—技術報告—

高速液体クロマトグラフィー質量分析によるインスリンの測定について

石井 浩

千葉県警察本部刑事部科学捜査研究所
〒260-0024 千葉県千葉市中央区中央港 1-71-1

**Determination of Insulin by High Performance Liquid Chromatography/
Mass Spectrometry (LC/MS)**

Hiroshi Ishii

*Forensic Science Laboratory, Chiba Prefectural Police H.Q.
1-71-1 Chuoko, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-0024, Japan*

(Received 26 September 2006; accepted 4 January 2007)

Analytical method for insulin was developed using high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS). The ESI-MS conditions were optimized for determining human insulin and analogues such as lispro, aspart, glargine. Insulin was also detected for samples such as insulin needles. All insulin analogues and human type were detected as polyvalent ions, and the molecular ion peak was converted by deconvolution. Detection limits of insulins were 0.1 unit/ml (3.8 $\mu\text{g/ml}$) in scan mode, 0.002 unit/ml (77 ng/ml) in SIM mode. Aspart, glargin and human type of insulins were able to be distinguished by the established LC/ESI-MS method. However, human type was not able to be distinguished from lispro type, because molecular weight was the same. Insulin was detected from the used needle which was left outside for two months.

Key words: Insulin, Analogue, Polyvalent ion, Deconvolution, LC/ESI-MS

緒 言

インスリンの過剰投与等の医療事故・過誤は、2004年4月より実施されたインスリン製剤中のインスリン濃度の規格統一によって減少傾向にあるとは言え、なくなることはない。また、インスリン製剤を自殺や殺人の目的で故意に他人に投与¹⁻³⁾するといった事件もある。このような医療過誤や事件が発生した場合、法科学的な見地から患者または被害者の生体試料や使用された医療器具中からインスリン

を検出することが望まれる。このことから、インスリンの分析方法を検討しておく必要がある。

インスリンの測定法には、イムノアッセイ⁴⁻⁸⁾や高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)⁹⁻¹²⁾がある。LC/MS測定は、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) により、多価イオンを検出するものである。この方法による測定の多くはヒトインスリンに対してのものであり、インスリンアナログについての報告¹³⁾は少ない。インスリンアナロ

グとは、ヒトインスリンの作用発現や持続時間の欠点を補うために開発された比較的新しいタイプのインスリンであり、現在では3種類のインスリンアナログが様々な製剤の形で販売されている。インスリンアナログのうち、インスリンリスプロは、ヒトインスリンのB鎖の28位のプロリンと29位のリジンを入れ替えたものであり、インスリンアスパルトは、B鎖の28位のプロリンをアスパラギン酸に置き替えたものである。インスリングルルギンは、21位のアスパラギンをグリシンに置き換え、B鎖C末端に2個のアルギニンを付加したものの¹⁴⁻¹⁶⁾である。

本実験では、ヒトインスリン及び3種類のインスリンアナログ（製剤）についてLC/MSにおける最適条件の検討を行った後、インスリンの検出限界を求めるとともに、インスリン注入針に付着したインスリンの検出を行った。また、インスリンはペプチドであるため、開放状態の系のなかで放置した場合、分解することも考えられることから、注入針内に付着させた後、室外に放置したものについて測定を行った。

材料及び方法

1 材料及び試薬

ヒトインスリン（遺伝子組換え体）は、和光純薬㈱より購入したものを使用した。インスリン製剤は、ペンフィルN注300：100単位/ml（ノボノルディスクファーマ製、ヒトインスリン）、ヒューマログN注カート：100単位/ml（日本イーライリリー製、インスリンリスプロ）、ノボラピッド注300：100単位/ml（ノボノルディスクファーマ製、インスリンアスパルト）、ランタス注オプチクリック300：100単位/ml（アベンティスファーマ製、インスリングルルギン）を使用した。インスリンの質量の単位は、1 mg = 26単位である。各インスリンの分子量をTable 1に、構造（アミノ酸配列の一部）をFig. 1に示した。

ヒトインスリン標準液は、0.01 M 塩酸に溶解して0.002～1 単位/ml（77 ng/ml～38 µg/ml）濃度溶液を調製した。インスリンリスプロ、インスリンアスパルト、インスリングルルギンは、各製剤を0.01 M 塩酸で希釈して調製し、製剤の表記濃度から濃

Table 1 Molecular weight of insulins.

Human	5807.57
Lispro	5807.57
Aspart	5825.54
Glargine	6062.89

度を換算して0.002～1 単位/ml になるように調製した。各標準液は、4℃で冷蔵保存し、用時、室温にもどして測定した。

インスリン注入器は、ペン型のノボノルディスク製ペンフィル300、注入針は、ベクトン・ディッキンソン製マイクロファインプラス31 G（外形0.25 mm）×5.0 mmを使用した。アセトニトリルは、和光純薬製LC/MS用溶媒を用いた。

2 注入針からの抽出

注入器及び注入針はFig. 2及びFig. 3に示したものを使用した。注入器にペンフィルN注300を装着し、注入針からインスリン製剤を5単位排出した。排出後、注入針を注入器からはずして各条件下で放置した。放置後の針を、Fig. 4のようにガスクロマトグラフ用セプタムを装着したプラスチック製注射器の先端に固定し、0.01 M 塩酸溶液50 µlで洗浄抽出し、測定試料とした。

3 高速液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）

高速液体クロマトグラフ質量分析計は、島津製作所製のLC/MS-QP8000αを用い、成分はマイティシルRP-18（150 mm × 2.1 mm i.d., 5 µm）により分離を行った。移動相は、A：0.1%酢酸、B：アセトニトリル、A：20%→（15分）→40%（5分）グラジエント溶出で行った。他の条件は、以下のとおりである。

流量：0.1 ml/min、ディフレクタ電圧：60 V、プローブ電圧：4.5 kV、CDL 温度（脱溶媒温度）：200 °C、ネブライザガス：窒素4.5 l/minでscan及びSIMモード、プロファイルスキャンで測定した。プロファイルスキャンから、デコンボリューションにより分子量を求めた。scanモードでの質量測定は、 m/z 500–2000の範囲で行った。SIMモードでは、 m/z 1011（グルルギン $[M+6H]^{6+}$ ）、1162（ヒト、リスプロ $[M+5H]^{5+}$ ）、1166（アスパルト

Fig. 1 Structures of insulins

(a): human insulin, (b): lispro, (c): aspart, (d): glargine

Fig. 2 Insulin filler Novopen 300 (Novonordisk).

Fig. 3 Needle of insulin filler (31 G 5 mm).
(Becton Dickinson)

[$M + 5H$] $^{5+}$) の各質量数を選択して行った. いずれの試料とも $5 \mu\text{l}$ を装置に導入した.

結果及び考察

1 最適条件の検討

ヒトインスリン標準液で最適分析条件を検討した. CDL 温度は, $180 \sim 250^\circ\text{C}$ で検討したところ, 200°C において最も感度が高く, 温度が高くなるほど感度の低下が認められた. ディフレクタ電圧は, $30 \sim 100 \text{ V}$ で検討したところ, 60 V で最高であった. 60 V を超えると感度の低下が認められた. 以上の最適条件において, Fig. 5 に示すように各インスリンから, いずれも 4 価～7 価の多価イオンスペクトルが検出された. また, デコンボリューション

Fig. 4 Extraction procedure.

処理により, 各インスリンの分子イオンピーク (Fig. 6) が検出された.

2 検出限界

scan および SIM とともに, 多価イオンピークが 3 本以上得られる限界濃度を検出限界と仮定すると (一番小さいイオンで $S/N=3$ 以上) いずれのインスリンも scan モードで 0.1 単位/ml ($3.8 \mu\text{g}/\text{ml}$), SIM モードで 0.002 単位/ml ($77 \text{ ng}/\text{ml}$) であり, 100 単位/ml の製剤で 1000 倍程度まで希釈しても検出可能 (scan) であった. また, 31 G (外形 0.25 mm) $\times 5.0 \text{ mm}$ のインスリン注入針内の残存試料 (内径約 0.15 mm $\cdot$ 長さ 1.5 cm で容積約 $0.26 \mu\text{l}$) から, 製剤 (ペンフィル N 注 300) 使用後の注入針を, 抽出溶媒 0.01 M 塩酸溶液 $50 \mu\text{l}$ で抽出した場合, 検出可能であった.

3 各インスリンの識別

各インスリンの識別は, 多価イオンスペクトルおよびデコンボリューションにより行った. アスパルトおよびグラルギンは, いずれもヒトおよびリスプロと質量および多価イオンスペクトルが異なるため (Fig. 5) 互いに識別可能であった. ヒトとリスプロは, 質量が同一であることから多価イオンスペクトルおよびデコンボリューションスペクトル (Fig. 6) が同一であり, 保持時間も同じであるため互い

Fig. 5 ESI-mass spectra of human insulin and analogues.
(A): human insulin, (B): lispro, (C): aspart, (D): glargine

に識別不能であった。これら、2種類のインスリンは、B鎖の28位と29位のプロリンとリジンを入れ替えただけのものであることから (Fig. 1), 質量測

定において識別不能であるばかりでなく、LCにおける分離も困難なものと考えられる。このことから、LC/MS/MSでの識別を検討する必要があると

Fig. 6 Deconvoluted mass spectra of human insulin and analogues.
(A): human insulin, (B): lispro, (C): aspart, (D): glargine

考えられる。

4 注入針からの検出

製剤（ペンフィル N 注300）排出後の注入針の放置条件は、室外で放置、乾燥加熱器で加熱したもの

について測定した。その結果、いずれの条件においてもヒトインスリンを検出することができた。インスリンは長期間放置することにより分解等で検出不能であることが予想されたが、2 ヶ月間直射日光や

Fig. 7 Total ion chromatogram of human insulin extracted from needle sample. Treatment conditions for needle sample before extraction.

(A) None

(B) Two months preservation (under the porch, season: winter)

(C) Heating (80°C, 5 hr)

雨にさらした試料や、80°Cで5時間乾燥加熱をした試料でも検出され (Fig. 7, Fig. 8), ある程度過酷な条件下にさらされた試料であっても検出可能であることが認められた. 分解物等は本条件では検出されなかった. また, インスリン製剤にはm-クレゾールやフェノール等の添加剤が含有されているため, 添加剤を検出することも製剤使用の証明に有用と考えられる.

結 語

ヒトインスリン, インスリンアナログであるリスプロ, アスパルト, グラルギンをLC/MSにより分析を行い, インスリンを付着させた注入針からのインスリンの検出を行った. 各インスリンの識別に関

しては, ヒトとリスプロは互いに識別できなかったが, この2種類のインスリンとアスパルト, グラルギンとは, 互いに識別可能であった. インスリン付着注射針を各条件下保存して, 溶出-分析したところ, 分解が予想される条件下にさらされた試料であっても検出可能であった.

文 献

- 1) Birkinshaw, V. J., Gurd, M. R., Randall, S. S., Curry, A. S., Price, D. E. and Wright, P. H.: Investigations in a case of murder by insulin poisoning. *Br. Med. J.*, 463-468 (1958).
- 2) Bauman, W. A., Yalow, R. S.: Insulin as a lethal weapon. *J. Forensic Sci.*, **26**, 594-598 (1981).
- 3) Haibach, H., Dix, J. D. and Shah, J. H.: Homicide by insulin administration. *J. Forensic Sci.*, **32**, 208-216 (1987).
- 4) Yalow, R. S., Berson, S. A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.*, **184**, 1648-1649 (1959).
- 5) Chevenne, D., Trivin, F. and Proquet, D.: Insulin assays and reference values. *Diabetes Metab.*, **25**, 459-476 (1999).
- 6) Lindrom, T., Hedman, C. and Arnqvist, H.: Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *J. Diabetes. Care.*, **25**, 1049-1054 (2002).
- 7) Sapin, R., Galudec, V. L., Gasser, F., Pinget, M. and Grucker, D.: Elecsys insulin assay: free insulin determination and the absence of cross-reactivity with insulin Lispro. *Clin. Chem.*, **47**(3), 602-605 (2001).
- 8) Butter, N. L., Hattersley, A. T. and Clark, P. M.: Development of a bloodspot assay for insulin. *Clin. Chim. Acta.*, **310**, 141-150 (2002).
- 9) 小川泰子, 梅田芳久, 加藤郁之進, 久原とみ子, 松本 勇: 生理活性ペプチドのイオンスプレー LC/MS による一斉分析. 日本医用マスペクトル学会講演集. **16**, 191-184 (1991).

Fig. 8 ESI-mass spectra of human insulin extracted from needle sample. Treatment conditions for needle sample before extraction.

- (A) None
- (B) Two months preservation (under the porch, season: winter)
- (C) Heating (80°C, 5 hr)

- 10) Stocklin, R., Vu, L., Vadas, L., Cerini, F., Offord, R. E. and Rose, K.: A stable isotope dilution assay for the *in vivo* determination of insulin levels in humans by mass spectrometry. *Diabetes.*, **46**, 44–50 (1997).
- 11) Kippen, A. D., Cerini, F., Vadas, L., Stocklin, R., Vu, L., Offord, R. E. and Rose, K.: Development of an isotope dilution assay for precise determination of insulin, C-peptide and proinsulin levels in non-diabetic and type II diabetic individuals with comparison to immunoassay. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12513–12522 (1997).
- 12) Darby, S. M., Miller, M. L., Allen, R. O. and Le Beau, M.: A mass spectrometric method for

- quantitation of intact insulin in blood samples. *J. Anal. Toxicol.*, **25**, 8–14 (2001).
- 13) Mario, T., Andreas, T., Philippe, D., Alan, B. and Wilhelm, S.: Qualitative determination of synthetic analogues of insulin human plasma by immunoaffinity purification and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for doping control purposes. *Anal. Chem.*, **77**, 3579–3585 (2005).
- 14) 日本イーライリリーヒューマログN注カート, 添付説明書. 2003.
- 15) ノボノルディスクファーマノボラピッド注300, 添付説明書. 2005.
- 16) アベンティファーマランタス注オプチクリック300, 添付説明書. 2005.