

# 小样本量预混精蛋白重组人胰岛素注射液的效价测定

孙雪, 黄元礼, 冯晓明, 卢大伟

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要** 目的: 建立小样本量( $<1$  mL) 预混精蛋白重组人胰岛素注射液的效价检测方法, 并进行相关的方法学验证。方法: 采用  $C_{18}$  柱(Phenomenex,  $4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ); 流动相为  $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸盐缓冲液-乙腈(73:27); 检测波长为  $214\text{ nm}$ ; 流速  $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。结果: 重组人胰岛素溶液在  $6\text{ h}$  内稳定性良好, 低、中、高浓度组的加样回收率分别为  $96.7\%$ ,  $97.0\%$ ,  $96.7\%$ , 小样本量法与大样本量法(即中国药典规定方法) 检测同批次预混精蛋白重组人胰岛素注射液效价, 结果无显著区别。结论: 本文建立的小样本量法适用于评价单只预混精蛋白重组人胰岛素笔芯及使用中笔芯的实际效价, 对检测具有重要的实用价值。

**关键词:** 预混; 重组人胰岛素; 效价; 含量测定; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)10-1987-03

## Determination of pre-mixed isophane protamine recombinant human insulin injection with small sample size

SUN Xue, HUANG Yuan-li, FENG Xiao-ming, LU Da-wei

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** An HPLC method for the determination of pre-mixed isophane protamine recombinant human insulin injection with small sample size ( $<1\text{ mL}$ ) was established and the methodology validation was carried out at the same time. **Method:**  $C_{18}$  column (Phenomenex,  $4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) was used. The mobile phase was sulfate buffer ( $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) - acetonitrile (73:27) and the flow rate was  $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , the detection wavelength at  $214\text{ nm}$ . **Results:** The solution of recombinant human insulin was stable within 6 hours. The results for the average recovery rates of low, middle and high concentration groups were  $96.7\%$ ,  $97.0\%$  and  $96.7\%$ . The same batch of pre-mixed isophane protamine recombinant human insulin injection were tested, the results of small sample size method and the large sample size method (ChP method) showed no significant difference. **Conclusion:** Small sample size method is suitable for the evaluation of single cartridge and the actual titer of single using cartridge.

**Key words:** pre-mixed; recombinant human insulin; titer; content determination; HPLC

糖尿病是由胰岛素分泌缺陷及其生物学作用障碍引起的以高血糖为特征的代谢性疾病, 该病常导致各种脏器, 尤其是眼、肾、神经及心血管的长期损害、功能不全和衰竭<sup>[1]</sup>。糖尿病作为一种常见的多发性疾病, 其带来的慢性并发症严重影响患者的生活质量和生存寿命, 并给家庭和社会带来沉重的经济负担<sup>[2]</sup>。

胰岛素(Insulin) 是治疗糖尿病的重要药物。它是由胰岛  $\beta$  细胞产生的多肽类激素, 其由 51 个氨基酸组成, 分子量近 6000。1921 年 Banting 与 Best 首

次从牛胰腺中分离出胰岛素并于 1922 年用于临床治疗糖尿病。

随着 DNA 重组技术的出现, 重组人胰岛素已经成功的进行大规模生产并投入到临床使用中。为了将患者的血糖水平尽量平稳的控制合理范围内, 通过不断的工艺改进, 重组人胰岛素发展出了短效、中效、长效以及预混型制剂, 本文的研究对象即为 70/30 预混型精蛋白重组人胰岛素注射液, 其中含有 30% 重组人胰岛素(短效人胰岛素) 和 70% 精蛋

白重组人胰岛素(中效人胰岛素)。与此同时,高效液相色谱(HPLC)法等先进的理化测定法代替烦琐的生物测定已成为胰岛素效价检测的必然趋势<sup>[9]</sup>。

目前,预混精蛋白重组人胰岛素笔芯(以下简称笔芯)的效价检测主要依据中华人民共和国药典(2010年版)二部中精蛋白重组人胰岛素注射液的“含量测定”项下的规定,采用合并多只笔芯的胰岛素药液,使其体积不小于1 mL后,按照中国药典方法“取本品,每1 mL中加 $9.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液3  $\mu\text{L}$ ”进行供试液的制备。但该方法仅适用于评价多只笔芯的平均效价,无法真实反映每只笔芯的实际效价,具有一定的局限性。并且在胰岛素注射笔的临床使用中,随着笔芯中药液体积的减少,现行的方法将不适用于检测使用中单只笔芯的实际效价。因此,建立可行的小样本量预混精蛋白重组人胰岛素注射液的效价检测方法,对于评价单只笔芯的初始效价及使用中的实际效价具有重要的实际意义。

本文在中国药典(2010年版)的基础上,建立了小样本量( $<1 \text{ mL}$ )预混精蛋白重组人胰岛素注射液的效价测定方法,并进行了相关的方法学验证。

## 1 材料

标准品:重组人胰岛素,批号140633-200703,效价 $27.9 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,中国药品生物制品检定所。

样品:精蛋白锌重组人胰岛素混合注射液(混合同型)(商品名:优泌林<sup>®</sup> 70/30),批号A656905E,规格3 mL:300单位(笔芯),Lilly France。

仪器:高效液相色谱仪,岛津LC-20AT,SPD-20A紫外检测器。

## 2 色谱条件

色谱柱: $\text{C}_{18}$ 柱(Phenomenex,  $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ );流动相: $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸盐缓冲液-乙腈(73:27);检测波长:214 nm;流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;柱温: $40^\circ\text{C}$ ;进样量:20  $\mu\text{L}$ 。该色谱条件下,人胰岛素峰的保留时间为14.4 min,人胰岛素峰与 $\text{A}_{21}$ 脱氨人胰岛素峰的分离度为3.9,人胰岛素峰的理论塔板数约为5700,拖尾因子为0.98,见图1。根据中国药典(2010年版)规定,该色谱条件用于含量测定,按外标法以人胰岛素峰与 $\text{A}_{21}$ 脱氨人胰岛素峰面积之和计算<sup>[9]</sup>。

## 3 方法学验证实验

3.1 重复性试验 精密称取重组人胰岛素标准品适量,用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶解并制成浓度为

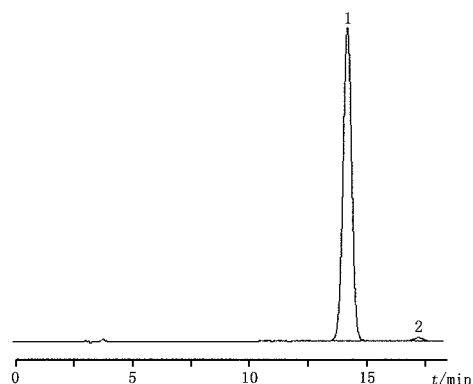


图1 重组人胰岛素的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of recombinant human insulin

1. 人胰岛素(human insulin) 2.  $\text{A}_{21}$ 脱氨人胰岛素( $\text{A}_{21}$  deamination of human insulin)

$10.0 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液。连续进样5次,记录重组人胰岛素峰面积,计算其RSD( $n=5$ )为0.08%。

3.2 稳定性试验 将上述工作液分别于1,2,3,4,5,6 h进样测定,记录重组人胰岛素峰面积,计算其RSD( $n=6$ )为0.05%。结果表明重组人胰岛素的盐酸溶液在6 h内保持稳定。

## 3.3 加样回收率实验

工作液的制备:分别精密称取重组人胰岛素标准品0.00222,0.00365,0.00491 g,置10 mL量瓶中,用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶解并定容至刻度,制成浓度为6.19,10.18,14.09  $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液。

样品溶液的制备:任取笔芯1只,按照胰岛素注射笔及笔芯的说明书将药液充分混匀后,注射出1 mL药液至容器中,并迅速用微量移液枪吸取100  $\mu\text{L}$ 药液,向其中加入 $0.99 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸3  $\mu\text{L}$ ,振荡使其完全澄清,再向其中加入 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸897  $\mu\text{L}$ 稀释并混匀。平行制备9份样品溶液备用。

将上述样品溶液分为3组,每组3份。分别精密加入上述重组人胰岛素工作液各1 mL,混匀后用HPLC进行检测。计算低、中、高3个浓度的加样回收率,测定结果见表1。

表1 加样回收率试验结果

Tab 1 Results of the average recovery experiment

| 组别<br>(components)        | 加标量<br>(amount added)<br>$/\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ | 平均加样回收率<br>(average recovery) /% | RSD<br>/% |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| 低浓度(low concentration)    | 6.19                                                       | 96.7                             | 0.91      |
| 中浓度(middle concentration) | 10.18                                                      | 97.0                             | 0.48      |
| 高浓度(high concentration)   | 13.70                                                      | 96.7                             | 0.30      |

#### 4 小样本量混悬型精蛋白重组人胰岛素注射液的效价测定

工作液的制备: 精密称取重组人胰岛素标准品适量, 用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶解并制成浓度为  $10.0 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的工作液。

样品溶液的制备: 任取笔芯 3 只, 分别按照胰岛素注射笔及笔芯的说明书将药液充分混匀后, 准确注射出 30IU 药液至容器中, 并迅速用微量移液枪吸取  $100 \mu\text{L}$  药液备用。分别向  $100 \mu\text{L}$  药液中加入  $0.99 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸  $3 \mu\text{L}$ , 振摇使其完全澄清, 再向其中加入  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸  $897 \mu\text{L}$  稀释并混匀, 制成理论效价为  $10.0 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品溶液, 用 HPLC 进行检测。通过外标单点法计算, 测定结果分别为  $10.44, 10.60, 10.48 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 5 大样本量混悬型精蛋白重组人胰岛素注射液的效价测定

工作液的制备: 精密称取重组人胰岛素标准品适量, 用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶解并制成浓度为  $10.0 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的工作液。

样品溶液的制备: 任取笔芯 10 只, 按照胰岛素注射笔及笔芯的说明书将药液充分混匀后, 准确注射出 30IU 药液, 合并收集至容器中, 加入  $9.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸  $9 \mu\text{L}$ , 振摇使其完全澄清, 精密吸取  $1 \text{ mL}$  至  $10 \text{ mL}$  量瓶中,  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸稀释并定容至刻度, 制成理论效价为  $9.97 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品溶液。平行制备 2 份样品溶液, 用 HPLC 进行检测。通过外标单点法计算, 测定结果分别为  $10.42, 10.42 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 6 讨论与结论

6.1 讨论 根据胰岛素注射笔及笔芯治疗糖尿病的临床使用情况, 本文选取了常用的每名患者每次注射用量中较小的  $100 \mu\text{L}$  (即 10IU) 作为小样本量待测样品溶液的体积。同时, 为排除胰岛素注射笔的注射精度对实验结果的影响, 采用先注射出较大体积的药液, 再用微量移液枪吸取的方式, 尽量排除可能引入的系统误差。

在中国药典(2010年版)二部中, 精蛋白重组人胰岛素注射液的“含量测定”项下规定, 所加盐酸的浓度为  $9.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 在本实验中, 为保证样品溶液的酸度一致, 将盐酸浓度按照样品溶液体积等比例调整为  $0.99 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 同样可将样品溶液转化为完全澄清, 以便进行下一步的处理。

除此以外, 本文中全部的人胰岛素含量测定均根据 2010 年版中国药典规定, 按外标法以人胰岛素峰与  $A_{21}$  脱氨人胰岛素峰面积之和计算, 与 2005 年版中国药典“以人胰岛素峰面积计算”的规定相区别。

6.2 结论 本文在中国药典(2010年版)的基础上, 建立了小样本量( $<1 \text{ mL}$ )预混精蛋白重组人胰岛素注射液的效价测定方法。由实验结果可见, 同时通过小样本量法及大样本量法(即中国药典规定方法)检测同批次预混精蛋白重组人胰岛素注射液的效价, 得到的结果无显著区别, 并符合方法学验证的要求。其适用于评价单只预混精蛋白重组人胰岛素笔芯及使用中笔芯的实际效价, 对笔芯质量控制及监测使用中笔芯的质量具有重要的实用价值。

#### 参考文献

- 1 LIANG Bin(梁斌). Observation of 40 cases in treating type 2 diabetes with isophane protamine recombinant human insulin injection(精蛋白生物合成人胰岛素注射液治疗 2 型糖尿病患者 40 例的疗效观察). *J Clin Exp Med*(临床和实验医学杂志), 2010, 9(4): 275
- 2 ZHANG Bin(张斌), LAI Xiao-wen(赖小文), ZHANG Hui-hu(张辉虎). Comparison of effect of gene recombinant human insulin and insulin analogs for type 2 diabetes(重组人胰岛素和人胰岛素类似物治疗 2 型糖尿病疗效对照). *Med J West China*(西部医学), 2010, 22(2): 247
- 3 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
- 4 ChP(中国药典). 2010. Vol II(二部): 569

(本文于 2010 年 9 月 10 日收到)