

## 肝素製劑品質監測研究

詹鈞凱 陳怡頻 許家銓 王博譽 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

### 摘要

肝素(Heparin)為常用抗血栓藥物，可與凝血級聯反應(Blood clotting cascade)中多種凝血因子結合，具抗凝血活性，除作為採血管之抗凝劑外，常用於治療栓塞疾病。然其來源為家畜腸黏膜或其他適當的組織萃取，可能含有少量的天然不純物質，如硫酸皮膚素(Dermatan sulfate, DS)及硫酸軟骨素(Chondroitin sulfate, CS)，因此監測肝素品質狀況至為重要。2008年全球發生使用肝素導致過敏而有多人因而不幸死亡情形，經調查發現原因係過硫酸化硫酸軟骨素(Oversulfated chondroitin sulfate, OSCS)化學物污染造成。有鑒於肝素製劑可能含有污染之雜質危害國人健康，另肝素製劑若活性不足，將導致凝血效能不全，因此於107年度進行肝素製劑及原料藥之品質全面監測調查，並利用陰離子交換高效液相層析法與氫核磁共振儀鑑別肝素及檢測肝素原料藥不純物質(如OSCS與DS等)，並使用比色法(Chromogenic assay)分析肝素原料藥及注射劑抗凝血因子Xa與IIa之活性。共抽樣45件檢體，包含傳統肝素注射液、低分子量肝素注射液及肝素原料藥，經分析，結果皆符合中華藥典第八版之規範，可確保國人用藥安全。

**關鍵詞：**肝素、凝血級聯反應、硫酸皮膚素、硫酸軟骨素、過硫酸化硫酸軟骨素、  
高效液相層析法、核磁共振儀、抗凝血因子Xa/IIa活性測定法

### 前言

肝素(Heparin)為一種醣胺聚醣化合物，其由重複之二醣三硫酸鏈結構組成，又稱硫酸化醣胺聚醣 (Sulfated glycosaminoglycan)，係臨床上常用之粘多糖硫酸酯類抗血栓藥物，可與凝血級聯反應(Blood clotting cascade)中多種凝血因子結合，具抗凝血之活性<sup>(1)</sup>。其來源係由豬或牛腸粘膜中提取的硫酸化醣胺聚醣 (Sulfated glycosaminoglycan)之鈉鹽製成，通常製作成注射劑型，臨床上可用於治療栓塞疾病，如靜脈栓塞、肺栓塞，亦可用於預防術後

栓塞，及心肺、腹膜透析或血液透析時之抗凝血藥物，或作為採血及血庫血液保存等體外抗凝血劑。

然而，美國、澳洲、加拿大、法國、德國、義大利、荷蘭、丹麥、日本、紐西蘭及中國等共10個國家曾於2007至2008年陸續有病人因注射以中國原料藥廠製成之肝素注射劑，而產生過敏反應，甚至造成全球至少百餘人死亡之案例<sup>(2,3)</sup>。

由於肝素是由家畜之腸黏膜或其他適當組織中萃取，需先經氧化再結合醇洗分離，將大量的雜質去除<sup>(4)</sup>。然純化過程中亦可能萃取出

物化性質相同之天然不純物，如含二醣三硫酸鏈重複結構之硫酸軟骨素(Chondroitin sulfate, CS)或含二醣單硫酸鏈重複結構之硫酸皮膚素(Dermatan sulfate, DS)，而過硫酸化硫酸軟骨素(Oversulfated chondroitin sulfate, OSCS)則是由人工合成二醣四硫酸鏈重複結構之CS，一般檢驗方法<sup>(5)</sup>無法辨別，需用精密的檢測儀器(如<sup>1</sup>H NMR等)進行分析檢驗<sup>(6,7)</sup>。

自2008年美商百特之肝素注射劑污染事件後，2009年美國藥典與歐洲藥典著手建立檢測肝素原料藥是否含有OSCS或其他不純物質之方法，食品藥物管理署於2010年針對國產藥廠所使用之原料藥是否含有OSCS 及DS 等不純物進行檢測，其結果皆不含不純物質，但尚未針對肝素製劑進行檢驗，並於2016年中華藥典第八版亦隨之跟進。美國、歐洲與中華藥典針對肝素原料藥之純度規範<sup>(8-10)</sup>除了以<sup>1</sup>H NMR檢測外，同時規範需利用高效液相層析法及效價測定法進行檢驗。近年來，由於國際藥典陸續更新肝素檢測方法，如最新版美國藥典新增肝素原料藥及注射劑之效價分析法、肝素原料藥抗凝血因子Xa與IIa活性比鑑別法及分子篩層析法(Size exclusion chromatography, SEC)分析肝素原料藥之平均分子量，並更新肝素高效液相層析法之層析管柱及條件。鑒於肝素原料藥與注射劑在我國使用廣泛，為了確保肝素產品之安全性、避免含過敏之不純物危害國人健康，本研究參考國際藥典與相關科學文獻建立原料藥與注射劑之鑑別、不純物檢測及效價分析方法，以國內上市之肝素產品評估方法之適用性，期作為後續檢測肝素品質監測研究之依據，確保國人用藥安全。

## 材料與方法

### 一、材料

#### (一)對照標準品

1. USP dermatan sulfate reference standard

(RS) (Lot: G0M092, Sigma, USA) (下稱DS 標準品)

2. USP heparin sodium identification RS, 16,000 Da, 50 mg (Lot: SLBK3464V, Sigma, USA) (下稱Heparin sodium 標準品)
3. USP over-sulfated chondroitin sulfate RS (Lot: R037XO, Sigma, USA) (下稱OSCS 標準品)
4. USP heparin sodium molecular weight calibrate RS (Lot: F0L483, Sigma, USA) (下稱Heparin calibrate標準品)
5. USP heparin sodium assays RS, 2144 IU/9.5 mg (Lot: F0I487, Sigma, USA) (下稱Heparin sodium活性分析標準品)

(二)檢品：抽樣檢品共45件，包含注射液計41件(39件傳統肝素注射液與2件低分子量肝素)與原料藥4件。

#### (三)藥品與試劑

1. Ammonium acetate (Merck, USA)
2. Biophen<sup>TM</sup> Anti - IIa (Hyphen BioMed, France)
3. Biophen<sup>TM</sup> Anti - Xa (Hyphen BioMed, France)
4. Citric acid (Sigma, USA)
5. Deuterium oxide (Sigma, USA)
6. Heparinase I (EC 4.2.2.7) (Lot: SLBK3464V, Sigma, USA)
7. Sodium azide (Merck, USA)
8. Sodium perchlorate monohydrate (Merck, USA)
9. Sodium phosphate monobasic dehydrate (Merck, USA)
10. Trimethylsilylpropionic acid (Sigma, USA)

#### (四)儀器與設備

1. <sup>1</sup>H NMR (Bruker UltraShield Plus 600 MHz/ 54 mm Plus, Bruker, USA)

## 2. 高效液相層析分析系統 (Dionex UltiMate 3000, Thermo, USA)

- (1) 高效液相層析溶媒輸送系統 (Dionex UltiMate 3000 Pump, Thermo, USA)
- (2) 自動注射器 (Dionex UltiMate 3000 Autosampler, Thermo, USA)
- (3) 管柱槽 (Dionex UltiMate 3000 Column Compartment, Thermo, USA)
3. 折射率偵測器 (RefractoMax 521, Thermo, USA)
4. 酵素免疫分析儀 (Synergy Mx, BioTek, USA)
5. 超純水製造系統 (Advantage A10, Merck Millipore, USA)

## 二、方法

(一) 核磁共振光譜法 ( $^1\text{H}$  NMR spectrum) - 原料藥之圖譜分析委託中央研究院高磁場核磁共振中心操作，並由食品藥物管理署自行分析檢驗結果。

### 1. 儀器裝置參數

- (1) 模式: NMR, pulsed
- (2) 頻率: 500 MHz
- (3) 溫度: 20 - 30°C

### 2. 溶液製備

- (1) Trimethylsilylpropionic acid (TSP) 溶液：取 TSP 0.4 mg 加入 deuterium oxide ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 20 mL 配製成 0.002% (w/v) 之溶液。
- (2) 標準品溶液：取適量 Heparin sodium 標準品溶於 TSP 溶液中，配製成濃度 20 mg/mL 之溶液。
- (3) 檢品溶液：分別取適量各原料藥檢品分別溶於 TSP 溶液中，配製成濃度 20 mg/mL 之溶液。
- (4) 系統適用性測試液：取適量 OSCS 標準品溶於 Heparin sodium 標準品溶液中，配製成 0.3% (w/w) 之溶液。

## (二) 陰離子交換高效液相層析法 (Strong anion - exchange HPLC, SAX - HPLC)

### 1. 溶液製備

- (1) 標準品溶液：取適量 Heparin sodium 標準品以二次水配製成 20 mg/mL 之 heparin sodium 標準品溶液。
- (2) 系統適用性測試液：取 0.1% (w/w) OSCS 標準品與 0.5% (w/w) DS 標準品加入適當濃度之 Heparin sodium 標準品，以二次水配製成 20 mg/mL 之 Heparin sodium 含 0.1% (w/w) OSCS 與 0.5% (w/w) DS 之系統適用性測試液。
- (3) 檢品溶液：原料藥以二次水配製成濃度為 20 mg/mL 之溶液，注射劑則以二次水稀釋成 1000 IU/mL 後備用。

### 2. 管柱與實驗方法

#### (1) 溶液製備

- a. 移動相 A：取 Sodium phosphate monobasic dihydrate 0.8 g 溶於二次水 1900 mL，以  $\text{H}_3\text{PO}_4$  調整 pH 值至  $3.0 \pm 0.1$ ，再以二次水定容至 2 L，經 0.45  $\mu\text{m}$  尼龍微孔濾膜過濾及脫氣處理。
- b. 移動相 B：取 Sodium phosphate monobasic dihydrate 0.8 g 與 Sodium perchlorate monohydrate 280 g 溶於二次水 1900 mL，以  $\text{H}_3\text{PO}_4$  調整 pH 值至  $3.0 \pm 0.1$ ，再以二次水定容至 2 L，經 0.45  $\mu\text{m}$  尼龍微孔濾膜過濾及脫氣處理。

#### (2) 層析管柱

- a. Guard column：Dionex IonPac AG11, 2 mm  $\times$  5 cm (Thermo)
- b. Column：Dionex IonPac AS11 - HC, 2 mm  $\times$  25 cm (Thermo)

#### (3) 流速：0.22 mL/min

#### (4) 管柱控溫：40°C

(5)偵測器：UV 202 nm

(6)分離梯度變化如表一

表一、陰離子交換高效液相層析分離梯度變化

| 時間(分鐘) | 移動相A (%) | 移動相B (%) |
|--------|----------|----------|
| 0      | 80       | 20       |
| 30     | 10       | 90       |
| 31     | 80       | 20       |
| 45     | 80       | 20       |

### 3. 測定

取Heparin sodium標準品溶液、檢品溶液各20  $\mu$ L，分別注入層析管柱中，按上述梯度變化層析之，記錄其波峰值，總滯留時間為45分鐘，並執行三重複試驗。

### (三) 分子篩層析法 (Size-exclusion chromatography, SEC) 評估分子量

#### 1. 溶液製備

(1)1 M Ammonium acetate solution：取Ammonium acetate 77.1 g溶於1 L之二次水中。

(2)1% Sodium azide solution：取NaN<sub>3</sub> 1 g溶於100 mL之二次水中。

(3)移動相溶劑：取Ammonium acetate solution 100 mL與Sodium azide solution 20 mL以二次水定容至1 L，以0.22  $\mu$ m尼龍微孔濾膜過濾及脫氣處理。

(4)校正液：取適量Heparin calibrate標準品以移動相溶劑配製成濃度為5 mg/mL之溶液，以0.22  $\mu$ m尼龍微孔濾膜過濾。

(5)系統適用性測試液：取適量Heparin sodium標準品以移動相溶劑配製成濃度為5 mg/mL之溶液，以0.22  $\mu$ m尼龍微孔濾膜過濾。

(6)檢品溶液：取原料藥檢品以移動相溶劑配製成濃度為5 mg/mL，以0.22  $\mu$ m

尼龍微孔濾膜過濾。

### 2. 層析管柱

(1)Guard column: TSK SWXL, 6  $\times$  40 mm (Tosoh)

(2)Column：TSK G4000SWXL, 7.8  $\times$  300 mm (Tosoh)

(3)TSK G3000SWXL, 7.8  $\times$  300 mm (Tosoh)

### 3. 測定

取校正液、檢品溶液及系統適用性測試液各20  $\mu$ L，分別注入層析管柱中層析之，設定流速為0.6 mL/min，管柱維持30 $^{\circ}$ C，分析時間為50分鐘，並執行二重複試驗，記錄其波峰值。

### (四) 抗凝血因子Xa與抗凝血因子IIa活性測定法 (Anti-factor Xa and Anti-factor IIa Assay)

#### 1. Biophen anti-IIa 與Biophen anti-Xa 檢驗試劑組

##### (1) Reagent之配製

a. Reagent 1 (R1)：加入1 mL二次水至R1瓶中，再以R1與R4 (1：4)之比例混合均勻，使用前皆須保持37 $^{\circ}$ C。

b. Reagent 2 (R2)：加入1 mL二次水至R2瓶中，再以R2與R4 (1：4)之比例混合均勻，使用前皆須保持37 $^{\circ}$ C。

c. Reagent 3 (R3)：加入5 mL二次水至R3瓶中，使用前皆須保持37 $^{\circ}$ C。

d. Reagent 4 (R4)：為R1 - R3及檢品之稀釋液。

e. 檢驗試劑組完成配製後，使用前皆須預熱至37 $^{\circ}$ C。

##### (2) 操作步驟

a. 取Heparin sodium活性分析標準品或檢品溶液40  $\mu$ L至96孔盤，並添加40  $\mu$ L R1至每孔中，於37 $^{\circ}$ C反應

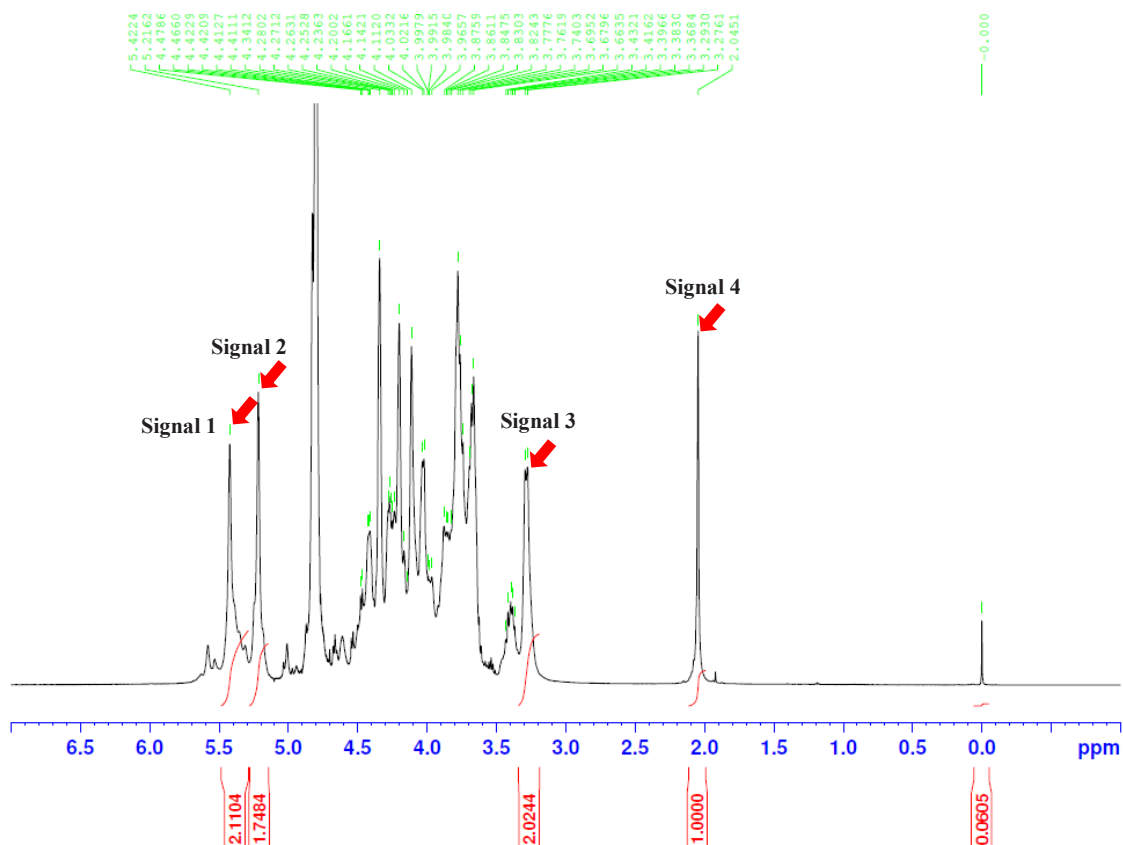
- 2分鐘。
- 添加R2 (Anti-factor Xa or IIa) 40  $\mu$ L至每孔中，於37 $^{\circ}$ C反應2分鐘。
  - 添加R3 (Chromogenic substrate) 40  $\mu$ L至每孔中，於37 $^{\circ}$ C反應2分鐘。
  - 添加2% Citric acid 80  $\mu$ L至每孔中終止反應，並利用酵素免疫分析儀於波長405 nm下測定吸收值。

## 結果與討論

### 一、肝素原料藥之核磁共振儀分析

本研究參考美國、歐洲與中華藥典之核磁

共振儀( $^1\text{H}$  NMR)系統適用性規範，於符合系統適用性規範情況下(圖一)使用核磁共振儀鑑別肝素原料藥及不純物，經分析，國內4件原料藥，皆可清楚鑑別到Heparin sodium之四個化學位移訊號，5.42 ppm (Signal 1)、5.21 ppm (signal 2)、3.28 ppm (Signal 3 doublet)及2.05 ppm (signal 4)，並與Heparin sodium標準品化學位移訊號一致(圖二)，且於2.12 - 3.00 ppm處(Region 2)沒有任何其它訊號，顯示4件檢品皆無OSCS。另，美國藥典中Heparin sodium之允收基準，於0.10 - 2.00、2.10 - 3.20及5.70 - 8.00 ppm不得有未鑑別之訊號，且其訊號不得大於Signal 1與Signal 2高度平均值之4%，發現一件



圖一、 $^1\text{H}$  NMR Heparin Sodium標準品分析之結果

原料藥檢品(如圖二，檢品B)於1.18 ppm、3.66 ppm與5.48 ppm相對於Heparin sodium標準品有相異之化學位移訊號，進一步以混合酒精之Heparin sodium標準品進行比對，證實之此3訊號分別為酒精之甲基(CH<sub>3</sub>)、亞甲基(CH<sub>2</sub>)與羥基(OH)之訊號(結果未呈現)，故該檢品相較於其他檢品有較多酒精殘留，查其廠規檢驗方法是依據美國藥典，經核磁共振儀定量結果確認其殘留量符合前述美國藥典建議之允收基準。

## 二、肝素原料藥及注射劑之陰離子交換高效液相層析分析

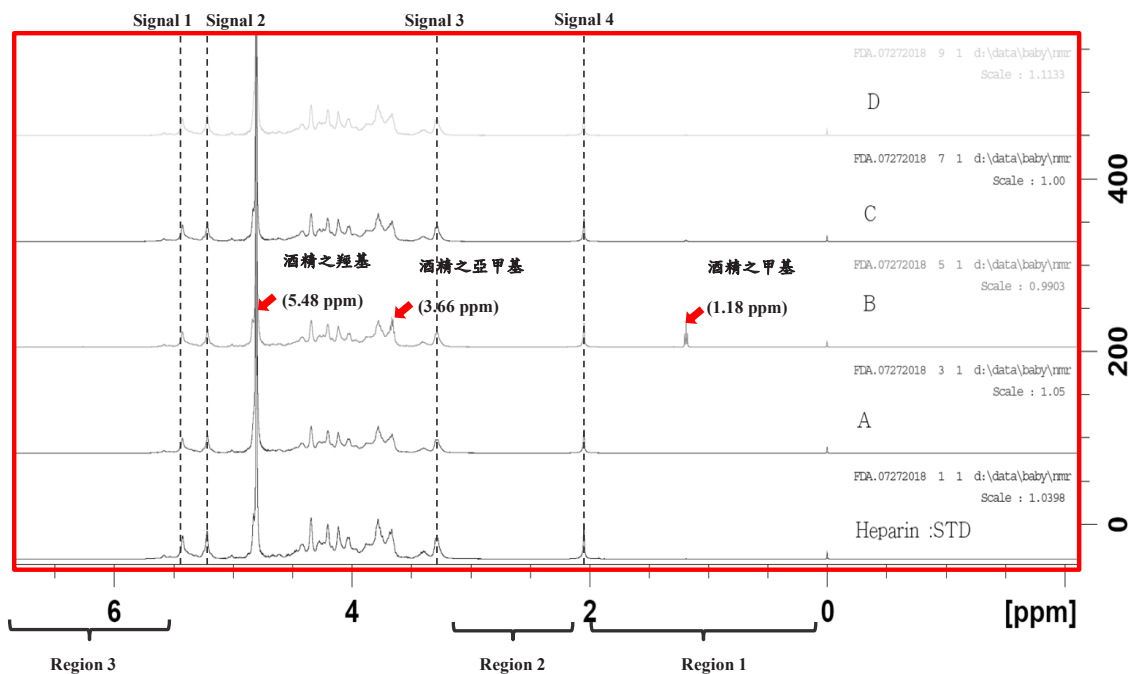
因肝素為多價陰離子之醯胺聚醣，故可使用陰離子交換高效液相層析法(SAX - HPLC)分析肝素，其可用於鑑別肝素及分析不純物。本研究參考美國、歐洲與中華藥典之陰離子交

換高效液相層析系統適用性規範，使用適用性溶液(Heparin sodium標準品添加0.5% (w/w) DS與0.1% (w/w) OSCS)所得之層析圖譜，Heparin sodium標準品與DS標準品之解析度大於1，與OSCS標準品之解析度大於1.5，符合適用性規範，DS、Heparin sodium與OSCS標準品之滯留時間分別為15.70、20.86及27.20分鐘(圖三)。

使用陰離子交換高效液相層析法評估41件注射液，其結果顯示Heparin出現之時間均類似Heparin sodium標準品，且均無DS或OSCS不純物存在。

## 三、肝素原料藥之分子篩層析分析

肝素為醯胺聚醣，有各種不同的結構及分子量，使用分子篩層析法檢測肝素原料藥

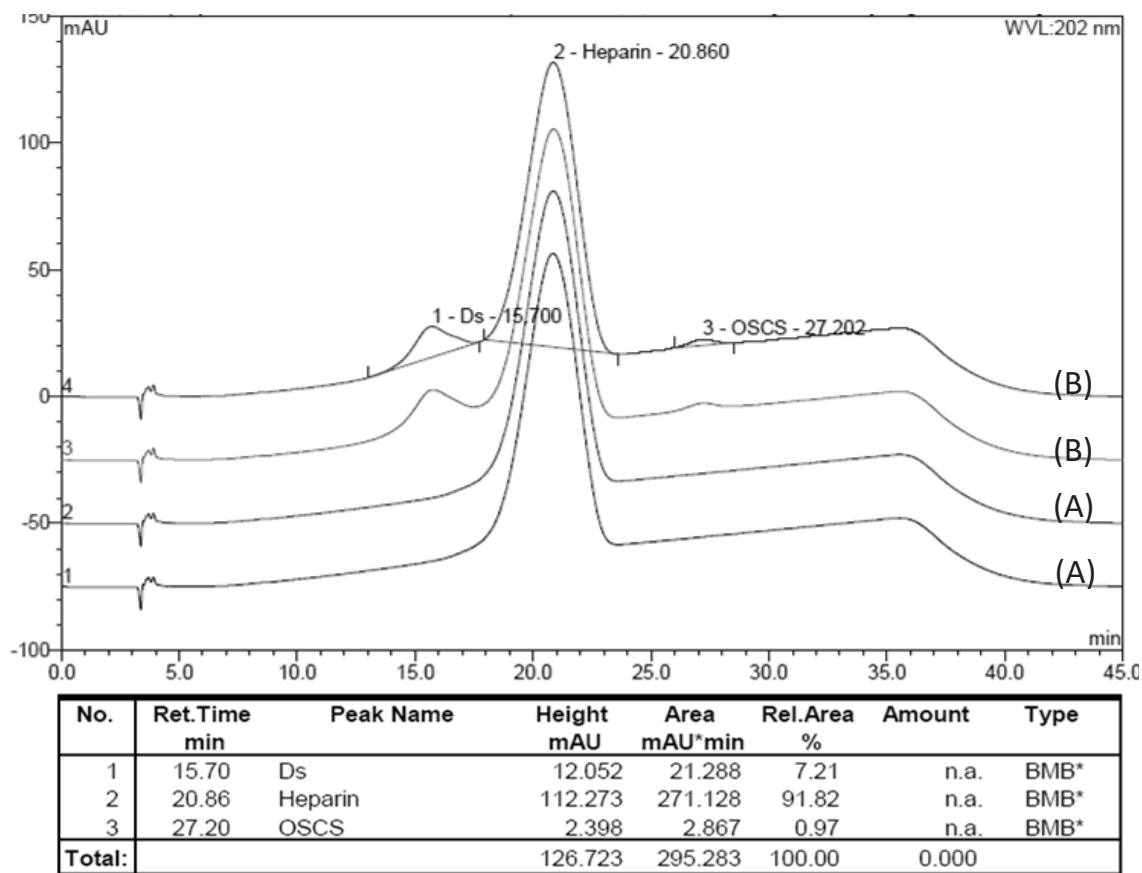


圖二、肝素原料藥檢品<sup>1</sup>H NMR分析之結果

註：Heparin STD: Heparin sodium標準品

A - D: 4件抽驗之肝素原料藥檢品





圖三、肝素之SAX-HPLC分析結果

註：Heparin sodium 標準品：二重複系統適用性溶液：含1. 0.5% DS；2. 20 mg/mL Heparin sodium標準品；3. 0.1% OSCS，二重複

之分子量可作為鑑別方法之一<sup>(11)</sup>，本研究參考美國藥典之高效液相層析系統系統適用性規範，使用Heparin calibrant標準品注入高效液相層析系統，須於滯留時間20至40分鐘得1寬波峰，根據肝素校正分子量標準表(Broad standard table，表二)之面積百分標示寬波峰之15個對照點，使用15個對照點之分子量對數值(log MW)作為y軸，及各對照點之實際滯留時間為x軸作分子量校正曲線配製，可得三次多項式，其適用性規範該曲線之相關係數 $R^2$ 需大於0.99，而使用本方法所得之曲線公式為 $Y = 0.0002X^3 - 0.0167X^2 + 0.5413X - 2.3884$ ，

另藥典亦規範Heparin sodium標準品兩重複試驗(兩次誤差不得高於5%)，計算所得之分子量結果應為標示值 $\pm 500$  Da。而使用本方法分析Heparin sodium標準品之結果為15,700 Da，查其標準品標示含量為16,000 Da，故本方法符合系統適用性規範。

使用分子篩層析法評估國內4件肝素原料藥之分子量，參考美國藥典允收基準，其規格如下，分子量大於24,000 Da不得大於20%、分子量介於8,000 - 16,000 Da與16,000 - 24,000 Da百分比之比值應不得低於1.0，及平均分子量需介於15,000至19,000 Da。使用本方法檢

表二、肝素校正分子量標準表

| No. | Mw (Da) | % below Mw |
|-----|---------|------------|
| 1   | 6,000   | 3.238      |
| 2   | 8,000   | 10.549     |
| 3   | 10,000  | 19.588     |
| 4   | 12,000  | 31.002     |
| 5   | 14,000  | 43.079     |
| 6   | 16,000  | 55.803     |
| 7   | 18,000  | 66.282     |
| 8   | 20,000  | 74.289     |
| 9   | 22,000  | 80.243     |
| 10  | 24,000  | 84.599     |
| 11  | 26,000  | 87.724     |
| 12  | 28,000  | 89.914     |
| 13  | 32,000  | 93.522     |
| 14  | 36,000  | 95.609     |
| 15  | 40,000  | 96.971     |

測結果，國內4件肝素原料藥平均分子量介於15,500 - 15,900 Da(表三)。

#### 四、肝素之抗凝血因子Xa與IIa活性

肝素藥理機制為與凝血級聯反應之抗凝血酶III結合，再與凝血因子Xa與IIa形成三聚

體，藉此影響凝血因子Xa與IIa活化，抑制凝血反應<sup>(12)</sup>。然而肝素與凝血因子IIa之親合力大於凝血因子Xa<sup>(13)</sup>，因此抗凝血因子IIa活性為肝素效價分析之依據，且抗凝血因子Xa與IIa活性比值亦可作為肝素製劑鑑別方法之一，因此，本研究使用抗凝血因子Xa與IIa活性檢驗試劑組分析45件檢品抗凝血因子Xa與IIa之活性，並參考美國藥典使用斜率比檢定法(slope ratio assay)計算抗凝血因子活性。

分析肝素抗凝血因子IIa活性作為產品的效價評估標準，根據中華藥典建議規範，注射劑應為標示效價90 - 110%，低分子量肝素注射液應為標示效價20 - 35%，原料藥應不得小於180 IU/mg。而本研究結果顯示，39件注射劑檢品抗凝血因子IIa之活性效價，分析結果介於標示效價90.40 - 109.69%，2件低分子量注射液抗凝血因子IIa之活性效價，分別為標示效價之29.9% (2,991 IU/mg)與30.9% (3,085 IU/mg) (表四(a))，4件原料藥抗凝血因子IIa之活性效價介於210.70 - 302.50 IU/mg (表四(b))，皆符合藥典允收基準。

另有2件低分子量肝素注射劑檢品相對於Heparin sodium分析標準品抗凝血因子Xa活性分別為10,443、10,980 IU/mg (表五(a))，而4件

表三、分子篩層析法分析肝素原料藥檢品分子量之結果

| Sample                                | Mw<br>(Da) <sup>a</sup> | Mw<br>(Da) <sup>b</sup> | M <sub>8000-16000</sub><br>(%) | M <sub>16000-24000</sub><br>(%) | M <sub>&gt;24000</sub><br>(%) | M <sub>ratio</sub> <sup>c</sup> | Criteria                                                                           |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Heparin calibrate<br>標準品 <sup>d</sup> | 15,723.0                | 15,700.0                | 45.8                           | 36.4                            | 15.9                          | 1.3                             | 1. M>24,000 is NMT 20%                                                             |
| 原料藥A                                  | 15,714.6                | 15,700.0                | 45.6                           | 33.3                            | 16.5                          | 1.4                             | 2. Mw is between 15,000 Da and 19,000 Da                                           |
| 原料藥B                                  | 15,810.5                | 15,800.0                | 44.4                           | 35.6                            | 17.1                          | 1.3                             | 3. The ratio of M <sub>8,000-16,000</sub> to M <sub>16,000-24,000</sub> is NLT 1.0 |
| 原料藥C                                  | 15,882.7                | 15,900.0                | 45.4                           | 28.2                            | 18.9                          | 1.6                             |                                                                                    |
| 原料藥D                                  | 15,517.9                | 15,500.0                | 47.4                           | 32.1                            | 15.0                          | 1.5                             |                                                                                    |

<sup>a</sup> Weight-average molecular weight

<sup>b</sup> Mw round to the nearest 100 Da

<sup>c</sup> The ratio of M<sub>8,000-16,000</sub> to M<sub>16,000-24,000</sub>

<sup>d</sup> The mean of duplication injection, Mw within 500 Da of the labeled value as stated in the USP Certificate for USP Heparin Sodium Identification RS. Mw of duplication does not differ by more than 5% of the upper value.



表四、低分子量肝素注射液與肝素原料藥抗凝血因子IIa活性分析之結果

| (a)低分子量注射液 |             |                 |                                |              |
|------------|-------------|-----------------|--------------------------------|--------------|
| Sample     | Slope ratio | Potency (IU/mg) | Percentage of Potency on label | Criteria (%) |
| 低分子量注射液A   | 0.299       | 2,991           | 29.9                           | 20 - 35      |
| 低分子量注射液B   | 0.309       | 3,085           | 30.9                           |              |

| (b)原料藥                |        |             |                 |                                          |
|-----------------------|--------|-------------|-----------------|------------------------------------------|
| Sample                | Slope  | Slope ratio | Potency (IU/mg) | Criteria                                 |
| Heparin sodium活性分析標準品 | -8.57  | 1.00        | 225.86          | Anti-IIa potency not less than 180 IU/mg |
| 原料藥A                  | -7.99  | 0.93        | 210.70          |                                          |
| 原料藥B                  | -8.01  | 0.98        | 220.40          |                                          |
| 原料藥C                  | -10.90 | 1.27        | 287.40          |                                          |
| 原料藥D                  | -11.48 | 1.34        | 302.50          |                                          |

表五、低分子量肝素注射液與肝素原料藥抗凝血因子Xa與IIa活性比值之結果

| Sample     | Anti Xa Potency | Anti IIa Potency | Xa/ IIa ratio | Criteria  |
|------------|-----------------|------------------|---------------|-----------|
| (a)低分子量注射液 |                 |                  |               |           |
| 低分子量注射液A   | 10,443.0        | 2,991.0          | 3.5           | 3.3 - 5.3 |
| 低分子量注射液B   | 10,980.0        | 3,085.0          | 3.6           |           |
| (b)原料藥     |                 |                  |               |           |
| 原料藥A       | 213.50          | 210.70           | 1.01          | 0.9 - 1.1 |
| 原料藥B       | 200.40          | 220.40           | 0.91          |           |
| 原料藥C       | 283.10          | 287.40           | 0.99          |           |
| 原料藥D       | 289.60          | 302.50           | 0.96          |           |

原料藥相對於Heparin sodium分析標準品抗凝血因子Xa活性介於200.40 - 289.60 IU/mg (表五(b))。參考國際藥典鑑別之允收基準，低分子量肝素注射液之Xa與IIa效價比值應介於3.3 - 5.3 (表五(a))，肝素原料藥抗凝血因子Xa與IIa效價比值應為0.9 - 1.1 (表五(b))，而本研究檢測原料藥結果，其比值皆符合藥典之建議允收基準。

查，共計45件產品，以陰離子交換高效液相層析法與氫核磁共振儀鑑別肝素及檢測肝素原料藥不純物質(如OSCS與DS等)，並使用比色法分析肝素原料藥及注射劑抗凝血因子Xa與IIa之活性，其結果皆符合美國與中華藥典相關規定，除協助全面調查國內肝素製劑與原料藥品質，亦供作主管機關及中華藥典制定相關規範之參考，以保障國人健康與用藥安全。

### 結 論

本研究針對肝素製劑與原料藥進行品質調

### 參考文獻

1. Feinstein D.I. 1982. Diagnosis and

- management of disseminated intravascular coagulation: the role of heparin therapy. *Blood*. 60: 284-287.
2. Liu H., Zhang Z. and Linhardt R.J. 2009. Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat Prod Rep*. 26: 313-321.
  3. Kishimoto T.K., Viswanathan K., Ganguly T. and *et al*. 2010. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med* 18. 362: 1056.
  4. Bray B.A., Mandl I. and Turino G.M. 1981. Heparin facilitates the extraction of tissue fibronectin. *Science*. 214: 793-795.
  5. Swoap O.F. and Kuizenga M.H. 1949. The sheep plasma method for the bioassay of heparin preparations. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*. 38: 563-565.
  6. Morris T.A. 2003. Heparin and low molecular weight heparin: background and pharmacology. *Clin Chest Med*. 24: 39-47.
  7. Guerrini M., Beccati D., Shriver Z. and *et al*. 2008. Oversulfated Chondroitin Sulfate is a major contaminant in Heparin associated with Adverse Clinical Events. *Nat Biotechnol*. 26: 669-675.
  8. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM). 2017. European Pharmacopoeia 9.0. pp. 2644-2649. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Strasbourg, France.
  9. United States Pharmacopeia Convention, Inc. 2016. The United States Pharmacopeia 39, The National Formulary 34. pp. 4188-4193. United States Pharmacopeia Convention, Inc. Rockville, MD, USA.
  10. 衛生福利部中華藥典編修委員會。2016。中華藥典。第八版。261-266頁，衛生福利部食品藥物管理署，台北。
  11. Mulloy B. and Hogwood J. 2015. Chromatographic molecular weight measurements for heparin, its fragments and fractions, and other glycosaminoglycans. *Methods Mol Biol*. 1229: 105-18.
  12. Mulloy B., Hogwood J., Gray E. and *et al*. 2016. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. *Pharmacol Rev*. 68: 76-141.
  13. Dalmora S.L., Souto R.B., Silva L.M. and *et al*. 2009. Biological potency evaluation and physicochemical characterization of unfractionated heparins. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 31: 326-332.

## Quality Inspection of Heparin in Taiwan

JHAN-KAI JHAN, YI-PIN CHEN, JIA-CHUAN HSU, PO-YU WANG,  
SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

### ABSTRACT

Heparin, a kind of the sulfated glycosaminoglycan (GAG), which is the most widely used anticoagulant drug in the world. *In vivo*, heparin exerts anticoagulant activity by binding to coagulation factors in the blood clotting cascade. It is either used as an anticoagulant for evacuated blood collection tube or to treat blood clot symptoms, for instance, thrombophilia, pulmonary embolism, et al. In addition, heparin is also used to prevent postoperative embolization. Because the main source of heparin is from the intestinal mucosa or other suitable tissues of domestic mammals, formulations of the processed heparin can contain low level of natural contaminants, such as dermatan sulfate (DS) or chondroitin sulfate (CS). DS could induce allergic reactions in human. In 2008, many people died due to the allergy to heparin contaminated with over-sulfated chondroitin sulfate (OSCS) in the United States. OSCS is a substance hard to differentiate from heparin by traditional analytical process (e.g., sheep plasma assay), owing to their similar structure. Therefore, new analytical methods, such as high performance liquid chromatography (HPLC) and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), could help to detect OSCS. In view of heparin containing active pharmaceutical ingredients which do harm human health, we established the SAX-HPLC, <sup>1</sup>H-NMR, size-exclusion chromatography (SEC) analytical methods and anti - coagulation factor Xa and IIa activity assays to identify and to measure the potency of heparin by referring to heparin sodium and injection monographs of the national pharmacopoeias and other relevant references. Forty-five samples (including 41 injections and 4 drug substances) were collected and analyzed; all of them were in compliance with the specification of Chinese Pharmacopeia. Overall, these established methods can be employed in the post-market surveillance for quality control of heparin preparation and for identification of heparin of the unknown sample to ensure the public health.

**Key words:** heparin, blood clotting cascade, dermatan sulfate, chondroitin sulfate, oversulfated chondroitin sulfate, HPLC, nuclear magnetic resonance spectroscopy, anti-coagulation factor Xa and IIa activity assays