

Determination of Related Substances in Ex4c by UPLC

Xinru Yang¹, Guimin Zhang^{1,2*}, Li Ma¹, Siguang Liu¹, Liangliang Zhao¹

¹Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd, Linyi Shandong

²National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutical, Linyi Shandong

Email: yangxinru2005@163.com, *lunan123456@126.com

Received: Apr. 25th, 2017; accepted: May 14th, 2017; published: May 17th, 2017

Abstract

Objective: To establish a method for the determination of related substances in Ex4c (the raw material of the pegylation of glucagon-like peptide-1) by UPLC. **Methods:** The UPLC method was developed by using a Waters ACQUITY UPLC® Peptide CSH™C18 column (130 Å, 2.1 × 150 mm, 1.7 μm) with a gradient elution system. The mobile phase A was 0.05% trifluoroacetic acid aqueous solution/tetrahydrofuran (9:1), and the mobile phase B was 0.05% trifluoroacetic acid in acetonitrile/tetrahydrofuran (9:1). The column temperature was maintained at 45°C while the detection wavelength setting at 214 nm. Furthermore, the sample injection was 2 μl via keeping a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. The developed method was validated. **Results:** The resolution between Ex4c and adjacent impurities, between Ex4c and the known impurities were greater than 1.5. All four known impurities exhibited good linear relationships with their related coefficients ≥ 0.995. And their detection limits ranged from 4.0 ng to 5.6 ng, comprising 96.3%~101.1% of recovered material. **Conclusion:** The validation results showed that the established method was simple, accurate and reproducible. It is capable of determining impurities in Ex4c (the raw material of the pegylation of glucagon-like peptide-1) and can be effectively used for quality control of this drug.

Keywords

Ex4c, UPLC, Related Substances, Method Validation

超高效液相色谱法测定Ex4c的有关物质

杨欣茹¹, 张贵民^{1,2*}, 马 丽¹, 刘思光¹, 赵亮亮¹

¹鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂

²国家手性制药工程技术研究中心, 山东 临沂

Email: yangxinru2005@163.com, *lunan123456@126.com

*通讯作者。

文章引用: 杨欣茹, 张贵民, 马丽, 刘思光, 赵亮亮. 超高效液相色谱法测定 Ex4c 的有关物质[J]. 分析化学进展, 2017, 7(2): 92-101. <https://doi.org/10.12677/aac.2017.72013>

收稿日期：2017年4月25日；录用日期：2017年5月14日；发布日期：2017年5月17日

摘要

目的：建立超高效液相色谱法(UPLC)测定聚乙二醇化促胰岛素分泌肽类似物原料Ex4c有关物质的方法。方法：采用Waters ACQUITY UPLC® Peptide CSH™ C18 column (130 Å, 2.1 × 150 mm, 1.7 μm)为色谱柱；以0.05%三氟乙酸水溶液-四氢呋喃(9:1)为流动相A，0.05%三氟乙酸乙腈溶液-四氢呋喃(9:1)为流动相B；进行梯度洗脱。柱温45℃，检测波长为214 nm，进样量为2 μl，流速为0.3 mL·min⁻¹。结果：杂质A、B、C、D线性良好，相关系数 r 均 ≥ 0.995；4种杂质的检测限范围为4.0~5.6 ng；平均回收率为96.3%~101.1%。结论：经方法学验证，所建立的方法简便、准确、重复性好，可用于测定聚乙二醇化促胰岛素分泌肽类似物原料Ex4c的有关物质，有效地控制药品质量。

关键词

Ex4c, 超高效液相色谱法, 有关物质, 方法学验证

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

糖尿病是一种常见的慢性非传染性疾病，已经成为严重威胁人类健康的体内代谢紊乱疾病，其特点是慢性高血糖，伴随由于胰岛素分泌减少或耐受所引起的糖、脂肪和蛋白质代谢紊乱[1]。目前常用的II型糖尿病(T₂DM)治疗药物包括：双胍类、磺脲类、α-葡萄糖苷酶抑制剂、噻唑烷二酮类等[2]。尽管传统抗糖尿病药物已经在临床上广泛应用并取得良好疗效，但仍存在着诸多问题，最显著的两个问题就是在降低高血糖方面不能维持长期疗效和不能有效缓解病情达到疗效指标，此外安全性和副作用同样是这些抗糖尿病药物亟待改善的问题。因此，研究和开发新的安全有效的T₂DM治疗药物具有重要的意义。GLP-1类似物药物[3][4]因其独特药理作用，已成为用于治疗 and 缓解该疾病的最新最具潜力的新型药物。全球已上市GLP-1类似物[5]产品中，有美国礼来公司与Amylin制药公司共同研制的艾塞那肽注射液(Byetta)和诺和诺德公司的利拉鲁肽注射液(Victoza)，但两者半衰期短，需频繁给药，且价格昂贵，患者依从性较差，并给患者(尤其是国内患者)带来极大的经济负担。本公司通过系统筛选和独特设计而获得的GLP-1类似物Ex4c新结构，经与35 kDa分子量无单甲氧基PEG的同源二聚体多肽修饰，形成了具有长效、低免疫原性、低给药剂量、高安全性和低成本的新一代GLP-1的长效制剂新药。

多肽测定方法已有相关文献报道，吴小曼等[6]采用了C18色谱柱，乙腈-磷酸二氢钾为流动相体系，以10%的氢氧化钾调节pH值，梯度洗脱，测定艾塞那肽的有关物质；石琳等[7]采用了C3色谱柱，乙腈-磷酸二氢钾为流动相体系，磷酸调节pH值，梯度洗脱，测定醋酸艾塞那肽的含量。两种方法中艾塞那肽与相邻杂质间分离度不好，有机溶剂消耗大。超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)作为一种高效分析技术，其高分辨率，高分析效率，低溶剂消耗在色谱分析中具有显著优势。本课题组利用UPLC开展了Ex4c有关物质方法的研究及方法学验证，方法简便，灵敏，准确度高，有机溶剂消耗少，对环境污染小。

2. 仪器与试药

仪器

Agilent1290 超高效液相色谱仪(配有 DAD 检测器), Mettler Toledo AL204 型电子天平, KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司)。

试药

聚乙二醇化促胰岛素分泌肽类似物原料 Ex4c 为本公司自制, 三氟乙酸(色谱纯, 天津市四友生物医学技术有限公司), 四氢呋喃(色谱纯, 天津市申泰化学试剂有限公司), 乙腈(色谱纯, merk); 水为超纯水。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件

仪器为 Agilent UPLC 1290; 色谱柱型号为 Waters ACQUITY UPLC® Peptide CSH™C18 column, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 × 150 mm; 流动相: 以 0.05% 三氟乙酸水溶液-四氢呋喃(9:1)为流动相 A, 0.05% 三氟乙酸乙腈溶液-四氢呋喃(9:1)为流动相 B; 梯度洗脱程序见表 1。柱温 45℃, 检测波长为 214 nm; 进样量为 2 μl; 流速为 0.3 mL·min⁻¹。

3.2. 溶液配制

3.2.1. 供试品溶液

取 Ex4c 适量, 加 30% 乙腈水溶液溶解并稀释成每 1 ml 中约含 1 mg 的溶液, 作为 Ex4c 供试品溶液。

3.2.2. Ex4c 储备液

精密称取 Ex4c 102.8 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加 30% 乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为 Ex4c 储备液。

3.2.3. 杂质储备液

精密称取杂质 A、B、C、D 各约 10 mg, 分别置 10 ml 量瓶中, 分别用 30% 乙腈溶解并稀释至刻度, 作为杂质 A、B、C、D 储备液。

3.3. 方法学考察

3.3.1. 专属性

1) 空白溶剂

取空白溶剂 30% 乙腈适量, 滤过, 依法测定, 记录色谱图。色谱图见图 1(a)。由图可知, 空白溶剂不干扰本品的有关物质的检查。

2) Ex4c 定位

(氨基酸序列: HGEFTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPGGSGGSC-NH₂)

取 Ex4c 适量, 加 30% 乙腈水溶液溶解并稀释制成 1 mg·ml⁻¹ 的溶液, 依法测定, 记录色谱图。色谱图见图 1(b)。由图可知, Ex4c 保留时间为 11.734 min, 且主峰与杂质均能有效分离。

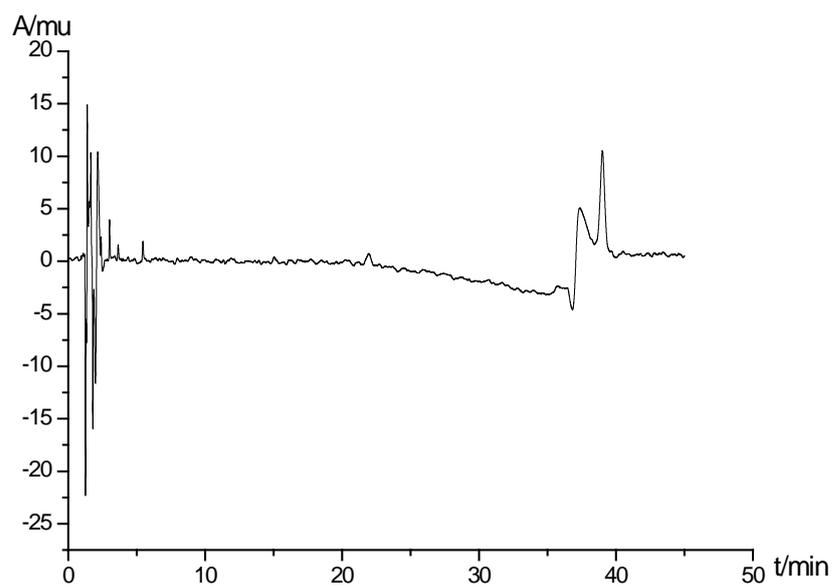
3) 杂质 A 定位

(氨基酸序列: HGEFTFTS[Asu]LSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPGGSGGSC-NH₂)

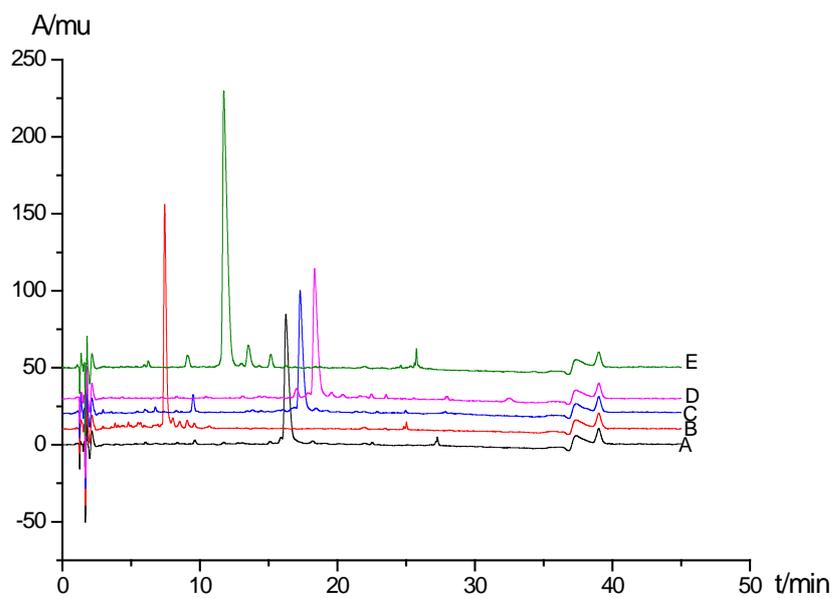
取杂质 A 对照品适量, 加 30% 乙腈水溶液配置成每 1 ml 中约含 0.5 mg 的溶液, 作为杂质 A 对照品溶液。取样依法测定, 记录色谱图。色谱图见图 1(b)。由图可知, 杂质 A 保留时间为 16.251 min。

Table 1. Gradient elution program
表 1. 梯度洗脱程序

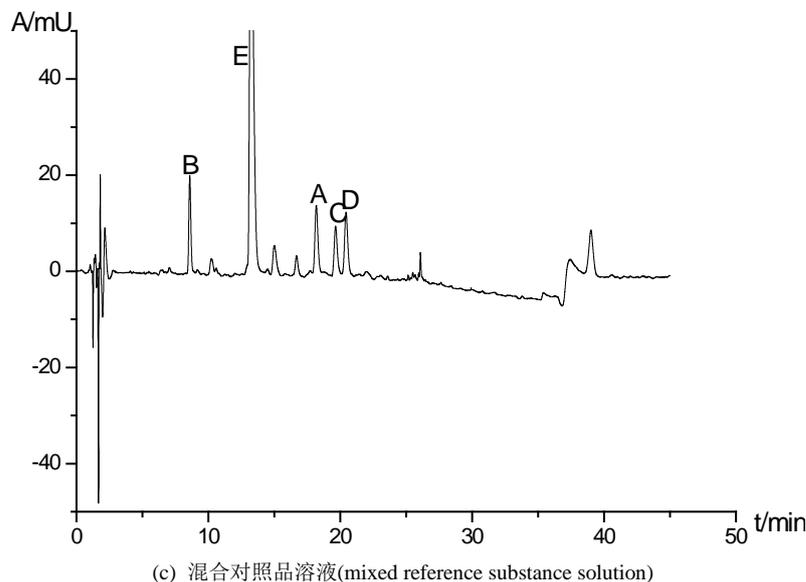
时间 (time)/min	流动相 A (mobile phase A)/%	流动相 B (%) (mobile phase B)/%
0	76	24
20	73	27
35	55	45
37	76	24
45	76	24



(a) 空白溶液(Blank solution)



(b) 杂质和供试品溶液(impurity and analytical solution)



A. 杂质 A (impurity A) B. 杂质 B (impurity B) C. 杂质 C (impurity C) D. 杂质 D (impurity D)
E. Ex4c

Figure 1. Chromatograms of specificity

图 1. 专属性色谱图

4) 杂质 B 定位

(氨基酸序列: DLSKQMEEEAVRLFEWLKNGGPGGSGGSC-NH₂)

取杂质 B 对照品适量, 加 30% 乙腈水溶液配置成每 1 ml 中约含 0.5 mg 的溶液, 作为杂质 B 对照品溶液。取样依法测定, 记录色谱图。色谱图见图 1(b)。由图可知, 杂质 B 保留时间为 7.435 min。

5) 杂质 C 定位

(氨基酸序列: EGTFTSDLSKQMEEEAVRLFEWLKNGGPGGSGGSC-NH₂)

取杂质 C 对照品适量, 加 30% 乙腈水溶液配置成每 1 ml 中约含 0.5 mg 的溶液, 作为杂质 C 对照品溶液。取样依法测定, 记录色谱图。色谱图见图 1(b)。由图可知, 杂质 C 保留时间为 17.286 min。

6) 杂质 D 定位

(氨基酸序列: GEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFEWLKNGGPGGSGGSC-NH₂)

取杂质 D 对照品适量, 加 30% 乙腈水溶液配置成每 1 ml 中约含 0.5 mg 的溶液, 作为杂质 D 对照品溶液。取样依法测定, 记录色谱图。色谱图见图 1(b)。由图可知, 杂质 D 保留时间为 18.334 min。

7) 混合对照品溶液

取 Ex4c 约 10 mg, 至 10 ml 量瓶中, 加上述各杂质定位溶液各 0.4 ml, 加 30% 乙腈水溶液稀释至刻度, 摇匀。依法测定, 记录色谱图。色谱图见图 1(c)。由图可知, 主成分和各杂质分离度均符合规定。

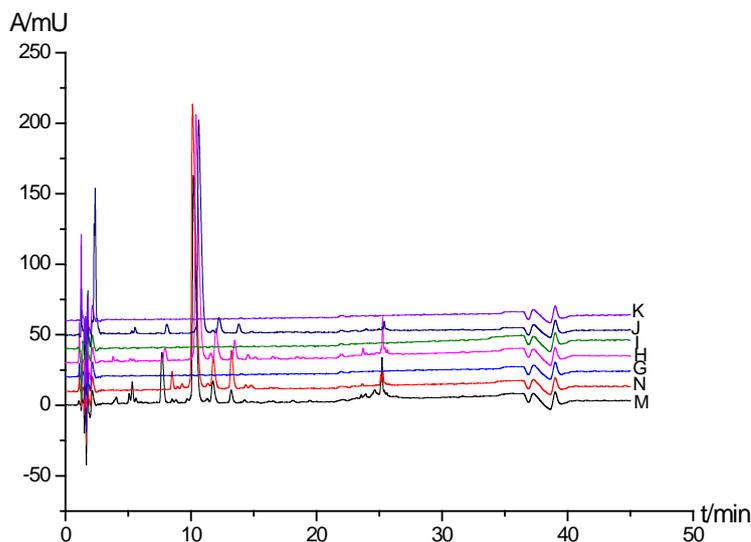
3.3.2. 破坏试验

1) 酸破坏

精密称取 Ex4c 约 10 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加 1.0 ml 30% 的乙腈水溶液溶解, 加入 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液 1 ml, 于 80℃ 水浴中破坏 30 min, 冷却至室温后中和至中性, 用 30% 乙腈水溶液稀释至刻度, 作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 2 μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图。色谱图见图 2。

2) 碱破坏

精密称取 Ex4c 约 10 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加 1.0 ml 30% 的乙腈水溶液溶解, 加入 0.1 mol·L⁻¹ 的氢



M. 高温破坏(high temperature hydrolysis) N. 酸破坏(acid hydrolysis) G. 酸破坏空白(blank solution of acid) H. 碱破坏(base hydrolysis) I. 碱破坏空白(blank solution of base) J. 氧化破坏(oxidation hydrolysis) K. 氧化破坏空白溶剂(blank solution of oxidation)

Figure 2. Chromatogram of stress condition test

图 2. 破坏试验色谱图

氧化钠溶液 0.5 ml，室温放置 60 min，中和至中性，用 30% 乙腈水溶液稀释至刻度，作为供试品溶液。取 2 μ l 供试品溶液注入液相色谱仪，记录色谱图。色谱图见图 2。

3) 高温破坏

精密称取 Ex4c 约 10 mg，精密称定，置 10 ml 量瓶中，于 105 $^{\circ}$ C 高温破坏 90 min，冷却至室温后用 30% 乙腈水溶解并稀释至刻度，作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 2 μ l 注入液相色谱仪，记录色谱图。色谱图见图 2。

4) 氧化破坏

精密称取 Ex4c 约 10 mg，置 10 ml 量瓶中，加 30% 的乙腈水溶液 1.0 ml 溶解，加入 0.3% 的双氧水溶液 0.5 ml，室温放置 80 min，用 30% 乙腈溶解并稀释至刻度，作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 2 μ l 注入液相色谱仪，记录色谱图。色谱图见图 2。

除不加样品外，同法配制各破坏条件的空白溶液同法测试，色谱图见图 2。

结果表明，各破坏条件下所产生的降解产物均能与 Ex4c 很好的分离，各降解产物之间也能较好的分离，峰纯度分析显示各破坏溶液的色谱图中 Ex4c 峰纯度合格。

3.3.3. 系统适用性试验

精密量取 Ex4c 储备液 1 ml，杂质 A、B、C、D 储备液各 100 μ l，置 5 ml 量瓶中，加 30% 乙腈稀释至刻度，作为系统适用性溶液。取系统适用性溶液，连续进样六次，分别计算各色谱图中 Ex4c 主峰、杂质 A、B、C、D 保留时间和峰面积的相对标准偏差，考察主峰与各杂质的分离度。结果表明 Ex4c 主峰、杂质 A、B、C、D 保留时间的相对标准偏差均小于 2%，峰面积的相对标准偏差均小于 3%。主峰与相邻杂质峰分离度均大于 1.5，理论板数按 Ex4c 峰计算均大于 5000。

3.3.4. 检测限与定量限

取杂质 A、B、C、D 储备液，采用逐步稀释法，以 S/N \approx 10 时的浓度作为定量限，以 S/N \approx 3 时的浓度作为检测限，结果见表 2。

Table 2. Results of LOD and LOQ test
表 2. 检测限与定量限试验结果

序号(No.)	组分(constituents)	检测限(LOD)/ng	定量限(LOQ)/ng
1	杂质 A	5.4	16.4
2	杂质 B	4.0	12.0
3	杂质 C	5.6	17.0
4	杂质 D	5.6	16.6

3.3.5. 线性关系考察

精密量取 Ex4c 储备液 0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml、1.0 ml、1.2 ml、1.5 ml 分别置 10 ml 量瓶中，分别精密量取杂质 A、B、C、D 储备液各 80 μl 、120 μl 、160 μl 、200 μl 、240 μl 、300 μl 置上述 10 ml 量瓶中，加 30% 乙腈稀释至刻度，摇匀，分别得到 40%、60%、80%、100%、120%、150% 的溶液。取上述溶液依法测定，记录色谱图。以 Ex4c 及杂质 A、B、C、D 的浓度 C ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) 为横坐标，以 Ex4c 及杂质 A、B、C、D 峰面积为纵坐标进行线性回归，结果见表 3。

由表 3 可知，该方法线性关系良好。

3.3.6. 精密度试验

1) 重复性 分别取本品 6 份各约 10 mg，精密称定，加各杂质 A、B、C、D 储备液各 200 μl ，置 10 ml 量瓶中，加 30% 乙腈稀释至刻度，作为供试品溶液，依法测定，记录色谱图。按面积归一化法，计算各个色谱图中 Ex4c 的纯度及杂质 A、B、C、D 百分含量，并计算其相对标准偏差，结果见表 4。

2) 中间精密度 实验员 A、B 于第二天分别同法配制 6 份供试品溶液，依法测定，记录色谱图。按面积归一化法，计算各个色谱图中 Ex4c 的纯度及杂质 A、B、C、D 百分含量，并计算其相对标准偏差，试验结果见表 4。

由表 4 可知，方法精密度良好。

3.3.7. 回收率试验

精密量取 Ex4c 储备液 1.0 ml，置 10 ml 量瓶中，配置 9 份，分别精密量取杂质 A、B、C、D 储备液 160 μl 、200 μl 、240 μl 置上述容量瓶中，每个浓度配置 3 份，加 30% 乙腈稀释至刻度，作为供试品溶液。精密量取 Ex4c 储备液 1.0 ml，置 10 ml 量瓶中，分别精密量取杂质 A、B、C、D 储备液 200 μl ，加 30% 乙腈稀释至刻度，同法配置两份，作为对照溶液。精密称取 Ex4c 适量，加 30% 乙腈溶解并稀释制成 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的溶液，作为样品测定溶液。

取上述各溶液依法测定，记录色谱图，计算各浓度项下的回收率，试验结果见表 5。

由表 5 可知，本方法对杂质和 Ex4c 均具有良好的回收率。

3.3.8. 耐用性试验

分别通过改变柱温($\pm 2^\circ\text{C}$)、流速($\pm 0.02 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$)和更换色谱柱，考察供试品溶液中 Ex4c 及各杂质的变化情况，试验结果见表 6。

结果表明：测定结果没有明显差异，峰形、分离度均符合要求，本方法的耐用性良好。

3.4. 样品测定

精密称取本品 3 批样品适量，分别加 30% 的乙腈溶解并稀释制成每 1 ml 含 Ex4c 1 mg 的溶液，作为供试品溶液。依法测定，有关物质按面积归一化法计算，结果见表 7。

Table 3. Results of linear equations test**表 3.** 线性关系试验结果

杂质 (solvent)	回归方程 (regression equation)	相关系数 r (correlation index) (n = 6)
杂质A	$A = 7972.44 C + 2.28$	0.9982
杂质B	$A = 8528.42 C - 9.07$	0.9989
杂质C	$A = 7401.09 C - 2.59$	0.9985
杂质D	$A = 8651.86 C - 5.03$	0.9960
Ex4c	$A = 4081.96 C - 59.76$	0.9995

Table 4. Results of precision test**表 4.** 精密度试验结果

序号 (No.)	组分 (constituents)	重复性 (repeatability) RSD/%	中间精密度 (intermediate precision) RSD/%
1	杂质A	1.00	2.97
2	杂质B	2.38	2.27
3	杂质C	1.18	2.03
4	杂质D	1.73	2.01
5	Ex4c	0.27	0.22

Table 5. Results of recovery test**表 5.** 回收率试验结果(n = 3)

组分 (constituents)	加入浓度 (added concentration)/%	平均回收率 (average recovery rate)/%	RSD/%
杂质A	80	99.8	3.5
	100	96.5	2.8
	120	97.3	4.1
杂质B	80	98.3	2.9
	100	96.6	4.6
	120	97.6	3.8
杂质C	80	96.3	4.2
	100	96.8	3.6
	120	96.9	1.9
杂质D	80	98.4	2.8
	100	96.7	4.2
	120	98.2	3.5
Ex4c	80	97.5	1.6
	100	100.3	2.1
	120	101.1	1.6

Table 6. Results of serviceability test
表 6. 耐用性试验结果

名称	指标	标准条件	柱温		流速		换色谱柱 (0125351561)
			43℃	47℃	0.28 ml/min	0.32 ml/min	
主成分纯度(%)		74.82	74.99	74.79	74.68	75.02	75.02
杂质 A (%)		2.93	2.98	3.11	2.99	2.94	2.91
杂质 B (%)		2.99	2.98	2.92	2.94	3.00	2.96
杂质 C (%)		2.76	2.73	2.76	2.77	2.81	2.74
杂质 D (%)		2.93	2.91	2.96	2.89	2.91	2.90

Table 7. Contents of residual solvent in samples
表 7. 样品有关物质测定

批号 (lot No.)	杂质 A (impurity A)	杂质 B (impurity B)	杂质 C (impurity C)	杂质 D (impurity D)	Ex4c
160201	未检出 (not detected)	0.15	未检出 (not detected)	0.36	97.30
160301	未检出 (not detected)	0.10	未检出 (not detected)	0.40	97.59
160401	未检出 (not detected)	0.24	未检出 (not detected)	0.49	97.49

由表 7 可知, 本法能准确地测定 Ex4c 的有关物质, 能较好地控制本品质量。

4. 讨论

4.1. 波长的选择

因本品为 38 个氨基酸的小肽, 只含有 3 个芳香族氨基酸; 而肽键的强吸收峰在 214 nm 处, 为保证有较高的检测灵敏度, 故将本品的检测波长确定为 214 nm。

4.2. 色谱条件的选择

流动相和洗脱梯度(A 液: 100%超纯水 + 0.1%TFA; B 液: 100%乙腈 + 0.1%TFA; 梯度为 35%~48% B 液在 15 min 以内), 结果显示主峰与杂质峰分离度、主峰峰型对称性均较差。流动相为 A 液: 超纯水 + 0.1%TFA; B 液: [80% (乙腈 + 0.1%TFA)] + 20%异丙醇; 梯度: 0~23 min, B 从 36%~55%; 23~30 min, B 从 55%~100%), 主峰与杂质峰的分离度、主峰峰型、理论塔板数有所改善, 但不符合规定。流动相为 A 液: 0.05% TFA 水溶液-四氢呋喃(9:1); B 液: 0.05% TFA 乙腈溶液-四氢呋喃(9:1); 梯度: 0~20 min, B 从 24%~27%; 20~35 min, B 从 27%~45%), 主峰与杂质峰的分离度较好, 主峰峰型较好, 理论塔板数较高。

4.3. 杂质的分析

根据 Ex4c 多肽的氨基酸组成特性和工艺, 确定主要有以下四个有关物质: ① 杂质 A: 根据多肽类药物质量控制要求[8], 如果多肽中含有易脱酰胺的氨基酸, 则必须对其脱酰胺产物进行鉴定。Ex4c 中的第 28 位氨基酸为 Asn, 该 Asn 易脱酰胺成 Asp, 进行 Ex4c 脱酰胺(Ex4c-DA)有关物质的研究; ② 杂质 B:

工艺合成过程中 Asn9 易转化成 Asu9(是 Asn 侧链形成琥珀酰亚胺环的同源异构体); ③ 杂质 C: 参照已上市艾塞那肽注射液有关物质研究[9], 本品 N 末端 1-2 位的两个氨基酸 His 和 Gly 易水解形成(3-38)Ex4c 的相关物质; ④ 杂质 D: Ex4c 多肽的 C 末端为半胱氨酸, 容易形成二硫键形式同源二聚体(Di-Ex4c)。

4.4. 结果的讨论

本实验建立了一种有效检测聚乙二醇化促胰岛素分泌肽类似物原料 Ex4c 的有关物质的 UPLC 方法, 由结果可知, 本法具有灵敏度高、精密度好等优点, 可用于质量控制研究。结合本方法, 从药物的源头开始控制, 对保障药物合成的安全性有着十分重要的意义。

基金项目

2015 年山东省自主创新及成果转化专项计划(长效糖尿病药物的研究及产业化, 2015ZDJQ05001)。

参考文献 (References)

- [1] Matthaehi, S., Stumvoll, M., Kellerer, M., *et al.* (2000) Pathophysiology and Pharmacological Treatment of Insulin Resistance. *Endocrine Reviews*, **21**, 585-618.
- [2] 杨彬. 治疗 2 型糖尿病药物最新研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(3): 249-251.
- [3] McDonnell, ME (2007) Combination Therapy with New Targets in Type 2 Diabetes: A Review of Available Agents with a Focus on Pre-Exercise Adjustment. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention*, **27**, 193-201. <https://doi.org/10.1097/01.HCR.0000281762.29287.a6>
- [4] Kieffer, T.J. (2004) Gastro-Intestinal Hormones GLP and GLP-1. *Annales d'Endocrinologie*, **65**, 13-21.
- [5] Studs, J., Goffredsen, C.F., Romer, J., *et al.* (2003) GLP-1 Derivative Liraglutide in Rats with Beta-Cell Deficiencies: Influence of Metabolic State on Beta-Cell Mass Dynamics. *British Journal of Pharmacology*, **140**, 123-132. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705397>
- [6] 吴小曼, 徐滢, 纪宇, 等. HPLC 法测定艾塞那肽的有关物质[J]. 中国药师, 2010, 13(9): 1304-1305.
- [7] 石琳, 董庆光, 王春雨, 等. HPLC 法测定注射用艾塞那肽中主药的含量[J]. 中国当代医药, 2009, 16(8): 122- 123.
- [8] 合成多肽药物药学研究技术指导原则[H]. GPH11-1. 2007.
- [9] 中国药品生物制品检定所. JX20080117 进口药品注册标准, 艾塞那肽注射液[S]. 2008.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: aac@hanspub.org