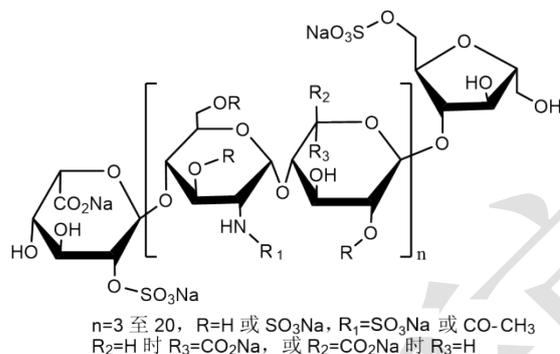


附件：达肝素钠公示稿

达肝素钠 Dagansuna Dalteparin Sodium



本品系达肝素的钠盐，是以猪小肠黏膜来源的肝素为原料，采用亚硝酸解聚的方法制得。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 2-O-硫- α -L-艾杜糖醛酸构成，还原端主要由 6-O-硫-2,5-脱水-D-甘露醇构成。本品的重均分子量为 5600~6400，峰位分子量约为 6000。每双糖单位的硫酸化程度为 2.0~2.5。按干燥品计算，本品每 1mg 的抗 Xa 因子效价应为 110~210 IU，抗 IIa 因子效价应为 35~100 IU，抗 Xa 因子效价与抗 IIa 因子效价之比应为 1.9~3.2。

【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 取达肝素钠对照品约 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 $30^\circ C$ ，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、3.28ppm、3.40ppm、5.01ppm、5.18ppm、5.22ppm 和 5.52ppm 处出现信号，其化学位移值与规定值不超过 $\pm 0.03ppm$ 。

(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 1.9~3.2。

(3) 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 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 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 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是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(V_2), V_2 与 V_1 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(SO_4^{2-})与羧酸根(COOH)的摩尔比, 应不小于 1.8。

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

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 精密量取钠元素标准溶液(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 10.5%~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 取达肝素钠对照品适量, 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 $^{\circ}$ C; 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 ± 200 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:

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

式中 RI_i 为洗脱的 i 级分的物质质量, 即示差色谱图的峰高;

M_i 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 5600~6400, 分子量小于 3000 的级分不得过总量的 13.0%, 分子量

大于 8000 的级分应为总量的 15.0%~25.0%。

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，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 \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（100 μ g/ml）适量，加水定量稀释制成每 1ml 中约含亚硝酸根 0.8 μ g 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 25 μ l。

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应不低于 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溶液中含亚硝酸根（NO₂⁻）的量。

限度 含亚硝酸根（NO₂⁻）的量不得过 0.0005%。

注：达肝素钠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 $^{\circ}$ C 减压干燥 3 小时（压力不超过 670Pa），减失重量不得过 5.0%（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 0.010 EU。

【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，加上上述缓冲液 (pH8.4) 溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.4IU (7.1lnkat) 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】 达肝素钠注射液

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