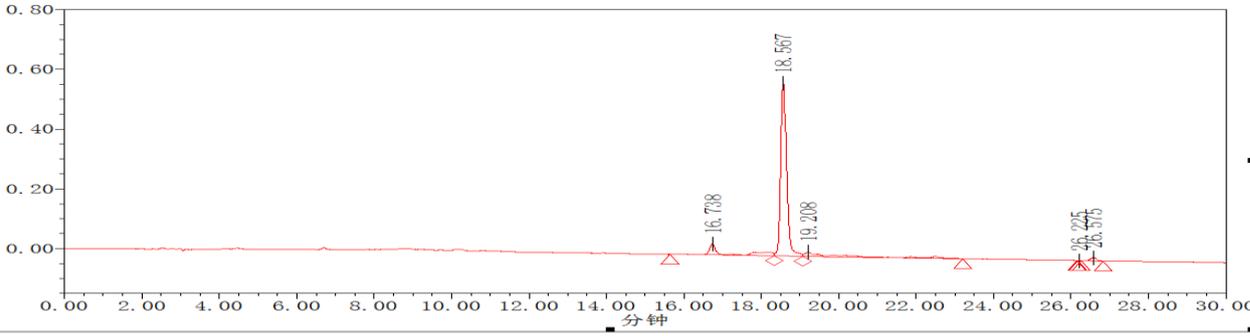


## 分离纯化报告

样品信息								
样品名称	替尔泊肽纯化项目	项目编号	XMGLLC-20240222-001					
样品性状	白色粉末	样品重量	粗品 1: 1g 粗品 2: 5g					
收样日期	2024/01/04	测试期间	2024/02/18~2024/03/08					
目标物信息								
								
峰结果								
* 名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	USP 理论塔板数	USP 分离度	USP 拖尾	对称因子	% 面积	% 面积
1	16.738	944824					11.70	11.70
2	18.567	6212295					76.95	76.95
3	19.208	795120					9.85	9.85
4	26.225	235					0.00	0.00
5	26.575	120966					1.50	1.50
目标物保留时间	目标物: 18.567min	面积归一化含量 (220nm, %)	76.95%					
实验要求								
开发替尔泊肽制备纯化工艺, 测试最大单针上样量、纯度及回收率								
试剂信息								
试剂名称	级别	供应商						
氨水	AR	阿拉丁						
三氟乙酸	AR	阿拉丁						
纯水	二级	月旭						
乙腈	HPLC	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	Sail 1000	月旭						

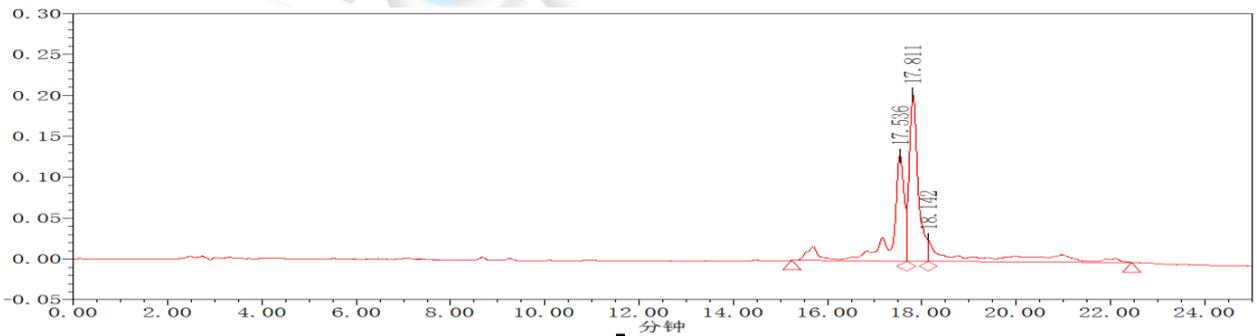
## 1. 粗品 1 试验过程

### 1.1. 中控方法建立

取 5mg 样品，置于 10mL 离心管中，加入 2ml 乙腈进行超声溶解再加入 3ml 水进行稀释，过滤至进样小瓶中，按照以下色谱分析方法进行分析：

色谱柱	Ultimate XB-C8(4.6×250mm, 5μm)		
流动相 A	0.1%TFA 水		
流动相 B	色谱级乙腈		
流速	1ml/min		
进样量	10μl		
柱温	40°C		
检测波长	220nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	65	35
	30	35	65
	31	10	90
	41	10	90
	42	65	35
	50	65	35

分析图谱如图 2 所示：



名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	USP 理论塔板数	USP 分离度	USP 拖尾	对称因子	% 面积	% 面积
1	17.536	2461936					38.07	38.07
2	17.811	2696553					41.70	41.70
3	18.142	1307866					20.23	20.23

图 2 中控方法图谱

结论：确定中控方法，可以确定 17.811min 为目标物。

### 1.2. 一分分离纯化过程

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 号楼邮编：201600

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号邮编：321000

Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼邮编：211500

Tel:400-810-6969

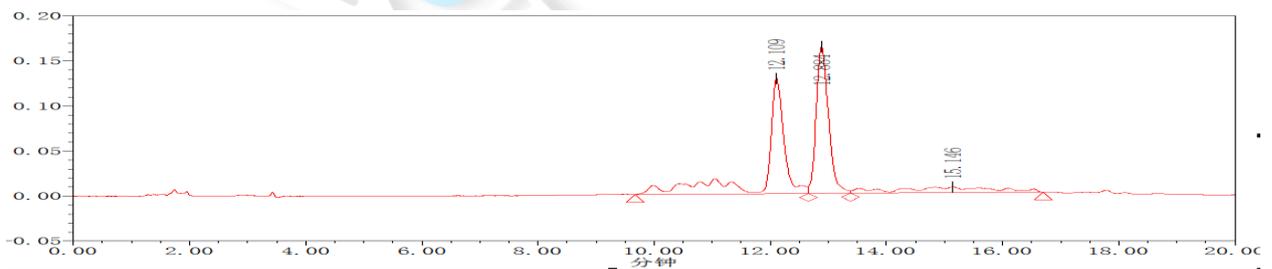


1.2.1. 方法开发

取 1.1 项下的进样小瓶按以下方法进行分析：

仪器信息	Waters e2695		
色谱柱	Xtimate C8(4.6×250mm,5μm)		
柱压	11.2MPa		
流动相	流动相 A:0.1%氨水 流动相 B:纯乙腈		
柱温	40°C		
检测波长	220nm		
流速	1ml/min		
进样量	10ul		
洗脱程序	时间	A	B
	0	85	15
	30	55	45
	40	10	90
	50	10	90
	51	85	15
	61	85	15

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 理论塔板数	USP 分离度	USP 拖尾	对称因子	% 面积	% 面积
1	12.109	2924189					47.81	47.81
2	12.884	2431463					39.76	39.76
3	15.146	760156					12.43	12.43

图 3XT-C8 图谱

1.2.2. 样品制备

称取 100mg 样品，加入 3ml 乙腈进行超声溶解，再加入 7ml 纯水进行稀释，过滤，使其浓度为 10mg/ml，制备液相条件如下所示：

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 号楼邮编：201600  
 Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号邮编：321000  
 Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼邮编：211500  
 Tel:400-810-6969



仪器	Sail1000		
色谱柱	Xtimate C8(21.2×250mm,10μm)		
流动相 A	0.1%氨水		
流动相 B	制备级乙腈		
流速	15ml/min		
进样量	100mg		
柱温	室温		
检测波长	220nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	83	17
	30	73	27
	40	10	90
	50	10	90
	51	83	17
	61	83	17

制备图谱如图 4 所示：

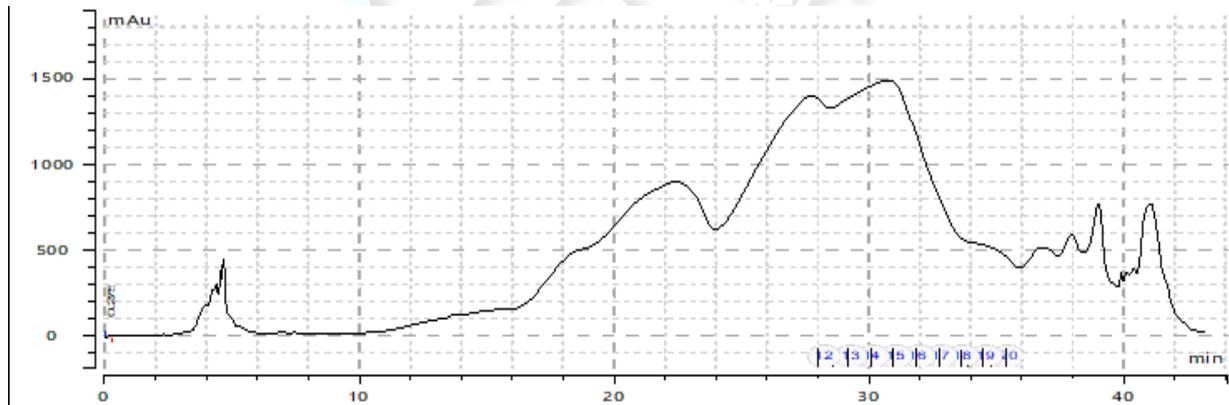


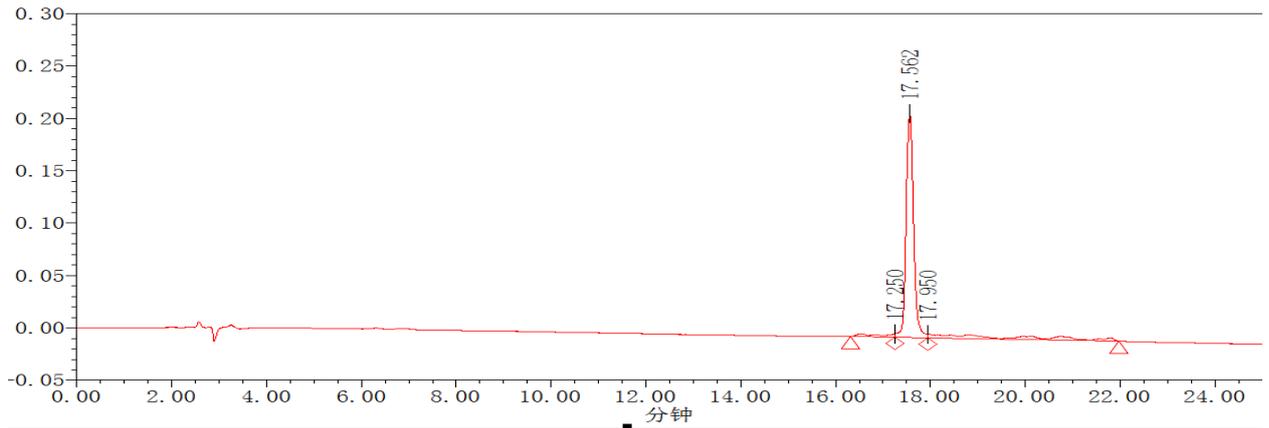
图 4 粗品制备图

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 所示：





峰结果								
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	USP 理论塔板数	USP 分离度	USP 拖尾	对称因子	% 面积	% 面积
1	17.250	105673					3.65	3.65
2	17.562	2303683					79.63	79.63
3	17.950	483661					16.72	16.72

图5 制备液分析图谱

结论：按此方法进行一分制备,总制备量 400mg,收集目标馏分进行冻干处理,冻干后称重 75mg,由此得出使用制备柱 Xtimate C8(21.2×250mm,10μm)单针上样量/填料量千分之二(100mg)时,回收率 50%,一分纯度 79.63%。

### 1.3. 二分分离纯化过程

#### 1.3.1. 方法开发

取 1.2.3 项下的进样小瓶按以下方法进行分析：

色谱柱	Xtimate C8(4.6×250mm, 5μm)		
流动相 A	0.1%TFA 水		
流动相 B	色谱级乙腈		
流速	1ml/min		
进样量	10μl		
柱温	40°C		
检测波长	220nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	65	35
	30	35	65
	31	10	90
	41	10	90
	42	65	35



	50	65	35
--	----	----	----

分析图谱如下图 6 所示：

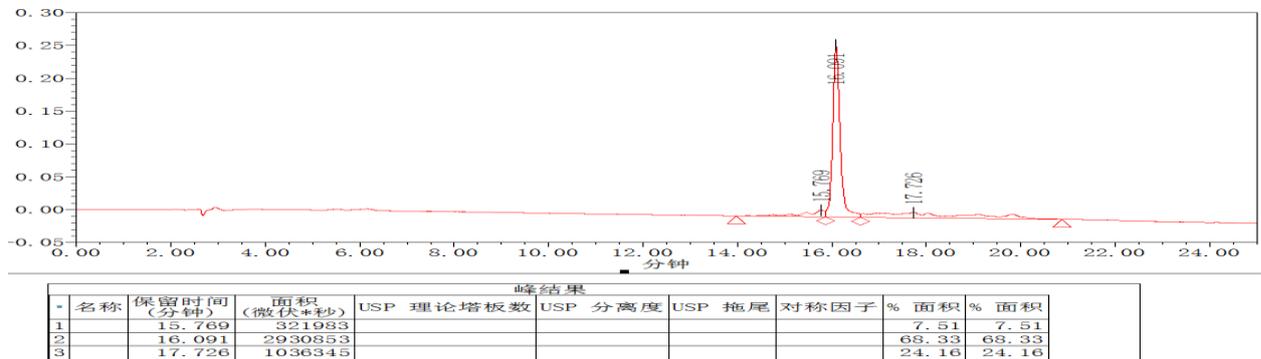


图 6XT-C8 分析图谱

### 1.3.2. 二分制备

将 1.2.2 中冻干的样品称取 50mg 用 30%的乙腈水溶液进行超声溶解，过滤后，即得。

按以下方法进行制备

仪器信息	Sial 1000		
色谱柱	Xtimate C8(21.2×250mm,10μm)		
柱压	5.2MPa		
流动相	流动相 A:0.1%三氟乙酸 流动相 B:纯乙腈		
柱温	室温		
检测波长	220nm		
流速	15ml/min		
进样量	50mg		
洗脱程序	时间	A	B
	0	80	35
	30	60	50
	40	10	90
	50	10	90
	51	80	20
	61	80	20

制备图谱如下图 7 所示



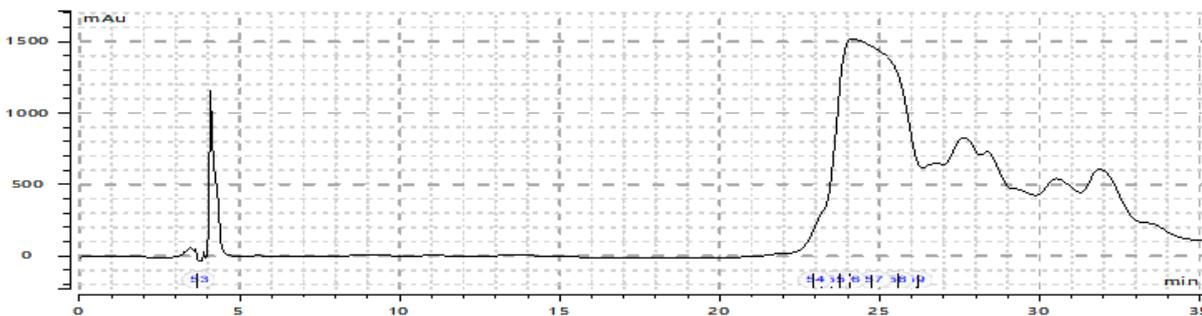
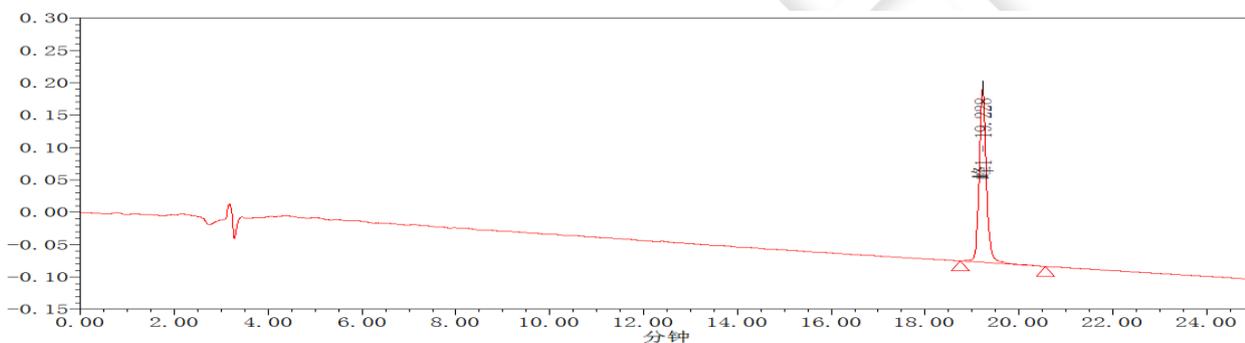


图 7XT-C8 二分制备图谱

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，冻干称重 24mg。

### 1.3.3. 杂质分析

将 1.3.2 中冻干的馏分按方法 1.1 进行分析，分析图谱如下图 8 所示



峰结果								
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	USP 理论塔板数	USP 分离度	USP 拖尾	对称因子	% 面积	% 面积
1 峰1	19.228	2911658	79932.442		1.276	1.28	100.00	100.00

图 8 二分制备分析图谱

## 2. 粗品 1 纯化结论

粗品 1 使用月旭 XtimateC8, 21.2×250mm,10μm 一分制备在 1.2.2 色谱条件下进行制备，单针上样量为 100mg 时，制备收集到的目标物纯度为 79.63%（220nm），回收率 46%；二分制备在 1.3.2 色谱条件下进行制备，单针上样量 50mg 使，制备收集到的目标馏分纯度为 100%（220nm），回收率 60%。

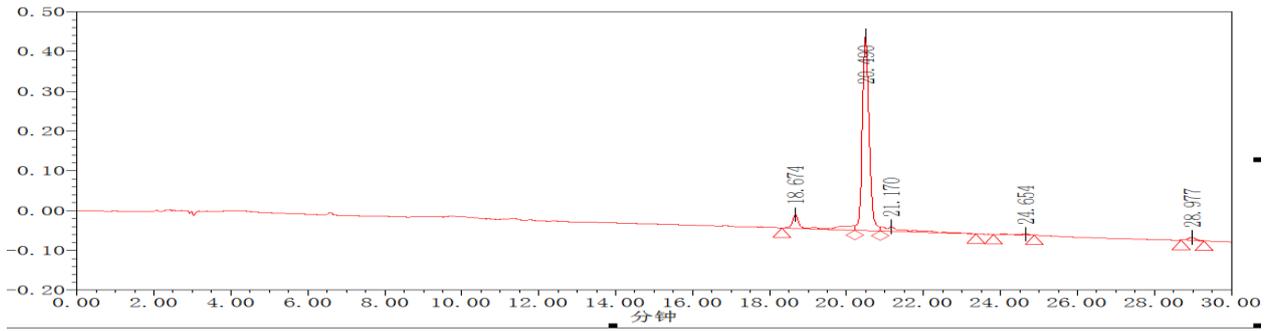
## 3. 粗品 2 试验过程

### 3.1. 中控方法进行分析

取 5mg 样品，置于 10mL 离心管中，加入 2ml 乙腈进行超声溶解再加入 3ml 水进行稀释，过滤至进样小瓶中，按照以下色谱分析方法进行分析：

按方法 1.1 进行分析粗品 2，分析图谱如下图 9 所示





峰结果									
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	USP 理论塔板数	USP 分离度	USP 拖尾	对称因子	% 面积	% 面积	
1	18.674	746403					10.07	10.07	
2	20.490	5986538					80.75	80.75	
3	21.170	505359					6.82	6.82	
4	24.654	71480					0.96	0.96	
5	28.977	103554					1.40	1.40	

图 9 粗品 2 中控方法图谱

结论：确定中控方法，可以确定 20.490min 为目标物。

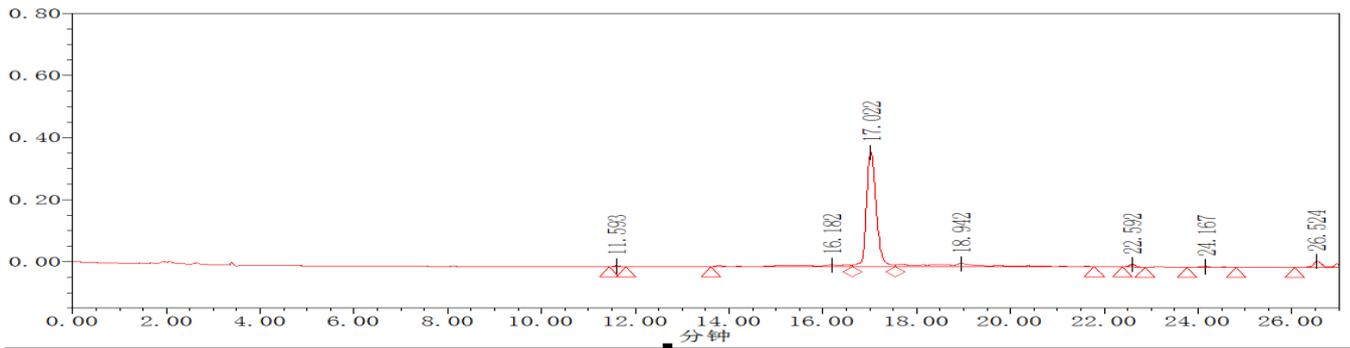
### 3.1.1. 方法开发

取方法 3.1 中的进行小瓶，按以下方法进行分析

仪器信息	Waters e2695		
色谱柱	Xtimate C8(4.6×250mm,5μm)		
柱压	11.2MPa		
流动相	流动相 A:0.1%氨水 流动相 B:纯乙腈		
柱温	40°C		
检测波长	220nm		
流速	1ml/min		
进样量	10ul		
洗脱程序	时间	A	B
	0	85	15
	30	55	45
	40	10	90
	50	10	90
	51	85	15
	61	85	15

分析图谱如下图 10 所示





峰结果								
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	USP 理论塔板数	USP 分离度	USP 拖尾	对称因子	% 面积	% 面积
1	11.593	30899					0.42	0.42
2	16.182	524236					7.12	7.12
3	17.022	5393546					73.20	73.20
4	18.942	979058					13.29	13.29
5	22.592	77839					1.06	1.06
6	24.167	54223					0.74	0.74
7	26.524	308181					4.18	4.18

图 10 粗品 2 XT-C8 分析图谱

### 3.1.2. 样品制备

样品溶解:称取 250mg 粗品 2,用 30%的乙腈水溶液进行超声溶解,过滤,即得.

把溶解后的样品按以下方法进行制备

仪器	Sail1000		
色谱柱	Xtimate C8(21.2×250mm,10µm)		
流动相 A	0.1%氨水		
流动相 B	制备级乙腈		
流速	15ml/min		
进样量	250mg		
柱温	室温		
检测波长	220nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	83	17
	30	73	27
	40	10	90
	50	10	90
	51	83	17
	61	83	17

制备图谱如下图 11 所示

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 号楼邮编: 201600

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号邮编: 321000

Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼邮编: 211500

Tel:400-810-6969



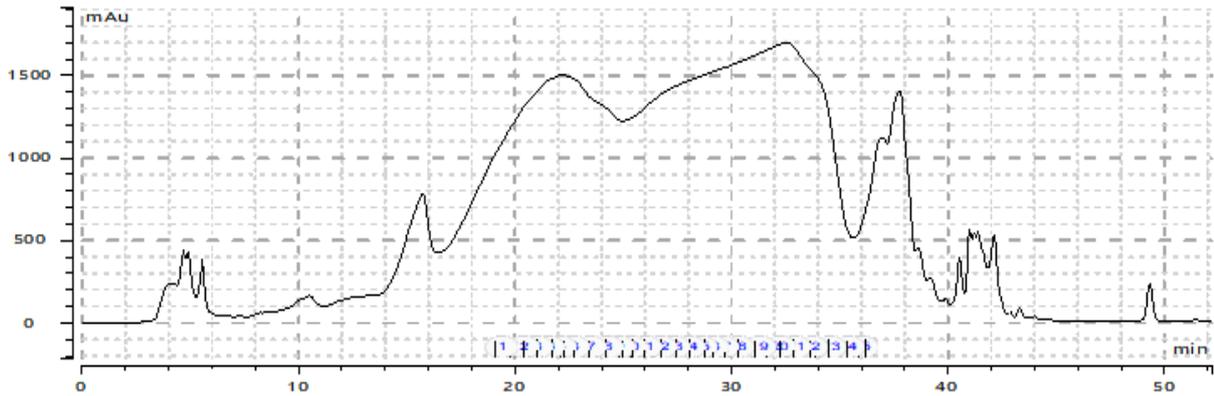


图 11 粗品 2 XT-C8 制备图谱

经过制备，按此方法进行制备总制备量 700mg,收集目标馏分进行冻干处理,称重 405mg,一分回收率 75% (220nm)

### 3.1.3. 杂质分析

将 3.1.2 中冻干的馏分按方法 1.1 进行分析，分析图谱如下图 12 所示

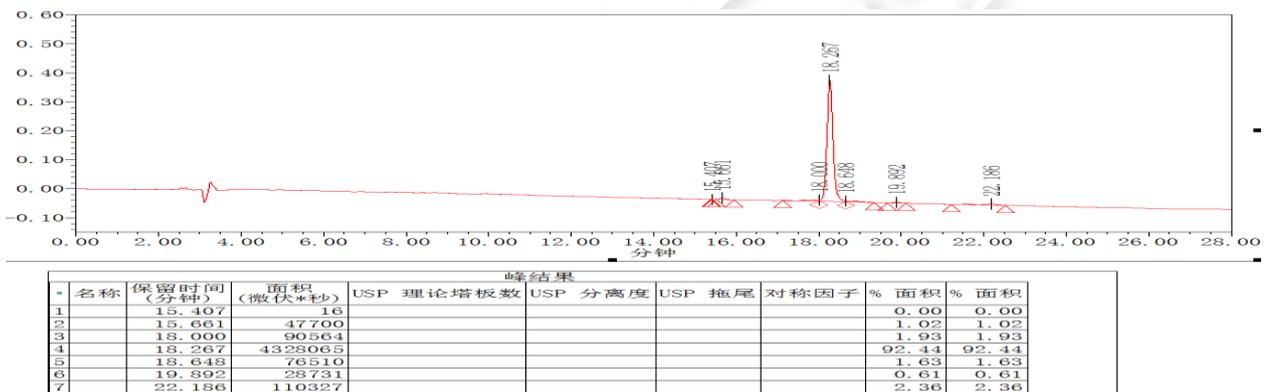


图 12 一分馏分分析图谱

## 3.2. 二分分离纯化过程

### 3.2.1. 二分方法开发

将方法 3.1.3 的馏分按以下方法进行分析

色谱柱	Xtimate C8(4.6×250mm, 5μm)
流动相 A	0.1%TFA 水
流动相 B	色谱级乙腈
流速	1ml/min
进样量	10μl
柱温	40°C

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 号楼邮编：201600

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号邮编：321000

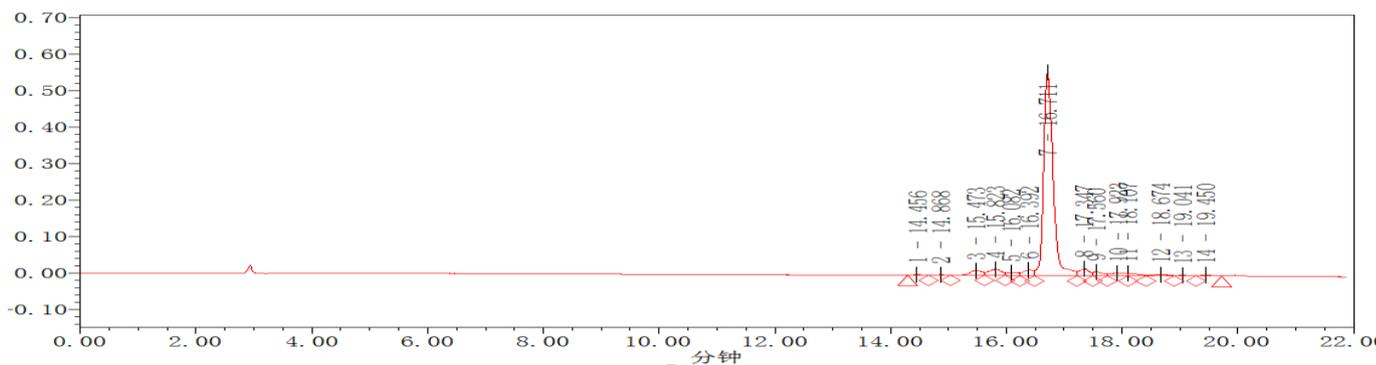
Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼邮编：211500

Tel:400-810-6969



检测波长	220nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	65	35
	30	35	65
	31	10	90
	41	10	90
	42	65	35
	50	65	35

分析图谱如下图 13 所示



峰结果									
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	USP 理论塔板数	USP 分离度	USP 拖尾	对称因子	% 面积	% 面积	
1	14.456	15800	45606.749		1.197	1.20	0.20	0.20	
2	14.868	16757	38335.277	1.32			0.21	0.21	
3	15.473	205718					2.62	2.62	
4	15.823	261311	13433.621				3.32	3.32	
5	16.082	118034					1.50	1.50	
6	16.392	187719					2.39	2.39	
7	16.711	6321398	55116.358		1.278	1.28	80.39	80.39	
8	17.347	232690					2.96	2.96	
9	17.560	123535					1.57	1.57	

图 13 XT-C8 分析图谱

### 3.2.2. 二分样品制备

取 3.1.2 中冻干的样品 200mg,用 30%乙腈水进行溶解,过滤,即得.

按以下方法进行制备

仪器信息	Sial 1000
色谱柱	Xtimate C8(21.2×250mm,10μm)
柱压	5.2MPa
流动相	流动相 A:0.1%三氟乙酸 流动相 B:纯乙腈
柱温	室温
检测波长	220nm
流速	15ml/min

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 号楼邮编：201600

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号邮编：321000

Add:江苏省南京市六合区天圣路 22 号 F 栋 4 楼邮编：211500

Tel:400-810-6969



进样量	200mg		
洗脱程序	时间	A	B
	0	80	35
	30	60	50
	40	10	90
	50	10	90
	51	80	20
	61	80	20

制备图如下图 14 所示

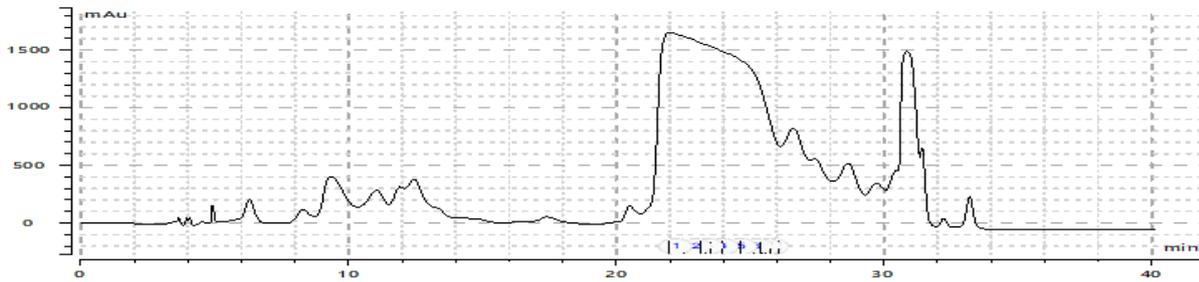


图 14 XT-C8 二分制备图谱

经过制备，按此方法进行制备量 200mg,收集目标馏分进行冻干处理,称重 92mg,一分回收率 50% (220nm)

### 3.2.3. 杂质分析

把 3.2.2 中冻干的样品取适量，进行溶解，按方法 1.1 进行分析，分析图谱如图 15 所示

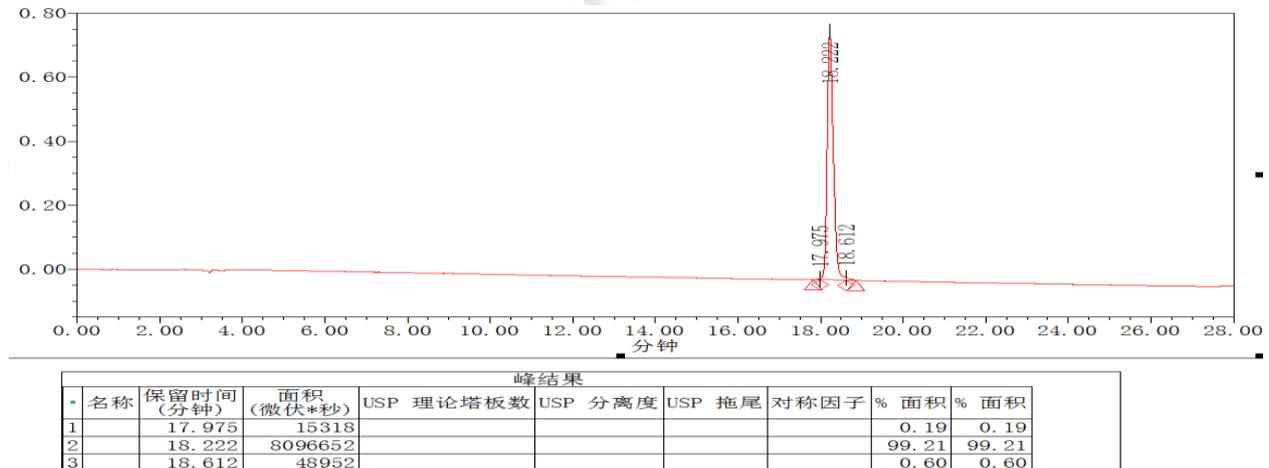


图 15 二分馏分分析图谱



#### 4. 粗品 2 纯化结论

粗品 2 使用月旭 XtimateC8 (21.2×250mm,10μm) 一分制备在 3.1.2 色谱条件下进行制备，单针上样量为 250mg 时，制备收集到的目标物纯度为 92.44% (220nm)，回收率 75%；二分制备在 3.2.2 色谱条件下进行制备，单针上样量 200mg 使，制备收集到的目标馏分纯度 99.21% (220nm)，回收率 50%。。

报告人:Mia

审核人:Jim

日期:2024/03/13

