

## 重组人 C1 酯酶抑制剂中异天门冬氨酸含量检测<sup>\*</sup>

秦玺, 姚文荣, 丁有学, 史新昌, 毕华, 陶磊, 李永红<sup>\*\*</sup>, 饶春明<sup>\*\*</sup>

(中国食品药品检定研究院, 卫生部生物技术产品检定及其标准化重点实验室, 北京 100050)

**摘要** 目的: 检测重组人 C1 酯酶抑制剂 (rhC1INH) 中异天门冬氨酸 (IsoAsp) 的含量。方法: 采用异天门冬氨酸甲基转移酶催化结合反相高效液相色谱的方法进行测定, 对该方法进行专属性、准确性和精密度检验, 并用该方法对 3 批样品的 IsoAsp 含量进行检测。结果: 浓度分别为 10、30、60 pmol/60  $\mu$ L 的 SAH 标准品的检测结果均在 90%~110% 范围内。对同一批 3 个待测样品进行测定, IsoAsp 含量为  $(0.413 \pm 0.020)$   $\mu$ mol IsoAsp/g rhC1INH, RSD 为 4.8%, 显示该方法具有较好的专属性、准确性和精密度。3 批测试样品中, IsoAsp 含量分别为 0.633、0.827、0.487  $\mu$ mol IsoAsp/g rhC1INH。结论: 经方法学验证, 异天门冬氨酸检测试剂盒结合 RP-HPLC 方法适用于 rhC1INH 中 IsoAsp 的含量检测, 可为类似蛋白制品中该项目的检测提供借鉴。

**关键词:** 重组人 C1 酯酶抑制剂 (rhC1INH); 反相高效液相色谱; 异天门冬氨酸 (IsoAsp); 含量检测

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)11-1905-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.09

## Determination of isoaspartic acid in the recombinant human C1 esterase inhibitor<sup>\*</sup>

QIN Xi, YAO Wen-rong, DING You-xue, SHI Xin-chang, BI Hua,

TAO Lei, LI Yong-hong<sup>\*\*</sup>, RAO Chun-ming<sup>\*\*</sup>

(National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To detect the content of isoaspartic acid (IsoAsp) in the recombinant human C1 esterase inhibitor (C1INH). **Methods:** Reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to determine the IsoAsp after rhC1INH samples were catalyzed by PIMT, the test was verified in specificity, accuracy and precision, and used to detect the contents of IsoAsp in 3 batches of rhC1INH. **Results:** The detected results for the reference substance of SAH at three concentrations (10 pmol/60  $\mu$ L, 30 pmol/60  $\mu$ L, 60 pmol/60  $\mu$ L) were all in the range of 90%–110%. Three groups from one batch were determined separately. The contents of IsoAsp were

<sup>\*</sup> 药品医疗器械审评审批制度改革专项课题 (ZG2017-3-02); 十三五科技重大专项课题“生物类似药质量相似性评价体系建设研究” (2015ZX09501008)

<sup>\*\*</sup> 通信作者 饶春明 Tel:(010)67095380; E-mail: raocm@nifdc.org.cn

李永红 Tel:(010)67095684; E-mail: liyh@nifdc.org.cn

第一作者 秦玺 Tel:(010)67095359; E-mail: qinxi@nifdc.org.cn

姚文荣 Tel:(010)67095359; E-mail: yz1322@126.com

( $0.414 \pm 0.020$ )  $\mu\text{mol IsoAsp/g rhC1INH}$ , and the RSD was 4.8%. This method showed good results in specificity, accuracy and precision. Three batches of rhC1INH were determined, and the contents of IsoAsp were 0.633  $\mu\text{mol IsoAsp/g rhC1INH}$ , 0.827  $\mu\text{mol IsoAsp/g rhC1INH}$  and 0.487  $\mu\text{mol IsoAsp/g rhC1INH}$ , respectively. **Conclusion:** Methodological verification showed that the Isoaspartic Acid Detection Kit combined with RP-HPLC method was suitable for the determination of IsoAsp in rhC1INH, which could provide a reference for the detection of similar protein products.

**Keywords:** recombinant human C1 esterase inhibitor (rhC1INH); reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC); isoaspartic acid (IsoAsp); content detection

遗传性血管水肿 (hereditary angioedema, HAE) 是一种罕见的常染色体显性遗传病, 临床表现为反复的皮肤及粘膜下水肿, 累及呼吸道和胃肠道, 尽管发病率仅为 1/10 000~1/15 000, 但当呼吸道受累时, 易诱发窒息, 死亡率极高。其分子机制为 C1 酯酶抑制剂 (C1 esterase inhibitor, C1INH) 编码基因突变, 导致人体内 C1INH 缺乏或功能缺陷, 从而致病, 因此又称为遗传性 C1 抑制物缺乏症<sup>[1-2]</sup>。

C1INH 由 478 个氨基酸残基组成, 蛋白质成分占 51%<sup>[3]</sup>, 是 1 种高度糖基化的单链糖蛋白, 属于 serpin 超家族中的 1 种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 是四大血浆级联系统的中心调节物质<sup>[4-7]</sup>。人体内缓激肽的积累会导致血管内容物渗出, 形成局部水肿, 从而诱发 HAE<sup>[8-10]</sup>。重组人 C1INH (rhC1INH) 是由转基因兔分泌兔奶生产的人 C1INH 类似物, 其糖基化程度低于人 C1INH, rhC1INH 可通过抑制激肽释放酶与活化的凝血因子 XII (FXIIa) 的活性, 抑制缓激肽的形成<sup>[6]</sup>, 从而达到治疗 HAE 的效果。

天冬酰胺 (Asn) 和谷氨酰胺 (Gln) 的脱酰胺作用或天冬酰胺残基的异构化可发生在生产或长期保存的蛋白中, 可能导致蛋白活性下降<sup>[11-12]</sup>, 而 Gln 的脱酰胺速率远低于 Asn<sup>[13]</sup>, 因此, 脱酰胺作用的程度可由蛋白中形成的异天冬氨酸 (IsoAsp) 的浓度反映<sup>[14]</sup>。IsoAsp 的形成影响 rhC1INH 制品的有效性和稳定性, 因此, 需要对 IsoAsp 的含量进行质量控制。

本研究采用异天冬氨酸甲基转移酶 (PIMT) 催化结合反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 技术, 建立了针对 rhC1INH 制品中 IsoAsp 的质量控制方法。PIMT 可将 IsoAsp 转化为异天冬氨酸甲酯, 此反应中 PIMT 催化甲基从底物 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM) 转移至 IsoAsp, 进而释放 S-腺苷-L-高半胱氨酸 (SAH) (图 1)。利用外标校正法检测 SAH 的浓度, 进而

间接检测 IsoAsp 的浓度, 最后, 用所建方法对 3 批 rhC1INH 制品中的 IsoAsp 含量进行检测。

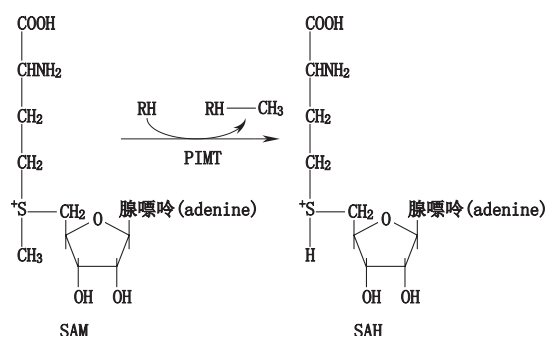


图 1 SAM 在 PIMT 催化下脱甲基示意图

Fig. 1 Diagram of demethylation of SAM catalyzed by PIMT

## 1 仪器与试剂

HPLC 色谱仪 (Waters 2659 分离器, 2487/2489 紫外检测器, Empower 工作站); Vydac 蛋白保护柱 (货号 218GK52); 蛋白质/肽 C<sub>18</sub> 分析柱 (Grace Vydac, 2.1 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 离心机, 涡旋仪, 水浴锅等。

异天冬氨酸检测试剂盒 [包含有 IsoAsp-DSIP 标准品 (DSIP, Delta-Sleep Inducing Peptide,  $\delta$  睡眠诱导肽)、反应缓冲液、SAM 标准品、SAH 标准品、PIMT 及相应稀释液] (Promega, MA1010); 三氟乙酸 (TFA) (分析纯, Aladdin); 乙腈 (色谱纯, Merk); 胃蛋白酶为分析纯。

4 批 rhC1INH 样品 (S1, S2, S3 和 S4, 科室留存); rhC1INH 标准品 ( $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 科室留存。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1**  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Gly/HCl 溶液 pH 2.0: 含  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  甘氨酸 (Gly) 的水溶液, 以  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 溶液调 pH 至 2.0。

**2.1.2** 胃蛋白酶溶液 取胃蛋白酶适量, 加 0.075

mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液溶解并制成每 1 mL 约含 0.5 mg 胃蛋白酶的溶液。

**2.1.3 Master mix** 每个反应体系对应的 Master mix 配方为: 水 10 μL + 反应缓冲液 10 μL + 0.15 mmol·L<sup>-1</sup> SAM 10 μL + PIMT 10 μL, 冰上配制, 轻轻混匀。

**2.1.4 供试品溶液和 rhC11NH 标准品的预处理** 用“2.1.1”项所配 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Gly/HCl 溶液, 分别将供试品和 rhC11NH 标准品稀释至 19.0 mg·mL<sup>-1</sup>。

## 2.2 酶反应

酶反应共分 2 步进行: 第一步是胃蛋白酶消化, 以避免蛋白在 PIMT 反应中 IsoAsp 位点可能发生的位阻效应; 第二步是 PIMT 反应, 由 PIMT 催化, 将甲基从底物 SAM 转移至 IsoAsp, 并释放出 SAH。第一步: 取“2.1.4”项预处理的供试品溶液和 rhC11NH 标准品溶液各 10 μL, 分别加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Gly/HCl 溶液 38 μL 和胃蛋白酶溶液 3 μL, 总体积为 51 μL, 供试品和 rhC11NH 标准品的浓度为 3.73 μg·μL<sup>-1</sup>, 同时取超纯水以同样体系处理, 作为阴性对照, 将各反应体系混匀后, 在 37℃ 孵育 120 min; 第二步: 从经过第一步消化的反应体系中, 各取 10 μL, 分别加入 Master mix 40 μL, 在 30℃ 孵育 30 min 后, 分别加入 0.3 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸溶液 10 μL 终止反应, 15 000 g 离心 5 min, 各吸取 60 μL 加入液相小瓶, 供试品和 rhC11NH 标准品的终浓度为 0.622 μg·μL<sup>-1</sup>。同时取 3.0 μmol·L<sup>-1</sup> 的 IsoAsp-DSIP (按试剂盒说明稀释) 10 μL, 以同样步骤处理, 用作系统适用性考察指标 (PRC 溶液)。以超纯水为空白, 准备进行液相色谱分析。

## 2.3 色谱条件

采用带有 Vydac 保护柱的 Vydac 蛋白质/肽 C<sub>18</sub> 分析柱; 柱温 30℃; 检测波长 260 nm; 进样量 20 μL; 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 用流动相 A (0.2% TFA 的水溶液) 和 B (1 mL TFA, 475 mL 乙腈, 25 mL 水) 梯度洗脱 [0~15 min, A-B (100:0); 15~18 min, A-B (100:0)→(0:100); 18~23 min, A-B (0:100); 23~26 min, A-B (0:100)→(100:0); 26~46 min, A-B (100:0)]。

## 2.4 SAH 标准曲线的绘制

将异天冬氨酸检测试剂盒中的 SAH 稀释至 5、10、15、20、30、40、50、60 pmol/60 μL, 按“2.3”项色谱条件检测 SAH, 以 SAH 峰面积 (Y) 对 SAH 浓度 (X) 绘制标准曲线, 用于后续试验计算 SAH 浓度, 进而得到 IsoAsp 浓度。本次试验的标准曲线:

$$Y=335.1X-1\ 960.9 \quad R^2=0.996$$

标准浓度为 10、15、20、30、40、50、60 pmol/60 μL 的 SAH 的检测峰面积, 经标准曲线公式计算得到对应的 SAH 检测浓度, 分别为 9.54、13.79、21.72、29.65、41.42、49.09、59.79 pmol/60 μL, 分别为标准浓度的 95.4%、91.9%、108.6%、98.8%、103.6%、98.2%、99.7%, 均在标准浓度的 90%~110% 范围内。

## 2.5 系统适用性

取 PRC 溶液, 按“2.3”项色谱条件检测 SAH 和 PIMT, 重复 2 次。如图 2 所示, PIMT 的保留时间约在 10 min, PIMT 峰的容量因子 ( $k'$ )=8.94, 峰面积为  $2.55 \times 10^4 \mu\text{V} \times \text{s}$ , 拖尾因子 ( $T$ )=1.43, 塔板数为  $3.57 \times 10^3$ ; SAH 的保留时间约在 14 min, SAH 峰的容量因子 ( $k'$ )=13.09, 峰面积为  $1.87 \times 10^4 \mu\text{V} \times \text{s}$ , 拖尾因子 ( $T$ )=1.08, 塔板数为  $2.42 \times 10^3$ ; PIMT 峰和 SAH 峰的分度度 ( $R_s$ )=4.61。

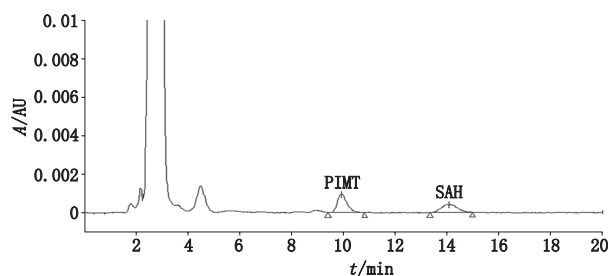


图 2 酶处理后的 IsoAsp-DSIP 色谱图

Fig. 2 Chromatogram of IsoAsp-DSIP after enzyme treatment

## 2.6 专属性验证

将经“2.2”项酶处理后的 rhC11NH 标准品, 按“2.3”项色谱条件检测 SAH 含量 (即 IsoAsp 含量)。标准曲线:

$$Y=335.1X-1\ 960.9 \quad R^2=0.996$$

结果如图 3 所示, PIMT 和 SAH 的保留时间分别在 9.89 min 和 13.98 min, 两者之间的分度度  $R_s=4.8$ , rhC11NH 标准品中 IsoAsp 的含量为 0.3 μmol IsoAsp/g rhC11NH。

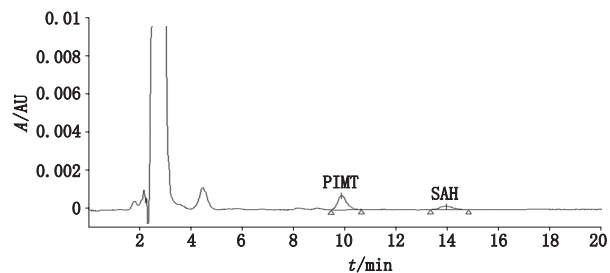


图 3 酶处理后的 rhC11NH 标准品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of rhC11NH reference substance after enzyme treatment

2.7 回收率试验

将异天冬氨酸检测试剂盒中的 SAH 稀释至 10、30、60 pmol/60 μL 3 个浓度 (QC1, QC2, QC3), 按“2.3”项色谱条件检测 SAH, 每个浓度检测 3 次。根

据标准曲线计算 SAH 的检测浓度。结果见表 1, SAH 的检测浓度均在标准浓度的 90%~110% 范围内, 表明该方法的准确性较好。

表 1 回收率试验结果 (n=3)

Tab. 1 The test results of recovery

供试品 (sample)	SAH 峰面积 (peak area of SAH)	平均峰面积 (average peak area)	SAH 检测值 (detection value of SAH)/(pmol/60 μL)	回收率 (recovery)/%	RSD/%
QC1	1 497	1 721	10.99	109.9	19.8
	1 331				
	2 336				
QC2	8 796	8 669	31.72	105.7	2.5
	8 280				
	8 930				
QC3	18 311	18 099	59.86	99.8	0.65
	17 958				
	18 027				

2.8 精密度验证

在 1 批供试品 (供试品 S1) 中取 3 支样品, 每个样品按“2.2”项酶处理后, 以“2.3”项色谱条件测定 3 次, 取 SAH 峰面积均值作为 1 次试验结果, 以当次试验标准曲线方程计算 SAH 含量 (即 IsoAsp 含量), 对试验的精密度进行验证 (图 4)。结果如表 2 所示, 该批供试品中, IsoAsp 含量为 0.413 μmol IsoAsp/g rhC11NH, RSD 为 4.8%, 显示了较好的精密度。

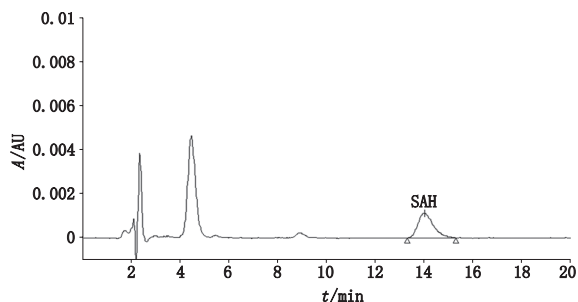


图 4 1 批供试品中 IsoAsp 含量的检测

Fig. 4 Content determination for IsoAsp of 1 batch of test sample

表 2 精密度试验结果

Tab. 2 The test result of precision

试验次数 (test number)	SAH 峰面积 (peak area of SAH)	平均值 (average)	SAH 检测值 (detection value of SAH)/(pmol/60 μL)	rhC11NH 含量 (content of rhC11NH)/μg	IsoAsp 含量 (content of IsoAsp) (μmol IsoAsp/g rhC11NH)
I	2 984	2 959	14.68	37.3	0.394
	3 202				
	2 690				
II	11 563	11 896	15.32	37.3	0.411
	13 672				
	10 453				
III	13 916	12 854	16.19	37.3	0.434
	13 460				
	11 186				
$\bar{X} \pm SD$	—	—	—	—	0.413 ± 0.020
RSD/%	—	—	—	—	4.84

2.9 方法的初步应用

分别将另外 3 批供试品 ( 供试品 S2、S3、S4 ) 按“2.2”项酶处理后,以“2.3”项色谱条件进行检测。重复测定 3 次,用该次试验标准曲线方程计算 3 批供

试品中 IsoAsp 的含量。本次试验的标准曲线方程:  $Y=800.3X-4\ 333.1 (R^2=0.995)$ , 结果如表 3 所示。供试品 S2、S3 和 S4 中, IsoAsp 的含量分别为 0.633、0.827 和 0.487  $\mu\text{mol IsoAsp/g rhC11NH}$ 。

表 3 3 批供试品中 IsoAsp 的含量测定

Tab. 3 Content determination for IsoAsp of 3 batches of test samples

供试品 (sample)	SAH 峰面积 (peak area of SAH)	平均值 (average)	SAH 检测值 (detection value of SAH)/(pmol/60 $\mu\text{L}$ )	rhC11NH 含量 (content of rhC11NH)/ $\mu\text{g}$	IsoAsp 含量 (content of IsoAsp)/( $\mu\text{mol IsoAsp/g rhC11NH}$ )
S2	10 621	14 562	23.61	37.3	0.633
	20 874				
	12 192				
S3	27 814	20 344	30.83	37.3	0.827
	14 648				
	18 570				
S4	6 123	10 215	18.18	37.3	0.487
	9 619				
	14 903				

3 讨论

由于对安全性和有效性的影响,治疗性蛋白的化学稳定性是需要重点关注的问题之一。对氨基酸残基的各种化学修饰是影响蛋白化学稳定性的主要因素,其中包括脱酰胺基化、糖基化、氧化等。脱酰胺可发生在 Asn 残基和 Gln 残基上,由于 Gln 脱酰胺发生的速率比 Asn<sup>[15-16]</sup>慢很多,因此关注的重点一般都在 Asn 的脱酰胺作用上。Asn 非酶催化的脱酰胺化主要有 2 种模式:1 种是在酸性环境中直接水解,另

1 种是在 pH 5~12 环境下, Asn C 末端骨架上的氮原子对 Asn 侧链酰胺基上的碳原子进行亲核攻击,形成 1 个闭环的琥珀酰亚胺残基中间体,琥珀酰亚胺残基快速水解,得到天冬氨酸 (Asp) 或 IsoAsp<sup>[17]</sup>(见图 5)。蛋白制品中天冬酰胺残基的脱酰胺化是蛋白降解的主要原因之一<sup>[18]</sup>,因此,在蛋白制品中,对蛋白脱酰胺化的检测是研究蛋白稳定性、安全性和有效性的的重要组成部分。

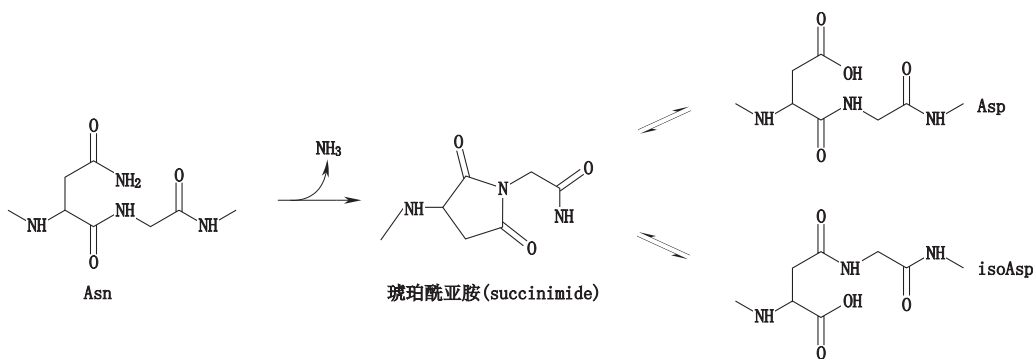


图 5 蛋白脱酰胺示意图

Fig. 5 Schematic diagram of protein deamidating



对脱酰胺反应的检测一般采用对脱酰胺位点的识别和对脱酰胺产物 IsoAsp 的检测 2 种方式<sup>[19]</sup>。对脱酰胺位点的识别一般采用高效液相色谱串联质谱的方式,在用高效液相色谱分离脱酰胺前后的多肽后,以质谱技术检测脱酰胺位点<sup>[12]</sup>。本试验采用对脱酰胺产物 IsoAsp 检测的方式,在经过 PIMT 催化后,对生成的 SAH 进行检测,进而得到蛋白制品 C1INH 中 IsoAsp 的定量结果。该方法有较好的专属性、准确性和精密度,且易于操作,适用于 C1INH 在生产和储存过程中的常规检验,可为该制品的稳定性、安全性和有效性及储存工艺研究提供重要的试验依据。

#### 参考文献

- [1] 徐迎阳,支玉香. 遗传性血管性水肿治疗[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2012, 6(03): 228  
XU YY, ZHI YX. Therapy of hereditary angioedema[J]. *Chin J Allergy Clin Immunol*, 2012, 6(03): 228
- [2] 李丽莎,支玉香. 遗传性血管性水肿的诊断及其鉴别[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(2): 190  
LI LS, ZHI YX. Diagnosis and treatment of hereditary angioedema[J]. *J Int Pharm Res*, 2017, 44(2): 190
- [3] CRUZ MP. Conestat alfa (ruconest): first recombinant C1 esterase inhibitor for the treatment of acute attacks in patients with hereditary angioedema[J]. *P&T*, 2015, 40(2): 109
- [4] HEDA GD, MARDENTE S, WEINER L, *et al.* Interferon  $\gamma$  increases in vitro and in vivo expression of C1 inhibitor[J]. *Blood*, 1990, 75(12): 2401
- [5] ZAHEDI K, PRADA AE, PRADA JA, *et al.* Characterization of the INF- $\gamma$ -responsive element in the 5' flanking region of the C1-inhibitor gene[J]. *J Immunol*, 1997, 159(12): 6091
- [6] JOSEPH K, THOLANIKUNNEL BG, KAPLAN AP, *et al.* Factor XIII-independent cleavage of high-molecular-weight kininogen by prekallikrein and inhibition by C1 inhibitor[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(1): 143
- [7] BORK K, STEFFENSEN I, MACHNIG T. Treatment with C1-esterase inhibitor concentrate in type I or II hereditary angioedema: a systematic literature review[J]. *Allergy Asthma Proc*, 2013, 34(4): 312
- [8] NIELSEN EW, JOHANSEN HT, HOGASEN K, *et al.* Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic and kallikrein-kinin system during attacks of hereditary angioedema[J]. *Immunopharmacology*, 1996, 33(1-3): 359
- [9] CUGNO M, CICARDI M, COPPOLA R, *et al.* Activation of factor XII and cleavage of high molecular weight kininogen during acute attacks in hereditary and acquired C1-inhibitor deficiencies[J]. *Immunopharmacology*, 1996, 33(1-3): 361
- [10] NUSSBERGER J, CUGNO M, CICARDI M, *et al.* Local bradykinin generation in hereditary angioedema[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 104(6): 1321
- [11] TAKATA T, OXFORD JT, BRANDON TR, *et al.* Deamidation alters the structure and decreases the stability of human lens betaA3-crystallin[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(30): 8861
- [12] HUANG L, LU J, WROBLEWSKI VJ, *et al.* In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(5): 1432
- [13] WRIGHT HT. Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1991, 26(1): 1
- [14] SHIMIZU T, MATSUOKA Y, SHIRASAWA T. Biological significance of isoaspartate and its repair system[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(9): 1590
- [15] BISCHOFF R, KOLBE HV. Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides: structural determinants and analytical methodology[J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1994, 662(2): 261
- [16] ROBINSON AB, SCOTCHLER JW, MCKERROW JH. Rates of nonenzymic deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues in pentapeptides[J]. *J Am Chem Soc*, 1973, 95(24): 8156
- [17] WAKANKAR AA, BORCHARDT RT. Formulation considerations for proteins susceptible to asparagine deamidation and aspartate isomerization[J]. *J Pharm Sci*, 2006, 95(11): 2321
- [18] CHELIUS D, REHDER DS, BONDARENKO PV. Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(18): 6004
- [19] 毕华,韩春梅,丁有学,等. 重组人血管内皮生长因子抑制剂中异天门冬氨酸含量检测[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(5): 879  
BI H, HAN CM, DING YX, *et al.* Determination of isoaspartic acid in the recombinant human vascular endothelial growth factor inhibitor[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(5): 879

(本文于 2018 年 9 月 1 日收到)