



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103995062 B

(45) 授权公告日 2015.06.17

(21) 申请号 201410205748.5

(22) 申请日 2014.05.14

(73) 专利权人 浙江圣兆药物科技股份有限公司
地址 310051 浙江省滨江区西兴街道江陵路
88号9幢南座11楼

(72) 发明人 彭忠华

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200
代理人 张法高 赵杭丽

(51) Int. Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

(56) 对比文件

US 2010317827 A1, 2010.12.16, 全文.

CN 101776651 A, 2010.07.14, 全文.

CN 103293255 A, 2013.09.11, 全文.

CN 103424496 A, 2013.12.04, 全文.

CN 101366692 A, 2009.02.18, 全文.

CN 101538323 A, 2009.09.23, 全文.

CN 101900712 A, 2010.12.01, 全文.

CN 102219849 A, 2011.10.19, 全文.

CN 102532303 A, 2012.07.04, 全文.

CN 103224558 A, 2013.07.31, 全文.

Liang, Rongcai

Zhang, Renyu

Li, Xiang. Stability of exenatide in
poly(D, L-lactide-co-glycolide) solutions:

A simplified investigation on the peptide
degradation by the polymer. 《EUROPEAN
JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES》. 2013,
第50卷(第3期), 502-510.

Liu Bin

Dong Qing-guang

Shi Lin. Development and Validation of
a Reverse-phase High Performance Liquid
Chromatography Method for Determination of
Exenatide in Poly(lactic-co-glycolic acid)
Microspheres. 《CHEMICAL RESEARCH IN CHINESE
UNIVERSITIES》. 2010, 第26卷(第1期), 33-37.

吴小曼等. HPLC法测定艾塞那肽的有
关物质. 《中国药师》. 2013, 第13卷(第9
期), 1304-1306.

Yu, Xiang

Warme, Christopher

Lee, Dinah. Characterization of a
Low-Level Unknown Isomeric Degradation
Product Using an Integrated Online-Offline
Top-Down Tandem Mass Spectrometry Platform.
《ANALYTICAL CHEMISTRY》. 2013, 第85卷(第19
期), 8964-8967.

宗欣欣等. HPLC法测定醋酸艾塞那肽注射
液中有关物质及主药的含量. 《沈阳药科大学学
报》. 2011, 第28卷(第10期), 791-796.

审查员 陈永晖

权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

一种高效液相色谱法测定艾塞那肽及其杂质
的方法

艾塞那肽及其杂质的分离并定量测定。

(57) 摘要

本发明提供一种高效液相色谱法测定艾塞那
肽及其杂质的方法,通过高效液相色谱法测定艾
塞那肽及其杂质,各杂质的专属性、线性及范围、
回收率、精密度、耐用性等试验均良好;通过本发
明方法使分离的已结构确证的杂质达到8个。本
发明方法设计合理,仪器设备为已普及的高效液
相色谱仪;且流动相配制简单、检测成本低,实现

CN 103995062 B

1. 一种高效液相色谱法测定艾塞那肽及其杂质的方法,其特征在于,通过以下步骤实现:

(1) 色谱柱的准备:所用色谱柱的填充剂为用辛烷基硅烷;

(2) 高效液相色谱仪的设置:检测器的检测波长为 214nm,自动进样器温度为 6°C,柱温为 40°C,流动相流速为 0.8~1.2ml/min;

(3) 色谱流动相水相的配置:称取烷基磺酸钠,用水溶解并稀释成浓度总和为 1.2~1.8mmol/L 溶液,并用磷酸调 pH 至 4.0~4.8;

(4) 流动相的准备:流动相 A 为乙腈-上述烷基磺酸钠溶液=10:90,流动相 B 为乙腈-烷基磺酸钠溶液=52:48;

(5) 梯度洗脱:洗脱时间及流动相 A 体积比顺序为 0~60 min 从 60%→25%、60~60.5min 再从 25%→60%、60%运行至 65min;

(6) 样品溶液的配置:称取样品,用流动相溶解并稀释至含艾塞那肽 0.4~1.6mg/ml 溶液;

(7) 精密吸取样品溶液 40 μ l,注入液相色谱仪测定,并记录色谱图,艾塞那肽的保留时间为 26.272min,各杂质的相对保留时间分别为:Exenatide fragment3-39:0.33, Acetyl Exenatide:0.42, L-Glu¹³ Exenatide:0.46, D-Ser⁸ Exenatide:0.50, D-Ser¹¹ Exenatide:0.88, Met[0] Exenatide:0.95, D-His¹ Exenatide:1.08, Des-Gly² Exenatide:1.12。

2. 根据权利要求 1 所述的一种高效液相色谱法测定艾塞那肽及其杂质的方法,其特征在于,步骤(3)中所述的烷基磺酸钠选用庚烷磺酸钠、戊烷磺酸钠、己烷磺酸钠、辛烷磺酸钠、壬烷磺酸钠或癸烷磺酸钠中的一种或多种的混合物。

一种高效液相色谱法测定艾塞那肽及其杂质的方法

技术领域

[0001] 本发明属分析化学领域,涉及分析检测艾塞那肽及其杂质的方法,特别涉及用一种高效液相色谱法有效分离并测定艾塞那肽及其杂质的方法。

背景技术

[0002] 在艾塞那肽合成、放置、制剂工艺过程中,会产生某些与艾塞那肽结构和性质类似的杂肽(即艾塞那肽杂质),例如缺失肽、非对映异构体等。目前,分离艾塞那肽及其杂质的方法常为反相高效液相色谱法和离子交换色谱法,但这些现公开的反相高效液相色谱法(流动相系乙腈:0.1%三氟乙酸溶液等)方法在艾塞那肽及其杂质测定过程中,专属性差,使得艾塞那肽及其杂质(Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[0] Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide)的峰不能分离或分离度达不到要求。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种高效液相色谱法测定艾塞那肽及其杂质的方法,旨在解决艾塞那肽及其杂质(Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[0] Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide)的分离并定量测定。

[0004] 本发明通过以下步骤实现:

[0005] 1、色谱柱的准备:所用色谱柱的填充剂为用辛烷基硅烷;

[0006] 2、高效液相色谱仪的设置:检测器的检测波长为214nm,自动进样器温度为6℃,柱温为40℃,流动相流速为0.8~1.2ml/min;

[0007] 3、色谱流动相水相的配置:称取烷基磺酸钠(庚烷磺酸钠、戊烷磺酸钠、己烷磺酸钠、辛烷磺酸钠、壬烷磺酸钠、癸烷磺酸钠)适量,用水溶解并稀释成浓度总和为1.2~1.8mmol/L溶液,并用磷酸调pH至4.0~4.8;

[0008] 所述的烷基磺酸钠可以是庚烷磺酸钠、戊烷磺酸钠、己烷磺酸钠、辛烷磺酸钠、壬烷磺酸钠、癸烷磺酸钠任意一种或多种的混合物;

[0009] 所述的烷基磺酸钠的浓度可以是庚烷磺酸钠、戊烷磺酸钠、己烷磺酸钠、辛烷磺酸钠、壬烷磺酸钠、癸烷磺酸钠一种或多种的混合物的浓度总和;

[0010] 4、流动相的准备:以乙腈-上述烷基磺酸钠溶液(10:90)为流动相A,乙腈-上述烷基磺酸钠溶液(52:48)为流动相B;

[0011] 5、采用梯度洗脱,洗脱时间及流动相A体积比程序为0.01~60min从60%→25%、60~60.5min再从25%→60%、60%运行至65min;

[0012] 6、样品溶液的配置:精密称取样品适量,用流动相溶解并稀释至每ml约含艾塞那肽0.4~1.6mg/ml溶液;

[0013] 7、精密吸取样品溶液40μl,注入液相色谱仪测定,并记录色谱图,在得到的色谱

图中,各杂质与主峰均达到良好分离,艾塞那肽的保留时间为26.272min,各杂质 Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[0] Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide 的保留时间分别为:8.787min、10.935min、12.109min、13.085min、23.204min、24.855min、28.458min、29.407min,相对保留时间分别为:0.33、0.42、0.46、0.50、0.88、0.95、1.08、1.12。

[0014] 本发明通过合理的方法设计,与现有的方法技术相比,具有明显的优点:使分离的已结构确证的杂质达到8个;各杂质的专属性、线性及范围、回收率、精密度、耐用性等试验均良好;仪器设备为已普及的高效液相色谱仪;且流动相配制简单、检测成本低等。

附图说明

[0015] 图1是艾塞那肽与各杂质液相分离图。

具体实施方式

[0016] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述,但是本发明的保护范围并不限于实施例。

[0017] 实施例1 本发明方法的建立过程:

[0018] 1、仪器与试剂

[0019] 仪器:Waters 2489 检测器, Waters e2695 泵, Empower 色谱工作站;

[0020] 试剂:乙腈(色谱纯);庚烷磺酸钠、戊烷磺酸钠、己烷磺酸钠、辛烷磺酸钠、壬烷磺酸钠、癸烷磺酸钠、三氟乙酸、磷酸(分析纯);注射用水。

[0021] 2、艾塞那肽杂质测定方法的建立

[0022] (1) 波长的选择:艾塞那肽及其杂质(Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[0] Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide)紫外光吸收具有自身的特性。我们测定了它的在25%乙腈溶液在紫外下的吸收图谱,艾塞那肽及其各杂质在214nm波长下均有较强的紫外吸收,因此我们选用214nm作为本品的检测波长。

[0023] (2) 溶解性试验:

[0024] 将艾塞那肽在水和25%乙腈中的溶解性对比试验,结果显示:艾塞那肽在25%的乙腈中的溶解度能达到1.6mg/ml以上,其杂质(Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[0] Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide)在25%乙腈中也能达到0.5mg/ml以上,表明,用25%乙腈作为分析艾塞那肽及其杂质能满足高效液相分析的测定的灵敏度的要求。

[0025] (3) 溶剂的干扰性试验:

[0026] 将艾塞那肽及其各杂质用25%乙腈溶解后的测试溶液及溶剂(25%乙腈)进行测试比较,以此判断所选择的溶剂(25%乙腈)是否干扰本项测定。

[0027] 方法如下:取艾塞那肽约10mg,精密称定,置10ml量瓶中,用25%乙腈溶解并定容至刻度,另取艾塞那肽各杂质(Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[0] Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide)适量,用25%乙腈制成浓度为每1ml中约含各成分10μg的溶液,作

为测定艾塞那肽及其杂质的供试品溶液。

[0028] 在上述色谱条件下,取供试品溶液及溶剂(25%乙腈)各 40 μ l,注入色谱仪,记录色谱图。

[0029] 结果显示:艾塞那肽及其杂质在本色谱条件下均能良好的检出,且均互不干扰。因此,我们采用 25%乙腈作为艾塞那肽及各杂质测定用溶剂。

[0030] (4) 方法的专属性

[0031] 破坏性(酸、碱、双氧水、热、光破坏) 试验下的分离:取艾塞那肽适量约 10mg,置于酸(0.1mol/ml HCl)、碱(0.1mol/ml NaOH)、双氧水(10%)、热 45 $^{\circ}$ C、光(4000L μ X)的条件下破坏 2 小时(由于本品为多肽类药物,其对氧化、热、光均比较敏感,整个降解时间比较短)。结果表明艾塞那肽在这些条件下均有降解峰产生,且它们与主峰均能达到良好的分离。因此我们认为本方法具有良好的专属性。

[0032] (5) 与现有的方法的比较

[0033] 在对专利(CN103293255A、CN103424496A)与本方法进行比较后:本文中的方法能分离的已结构确证杂质数量达到 8 个(参见图 1),不仅比原有的技术(CN103293255A)多分离出两个杂质,而且有六个杂质(Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide)是新分离出的;原有的技术(CN103293255A)用到的是尚未普及的超高效液相色谱法,本文中的技术为已普及的高效液相色谱法。

[0034] (6) 进样精密度

[0035] 取艾塞那肽杂质测定中的各溶液,精密吸取 40 μ l 进样,重复 6 次,记录各主峰面积,计算该方法进样精密度。结果表明,艾塞那肽及其各杂质峰面积的相对标准偏差均小于 2.0%,表明本方法的进样精密度良好。

[0036] (7) 艾塞那肽各杂质的回收率试验

[0037] 供试品溶液:精密称取艾塞那肽约 10mg,9 份,置于 10ml 的棕色容量瓶中,再相应精密加入各杂质对照品母液(含杂质 Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[0] Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide 的浓度约为 100 μ g/ml)0.5、1.0、1.5ml 各三份,用 25%乙腈溶解并定容,备用。

[0038] 对照品溶液:精密吸取艾塞那肽各杂质对照品母液(含杂质的浓度约为 100 μ g/ml) 1.0ml,置于 10ml 的棕色容量瓶中,25%乙腈稀释定容,备用。

[0039] 按照上述艾塞那肽及其各杂质 HPLC 法测定。计算,结果见表 1。

[0040]

表 1

杂质名称	回收率均值 (%)	回收率 RSD (%)
Exenatide fragment3-39	99.34	1.31
Acetyl Exenatide	98.84	1.40
L-Glu ¹³ Exenatide	99.03	0.93
D-Ser ⁸ Exenatide	98.86	1.24
D-Ser ¹¹ Exenatide	98.27	1.93
Met[O]Exenatide	99.26	1.20
D-His ¹ Exenatide	99.17	0.84
Des-Gly ² Exenatide	99.51	1.83

[0041] 以上结果表明：本发明对艾塞那肽各杂质(D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[O] Exenatide、Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide)测定的回收率良好。

[0042] (8) 线性及范围

[0043] 精密量取艾塞那肽各杂质的对照品母液(含杂质 D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[O] Exenatide、Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide 的浓度约为 100 μ g/ml)0.5、0.7、1.0、1.2、1.5、2.0ml,置于 10ml 的棕色容量瓶中,用 25% 乙腈稀释定容,分别取 40 μ l 进样,记录峰面积。计算浓度与峰面积之间的线性关系,得回归曲线与回归方程。

[0044] 结果显示：各杂质(D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[O] Exenatide、Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide)浓度在 5 ~ 20 μ g/ml 范围内,艾塞那肽各杂质的峰面积与浓度之间有良好的线性关系,相关系数 r 值均大于 0.9991。

[0045] (9) 检测限及定量限

[0046] 将艾塞那肽各杂质的对照品母液(含杂质 D-Ser⁸ Exenatide、D-Ser¹¹ Exenatide、Met[O] Exenatide、Exenatide fragment3-39、Acetyl Exenatide、L-Glu¹³ Exenatide、D-His¹ Exenatide、Des-Gly² Exenatide 的浓度约为 100 μ g/ml)用 25% 乙腈进行逐级稀释,注入色谱仪,记录峰高,当各杂质峰高为基线噪声的 10 倍高时的浓度为定量限浓度、2 ~ 3 倍高时的浓度为检测限浓度,各杂质的定量限均为 :25ng/ml ;定量限均为 :10ng/ml。

[0047] (10) 方法耐用性

[0048] 在艾塞那肽杂质测定方法的方法学研究及杂质测定中,我们曾使用过不同的液相仪及不同品牌的色谱柱,其结果均为一致。因此表明本方法的耐用性能达到要求。

[0049] (11) 测试溶液的稳定性

[0050] 取艾塞那肽及其各杂质的测试溶液,放置,分别于不同时间进样,记录峰面积,视其稳定性。结果表明：艾塞那肽及其相关的杂质各测试溶液在 8 时的峰面积未见明显变化,即测试溶液在本方法的条件下 8 小时内稳定。

[0051] 按以下检测方法对四批艾塞那肽样品的各杂质进行检测。

[0052] 实施例 2 按照高效液相色谱法(中国药典 2010 年版二部附录 V A)测定。

[0053] 艾塞那肽的各杂质测定：用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈—庚烷磺酸钠溶液(1.2mmol/L 庚烷磺酸钠溶液,磷酸调 pH 至 4.0) (10:90) 为流动相 A,乙腈—庚烷

磺酸钠溶液(52:48)为流动相B,照下表2进行梯度洗脱。

表2

时间(分)	A%	B%
0	60	40
60	25	75
60.5	60	40
65	60	40

[0055] 检测波长为214nm;流速1.2ml/min;自动进样器温度为6℃;柱温为40℃主峰与杂峰的分离度应符合要求。

[0056] 艾塞那肽供试品溶液的制备:取艾塞那肽样品适量(约含艾塞那肽10mg),精密称定,用25%乙腈配制成浓度为每1ml中约含艾塞那肽1mg的溶液,摇匀,备用。

[0057] 测定法:在本发明的色谱条件下,取供试品溶液各40μl,注入色谱仪,记录色谱图,以面积归一法计算艾塞那肽杂质的含量。结果见表3。

[0058]

表3

样品序号 含量(%) 杂质名称	1	2	3	4
	Exenatide fragment3-39	0.11	0.16	0.16
Acetyl Exenatide	0.22	/	0.13	/
L-Glu ¹³ Exenatide	/	/	0.21	0.22
D-Ser ⁸ Exenatide	0.11	0.20	0.15	0.26
D-Ser ¹¹ Exenatide	/	/	/	0.13
Met[O]Exenatide	/	0.27	/	0.37
D-His ¹ Exenatide	0.13	0.12	/	/
Des-Gly ² Exenatide	0.34	0.45	0.38	0.56

[0059] 实施例3 按照高效液相色谱法(中国药典2010年版二部附录V A)测定。

[0060] 艾塞那肽的各杂质测定:用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈-庚烷磺酸钠溶液(1.8mmol/L庚烷磺酸钠溶液,磷酸调pH至4.8)(10:90)为流动相A,乙腈-庚烷磺酸钠溶液(52:48)为流动相B,照下表4进行梯度洗脱。

[0061]

表4

时间(分)	A%	B%
0	60	40
60	25	75
60.5	60	40
65	60	40

[0062] 检测波长为214nm;流速1.2ml/min;自动进样器温度为6℃;柱温为40℃主峰与杂峰的分离度应符合要求。

[0063] 艾塞那肽杂质供试品溶液的制备:取艾塞那肽样品适量(约含艾塞那肽 10mg),精密称定,用 25% 乙腈配制成浓度为每 1ml 中约含艾塞那肽 1mg 的溶液,摇匀,备用。

[0064] 测定法:在本发明的色谱条件下,取供试品溶液各 40 μ l,注入色谱仪,记录色谱图,以面积归一法计算艾塞那肽的杂质的含量。结果见表 5。

[0065]

表 5

样品序号 \ 杂质名称	1	2	3	4
Exenatide fragment3-39	0.12	0.12	0.17	0.13
Acetyl Exenatide	0.25	/	0.15	/
L-Glu ¹³ Exenatide	/	/	0.21	0.22
D-Ser ⁸ Exenatide	0.13	0.19	0.12	0.28
D-Ser ¹¹ Exenatide	/	/	/	0.15
Met(O)Exenatide	/	0.24	/	0.39
D-His ¹ Exenatide	0.17	0.16	/	/
Des-Gly ² Exenatide	0.38	0.42	0.39	0.52

[0066] 实施例 4 按照高效液相色谱法(中国药典 2010 年版二部附录 V A)测定。

[0067] 艾塞那肽的各杂质测定:用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈—癸烷磺酸钠溶液(1.1mmol/L 癸烷磺酸钠溶液,磷酸调 pH 至 4.0) (10:90) 为流动相 A,乙腈—癸烷磺酸钠溶液(52:48) 为流动相 B,照下表 6 进行梯度洗脱。

[0068]

表 6

时间(分)	A%	B%
0	60	40
60	25	75
60.5	60	40
65	60	40

[0069] 检测波长为 214nm ;流速 1.2ml/min ;自动进样器温度为 6 $^{\circ}$ C ;柱温为 40 $^{\circ}$ C 主峰与杂峰的分离度应符合要求。

[0070] 艾塞那肽杂质供试品溶液的制备:取艾塞那肽适量(约含艾塞那肽 10mg),精密称定,用 25% 乙腈配制成浓度为每 1ml 中约含艾塞那肽 1mg 的溶液,摇匀,备用。

[0071] 测定法:在本发明的色谱条件下,取供试品溶液各 40 μ l,注入色谱仪,记录色谱图,以面积归一法计算艾塞那肽的杂质的含量。结果见表 7。

[0072]

表 7

杂质名称	样品序号			
	1	2	3	4
Exenatide fragment3-39	0.14	0.16	0.14	0.11
Acetyl Exenatide	0.21	/	0.13	/
L-Glu ¹³ Exenatide	/	/	0.20	0.23
D-Ser ⁸ Exenatide	0.11	0.17	0.16	0.17
D-Ser ¹¹ Exenatide	/	/	/	0.11
Met[O]Exenatide	/	0.24	/	0.37
D-His ¹ Exenatide	0.12	0.18	/	/
Des-Gly ² Exenatide	0.35	0.43	0.37	0.51

[0073] 实施例 5 按照高效液相色谱法(中国药典 2010 年版二部附录 V A)测定。

[0074] 艾塞那肽的各杂质测定:用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈—癸烷磺酸钠溶液(1.8mmol/L 癸烷磺酸钠溶液,磷酸调 pH 至 4.8)(10:90)为流动相 A,乙腈—癸烷磺酸钠溶液(52:48)为流动相 B,照下表 8 进行梯度洗脱。

[0075]

表 8

时间(分)	A%	B%
0	60	40
60	25	75
60.5	60	40
65	60	40

[0076] 检测波长为 214nm;流速 1.2ml/min;自动进样器温度为 6℃;柱温为 40℃主峰与杂峰的分离度应符合要求。

[0077] 艾塞那肽杂质供试品溶液的制备:取艾塞那肽样品适量(约含艾塞那肽 10mg),精密称定,用 25% 乙腈配制成浓度为每 1ml 中约含艾塞那肽 1mg 的溶液,摇匀,备用。

[0078] 测定法:在本发明的色谱条件下,取供试品溶液各 40 μl,注入色谱仪,记录色谱图,以面积归一法计算艾塞那肽的杂质的含量。结果见表 9。

[0079]

表 9

杂质名称	样品序号			
	1	2	3	4
Exenatide fragment3-39	0.13	0.14	0.16	0.13
Acetyl Exenatide	0.22	/	0.12	/
L-Glu ¹³ Exenatide	/	/	0.20	0.23
D-Ser ⁸ Exenatide	0.12	0.14	0.17	0.13
D-Ser ¹¹ Exenatide	/	/	/	0.15
Met[O]Exenatide	/	0.21	/	0.35
D-His ¹ Exenatide	0.13	0.17	/	/
Des-Gly ² Exenatide	0.40	0.41	0.29	0.49

[0080] 实施例 6 高效液相色谱法(中国药典 2010 年版二部附录 V A)测定。

[0081] 艾塞那肽的各杂质测定:用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈—烷基磺酸钠混合溶液(0.25mmol/L 庚烷磺酸钠、0.25mmol/L 戊烷磺酸钠、0.25mmol/L 己烷磺酸钠、0.25mmol/L 辛烷磺酸钠、0.25mmol/L 壬烷磺酸钠、0.25mmol/L 癸烷磺酸钠混合溶液,磷酸调 pH 至 4.2)(10:90)为流动相 A,乙腈—烷基磺酸钠混合溶液(52:48)为流动相 B,按照表 10 进行梯度洗脱。

[0082]

表 10

时间(分)	A%	B%
0	60	40
60	25	75
60.5	60	40
65	60	40

[0083] 检测波长为 214nm;流速 1.2ml/min;自动进样器温度为 6℃;柱温为 40℃主峰与杂峰的分离度应符合要求。

[0084] 艾塞那肽杂质供试品溶液的制备:取艾塞那肽样品适量(约含艾塞那肽 10mg),精密称定,用 25% 乙腈配制成浓度为每 1ml 中约含艾塞那肽 1mg 的溶液,摇匀,备用。

[0085] 测定法:在本发明的色谱条件下,取供试品溶液各 40 μl,注入色谱仪,记录色谱图,以面积归一法计算艾塞那肽的杂质的含量。结果见下表 11。

表 11

杂质名称	样品序号			
	1	2	3	4
Exenatide fragment3-39	0.17	0.15	0.18	0.14
Acetyl Exenatide	0.21	/	0.11	/
L-Glu ¹³ Exenatide	/	/	0.21	0.23
D-Ser ⁸ Exenatide	0.11	0.15	0.15	0.16
D-Ser ¹¹ Exenatide	/	/	/	0.14
Met[O]Exenatide	/	0.24	/	0.33
D-His ¹ Exenatide	0.13	0.17	/	/
Des-Gly ² Exenatide	0.39	0.38	0.27	0.52

[0086]

[0087] 实施例 7 高效液相色谱法(中国药典 2010 年版二部附录 V A)测定。

[0088] 艾塞那肽的各杂质测定:用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈-庚烷磺酸钠溶液(1.5mmol/L 庚烷磺酸钠溶液,磷酸调 pH 至 3.9)(10:90)为流动相 A,乙腈-庚烷磺酸钠溶液(52:48)为流动相 B,按照表 12 进行梯度洗脱。

[0089]

表 12

时间(分)	A%	B%
0	60	40
60	25	75
60.5	60	40
65	60	40

[0090] 检测波长为 214nm;流速 1.2ml/min;自动进样器温度为 6℃;柱温为 40℃主峰与杂峰的分度应符合要求。

[0091] 艾塞那肽杂质供试品溶液的制备:取艾塞那肽样品适量(约含艾塞那肽 10mg),精密称定,用 25% 乙腈配制成浓度为每 1ml 中约含艾塞那肽 1mg 的溶液,摇匀,备用。

[0092] 测定法:在本发明的色谱条件下,取供试品溶液各 40 μl,注入色谱仪,记录色谱图,以面积归一法计算艾塞那肽的杂质的含量。结果见表 13。

[0093]

表 13

杂质名称	样品序号			
	1	2	3	4
Exenatide fragment3-39	0.16	0.17	0.16	0.15
Acetyl Exenatide	0.21	/	0.15	/
L-Glu ¹³ Exenatide	/	/	0.22	0.21
D-Ser ⁸ Exenatide	0.13	0.12	0.17	0.15
D-Ser ¹¹ Exenatide	/	/	/	0.16
Met[O]Exenatide	/	0.25	/	0.31
D-His ¹ Exenatide	0.15	0.17	/	/
Des-Gly ² Exenatide	0.41	0.40	0.25	0.51

[0094] 结果：艾塞那肽的峰与其他的杂质峰分离度不能达到中国药典的要求，因此无法得出杂质的正确结果。

[0095] 实施例 8 高效液相色谱法(中国药典 2010 年版二部附录 V A)测定。

[0096] 艾塞那肽的各杂质测定：用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以乙腈—庚烷磺酸钠溶液(1.9mmol/L 庚烷磺酸钠溶液，磷酸调 pH 至 4.7) (10:90) 为流动相 A，乙腈—庚烷磺酸钠溶液(52:48) 为流动相 B，照表 14 进行梯度洗脱。

[0097]

表 14

时间(分)	A%	B%
0	60	40
60	25	75
60.5	60	40
65	60	40

[0098] 检测波长为 214nm；流速 1.2ml/min；自动进样器温度为 6℃；柱温为 40℃主峰与杂峰的分度应符合要求。

[0099] 艾塞那肽杂质供试品溶液的制备：取艾塞那肽样品适量(约含艾塞那肽 10mg)，精密称定，用 25% 乙腈配制成浓度为每 1ml 中约含艾塞那肽 1mg 的溶液，摇匀，备用。

[0100] 测定法：在本发明的色谱条件下，取供试品溶液各 40 μl，注入色谱仪，记录色谱图，以面积归一法计算艾塞那肽的杂质的含量。

[0101] 结果：主峰保留时间约为 45 分钟，杂质峰的相对保留时间约为 0.93。艾塞那肽的峰与其他的杂质峰分离度不能达到中国药典的要求。因此无法得出杂质的正确结果。

[0102] 从实施例 1-5 和实施例 6-7 (比较实施例)的结果可以看出：本发明方法简单，又能达到中国药典的要求，明显优于已公开的技术，因此该方法更适用于艾塞那肽及其杂质的测定。

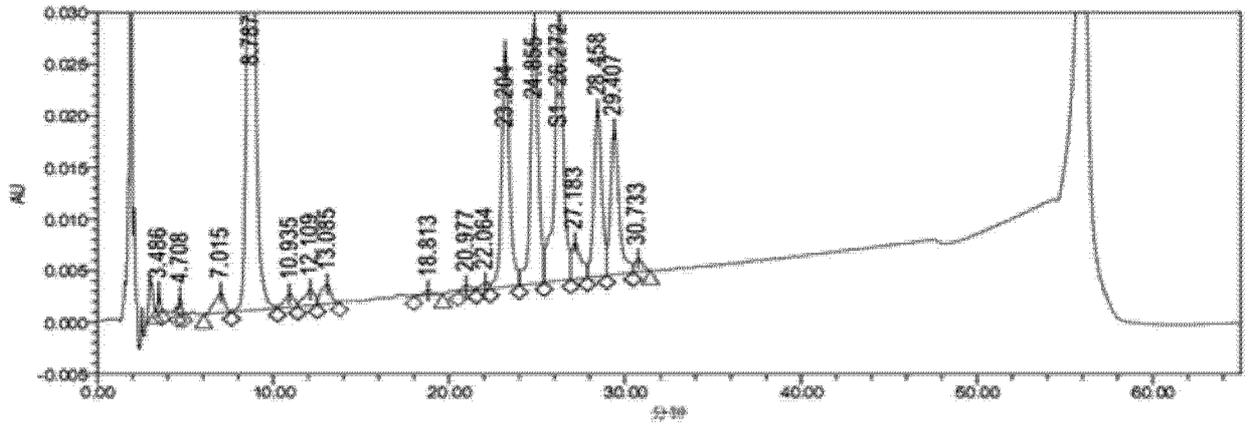


图 1