

附件：1216 卵泡刺激素生物测定法公示稿（第二次）

1216 卵泡刺激素生物测定法

本法适用于卵泡刺激素的效价测定。测定方法分为卵巢增重法和人颗粒细胞孕酮测定法。当检验结果有争议时，以卵巢增重法试验结果为准。

第一法 卵巢增重法

本法系比较尿促性素（或尿促卵泡素、重组人促卵泡素等）标准品(S)与供试品(T)对幼大鼠卵巢增重的作用，以测定供试品中卵泡刺激素的效价。试验时应选择与供试品同质的标准品。

溶剂的制备 试验当日，称取牛血清白蛋白适量，加 0.9%氯化钠溶液溶解，一般可制成每 1ml 中含 1mg 的溶液，充分溶解后，用 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.2 ± 0.2 。

精密称取已知效价的绒促性素（原料或粉针剂均可），加入上述溶液中溶解，制成每 1ml 中含 20 单位的溶液，混匀备用。

标准品溶液的制备 试验当日，按尿促性素标准品中卵泡刺激素的标示效价，用上述溶剂，按高、中、低剂量组（ d_{s3} 、 d_{s2} 、 d_{s1} ）配成 3 种浓度的标准品溶液，相邻两浓度之比（ r ）应相等，且不得大于 1:0.5。一般高浓度的标准品溶液可制成每 1ml 中含 2~5 单位。调节剂量使低剂量组卵巢明显增重，高剂量组卵巢增重不致达到极限。标准品溶液置 2~10℃ 贮存，可供 3 日使用。

供试品溶液的制备 按供试品中卵泡刺激素的标示量或估计效价（ A_T ），照标准品溶液的制备法制成高、中、低（ d_{t3} 、 d_{t2} 、 d_{t1} ）3 种浓度的供试品溶液，相邻两浓度之比（ r ）应与标准品相等，供试品与标准品各剂量组所致反应平均值应相近。

测定法 取健康合格，出生 19~23 日，或体重 36~60g，同一来源的雌性幼大鼠，一次试验所用大鼠的出生日期相差不得超过 3 日，或体重相差不得超过 15g；按体重随机等分成 6 组，每组不少于 8 只，每日于大致相同的时间分别给每鼠皮下注入一种浓度的标准品溶液或供试品溶液 0.5ml，每日一次，连续注

26 入3次,于最后一次注入24小时后,将动物处死,称重,解剖,摘出卵巢,剥离附
27 着的组织,去除输卵管,用滤纸吸去周围的液体,直接称重(天平精密度0.1mg)
28 并换算成每10g体重的卵巢重,照生物检定统计法(通则1431)中的量反应平
29 行线测定法计算效价及实验误差。

30 本法的可信限率(FL%)不得大于45%。

31 **第二法 人颗粒细胞孕酮测定法**

32 本法系比较尿促性素(或尿促卵泡素)标准品(S)与供试品(T)对人卵
33 巢颗粒细胞分泌孕酮的作用,以测定供试品中卵泡刺激素的效价。

34 **试剂** (1)完全培养液 试验当日,取胎牛血清和DMEM/F12培养液,按
35 体积比配制成含10%胎牛血清的DMEM/F12细胞培养液(不添加青链霉素或其
36 他抗生素),混匀,置2~8℃保存。

37 (2)测定培养液 试验当日,取胎牛血清和DMEM/F12培养液,按体
38 积比配制成含1%胎牛血清的DMEM/F12细胞培养液(不添加青链霉素或其
39 他抗生素),混匀,置2~8℃保存。

40 (3)氯化钠溶液的制备 取氯化钠粉末9g,加水溶解并稀释至1000
41 ml,经121℃、15分钟灭菌。

42 (4)PBS 取氯化钠8.0g、氯化钾0.20g、磷酸氢二钠1.44g、磷酸二氢
43 钾0.24g,加水溶解并稀释至1000ml,经121℃、15分钟灭菌。

44 (5)消化液的制备 称取乙二胺四乙酸二钠0.2g、胰酶2.5g,用PBS
45 溶解并稀释至1000ml,过滤除菌。2~8℃保存。

46 **标准品溶液的制备** 试验当日,按标准品中卵泡刺激素的标示效价,用
47 测定培养液制成每1ml中含30IU,在无菌玻璃试管中配制系列溶液,一般高
48 剂量的浓度可制成每1ml中含3IU,或其他适宜的浓度。一般不少于7个浓
49 度,相邻两浓度之比值(r)应相等,为1:3。应符合四参数反应。**以上操作**
50 **在无菌条件下进行。**

51 **供试品溶液的制备** 试验当日,按供试品中卵泡刺激素的标示效价或估
52 计效价(A_T),照标准品溶液的制备法制成供试品溶液,相邻两浓度之比值(r)

53 应与标准品相等，供试品与标准品各剂量组所致反应平均值应相近，供试品
54 溶液浓度一般应与标准品溶液浓度一致。以上操作在无菌条件下进行。

55 **测定法** 人卵巢颗粒细胞用完全培养液于 37℃、5%二氧化碳条件下培养，
56 当细胞生长融合度达到 80%时，消化和收集细胞。用完全培养液配制成每 1ml
57 含 10^5 个细胞悬液，将上述悬液接种于同一 96 孔细胞培养板中，每孔加入
58 $100\mu\text{l}$ 。待细胞完全贴壁后，吸弃孔内生长培养基，更换为测定培养液，每孔
59 $100\mu\text{l}$ 。每孔分别再加入对应的标准品和供试品溶液 $100\mu\text{l}$ ，每个剂量不少于
60 3 个复孔，于 37℃、5%二氧化碳培养箱条件下继续培养 72h。取细胞培养上清
61 液按照孕酮测定试剂盒说明书进行孕酮检测。

62 采用四参数回归计算法（通则 1431）进行判定，并按下式计算结果。

63 供试品生物学活性（IU/ml） $=P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r}$

64 式中 P_r 标准品生物学活性，IU/ml；

65 D_s 为供试品预稀释倍数；

66 D_r 为标准品预稀释倍数；

67 E_s 为供试品相当于标准品半效量的稀释倍数；

68 E_r 为标准品半效量的稀释倍数。

69 本法的置信限率不得大于 25%，四参数反应曲线的相关系数应大于或等
70 于 0.95，试验方为有效。

起草单位：中国食品药品检定研究院 联系电话：010-53851590

参与单位：深圳市药品检验研究院（深圳市医疗器械检测中心）、天津市药品检验研
究院、北京市药品检验研究院（北京市疫苗检验中心）、山西省检验检测中心（山西省
标准计量技术研究院）药品检验技术研究所、江苏省食品药品监督检验研究院、河南省
药品医疗器械检验院（河南省疫苗批签中心）、山东省食品药品检验研究院

1216 卵泡刺激素生物测定法第二次公示稿修改说明

本次公示修订了第一法的部分内容，进一步规范表述，增强可操作性，主要为：

1. 增加尿促卵泡素、重组人促卵泡素等标准品的内容。
2. 在溶剂的制备项下增加“一般”的表述。
3. 明确标准品的选择应和待测品具有同质性。