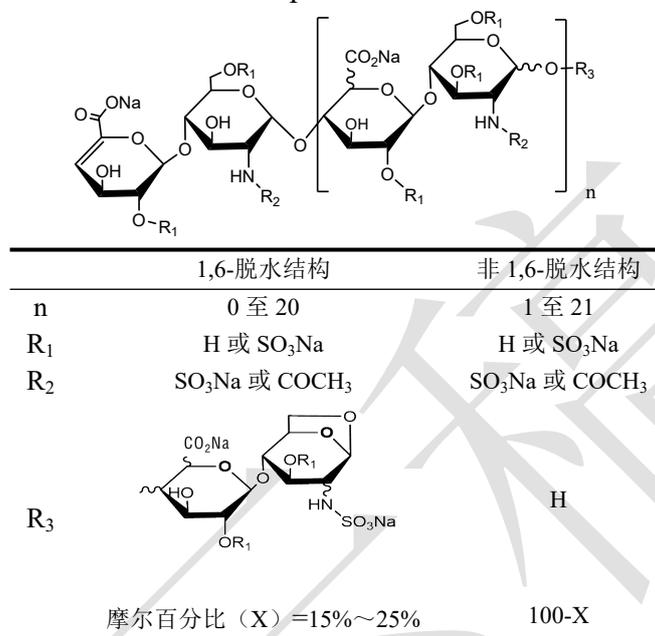


附件：依诺肝素钠公示稿

依诺肝素钠
Yinuogansuna
Enoxaparin Sodium



本品系依诺肝素的钠盐，是以猪小肠黏膜来源的肝素为原料，采用经对肝素苄基酯衍生物进行碱解聚的方法制得。本品由未被完全定性的一系列复杂寡糖组成，非还原端主要由 4-烯醇式吡喃糖醛酸构成，其中 15%~25% 的组分在还原端有 1,6-脱水衍生物结构。本品的重均分子量为 3800~5000，峰位分子量约为 4500。每双糖单位的硫酸化程度约为 2。按干燥品计算，本品每 1mg 的抗 Xa 因子效价应为 90~125 IU，抗 IIa 因子效价应为 20~35 IU，抗 Xa 因子效价与抗 IIa 因子效价之比应为 3.3~5.3。

【性状】本品为白色或类白色的粉末；极具引湿性。

本品在水中易溶，在乙醇中不溶。

【鉴别】（1）照核磁共振氢谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0441）测定。

供试品溶液 取本品约 40mg，加含有 0.05% 的 2, 2, 3, 3-d₄-3-三甲基硅基丙酸钠（TSP-d₄）的重水 0.7ml 溶解。

对照品溶液 取依诺肝素钠对照品约 40mg，加含有 0.05% 的 2, 2, 3, 3-d₄-3-三甲基硅基丙酸钠（TSP-d₄）的重水 0.7ml 溶解。

核磁共振波谱仪参数 脉冲傅里叶变换核磁共振波谱仪兆周数不低于 500 MHz（以 ¹H 主磁场频率计），90° 激发脉冲，温度为 30℃，谱宽（SW）12ppm，中心频率（O1P）4.0ppm，弛豫延迟时间（D1）和采集时间（AQ）均不少于 2 秒，线展宽因子（LB）0.3Hz，TSP-d₄ 甲基的化学位移设为 0.00ppm。

系统适用性要求 供试品溶液和对照品溶液 ¹H NMR 图谱 TSP-d₄ 甲基信号的半峰宽不得大于 1.5，2.02ppm 到 2.08ppm 区域信号的信噪比不得低于 1000。

测定法 分别将对照品溶液和供试品溶液转移至 5mm 核磁管中，核磁共振波谱仪采集 ¹H NMR 谱图。

结果判定 供试品溶液的 ¹H NMR 图谱与对照品溶液的图谱一致，并且在 2.05ppm、3.21ppm、5.22ppm、5.41ppm、5.62ppm 和 5.99ppm 处出现信号，其化学位移值与规定值不超过 ±0.03ppm。

(2) 取本品, 照效价测定项下的方法试验, 抗 Xa 因子效价与抗 IIa 因子效价之比应为 3.3~5.3。

(3) 取本品, 加 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.5 mg 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, 吸收系数($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)应为 14.0~20.0。

(4) 本品的水溶液显钠盐的鉴别反应(中国药典 2020 年版四部通则 0301)。

【检查】酸碱度 取本品 1.0g, 加水 10ml 溶解后, 依法测定(中国药典 2020 年版四部通则 0631), pH 值应为 6.2~7.7。

溶液的澄清度与颜色 取本品 1.0g, 加水 10ml 溶解后, 依法检查, 溶液应澄清无色; 如显色, 与黄色 1 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。

硫酸根与羧酸根摩尔比 取本品约 0.1g, 加新沸放冷的去离子水 20ml 溶解后, 取 2ml 通过预冷的阳离子交换树脂柱(约 10cm×1cm), 用 10~15ml 上述去离子水缓缓将其洗入置于冰浴中的烧杯内, 洗脱完毕后用电导率仪立即进行滴定, 照仪器说明书操作, 以铂黑电极或其它能满足测定需求的电极为测定电极, 在磁力搅拌下, 每次加氢氧化钠滴定液(0.05mol/L)约 50 μ l, 直至终点。以电导率为纵坐标, 以滴定液体积为横坐标, 绘制曲线。分别对突然下降, 稍微爬升, 急剧上升的三个线性部分拟合最佳线性方程。在第一条直线和第二条直线, 第二条直线和第三条直线的交点, 分别对横坐标作垂直线, 第一条和第二条直线交点的垂足即硫酸根消耗氢氧化钠滴定液(0.05mol/L)的毫升数(V_1), 第二条和第三条直线交点的垂足即硫酸根和羧酸根共同消耗氢氧化钠滴定液(0.05mol/L)的毫升数(V_2), V_2 与 V_1 之差为羧酸根消耗氢氧化钠滴定液(0.05mol/L)的毫升数, 按下式计算供试品中硫酸根(SO_4^{2-})与羧酸根(COOH^-)的摩尔比, 应不小于 1.8。

$$\text{硫酸根与羧酸根摩尔比} = V_1 / (V_2 - V_1)$$

1,6-脱水衍生物 照高效液相色谱法(中国药典 2020 年版四部通则 0512)测定。

醋酸钠钙溶液 取牛血清白蛋白 10mg, 醋酸钙 32mg, 加水 60ml 振摇使溶解, 加冰醋酸 580 μ l, 用 2mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 值至 7.0, 全量转移至 100ml 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 滤过。

磷酸钾缓冲液 取磷酸二氢钾 68mg, 牛血清白蛋白 10mg, 加水 30ml 溶解, 用氢氧化钾试液调节溶液 pH 值至 7.0, 全量转移至 50ml 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 滤过。

肝素酶混合溶液 取肝素酶 I、II 和 III 各适量, 分别加磷酸钾缓冲液(pH7.0)溶解并稀释制成每 1ml 中各约含 0.4 IU 的溶液(在-20 $^{\circ}$ C 条件下可贮存 3 个月), 分别取 3 种肝素酶溶液, 按 1:1:1 的比例等体积混合, 摇匀。

硼氢化钠溶液 取硼氢化钠 12mg, 加水 400 μ l 使溶解, 涡旋混匀。临用新制。

供试品贮备液与对照品贮备液 取本品与依诺肝素钠对照品各适量, 分别加水溶解并稀释制成每 1ml 中各约含 20mg 的溶液。

供试品酶解溶液与对照品酶解溶液 取供试品贮备液与对照品贮备液各 20 μ l, 分别加醋酸钠钙溶液 70 μ l 和肝素酶混合溶液 100 μ l, 轻轻翻转混匀, 在 25 $^{\circ}$ C 水浴中恒温 48 小时以上进行酶解。

供试品溶液与对照品溶液 取供试品酶解溶液与对照品酶解溶液各 60 μ l, 分别加硼氢化钠溶液 10 μ l, 涡旋混匀后放置至少 4 小时进行还原(该溶液在室温条件下 48 小时内稳定)。

空白溶液 取水 20 μ l, 与供试品贮备液与对照品贮备液同时同法进行酶解与还原操作。

双糖定位溶液 分别取 Δ I A、 Δ II A、 Δ III A、 Δ IV A、 Δ I S、 Δ II S、 Δ III S 和 Δ IV S 双糖对照品各适量, 置同一量瓶中, 加水溶解并稀释制成每 1ml 中各约含 0.25mg 的溶液。

还原双糖定位溶液 取双糖定位溶液 60 μ l, 加入硼氢化钠溶液 10 μ l, 涡旋混匀后放置至少 4 小时进行还原。

色谱条件 用强阴离子交换树脂为填充剂(Spherisorb SAX, 4.0mm×250mm, 5 μ m 或效能相当的色谱柱), 并采用保护柱(Spherisorb SAX, 4.6mm×10mm, 5 μ m 或效能相当的保护柱)。以

磷酸二氢钠溶液（取磷酸二氢钠 0.280g，加水 950ml 使溶解，用磷酸调节 pH 值至 3.0，用水稀释至 1000ml）为流动相 A，以高氯酸钠磷酸二氢钠溶液（取高氯酸钠 140g，加流动相 A 950ml 使溶解，用磷酸调节 pH 值至 3.0，用流动相 A 稀释至 1000ml）为流动相 B，按下表进行线性梯度洗脱，流速为每分钟 0.8ml；柱温 50℃；检测波长为 234nm；进样体积 10μl。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	97	3
20	65	35
50	0	100
60	0	100
61	97	3
79	97	3

系统适用性要求 对照品溶液色谱图中，1,6-脱水Δ I S- I S 与 1,6-脱水Δ I S 的峰面积之比不得过 1.15，Δ I S 与还原Δ I S 的峰面积之比不得过 0.02，还原Δ I A 峰与 1,6-脱水Δ I S 峰之间的分离度应不小于 1.5；对照品中 1,6-脱水衍生物的测定值应在标示值±1.5%的范围内。

测定法 采用面积归一化法，扣除空白溶液中对应的色谱峰后，量取供试品溶液和对照品溶液色谱图中各峰面积与总峰面积。参照定位溶液色谱图，在供试品溶液和对照品溶液的色谱图中定位八个被还原双糖的峰，1,6-脱水Δ I S、1,6-脱水Δ II S 和 1,6-脱水Δ I S- I S 及其他寡糖峰参照下表（依诺肝素钠还原后的糖片段峰相对保留时间与分子量关系表）中相对于还原Δ I S 双糖峰的相对保留时间进行峰定位。按下式及下表中的分子量计算对照品及供试品中含 1,6-脱水衍生物的摩尔百分比。

$$1,6\text{-脱水衍生物}\% = 100 \times \frac{M_w}{\sum M_{w_x} \times A_x} \times (A_1 + A_2 + A_3)$$

式中 M_w 为供试品的重均分子量；

M_{w_x} 为相对保留时间为 x 的色谱峰对应的分子量；

A_x 为相对保留时间为 x 的色谱峰对应的峰面积；

A_1 为 1,6-脱水Δ I S 的峰面积；

A_2 为 1,6-脱水Δ II S 的峰面积；

A_3 为 1,6-脱水Δ I S- I S 的峰面积。

依诺肝素钠还原后的糖片段峰相对保留时间与分子量关系表

序号	名称	相对保留时间（RRT）	分子量（Da）
1	未知峰	<0.24	741
2	还原Δ IV A	0.24	401
3	未知峰	0.24~0.52	741
4	还原Δ IV S	0.52	461
5	未知峰	0.52~0.56	483
6	还原Δ II A	0.56	503
7	未知峰	0.56~0.61	503
8	1,6-脱水Δ II S	0.61	443
9	未知峰	0.61~0.64	503
10	还原Δ III A	0.64	503

11	未知峰	0.64~0.73	533
12	还原 Δ II S	0.73	563
13	未知峰	0.73~0.78	563
14	还原 Δ III S	0.78	563
15	未知峰	0.78~0.87	583
16	还原 Δ I A	0.87	605
17	未知峰	0.87~0.90	635
18	1,6-脱水 Δ I S	0.90	545
19	未知峰	0.90~0.97	635
20	还原 Δ II A-IV Sglu	0.97	1066
21	未知峰	0.98~1.00	635
22	还原 Δ I S	1.00	665
23	未知峰	1.00~1.03	665
24	Δ I S	1.03	665
25	未知峰	1.03~1.10	1228
26	还原 Δ II A- II Sglu	1.09	1168
27	未知峰	1.09~1.23	1228
28	1,6-脱水 Δ I S- I S	1.23	1210
29	未知峰	>1.23	1228

限度 含 1,6-脱水衍生物的摩尔百分比应为 15%~25%。

氮 取本品，照氮测定法（中国药典 2020 年版四部通则 0704 第二法或第三法）测定，按干燥品计算，本品中总氮（N）含量应为 1.5%~2.5%。

钠 照原子吸收分光光度法（中国药典 2020 年版四部通则 0406 第一法）测定。

溶剂 氯化铯-盐酸溶液（每 1ml 0.1mol/L 盐酸溶液中含氯化铯 1.27mg）。

供试品溶液 取本品适量，精密称定，加溶剂溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 0.5mg 的溶液。

对照品溶液 精密量取钠单元标准溶液（每 1ml 中含钠 200 μ g），用溶剂分别定量稀释制成每 1ml 中含钠离子 25 μ g、50 μ g 和 75 μ g 的溶液。

测定法 在 330.3nm 的波长处分别测定各对照品溶液和供试品溶液的吸光度。

限度 按干燥品计算，含钠（Na）应为 11.3%~13.5%。

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，加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中约含 10mg 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 25 μ l。

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：

$$M_w = \sum (R_i M_i) / \sum R_i$$

式中 R_i 为洗脱的 i 级分的物质质量，即示差色谱图的峰高；

M_i 为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 取本品适量，精密称定，加流动相溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的溶液。

对照品溶液 精密量取硫酸根标准液（100 μ g/ml）适量，用流动相定量稀释制成每 1ml 中分别约含硫酸根 0.1 μ g、0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、5 μ g、10 μ g 和 20 μ g 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 50 μ g 的溶液，取 1ml 与每 1ml 中含硫酸根 10 μ g 的对照品溶液 3ml，置同一 10ml 量瓶中，用流动相稀释至刻度，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（AS11 阴离子交换柱，4mm \times 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 \times 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 25 μ l。

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之间的分离度应不小于 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（ SO_4^{2-} ）的量。

限度 含硫酸根离子（ SO_4^{2-} ）的量不得过 0.5%。

苯甲醇 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0512）测定。

供试品溶液 取本品约 0.5g，精密称定，置 10ml 量瓶中，精密加入 1mol/L 氢氧化钠溶液 5ml，振摇溶解后放置 1 小时，精密加入冰醋酸 1ml，用水稀释至刻度，摇匀。

对照品溶液 取苯甲醇对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 0.25mg 的溶液，精密量取 0.5ml，置 10ml 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

色谱条件 以辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-乙腈-水（5:15:80）为流动相；检测波长为 256nm；进样体积 20 μ l。

测定法 精密量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。

限度 按外标法以峰面积计算不得过 0.1%。

残留溶剂 照残留溶剂测定法（中国药典 2020 年版四部通则 0861 第二法）测定，应符合规定。

干燥失重 取本品，以五氧化二磷为干燥剂，60 $^{\circ}$ C 减压干燥 3 小时（压力不超过 670Pa），减失重量不得过 10.0%（中国药典 2020 年版四部通则 0831）。

重金属 取本品，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 0821 第二法），含重金属不得过百万分之二十。

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。

【效价测定】 照生物检定统计法（中国药典 2010 年版附录 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 800ml 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） 取本品适量，精密称定，按标准品溶液相同方法溶解并用上述缓冲液（pH8.4）分别定量稀释制成与 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 1IU 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（7.1 μ kat）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 20～50 μ l 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 40～100 μ l（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超过 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）与供试品溶液（T） 照抗 Xa 因子效价项下的方法制备，溶液的浓度一般为每 1ml 中约含 0.005～0.05 IU。

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 20～50 μ l 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 40～100 μ l（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超过 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】 抗凝血药。

【贮藏】 密封，在干燥处保存。

【制剂】（1）依诺肝素钠注射液（2）注射用依诺肝素钠

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