那屈肝素钙

Naqugansugai

Nadroparin Calcium



本品系那屈肝素的钙盐，是以猪小肠黏膜来源的肝素为原料，采用亚硝酸解聚后，选择性的去除大部分分子量小于2000的糖链后制得。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2-O-硫-α-L-艾杜糖醛酸组成，还原端主要由6-O-硫-2,5-脱水-D-甘露醇组成。本品的重均分子量为3600～5000，峰位分子量约为4300。每双糖单位的硫酸化程度为2.0。按干燥品计算，本品每1mg的抗Ⅹa因子效价应为95～130IU，抗Ⅹa因子效价与抗Ⅱa因子效价之比应为2.5～4.0。

【生产要求】 本品在生产过程中应使用经过验证的生产和纯化工艺，以降低*N*-亚硝基化合物在成品中的水平。必要时应采用适宜的经过验证的分析方法，对成品中*N-*亚硝基化合物的含量进行测定，以确认符合我国药品监管部门相关指导原则或ICH M7指导原则的限度要求。

【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 取那屈肝素钙对照品约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。

仪器参数 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1.5，2.03 ppm到2.09ppm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2.06ppm、3.31ppm、4.94ppm、5.23ppm、5.28ppm、5.43ppm和5.52ppm处出现信号，其化学位移值与规定值不超过±0.03ppm。

（2）取本品，照效价测定项下方法试验，抗Ⅹa因子效价与抗Ⅱa因子效价之比应为2.5～4.0。

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

【检查】 酸碱度 取本品0.10g，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5.5～8.0。

溶液的澄清度与颜色 取本品0.5 g，加水10 ml溶解后，溶液应澄清无色；如显浑浊，与II号浊度标准液（中国药典2020年版四部通则0902第一法）比较，不得更浓；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电导滴定，以铂黑电极或其它能满足测定需求的电极为测定电极，在磁力搅拌条件下，每次加氢氧化钠滴定液（0.05mol/L）约50μl，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是硫酸根消耗氢氧化钠滴定液（0.05mol/L）的毫升数（V1），第二条和第三条直线交点的垂足是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（V2），V2与V1之差为羧酸根消耗氢氧化钠滴定液的毫升数，按下式计算供试品中硫酸根（）与羧酸根（COOH-）的摩尔比，应不小于1.8。

硫酸根与羧酸根摩尔比=V1/（V2-V1）

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％。

钙 取本品约0.4g，精密称定，加水100ml使溶解，加氢氧化钠试液15ml与钙紫红素指示剂0.1g，用乙二胺四醋酸二钠滴定液（0.05mol/L）滴定至溶液自紫红色转变为纯蓝色。每1ml乙二胺四醋酸二钠滴定液（0.05mol/L）相当于2.004mg的钙，按干燥品计算，本品中钙的含量应为9.5％～11.5％。

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 取那屈肝素钙对照品适量，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3600～5000，分子量小于2000的级分不得过总量的15.0％，分子量为2000～4000的级分应为总量的35.0%～55.0％，分子量为2000～8000的级分应为总量的75.0%～95.0％。

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，用流动相溶解并定量稀释制成每1ml中约含1mg的溶液，离心并用适宜的滤膜滤过，取续滤液即得。

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溶液中含硫酸根离子（SO42-）的量。

限度 含硫酸根离子（SO42-）的量不得过0.5％。

亚硝酸盐 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，加水溶解并定量稀释制成每1ml中约含8mg的溶液（放置30分钟后使用）。

对照品溶液 精密量取亚硝酸根标准溶液（100μg/ml）适量，加水定量稀释制成每1ml中约含亚硝酸根0.8μg的溶液，作为对照品贮备溶液；精密量取适量，分别用水定量稀释制成每1ml中约含亚硝酸根8ng、24ng和40ng的溶液，作为对照品溶液（1）、（2）和（3）。

色谱条件 以强阴离子交换树脂为填充剂；以1.361%醋酸钠溶液（用磷酸调节pH值至4.3）为流动相；流速为每分钟1.0ml；采用安培检测器，工作电极为玻碳电极，参比电极为银-氯化银电极，工作电位为+1.00V。进样体积25μl。

系统适用性要求 对照品溶液（2）色谱图中，理论板数以亚硝酸根峰计算不低于1000，亚硝酸根峰的拖尾因子应在0.8～1.2之间；重复进样6次，亚硝酸根峰面积相对标准偏差应小于3.0％；以对照品溶液（1）、（2）和（3）的浓度与相应的峰面积计算线性回归方程，相关系数（*r*）应大于0.995；对照品溶液（1）色谱图中亚硝酸根峰的信噪比应不小于5。

测定法 精密量取供试品溶液与对照品溶液（1）、（2）和（3），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原液中含亚硝酸根（NO2-）的量。

限度 含亚硝酸根（NO2-）的量不得过0.0005%。

注：那屈肝素钙容易阻塞固定相的结合位点，从而缩短保留时间和降低柱效，可用5.8%氯化钠溶液，以每分钟1ml的流速淋洗1小时，再用200~400ml水淋洗，使柱效得到部分恢复。

残留溶剂照残留溶剂测定法（中国药典 2020 年版四部通则 0861）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℃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，再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）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20～50μl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，再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】 抗凝血药。

【贮藏】 密封，在干燥处保存。

【制剂】 （1）那屈肝素钙注射液 （2）注射用那屈肝素钙

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