

分离纯化报告

| 样品信息 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--------------------------------|-----------------------|----------------------|--------------|--------------|--------|------------|-----------|---------|--------|---|-------|-----|-------|-----|-------|------|---|-------|------|-------|-----|-------|------|---|-------|-----|-------|-----|-------|------|---|-------|-------|-------|------|-------|------|---|-------|-----|-------|-----|-------|------|---|--------|------|-------|-----|-------|-------|---|--------|------|-------|-----|-------|-------|---|--------|----------|--------|--------|-------|-------|---|--------|-------|-------|-----|--|--|----|--------|---------|-------|-------|--------|------|
| 样品名称 | VBA046-A2-240523-1- S4 物料代号 | 项目编号 | 20240606-536 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 样品性状 | 黄色粉末 | 样品重量 | 1g | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 收样日期 | 2024/06/14 | 测试期间 | 2024/06/14~2024/6/20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 目标物信息 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>自动标尺色谱图</p> <p>峰结果</p> <table><thead><tr><th>保留时间 (分钟)</th><th>面积 (微伏*秒)</th><th>% 面积</th><th>高度 (微伏)</th><th>USP 理论塔板数</th><th>USP 分离度</th><th>USP 拖尾</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>4.171</td><td>528</td><td>0.003</td><td>140</td><td>25463</td><td>1.07</td></tr><tr><td>2</td><td>4.565</td><td>3417</td><td>0.020</td><td>573</td><td>11825</td><td>2.92</td></tr><tr><td>3</td><td>4.764</td><td>579</td><td>0.003</td><td>119</td><td>19441</td><td>1.29</td></tr><tr><td>4</td><td>5.384</td><td>32524</td><td>0.194</td><td>4713</td><td>14380</td><td>3.84</td></tr><tr><td>5</td><td>7.071</td><td>966</td><td>0.006</td><td>144</td><td>22195</td><td>9.29</td></tr><tr><td>6</td><td>17.979</td><td>1698</td><td>0.010</td><td>170</td><td>76131</td><td>47.57</td></tr><tr><td>7</td><td>26.204</td><td>3239</td><td>0.019</td><td>213</td><td>33838</td><td>22.89</td></tr><tr><td>8</td><td>30.749</td><td>15233923</td><td>90.761</td><td>993313</td><td>94105</td><td>10.71</td></tr><tr><td>9</td><td>31.424</td><td>11388</td><td>0.068</td><td>967</td><td></td><td></td></tr><tr><td>10</td><td>34.509</td><td>1359648</td><td>8.101</td><td>91542</td><td>127224</td><td>1.07</td></tr></tbody></table> | | | | 保留时间 (分钟) | 面积 (微伏*秒) | % 面积 | 高度 (微伏) | USP 理论塔板数 | USP 分离度 | USP 拖尾 | 1 | 4.171 | 528 | 0.003 | 140 | 25463 | 1.07 | 2 | 4.565 | 3417 | 0.020 | 573 | 11825 | 2.92 | 3 | 4.764 | 579 | 0.003 | 119 | 19441 | 1.29 | 4 | 5.384 | 32524 | 0.194 | 4713 | 14380 | 3.84 | 5 | 7.071 | 966 | 0.006 | 144 | 22195 | 9.29 | 6 | 17.979 | 1698 | 0.010 | 170 | 76131 | 47.57 | 7 | 26.204 | 3239 | 0.019 | 213 | 33838 | 22.89 | 8 | 30.749 | 15233923 | 90.761 | 993313 | 94105 | 10.71 | 9 | 31.424 | 11388 | 0.068 | 967 | | | 10 | 34.509 | 1359648 | 8.101 | 91542 | 127224 | 1.07 |
| 保留时间 (分钟) | 面积 (微伏*秒) | % 面积 | 高度 (微伏) | USP 理论塔板数 | USP 分离度 | USP 拖尾 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 4.171 | 528 | 0.003 | 140 | 25463 | 1.07 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 4.565 | 3417 | 0.020 | 573 | 11825 | 2.92 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 4.764 | 579 | 0.003 | 119 | 19441 | 1.29 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 5.384 | 32524 | 0.194 | 4713 | 14380 | 3.84 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 7.071 | 966 | 0.006 | 144 | 22195 | 9.29 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 17.979 | 1698 | 0.010 | 170 | 76131 | 47.57 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 26.204 | 3239 | 0.019 | 213 | 33838 | 22.89 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 30.749 | 15233923 | 90.761 | 993313 | 94105 | 10.71 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 31.424 | 11388 | 0.068 | 967 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 34.509 | 1359648 | 8.101 | 91542 | 127224 | 1.07 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 目标物保留时间 | 主峰：30.7min 目标杂质：34.5min | 面积归一化含量 (220nm, %) | 8.1% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 实验要求 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 开发方法制备 34.5min 的目标杂质和 30.7min 的主峰 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 试剂信息 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 试剂名称 | 级别 | 供应商 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 磷酸二氢钾 | AR | 阿拉丁 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 三乙胺 | AR | 麦克林 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 甲醇 | HPLC | 月旭 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 三氟乙酸 | AR | 阿拉丁 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

声明：除非另有说明，此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可，不可复制。

Add:上海市松江区明南路 85 号启迪漕河泾（中山）科技园·紫荆园 10 号楼

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼

Tel:400-810-6969

第 1 页 共 6 页

邮编：201600

邮编：321000

邮编：211500

邮编：211500

| | | |
|------|--------------|--------|
| 乙腈 | HPLC | 月旭 |
| 纯水 | 二级 | 月旭 |
| 仪器信息 | | |
| 仪器名称 | 仪器型号 | 仪器厂家 |
| 分析液相 | Waters e2695 | Waters |
| 制备液相 | Welprep 2000 | 月旭 |

1. 试验过程

1.1. 方法重现

流动相配置：

流动相 A:称取 1.36g 磷酸二氢钾至 1L 烧杯中, 加入 1000ml 纯水进行超声溶解, 用三乙胺调节 pH 至 6.8, 过滤, 即得。

流动相 B:纯甲醇, 过滤, 即得。

样品配置: 称取 2mg 粗品加入 1ml 乙腈进行超声溶解, 再加入 1ml 纯水进行稀释。

| | | | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----------|
| 色谱柱 | Xtimate C18 (4.6×250mm,5μm) | | |
| 流动相 A | 磷酸盐缓冲溶液 | | |
| 流动相 B | 纯甲醇 | | |
| 流速 | 1ml/min | | |
| 进样量 | 10μl | | |
| 柱温 | 30°C | | |
| 检测波长 | 220nm | | |
| 梯度洗脱程序 | 时间 (min) | 流动相 A (%) | 流动相 B (%) |
| | 0 | 45 | 55 |
| | 10 | 45 | 55 |
| | 45 | 20 | 80 |
| | 55 | 20 | 80 |
| | 55.01 | 45 | 55 |
| | 65 | 45 | 55 |

分析图谱如图 2 所示:



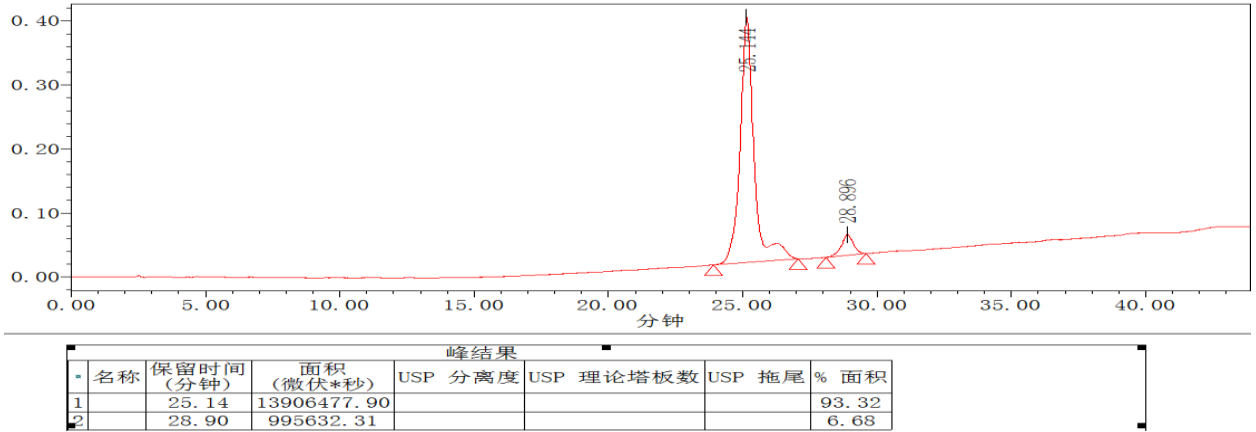


图2 方法重现图谱

结论：通过与图1进行比较，可以确 28.896min 为目标物。

1.2. 分离纯化过程

1.2.1. 方法开发

取 4.1 项下的进样小瓶按以下方法进行分析：

流动相配置：

流动相 A:量取 1000ml 纯水加入 1ml 三氟乙酸, 配置成为 0.1%的三氟乙酸水溶液, 过滤即得.

流动相 B:纯乙腈, 过滤即得.

| | | | |
|------|---------------------------------|----|----|
| 仪器信息 | Waters e2695 | | |
| 色谱柱 | Ultimate Phenyl (4.6×250mm,5μm) | | |
| 柱压 | 13.5MPa | | |
| 流动相 | 流动相 A:0.1%TFA 流动相 B:纯乙腈 | | |
| 柱温 | 30℃ | | |
| 检测波长 | 220nm | | |
| 流速 | 1ml/miin | | |
| 进样量 | 10ul | | |
| 洗脱程序 | 时间 | A | B |
| | 0 | 80 | 20 |
| | 30 | 20 | 80 |
| | 40 | 20 | 80 |
| | 41 | 80 | 20 |

声明：除非另有说明，此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可，不可复制。

Add:上海市松江区明南路 85 号启迪漕河泾（中山）科技园.紫荆园 10 号楼

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼

Tel:400-810-6969

第 3 页 共 6 页

邮编：201600

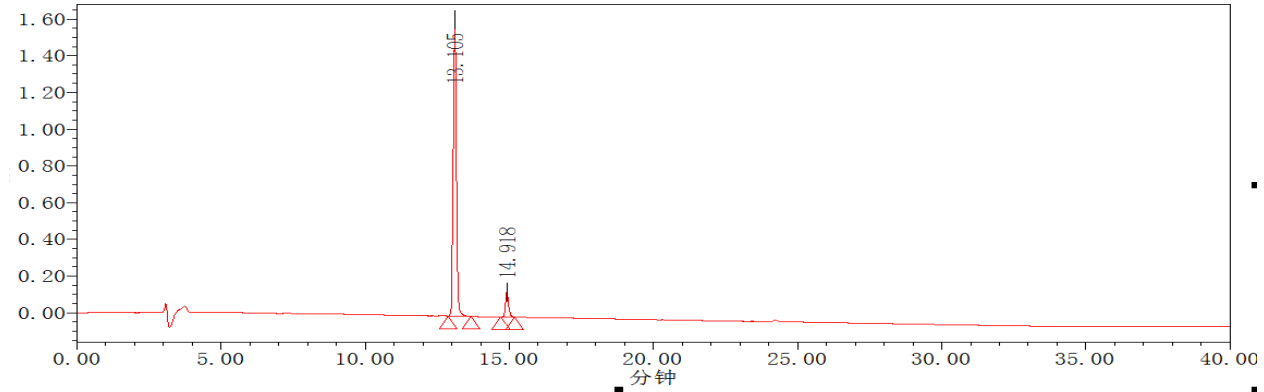
邮编：321000

邮编：211500



| | | | |
|--|----|----|----|
| | 51 | 80 | 20 |
|--|----|----|----|

分析图谱如下图 3 所示：



| 峰结果 | | | | | | |
|-----|-----------|-------------|---------|-----------|--------|-------|
| 名称 | 保留时间 (分钟) | 面积 (微伏*秒) | USP 分离度 | USP 理论塔板数 | USP 拖尾 | % 面积 |
| 1 | 13.10 | 11837745.47 | | | | 92.02 |
| 2 | 14.92 | 1027217.45 | | | | 7.98 |

1.2.2. 样品制备

称取 10mg 样品，加入 50%乙腈水溶解稀释，过滤，使其浓度为 2mg/ml，制备液相条件如下所示：

| | | | |
|--------|---------------------------------|-----------|-----------|
| 仪器 | Sail1000 | | |
| 色谱柱 | Ultimate Phenyl (10×250mm, 5μm) | | |
| 流动相 A | 0.1%TFA | | |
| 流动相 B | 制备级乙腈 | | |
| 流速 | 5ml/min | | |
| 进样量 | 10mg | | |
| 柱温 | 室温 | | |
| 检测波长 | 210nm | | |
| 梯度洗脱程序 | 时间 (min) | 流动相 A (%) | 流动相 B (%) |
| | 0 | 70 | 30 |
| | 30 | 50 | 50 |
| | 40 | 20 | 80 |
| | 41 | 70 | 30 |

声明：除非另有说明，此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可，不可复制。

Add:上海市松江区明南路 85 号启迪漕河泾（中山）科技园.紫荆园 10 号楼

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼

Tel:400-810-6969



| | | | |
|--|----|----|----|
| | 51 | 70 | 30 |
|--|----|----|----|

制备图谱如图 4 所示：

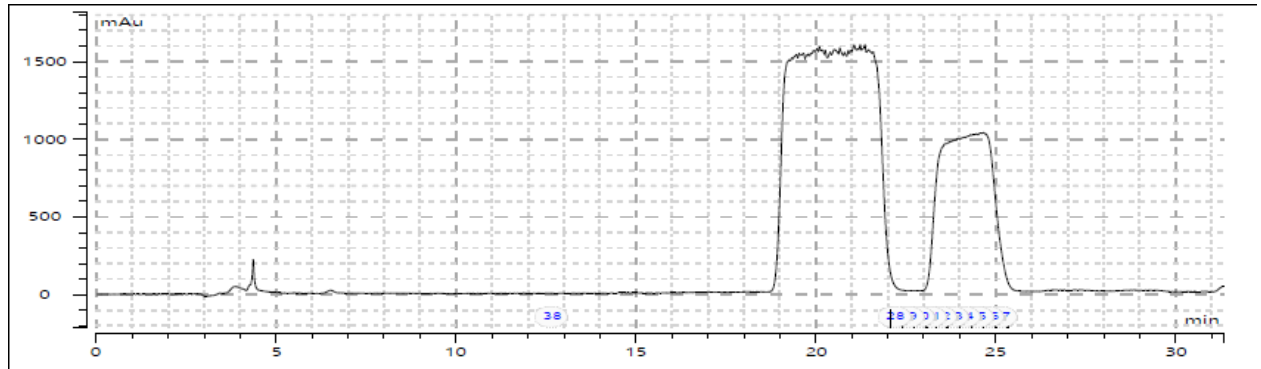
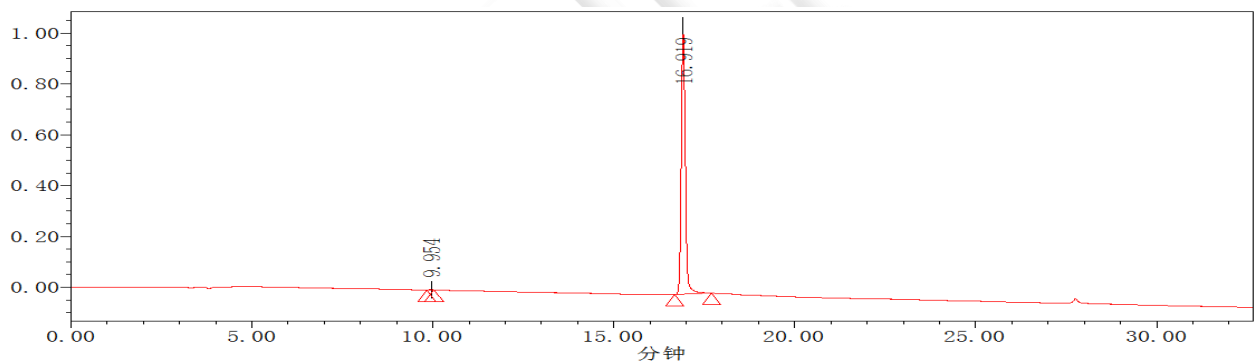


图 4 粗品制备图

经过制备，收集到目标馏分，用干冰加乙醇预冻，然后挂冻干机冻干。

1.2.3. 杂质分析

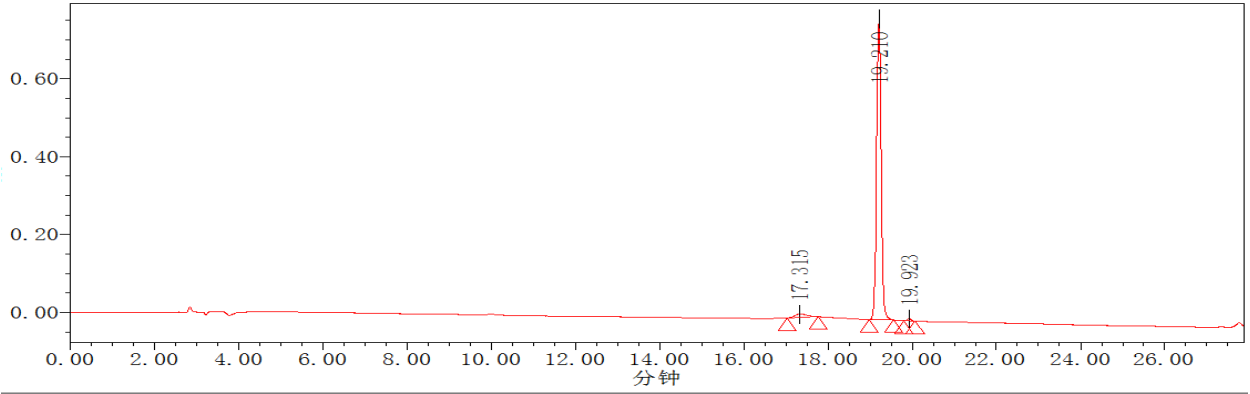
将 1.2.2 中冻干的杂质进行液相色谱分析，具体分析条件同“步骤 1.1”一致。分析图谱如图 5 图 6 所示：



| 峰结果 | | | | | | |
|-----|-----------|------------|---------|-----------|--------|-------|
| 名称 | 保留时间 (分钟) | 面积 (微伏*秒) | USP 分离度 | USP 理论塔板数 | USP 拖尾 | % 面积 |
| 1 | 9.95 | 11612.79 | | | | 0.15 |
| 2 | 16.92 | 7819377.52 | | | | 99.85 |

图 5 主峰冻干后分析图谱





| 峰结果 | | | | | | |
|-----|--------------|--------------|---------|-----------|--------|-------|
| 名称 | 保留时间 (分钟) | 面积 (微伏*秒) | USP 分离度 | USP 理论塔板数 | USP 拖尾 | % 面积 |
| 1 | 17.32 | 164094.86 | | | | 2.78 |
| 2 | 19.21 | 5704909.20 | | | | 96.53 |
| 3 | 19.92 | 41052.45 | | | | 0.69 |

图 5 目标杂质冻干后分析图谱

2. 结论

使用月旭 Ultimate® Phenyl (10×250mm,5μm) 在此色谱条件下进行制备，单针上样量为 10mg 时，制备收集到的主峰冻干后纯度为 99.85% (220nm)，目标杂质冻干后纯度为 96.53% (220nm)，制备结果满足客户要求。

报告人:Mia

审核人: Jim

日期: 2024/6/21

声明：除非另有说明，此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可，不可复制。

Add:上海市松江区明南路 85 号启迪漕河泾（中山）科技园·紫荆园 10 号楼

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼

Tel:400-810-6969

