

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.09.021

重组人胰岛素注射液中异天冬氨酸含量检测*

李 恒¹, 晏菊姣¹, 范晓磊¹, 宋德芳¹, 吴健鸿^{1△}, 周朝晖²

(1. 武汉药品医疗器械检验所, 湖北 武汉 430075; 2. 东北大学化学与生物化学系·巴奈特化学与生物分析研究所, 美国 波士顿 02115)

摘要:目的 建立测定重组人胰岛素注射液中异天冬氨酸(isoAsp)含量的方法。方法 应用 IsoQuant[®]异天冬氨酸检测试剂盒, 结合高效液相色谱法检测重组人胰岛素注射液中 isoAsp 的含量, 同时按 2020 年版《中国药典(三部)》法定标准测定杂质 A₂₁ 脱氨人胰岛素。结果 S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)进样量在 5~100 pmol 范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.9997$), SAH 平均加样回收率为 101.68%, RSD 为 11.60% ($n=9$); 2 批样品中 isoAsp 含量的平均值分别为 3.46 nmol/L 和 2.78 nmol/mL, 杂质 A₂₁ 脱氨人胰岛素的含量分别为 1.04 nmol/mL 和 1.70 nmol/mL。结论 所建立的方法可有效测定重组人胰岛素注射液中 isoAsp 的含量, 可作为法定标准中杂质 A₂₁ 脱氨人胰岛素检验的补充, 以控制重组人胰岛素注射液的质量。

关键词: 重组人胰岛素注射液; 异天冬氨酸; 高效液相色谱法; 含量

中图分类号: R927.2; R977.1*5

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)09-0090-04

Determination of Isoaspartic Acid in Recombinant Human Insulin Injection

LI Heng¹, YAN Jujiao¹, FAN Xiaolei¹, SONG Defang¹, WU Jianhong¹, Zhaohui Sunny ZHOU²

(1. Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan, Hubei, China 430075; 2. Department of Chemistry and Chemical Biology · Barnett Institute of Chemical and Biological Analysis, Northeastern University, Boston, Massachusetts, USA 02115)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of isoaspartic acid (isoAsp) in Recombinant Human Insulin Injection. **Method** An IsoQuant[®] isoAsp detection kit was used to determine the content of isoAsp in Recombinant Human Insulin Injection by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, and the impurity A₂₁ desamido human insulin was determined according to the legal standard of the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition, Volume III). **Results** The injection amount of S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) had a good linear relationship with the peak area in the range of 5-100 pmol ($R^2=0.9997$). The average recovery of SAH was 101.68% with an RSD of 11.60% ($n=9$). The average content of isoAsp in the two batches of samples was 3.46 nmol/L and 2.78 nmol/mL, and the content of impurity A₂₁ desamido human insulin was 1.04 nmol/mL and 1.70 nmol/mL. **Conclusion** The established method can effectively determine the content of isoAsp in Recombinant Human Insulin Injection, which can be used as a supplement to the determination of impurity A₂₁ desamido human insulin in the legal standard to control the quality of Recombinant Human Insulin Injection.

Key words: Recombinant Human Insulin Injection; isoaspartic acid; HPLC; content

脱酰胺化是常见的蛋白翻译后修饰形式, 普遍存在于蛋白、多肽类药物中。药物蛋白在生产、存储过程

中天冬酰胺(Asn)残基发生非酶催化脱酰胺反应^[1], 产生特异性降解产物异天冬氨酸(isoAsp), 可改变蛋白质

*基金项目: 湖北省武汉市第五批“黄鹤英才计划”[2017]; 湖北省食品药品监督管理局科研项目[201801013]。

第一作者: 李恒, 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为药品质量分析, (电子信箱)12941574@qq.com。

△通信作者: 吴健鸿, 女, 博士, 主任药师, 研究方向为药理学, (电子信箱)627760985@qq.com。

- [9] 胡雯雯, 陶建伟, 王庆伟, 等. 高精度定量毛细管电泳法同时测定复合维生素 B 片中 B₁、B₂、B₆、烟酰胺及泛酸钙[J]. 色谱, 2019, 37(6): 661-665.
- [10] 张丰梅, 何 轶, 李耀磊, 等. 高效液相色谱与 QDA 质谱联用同时测定附子理中丸中 6 个单酯及双酯型生物碱含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1248-1253.
- [11] 石 岩, 魏 锋, 吕宝俊, 等. 基于 UPLC-QDA 的培植牛黄中胆汁酸类成分化学轮廓考察与测定研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5232-5237.
- [12] 王文波, 于传飞, 张 峰, 等. 超高效液相色谱串联 Qda 质谱法检测单抗 N 糖的研究[J]. 中国药理学杂志, 2018,

53(3): 223-227.

- [13] 刘 伟, 刘天琦, 葛豫炜, 等. UPLC-UV-QDa 联用系统快速分析野生櫻桃李叶化学成分[J]. 食品与机械, 2018, 34(9): 96-99.
- [14] 孙维来, 郑晓雨, 赵彦彪, 等. 基于超高效液相色谱-质谱联用技术对大麻植物中 3 种成分及化学表型分析[J]. 分析化学, 2017, 45(7): 1052-1058.
- [15] 王纯强, 钱永忠, 章程辉, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-QDa 质谱法快速测定白菜与油菜中 15 种氨基甲酸酯类农药及代谢物残留[J]. 农药学报, 2018, 20(4): 459-467.

(收稿日期: 2021-06-17; 修回日期: 2021-09-08)

的结构和功能^[2-3],并可能导致蛋白活性下降^[4-5]。重组人胰岛素由51个氨基酸组成,含有3个天冬酰胺残基,Asn21位点易发生脱酰胺反应^[6],2020年版《中国药典(三部)》中对A₂₁脱氨人胰岛素进行了杂质控制^[7]。目前,胰岛素注射液质量标准的逐步提升使其制剂工艺不断改进,其质量显著提高。蛋白的脱酰胺化研究已列入生物技术药物质量控制的相关内容^[1]。本研究中应用IsoQuant®定量试剂盒,建立了测定重组人胰岛素注射液中脱酰胺产物 isoAsp 含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity II型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);XS205BU型电子天平(精度为0.01 mg),Mettler SevenEasy型pH计,均购于梅特勒-托利多仪器公司;Classic型超纯水机(Elga公司);Vortex-Kylin-Bell 5型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);DK-S26型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);SK250LHC型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为50 kHz);R1750R型高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);AP-9928-3型真空泵(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

重组人胰岛素注射液[诺和诺德(中国)制药有限公司,商品名诺和灵®,批号分别为2020010192和2020061612,规格为300 IU/3 mL(笔芯),质量浓度为3.5 mg/mL];重组人胰岛素标准品(中国食品药品检定研究院,批号为140633-201907,含量为27.2 IU/mg);IsoQuant®定量试剂盒[美国Promega公司,货号为MA1010,批号为0000387327,S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)含量为14.97 μmol/L,IsoAsp-DSIP含量为96.1 μmol/L,S-腺苷-L-甲硫氨酸(SAM)含量为1 mmol/L,异天冬氨酸甲基转移酶(PIMT),5倍反应缓冲液,0.3 mol/L磷酸];磷酸二氢钾(批号为20190509)、磷酸氢二钾(批号为20180109)、无水硫酸钠(批号为20181023)、磷酸(批号为20160425)、乙醇胺(批号为20200807),均为分析纯,盐酸(优级纯,批号为20190118),均购自国药集团化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯,Scharlau公司,批号为20277613)。

2 方法与结果

2.1 HPLC法测定 isoAsp 含量

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Welch Ultimate® XB-C₁₈柱(100 mm × 4.6 mm,5 μm);流速:1.0 mL/min;采用二极管阵列检测器(DAD);检测波长:260 nm;进样量:40 μL;柱温:

25℃;流动相:10%甲醇溶液(含7.9 mmol/L磷酸二氢钾和1.1 mmol/L磷酸氢二钾,用磷酸调pH至6.2,A)-甲醇(B),梯度洗脱(程序见表1)。

表1 梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution procedure(%)					
时间	流动相A	流动相B	时间	流动相A	流动相B
0 min	100	0	10 min	10	90
8 min	80	20	11 min	10	90

2.1.2 溶液制备

SAH对照品溶液:取IsoQuant®定量试剂盒,于室温放置30 min解冻,取试剂盒中SAH对照品(浓度为14.97 μmol/L),分别精密吸取0.5,1.0,2.0,3.0,5.0,10.0 μL,置200 μL进样瓶中,加水稀释至60 μL,制备含量分别为0.125,0.250,0.500,0.750,1.250,2.500 μmol/L的系列SAH对照品溶液。

isoAsp-DSIP质控对照溶液:取IsoQuant®定量试剂盒,于室温放置30 min解冻,取试剂盒中的IsoAsp-DSIP质控对照品浓度为96.1 μmol/L,精密吸取2 μL,置200 μL离心管中,加水稀释至50 μL,得浓度为3.84 μmol/L的isoASP-DSIP质控对照溶液。

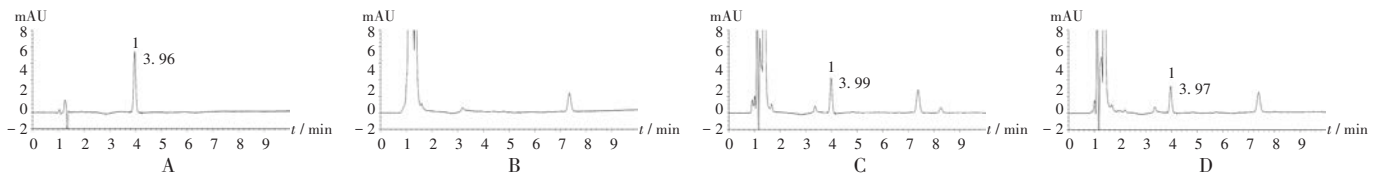
酶反应溶液:取重组人胰岛素注射液(批号为2020010192),取上述isoAsp-DSIP质控对照溶液(浓度为3.84 μmol/L)和水(空白)各10 μL,分别置200 μL离心管中,平行2份,各加入主反应混合物(MM)溶液[水-5倍反应缓冲液-SAM-PIMT(1:1:1:1,V/V/V/V)]40 μL,轻轻涡旋并离心(转速为12 000 r/min),以确保液体均在管底。将离心管放置在30℃的水浴中30 min,取出,置冰上,加终止液(0.3 mol/L磷酸)10 μL,放置5~10 min至反应完全,轻轻涡旋并离心(4℃,转速为12 000 r/min),取上清液,置200 μL进样瓶中,4℃避光保存。

2.1.3 测定法

取SAH对照品溶液(浓度为1.25 μmol/L),以及参与酶反应的供试品溶液、isoAsp-DSIP质控对照溶液、水(空白)各40 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。用标准曲线计算样品中SAH的含量,酶反应溶液中测得1 mol SAH相当于样品中蛋白含有1 mol isoAsp,以此计算重组人胰岛素注射液和IsoAsp-DSIP质控对照溶液中蛋白的isoAsp含量。色谱图见图1。

2.1.4 方法学考察

线性关系考察:分别取2.1.2项下系列SAH对照品溶液各40 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定,以SAH进样量(X,pmol)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.8667X + 0.3613$ ($R^2 = 0.9997$)。结果表明,SAH进样量在5~100 pmol范围内与峰面积



1. SAH
A. SAH对照品溶液 B. 水(空白) C. isoAsp - DSIP 质控对照溶液 D. 供试品溶液

图1 重组人胰岛素注射液 isoAsp 含量检测高效液相色谱图

1. SAH
A. SAH reference solution B. Water (blank) C. isoAsp - DSIP reference solution for quality control D. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of content determination of isoAsp in Recombinant Human Insulin Injection

线性关系良好。

精密度及稳定性试验:取2.1.2项下浓度为1.25 $\mu\text{mol/L}$ 的SAH对照品溶液40 μL ,分别于开始(0 h)、中间(5 h)和结束(10 h)时按2.1.1项下色谱条件进样测定2次。结果SAH峰保留时间和峰面积平均值分别为3.96 min和43.57, RSD 分别为0.11%和0.33% ($n=6$)。

重复性试验:取样品(批号为2020010192)适量,按2.1.2项下酶反应溶液制备方法平行制备6份供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,用标准曲线计算含量。结果isoAsp含量的平均值为3.46 nmol/mL, RSD 为5.10% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取2.1.2项下酶反应溶液与SAH对照品溶液各30 μL ,混匀,即得添加SAH对照品浓度分别为0.25, 0.75, 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 的低、中、高水平加样回收溶液,平行3份,按2.1.1项下色谱条件进样测定SAH的含量,并计算回收率。结果见表2。

表2 加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(pmol)	加入量(pmol)	测得量(pmol)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
11.55	5	16.50	99.00		
11.55	5	16.65	102.00		
11.55	5	17.55	120.00		
11.55	15	25.35	92.00		
11.55	15	25.26	91.40	101.68	11.60
11.55	15	23.94	82.60		
11.55	25	38.54	107.96		
11.55	25	38.14	106.36		
11.55	25	39.99	113.76		

灵敏度考察:取2.1.2项下SAH对照品溶液(浓度为0.125 $\mu\text{mol/L}$),按2.1.1项下色谱条件进样测定。结果色谱峰的信噪比(S/N)为15.9,符合定量要求。

2.2 法定标准 A_{21} 脱氨人胰岛素测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Welch Ultimate® XB - C_{18} 柱(100 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 以0.2 mol/L硫酸盐缓冲液(取无水硫酸钠28.4 g,加水溶解,加磷酸2.7 mL、水

800 mL,用乙醇胺调pH至2.3,加水至1 000 mL) - 乙腈(82:18, V/V)为流动相A,以乙腈 - 水(50:50, V/V)为流动相B,梯度洗脱(程序见表3); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 214 nm; 进样量: 20 μL 。

表3 梯度洗脱程序(%)

Tab. 3 Gradient elution procedure(%)

时间	流动相A	流动相B	时间	流动相A	流动相B
0 min	75	25	61 min	33	67
36 min	75	25	67 min	33	67

2.2.2 溶液制备

系统适用性试验溶液:取重组人胰岛素标准品,加0.01 mol/L盐酸溶液溶解,稀释成每1 mL含1 mg的溶液,室温放置至少24 h。

供试品溶液:取重组人胰岛素注射液,每1 mL中加9.6 mol/L盐酸溶液3 μL ,即得(相当于人胰岛素70 μg)。

2.2.3 系统适用性试验

取2.2.2项下系统适用性试验溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,调节流动相比比例使重组人胰岛素主峰的保留时间约为25 min,重组人胰岛素峰和 A_{21} 脱氨人胰岛素峰(与重组人胰岛素峰的相对保留时间约为1.3)的分离度不小于1.8,拖尾因子不大于1.8。另取2.2.2项下供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,除去苯酚峰或间甲基苯酚峰,按峰面积归一化法计算 A_{21} 脱氨人胰岛素含量。色谱图见图2。

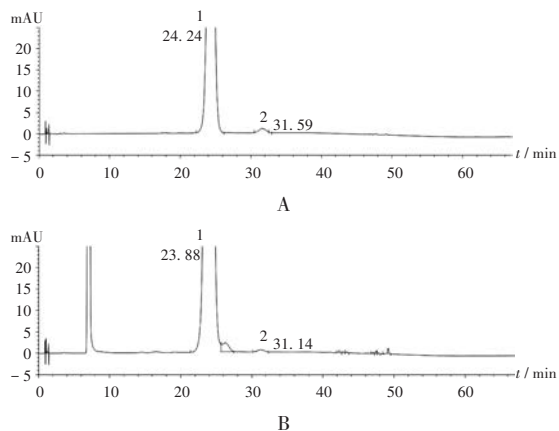
2.3 样品含量测定

对不同批次的样品蛋白进行isoAsp与 A_{21} 脱氨人胰岛素含量测定,结果见表4。

3 讨论

随着生物技术药物在我国的发展,蛋白药物的质量控制越来越严格,脱酰胺化越来越受到关注^[1],关于蛋白药物中isoAsp的研究越来越多^[8-10]。isoAsp的产生是动态变化的过程^[11-14],建立准确、量的检测方法非常必要。

本研究中应用IsoQuant®定量试剂盒中的PIMT催化SAM上的甲基移至样品蛋白中isoAsp的羧基上,而SAM转变为SAH^[1],反应中SAM,SAH,isoAsp的摩尔比



1. 重组人胰岛素 2. A₂₁脱氨人胰岛素
A. 系统适用性试验溶液 B. 供试品溶液
图2 有关物质测定高效液相色谱图

1. Recombinant human insulin 2. A₂₁ desamido human insulin
A. System suitability test solution B. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms of determination of related substance

表4 isoAsp和A₂₁脱氨人胰岛素含量测定结果

Tab. 4 Results of content determination of isoAsp and A₂₁ desamido human insulin

批号	isoAsp		A ₂₁ 脱氨人胰岛素(nmol/mL)
	$\bar{X}$ (nmol/mL)	RSD(%)	
2020010192	3.46	5.10	1.04
2020061612	2.78	0.27	1.70

为1:1:1,即可通过测定SAH而测定蛋白中isoAsp。为保证结果的准确性,需特别注意溶液配制、酶反应操作过程的精确度。重组人胰岛素注射液和isoAsp-DSIP质控对照溶液中SAH含量均在5~100 pmol线性范围内;加入isoAsp-DSIP质控对照溶液(浓度为3.84 μmol/L,理论值为25.63 pmol),其平均值为27.80 pmol(+8.5%),符合要求(±10%)。本研究中所建立的方法操作简便、测定快速、检测有效、结果准确。

曾对重组人胰岛素对照品中的isoAsp进行测定,结果未检测到。可能原因是对照品为粉末,在-18℃温度下于棕色瓶中保存,脱酰胺化不易发生;重组人胰岛素注射液中检测到isoAsp,样品为液体,且保存条件通常为2~8℃,易发生脱酰胺化。由表4可知,2批重组人胰岛素注射液蛋白中isoAsp含量测定结果高于药典方法测得A₂₁脱氨人胰岛素含量,表明重组人胰岛素注射液中发生脱酰胺的位点除Asn21外,还存在其他位点^[15],该结果是对制剂中蛋白脱酰胺化程度的整体评价。isoAsp不同于脱氨人胰岛素,现行法定检验方法有关物质A₂₁脱氨人胰岛素不能真实反映重组人胰岛素注射液中蛋白的脱酰胺化程度,更不能表达isoAsp的情况。

综上所述,所建立的方法能较全面地反映重组人胰岛素注射液中胰岛素蛋白脱酰胺化后产生isoAsp的含量,可作为法定标准中杂质A₂₁脱氨人胰岛素检验的补充,以更好地控制其质量。

参考文献

- [1] 李恒,何雁南,马吉胜,等. 生物技术药物中脱酰胺化检测方法概述[J]. 医药导报,2019,38(2):147-152.
- [2] NOGUCHI S, SATOW Y, UCHIDA T, et al. Crystal structure of *Ustilago sphaerogena* ribonuclease U₂ at 1.8 Å resolution[J]. Biochemistry, 1995, 34(47):15583-15591.
- [3] NOGUCHI S, MIYAWAKI K, SATOW Y. Succinimide and isoaspartate residues in the crystal structures of hen egg-white lysozyme complexed with tri-N-acetylchitotriose[J]. J Mol Biol, 1998, 278(1):231-238.
- [4] CACIA J, KECK R, PRESTA LG, et al. Isomerization of an aspartic acid residue in the complementarity-determining regions of a recombinant antibody to human IgE: Identification and effect on binding affinity[J]. Biochemistry, 1996, 35(6):1897-1903.
- [5] JOHNSON BA, SHIROKAWA JM, HANCOCK WS, et al. Formation of isoaspartate at two distinct sites during in vitro aging of human growth hormone[J]. J Biol Chem, 1989, 264(24):14262-14271.
- [6] 丁晓丽,李湛军,辛中帅,等. 胰岛素注射液质量现状及相关标准研究[J]. 中国药房,2015,26(27):3849-3852.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:378-381.
- [8] 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):879-883.
- [9] 秦玺,姚文荣,丁友学,等. 重组人C1酯酶抑制剂中异天门冬氨酸含量检测[J]. 药物分析杂志,2018,38(11):1905-1910.
- [10] 于雷,陶磊,毕华,等. RP-HPLC法测定可溶性CD95-Fc融合蛋白中异天门冬氨酸的含量[J]. 中国医药导报,2019,16(6):109-112.
- [11] LIU SS, MOULTON KR, AUCLAIR JR, et al. Mildly acidic conditions eliminate deamidation artifact during proteolysis: Digestion with endoprotease Glu-C at pH 4.5[J]. Amino Acids, 2016, 48(4):1059-1067.
- [12] LIU M, CHEETHAM J, CAUCHON N, et al. Protein Isoaspartate Methyltransferase-Mediated ¹⁸O-Labeling of Isoaspartic Acid for Mass Spectrometry Analysis[J]. Anal Chem, 2012, 84(2):1056-1062.
- [13] NI WQ, DAI SJ, KARGER BL, et al. Analysis of Isoaspartic Acid by Selective Proteolysis with Asp-N and Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry[J]. Anal Chem, 2010, 82(17):7485-7491.
- [14] ALFARO JF, GILLIES LA, SUN HG, et al. Chemo-Enzymatic Detection of Protein Isoaspartate Using Protein Isoaspartate Methyltransferase and Hydrazine Trapping[J]. Anal Chem, 2008, 80(10):3882-3889.
- [15] 徐军,吴萌,龚庆伟,等. 重组人胰岛素注射液中B3和B3iso脱氨人胰岛素的分析与鉴定[J]. 分析测试学报, 2015, 34(10):1173-1178.

(收稿日期:2021-09-26;修回日期:2021-12-12)