·实验研究·

第 10 批绒促性素国家标准品的标定

吴彦霖[1],张　媛[1],万龙岩[2],汪佩华[2],唐黎明[3],王巧旭[3],芮　菁[4],华晓东[4],侯　娟[4],巩媛媛[4],夏星辉[5],叶　飞[5],李　严[6],吴海苹[7],张铭露[1],贺　庆[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 上海市食品药品检验所,上海 201203;4 天津市药品检验研究院,天津 300070;5 宁波人健药业集团股份有限公司,慈溪 315300;6 上海天伟生物制药有限公司,上海 201108;7 厦门鲎试剂生物科技股份有限公司,厦门 361022)

[**摘要**] **目的**:研制第 10 批绒促性素(HCG)国家标准品。**方法**:依据《中华人民共和国药典》2015 年版四部 1209“绒促性素生物测定法”,以第 5 批国际标准品 07/364 作为参考,联合 6 个实验室对 HCG 国家待标品的生物效价进行协作标定。**结果**:本批 HCG 待标品经协作标定和合并计算,生物效价为 55 IU·安瓿$^{-1}$。**结论**:本品可作为第 10 批 HCG 国家标准品,供 HCG 原料药及制剂的效价测定使用。

[**关键词**] 标准品研制;绒促性素;生物测定;效价

[**中图分类号**] R927　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003 - 3734(2021)20 - 1906 - 05

Preparation of the proposed 10th national standard reference for human chorionic gonadotrophin by bioassay

WU Yan-lin[1], ZHANG Yuan[1], WAN Long-yan[2], WANG Pei-hua[2], TANG Li-ming[3], WANG Qiao-xu[3], RUI Jing[4], HUA Xiao-dong[4], HOU Juan[4], GONG Yuan-yuan[4], XIA Xing-hui[5], YE Fei[5], LI Yan[6], WU Hai-ping[7], ZHANG Ming-lu[1], HE Qing[1], YANG Ze-an[1], GAO Hua[1]

(1 *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*; 2 *Shanghai Li Zhu Pharmacy Co., Ltd.*, *Shanghai* 201206, *China*; 3 *Shanghai Institute for Food and Drug Control*, *Shanghai* 201203, *China*; 4 *Tianjin Institute for Drug Control*, *Tianjin* 300070, *China*; 5 *Ningbo Renjian Pharmacy Co., Ltd.*, *Cixi* 315300, *China*; 6 *Shanghai Techwell Biopharmaceutical Co., Ltd.*, *Shanghai* 201108, *China*; 7 *Xiamen Bioendo Technology Co., Ltd.*, *Xiamen* 361022, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish the 10th national standard for human chorionic gonadotrophin (HCG). **Methods**: According to Chinese Pharmacopoeia (Volume Ⅳ, 2015 edition) 1209 Chorionic Gonadotrophin bioassay, the 5th batch of international standard 07/364 was taken as reference, six laboratories collaboratively calibrated the biotiter of the 10th HCG nation standard. **Results**: The 10th batch of HCG national standard products was determined to have biological titer of 55 IU·per ampoule after collaborative calibration. **Conclusion**: The candidate was established as the 10th national standard for the determination of the titer of HCG API and preparations.

[**Key words**] preparation of standard reference; human chorionic gonadotrophin; *in vivo* bioassay; potency

绒促性素(chorionic gonadotropin)又称人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG),系从孕妇尿液、胎盘等组织中提取,是胎盘滋养层细胞分泌的一种促性腺激素,分子量约为 36 000 Da,等电点(pI)为 3.0[1-2]。HCG 具有促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)活性,对女性具促使卵泡成熟和排卵的作用,对男性具促间质细胞分泌激素的作用,促使其性器官和副性征发育和成熟,睾丸下

[**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。

降和精子生成,临床常用来治疗不孕症、黄体功能不足、功能性子宫出血、闭经、先兆流产或习惯性流产、男性性腺机能减退症、精子过少等症状[4-5]。HCG由α和β亚基以非共价键形式构成,其中α亚基负责信号转导和亚基折叠,β亚基负责清除体内HCG及体内的生物活性[6-7]。

HCG国际标准品由世界卫生组织(World Health Organization, WHO)生物标准化委员会建立批准,英国国家生物制品标准化和质量控制研究所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)负责制备,供各国标准品研制标定溯源用。目前现行批为第5批(07/364),发售时间为2007年。HCG国家标准品由中国食品药品检定研究院制备和发放,是HCG原料药和制剂进行生物效价测定的参考标准,该标准品自1960年建立以来,已经延续了9个批次,2004年研制的第9批HCG国家标准品(150513-200409)已用完,为满足检验的需要,使HCG国家标准品得以延续,特制备和标定第10批HCG国家标准品。

材料与方法

1 药物与试剂

标准品:WHO第5批HCG国际标准品(07/364)购自NIBSC,规格(生物测定用):162 IU·安瓿$^{-1}$。国家待标品原料药(上海丽珠制药有限公司,批号:190203,生物效价:5 412 IU·mg^{-1})每支安瓿单针灌装0.5 mL,冻干,熔封后即得成品,预估效价60 IU·安瓿$^{-1}$。牛血清白蛋白[Sigma公司,批号:WXBC9734V,SLBJ9162V;国药集团化学试剂有限公司,批号:20180322,20180831;生工生物工程(上海)股份有限公司,批号:ECr7BA0039,F524BA0008];人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒(日本东曹株式会社,批号:J3R70A1)。右旋糖酐(上海华贸药业有限公司,批号:20160703);甘露醇(批号:20180913)、十二水合磷酸氢二钠(批号:20181204)、磷酸二氢钠(批号:20150714)均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 仪器

电子天平型号:BT224S(德国赛多利斯公司);XS205DU,AL-104,PL4002,PL1501-S,AL104(梅特勒-托利多公司);YP402N,YP502N,FA2104(上海精密科学仪器有限公司)。AIA 360全自动免疫分析仪(日本东曹公司)。

3 动物

SPF级KM或ICR雌性小鼠,体重9~13 g,鼠龄15~23 d,一次实验所用小鼠的出生日期相差不得超过3 d,体重相差不得超过3 g;小鼠分别购自上海西普尔-必凯实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006]、斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0002]、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)2017-0005]、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]。

4 溶剂配制

称取牛血清白蛋白适量,加0.9%氯化钠溶液溶解,调节pH至(7.2±0.2),制成1 mg·mL^{-1}牛血清白蛋白溶液,混匀至充分溶解,即得溶媒对照。

5 HCG生物测定法

将小鼠按照体重随机分组,每组动物数量不少于10只,按照HCG的标识/预估效价,用溶媒将标准品和待标品分别配制成高、中、低3个浓度的溶液,剂距r值为0.6。每只小鼠皮下注入待测溶液0.2 mL,空白组注入等体积溶媒,连续3 d,于最后1次注入24 h后,按照给药顺序处死动物,称重,解剖,摘出子宫,剥离附着的组织,去除输卵管,压干子宫内液,直接称重(天平精密度0.1 mg)并换算成每10 g体重的子宫重量。

6 均匀性检验

6.1 抽样方案 参照中国食品药品检定研究院标准操作程序(SOP),抽样在冻干完成后进行,每个点抽10支样品,样品储存条件为-20 ℃,分发备检。

6.2 均匀性检验 按照SOP进行待标品均匀性检验,随机抽取样品中的12支,按照人绒毛膜促性腺激素检测试剂盒的说明书,进行ELISA-HCG检测,每支待标品出具2个独立结果。

7 短期稳定性检验

取5支待测品分别在温度点-20 ℃,4 ℃,20 ℃,45 ℃放置,放置时间7 d,此数据用于支持标准品发放时效价稳定性(运输过程不超过7 d)。采用ELISA检测实验结果,以-20 ℃放置的待测品作为参照,分别比较4 ℃,20 ℃,45 ℃放置的待测品效价。

8 装量差异

8.1 溶液配制 精密称定甘露醇120 g,右旋糖酐30 g,加注射用水7.5 L,搅拌均匀(必要时加热溶解使均匀),调节至pH 6.5~7.5,用0.22 μm滤膜过

滤,即得赋形剂溶液,将赋形剂和原料药按比例配制成 120 IU·mL^{-1}的溶液。

8.2 灌装 取洁净安瓿 100 支编号,并精密称定重量,随机放入灌装机内,每 20 min 取带编号的安瓿(含溶液),精密称定重量,与空安瓿相减即得灌装体积重量 A 值,共计抽到 78 支。计算上述的平均 A 值和标准差(s),计算变异系数(CV,%),CV/% = $s \cdot A^{-1} \times 100\%$,CV 应≤1%。

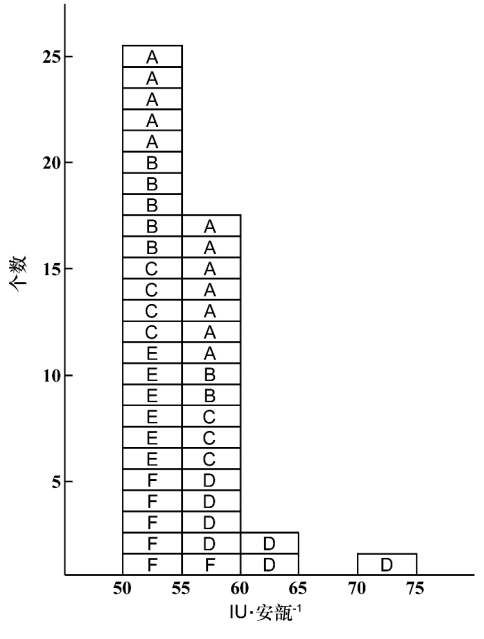
9 统计分析

HCG 活性检测,依据量反应平行线测定法,采用 BS 2000 软件计算效价。可靠性测验应符合要求,可信限率(fiducial limit,FL,%)不得 >25%[9-10]。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 值应≥0.05,稳定性检测采用 Excel 2010 student 进行 t 检验分析,P 值应≥0.05。

结 果

1 HCG 标定结果

以第 5 批 HCG 国际标准品 07/364 为标准,经过 6 家协作单位分别测定第 10 批 HCG 国家标准品待测品,共获得 45 个结果,汇总 6 家单位的效价(P_T)及 FL 合并计算,每家协作单位结果的数据和频数图,见图 1 和表 1。



A:上海丽珠制药公司;B:上海天伟生物制药公司;C:宁波人健药业公司;D:上海市食品药品检验所;E:天津市药品检验研究院;F:中国食品药品检定研究院药理室

图 1 HCG 协作标定结果频数图

表 1 HCG 协作标定结果 $n = 6$

实验室	采纳数量	实验结果	
		效价(P_T)/IU·安瓿$^{-1}$	可信限率/%
上海丽珠制药公司	12	55.683	3.80
上海天伟生物制药公司	7	53.357	5.33
宁波人健药业公司	7	54.490	5.43
上海市食品药品检验所	7	60.418	8.80
天津市药品检验研究院	6	52.651	6.52
中国食品药品检定研究院药理室	6	53.357	5.26
合并计算	—	55.476	2.05

3 均匀性检验

因动物实验精密度差且耗时耗力,无法在一次实验中完成均匀性检验,因此以 HCG 的 ELISA 效价值作为均匀性考察的结果。HCG 的活性测定包括 P_T 和结合效价值(C),前者系 HCG 刺激小鼠所测定的体内生物活性值,是临床使用的依据;后者系经过 ELISA 双夹心方法所测定的结合活性值 C(单位·安瓿$^{-1}$),P_T 不完全等同于 C。但本批标准物质原料药为同一来源,P_T 和 C 之间存在一定的相关性,C 值结果可用于表示待标品的均匀性[11]。通过 JMP10 对 12 支待标品的 C 值进行单因素方差分析,计算概率 P 是 0.085 3,结果说明待标品不存在显著性差异,均匀性检验符合要求,见图 2。

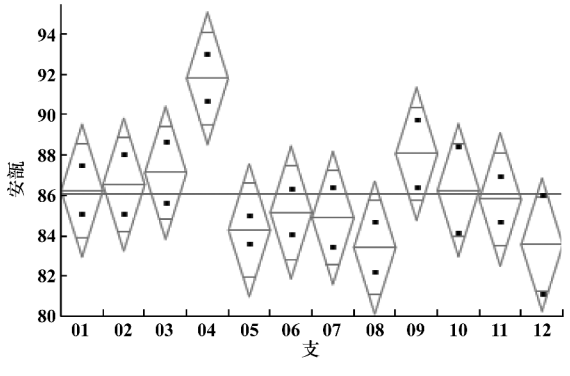


图 2 使用 ELISA 对 HCG 测定结果($n = 12$)

4 短期稳定性检验

取 5 支待测品分别在温度点 −20 ℃,4 ℃,20 ℃,45 ℃放置,放置时间 7 d,此数据用于支持标准品发放时效价稳定性(运输过程不超过 7 d)。采用进行 ELISA 检测,实验结果见表 2,表明 4 ℃,20 ℃,45 ℃放置的待测品均 $P > 0.5$,短期稳定性结果符合要求。

表 2 短期稳定性 ELISA 结果 $\bar{x} \pm s, n = 5$

放置温度	−20 ℃	4 ℃	20 ℃	45 ℃
ELISA 值	71.61 ± 2.51	73.72 ± 1.25	73.33 ± 4.54	73.02 ± 2.93
P 值	—	0.065	0.240	0.218

5 装量差异

78 支冻干品的每支装量平均结果为(0.502 1 ± 0.003) g,CV 为 1%,符合中国食品药品检定研究院对国家标准物质的要求。

第 10 批 HCG 国家标准品标定过程是参考第 5 批 HCG 国际标准品 07/364,通过 6 个实验室之间的协作标定,结果为 55.476(54.351 ~ 56.625) IU·安瓿$^{-1}$。最终其生物效价确定为 55 IU·安瓿$^{-1}$,供 HCG 生物效价测定用。本批待标品可作为第 10 批 HCG 国家标准品使用,批号:150513-201910。

讨 论

HCG 实验属于生物活性测定类方法,测定方法有:小鼠子宫增重法、大鼠子宫增重法、大鼠卵巢增重法[12]、大鼠精囊增重法[13]、小鼠阴道涂片法和大鼠阴道涂片法[1],《中华人民共和国药典》2015 年版通则收录方法是 1209“绒促性素生物测定法”(小鼠子宫增重法)[7],在符合通则 1209 的基础上,当地动物灵敏度、饲养环境的温湿度及光照频率导致不同实验室形成独立的 SOP,操作细节有差异,汇总 8 家单位的实验 SOP,比较异同点,相同之处表现在对解剖时的细节和动物体重要求:① 处死动物时应快速,防止脏器充血,可使用脱颈椎、CO_2 窒息死和乙醚麻醉死的安乐死方式。② 剂距按照《中华人民共和国药典》通则 1209 要求,不得 <1:0.5,实验室基本都在 1:0.6,笔者在检索第 9 批 HCG 国家标准品研制技术档案发现,当剂距为 1:0.5 时,容易出现线性回归、二次曲线和反向二次曲线不符合实验要求的情况,剂距为 1:0.6 时,该现象基本消除。③ 解剖人员操作应统一或固定人员,为减少误差,剥离子宫、压出子宫内液时操作应统一。④ 不要拉扯子宫,尽量剥离子宫附着的结缔组织和脂肪,使用滤纸轻压、吸净子宫内液体。⑤ 建议控制动物体重和日龄,减少动物体重对实验结果的影响,尽量选择体重 10 ~ 13 g 范围内,符合 1209 通则要求的小鼠。差异主要表现在给药剂量,高剂量组按照《中华人民共和国药典》通则 1209 要求,应为 0.14 ~ 0.8 IU·mL^{-1},所致子宫增重不会达到极限,低剂量组应较正常子宫明显增重,部分实验室虽然设空白溶媒对照,但动物数量少于供试品组动物数量,不同实验室差异具体见表 3。

表 3 不同实验室方法操作的差异点

地区	A			B	C	D	E	F
实验室编号	1	2	3	4	5	6	7	8
动物品系	ICR	ICR	ICR	KM	ICR	KM	ICR	ICR
每组动物数量/只	15	10	16	10	16	15	15 ~ 16	15 ~ 16
高剂量/IU·mL^{-1}	0.16	~0.1	0.168	0.36	0.2	0.2	0.3	0.16
剂距(*r*)	1:0.6	1:0.625	1:0.6	1:0.6	1:0.6	1:0.6	1:0.6	1:0.6
是否玻璃注射器	是	否	否	否	否	是	否	皆可
针头号	5.5	7	6	6	4	5.5	—	小号但针头尽量长
注射位点	背颈皮下注射,3 d 分别向脊椎外、内、中间方向注射	颈部皮下注射,进针至尾背部皮下注射或左大腿根部、右大腿根部、尾背部各 1 d	颈背部皮下注射,左右侧交替进针注射	两侧及背部皮下注射	头颈皮下注射	头颈皮下注射,3 d 分别向左肩、右肩、脊柱方向注射	颈部皮下注射,左中右更换注射部位	背部皮下注射,3 次尽量变换位置
空白溶媒对照	有	有	有	无	有	有	有	有

HCG 国家标准物质是保障 HCG 原料药和制剂效价检测的基准,维持发放时间 8 ~ 15 年不等,其效价的准确与否是保障临床用药合理、安全的基础。不同批次间的质量由于原料工艺、冻干工艺等环节差异或有不同,因此均匀性和稳定性检验是其研制过程中的重要环节。按照现有的均匀性检验规程,每支样品出具 2 个及以上独立结果,每次样品不小于 12 支,同时考察支内和支间差异。HCG 标准品的使用方式是整支复溶,形成均一溶液,无法检验支内差异,且受限于实验本身因素,无法在单独 1 次检验中同时完成 12 支待测品支间差异。笔者建议,因本次标准品来源均一,可以结合活性作为均匀性考察对象,使用 ELISA 方法对 HCG 的效价进行测定,考察本批待标品的均匀性。

本次使用 NIBSC 发放的第 5 批 HCG 国际标准品(07/364)作为基准,标定第 10 批 HCG 国家标准品。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[14-20]。现行第 9 批国家标准品已停发,参与标定的数据仅在实验体系作为内部参考使用。

[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: 200 - 209.

[2] 孙爱龙, 庄苏星, 彭士明. 胎盘中人绒毛膜促性腺激素的提取[J]. 镇江医学院学报, 1997, 7(4):405.

[3] 曾宪彪. 高效价人绒毛膜促性腺激素精品的提取纯化[J]. 广西医学, 1998, 20(4): 586 - 587.

[4] 熊美花. 人绒毛膜促性腺激素联合保胎灵治疗黄体功能不全习惯性流产的临床疗效分析[J]. 当代医学, 2018, 24(1): 58 - 59.

[5] 杨金平. 黄体酮联合绒毛膜促性腺激素治疗黄体功能不全先兆流产临床疗效研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(10): 91 - 92.

[6] FARES FA, SUGANUMA N, NISHIMORI K, *et al*. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit[J]. *PNAS*, 1992, 89(10): 4304 - 4308.

[7] FARES F. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: Development of agonists and antagonists[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(4): 560 - 567.

[8] 冷炜. 药品的生物检定[M]. 气象出版社,1995:100 - 107.

[9] 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: 168.

[10] 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.

[11] 吴彦霖, 张媛, 万龙岩, 等. 第 5 批人绝经尿促性腺素国家标准品的制备与标定[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(5): 441 - 446.

[12] 日本药局方编辑委员会. 日本药局方[S]. JP17. 日本厚生省:日本厚生省出版社, 2016: 997 - 999.

[13] 欧洲药典委员会. 欧洲药典[S]. EP10.0. 法国: 欧洲药品质量管理局, 2020: 2782.

[14] 钱德明, 刘群丽, 张媛, 等. 第九批绒促性素国家标准品的建立[J]. 中国药事, 2007, 21(10): 816 - 818.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 07 - 08