·实验研究·

第5批人绝经尿促性腺素国家标准品的制备与标定

吴彦霖[1],张　媛[1],万龙岩[2],汪佩华[2],李　严[3],夏星辉[4],叶　飞[4],唐黎明[5],王巧旭[5],
孟长虹[6],王　瑶[6],吴海苹[7],贺　庆[1],张铭露[1],杨泽岸[1],高　华[1]
(1 中国食品药品检定研究院,北京 102629;2 上海丽珠制药有限公司,上海 201206;3 上海天伟生物制药有限公司,上海 201108;4 宁波人健药业集团股份有限公司,慈溪 315300;5 上海市食品药品检验所,上海 201203;6 江苏省食品药品监督检定研究院,南京 210008;7 厦门堂试剂生物科技股份有限公司,厦门 361022)

[摘要] **目的**:制备和标定第5批人绝经尿促性腺素(HMG)国家标准品。**方法**:以WHO第5批国际标准品10/286作为标准,选择6个实验室,采用《中华人民共和国药典》2015年版四部1216卵泡刺激素(FSH)测定法和1217黄体生成素(LH)测定法对第5批HMG国家标准品待标品的生物效价进行标定;按照2015年版药典四部通则1431生物统计法中的量反应平行线测定法,采用BS 2000软件计算生物效价,并进行合并计算。**结果**:第5批HMG国家标准品待标品经协作标定,确定其生物效价FSH为220 IU·安瓿$^{-1}$,LH为203 IU·安瓿$^{-1}$。**结论**:本批待标品可作为第5批HMG国家标准品供HMG及相关制剂的生物效价测定用。

[关键词] 人绝经尿促性腺素;卵泡生成激素;促黄体生成素;生物测定;效价;标准品制备
[中图分类号] R921.2　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)05-0441-06

Preparation and calibration of the 5th batch of national standard reference for human menopausal gonadotropin (HMG)

WU Yan-lin[1], ZHANG Yuan[1], WAN Long-yan[2], WANG Pei-hua[2], LI Yan[3], XIA Xing-hui[4], YE Fei[4], TANG Li-ming[5], WANG Qiao-xu[5], MENG Chang-hong[6], WANG Yao[6], WU Hai-ping[7], HE Qing[1], ZHANG Ming-lu[1], YANG Ze-an[1], GAO Hua[1]
(1 *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*; 2 *Shanghai Li Zhu Pharmacy Ltd.*, *Shanghai* 201206, *China*; 3 *Shanghai Techwell Biopharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Shanghai* 201108, *China*; 4 *Ningbo Renjian Pharmacy Ltd.*, *Cixi* 315300, *China*; 5 *Shanghai Institute for Food and Drug Control*, *Shanghai* 201203, *China*; 6 *Jiangsu Institute for Food and Drug Control*, *Nanjing* 210008, *China*; 7 *Xiamen Bioendo Technology Co.*, *Ltd.*, *Xiamen* 361022, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To prepare and calibrate the 5th batch of national standard reference for human menopausal gonadotropin (HMG). **Methods**: Taking WHO 5th batch of international standard 10/286 as reference, the biological potency of the 5th batch of HMG national standard was determined by the method of 1216 follicle stimulating hormone assay and 1217 luteinizing hormone assay in Chinese Pharmacopeia (ChP, Volume Ⅳ, 2015 edition) in 6 laboratories. According to the parallel line measurement method of quantitative response in the

[作者简介] 吴彦霖,女,博士,副研究员,主要从事药检药理研究。联系电话:(010)53851590,E-mail:wyljoe@126.com。张媛,女,硕士,副研究员,主要从事药检药理研究。联系电话:(010)53851631,E-mail:zhyuan_cn@126.com。
[通讯作者] 高华,女,博士,研究员,主要从事药检药理研究。联系电话:(010)53851589,E-mail:huag55@163.com。

biometric method 1431 in ChP (Volume Ⅳ, 2015 edition), BS2000 software was used to calculate the biological potency and conduct the combined calculation. **Results**: The biological titer FSH and LH of the 5th batch of HMG national standard products were identified to be 220 IU·ampoule^{-1} and 203 IU·ampoule^{-1} after collaborative calibration. **Conclusion**: The candidate of HMG can be used as the 5th batch of HMG national standard for biological titer determination of HMG and related preparations.

[**Key words**] human menopausal gonadotropin (HMG); follicle stimulating hormone (FSH); luteinizing hormone (LH); *in vivo* bioassay; potency; preparation of standard reference

人绝经尿促性腺素(human menopausal gonadotropin, HMG)又称尿促性素、人绝经期促性腺激素,含有卵泡生成激素(follicle stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(luteinizing hormone, LH)2 种激素[1-2]。HMG 系绝经期妇女尿液中提取物,为人体内垂体前叶分泌的天然促性腺激素,具有促卵泡生成和黄体生成 2 种作用,临床上用于治疗垂体功能低下所致的无排卵患者,可使其卵泡发育;分泌雌激素,使女性子宫内膜增生;与绒促性素(human chorionic gonadotrophin, HCG)合用,能促排卵及黄体生成,分泌黄体酮;本品也可刺激男性睾丸间质细胞分泌睾酮,具有促生精作用[3-4]。

现行的第 5 批国际标准品人尿 FSH 和 LH 编号为 10/286,第 4 批 HMG 国家标准品编号为 150524-201504,用于 HMG 及其相关制剂的鉴别和生物效价测定[5]。鉴于第 4 批人 HMG 国家标准品已经用完,基于向 HMG 生物活性测定提供一种延续、可靠的标准物质,特此研制第 5 批 HMG 国家标准品,报道如下。

材料与方法

1 实验材料

1.1 标准品 WHO 第 5 批人尿 FSH 和 LH 国际标准品(10/286)由 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)发放,冻干品,规格为 FSH: 183 IU·安瓿$^{-1}$,LH: 177 IU·安瓿$^{-1}$。

1.2 待标品 第 5 批 HMG 国家标准品待标品原料药由上海丽珠制药有限公司提供,批号为 180104,生物效价为 FSH: 660 IU·mg^{-1}和 LH: 635 IU·mg^{-1};每支待标品含 HMG 原料药 0.38 mg,右旋糖苷 402 mg,甘露醇 8 mg,经 0.45 μm 滤膜抽滤,单针灌装,0.5 mL·安瓿$^{-1}$,冻干,熔封后即得成品。

1.3 实验动物 SPF 级 SD/Wistar 大鼠,体重 40 ~ 60 g,日龄19 ~ 23 d,一次实验所用的幼龄大鼠的出生日期相差不得超过 3 d,体质量相差不得超过 10 g;购自中国食品药品检定研究院实验动物资源中心[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2017-0005]、浙江维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2018-0001]、上海斯莱克实验动物有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005]、宁波人健药业集团股份有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2012-0051]、上海西普尔-必凯公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016]。

1.4 试剂 人绒促性素(human chorionic gonadotrophin,HCG)原料药由宁波人健药业集团股份有限公司提供,批号:C018-201140923,生物效价:5 946 IU·mg^{-1};上海天伟生物制药有限公司,批号:101201,生物效价:2 000 IU·瓶$^{-1}$;上海丽珠制药有限公司,批号:170101,生物效价:5 400 IU·mg^{-1}。牛血清白蛋白购自 Sigma 公司,批号:SLBJ 9162V, WXBC2116V, WXBC4547V;国药集团化学试剂有限公司,批号:20161101,20180322;氯化钠注射液购于石家庄四药有限公司;卵泡刺激激素检测试剂盒购自日本东曹公司,批号:HZR6833。

1.5 赋形剂 甘露醇购自国药集团化学试剂有限公司,批号:20150701;右旋糖酐购自上海华贸药业有限公司,批号:20160703;磷酸氢二钠购自国药集团化学试剂有限公司,批号:20160219;磷酸二氢钠购自国药集团化学试剂有限公司,批号:20150714。

1.6 仪器 全自动免疫分析仪为日本东曹公司产品,型号:AIA 360;电子天平为德国赛多利斯公司产品,型号:BT224S;梅特勒-托利多公司产品,型号:XS205, AL-104, PL4002, PL1501-S;上海精密科学仪器有限公司产品,型号:YP402N, YP502N, FA2104。

2 实验方法

2.1 溶剂配制 FSH 溶剂:试验当日,称取牛血清白蛋白适量,加 0.9% 氯化钠溶液溶解,用 1 mol·L^{-1}

氢氧化钠溶液调节 pH 至(7.2 ± 0.2),制成每 1 mL 含 1 mg 牛血清白蛋白的溶液,充分溶解;精密称取已知效价的 HCG 原料药适量,加入上述牛血清白蛋白溶液溶解,制成每 1 mL 含 20 单位 HCG 的溶液,混匀备用,即得。

LH 溶剂:试验当日,称取牛血清白蛋白适量,加 0.9% 氯化钠溶液溶解,用 1 mol·L^{-1}氢氧化钠溶液调节 pH 至(7.2 ± 0.2),制成每 1 mL 含 1 mg 牛血清白蛋白的溶液,充分溶解,即得。

2.2 FSH 生物测定法 按照 FSH 标识效价用 FSH 溶剂将标准品和待标品分别配制成高、中、低 3 个浓度的待测溶液,剂距 r 值为 1∶0.5 或 1∶0.6。每鼠皮下注入上述待测溶液 0.5 mL,每日 1 次,连续注入 3 次,于最后 1 次注入 24 h 后,按照给药顺序处死动物,称取每鼠体质量,解剖,取出卵巢,剥离附着的组织,去除输卵管,用滤纸吸干周围的液体并立即称量(精确到 0.1 mg),称取每只大鼠的卵巢量(mg),进行体质量转换(每 10 g 体重对应的器官重)[5-7,9-10]。

2.3 LH 生物测定法 按照 LH 标识效价用 LH 溶剂将标准品和待标品分别配制成高、中、低 3 个浓度的待测溶液,剂距 r 值为 1∶0.5 或 1∶0.6。每鼠皮下注入上述待测溶液 0.5 mL,每日 1 次,连续注入 4 次,于最后 1 次注入 24 h 后,按照给药顺序处死动物,称取每鼠体质量,解剖,取出精囊,剥离附着的组织,用滤纸吸干精囊周围的液体并立即称量(精确到 0.1 mg),称取每只大鼠的精囊量(mg),进行体质量转换(每 10 g 体重对应的器官重)[5-7,10-11]。

2.4 含水量测定 按照 2015 年版《中华人民共和国药典》四部通则 0832 水分测定法第一法(费休氏法)之库伦滴定法测定第 5 批人绝经尿促性腺素(HMG)国家标准品待标品的水分含量。取 7 支冻干品,进行水分测定,计算平均 A 值,按照中国食品药品检定研究院标准操作规程水分含量应不大于 3%[12]。

2.5 均匀性检验 抽样:按照中国食品药品检验研究院标准操作规程进行待测样品的抽样工作,冻干完成后在每个冻干盘中心点(E)及四角(A,B,C,D)抽样,每个点抽 10 支样品作唯一标记(第 3 盘左上角标记为 A3、左下角标记为 C3;第 5 盘右上角标记为 B5、右下角标记为 D5),P 标记为其余未标记样品中随机抽取,上述样品存于 -20 ℃,分发备检。

均匀性检验:按照中国食品药品检验研究院标准操作规程进行待标品均匀性检验,随机抽取样品中的 15 支,按照卵泡刺激激素检测试剂盒的说明书进行 ELISA-FSH 检测,每支待标品出具 2 个独立结果。

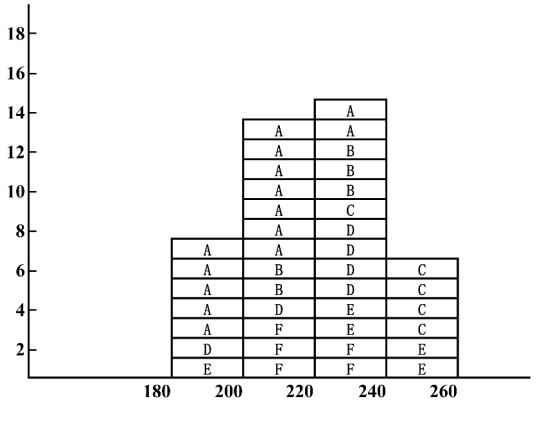
2.6 装量差异 灌装前随机标记空安瓿瓶,精密称定重量并记录,每间隔 30 min 取 10 支已灌装的带标记安瓿,精密称定重量并计算相差数值,标记 100 支,抽取 82 支。使用 Excel 2010 计算 82 支样品的平均 A 值和标准差 s,以 $\bar{x} \pm s$(n = 82)表示,并计算装量差异,以变异系数 CV% 表示,按照中国食品药品检定研究院标准操作规程 CV% 不大于 1%。CV% = 标准差 s·平均 A 值$^{-1}$ × 100%。

2.7 统计分析 FSH 和 LH 活性检测,参照《中华人民共和国药典》2015 年版四部 1431 生物统计法中的量反应平行线测定法,采用 BS 2000 软件计算生物效价及实验误差(采用完全随机设计)。应通过可靠性测验,FSH 生物测定法的可信限率 FL%(fiducial limit, FL)不得大于 45%;LH 生物测定法的 FL% 不得大于 35%[5-8]。均匀性检测以单因素方差分析进行处理,采用 JMP10 统计分析软件分析,P 应≥0.05。

结 果

1 FSH 协作标定结果

以第 5 批 HMG 国际标准品 10/286 为标准,经过 6 家协作单位分别测定,共获得 40 个结果,标定第 5 批 HMG 国家标准品待标品的 FSH 结果,通过 BS 2000 计算效价 P_T 及可信限率 FL%,并使用 BS 2000 进行合并计算,见表 1,每家协作单位结果的频数分布图见图 1。



x 轴为每支待标品效价,y 轴为频数个数

图 1 FSH 协作标定结果频数分布图

表 1 FSH 协作标定结果 $n=40$

协作单位	编号	P_T（效价）/IU·安瓿$^{-1}$	FL/%
上海丽珠制药 A	A1	212.21	25.774
	B5	222.35	33.364
	C9	214.28	37.256
	P1	220.71	38.385
	B5	199.72	28.913
	C9	197.8	27.358
	D13	202.63	28.152
	P2	185.07	30.921
	D13	219.3	26.824
	E16	206.57	17.589
	P2	194.83	18.78
	D9	213.87	24.517
	P2	202.15	28.789
	E12	193.54	22.584
上海天伟 B	A3	217.4	13.17
	E7	220.8	14.08
	C11	212.0	15.41
	D15	221.6	19.92
	E2	220.5	17.49
宁波人健 C	A5	249.36	21.418
	B10	245.94	21.919
	C13	232.73	18.176
	D2	244.78	17.995
	E4	243.62	20.131
上海药检所 D	A7	229.89	12.4
	B12-1	207.51	14.5
	B12-2	234.93	20.4
	C15	226.22	11.6
	D4	223.36	21.0
	E6	182.51	25.5
江苏食品药品监督检验研究院 E	A9	253.37	32.067
	B14	238.69	30.921
	C2	238.13	39.045
	D6	193.04	27.125
	E8	242.39	27.697
中国食品药品检定研究院 F	B4	218.34	22.691
	E11	201.22	30.844
	12A	228.95	32.334
	5D	226.89	37.428
	1E	218.17	37.586

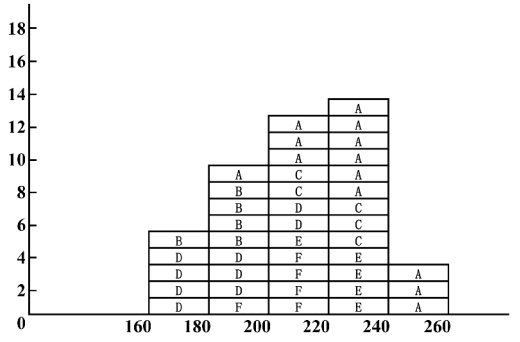
图 1 中上海丽珠制药有限公司（实验室代码 A）、上海天伟生物制药有限公司（实验室代码 B）、宁波人健药业集团股份有限公司（实验室代码 C）、上海市食品药品检验所（实验室代码 D）、江苏省食品药品监督检验研究院（实验室代码 E）以及中国食品药品检定研究院药理室（实验室代码 F）。

2 LH 协作标定结果

以第 5 批 HMG 国际标准品 10/286 为标准，经过 6 家协作单位分别测定，共获得 40 个结果，标定第 5 批 HMG 国家标准品待标品的 LH 结果，通过 BS 2000 计算效价 P_T 及可信限率 FL%，并使用 BS 2000 进行合并计算，见表 2，每家协作单位结果的频数分布图见图 2。

表 2 LH 协作标定结果 $n=42$

协作单位	编号	P_T（效价）/IU·安瓿$^{-1}$	FL/%
上海丽珠制药 A	A1	221.94	30.524
	B5	223.05	33.030
	C9	237.29	29.121
	P1	234.68	31.321
	C5	219.21	31.221
	A15	217.20	31.456
	D13	246.97	29.573
	P2	241.00	29.583
	B1	192.83	32.784
	E16	242.90	29.049
	D9	239.37	22.391
	P2	238.55	25.814
	E12	218.13	23.218
上海天伟 B	A3	190.8	17.41
	B7	179.2	17.65
	C11	186.0	20.24
	D15	189.9	15.39
	E2	180.3	15.77
宁波人健 C	A5	227.63	21.418
	B10	218.51	21.919
	C13	209.31	18.176
	D2	220.37	17.995
	E4	237.59	20.131
上海药检所 D	A7-1	192.67	20.15
	A7-2	201.53	13.5
	B12-1	160.96	17.9
	B12-2	187.16	15.1
	C15-1	212.57	20.0
	C15-2	185.67	15.1
	D4	161.67	25.0
	E6-1	179.24	20.5
	E6-2	179.34	13.0
江苏食品药品监督检验研究院 E	A9	234.99	29.893
	B14	215.89	32.41
	C2	225.41	22.778
	D6	220.05	20.737
	E8	232.99	24.039
中国食品药品检定研究院 F	E5	191.26	24.509
	E11	215.43	23.714
	12A	216.88	24.521
	5D	212.07	27.235
	1E	206.16	25.634



x 轴为每支待标品效价，*y* 轴为频数个数

图 2 LH 协作标定结果频数分布图

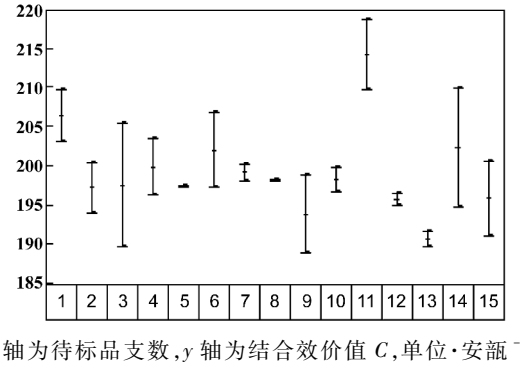
图 2 中上海丽珠制药有限公司（实验室代码 A）、上海天伟生物制药有限公司（实验室代码 B）、宁波人健药业集团股份有限公司（实验室代码 C）、上海市食品药品检验所（实验室代码 D）、江苏省食品药品监督检验研究院（实验室代码 E）以及中国食品药品检定研究院药理室（实验室代码 F）。

3 含水量测定

7 支冻干品的水分含量（%）平均结果为 2.17%，符合中国食品药品检定研究院对国家标准物质的要求。

4 均匀性检验结果

以 HMG 中所含 FSH 的效价值作为均匀性考察的结果，FSH 的活性测定包括生物效价值 P_T 和结合效价值 C，前者系由标准品 S 及待标品 T 刺激动物体内所测定的生物活性数值，该值作为临床使用的依据，后者系 S 和 T 经过 ELISA 双夹心方法所测定的结合活性数值，生物活性 P_T 不完全等同于结合活性 C。由于本批标准物质原料药系单一来源，结合活性与生物活性存在一定的相关性，C 值可用于表示待标品 T 的均匀性研究。使用 JMP10 统计软件包对 15 支待标品进行单因素方差分析，方差分析中概率 P 为 0.125 3，待标品均匀性检验符合要求，不存在显著性差异，见图 3。



x 轴为待标品支数，*y* 轴为结合效价值 *C*，单位·安瓿$^{-1}$

图 3 使用 ELISA 对 FSH 测定结果（n = 15）

讨 论

第 5 批 HMG 国家标准品待标品含有 2 种成分，分别是 FSH 和 LH，以第 5 批 HMG 国际标准品 10/286 为标准，经 6 个实验室协作标定其生物效价，使用 BS 2000 合并计算结果为：FSH 219.62（212.66 ~ 226.8）IU·安瓿$^{-1}$；LH 202.74（196.6 ~ 209.07）IU·安瓿$^{-1}$。最终其生物效价确定为 FSH 220 IU·安瓿$^{-1}$，LH 203 IU·安瓿$^{-1}$，供 HMG 生物效价测定用。本批待标品可作为第 5 批 HMG 国家标准品使用，批号为 150524-201805。

现有的国家标准物质均匀性检验规程，使用 12 支以上的样品，每支样品出具 2 个及以上独立结果进行均匀性检查，并考察支内和支间差异的均匀性。生物测定用标准品的使用方式是整支或多支复溶进行检验，依据现有规程无法完成支内差异的检验，且生物实验使用动物数量多，工作繁琐，检验人员无法在一次实验内完成支间差异的检验。鉴于上述困难，笔者使用 ELISA 方法对 HMG 中 FSH 的效价进行测定，以结合活性作为均匀性考察对象，考察本批待标品的均匀性。但 HMG 的机能是由 FSH 和 LH 形成激素共同调节的，这些激素是由脑下垂体前叶分泌产生，并且 LH 对 FSH 具有反馈激活的作用。因此针对同一来源的 HMG 待标品可用 ELISA 法进行效价均匀性检查，对不同来源的 HMG 待标品不建议使用该法。

本次使用现行的 WHO 第 5 批人尿 FSH/LH 国际标准品（10/286）作为基准，进行第 5 批 HMG 国家标准品待标品标定。国家标准物质溯源于 WHO 国际标准物质，按照标准物质赋值的相关规定，完成了实验室间的协作标定，进行合并计算，确定了该品生物效价。整个标定工作有效地完成了标准品之间的效价传递，确保该标准品发放的权威性[5,9-11,13-14]。现行第 4 批国家标准品标定的数据仅在实验体系作为内部参考用，不参与第 5 批国家标准品的赋值。

HMG 国家标准品长期存放在 -20 ℃环境下，实验证明 2015 年制备的第 4 批 HMG 国家标准品（批号为 150524-201503）发放 5 年，生物效价相对稳定。2016 年和 2018 年 HMG 标准品生物效价期间核查的结果表明该品稳定性较好。鉴于第 3 批国家标准品（批号 150524-200503，已停用）发放了 10 年；第 2 批国家标准品（批号 0524-9402，已停用）发

放了 12 年,说明 HMG 国家标准品在 -20 ℃环境下的生物效价长期稳定。

[参 考 文 献]

[1] 周海钧. 药品生物检定[M]. 北京: 人民卫生出版社,2005: 218 - 223.

[2] 冷炜. 药品的生物检定[M]. 北京: 气象出版社,1995:114 - 124.

[3] MATTHEW P, ROSE E, GAINES DAS, *et al*. Definition and measurement of follicle stimulating hormone[J]. *Endoc Rev*, 2000, 21(1):5 - 22.

[4] PAULINE C, ALLAN EH. Optogenetic activation of GnRH neurons reveals minimal requirements for pulsatile luteinizing hormone secretion[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111 (51): 18387 - 18392.

[5] 吴彦霖,张媛,唐黎明,等. 第 4 批人绝经尿促性腺素(HMG)国家标准品的协作标定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1487 - 1494.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2015:1216 - 1217.

[7] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:484 - 489.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2015:182 - 200.

[9] 吴彦霖,张媛,万龙岩,等. 第 1 批尿促卵泡素国家标准品的标定[J]. 中国新药杂志,2017, 26(20): 2376 - 2379.

[10] 徐立根, 沈洪征, 钱德明, 等. 尿促卵泡激素和促黄体生成激素国际标准品协作标定[J]. 中国药事, 2003, 17(4): 248 - 249.

[11] 钱德明, 刘群丽, 李波. 重组人促黄体生成素国际标准品的协作标定[J]. 中国药品标准, 2007, 8(5):49 - 50.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2015:103 - 105.

[13] 贺庆, 刘群丽, 张媛, 等. 第 5 批绒促性素国际标准品协作标定[J]. 中国药事,2013, 27(4):405 - 410.

[14] 张媛, 刘倩, 吴彦霖, 等. 第一批赖氨酸升压素国家标准品的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(7):923 - 926.

编辑:杨青/接受日期:2020 - 06 - 08