



## Test report

## 测试报告

Sample Information			
样品信息			
Sample Name 样品名称	Semaglutide 司美格鲁肽	Sample properties 样品性状	Solid 固体
Date of receipt 收样日期	2025/09/29	During testing 测试期间	2025/10/20 ~ 2025/10/22
Test the ingredients and structural formula			
测试成分及结构式			
API/主成分: BOC -His(Trt)- Aib- Glu(OtBu)-GlyOH Isomer/异构体: BOC-D-His(Trt) -Aib-D- Glu(OtBu)-GlyOH			
Experimental Requirements			
实验要求			
Develop a method for determining the content of polypeptides, requiring the separation of the main component from its isomers with a resolution greater than 2. 开发方法测定多肽含量, 要求主成分与异构体分离, 分离度大于 2			
Reference Method			
参考方法			
/			
Reagent information			
试剂信息			
Reagent Name 试剂名称	Grade 级别	Brand 品牌	
Water 水	Ultrapure water 超纯水	Welch 月旭	
Acetonitrile 乙腈	HPLC 色谱级	Welch 月旭	
Trifluoroacetic acid	AR	Aladdin	

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

邮编: 201600

邮编: 321000

邮编: 211500

Web: www.welchmat.com



三氟乙酸	分析级	阿拉丁
Instrument Information 仪器信息		
Test instruments 测试仪器	Instrument Model 仪器型号	
High Performance liquid chromatograph 高效液相色谱仪	Shimadzu LC-20AD	

## 1. Test process:

### 试验过程

#### 1.1. Chromatographic conditions:

##### 色谱条件

Chromatographic column: 色谱柱	Ultimate LP-C18 (4.6×250mm,5μm)		
Mobile phase: 流动相	Mobile phase A: 0.1% TFA solution A 相: 0.1%三氟乙酸水溶液 Mobile phase B: 0.1% TFA Acetonitrile B 相: 0.1%三氟乙酸乙腈		
Flow rate: 流速	1.0 mL/min		
Injection volume: 进样量	10μL		
Column temperature: 柱温	35 °C		
Detector: 检测器	UV		
Detection wavelength: 检测器波长	210 nm		
Gradient program: 梯度程序	Time (min) 时间 (分钟)	A (%)	B(%)
	0	50	50
	40	50	50
Notes 注意事项	/		

#### 1.2. Solution preparation (溶液配制)

##### 1.2.1. Preparation of mobile phase (流动相配制):

Mobile phase A :Take 1ml TFA in 1000 ml of pure water, mix well and filter to obtain.

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

邮编: 201600

邮编: 321000

邮编: 211500

Web:www.welchmat.com



流动相 A: 移取三氟乙酸 1ml 至 1000ml 纯水中, 充分混匀后抽滤即得。

Mobile phase B: Take 1ml TFA in 1000 ml of acetonitrile, mix well and filter to obtain.

流动相 B: 移取三氟乙酸 1ml 至 1000ml 乙腈中, 充分混匀后抽滤即得。

1.2.2. Blank solution、Diluent (空白溶液、稀释剂):

Acetonitrile-Water (1:1, v/v) (等比例乙腈水)

1.2.3. API reference solution: Weigh 2 mg of the main component, transfer it to a 10 mL volumetric flask, dissolve it with a solvent, dilute to the marked volume, and mix well to obtain the solution.

主成分对照溶液: 取主成分 2mg 至 10ml 容量瓶中, 溶剂溶解并定容至刻度, 混匀即得。

1.2.4. Isomer reference solution: Weigh 1 mg of the isomer, transfer it to a 10 mL volumetric flask, dissolve it with a solvent, dilute to the marked volume, and mix well to obtain the solution.

异构体对照溶液: 取异构体 1mg 至 10ml 容量瓶中, 溶剂溶解并定容至刻度, 混匀即得。

1.2.5. Mixed reference solution: Take the reference solutions of the main component and the isomer, mix them in equal proportions, and blend well to obtain the solution.

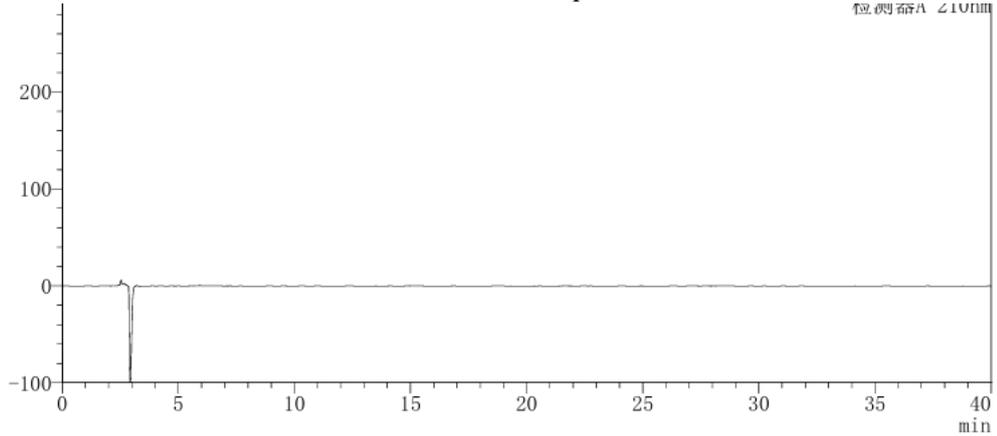
混合对照溶液: 取主成分与异构体对照溶液, 等比例混合, 混匀即得。

1.2.6. System solution: Weigh 10 mg of the main component accurately, transfer it to a 10 mL volumetric flask, dissolve it with a solvent, add 0.1 mL of the isomer reference solution, dilute to the marked volume, and mix well. This gives a system solution with a main component concentration of 1 mg/mL and an isomer concentration of 1  $\mu$ g/mL.

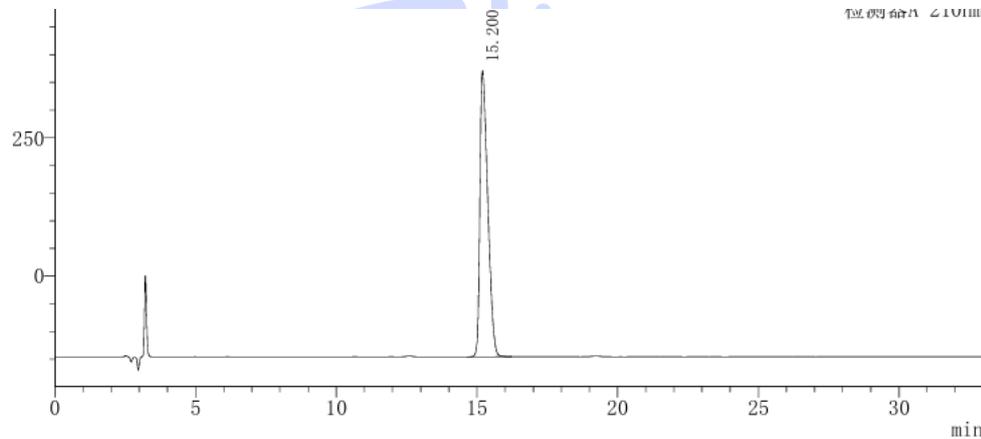
系统溶液: 取主成分 10mg 至 10ml 容量瓶中, 溶剂溶解并加入异构体对照溶液 0.1ml, 定容至刻度混匀得到主成分浓度 1mg/ml, 异构体 1 $\mu$ g/ml 的系统溶液。

## 2. Chromatogram and data (谱图和数据)

(1) Analysis spectrum of blank solution (空白溶液分析图谱):



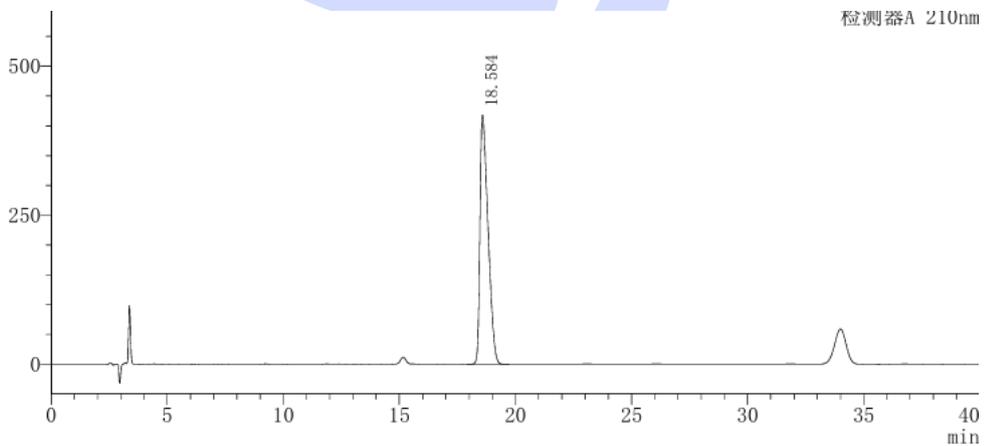
(2) Analysis spectrum of Sample API reference solution (主成分对照溶液分析图谱):



峰号	化合物名	保留时间	面积	面积%	理论塔板数(USP)
1	BOC-HiS(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-OH	15.20	10050884	100.00	13234
总计			10050884	100.00	

拖尾因子	分离度(USP)
1.61	--

(3) Analysis spectrum of Isomer reference solution (异构体对照溶液分析图谱):



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

Web: www.welchmat.com

邮编: 201600

邮编: 321000

邮编: 211500

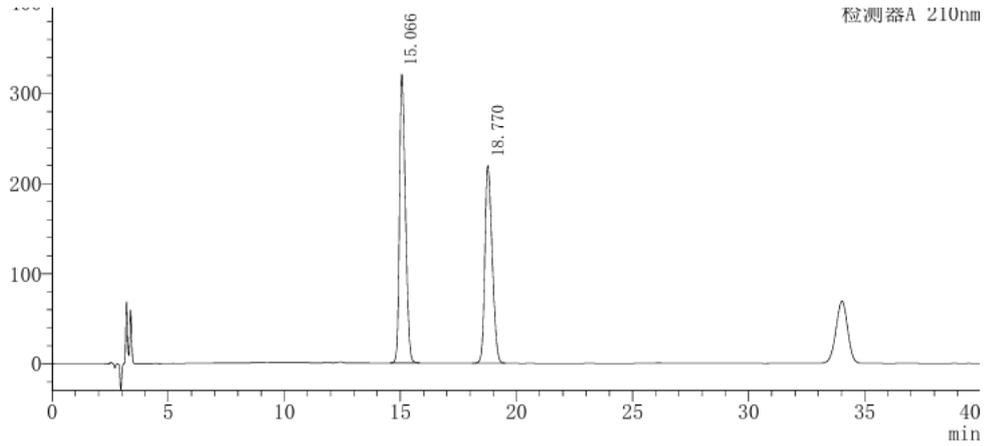


检测器A 210nm

峰号	化合物名	保留时间	面积	面积%	理论塔板数(USP)
1	BOC-D-HiS(Trt)-Aib-D-Glu(OtBu)-Gly-OH	18.58	10088942	100.00	12591
总计			10088942	100.00	

拖尾因子	分离度(USP)
1.71	--

#### (4) Analysis spectrum of Mixed reference solution (混合对照溶液分析图谱):

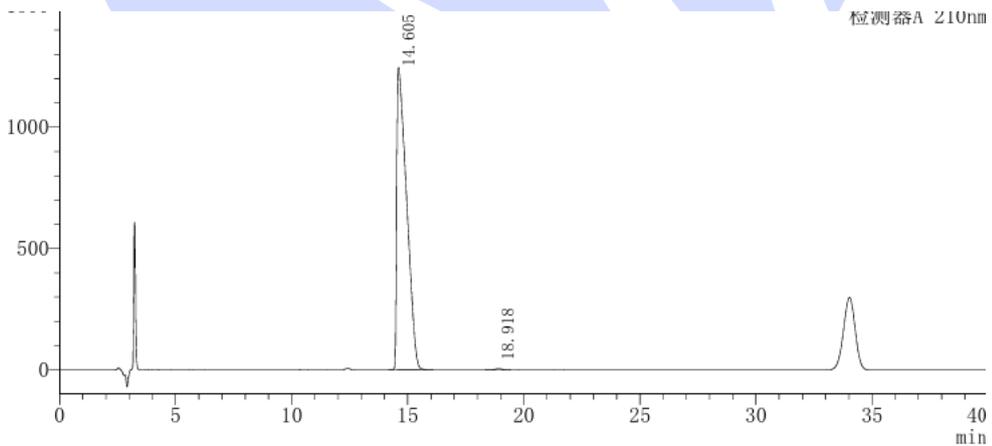


检测器A 210nm

峰号	化合物名	保留时间	面积	面积%	理论塔板数(USP)
1	BOC-HiS(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-OH	15.07	5681515	54.20	16249
2	BOC-D-HiS(Trt)-Aib-D-Glu(OtBu)-Gly-OH	18.77	4800704	45.80	16531
总计			10482219	100.00	

拖尾因子	分离度(USP)
1.30	--
1.27	7.0

#### (5) Analysis spectrum of System solution (系统溶液分析图谱)



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

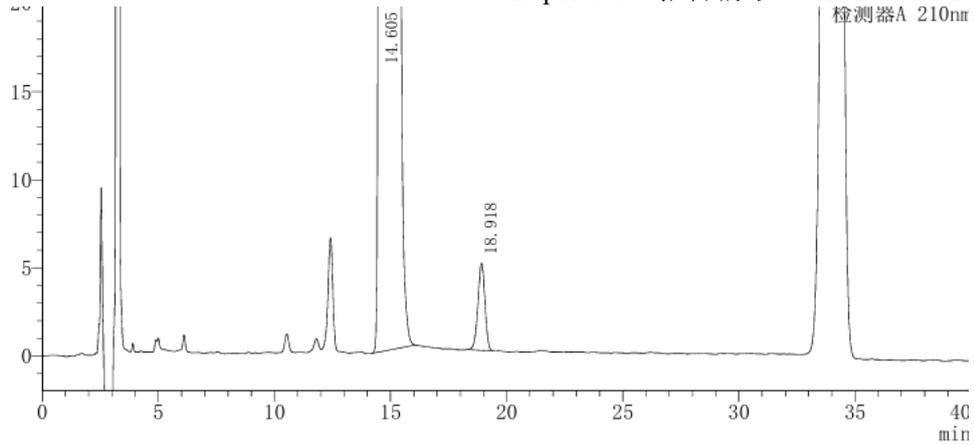
Tel:400-810-6969

邮编: 201600

邮编: 321000

邮编: 211500

Web:www.welchmat.com



峰号	化合物名	保留时间	面积	面积%	理论塔板数(USP)
1	BOC-HiS(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-OH	14.60	36756511	99.72	4613
2	BOC-D-HiS(Trt)-Aib-D-Glu(OtBu)-Gly-OH	18.92	104149	0.28	18529
总计			36860660	100.00	

拖尾因子	分离度(USP)
3.17	—
0.96	6.1

### 3. Conclusion (结论)

Using Welch Ultimate LP-C18 (4.6×250mm, 5µm) analyzed the content of polypeptide under this chromatographic condition, the resolution between the main component and the isomer is 6.1, which was analyzed without interference from other substances, meets the customer's testing requirements.

使用月旭色谱柱 Ultimate LP-C18 (4.6×250mm, 5µm) 在此色谱条件下测定多肽含量, 系统中主成分与异构体分离度为 6.1, 满足客户检测检测需求。

### Report signature (报告签字)

Tester(测试): Jeff (王祝超)

Date (日期): 2025/10/22

Reviewer(审核): Yana (杨旸)

Date (日期): 2025/10/22

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

邮编: 201600

邮编: 321000

邮编: 211500

Web:www.welchmat.com