薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (12) 1309—1313 (1984)

高速液体クロマトグラフィーによるインシュリンの分析 (第4報¹⁾)

塩酸溶液中のインシュリンの安定性²⁾

太田美矢子,* 徳永裕司, 木村俊夫, 山羽 力

国立衛生試験所

Analysis of Insulin by High-Performance Liquid Chromatography. IV.¹⁾

Stability of Insulin in Hydrochloric Acid²⁾

MIYAKO OHTA,* HIROSHI TOKUNAGA, TOSHIO KIMURA, and TSUTOMU YAMAHA

National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1, Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo, 158, Japan

(Received June 6, 1984)

The stability of porcine insulin (PI) in various concentrations of hydrochloric acid was investigated by use of high-performance liquid chromatographic (HPLC) method. Separation and determination of PI and its degradation products were achieved on a column of LiChrosorb RP-18 with a mixture of acetonitrile and 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) (29 : 71) containing 50 mM sodium sulfate and 0.2 mM cetyltrimethylammonium bromide as a mobile phase at 30°C. The decomposition of PI in hydrochloric acid was greatly affected by the concentration of hydrochloric acid and temperature, and followed a good pseudo-first order reaction. In 0.001 and 0.01 N hydrochloric acid, PI was stable at 0°C for 28 d, but it decomposed quickly at 30 and 60°C, and gave almost one degradation product. In 0.1 and 0.3 N hydrochloric acid, PI was slightly decomposed at 0°C, but decomposed rapidly at 30°C and gave many degradation products. HPLC method was very useful for the mutual separation of PI and its degradation products in various concentrations of hydrochloric acid.

Keywords—HPLC; LiChrosorb RP-18; porcine insulin; acid-stability; desamido-insulin; degradation product

有用な糖尿病治療剤のインシュリンは、製剤 (中性及び酸性溶液) や塩酸溶液中で徐々に分解し、デスアミドインシュリンを生ずると報告されている。³⁾ これはインシュリンが徐々にデスアミド化されるためで、特にA鎖末端のアスパラギンが容易にデスアミド化されているとされている。Sundby^{3a)} はインシュリンを 0.1 及び 0.5 N 塩酸溶液、37°C、24 日間保存する時、最終的に 1—6 個デスアミド化した 6 種類の分解物を生じたと報告した。しかし、これら 6 種類のモノ、ジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサデスアミドインシュリンは可能な組合せが 63 種類あり、多数の分解物を生成する可能性があるが、Sundby の用いたろ紙電気泳動では分離できず、これに関し詳細に検討した報告は見当らない。著者らは、種々の濃度の塩酸溶液中で生成する多数のデスアミド体の分離定量法を検討し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離定量法を確立し、デスアミド化の機構を解明することが可能となったので報告する。

実 験 の 部

試料、試薬及び溶液 ブタインシュリン (PI) は、ノボ社のモノコンポーネントインシュリンを用いた。塩酸は和光純薬工業株式会社の精密分析用、他の試薬は試薬特級品を用いた。

アクリルアミド水溶液——アクリルアミド 22.2 g と *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド 1.2 g を水に溶かし 1000 ml とする。

緩衝液 A——2 g ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) に 0.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) を加えて溶かし 1000 ml とする。

緩衝液 B——ピリジン 40 g に 800 ml の水を加え、酢酸で pH 5.8 とし、水で 1000 ml とする (0.5 M)。

モノデスアミドインシュリン (PDI)——PI 25 mg に 0.01 N 塩酸溶液 25 ml を加え、60°C で 2 日間インキュベート後凍結乾燥し、乾燥物を 0.01 N 塩酸溶液 5 ml に溶解し、HPLC で分取し、透析膜で脱塩後、凍結乾燥した。

この PDI 1 mg を 0.01 N 塩酸溶液 0.1 ml に溶かし、緩衝液 B 2.5 ml を加えると濁るのでピリジン 0.5 ml を加え完全に溶かす。この液を、緩衝液 B で十分洗浄したカルボキシピプチダーゼ Y 固定化 CH-セファローズ 4B カラム (8×1 cm i.d.) に吸収させたのち緩衝液 B で少し溶出し、初流 4 ml を除き、室温で 1 時間放置する。緩衝液 B で溶出し、最初の 15 ml を分取し、凍結乾燥後、0.02 N 塩酸 0.5 ml を加えて溶かしアミノ酸分析を行う。PI も同様に操作した。アミノ酸分析の結果、アスパラギン酸が PI では見られないが PDI では十分検出されたので、PDI は A 鎖末端のアルギニンがデスアミド化したものである。

装置及び HPLC の条件 HPLC の装置は日立プロセッサ 655-60 (データ処理装置) 付き日立高速液体クロマトグラフ 655 形を用い、カラムはリクロソルブ RP-18 (メルク社、5 μ m, 250 mm×4 mm i.d.)、カラム温度 30°C、流量は 0.8 ml/min で溶出した。検出器は日立波長可変 UV モニター 638-41 を用い、波長は 220 nm、感度は 0.08 O.D. とした。移動相はアセトニトリルと 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.0) (29 : 71) の混液に 50 mM 硫酸ナトリウムと 0.2 mM 臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) を加えた。調製は 20°C で行い、カラムは毎日使用前にアセトニトリルと 0.1 M リン酸 (29 : 71) の混液に 1 mM CTAB を加えた移動相で 1 時間洗浄後、0.2 mM CTAB を加えた移動相で 30 分間洗浄し用いた。アミノ酸分析は日立高速アミノ酸分析計 835 形を用いた。

試料の調整及び定量法 PI 10 mg に 0.01, 0.1 または 0.3 N 塩酸溶液 2 ml を加えて溶かし、一定温度で保存し、各保存日数ごとに 100 μ l ずつとり、それぞれ 0.01, 0.1 または 0.3 N 水酸化ナトリウム溶液で pH 4.0 にし、水で全量を 250 μ l にした (0.001 N 塩酸溶液の場合は 10 ml に溶かし、500 μ l ずつとり 0.01 N 水酸化ナトリウム溶液で pH 4.0 にし、水で全量を 550 μ l とした)。保存温度は 0, 30 または 60°C、保存日数は 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 17, 21, 24 及び 28 日とした。それぞれの試料液は分解の度合いに応じて 1—30 μ l を HPLC に注入し、各定量値はプロセッサから打出された全ピーク面積の総和を 100% とし、各ピークの面積から求めた (重なりピークや小ピークの場合は波形処理線を見ながらベースライン補正し適当なピーク処理法で面積を求めた)。

$$\text{ピーク I の含有量 (\%)} = \frac{\text{ピーク I の面積}}{\text{全ピーク面積の総和}} \times 100$$

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 試料の調製——試料 (2 mg/ml) 0.1 ml、水 0.3 ml 及び 1% SDS を含む 0.01 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 0.4 ml を加えて 37°C、一夜放置した。この液 0.1 ml を適量のしょ糖と 0.05% ブロムフェノールブルーを加え混合した。

ゲルの調製——アクリルアミド水溶液 12.5 ml と緩衝液 6.5 ml を混合し、1.5% 過硫酸アンモニウム水溶液 1 ml、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン 0.03 ml を加えて混合し、直ちにガラス管 (9 cm×6 mm i.d.) に分注し 7 cm の高さにした。その上に水を少し重層し、30 分以上静置した。

泳動——ゲルガラス管を泳動装置に取り付け試料を重層し、泳動用緩衝液 (緩衝液 A: 水=1 : 1) を上下の電極槽に入れ、上を陰極、下を陽極としてカラム 1 本当たり 8 mA の定電流で 4 時間泳動した。0.1% アミドブラック 試液で染色し、7% 酢酸で脱色した。

結 果 と 考 察

HPLC の移動相の検討

CTAB を用いない移動相では、動物種の違うインシュリンの分離に有用だが、⁴⁾ 多数の分解物の分離は困難であった。少量の CTAB を移動相に加えることで、多数の分解物の分離が可能となった。しかし、この条件では保持時間が変動しやすいので、カラムは使用前に実験の部で示したように充分洗浄した。アセトニトリル、硫酸ナトリウム及び CTAB の濃度、0.1 M リン酸塩緩衝液の pH など検討の結果、実験の部で示した移動相を用いた。

各濃度塩酸溶液中での PI の安定性

各種塩酸溶液で、28 日間 PI を保存した時のクロマトグラムを Fig. 1, 2 に示す。分解物は保持時間の短い順に A, B……と記号を付けた (PI は HPLC で 98.9% で PDI を少量含む)。

0°C、28 日間保存では、PI は比較的安定で、0.001 と 0.01 N 塩酸溶液ではそれぞれ 98.8 と 98.0% と安定で、0.1 N 塩酸溶液では 94.9%、0.3 N 塩酸溶液では Fig. 1 a) に示すように、PI は 79.4% と減少し主な分解物の

Dは13.6%であった。

30°C, 28日間保存では, PIは不安定で0.001 N塩酸溶液でもPIは55.1%になったが, 分解物はPDIのみであった。0.01 N塩酸溶液ではFig. 1 b)のように, PIは28.2%で主な分解物のPDIが67.0%も生成した。0.1 N塩酸溶液ではFig. 2 a)に示すように, PIは4.2%のみで, 主な分解物はPDI, D, I, Mでそれぞれ14.8, 6.1, 23.5, 10.8%で, 分解物数は17個あった。PIと主な分解物の経時変化をFig. 3に示す。最初にPDIとDが生成し10日目が最高でその後減少, Iは4日目より生成し21日目が最高でその後徐々に減少, Mは14日目から生成し28日目まで増加した。0.3 N塩酸溶液ではFig. 2 b)に示すように, PI, PDI, Dは消失, M, N₁, N, Oは6–10%ずつ生成, 新たに長い保持時間をもつUとWがそれぞれ28及び16%生成した。保存中30個もの分解物が生成した。

60°C保存の時, 0.3と0.1 N塩酸溶液では1日目, 0.01 N塩酸溶液では3日目にゼラチン様に変質し測定不可能となった。0.001 N塩酸溶液で28日間保存した時, Fig. 1 c)に示すようにPIは完全に消失(7日目で消失)するが, 主な分解物はPDIで77.7%もあった。

塩酸溶液中でのPIの分解に関する考察

各種塩酸溶液を各温度で保存する時, 保存日数に対しPIの残存率を対数目盛でプロットした時, Fig. 4に示すようにいずれも直線となり, 擬一次反応式に従った。0.1及び0.3 N塩酸溶液, 30°C保存では多数の分解物が生成したが, これらは継起反応が主体で複雑でない。Fig. 4では直線(1)–(2)が

Fig. 1. Chromatograms of Porcine Insulin

a) incubated at 0°C for 28 d in 0.3 N hydrochloric acid (4 µg), b) incubated at 30°C for 28 d in 0.01 N hydrochloric acid (3 µg), c) incubated at 60°C for 28 d in 0.001 N hydrochloric acid (4 µg).

Conditions: column, LiChrosorb RP-18 (250 mm × 4 mm i.d.); temperature, 30°C; flow rate, 0.8 ml/min; detection, 220 nm (0.08 O.D.); mobile phase, a mixture of acetonitrile and 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) (29:71) containing 50 mM sodium sulfate and 0.2 mM cetyltrimethylammonium bromide (CTAB).

Compounds: PI, porcine insulin; PDI, porcine monodesamido-insulin. Other degradation products are shown by an alphabet in order of faster retention time.

Fig. 2. Chromatograms of Porcine Insulin

a) incubated at 30°C for 28 d in 0.1 N hydrochloric acid (8 µg), b) incubated at 30°C for 28 d in 0.3 N hydrochloric acid (60 µg).

Conditions and compounds were the same as in Fig. 1.

After an arrow in HPLC chromatogram, the mobile phase was changed from 29% of acetonitrile to 32%.

Fig. 3. Time Courses of Porcine Insulin and Its Degradation Products in 0.1 N Hydrochloric Acid at 30°C

—●—, PI; —○—, PDI; —▲—, D; —■—, I; —△—, M.

0°C, (3)–(6) が 30°C, (7)–(8) が 60°C で、速度定数 k' は塩酸溶液の濃度変化よりも、温度変化に依存すると考えられる。そこで 0.01 N 塩酸溶液中で 30–55°C の各温度で保存した時の k' を求めアレニウス・プロットを作製したところ 1 本の直線となり、活性化エネルギーが 24.5 kcal/mol·degree と大きいことから、PI の分解は複雑な反応でなく、温度に大きく影響され、加熱で促進し、0°C では安定であることが明らかになった。

分解物の分子量が PI と大きく違うかどうかの検討のために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を過酷な条件 (0.3 N 塩酸溶液, 30°C, 28 日間) の試料を用いて PI と比較した (Fig. 5). 両者共に単一バンドで、呈色度合いや移動度も一致した。したがって、多数の分解物は、分子量が PI と大きく変化せず、Sundby^{3a)} の言うように、デスアミドインシュリンであることが示唆された。

塩酸溶液中の PI の分解過程は、みかけ上 2 つ観察された。一方は低濃度塩酸溶液 (0.001 と 0.01 N) の場合で、必ず PDI が生成しその後少しずつ D, I に移行した。他方は高濃度塩酸溶液 (0.1 と 0.3 N) の場合で、最初 PDI と D が生成 (0.3 N では D が多い) し、その過程は $PI \rightarrow PDI + D \rightarrow I \rightarrow M$ (Fig. 3) と進むようだが、擬一次反応であること、0.001 N 塩酸溶液、60°C の分解過程で PDI がほとんど生成してから D が生成することから、PDI の生成と同時に、別の位置のデスアミド化が起こり D となる。したがって高濃度でも $PI \rightarrow PDI \rightarrow D \rightarrow I \rightarrow M$ と逐次分解するが、低濃度に比べ PDI $\rightarrow$ D 以後の反応が非常に早く進行する。

この移動相で多数の分解物が分離出来るのは、デスアミド化によりカルボニル基が増加し、移動相の pH が PI の等電点付近のためカルボニル基が解離し、移動相中の CTAB とイオンペアを形成し疎水性が増すためと考えられる。

Fig. 4. Observed-Pseudo-1st-Order Kinetic Degradation of Porcine Insulin

(1) incubated at 0°C in 0.001, 0.01 and 0.1 N hydrochloric acid, (2) incubated at 0°C in 0.3 N hydrochloric acid, (3) incubated at 30°C in 0.001 N hydrochloric acid, (4) incubated at 30°C in 0.01 N hydrochloric acid, (5) incubated at 30°C in 0.1 N hydrochloric acid, (6) incubated at 30°C in 0.3 N hydrochloric acid, (7) incubated at 60°C in 0.001 N hydrochloric acid, (8) incubated at 60°C in 0.01 N hydrochloric acid.

Fig. 5. SDS Polyacrylamide Disc-Gel Electrophoretograms of Porcine Insulin

(1) PI, (2) incubated at 30°C for 28 d in 0.3 N hydrochloric acid.

Sundby^{3a)} はロ紙電気泳動のため 6 個のスポットしか観察できなかったが、この HPLC 法では 30 個に及ぶ多数のピークを検出したことから、この HPLC 法は分解物の分離定量には非常に有用であった。今後これらの酸分解物を分取し、その構造及び分解過程を検討する予定である。

引用文献及び注

- 1) 第 3 報: M. Ohta, H. Tokunaga, T. Kimura, H. Satoh, J. Kawamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4642 (1984).
- 2) 日本分析化学会, 第 32 年会, 新潟, 1983 年 10 月.
- 3) a) F. Sundby, *J. Biol. Chem.*, **237**, 3406 (1962); b) T. Kasama, Y. Iwata, K. Oshiro, M. Uciida, Y. Sakaguchi, K. Namie, M. Sugiura, *Diabetologia*, **21**, 65 (1981); c) L. F. Lloyd, P. H. Corran, *J. Chromatogr.*, **240**, 445 (1982).
- 4) M. Ohta, H. Tokunaga, T. Kimura, H. Satoh, J. Kawamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3566 (1983).