

ヒトインスリン製剤中の B-3 デスアミド体の液体クロマトグラフ法による分析

四方田千佳子[#]・田頭 洋子・宮崎 玉樹・岡田 敏史

Analysis of B-3 desamido insulin in human insulin preparations by HPLC

Chikako Yomota[#], Yoko Tagashira, Tamaki Miyazaki and Satoshi Okada

The content of A-21 desamido insulin (A-21 DI) and B-3 desamido insulin (B-3 DI) in human insulin preparations was measured by new RP-HPLC method using a neutral eluent (pH 6.5). Sometimes the content of B-3 DI in human insulin preparations was about two times larger than that of A-21 DI. In particular, in the case of neutral insulin injection, the content of B-3 DI has increased remarkably as the increase of total desamido content. The content of B-3 DI obtained by the new RP-HPLC method will open the new aspect of the impurity test for insulin preparations.

Keywords: human insulin preparations, A-21 desamido insulin, B-3 desamido insulin, RP-HPLC, impurity test

(Received May 30, 1997)

諸 言

ヒトインスリン製剤の国家検定及び国家検査の純度試験では、デスアミド体含量はその承認申請書の内容の違いに応じて、RP-HPLC法(A法)またはポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動法(B法)が採用されている。ヒトインスリン製剤中に含まれる主なデスアミド体はA-21デスアミド体とB-3デスアミド体であるが、通常のRP-HPLCで分離されるのはA-21デスアミド体のみであり、B-3デスアミド体はヒトインスリンピークに含まれている。他方、電気泳動ではヒトインスリン、A-21デスアミド体、B-3デスアミド体のバンドが分離される。

B法の電気泳動ではB-3デスアミド体を分離することはできるが、染色されたデスアミド体の二つのバンドの色の和を標準バンドの色と比較して濃くないといった、定性的な試験法となっている。この問題を解決するため種々の検討を行い、ヒトインスリン中のB-3デスアミド体は、キャピラリー電気泳動法、またはpH 6.5~pH 9の溶離液を用いるRP-HPLCにより定量的に分析可能なこと、さらに、ヒトインスリン製剤を冷蔵庫で保存中にB-3デスアミド体含量が増加することをすでに報告した¹⁾。A-21デスアミド体は酸性条件下で速やかに生成するため、インスリン原体の製造工程における品質管理上重要な意味を持つものであるが、中性条件ではA-21デスアミド体はあまり増加しないが、B-3デスアミド体は冷蔵下でも徐々に生成

することを考慮すると、製剤においてはむしろB-3デスアミド体含量の追跡に意味があると思われる。

そこで、本報では、1996年10月より1997年3月における国家検定あるいは国家検査対象品目のすべての製剤に、pH 6.5の溶離液を用いるRP-HPLCを適用し、A-21デスアミド体及びB-3デスアミド体含量の測定を試みたので結果を報告する。なお、1997年3月末にヒトインスリン製剤の国家検定は廃止されたが、現在は国家検査として同様の純度試験が継続されている。

実験方法

1. 試料

1996年秋から1997年3月までのヒトインスリン製剤の国家検定及び国家検査対象品目を製剤用試料とした。

2. 装置

島津製作所製のLC-10A型送液ポンプ、SPD-10A型検出器、CTO-10A型カラムオーブン、SCL-10A型システムコントローラー、C-R 4 A型データ処理装置及びWaters社製のWaters717オートサンプラーを用いた。

3. 操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (検出波長：210 nm)

カラム：Waters NOVA pack C18(3.9mm I.D. ×150 mm)

カラム温度：40℃

移動相：0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.5) /アセトニトリル (73.5 : 26.5) または硫酸ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 2.3) /アセトニトリル (73.5 : 26.5)

流速：0.8 ml/min

試料溶液の調製：ヒトインスリン製剤の20単位を含む容

[#] To whom correspondence should be addressed: Chikako Yomota; Hoenzaka1-1-43, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: yomota@nihs.go.jp

Table 1. Limit of desamido content in human insulin preparations in Japanese national test

Method A: RP-HPLC in acidic condition	
Neutral insulin injection	≤ 5 %
Isophane insulin injection	≤ 4 %
Crystalline insulin zinc injection	≤ 4 %
Biphasic isophane insulin injection	≤ 4 %
Method B: Polyacrylamide-dicsgel-electrophoresis	
Neutral insulin injection	<6.7%
Isophane insulin injection	<4.0%
Crystalline insulin zinc injection	<4.0%
Insulin zinc injection	<4.0%
Biphasic isophane insulin injection	<4.0%

量を正確に量り、0.01N 塩酸試液で全量を 1 ml とし、試料溶液とする。これらの液 20 μl につき、上記の条件で HPLC 法による試験を行う。

4. デスアミドインスリン含量

デスアミドインスリン含量 [%] = (デスアミドインスリンピーク面積) ÷ (インスリンピーク面積 + デスアミドインスリンピーク面積) × 100

結果及び考察

はじめに、現在の国家検査におけるヒトインスリン製剤中のデスアミド体含量規格についてまとめ、Table 1 に A 法、B 法が採用されている製剤とその規格を記した。同種の製剤でも二つの方法が採られている。

A 法は A-21 デスアミド体のみを測定し、B 法では A-21 及び B-3 デスアミド体の両方を測定することになるが、限度値にそれほど差は見られない。

それぞれのヒトインスリン製剤中の A-21 及び B-3 デスアミド体の含量を中性溶離液を用いる RP-HPLC で同時に測定し、その HPLC チャート例を Fig. 1 に示した。中性インスリン注射液のチャートを示したが、B-3 デスアミド体はインスリンピークの前に、A-21 デスアミドピークはインスリンピークの後に溶出した。ピーク 1 の m-クレゾールは保存剤である。さらに、Fig. 2 に 2 種類の中性インスリン製剤 (A)、(B) のクロマトグラム例を示した。(B) 製剤のクロマトグラムに見られるように、インスリンメインピークの前にかなり大きな 2 本の不純物ピークが現れることがあり、B-3 デスアミド体ピークはその前に溶出した。なお、Fig. 1 よりもインスリンピークの溶出が早い条件のため、A-21 デスアミド体の分離はやや悪い。Fig. 3 には、Fig. 2 と同じ製剤を pH 2.3 の溶離液で溶出したときの HPLC チャートを示した。B-3 デスアミド体ピークは溶出

しなくなるが、(B) 製剤の 2 本の不純物ピーク 5 は、同じように溶出した。なお、この不純物ピークに関しては、現在国家検査で検査項目として該当するものが設定されていないが、中性インスリンでは 0.36-1.91%、イソフェンインスリン水性懸濁注射液では、0.1-0.56%、二相性製剤では 0.35-0.82% と既知のデスアミド体よりもかなり多く含まれていた。

製剤における B-3 デスアミド体及び A-21 デスアミド体のそれぞれの含量を二種のデスアミド体含量の和に対して図示して、Fig. 4 に中性インスリン (A)、イソフェンインスリン水性懸濁注射液 (B)、二相性イソフェンインスリン水性懸濁注射液 (C)、結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液及びインスリン亜鉛水性懸濁注射液 (D) の順に示した。

数値的にはすべての製剤が Table 1 に示した製剤の純度試験規格に適合していたが、製剤間で比較すると、(A) の中性製剤では、Total デスアミド体含量はやや他の製剤よりも多く、特に Total 含量が増えるに従って B-3 デスアミド体含量が増えていく傾向が認められた。中性製剤ではヒトインスリンが中性条件で完全に溶解している状態のため製剤化後の B-3 デスアミド体の生成が多いのではない

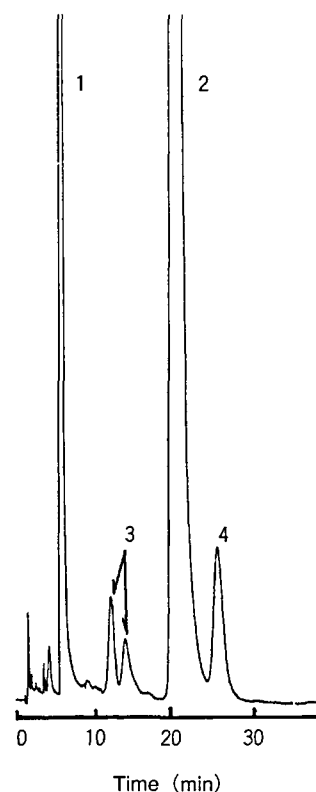


Fig. 1. HPLC chromatogram of neutral insulin injection using a eluent at pH 6.5. Peaks: 1 = m-cresol; 2 = human insulin; 3 = B-3desamido human insulin; 4 = A-21desamido human insulin.

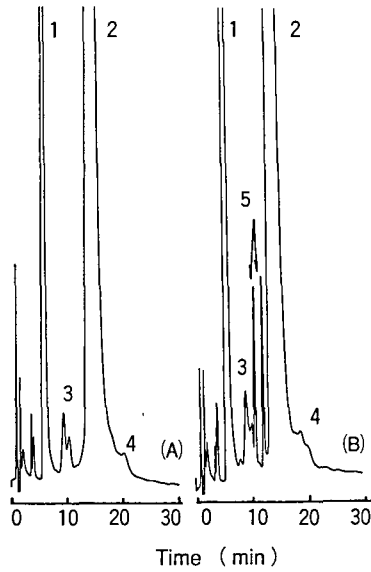


Fig. 2. HPLC chromatograms of 2 kinds of neutral insulin injection using a eluent at pH 6.5. Peaks: 1=m-cresol; 2=human insulin; 3=B-3-desamido human insulin; 4=A-21-desamido human insulin; 5=unknown peaks.

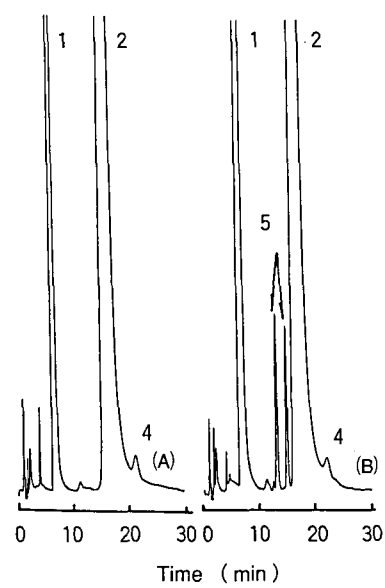


Fig. 3. HPLC chromatograms of the same preparations shown in Fig.2 using a eluent at pH 2.3. Peaks: 1=m-cresol; 2=human insulin; 4=A-21-desamido human insulin; 5=unknown peaks.

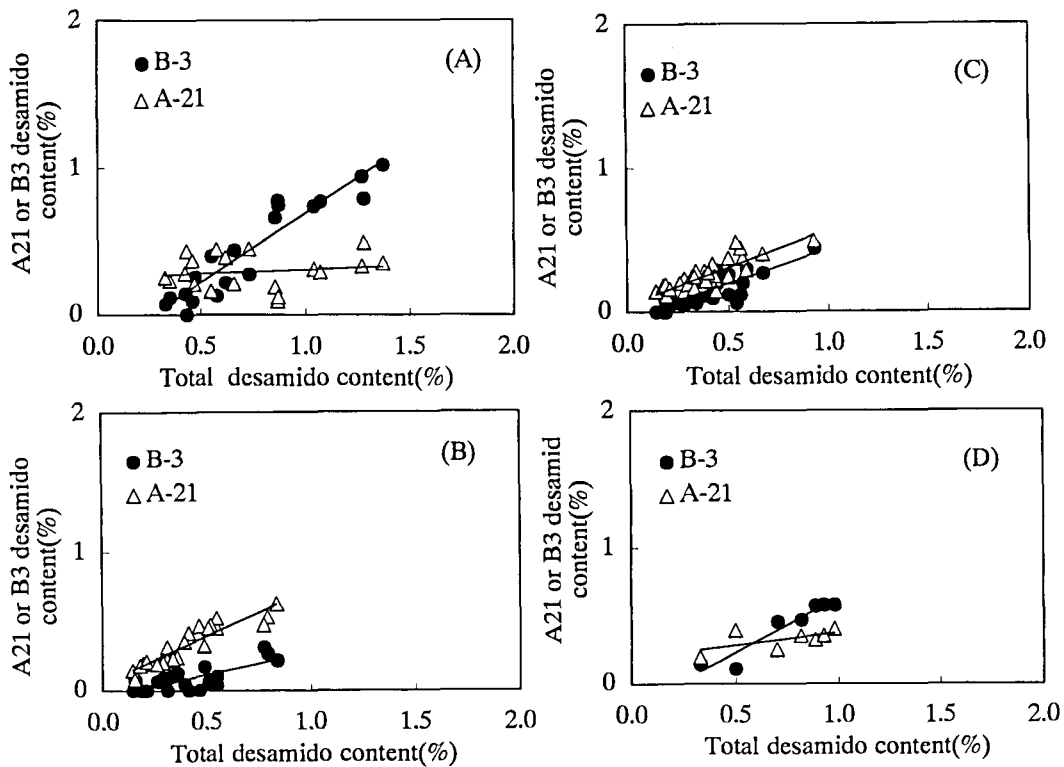


Fig. 4. A-21 or B-3 desamido content plotted against total desamido content in the case of (A) neutral insulin injection, (B) isophane insulin injection, (C) biphasic isophane insulin injection, (D) crystalline insulin zinc injection and insulin zinc injection.

かと考えられる。また、ヒトインスリンがイソフェン状態で不溶化されている場合 (B) や、50~70%程度の結晶が混在している二相性製剤 (C)、85%以上あるいは62-73%

が結晶状態にある場合 (D) では (A) の場合よりもデアミド体含量はやや少なく、その差は主に B-3 デサミド体含量の差といえる。

現在、ヨーロッパ薬局方1997では、ヒトインスリンのA-21デスアミド体含量を酸性溶離液を用いる RP-HPLC 法 (A 法) で規定しており、ヒトインスリン原体では 2.0% 以下、動物インスリン原体では 3.0% 以下、すべての注射用製剤で 5.0% 以下と限度を定めているが、B-3 デスアミド体に対する規格はない。本報で試験を行った製剤中、A-21 デスアミド体含量の最高値は 0.62% であるが、B-3 デスアミド体含量では最高 1.02% とむしろ B-3 のほうが多い場合がある。従来の B-3 デスアミド体の分析法であるポリアクリルアミドゲル電気泳動では、操作が煩雑なわりには正確な測定値を得ることができず、B-3 デスアミド体の規格設定が困難であった。ここに報告した中性の溶離液

を用いる HPLC 法では、どの製剤においても A-21 デスアミド体と B-3 デスアミド体を容易に同時に定量することが可能である。ヒトインスリン製剤中の B-3 デスアミド体含量が製品化直後に A-21 デスアミド体より多い場合があり、製剤化後も冷蔵中に徐々に増加することを考えあわせると、ヒトインスリン製剤におけるデスアミド体の純度試験では中性付近での RP-HPLC を適用して B-3 デスアミド体をも含めた規格設定にすることが望ましいと考えられる。

文 献

- 1) Yomota, C., Yoshii, Y., Takahata, T. and Okada, S.: *J. Chromatogr.*, **721**, 89-96 (1996)