濾泡刺激素濃縮液

Follitropin concentrated solution

α-次單元

APDVQDCPEC TLQENPFFSQ PGAPILQCMG CCFSRAYPTP 40
LRSKKTMLVQ KNVTSESTCC VAKSYNRVTV MGGFKVENHT 80
ACHCSTCYYH KS 92

β-次單元

NSCELTNITI AIEKEECRFC ISINTTWCAG YCYTRDLVYK 40*
DPARPKIQKT CTFKELVYET VRVPGCAHHA DSLYTYPVAT 80*
QCHCGKCDSD STDCTVRGLG PSYCSFGEMK E 111*

醣基化位點（glycosylation sites）：

Asn-52, Asn-78, Asn-7*, Asn-24*

雙硫鍵（disulfide bridges）：

7-31, 10-60, 28-82, 32-84, 59-87, 3*-51*, 17*-66*, 20*-104*, 28*-82*, 32*-84*, 87*-94*

分子量：約 30,000～40,000

本品係利用基因重組技術以哺乳類細胞作為宿主細胞而得之濾泡刺激素（follicle stimulating hormone, FSH）。本品係利用冷凍乾燥製備之異二聚體醣蛋白，具人類濾泡刺激素結構，由非 FSH 專一性之 92 個胺基酸α鏈與 FSH 專一性之 111 個胺基酸β鏈兩個次單元組成。本品於製造過程中之原液應適時取樣，並進行宿主細胞蛋白質與宿主細胞及載體 DNA 殘留分析，須符合規定。本品每 mL 濾泡刺激素之蛋白質含量應介於 0.4～0.8 mg，每 mg 蛋白質效價應介於 9,000～

17,000 IU。

性狀：本品為澄明或微混濁無色液體。

鑑別：

(1) 本品按效價測定項分析，其生物活性應符合效價規定。

(2) 本品按下述等電聚焦電泳分析法（通則 4044）測定之，所得電泳圖須與標準品溶液相符。

標準品溶液—以配製檢品溶液的去鹽程序將濾泡刺激素對照標準品去鹽與濃縮。以水稀釋標準品溶液使成濃度 5 mg/mL 之溶液。

檢品溶液—取本品適當確效程序進行去鹽與濃縮，以水稀釋檢品溶液使成濃度 5 mg/mL 之溶液。

pH 梯度—透過兩性電解質（ampholytes）與電極緩衝液（electrode buffers）之組合，於 3.5～5.5 的等電點值（pI）範圍內進行功能分離，應選用系統定義的適用標準範圍；如使用預鑄膠體，得結合專用的電極溶液；或使用適當稀釋無機或有機酸與鹼之 pH 值應分別低於與高於兩性電解質所使用之 pH 值。

陰極—20.0 g/L 甘胺酸溶液。

陽極—含有 3.4 g/L 天冬胺酸與 3.6 g/L 麩胺酸之溶液，調整 pH

值至 2.8～3.8。

系統適用性—在利用標準品溶液電泳圖中，等電點值 pI 3.5～5.5 區域中看到區帶數量與位置和濾泡刺激素對照標準品之電泳圖結果相符。

測定法—取標準品溶液與檢品溶液各 10 μL 至膠體，於電場作用下形成聚焦作用，觀察電泳圖結果，檢品溶液區帶之排列結果須與標準品溶液相符。

(3) 本品按含量測定項測定之，記錄濾泡刺激素寡聚體（follitropin oligomers）層析分離圖譜結果，所得圖譜之主波峰滯留時間須與對照標準品者相符。

(4) 本品按下述肽圖譜法（通則 4045）測定之，所得圖譜須與對照標準品者相符。

分離 α-與 β-次單元—液相層析法（通則 1010.5）。

移動相溶劑 A—取三氟乙酸 1 mL 加水稀釋至 1000 mL。

移動相溶劑 B—三氟乙酸：水：乙腈（0.9：50：950）混液。

標準品溶液—取濾泡刺激素對照標準品以移動相溶劑 A 稀釋至濃度約為 0.4 mg/mL。

檢品溶液—取本品以移動相溶劑 A 稀釋至濃度為 0.4 mg/mL。

層析系統—液相層析系統，具波長 226 nm 檢測器，4.6 mm × 1.2 cm

前置層析管，充填 5 μm 丁矽烷鍵結之多孔矽石或陶瓷微粒，4.6 mm × 25 cm 層析管，充填 5 μm 丁矽烷鍵結之孔徑 30 nm 多孔矽石或陶瓷微粒，移動相溶劑流速每分鐘 1.0 mL。

時間（分）	移動相溶劑 A（%）	移動相溶劑 B（%）
0～2	100	0
2～8	100 → 76	0 → 24
8～17	76	24
17～36	76 → 70	24 → 30
36～41	70 → 25	30 → 75
41～46	25	75
46～47	25 → 100	75 → 0
47～57	100	0

測定法—取標準品溶液與檢品溶液各 800 μL，分別注入層析系統層析之，β-次單元之滯留時間約 14 分鐘，α-次單元約 30 分鐘。收集含有 α-與 β-次單元並冷凍乾燥之。

純化次單元之還原與修飾

溶液 A—取三丁基膦（tributylphosphine）10 μL 以丙醇稀釋至 2 mL 並利用氮氣除氣。

溶液 B—取 4-乙烯基吡啶（4-vinylpyridine）20 μL 以丙醇稀釋至 200 μL 並利用氮氣除氣。

標準品溶液—取標準品溶液中所得 α-與 β-次單元以檢品溶液相同方式製備之。

檢品溶液—取前述步驟來自檢品溶液之 α-與 β-次單元部分各自溶於 pH 8.5 guanidine-tris(hydroxymethyl)aminomethane-EDTA 緩衝溶液 300 μL ，置 37˚水浴 60 分鐘，加入溶液 A 100 μL 混勻並以氮氣除氣，再置 37˚作用 90 分鐘，加入溶液 B 10 μL 混勻並利用氮氣除氣，置 37˚作用 45 分鐘，最後加入 10% v/v 三氟乙酸 100 μL 並混勻。

純化次單元之去鹽

移動相溶劑 A—取三氟乙酸 1 mL 加水稀釋至 1000 mL。

移動相溶劑 B—取三氟乙酸：水：乙腈（1：300：700）混液。

標準品溶液、檢品溶液 α-次單元及 β-次單元—取標準品溶液、檢品 α-次單元及 β-次單元溶液適量，以移動相溶劑 A 稀釋至 840 μL。

層析系統—液相層析系統，具波長 226 nm 檢測器，4.6 mm × 2 cm 層析管，充填 5 μm 丁矽烷鍵結之多孔矽石或陶瓷微粒，移動相溶劑流速每分鐘 1.0 mL。取標準品溶液按下列設定程序自動作線性轉變層析之，記錄其波峰值，α-次單元溶液（單乙烯基吡啶修飾 α-次單元）之相對滯留時間約 15 分鐘，β-次單元溶液（單乙烯基吡啶修飾 β-次

單元）約 16 分鐘。

時間（分）	移動相溶劑 A（%）	移動相溶劑 B（%）
0～7	100	0
7～27	100 → 0	0 → 100
27～27.01	0 → 100	100 → 0
27.01～32	100	0

測定法—取標準品溶液與檢品溶液各 800 μL，分別注入層析系統層析之，記錄其層析圖譜。層析圖譜顯示一單乙烯基吡啶修飾次單元（monovinylpyridine-modified subunit）之主波峰與數個二與寡乙烯基吡啶修飾的次單元（di- and oligovinylpyridine-modified subunits）次要波峰，僅含單乙烯基吡啶修飾的次單元部分用於進一步消化，收集含有單乙烯基吡啶修飾之 α-與 β-次單元部分並冷凍乾燥之。

選擇性切割肽鍵分析

溶液 C—取尿素 480 g 溶於水 600 mL，再加水稀釋至 1000 mL 使成濃度為 8M 之溶液，加入混合床樹脂 3～5 g 並攪拌約 1 小時，使用前以玻璃過濾器過濾。

溶液 D—取碳酸氫銨（ammonium hydrogen carbonate）15.8 g 與乙二胺四乙酸（sodium edetate）8.3 g 溶於水 800 mL。以 80 g/L 氫

氧化鈉溶液調整 pH 值至 7.8，並加水稀釋至 1000 mL。

標準品溶液—取標準品溶液 α-與 β-次單元並以利用檢品溶液相同的方式同時製備。

檢品溶液—取前述步驟來自檢品溶液之修飾 α-次單元與 β-次單元適量，溶於溶液 C 42.5 μL 並於室溫作用 30 分鐘，再加入溶液 D 42.5 μL 混勻，取此檢品溶液每 42.5 μL 加入 23 mU/μL 之內切蛋白酶 Lys-C(endoproteinase Lys-C)溶液 35 μL 並混勻，於 37°反應 4 小時，再加入內切蛋白酶 Lys-C 溶液 35 μL 混勻，於 37°靜置過夜，最後以移動相溶劑 A 稀釋至 420 μL。

層析分離—

移動相溶劑 A—取三氟乙酸 1 mL 加水稀釋至 1000 mL。

移動相溶劑 B—三氟乙酸：水：乙腈（1：300：700）混液。

層析系統—液相層析系統，具波長 210 nm 檢測器，4.6 mm × 2 cm 前置層析管，充填 5 μm 十八矽烷鍵結多孔矽石或陶瓷微粒，4.6 mm × 25 cm 層析管，充填 5 μm 十八矽烷鍵結之孔徑 30 nm 多孔矽石或陶瓷微粒，移動相溶劑流速每分鐘 1 mL。取標準品溶液按下列設定程序自動作線性轉變層析之。

時間（分）	移動相溶劑 A（%）	移動相溶劑 B（%）

0～7	100	0
7～77	100 → 30	0 → 70
77～82	30 → 0	70 → 100
82～87	0	100
87～92	0 → 100	100 → 0
92～107	100	0

系統適用性—α-次單元：標準品溶液之層析圖譜應與濾泡刺激素對照標準品α-次單元消化物(follitropin α-subunit digest)結果類似。標準品溶液與檢品溶液之層析圖譜應具有 L4、L6、L3、L5 及 L1-2/L1 波峰片段。標準品溶液與檢品溶液 L4、L6 及 L3 片段滯留時間差異不得超過 5%，L5 片段差異不得超過 3%，L1-2/L1 波峰片段差異不得超過 2%。β-次單元：標準品溶液之層析圖譜應與濾泡刺激素對照標準品 β-次單元消化物（follitropin β-subunit digest）結果類似。標準品溶液與檢品溶液之層析圖譜應具有 L5、L7、L6 及 L1-4 波峰片段。標準品溶液與檢品溶液 L5 片段滯留時間差異不得超過 5%，L7 與 L6 片段差異不得超過 2%，L1-4 片段差異不得超過 1%。

測定法—取標準品溶液與檢品溶液各 400 μL，分別注入層析系統層析之，記錄其層析圖譜，檢品溶液之層析圖譜應與對照標準品

溶液之層析圖譜相符。

(5) 聚醣分析—取本品按下述方法擇一或醣蛋白與聚醣分析法（通則 6035）測定之， Z 值應符合規定。

方法一

蛋白質變性（Protein denaturation）

標準品溶液—取濾泡刺激素對照標準品 500 μg 並冷凍乾燥，回溶於 pH 7.5 之 0.05 M 磷酸鹽緩衝溶液 60 μL，以配製檢品溶液之相同方法同時製備之。

檢品溶液—取檢品 500 μg 溶於 pH 7.5 之 0.05 M 磷酸鹽緩衝溶液 60 μL，加入 10 mg/mL 十二烷基硫酸鈉溶液 6 μL 與 1% 2-巯基乙醇（2-mercaptoethanol）溶液 35 μL，置旋渦混合器混和，離心後在 37° 環境下反應 15 分鐘。

選擇性釋放聚醣—本品按液相層析法（通則 1010.5）分析異構物，所得圖譜須與對照標準品者相符。

移動相溶劑 A—乙腈。

移動相溶劑 B—配製 pH 4.5 之 0.5 M 乙酸銨緩衝溶液，經孔徑 0.22 μm 膜過濾器過濾。

移動相溶劑 C—無微粒水（particle-free water）。

標準品溶液—以製備檢品溶液之相同方法同時製備之。

檢品溶液—取前述蛋白質變性之檢品溶液溶於辛基苯基-聚乙二醇（octylphenyl-polyethylene glycol）溶液 0.75 μL，以旋渦混合器混和。再加入肽 *N*-糖苷酶 F（peptide *N*-glycosidase F）25 mU，以旋渦混合器混和並離心，於 37˚反應 24 小時。取無水乙醇溶液 600 μL 於-20˚預冷 45 分鐘，再加入檢品溶液以旋渦混合器混和並離心之，以-20˚沉澱蛋白質 15 分鐘後，經 4˚ 10,600 g 離心約 5 分鐘。取上清液至新試管，並使乙醇蒸發 15 分鐘。加入無微粒水 1 mL 並繼續蒸發液體至體積約 500～800 μL，接著冷凍乾燥。以 2-胺基苯甲醯胺標記檢品自由聚醣。此程序應採用最佳化與驗證過的不同試劑組合以達到高效率標記聚醣，並由反應中萃取與回收標記的聚醣。取無微粒水 1.5 mL 回溶檢品。

層析系統—液相層析系統，具激發波長 330 nm 與發射光波長 420 nm 螢光檢測器，7.5 mm × 7.5 cm 層析管，充填 10 μm 弱陰離子交換樹脂多孔矽石或陶瓷微粒。層析管溫度維持 30˚，移動相溶劑流速每分鐘 0.4 mL。取標準品溶液按下列設定程序自動作線性轉變層析之，記錄其波峰值。

時間（分）	移動相溶劑 A（%）	移動相溶劑 B（%）	移動相溶劑 C（%）
0～5	20	0	80

5～21	20	0 → 4	80 → 76
21～61	20	4 → 25	76 → 55
61～62	20	25 → 50	55 → 30
62～71	20	50	30
71～72	20	50 → 0	30 → 80
72～117	20	0	80

系統適用性—標準品溶液層析結果與濾泡刺激素對照標準品者結果類似。鑑定中性、單-、二-、三-及四-唾液酸化形式，記錄每個波峰面積並以百分比表示，依下式計算 Z 值：

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

A_0：中性形式之波峰面積百分比。

A_1：單唾液酸化形式（mono-sialylated form）之波峰面積百分比。

A_2：二唾液酸化形式（di-sialylated form）之波峰面積百分比。

A_3：三唾液酸化形式（tri-sialylated form）之波峰面積百分比。

A_4：四唾液酸化形式（tetra-sialylated form）之波峰面積百分比。

標準品溶液 Z 值應介於 177～233。

測定法—取檢品溶液與標準品溶液 50 μL，分別注入層析系統層析之，記錄其層析圖譜，檢品溶液之層析圖譜應與對照標準品之層析圖譜相符，且 Z 值應介於 177～233。

方法二

蛋白質變性（Protein denaturation）

標準品溶液 A—取濾泡刺激素對照標準品 1 mg 加入溶液 A 0.2 mL，置 37 ± 1˚水浴 2 小時。以製備檢品溶液之相同方法製備之，確認標準品溶液之蛋白質含量。

標準品溶液 B—將濾泡刺激素對照標準品改為胎球蛋白，以製備檢品溶液之相同方法製備之，確認標準品溶液之蛋白質含量。

溶液 A—取 2-[*N*-嗎啉代]乙磺酸（2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid） 1.952 g 與鹽酸胍（guanidine hydrochloride） 57.32 g，溶於 15.4 g/L 二硫蘇糖醇（dithiothreitol）溶液 1 mL、18.61 g/L 乙二胺四乙酸鈉（sodium edetate）溶液 10 mL 及水 20 mL，於 37˚水浴 1 分鐘。以 80 g/L 氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 8.1，並以水稀釋至 100.0 mL，混勻。

溶液 B—取碘乙醯胺（iodoacetamide） 37 mg 溶於水 1 mL，混和均勻，避光。

溶液 C—取磷酸氫二鈉二水合物（disodium hydrogen phosphate dehydrate）26.7 g 與乙二胺四乙酸鈉 11.2 g 加入水 3 L 混合均勻。以 40 g/L 氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 7.5。

檢品溶液—取檢品 1 mg 加入溶液 A 0.2 mL 並於 37 ± 1˚水浴槽作用 2 小時。加入新鮮配的溶液 B 20 μL 混勻，置於 37 ± 1˚避光 2

小時，再加入 2-巯基乙醇（2-mercaptoethanol）10 μL 並混勻。以溶液 C 1 L 透析此檢品溶液，再加入溶液 C 200 μL 混勻，檢測此溶液之蛋白質含量。

選擇性釋放聚醣—本品按液相層析法（通則 1010.5）分析異構物，所得圖譜應與對照標準品者相符。

移動相溶劑 A—取 20 g/L 氫氧化鈉溶液於氦氣中保存。

移動相溶劑 B—水於氦氣中保存。

移動相溶劑 C—取無水乙酸鈉 41 g 加入水 800 mL，以水稀釋至 1 L，混合均勻，再以孔徑 0.45 μm 濾膜過濾，於氦氣中保存。

標準品溶液 A—以製備檢品溶液之相同方法製備之，唯使用蛋白質變性之濾泡刺激素標準品溶液 A。

標準品溶液 B—以製備檢品溶液之相同方法製備之，唯使用蛋白質變性之胎球蛋白標準品溶液 B。

檢品溶液—取檢品適量，以溶液 C 稀釋成濃度為 1.1 g/L 之溶液。依檢品溶液每 500 μg 加入肽 *N*-醣苷酶 F 溶液 1 U，混合並於 37 ± 1°作用 24 小時。將溶液置冰上，以 3 倍體積冰冷無水乙醇將檢品溶液蛋白質與鹽類沉澱，置冰上 10 分鐘。經 16,000 g 離心約 5 分鐘，將上清液取至新試管，加入 1 μg/μL 麥芽三糖溶液 3 μL，接著冷凍乾燥。將檢品溶液溶於水 100 μL 進行層析。

層析系統—液相層析系統，脈衝安培檢測器或具有金指示電極（gold indicator electrode），銀-氯化銀參比電極（silver-silver chloride reference electrode）與作為電池體的不銹鋼輔助電極的等效物，分別保持+ 0.05V 檢測電位、+0.75V 氧化電位及-0.80V 還原電位，脈衝持續時間根據使用的儀器而定，4.0 mm × 5 cm 前置層析管，充填強鹼性陰離子交換樹脂多孔矽石或陶瓷微粒，4.0 mm × 25 cm 層析管，充填強鹼性陰離子交換樹脂多孔矽石或陶瓷微粒。層析管溫度維持 30°，移動相溶劑流速每分鐘 1.0 mL。取標準品溶液按下列設定程序自動作線性轉變層析之，記錄其波峰值。

時間（分）	移動相溶劑 A（%）	移動相溶劑 B（%）	移動相溶劑 C（%）
0～0.2	20	80	0
0.2～94.0	20	80 → 34	0 → 46
94.0～97.0	20	34	46
97.0～97.1	20	34 → 80	46 → 0
97.1～115.0	20	80	0

系統適用性—標準品溶液層析結果與濾泡刺激素對照標準品結果類似。鑑定中性、單-、二-、三-、四-唾液酸化形式，記錄每個波峰面積並以百分比表示其數量，並按以下公式計算 Z 值：

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

A_0：中性形式之波峰面積百分比。

A_1：單-唾液酸化形式之波峰面積百分比。

A_2：二-唾液酸化形式之波峰面積百分比。

A_3：三-唾液酸化形式之波峰面積百分比。

A_4：四-唾液酸化形式之波峰面積百分比。

標準品溶液 B 之 Z 值應介於 290～325 之間。

測定法—取檢品溶液與標準品溶液 45 μL，分別注入層析系統層析之，記錄其層析圖譜，檢品溶液之層析圖譜應與對照標準品之層析圖譜相符，且 Z 值應介於 178～274。

雜質、不純物限量、一般檢查及其他規定：

(1) 寡聚體含量—本品按分子篩層析法（size-exclusion chromatography）測定之，檢品溶液之層析圖譜應與對照標準品之層析圖譜相符。

溶液 A—取磷酸二氫鈉 118 mg、磷酸氫二鈉二水合物 1.65 g 及蔗糖 30.0 g 加入水 40 mL 混和均勻，並以水定容至 100.0 mL。

溶液 B—取牛血清白蛋白 2.0 mg 溶於溶液 A 30 mL。

標準品溶液—取濾泡刺激素對照標準品適量，以溶液 A 稀釋至濃度 0.5 mg/mL，再取此溶液與溶液 B（1：1）混勻，使成濃度為 0.25

mg/mL 之溶液。

檢品溶液—取本品適量，以溶液 A 稀釋，使成濃度為 0.25 mg/mL 之溶液。

移動相溶劑—取無水硫酸鈉 28.4 g 溶於 pH 6.7 之 0.1 M 磷酸鹽緩衝液 2 L，再以孔徑 0.45 μm 濾膜過濾之。

層析系統—液相層析系統，具波長 215 nm 檢測器，7.8 mm × 30 cm 層析管，充填適用分離分子量範圍 1,000～300,000 的球形蛋白質之直徑 5 μm 親水矽膠多孔矽石或陶瓷微粒。移動相溶劑流速每分鐘 0.5 mL，記錄其波峰值。

系統適用性—在標準品溶液之層析圖譜中，濾泡刺激素對照標準品滯留時間介於 14～16 分鐘，牛血清白蛋白與濾泡刺激素對照標準品波峰值之間最小值解析度應為 1.2，空白對照組注射之 5～16 分鐘之間應未檢測到波峰值。滯留時間總波峰值之總和小於主波峰值之和，其相對標準差不得大於 0.5%。

測定法—取標準品溶液與檢品溶液 100 μL，分別注入層析系統層析之，記錄其層析圖譜，檢品溶液之層析圖譜應與對照標準品之層析圖譜相符。

(2) 游離次單元—本品在未還原的情況下按下述硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠體電泳法（通則 4046）或其他適當方法測定之，所得圖譜

區帶之位置與強度須與對照標準品者相符，各組別之游離次單元不得高於 3%。。

硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠體—厚度 1.5 mm，12%丙烯醯胺分離膠體。

檢品緩衝溶液—濃縮硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠體電泳之溶液。

標準品溶液 A—取濾泡刺激素對照標準品，以經適當確效程序濃縮使成濃度為 2 μg/μL。將此溶液與檢品緩衝溶液（1：1）混勻，然後取此溶液 40 μL 加入檢品緩衝溶液 180 μL 與水 180 μL，置室溫 4 小時，之後煮沸 5 分鐘。

標準品溶液 B—使用適當可校正硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠體電泳分子量在 14.4～94 kDa 的分子量標記物溶液。

檢品溶液—本品以水稀釋，使成濃度為 2 μg/μL 之溶液。將此溶液與檢品緩衝溶液（1：1）混勻，置於室溫 4 小時。

膠體電泳法—依下表順序於電泳裝置的每一凹槽分別注入標準品溶液 A、標準品溶液 B 及檢品溶液。利用考馬氏染色偵測膠體。電泳圖譜中，標準品溶液 B 應符合確效標準，檢品溶液+標準品溶液 A 之組別對應於濾泡刺激素異二聚體與次單元的區帶應清楚分開；標準品溶液 A 之組別無對應於濾泡刺激素異二聚體的區帶。

電泳孔	溶液	體積

		（μL）
1	標準品溶液 A	40
2	標準品溶液 A	30
3	標準品溶液 A	20
4	標準品溶液 A	15
5	標準品溶液 A	10
6	標準品溶液 A	5
7	檢品溶液	50
8	檢品溶液+標準品溶液 A	50 + 25
9	標準品溶液 B	10

(3) 氧化濾泡刺激素（Oxidised follitropin）—取本品依下述液相層析法（通則 1010.5）測定之，總氧化態不得高於 6%。

移動相溶劑 A—pH 2.5 之 0.2 M 磷酸鹽緩衝液。

移動相溶劑 B—水：乙腈（40：60）混液。

移動相溶劑 C—水。

溶液 A—取 2,4-二氯苯甲酸 3.3 mg 溶於乙醇(96%)10.0 mL 中。

標準品溶液 A—取濾泡刺激素對照標準品以水稀釋至濃度 300 μg/mL。

標準品溶液 B—配製強過氧化氫溶液 0.1 mL 以水稀釋至 30 mL。取濾泡刺激素對照標準品適量，以上述溶液稀釋至濃度 300 μg/mL，作用 30～45 分鐘。取溶液 A 加入此溶液至 2,4-二氯苯甲酸溶液之濃度為 17 μg/mL 並立即使用。

檢品溶液—取本品以水稀釋至濃度 300 μg/mL。

層析系統—液相層析系統，具波長 210 nm 檢測器，4.6 mm × 25 cm 層析管，充填 5 μm 丁矽烷鍵結之多孔矽石或陶瓷微粒。移動相溶劑流速每分鐘 1.0 mL。取標準品溶液按下列設定程序自動作線性轉變層析之，記錄其波峰值。

時間（分）	移動相溶劑 A（%）	移動相溶劑 B（%）	移動相溶劑 C（%）
0～8.4	50	25 → 39	25 → 11
8.4～8.5	50	39 → 45	11 → 5
8.5～15	50	45	5
15～15.1	50	45 → 25	5 → 25
15.1～25	50	25	25

系統適用性—在標準品溶液 B 的層析圖譜中，氧化的濾泡刺激素對照標準品 α-與 β-次單元產生的波峰值與未氧化的濾泡刺激素對照標準品 2,4-二氯苯甲酸產生的波峰值不同，且層析圖與濾泡刺激素對照標準品層析圖相符，總氧化態不得高於 6%。

測定法—取標準品溶液與檢品溶液適量（約 25 μL），分別注入層析系統層析之，記錄其層析圖譜，檢品溶液之層析圖譜應與濾泡刺激素對照標準品之層析圖譜相符。依照下列公式計算濾泡刺激素次單元氧化之百分比：

$$(A_2 + A_4) \times 100 / (A_1 + A_2 + A_3 + A_4)$$

A1：濾泡刺激素 α 次單元之波峰面積。

A2：氧化濾泡刺激素 α 次單元之波峰面積。

A3：濾泡刺激素 β 次單元之波峰面積。

A4：氧化濾泡刺激素 β 次單元之波峰面積。

(4) 細菌內毒素—取本品依細菌內毒素檢驗法（通則 7008）測定之，如做為製造注射劑用途而無進一步適當移除細菌內毒素的程序時，則每 1 IU 濾泡刺激素之細菌內毒素含量應小於 0.1 IU。

含量測定：取本品按液相層析法（通則 1010.5）測定蛋白質含量。

移動相溶劑—取磷酸 6.74 mL 與無水硫酸鈉 14.2 g 加入水 900 mL，再以 0.5 g/mL 氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 6.7，用水稀釋至 1.0 L，再以孔徑 0.45 μm 濾膜過濾之。

溶液 A—取泊洛沙姆 188（poloxamer 188）100 mg 加入水 900 mL，並以水稀釋至 1.0 L。

標準品溶液—取濾泡刺激素對照標準品以溶液 A 稀釋，使成濃

度為 0.03 mg/mL 之溶液。

檢品溶液—取本品以溶液 A 稀釋，使成濃度為 0.03 mg/mL 之溶液。

層析系統—液相層析系統，具波長 214 nm 檢測器，7.8 mm × 30 cm 層析管，充填適用分離分子量範圍為 1,000～300,000 的球形蛋白質之直徑 5 μm 親水矽膠多孔矽石或陶瓷微粒。移動相溶劑流速每分鐘 1 mL，記錄其波峰值。

系統適用性—標準品溶液之理論板數不得少於 1300，計算適用於因濾泡刺激素引起的波峰值。計算濾泡刺激素的含量，須考量到濾泡刺激素的分配內容。

效價測定：取本品按下述方法或其他適當方法測定之，其效價應為標誌量之 80～125%，且其 95%信賴區間之下限不得低於 64%，上限不得高於 156%。

(1) 標準品溶液與檢品溶液—選擇標準品溶液與檢品溶液各 3 種劑量，其最小劑量在一些大鼠呈陽性反應，且最大劑量不會在所有大鼠中產生最大反應。使用幾何級數之劑量，初始以總劑量約 1.5、3.0 及 6.0 IU 測試，因劑量取決於所用大鼠的敏感性，其差異可能很大。分別稀釋與溶解所有標準品溶液與檢品溶液於 pH 7.2 磷酸鹽-白蛋白緩衝鹽中，使每日施打劑量約為 0.5 mL。每日劑量之緩衝溶液應不得低於 14 IU

之絨毛膜促性腺激素（chorionic gonadotrophin），以確保完全黃體化，並加入適當的抗菌保藏劑，例如 4 g/L 苯酚或 0.02 g/L 硫柳汞，儲存溶液於 5 ± 3°。

(2) 試驗法—濾泡刺激素的卵泡刺激活性估計方法為在特定條件下，可促進施打絨毛膜性腺激素的未成熟大鼠卵巢增大，並與國際標準製備人類重組濾泡刺激素或國際單位校準的基準製劑達到相同效果。FSH 的國際單位定義為在一定量的國際標準重組人類濾泡刺激素所產生的活性。國際標準的國際單位等同性由世界衛生組織規定。使用相同未成熟雌大鼠，19～28 日齡，其差異不超過三日齡，且最重與最輕體重不超過 10 g。將大鼠平均且隨機分配至 6 組，1 組至少 5 隻。如果有鼠群具備 6 個同窩可用，則分配同窩鼠到各個組別並根據其窩進行紀錄。依據各組以皮下注射方式向大鼠施打每日劑量。於第一次注射 24、48 小時後重複施打各劑量。在最後一次注射約 24 小時後，將大鼠安樂死並摘除卵巢。清除卵巢內的任何外來液體和組織並立即稱量每隻大鼠的 2 個卵巢。按生物測定法分析（通則 4041）計算結果，2 個卵巢合併重量為結果。（測定之精密度可通過以大鼠的重量適當修正器官重量來改善；可使用共變數分析。)

包裝與儲存：本品應置於緊密容器內貯之，貯藏溫度不宜超過-20°。

用途分類：促使濾泡發育成熟。

草案