依诺肝素钠注射液

Yinuogansuna Zhusheye

Enoxaparin Sodium Injection

本品为依诺肝素钠的无菌水溶液。其抗Xa因子效价应为标示量的90％～110％。

【性状】 本品为无色至淡黄色的澄明液体。

【鉴别】 （1）取本品，照效价测定项下方法试验，抗Ⅹa因子与抗Ⅱa因子效价之比应为3.3～5.3。

（2）取本品，用0.01 mol/L盐酸溶液稀释制成每1ml中约含0.5mg的溶液，照紫外-可见分光光度法（中国药典2020年版四部通则0401）测定，在231nm波长处有最大吸收。

（3）本品显钠盐的鉴别反应（中国药典2020年版四部通则0301）。

【检查】 pH值 应为5.5～7.5（中国药典2020年版四部通则0631）。

澄清度与颜色 取本品，依法检查，溶液应澄清无色；如显色，与黄色4号标准比色液（中国药典2020年版四部通则0901第一法）比较，不得更深。

分子量与分子量分布 照分子排阻色谱法（中国药典2020年版四部通则0514）测定。

供试品溶液 取本品适量，用流动相稀释制成每1ml中约含1500IU的溶液。

对照品溶液 取低分子肝素分子量对照品适量，加流动相溶解并稀释制成每1ml中约含10mg的溶液。

系统适用性溶液 取依诺肝素钠对照品适量，加流动相溶解并稀释制成每1ml中约含10mg的溶液。

色谱条件 以适合分离分子量为15000～100000蛋白的亲水性键合硅胶为填充剂；以0.1mol/L醋酸铵溶液为流动相；流速为每分钟0.5ml；柱温30℃；示差折光检测器。进样体积25μl。

系统适用性要求 系统适用性溶液色谱图中，主峰与溶剂峰能够完全洗脱；重均分子量应在标示值的±150范围内；对照品溶液色谱图中，准确计算低分子肝素峰的总面积（不包括盐峰）及每个点的累积峰面积百分比，确定与低分子肝素分子量对照品附带的宽分布标样表中累积峰面积百分比最接近点的保留时间及对应的分子量，以保留时间为横坐标，分子量的对数值为纵坐标，使用GPC软件，拟合三次方程，建立校正曲线，相关系数应不小于0.990。

测定法 取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按下式计算本品的重均分子量：

Mw=∑（RIiMi）/ ∑RIi

式中 RIi 为洗脱的i级分的物质量，即示差色谱图的峰高；

 Mi 由校正曲线计算得出的i级分的分子量。

限度 重均分子量应为3800～5000，分子量小于2000的级分应为总量的12.0%～20.0%，分子量为2000～8000的级分应为总量的68.0%～82.0％，分子量大于8000的级分不得过总量的18.0％。

游离硫酸盐照离子色谱法（中国药典2020年版四部通则0513）测定。

供试品溶液 精密量取本品适量，用流动相定量稀释制成每1ml中约含100IU的溶液。

对照品溶液 精密量取硫酸根标准液（100μg/ml）适量，用流动相定量稀释制成每1ml中分别约含硫酸根0.1μg、0.5μg、1μg、2μg、5μg、10μg和20μg的溶液。

系统适用性溶液 取草酸钠适量，加流动相溶解并稀释制成每1ml中约含50μg的溶液，取1ml与每1ml中含硫酸根10μg的对照品溶液3ml，置同一10ml量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀。

色谱条件 以烷醇季铵的乙基乙烯基苯-二乙烯基苯树脂为填充剂（如AS11阴离子交换柱，4mm×250mm，或效能相当的色谱柱），连接与分析柱填料相同的保护柱（4mm×50mm）；以3.0mmol/L碳酸钠溶液为流动相；流速为每分钟2.0ml；采用配备有阴离子自动再生抑制器或适宜的化学抑制器的电导检测器。进样体积25μl。

系统适用性要求 系统适用性溶液色谱图中，硫酸根峰与草酸根峰的分离度应不小于1.0；以对照品溶液的浓度与相应对照品溶液色谱图中的峰面积计算线性回归方程，相关系数（*r*）应不小于0.995。

测定法 精密量取供试品溶液与系列对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，用线性回归方程计算供试品中含硫酸根离子（SO42-）的量。

限度 本品每1ml中含硫酸根离子（SO42-）的量不得过1.2mg。

装量取供试品1支，用于清洗注射器及针头（选用的注射器体积应不大于供试品标示装量的2倍）；另取供试品5支，分别用注射器将内容物尽量抽尽，再缓慢注入干燥的已称重的适宜容器中（若为预灌装注射器，取5支，将内容物分别注入干燥的已称重的适宜容器中），精密称定内容物重量。在相同温度下测定内容物的相对密度，计算本品每支的装量，均不得少于标示装量。

无菌取本品，依法检查（中国药典2020年版四部通则1101薄膜过滤法），以金黄色葡萄球菌为阳性对照菌，应符合规定。

细菌内毒素 取本品，依法检查（中国药典2020年版四部通则1143），以抗Xa因子效价计算，每1 IU中含内毒素的量应小于0.010EU。

其他 应符合注射剂项下有关的各项规定（中国药典2020年版四部通则0102）。

【效价测定】 照生物检定统计法（中国药典2020年版四部通则1431）中的量反应平行线测定法，采用4×4法进行实验设计与统计计算。

抗Xa因子效价三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇6000缓冲液（pH8.4） 取三羟甲基氨基甲烷6.06 g，氯化钠10.23g，乙二胺四醋酸二钠2.8g，聚乙二醇6000 1.0g，加水800 ml使溶解，用盐酸调节pH值至8.4，加水稀释至1000 ml，摇匀。

标准品溶液（S）取低分子肝素标准品，复溶后，用上述缓冲液（pH8.4）分别定量稀释制成4种浓度的溶液。溶液的浓度应在log剂量-反应的线性范围内（一般为每1 ml中约含0.01～0.1 IU）。

供试品溶液（T） 取本品5支，混匀，用上述缓冲液（pH8.4）分别稀释制成与4种标准品溶液浓度相当的溶液。

抗凝血酶溶液 取抗凝血酶适量，加上述缓冲液（pH8.4）制成每1ml中约含抗凝血酶1 IU的溶液。

Ⅹa因子溶液 取Ⅹa因子适量，加上述缓冲液（pH8.4）溶解并稀释制成每1ml中约含0.4IU（7.1nkat）的溶液，必要时可调整其浓度，使按下述测定法测定时，空白管（B1、B2）在405nm波长处的吸光度值在0.6～1.0范围内。

发色底物溶液 取发色底物S-2765，加水溶解并稀释制成浓度为3mmol/L的溶液，临用前用水稀释至1mmol/L。

测定法 取不同浓度的标准品溶液（S）或供试品溶液（T）及上述缓冲液（B），按B1、S1、S2、S3、S4、T1、T2、T3、T4、T1、T2、T3、T4、S1、S2、S3、S4、B2的顺序依次向小管中分别精密加入20～50μl相同体积（V）的上述溶液，再向每管精密加入相同体积的抗凝血酶溶液，混匀，37℃平衡2分钟，然后再精密加入Xa因子溶液40～100μl（2V），混匀，37℃平衡2分钟，精密加入发色底物溶液适量（2V），混匀，37℃准确保温2分钟后，各精密加入50％醋酸溶液适量（2V）终止反应。用适宜设备在405nm的波长处测定各管的吸光度。空白缓冲液B1、B2两管的吸光度相差不得过0.05。以吸光度为纵坐标，标准品溶液（或供试品溶液）浓度的对数值为横坐标分别作线性回归，计算效价及实验误差。平均可信限率（FL%）不得大于10％。

抗IIa因子效价 三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇6000缓冲液（pH8.4） 照抗Xa因子效价项下的方法制备。

标准品溶液（S） 取低分子肝素标准品，复溶后，再用上述缓冲液（pH8.4）分别定量稀释制成4种浓度的溶液。溶液的浓度应在log剂量-反应的线性范围内，溶液的浓度一般为每1ml中约含0.005～0.05 IU。

供试品溶液（T） 取本品5支，混匀，用上述缓冲液（pH8.4）分别稀释制成与4种标准品溶液浓度相当的溶液。

抗凝血酶溶液 照抗Xa因子效价项下的方法制备，溶液的浓度为每1ml中约含抗凝血酶 0.25IU。

凝血酶溶液 取凝血酶适量，加上述缓冲液（pH8.4）溶解并稀释成每1ml中约含5 IU的溶液，必要时可调整其浓度，使按下述测定法测定时，空白管（B1、B2）在405nm波长处的吸光度值在0.6～1.0范围内。

发色底物溶液 取发色底物S-2238，加水溶解并稀释制成浓度为3mmol/L的溶液，临用前用水稀释至0.625mmol/L。

测定法 取不同浓度的标准品溶液（S）或供试品溶液（T）及上述缓冲液（B），按B1、S1、S2、S3、S4、T1、T2、T3、T4、T1、T2、T3、T4、S1、S2、S3、S4、B2的顺序依次向小管中分别精密加入20～50μl相同体积（V）的上述溶液，再向每管中精密加入相同体积的抗凝血酶溶液，混匀，37℃平衡2分钟，然后每管再精密加入凝血酶溶液40～100μl（2V），混匀，37℃平衡2分钟，精密加入发色底物溶液适量（2V），混匀，37℃准确保温2分钟后，各精密加入50％醋酸溶液适量（2V）终止反应。用适宜设备在405nm的波长处测定各管吸光度。空白缓冲液B1、B2两管的吸光度相差不得过0.05。以吸光度为纵坐标，标准品溶液（或供试品溶液）浓度的对数值为横坐标分别作线性回归，计算效价及实验误差。平均可信限率（FL%）不得大于10％。

【类别】 同依诺肝素钠。

【规格】 （1）0.2ml:2000 AXaIU （2）0.4ml:4000 AXaIU （3）0.6ml:6000 AXaIU （4）0.8ml:8000 AXaIU （5）1.0ml:10000 AXaIU

【贮藏】 密闭保存。

起草单位：中国食品药品检定研究院

复核单位：广东省药品检验所

浙江省食品药品检验研究院

江苏省食品药品监督检验研究院

北京市药品检验研究院

中国医学科学院药物研究所

武汉工程大学