

# 肝素钠的质量控制

中检院生化药品室

范慧红

中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control



# 主要内容

- 背景介绍
- 质控分析进展
- 质量标准现状
- 国产肝素钠原料及注射液质量分析
- 建议与思考

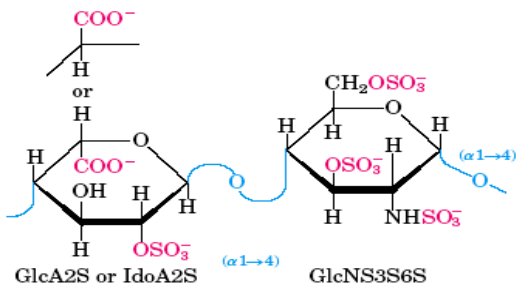
# 背景

常用抗凝剂, ChP1963版开始收载

国家基本药物

肝素钠

2008年“肝素钠事件”



猪肠粘膜提取

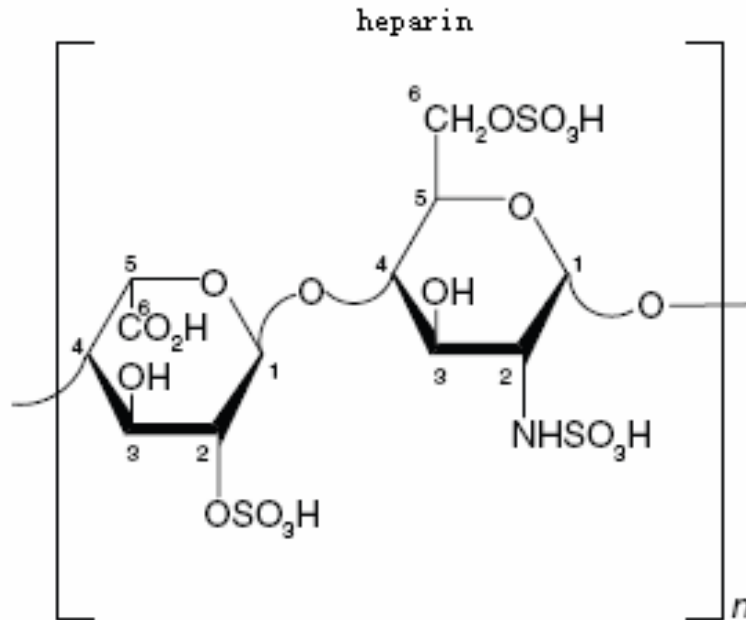
2ml:1000IU

2ml:5000IU

2ml:12500IU

# 肝素钠的结构

- 肝素钠二糖重复单位：10-30
- 葡萄糖醛酸/艾杜糖醛酸 + 氨基葡萄糖



# 质量控制分析进展

- 含量测定
- 荧光酶标仪测定肝素钠及其他硫酸化多糖含量
- 杂质测定
- H1 NMR
- ATR-IR spectroscopy
- Roman spectroscopy
- Prothrombin time

# 荧光酶标仪测定肝素钠及其他硫酸化多糖含量

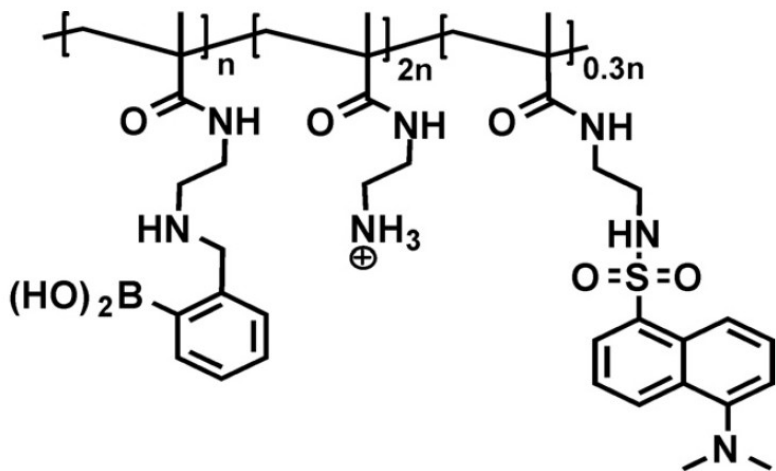


Fig. 1. Schematic structure of polymer fluorescent (dansyl), tailored for heparin complexation by electrostatic (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) and covalent interactions (boronic acid).

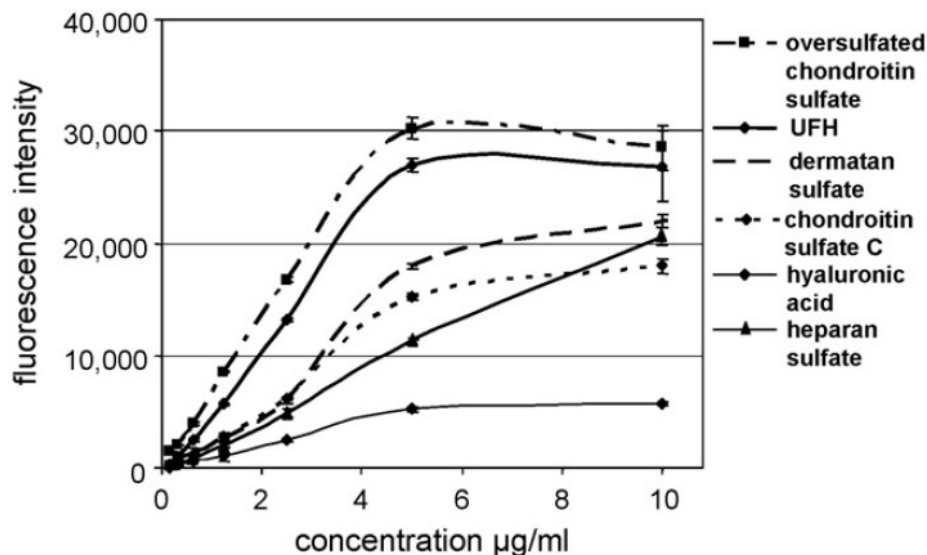


Fig. 3. Influence of glycosaminoglycans on the Polymer-H fluorescence intensity.

- 优点：快速、简便、可测定所有肝素（包括不含抗凝血酶结合五糖的肝素）
- 缺点：对不同的硫酸化多糖无特异性
- J Pharm Biomed Anal. 2010 May 1;52(1):1-8. Epub 2009 Dec 23.

# H1 NMR 定量测定DS和OSCS

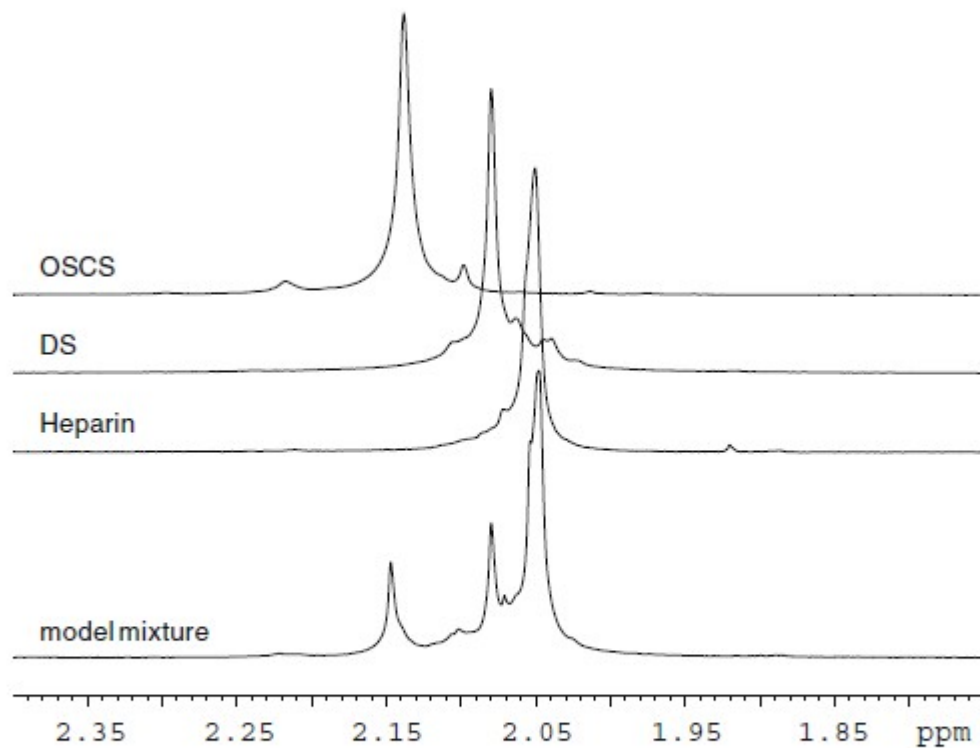


Fig. 1  $^1\text{H}$  NMR spectra of the N-acetyl regions of heparin spiked with OSCS and DS (model mixture) as well as of the three single components

- 检出限:
- OSCS 0.1%
- DS 0.5%
- 1 Bioanal Chem. (2011) Jan;399(2):605-620

# Raman spectroscopy

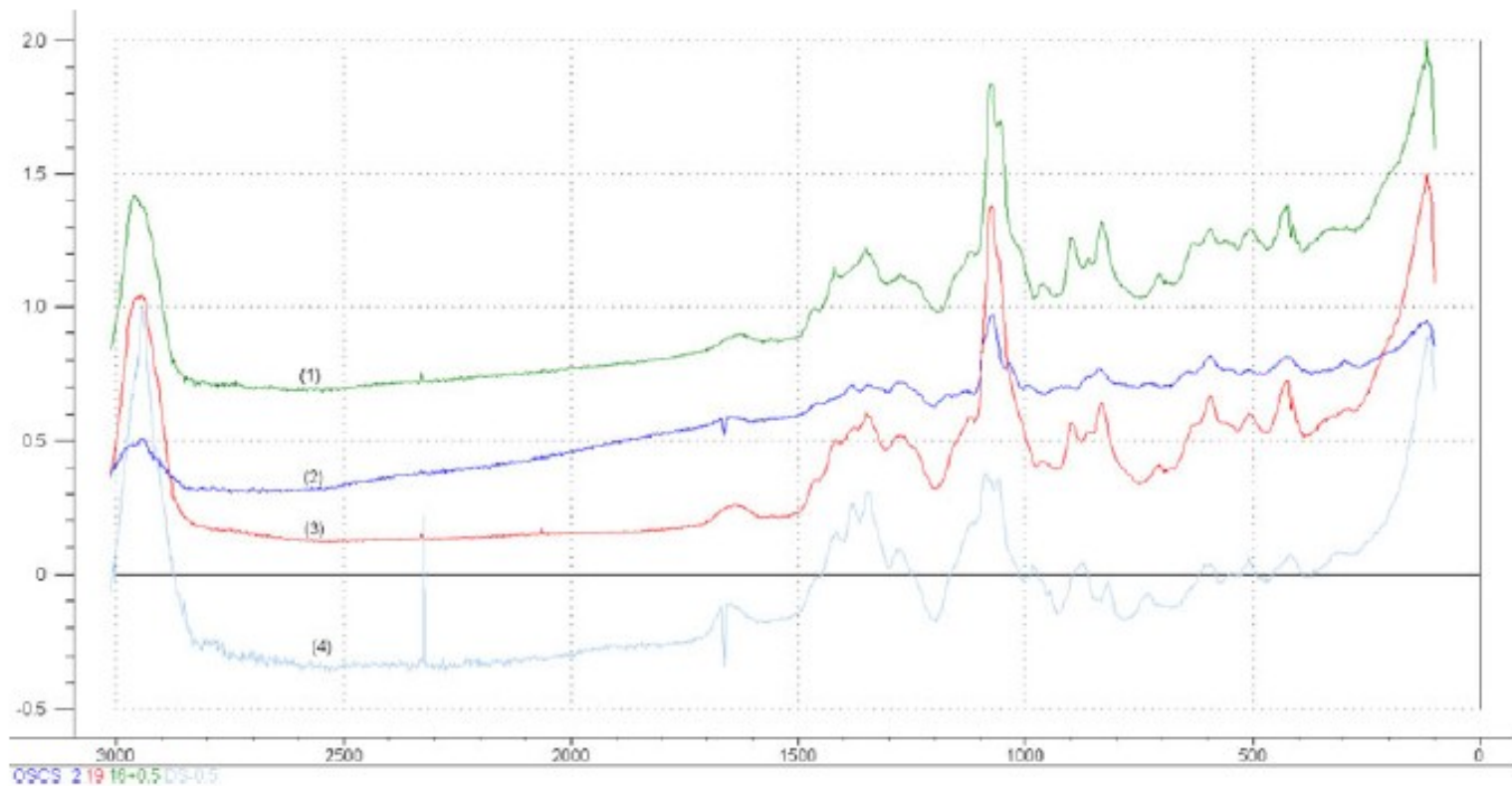


Fig. 4 Raman spectra of (1) a non-contaminated heparin sodium sample no. 16, (2) OSCS, (3) OSCS-contaminated heparin sodium sample no. 19, and (4) Dermatan sulfate

- 1 Bioanal Chem. (2011) Jan;399(2):605–620

# 质量标准现状

- 中国药典2010年版
- USP34
- EP 7.0

# 质量标准现状

标准项目	中国药典（2010年版）	欧洲药典（EP7.0）	美国药典（USP34）
含量限度	按干燥品计算，每1mg的效价不得少于170单位	按干燥品计算，每1mg效价不得少于150IU。（非口服制剂），每1mg效价不得少于120I.U。（口服制剂）	按干燥品计算，每1mg中效价不得少于180USP 肝素单位
性状	白色至类白色的粉末，极具引湿性	白色或几乎白色的粉末，有适度的引湿性	
溶解度	在水中易溶	在水中易溶	
比旋度	应不小于+50°（40mg/ml, 水）		
鉴别	1、色谱法 2、显钠盐的鉴别反应	A、具有抗凝血作用 B、比旋度为不小于+35°（40mg/ml, 水） C、电泳法：取本品与肝素标准品，分别加水制成2.5mg/ml的溶液 试验，供试品和标准品所显斑点的迁移距离之比应为0.9~1.1 D. 炽灼残渣项下处理的样品显钠盐的鉴别反应	A、H-NMR B、IC法鉴别DS和OSCS，不得有OSCS C、抗Xa/抗IIa：0.9~1.1 D、显钠盐鉴别反应

# 质量标准现状

标准项目	中国药典（2010年版）	欧洲药典（EP7.0）	美国药典（USP34）
酸碱度	5.0~7.5（0.10g到10ml水）	5.5~8.0（0.10g到10ml水）	5.0~7.5（0.10g到10ml水）
溶液的澄清度与颜色	本品0.50g加水10ml溶解后，溶液应澄清无色；如显浑浊，在640nm的波长处吸收度不得大于0.018；如显色，与黄色1号标准比色液比较，不得更深	50000I. U. /10ml的溶液澄清，颜色不得深与5号对照液	
半乳糖胺			水解液中半乳糖胺含量不得过总己糖胺1%
吸光度(蛋白质和核酸杂质)	4mg/ml的水溶液，在260nm的波长处其吸收度不得大于0.10；在280nm的波长处其吸收度不得大于0.10	4mg/ml的水溶液，在260nm的波长处其吸收度不得大于0.20；在280nm的波长处其吸收度不得大于0.15	1ml 溶液（1→100）中加5滴氯酸（1→5）溶液，无沉淀或混浊产生

# 质量标准现状

标准项目	中国药典（2010年版）	欧洲药典（EP7.0）	美国药典（USP34）
多硫酸软骨素			A、鉴别A中2.12~3.00ppm不得有OSCS峰 B、鉴别B中不得有OSCS峰
有关物质	离子色谱法测定，硫酸皮肤素含量不得过5.0%。肝素钠主峰后其他杂质不得大于3.0%		
蛋白杂质			Lowry法测定，不得过1.0%
残留溶剂	气相色谱法，本品含甲醇不得过0.05%，乙醇不得过0.5%，丙酮不得过0.5%		应符合规定
干燥失重	不得过5.0%	不得过8.0%	
炽灼残渣	28.0%~41.0	30%~43%	28.0%~41.0
重金属	不得过百万分之三十	≤30ppm	≤30ppm
细菌内毒素	每1单位肝素小于0.010EU		每单位肝素钠不超过0.03单位
钠	9.5~12.5%	9.5~12.5%	
总氮量	按附录，1.3%~2.5%	不得过2.5%	1.3~2.5%



# 国产肝素产品质量状况分析

- 肝素钠注射液生产厂家23个，批准文号45个。
- **2009年**
  - 抽样涉及7个生产厂家、7个批准文号，206批次样品，生产企业抽样覆盖率为30.4%。
  - 抽样地点基本覆盖全国，涉及除港、澳、台地区的31个省
- **2010年**
  - 7个生产厂家的7个批准文号，168批次样品
  - 生产企业抽样覆盖率为30.4%。
  - 抽样地点基本覆盖了全国，涉及除西藏港澳台地区的30个省。

# 法定检验结果

	抽样批次	不合格批次	不合格率	不合格项目
2009年	206	14	6.80%	可见异物
2010年	168	3	1.80%	可见异物

检验依据：中国药典2005年版



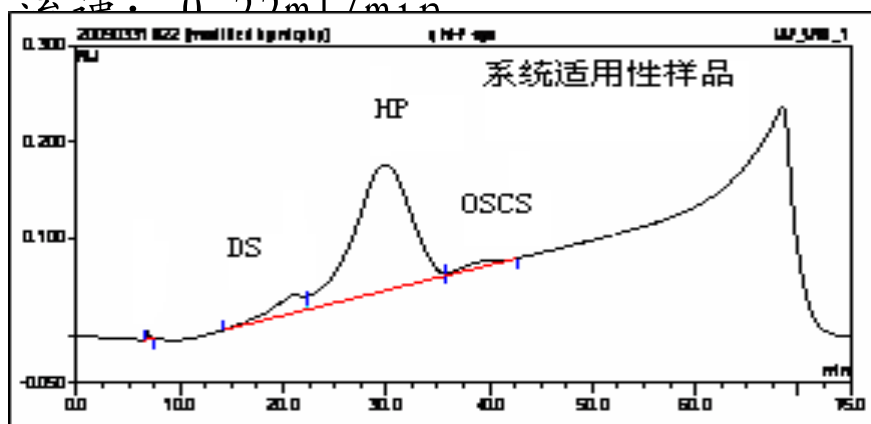
# 2009年探索性方法研究

- 1、离子色谱法检查有关杂质
- 2、毛细管电泳法检查有关杂质
- 3、体积排阻色谱法检查分子量分布及纯度
- 4、反相色谱法检查防腐剂苯酚含量及纯度
- 5、微量生色底物法测定抗FXa和抗FIIa活性
- 6、旋光度测定检查样品纯度
- 7、渗透压测定考察处方及工艺稳定性

# 探索方法1-高效阴离子交换色谱法

- 实验方法: Chp2010标准草案肝素钠注射液有关物质检查
- 实验目的: 检查肝素中硫酸皮肤素、多硫酸软骨素
- 色谱条件: ICS3000离子色谱仪, AS11阴离子交换色谱柱  
系统适用性溶液: 每ml溶液中含20mg肝素, 0.02mgDS, 0.02mgOSCS  
流动相A: 0.04%磷酸二氢钠溶液 (pH3.0)  
流动相B: 14%高氯酸钠-0.04%磷酸盐溶液 (pH3.0)  
紫外检测波长: 202nm

流速: 0.22ml/min



National Institutes for Food and Drug Control



# 探索方法2-毛细管电泳法

- 实验方法：2008年4月，国家药监局颁布“毛细管电泳分析肝素钠杂质的补充检验方法”；

Journal of chromatography 1216(2009):4107-4112,

“Determination of oversulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate impurities in heparin by capillary electrophoresis”

- 实验目的：检查肝素中硫酸皮肤素、多硫酸软骨素
- 色谱条件：

Bekmann P/ACE 5000毛细管电泳仪

熔融石英毛细管（75  $\mu\text{m}$   $\times$  57cm，有效长度50cm）

400mM Tris-磷酸盐缓冲液（pH3.0）为电极液

检测波长200nm，毛细管温度25 $^{\circ}\text{C}$

分离电压为25KV，进样端为负极

压力进样，0.5psi，进样时间4秒

# 有关物质检查结果

- 标准规定：CHP2010，硫酸软骨素不得过5.0%（外标法）  
多硫酸软骨素不得过3.0%（面积归一化法）。
- 检查结果：206批次样品中，有3批样品有关物质不合格。

# 探索方法3-UV/RI高效体积排阻色谱法

- 实验目的：分子量与分子量分布、纯度检查

- 色谱条件：

Sepax SRT SFC-300 (7.8 × 300mm, 5 $\mu$ m, 300 $\text{\AA}$ ) 凝胶柱

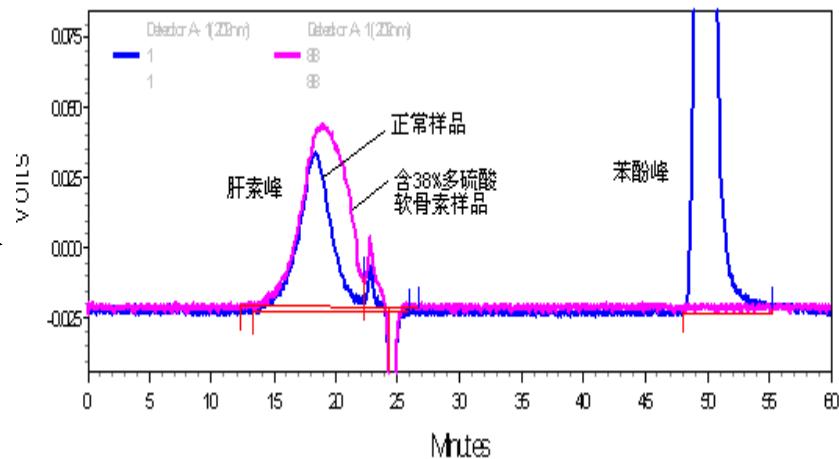
紫外与示差折光检测器联用，检测波长：202nm, 234nm

流动相：2.84%硫酸钠溶液 (pH5.0)

流速：0.5ml/min;

柱温：35 $^{\circ}$ C

- 发现问题：混入具有强紫外吸收的杂质的峰面积明显增加。

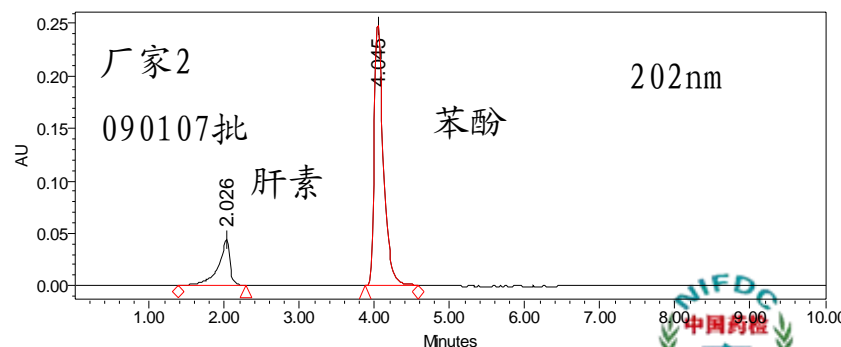
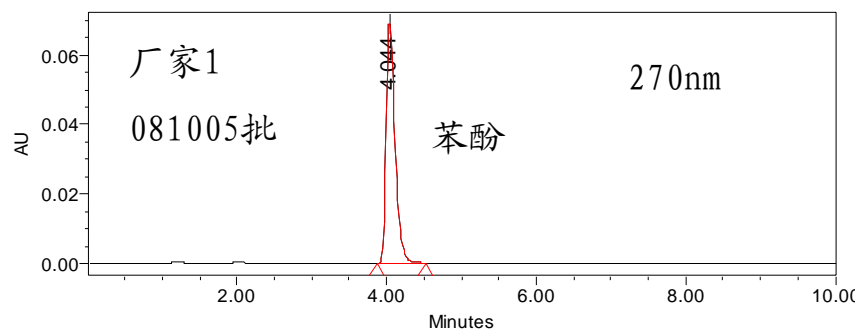


# 探索方法4-反相高效液相色谱法

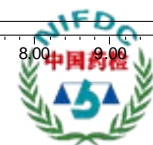
- 实验方法：中国药业2006年第15卷第6期，“高效液相色谱法测定苯酚滴耳液中苯酚含量”
- 实验目的：考察肝素在反相色谱中的分离情况，测定防腐剂苯酚含量
- 色谱条件：ZORBAX 300SB-C18 (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250mm) 色谱柱  
甲醇：水：60：40；紫外检测（270nm, 202nm）；流速：0.6ml/min
- 结果与问题：

(1) 肝素等多糖紫外末端吸收较强，2min左右出峰，无法分离；苯酚在270nm为特征吸收，4min左右出峰，

(2) 7个厂家中有3个使用0.25%的苯酚作防腐剂，含量在90.0%~110.0%。



National Institutes for Food and Drug Control



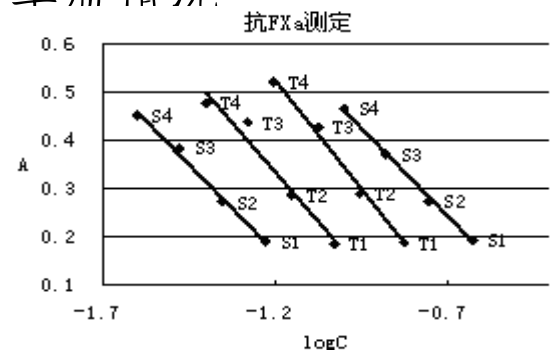
# 探索方法5- 微量底物法测抗FXa、抗FIIa活性

- 传统方法：凝血法，抗凝效价，专属性差，人为影响因素多
- 改进方法：底物法测定，抗FXa、抗FIIa效价，专属性强，自动化程度高
  - (1)  $\text{ATIII} + \text{HP} \rightarrow [\text{ATIII-HP}]$
  - (2)  $[\text{ATIII-HP}] + \text{过量FXa/FIIa} \rightarrow [\text{ATIII-HP-FXa/FIIa}] + \text{剩余FXa/FIIa}$
  - (3)  $\text{剩余FXa/FIIa} + \text{显色底物} \rightarrow \text{pNA}, 405\text{nm}$ 测定吸光度
- 仪器：96孔板、酶标仪、4×4量反应平行线法、BS2000统计软件。
- 发现问题：抗凝效价不能完全反应样品中杂质情况。

Xa-V1-W1-Z1-1.pda

	Xa											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.284	0.321	0.368	0.287								
B	0.386	0.418	0.477	0.393								
C	0.504	0.689	0.577	0.589								
D	0.629	0.651	0.636	0.719								
E	0.244	0.324	0.268	0.308								
F	0.364	0.458	0.447	0.479								
G	0.482	0.568	0.573	0.583								
H	0.661	0.653	0.718	0.691								

Endpoint  
Lm1 405  
Automix: Off  
Calibrate: On  
Plate Last Read:  
15:02 2009-1-21  
Wavelength Combination: lLm1  
Temperature Set Point: 37.0 Mean 37.0  
Reader: PLUS190PC ROM v1.13 Nov 2001



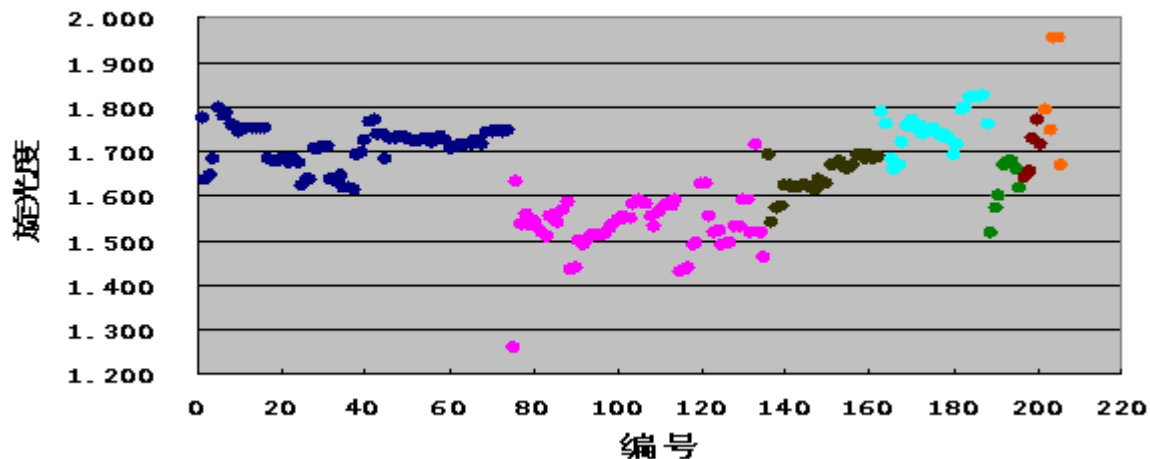
# 抗FXa、抗FIIa测定结果

生产单位	批数	抗FXa效价 (IU/支)	抗FIIa效价 (IU/支)	抗FXa 标示量%	抗FXa / 抗FIIa	抗凝效价 (血浆法)
1	3	15179	15294	121.4%	1.0	100%
2	2	12407	12503	99.3%	1.0	98%
3	3	12609	13294	100.8%	1.0	101%
4	3	12805	12984	102.4%	1.0	101%
5	3	12562	12969	100.5%	1.0	99%
6	3	12126	12538	97.0%	1.0	100%
7	2	13111	12490	104.9%	1.0	101%
8	2008030 8	10766	10762	86.1%	1.0	99%
9	090105	9869	9400	79.0%	1.0	100%

# 探索方法6-旋光度测定

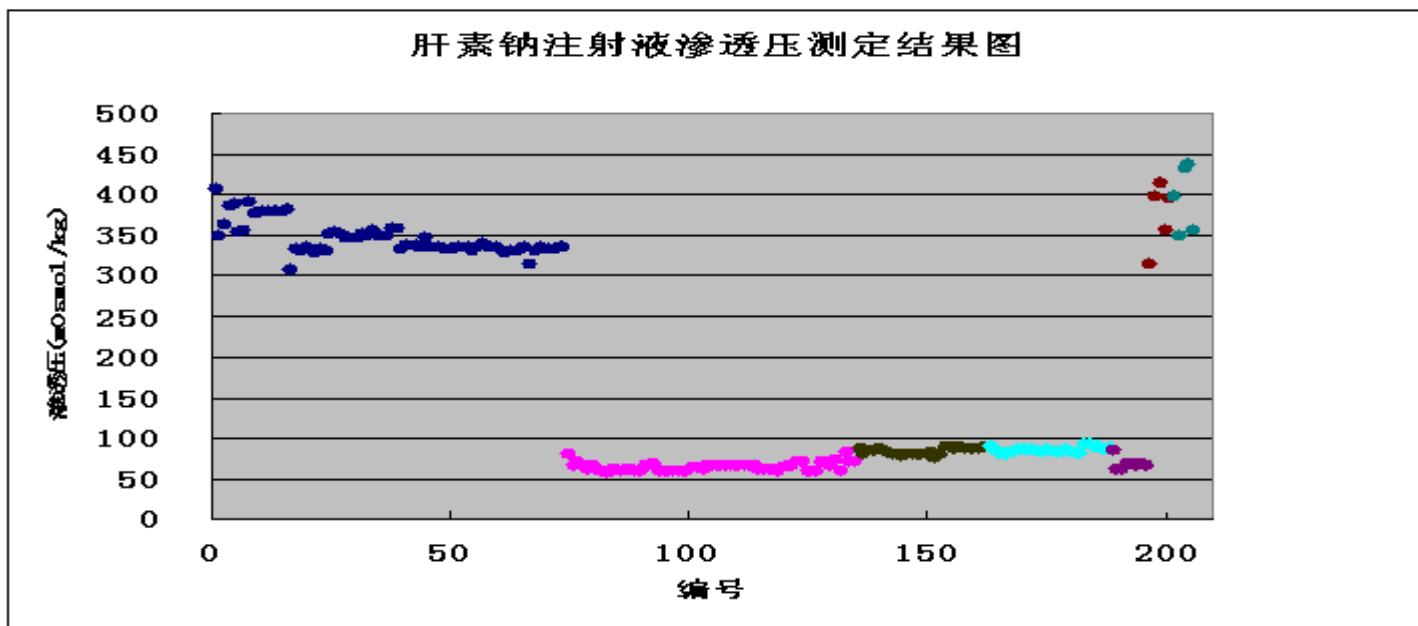
- 实验方法: CHP2005年版肝素钠比旋度测定方法
- 实验目的: 在一定程度上反应样品的纯度
- 测定条件: PE-343plus旋光仪
- 发现问题: 1批含大量OSCS杂质样品旋光度明显下降, 2批样品旋光度升高, 可能含有右旋杂质。

肝素钠注射液旋光度测定结果



# 探索方法7-渗透压测定

- 实验目的：溶液的渗透压反映的是溶液中各种溶质渗透压贡献的总和，测定注射液渗透压，考察制剂处方及生产工艺的稳定性。
- 测定条件：美国FISKE公司 MARK3渗透压仪
- 发现问题：各厂家处方不同，含辅料多和杂质多的样品溶液渗透压值升高。

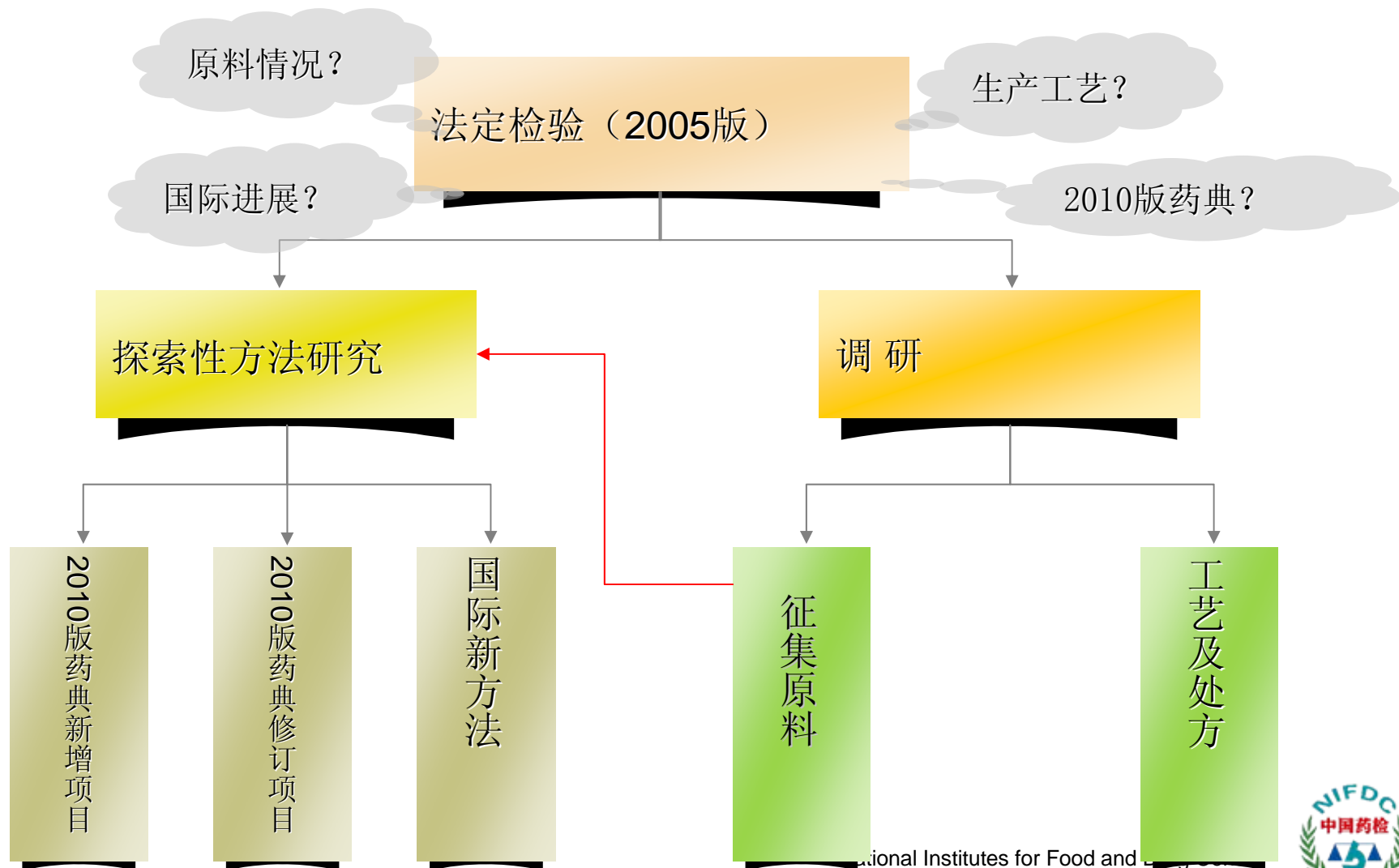


# 肝素钠注射液处方探讨

- 是否需要添加防腐剂苯酚？
- 是否需用0.9%氯化钠配液？

厂家序号	处方	有效期
1	注射用水配液	36个月
2	注射用水配液	24个月
3	0.9%氯化钠配液	36个月
4	0.9%氯化钠配液	18个月
5	注射用水配液、0.25%苯酚防腐	36个月
6	注射用水配液、0.25%苯酚防腐	36个月
7	0.9%氯化钠配液、0.25%苯酚防腐	36个月

# 2010年探索性方法研究



# 探索性方法研究

2010新增

有关物质检查

鉴别

原料残留溶剂检查

2010修订

比旋度检查原料纯度

吸光度检查原料残留核酸和蛋白

细菌内毒素检查

国际

新方法

Lowry法测定原料残留蛋白

SEC-MALLS法测定分子量及其分布

# 离子色谱法测定有关物质

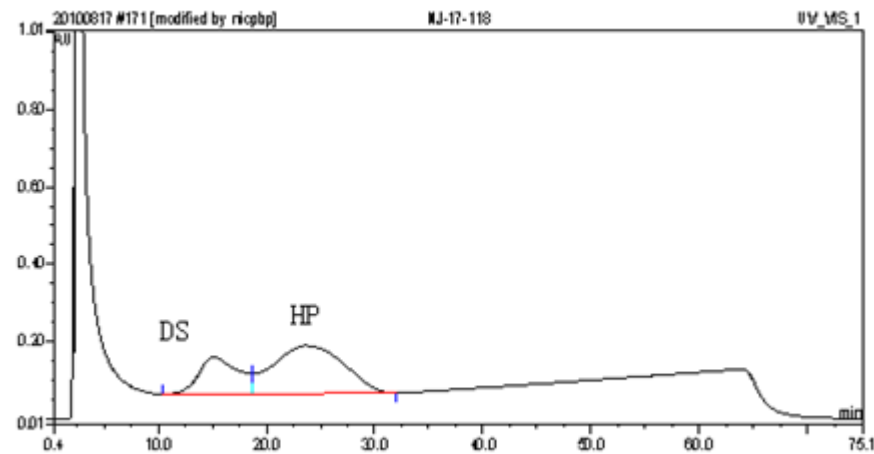
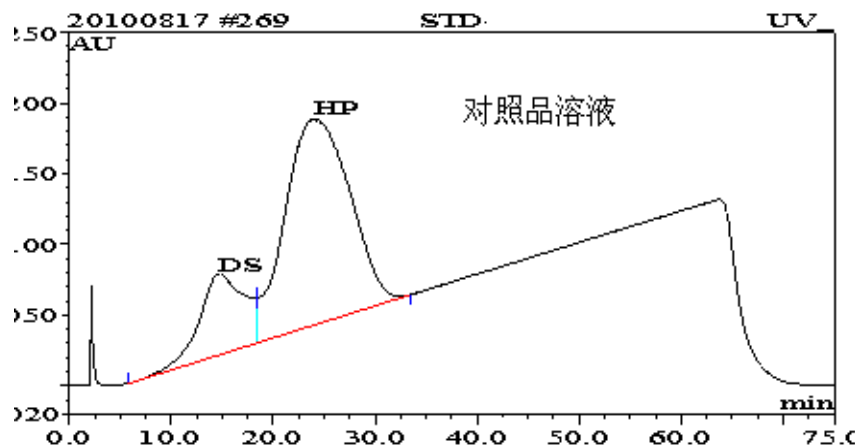
	ChP 2010	USP 32	EP 7.0
对照品及供试品溶液	无需前处理	同ChP 2010	亚硝酸钠水解
DS 限度	不得过5.0% (外标法)	同ChP 2010	不得过2.0% (外标法)
OSCS 限度	不得过3.0% (面积归一化法)	同ChP 2010	不得过2.0% (外标法)
进样量	10 $\mu$ l	同ChP 2010	20 $\mu$ l
采集时间	75min	同ChP 2010	65min

# 有关物质检查结果 (ChP2010)

## •检查结果:

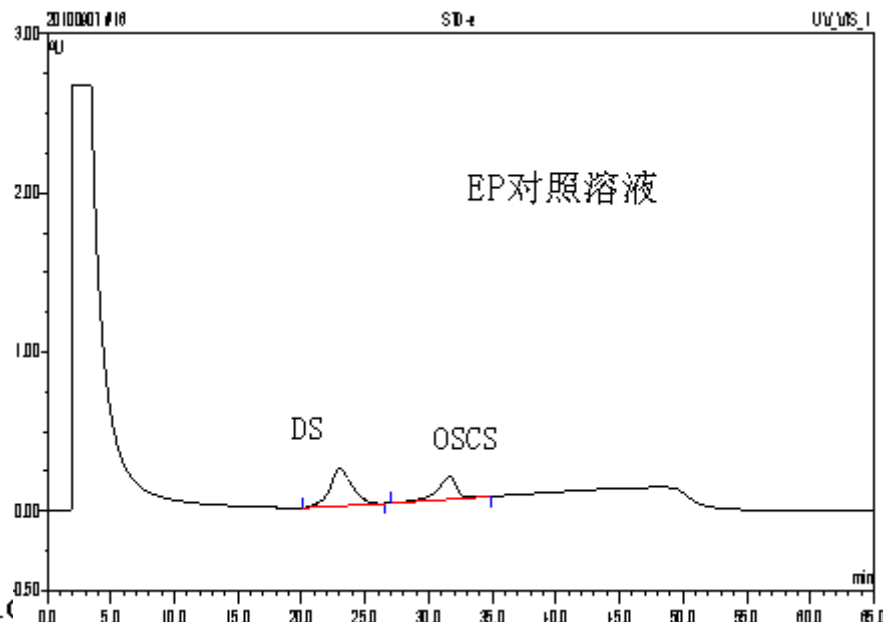
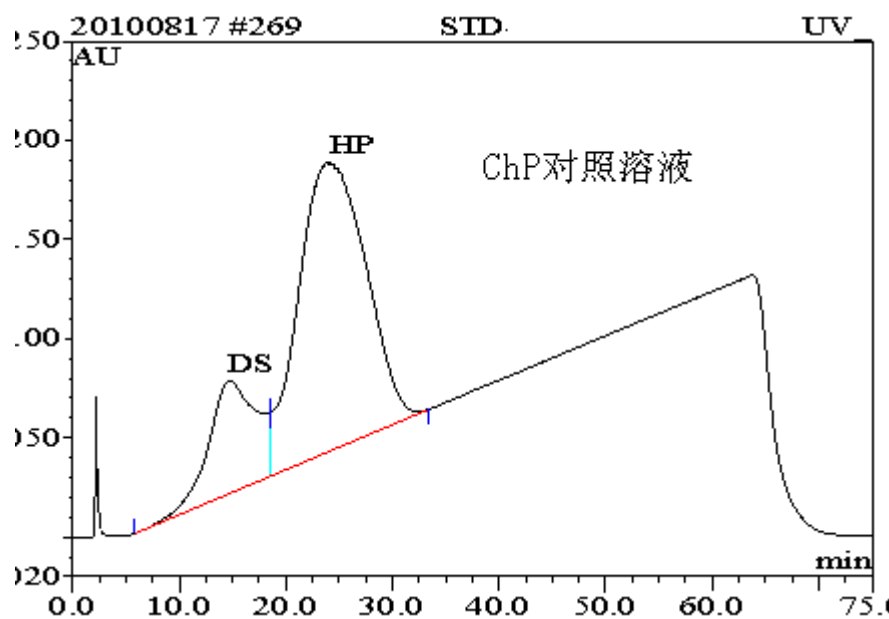
- 注射液: 168批次中, 有1批样品有关物质不合格。
- 原料: 16批原料均符合标准规定。

生产厂家	批号	杂质	含量	计算方法	标准规定
1	100103	硫酸皮肤素	8.0%	外标法	≤5.0%



# 有关物质检查结果 (EP7.0)

- 系统适用性溶液
  - ChP: 20mg/ml HP, 含1%DS、1%OSCS。
  - EP: 50mg/ml HP (水解), 含2%DS、2%OSCS。
- 对照溶液
  - ChP: 20mg/ml HP, 含5%DS。
  - EP: 同系统适用性溶液。

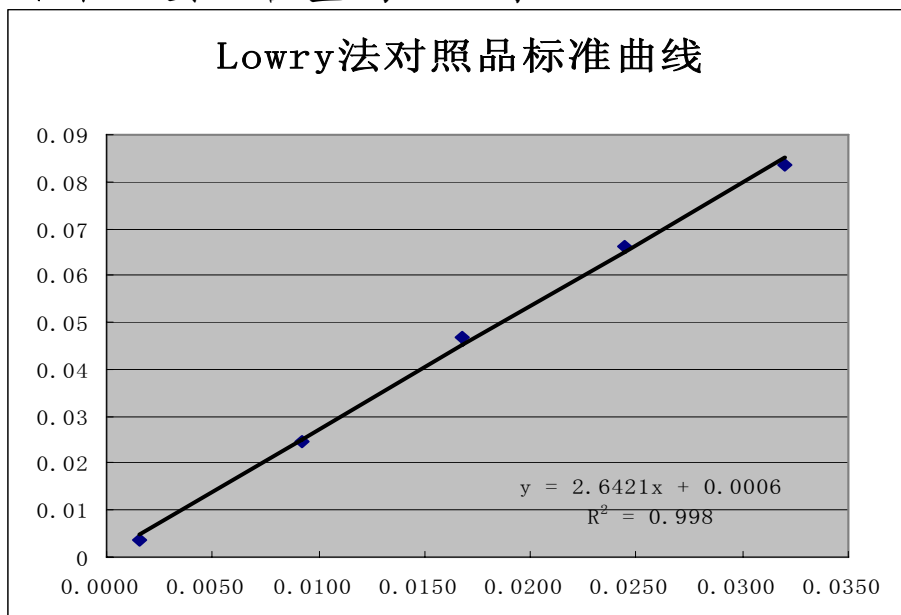


# 有关物质检查结果

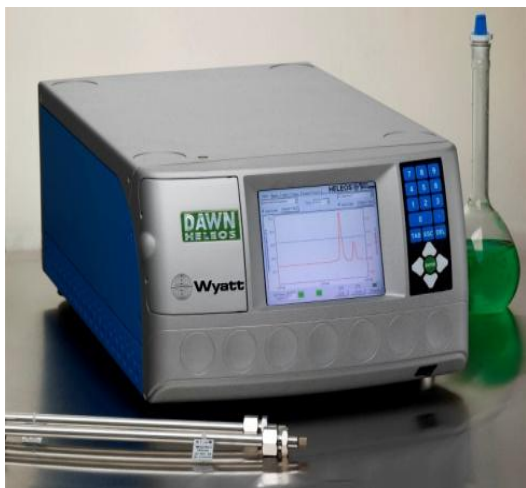
	ChP 2010 (USP 32)	EP 7.0
优点	<ul style="list-style-type: none"><li>(1) 样品前处理简单。</li><li>(2) 可用作HP鉴别项目，不用另配样品。</li><li>(3) 原料、制剂均可分析。</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>(1) HP被水解，DS、OSCS分离度好 (&gt;3.0)，便于定量。</li><li>(2) OSCS定量采用外标法，定量准确。</li></ul>
缺点	HP、DS分离度较差 (<1.0)，影响DS准确定量，DS含量较低时易出现假阴性结果	<ul style="list-style-type: none"><li>(1) 样品处理繁琐，水解步骤引入大量离子，影响色谱柱寿命。</li><li>(2) 水解时会使苯酚氧化，限制了其在注射液中的应用</li></ul>

# Lowry法测定原料残留蛋白

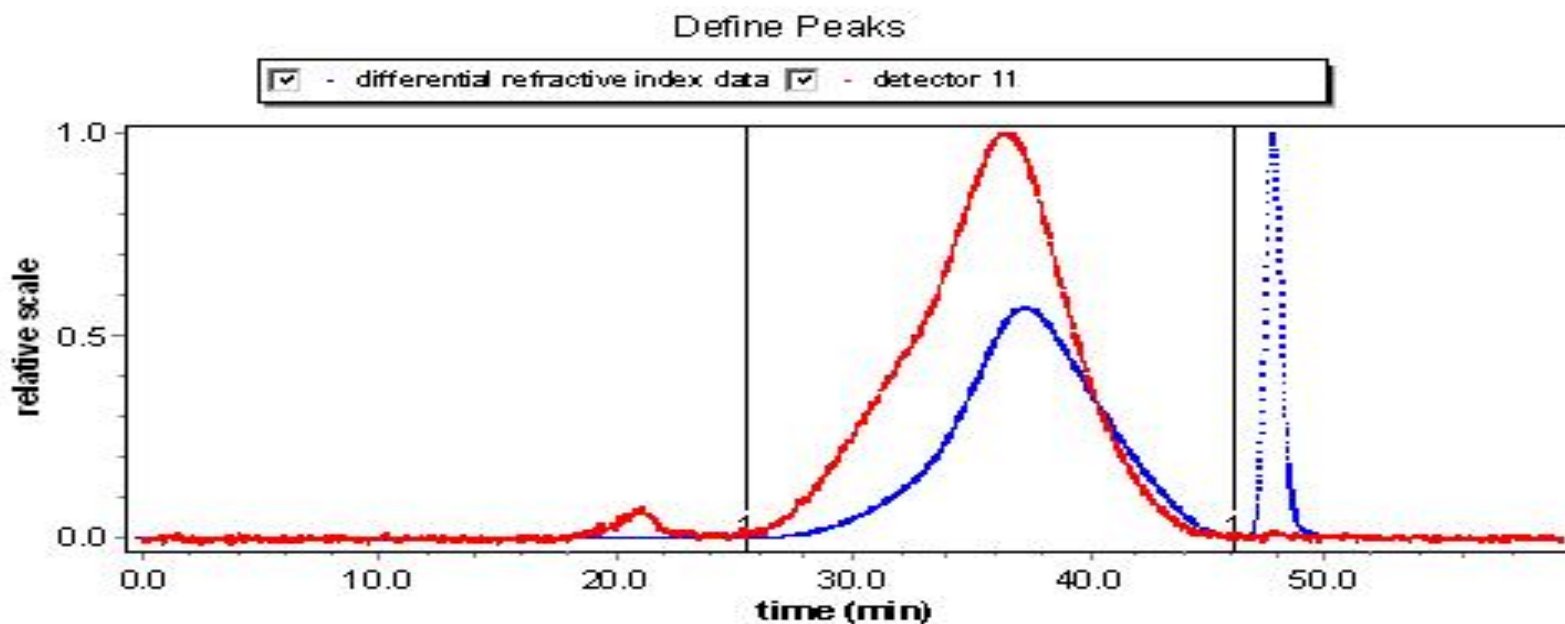
- 实验方法：参考USP FORUM 35；EP 7.0.
- 实验目的：检查肝素钠原料中残留蛋白。
- 测定方法：Lambda 35 紫外-可见分光光度计；  
波长750nm；标准曲线法
- 限度标准：不得过1.0%（USP）；不得过0.5%（EP）
- 实验结果：蛋白含量均不大于**0.1%**。



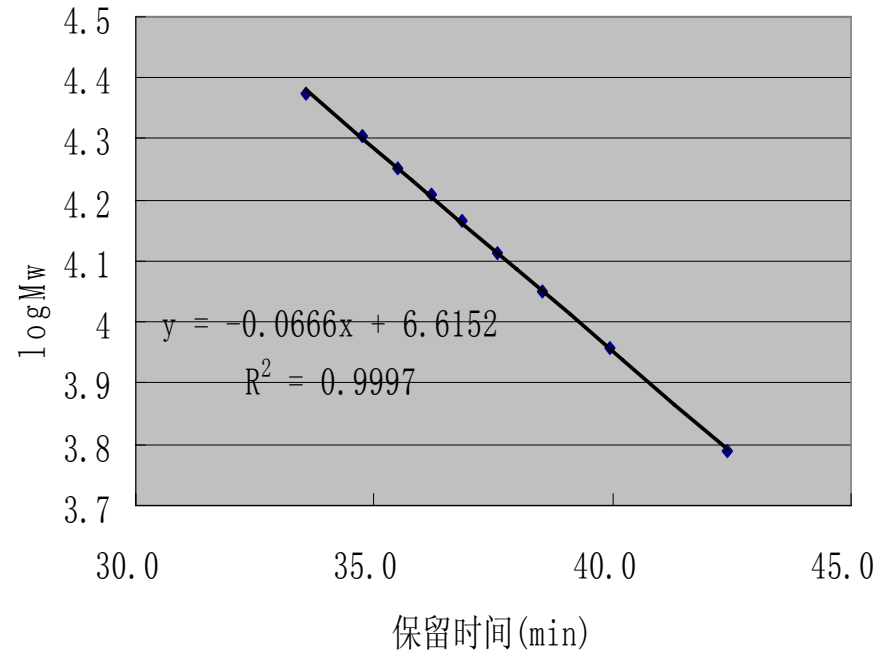
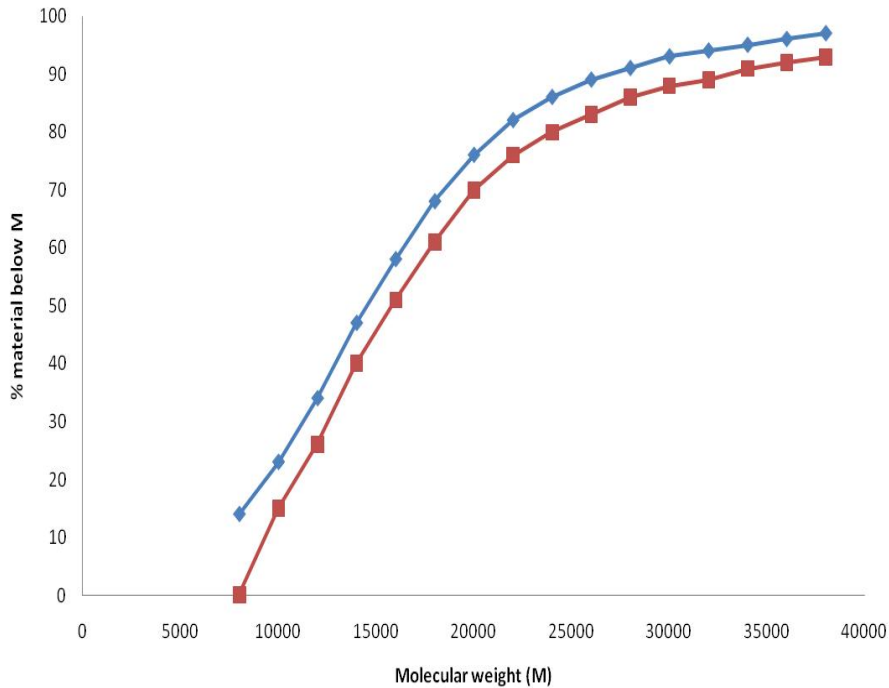
# SEC-MALLS测定分子量及分子量分布



- 实验目的：分子量与分子量分布
- 色谱条件：
  - 流动相：2.84%硫酸钠水溶液
  - 色谱柱：TSK G4000SWXL + TSK G3000SWXL
- 对照品：USP协作标定样品
- 考察国内样品
- 探讨分子量分布订入质量标准的可能性



# 探索方法-SEC-MALLS法



- 国内样品重均分子量范围：14000-17000

# 建议

## 1. 标准修订

- 肝素钠原料残留蛋白检查，考察增订Lowry法的可能性
- 考察增订肝素钠分子量分布检查的可能性
- 修订肝素钠注射液前言，用“……**无菌**水溶液”代替“……**灭菌**水溶液”

## 2. 规范肝素钠注射液的生产工艺、处方、说明书

建议不加防腐剂苯酚，用注射用水配液，统一效期

## 3. 继续肝素的质量研究工作

密切关注国际研究前沿动向，进一步完善质量标准



Thanks for your attention!