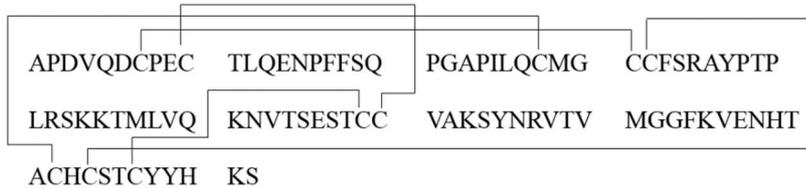
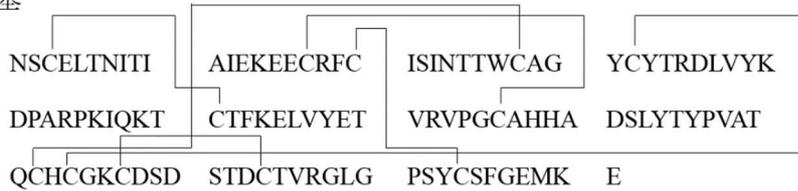


注射用人促卵泡激素  
Zhusheyong Ren Culuanpaojisu  
Human Follitropin for Injection

$\alpha$ -亚基



$\beta$ -亚基\*



糖基化位点: Asn-52, Asn-78, Asn-7\*, Asn-24\*

分子量: 30 000~40 000

本品系由含有可高效表达人促卵泡激素基因的工程化细胞, 经过细胞培养、分离和高度纯化后获得的人促卵泡激素 (hFSH), 加适宜稳定剂制成的无菌冻干品, 不含抑菌剂和抗生素。

### 1. 基本要求

生产和检定用设施、原材料及辅料、水、器具、动物等应符合“凡例”的有关要求。

### 2. 制造

#### 2.1 工程细胞

##### 2.1.1 名称及来源

人促卵泡激素工程细胞系由含有人促卵泡激素基因的重组质粒转染的 CHO 细胞系。

##### 2.1.2 细胞库建立、传代及保存

由原始细胞库的细胞传代, 扩增后冻存于液氮/气相液氮中, 作为主细胞库; 从主细胞库的细胞传代, 扩增后冻存于液氮/气相液氮中, 作为工作细胞库。各级细胞库细胞传代应不超过批准的代次。细胞冻存于液氮/气相液氮中, 检定合格后方可用于生产。

##### 2.1.3 主细胞库及工作细胞库的检定

应符合生物制品生产用动物细胞基质制备及质量控制 (通则 0234) 规定。

---

#### 2.1.3.1 外源因子检查

细菌和真菌、支原体、病毒检查均应为阴性。

#### 2.1.3.2 细胞鉴别试验

应用同工酶分析、生物化学、免疫学、细胞学和遗传标记物等任一方法进行鉴别，应为典型CHO细胞。

#### 2.1.3.3 人促卵泡激素表达量

应符合批准的要求。

#### 2.1.3.4 目的基因核苷酸序列检查（工作种子批可免做）

目的基因核苷酸序列应与批准的序列相符。

### 2.2 原液

#### 2.2.1 细胞的复苏与扩增

从工作细胞库来源的细胞复苏后，于不含动物源成分的培养液中进行传代、扩增，供摇瓶或细胞培养罐接种用。

#### 2.2.2 生产用细胞培养液

生产用细胞培养液应不含动物源成分和抗生素。

#### 2.2.3 细胞培养

细胞培养全过程应严格按照无菌操作。细胞培养时间应符合批准的要求。

#### 2.2.4 分离纯化

收集的培养液采用经批准的方法进行纯化，多步色谱纯化后制得高纯度的人促卵泡激素，过滤后即为人促卵泡激素原液。如需存放，应规定保存温度和时间。

#### 2.2.5 原液检定

照3.1项进行。

### 2.3 半成品

#### 2.3.1 配制与除菌

按经批准的配方配制稀释液，配制后应立即用于稀释。将原液用稀释液稀释至所需浓度，过滤后即為半成品，保存于适宜的温度。

#### 2.3.2 半成品检定

照 3.2 项进行。

### 2.4 成品

#### 2.4.1 分批

---

应符合生物制品分包装及贮运管理（通则 0239）规定。

#### 2.4.2 分装与冻干

应符合生物制品分包装及贮运管理（通则 0239）与注射剂（通则 0102）项下有关规定。

#### 2.4.3 规格

5.5 $\mu$ g（75IU）

#### 2.4.4 包装

应符合生物制品分包装及贮运管理（通则 0239）与注射剂（通则 0102）项下有关规定。

### 3. 检定

各项目中如涉及人促卵泡激素质量，均以人促卵泡激素蛋白质部分计。

#### 3.1 原液检定

##### 3.1.1 外观

应为无色澄明或微浊液体。

##### 3.1.2 鉴别

###### 3.1.2.1 电泳法

照电泳法（通则 0541 第六法方法 2）试验或使用经批准的方法。

对照品溶液 取人促卵泡激素对照品适量，用水稀释制成每 1ml 约含人促卵泡激素 5mg 的溶液。

取 90 $\mu$ l，加 pH 3~6 的两性电解质溶液 10 $\mu$ l 和甲基红溶液 2 $\mu$ l，混匀。

供试品溶液 取供试品适量，用水稀释制成每 1ml 约含人促卵泡激素 5mg 的溶液。取 90 $\mu$ l，加 pH3~6 的两性电解质溶液 10 $\mu$ l 和甲基红溶液 2 $\mu$ l，混匀。

系统适用性要求 对照品溶液电泳图谱中，对照品等电点在 3.5~5.5 之间的条带信号之和占总信号不低于 70%，等电点在 4.25~5.20 之间的条带信号之和占总信号不低于 50%。

测定法 精密量取供试品溶液和对照品溶液适量（10~20 $\mu$ l），分别加至上样孔，依法测定，记录电泳图。

结果判定 供试品溶液电泳图谱中主要条带的位置应与对照品溶液电泳图谱中主要条带的位置一致。

###### 3.1.2.2 毛细管电泳法

照毛细管电泳法（通则 0542）试验。

试剂 预混溶液 取两性电解质溶液 20 $\mu$ l、40mmol/L 亚氨基二乙酸溶液 100 $\mu$ l、等电点为 3.21 和 7.05 的标志物各 2.5 $\mu$ l 和 1% 甲基纤维素溶液 175 $\mu$ l，摇匀。

对照品溶液 取人促卵泡激素对照品适量（相当于约含人促卵泡激素 0.4mg），用超滤或其他适

---

宜方法将其缓冲体系置换为水，并制成每 1ml 约含人促卵泡激素 8mg 的浓缩液。取浓缩液适量，加水稀释 20 倍，按蛋白质含量测定法[通则 0731 第六法测定法（1）吸收系数法]测定该溶液的蛋白质浓度，吸收系数 $E_{1cm}^{1mg/ml}$ 以 1.0 计。取浓缩液适量（相当于约含人促卵泡激素 160 $\mu$ g），加预混溶液 60 $\mu$ l，用水稀释至 100 $\mu$ l，在低温下以不小于 10000g 离心 5 分钟，取上清液 90 $\mu$ l，相同条件下再次离心，取上清液。

供试品溶液 取本品适量，照对照品溶液同法制备。

空白溶液 以相同体积的水替代浓缩液，除蛋白浓度测定外，照对照品溶液同法制备。

电泳条件 氟碳涂层全柱成像石英毛细管柱（内径 100 $\mu$ m）；以含 80mmol/L 磷酸的 0.1% 甲基纤维素溶液为阳极电极液，以含 100mmol/L 氢氧化钠的 0.1% 甲基纤维素溶液为阴极电极液，1500V 预电泳 1 分钟，3000V 电泳 6 分钟；检测波长 280nm。

系统适用性要求 空白溶液电泳图谱中应有两个等电点标志物峰，且两峰之间应无干扰峰。对照品溶液电泳图谱中，以各等电点标志物的等电点值对其峰尖垂直投射于横坐标上的像素值进行线性回归，将各峰簇同法所得像素值代入回归方程，计算各峰簇的等电点；两个标志物峰之间应有 10~12 个峰簇，等电点在 4.2~5.5 之间的各峰谷的谷高与相邻较低峰簇的峰高之比均应不得过 0.5；以两个标志物峰之间所有峰与峰簇面积之和为总峰面积，等电点在 3.5~5.5 之间各峰簇的面积和与总峰面积之比应不低于 70%；等电点在 4.2~5.2 之间各峰簇的面积和与总峰面积之比应不低于 50%。

测定法 取空白溶液、对照品溶液和供试品溶液，按所选设备默认参数先后进样，记录电泳图谱。对照品溶液电泳图谱中，以各等电点标志物的等电点值对其峰尖垂直投射于横坐标上的像素值进行线性回归，将各峰簇同法所得像素值代入回归方程，计算各峰簇的等电点。供试品溶液电泳图谱和对照品溶液电泳图谱同法积分。

结果判定 供试品溶液主要峰簇的图谱应与对照品溶液主要峰簇的图谱一致。

#### 3.1.2.3 凝胶色谱法

在 3.1.5 项下记录的色谱图中，供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

#### 3.1.2.4 肽图

照高效液相色谱法（通则 0512）试验或采用经批准的方法。

试剂 （1）胰蛋白酶溶液 取经甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲酮（TPCK）处理的胰蛋白酶适量，以 0.1mmol/L 盐酸溶液制成每 1ml 含 1mg 的溶液。

（2）变性缓冲液 取尿素 480.5g，加水 500ml 和盐酸 1ml 使溶解，加三羟甲基氨基甲烷 43.6g 和 0.05g/ml 乙二胺四乙酸钠溶液 24ml，摇匀，用盐酸溶液调节 pH 至 8.6，加水稀释至 1000ml，摇匀。

(3) 碘乙酸溶液 临用新制。取碘乙酸 186mg，加 1mol/L 氢氧化钠溶液使溶解并稀释至 1ml。

(4) 二硫苏糖醇溶液 取二硫苏糖醇 1.54g，加水溶解并稀释至 10ml，摇匀。

(5) 碳酸氢铵溶液 取 1.58g 碳酸氢铵，加水溶解并稀释至 1000ml，调节 pH 至 8.0。

(6) 糖苷酶 F 溶液 取糖苷酶 F 适量，按说明书配制成适宜浓度的溶液。

对照品溶液 取人促卵泡激素对照品适量，用超滤浓缩（选取截留分子量为 3000 或 10000 的超滤管）或其他适宜方法将其缓冲体系置换为变性缓冲液并制成每 1ml 约含人促卵泡激素 1mg 的溶液。取此溶液适量，于 65℃ 加热 10 分钟，按 1:100 (V/V) 加入二硫苏糖醇溶液，于 37℃ 反应 1 小时后，按 1:40 (V/V) 加入碘乙酸溶液，避光放置 30 分钟，按 1:20 (V/V) 加二硫苏糖醇溶液。采用超滤浓缩或其他适宜方法将上述缓冲体系置换为碳酸氢铵溶液，并制成每 1ml 约含人促卵泡激素 1mg 的溶液。取此溶液适量，加糖苷酶 F (PNGaseF) 溶液适量，于 37℃ 反应 16 小时，即为糖苷酶酶切溶液。取此溶液适量，按 1:40 (mg/mg) 加胰蛋白酶溶液，于 37℃ 反应 16 小时，立即置 -20℃ 终止反应。上述变性、还原、烷基化及酶切步骤也可采用经批准的方法。

供试品溶液 取人促卵泡激素原液适量，照对照品溶液同法制备。

空白溶液 取不加胰蛋白酶溶液的供试品溶液，照对照品溶液同法制备。

色谱条件 以耐酸的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，柱温为 40℃；以含 0.1% 三氟乙酸的 5% 乙腈溶液为 A 相，以含 0.1% 三氟乙酸的 90% 乙腈溶液为 B 相，按下表进行梯度洗脱，流速为每分钟 1ml；检测波长为 214nm。进样体积 50 $\mu$ l。

时间 (分钟)	A 相 (%)	B 相 (%)
0	98	2
3	98	2
43	78	22
60	65	35
70	20	80
71	0	100
85	0	100
86	98	2
100	98	2

测定法 取空白溶液，对照品溶液和供试品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。

结果判定 供试品溶液肽图应与对照品溶液肽图一致。

### 3.1.2.5 糖谱

照高效液相色谱法（通则 0512）试验或采用经批准的方法。

试剂 （1）磷酸盐缓冲液 取磷酸氢二钠 8.9g 和乙二胺四乙酸 3.7g，加水 900ml 使溶解，用 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.5，用水稀释至 1000ml，摇匀。

（2）十二烷基硫酸钠溶液 取十二烷基硫酸钠适量，加水使溶解并稀释制成每 1ml 含 10mg 的溶液。

（3）2-巯基乙醇溶液 取 2-巯基乙醇适量，用水制成 1%（v:v）的溶液。

（4）辛苯基聚乙二醇溶液 取辛苯基聚乙二醇适量，用水制成 10%（v:v）的溶液。

（5）糖苷酶 F 溶液 取糖苷酶 F（如 Prozyme 规格为 2.5U/ml 的产品或同等产品）。

供试品溶液 取人促卵泡激素原液适量（相当于约含人促卵泡激素 0.5mg），用超滤浓缩（选取截留分子量为 3000 或 10000 的超滤管）或其他适宜方法将其缓冲体系置换为磷酸盐缓冲液并制成每 1ml 约含人促卵泡激素 8.3mg 的溶液。取此溶液 60 $\mu$ l，加十二烷基硫酸钠溶液 6 $\mu$ l 和 2-巯基乙醇溶液 35 $\mu$ l，混匀后于 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟，加辛苯基聚乙二醇溶液 7.5 $\mu$ l 和糖苷酶 F 溶液 25mU，混匀后于 37 $^{\circ}$ C 反应 24 小时，作为切糖后样品溶液。采用适宜的经验证的方法去除蛋白质组份。如采用冷乙醇沉淀法，以下为示例方法：向上述切糖后样品溶液中加入在 -20 $^{\circ}$ C 预冷 45 分钟的无水乙醇 600 $\mu$ l，混匀后于 -20 $^{\circ}$ C 沉淀蛋白 15 分钟，在 4 $^{\circ}$ C 以 10600g 的离心力离心 5 分钟。转移上清液至试管中，放置约 15 分钟至乙醇挥发后加入 1ml 水，继续挥发直至剩余体积约为 500~800 $\mu$ l，冻干或离心干燥。采用经优化与验证的 2-氨基苯甲酰胺衍生试剂盒，按照相应操作步骤有效标记冻干样品中的寡糖，然后采取经验证的萃取小柱回收标志物作为供试品溶液；或以冷乙腈去除过量荧光试剂后冻干或离心干燥标志物，以 1ml 水或一定体积经验证的含水有机相复溶标志物，作为供试品溶液。上述变性、还原、烷基化及酶切步骤也可采用经批准的其它方法。

对照品溶液 取人促卵泡激素对照品适量，照供试品溶液同法制备。

色谱条件 用以二乙氨基乙基（DEAE）为键合相的聚合物基质阴离子交换树脂为填充剂的色谱柱（7.5mm $\times$ 75mm，10 $\mu$ m），柱温 30 $^{\circ}$ C；以乙腈为流动相 A，以 0.5mol/L 醋酸-醋酸铵缓冲液（pH 值为 4.5）为流动相 B，水为流动相 C，按下表进行梯度洗脱，流速为每分钟 0.4ml；荧光检测器的激发波长为 330nm，发射波长为 420nm。进样体积 50 $\mu$ l。

时间（分钟）	A 相（%）	B 相（%）	C 相（%）
0	20	0	80
5	20	0	80
21	20	4	76
61	20	25	55

62	20	50	30
71	20	50	30
72	20	0	80
117	20	0	80

系统适用性要求 对照品溶液色谱图中,按出峰顺序依次为中性糖、单唾液酸、双唾液酸、三唾液酸、四唾液酸各峰簇,按面积归一化法计算上述各组分含量并计算 Z 值,应符合规定。

测定法 精密量取对照品溶液和供试品溶液,注入液相色谱仪,记录色谱图,按面积归一化法计算中性糖、单唾液酸、双唾液酸、三唾液酸、四唾液酸的含量,按下式计算 Z 值。

$$Z = (A_0 \times 0) + (A_1 \times 1) + (A_2 \times 2) + (A_3 \times 3) + (A_4 \times 4)$$

其中  $A_0$ 、 $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$ 、 $A_4$  分别为中性糖、单唾液酸、双唾液酸、三唾液酸、四唾液酸的含量。限度 Z 值应符合批准的要求。

#### 3.1.2.6 N 端氨基酸序列

至少每年测定 1 次。采用经验证的方法分离  $\alpha$  与  $\beta$  两个亚基,以氨基酸序列分析仪或其他适宜的方法进行测定, N 端序列应为:

$\alpha$  亚基: Ala-Pro-Asp-Val-Gln-Asp-Cys-Pro-Glu-Cys-Thr-Leu-Gln-Glu-Asn。

$\beta$  亚基序列一 ( $\beta$ 亚基完整序列): Asn-Ser-Cys-Glu-Leu-Thr-X-Ile-Thr-Ile- Ala-Ile-Glu-Lys-Glu;  $\beta$  亚基序列二 ( $\beta$ 亚基 N 端缺失 2 个氨基酸的序列): Cys-Glu-Leu-Thr-X-Ile-Thr-Ile-Ala-Ile-Glu-Lys-Glu-Glu-Cys; 其中 X 代表被修饰的氨基酸。

### 3.1.3 检查

#### 3.1.3.1 聚合物

照电泳法(通则 0541 第五法)试验。

供试品溶液 取本品,用水制成每 1ml 约含人促卵泡激素 0.2mg 的溶液,取此溶液适量,加等量非还原供试品缓冲液(通则 0541 第五法),混匀。

对照溶液 精密量取供试品溶液适量,用非还原供试品缓冲液定量液稀释并制成人促卵泡激素浓度为供试品溶液浓度 1.5% 的溶液。

测定法 采用非还原型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法试验,分离胶浓度为 12.5%,供试品溶液及对照溶液加样量均不低于 1.0 $\mu$ g,银染法显色。

结果判定 供试品溶液中聚合物条带显色应不深于对照溶液中主条带的颜色(1.5%)。

#### 3.1.3.2 解离亚基

照电泳法(通则 0541 第五法)试验。

供试品溶液 取本品，用水制成每 1ml 约含人促卵泡激素 0.2mg 的溶液，取此溶液适量，加等量非还原供试品缓冲液，混匀。

对照溶液 精密量取供试品溶液适量，用非还原样品缓冲液定量稀释并制成人促卵泡激素浓度为供试品溶液浓度 4% 的溶液，100 加热 5 分钟，放冷。

测定法 采用非还原型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行试验，分离胶浓度为 12.5%，供试品溶液及对照溶液加样量均不低于 1.0 $\mu$ g，银染法显色。

结果判定 供试品溶液中解离亚基条带显色应不深于对照溶液中解离亚基条带的颜色（4%）。

### 3.1.3.3 总氧化亚基

照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

供试品溶液 取本品适量，加水定量稀释制成每 1ml 中约含人促卵泡激素 0.1mg 的溶液。

系统适用性溶液 取人促卵泡激素对照品适量，加水溶解并制成每 1 ml 中含 0.5mg 的溶液。取此溶液 100 $\mu$ l，加入 1.2% 双氧水溶液 5 $\mu$ l，于 37 $^{\circ}$ C 反应 30~40 分钟后，加入 25mg/ml 的甲硫氨酸水溶液 50 $\mu$ l 终止反应，作为系统适用性溶液。

对照品溶液 取人促卵泡激素对照品适量，加水定量稀释制成每 1ml 中约含人促卵泡激素 0.1mg 的溶液。

色谱条件 以丁基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱（4.6mm $\times$ 250mm，5 $\mu$ m），柱温为 30 $^{\circ}$ C；以磷酸盐缓冲液（取磷酸二氢钾 27.2g，加水 900ml 使溶解，用 85% 磷酸调节 pH 至 2.5，加水至 1000ml，摇匀）为流动相 A，以乙腈-水（80:20）为流动相 B，按下表进行梯度洗脱，可适当调整流动相 B 的初始浓度，使  $\beta$  亚基的保留时间为 10~12min，流速为每分钟 1.0ml；检测波长为 210nm。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	82	18
10	74	26
25	60	40
26	20	80
56	20	80
56.1	82	18
75	82	18

系统适用性要求 对照品溶液色谱图中， $\beta$  亚基与  $\alpha$  亚基先后出峰，理论塔板数按  $\beta$  亚基峰计算应不小于 1000；在系统适用性溶液色谱图中， $\beta$  亚基峰与  $\alpha$  亚基峰之间的峰簇为  $\alpha$  亚基氧化峰， $\beta$  亚基峰之前与之相邻的峰簇为  $\beta$  亚基氧化峰， $\alpha$  亚基峰与  $\alpha$  亚基氧化峰之间的分离度应符合要求， $\beta$  亚

基氧化峰的峰高与  $\beta$  亚基峰之间峰谷高之比应不小于 1.3。

测定法 精密量取对照品溶液和供试品溶液各 100 $\mu$ l、系统适用性溶液 30 $\mu$ l，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。供试品溶液色谱图中，仅对溶剂峰与  $\alpha$  亚基峰（含）之间的色谱峰进行积分，按面积归一化法计算总氧化亚基含量。

限度 应不得过 5.0%。

#### 3.1.3.4 $\beta$ 亚基 N 端缺失比

至少每年测定一次。照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

试剂 （1）变性缓冲液 取尿素 480.5g，加水 500ml 和盐酸 1ml 使溶解，加三羟甲基氨基甲烷 43.6g 和 0.05g/ml 乙二胺四乙酸钠溶液 24ml，摇匀，用盐酸调节 pH 至 8.6，加水稀释至 1000ml，摇匀。

（2）二硫苏糖醇溶液 取二硫苏糖醇 15.4g，加水溶解并稀释至 100ml，摇匀。

（3）碳酸氢铵溶液 取碳酸氢铵 1.58g，加水溶解并稀释至 1000ml，调节 pH 至 8.0。

供试品溶液 取本品适量，用超滤浓缩或其他适宜方法将其缓冲体系置换为变性缓冲液并制成每 1ml 约含人促卵泡激素 1mg 的溶液。取此溶液适量，于 65 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟，冷却后按 1:100 (V/V) 加入二硫苏糖醇溶液，于 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，按 1:40 (V/V) 加入 1mol/L 碘乙酸溶液，避光放置 30 分钟，按 1:20 (V/V) 加入二硫苏糖醇溶液。采用超滤浓缩或其他适宜方法将上述样品的缓冲体系置换为碳酸氢铵溶液并制成每 1ml 约含人促卵泡激素 1mg 的溶液。取此溶液，加糖苷酶 F 适量，于 37 $^{\circ}$ C 反应 16 小时，放冷。

对照品溶液 取人促卵泡激素对照品，照供试品溶液同法制备。

空白溶液 取变性缓冲液适量，自第一次加入二硫苏糖醇溶液开始，照供试品溶液同法制备。

色谱条件 以耐酸的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(4.6 mm $\times$ 250mm, 3.5  $\mu$ m, 如 Waters XBridge Peptide BEH C18 或等效色谱柱)，柱温为 60 $^{\circ}$ C；以 0.1% 三氟乙酸水溶液为 A 相，以含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液为 B 相，按下表进行梯度洗脱，流速为每分钟 0.8ml；检测波长为 214nm。进样体积 50 $\mu$ l。

时间（分钟）	A 相（%）	B 相（%）
0	71	29
3	71	29
23	69	31
25	66	34
50	64	36

52	20	80
62	20	80
63	71	29

系统适用性要求 对照品溶液色谱图中保留时间 25~50 分钟内有两个相邻主峰，第 1 个峰为 N 端缺失了 2 个氨基酸残基的  $\beta$  亚基峰（缺失  $\beta$  亚基峰），第 2 个峰为 N 端完整的  $\beta$  亚基峰（完整  $\beta$  亚基峰），两峰之间的分离度应不低于 1.0；空白溶液色谱图中上述两峰所在时间段内应无干扰峰。

测定法 精密量取空白溶液、对照品溶液与供试品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。供试品溶液色谱图中仅对缺失  $\beta$  亚基与完整  $\beta$  亚基峰面积进行积分，计算缺失  $\beta$  亚基峰面积与完整  $\beta$  亚基峰面积的比值，即为  $\beta$  亚基 N 端缺失比。

限度 应为 0.8~1.2。

#### 3.1.3.5 宿主菌 DNA 残留量

依法测定（通则 3407）或采用经验证并批准的其他适宜方法，每 1mg 人促卵泡激素含宿主 DNA 不得过 3ng。

#### 3.1.3.6 CHO 细胞蛋白质残留量

依法测定（通则 3412、3413 或 3414）或采用经验证并批准的其他适宜方法，每 1mg 人促卵泡激素含 CHO 细胞蛋白质不得过 100ng。

#### 3.1.3.7 细菌内毒素

依法检查（通则 1143 凝胶限度试验），每 1 $\mu$ g 人促卵泡激素含内毒素的量应小于 0.01EU。

#### 3.1.4 生物学活性

##### 3.1.4.1 体内生物学活性

取人促卵泡激素标准品，依法测定（通则 1216 第一法）。

##### 3.1.4.2 体外生物学活性

取人促卵泡激素标准品，依法测定（通则 3536）。

##### 3.1.4.3 比活性

计算体内生物学活性与 3.1.5 项下蛋白质含量测定结果的比值。每 1mg 人促卵泡激素的效价应为 10500~16500IU。

#### 3.1.5 含量测定

照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

供试品溶液 取人促卵泡激素原液适量，用水制成每 1ml 约含人促卵泡激素 0.1mg 的溶液。

对照品溶液 精密称取人促卵泡激素对照品适量，加水溶解并定量稀释制成每 1ml 约含人促卵

---

泡激素 0.1mg 的溶液。

色谱条件 以适合分离分子质量为 5000-15000Da 球状蛋白质的亲水改性硅胶为填充剂；以磷酸盐缓冲液（取 85%磷酸 6.74ml，加水 800ml，加无水硫酸钠 14.2g，用 50%氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.7，加水至 1000ml，摇匀）为流动相，流速为每分钟 1.0ml；检测波长 214nm；进样体积 20 $\mu$ l。

系统适用性要求 对照品溶液色谱图中，理论板数按人促卵泡激素峰计算应不小于 1000。

测定法 取对照品溶液和供试品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法以峰面积计算人促卵泡激素含量。

限度 应为 0.65~1.35mg/ml。

### 3.2 半成品检定

如需对原液进行稀释或加入其他辅料制成半成品，应确定半成品的质量控制要求，包括检定项目和可接受的标准，按如下检项或批准的检项进行。

#### 3.2.1 细菌内毒素

依法检查（通则 1143），每 1 $\mu$ g 人促卵泡激素含内毒素的量应小于 0.25EU。

#### 3.2.2 无菌

依法检查（通则 1101 薄膜过滤法），应符合规定。

### 3.3 成品检定

#### 3.3.1 外观

本品应为白色疏松体。每瓶加水 1ml，复溶后应为无色澄明液体。

#### 3.3.2 鉴别试验

##### 3.3.2.1 免疫斑点法

照免疫斑点法（通则 3402）测定，应为阳性。

##### 3.3.2.2 凝胶色谱法

3.3.5 项下记录的色谱图中，供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

#### 3.3.3 检查

##### 3.3.3.1 复溶时间

取本品 5 瓶，每瓶加水 1ml，复溶时间均不得过 60 秒。

##### 3.3.3.2 水分

不得过 3.0%（通则 0832 第一法 2 库仑滴定法或 1 容量滴定法）。

##### 3.3.3.3 酸碱度

取本品，每瓶加水 1ml 使溶解，合并后依法检查（通则 0631），pH 应为 6.5-7.5。

---

### 3.3.3.3 渗透压摩尔浓度

取本品，每瓶加水 1ml 使溶解，合并后依法检查（通则 0632），应为 95-155mOsmol/kg。

### 3.3.3.4 聚合物

照电泳法（通则 0541 第五法）试验。

供试品溶液 取本品，每瓶加水 60 $\mu$ l 使溶解，按 4: 1 (V/V) 加入非还原供试品缓冲液 (4 $\times$ )，摇匀。

对照溶液 精密量取供试品溶液适量，用非还原供试品缓冲液 (4 $\times$ ) 定量稀释并制成人促卵泡激素浓度为供试品溶液浓度 2% 的溶液。

测定法 取供试品溶液及对照品溶液适量，照 3.1.3.1 项方法或使用经批准的方法测定。

结果判定 供试品溶液中聚合物条带显色应不深于对照品溶液中主条带的颜色 (2%)。

### 3.3.3.5 解离亚基

照电泳法（通则 0541 第五法）试验。

供试品溶液 取本品，每瓶加水 60 $\mu$ l 溶解使，按 4:1 (V/V) 加入非还原供试品缓冲液 (4 $\times$ )，摇匀。

对照溶液 精密量取供试品溶液，用非还原供试品缓冲液 (4 $\times$ ) 定量稀释并制成人促卵泡激素浓度为供试品溶液浓度 7.5% 的溶液，100 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟，放冷。

测定法 精密量取供试品溶液及对照溶液适量，照 3.1.3.1 项下第一法或使用经批准的方法测定。

结果判定 供试品溶液中解离亚基条带显色应不深于对照溶液中解离亚基条带的颜色 (7.5%)。

### 3.3.3.6 总氧化亚基

照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

供试品溶液 取本品，每瓶加水 110 $\mu$ l 使内容物溶解，全量混匀并制成每 1ml 中约含人促卵泡激素 50 $\mu$ g 的溶液。

系统适用性溶液 取人促卵泡激素对照品适量，加水溶解并制成每 1 ml 中约含人促卵泡激素 0.5mg 的溶液。取此溶液 100 $\mu$ l，加 1.2% 双氧水溶液 5 $\mu$ l，于 37 $^{\circ}$ C 反应 30~40 分钟后，加 25mg/ml 甲硫氨酸溶液 50 $\mu$ l 终止反应。

对照品溶液 取人促卵泡激素对照品适量，加水溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含人促卵泡激素 0.1mg 的溶液。

空白溶液 以水为空白溶液。

色谱条件与系统适用性要求 进样体积除外，其它同 3.1.3.3 项下。

测定法 精密量取空白溶液 200 $\mu$ l、对照品溶液 100 $\mu$ l、系统适用性溶液 30 $\mu$ l 和供试品溶液 200 $\mu$ l，

---

分别注入液相色谱仪，记录色谱图。供试品溶液色谱图中，扣除空白溶液中的色谱峰后，仅对  $\alpha$  亚基峰及其之前的色谱峰进行积分。按面积归一化法计算总氧化亚基含量。

限度 不得过 10.0%。

#### 3.3.3.7 可见异物

取本品，每瓶按说明书标示量加注射用水或附带稀释剂使溶解，依法检查（通则 0904 第一法），不得检出金属屑、玻璃屑、长度或最大粒径超过 2mm 纤毛和块状物等明显外来可见异物。

#### 3.3.3.8 不溶性微粒

取本品，依法（通则 0903）检查，每份容器中含  $10\mu\text{m}$  及  $10\mu\text{m}$  以上的微粒数不得过 6000 粒，含  $25\mu\text{m}$  及  $25\mu\text{m}$  以上的微粒数不得过 600 粒。

#### 3.3.3.9 装量差异

取本品，依法检查（通则 0102），应符合规定。

#### 3.3.3.10 无菌

取本品，依法检查（通则 1101 薄膜过滤法），应符合规定。

#### 3.3.3.11 细菌内毒素

取本品，依法检查（通则 1143），每  $1\mu\text{g}$  人促卵泡激素中含内毒素的量应小于 0.6EU。

#### 3.3.3.12 异常毒性

取本品，依法检查（通则 1141 小鼠试验法），按腹腔注射给药，应符合规定。

#### 3.3.4 体内生物学活性

取本品，依法测定（通则 1216 第一法），应为标示量的 80%-135%。

#### 3.3.5 含量测定

照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

泊洛沙姆 188 溶液 取泊洛沙姆 188 10mg，加水 100ml 使溶解。

F68 溶液 取 F68 10mg，加水 100ml 使溶解。

供试品溶液 取本品，每瓶加泊洛沙姆 188 溶液 250 $\mu\text{l}$  或 F68 溶液 200 $\mu\text{l}$  使溶解，合并并混匀。

上述溶剂加入量如低于 500 $\mu\text{l}$ ，计算溶液浓度时应考虑溶解后溶液的增容效应。

对照品溶液 精密称取人促卵泡激素对照品适量，用泊洛沙姆 188 溶液 250 $\mu\text{l}$  或 F68 溶液 200 $\mu\text{l}$  稀释制成每 1ml 约含人促卵泡激素 30 $\mu\text{g}$  的溶液。上述溶剂加入量如低于 500 $\mu\text{l}$ ，计算溶液浓度时应考虑溶解后溶液的增容效应。

色谱条件 进样体积 100 $\mu\text{l}$ ；其它同 3.1.5 项下。

系统适用性要求 对照品溶液色谱图中，理论板数按人促卵泡激素峰计算应不小于 1000。

---

测定法 取泊洛沙姆 188 溶液、对照品溶液和供试品溶液，分别注入液相色谱仪，记录供试品溶液色谱图至泊洛沙姆 188 或 F68 出峰。按外标法以峰面积计算供试品中人促卵泡激素含量。

限度 应为标示量的 98.2%~120.0%。

4. 稀释剂

本品如附有稀释剂，则应符合批准的生产工艺及质量标准要求。

5. 保存、运输及有效期

于 2-8℃ 遮光、密闭保存和运输，自生产之日起，按批准的有效期执行。

6. 使用说明

应符合生物制品分包装及贮运管理（通则 0239）规定和批准的内容。