

胰岛素 USP 专论含量和相关化合物 分析 HPLC 方法的现代化

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱并按照
新修订的 USP <621> 指导原则分析胰岛素

作者

Rongjie Fu
安捷伦科技（上海）有限公司

摘要

按照新修订的 USP <621> 指导原则，使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱对用于胰岛素和人胰岛素含量和相关化合物分析的原始美国药典 (USP) 专论 HPLC 方法进行现代化改造。原始含量测定方法使用 4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱进行等度分离，分析时间为 15 分钟。当方法转移至 InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 和 EC-C18 色谱柱 (4.6×50 mm, $2.7 \mu\text{m}$) 时，分析时间从 15 分钟缩短至 6 分钟（分析时间和溶剂消耗量减少 60%），且无需重新进行方法验证。针对相关化合物的原始方法使用 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱进行梯度分离。当方法转移至 InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 和 EC-C18 色谱柱 (4.6×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$) 时，胰岛素的分析时间从 97 分钟缩短至 39 分钟（分析时间和溶剂消耗量减少 60%），人胰岛素的分析时间从 73 分钟缩短至 29 分钟（分析时间和溶剂消耗量减少 60%），且无需重新验证方法。符合所有系统适用性要求，同时分析时间和溶剂消耗量均显著减少。

前言

大多数 USP 专论中，都提供了用于检测原辅料和配制产品的 HPLC 方法。这些方法一直是仿制药制造商的常规分析技术。这些方法主要采用包括传统 5 µm 颗粒填料色谱柱在内的旧款色谱柱技术。由于这些类型的色谱柱的柱效较低，因此通常需要较长的色谱柱（如柱长 150 mm 或 250 mm），从而导致分析时间较长。根据先前的 USP <621> 指导原则，对于等度方法，USP 仅允许将方法从传统的 5 µm 色谱柱转移至较小粒径的色谱柱。现行 USP <621> 指导原则（2022 年 12 月修订）允许使用全多孔颗粒（TPP，具有较小的粒径）和表面多孔颗粒（SPP）色谱柱同时对梯度方法进行现代化^[1]。

SPP 最近已被应用于 HPLC 色谱柱，提供了比 TPP 色谱柱更高的柱效。安捷伦开发的 2.7 µm InfinityLab Poroshell 120 色谱柱能够提供与亚 2 µm TPP 色谱柱相似的柱效，同时具有更低的反压。使用 2.7 µm SPP 色谱柱和短色谱柱的优点包括缩短运行时间和节省溶剂。这些色谱柱可以与任何 HPLC 和 UHPLC 系统配合使用，因为色谱柱使用标准 2 µm 筛板，可降低颗粒堵塞色谱柱的可能性。与使用较小筛板的亚 2 µm 色谱柱相比，此功能可延长色谱柱寿命。

在我们之前关于胰岛素分析的研究中，证明具有较大孔径 (> 100 Å) 的色谱柱可提供远远更高的柱效和更小的拖尾因子，并且较小的颗粒可提供更高的柱效。2.7 µm InfinityLab Poroshell 120 色谱柱同样提供了出色的柱效^[2]。在涉及根据中国药典的胰岛素和人胰岛素分析的先前研究中也观察到这一结果^[3,4]。

在本应用简报中，根据 2022 年 12 月 1 日起生效的现行 USP <621> 指导原则，在允许的调整范围内，将 USP 中针对胰岛素和人胰岛素的原始含量测定方法和相关化合物检测方法^[5,6]转移至 SPP 色谱柱。原始方法首先在 5 µm Agilent Pursuit C18 和 Polaris C18-A 色谱柱上运行，经过现代化改造的方法则在 InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 和 EC-C18, 2.7 µm 色谱柱上实现。

实验部分

仪器与材料

在整个应用程中，Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统均使用 0.17 mm 管线。表 1 列出了仪器配置。

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级。乙腈、无水硫酸钠、磷酸、乙醇胺以及胰岛素和人胰岛素标准品购自安谱实验科技公司（中国上海）。水经由 Elga PURELAB Chorus 系统 (High Wycombe, UK) 纯化。根据 USP 胰岛素和人胰岛素专论制备系统适用性溶液。

原始方法条件和系统适用性要求列于表 2 中。用于相关化合物分析的传统色谱柱和 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱的梯度条

表 1. 仪器配置

模块和软件	组件规格
Agilent 1260 Infinity II 二元泵 (G7112B)	4 位/10 通阀, 600 bar (货号 5067-4287)
Agilent 1260 Infinity II Multisampler (G7167A)	样品瓶, 螺口, 棕色, 带书标签, 经认证, 2 mL, 100/包 (货号 5182-0716)
	瓶盖, 螺口, 蓝色, PTFE/红色硅橡胶隔垫, 100/包 (货号 5182-0717)
Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (MCT, G7116A)	标准气流加热器 (G7116-60015) 加热器和色谱柱: Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接组件, 105 mm, 0.17 mm (货号 5067-6166)
Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)	10 mm 13 µL 流通池 (货号 G1315-60022) 长寿命氙灯 (2.5 Hz/20 Hz)
Agilent OpenLab CDS, C.01.07 版	-

表 2. 用于胰岛素和人胰岛素分析的原始液相色谱方法条件

参数	含量测定方法的值	相关化合物分析方法的值
色谱柱	L1: 4.6 × 150 mm	L1: 4.6 × 250 mm
流动相	将 28.4 g 无水硫酸钠溶于 1000 mL 水中，移取 2.7 mL 磷酸至该溶液中，并在必要时将溶液 pH 用乙醇胺调节至 2.3。制备该溶液与乙腈 (74:26) 的经过滤和脱气的混合物。	溶剂: 0.2 mol/L 硫酸盐 (将 28.4 g 无水硫酸钠溶于水中，加入 2.7 mL 磷酸，将 pH 用乙醇胺调节至 2.3，再加水定容至 1000 mL) 溶液 A: 制备溶剂与乙腈 (82:18) 的经过滤和脱气的混合物。 溶液 B: 制备溶剂与乙腈 (50:50) 的经过滤和脱气的混合物。
流速	1.0 mL/min	1.0 mL/min
柱温	40 °C	40 °C
进样量	20 µL	20 µL
检测器	214 nm	214 nm
系统适用性要求	重复进样的相对标准偏差不得超过 1.6%；胰岛素或人胰岛素与 A-21 脱酰胺胰岛素之间的分离度 R 不得低于 2.0；且胰岛素或人胰岛素峰的拖尾因子不得超过 1.8	胰岛素或人胰岛素与 A-21 脱酰胺胰岛素之间的分离度 R 不得低于 2.0；且胰岛素或人胰岛素峰的拖尾因子不得超过 1.8

件如表 3 所示。如专论中所述，根据主峰的保留时间要求，通过优化各色谱柱上的流动相组成来调整主峰的保留时间。

表 3. 用于胰岛素和人胰岛素相关化合物分析的梯度条件

色谱柱	流速 (mL/min)	梯度				进样量 (μL)	大容量柱温箱 (°C)	二极管阵列 检测器
		胰岛素		人胰岛素				
Agilent Pursuit 200 Å C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm (货号 A3000250X046)	1.0	时间 (min) 0 60 85 91 92 97	%B 28 28 67 67 28 28	时间 (min) 0 36 61 67 68 73	%B 28 28 67 67 28 28	20	40	214 nm, 2.5 Hz
Agilent Polaris C18-A, 4.6 × 250 mm, 5 μm (货号 A2000250X046)	1.0	时间 (min) 0 60 85 91 92 97	%B 28 28 67 67 28 28	时间 (min) 0 36 61 67 68 73	%B 28 28 67 67 28 28	20	40	214 nm, 2.5 Hz
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (货号 685975-902)	1.0	时间 (min) 0 24 34 36.40 36.80 38.80	%B 30 30 67 67 30 30	时间 (min) 0 14.40 24.40 26.80 27.20 29.20	%B 30 30 67 67 30 30	8	40	214 nm, 40 Hz
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (货号 695975-902)	1.0	时间 (min) 0 24 34 36.40 36.80 38.80	%B 30 30 67 67 30 30	时间 (min) 0 14.40 24.40 26.80 27.20 29.20	%B 30 30 67 67 30 30	8	40	214 nm, 40 Hz

结果与讨论

将含量测定方法和相关化合物分析方法均转移至 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱。根据新修订的 USP <621> 指导原则, 分别按照等度和梯度方法规则调整色谱条件。

含量分析方法调整 (针对等度洗脱的调整)

原始含量测定方法为等度方法, 使用 1260 Infinity II 液相色谱系统和 4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$ C18 (L1) 色谱柱。基于之前的研究, 原始方法检测使用孔径较大的 $5 \mu\text{m}$ 色谱柱, 包括 Pursuit C18 ($200 \text{ \AA}$) 和 Polaris C18-A ($180 \text{ \AA}$)。系统适用性溶液的色谱图如图 1 所示。利用两根色谱柱均得到对称的峰形, 并使胰岛素与 A-21 脱酰胺胰岛素之间获得足够高的分离度。胰岛素和人胰岛素峰面积的相对标准偏差均小于 0.50%, 低于该检测的要求 (1.6%, 见表 5)。

之前, 根据 USP <621> 中允许的调整指导原则, 所有色谱柱和粒径调整均可遵循 L/dp 规则。在该调整中, 色谱柱长度与粒径之比在 -25% 至 +50% 范围内保持不变。按照 L/dp 规则, 不允许将 $5 \mu\text{m}$, 150 mm 色谱柱调整为 $2.7 \mu\text{m}$, 50 mm 色谱柱, 因为 L/dp 低于允许的范围。此规则仍然适用于 TPP-to-TPP 调整。但是, 当应用包括 SPP 的调整时, 调整遵循 N 规则。

新修订的 USP <621> 允许将 TTP 色谱柱变更为 SPP 色谱柱, 只要等度方法的塔板数 (N) 在 -25% 至 +50% 范围内即可。此要求意味着当使用 SPP 色谱柱时, 必须使用通过原始方法和最终调整的方法测量的化合物对 N 进行直接比较。已证明 InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 和 EC-C18 色谱柱有助于成功实施胰岛素分析。因此, InfinityLab Poroshell 120 色

谱柱尺寸的选择取决于实验测得的胰岛素的 N 值。由于 50 mm , $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱的 L/dp 刚好低于允许调整的可接受范围, 因此使用此色谱柱通过实验测定胰岛素效率。填充 SPP 的色谱柱比填充相似尺寸的 TPP 的色谱柱具有更高的柱效。使用 $5 \mu\text{m}$ 色谱柱和 $2.7 \mu\text{m}$ InfinityLab Poroshell 120 色谱柱所获得的 N 值如图 2 所示。

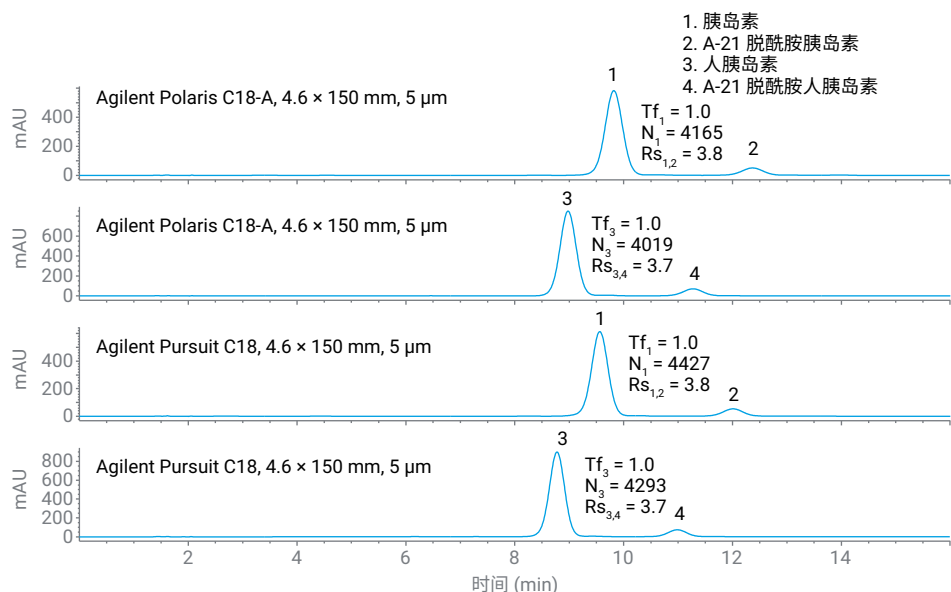


图 1. 使用 4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱进行含量分析的系统适用性测试

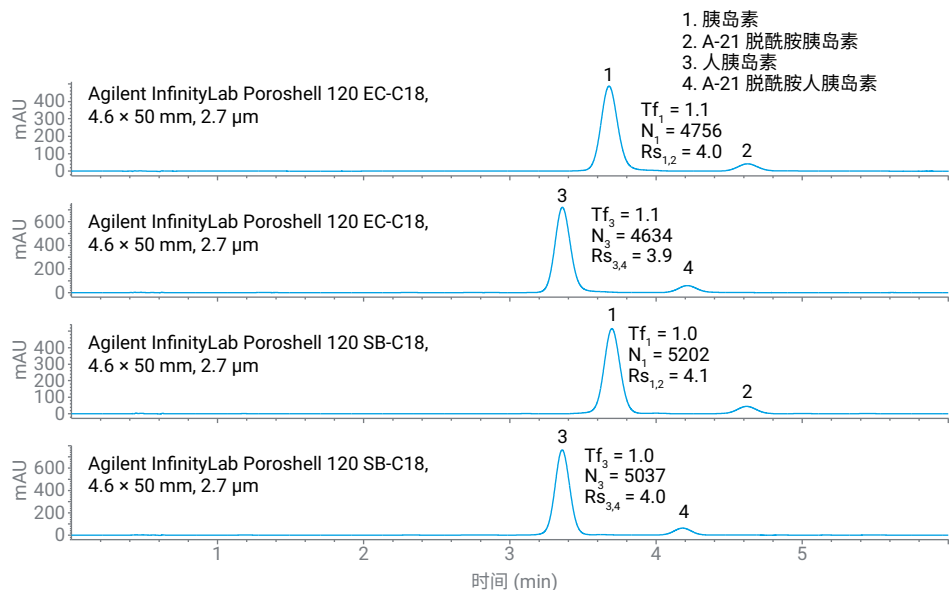


图 2. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 4.6×50 mm, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱进行含量分析的系统适用性测试

在 50 mm, 2.7 μm 色谱柱上，调整后的方法的 N 值均在表 4 所示的允许范围内。此结果意味着，只要含量测定方法符合系统适用性要求（表 5），即可将其转移至 50 mm, 2.7 μm 色谱柱，无需进行额外的方法验证。

使用公式 1 计算允许的进样量调整。

公式 1.

$$V_2 = V_1 \times (L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)$$

其中 V₂ 为调整后的方法的进样量；V₁ 为原始色谱柱的进样量；L₂ 为调整后的柱长；L₁ 为原始柱长；dc₂ 是指调整后的色谱柱内径；且 dc₁ 是指原始色谱柱内径。

因此，进样量按比例从 20 μL 减少至 6.7 μL。

使用公式 2 计算允许的流速。

公式 2.

$$F_2 = F_1 \times [(dp_1 \times dc_2^2) / (dp_2 \times dc_1^2)]$$

其中 F₂ 为调整后的方法的流速；F₁ 为原始方法的流速；dp₂ 为调整后的色谱柱粒径；dp₁ 为原始色谱柱粒径；dc₂ 是指调整后的色谱柱内径；且 dc₁ 是指原始色谱柱内径。

表 4. 含量分析中的色谱柱尺寸变更

色谱柱	胰岛素的 N	可接受范围 (-25% 至 +50%)	人胰岛素的 N	可接受范围 (-25% 至 +50%)
Agilent Polaris C18-A, 4.6 × 150 mm, 5 μm	4165	3124–6048	4019	3014–6029
Agilent Pursuit C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm	4427	3320–6641	4293	3220–6440
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 50 mm, 2.7 μm	4756	在范围内	4634	在范围内
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 4.6 × 50 mm, 2.7 μm	5205	在范围内	5037	在范围内

表 5. 含量分析的系统适用性总结

色谱柱	拖尾因子		分离度		5 次进样峰面积的 RSD (%)	
	胰岛素	人胰岛素	胰岛素	人胰岛素	胰岛素	人胰岛素
Agilent Polaris C18-A, 4.6 × 150 mm, 5 μm	1.0	1.0	3.8	3.7	0.4	0.07
Agilent Pursuit C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm	1.0	1.0	3.8	3.7	0.08	0.3
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 50 mm, 2.7 μm	1.1	1.1	4.0	3.9	0.2	0.05
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 4.6 × 50 mm, 2.7 μm	1.0	1.0	4.1	4.0	0.1	0.09
USP 系统适用性要求	≤ 1.8		≥ 2.0		≤ 1.6%	

在本例中，计算出的流速为 1.85 mL/min。根据修订的 <621> 指导原则，在因色谱柱尺寸改变而进行调整后，允许将流速额外改变 ±50%。如果符合系统适用性要求，则可以在 0.9–2.8 mL/min 的范围内调整流速。对于分子量较大的化合物（例如胰岛素），增加流速并不能成比例地缩短峰的洗脱时间，因此调整后的方法仍采用流速 1 mL/min。

将用于胰岛素和人胰岛素的 USP 含量测定方法从传统的 4.6 × 150 mm, 5 μm TPP 色谱柱转移至 4.6 × 50 mm, 2.7 μm SPP 色谱柱，无需进行额外的方法验证。分析时间从 15 min 缩短至 6 min，分析时间和溶剂消耗量减少 60%。评价了系统适用性标准，且两种方法均符合该标准。显然，使用所述方法能够提高实验室工作效率和样品通量。

针对相关化合物分析的方法调整（针对等度洗脱的调整）

首先使用 1260 Infinity II 液相色谱系统以及 4.6 × 250 mm, 5 μm Pursuit C18 (L1) 和 Polaris C18-A (L1) 色谱柱，测试原始的使用梯度方法的相关化合物分析。系统适用性溶液的色谱图如图 3 和 4 所示。轻松满足系统适用性要求（见表 6）。Pursuit C18 色谱柱在胰岛素主峰与其之前洗脱的杂质之间提供了更出色的分离度，该杂质仅出现在胰岛素系统适用性溶液中。

根据新修订的 USP <621> 指导原则，可以将该梯度方法转移至合适的 UHPLC 色谱柱，以同时减少分析时间和溶剂消耗量。修订后的 USP <621> 指导原则允许将梯度方法的 TTP 改变为 SPP 色谱柱，只要比率 $(t_R/W_h)^2$ 在 -25% 至 +50% 范围内（其中 t_R 为保留时间，且 W_h 为半峰高处的峰宽）即可。将用于相关化合物分析的原始方法转移至 InfinityLab Poroshell 120, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱，且两种 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱上的比率 $(t_R/W_h)^2$ （见表 7）也完全在可接受范围内。此结果表明，将原始方法转移至所述 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱时，无需重新验证方法。

使用 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱所获得的相关化合物分析的色谱图如图 5 和图 6 所示。系统适用性结果如表 6 所示。所有系统适用性值（包括拖尾因子、

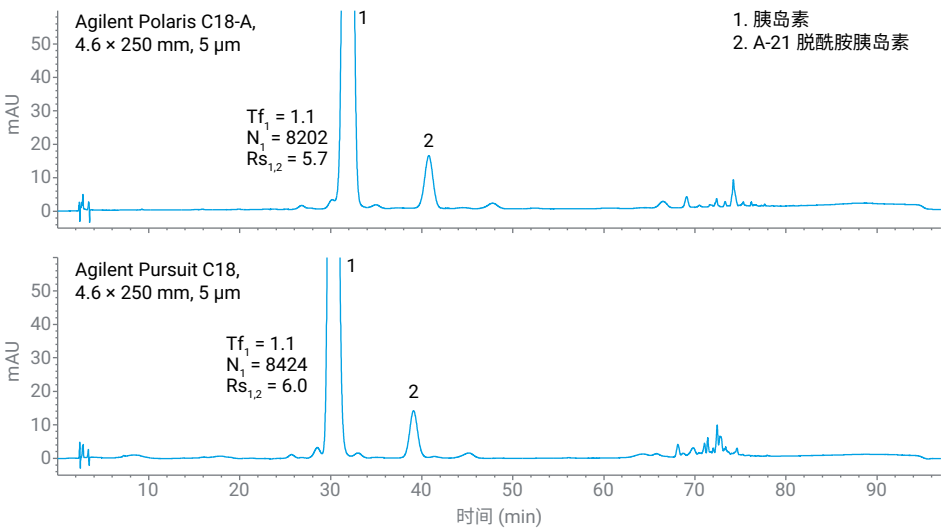


图 3. 使用 4.6 × 250 mm, 5 μm 色谱柱进行胰岛素相关化合物分析的系统适用性测试

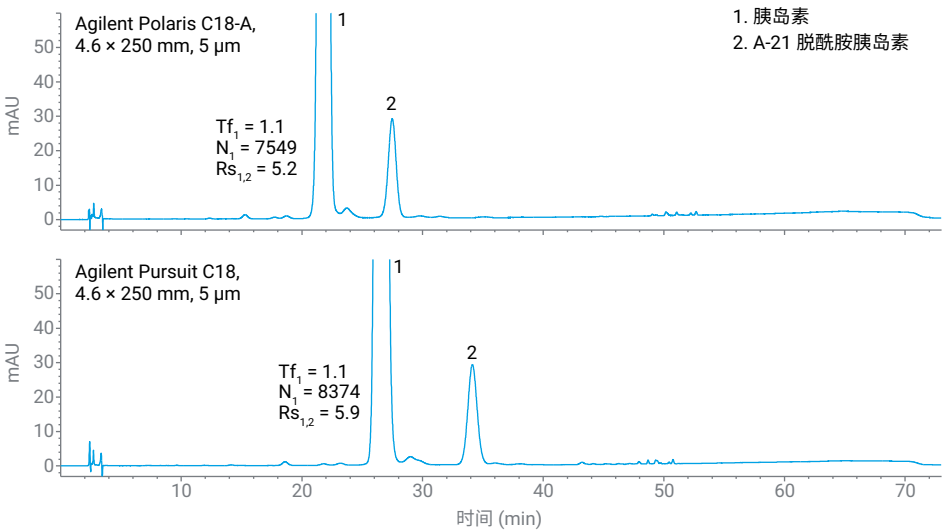


图 4. 使用 4.6 × 250 mm, 5 μm 色谱柱进行人胰岛素相关化合物分析的系统适用性测试

表 6. 相关化合物分析的系统适用性总结

色谱柱	拖尾因子		分离度	
	胰岛素	人胰岛素	胰岛素	人胰岛素
Agilent Polaris C18-A, 4.6 × 250 mm, 5 μm	1.1	1.1	5.7	5.2
Agilent Pursuit C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm	1.1	1.1	6.0	5.9
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	1.0	1.0	6.0	5.6
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	1.1	1.1	6.4	5.8
USP 系统适用性要求	≤ 1.8		≥ 2.0	

表 7. 相关化合物分析中的色谱柱尺寸变更

色谱柱	t _R (min)		W _h (min)		(t _R /W _h) ²		可接受范围	
	胰岛素	人胰岛素	胰岛素	人胰岛素	胰岛素	人胰岛素	胰岛素	人胰岛素
Agilent Polaris C18-A, 4.6 × 250 mm, 5 μm	31.819	21.748	0.8369	0.5892	1445.5	1362.4	1084–2168	1022–2044
Agilent Pursuit C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm	30.220	26.520	0.7751	0.6821	1520.1	1511.6	1140–2280	1134–2267
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	13.440	9.248	0.3500	0.2428	1474.6	1450.8	在范围内	在范围内
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	13.951	9.251	0.3431	0.2639	1653.4	1228.8	在范围内	在范围内

分离度和峰面积相对标准偏差测量值) 均符合要求。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 和 SB-C18 色谱柱均提供了对称的峰形, 而 InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 色谱柱比 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱更有效地分离了胰岛素峰之前的杂质。SB-C18 是一种未封端 C18 固定相, 具有与封端 EC-C18 固定相不同的选择性, 为方法开发提供了更高的灵活性。还可以根据公式 1 和 2 调整进样量和流速。同样, 对于 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱, 流速保持在 1 mL/min。

使用公式 3 调整梯度时间。

公式 3.

$$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$$

其中 t_{G2} 为调整后的方法的梯度分段时间; t_{G1} 为原始方法的梯度分段时间; F₂ 为调整后的方法的流速; F₁ 为原始方法的流速; L₂ 为调整后的方法的柱长; L₁ 为原始方法的柱长; dc₂ 为调整后的色谱柱内径; dc₁ 为原始色谱柱内径。

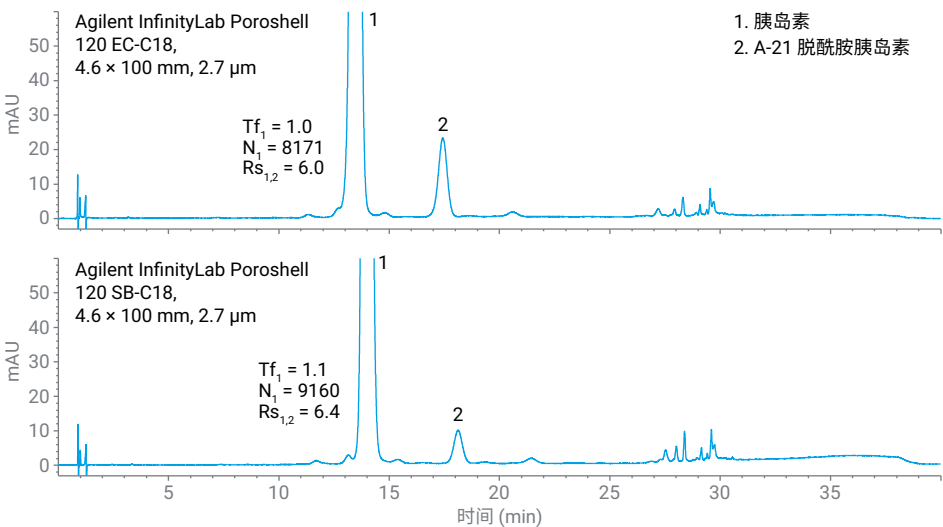


图 5. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱进行胰岛素中相关化合物分析的系统适用性测试

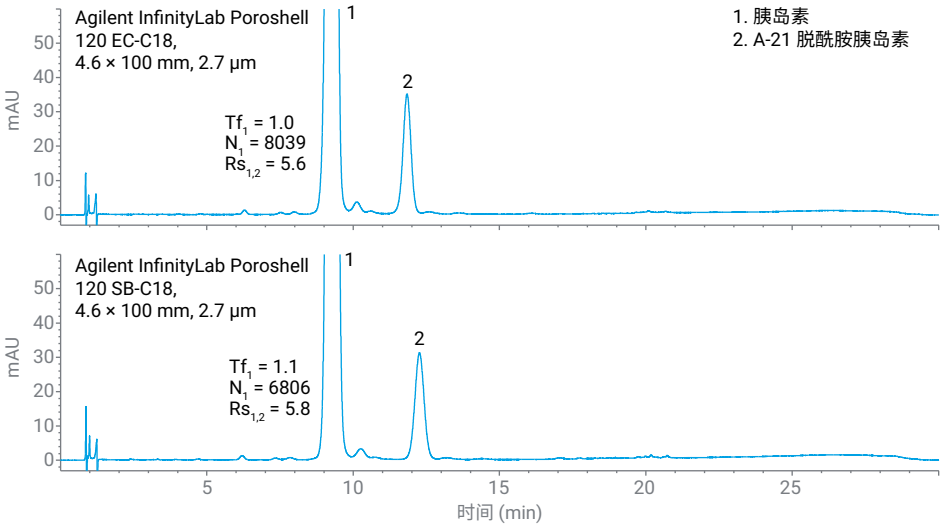


图 6. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱进行人胰岛素中相关化合物分析的系统适用性测试

总之，通过使用现代化 USP 方法与 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱，显著减少了相关化合物分析的总运行时间和溶剂用量。当使用 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱时，分析时间和溶剂消耗量总共减少了 60%。评价了系统适用性标准，且两种方法均符合该标准。显然，使用所述方法能够提高实验室工作效率和样品通量。

结论

使用传统 5 μm TPP 色谱柱的旧款色谱柱技术对胰岛素和人胰岛素进行含量测定和相关化合物分析的 USP 方法可获益于更新的技术，例如 SPP 色谱柱。这些方法可经过现代化改造，以 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱为特点，提供类似或改进的结果，同时显著减少分析时间和流动相用量。根据新修订的 USP <621> 指导原则，这些方法调整符合要求，无需进行额外的方法验证。

参考文献

1. USP Harmonized Standards Home Page. *Supplement USP Stage 4 Harmonization*, Official, 1 December **2022**
2. Fu, R.; Joseph, M. 硅胶填料的孔径和粒径大小对一种小分子蛋白质 — 胰岛素分离的影响, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5990-9028CHCN, **2011**
3. Fu, R. Converting a CHP Method of Insulin to Agilent Poroshell 120 columns (将 CHP 胰岛素分析方法转换至 Agilent Poroshell 120 色谱柱), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5990-9029EN, **2011**
4. Fu, R. Converting a CHP Method of Insulin to Agilent Poroshell 120 columns (将 CHP 人胰岛素中相关化合物分析方法转换至 Agilent Poroshell 120 色谱柱), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-4756EN, **2022**
5. USP NF Monographs. USP Insulin, *United States Pharmacopeia* 3503
6. USP NF Monographs. USP Insulin Human, *United States Pharmacopeia* 3506

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE08622455

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2023
2023 年 7 月 12 日, 中国出版
5994-6533ZHCN