

RP-HPLC에 의한 Insulin제제의 동태연구

약품화학과

이 명 숙 · 황 영 숙 · 채 영 주

Determination of Insulin Preparations by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Division of Pharmaceutical Chemistry

Myung Sook Lee, Young Sook Hwang and Young Zoo Chae

= Abstract =

This study was performed to develop the analytical condition of insulin (human, bovine, porcine) preparations. A convenient and quantitative method was based on the RP-HPLC on a Novapak C₁₈ column with ACN/0.2M Na₂SO₄(26/74) at uv 214nm, 25°C. It was showed a good reproducibility(102.5%) and recovery rate(97.4%).

緒 論

최근들어 생활수준의 향상으로 인해 각종 성인병의 발생률이 증가하는 추세로, 대표적 성인병 질환인 당뇨병자의 대사와 관련된 합병증들은 치료가 거의 불가능하며 치명적이다. 이에 고혈당으로 유발되는 혈관기능저하 및 변형을 직접적으로 조절할 수 있는 효과적인 인슐린 제제의 사용량이 증가되고 있다.

De-Meyer(1909)가 췌장의 Langerhans섬에서 분비되는 hormone을 insulin이라고 명명한 이래 Abel(1926)이 insulin을 결정화(結晶化)하였고 Sanger(1955)에 의해서 구조가 결정되었으며 최근에는 insulin이 합성되었다. Insulin은 육각결정계(hexagonal system)로 존재하고 약산, 약염기에는 잘 녹으며 등전점(isoelectric point)이 5.30-5.35이다. Insulin은 A와 B chain이 2개의 disulfide결합으로 이루어지고 A chain 내부에는 또 다른 disulfide결합이 있는 단백질로(Fig. 1), disulfide결합이

환원으로 파괴되면 생물학적 활성이 소실되며¹⁾ 각종 동물의 insulin(human insulin m.w. 5808, bovine insulin m.w. 5734, porcine insulin m.w. 5778)은 A chain 중 3개의 아미노산 배열이 다른 유사한 생물학적 활성을 가지고 있다.²⁾ Insulin은 절식(絶食)시킨 2kg 가축에 주사했을 때 혈당이 45mg/100ml로 저하되는 것을 1 국제단위로 하고 있으며, insulin의 국제표준품은 22 IU/mg을 함유한다. 또한, insulin은 혈당이 상승하면 췌장의 β -섬 세포에서 분비되어 포도당의 말초적 이용을 촉진시키고 간에서의 유리를 억제하여 혈당량을 저하시킴으로써 혈당량을 정상치로 유지시켜 당뇨병 치료에 이용하는데 작용시간에 따라 속효성, 중간형, 장시간형으로 나누어진다.³⁾

국내의약품 중 인슐린제제의 함량시험은 대한약전 제 6 개정 "인슐린 주사액"에 의한 bioassay로 실험동물을 토끼로 사용하고, 표준액과 검액의 주사량을 예비시험 또는 경험에 의하여 0.3-0.5ml 범위내에서 정해서 투여하고 일정 시간 후 토끼귀의 주변정맥에서 충분한 양의 혈액을 채취하여 혈당을 정량한다.⁴⁾ 그러나, 이 정량법은 투여용량을 경

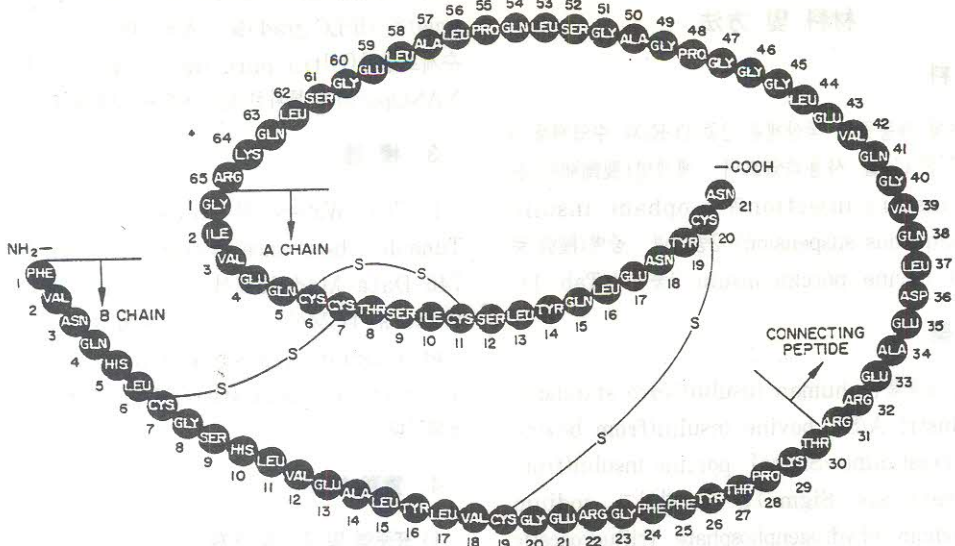


Fig. 1. Human proinsulin and its conversion to insulin.

험에 의해서 결정해야 하는 모호한 면과 실험동물의 개체특성으로 야기될 수도 있는 오차등을 혈당변화 대 역가에 관한 환산으로 보정해야만 하는 결점이 있고, 인간이 아닌 소나 돼지등에서 유래된 이종인슐린과의 구별방법이 아직 기재되지 못한 상태이다. 또한 그 조작방법과 계산법이 까다

로와 많은 시간과 숙련된 기술이 요구되기도 한다. 이에 저자들은 공정서와 문헌조사를 통해 얻은 RP-HPLC조건을 기초로 하여 비교실험 후, 실제 검정업무에 적합하도록 신속하고 간편한 RP-HPLC에 의한 인슐린 정량법을 확립코자 본 실험을 시도하였다.

Table 1. Properties of preparations of insulin.

sample	ingredient (per ml)	type of preparations		appearance
A	human insulin 100 units m-cresol 3 mg	fast acting	neutral insulin injection	clear solution
B	human insulin 100 units m-cresol 1.5 mg phenol 0.65 mg	intermediate acting	isophane insulin injection	cloudy suspension
C	human insulin 100 units (regular 30%, isophane 70%) m-cresol 1.5 mg phenol 0.65 mg	intermediate acting	biphasic isophane insulin injection	cloudy suspension
D	bovine insulin 100 units m-cresol 1.5 mg phenol 0.65mg	intermediate acting	isophane insulin suspension	cloudy suspension
E	bovine insulin 80 units m-cresol 1.8-2.2 mg	intermediate acting	isophane insulin injection (aqueous suspension)	cloudy suspension
F	porcine insulin 100 units m-cresol 3 mg	fast acting	neutral insulin injection	clear solution
G	porcine insulin 100 units m-cresol 1.5 mg phenol 0.65mg	intermediate acting	isophane insulin injection	cloudy suspension

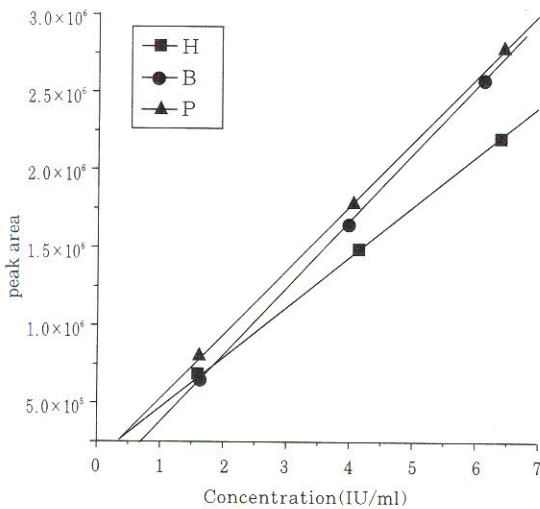
材料 및 方法

1. 材料

서울시내에 유통중인 국산제품 2종(D, E)과 수입제품 5종(A, B, C, F, G)을 사용하였으며, 제제별(製劑別)로는 neutral insulin injection과 isophane insulin injection(aqueous suspension) 2종이며, 종별(種別)로는 human, bovine, porcine insulin 3종이다(Tab. 1).

2. 試藥

Insulin 표준품은 human insulin(Novo standard, Novo industri A/S), bovine insulin(from bovine pancreas crystalline, Sigma), porcine insulin(from porcine pancreas, Sigma)을 사용하였고, sodium sulfate, sodium dihydrogenphosphate, trifluoroacetic



Linear Regression for Data1_H:
 $Y = A + B * X$
 Param Value sd
 A 125001 36866.16681
 B 321818.13516 8343.77324
 R = 0.99966
 SD = 30101.09915, N = 3
 P = 0.0165

Linear Regression for Data1_B:
 $Y = A + B * X$
 Param Value sd
 A -23000 12075.08696
 B 409662.2276 2762.68395
 R = 0.99998
 SD = 9859.26721, N = 3
 P = 0.00429

Linear Regression for Data1_P:
 $Y = A + B * X$
 Param Value sd
 A 108865.5 2849.3801
 B 396685.38441 624.83433
 R = 1
 SD = 2326.50911, N = 3
 P = 0.001

H : human insulin
 B : bovine insulin
 P : porcine insulin

Fig. 3. Calibration of standard insulins

acid, hydrochloric acid는 특급시약을, ACN(acetonitrile)은 HPLC grade를 사용하였다. 그리고 증류수는 순수제조장치(Ultra pure water system, Barnstead NANOpure)를 통과한 탈이온수를 사용하였다.

3. 機器

HPLC는 Waters사의 U6K Universal Injector, 484 Tunable Absorbance Detector, 510 HPLC Pump, 746 Data Module에서 시행되었고, 컬럼의 온도는 Waters TCM에 의해 조절되었다. 그 밖에 pH meter(Orion Research, model 701A/ digital ionalyzer), magnetic stirrer MG-15(선일기기)등이 사용되었다.

4. 實驗方法

1) 표준액 및 검액의 조제

① 표준액의 조제 : Human insulin(100.0 IU/ml), bovine insulin(23.6 IU/mg), porcine insulin(27.8 IU/mg) 표준품을 각각 10ml, 35mg, 31mg씩 정밀하게 취해 50ml 용량플라스크에 넣고 0.01N-HCl로 표선까지 채워 표준원액으로 한다(human 20.0 IU/ml, bovine 16.5 IU/ml, porcine 17.2 IU/ml).

② 검액의 조제 : 검체를 각각 1ml씩 취하여 50ml 용량 플라스크에 넣고 0.01N-HCl로 표선까지 채운다(1.6-2.0 IU/ml).

2) 검량선(檢量線) 작성

1)①의 표준원액을 각각 5.0, 10.0, 20.0ml씩 취하여 50ml 용량플라스크에 넣고 0.01N-HCl로 표선까지 채운 후, 이들 표준액을 각각 10 μ l씩 injection하여 얻은 peak area를 이용하여 검량선을 작성하였다(Fig. 3).

3) 이동상과 온도변화에 따른 정량(定量)

유기변형제(organic modifier)로 ACN을 사용하고, 완충액으로 0.1M NaH₂PO₄(pH2.0), 0.2M Na₂SO₄(pH2.3), 0.1v/v% TFA(trifluoroacetic acid) 세 종류를 사용했다. Bovine insulin 표준액(1.652IU/ml)을 가지고 처음에는 ACN의 비율을 20, 30, 40%로 해서 각각의 피크모양과 피크 머무름시간(retention time)을 관찰했고, 그 중 가장 양호한 30% ACN을 기준으로 다시 26, 28, 30, 32, 34% ACN으로 세분하여 실험하였다. 또, 결과가 대체로 양호한 5가지 이동상을 조제한 후, 25, 30, 35, 40, 45 $^{\circ}$ C에서의 온도변화에 따른 인슐린의 동태를 살

Table 2. Analytical condition of HPLC

column	Novapak C ₁₈ (4 μ m, 3.9mm I.D x 150mm)
detection wavelength	uv 214 nm
flow rate	0.8 ml/min
injection volume	10 μ l
chart speed	0.25 cm/min
mobile phase	① ACN : 0.1M NaH ₂ PO ₄ (pH2.0) = 30 : 70 ② ACN : 0.1M NaH ₂ PO ₄ (pH2.0) = 28 : 72 ③ ACN : 0.1 v/v% TFA = 30 : 70 ④ ACN : 0.2M Na ₂ SO ₄ (pH2.3) = 30 : 70 ⑤ ACN : 0.2M Na ₂ SO ₄ (pH2.3) = 26 : 74

해보았다. RP-HPLC의 조건 및 이동상의 조성은 Tab. 2와 같다.

4) 회수율(回收率) 측정

일정량의 human insulin, bovine insulin, porcine insulin 표준원액을 일정량의 검체에 가한 후 검액의 조제와 같은 방법으로 조제하여 회수율을 측정하였다.

結果 및 考察

Human insulin의 분자구조는 Fig.1과 같으며 이 구조에서 B30위치의 threonine이 alanine으로 전환되면 porcine insulin의 구조가 되며, 다시 여기에서 A8과 A10의 threonine과 isoleucine이 alanine 과 valine으로 치환되면 bovine insulin의 구조가 된다.

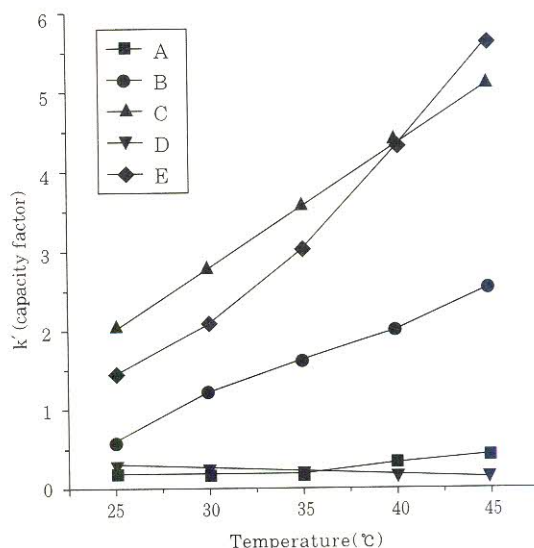
1. 이동상의 변화에 따른 insulin 동태

Purcell A.W등은 ACN을 유기변형제로 사용해서 insulin을 분석했는데, 대개 40%비율까지는 ACN비율이 증가하면 용량인자가 증가하고 40%이상에서는 이와 다른 양상을 보여주었다.⁵⁾ 이에 근거하여 저자들이 이동상의 조성 중 ACN의 비율을 20, 30, 40%로 변화시켜 실험했을 때 20%에서는 insulin이 검출되지 않았고(60분까지 관찰) 30%에서는 1-2분대의 피크를 얻었으며 40%에서는 용매피크와 겹쳐 나왔다. 그래서 그 중 양호한 30% ACN을 기준으로 하여 머무름시간과 피크모양이 적절할 것이라고 예상되는 25-35% ACN을 26, 28, 30, 32, 34%로 다시 세분하여 비교실험했을 때, ACN의 비율이 높으면 피크모양은 sharp하나 용매피크와 겹치고 ACN의 비율이 낮으면 분리도는 좋으나 피크모양이 너무 broad했다. 완충액에 따라 그 양상이 달랐으나 0.1M NaH₂PO₄(pH2.0)와 0.2M Na₂SO₄(pH2.3)완충액은 서로 비슷하고 0.1v/v% TFA 완충액과는 차이를 보였다. 그래서 용매피크와 겹치지 않으

면서도 피크모양과 머무름시간이 양호한 5가지 이동상을 Tab. 2와 같이 결정하여 비교하였다.

2. 온도변화에 따른 insulin의 동태

문헌에 나타난 조건들은, 온도는 40-50℃부근이 비교적 피크 모양이 안정되며 분석에 양호한 조건을 나타내었고 용매변화를 이용한 분석방법과 균일용매를 쓰는 방법이 혼재하며 대략 uv 214nm부근의 단파장에서 강산성의 이동상을 사용하여 분석된 것을 볼 수 있었다.⁵⁾⁻⁹⁾ 저자들은 위에서 결정한 5가지 이동상을 가지고 25, 30, 35, 40, 45℃에서의 온도변화에 따른 insulin의 동태를 관찰하였으며 그 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2는 용질의 머무름을 나타내는



A : ACN : 0.1M NaH₂PO₄(pH 2.0) = 30 : 70
 B : ACN : 0.1M NaH₂PO₄(pH 2.0) = 28 : 72
 C : ACN : 0.1v/v% TFA = 30 : 70
 D : ACN : 0.2M Na₂SO₄(pH 2.3) = 30 : 70
 E : ACN : 0.2M Na₂SO₄(pH 2.3) = 26 : 74

Fig. 2. Capacity factor(k') of insulin in various temperature. (k' = (t_r-t₀) / t₀)

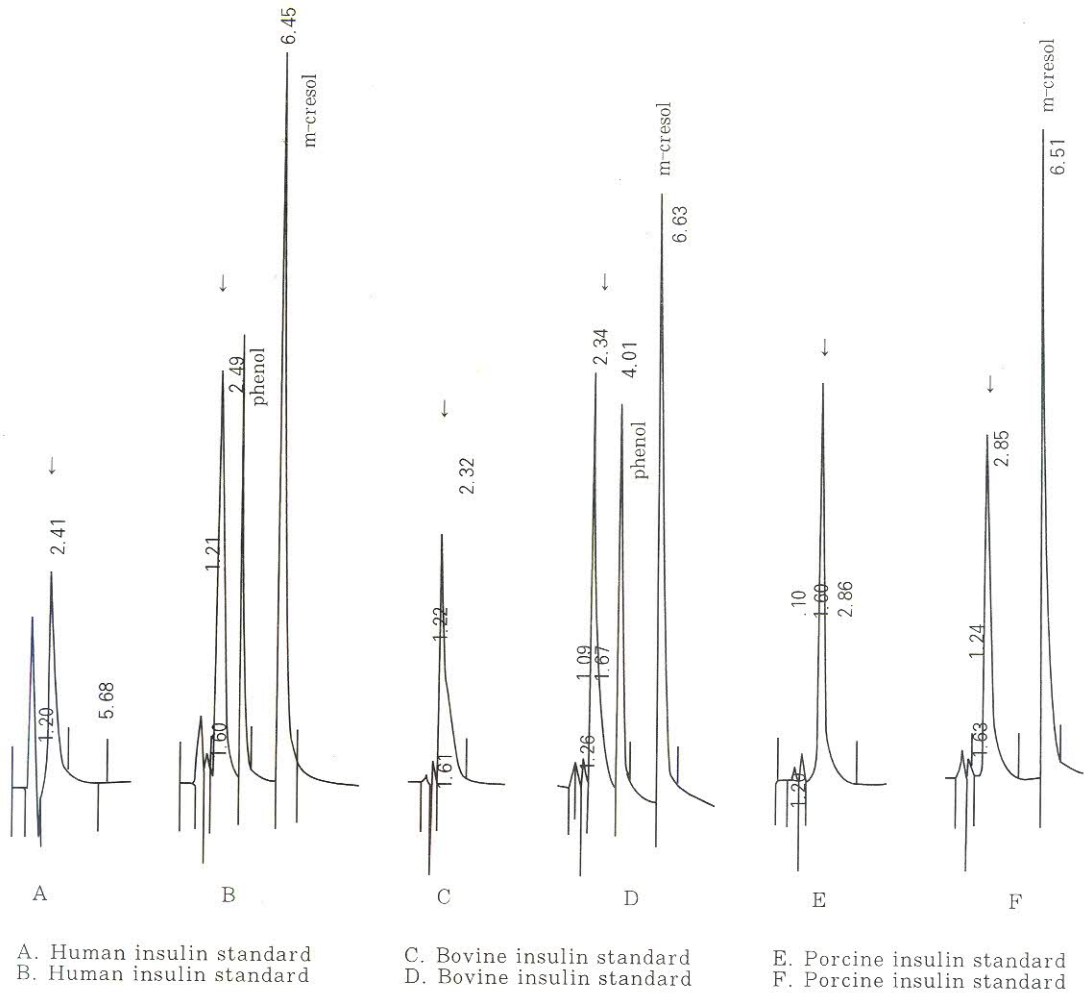


Fig. 4. HPLC Chromatogram of the standard and sample insulins

Table 3. Contents and recovery rates of insulin preparations

sample	labeled amount (IU/ml)	contents of insulin(%)*	recovery rates (%)*
A	2.0	100.9	98.5
B	2.0	103.6	96.3
C	2.0	103.3	95.2
D	2.0	101.6	98.5
E	1.6	100.9	99.8
F	2.0	104.5	98.4
G	2.0	102.6	94.9
average		102.5	97.4

*mean value (n=4).

A, B, C : human insulin D, E : bovine insulin
 F, G : porcine insulin

용량인자(capacity factor) k' 과 온도와의 상관관계를 표시하였는데 $k'=(t_r-t_0)/t_0$ (t_r : insulin의 머무름시간, t_0 : 용매의 머무름시간)로 계산하였다. ACN이 0.1M NaH_2PO_4 (pH2.0)나 0.2M Na_2SO_4 (pH2.3)의 완충액과 30:70의 비율로 된 이동상에서는 온도에 따라 별다른 변화가 없었고, ACN:0.1v/v% TFA=30:70인 이동상과 ACN:0.2M Na_2SO_4 (pH2.3)=26:74인 이동상에서는 온도가 증가됨에 따라 k' 이 급격한 변화를 나타냈으며 ACN:0.2M Na_2SO_4 (pH2.3)=28:72인 이동상에서는 완만한 변화를 나타냈다. 온도의 영향을 받는 이동상에서는 온도가 상승함에 따라 insulin의 머무름시간이 늦어지는 반면 보존제(m-cresol, phenol)는 일반적인 예측대로 머무

름시간이 빨라졌다.

3. 최적조건의 결정 및 검량선 작성

위와 같은 실험결과를 바탕으로 피크모양과 머무름시간을 비교해 본 결과, 25℃에서 ACN:0.2M Na₂SO₄ (pH2.3)=26:74인 이동상으로 분석했을 때를 RP-HPLC에 의한 insulin의 최적조건으로 결정하였다. 또, 이 조건으로 Fig. 3과 같이 human, bovine, porcine insulin의 standard 검량선을 그려본 결과, 모두 양호한 직선성을 나타내었다. Donald 등⁶⁾이 ACN과 sulfate buffer 이동상에서 HPLC로 행한 분석과 생물학적 역가실험(bioassay)을 하여 비교한 결과가 95% 신뢰구간에 있었으므로 본 실험에서 선택한 분석조건이 실제 약품검정에 응용되면 큰 도움이 되리라 생각된다.

4. Insulin제제의 분석

시중에 유통중인 인슐린 제제 7종의 함량시험결과 Fig. 4와 같이 human insulin은 2.4분대, bovine insulin은 2.3분대, porcine insulin은 2.8분대에서 검출되어 구별은 되었으나 3가지 insulin을 동시정량할 수는 없었다. 그러나 insulin제제들이 대부분 복합제제가 아닌 단일제제로 되어 있기 때문에 유통중인 insulin제제의 분석에는 별 어려움이 없으리라 생각된다. 또한, insulin제제의 함량시험 기준은 각국의 공정서에서 neutral insulin, isophane insulin 모두 90.0-110.0%로 규정하고 있으며^{2-4), 10), 11)} 결과는 Tab. 3과 같다. 7개 insulin제제의 평균함량은 102.5%이며 평균회수율은 97.4%로 비교적 양호한 결과를 나타냈다.

結 論

서울시내에 유통중인 인슐린 제제 7종(human insulin 3종, bovine insulin 2종, porcine insulin 2종)을 사용하여 분석한 RP-HPLC의 결과는 다음과 같다.

1. Novapak C₁₈컬럼을 이용한 인슐린의 분석조건은 이동상 ACN/0.2M Na₂SO₄(pH2.3)(26/74), 파장 uv 214nm, 유속 0.8ml/min로 25℃에서 측정할 때가 최적조건이었다.

2. 인슐린제제의 기원동물에 따라 human, bovine, porcine insulin을 각각 구별될 수 있는 양호한 용량인자를 가진 크로마토그램을 관측할 수 있었다.

3. 인슐린 제제의 평균함량은 102.5%, 평균회수율은

97.4%로 비교적 양호한 분석결과를 얻었으며 위와 같은 간편하고 신속한 분석조건으로 실제 약품검정업무에 응용이 가능하게 되었다.

參 考 文 獻

- 1) 한국약학대학협의회 약물학분과회 : 약물학 4개정, 문성사, 서울, p662-663 (1987)
- 2) The United States Pharmacopoeia XXIII, United States Pharmacopoeial Convention, INC. Rockville, MD, p807-815 (1995)
- 3) 한국약학대학협의회 약물학분과회 : 약물학 4개정, 문성사, 서울, p664-667 (1987)
- 4) 대한보건공정서협회 : 대한약전 제6개정, 한국메디칼인덱스사, 서울, p646-649 (1992)
- 5) Purcell A.W., Aguilar M.I., and Hearn M.T. : Conformational effects in reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptides. I. Resolution of insulin variants. Journal of Chromatographic Analysis. 711 : 61 (1995)
- 6) Donald J.S., Richard M.V. : Separation and quantitation of insulins and related substances in bulk insulin crystals and injectables by reversed-phase high performance liquid chromatography and the effect of temperature on the separation, Journal of Chromatographic Science. 23 : 81 (1985)
- 7) Benny S.W., Hans H.S. : Alternative mobile phases for the reversed-phase high performance liquid chromatography of peptides and proteins, Journal of Chromatography. 537 : 181 (1991)
- 8) Klyushnichenko V.E., Yakimov S.A., Arutyunyan A.M., Ivanov A.E., Maltsev K.V., Wulfson A.N. : Recombinant human insulin V Optimization of the reversed-phase high performance liquid chromatographic separation, Journal of Chromatography. 662 : 363 (1994)
- 9) Susumo Seino, Akihiro Funakoshi, Zu Zhi Fu, and Aaron Vviniak : Identification of insulin variants in patients with hyperinsulinemia by reversed-phase, high performance liquid chromatography, Diabetes 34: 1 (1985)
- 10) British Pharmacopoeia 1993, Her Majesty's Stationery Office, London, p354-357 (1993)
- 11) British Pharmacopoeia 1993, Her Majesty's Stationery Office, London, p961-965 (1993)