

分离纯化报告

样品信息			
样品名称	D989	项目编号	20240320-230
样品性状	白色粉末	样品重量	70mg
收样日期	2024/03/21	测试期间	2024/03/21~2024/03/28
目标物信息			
			
目标物保留时间	目标物 1.414:	面积归一化含量 (220nm, %)	/
实验要求			
开发制备方法，制备目标物纯度大于 95%			
试剂信息			
试剂名称	级别	供应商	
乙腈	HPLC	月旭	
纯水	二级	月旭	
碳酸氢铵	AR	麦克林	
三氟乙酸	AR	阿拉丁	
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

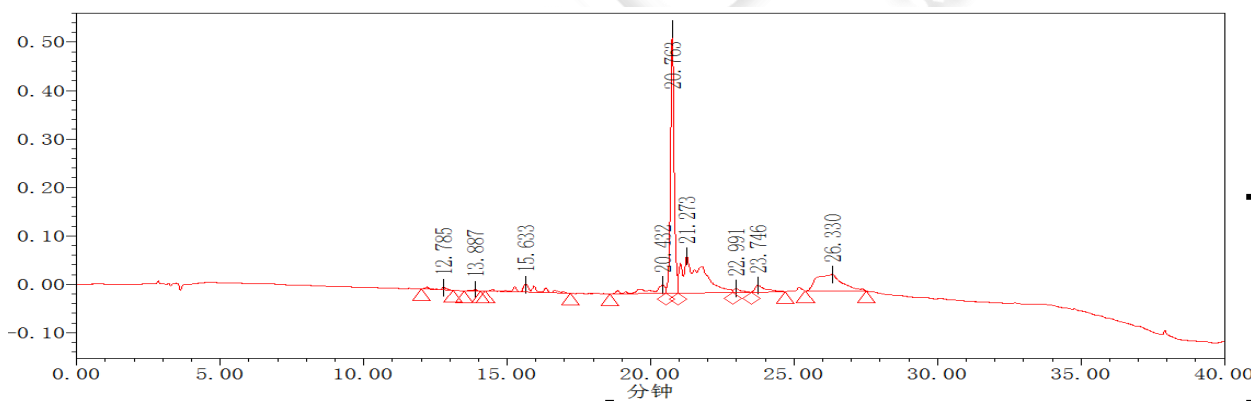
1.1. 方法重现

取 2mg 样品，置于 2mL 离心管中，加入 2ml30%的乙腈水溶液，溶解，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 LP-C18 (4.6×150mm, 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	30°C		
检测波长	220/254nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	80	20
	30	45	55
	40	20	80
	41	80	20
	51	80	20

分析图谱如图 2 所示：



峰结果						
名称	保留时间 (分钟)	% 面积	USP 理论塔板数	USP 分离度	对称因子	面积 (微伏*秒)
1	12.78	0.80				100614
2	13.89	0.42				52706
3	15.63	4.89				611379
4	20.43	4.70				587189
5	20.76	37.91				4740323
6	21.27	29.92				3741666

图 2 LP-C18 分析图谱

结论：根据分析图谱可以确定 20.7min 为目标物。

1.2. 一分分离纯化过程

1.2.1. 方法开发

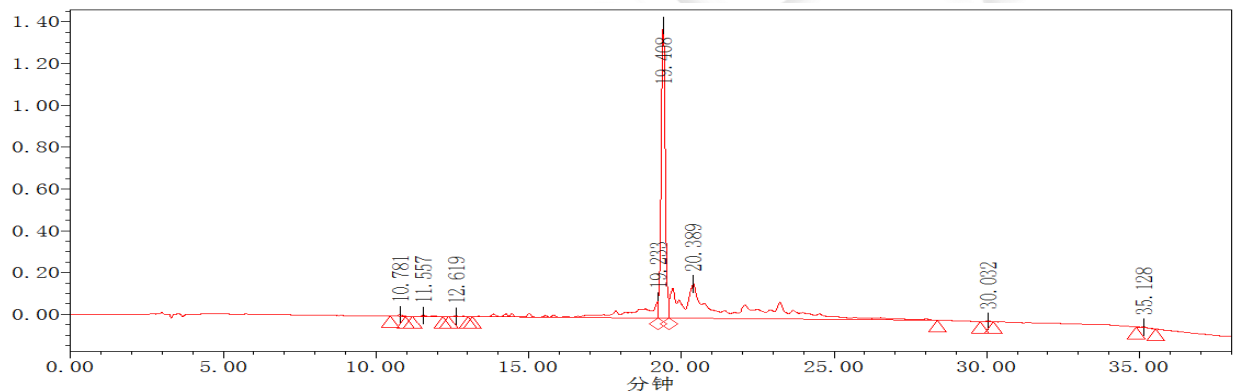
取 1.1 项下的进样小瓶按以下方法进行分析：

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



色谱柱	Ultimate Phenyl (4.6×150mm, 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	30°C		
检测波长	220/254nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	80	20
	30	45	55
	40	20	80
	41	80	20
	51	80	20

分析图谱如下图 3 所示：



名称	保留时间 (分钟)	% 面积	USP 理论塔板数	USP 分离度	对称因子	面积 (微伏*秒)
1	10.78	0.24				79739
2	11.56	0.26				85570
3	12.62	0.15				50824
4	19.23	13.64				4570739
5	19.41	36.93				12375429
6	20.39	48.51				16256458

图 2 Phenyl 分析图谱

1.2.2. 一分样品制备

称取 6mg 样品，加入 2ml30%乙腈水溶液进行溶解过滤，使其浓度为 3mg/ml，制备液相条件如下所示：



仪器信息	Welprep 2000		
色谱柱	Ultimate Phenyl (10×250mm,5μm)		
柱压	3.8MPa		
流动相	流动相 A:0.1%TFA 流动相 B:纯乙腈		
检测波长	220/254nm		
流速	5ml/min		
进样量	6mg		
洗脱程序	时间	A	B
	0	70	30
	30	55	45
	40	35	65
	41	70	30
	51	70	30

制备图谱如图 3 所示：

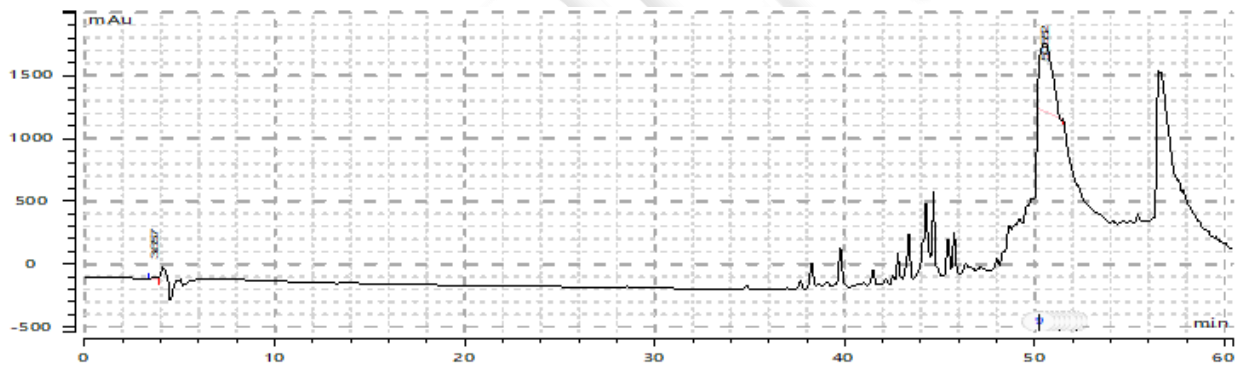


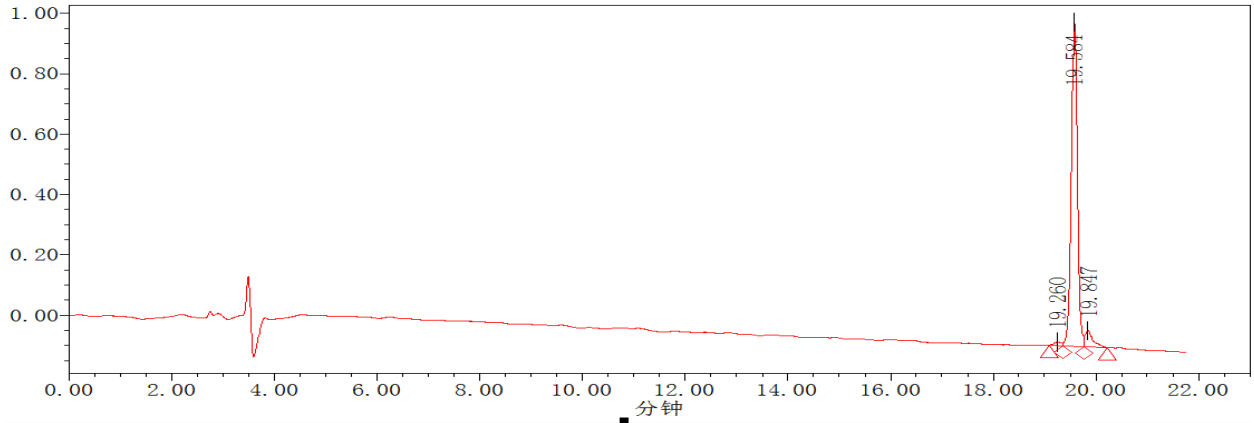
图 3 粗品制备图

连续制备 4 针，收集目标馏分。

1.2.3. 杂质分析

将 1.2.1 中收集的目标馏分进行液相色谱分析，具体分析条件同“步骤 1.1”一致。分析图谱如图 4 所示：





峰结果							
名称	保留时间 (分钟)	% 面积	USP 理论塔板数	USP 分离度	对称因子	面积 (微伏*秒)	
1	19.26	1.18				111841	
2	19.58	92.63				8762338	
3	19.85	6.19				585085	

图4 制备液分析图谱

结论：由图可见一分制备液面积归一化含量为 92.63%（220nm）。

1.3. 二分分离纯化过程

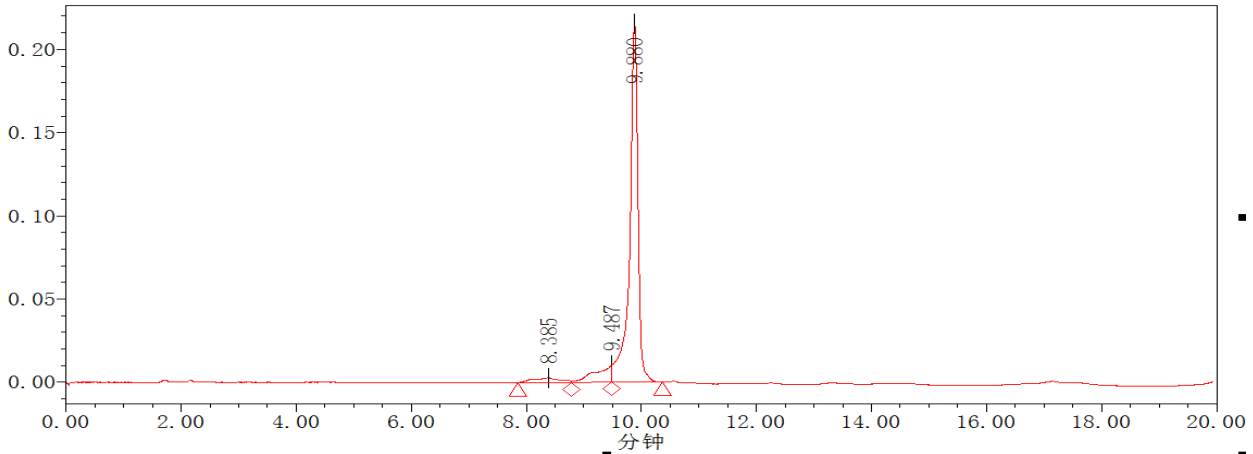
1.3.1. 方法开发

取 1.2.1 中收集的馏分按一下方法进行分析

色谱柱	Ultimate XB-C18 (4.6×150mm, 5μm)		
流动相 A	20mmol/L 碳酸氢铵溶液		
流动相 B	色谱级乙腈		
流速	1ml/min		
进样量	10μl		
柱温	30°C		
检测波长	220/254nm		
梯度洗脱程序	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0	80	20
	30	45	55
	40	20	80
	41	80	20
	51	80	20

分析图谱如图谱 5 所示





峰结果							
名称	保留时间 (分钟)	% 面积	USP 理论塔板数	USP 分离度	对称因子	面积 (微伏*秒)	
1	8.39	3.67				89286	
2	9.49	8.26				201111	
3	9.88	88.07				2144770	

图 5 二分方法开发分析图谱

1.3.2. 二分分样品制备

把 1.2.1 中收集的馏分按一下方法进行制备

仪器信息	Welprep 2000		
色谱柱	Ultimate XB-C18 (10×250mm,5μm)		
柱压	3.8MPa		
流动相	流动相 A:20mmol/L 碳酸氢铵 流动相 B:纯乙腈		
检测波长	220/254nm		
流速	5ml/min		
洗脱程序	时间	A	B
	0	75	25
	30	65	35
	40	35	65
	41	75	25
	51	75	25

制备图谱如图 6 所示



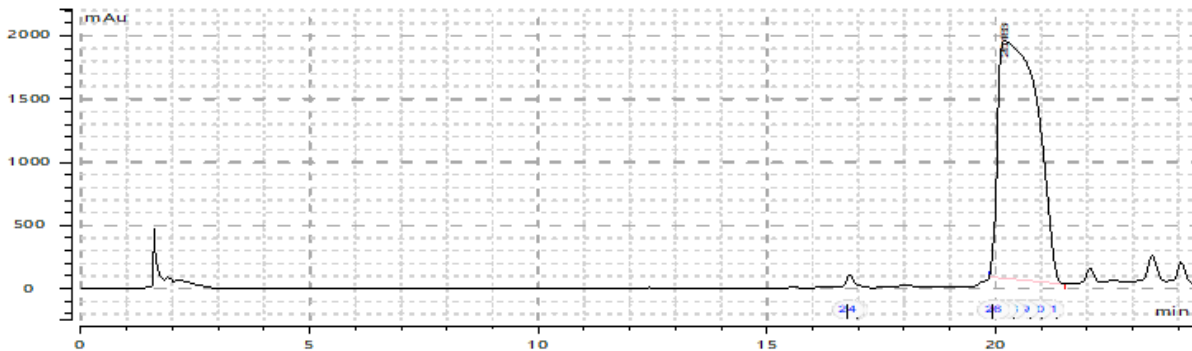
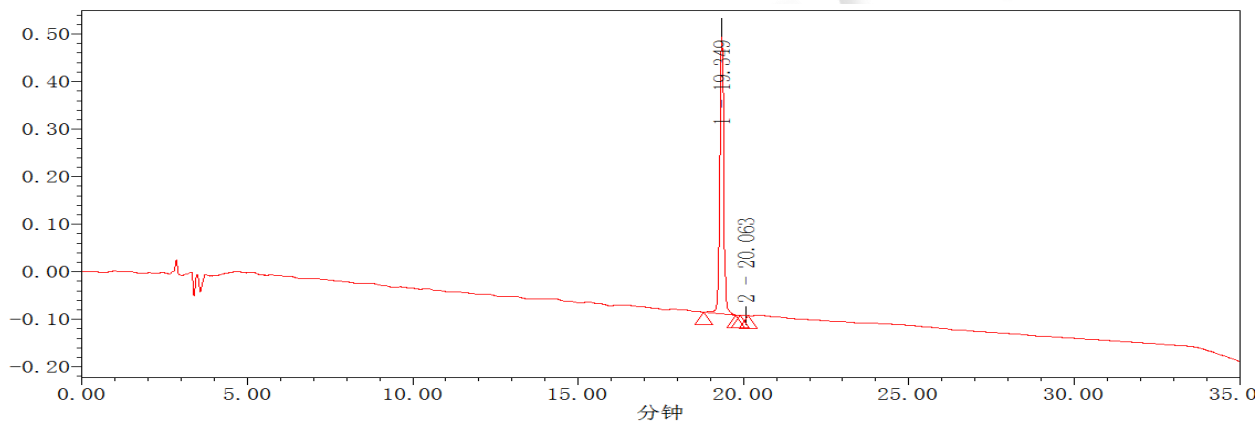


图 6 二分制备图谱

经过制备，收集目标馏分。

1.3.3. 杂质分析

将方法 1.3.2 中收集的馏分按方法 1.1 进行分析分析图谱如图 7 所示



峰结果						
名称	保留时间 (分钟)	% 面积	USP 理论塔板数	USP 分离度	对称因子	面积 (微伏*秒)
1	19.35	99.89	154278.11		1.00	4720754
2	20.06	0.11	127349.21	3.78	0.85	5055

图 7 二分馏分分析图谱

2. 结论

一分使用月旭 Ultimate® Phenyl (10×250mm,5μm) 在此色谱条件下进行制备，单针上样量为 6mg 时，制备收集到的目标物纯度为 92.63% (220nm)，二分使用月旭 Ultimate®XB-C18 (10×250mm,5μm) 在此色谱条件下进行二分制备，制备收集到的目标物纯度为 99.89% (220nm)，制备结果满足客户要求。

报告人:Mia

审核人:Jim

日期:2024/4/1

