

生化药物生物活性测定方法及其替代方法研究

李震, 张媛, 高华

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要 通过比较中国和国外药典对于部分生化药物的生物活性测定方法的不同, 分析了中国理化方法替代生物活性测定方法的趋势。针对生化药物活性组分不同对其进行分类并分别提出了理化替代方法建立与验证的思路, 总结了替代研究时的实验设计思路与实验结果的统计分析方法, 探讨了不同质量控制模式之间的关系, 对中国质量控制方法的发展提出了展望。

关键词 生化药物; 生物活性测定法; 理化方法; 替代

药品生物检定技术是指利用药物对生物体(整体动物、离体组织、微生物和细胞等)所起的药理作用或毒理作用及其他反应来测定药品的有效性(生物活性或效价)、安全性(毒性或某些有害物质限度检查、无菌和控制菌检查)和研究药物量效关系, 反应临床功能及效价和安全的一门学科^[1]。它包括生物活性测定法(即效价测定)和生物检查法。其中效价测定是以生物学方法和药物的药理作用为基础, 以生物统计为工具, 运用特定的实验设计与对比检定方法或其他方法进行各种反应、试验、检查, 最终评价药品的生物活性(药效、活力或毒力)的定量方法^[2]。

合理设计的生物活性测定法直接从药效学本质入手, 借由效价概念直观反应了药品的生物学作用及其效力, 例如配体-受体结合、信号传导过程和最终观测到的生物学效应等。该法在成分复杂、结构不明确的多肽、激素等生化药物质量控制上具有显著的优势^[3]。尤其过去生化药大多是从动物、植物、微生物中直接提取, 限于落后的提取纯化工艺, 产品纯度普遍不高, 生物活性测定法利用效价测定解决了理化方法定量测定的困难。但是生物活性测定法使用的实验动物个体差异较大, 方法的精密度与准确度较差; 实验方法繁琐且干扰因素众多, 对实验人员的专业要求较高; 实验动物的使用也不符合3R原则(减少、替代、优化3种原则)。

近年来随着生物技术的发展, 重组技术和合成、纯化工艺的提高及检测分析技术的突飞猛进, 生化类药品纯度不断提

高, 理化方法如高效液相色谱法(HPLC)等能有效地分离并定量测定活性成分和非活性杂质, 为该类药品检测开辟新道路。

1 中美英日现行药典中部分生化药的效价(含量)测定方法比较

目前, 中国药典对于该类药物的效价检测大多停留在生物活性测定阶段, 2015版中国药典中仍有肝素、绒促性素、胰岛素、缩宫素、硫酸鱼精蛋白等利用生物检定法测定效价。其他国家已开始使用理化方法替代。将中国药典(ChP 2015年版)、美国药典(USP 39版)、英国药典(BP 2016版)及日本药局方(JP 16版)中部分生化药的效价(含量)测定方法进行总结和比较^[4-7], 如表1所示, 分析其发展趋势。

从表1可以看出, 对于成分复杂的卵泡刺激素、绒促性素等激素类药物, 各国药典大多采用直接测定其效价活性的生物测定法, 操作复杂但结果直观明确; 对于升压素、缩宫素、胰岛素、降钙素、重组人生长激素等结构明确、活性成分单一的多肽类化合物, 国外药典已逐步废除了生物活性检查, 由理化方法测定其效价值, 而中国药典对于胰岛素、降钙素、重组人生长激素的含量控制也改为HPLC方法, 但为保持生物活性的稳定, 仍保留检查项中的生物活性项, 简化了检查步骤, 仅检查原料或每年至少检查一次; 对于升压素、缩宫素、硫酸鱼精蛋白等药物中国仍保留着生物活性测定方法, 目前尚未完成生物活性检测到理化检测的过渡。

收稿日期: 2106-08-30; 修回日期: 2016-10-30

基金项目: 2015年国家药品标准提高项目; “重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09303-001)

作者简介: 李震, 硕士研究生, 研究方向为药理学, 电子信箱: cpu_lizhen@126.com; 高华(通信作者), 研究员, 研究方向为药理学, 电子信箱: huag55@163.com

引用格式: 李震, 张媛, 高华. 生化药物生物活性测定方法及其替代方法研究[J]. 科技导报, 2017, 35(13): 66-69; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.11.010

表1 中美英日现行药典中部分生化药的效价(含量)测定方法比较
 Table 1 Comparison of bioassays of some biochemical drugs between ChP, USP, BP and JP

药品名	英文名称	来源	ChP2015	USP39	JP16	BP2016
升压素	Vasopressin	自脑垂体后叶中分离精制或化学合成的9个氨基酸组成的多肽化合物	生物检定法 (大鼠血压升高法)	理化方法 (HPLC)	生物检定法 (大鼠血压升高法)	未收载
玻璃酸酶	Hyaluronidase	自哺乳动物睾丸中提取的一种能水解玻璃酸类黏多糖的酶	理化方法(分光光度法,需要牛血清)	理化方法(分光光度法,需要马血清)	未收载	理化方法 (黏度计+计时器)
缩宫素	Oxytocin	自猪或牛的脑垂体后叶中提取或化学合成的九肽化合物	生物检定法 (大鼠子宫法)	理化方法 (HPLC)	理化方法 (HPLC)	理化方法 (HPLC)
胰岛素	Insulin	自猪胰提取制得的由51个氨基酸组成的蛋白质	生物活性检查联合HPLC含量测定 (小白鼠血糖法)	理化方法 (HPLC)	未收载	理化方法 (HPLC)
重组人生长激素	Recombinant Human Growth Hormone	为重组技术生产的由191个氨基酸残基组成的蛋白质	生物活性检查联合HPLC含量测定	理化方法 (HPLC)	理化方法 (HPLC)	理化方法 (HPLC)
硫酸鱼精蛋白	Protamine Sulfate	自适宜鱼类新鲜成熟精巢中提取的碱性蛋白质的硫酸盐	生物检定法 (兔全血法)	理化方法 (HPLC)	理化方法 (肝素结合力-分光光度法)	理化方法 (肝素结合力-分光光度法)
卵泡刺激素	Follicle-stimulating hormone	卵泡刺激素垂体分泌的可以刺激精子生成和卵子成熟的一种激素	生物检定法 (幼大鼠卵巢增重法)	未收载	未收载	生物检定法 (幼大鼠卵巢增重法)
降钙素	Calcitonin	化学合成的由12个氨基酸组成的多肽,与天然降钙素I结构相同。	生物活性检查联合HPLC含量测定 (大鼠血钙降低法)	理化方法 (HPLC)	生物检定法 (大鼠血钙降低法)	理化方法 (HPLC)
绒促性素	Chorionic Gonadotrophin	从健康人群的尿中提取	生物检定 子宫增重法	未收载	生物检定 子宫增重法	生物检定 子宫增重法

2 理化替代方法的建立与验证

针对药品活性组分不定这一情况可将生化药物分为简单的生化药物和复杂的生化药物两类。简单生化药物即那些单一组分发挥全部活性的生化药物(如胰岛素、升压素等),复杂的生化药物(如硫酸鱼精蛋白)是指那些含多活性组分的生化药物。二者应分开处理,因为它们和方法开发和验证中存在较大区别。简单的生化药物只需控制主要活性成分的质量即可,理化方法如HPLC可以实现活性成分与无活性杂质的分离与定量。

对于复杂的生化物理化替代方法的建立,有以下两种思路:1) 结合其药理作用将其作为一个整体考虑建立定量方法。如硫酸鱼精蛋白是自适宜鱼类新鲜成熟精巢中提取的碱性蛋白质的硫酸盐,不同来源所含活性成分也不同,但这些蛋白由于带有的强正电荷可与肝素分子中维持抗凝活性的负电荷结合,形成稳定复合物,从而起到拮抗肝素活性的

作用。因此BP、JP中的肝素结合力-分光光度法从其药理作用入手,利用硫酸鱼精蛋白溶液与肝素溶液进行滴定时吸光度值的突变作为反应终点,定量测定效价值;而USP中所建立的HPLC方法则将其所有蛋白峰作为一个整体,通过控制其所有蛋白的含量同时限定其主要蛋白峰的纯度值进而保证其质量。以上两方法与生物活性检定法相比简单易操作,精密度大为提升,但分光光度法需重复测定耗时较多,HPLC方法则忽略了药品中杂质可能存在的激动或拮抗作用。2) 利用HPLC方法分离并纯化多组分药物中的单个组分,包括工艺杂质和降解杂质。分别测定主成分、工艺杂质和降解杂质的药理活性,每一组分相对于标准物质的活性比值设为相对活性(F),相对活性低于1%的工艺杂质和降解杂质可忽略不计。然后将单一组分的相对活性(F)与其所占纯度百分比结合起来,最终得到药物的综合效价值^[9]。该法将药品中杂质的影响考虑在内,方法准确度较好,但对于纯度低杂质多

的药品其 HPLC 方法的建立与杂质的分离纯化存在一定困难,工作量较大,需要同质的标准物质,而且需要确保药品批间一致性,以防未知杂质的干扰。此方法目前多应用于抗生素微生物检定替代方法的建立,如杨利红等^[8]利用 HPLC 法测定庆大霉素的纯度与效价时,分别制备了庆大霉素 C1a、C2、C2a 和 C1 单组分样品,然后利用核磁共振(NMR)、HPLC 和微生物检定法确定每个 C 组分的有效成分纯度与理论效价之间的相对活性值,进而建立了根据 HPLC 分析得到的庆大霉素 C 组分的比例与含量确定庆大霉素效价的方法,实现了庆大霉素 HPLC 纯度分析与效价测定的统一。

对于理化方法的验证可按照化学药品质量标准分析方法验证指导原则进行,但在进行具体的验证时还需要结合生化药物自身的特点考虑。验证指标有准确度、精密度、专属性、检测限、定量限、线性、范围和耐用性。

3 方法替代实验设计

对于方法的改进替代,需要做大量的方法对比、一致性研究等工作,生物检定是验证的主要标尺。目前,研究方法替代的途径主要有以下两种。

3.1 批量测定实验

样品分别使用生物检定法和理化测定法测定不同来源不同批次样品的效价值和含量值,进行效价含量转换后,利用统计软件对两种方法所得结果进行线性回归分析。Thiago 等建立并验证了新的 HPLC 法测定重组人促红细胞生成素,并利用该方法和生物测定法平行测定了 8 份样品的效价值,比较其效价平均值后利用皮尔逊相关系数计算其的相关性^[9];徐雷鸣等^[10]利用建立的 HPLC 法与大鼠子宫法分别测定了不同厂家 14 份样品的效价值,并对试验结果进行了相关性分析,实验表明大鼠子宫法与 HPLC 法测定缩宫素效价的结果具有显著相关性($P < 0.01, R = 0.802$),为将来国产原料和制剂的缩宫素效价测定采用 HPLC 法替代大鼠子宫法提供了初步实验依据。

3.2 线性实验和破坏性实验

线性实验和破坏性实验考查测定两种方法在不同样品浓度下的灵敏度和方法的专属性。将样品稀释至一系列线性浓度,分别利用理化方法和生物检定法测定线性浓度下的效价值,并与理论效价值做回归分析,然后比较二者所得回归方程的斜率、截距、相关系数和标准偏差。Maxl 等^[11]在进行缩宫素、升压素及其类似物的生物检定法替代研究时正是采用了此种方法。Fisher 等^[12]在进行胰岛素生物检定法的 HPLC 替代研究时也是采用了类似的方法,在比较正常样品的基础上,还对比研究了-20、5、25、37、50、60℃条件下储存 3 个月后的含量情况,HPLC 法可检测出生物检定法无法检测的降解产物。线性实验和破坏性实验特别适用于批次较少的样品,免除了大批量样品的收集与检测,同时还考查了样品测定的线性关系和样品降解后的方法适用情况。

4 数据统计方法

USP39 中对于替代方法的要求是得到“equivalent or better results”^[15]。因此替代方法需要跟现有的公认或法定方法(即“金标准”)进行比较,而非与真实值比较。即理化方法需要与生物活性测定法的结果进行一致性检验。目前中国对于方法替代评价的研究及对统计评价指标的确定尚少。定量测定结果涉及到一致性评价时,主要统计方法有双向单侧 t 检验、简单相关分析、回归分析方法和 Bland-Altman 方法等。以上各方法各有利弊,目前药学领域判断两种方法的一致性时主要采用简单的直线相关分析方法。但是相关系数 R 对“系统误差”缺乏鉴别能力,它表达的只是检验数据同步变化的方向与紧密程度。准确的一致性评价,应同时考虑数据的集中趋势、离散趋势及相关性,本文主要介绍目前应用较广的截距与斜率的回归分析法和 Bland-Altman 法^[13]。

4.1 截距与斜率的回归分析法

在 t 检验的基础上对两种方法的测定结果拟合直线回归方程,并将此直线与方程 $y=x$ (截距和斜率分别为 0 和 1) 进行比较,即分别检验总体截距与 0 之间的差别是否具有统计学意义和总体斜率与 1 之间的差别是否具有统计学意义。

4.2 Bland-Altman 法

针对不同方法间测量结果的差异分布并通过图示而开发,主要是利用原始数据的均值与差值,分别以均值为横轴,以差值为纵轴做散点图,计算差值的均数以及差值的 95% 分布范围(即为一致性界限,LoA, $d \pm 1.96S$),认为应该有 95% 的差值位于该一致性界限以内。经典的 Bland-Altman 图如图 1 所示。分析散点的分布与一致性界限的位置关系,并且与专业上可接受的界限值相比较。如果一致性界限在实际应用中可接受,则可以认为两种方法之间的一致性较好。结合生物测定法的抽样误差,可在本统计方法基础上增添两条一致性界限分别对应 95% 可信区间^[14]。

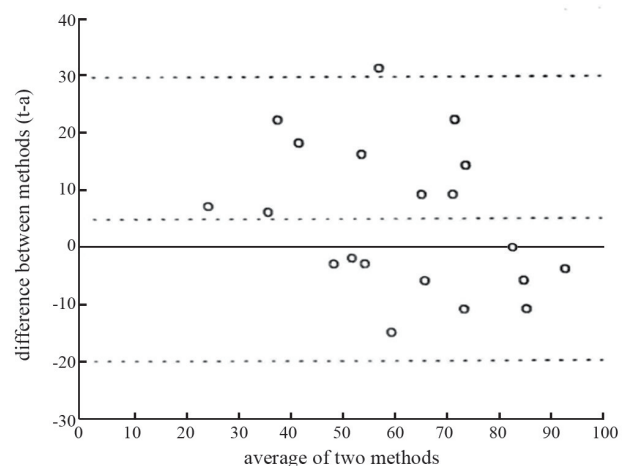


图 1 两种左室射血分数测定方法 Bland-Altman 比较
Fig. 1 Comparison of two methods of measuring left ventricular ejection fraction

5 展望

药品质量控制的发展大致经历了感官测定、生物检定和理化检测 3 种主要模式^[15]。3 种模式是依次随着药品生产技术与仪器检测水平的发展而逐渐衍变而来的。不同检定方法各有优劣,互相补充,共同保证药品的质量与安全。因此方法替代并不意味着旧方法的淘汰,生物检定法在药物开发与药品活性检测中依然有着重要作用。

中国部分药品与国际先进企业的产品质量间还存在较大的差异。例如目前中国部分厂家的缩宫素效价符合规定,但产品纯度仅为 70%,杂质含量大幅超过国外药典规定的限度(5%),无法控制未知杂质的潜在危害^[16]。因此利用理化方法替代或联合生物检定法对药品进行质量控制,可以补充生物检定方法的不足,同时推动药企改进药品生产工艺,提高药品的质量。

参考文献(References)

- [1] Mire-sluis A R. Setting specifications for potency assays—basic principles[J]. *Developments in Biologicals*, 2002, 107: 107–15.
- [2] 李湛群, 杨昭鹏. 理化测定代替生物测定法在基因工程药品质量控制中的应用[J]. *中国生化药物杂志*, 1999(1): 50–52.
Li Zhanqun, Yang Zhaopeng. Replacing bioassay by physicochemical assay for the quality control of recombinant DNA pharmaceuticals[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 1999(1): 50–52.
- [3] 郑敏霞, 沈洁, 丰素娟. 生物效价检测研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2011(6): 511–514.
Zheng Minxia, Shen Jie, Feng Sujuan. Progress in the study of biological potency detection[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2011(6): 511–514.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典 2015 年版: 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. *China pharmacopoeia 2015: Volume IV*[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [5] The US Pharmacopeial Convention. USP39–NF34[S]. Maryland: United Book Press, 2016.
- [6] The Minister of Health, Labour and Welfare. JP16[S]. Tokyo: Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan, 2016.
- [7] British Pharmacopoeia Commission. BP2016[S]. London: The Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, 2016.
- [8] 杨利红, 常艳, 姚尚辰, 等. HPLC 法同时测定庆大霉素的组分纯度和效价活性[J]. *药学报*, 2012(12): 1660–1666.
Yang Lihong, Chang Yan, Yao Shangchen, et al. Simultaneous determination of purity and potency of the components of gentamycin using high-performance liquid chromatography[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012(12): 1660–1666.
- [9] Barth T, Sangoi M S, da Silva L M, et al. Assessment of rhEPO in Pharmaceutical Formulations by a Reversed-Phase Liquid Chromatography Method and Bioassay[J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2007, 30(9/10): 1277–1288.
- [10] 许雷鸣, 顾倩, 堵伟锋, 等. 大鼠离体子宫法与高效液相色谱法测定缩宫素效价的相关性分析[J]. *安徽医药*, 2014, 18(1): 37–40.
Xu Leiming, Gu Qian, Du Weifeng, et al. Correlation between isolated rats uterus method and HPLC method for oxytocin assay[J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2014, 18(1): 37–40.
- [11] Maxl F, Siehr W. The use of high-performance liquid chromatography in the quality control of oxytocin, vasopressin and synthetic analogues [J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 1989, 7(2): 211–216.
- [12] Fisher B V, Smith D. HPLC as a replacement for the animal response assays for insulin[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 1986, 4(3): 377–387.
- [13] 谭德讲, 马双成. 药品监督与检定中的统计学应用[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2011, 291–298.
Tan Dejiang, Ma Shuangcheng. *Statistic Applications in Biopharmaceutical Regulatory Science*[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2011: 291–298.
- [14] Bland J M, Altman D G. Measuring agreement in method comparison studies[J]. *Statistical Methods in Medical Research*, 1999, 8(2): 135–160.
- [15] 肖小河, 鄢丹, 王伽伯, 等. 关于中药质量生物检定的几点商榷[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2009, 11(4): 504–508.
Xiao Xiaohu, Yan Dan, Wang Jiabo, et al. Some opinions on bioassays for the quality control of Chinese medicines[J]. *World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, 2009, 11(4): 504–508.
- [16] 黄青, 陆益红, 史清水, 等. 高效液相色谱法测定缩宫素注射剂含量及其与生物效价测定法比较和应用[J]. *药物分析杂志*, 2015(6): 1115–1121.
Huang Qing, Lu Yihong, Shi Qingshui, et al. HPLC determination of oxytocin injection and comparison with biological titer measurement and its applications[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2015(6): 1115–1121.

Bioassays of biochemical drugs and their alternatives

LI Zhen, ZHANG Yuan, GAO Hua

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract An overview of the definition, the strengths and the limitations of bioassays in the quality control is made and the trend of their replacement by physical and chemical methods through a comparison of ChP and other countries' pharmacopoeia is analyzed. Ideas and references of the establishment and the validation of the alternative methods are provided for different sorts of biochemical drugs. The review also summarizes the most common experimental design and two statistical analysis methods. At last, the importance of the combination and the promotion of different quality control modes is emphasized.

Keywords biochemical drugs; bioassays; physical and chemical methods; alternative research

(责任编辑 田恬)