

## HPLC 法同时测定 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中的 6 个杂质\*

杨欣茹, 李铁健, 胡发红, 韩忠丽, 张贵民\*\*

(鲁南制药集团股份有限公司, 国家手性制药工程技术研究中心, 临沂 273400)

**摘要** 目的: 建立高效液相色谱同时测定 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中 6 个特定杂质的方法。方法: 采用 YMC Triart C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以 0.1% 三氟乙酸水溶液为流动相 A, 以 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液为流动相 B, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 梯度洗脱, 检测波长 265 nm, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL。结果: *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸与相邻杂质峰的分离良好; 6 个杂质分离度均大于 1.5; 且在相应质量浓度范围内呈现良好的线性关系 ( $r \geq 0.999$ ); 6 个杂质检测限和定量限分别约为 0.03 μg · mL<sup>-1</sup> 和 0.06 μg · mL<sup>-1</sup>; 6 个杂质的平均回收率 ( $n=9$ ) 在 97.6%~98.8% 范围内。3 批 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸测定结果显示, 杂质 1 的含量 < 0.2%, 杂质 4 的含量 < 0.1%, 其他 4 种杂质未检出, 总杂含量 < 1%。结论: 本方法分离度好, 灵敏度高, 专属性强, 适用于 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中有关物质的检测。

**关键词:** *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸; 高效液相色谱法; 杂质; 梯度洗脱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)03-0468-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.03.12

## Determination of six related substances in

## *N*-fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine by HPLC\*

YANG Xin-ru, LI Tie-jian, HU Fa-hong, HAN Zhong-li, ZHANG Gui-min\*\*

(National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutical, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 273400, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method for the determination of six related substances in *N*-fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine. **Methods:** The analysis was conducted on YMC Triart C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 3 μm) column, the mobile phase was consisted with 0.1% trifluoroacetic acid in water (A) and 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile (B) at the flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The column temperature was set 30 °C, the detection wavelength was 265 nm and the injection volume was 10 μL. **Results:** *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine had good separation from the adjacent impurity peaks; The resolution of impurity 1-6 was greater than 1.5, and showed a good linear relationship ( $r \geq 0.999$ ) in the corresponding mass concentration range, the detection limit of impurity 1-6 was 0.03 μg · mL<sup>-1</sup>, and the quantitative limit was 0.06 μg · mL<sup>-1</sup>, the average recovery rate ( $n=9$ ) of impurity 1-6 was in the range of 97.6%~98.8%.

\* 山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY010516)

\*\* 通信作者 Tel: (0539) 8336002; E-mail: lunanzhangguimin@163.com

第一作者 Tel: 13407680882; E-mail: yangxinru2005@163.com

The results of the three batches of *N*-fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine showed that the contents of impurity 2, impurity 4 were <0.2% and <0.1%, respectively, and the other four impurities were not detected, and content of the total impurity was <1%. **Conclusion:** This method has good resolution, high sensitivity and strong specificity, and is suitable for the determination of related substances in *N*-fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine.

**Keywords:** *N*-fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine; HPLC; the six impurities; gradient elution

多肽类临床药物是治疗多种疾病的大宗基础性药物,该类药物约占全世界总临床药物的5%~8%左右。多肽类药已经用于各种疾病的治疗<sup>[1-6]</sup>。多肽药物的合成工艺主要为经典的液相合成和固相合成,其中固相合成技术日趋成熟<sup>[7-8]</sup>。保护氨基酸是固相合成多肽的起始物料之一,其质量对多肽的质量有重要的影响。吴一凡<sup>[9-10]</sup>等在审评中发现申请人在进行固相合成多肽的研发时多关注于合成策略及保护氨基酸的投料比、裂解剂的选择,而对起始物料-保护氨基酸的研究不够全面,具体表现为保护氨基酸的纯度检测方法专属性差(如仅仅使用TLC法进行杂质控制)或限度过于宽松,无法有效控制起始物料的质量,也无法有效保证原料药的质量。多肽合成过程中,由起始物料引入的杂质所产生的相关杂质在纯化过程中可能与目标肽共洗脱,因此杂质很难减少或消除。为了尽量减少对终产物的潜在影响,这类杂质的限度应严格控制<sup>[11]</sup>。国家药品监督管理局2023年出台的《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则》<sup>[12]</sup>中指出,由于保护氨基酸中的杂质可能伴随化学反应而发生杂质传递和转化,继而增加多肽药物的提纯难度,应增加必要的杂质研究,同时制定合理的控制限度。应结合保护氨基酸的合成工艺确定杂质谱组成。由此可见,保护氨基酸中杂质控制非常重要。

*N*-苄氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine),是保护氨基酸中的一种化合物,其制备工艺比较复杂,结合工艺路线及反应机理,*N*-苄氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中可能含有的杂质为Fmoc-Thr-OH(杂质1)、Fmoc-β-Ala-OH(杂质2)、Fmoc-β-Ala-Thr(tBu)-OH(杂质3)、Fmoc-Thr(tBu)-Thr(tBu)-OH(杂质4)、Fmoc-β-Ala-β-Ala-OH(杂质5)、Fmoc-Ala-Ala-

OH(杂质6),结构式见图1,其中,杂质1为侧链保护基丢失产生,杂质2、杂质3、杂质4为引入Fmoc保护基时产生的杂质,杂质5、杂质6为起始原料引入。多肽药物质量控制的文献多有报道<sup>[13-15]</sup>,但保护氨基酸质量控制的文献鲜有报道<sup>[16-18]</sup>,未检索到同时测定*N*-苄氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中6个杂质的文献。本文开发了一种高效液相色谱方法,同时测定了*N*-苄氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中的6个杂质,为保护氨基酸中杂质控制提供参考。

## 1 仪器与试剂

Thermo Ultimate 3000 高效液相色谱仪配 Chromleon Console 工作站(Thermo 公司); MS205DU 十万分之一电子天平(Mettler Toledo 公司); Milli-Q 超纯水机(默克密理博公司)。

*N*-苄氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸(批号 GLS221008-36202、GLS220719-36202、GLS220524-36202-1)和杂质1对照品(批号 GLS220606-36201,含量93.26%)、杂质2对照品(批号 GLS210529-35003,含量99.39%)、杂质3对照品(批号 GLS220605-35068,含量99.07%)、杂质4对照品(批号 GLS210302-36242,含量98.68%)、杂质5对照品(批号 GLS220322-35073,含量96.65%)、杂质6对照品(批号 GLS220927-J10867,含量98.52%),均购自吉尔生化(上海)有限公司;三氟乙酸(色谱级,TCI公司),乙腈(色谱级,Merck公司),纯化水(自制)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 YMC Triart C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 3 μm),流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸水溶液,流动相 B 为 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液,洗脱程序见表 1,检测波长为 265 nm,流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,柱温为 30 °C,进样量为 10 μL。

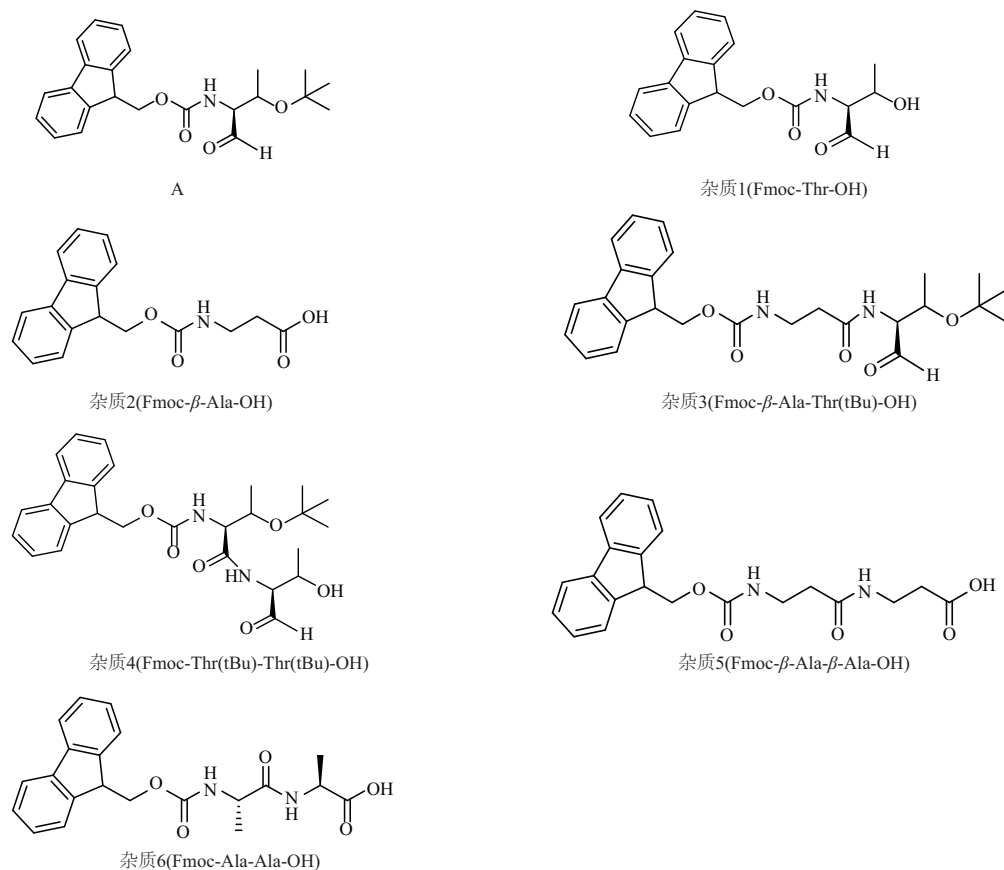
图1 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸(A)及杂质的化学结构Fig. 1 Chemical structures of *N*-fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine(A) and impurities

表1 洗脱程序表

Tab. 1 Gradient elution program

| 时间<br>(time)/min | 流动相比比例(ratio of mobile phase)/% |     |
|------------------|---------------------------------|-----|
|                  | A                               | B   |
| 0                | 50                              | 50  |
| 5                | 50                              | 50  |
| 15               | 40                              | 60  |
| 30               | 0                               | 100 |
| 35               | 0                               | 100 |
| 36               | 50                              | 50  |
| 45               | 50                              | 50  |

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1** 空白溶剂 乙腈-水(50:50)为空白溶剂。

**2.2.2** 杂质对照品储备液 精密称定杂质1~6对照品各约12.5 mg,分别置25 mL量瓶中,加空白溶剂溶解并定容,摇匀,制成各杂质质量浓度均为0.5 mg·mL<sup>-1</sup>的杂质对照品储备液。

**2.2.3** 混合对照品溶液 精密量取“2.1.2”项各杂质对照品储备液各100 μL,置同一10 mL量瓶中,用空白溶剂稀释并定容至刻度,摇匀,制成各杂质质量浓度均为5 μg·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**2.2.4** 杂质定位溶液 取“2.1.2”项各杂质对照品储备液各100 μL,分别置10 mL量瓶中,用空白溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.2.5** 供试品加标溶液 取*N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸约25 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,加适量空白溶剂溶解,再加入“2.1.2”项各杂质储备液250 μL,用空白溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.1.6** 供试品溶液 取*N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸约25 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,加空白溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.1.7** 供试品自身对照溶液 精密量取供试品溶液0.5 mL,置100 mL量瓶中,用空白溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

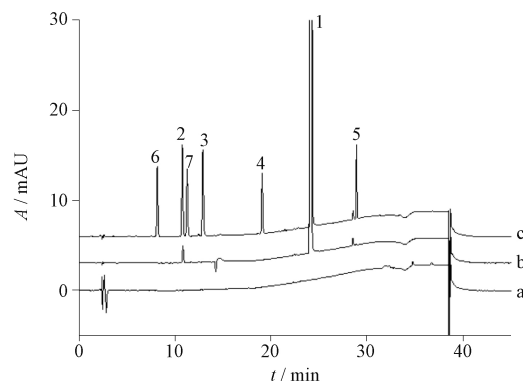
## 2.3 方法学考察

**2.3.1 专属性试验** 取空白溶剂、各杂质定位溶液、供试品溶液、供试品加标溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,并记录色谱图。结果如图2所示,空白溶剂对 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸有关物质的测定无干扰,供试品溶液及供试品加标溶液中 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸主峰与相邻杂质分离度、各个杂质间分离度均大于1.5,专属性良好。

精密称取 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸约10 mg,共6份,各置20 mL量瓶中,分别进行酸、碱、氧化、光照及高温破坏试验。①未破坏溶液:加空白溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀;②高温破坏溶液:于105 °C条件下放置48 h,取出放冷,加空白溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀;③光照破坏溶液:置复合光照箱内(25 °C,5 000 lx),放置12 d,取出,加空白溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀;④酸破坏溶液:加入1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液1 mL,摇匀,室温放置20 h后加入1 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液1 mL中和,加空白溶剂稀释至刻度,摇匀;⑤碱破坏溶液:加入1 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液1 mL,摇匀,室温放置2 min后加入1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液1 mL中和,加空白溶剂稀释至刻度,摇匀;⑥氧化破坏溶液:加入5%过氧化氢溶液2 mL,摇匀,室温放置1 h,加空白溶剂稀释至刻度,摇匀。将上述溶液分别按“2.1”项下色谱条件进行测定,并记录色谱图,空白溶剂、供试品加标溶液、供试品溶液、强降解试验色谱图见图1、2。

结果显示,*N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸对酸、高温、光照条件较稳定,杂质个数、杂质总量无明显变化;对碱、氧化条件下有不同程度的降解,各有关物质及主峰均可完全分离,经峰纯度考察,主峰均为纯峰,以未破坏溶液的主峰含量为100%,计算上述各破坏条件下主药的物料平衡情况,结果显示物料守恒。说明本方法专属性好,能有效检出 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中的降解产物。

**2.3.2 检测限与定量限** 分别称取杂质1~杂质6对照品适量,加入溶剂溶解后逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件进行测定,以信噪比  $S/N \geq 3$  计算检测限(LOD),以信噪比  $S/N \geq 10$  计算定量限(LOQ)。结果表明杂质1~杂质6的LOD均约为0.03 μg·mL<sup>-1</sup>。



1. *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine) 2~7. 杂质1~6 (impurity 1~6)

a. 空白溶剂(blank solvent) b. 供试品溶液(sample solution) c. 供试品加标溶液(mixed solution)

图2 专属性图谱

Fig.2 Specificity Chromatograms

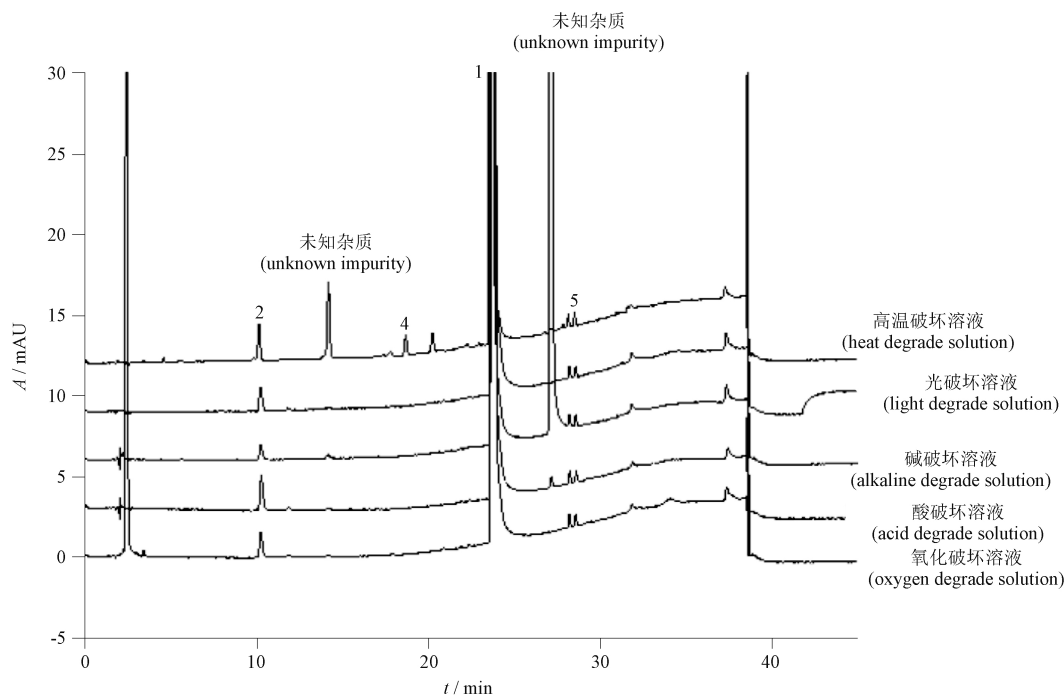
LOQ均约为0.06 μg·mL<sup>-1</sup>。取LOQ溶液,连续进样6针,计算杂质1~杂质6峰面积的RSD( $n=6$ )均小于5.0%,表明本方法灵敏度较高。

**2.3.3 线性关系试验** 取 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸适量,精密称定,加溶剂溶解并稀释制成每1 mL中约含0.5 mg的溶液,得 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸储备溶液。

按“2.2”项下配制供试品溶液及各杂质对照品储备液,配制成6个线性溶液。取“2.3.2”项下定量限溶液及6个线性溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,并记录色谱图。以浓度  $C$  为横坐标、峰面积  $A$  为纵坐标,进行线性回归,得回归方程。结果见表2, *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸、杂质1~杂质6的相关系数  $r$  均大于0.990 0,各有关物质在相应的浓度范围内线性关系良好。

**2.3.4 精密度试验** 按“2.2”项下配制各杂质对照品储备溶液及对照品溶液,取 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸约25 mg精密称定,置50 mL量瓶中,先加适量空白溶剂溶解,再分别加入各杂质储备溶液250 μL,用溶剂稀释至刻度,摇匀,作为重复性溶液,平行配制6份,分别进样。结果显示,6份重复性溶液中杂质1~杂质6含量的平均值( $n=6$ )分别为0.59%、0.50%、0.50%、0.56%、0.49%、0.49%,RSD分别为1.6%、1.0%、0.82%、1.1%、1.1%、1.3%,说明重复性良好。

更换分析人员及检测仪器,于不同日期同法



1. *N*-苄氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸(*N*-fluorenylmethoxycarbonyl-*O*-tert-butyl-*L*-threonine) 2. 杂质1(impurity 1) 4. 杂质3(impurity 3) 5. 杂质4(impurity 4)

图3 强降解试验色谱图

Fig. 3 Chromatograms of forced degradation

表2 线性试验结果

Tab.2 Results of Linearity Test

| 化合物<br>(compound)  | 线性范围<br>(linear range)/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 线性方程<br>(linear equation) | <i>r</i> | 校正因子<br>(correction factor) |
|--|---|---------------------------|----------|-----------------------------|
| <i>N</i> -苄氧羰基- <i>O</i> -叔丁基- <i>L</i> -苏氨酸( <i>N</i> -fluorenylmethoxycarbonyl- <i>O</i> -tert-butyl- <i>L</i> -threonine) | 0.062 ~ 4.944   | $Y = 0.4544X - 0.0152$    | 0.9998   | -                           |
| 杂质1(impurity 1)  | 0.059 ~ 4.697   | $Y = 0.5214X - 0.0045$    | 0.9997   | 0.87                        |
| 杂质2(impurity 2)  | 0.061 ~ 4.894   | $Y = 0.5726X - 0.0165$    | 0.9998   | 0.79                        |
| 杂质3(impurity 3)  | 0.062 ~ 4.926   | $Y = 0.3765X - 0.0126$    | 0.9998   | 1.21                        |
| 杂质4(impurity 4)  | 0.062 ~ 4.950   | $Y = 0.3103X - 0.0081$    | 0.9998   | 1.46                        |
| 杂质5(impurity 5)  | 0.060 ~ 4.782   | $Y = 0.4673X - 0.0110$    | 0.9998   | 0.97                        |
| 杂质6(impurity 6)  | 0.062 ~ 4.946   | $Y = 0.4599X - 0.0062$    | 0.9997   | 0.99                        |

试验6次,与重复性试验6个数据结果一并计算RSD。结果显示,12份加标溶液中杂质1~6含量的平均值( $n = 12$ )分别为0.59%、0.50%、0.49%、0.56%、0.48%、0.49%,RSD( $n = 12$ )分别为1.1%、1.6%、0.76%、0.68%、0.67%、0.79%,说明精密度高。

**2.3.5 回收率试验** 按“2.2”项方法配制各杂质对照品储备液、混合对照品溶液、供试品溶液。

精密量取各杂质对照品储备液适量,加入供试

品溶液中,分别配制定量浓度80%、100%、120%的回收率溶液,每个浓度平行配置3份。精密量取各回收率溶液0.5 mL,分别置100 mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀,作为回收率自身对照溶液。

取对照品溶液、供试品溶液、各浓度回收率溶液及回收率自身对照溶液,分别进样,计算各杂质的回收率及RSD;分别用外标法及加校正因子的自身对照法计算各准确度溶液中特定杂质含量,比较2种算法的差距。结果表明,杂质1~6的平均回收率( $n$

= 9) 分别为 98.6%、98.7%、98.8%、97.6%、98.3%、98.1%, RSD( $n=9$ ) 分别为 3.0%、0.68%、0.96%、2.1%、1.1%、0.88%, 2 种算法结果无明显差异。

**2.3.6 溶液稳定性考察** 考察供试品溶液、对照品溶液、供试品加标溶液于室温(25 °C)条件下放置 0、4、8、12、20 h 的稳定性。结果显示, 供试品溶液、对照品溶液、供试品加标溶液于室温条件下放置 20 h 内基本稳定。

**2.3.7 耐用性考察** 在“2.1”项下色谱条件的基础上, 分别改变柱温( $\pm 2$  °C)、流速( $\pm 0.1$  mL·min<sup>-1</sup>), 更换不同批号的色谱柱, 其他色谱条件不

变, 考察方法的耐用性。分别按外标法以及加校正因子的自身对照法计算供试品加标溶液中各特定杂质含量。结果表明, 当各条件微小改变时, 供试品加标溶液中各杂质的含量基本一致, RSD 均小于 2.0%, 表明本法耐用性良好。外标法及加校正因子的自身对照法分别计算供试品加标溶液中特定杂质含量, 结果基本一致, 表明加校正因子的自身对照法可准确用于本品有关物质计算。

## 2.4 样品测定

取 3 批 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸原料药, 依法测定, 结果如表 3 所示, 检测结果符合拟定的有关物质限度标准。

表 3 样品检测结果

Tab.3 Results of sample test

| 化合物<br>(compound)           | 有关物质含量(content of related substance)/% |                               |                           |
|-----------------------------|--|-------------------------------|---------------------------|
|                             | lot No. GLS221008 - 36202              | lot No. GLS220524 - 36202 - 1 | lot No. GLS220719 - 36202 |
| 杂质 1 (impurity 1)           | 0.12                                   | 0.11                          | 0.068                     |
| 杂质 2 (impurity 2)           | -                                      | -                             | -                         |
| 杂质 3 (impurity 3)           | -                                      | -                             | -                         |
| 杂质 4 (impurity 4)           | 0.056                                  | 0.008 5                       | 0.007 3                   |
| 杂质 5 (impurity 5)           | -                                      | -                             | -                         |
| 杂质 6 (impurity 6)           | -                                      | -                             | -                         |
| 未知杂质 (unspecified impurity) | 0.041                                  | 0.039                         | 0.060                     |
| 总杂质 (total impurity)        | 0.28                                   | 0.17                          | 0.23                      |

注 (note): “-”. 未检出 (not detected)

## 3 讨论与结论

采用二极管阵列检测器 (DAD) 对 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸、杂质 1~6 进行全波长扫描, 结果显示, *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸、杂质 1~6 均在 265 nm 附近有最大吸收, 因此选择 265 nm 作为有关物质的检测波长。流动相采用三氟乙酸水溶液和三氟乙酸乙腈溶液体系, 通过调整梯度洗脱程序, 实现了 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸与相邻杂质、各杂质之间的基线分离。在方法学验证中对外标法和加校正因子的自身对照法进行了对比, 从结果可以看出, 外标法和加校正因子的自身对照法均可以准确地测定 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中的 6 个杂质的含量, 结果无明显差异。因外标法需用到杂质对照品, 杂质对照品难获得, 而加校正因子的自身对照法不需杂质对照品, 操作简

单, 因此, 可以用加校正因子的自身对照法对 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中的 6 个杂质进行检测。

## 3.4 小结

本研究建立了加校正因子的自身对照法同时检测 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中 6 个特定杂质的方法, 灵敏度高, 专属性强, 准确度高, 适用于 *N*-苄甲氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-苏氨酸中有关物质的检测, 为多肽药物起始物料保护氨基酸质量研究提供了依据。

## 参考文献

- [1] 高云龙. 多肽药物合成和纯化方法发展现状[J]. 医药前沿, 2022, 12(14):22  
GAO YL. Development status of peptide drug synthesis and purification methods[J]. J Front Med, 2022, 12(14):22
- [2] 牛潇爽, 胡争, 周秀曼, 等. 多肽药物在肿瘤免疫治疗中的研

- 究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2023, 50(6):272  
NIU XS, HU Z, ZHOU XM, *et al.* Research progress on peptide drugs in cancer immunotherapy[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2023, 50(6):272
- [3] 郑龙, 田佳鑫, 张泽鹏, 等. 多肽药物制备工艺研究进展[J]. 化工学报, 2021, 72(7):3538  
ZHENG L, TIAN JX, ZHANG ZP, *et al.* Progress on pharmaceutical engineering of peptide-based drugs[J]. *CIESC J*, 2021, 72(7):3538
- [4] 徐晓寒, 吴闻哲. 多肽类药物微球注射制剂的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(10):985  
XU XH, WU WZ. Progress in injectable microsphere formulations of peptide drugs[J]. *Chin J Pharm*, 2014, 45(10):985
- [5] 顾玲玲, 吴忠虹, 尹霞, 等. 多肽类药物长效微球制剂仿制药研发要点浅析[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(11):1436  
GU LL, WU ZH, YIN X, *et al.* Introduction to key points for development of generic long-acting microsphere preparations of peptide drugs[J]. *Chin J Pharm*, 2021, 52(11):1436
- [6] 戴佳, 赵巧君, 童玥. 合成多肽药物质量控制研究探讨[J]. 药物生物技术, 2023, 30(1):69  
DAI J, ZHAO QJ, TONG Y. Quality control of synthetic peptide drugs[J]. *Pharm Biotechnol*, 2023, 30(1):69
- [7] 林龙, 姜素云, 汤新强. 多肽类药物体外合成方法的研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2014, 36(2):177  
LIN L, JIANG SY, TANG XQ. Recent research progress in the methods of *in vitro* synthesis of peptide drugs[J]. *J Dalian Med Univ*, 2014, 36(2):177
- [8] 胡玉玺, 蒋煜, 韩天娇. 制备工艺和过程控制对合成多肽药物有关物质的影响[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(18):2143  
HU YX, JIANG Y, HAN TJ. Effects of manufacturing process and process control on related substances of synthetic peptide drugs[J]. *Chin J New Drugs*, 2017, 26(18):2143
- [9] 吴一凡, 刘福利. 多肽固相合成中起始物料的控制策略[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(10):937  
WU YF, LIU FL. The control strategy of starting materials used in solid-phase peptide synthesis[J]. *Chin J New Drugs*, 2022, 31(10):937
- [10] 王鹏. 合成多肽药物的合成工艺中关键问题分析[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(2):102  
WANG P. Analysis of key problem on synthesis of synthetic peptide drugs[J]. *Chin J New Drugs*, 2010, 19(2):102
- [11] EGGENI. Control strategies for synthetic therapeutic peptide APIs part I: analytical considerations[J]. *Biopharm Intern*, 2014, 27(3):16
- [12] 国家药品监督管理局. 化学合成多肽药物药学研究技术指导原则[S]. 2023  
National Medical Products Administration. Technical Guidelines for Research in the Synthetic Peptide Drugs[S]. 2023
- [13] 林凤强, 李铁健, 杨欣茹, 等. HPLC法 HILIC模式测定生长抑素中对映异构体 *D*-Ala1-生长抑素的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(3):419  
LIN FQ, LI TJ, YANG XR, *et al.* Determination of enantiomeric purity *D*-Ala1-somatostatin in somatostatin by HILIC HPLC[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(3):419
- [14] 李茜, 梅芊, 刘英. 醋酸奥曲肽原料及其制剂的杂质分析[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(3):492  
LI Q, MEI Q, LIU Y. Analysis of impurities in octreotide acetate and its injection[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(3):492
- [15] 忻余, 徐康森. 高效液相色谱法测定尿多肽注射液中分子肽的含量[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(3):191  
XIN Y, XU KS. HPLC determination of peptide's molecular weight in niaoduosuantai injection[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2001, 21(3):191
- [16] 邱芊, 陈永森. 固相多肽合成中氨基酸保护的研究进展[J]. 化工时刊, 2005, 19(6):56  
QIU Q, CHEN YS. The Development of amino protecting groups using in solid-phase peptide synthesis[J]. *Chem Ind Times*, 2005, 19(6):56
- [17] 林琳, 夏立钧, 许旭, 等. 大环糖肽抗生素键合相高效液相色谱法拆分7种氨基带保护基的氨基酸对映体[J]. 色谱, 2006, 24(2):144  
LIN L, XIA LJ, XU X, *et al.* Separation of enantiomers of amino acid derivatives by high performance liquid chromatography on teicoplanin chiral stationary phase[J]. *Chin J Chromatogr*, 2006, 24(2):144
- [18] 杨欣茹, 李铁健, 王金迪, 等. 反相高效液相色谱法测定 Fmoc-L-His(Trt)-OH中光学异构体 Fmoc-D-His(Trt)-OH的含量[J]. 中南药学, 2023, 21(8):2170  
YANG XR, LI TJ, WANG JD, *et al.* Determination of optical isomer Fmoc-D-His(Trt)-OH in Fmoc-L-His(Trt)-OH by RP-HPLC[J]. *Cent South Pharm*, 2023, 21(8):2170

(本文于2023年8月6日收到)