


肝素类药物 质量控制概述

Gansulei Yaowu Zhiliang Kongzhi Gaishu

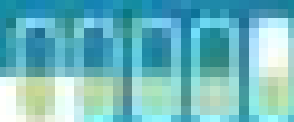


石峰 巩丽萍 咸瑞卿 编著

 江西科学技术出版社

肝素类药物 质量控制概述

General Quality Control Methods of Heparin Drugs



目录 第一章 概述 第二章 原料药的检测 第三章 制剂的检测



中国医药出版社

图书在版编目(CIP)数据

肝素类药物质量控制概述 / 石峰, 巩丽萍, 咸瑞卿
编著. — 南昌: 江西科学技术出版社, 2022. 11
ISBN 978-7-5390-8331-5

I. ①肝… II. ①石… ②巩… ③咸… III. ①肝素拮
抗药-质量控制 IV. ①R973

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2022)第 176524 号

国际互联网(Internet)地址:

<http://www.jxkjcs.com>

选题序号:ZK2022308

肝素类药物质量控制概述

石峰 巩丽萍 咸瑞卿 编著

出版 江西科学技术出版社
发行 江西科学技术出版社
社址 南昌市蓼洲街2号附1号
邮编:330009 电话:(0791)86615241 86623461(传真)
印刷 北京虎彩文化传播有限公司
经销 各地新华书店
开本 787mm×1092mm 1/16
字数 309千字
印张 16.75
版次 2022年11月第1版
印次 2022年11月第1次印刷
书号 ISBN 978-7-5390-8331-5
定价 69.00元

赣版权登字-03-2022-233

版权所有,侵权必究

(赣科版图书凡属印装错误,可向承印厂调换)

《肝素类药物质量控制概述》编委会

主 编：石 峰 巩丽萍 咸瑞卿

副主编：由鹏飞 刘 毅 冷佳蔚 杭宝建 韩 莹

编 委：(按姓氏笔画排序)

王夙博 王聪聪 李春焕 陈 晓 张迅杰

张乃斌 杨明正 贺美莲 姜树银 常 涛

薛维丽

前 言

肝素类药物是目前临床使用最广泛的抗凝血、抗血栓药物,主要分为肝素和低分子量肝素两大类。肝素也称为未分级肝素,是一种结构复杂的天然糖类高分子聚合物,已有 90 余年的临床应用历史。低分子量肝素是基于肝素的抗凝活性构效关系,以肝素为母体开发的新一代肝素类药物,其单糖成分、取代方式和寡糖序列结构特征与肝素相近,但抗血栓作用更强,且具有皮下注射吸收良好、生物利用度高、体内半衰期长、出血倾向小等优点,已逐渐成为最具临床价值的肝素类药物。

肝素是糖类药物中最复杂的物质,属于糖胺聚糖家族,主要以天然动物组织为来源。来源的不可控性和结构组成的复杂性给肝素类药物的质量控制带来了巨大挑战。药用肝素在 2008 年曾经发生过导致 100 多例患者死亡的全球性药害事件,之后也陆续出现过其他质量安全问题。因此,肝素类药物的质量控制一直是医药领域关注的重点。近年来,随着新型分析仪器和检测技术的开发应用,极大促进了肝素类药物的质量标准完善和质量控制水平提升。

本书在简述肝素类药物的历史沿革、品种分类、药理作用、生产工艺、临床应用等方面的基础上,重点对比分析了国内外肝素类药物的质量标准,剖析了不同肝素类药物的关键质量属性,介绍了色谱分离技术(液相色谱、气相色谱、离子色谱)、电泳技术(薄膜电泳、凝胶电泳、毛细管电泳)、红外光谱技术、核磁共振、质谱技术以及其他分析技术在肝素类药物质量控制领域的应用。本书对肝素类药物的质量控制具有积极的指导意义,

可供肝素类药物研发、生产、监管、检测技术人员参考。

本书在编写过程中得到了山东省食品药品检验研究院、山东省食品药品审评查验中心及国药控股北京天星普信生物医药有限公司的大力支持。由于编者水平有限,本书难免存在不妥和错误之处,恳请广大读者批评指正。

编 者

2022年8月8日

目 录

第 1 章 肝素类药物概况	1
1.1 肝素类药物的历史沿革	1
1.1.1 肝素的发现	1
1.1.2 肝素的结构解析历程	2
1.1.3 肝素抗凝机制	4
1.1.4 肝素的品种分类	6
1.1.5 “肝素钠”事件与肝素药物质量监控	14
1.2 肝素类药物的生产工艺	20
1.2.1 未分级肝素	20
1.2.2 低分子量肝素	28
1.3 肝素类药物的药理学作用及临床应用	39
1.3.1 药理作用	39
1.3.2 药代动力学	47
1.3.3 给药方式	49
1.3.4 临床应用	51
1.3.5 副作用及其防治	59
1.3.6 肝素用药实例	64

第2章 肝素类药物质量控制标准	78
2.1 肝素及其制剂质量标准比较	78
2.1.1 肝素钠原料及注射液质量标准比较	78
2.1.2 质量标准对比评价	83
2.2 依诺肝素钠及其制剂质量标准比较	83
2.2.1 质量标准对比评价	93
2.3 那屈肝素钙及其制剂质量标准比较	93
2.3.1 现行国内外标准对比分析	102
2.4 达肝素钠及其制剂质量标准比较	102
2.4.1 达肝素钠	109
2.4.2 达肝素钠注射液	109
2.5 其他肝素类药物质量标准比较	110
2.5.1 国内低分子量肝素类药物	111
2.5.2 国外其他低分子量肝素	119
2.5.3 低分子量肝素类药物的质量控制	119
2.5.4 低分子量肝素类关键项目检测方法研究	125
第3章 肝素类药物质量控制关键技术	130
3.1 质谱技术在肝素质量控制中的应用	130
3.1.1 质谱简介	130
3.1.2 肝素结构	139
3.1.3 肝素结构质谱分析策略	142
3.1.4 质谱在肝素与蛋白相互作用中的研究	167
3.2 核磁技术在肝素类药物质量控制中的应用	173
3.2.1 核磁共振技术简介	173
3.2.2 低分子量肝素的 ¹ H NMR 和 HSQC 谱	178

3.2.3	核磁共振在肝素类药品标准领域的应用	188
3.2.4	肝素钠中污染物 OSCS 的测定技术进展	193
3.3	色谱技术在肝素类药物质量控制中的应用	195
3.3.1	高效液相色谱法在肝素类药物质量控制中的应用	196
3.3.2	气相色谱法在肝素类药物质量控制中的应用	209
3.3.3	离子色谱法在肝素类药物质量控制中的应用	213
3.3.4	其他类型色谱技术在肝素类药物质量控制中的应用	218
3.4	其他分析技术在肝素质量控制中的应用	229
3.4.1	生色底物法测定肝素类药物抗 Xa 因子和抗 IIa 因子效价	230
3.4.2	全自动血凝仪测定肝素类药物抗 Xa 因子和抗 IIa 因子效价	234
3.4.3	聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定肝素类药物相对分子质量	244
3.4.4	多角度激光光散射仪法测定肝素类药物相对分子质量	246
3.4.5	紫外-可见分光光度法测定肝素类药物吸光度和残留蛋白	247
3.4.6	原子吸收分光光度法测定钠含量	250
3.4.7	近红外一致性模型建立对肝素类药物的质量控制	253
3.4.8	拉曼光谱法定性模型建立对肝素类药物的质量控制	255

第 1 章 肝素类药物概况

1.1 肝素类药物的历史沿革

肝素是一种结构复杂的天然糖类高分子聚合物药物。肝素作为最古老的药物之一，目前仍广泛应用于临床，用于抗凝血以及预防血栓形成，同时还有抗炎、抗动脉粥样硬化、抗病毒、抗哮喘、调整血脂浓度和抗过敏等生物学功效。

1.1.1 肝素的发现

肝素的故事开始于 1916 年第一次世界大战期间，就读于巴尔的摩的约翰·霍普金斯大学 (Johns Hopkins University) 医学院二年级学生 McLean 在导师 Howell 的指导下，从哺乳动物组织中分离出了一些抑制凝血的成分。正是这一典型的科学界常见的“意外发现”，开启了肝素类药物的百年抗凝历史。

McLean 出生于 1890 年，11 岁时，他的理想是成为一名基于生理学的外科医生。为此，他在 1914 年从加州大学伯克利分校 (University of California, Berkeley) 毕业后，完成了第一年的医学学习。在没有被约翰·霍普金斯大学正式录取的情况下，他去了巴尔的摩。正是这个决定，一份幸运降临到年轻的 McLean 身上——医学院二年级的一个职位突然空出来了。为了坚持他早先的理想，McLean 找到 Howell 教授，申请进入他的实验室进行为期一年的科学问题的研究。Howell 教授接受了他的申请并派他从不同组织中分离、纯化和检测血液中潜在促凝物质——脑磷脂 (cephalin)。

在 1916 年发表的文章中，McLean 得到的结果与 Howell 先前发表的结果完全一致，这一结论证实了观察到的血栓形成是由脑磷脂而不是杂质引起的。此外 McLean 根据各种实验方案从大脑、心脏和肝脏中制备各种磷脂，还获得了其他研究人员制备的不同磷

脂,通过血凝实验发现,并不是所有的磷脂都有促凝活性,心磷脂(cuorin)和肝磷脂(heparphosphatide)在凝血实验中表现出了抗凝的活性,其中心磷脂诱导的凝血时间是心脏脑磷脂的120倍,是溶剂对照(水)的40倍。尽管McLean没有公布使用肝磷脂获得的数据,但是他在肝脏来源的脑磷脂和肝磷脂中也观察到了类似的发现。

McLean分离心脏和肝脏中促凝血作用磷脂的方法与Howell最初用于分离脑磷脂的方法一致。简单地说,最终的产物是用有机溶剂从组织中提取出来的。来源于心脏和肝脏的组织经过乙醚的萃取,萃取液经热(60℃)乙醇沉淀,脑磷脂可溶于热乙醇,而心磷脂和肝磷脂则形成沉淀。在McLean发表的《关于肝素发现的回忆》中,他描述了Howell对自己发现天然抗凝血酶的可能性所表示的怀疑态度,因为他正在分离磷脂,所以他发现的潜在未知物质不太可能是抗凝血酶。McLean用多批次的肝磷脂和多次测试的实验结果证实了加入肝磷脂的猫血不会发生凝血。McLean的执着最终引起了Howell对这种抗凝成分的注意,在McLean的论文发表后的第二年,Howell就公开了他目前在血液凝固方面的发现。他重点讲述了McLean发现的提取物的抗凝现象,并对这一现象做出假设。此时他只是认为这种具有抗凝活性的物质是一种区别于抗凝血酶的“抗凝血酶原”。

Howell在McLean毕业后继续对这种抗凝物质进行研究,并在另一名医学生Emmett Holt的帮助下,用有机试剂从狗的肝脏中提取出这种抗凝物质,并在2018年发表的论文中首次提出“肝素”这个名词。尽管在这份报告描述中他们还没有证明肝素在血液中的存在,但他们推测肝素是一种天然成分,其生理功能是维持血液的流动性。

由于早期肝素的提取工艺是依赖于有机试剂,肝素一直被认为是一种磷脂,直到Howell提出了分离肝素的改进方案,并进行了一系列的活性评价。他没有使用有机试剂,而是使用水作为提取试剂,并用丙酮沉淀,即为首个肝素粗品。根据新方案分离出来的肝素不含氮和磷,但含有葡糖醛酸和硫酸钙,是一种碳水化合物。用这种方法制备的肝素纯度更高,生物学上更有效,其抗凝活性是有机试剂提取的肝素的50~100倍。

McLean于1916年分离的具有抗凝血活性的物质严格来说并不是“肝素”,但是,正如Jaques在一篇关于肝素发现的文章中所指出的那样,科学发现通常归属于其研究能引导新技术成功开发与应用的个人。McLean的论文使后人能够详细地了解导致肝素发现的各种实验活动,并为随后解释这一现象直至“肝素”的最终发现铺平了道路。总之,肝素的发现发生在Howell的实验室,开始于McLean对某些磷脂抑制凝血活性的观察。如果将发现肝素的功绩完全归于McLean,将削弱Howell和他的同事们理解McLean观察到的抑制现象而进行的工作所应得的认可。

1.1.2 肝素的解析历程

肝素最初是由Mclean分离得到的抗凝物质,被认为是一种磷脂。20世纪20年代,

随着 Howell 对提取工艺的改进,认识到磷脂对肝素来说其实是杂质成分。1928 年,Howell 确定肝素是一种含硫的糖类。对于肝素的化学结构,1959 年 Charles 和 Best 这样总结:“肝素是一种复杂的高度硫酸化的多糖,葡糖醛酸和氨基葡萄糖的摩尔比是 1:1。与黏液素或硫酸软骨素不同,肝素分子结构中的氨基不是游离的,也没有乙酰化,而是 N-硫酸化。”在这 30 年间,肝素化学研究的进展并不是一帆风顺的,例如,虽然 Howell 于 1928 年就提出肝素含糖醛酸,但 Charles 和 Scott 提出了不同意见,因为当时肝素的糖醛酸检测呈阴性。

1935 年,瑞典卡罗林斯卡研究所的 Jorpes 鉴定出肝素的主要糖结构是糖醛酸和己糖胺,摩尔比是 1:1,分子结构中的硫酸基含量约占总量的 40%。Jorpes 是第一个认识到硫酸基团是肝素分子重要特征的学者,并计算出每个双糖单位含 2.5 个硫酸基。但由于当时无法确认糖醛酸和己糖胺的具体结构,Jorpes 当时认为他所分离的物质是一种硫酸软骨素,他也假设肝素是均一的化合物,其结构可能是三硫酸软骨素。虽然 Jorpes 的最终结论并不正确,但他的研究正确鉴定了肝素的基本结构单位是由糖醛酸和己糖胺组成的硫酸化二糖;己糖胺后被 Jorpes 和 Bergström 鉴定为葡萄糖胺(Bergström 后因发现和分离前列腺素而被授予诺贝尔奖)。约 20 年后,肝素精细结构的复杂性和不均一性才被理解,再约 25 年后,肝素抗凝作用的分子机制才被揭示。

肝素的结构解析中存在的两个难点之一是多年来人们都认为肝素是一种结构唯一的单一化学物质。20 世纪 30 年代,Jorpes 认为肝素中的氨基己糖是 N-乙酰化的。1950 年 Jorpes 等提出,肝素中葡萄糖胺残基大多是 N-硫酸化的,N-乙酰化者仅占 10%。因为当时很难接受同一分子中同时存在 N-乙酰基和 N-硫酸基的观点,Jorpes 认为 N-乙酰基是由于污染所致。1940 年 Charles 等也指出肝素分子结构中每个四糖含有 5 个硫酸基。

肝素分子糖醛酸成分鉴定尤为困难。由于肝素耐酸水解,水解时不得不用相当剧烈的方式,这随之破坏了大部分释出的糖醛酸。20 世纪 30 年代,Howell 和 Jorpes 已推测肝素的糖醛酸成分是葡糖醛酸,但 1946 年前都未能提供确凿证据。1946 年,Wolfrom 和 Rice 设计了新的水解条件,保护了释出的糖醛酸,才鉴定出了肝素的 D-葡糖醛酸结构。

1962 年,Cifonelli 和 Dorfman 在肝素的酸水解产物中发现了 L-艾杜糖醛酸。随后,Lindahl 等和 Perlin 等也证实了这一点。随着分析问题的能力的不断提高,最终证明艾杜糖醛酸才是肝素中主要的糖醛酸。

20 世纪 50—70 年代的系列研究确定了氨基葡萄糖和糖醛酸的连接键构型及连接位置。艾杜糖醛酸和葡萄糖胺残基通过 α -1,4 键与糖链中相邻糖残基相连,葡糖醛酸

则通过 β -1,4 键与相邻糖残基连接。

1976 年,Johnson 和 Mulloy 证实了肝素结构的不均一性(heterogeneity),并确定了肝素的分子量范围是 5000~35000。Rosenberg 的研究团队对肝素与抗凝血酶(antithrombin, AT)的混合物进行蔗糖密度梯度离心,发现仅三分之一的肝素随 AT 一起迁移,约三分之二的肝素仍保留在原地。Lindahl 的研究团队利用固定化 AT 将肝素分为高亲和性成分和低亲和性成分,发现高亲和性成分几乎表现出了所有的抗凝活性,低亲和性成分只有很小的抗凝活性。尽管高、低亲和性成分在化学组成上没有明显差异,但以上发现提示肝素分子中必然存在一种特异性序列,使高亲和性成分与 AT 结合。

1980 年,Lindahl 及其同事与 Leder 合作阐明了肝素与 AT 高亲和力结合所必需的 3 位 O-硫酸基团。Lindahl 等的研究最终确证,肝素与 AT 结合的特异五糖序列为 GlcNAc(6S)/GlcNS(6S)-(1 \rightarrow 4)-GlcA-(1 \rightarrow 4)-GlcNS(3S)/GlcNS(3S,6S)-(1 \rightarrow 4)-IdoA(2S)-(1 \rightarrow 4)-GlcNS(6S)。该序列是肝素发挥抗凝血活性的关键位点(图 1-1)。

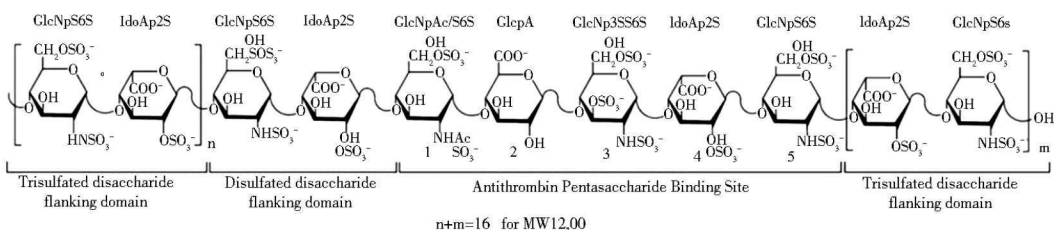


图 1-1 肝素的代表性结构

1983 年 Choay 等合成出了肝素独特的五糖结构,这是肝素发展史上的又一个里程碑式事件。

1.1.3 肝素抗凝机制

早在 1925 年,Howell 就认识到肝素需在某种血浆共因子存在时才能发挥抗凝作用,但并不了解此共因子的性质。20 世纪 30 年代后期,曾报道过肝素共因子与血浆中天然存在的 AT 有关,直到 20 世纪 60 年代,Abildgaard 纯化出抗凝血酶 III(AT III),并指出它与血浆共因子是同一种物质。为更准确了解肝素的抗凝机制,先认识一下血液凝固系统。

1.1.3.1 凝血系统

凝血系统在血液流动性(血液在血管内自由流动的能力)和凝固性(减少血液在局部血管区域的流动的能力)之间保持着一种复杂的平衡。为了保持这种平衡,必须对促凝血和抗凝血成分进行严格的控制。这是通过复杂的相互作用的细胞、凝血因子、辅助因子和其他介质,涉及一系列正反馈和负反馈及前馈相互作用。

凝血网络负责调节凝块中纤维蛋白成分的形成和随后的降解。它表现为凝血因子在非活性状态下保持静息循环,当系统受到刺激时,这些凝血因子很容易被激活。传统理论中,凝血活化和级联反应在理论上分为外在途径和内在途径:①组织因子(tissue factor,TF)刺激外在通路。②凝血因子XII与带负电荷的表面接触触发内在通路。这两条通路在X因子处汇聚成一条共同通路,并通过纤维蛋白原凝血酶催化纤维蛋白的关键反应及其随后的交联形成血凝块的骨架。凝血系统的一个重要特征是它能够放大损伤信号,导致损伤部位迅速生成纤维蛋白,然而凝血级联反应必须受到控制,以防止血管全部闭塞或凝块延伸到非受伤区域,导致严重的血栓并发症。抗凝血酶III(ATIII)和肝素辅助因子II(heparin cofactor,HCII)是影响血液流动性的两个关键抗凝机制,提供了血浆总凝血酶抑制能力的70%。由于这些抑制剂是肝素介导的抗凝血作用的主要靶点,因此需要对其生物活性进行更详细的讨论。

1.1.3.2 抗凝血酶III

ATIII是丝氨酸蛋白质超家族中的一员,分子量约为55kDa,具有许多结构和生物化学特性。AT最初在1905年被确定为降低血液凝固活性的物质。随后在1939年描述了肝素的AT依赖性抗凝血活性;然而直到1946年才出现了一种测定AT活性的方法,使AT的研究能够在临床研究和实践中进行。随后进行了大量的研究,并增加了我们目前对这种关键抗凝剂活性的理解。

AT通过形成化学计量(1:1)复合物来发挥其抗凝血活性,从而使凝血系统中几个关键的活化凝血因子失活。形成的络合物的共价性质意味着它对还原剂和变性剂是稳定的。

AT的主要失活靶点是IIa,而AT是IIa的主要抑制剂。IIa作为凝血系统的产物和关键调节剂,其严密精确的调控对平衡止血至关重要。血液中IIa的清除要么通过与内皮细胞受体结合随后内化,要么通过形成一种不活跃的IIa抑制剂复合物从血液中迅速清除。

因子Xa是AT灭活的凝血系统共同通路的另一个关键产物。因子Xa与活化因子V(Va)形成一种复合物,与活化血小板的膜磷脂结合,在凝血酶原激活中起主要作用,称为凝血酶原复合物。IIa也是在凝血酶原复合物之外产生的,但速度要慢得多。

由AT引起的凝血因子失活速率可以用二级动力学描述。值的差异可能是由于测试在不同的反应条件下,不同的试剂效力,或不同的蛋白质摩尔质量用于计算反应速率常数。例如,发现纤维蛋白原可能通过竞争机制降低AT:IIa复合体的二级速率常数,而血小板则增加该常数。

1.1.3.3 肝素辅助因子 II

HC II 是另一种血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂,与 AT 大约有 30% 的同源性。它在 1967 年首次被描述,并被确定为具有类似 AT 的活性,但是具有电泳迁移慢的特征。免疫测定法能够敏感、特异地测定 HC II 的浓度。相比之下,酰胺水解试验相对较为复杂,需要一个初步步骤从血浆中去除 AT,但是它们能够提供更多关于 HC II 生理活性的信息。与 AT 不同的是,HC II 对 IIa 有特异性抑制作用,但是不抑制其他凝血因子。HC II 介导的 IIa 抑制机制与 AT 相似。HC II 在经硫酸皮肤素(在动脉和静脉壁的细胞外间质中发现最丰富的糖胺聚糖,是血管非血栓性特性的主要贡献者)激活后中和凝血酶中发挥重要的生理作用。此外,HC II 杂合缺陷是血栓性疾病的轻微危险因素(文献中没有明确的纯合缺陷病例报道)。

HC II 与 IIa 形成化学计量比 1:1 的非活性络合物。与 AT 反应一样,反应遵循二级动力学,在纯体系中测得的数值为 $1.5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5 \text{ mol/L} \cdot \text{min}$ 。HC II 在血浆中的正常浓度为 $0.92 \sim 1.24 \mu\text{mol/L}$ ($61 \sim 82 \text{ mg/L}$)。测定健康志愿者¹²⁵I 标记的 HC II 半衰期为 2.5 天。非活性的 HC II - IIa 复合物能被肝脏迅速从血液中清除。

1.1.4 肝素的品种分类

肝素广泛分布与哺乳动物组织中,比如心、肺、肝、脾、肾、胸腺、胎盘、肌肉、血液和肠黏膜等,所有肝素制剂都是多分散线性聚合物,因此他们的分子量不能用单一的数字来描述,表示肝素分子量分布最常用的参数为重均分子量(M_w)。从动物组织中提纯的肝素又叫做普通肝素或者未分级肝素(UFH),由 UFH 经过加工获得的更小分子量的肝素为低分子量肝素。

1.1.4.1 未分级肝素

(1) 肝素钠

肝素钠是一种具有抗凝血、抗血栓形成特性的原料药,提取过程中由 UFH 分子与钠盐结合而成,主要由 UFH 分子发挥作用。肝素在提取过程中极易与钠结合形成肝素钠,肝素钠是从新鲜健康的猪小肠黏膜中提取并制成肝素钠粗品,粗品种还含有病毒、残余的蛋白质杂质、核酸类物质以及一些黏多糖物质,效价较低,同时含有较多杂质而不能直接用于临床,需对肝素钠粗品进一步除杂提纯,去除部分参与的杂质,该过程称为肝素钠的精制。肝素钠粗品经精制制成为肝素钠精品,即肝素钠原料药。肝素钠原料药一方面可以直接制成标准肝素钠制剂应用于临床治疗,也可以进一步加工制成低分子量肝素钠原料药,在制成低分子量肝素钠制剂供使用。

肝素钠注射液为其主要剂型,为国家基本药物,国内生产企业有 20 家,涉及 39 个批准文号,5 个规格(2ml:12500 单位、2ml:5000 单位、2ml:1000 单位、5ml:500 单位、5ml:50 单位)。各企业均执行中国药典标准,USP、EP、BP、JP 均收录了肝素钠原料,USP 和 JP 收录了肝素钠注射液。

(2) 肝素钙

肝素钙系自猪或牛的肠黏膜中提取的硫酸氨基葡萄糖的钙盐,属粘多糖类物质,具有延长凝血时间的作用。其临床试验结果显示肝素钙局部副作用如疼痛、硬结、瘀点瘀斑等明显少于肝素钠注射液。此外,肝素钠的抗凝作用不如肝素钙稳定,且贮存过程中效价易变化,国外已有用肝素钙取代肝素钠的趋势。我国也已于 20 世纪 80 年代研制了肝素钙注射液。

制备肝素钙的原料为肝素钠,主要的制备方法有阳离子交换法和直接交换法,用 Ca^{2+} 置换肝素钠的 Na^+ 。根据我国药典肝素钙现行标准,肝素钙制品的钠含量不得大于 0.15%,钙含量为 9.5%~11.5%,酶 1mg 的效价不得少于 170IU。

目前肝素钙分为肝素钙注射液和注射用肝素钙两种制剂。国内生产企业共有 5 家,共计 12 个批准文号,6 个规格,国内没有引入进口的肝素钙注射液品种。

1.1.4.2 低分子量肝素

低分子量肝素(low molecular weight heparin, LMWH)系由 UFH 经不同降解工艺制得,其单糖成分、取代方式和寡糖序列结构特征与未分级肝素相近,相对于 UFH, LMWH 在生物利用度,抗凝血活性和出血等不良反应方面有明显优势。

LMWH 的化学结构受降解方法影响,不同的降解方法有不同的裂解位点,产生不同的还原和非还原残基。不同方法制得的 LMWH 结构的最大差异在于其末端结构。英国药典(BP)从 1993 年增补本中开始收录 LMWH,目前 BP 收录了依诺肝素钠、帕肝素钠、达肝素钠、那曲肝素钙、汀肝素钠五种 LMWH,欧洲药典(EP)收录的 LMWH 内容与 BP 相同,美国药典(USP)从 32 版开始收录了依诺肝素钠。随着对 LMWH 结构研究的不断深入,各国药典不断增补对 LMWH 末端结构的描述,其中 USP32 版依诺肝素就加入了 1,6-脱水结构的要求。

LMWH 可通过 UFH 的分级分离得到。但由于肝素中低分子片段含量很少,因此该方法不适于大批量生产。最常用的方法为采用亚硝酸盐或亚硝酸异戊酯进行脱氨裂解。该方法在 *N*-硫酸氨基葡萄糖(GlcNS)处断裂肝素链,形成特征性的无水甘露糖(通常还原为无水甘露醇)还原末端残基。其次为化学或酶促 β -消除裂解,在非还原末端形成不饱和糖醛酸。第三种常用的方法是自由基氧化降解,这种方法不形成特殊的末端结构。

根据不同的工艺,产生了不同结构特征的 LMWH,目前主要有以下品种。

1.1.4.3 依诺肝素钠

依诺肝素钠是由猪肠黏膜肝素的苄基酯衍生物经碱性降解生成的 LMWH,其结构较复杂,目前尚为完全表征。大部分成分在糖链的非还原端具有 4-烯吡喃糖醛酸结构,大约 20%(15%~25%)的成分在糖链还原端具有 1,6-脱水结构。其平均 M_w 3800~5000,特征值约为 4500。硫酸化程度约为每一双糖单位 2.0。抗活化 X 因子(FXa)活性 90~125IU/mg,抗 FXa 活性与抗活化 II 因子(FIIa)活性比值为 3.3~5.3。依诺肝素钠的结构见图 1-2。

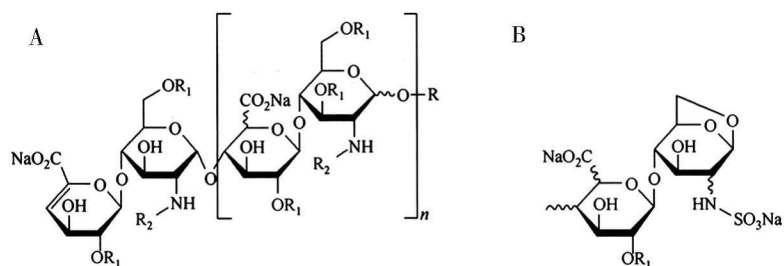


图 1-2 A 依诺肝素钠结构式;B 还原端 R 结构(含 1,6-脱水衍生物)

依诺肝素钠由 SANOFI AVENTIS(赛诺菲安万特)公司研发,1987 年 4 月 3 日依诺肝素钠注射液获法国健康产品卫生安全局批准上市销售,商品名为 Lovenox[®],最初上市销售的药品规格为 0.2ml:2000AxaIU 和 0.4ml:4000AxaIU,1993 年 3 月 17 日增加 0.6ml:6000AxaIU、0.8ml:8000AxaIU 和 1ml:10000AxaIU 三个规格,于 1998 年 8 月 6 日增加 3ml:30000AxaIU 规格。1993 年 3 月 29 日,获美国食品药品监督管理局批准上市,FDA 橙皮书将 SANOFI AVENTIS US 生产的 Lovenox[®]列为参比制剂。随后 SANDOZ INC、AMPHASTAR PHARM 以及 TEVA 公司分别于 2010 年、2011 年以及 2014 年在 FDA 上市销售依诺肝素钠仿制药。依诺肝素钠注射液在德国、意大利、西班牙、澳大利亚、波兰及印度等地均有上市销售。2016 年 Techdow Europe AB 和 Pharmathen S. A. 的依诺肝素钠生物类似药在欧盟获批上市销售。原研制剂于 2009 年 3 月在中国获批,商品名为克赛[®](Clexane[®]),上市公司为 SANOFI AVENTIS FRANC,分装公司为赛诺菲(北京)制药有限公司。

目前,依诺肝素钠分为依诺肝素钠注射液和注射用依诺肝素钠两种制剂。该品种共有国内生产企业有 11 家,共计 26 个批准文号,8 个规格;原研企业国内进口分装企业 1 家,2 批准文号,2 个规格;原研企业 7 个注册证号,5 个规格。