依诺肝素钠注射液质量分析及一致性评价

李春焕，咸瑞卿，薛维丽，由鹏飞，张乃斌*
（山东省食品药品检验研究院，山东省仿制药一致性评价工程技术研究中心，
国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室，山东济南 250101）

摘要：目前依诺肝素钠注射液没有统一的药典标准，属于存在安全性风险的品种，因此对其进行质量监督至关重要。连续 3 年对该产品进行跟踪检验，抽样范围广，样品规格全，代表性强，能较好地反映全国依诺肝素钠注射液的质量现状。在日常监督抽验的基础上，结合国家评价性抽验已有的研究成果，该研究总结了 8 家生产企业的 200 余批样品质量现状，评估了不同企业依诺肝素钠注射液的质量差异。此外，首次考察了国内企业产品与原研制剂的质量一致性，以及首次对比分析了在中国市场、美国市场和欧洲市场上市的原研制剂质量，为质量标准提升及临床用药安全提供参考。通过调研、按现行法定标准检验以及探索性研究，结合现行标准的科学性、合理性综合分析，发现依诺肝素钠注射液仍然存在质量标准不统一、个别企业处方与生产工艺不一致以及一些其他问题。因此，现行质量标准仍存在缺陷，需进一步统一和完善。

关键词：依诺肝素钠注射液；质量分析；一致性评价；质量标准
中图分类号：R944.1^{+}1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2023)02-0243-11
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.02.013

Quality Analysis and Consistency Evaluation of Enoxaparin Sodium Injection

LI Chunhuan, XIAN Ruiqing, XUE Weili, YOU Pengfei, ZHANG Naibin*
(*National Medical Products Administration (NMPA) Key Lab. for Research and Evaluation of Generic Drugs, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Consistency Evaluation of Generic Drugs, Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101*)

ABSTRACT: At present, there is no uniform standard for enoxaparin sodium injection in the pharmacopoeia, and enoxaparin sodium injection belongs to the species with safety risks. Therefore, it is very important to supervise its quality. A follow-up inspection of the product for 3 consecutive years was carried out. The sampling range was wide, the sample specifications were complete, and the representativeness was strong, so the inspection results could better reflect the quality status of enoxaparin sodium injection nationwide. According to the daily supervision and sampling test, combined with the existing research results of national evaluation sampling test, the quality status of more than 200 batches of samples from 8 manufacturers was summarized in this paper, and the quality difference of enoxaparin sodium injection from different enterprises was evaluated. In addition, the quality consistency between the products of domestic enterprise and reference listed drug (RLD) was inspected for the first time; and the quality of RLD marketed in the Chinese market, the US market and the European market was also compared and analyzed for the first time, so as to provide references for the improvement of quality standards and the safety of clinical medication. Through investigations, inspections according to current legal standards, and exploratory research, combined with the comprehensive analysis of the scientificity and rationality of the current standards, it was found that enoxaparin sodium injection still had inconsistencies in quality standards, inconsistencies between prescription and production processes in individual enterprises, and other problems. Therefore, the current quality standards still have defects and need to be further unified and improved.

Key Words: enoxaparin sodium injection; quality analysis; consistency evaluation; quality standard

依诺肝素（enoxaparin，**1**）是常用的低分子肝素（low molecular weight heparin，LMWH）类药物，活性作用位点为独特的 1,6- 脱水环状（二环）结构，使其具有区别于其他 LMWH 的药理学特性，半衰期比其他 LMWH 长、生物利用度比其他 LMWH 高、抗Ⅹ a 因子与抗Ⅱ a 因子的效价高于其他 LMWH[1]。依诺肝素钠（enoxaparin sodium，**2**）注射液作为一种新型且临床常用的 LMWH 类药物，因具有较好的抗凝血和抗血栓疗效、较低的出血危险，是目前所有 LMWH 类药物中较畅销的品种，已在全球多地上市销售[2—5]；在临床上主要用于预防静脉血栓形成，治疗已形成的深静脉血栓及肺栓塞，预防血液透析体外循环时血栓的形成，与阿司匹林联用治疗不稳定型心绞痛和非 Q 波心肌梗死等[6]。但 **2** 注射液在使用过程中也暴露出很多缺点，如剂量个体差异大，存在自发性出血倾向，停药后血栓易复发，产生皮疹或全身过敏、血小板减少症、转氨酶升高、骨质疏松等不良反应[7—8]，属于存在安全性风险的品种，而其目前在国内并没有统一的药典标准，各企业均执行注册标准。因此，**2** 注射液在 2019 年被纳入国家评价性抽验。

在国家评价性抽验工作中，本课题组不仅对抽验的 156 批样品进行了法定检验和探索性研究，而且首次考察了国内企业产品与原研制剂（reference listed drug，RLD）的一致性，以及首次对在中国、美国和欧洲市场上市的 RLD 质量进行了对比分析；同时在 2020—2021 年对比分析了新上市的 **2** 注射液与 RLD 的质量。通过连续 3 年对该产品的跟踪检验，本课题组对发现问题进行了深入研究和总结，为制订和统一质量标准提供参考依据。

1　执行标准及抽样情况

通过国家药品监督管理局数据库查询，目前 **2** 注射液共有国内生产企业 8 家，涉及 20 个批准文号，5 个规格；进口企业 1 家，涉及 7 个注册证号，5 个规格，该进口企业在国内的分装企业 1 家，涉及 2 个批准文号，2 个规格。目前国内上市的 **2** 注射液及其原料药均执行企业注册标准。

近 3 年，通过国家评价性抽验以及日常监督抽验和注册检验，共检验 **2** 注射液样品 200 余批，抽验样品来源覆盖 27 个省（区、市），来自：经营企业（34.0%）、医疗机构（52.6%）和生产企业（13.5%），抽样范围大，样品规格全，代表性强，能较好地反映全国范围内 **2** 注射液的质量现状。此外，还抽取了在中国、美国和欧洲市场上市的 RLD 来进行对比分析和一致性评价，其中中国市场 17 批、美国市场 2 批、欧洲市场 1 批，上述市场上市的 RLD 商品名、生产商、规格和批号如表 1 所示。

表 1　不同市场上市的 RLD 商品名、生产商、规格和批号

Tab.1　Trade Names, Manufacturers, Specifications and Batch Numbers of RLD in Different Markets

商品名	生产商	市场	规格	批号
克赛	赛诺菲（北京）制药有限公司	中国	0.4 mL：4 000 Axa IU	7S1EJ
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S464
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S566
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S395
			0.4 mL：4 000 Axa IU	7S13J
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S424
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S673
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S542
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S144
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S597
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S362
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S598
			0.6 mL：6 000 Axa IU	8S868
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S586
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S982
			0.4 mL：4 000 Axa IU	8S095
			0.4 mL：4 000 Axa IU	7S858
Lovenox	Sanofi-Aventis U.S. LLC	美国	0.4 mL：40 mg	8L09AC
			0.6 mL：60 mg	8LU65A
Clexane	Sanofi Winthrop Industrie	欧洲	0.4 mL：40 mg	6CL12A

2　法定检验结果及发现的问题

2.1　法定检验结果

2019—2021 年，按照各企业注册标准对国家评价性抽验样品以及日常监督抽验和注册检验样品进

收稿日期：2022-03-31

作者简介：李春焕（1991—），女，硕士，主管药师，从事药品检验工作。

通信作者：张乃斌（1988—），男，硕士，主管药师，从事药品检验工作。

E-mail：286588454@qq.com

行检验，所有项目均符合规定，合格率为100%。

2.2 法定检验发现的问题

2.2.1 质量标准不统一

在法定检验工作中发现质量标准不统一，各标准在检验项目、检验方法、限度要求上均存在较大差异，影响各企业产品质量评价的准确性。通过对各质量标准对比发现，国内各企业质量标准中的检验项目除覆盖美国药典（USP 42）、欧洲药典（EP 10.0）和英国药典（BP 2019）的检验项目外，且增加了个别鉴别或检查项目，方法及限度基本一致。但部分项目存在一定差异，需要完善和统一。

对于**2**原料药，在“鉴别”项下，除国家药典委员会官方网站公布的依诺肝素钠征求意见稿（2017）[以下简称“征求意见稿（2017）”]外，各质量标准均收载了^{13}C NMR鉴别；国家食品药品监督管理总局标准YBH02262016（“Y”开头的均为原国家食品药品监督管理总局颁布的企业质量标准）还收载了红外光谱鉴别。在检查项下，与征求意见稿（2017）相比，YBH0072013中有“吸收系数”“吸光度”检查；YBH00052014和YBH02262016有“苄索氯铵”检查；YBH01122015收载了“残留铵”检查；USP 42及EP 10.0均无“残留溶剂”检查项。“分子量与分子量分布”项下，各标准均采用分子排阻色谱法，但所用流动相、对照品、检测器类型、限度要求不同；“效价”项下，各标准均采用生色底物法，限度一致，但在实验操作上有所不同，如缓冲液种类、试剂加入量、可信限率规定等存在差异。**2**的上述质量标准比较结果如表2所示。

对于**2**注射液，各标准“鉴别”项中的设置有所差异，征求意见稿（2017）、BP 2019及两家企业标准均未收载硫酸鱼精蛋白沉淀反应，USP 42未收载钠盐鉴别反应。检查项下，各企业标准中对“澄清度与颜色”规定高于征求意见稿（2017）；YBH00692013还增加有“吸收系数”“钠含量”等检查项，YBH02232016、YBH04982006和YBH00362015均缺少“游离硫酸盐”检查项。“分子量与分子量分布”项下，各标准均采用分子排阻色谱法，但所用流动相、对照品、检测器类型、限度要求不同。BP 2019收载了有关物质检查（硫酸皮肤素和硫酸软骨素等），其他标准中均未收载。“效价”项下，各标准均采用生色底物法，抗Ⅹa因子效价限度均一致，除JX20140211规定抗Ⅱa因子效价为2 000～3 500 IU/mL外，其他标准均规定抗Ⅹa因子与抗Ⅱa因子效价比值为3.3～5.3；且在实验操作上，缓冲液种类、试剂加入量、可信限率规定等存在差异。**2**注射液的上述质量标准比较结果如表3所示。此外，各标准对贮存、有效期及规格的描述等也不统一。由此可见，该品种的质量标准亟待统一和完善。

2.2.2 现行标准可行性及制剂原料药投料问题

个别企业标准存在可行性问题，如某家企业注射液的质量标准对“钠含量”的描述为“按所含低分子量肝素钠计应为11.3%～13.5%”，而在检验中按照标示量（1 mL ∶ 100 mg）或按照效价测定结果折算成**1**质量（10 000 u ∶ 100 mg）计算时，其钠含量均低于限度。之后与该注册标准的复核单位沟通，了解到此项检查需按照企业实际生产投料量计算，随后向企业索取了近2年所有批次产品的投料数据，根据实际投料量计算对应批次的钠含量，结果均符合规定。由此可见，该法需要企业提供投料量数据，表明其可行性和合理性存在问题。在对上述问题的分析中发现，该企业的获批处方为100 mg/mL，而企业提供的投料数据显示约为85 mg/mL。通过制剂中钠含量折算，也进一步证实了该企业实际投料量约为85 mg/mL，提示该企业原料药效价偏高，实际生产中依据效价投料。

2.2.3 效价比偏低

效价比是影响该产品有效性的关键质量属性，各标准限度均为3.3～5.3，但在法定检验过程中发现，RLD及部分国内企业产品的效价比均接近低限，平均值约3.5，远低于限度中值，存在不合格及不良反应增加的风险，需进一步研究出现该异常现象的原因。

3 探索性研究试验

根据调研和法定检验中发现的问题，重点从安

表 2　2 质量标准的比较

Tab.2　Comparison of Quality Standards for **2**

项目[1)]	质量标准									
	征求意见稿(2017)	USP 42	EP 10.0	BP 2019	YBH00132013	YBH0072013	YBH00052014	YBH02262016	YBH01122015	YBH00522014
鉴别	①效价比 3.3 ～ 5.3；②最大吸收 231 nm，吸收系数 14.0 ～ 20.0；③钠盐鉴别	①最大吸收(231±2)nm；② ^{13}C NMR 鉴别；③效价比 3.3 ～ 5.3；④分子量与分子量分布；⑤钠盐鉴别	① ^{13}C NMR 与对照品一致；② 1,6- 脱水衍生物，15%～25%；③分子量与分子量分布	① ^{13}C NMR 与对照品一致；② 1,6- 脱水衍生物，15%～25%；③分子量与分子量分布	①最大吸收 231 nm，吸收系数 14.0 ～ 20.0；② ^{13}C NMR 与对照品一致	①硫酸鱼精蛋白沉淀；② ^{13}C NMR 与对照品一致；③最大吸收(231±2)nm；④效价比 3.3 ～ 5.3；⑤显钠盐鉴别(2)反应	①最大吸收 231 nm；② ^{13}C NMR 与标准品一致；③效价比 3.3 ～ 5.3；④钠盐鉴别(1)反应	①红外鉴别；②钠盐鉴别焰色反应；③ ^{13}C NMR 鉴别	①硫酸鱼精蛋白沉淀；②钠盐鉴别焰色反应；③最大吸收 231 nm；④ ^{13}C NMR 鉴别；⑤效价比 3.3～5.3	① ^{13}C NMR 与对照品一致；②最大吸收 231 nm；③效价比 3.3 ～ 5.3；④钠盐鉴别(2)反应
吸收系数	14.0～20.0	—	14.0～20.0	14.0～20.0	14.0～20.0	14.0～20.0	14.0～20.0	14.0～20.0	14.0～20.0	14.0～20.0
吸光度	—	—	—	—	—	应符合规定	—	—	—	—
残留溶剂	GC 法，甲醇、乙醇和二氯甲烷	—	—	—	GC 法，甲醇、乙醇和二氯甲烷	GC 法，甲醇、乙醇	GC 法，甲醇、乙醇和二氯甲烷	GC 法，*N*,*N*- 二甲基甲酰胺、甲醇	GC 法，甲醇、乙醇和二氯甲烷	GC 法，乙醇和 *N*,*N*- 二甲基甲酰胺
苄索氯铵	—	—	—	—	—	—	HPLC法，不得过 0.1%	HPLC法，不得过0.02%	—	—
残留铵	—	—	—	—	—	—	—	—	离子色谱法，不得过 0.02%	—
分子量与分子量分布	流动相为 0.1 mol/L 乙酸铵溶液，亲水性键合硅胶色谱柱，示差折光检测器，低分子肝素分子量对照品宽分布标样；重均分子量(M_w)：3 800 ～ 5 000；相对分子质量(M)<2 000：12.0%～ 20.0%，M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%；M>8 000：≤ 18.0%	流动相为 0.5 mol/L 硝酸锂溶液，L59 色谱柱，示差折光检测器，USP 依诺肝素钠分子量测定用对照品 A 和 B；M_w：4 500，3 800～5 000；M<2 000：16%，12.0%～20.0%；M 2 000～8 000：74%，68.0%～82.0%；M> 8 000：≤18.0%	同鉴别③。流动相为 2.84% 硫酸钠溶液(pH 5.0)，多孔硅胶固定相，紫外(234 nm)+示差检测器，EP 低分子量肝素对照品；M_w：3 800 ～ 5 000；M<2 000：12.0%～ 20.0%；M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%	同鉴别③。流动相为 2.84% 硫酸钠溶液(pH 5.0)，多孔硅胶固定相，紫外(234 nm)+示差检测器，EP 低分子量肝素对照品；M_w：3 800 ～ 5 000；M<2 000：12.0%～ 20.0%；M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%	流动相为 2.84% 硫酸钠溶液(pH 5.0)，多孔硅胶固定相，紫外(234 nm)+示差检测器，低分子肝素标分子量标准品；M_w：3 800 ～ 5 000，M<2 000：12.0%～ 20.0%；M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%	流动相为 2.84% 硫酸钠溶液(pH 5.0)，多孔硅胶固定相，紫外(234 nm)+示差检测器，低分子肝素标准品，M_w：4 000 ～ 4 600，M<2 000：15.0%～ 20.0%；M 2 000 ～ 8 000：70.0%～ 76.0%，M>8 000：≤ 12.0%	流动相为 0.5 mol/L 硝酸锂，TSK 凝胶色谱柱，示差折光检测器，USP 依诺肝素钠分子量测定用对照品 A 和 B；M_w：3 800 ～ 5 000，M<2 000：12.0%～ 20.0%；M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%，M>8 000：≤ 18.0%	流动相为 0.2 mol/L 硫酸钠溶液(pH 5.0)，TSK 凝胶色谱柱，示差检测器；低分子肝素分子量测定用对照品；M_w：3 800 ～ 5 000，M<2 000：12.0%～ 20.0%；M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%	流动相为 2.84% 硫酸钠溶液(pH 5.0)，亲水改性硅胶色谱柱，紫外(234 nm)+示差检测器，低分子肝素标分子量测定用标准品；M_w：3 800 ～ 5 000，M<2 000：12.0%～ 20.0%；M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%，M>8 000：≤ 18.0%	流动相为 2.84% 硫酸钠溶液(pH 5.0)，亲水性键合硅胶色谱柱，紫外(234 nm)+示差检测器，低分子肝素分子量对照品；M_w：3 800 ～ 5 000；M<2 000：12.0%～ 20.0%；M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%

注：[1)] 各标准中“效价”项下均采用生色底物测定法。①按干燥品计算，抗Ⅹa 因子效价应为 90 ～ 125 IU/mg；②抗Ⅱa 因子效价应为 20 ～ 35 IU/mg；③抗Ⅹa 因子与抗Ⅱa 因子效价比为 3.3 ～ 5.3。

表 3　2 注射液质量标准的比较

Tab.3　Comparison of Quality Standards for **2** Injection

项目[1)]	标准									
	征求意见稿(2017)	USP 42	BP 2019	YBH02232016	YBH04982006	YBH00692013	YBH00062014	YBH00362015	YBH01132015	JX20140211
鉴别	①效价比 3.3 ～ 5.3；②最大吸收 231 nm；③钠盐鉴别	①硫酸鱼精蛋白沉淀；②最大吸收 (231±2) nm	①分子量与分子量分布；②效价比 3.3 ～ 5.3；③钠盐鉴别焰色反应	①效价比 3.3 ～ 5.3；②最大吸收 231 nm；③钠盐鉴别焰色反应	①最大吸收 (231±2) nm；②钠盐鉴别焰色反应	①硫酸鱼精蛋白沉淀；②最大吸收 (231±2) nm；③钠盐鉴别	①硫酸鱼精蛋白沉淀；②最大吸收 231 nm；③效价比 3.3 ～ 5.3；④钠盐鉴别焰色反应	①硫酸鱼精蛋白沉淀；②最大吸收 231 nm；③钠盐鉴别焰色反应	①硫酸鱼精蛋白沉淀；②最大吸收 231 nm；③效价比 3.3 ～ 5.3；④钠盐鉴别焰色反应	①硫酸鱼精蛋白沉淀；②最大吸收 (231±2) nm；③效价比 3.3 ～ 5.3；④钠盐鉴别
吸收系数	—	—	—	—	—	14.0～20.0	—	—	—	—
钠含量/%	—	—	10.2～16.9	—	—	11.3～13.5	—	—	—	—
游离硫酸盐	离子色谱法，流动相为 3.0 mmol/L 碳酸钠溶液；限度：1.2 mg/mL	离子色谱法，流动相为 3.0 mmol/L 碳酸钠溶液；限度：0.12%	—	—	—	离子色谱法，流动相为 3.0 mmol/L 碳酸钠溶液；限度：≤ 0.12%	离子色谱法，流动相为 20 mmol/L 氢氧化钠溶液；限度：≤ 0.12%	—	离子色谱法，流动相为 10 mmol/L 碳酸钠溶液；限度：≤ 0.12%	离子色谱法；流动相0.1 mol/L 乙酸铵溶液；限度：≤0.12%
分子量与分子量分布	流动相为 0.1 mol/L 乙酸铵溶液，亲水性键合硅胶色谱柱，示差折光检测器，低分子肝素分子量对照品宽分布标样；M_w：3 800 ～ 5 000，M<2 000：12.0%～ 20.0%，M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%，M>8 000：≤ 18.0%	—	—	流动相为 0.2 mol/L 硫酸钠溶液 (pH 5.0)，TSK 凝胶色谱柱，示差检测器；低分子肝素分子量测定用对照品；M_w：3 800 ～ 5 000，M<2 000：12.0%～ 20.0%，M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%	流动相为 2.84% 硫酸钠溶液 (pH 5.0)，多孔硅胶固定相，紫外 (234 nm)+示差检测器，低分子肝素标分子量标准品；M_w：3 500 ～ 5 500，M<2 000：12.0%～ 20.0%，M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 88.0%	流动相为 2.84% 硫酸钠溶液 (pH 5.0)，亲水改性硅胶色谱柱，紫外 (234 nm)+示差检测器，紫外 (234 nm)+示差检测器，低分子肝素标准品；M_w：4 000 ～ 4 600，M<2 000：15.0%～ 20.0%，M 2 000 ～ 8 000：70.0%～ 76.0%，M>8 000：≤ 12.0%	流动相 0.5 mol/L 硝酸锂，TSK 凝胶色谱柱，示差折光检测器，USP 依诺肝素钠分子量测定用对照品 A 和 B；M_w：3 800 ～ 5 000，M<2 000：12.0%～ 20.0%，M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%，M>8 000：≤ 18.0%	流动相为 2.84% 硫酸钠溶液 (pH 5.0)，亲水性键合硅胶色谱柱，紫外 (234 nm)+示差检测器，低分子肝素分子量对照品；M_w：3 800 ～ 5 000，M<2 000：12.0%～ 20.0%，M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%	流动相为 2.84%硫酸钠溶液 (pH 5.0)，亲水改性硅胶色谱柱，紫外 (234 nm)+示差检测器，低分子肝素标分子量测定用标准品；M_w：3 800 ～ 5 000，M<2 000：12.0 ～ 20.0%，M 2 000 ～ 8 000：68.0%～ 82.0%，M> 8 000：≤ 18.0%	流动相 0.1 mol/L 乙酸铵溶液，亲水性键合硅胶色谱柱，示差折光检测器，低分子肝素分子量对照品宽分布标样；M_w：3 800 ～ 5 000；M<2 000：12.0%～20.0%，M 2 000～8 000：68.0%～82.0%；M>8 000：≤ 18.0%
其他	应符合规定	应符合规定	有关物质，HPLC，硫酸皮肤素和硫酸软骨素≤ 2.0%，不得检出其他杂质	应符合规定	除可见异物外，应符规定	应符合规定	应符合规定	应符合规定	应符合规定	应符合规定

注：[1)] 对于“澄清度与颜色”项目，除征求意见稿 (2017) 中规定为“澄清无色；浅于黄色 4 号标准比色液”、USP 42 未作规定以及 BP 2019 中规定为“澄清无色；浅于 Y4 或 BY4 号标准比色液”以外，其他标准均规定为“澄清无色；浅于 1 号浊度标准液；浅于黄色 3 号标准比色液”；对于“效价”项目，除 YBH00692013 标准规定为“生色底物测定法。①抗Ⅹa 因子 90%～ 110%；②抗Ⅱa 因子效价为抗Ⅹa 因子 20.0%～ 35.0%；③抗Ⅹa 因子与抗Ⅱa 因子效价比为 3.3 ～ 5.3”以及 JX20140211 标准规定为“生色底物测定法。(1) 抗Ⅹa 因子 90%～ 110%。(2) 抗Ⅱa 因子效价 2 000 ～ 3 500 IU/mL”以外，其他均规定为“生色底物测定法。①抗Ⅹa 因子 90%～ 110%；②抗Ⅹa 因子与抗Ⅱa 因子效价比为 3.3 ～ 5.3”。

全性和仿制药与 RLD 的一致性方面入手，开展了 15 项探索性研究工作。

3.1 安全性研究

在安全性方面，作为动物来源的生化药物，首先应关注的是原料的种属来源；其次，还应重点关注工艺杂质、包材相容性和制剂稳定性。

3.1.1 种属来源研究

采用液相色谱法[9]对 7 家企业的 14 批制剂及 6 批原料药进行了六糖分析，并与 EP 标准品（猪源）进行对比，强阴离子交换（SAX）色谱图如图 1 所示。通过分析表明，不同动物来源（猪、羊）的 **2** 色谱图上 3 号色谱峰存在明显差异，羊源性样品的 3 号色谱峰与 4 号色谱峰的峰面积比小于 0.16，猪源性样品的该面积比大于 0.45。20 批样品测得的面积比均大于 0.45，推测原料均为猪来源。此外，猪、羊源性 **2** 的色谱图在 110 ～ 150 min 之间差异明显，因此借助中药指纹图谱软件对不同企业的原料药和制剂进行了分析，结果表明 7 家企业的原料药和制剂均与标准品相似性较高（≥ 0.95），也显示应为猪源性 **2**。

3.1.2 工艺杂质研究

根据对原料药生产工艺的分析，工艺中所用氯化苄极易水解生成苯甲醇，还可能在后续氧化步骤中生成苯甲醛，但现行标准均仅控制苯甲醇含量不得过 0.1%。根据各企业标准中检测苯甲醇的色谱方法，对 200 余批制剂和 6 批原料药进行检测，结果均检出苯甲醛，典型样品色谱图如图 2 所示。其中，各企业 **2** 注射液中苯甲醇含量分布在 1.1 ～ 3.2 μg/mL，均值 2.0 μg/mL；原料药中苯甲醇含量分布在 64.7 ～ 86.8 μg/g，均值 70.0 μg/g。各企业 **2** 注射液中苯甲醛含量分布在 0 ～ 6.0 μg/mL，均值 1.52 μg/mL；原料药中的苯甲醛分布在 0.6 ～ 1.9 μg/g，均值 1.0 μg/g。因此，在原料药中同时控制苯甲醇和苯甲醛总量更为合理。

3.2 一致性研究

在法定检验工作中发现，不同企业产品的关键质量属性存在差异，结合开展的注射剂一致性评价工作，选择了产品的关键质量属性进行了研究，包括结构一致性和效价一致性。

3.2.1 结构一致性研究

3.2.1.1 二糖和寡糖结构单元的研究

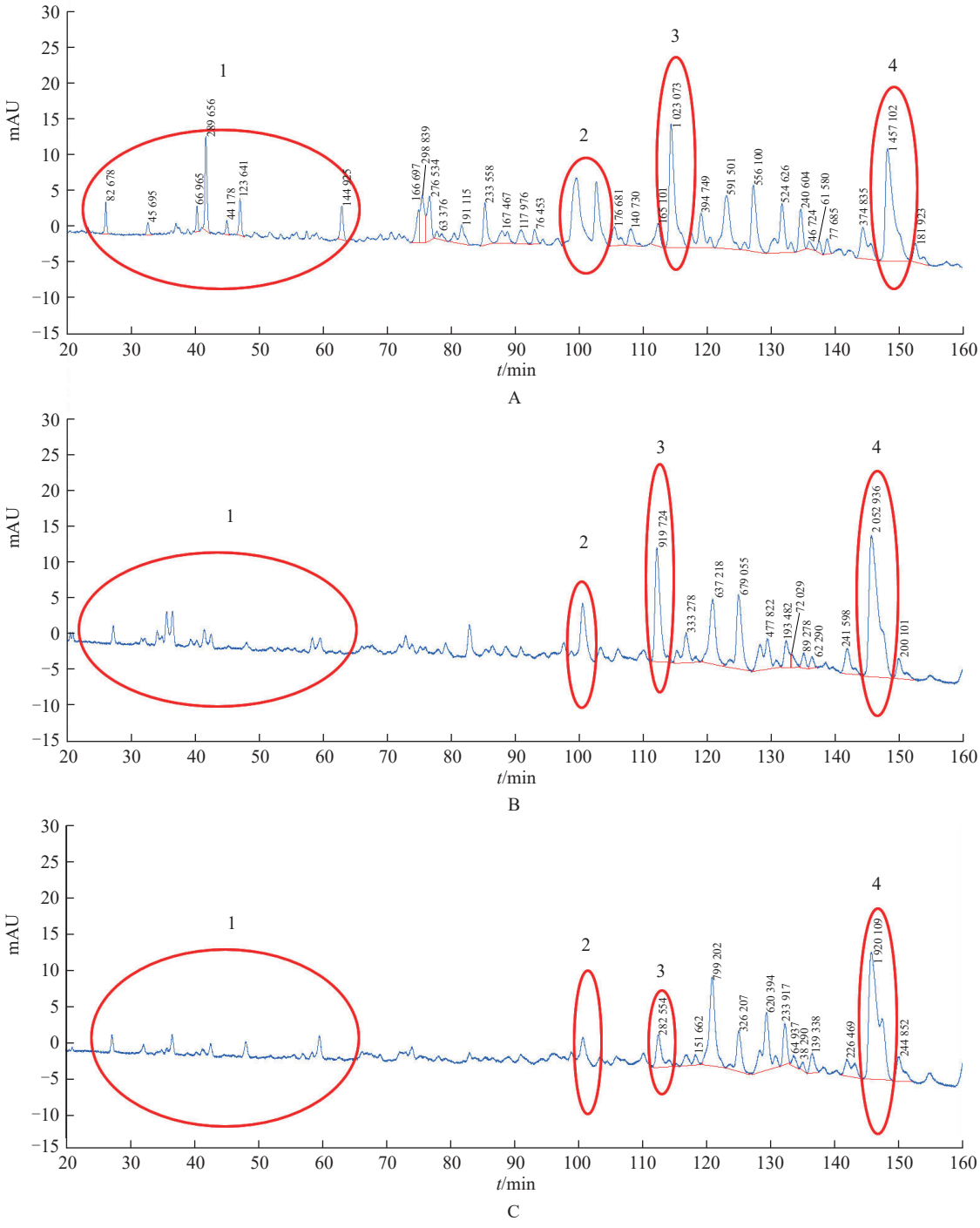
美国 FDA 提出二糖和寡糖结构单元是评价 **1** 一致性的指标之一。本研究参考文献[10—13]，使用由肝素酶Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ组成的混合酶对 **2** 进行彻底酶解，然后用亲水相互作用液相色谱 - 电喷雾质谱联用技术（HILIC-ESI-MS）对酶解产物进行定性和相对定量分析[14]。对 7 家企业共 14 批次的 **2** 注射液及 6 家企业共 6 批次的 **2** 原料药进行了分析，共鉴定出 13 种二糖和基本组成单元结构，包括 8 种不饱和二糖［ΔUA-GlcNAc（ΔIVA）、ΔUA-GlcNS（ΔIVS）、ΔUA-GlcNAc6S（ΔIIA）、ΔUA2S-GlcNAc（ΔIIIA）、ΔUA-GlcNS6S（ΔIIS）、ΔUA2S-GlcNS（ΔIIIS）、ΔUA2S-GlcNAc6S（ΔIA）和 ΔUA2S-GlcNS6S（ΔIS）］、1 种非还原端饱和的二糖结构［dp2（2*S*）NRE］、3 种还原端含 1,6- 内醚的二糖结构［Δdp2（1*S*）RE、Δdp2（2*S*）RE 和 Δdp4（5*S*）RE］和 1 种连接结构域寡糖（$Linkage_{ox}$）。**2** 注射液中各组分的提取离子流色谱图如图 3 所示。

分别对制剂和原料药进行相对定量分析，结果显示在这 13 种组分中，ΔIS 的相对含量最高，占 60%～ 65.5%，其次是 ΔIIS（13.5%～ 17.0%）和 ΔIIIS（9.0%～ 12.0%），8 种二糖的总量占鉴定到的所有组分的 93.0%～ 96.5%，是构成 **2** 的主要组成单元；dp2（2*S*）NRE 占 0.35%～ 0.55%，来源于肝素原料；1,6- 内醚是 **2** 的特征结构，本次鉴定到的 3 种还原端含 1,6- 内醚的二糖结构总量占 3.0%～ 4.5%。在生物合成过程中，肝素糖链通过连接结构域与核心蛋白上的丝氨酸相连，本次鉴定到 $Linkage_{ox}$（即 ΔUA-Gal-Gal-Xyl-*O*-Serox）占 0.3%～ 3.0%，其与生产工艺中的氧化脱色过程有关。

对企业间样品中的各组分进行对比研究，观察到有 1 家企业生产的 **2** 注射液完全酶解后的连接结构域寡糖 $Linkage_{ox}$ 高于原研及其他企业，与原料药测定结果一致，推测为 **2** 原料药氧化脱色的生产工艺有差异所致。

3.2.1.2 分子量与分子量分布的探索性研究

在结构一致性方面，还对分子量与分子量分布进行了系统比较和分析。分子量与分子量分布是 **2**

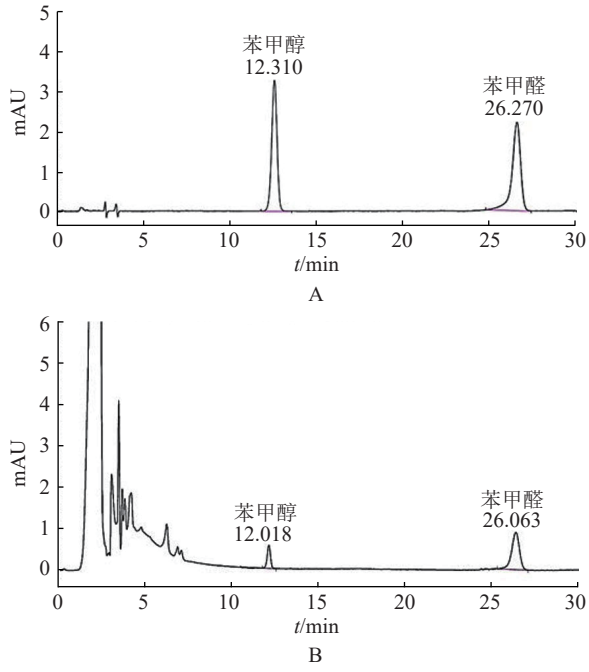


A—EP 标准品；B—自制猪源性 **2**；C—自制羊源性 **2**。

图 1　EP 标准品、自制猪源性 2、自制羊源性 2 的六糖 SAX 分析谱图

Fig.1　SAX Analysis Spectra of EP Standard Substance, Homemade **2** Derived from Pig, Homemade **2** Derived from Sheep

注射液重要的质控指标之一[15]，它与抗凝活性关系密切[16]。目前 **2** 注射液的 8 家生产企业采用不同的质量标准，各企业测定方法不一致，影响了测定结果的可比性，因此将各企业产品按照 RLD 的方法进行了检测，用来比较各企业样品分子量与分子量分布的差别，并将该结果与按各企业质量标准



A—标准品溶液（苯甲醇为 4.0 μg/mL，苯甲醛为 3.0 μg/mL）；B—样品溶液。

图 2　苯甲醇和苯甲醛的典型图谱

Fig.2　Typical Chromatograms of Benzyl Alcohol and Benzaldehyde

方法测定的结果进行比较，结果显示国内各仿制制剂采用 RLD 方法测得的 M_w 结果普遍高于法定检验结果，分子量分布也有所差异，但大部分差异不大，偏差在 2％以内，只有 1 家企业的样品差异显著，偏差为 8.0％。同时，对在美国、欧洲和中国上市 RLD 的分子量与分子量分布情况进行了对比分析，考察不同市场 RLD 的差异，结果（表 4）显示，不同市场 RLD 的分子量与分子量分布差异不大[17]。

表 4　不同市场 RLD 的测定结果

Tab.4　Determination Results of RLD from Different Markets

市场	规格/mL	M_w	M分布		
			<2 000	2 000～8 000	>8 000
中国	0.4	4 400	13.9	76.0	10.1
	0.6	4 400	13.8	75.4	10.8
欧洲	0.4	4 500	13.1	75.9	11.0
美国	0.4	4 400	13.8	75.5	10.6
	0.6	4 400	13.8	75.2	11.0

目前，各企业质量标准中该项目的检验方法以及对照品来源各不相同，导致各企业的测定结果也有所差异，因此建议参照征求意见稿（2017）尽快统一分子量与分子量分布的测定方法。

3.2.2　效价一致性研究

3.2.2.1　不同市场 RLD 的效价考察

抗Ⅹa因子效价、抗Ⅱa因子效价和抗Ⅹa因子与抗Ⅱa因子效价比是 LMWH 类产品的特征参数及重要质量控制项目。根据前期调研了解，在中

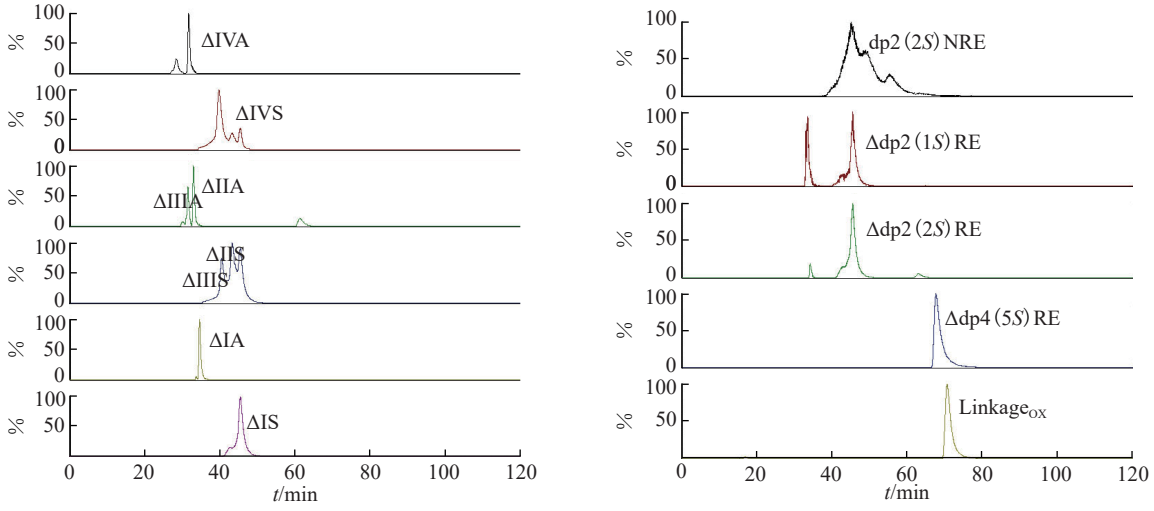


图 3　2 注射液中二糖及寡糖结构组分的提取离子流色谱图

Fig.3　Extracted Ion Chromatograms of Components of Disaccharide and Oligosaccharide Structures in **2** Injection

国、美国和欧洲上市的**2**注射液的制剂生产企业和肝素钠来源不同，可能会导致部分关键质量属性存在差异，因此收集了原研企业在美国、欧洲和中国上市的产品，以考察不同市场RLD的质量情况。效价测定结果如表5所示，可见不同市场RLD的抗Ⅹa因子效价、抗Ⅱa因子效价和抗Ⅹa因子与抗Ⅱa因子效价比并无明显差异，表明不同市场RLD的效价一致性良好。

表5 不同市场RLD的效价测定结果

Tab.5 Determination Results of the Potency of RLD in Different Markets

市场	规格	抗Ⅹa因子效价/IU	抗Ⅱa因子效价/IU	抗Ⅹa因子与抗Ⅱa因子的效价比
欧洲	0.4 mL∶40 mg	10 144	2 971	3.4
美国	0.4 mL∶40 mg	10 688	3 164	3.4
	0.6 mL∶60 mg	10 061	2 803	3.6
中国	0.4 mL∶4 000 Axa IU	10 005	2 774	3.6
	0.4 mL∶4 000 Axa IU	10 063	2 859	3.5

3.2.2.2 原研制剂与仿制药的效价对比研究

通过质量标准对比分析，RLD的效价测定方法与征求意见稿（2017）基本一致，因此统一采用RLD效价测定方法对各企业原料药和制剂进行效价测定，比较各企业原料药和制剂效价的差别，并将该结果与按各企业质量标准方法测定的结果进行比较，以考察国内各仿制制剂与RLD的差异。

国内不同企业的原料药和制剂测定结果（表6和表7）表明，与RLD比较，其中2家企业原料药抗Ⅹa因子效价偏高，各企业原料药抗Ⅱa因子效价及效价比差别比较大，3家企业制剂的效价比偏高，与RLD的一致性较差。

表6 不同企业2原料药的效价测定结果

Tab.6 Determination Results of the Potency of **2** Bulk Drug from Different Manufacturers

生产企业	抗Ⅹa因子效价/IU	抗Ⅱa因子效价/IU	抗Ⅹa因子与抗Ⅱa因子的效价比
H	100.4	30.6	3.3
C	100.4	27.8	3.6
D	117.7	32.3	3.7
F	108.5	27.8	3.9
原研	101.0	26.2	3.9

3.3 其他项目的探索性研究

此外，还进行了有关物质（苯甲醇、苯甲醛、氯化苄、苄索氯铵、残留蛋白、硫酸根）、残留溶剂（二氯甲烷、甲醇、乙醇、DMF）、重金属、钠含量、注射液吸光度以及拉曼光谱快检研究，结果显示，**2**原料药及其制剂整体质量良好。

4 发现的主要问题与建议

4.1 质量标准存在的问题

4.1.1 质量标准不统一

2原料药及注射液的现行标准均为企业注册标准。虽然国家药典委已于2017年公布了**2**原料药及注射液的征求意见稿，但目前尚未执行。不同企业质量标准在检验项目、检验方法、限度要求方面均存在较大差异，影响了不同企业产品质量之间的可比性。

4.1.2 项目设置问题

现行各企业质量标准检验项目的设置存在较大差异，个别企业质量标准存在主要项目缺失、项目

表7 不同方法测得的2注射液效价的比较结果

Tab.7 Comparison Results of the Potency of **2** Injection by Different Determination Methods

生产企业	企业标准			原研标准		
	抗Ⅹa因子效价/IU	抗Ⅱa因子效价/IU	抗Ⅹa因子与抗Ⅱa因子的效价比	抗Ⅹa因子效价/IU	抗Ⅱa因子效价/IU	抗Ⅹa因子与抗Ⅱa因子的效价比
A	10 414	2 152	4.8	10 252	2 389	4.3
B	10 256	2 754	3.7	9 991	2 964	3.4
C	10 162	2 297	4.4	10 062	2 473	4.1
D	9 984	2 785	3.6	10 075	2 693	3.7
E	10 233	2 831	3.6	10 007	2 932	3.4
F	10 025	2 168	4.6	9 842	2 258	4.4
原研	9 996	2 840	3.5	9 996	2 840	3.5

设置不合理的问题。如“游离硫酸盐”检查是表征该类产品质量和稳定性的关键质量属性，部分企业质量标准中“游离硫酸盐”检查缺项；个别企业注射液质量标准中检查项下设置了“相对密度”“吸收系数”“钠含量”“苯甲醇”等，这些检查项的必要性有待商榷。

4.1.3 检验方法问题

现行各企业质量标准中的部分检验方法存在可行性和合理性问题。如个别企业质量标准中“钠含量”检查需要企业提供对应批次 **2** 原料药的实际投料量才能计算得到，对方法的可行性、结果的准确性带来不确定因素；“游离硫酸盐”检查项目，个别企业质量标准中定量方法采用峰高法，方法的耐用性和精密度低于峰面积定量法；“分子量与分子量分布”项目，各标准均采用分子排阻色谱法，但所用流动相、对照品、检测器类型、限度要求不同，无法客观衡量不同企业产品的质量差异。

4.1.4 限度设置问题

现行各企业质量标准中的相同检验项目的限度存在不统一和合理性问题。如注射液“效价”项下未规定抗Ⅱa因子效价范围，效价比范围设置的合理性有待商榷；装量限度各企业标准不一致等。

4.2 原辅料、处方与生产工艺中存在的问题

4.2.1 原辅料

2 制剂的生产工艺简单，辅料对产品质量影响较小，加强对该品种原料药的控制是保障制剂质量的基础。收集到的各企业原料药及制剂的效价比结果均低于限度中值，多数接近下限，其中存在的风险需引起关注。通过对原料药的种属来源进行研究，虽未发现其他非猪源性成分，但根据调研发现存在非猪源性或非小肠黏膜来源原料药的风险，因此应加强原料药来源监管。

4.2.2 处方与生产工艺

有 1 家企业 **2** 注射液的获批处方是按照 **1** 质量进行投料，其规格标示为 mL ： mg，而该企业质量标准对含量限度的规定是依照 **2** 效价来制定的。由于原料药实际效价（约 118 IU）大于理论效价（100 IU），因此在实际生产过程中，企业为确保含量符合要求，降低了 **2** 原料药的投料量。以生产 1 000 mL 药液计，批准的生产处方中 **2** 投料量为 100 g，而其实际批生产处方中约为 85 g。因此，以 **2** 质量计，其批准处方与实际生产处方的投料量差异较大。

4.3 存在的其他问题

4.3.1 产品包装说明书中的规格描述不规范

有 2 家企业的产品包装说明书中的规格采用原料药质量标示（mL ： mg）；实际产品均以抗Ⅹa因子效价投料，因此规格应以效价标示（mL ： Axa IU）。

4.3.2 欠缺效价测定用 **2** 标准品

USP 已收载效价测定用 **2** 标准品，但国内 **2** 效价测定多采用低分子肝素标准品，尚无国产效价测定用 **2** 标准品。

4.3.3 产品效价比接近限值低限

RLD 及部分国产仿制药的抗Ⅹa因子与抗Ⅱa因子效价比均接近限值低限，存在不合格及不良反应增加的风险。

4.3.4 仿制药工艺尚需优化

个别国内仿制药在效价、分子量与分子量分布等部分关键质量属性方面与 RLD 存在差异，需优化原料药的生产工艺。

5 解决问题的建议

通过连续 3 年对该产品的检验工作，建议尽快统一和完善质量标准；对于企业，建议规范产品规格，进行合理的质量一致性评价；对于监管部门，建议组织对 RLD 效价比均接近低限的情况进行溯源分析，深入了解其原料来源或工艺变更对该关键质量属性的影响，进一步进行风险评估，确定是否需要进行限度修订；建议监管部门继续加强对肝素类产品原料来源的检查。

参考文献：

[1] 林剑萍. 依诺肝素的临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2011, **5**(20): 65-66.

[2] 李　京, 王　悦, 宋玉娟, 等. 低分子肝素注射剂质量评价[J]. 药物分析杂志, 2013, **33**(10): 1768-1773.

[3] 李志敏, 马志华, 杜旭召, 等. 依诺肝素钠宽分布相对分子质量对照品研制[J]. 食品与药品, 2015, **17**(3): 153-

156.

[4] 金 飞, 徐飞虎, 王彦广. 依诺肝素钠的制备与纯化[J]. 中国医药工业杂志, 2008, **39**(1): 15-17.

[5] 陈敬恒, 黄杰中, 陈凯奇, 等. 血府逐瘀汤联合依诺肝素钠注射液预防人工全髋关节置换术后下肢DVT形成的临床疗效观察[J]. 中国现代药物应用, 2021, **15**(11): 220-222.

[6] 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.

[7] 陈 霞, 谭 兵. 低分子肝素致不良反应69例文献分析[J]. 中国药房, 2013, **24**(20): 1898-1900.

[8] 庞利珍, 郑芸颖, 杨 辉. 依诺肝素钠注射液导致全身皮疹的迟发型过敏反应[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, **36**(3): 344-350.

[9] ZHANG F, YANG B, LY M, *et al*. Structural characterization of heparins from different commercial sources [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, **401**(9): 2793-2803.

[10] 祝 贺, 吕友晶, 韩现伟, 等. 不同1,6-酐衍生度依诺肝素钠结构及其抗凝血活性比较[J]. 药学学报, 2014, **49**(7): 1049-1053.

[11] 张 震. 低分子肝素的结构确证研究[J]. 中国新药杂志, 2014, **23**(8): 901-905.

[12] 姬胜利, 桑 青, 张天民. 肝素的来源控制、结构分析以及结构与生物活性关系的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2012, **47**(9): 660-663.

[13] 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.

[14] LIU X, St. ANGE K, LIN L, *et al*. Top-down and bottom-up analysis of commercial enoxaparins [J]. *J Chromatogr A*, 2017, **1480**: 32-40.

[15] 李文茂, 马志华, 张 惠, 等. 低分子肝素分子量及其分布测定准确性影响因素探讨[J]. 亚太传统医药, 2014, **10**(2): 19-20.

[16] 李 京, 范慧红. 低分子肝素相对分子质量与抗凝活性关系研究[J]. 中国新药杂志, 2007, **16**(2): 1695-1697.

[17] 由鹏飞, 薛维丽, 杭宝建, 等. 依诺肝素钠注射液分子量与分子量分布比较研究[J]. 药学研究, 2021, **40**(6): 374-376.

(上接第242页)

[14] 张青铃, 罗友华, 许光辉, 等. 干法制粒工艺在中药口服固体制剂制备中的应用[J]. 中国现代中药, 2020, **22**(5): 827-834.

[15] 吴 梅, 王优杰, 张继全, 等. 响应面法优化藿苓生肌颗粒安慰剂干法制粒工艺研究[J]. 上海中医药大学学报, 2019, **33**(5): 61-66.

[16] 孙爱国. 干法制粒工艺及设备若干问题的探讨[J]. 机电信息, 2011, (17): 43-45.