

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710141872.X

[51] Int. Cl.

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101366692A

[22] 申请日 2007.8.15

[21] 申请号 200710141872.X

[71] 申请人 江苏豪森药业股份有限公司

地址 222047 江苏省连云港市开发区第十工业小区

[72] 发明人 钟慧娟 吴玉霞 李语如

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书3页 说明书8页

[54] 发明名称

一种稳定的艾塞那肽制剂

[57] 摘要

本发明提供一种稳定的艾塞那肽制剂及其制备方法和其应用,以及制剂中艾塞那肽含量的测定方法。本发明的制剂长期稳定性明显提高,可用于防治糖尿病、得益于降低血浆血糖或延迟和/或减慢胃排空或抑制摄取食物的病症。

1、一种稳定的艾塞那肽制剂，所述制剂包括艾塞那肽、防腐剂、抗氧化剂、络合剂、渗透压调节剂、缓冲剂和 pH 调节剂。

2、根据权利要求 1 所述的制剂，所述制剂中艾塞那肽的含量为 0.005-0.4% (w/v)，优选为 0.010-0.10% (w/v)，更优选为 0.015-0.05% (w/v)，最优选为 0.025% (w/v)。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的制剂，所述的防腐剂为本领域常用的防腐剂，优选为间甲酚、苜醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸苯酯、苯酚、甲酚、三氯叔丁醇、对氯间甲酚的任一种或其组合，更优选为间甲酚或对氯间甲酚的任一种或其组合，所述防腐剂的用量为 0.1% (w/v) -2% (w/v)，优选 0.2% (w/v) -0.5% (w/v)。

4、根据权利要求 1-3 任一项所述的制剂，所述的抗氧化剂为本领域常用的抗氧化剂，优选为甲硫氨酸、V_C、半胱氨酸、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、二丁基苯酸、V_E、2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚、谷维素、黄酮类、枸橼酸的任一种或其组合，更优选为甲硫氨酸、V_C、半胱氨酸的任一种或其组合，所述抗氧化剂的用量为 0.2% (w/v) -5% (w/v)，优选为 0.5% (w/v) -2% (w/v)。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的制剂，所述的络合剂为本领域常用的络合剂，优选为乙二胺四乙酸二钠、乙二胺四乙酸钙钠或 1, 2-二氨基环己烷四乙酸的任一种或其组合，所述络合剂的用量为 0.01% (w/v) -0.1% (w/v)，优选为 0.05% (w/v) -0.075% (w/v)。

6、根据权利要求 1-5 任一项所述的制剂，所述的渗透压调节剂选自碳水化合物、多元醇或盐，优选为半乳糖、阿拉伯糖、乳糖、山梨醇、甘露醇、肌醇、甘油、木糖醇、聚丙二醇/乙二醇共聚物、PEG200、PEG 400、PEG 1450、PEG 3350、PEG 4000、PEG 6000、PEG 8000、氯化钠、葡萄糖的任一种或其组合，更优选为山梨醇、木糖醇、或甘露醇的任一种或其组合。

7、根据权利要求 1-6 任一项所述的制剂，所述的缓冲剂为本领域常用的缓冲剂，优选为醋酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂或谷氨酸盐缓冲剂的任一种或其组合。

8、根据权利要求 1-7 任一项所述的制剂，所述的 pH 调节剂为本领域常用的 pH 调节剂，优选为氨丁三醇、盐酸、枸橼酸、氢氧化钾、氢氧化钠、枸橼酸钠、三乙醇胺的任一种或其组合，更优选为氨丁三醇或三乙醇胺的任一种或其组合。

9、根据权利要求 1-8 任一项所述的制剂，还包括溶媒，所述溶媒为本领域常用的溶媒，优选为注射用水。

10、根据权利要求 1-9 任一项所述的制剂，所述制剂的 pH 为 3.0-7.0，优选为 4.0-6.0，更优选为 4.0-5.0。

11、根据权利要求 1-10 任一项所述的制剂，所述制剂选自液体制剂、冻干制剂或其改进制剂，优选液体制剂为胃肠外液体制剂，更优选为皮下注射剂、静脉内注射剂或静脉内输注剂。

12、根据权利要求 1-11 任一项所述的制剂，所述制剂选自经鼻给药制剂、经肺给药制剂、口服给药制剂、气管内给药制剂、舌下给药制剂或经颊给药制剂。

13、根据权利要求 1-12 任一项所述的制剂，所述的冻干制剂选自冻干单位制剂或冻干多用制剂。

14、根据权利要求 1-13 任一项所述的制剂，所述的制剂包括 0.025% (w/v) 的艾塞那肽、0.5% (w/v) 氨丁三醇、1.0% (w/v) 的甘露醇、0.22% (w/v) 的间甲酚、1.0% (w/v) 的甲硫氨酸和 0.01% (w/v) 的 EDTA-Na，余量为注射用水。

15、权利要求 1-14 任一项所述的艾塞那肽制剂用于制备防治糖尿病、肥胖症、得益于减慢胃排空、降低血浆葡萄糖水平或减少摄取食物的病症的药物中的应用。

16、根据权利要求 15 所述的应用，所述糖尿病选自 I 型糖尿病或 II 型糖尿病。

17、一种测定艾塞那肽制剂含量的方法，其特征在于，采用高效液相色谱法测定制剂中艾塞那肽的含量，以十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂，由流动相进行梯度洗脱，流速为 1.0ml/min，检测波长为 220nm，以艾塞那肽计，理论板数不低于 2000，所述流动相由流动相 A 和流动相 B 组成，所述流动相 A 为含 0.05% 三氟乙酸的水，所述流动相 B 为含 0.05% 三氟乙酸的乙腈。

18、根据权利要求 17 所述的方法，所述的测定方法还包括，取制剂适量，精密称定，用 0.05% 三氟乙酸水溶液溶解并稀释成浓度为 0.25mg/ml 的溶液，摇匀，

作为供试品溶液；精密量取 20 μ l 供试品溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图。

19、根据权利要求 17 或 18 所述的方法，检测开始时的流动相组成为 A: B 为 78: 22，检测 30min 时的流动相组成为 A: B 为 35: 65。

一种稳定的艾塞那肽制剂

技术领域

本发明涉及 exendin 激动剂制剂，特别涉及一种稳定的艾塞那肽制剂及其制备方法和其用途，所述的制剂可通过注射和非注射途径给药，用于防治包括 I 型和 II 型糖尿病在内的糖尿病，以及用于防治得益于降低血浆血糖水平、有效延迟和/或减慢胃排空或减少摄取食物的病症。

背景技术

根据 WHO 在 1997 年的报告，1995 年全球约有 1.35 亿名糖尿病患者，预测到 2025 年将猛增到 2.99 亿，糖尿病(II 型糖尿病，NIDDM)已成为继肿瘤、心脑血管病之后第三位严重危害人类健康的慢性病。近年来，我国糖尿病发病率不断上升、患者低龄化的情况日益突出。1997 年，我国 11 省市的调查结果表明，糖尿病(DM)标化患病率 3.21%，糖耐量减低(IGT)标化患病率为 4.76%，据推测，我国现有 II 型糖尿病患者和糖耐量减低者 5000 万人，至少有 1/4-1/2 的糖尿病患者未被诊断，只有 1/3 的已诊断患者得到理想控制。因此，研究开发理想的糖尿病临床用药非常重要。

艾塞那肽(代号 AC-2993，化学名 exenatide，又称艾塞那肽)为 Exendin-4 类激动剂，是大毒蛇(美国西南部产)在进食时分泌唾液中所含有的类胰高血糖素类肽-1(Glucagon-like Peptide-1, GLP-1)物质的人工合成物，可通过模拟肠促胰岛素的内在作用在体内发挥作用，从而达到控制血糖的效果。

艾塞那肽的氨基酸序列为：
H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂，为 39 个氨基酸的多肽，分子量为 4186.6 道尔顿，在水、甲醇或乙醇中易溶，比旋度为 -61° ~ -68°。

艾塞那肽可由标准固相肽合成技术(如自动或半自动肽合成法)制备得到，首先由美国 Amylin 和礼来制药公司共同开发，为含有 39 个氨基酸的多肽，也是首个获准的肠降血糖素类似物(incretin mimetics)药物，其新药上市申请于 2005 年 4 月获得美国 FDA 批准，商品名 Byetta®，可有效控制血糖、刺激胰岛素分泌、抑制高血糖素分泌和减缓胃的排空速度，降低食欲，减少食物摄入和减轻体重，非常适用于 II 型糖尿病的治疗，例如，用于改善和控制二甲双胍和磺酰脲类药物治疗不理想的 II 型糖尿病患者的血糖。

艾塞那肽的已知药理作用包括：(1)显著增加葡萄糖依赖性促胰岛素分泌，在血糖水平正常或低血糖时并不刺激胰岛素的分泌，仅在血糖水平较高时刺激胰岛素分泌；(2)抑制 II 型糖尿病患者胰高血糖素的分泌，并在高血糖时降低血清中胰高血糖素浓度，但不减弱正常胰高血糖素对低血糖的反应；(3)抑制餐后胃肠动力及分泌功能，延迟胃排空，从而有利于餐后血糖的控制；(4)降低食欲，减少食物的摄入；(5)刺激 β 细胞增生或胚胎胰岛素成熟分化，抑制 β 细胞凋亡，从而增加 β 细胞的数量；(6)恢复 II 型糖尿病患者丧失的胰岛素第一时相反应，显著增加第一时相及第二时相胰岛素的分泌，改善 II 型糖尿病患者的空腹及餐后血糖水平。

在一项为期 30 周的随机双盲安慰剂对照研究中，733 例联合使用二甲双胍及磺酰脲类降糖药治疗不能有效控制血糖的患者 [HbA_{1c} 的基线水平在 (8.2 ± 1.0) %]，首先 2 次/日皮下注射艾塞那肽 5 μ g 或安慰剂；4 周后，艾塞那肽组分为 A 组和 B 组，A 组继续维持艾塞那肽剂量不变，B 组改用 2 次/日，每次 10 μ g；安慰剂组在整个研究中均按照 2 次/日使用；研究期间，二甲双胍治疗组仍维持原有剂量，磺酰脲类治疗组则随机分成有效剂量 (MAX) 和最低推荐剂量 (MIN) 组。结果显示，治疗 30 周时，患者 HbA_{1c} 显著降低，疗效与艾塞那肽呈现量效关系，且 2 个剂量给药组患者体重均显著减轻。

另外，艾塞那肽用于 II 型糖尿病患者的临床研究提示，患者的耐受性良好，与剂量相关的最常见不良反应为恶心，不良反应多为轻度和中度，并在随后的持续治疗中，患者的恶心、呕吐发生率及其严重程度都随之下降。

艾塞那肽为一种全新的 GLP-1 类似物，可降低 II 型糖尿病患者餐后和空腹血糖，并能使 HbA_{1c} 水平维持在正常范围内，并且仅在血糖水平较高时才刺激胰岛素分泌，能控制对常用降糖药无应答患者的血糖水平，降低大部分患者的体重，且患者的耐受性好，不良反应较轻，适用于饮食调节和其他降糖药不能控制的 II 型糖尿病患者。

中国发明专利申请 00804847.9 公开了艾塞那肽的皮下注射剂、静脉内注射剂或静脉内输注制剂，其全文内容及其引用文献所公开的内容均作为本申请的参考。

发明内容

本发明的目的在于提供一种稳定的艾塞那肽制剂，所述制剂包括艾塞那肽、防腐剂、抗氧剂、络合剂、渗透压调节剂、缓冲剂和 pH 调节剂。

本发明的制剂可以有效减慢糖尿病患者的胃排空和降低其血浆葡萄糖水平。

进一步，制剂中艾塞那肽的含量为 0.005-0.4% (w/v)，优选为 0.010-0.10% (w/v)，更优选为 0.015-0.05% (w/v)，最优选为 0.025% (w/v)。

进一步，所述的防腐剂为本领域常用的防腐剂，优选防腐剂选自间甲酚、苜醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、

对羟基苯甲酸苯酯、苯酚、甲酚、三氯叔丁醇、对氯间甲酚的任一种或其组合，更优选为间甲酚、对氯间甲酚的任一种或其组合。本发明所述防腐剂的用量为 0.1% (w/v) -2% (w/v)，优选 0.2% (w/v) -0.5% (w/v)。

进一步，所述的抗氧化剂为本领域常用的抗氧化剂，优选抗氧化剂选自甲硫氨酸、V_C、半胱氨酸、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、二丁基苯酸、V_E、2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚、谷维素、黄酮类、枸橼酸的任一种或其组合，更优选为甲硫氨酸、V_C、半胱氨酸的任一种或其组合。本发明所述抗氧化剂的用量为 0.2% (w/v) -5% (w/v)，优选为 0.5% (w/v) -2% (w/v)。

进一步，所述的络合剂为本领域常用的络合剂，优选络合剂选自乙二胺四乙酸二钠、乙二胺四乙酸钙钠或 1, 2-二氨基环己烷四乙酸的任一种或其组合。本发明所述络合剂的用量为 0.01% (w/v) -0.1% (w/v)，优选为 0.05% (w/v) -0.075% (w/v)。

进一步，所述的渗透压调节剂为本领域常用的渗透压调节剂，如碳水化合物、多元醇或盐，优选渗透压调节剂选自半乳糖、阿拉伯糖、乳糖或任何其它碳水化合物、山梨醇、甘露醇、肌醇、甘油、木糖醇、聚丙二醇/乙二醇共聚物、聚乙二醇 200(PEG200)、PEG 400、PEG 1450、PEG 3350、PEG 4000、PEG 6000、PEG 8000、氯化钠、葡萄糖的任一种或其组合，使得制剂的水连续相为等张或等渗溶液，有效稳定制剂中的蛋白质，并抵抗温度升高、冻融或冻干工艺引起的蛋白质变性。本发明所述碳水化合物对糖尿病患者没有副作用，不会代谢形成高浓度的血糖；更优选为山梨醇、甘露醇、木糖醇的任一种或其组合。

进一步，所述的缓冲剂为本领域常用的缓冲剂，优选缓冲剂选自醋酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂或谷氨酸盐缓冲剂的任一种或其组合。

进一步，所述的 pH 调节剂为本领域常用的 pH 调节剂，优选 pH 调节剂选自氨丁三醇、盐酸、枸橼酸、氢氧化钾、氢氧化钠、枸橼酸钠、三乙醇胺的任一种或其组合，更优选为氨丁三醇或三乙醇胺。

进一步，本发明的艾塞那肽制剂还可包括溶媒，所述溶媒为本领域常用的溶媒，如注射用水，以获得需要浓度的溶液。

进一步，所述制剂的 pH 为 3.0-7.0，优选为 4.0-6.0，更优选 4.0-5.0，以减少制剂对患者的刺激。

进一步，所述制剂选自液体制剂、冻干制剂或其改进制剂，可用于经口、鼻、颊、注射、舌下、气管内、肺传递或皮肤贴片等途径给药，例如鼻给药制剂、经肺给药制剂、口服给药制剂、气管内给药制剂、舌下给药制剂或经颊给药制剂，优选为液体制剂为胃肠外液体制剂，如注射剂，所述注射剂可选自皮下注射剂、静脉内注射剂或静脉内输注剂。本发明所述的冻干制剂选自冻干单位制剂或冻干多用制剂。可采用本领域熟知的制剂技术手段制备得到本发明的制剂。

必要时，本发明组合物中还包含其他药学上可接受的载体，用于保持艾塞那肽及其制剂的稳定性，所述药学上可接受的载体为本领域熟知的用于制备上述制剂

的常用赋形剂或辅料，其用量、种类根据组合物中有效成分的理化性质和含量、制剂类型等因素而定。

另外，还可将活性成分与药学上可接受的缓控释载体按其制备要求加以混合，再按照本领域熟知的缓控释制剂的制备方法，如加入阻滞剂包衣或将活性成分微囊化后再制成微丸，如缓释微丸或控释微丸；所述的缓控释载体包括但不限于油脂性掺入剂、亲水胶体或包衣阻滞剂等，所述的油脂性掺入剂为单硬脂酸甘油酯、氢化蓖麻油、矿油、聚硅氧烷、二甲基硅氧烷；所述的亲水胶体为羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素等纤维素衍生物，或PVP、阿拉伯胶、西黄耆胶或卡波普等；所述的包衣阻滞剂为乙基纤维素(EC)、羟丙基甲基纤维素(HMPC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、邻苯二甲酸醋酸纤维素(CAP)、丙烯酸类树脂等。

本发明的冻干制剂稳定，可含有冻干赋形剂，以改善制剂的成形性，并利于制剂的稳定和/或缓解注射疼痛，以及包含有益于结块特性和/或复溶的表面活性剂。所述冻干赋形剂选自约1.0-10%(w/v)碳水化合物、多元醇、生理盐水的任一种或其组合，例如山梨醇、甘露醇、木糖醇、葡萄糖的任一种或其组合；所述表面活性剂为本领域常用的表面活性剂，优选约0.1-约1.0%(w/v)吐温80或其它非离子去垢剂。

本发明还包括用于经口、颊、舌下、气管内、鼻和肺传递的固体剂型，如液体制剂和/或干粉制剂。干粉制剂可含有增量剂和/或盐类，有助于形成的一定大小的颗粒和合适的颗粒大小分布，以及利于干粉颗粒形态学特性和/或促进组织摄取所述活性成分。

当本发明的制剂基于患者体重的剂量范围为约0.005 μg/kg/剂至约0.2 μg/kg/剂，优选为约0.02 μg/kg/剂至约0.1 μg/kg/剂，更优选为约0.05 μg/kg/剂至约0.1 μg/kg/剂，以及推荐给药频率1-4次/天，优选为1-2次/天。

用于注射给药时，其推荐给药剂量和方式为：约0.1 μg/Kg -约0.5 μg/Kg，以1-3次/天形式给药，优选为2-3次/天，更优选为2次/天。

按照本发明的口服剂量包括约50至约100倍的所述活性成分，也就是说以单剂或多剂给药的剂量为每天约500至约12,000 μg、优选每天约500至约5,000 μg。按照本发明的肺部给药剂量包括约10至约100倍的所述活性成分，也就是说以单剂或多剂给药的剂量为每天约100至约12,000 μg，优选每天约500-1000 μg。按照本发明的鼻、颊和舌下给药剂量也包括约10至约100倍的所述活性成分，也就是说以单剂或多剂给药的剂量为每天约100至约12,000 μg。例如，经鼻给药的优选剂量为每天约10-1000至约1200-12,000 μg，经颊给药的优选剂量为每天约10-1000至约1200-12,000 μg，舌下给药的优选剂量为每天约10-1000至约1200-8,000 μg。

本发明的另一目的在于提供一种测定艾塞那肽制剂含量的方法，其特征在于，

采用高效液相色谱法测定制剂中艾塞那肽的含量，以十八烷基硅烷键合硅胶 C₁₈ 150X4.6mm 300A 为色谱柱填充剂，由流动相进行梯度洗脱，流速为 1.0ml/min，检测波长为 220nm，以艾塞那肽计，理论板数不低于 2000，所述流动相由流动相 A 和流动相 B 组成，所述流动相 A 为含 0.05% 三氟乙酸的水，所述流动相 B 为含 0.05% 三氟乙酸的乙腈。

进一步，所述的测定方法还包括，取制剂适量，精密称定，用 0.05% 三氟乙酸水溶液溶解并稀释成浓度为 0.25mg/ml 的溶液，摇匀，作为供试品溶液；精密量取 20 μ l 供试品溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图。

进一步，检测开始时的流动相组成为 A: B 为 78: 22，检测 30min 时的流动相组成为 A: B 为 35: 65。

本发明的另一目的在于提供艾塞那肽制剂用于制备防治糖尿病的药物中的应用，以增强患者对内源性或外源性胰岛素的敏感性。所述糖尿病选自 I 型糖尿病、II 型糖尿病、肥胖症、其它得益于减慢胃排空、降低血浆葡萄糖水平和减少摄取食物等病症。

除非另有说明，本发明的百分比为重量体积百分比 (w/v)。

本发明所述的 **exendin-4** 应用标准固相肽合成技术(如自动或半自动肽合成法) 制得：在一种碱(如二异丙基乙胺)和偶联剂(如二环己基碳二亚胺和 1-羟基苯并三唑)存在下，在惰性溶剂(如二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯二酮(N-methylpyrrolidinone)或二氯甲烷)中，室温下，使 α -N-氨基甲酰基保护的氨基酸和连接在树脂上的延长肽链的氨基酸偶联。采用试剂(如三氟乙酸或哌啶)从产生的肽-树脂去除 α -N-氨基甲酰基保护基，用加入到所述肽链的下一个需要的 N-保护的氨基酸重复偶联反应。所述的 N-保护基团是本领域常用的 N-保护基团，优选为叔丁氧基羰基(tBoc)和苄基甲氧基羰基(Fmoc)。

具体实施方式

以下将结合实施例具体说明本发明，本发明的实施例仅用于说明本发明的技术方案，并非限定本发明的实质。

实施例 1 艾塞那肽制剂的制备

艾塞那肽	250mg
氨丁三醇	5.0g
甘露醇	10.0g
间甲酚	2.2g
甲硫氨酸	10.0g
EDTA-Na	0.1g

注射用水加至 1000ml。

对比实施例 1 艾塞那肽制剂的制备

艾塞那肽	250mg
醋酸钠	6.0g
甘露醇	10.0g
醋酸	适量
间甲酚	2.2g
注射用水加至 1000ml。	

实施例 2 艾塞那肽制剂的制备

艾塞那肽	250mg
氨丁三醇	5g
甘露醇	10.0g
间甲酚	2.28g
甲硫氨酸	10g
醋酸	适量
注射用水	适量

实施例 3 艾塞那肽制剂的制备

艾塞那肽	250mg
氨丁三醇	5g
甘露醇	10.0g
间甲酚	2.2g
Vc	12g
注射用水	适量

实施例 4 艾塞那肽制剂的制备

艾塞那肽	250mg
氨丁三醇	5.0g
甘露醇	10.0g
间甲酚	2.2g
甲硫氨酸	20.0g
注射用水	适量

实施例 5 艾塞那肽制剂的制备

艾塞那肽	250mg
------	-------

氨丁三醇	5.0g
甘露醇	10.0g
间甲酚	2.2g
甲硫氨酸	10.0g
EDTA-Na	0.05g
注射用水	适量

实施例6 制剂稳定性考察实验

将实施例1与对比实施例1制得的艾塞那肽制剂置于卡式玻璃瓶或管式玻璃瓶中，用丁基胶塞封口，分别于25℃和2~8℃条件下放置，进行稳定性的考察，采用高效液相色谱法测定样品中艾塞那肽含量在考察过程中的变化。

采用高效液相色谱法测定制剂中艾塞那肽的含量，以十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂(C₁₈ 150X4.6mm 300A)，以水（含0.05%的三氟乙酸）为流动相A；以乙腈（含0.05%的三氟乙酸）流动相B，流动相的组成参见表1；梯度洗脱；流速为1.0ml/min，检测波长为220nm，理论板数以艾塞那肽计应不低于2000。

表1 流动相的组成

时间 (min)	流动相 A	流动相 B
0	78	22
30	35	65

取制剂适量，精密称定，用0.05%三氟乙酸水溶液溶解并稀释成浓度为0.25mg/ml（以艾塞那肽计）的溶液，摇匀，作为供试品溶液；精密量取20μl，注入液相色谱仪，记录色谱图，结果参见表2。

表2 艾塞那肽制剂的稳定性考察实验结果

考核条件	考核指标		制剂中艾塞那肽的含量 (%)	
	考核时间	外观色泽	实施例1	对比实施例1
2-8℃	起始	无色澄明液	99.1	100.7
	5D	无色澄明液	98.7	97.2
	10D	无色澄明液	98.5	98.5
	1M	无色澄明液	98.9	95.1
	2M	无色澄明液	98.6	99.2
	3M	无色澄明液	99.2	92.6
	6M	无色澄明液	98.4	90.1
25℃	起始	无色澄明液	99.1	100.7
	5D	无色澄明液	99.4	93.2
	10D	无色澄明液	98.6	91.1

	1M	无色澄明液	97.9	88.5
	2M	无色澄明液	97.5	87.0
	3M	无色澄明液	97.6	85.7
	6M	无色澄明液	96.5	80.1

说明：表 2 中的 D 表示“day”；M 表示“month”。

分析表 2 得知，本发明艾塞那肽制剂的长期稳定性明显提高。