

对甘精胰岛素有关物质分析用系统适用性试验的研究

丁晓丽, 胡馨月, 孙悦, 李晶, 张慧, 王岩*, 梁成罡* (中国食品药品检定研究院, 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要 目的: 对不同企业甘精胰岛素有关物质分析用系统适用性试验进行研究, 发现存在的问题, 提示企业完善质量标准, 更科学有效地控制产品质量。方法: 采用高效液相色谱法及液质联用方法对不同企业有关物质分析用系统适用性试验进行研究评价, 发现存在多种问题。结果: 部分企业系统适用性溶液中所用的“O^A-甘精胰岛素”的结构经LC-MS/MS确认后, 发现与理论序列不同, 部分企业采用酶切方法制备系统适用性溶液, 存在杂质较多、操作步骤复杂、溶液易浑浊等问题。结论: 建议企业提高对系统适用性试验的重视程度, 加强研究, 完善质量标准, 科学有效地进行药品质量控制。

关键词: 甘精胰岛素; 有关物质; 系统适用性试验; 高效液相色谱法; 液质联用技术; O^A-甘精胰岛素; 结构确认

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)02-0175-09

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.02.008

Study on System Suitability Test for Determination of Related Substances of Insulin Glargine

Ding Xiaoli, Hu Xinyue, Sun Yue, Li Jing, Zhang Hui, Wang Yan*, Liang Chenggang* (National Institutes for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To study on system suitability test for determination of related substances of insulin glargine in different enterprises, and identify existing problems, so as to prompt enterprises to improve quality standards and control product quality more scientifically and effectively. **Methods:** The system suitability test for determination of related substances of insulin glargine in different enterprises was studied by HPLC and LC-MS/MS, and multiple problems were found. **Results:** The structures of "O^A-insulin glargine" confirmed by LC-MS/MS were different from the theoretical sequence in some enterprises. There are many problems of system suitable solution prepared by enzyme digestion in some other enterprises, such as more impurities, complex operation steps, turbidity of the solution and so on. **Conclusion:** It is suggested that the enterprises should pay more attention to the system suitability test, strengthen the research and improve the quality standards, so as to carry out the drug quality control scientifically and effectively.

基金项目: 国家重点研发计划课题“蛋白类生物制品主成分及其相关成分精准定量检测技术研究”(编号 2021YFF0600804)

作者简介: 丁晓丽 Tel: (010) 53851647; E-mail: dingxiaoli@nifdc.org.cn

通信作者: 梁成罡 Tel: (010) 53851638; E-mail: liangchenggang@nifdc.org.cn

王岩 Tel: (010) 53851641; E-mail: rock@nifdc.org.cn

Keywords: insulin glargine; related substances; system suitability test; RP-HPLC; LC-MS/MS; 0^A- insulin glargine; structural identification

甘精胰岛素 (Insulin Glargine), 临床应用剂型主要是甘精胰岛素注射液, 是临床应用比较广泛的基础胰岛素^[1], 其结构如图1所示, 与人胰岛

素相比, 在A链的21位由甘氨酸代替门冬酰胺, 在B链的C末端增加了2个精氨酸, 分别为精氨酸 (B31) 和精氨酸 (B32)^[2]。

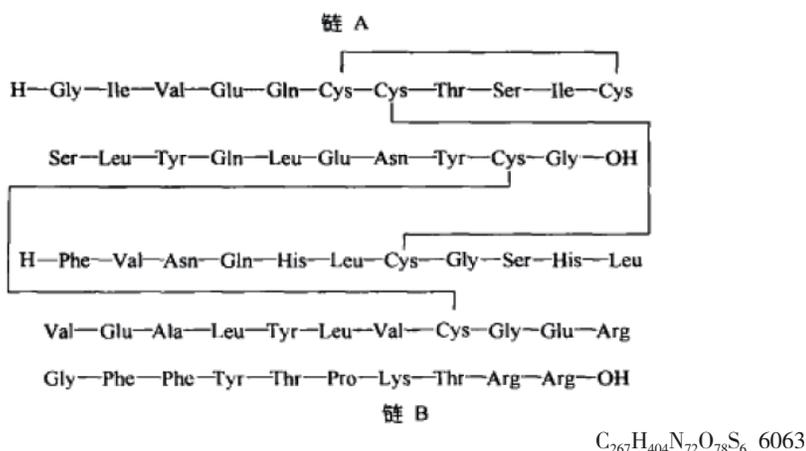


图1 甘精胰岛素氨基酸序列

甘精胰岛素是重组DNA技术生产的原料药^[3], 与人胰岛素生产工艺类似, 涉及细胞系构建、上游表达和下游纯化等多个过程^[4], 常用的生产途径主要有两种^[5-6]: 一种是通过基因工程大肠杆菌发酵, 表达包涵体, 通过复性、酶切、纯化等过程得到有活性的胰岛素; 另一种是通过基因工程酵母菌中分泌表达胰岛素原, 再经过酶切、纯化等步骤得到有活性的胰岛素。胰岛素原的表达效率及稳定性是影响胰岛素产率的重要因素之一^[7], 受知识产权的限制, 不同的生产企业会通过不同的方式设计不同类型的胰岛素原, 包括胰岛素原B链N端连接不同短肽作为信号前导肽、将C肽改短或者以其他氨基酸序列替代C肽等^[8-9]。因生产工艺不同及蛋白酶的酶切等原因, 产生的工艺杂质也不同。

系统适用性试验是高效液相色谱法完整分析的一部分, 是用规定的对照品溶液或系统适用性溶液在规定的色谱系统进行试验, 对色谱系统的理论板数、分离度、灵敏度、拖尾因子及重复性等参数进行考察^[10]。目前各国药典高效液相色谱法

均要求考察系统适用性试验, 只有确信系统适用性试验满足方法的要求后才能进行样品分析, 否则样品分析无效。系统适用性溶液的配制一般采用主成分对照品及杂质对照品混合配制, 考虑到系统适用性溶液配制的方便性、可操作性及成本方面^[11], 目前大多数甘精胰岛素生产企业有关物质测定用系统适用性溶液是选取原料药生产过程中的工艺杂质与甘精胰岛素混合配制, 因各个企业生产工艺不同, 系统适用性试验也各不相同。甘精胰岛素有关物质测定用系统适用性试验主要有三种: 一是部分企业标准采用甘精胰岛素与0^A-甘精胰岛素考察分离度, 与2023年美国药典 (USP-NF 2023)^[12]和欧洲药典第11版 (EP 11)^[13]基本相同; 二是部分企业标准采用甘精胰岛素与B32脱精氨酸甘精胰岛素考察分离度; 三是《中华人民共和国药典》2020年版各论标准采用甘精胰岛素与3^B-琥珀酰亚胺甘精胰岛素考察分离度。

结合注册检验工作及2022年甘精胰岛素注射液国家评价性抽检工作, 笔者针对其中4家企业的系统适用性试验进行了研究, 发现企业质量标准

有关物质方法系统适用性试验存在的问题,提示企业需完善质量标准,更科学有效地控制产品质量。

1 仪器与试剂

液质联用仪器UPLC I-Class/synapt G2-S (Waters公司), Orbitrap Exploris 480[赛默飞世尔科技(美国)公司], 20-AT高效液相色谱仪(包括20AT泵, SPD-20A紫外检测器, LC-Solution色谱工作站, 岛津公司), 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), 液相分析色谱柱为Thermo Scientific Bio-Basic-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 液质联用分析色谱柱为ACQUITY UPLC Peptide BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 300 Å)。

甘精胰岛素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 140701-202004), 0^A-甘精胰岛素(企业A、B、C分别提供1个批次), 乙腈(购自Fisher公司, 色谱纯), 甲酸(购自Fisher公司, 色谱纯), 亮氨酸-脑啡肽(购自Waters公司, 色谱纯), 三(2-羧乙基)膦(TCEP, 购自Sigma公司, 质谱级), 胰蛋白酶(购自Promega公司, 质谱级), 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl, 购自Merck公司, 分析纯), 氯化钠、无水合磷酸二氢钠、盐酸、磷酸、氢氧化钠(均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司); 水为Millipore超纯水机制去离子水。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件

参照《中华人民共和国药典》2020年版甘精胰岛素各论项下有关物质分析方法进行试验。色谱柱为Thermo Scientific Bio-Basic-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。取氯化钠18.4 g, 加磷酸盐缓冲液(取无水磷酸二氢钠20.7 g, 加水800 mL溶解, 再用85%磷酸调节pH至2.5, 加水至1000 mL) 250 mL溶解, 加乙腈250 mL, 混匀后, 用水定容至1000 mL, 作为流动相A; 另取氯化钠3.2 g, 加上述磷酸盐缓冲液250 mL溶解, 加乙腈650 mL, 混匀后, 用水定容至1000 mL, 作为流动相B; 流速为1.0 mL·min⁻¹, 柱温为35 °C, 检测波长为214 nm, 进样量为20 μL。洗脱梯度(0~20 min, 流动相B: 4%→17%; 20~30 min, 流

动相B: 17%→37%; 30~40 min, 流动相B: 37%→4%)。

2.2 液质联用色谱条件

液相分离采用反相柱为ACQUITY UPLC Peptide BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 300 Å)色谱柱; 流动相A为0.1%甲酸-水溶液, 流动相B为0.1%甲酸-乙腈溶液, 梯度洗脱(0~1 min, 流动相B: 5%; 1~5 min, 流动相B: 5%→95%; 5~7 min, 流动相B: 95%→95%); 柱温为50 °C。实时校正: 亮氨酸-脑啡肽(200 pg·μL⁻¹); 电喷雾离子源(ESI), MS检测模式; 锥孔气流为50.0 L·h⁻¹; 正离子扫描模式; 锥孔电压为40.0 V; 扫描范围为50~2000 Da。

2.3 溶液配制

2.3.1 系统适用性溶液1(企业A、B、C)

取甘精胰岛素对照品适量, 用0.01 mol·L⁻¹ HCl溶液配制成每1 mL含10 U的对照品溶液, 取企业A提供的0^A-甘精胰岛素适量, 用对照品溶液稀释制成每1 mL约含50 μg的系统适用性溶液1。企业B及企业C的系统适用性溶液配制方法同企业A。

2.3.2 液质联用测定用样品溶液

取企业A提供的0^A-甘精胰岛素适量, 用0.1%甲酸溶液配制成每1 mL含1 mg的溶液, 加入TCEP进行还原处理, 作为液质联用测定用样品溶液。企业B及企业C的样品溶液配制方法同企业A。

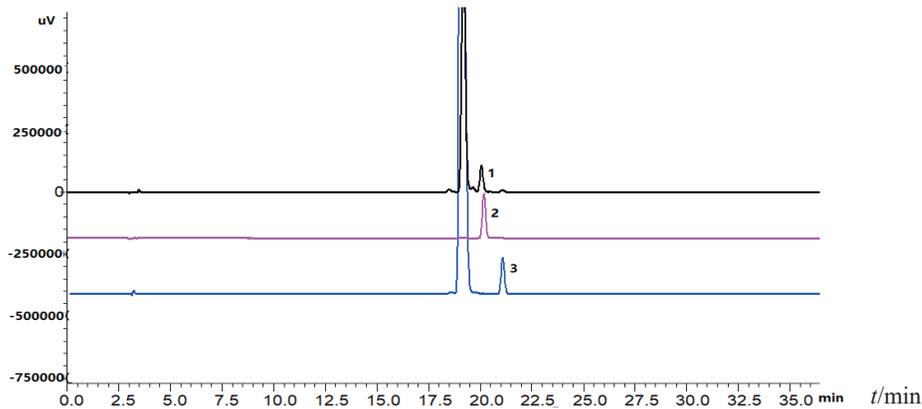
2.3.3 系统适用性溶液2(企业D)

取甘精胰岛素对照品适量, 用0.05 mol·L⁻¹的Tris-HCl缓冲液(pH 8.5)配制成每1 mL含1 mg的溶液, 每1 mL加入1 mg·mL⁻¹胰蛋白酶溶液4 μL, 室温放置2 h, 混匀, 作为系统适用性溶液2。

2.4 试验结果

2.4.1 不同企业的系统适用性溶液1液相色谱分析结果

将企业A、B、C有关物质测定用系统适用性溶液1分别注入液相色谱仪, 按照“2.1”项液相色谱条件进行检测, 记录色谱图, 如图2, 企业A、B、C的“0^A-甘精胰岛素”虽然命名相同, 但在液相色谱仪上的保留时间不同。



1. 企业 B “ 0^A -甘精胰岛素”；2. 企业 A “ 0^A -甘精胰岛素”；3. 企业 C “ 0^A -甘精胰岛素”。

图 2 企业 A、B、C 的 “ 0^A -甘精胰岛素”液相色谱图

2.4.2 不同企业的 “ 0^A -甘精胰岛素” LC-MS/MS 分析结果

将企业 A、B、C 提供的 “ 0^A -甘精胰岛素” 分别采用 LC-MS/MS 对其进行结构确认。结果表明，3 家企业的 “ 0^A -甘精胰岛素” 结构完全不同。

企业 A 提供的 0^A -甘精胰岛素经过 TCEP 还原处理后进行 LC-MS/MS 分析^[14-16]，b 系列及 y 系列碎片离子覆盖图见图 3 及图 4，分析结果显示，该 “ 0^A -

甘精胰岛素” B 链单一同位素分子量与甘精胰岛素 B 链单一同位素分子量相同，未发生变化；A 链单一同位素分子量（2481.08 Da）与甘精胰岛素 A 链单一同位素分子量（2324.979 Da）相比，分子量增加约 156 Da。根据 b 系列及 y 系列碎片结果，可确定结构为甘精胰岛素 A 链 0 位增加一个精氨酸，该结构与美国药典及欧洲药典使用的 0^A -甘精胰岛素结构完全一致。

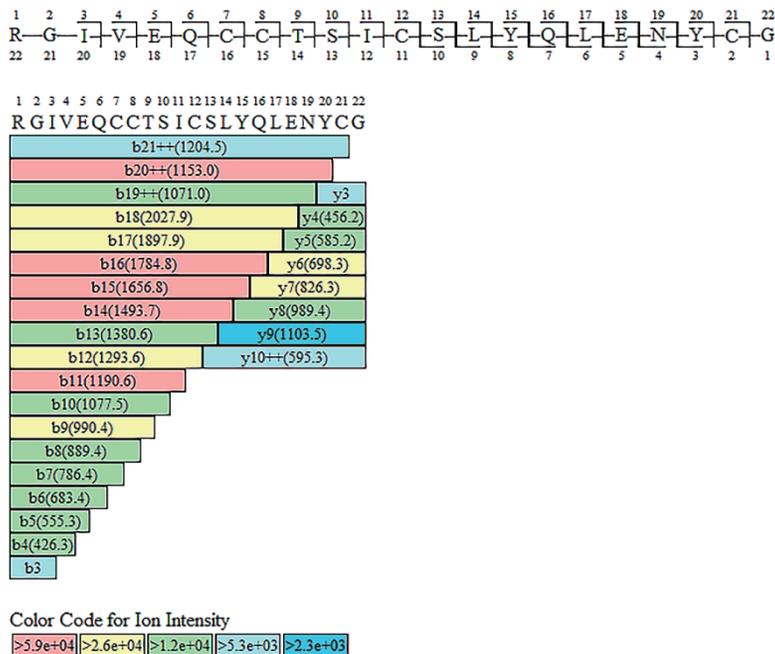


图 3 企业 A 的 0^A -甘精胰岛素 A 链的 b 系列及 y 系列碎片覆盖图

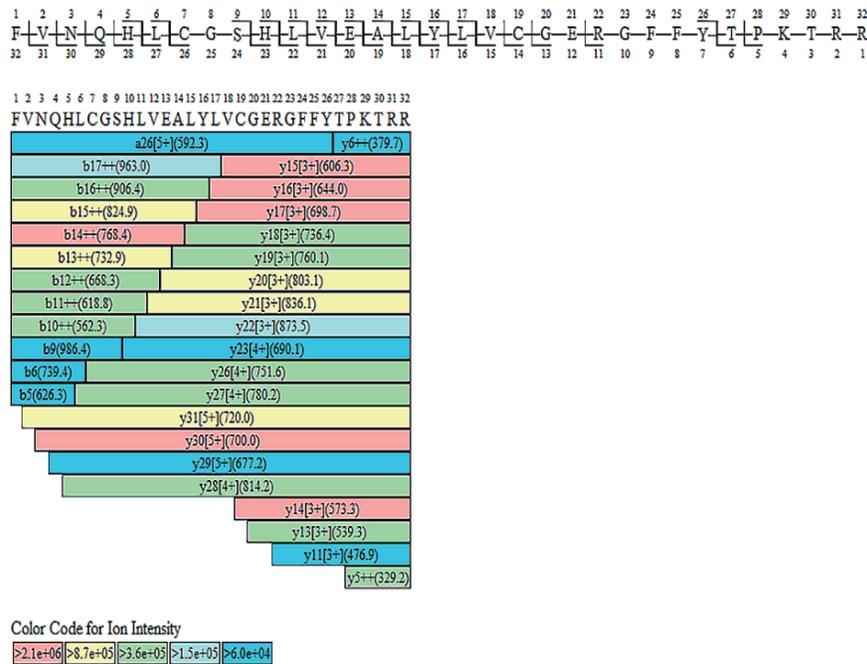


图4 企业A的O^A-甘精胰岛素B链的b系列及y系列碎片覆盖图

企业B的O^A-甘精胰岛素经过TCEP还原处理后进行LC-MS/MS分析，b系列及y系列碎片离子覆盖图见图5及图6，分析结果显示，该“O^A-甘精胰岛素”A链单一同位素分子量与甘精胰岛素A链单一同位素分子量相同，未发生变化；B链单一同位素分子量（3583.786 Da）

与甘精胰岛素B链单一同位素分子量（3739.887 Da）相比，缺失156 Da分子量，输入理论序列FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTR二级质谱图可完全匹配，可确定结构为甘精胰岛素B链32位脱一个精氨酸，即为B32脱精氨酸甘精胰岛素。

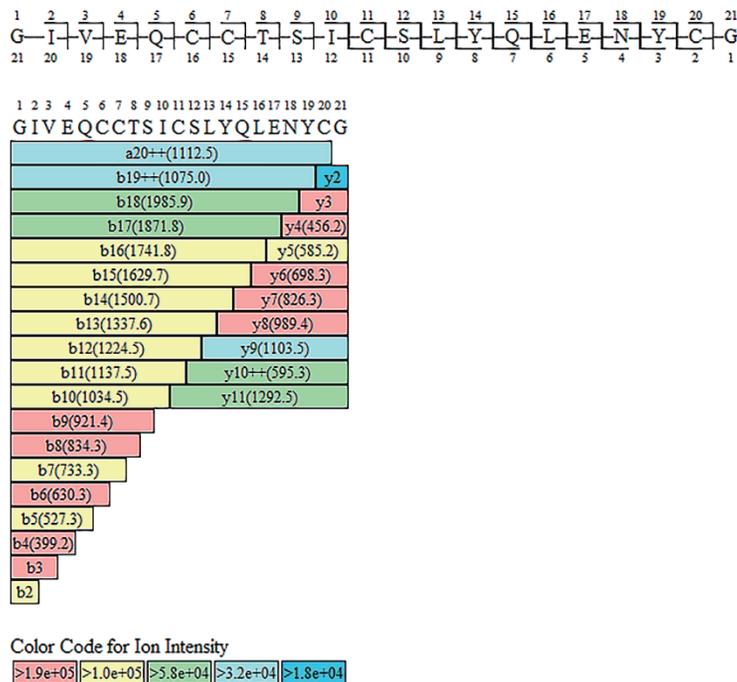


图5 企业B的O^A-甘精胰岛素A链的b系列及y系列碎片覆盖图

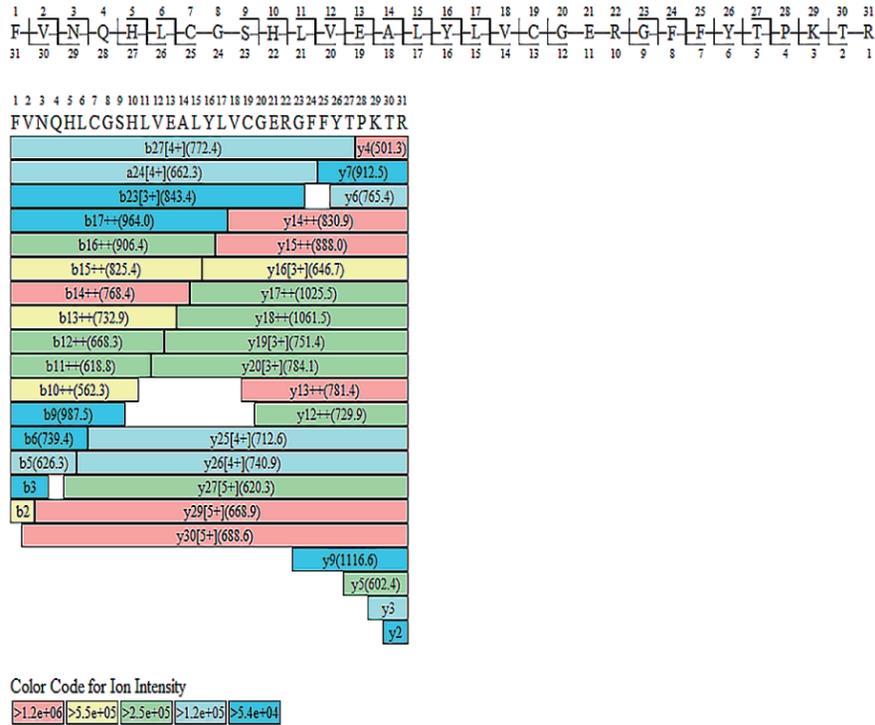


图 6 企业 B 的 O^A-甘精胰岛素 B 链的 b 系列及 y 系列碎片覆盖图

企业 C 的 O^A-甘精胰岛素经过 TCEP 还原处理后进行 LC-MS/MS 分析, b 系列及 y 系列碎片离子覆盖图见图 7 及图 8, 分析结果显示, 该“O^A-甘精胰岛素”A 链单一同位素分子量 (2481.080 Da) 与甘精胰岛素 A 链单一同位素分子量 (2324.979 Da) 相

比, 分子量增加约 156 Da; B 链单一同位素分子量 (3583.786 Da) 与甘精胰岛素 B 链单一同位素分子量 (3739.887 Da) 相比, 缺失 156 Da 分子量。根据 b 系列及 y 系列碎片结果, 可确定结构为甘精胰岛素 A 链 0 位增加一个精氨酸, B 链 32 位脱一个精氨酸。

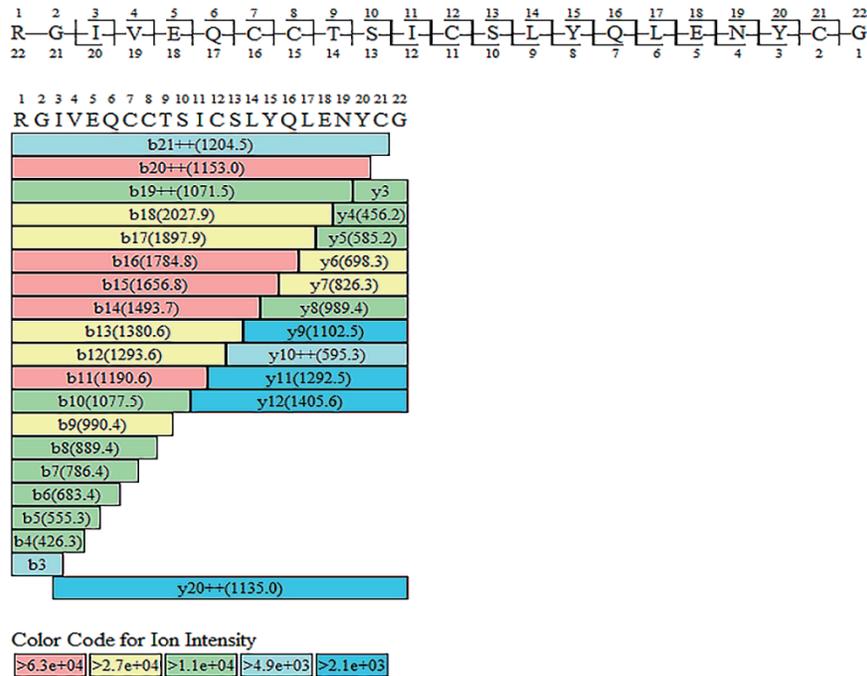


图 7 企业 C 的 O^A-甘精胰岛素 A 链的 b 系列及 y 系列碎片覆盖图

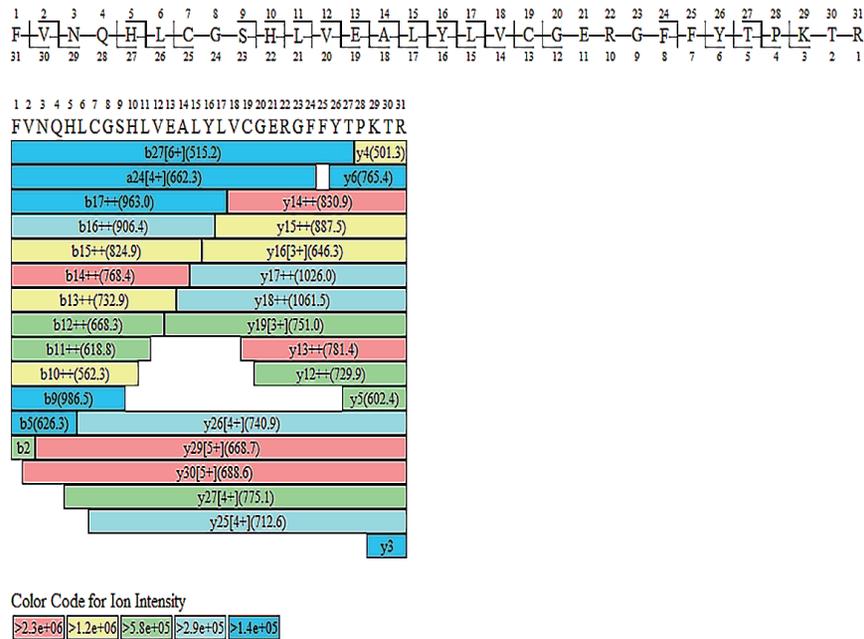
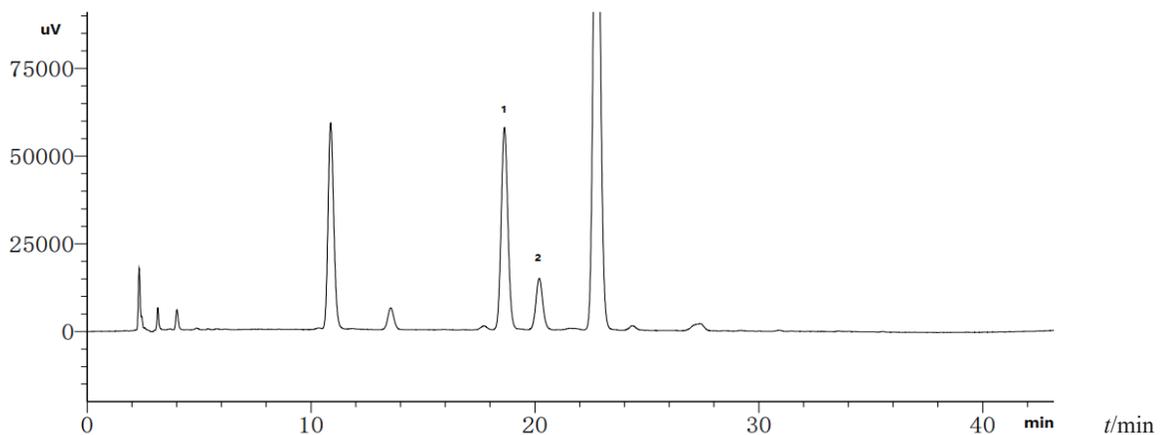


图 8 企业 C 的 O^A- 甘精胰岛素 B 链的 b 系列及 y 系列碎片覆盖图

2.4.3 系统适用性溶液 2 液相色谱分析结果

将系统适用性溶液 2（企业 D）注入液相色谱仪，按照“2.1”项液相色谱条件进行检测，记录色谱图，如图 9。企业 D 系统适用性试验采用胰蛋白酶酶切甘精胰岛素对照品制备甘精胰岛素与 B32 脱精氨酸甘精胰岛素的混合物。由图 1 及图 9 可以看出，因甘精胰岛素肽链有多个胰蛋白酶切位点，

胰蛋白酶酶切后产生的杂质较多，主峰甘精胰岛素及 B32 脱精氨酸甘精胰岛素的含量均较低，酶切后无法判断其准确的出峰位置。且该方法操作步骤繁琐，酶切过程中溶液易浑浊，无法直接进样。因此，企业 D 应根据试验目的，从试验的方便性、实用性、可操作性等方面对系统适用性试验进行更科学严格的设计。



1. 甘精胰岛素；2. B32 脱精氨酸甘精胰岛素。

图 9 系统适用性溶液 2 色谱图

3 讨论

综上,通过对4家企业标准有关物质方法的系统适用性试验进行研究,发现存在不同的问题。其中企业A、B、C系统适用性试验中使用的“O^A-甘精胰岛素”,虽然命名相同,但结构完全不同。企业A“O^A-甘精胰岛素”的结构与美国药典及欧洲药典收录的O^A-甘精胰岛素结构完全一致。企业B“O^A-甘精胰岛素”经结构确认应为B32脱精氨酸甘精胰岛素,企业C“O^A-甘精胰岛素”经结构确认为甘精胰岛素A链0位增加一个精氨酸,B链32位脱一个精氨酸。企业B及企业C的“O^A-甘精胰岛素”的序列测定结果均与O^A-甘精胰岛素的理论序列不一致。企业B及企业C应根据原料药的生产工艺,对工艺杂质进行结构确认,对系统适用性试验所用的杂质名称进行正确命名,更科学准确地对产品中的杂质进行准确定位及测定。企业D采用胰蛋白酶酶切甘精胰岛素对照品制备系统适用性溶液,存在酶切产生的杂质较多,操作步骤繁琐,酶切过程中溶液易浑浊等多种问题。企业D应根据试验目的,积极开发更科学有效的系统适用性试验。

对于甘精胰岛素,《中华人民共和国药典》2020年版已收录,其各论有关物质的限度规定为“最大有关物质不得过1.0%,总有关物质不得过3.0%”,欧美药典及企业标准的限度规定均为“最大有关物质不得过0.5%,总有关物质不得过2.0%”。目前甘精胰岛素注射液有关物质的测定基本执行企业标准。对于系统适用性试验来说,《中华人民共和国药典》2020年版各论与欧美药典及企业标准采用甘精胰岛素与工艺杂质混合制备系统适用性溶液不同,是采用甘精胰岛素与3^B-琥珀酰亚胺-甘精胰岛素混合制备系统适用性溶液。3^B-琥珀酰亚胺-甘精胰岛素为甘精胰岛素的降解产物,不同企业的产品在储存过程中均会产生,适用性比较广;相比较其他工艺杂质,3^B-琥珀酰亚胺-甘精胰岛素为该液相色谱条件下检出的最大有关物质,出峰位置更靠近主峰,更能体现色谱柱的分离效果^[17]。因此,企业应根据试验目的,从系统适用性试验的方便性、可操作性及科学性考虑,参考《中华人民共和国药典》2020年版各论的系统适用性试验,科学合理地设计企业标准的系统适用性试验。

系统适用性试验是高效液相色谱法完整分析

的重要组成部分,已经被越来越多的监管机构所重视,系统适用性要求应该是以满足分析方法检测为目的。从目前甘精胰岛素有关物质分析方法系统适用性试验的质量标准现状来看,部分企业在分析方法开发阶段并没有足够的认识。建议企业提高对系统适用性试验的重视程度,加强研究,完善质量标准,科学有效地进行药品质量控制。

参考文献:

- [1] Ji LN, Zhang PH, Zhu DS, et al. Observational Registry of Basal Insulin with Oral Antihyperglycaemic Drugs: Real-life Use of Basal Insulin in China[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2017, 19 (6): 822.
- [2] 王绿音, 杨慧敏, 李晶, 等. 甘精胰岛素肽图分析方法研究[J]. *生物技术通讯*, 2018, 9 (5): 667.
- [3] 中华人民共和国药典: 三部[S]. 2020: 390.
- [4] Ohnson I S. Human Insulin from Recombinant DNA Technology[J]. *Science*, 1983, 219 (4585): 632.
- [5] Yang Y, Hua Q X, Liu J, et al. Solution Structure of Proinsulin: Connecting Domain Flexibility and Prohormone Processing[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (11): 7847.
- [6] Weiss M A. Proinsulin and the Genetics of Diabetes Mellitus[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (29): 19159.
- [7] Kjeldsen T. Yeast Secretory Expression of Insulin Precursors [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54 (3): 277.
- [8] Sung WL, Yao FL, Zahab DM, et al. Short Synthetic Oligodeoxyribo Nucleotide Leader Sequences Enhance Accumulation of Human Proinsulin Synthesized in Escherichia Coli[J]. *Proc Nstl Acad Sci USA*, 1986, 83 (3): 561.
- [9] 陈来同, 张明军, 胡美浩. 小C肽人胰岛素原类似物(B-Arg-Arg-A)和人胰岛素原(B-C-A)A、B链重组条件的研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2000, 21 (5): 217.
- [10] 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020: 62.
- [11] 周晓源, 李雪茹. 高效液相色谱系统适用性实验设计的变化趋势[J]. *首都医药*, 2006 (9): 53-54.
- [12] USP NF 2023: Vol I[S]. 2023: 2342.
- [13] EP 11.2: Vol II[S]. 2023: 2571.
- [14] 孙瑞祥, 罗兰, 迟浩, 等. “自顶向下(top-down)”的蛋白质组学—蛋白质变体的规模化鉴定[J]. *生物化*

- 学与生物物理进展, 2015, 42 (2): 101. (20): 2876.
- [15] 赵丽艳, 张养军, 钱小红. 蛋白质和多肽的N端测序技术研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2008, 3 (3): 214. [17] 丁晓丽, 陈莹, 梁成罡, 等. 甘精胰岛素注射液有关物质分析方法研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42 (1): 23.
- [16] 温学美, 李悦, 陆静, 等. 串联质谱法在合成多肽药物结构确证中的应用进展[J]. 中国药房, 2019, 30 (收稿日期 2023年9月20日 编辑 王雅雯)