

中、美、英、日四国药典中胰岛素质量标准的比较*

张歌, 董婧, 汤玥, 朱家璧**, 陈西敬**

(中国药科大学药学院, 南京 210009)

摘要 通过查阅中、美、英、日四国药典中关于胰岛素标准的有关内容, 对各主要分析指标及其历年来的改进情况进行分析和对比, 结果中国药典对胰岛素含量测定方法等与美、英等国药典相比尚存在较大差距。建议在今后的中国药典修订版中将含量测定的生物检定法改为 HPLC 法, 其他项目也应参考国外药典改用更加先进的方法。

关键词: 胰岛素; 中国药典; 美国药典; 英国药典; 日本药典; 质量标准

中国分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1969-04

The comparison of the quality standard of insulin in ChP with those in BP, USP and JP*

ZHANG Ge, DONG Jing, TANG Yue, ZHU Jia-bi**, CHEN Xi-jing**

(College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract To investigate the limit contents for quality standard of insulin from the main pharmacopoeias being used in the world looking into the official monographs and appendices in the ChP, USP, BP and JP. The insulin assay method in the ChP is inferior to that of USP and BP and the revision seems urgent.

Key words insulin; ChP; USP; BP; JP; quality standard

体内胰岛素是由胰岛 β 细胞受内源性或外源性物质如葡萄糖等的激动而分泌的一种激素, 由 51 个氨基酸组成, 相对分子质量近 6000 在调节机体糖代谢、脂肪代谢和蛋白质代谢方面有重要作用, 是维持血糖在正常水平的重要激素之一。自 1921 年 Banting 与 Best 首次从牛胰腺中分离出胰岛素并于 1922 年应用于临床治疗以来, 胰岛素一直在糖尿病治疗中发挥着不可替代的作用。它的发现和应用被当作二十世纪生物科学发展的里程碑, 它也是第一个由 DNA 重组技术生产的药品, 为 DNA 重组技术在医药、农业、化工等方面的应用开辟了新纪元^[1]。

胰岛素根据其来源不同, 可分为三类。1. 动物胰岛素: 从猪和牛的胰腺中提取, 两者药效相同, 但与人胰岛素相比, 猪胰岛素中有 1 个氨基酸不同, 牛胰岛素中有 3 个氨基酸不同, 因而易产生抗体。2. 半合成胰岛素: 将猪胰岛素第 30 位丙氨酸, 置换成与人胰岛素相同的苏氨酸, 即为半合成胰岛素。3. 生物合成胰岛素: 利用生物工程技术获得的高纯度的基因重组人胰岛素, 其氨基酸排列顺序及生

物活性与人体本身的胰岛素完全相同。

随着糖尿病人日益增多, 对胰岛素的需要也逐年增长, 有关胰岛素生产工艺及剂型的研究一直在深入进行着, 对胰岛素及其制剂的质量要求也在不断提高。药典作为各个国家药品生产、供应、使用和管理的法定技术依据。对保证药品质量和保障用药安全具有十分重要的作用^[2]。随着胰岛素检测技术的逐步发展, 药典关于其质量标准的规定也在不断改善。现将中国药典 (ChP2005 年版)、美国药典 (USP31 版)、英国药典 (BP2007 版) 及日本药局方 (JP15 版) 中胰岛素质量标准的测定方法进行总结和比较, 分析其发展趋势^[3-13], 并对中国药典与国外药典的差距和改进办法进行论述。

1 各国药典历年来对胰岛素质量标准的改进

1.1 中国药典对胰岛素质量标准的改进情况

中国药典从 1953 年版至 2005 年版均收录了有关胰岛素的质量标准。但在 1953 年版和 1963 年版中仅收录了胰岛素注射液的质量标准, 至 1977 年版才开始收载原料药质量标准, 其中关于胰岛素的鉴

* 国家高技术研究发展计划 (863) 资助项目 (项目名称: 基因重组人胰岛素吸入粉雾剂研制的关键技术与应用 编号: 2007AA02Z171)

** 通讯作者: 陈西敬: Tel (025) 83271286 E-mail: chenxj@jlonline.com 朱家璧: Tel (025) 85338217 E-mail: zhbjb02@vip.163.com

别主要通过酸碱法和小鼠惊厥法,含量测定选用生物检定法。1995年版开始增加了电泳法和葡聚糖凝胶法对有关蛋白质和大分子蛋白质的测定。而各版对含量测定方法一直没有改变,一直采用生物检定法。各版药典的主要发展变化见表 1^[14]。

1.2 美国药典对胰岛素质量标准的改进情况

美国药典过去对于有关蛋白质和大分子蛋白质的测定分别选用过电泳法和凝胶色谱法,而到第 24 版时,均改为 HPLC 法。在 21 版前含量测定均选用生物检定法,至 21 版将 HPLC 法同时收入,至第 24 版,只收录 HPLC 法。在美国近三版药典 (29, 30, 31) 中,胰岛素的质量标准没有变化,人胰岛素的质量标准也没有变化。

1.3 英国药典对胰岛素质量标准的改进情况

英国药典至 1993 版对有关蛋白质和大分子蛋白质的测定仍分别选用电泳法和凝胶色谱法,到 1998 版时均改为 HPLC 法;对胰岛素含量的测定,在 1988 版之前均为生物检定法,而到 1993 版改为 HPLC 法。自 2002 版将牛、猪、人胰岛素质量标准分叙,至 2005 版又单列出人胰岛素类似物 A_{spart} 的质量标准,近三版的药典 (2004, 2005, 2007) 一直都有对语言方面的改进,使其叙述更有条理,而实际内容和条款变化不大。

1.4 日本药典对胰岛素质量标准的改进情况

日本药典目前仍采用兔血糖法进行胰岛素含量

测定,且至今对大分子蛋白质、有关蛋白质、微生物限度和细菌内毒素等均未作要求,该药典自第 14 版开始收录重组人胰岛素。近三版日本药典 (JP13, 14, 15) 中,除第 15 版中将部分项目的质量单位改变 (例: 0.01g 改为 10mg) 外,对其它方面的内容均未修订。

2 中、美、英、日四国现行药典中关于胰岛素质量标准的比较

通过比较中、美、英、日四国现行药典 (ChP2005, USP31, BP2007, JP15), 我们发现各国药典对胰岛素质量标准存在着一定差别 (表 2)。鉴别方面,中国药典采用酸碱法、小鼠惊厥法和 HPLC 3 种方法进行鉴别,日本药典中对胰岛素仅采用沉淀法进行鉴别,而美、英药典均直接采用 HPLC 法进行鉴别;有关蛋白质 (有关物质) 的测定方面,中国药典采用电泳法,而美国药典则已经采用 HPLC 法,显然,方法准确度高于中国药典;大分子蛋白质检测方面,中国药典和英国药典选用分子排阻色谱法,而美国药典则选取 HPLC 法;含量测定方面,中国药典至今仍为生物检定法——小鼠血糖法;日本药典采取双交叉兔血糖法,而英、美药典则早已淘汰了生物检定法而选用 HPLC 法;其他方面,与美国药典和英国药典相比,中国药典尚缺少对胰岛素原及细菌内毒素检查的要求,此外美国药典还对微生物限度检查有具体要求。

表 1 不同时期中国药典胰岛素质量标准比较

Tab 1 Comparison of the quality standard of insulin in different ChP editions

项目 (item)	1977年版 (1977 ed)	1985年版 (1985 ed)	1990年版 (1990 ed)	1995年版 (1995 ed)	2000年版 (2000 ed)	2005年版 (2005 ed)
鉴别 (identification)	(1)酸碱法, (2)小鼠惊厥法 ((1) chemical (2) animal)	同 1977 年版 (as 1977 ed)	同 1977 年版 (as 1977 ed)	(1)、(2)及 (3)HPLC 法 ((1), (2) & (3) HPLC)	同 1995 年版 (as 1995 ed)	同 1995 年版 (as 1995 ed)
吸收度 (absorbance)	-	-	276nm 吸收度为 0.48~0.55 (absorbance at 276nm)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)
有关蛋白质 (related proteins)	-	-	-	电泳法 (electrophoresis)	同 1995 年版 (as 1995 ed)	同 1995 年版 (as 1995 ed)
大分子蛋白质 (high molecular weight proteins)	-	-	-	分子排阻色谱 (size-exclusion chromatography)	同 1995 年版 (as 1995 ed)	同 1995 年版 (as 1995 ed)
氮含量 (nitrogen content)	-	-	14.5% - 16.0% (14.5% - 16.0%)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)
干燥失重 (loss on drying)	-	-	≤ 10% (≤ 10%)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)
炽灼残渣 (residue)	-	-	≤ 2.0% (≤ 2.0%)	-	-	-
含量测定 (assay)	生物检定法 ≥ 25 μ·mg ⁻¹ (bioassay ≥ 25 μ·mg ⁻¹)	同 1977 年版 (as 1977 ed)	生物检定法 ≥ 26 μ·mg ⁻¹ (bioassay ≥ 26 μ·mg ⁻¹)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)
类别 (category)	激素类药 (anionide)	同 1977 年版 (as 1977 ed)	降血糖药 (hypoglycemic)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)	同 1990 年版 (as 1990 ed)

表 2 中、美、英、日现行药典中胰岛素质量标准比较

Tab 2 Comparison of the quality standard of insulin in present ChP, USP, BP and JP

	ChP	USP	BP	JP
鉴别 (identification)	(1)酸碱法 (2)小鼠惊厥法 (3)HPLC法 ((1) chemical (2) animal (3) HPLC	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)	沉淀法 (precipitation)
吸收度 (absorbance)	+ (+)	- (-)	+ (+)	- (-)
有关蛋白质 (related proteins)	电泳法 (electrophoresis)	HPLC(HPLC)	HPLC(HPLC)	- (-)
大分子蛋白质 (high molecular weight proteins)	分子排阻色谱 (size-exclusion chromatography)	HPLC (HPLC)	分子排阻色谱 (size-exclusion chromatography)	- (-)
干燥失重 (loss on drying)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
炽灼残渣 (residue on ignition)	- (-)	- (-)	+ (+)	+ (+)
锌含量 (zinc content)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
氮含量 (nitrogen content)	+ (+)	- (-)	- (-)	+ (+)
微生物限度 (microbial limits)	- (-)	+ (+)	- (-)	- (-)
细胞内毒素 (bacterial endotoxins)	- (-)	+ (+)	+ (+)	- (-)
胰岛素原 (proinsulin)	- (-)	+ (+)	+ (+)	- (-)
含量测量 (assay)	小鼠血糖法 (mouse blood glucose assay)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)	兔血糖法 (rabbit blood glucose assay)

3 重组人胰岛素

从 2000年第 7版中国药典开始收录重组人胰岛素的质量标准, 而到 2005年版又进行了原则性的调整。如将大分子蛋白质的测定方法由 HPLC法改为分子排阻色谱法, 将无菌检查由薄膜过滤法改为微生物限度测定法。含量测定采用反相 HPLC法

(表 3)。中国药典中的测定项目与现行的美国药典相似, 但与美国药典稍有不同的是: 对人胰岛素有氮含量及炽灼残渣的检查要求。而日本药典和英、美两国药典相比, 缺少微生物限度项的要求。总体而言, 与动物胰岛素相比, 中国药典关于人胰岛素的质量标准与美英质量标准相差较小。

表 3 中、美、英、日现行药典中人胰岛素质量标准比较

Tab 3 Comparison of the quality standard of human insulin in present ChP, USP, BP and JP

	ChP	USP	BP	JP
鉴别 (identification)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)
有关蛋白质 (related proteins)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)
大分子蛋白质 (high molecular weight proteins)	分子排阻色谱 (size-exclusion chromatography)	HPLC (HPLC)	分子排阻色谱 (size-exclusion chromatography)	HPLC (HPLC)
干燥失重 (loss on drying)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
炽灼残渣 (residue on ignition)	+ (+)	- (-)	+ (+)	- (-)
锌含量 (zinc content)	UV (UV)	UV (UV)	原子吸收光谱 (AAS)	原子吸收光谱 (AAS)
氮含量 (nitrogen content)	+ (+)	- (-)	- (-)	- (-)
微生物限度 (microbial limits)	+ (+)	+ (+)	- (-)	- (-)
细胞内毒素 (bacterial endotoxins)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
含量测量 (assay)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)	HPLC (HPLC)

通过以上比较可以看出, 四国药典关于胰岛素质量标准存在较大的差异。就胰岛素的含量测定来说, 中国和日本药典目前仍在采用生物检定法。虽然生物检定法一般与药物的活性密切相关, 且结果较为直观, 但使用动物量较多, 操作烦琐, 影响因素多, 实验条件难以控制, 与 HPLC 法相比精密差^[15], 因此英美药典早已不选用这种方法。如美国药典在 1985 年第 21 版即将 HPLC 法与生物检定法同时载入, 至 2000 年第 24 版则只收录 HPLC 法。英国药典在 1988 年版将生物检定法与 HPLC 法同时载入, 而至 1993 年版就将生物检定法淘汰而仅采用 HPLC 法。而我国药典至最新的 2005 年版中却仍采用生物检定法, 质量标准远远落后于国际水平。

过去临床使用的胰岛素是从牛或猪胰腺中直接提取的, 由于当时工艺条件较为落后, 所以产品纯度较低, 难以用色谱法进行定量分析, 只能依赖生物检定法来检测其效价。近年来随着提纯工艺的改进, 使产品达到高纯度与单组分。另外, 随着物理化学分析仪器的逐渐发展, HPLC 法以其良好的精密度和重现性, 得到越来越多的利用。如李湛君等^[16]对比了 RP-HPLC 和生物检定法(小鼠血糖法), 实验证明, 2 种方法测定结果基本吻合, 无显著差异。HPLC 法较生物检定法更加的快捷, 可作自动连续分析, 而生物检定法与之相比准确性较差且费用昂贵^[17]。本文作者^[18, 19]利用 HPLC 法对胰岛素吸入粉雾剂的含量和有关物质进行测定, 证明了与生物法相比 HPLC 法测定结果的精密可大大提高, 且可节约时间和测试成本, 完全可以代替生物检定法进行胰岛素含量测定。除进行常规的效价测定外, HPLC 法可以快速、有效地对胰岛素注射液中的脱酰胺胰岛素、胰岛素原以及一些杂质进行检测, 为胰岛素制剂的质量控制和安全评价提供参考。而在进行生物检定法试验的过程中, 即使出现过敏或动物死亡等急性反应, 也会因整体动物的复杂性而无从得知产生的原因。

药典规定的标准, 应是在安全、有效前提下, 可以正常生产、使用药品的质量标准。所用的检测方法, 也应在考虑国家的经济状况、科技实力和相关人员素质等条件下具体选择。随着我国分析技术的进步和色谱分析仪器的普及, 目前我国已具备修订和完善胰岛素质量标准的条件。故作者建议我国药典

在今后的修订版中对胰岛素的含量测定应淘汰生物检定法而改选 HPLC 法, 其它项目也应参考国外药典改用更加先进的方法。

参考文献

- LI Zhan-jun(李湛君), XU Kang-sen(徐康森). Determination of the insulin potency(胰岛素的效价测定). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18(4): 278
- TIAN Song-jin(田颂九), DING Li-Xia(丁丽霞), TIAN Jie(田洁), et al Developing Status of quality standard in home and abroad Pharmacopoeia(国内外药典中质量标准的发展趋势简述). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1999, 34(11): 780
- ChP(中国药典). 2000. Vol II (二部): 732
- ChP(中国药典). 2005. Vol II (二部): 623
- USP. 2005. 29(II): 1132
- USP. 2006. 30(II): 2356
- USP. 2007. 31(II): 2403
- BP. 2004 Vol I: 1023
- BP. 2005 Vol I: 1039
- BP. 2007 Vol I: 1132
- JP. 1996 13 310
- JP. 2000 14 536
- JP. 2006 15 758
- LIU Wei(刘玮), WANG Wen-Xue(王文学), ZHOU Ying(周颖), et al The comparison of the quality standard between insulin and its preparations(胰岛素及其制剂质量标准的比较). *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2004, 25(3): 187
- LIU Yang(刘杨), HE Hua(何华), NI Kun-yi(倪坤仪). Present Situation and Development in Analysis of Biochemical Drugs(生化药物分析方法的现状与进展). *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2001, 25, (2): 71
- LI Zhan-jun(李湛君), YANG Zhao-peng(杨昭鹏), XU Kang-sen(徐康森). Correlation of HPLC and mouse blood glucose bioassay of rh-Insulin(重组人胰岛素效价测定中生物测定与理化测定的相关性验证). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18(4): 241
- Fisher BV, Smith D. HPLC as a replacement for the animal response assays for insulin. *J Pharm Biomed Anal*, 1986, 4(3): 377
- CHEN Xi-jing(陈西敬), ZHU Jia-bi(朱家璧), WANG Guang-ji(王广基), et al Comparison of HPLC and biological method for insulin assay in insulin powder for inhalation(HPLC 法和生物检定法对胰岛素吸入粉雾剂含量测定的比较). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(4): 313
- CHEN Xi-jing(陈西敬), ZHU Jia-bi(朱家璧), WANG Guang-ji(王广基), et al HPLC determination of insulin its related substances in insulin powder for inhalation(高效液相色谱法测定胰岛素吸入粉雾剂和有关物质). *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2002, 37(2): 131

(本文于 2008 年 12 月 18 日收到)