

# 药品的生物检定法

卫生部药品生物制品检定所 编

人 民 卫 生 出 版 社



# 药 品 的 生 物 检 定 法

卫生部药品生物制品检定所 编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

人民卫生出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 4 $\frac{1}{2}$ 印张 92千字

1959年2月第1版第1次印刷

1978年5月第2版第5次印刷

印数：8,351—18,650

统一书号：14048·1815 定价：0.30元

## 再 版 前 言

本书自1958年出版以来已近二十年了。在此期间,药品检定工作有了很大的发展,特别是文化大革命以来各单位通过不断实践,积累了很多经验,希望得到交流。当前卫生革命蓬勃发展,药检工作队伍不断壮大,为适应大好形势发展的需要乃将本书再版。

本书的修改由卫生部药品生物制品检定所首先书面征集了全国各药检单位的经验,经过初步整理编印成初稿,再普遍征求各有关单位的意见,并组织召开了二十个省市药检所参加的座谈会共同讨论修改定稿。

本书是药品检验丛书之一,供从事生物检定工作者参考用。内容以效价测定为主,有些品种收载了两种方法,书中着重介绍了各单位的经验及实验中需要注意的一些问题。有关品种的性状、规格标准等应以新药典为准,本书不再叙述。书中如有与新药典规定矛盾之处以药典为准。

由于我们的政治思想及业务水平有限,难免有错误和缺点,诚恳地欢迎读者提出批评指正,以便及时纠正。

卫生部药品生物制品检定所

一九七七年九月

## 目 录

|                        |     |
|------------------------|-----|
| 生物检定的一般介绍·····         | 1   |
| 胰岛素生物检定法·····          | 9   |
| 精蛋白锌胰岛素注射液延缓作用检查法····· | 27  |
| 促皮质素生物检定法·····         | 28  |
| 催产素生物检定法·····          | 50  |
| 垂体后叶生物检定法·····         | 60  |
| 绒促性素生物检定法·····         | 60  |
| 肝素生物检定法·····           | 74  |
| 硫酸鱼精蛋白生物检定法·····       | 87  |
| 洋地黄生物检定法·····          | 93  |
| 葡萄糖酸锑钠毒力检查法·····       | 100 |
| 新肿凡纳明毒力、疗效检查法·····     | 102 |
| 降压物质检查法·····           | 108 |
| 升压物质检查法·····           | 114 |
| 热原检查法·····             | 119 |
| 附表·····                | 125 |

## 生物检定的一般介紹

### 一、概况

生物检定是利用活的有机体或组织来测定药品有效成分含量的一种方法。它是在药理学的基础上，利用药物对生物某些方面独特的作用，比较供试品与其相应的标准品或对照品在一定条件下对于生物所起的作用，定出供试品的效价。因此，它包括的范围很窄，仅仅是在测定方法和标准品都具备的条件下，检定工作者为了要判定药品的效价，利用生物作为对象，进行定量试验而已。对于那些尚未建立检验方法和标准品的药品所进行的生物试验就不在生物检定之例。但是我们应该从革命的实际需要出发，而不能单纯从定义出发，总结我国建国以来生物检定工作的内容常涉及以下几方面：

1. 效价测定：通过供试品和相当的标准品在一定条件下进行比较，以定出供试品的效价。

2. 建立检验方法：一个新药，在经过药理工作者进行系统的药理试验后，被推荐到临床试用，如疗效确实，即由工厂大规模投产，投产前必须制订标准规格和检验方法，以控制产品的质量。对于那些尚不能用理化方法控制质量的品种，生物检定工作者须从系统的药理作用中选择一种能代表临床疗效或毒性反应的指标，建立一个生物检定的检验方法。

3. 比较药物的作用强度：被试的药品往往与其相比的对照品在性质上相近似，并不像一般所谓生物检定中所要求

标准品必须和被试品性质基本相同。试验的目的只是通过药物作用强度的比较，从已知药理性质和强度的药品来探知被试物的作用。如利用生物比较试验检定中药的质量，比较同一类药品的毒性和疗效等。

4. 限度试验：在试验本身达不到效价测定的精确度或者药品的质量评定并不需要以确切的数字表示时采用的方法，如脏器制剂中降压物质检查、安全试验等。

## 二、生物检定效价的表示方法和标准品

生物检定效价的表示方法，最初是用“动物单位”。即在规定的实验条件下，把对于某种动物产生一定程度药理反应的药量，作为表示效价的单位。这种表示方法易受动物种属、体质、年龄、性别、季节等影响。

1897年 Ehrlich 首先建议用供试品和标准品对比的方法来解决这个问题，第一次制备了白喉抗毒素对照标准品，到二十世纪二十年代洋地黄、胰岛素、垂体后叶等生物检定制用国际标准品亦相继建立。即将原始标准品以某种定义确定单位后，一切供试品均以此做对照，计算成相当于国际标准品的单位数，成为测定药物活性的尺度。这样就大大减低了由于不同国家、不同实验室等各种不同条件带来实验结果不一致的问题。第一次世界大战后，对许多类似药物均认为有统一制备标准品的必要，国际联盟承担了组织、收集和分发的任务，统一供应标准品，具体由丹麦哥本哈根血清研究所及英国伦敦国立医学研究院（现已专门成立国家生物标准检定所）负责。第二次世界大战以后，由世界卫生组织承担了此项工作，建立了生物检定专家委员会，具体工作仍由原单位进行。

国际标准品一般不在具体检定工作中直接应用，各个国

家根据本国情况制备自己的国家标准品。我国解放后，在毛主席无产阶级革命卫生路线指引下，医药工业迅速发展，特别是生物制剂从无到有，发展极为迅速。为适应形势发展的需要，保障人民用药安全有效，我国自1952年开始建立了国家标准品，由中华人民共和国卫生部审定，具体工作由卫生部药品生物制品检定所负责，会同全国各有关单位共同进行选择、分装、协作标定、定出效价，由药品生物制品检定所统一保管分发。凡是国际上已制备国际标准品的品种，在制备国家标准品时，均与国际标准品比较而定出其效价，以单位或重量表示。我国特有的品种则自定效价。一批标准品用完后另行制备新标准。一般情况下新标准品开始使用后，前批标准品即停止使用。凡制备过程中原料纯度较差，标定数据由于某些条件限制精确度不够好或原料稳定性较差等情况时，做为暂行标准品。

### 三、生物检定中的几个基本问题

1. 生物差异和它的规律：生物检定实验误差较大，其根本原因在于生物差异，其中包括动物正常的生理反应的差异和给药后对药理反应的差异。因此必须尽量控制可以限定的条件，以减少实验误差，如对动物的种属来源、饲养条件、环境实验条件等均要严格控制。但生物差异也是有规律的，如以反应的程度或最小有效量作横轴，以某一反应程度或最小有效量的出现次数换算成对数为纵轴来画分布曲线，则接近于常态分布曲线。这个曲线中间高，两端低，两边对称，它的对称中点纵座标最高点的横座标，就是平均对数反应或平均对数最小有效量。即在一群反应或一群最小有效量里，很小或很大的数值都比较少，最多的是平均对数反应或平均对数最小有效量。因此，可选反应灵敏的一段来进行实

验，以减少误差。

2. 剂量和反应的关系：进行实验设计选择方法，首先必须了解剂量和反应的关系，以确定如何处理结果。剂量和反应的关系，最好是直线的，因为直线关系最简单，直线方程式为一元一次，两点即可决定一条直线，最容易处理。所以如二者不成为直线则应采取各种方法使其转换成直线。常用的如将剂量换算成对数，或将反应转换成对数，或其他函数，亦可二者都加以转换。而这条直线的斜度（直线和横轴所交角的正切值）则有特殊意义：在量反应和时反应检定里，它反映着动物对于药物剂量变化的敏感度，表示剂量增减一定数值时所致反应的增减程度。在质反应里斜度则反映着生物差异性，斜度越大，表示生物差异性小，实验结果越精密可靠；斜度越小，结果就相反。因此在一般情况下如以剂量作横轴，反应为纵轴时剂量反应线斜度的绝对值总是愈大愈好。

3. 平行线关系：如剂量（或其对数）和反应（或其函数）呈直线关系，同时标准品和供试品性质相同，仅强度不同，则标准品和供试品的两条剂量反应直线必相平行。反之，如果二者不平行，说明两种药物在质上是不相同的，这一点在生物检定中是一个极为重要的问题，原则上供试品的检定必须以质相同或类似的物质为标准，结果才可靠。

#### 4. 可信限：

(1) 可信限：可信限是反映实验误差的统计值，是在一定机率水平下，从样本均数估计总体均数（真值）可能的范围，通常以  $m \pm tS_e$  表示。当机率（ $P$ ）= 0.95 时，即总体均数有 95% 可能性落在  $m \pm tS_e$  范围以内。因此可信限亦反映实验的重现性。当实验操作正确无误，又实验在同样条件

下进行时，可信限愈小，实验重现性愈大，实验结果愈接近于真值的可能性愈大。反之，则重现性小，实验结果偏离真值愈远的可能性愈大。可信限的估计范围和估计本身的准确性机率之间是互相矛盾的，一般认为机率为95%，即如有95%的可能即认为有显著的可能。生物检定中也经常用这个水平。

(2) 可信限率：可信限的绝对值和实验结果的相对关系，即可信限相当于实验结果的百分数为可信限率。

(3) 平均可信限率：当实验结果是以对数值换算者常使高限与低限不成等距，为方便计，则取其平均值，称为平均可信限率。

各种不同的具体检定方法，在正常情况下，根据经验规定最高平均可信限率。超过它，表示实验情况不正常，应找出原因，重新实验。

#### **四、常用的实验设计**

生物检定的基础，即药理实验，对影响实验的条件和因素须严格控制，选择适当的设计，以期尽可能达到准确、精密、迅速、简单和经济的要求。

选择检定方法，尽量要和药物的药理作用相同，但如标准品和供试品的性质完全相同，同时所含杂质不具有药理作用，或不干扰主药的药理作用，则主药的任何一种药理反应都可被考虑作为实验的对象。如肝素的检定即利用它的主要药理作用——抗凝血作用。而洋地黄临床上虽用其强心作用，但因其使鸽的心脏发生急性致死的毒性和它的强心效力在量的关系上互相平行，因此检定方法即采用了鸽致死量的方法。

常用的生物检定方法有以下几种：

1. 量反应或时反应：观察药物反应的程度，可以用数字来表示其大小，如子宫收缩的高度，血液凝固的时间等。

(1) 四点法：本法适用于具有平行线关系的量反应或时反应检定，标准品和供试品均用两个剂量，高低剂量的比值应相等，共四组，具体实验尚有以下两种：一种方法为在一个动物或一个器官上能反复多次给药者，可以标准品、供试品高低剂量各给药一次为一组，以不同的给药次序，反复试验做4~8组结果，按公式计算。本法经常使用，如催产素检定法等。另一种方法为在一个动物上只能得出一个反应者，把动物分成4组，每组10~15只，各组分别给以标准品和供试品的高低剂量，得四组结果，按公式计算。本法亦为常用的实验设计，如促皮质素检定法等。

(2) 六点法：与四点法实验设计类似，仅标准品及供试品各用三个剂量，相邻两剂量间的比值必须相等，此类试验四点法与六点法常可以通用，如剂量选择适当，四点法即可得准确结果。如绒毛促性素子宫称重法等。

(3) 固定标准法：本法适用于实验过程中反应出现有规律的递减或递增情况。即标准品剂量固定，而供试品用高于、低于、等于标准品的三个剂量，与标准品间隔给药为一组，再以不同顺序重复一到二次，通过测定各反应值，计算供试品的效价，如检定垂体后叶子宫收缩素所用的鸡血压法等，现不常用。

(4) 比较平均法：本法适用于短时间内在一个动物或器官上多次给药以观察反应的检定。寻找一个标准品的剂量，使它产生的反应程度恰好在供试品两个剂量（一个较它大，另一个较它小的两个剂量）之间，取供试品两个剂量的平均值，即相当于标准品的剂量。本法比较简单，但一般认为误

差较大，现不常用。

2. 质反应：观察某一反应或反应的某种特定程度是否出现。如死或不死，血液中的锥虫是否肃清等，因此只有出现正反应或负反应的两种情况，而无程度之别。

(1) 最小效量法：本法用于产生某种反应的剂量可以较准确测得的试验，将供试品所需剂量与标准品比较，来测定供试品的效价，如洋地黄生物检定法。

(2) 机率单位法：本法适用于对数剂量和反应的百分率所相当的机率单位呈直线关系，标准品和供试品的两条直线呈平行线关系的实验，剂量按等比级数，标准品与供试品的剂间比例应相同。一般用  $1:0.5 \sim 1:0.85$ ，根据剂量反应的直线斜率来设计，斜率愈大，比例可设计小些，斜率愈小，一般比例可大些。实验组数可根据剂量反应的直线斜率、剂间距离、动物来源难易等情况而定，如胰岛素小鼠惊厥法用四点，绒促性素阴道涂片法则常用六点，而在毒性或疗效实验中，有时还要采用八点或十点。

(3) 半数效量法：本法为标准品与供试品分别用 2 个以上剂量测定其对动物的反应，通过公式计算动物产生半数质反应率的剂量，通常用  $ED_{50}$  表示，毒性亦可按此法计算。如以死亡为指标，则为半数致死量，以  $LD_{50}$  表示。分别测定标准品与供试品的  $ED_{50}$ （或  $LD_{50}$ ），比较二者的剂量，算出比值，可判断供试品的作用强弱。

3. 限度试验：有时药物的某些性质，只要限定其不超过一定限度，以保证安全，或不低于某一限度，以保证有效，即可用限度试验方法，如降压物质、热原检查等。

## 五、影响实验的因素

生物检定由于动物的生物差异，能影响实验的因素很

多，要在实验中予以注意。例如：

1. 动物要求健康无伤，如动物需要重复使用，前一次实验对下一次实验可能产生的影响必须考虑。如用家兔进行热原检查，两次实验间隔时间，及家兔最多使用的次数均有规定。

2. 动物的分组应根据实验要求，按体重、年龄、性别、甚至窝别均匀分组，尽量使标准品和供试品两组所用动物的条件一致，以减少生物差异。

3. 某些实验要求动物要在特定的生理条件范围，方能获得成功，或成功率才能提高，因此对实验规定的条件需严格注意。如催产素生物检定大白鼠子宫法所用动物宜选择动情前期较为合适，胰岛素小鼠惊厥法则要求用饥饿一定时间的动物，停食时间的长短对结果都有影响。

4. 某些检定所用动物对药物的敏感性因季节、时间有明显的差异，如绒促性素检定春、夏季小白鼠的敏感度就比秋冬季为高，所用剂量就应适当调整，小白鼠对胰岛素的敏感度晨、午、晚，亦有显著不同等等，实验中均应注意。

5. 实验在同一动物或同一器官反复多次给药时，需控制各次给药时间，间隔要恒定，有时还要受给药次序的影响，则实验中应把各种剂量交互调换各种次序给药，如垂体后叶子宫收缩素的生物检定，给药次序要按拉丁方排列。同时在实验安排上作相应的注意，以便于进行统计分析时可以把这些差异的影响分离出来，使所得结果更为可靠。

6. 离体器官实验要求恒温，温度的变化对结果有显著的影响。

7. 两人以上合作一个实验时，必须注意人与人之间的操作差异。如标准品和供试品分别由两个人给药常会给实验带

来很大误差，而应两个人分别各进行一部分标准品和供试品的实验而后合并计算，以消除实验操作误差。

8. 注射给药时，应注意溶液的体积，药物的浓度、溶剂的性质以及静脉给药时的给药速度，这些均能影响实验的结果，必须注意。

9. 其他：一些实验对环境、仪器等有特定的要求，如热原质检查要求室温恒定，凝血试验要求试管清洗光滑等都要特别注意，以提高实验的成功率和准确性。

## 胰岛素生物检定法

胰岛素是从哺乳动物胰腺的胰岛 $\beta$ -细胞中分泌的一种由两个硫硫键联接的A链和B链共51个氨基酸所组成的多肽激素。1965年我国在世界上第一次成功的合成了人工蛋白质——牛胰岛素结晶。

胰岛素为六方晶系结晶，通常产品呈板状棱面体。易溶于80%乙醇和酸性水溶液中，在pH 2.5的酸性溶液中比较稳定。不溶于乙醚、丙酮等有机溶剂及pH 4.5~7.0的溶液中，等电点为pH 5.3~5.35。

胰岛素的主要药理作用是降低血糖，在人体代谢方面是一个很重要的激素。遇碱及蛋白酶即被破坏，因此一般为注射剂，口服无效。大量注入胰岛素可引起惊厥、休克、甚至死亡，临床使用时需严格控制剂量。

本品制剂有普通胰岛素，一般为每毫升40单位、80单位，其原料要求每毫克效价不得低于25个单位。还有中效、长效制剂，一般为每毫升40单位。

**效价测定** 本品检验方法很多，但目前主要仍采用生物

检定法，是根据其有降血糖的药理作用进行效价测定。常用小白鼠惊厥法及家兔血糖降低法。长效胰岛素的延长作用，只能用兔血糖降低法测定。

### 一、小白鼠惊厥法

本法系将胰岛素标准品与供试品分别注入小白鼠皮下，比较两者使小白鼠血糖下降并导致惊厥的百分率，以决定供试品效价的一种方法。

【标准品溶液的配制与稀释】 精密称取胰岛素标准品适量，加每 100 毫升含有苯酚 0.2 克并用稀盐酸调节pH为 2.5 的生理氯化钠溶液，使溶解成每 1 毫升相当于 20 个单位的溶液。将其分装熔封，贮于冰箱中保存，并防止冰冻。如无沉淀发生，六个月内可以应用。临用前再用 pH 2.5 生理氯化钠溶液稀释成适当浓度。

【供试品溶液的配制与稀释】 供试品为粉末，可按标准品溶液的配制与稀释方法配制。如供试品为注射液，可按标示量或估计效价照标准品溶液的稀释法稀释。供试品如为延效作用胰岛素，按每毫升加入 0.2~0.3 毫升 N/10 盐酸，使溶液澄清后再进行稀释。

【动物】 同一起来源的健康小白鼠，雌雄均可（但需分开饲养）。在试验前 18~22 小时移去饲料，仍给予饮水。临试验前取 18~25 克小白鼠 96 只，每次试验各鼠间体重相差不超过 4 克。

【检定法】 将选出的 96 只小白鼠按体重和性别均匀分成 4 组，每组 24 只。然后分别自各鼠皮下注射相同容量（0.2~0.5 毫升）的标准品或供试品高、低剂量稀释液，注射后的小白鼠分别放于适宜的容器内。全部注射时间不得超过 15 分钟。标准品高、低剂量的比值应与供试品相同，但

不得大于1:0.5。待全部注射后立即将各鼠置于已调节好温度的恒温箱（或恒温设备）内，放入后注意恒温箱温度的变化，待达到适宜温度（一般为29~37°C）后，即保持恒温（±0.75°C），并应适当通风。由小白鼠放入恒温箱开始计时，注意观察90分钟，记录各组发生惊厥反应的鼠数。观察完毕后，自箱中取出小白鼠，将所有未发生惊厥反应的小白鼠进行检查，如遇有死亡、后肢麻痹瘫痪不能正常行动、使其仰卧在3秒内不能自行翻身者，均认为是阳性反应。试验要求供试品与标准品的高低剂量组的阳性反应数应相当，高低剂量两组所致的阳性反应数至少应相差10只；同时各低剂量组的小白鼠应有1~9只发生阳性反应，各高剂量组的小白鼠应有15~23只发生阳性反应。

将阳性反应鼠数换算成机率单位。按下列公式计算：

供试品的效价相当于标示量或估计效价的%

$$= \frac{d_s}{d_r} \times \log^{-1} \left[ \frac{V}{W} \times I \right] \times 100\%$$

$$W = \frac{1}{2} (T_2 - T_1 + S_2 - S_1)$$

$$V = \frac{1}{2} (T_2 + T_1 - S_2 - S_1)$$

式中：

$d_s$ ：标准品高剂量中所含的单位数

$d_r$ ：供试品高剂量中按其标示量或估计效价计算所含的单位数

$I$ ：高剂量与低剂量比值的对数

$S_2$ ：标准品高剂量组的机率单位

$S_1$ ：标准品低剂量组的机率单位

$T_2$ ：供试品高剂量组的机率单位

$T_1$ ：供试品低剂量组的机率单位

将所得百分率乘以标示量或估计效价，即得供试品实际含有的单位数。

【举例】 用小白鼠惊厥法测定胰岛素粉末的效价。

标准品：标示量 26 单位/毫克。精密称取适量，用 pH 2.5 生理氯化钠溶液配成 20 单位/毫升的溶液。

供试品：标示量 26 单位/毫克，配法同标准品。

试验前将标准品及供试品均再用 pH 2.5 生理氯化钠溶液稀释成 240 毫单位/毫升，120 毫单位/毫升各两个剂量，剂距为 1:0.5，每鼠注射 0.25 毫升。结果如表 1：

表 1 胰岛素效价测定结果

| 组 别            | 标 准 品   |         | 供 试 品   |         |
|----------------|---------|---------|---------|---------|
| 剂量(毫单位/毫升)     | 240     | 120     | 240     | 120     |
| 反应数            | 18/24   | 5/24    | 20/24   | 4/24    |
| 反应率            | 75.0    | 20.8    | 83.3    | 16.7    |
| 机率单位           | 5.67    | 4.19    | 5.97    | 4.03    |
| 权重( $\omega$ ) | 12.9552 | 11.9952 | 10.7664 | 10.7664 |
| 平 均 权 重        | 11.6208 |         |         |         |

计算：

$$W = \frac{1}{2}(5.97 - 4.03 + 5.67 - 4.19) = 1.71$$

$$V = \frac{1}{2}(5.97 + 4.03 - 5.67 - 4.19) = 0.07$$

$$I = \log \frac{240}{120} = \log 2 = 0.301$$

供试品效价相当于标示量的%

$$\begin{aligned}
 &= \frac{240}{240} \times \log^{-1} \left[ \frac{0.07}{1.71} \times 0.301 \right] \times 100\% \\
 &= \log^{-1}(0.0123) \times 100\% \\
 &= 102.9\%
 \end{aligned}$$

供试品的效价 = 26.0 单位/毫克  $\times 102.9\%$   
 = 26.8 单位/毫克

按下列公式计算平均可信限率:

平均可信限率 =  $S_m \times 2.3 \times t \times 100\%$

$$S_m = \frac{I}{W^2} \times \sqrt{\frac{I}{\bar{\omega}}(W^2 + V^2)}$$

式中:  $S_m$ : 标准误

$\bar{\omega}$ : 平均权重

(权重 = 权重系数  $\times$  动物数)

实验例平均可信限率计算:

$$\begin{aligned} S_m &= \frac{0.301}{1.71^2} \sqrt{\frac{1}{11.6208} (1.71^2 + 0.07^2)} \\ &= 0.1029 \sqrt{0.0861 (2.9241 + 0.0049)} \\ &= 0.1029 \times \sqrt{0.2522} \\ &= 0.0517 \end{aligned}$$

当自由度  $df > 30$   $t = 1.96$  ( $P = 0.95$ )

平均可信限率 =  $0.0517 \times 2.3 \times 1.96 \times 100\%$   
 = 23.31%

一般情况下, 此方法平均可信限率在 30% 以下。

【注意事项与经验介绍】:

1. 影响实验灵敏度的几个因素:

(1) 动物饲养条件最好恒定。选用健康活泼的动物能提高实验的成功率。饥饿前后体重相差较大, 因此应在饥饿后称体重, 并按其性别、体重均匀分组, 以保持其条件尽可能一致。饥饿后小白鼠体重最好在 20 克以上成功率较高。

(2) 在一定时间内饥饿能使小白鼠糖元减少, 饥饿时间能影响小白鼠对胰岛素的敏感度。因此在各次试验中, 饥饿