

首批依诺肝素钠国家对照品1,6-脱水衍生物含量赋值的协作研究

王悦, 李京, 范慧红* (中国食品药品检定研究院 化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要 目的: 建立首批1,6-脱水衍生物系统适用性对照品, 完善国家标准。**方法:** 以欧洲药典依诺肝素钠对照品 (EP Enoxaparin Sodium, Batch5) 为系统适用性对照品, 采用依诺肝素钠新国家标准草案“1,6-脱水衍生物”检查法, 对依诺肝素钠国家对照品 (批号: 140810-201801) 进行1,6-脱水衍生物含量测定, 由全国14个药品检验机构及依诺肝素生产企业实验室协作标定。**结果:** 对依诺肝素钠系统适用性国家对照品 (批号: 140810-201801) 1,6-脱水衍生物含量标定结果为20.3%, 并对实验室内误差进行考察, 14个实验室中有1个实验室 (Lab1) 标准差 (SD) 为1.8%, 5个实验室 (Lab2、Lab4、Lab10、Lab11和Lab13) 的SD为0.5%~0.7%, 其余8个实验室的SD值均小于0.5%。对实验室间误差进行考察, 有效数据的SD值为0.6%, 相对标准偏差 (RSD) 为3.2%。**结论:** 经国家药品标准物质委员会审定后批准, 依诺肝素系统适用性国家对照品 (批号: 140810-201801) 增加1,6-脱水衍生物含量赋值, 可以用于依诺肝素钠1,6-脱水衍生物检查系统适用性考察使用。

关键词: 依诺肝素钠; 1,6-脱水衍生物; 对照品; 国家标准; 协作标定

中图分类号: R95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7777(2022)07-0772-08
doi:10.16153/j.1002-7777.2022.07.005

The Collaborative Study on the Content Assignment of 1,6-anhydro Derivatives of the 1st Enoxaparin National Standard

Wang Yue, Li Jing, Fan Huihong* (National Institutes for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: The new draft of National standard for enoxaparin sodium has added the determination item of 1,6-anhydro derivatives. The 1st batch of 1,6-anhydro derivatives of national reference standard should be established for systematic applicability. **Methods:** The European Pharmacopoeia enoxaparin sodium reference substance (EP enoxaparin sodium, batch 5) was used as the system applicability reference substance. The national standard (batch number: 140810-201801) of enoxaparin was used to determine the content of 1,6-anhydro derivatives by the new national standard draft "1, 6-dehydrated derivatives" examination method, which was determined by 14 national drug inspection institutions and laboratories of enoxaparin manufacturers. **Results:** The content calibration result of 1,6-anhydroderivatives was 20.3% in the national standard (batch number: 140810-201801) applicable to enoxaparin sodium system, and the laboratory errors were investigated. Among

基金项目: 国家重大新药创制课题 (编号 2015ZX093030001); 学科带头人培养基金课题 (编号 2021X6)

作者简介: 王悦 Tel: (010) 53851530; E-mail: wangyue07@nifdc.org.cn

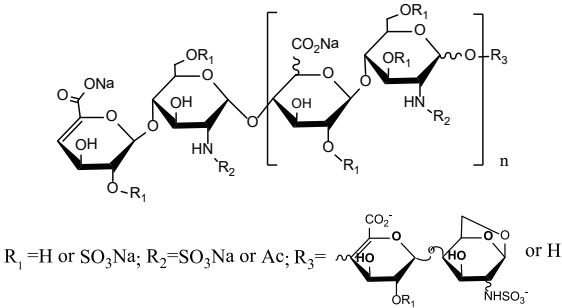
通信作者: 范慧红 Tel: (010) 53851585; E-mail: shenghuayaoshi@126.com

the 14 laboratories, the standard deviation (SD) of 1 laboratory (Lab1) was 1.8%, the SD of 5 laboratories (Lab2, Lab4, Lab10, Lab11 and Lab13) was 0.5%-0.7%, and the SD values of the remaining 8 laboratories were all less than 0.50%. When the interlaboratory errors were examined, the SD of the valid data was 0.6%, and the relative standard deviation (RSD) was 3.2%. **Conclusion:** After approval by National Drug Standard Substances Committee, the national standard applicable to enoxaparin sodium (batch number: 140810-201801) was approved to add the content assignment value of 1,6-anhydro derivatives. This national standard could be used in the test of enoxaparin 1,6-dehydrated derivatives in enoxaparin sodium Chinese national standard.

Keywords: enoxaparin sodium; 1,6-anhydro derivatives; standard; Chinese national standard; collaborative study

低分子肝素（Low Molecular Weight Heparin, LMWH）是通过酶解或化学降解等手段水解肝素后得到的产物，双糖单位是由糖醛酸（ β -D-葡萄糖醛酸，G或 α -L-艾杜糖醛酸，I）和 α -D-氨基葡萄糖（GlcN）通过1 $\rightarrow$ 4糖苷键连接而成^[1-2]。依诺肝素钠是对肝素苄基酯衍生物进行碱裂解 β -消除而获得的一种低分子肝素，结构较为复杂，其结构特

点是糖链的多数非还原端有一个4-吡喃糖醛酸的结构，有15%~25%的糖链在其还原端有特征双环结构（1,6-脱水葡萄糖和1,6-脱水甘露糖，1,6-脱水衍生物的双环结构，见图1）^[3-5]。这一结构与其抗凝活性相关^[6-7]，也是其区别于其他品种低分子肝素的特征性指标，可以用于对依诺肝素钠进行特征性鉴别^[8]。



名称	结构
Δ I S	Δ UA2S-GlcNS6S
Δ II S	Δ UA-GlcNS6S
Δ III S	Δ UA2S-GlcNS
Δ IV S	Δ UA-GlcNS
Δ I A	Δ UA2S-GlcNAc6S
Δ II A	Δ UA-GlcNAc6S
Δ III A	Δ UA2S-GlcNAc
Δ IV A	Δ UA-GlcNAc
1,6-anhydro Δ I S	Δ UA2S-GlcNS-1,6-anhydro
1,6-anhydro Δ II S (epi)	Δ UA-GlcNS-1,6-anhydro
1,6-anhydro Δ I S- I S ^{epi}	Δ UA2S-GlcNS6S-IdoA2S-ManNS-1,6-anhydro
Δ II A - IV S _{glu}	Δ UA-GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S
Δ II A- II S _{glu}	Δ UA-GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S6S

Δ U-unsaturated uronic acid; GlcA-glucuronic acid; IdoA-iduronic acid; GlcN-glucosamine; ManN-mannosamine; Ac-acetyl group; S-sulfo groups。

图 1 依诺肝素钠结构^[3]

美国药典(The United States Pharmacopoeia, USP) 42版^[9]、欧洲药典(European Pharmacopoeia, EP) 10.0版^[10]收录了该项检查,我国依诺肝素钠国家标准草案也收录了该项检查,目前已经在国家药典委员会网站上进行了公示,即将实施。由于该检查前处理步骤和色谱分离、定性均较为复杂,需要系统适用性样品对结果的可靠性进行评估。目前我国尚未建立依诺肝素钠1,6-脱水衍生物含量系统适用性对照品,结合依诺肝素钠国家标准草案中其他项目和已经发放的国家对照品情况,经专家讨论,认为可以在国家依诺肝素钠对照品现有用途基础上增加1,6-脱水衍生物含量值。本试验在全国范围内征集协作标定实验室,进行1,6-脱水衍生物含量协作研究。协作标定目的除了准确赋值,还要通过对协作标定大数据的统计分析,考察对照品在实际应用中的适用性、标准限度的合理性、试验的影响因素以及试验误差等。

本研究确定了我国首批依诺肝素钠1,6-脱水衍生物含量,这是我国多糖类药物中首个用于糖链精细结构确定的对照品,对多糖类药物结构控制有重要指导意义。我国是肝素产业和出口大国,该研究对肝素类物质控水平的提高有积极的促进作用。

1 参加实验室

从有意愿参加协作研究的实验室中挑选了14家经验丰富的实验室,其中5家是省级药品监管机构下设的检测机构,9家为制药企业,所以共有14组数据参与计算,下文中按14个实验室进行随机编号。

2 标定方案

实验仪器、色谱柱和水解酶等试验材料的品牌和规格未进行严格规定。试验方法按照依诺肝素钠国家药品标准征求意见稿中方法进行测定,并按照方法中的系统适用性要求进行控制,系统适用性对照品采用欧洲药典依诺肝素钠对照品,测定结果以算术平均值计算14家协作单位的计算结果,作为最终赋值。

3 材料

3.1 欧洲药典依诺肝素钠对照品(EP-CRS)

欧洲药典依诺肝素钠对照品(EDQM Enoxaparin sodium CRS 批号:5.0),包装为棕色西林瓶,内容物为白色粉末,1,6-脱水衍生物标示

值:21.5%,重均分子量:4480Da,约200 mg,每个实验室1支。

3.2 依诺肝素钠国家对照品待标品(CHP-CRS)

依诺肝素钠肝素国家对照品待标品,批号140810-201801^[11],包装为棕色西林瓶,内容物为白色粉末,约300 mg,每个实验室4支。

4 方法

4.1 试验条件

采用混合肝素酶溶液对糖链进行酶解,然后用硼氢化钠溶液进行还原,酶解和还原后的产物经阴离子交换色谱进行分离和定量计算。

4.2 系统适用性要求

每个实验室以EP-CRS为系统适用性对照品,考察酶解及分离准确度,EP-CRS测定结果应符合试验操作中系统适用性要求,1,6-脱水衍生物含量测定值应在标示值 $\pm 1.5\%$ 范围内,满足上述2个要求后方可进行当天CHP-CRS的测定。

4.3 日间差异和样品间差异考察

为考察日间差异及样品间差异,应在4天内对4支持标品进行试验,每次试验CHP-CRS均需新开一支,新鲜配制溶液测定,由于本试验样品前处理操作步骤复杂,CHP-CRS从酶解操作开始平行制备2份样品。EP-CRS可制备成溶液分装保存,每次试验使用分装后的对照品溶液,EP-CRS可制备1份。每份CHP-CRS和EP-CRS均需平行进样2针。若系统适用性未通过,当天试验数据不参与统计计算。

4.4 进样顺序

试验的进样顺序可参考表1,或使用各实验室习惯使用的进样方式。

表1 参考进样序列表

样品	进样次数
blank	2
EP-CRS	1
CHP-CRS_sample1ASAL	2
CHP-CRS_sample2	2
EP-CRS	1

5 结果与讨论

5.1 参加实验室使用的硬件

14个实验室使用了17台配有紫外检测器的液相色谱仪进行了依诺肝素钠1,6-脱水衍生物的测定,其中5个实验室使用Agilent液相色谱仪及软件进行测定,5个实验室使用Waters液相色谱仪及软件进行测定,4家实验室使用岛津(Shimadzu)液相色谱仪进行测定,各有1个实

验室分别使用赛默飞和戴安液相色谱仪及软件进行测定。使用JMP10统计软件对两种仪器测定的同一样品1,6-脱水衍生物结果进行单因子方差分析,由于赛默飞和戴安液相色谱仪都仅有1家实验室使用,数据代表性不够,因此剔除。 p 值为0.7410(大于0.05),结果没有显著性差异。Agilent液相色谱仪及软件计算结果的标准差(SD)略大(见图2)。

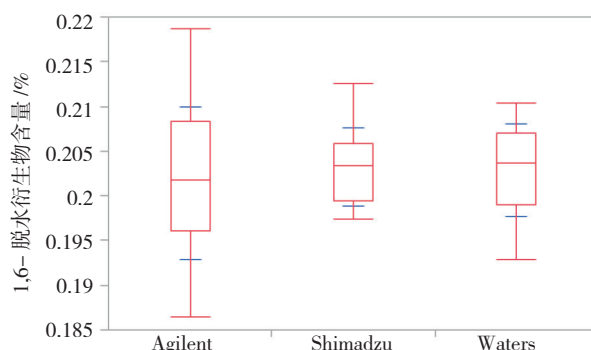
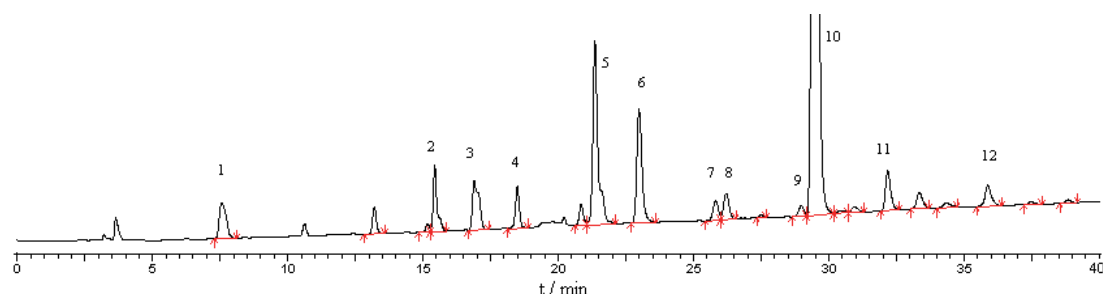


图2 采用不同仪器测定 CHP-CRS 1,6-脱水衍生物箱线图

5.2 参加实验室使用的色谱柱

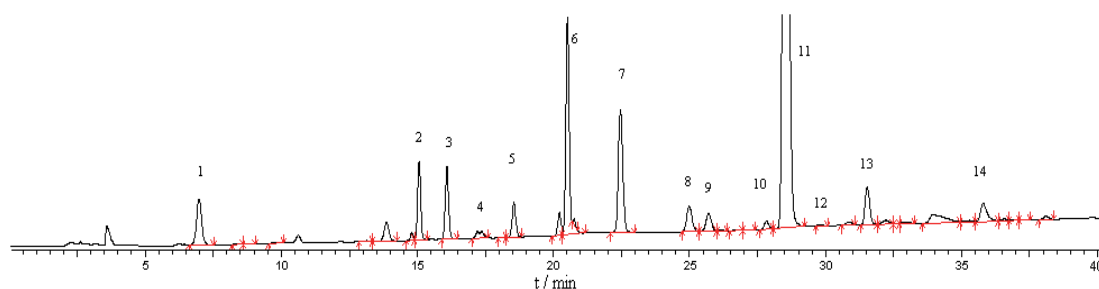
依诺肝素钠多糖糖链的结构复杂,水解后对色谱分离有较大挑战,需要有较好分离效果的色谱柱,才能保证最终结果的准确程度(见图3~4)。本次协作标定未对色谱柱品牌型号进行明确要求,以对目前各生产企业实际使用的色谱柱进行评估。14个实验室均使用Waters Spherisorb 5 μ m SAX 250 mm型号色谱柱完成了本次分析工作,包括4.0 mm和4.6 mm 2个内径规格,配同规格预柱,其中使用4.0 mm内径色谱柱的实验室有9家,使用4.6 mm内

径色谱柱的实验室有5家。使用JMP10统计软件对2种内径色谱柱测定的同一样品1,6-脱水衍生物结果进行Welch分析, p 值为0.4361(大于0.05),结果没有显著性差异。4.6 mm内径SD大于4.0 mm(图5)。在统计各实验室色谱柱和实验条件时发现,部分使用4.6 mm内径色谱柱的实验室进行了流速的修正,而部分实验室则没有进行流速修正,可能会对分离效果产生一定影响,提示在试验过程中,应根据所使用色谱柱的不同对流速等试验条件进行调整,以达到最好的分离效果。



1. Δ IV A; 2. Δ IV S; 3. Δ II A+1,6-anhydro II S; 4. Δ III A; 5. Δ II S; 6. Δ III S; 7. 1,6-anhydro Δ I S; 8. Δ I A; 9. Δ II A-IV S glu; 10. Δ I S; 11. Δ II A-II S glu; 12. 1,6-anhydro I s-I s。

图3 对照品溶液1色谱图(酶解后)



1. reduced Δ IV A; 2. reduced Δ IV S; 3. reduced Δ II A; 4. 1,6-anhydro Δ II S; 5. reduced Δ III A; 6. reduced Δ II S; 7. reduced Δ III S; 8. reduced Δ I A; 9. 1,6-anhydro Δ I S; 10. reduced Δ II A - IV S glu; 11. reduced Δ I S; 12. Δ I S; 13. reduced Δ II A - II S glu; 14. 1,6-anhydro Δ I S - I S。

图4 对照品溶液2色谱图(还原后)

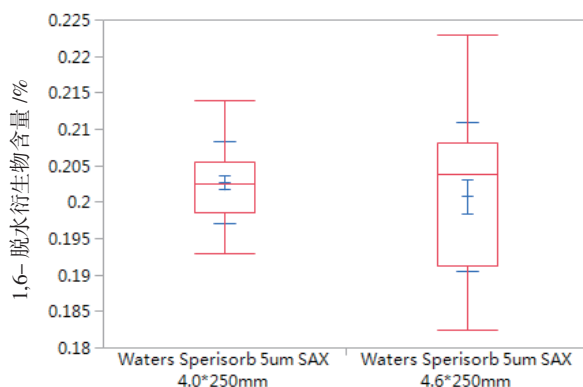


图5 采用不同色谱柱测定 CHP-CRS 1,6-脱水衍生物箱线图

5.3 系统适用性试验

欧洲药典依诺肝素钠对照品 (EDQM Enoxaparin sodium CRS 批号: 5.0) 1,6-脱水衍生物标示值: 21.5%, 重均分子量为4480Da, 欧洲药典依诺肝素钠对照品的1,6-脱水衍生物测定结果应在标示值 $\pm 1.5\%$ 范围内。除此以外, 由于该试验包括了酶解、还原等复杂的前处理步骤和分离步骤, 除了要满足上述要求外, 对于酶解效果、还原效果和色谱分离度还需分别满足以下系统适用性要求: 对照品酶解后的色谱图(图2)中1,6-脱水 Δ I S- I S与1,6-脱水 Δ I S色谱峰面积比不得过1.15; 对照品溶液(图3)和供试品溶液(还原后)色谱图中, Δ I S和还原 Δ I S的峰面积比不得过0.02; 还原 Δ I A和1,6-脱水 Δ I S色谱峰分离度不得小于1.5。在4天的重复试验里, 14家参与实验室中Lab1和Lab8均有1天未满足对照品酶解后的色谱图中1,6-脱水 Δ I S- I S与1,6-脱水 Δ I S色谱峰面积比的系统适用性要求; Lab8 4天试验的还原1,6-脱水

Δ I A峰与1,6-脱水 Δ I S峰分离度均未满足要求; Lab1、Lab8 4天试验和Lab10 1天试验未满足对照品1,6-脱水衍生物测定值在标示值 $\pm 1.5\%$ 范围内的要求。可见, 该试验的主要问题集中在分离和酶解2个步骤, 尤其是酶解步骤, 是影响试验结果的重要因素。依诺肝素钠的1,6-脱水衍生物含量首先需要使用复合肝素酶将复杂糖链进行水解, 再对酶解后的产物进行后续处理和分析^[12], 所以酶的活力就显得至关重要^[13-14]。目前市面上肝素酶的种类较多且各厂家间的生产工艺也有所不同^[15], 本次试验未指定肝素酶来源, 各实验室均按照日常使用习惯选择肝素酶进行试验。14家实验室共使用了5个来源的肝素酶进行试验, 其中4个为市售肝素酶, 1个为企业自制肝素酶。统计发现, 对照品测定值出现不满足要求结果的Lab1、Lab8和Lab10使用的肝素酶均来自同一家肝素酶企业, 提示不同企业的肝素酶活力或稳定性有所区别。因此, 在试验前应对肝素酶活力进行确认, 或适当延长酶解时间, 以满足

酶解要求。

5.4 依诺肝素钠国家对照品 (批号140810-201801)

1,6-脱水衍生物含量标定

各实验室4天的标定结果见表3, 图5。表3中列出了每个试验4支供试品的试验结果均值和各实验室结果平均值。对实验室内误差进行考察, 14个实验室中有1个实验室 (Lab1) 标准差 (SD) 为1.8%, 5个实验室 (Lab2、Lab4、Lab10、Lab11和Lab13) 的SD值为0.5%~0.7%, 其余8个实验室的SD值均小于0.5%。对实验室间误差进行考察, 剔除未通过系统适用性的相应数据, SD值为0.6%, 相对标准偏差 (RSD) 为3.2%。使用JMP10对结果进

行统计分析, 将Lab1、Lab8和Lab10未通过系统适用性测试的相应天数数据均予以剔除, 最终参与计算的47个数据点符合正态分布, 依诺肝素钠国家对照品 (140810-201801) 1,6-脱水衍生物标定最终结果为20.3%。

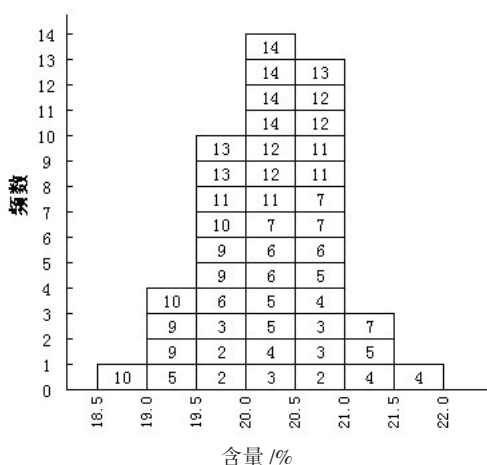
5.5 稳定性考察

于试验开始的第0天、5天、10天分别将CHP-CRS置于30℃、80%RH的恒温恒湿箱中放置, 在第10天全部取出, 分别作为短期稳定性10天、5天、0天样品, 并测定其1,6-脱水衍生物含量, 0天、5天、10天样品的含量分别为20.3%、20.6%、20.5%, 说明在该条件下该结构含量没有发生变化。

表3 依诺肝素钠国家对照品 (批号 140810-201801) 1,6-脱水衍生物标定结果

实验室编号	瓶 1	瓶 2	瓶 3	瓶 4	平均值	SD	RSD
1	18.24*	22.30*	20.83*	19.20*	20.14*	1.80	8.9
2	19.09	19.79	19.58	20.89	19.84	0.68	3.4
3	20.68	20.30	19.86	20.55	20.35	0.33	1.6
4	20.88	21.40	21.86	20.24	21.09	0.65	3.1
5	20.61	20.27	20.49	21.26	20.66	0.40	1.9
6	20.77	20.41	20.46	19.88	20.38	0.37	1.8
7	20.76	21.04	20.73	20.42	20.74	0.31	1.5
8	19.95*	20.08*	19.75*	19.94*	19.93*	0.16	0.8
9	19.65	19.29	19.42	19.83	19.55	0.32	1.6
10	19.05	18.83	19.88	18.64*	19.10*	0.52	2.7
11	20.13	20.54	20.27	19.86	20.20	0.51	2.5
12	20.92	20.62	20.35	20.46	20.59	0.24	1.2
13	20.54	19.41	19.58	19.76	19.82	0.57	2.9
14	20.12	20.33	20.40	20.18	20.25	0.12	0.6
合并计算	平均值: 20.3% (95% 均值置信区间: 20.1% ~ 20.4%)						
	实验室间 SD: 0.006, RSD: 3.2%						

注: * 为未通过系统适用性的相应数据, 未参与总均值的计算。



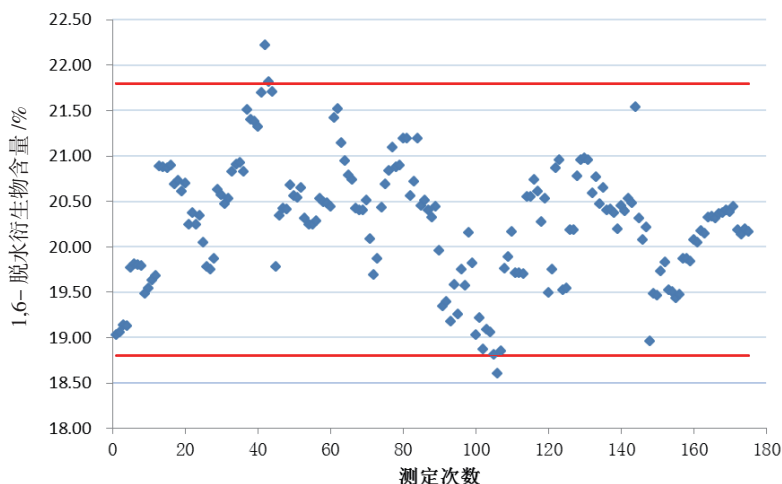
注：图中每一个方块表示一天的测定结果均值，方块中的数字为实验室代号。

图5 依诺肝素钠国家对照品(批号 140810-201801) 1,6-脱水衍生物测定结果频数图

5.6 误差分析

依诺肝素钠国家标准草案1,6-脱水衍生物检查项的系统适用性也要求对照品溶液1,6-脱水衍生物测定结果应符合标示值 $\pm 1.5\%$ 范围，我们对此次协作标定的174个有效数据结果进行了统计，

详见图6，只有1家实验室的2个数据点落在本次标定值 $\pm 1.5\%$ 范围（18.8%~21.8%）外，说明多数实验数据是可以满足该系统适用性要求的，标示值 $\pm 1.5\%$ 范围的系统适用性要求是合理的。



注：图中一个数据点代表一次独立进样计算结果。

图6 依诺肝素钠协作标定结果分布图

6 结论

经国家药品标准物质委员会审定后批准，依诺肝素系统适用性国家对照品（批号：140810-201801）增加1,6-脱水衍生物含量赋值，1,6-脱水衍生物含量值为20.3%，可以用于依诺肝素钠1,6-脱水衍生物检查系统适用性考察使用。目前，依诺肝素钠国家标准草案中的系统适用性要求标示值

$\pm 1.5\%$ 范围的系统适用性要求是合理的。

致谢：衷心感谢参与协作标定实验室：江苏省食品药品监督检验研究院、广东省食品药品检验所、山东省食品药品检验研究院、四川省食品药品检验检测院、常州千红生化制药股份有限公司、南京健友生化制药股份有限公司、杭州九源基因工程有限公司、东营天东制药有限公司、深圳市天道医药有限

公司、北京双鹭药业股份有限公司、苏州二叶制药有限公司、成都百裕制药股份有限公司、烟台东诚药业集团股份有限公司（上述实验室排序与文中实验室代号顺序不同）。

参考文献：

- [1] Zhang C, Tang F, Zhang J, et al. Uncovering the Detailed Mode of Cleavage of Heparinase I Toward Structurally Defined Heparin Oligosaccharides[J]. *Int J Biol Macromol*. 2019 Dec 1;141:756–764. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.260. Epub 2019 Aug 31. PMID: 31479666.
- [2] Xu X, Li D, Chi L, et al. Fragment Profiling of Low Molecular Weight Heparins Using Reversed Phase Ion Pair Liquid Chromatography–electrospray Mass Spectrometry[J]. *Carbohydr Res*, 2015, 407: 26–33.
- [3] 王悦, 李京, 李颖颖, 等. 高效阴离子交换色谱法测定依诺肝素钠1,6-脱水衍生物含量[J]. *中国药学杂志*, 2014, 49 (16) : 1461–1466.
- [4] Giuseppe Mascellani, Marco Guerrini, Giangiacomo Torri, et al. Characterization of di- and Monosulfated, Unsaturated Heparin Disaccharides with Terminal N-sulfated 1,6-anhydro- β -D-mannosamine residues[J]. *Carbohydr Res*, 2007, 342 (6) : 835–842.
- [5] Rahul G Ingle, Aayush S Agarwal. A World of Low Molecular Weight Heparins (LMWHs) Enoxaparin as a Promising Moiety—A review[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 106: 148–153.
- [6] Marco Guerrini, Stefano Elli, Davide Gaudesi, et al. Effects on Molecular Conformation and Anticoagulant Activities of 1,6-Anhydrosugars at the Reducing Terminal of Antithrombin-binding Octasaccharides Isolated from Low-molecular-weight Heparin Enoxaparin[J]. *J. Med. Chem*, 2010, 53: 8030–8040.
- [7] 祝贺, 吕友晶, 韩现伟, 等. 不同1,6-酐衍生物依诺肝素钠结构及其抗凝血活性比较[J]. *药学学报*, 2014, 49 (7) : 1049–53.
- [8] 张筱红, 任连杰, 余立, 等. 依诺肝素钠的质量控制思路[J]. *中国新药杂志*, 2012, 21 (11) : 1200–1202.
- [9] USP42-NF37[S]. 2019: 6531–6537.
- [10] EP10.0[S]. 2020: 2502–2504.
- [11] 李京, 王悦, 宋玉娟, 等. 首批低分子肝素相对分子质量国家对照品的建立[J]. *中国药学杂志*, 2020, 55 (10) : 824–837.
- [12] Chen L, Ouyang Y, Yan N, et al. Comprehensive Analysis of Heparinase Derived Heparin-products Using Two-dimensional Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2021, 643: 462049.
- [13] Bhushan I, Alabbas A, Sistla JC, et al. Heparin Depolymerization by Immobilized Heparinase: A Review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 99: 721–730.
- [14] Wu J, Zhang C, Mei X, et al. Controllable Production of Low Molecular Weight Heparins by Combinations of Heparinase I/II/III[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 101: 484–492. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.052. Epub 2013 Sep 23. PMID: 24299802.
- [15] 朱梦, 李笃信, 杨凯歌, 等. 不同来源肝素酶I对依诺肝素钠降解作用的研究[J]. *药物分析杂志*, 2020, 40 (7) : 1254–1261.

（收稿日期 2022年3月1日 编辑 肖妍）