

第3批缩宫素国家标准品的建立

张媛¹, 杨泽岸¹, 孟长虹², 李晓洁², 高华¹, 吴彦霖^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629

2. 江苏省食品药品监督检定研究院, 江苏 南京 210008

摘要: 目的 建立首批HPLC含量测定用缩宫素国家标准品。方法 第3批缩宫素国家标准品采用冻干制备。使用核磁共振和HPLC法对缩宫素进行结构确证; 采用HPLC法测定待标品的质量分数, 并测定待标品水分及氨基酸比值; 以缩宫素USP对照品为标准, 采用HPLC外标法和大鼠子宫法分别测定待标品的生物效价。**结果** 经核磁共振和HPLC法确证缩宫素的结构; 待标品水分含量为4.8%, 各氨基酸比值均在限度范围内, 经HPLC检测质量分数为99.69%; 待标品经HPLC法测定每支含量为274 IU, 经大鼠子宫法测定每支含量为275 IU。**结论** 建立的待标品可作为第3批缩宫素国家标准品, 供缩宫素效价测定及鉴别使用。

关键词: 缩宫素; 高效液相色谱法; 标准品; 生物效价; 大鼠子宫法

中图分类号: R921.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 03-0578-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.03.015

Establishment of 3rd batch of national standard of oxytocin

ZHANG Yuan¹, YANG Zean¹, MENG Changhong², LI Xiaojie², GAO Hua¹, WU Yanlin¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China

Abstract: **Objective** To establish the first batch of national standard of oxytocin for high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** This batch of standard is prepared by freeze-drying. The structure of oxytocin was confirmed by NMR and HPLC. HPLC was used to determine the purity of the standard, moreover the water and amino acid ratio of the standard were determined. The biological potency of oxytocin was determined by HPLC external standard method and rat uterus method against the oxytocin USP reference standard. **Results** The structure of oxytocin was confirmed by NMR and HPLC. The water content of the standard sample was 4.8%, the ratio of each amino acid was within the limit, and the mass fraction is 99.69% by HPLC. The content of oxytocin national standard was 274 IU per ampoule by HPLC and 275 IU per ampoule by rat uterus method. **Conclusion** This batch of standard substance can be used as the first batch of oxytocin national standard for HPLC content determination for oxytocin potency determination and HPLC identification.

Key words: oxytocin; high performance liquid chromatography; standard; biological potency; rat uterus method

缩宫素又称催产素, 是一种含有9个氨基酸的多肽类激素, 于下丘脑视上核和室旁核中合成, 自垂体后叶释放至体循环^[1]。缩宫素被广泛应用于产科引产和催产中, 并发挥着至关重要的作用。但缩宫素的不当使用也会增加并发症的发生率, 如宫缩过强、胎儿窘迫, 甚至子宫破裂等^[2]。因此, 缩宫素生物效价的准确测定对其临床用药安全起着至关重要的作用。目前, 《中国药典》收录的缩宫素生物活性效价测定方法为大鼠子宫法^[3]。此法虽具有直

观反映缩宫素生物活性的优点, 但该方法实验精密度较低、操作繁琐、对实验人员技术要求较高, 加之实验动物的使用, 使得该方法不易推广, 在全国范围内开展较少^[4]。目前, 包括美国(USP)、英国、日本(JP)等在内的多个国家药典有关缩宫素效价测定的方法均由包括大鼠子宫法在内的生物检定法转为HPLC测定法。本实验室结合我国缩宫素的生产现状, 针对我国缩宫素产品进行了相关方法替代的研究, 并取得满意结果^[5]。国家药典委员会亦于

收稿日期: 2022-09-15

第一作者: 张媛, 研究方向为药理学。E-mail: zhyuan_cn@126.com

*通信作者: 吴彦霖, 研究方向为药理学。E-mail: wyljoe@126.com

2019年底公示了缩宫素溶液及其制剂的质量标准,将缩宫素效价测定方法改为HPLC测定法。该质量标准虽未正式颁布,但缩宫素效价测定方法的替代已势在必行。因此,本实验建立了第3批缩宫素国家标准品,该批标准品的适用范围由传统生物检定方法——大鼠子宫法,扩展至HPLC含量测定用,以满足不同实验的需求。

1 材料

1.1 标准品

缩宫素 USP 对照品, Catalog No.: 1491300, 批号: R05360, 规格: 每瓶 1.81 mg; 缩宫素 USP 鉴别对照品, Catalog No.: 1491296, 批号: R100Y0, 规格: 每瓶 15 mg, 均来源于美国药典委员会。缩宫素 JP 标准品, 批号: OXY02A, 规格: 每支 633 IU, 来源: 日本药局方; 第2批缩宫素国家标准品, 批号: 150529-200902, 规格: 每支 21 IU, 来源: 中国食品药品检定研究院; 18种氨基酸对照品, 批号: 140624~201506, Tyr、Cys-Cys 质量分数为 99.8%, Phe、Lys.HCl 质量分数为 100.0%, 其余氨基酸质量分数为 99.9%, 来源: 中国食品药品检定研究院。

1.2 待标品(第3批缩宫素国家标准品)

原料来源为化学合成缩宫素, 此批待标品经冻干制备, 灌装体积为每支 1 mL, 灌装容器为 5 mL 无色安瓿, 采用单针灌装, 冻干赋形剂为人血白蛋白。

1.3 主要试剂及仪器

人血白蛋白购自美国 Sigma 公司(货号 A9511); 柠檬酸、磷酸二氢钠购自国药集团化学试剂有限公司; 乙腈购自美国 Sigma 公司、德国 Merck 公司、美国 TEDIA 公司; OXYTOCIN/DESMOPRESSIN VALIDATION MIXTURE CRS(货号 O0770000)购自 EDQM。

LC-20A 液相色谱仪(Shimadzu), E2695 液相色谱仪(Waters公司); ALC-MPA2000 离体器官测定系统(上海奥尔科特生物科技有限公司); DJW-1 型电动记纹鼓(上海康为医疗科技发展有限公司); Avance Neo600 MHz 核磁共振仪(Bruker 公司); 803 水分仪(Metrohm 公司)。

1.4 实验动物

SPF 级成年雌性大鼠, 体质量 160~240 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司、上海西普尔-必凯公司, 实验动物生产许可证号分别为 SCXK(沪)2017-0005、SCXK(沪)2018-0006。本实验经中国食品药品检定研究院实验动物福利伦理审查委员会批准, 实验动物伦理号: 中检动(福)第 2022(A)080 号。

2 方法与结果

2.1 待标品制备装量差异

灌装前将空安瓿随机进行标记后精密称定质量; 于灌装开始 0、30、60、120、180 min, 每个时间点各取 5 支已罐装的标记安瓿, 精密称定质量, 并计算罐装液体净重, 共取样 30 支。装量差异以变异系数(CV)表示。测定结果表明本批待标品罐装的 CV 为 0.95%, 符合中国食品药品检定研究院标准操作规程不大于 1% 的要求。

2.2 鉴别与结构确证

2.2.1 核磁共振定性鉴别 精密称取缩宫素 USP 鉴别对照品及待标品原料药, 溶于重水使其完全溶解, 转移至核磁管中。采集一维 ^1H -NMR 及 ^{13}C -NMR。测定结果表明待标品的 ^1H -NMR 及 ^{13}C -NMR 与缩宫素 USP 鉴别对照品图谱一致。结果见图 1.2。

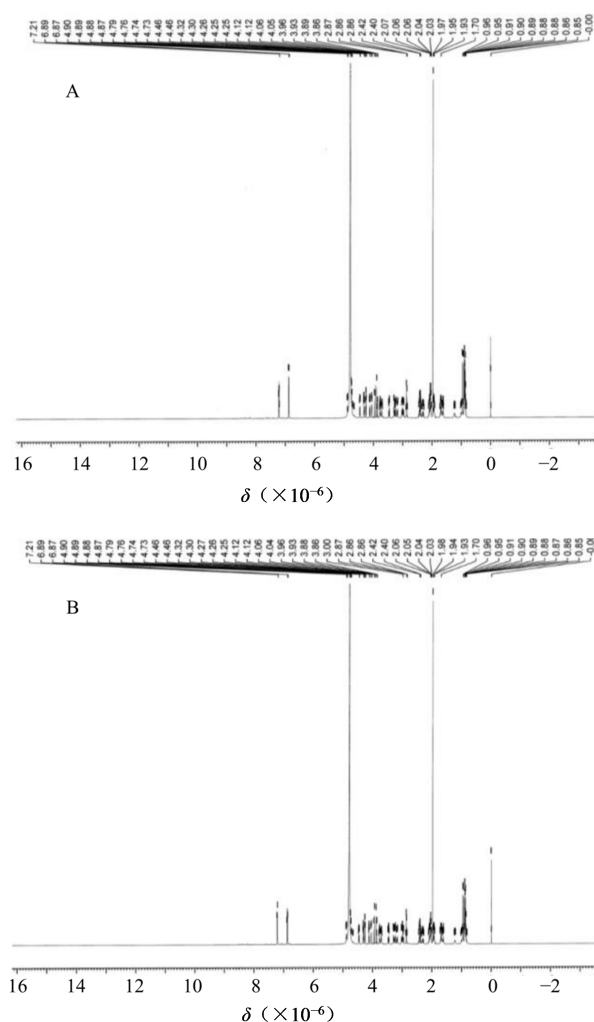


图1 缩宫素USP鉴别对照品(A)与第3批缩宫素国家标准品(B) ^1H -NMR图

Fig. 1 ^1H -NMR spectrum of identification reference substance of oxytocin USP (A) and 3rd batch of oxytocin national standard (B)

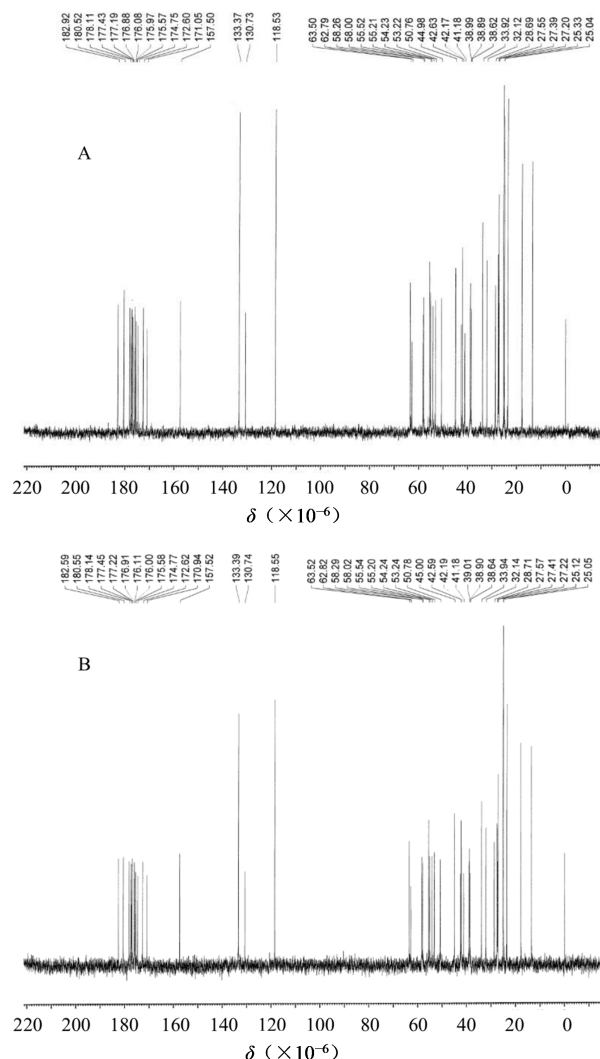


图2 缩宫素 USP 鉴别对照品(A)与第3批缩宫素国家标准品(B)¹³C-NMR谱图

Fig. 2 ¹³C-NMR spectrum of identification reference substance of oxytocin USP (A) and 3rd batch of oxytocin national standard (B)

2.2.2 HPLC 鉴别^[5-6] 色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠, B 为 乙腈-水(1:1), 进行梯度洗脱, 见表 1。检测波长为 220 nm, 柱温 40 °C。将缩宫素 USP 对照品和待标品原料药用流动相 A 溶解制成约 10 IU·mL⁻¹, 进样体积 100 μL。记录色谱图, 见图 3。

表1 缩宫素 HPLC 测定洗脱条件
Table 1 HPLC elution condition of oxytocin

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	70	30
5	70	30
35	40	60
35.1	70	30
45	70	30

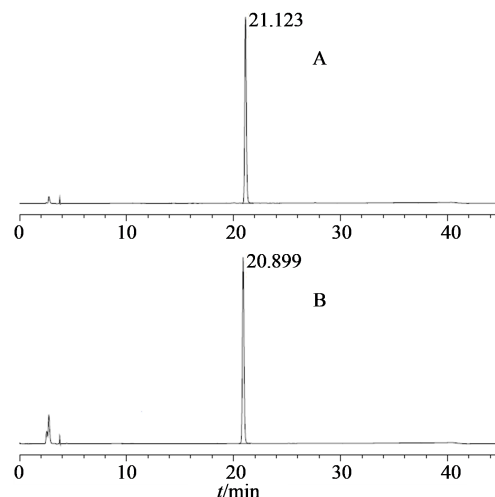


图3 USP对照品(A)与第3批缩宫素国家标准品(B)HPLC 典型色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of reference substance of oxytocin USP (A) and 3rd batch of oxytocin national standard (B)

测定结果表明待标品主峰的保留时间与缩宫素 USP 对照品主峰的保留时间一致。

2.3 理化特性

2.3.1 水分 采用卡氏库伦法^[3]测定水分。取待标品冻干成品, 平行测定 5 次, 测定待标品水分含量为 4.8%。

2.3.2 氨基酸比值^[6] 鉴于待标品缩宫素为多肽, 采用 HPLC 法测定待标品氨基酸比值。精密称取待标品原料药, 用 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液置于 110 °C 水解 24 h, 蒸干后衍生。按照内标法计算待标品各氨基酸的相对摩尔比值。测定结果表明待标品各氨基酸比值均在限度范围内, 结果见表 2。

2.4 质量分数

色谱条件参照“2.2.2”项方法。取 OXYTOCIN/DESMOPRESSIN VALIDATION MIXTURE CRS 1

表2 第3批缩宫素国家标准品氨基酸比值测定结果
Table 2 Results of amino acid ratio of 3rd batch of oxytocin national standard

氨基酸	氨基酸相对摩尔比值	氨基酸相对摩尔比值 标准规定
Asp	1.00	0.95~1.05
Glu	1.04	0.95~1.05
Gly	0.95	0.95~1.05
Tyr	1.03	0.70~1.05
Cys	2.10	1.40~2.10
Ile	1.02	0.90~1.10
Leu	1.03	0.90~1.10
Pro	0.96	0.95~1.05

支,加入1 mL流动相A复溶即为系统适用性溶液,在该色谱图(图4-A)中,缩宫素峰与去氨加压素峰之间有效分离。精密量取待标品溶液,用流动相A稀释1 000倍,作为灵敏度溶液,在灵敏度溶液色谱图(图4-B)中,缩宫素峰的信噪比不小于10。待标品采用面积归一化法计算(图4-C),单个最大杂质质量分数为0.21%,HPLC质量分数为99.69%。采用1.0%自身对照法计算(图4-D),单个最大杂质含量为0.20%,HPLC质量分数为99.69%。

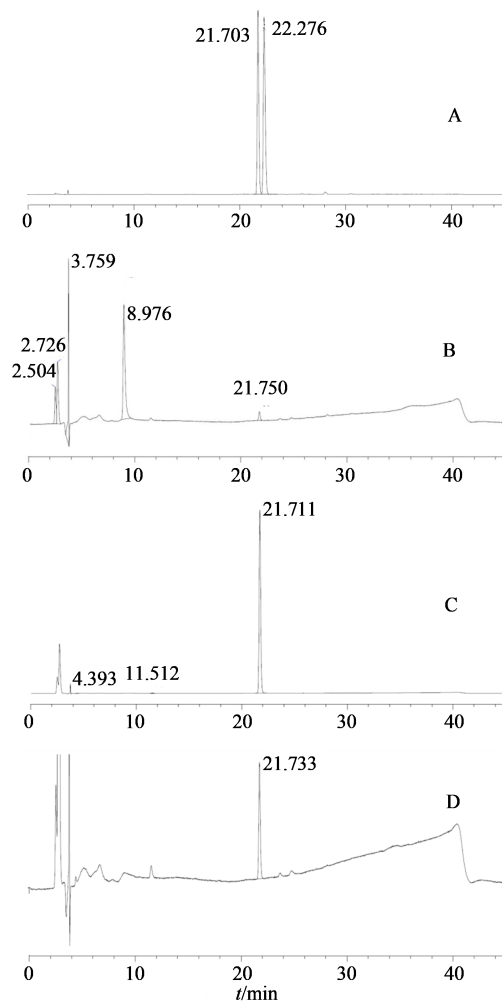


图4 系统适用性溶液(A)、灵敏度溶液(B)、第3批缩宫素国家标准品(C)、1.0%自身对照(D)HPLC典型色谱图
Fig. 4 HPLC chromatogram of system suitability (A), sensitivity solution (B), 3rd batch of oxytocin national standard (C), 1.0% self control (D)

2.5 HPLC含量测定

色谱条件参照“2.2.2”项。以缩宫素USP对照品作为标准,共邀请包括药检机构及缩宫素生产企业(具体企业见致谢)在内的4家实验室参与本批待标品HPLC含量的协作标定,以缩宫素USP对照品作为标准,测定待标品HPLC含量结果均值

为274 IU·支⁻¹,结果见表3。此外,中国食品药品检定研究院以缩宫素JP标准品作为标准,使用外标法测得待标品含量亦为274 IU·支⁻¹。

表3 第3批缩宫素国家标准品HPLC含量测定协作标定结果
Table 3 Collaborative calibration results of 3rd batch of oxytocin national standard by HPLC

机构	均值/(IU·支 ⁻¹)	SD	RSD/%
A	273	3.48	1.27
B	276	3.36	1.22
C	272	2.87	1.05
D	274	1.11	0.41
合并结果	274	—	—

2.6 生物效价测定

共3家实验室(具体见致谢)以缩宫素USP对照品作为标准品,对待标品的生物效价进行了标定。采用《中国药典》2020年版四部通则1210缩宫素生物测定法^[3]。缩宫素USP对照品和待标品的配制:将缩宫素USP对照品按照标识效价配制成高、低2种浓度的稀释液,剂距不得大于1:0.7。调节剂量使得低剂量能引起子宫收缩,高剂量不致使子宫收缩达到极限,且高、低剂量所致子宫的收缩应有明显差别。待标品按照预估值制成与标准品相同浓度的高、低2种浓度稀释液,剂距应与标准品相同,待标品和标准品高、低剂量所致的反应值应相近。子宫肌蓄养液的制备:实验当日,按照《中国药典》通则要求,称取氯化钠、氯化钾、氯化钙与葡萄糖加水溶解,另取碳酸氢钠适量,加水溶解后,缓缓倾注于前一溶液中,边加边搅拌,最后加水至终体积。测定法:取健康成年雌性大鼠,体质量160~240 g。实验当日通过阴道涂片选择动情前期的动物,亦可采用雌性激素处理动物使其进入动情前期。大鼠迅速处死后,取出子宫,仔细分离结缔组织,同时注意避免过度牵拉使子宫肌受损。取其中一段子宫下端固定于离体器官恒温水浴装置底部,上端与记录装置相连,记录子宫收缩。浴槽中加入子宫肌蓄养液,32~35℃保持恒温,连续通入适量空气,静置约15 min,按次序准确注入等体积的标准品或供试品2种浓度的稀释液,待子宫肌收缩至最高点开始松弛时,弃去蓄养液,并用蓄养液洗涤。相邻2次给药的时间间隔应相等。标准品稀释液和供试品稀释液各取高、低2个剂量为一组,按随机区组设计的次序轮流注入每组4个剂量,重复4~6组。测量各剂量所致子宫收缩的高度,按照《中国药典》2020年版四部通则1431生物检定统计法中的两反应平行线测定法计算效价及实验误差^[3]。可信限率(FL%)不得

大于10%。

每个实验室提供4次独立实验结果,测定结果经合并计算,待标品的生物效价为275 IU·支⁻¹。FL%为1.938 6%,可信限范围为269.47~280.12 IU·支⁻¹。结果见表4。

表4 第3批缩宫素国家标准品生物效价协作标定结果($n=4$)

Table 4 Collaborative calibration results of 3 rd batch of oxytocin national standard by bioassay ($n=4$)			
机构	均值/(IU·支 ⁻¹)	SD	RSD/%
A	279	4.80	1.72
B	278	4.57	1.64
C	268	10.30	3.84
合并结果	274.75	—	—

2.7 均匀性检验

按照罐装冻干盘的前、中、后顺序,自15个冻干盘中各取1支持标品,共计15支样品进行均匀性检验。均匀性检验采用HPLC法进行测定,测定结果采用单因素方差分析进行统计,统计结果表明本批待标品均匀性符合要求。

2.8 统计分析

缩宫素生物效价、可信限率及数据合并等使用BS2000软件计算。均匀性检验采用单因素方差分析进行统计,使用GraphPad统计软件计算。

3 讨论

第3批缩宫素国家标准品待标品原料来源为化学合成缩宫素,且质量分数大于99.5%,经HPLC法含量测定及大鼠子宫法生物效价测定,每支持标品效价分别为274 IU及275 IU。2种方法测定结果基本一致,即表明HPLC含量测定法与大鼠子宫法测定缩宫素效价具有等效性,这也与本实验室及其他实验室前期研究结果一致^[5,7-8]。该批待标品生物效价测定使用的2种方法均溯源于现行的缩宫素USP对照品,采用实验间协作标定的方式完成赋值,保证了该批标准品赋值的准确性。

本批待标品为第3批缩宫素国家标准品,其冻干配方与第2批缩宫素国家标准品(150529~200902)一致,该批标准品至今已使用13年,期间经多次稳定性核查生物效价均稳定,表明缩宫素在现有储存条件下生物效价可保持长期稳定。因此本批待标品未对稳定性进行重复考察,储存条件参考编号为150529现有的缩宫素标准品,为-20℃存储,这一存储条件也与USP、JP、WHO等缩宫素标准品一致。

本批待标品可作为第3批缩宫素国家标准品使用,规格为274 IU·支⁻¹,用于缩宫素生物检定及

HPLC效价测定及HPLC鉴别。这一标准品的建立扩大了我国缩宫素国家标准品的适用范围,为我国缩宫素效价HPLC测定法提供了必备的标准物质。

志谢:江苏省食品药品监督检验研究院、厦门鲎试剂生物科技股份有限公司、上海上药第一生化有限公司及上海禾丰制药有限公司

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 汝萍, 刘铭. 缩宫素在催引产中的规范化应用[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(9): 907-911.
Ru P, Liu M. Standardized application of oxytocin in induction and augmentation of labor [J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2021, 37(9): 907-911.
- [2] 沈小雅, 陈娟娟. 缩宫素的药理与用药规范[J]. 中华产科学急救电子杂志, 2018, 7(4): 253-256.
Shen X Y, Chen J J. Pharmacological and pharmaceutical specifications of oxytocin [J]. Chin J Obstet Emerg Electron Ed, 2018, 7(4): 253-256.
- [3] 中国药典[S]. 四部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020.
- [4] 张媛, 谭德讲, 常艳, 等. 缩宫素效价测定能力验证研究[J]. 中国药师, 2021, 24(4): 777-780.
Zhang Y, Tan D J, Chang Y, et al. Proficiency testing for the determination of oxytocin potency [J]. China Pharm, 2021, 24(4): 777-780.
- [5] 张媛, 李震, 谭德讲, 等. 化学合成缩宫素生物活性测定法的替代研究[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(5): 558-564.
Zhang Y, Li Z, Tan D J, et al. Alternative research on bioassays of synthetic oxytocin [J]. Chin J New Drugs, 2019, 28(5): 558-564.
- [6] 中国药典[S]. 二部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume II. 2020.
- [7] 黄青, 陆益红, 史清水, 等. 高效液相色谱法测定缩宫素注射剂含量及其与生物效价测定法比较和应用[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1115-1121.
Huang Q, Lu Y H, Shi Q S, et al. HPLC determination of oxytocin injection and comparison with biological titer measurement and its applications [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(6): 1115-1121.
- [8] 许雷鸣, 顾倩, 堵伟锋, 等. 大鼠离体子宫法与高效液相色谱法测定缩宫素效价的相关性分析[J]. 安徽医药, 2014, 18(1): 37-40.
Xu L M, Gu Q, Du W F, et al. Correlation between isolated rats uterus method and HPLC method for oxytocin assay [J]. Anhui Med Pharm J, 2014, 18(1): 37-40.

[责任编辑 兰新新]