

# Comparative Study on the Determination of Molecular Weight of Enoxaparin Sodium by Broad Distribution Reference Substance

Qinjuan Xu, Hongmeng Cui\*

Weihai Ocean Vocational College, Rongcheng Shandong  
Email: [cuihongmeng@163.com](mailto:cuihongmeng@163.com), 15662370667@163.com

Received: Jan. 7<sup>th</sup>, 2019; accepted: Jan. 21<sup>st</sup>, 2019; published: Jan. 28<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

**Objective:** Comparative study on the European Pharmacopeia (EP) and the World Health Organization (WHO) low molecular weight heparin reference substances (RS) (both broad distribution reference substance, hereinafter referred to as EP RS and WHO RS), in the determination of the molecular weight and molecular weight distribution of enoxaparin sodium. **Methods:** A high performance size exclusion chromatography was applied by TSK G2000SWxl (7.5 mm × 300 mm) column. The mobile phase was 0.2 mol·L<sup>-1</sup> sodium sulfate aqueous solution adjusted the pH value of 5.0 with sulfuric acid and 0.1 mol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate aqueous solution, respectively. An isocratic elution was performed at a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, and the column temperature was maintained at 30°C. UV detection with the wavelength at 234 nm was applied. A differential refraction detector and its temperature was kept at 35°C, with an injection of 25 μl was used. **Results:** By using EP RS and WHO RS in two different mobile phase systems, the molecular weight and molecular weight distribution of enoxaparin sodium CRS (weight-average molecular weight labeled as 4480 Da), enoxaparin sodium injection (clexane), enoxaparin sodium drug substance and enoxaparin sodium injection (self-produced) were determined. And according to the results, the difference of the weight-average molecular weight between samples was less than 100 Da, meanwhile, the difference of the molecular weight distribution was less than 1%. **Conclusion:** The results of eight batches of samples showed that there was no significant difference in the determination of the molecular weight and molecular weight distribution for enoxaparin sodium via employing EP RS and WHO RS.

## Keywords

Enoxaparin Sodium, Molecular Weight and Molecular Weight Distribution, Low-Molecular-Mass Heparin Reference Substance, Broad Distribution Reference Substance, Weight-Average Molecular Weight

## 对比研究宽分布对照品测定依诺肝素钠分子量

\*通讯作者。

徐勤娟, 崔洪萌\*

威海海洋职业学院, 山东 荣成

Email: cuihongmeng@163.com, 15662370667@163.com

收稿日期: 2019年1月7日; 录用日期: 2019年1月21日; 发布日期: 2019年1月28日

## 摘要

**目的:** 对比研究欧洲药典(European Pharmacopeia, EP)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)低分子肝素分子量对照品(均为宽分布对照品, 下称EP对照品和WHO对照品)测定依诺肝素钠分子量和分子量分布。**方法:** 以TSK G2000SWxl (7.5 mm × 300 mm)为色谱柱, 分别以0.2 mol·L<sup>-1</sup>硫酸钠水溶液(硫酸调pH值5.0)为流动相和0.1 mol·L<sup>-1</sup>醋酸铵水溶液为流动相, 流速为0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温30℃, 紫外检测波长234 nm, 示差折光检测器温度为35℃, 进样量25 μL。**结果:** 分别在两种流动相体系下, 用EP对照品和WHO对照品, 对依诺肝素钠CRS (EP, 重均分子量标示量为4480 Da)、依诺肝素钠注射液(克赛®)、依诺肝素钠原料药(国产)和依诺肝素钠注射液(国产), 进行分子量和分子量分布检查, 各样品重均分子量差值均小于100 Da, 分子量分布差值均小于1%。**结论:** 通过八批样品试验验证, EP对照品和WHO对照品用于依诺肝素钠分子量和分子量分布测定结果无显著性差异。

## 关键词

依诺肝素钠, 分子量和分子量分布, 低分子肝素分子量对照品, 宽分布对照品, 重均分子量

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

依诺肝素钠是新一代肝素类抗血栓药物, 其分子量和分子量分布是其重要的质量控制指标。目前美国药典(USP 42), 欧洲药典(EP 9.7), 英国药典(BP 2018)均有收录依诺肝素钠[1] [2] [3], 均采用凝胶渗透色谱对其进行检测, 通过GPC软件计算其分子量和分子量分布, 其重均分子量为3800 Da~5000 Da, 小于2000 Da的组分所占比例为12%~20%, 2000 Da~8000 Da所占的比例为68%~80%。其中USP 42依诺肝素钠分子量和分子量分布检查项是通过两个窄分布的分子量对照品(含有七个已知分子量对照品)作标准曲线, 和一个已知重均分子量的对照品进行系统适用性验证后, 进行分子量检测; EP 9.7和BP 2018是通过一个宽分布对照品, 通过手工取点作标准曲线进行分子量检测[4] [5] [6] [7]。

在分子量测定过程中EP对照品通过特殊的解聚方法在每一分子上引入一个发色团, 在234 nm波长处有最大吸收, 检测时需串联紫外检测器和示差检测器, 紫外检测器响应值和摩尔浓度成正比, 而示差检测器响应值和质量浓度成正比, 两者比值和依诺肝素钠分子量成正比, 比例常数的确定使用了对照品的数均分子量( $M_{na} = 3800$ ), 因此需通过复杂的计算和手工取点的方式才能得到校正曲线。而WHO对照品提供了宽分布标样表, 即分子量与累积面积百分比的对应表, 检测时仅使用示差检测器, 且不用分离出寡糖峰, 检测和计算过程比较简便[6] [8]-[13]。

## 2. 实验部分

### 2.1. 实验材料

#### 2.1.1. 实验药品

EP 低分子肝素分子量对照品(Heparin Low-Molecular-Mass for Calibration CRS, EP 对照品。数均分子量  $M_{na} = 3800$ )从欧洲药监局购买, 批号为 batch 3。

WHO 低分子肝素分子量对照品(Low Molecular Weight Heparin for Molecular Weight Calibration, WHO 对照品)从英国国家生物制品检定所购买, 批号为 05/112。

依诺肝素钠 CRS (Enoxaparin Sodium CRS, 重均分子量标示量为 4480 Da)从欧洲药监局购买, 批号为 batch 5。

依诺肝素钠注射液(克赛<sup>®</sup>)购自赛诺菲安万特公司, 批号为 4SC98、5SA66、5SL48。

依诺肝素钠原料药为国内某公司生产, 批号为 150402、150403。

依诺肝素钠注射液为国内某公司生产, 批号为 160202、160203。

#### 2.1.2. 仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪 20 A (紫外检测器、示差检测器、ALS 自动进样器、二元泵), MS205DU 型电子分析天平(METTLER TOLEDO)。

D-(+)-葡萄糖为优级纯(百灵威科技); 葡聚糖 2000 为优级纯(上海迈瑞尔化学技术有限公司); 硫酸、硫酸钠、醋酸铵为分析纯(西陇化工股份有限公司); 水为娃哈哈纯净水。

### 2.2. 实验方法

#### 2.2.1. 硫酸钠体系

1) **色谱条件:** 色谱柱: TSK G2000SWxl (7.5 mm × 300 mm); 柱温: 30°C; 紫外检测器和示差检测器联用, 紫外检测波长: 234 nm, 示差检测器温度: 35°C; 流速: 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 25 μL; 流动相: 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 硫酸钠水溶液(硫酸调 pH 值 5.0)。

2) **溶液的制备:** 供试品溶液的制备分别取依诺肝素钠 CRS、依诺肝素钠注射液(克赛)、依诺肝素钠(自制)、依诺肝素钠注射液(自制)适量, 分别加硫酸钠流动相溶解并稀释成每 1 mL 中约含依诺肝素钠 10 mg 的溶液, 分别作为供试品溶液 1。

系统适用性溶液的制备分别精密称取葡聚糖 2000 和葡萄糖各约 10 mg, 置 1.5 mL 离心管中, 精密加入 1 mL 硫酸钠流动相使溶解, 作为系统适用性溶液 1。

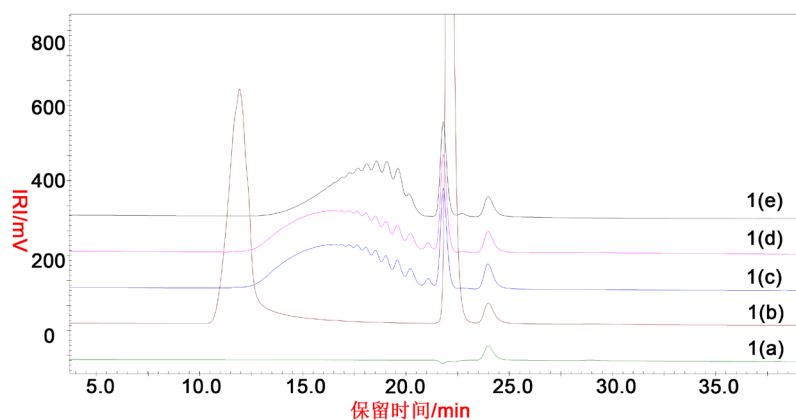
EP 对照品溶液的制备精密称取 EP 对照品约 10 mg, 置 1.5 mL 离心管中, 精密加入 1 mL 硫酸钠流动相使溶解, 作为 EP 对照品溶液 1。

WHO 对照品溶液的制备精密称取 WHO 对照品约 10 mg, 置 1.5 mL 离心管中, 精密加入 1 mL 硫酸钠流动相使溶解, 作为 WHO 对照品溶液 1。

#### 3) 实验过程:

##### 专属性和系统适用性试验

分别取空白溶剂(0.2 mol·L<sup>-1</sup> 硫酸钠水溶液)、“1.2”项下依诺肝素钠 CRS 供试品溶液 1、系统适用性溶液 1、EP 对照品溶液 1、WHO 对照品溶液 1 各 25 μL, 注入液相色谱仪。空白溶剂不干扰本品出峰; 系统适用性溶液 1 示差色谱图中理论板数按葡萄糖峰计算为 21379, 葡萄糖峰和葡聚糖 2000 峰分离度为 8.80; 依诺肝素钠 CRS、EP 对照品和 WHO 对照品示差色谱图中主峰保留时间在葡萄糖(保留时间为 22.196 min)和葡聚糖 2000 (保留时间为 12.035 min)的保留时间之间。色谱图见图 1。



1(a) 空白溶剂; 1(b) 系统适用性溶液 1; 1(c) EP 对照品溶液 1; 1(d) WHO 对照品溶液 1; 1(e) 依诺肝素钠 CRS 供试品溶液 1

**Figure 1.** Chromatogram 1 of specificity and system suitability tests of sodium sulfate system  
**图 1.** 硫酸钠体系专属性和系统适用性试验色谱图 1

**样品测定**精密量取“2.2.1”项下依诺肝素钠 CRS 供试品溶液 1、EP 对照品溶液 1、WHO 对照品溶液 1 各 25  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 记录紫外和示差色谱图。根据 EP 对照品( $M_n = 3800$ ), 采用手工取 18 个点, 以  $\log M$  对保留时间  $T$  作三阶校正曲线, 计算各供试品溶液的分子量和分子量分布; 根据 WHO 对照品宽分布标样表, 以  $\log M$  对保留时间  $T$  作三阶校正曲线, 计算各供试品溶液的分子量和分子量分布; EP 对照品和 WHO 对照品的校正曲线见表 1, 样品测定结果见表 2。

**Table 1.** Reference calibration curve of sodium sulfate system

**表 1.** 硫酸钠体系对照品校正曲线

选点个数	WHO 对照品		EP 对照品	
	保留时间(min)	分子量	保留时间(min)	分子量
1	13.421	18,000	13.808	14,314
2	13.713	15,600	14.217	12,801
3	14.063	13,600	14.617	11,069
4	14.404	12,000	15.008	9859
5	15.079	9600	15.400	8943
6	15.529	8400	15.775	7841
7	16.063	7200	16.133	7007
8	16.354	6600	16.343	6661
9	16.671	6000	16.628	6071
10	17.012	5400	16.961	5559
11	17.363	4800	17.437	4841
12	17.746	4200	17.726	4128
13	18.154	3600	18.240	3482
14	18.588	3000	18.605	3053
15	19.063	2400	19.101	2421
16	19.604	1800	19.664	1860
17	20.271	1200	20.298	1247
18	21.246	600	21.254	583
校正曲线	$\log M = -0.00275648T^3 + 0.1320164T^2 - 2.238323T + 17.17206$		$\log M = -0.002832371T^3 + 0.1349939T^2 - 2.269252T + 17.21699$	
相关系数 R	0.99995		0.99978	
离差	0.0038896		0.0074436	

**Table 2.** Determination results of samples by sodium sulfate system**表 2.** 硫酸钠体系样品测定结果

批号	EP 对照品计算结果			WHO 对照品计算结果			差值		
	重均分子量(Da)	小于 2000 Da (%)	2000 Da~8000 Da (%)	重均分子量(Da)	小于 2000 Da (%)	2000 Da~8000 Da (%)	重均分子量(Da)	小于 2000 Da (%)	2000 Da~8000 Da (%)
依诺肝素钠 CRS	4447	16.58	74.04	4393	16.52	73.75	54	0.06	0.29
5SL48	4265	17.55	74.46	4221	17.37	74.34	44	0.18	0.12
5SA66	4263	17.57	74.43	4220	17.29	74.44	43	0.28	0.01
4SC98	4277	17.33	74.59	4233	17.35	74.23	44	0.02	0.36
160202	4271	17.94	73.75	4220	17.82	73.62	51	0.12	0.13
160203	4347	17.99	73.02	4299	17.49	73.3	48	0.50	0.28
150402	4272	18.22	73.39	4228	17.66	73.76	44	0.56	0.37
150403	4327	17.54	73.78	4279	17.74	73.17	48	0.20	0.61

### 2.2.2. 醋酸铵体系

1) 色谱条件: 色谱柱: TSK G2000SWxl (7.5 mm × 300 mm); 柱温: 30°C; 紫外检测器和示差检测器联用, 紫外检测波长: 234 nm, 示差检测器温度: 35°C; 流速: 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 25 μL; 流动相: 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液。

#### 2) 溶液的制备:

供试品溶液的制备 供试品溶液的制备分别取依诺肝素钠 CRS、依诺肝素钠注射液(克赛)、依诺肝素钠(自制)、依诺肝素钠注射液(自制)适量, 分别加醋酸铵流动相溶解并稀释成每 1 mL 中约含依诺肝素钠 10 mg 的溶液, 分别作为供试品溶液 2。

系统适用性溶液的制备 分别精密称取葡聚糖 2000 和葡萄糖各约 10 mg, 置 1.5 mL 离心管中, 精密加入 1 mL 醋酸铵流动相使溶解, 作为系统适用性溶液 2。

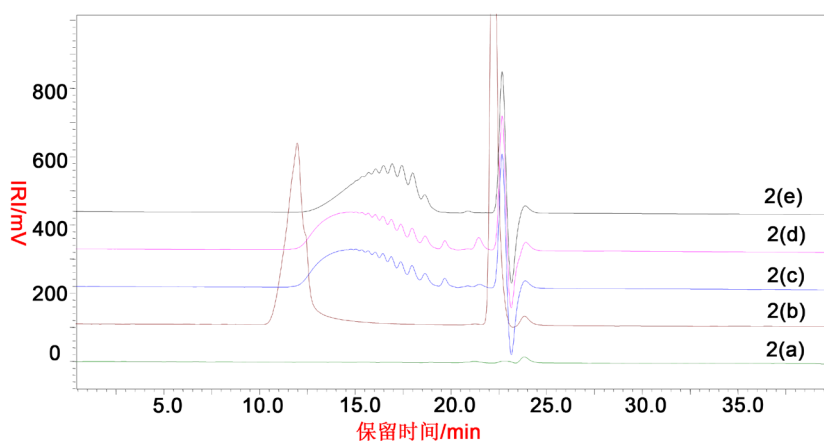
EP 对照品溶液的制备 精密称取 EP 对照品约 10 mg, 置 1.5 mL 离心管中, 精密加入 1 mL 醋酸铵流动相使溶解, 作为 EP 对照品溶液 2。

WHO 对照品溶液的制备 精密称取 WHO 对照品约 10 mg, 置 1.5 mL 离心管中, 精密加入 1 mL 醋酸铵流动相使溶解, 作为 WHO 对照品溶液 2。

#### 3) 实验过程:

##### 专属性和系统适用性试验

分别取空白溶剂(0.1 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液)、“2.2.2”项下依诺肝素钠 CRS 供试品溶液 2、系统适用性溶液 2、EP 对照品溶液 2、WHO 对照品溶液 2 各 25 μL, 注入液相色谱仪。空白溶剂不干扰本品出峰; 系统适用性溶液 2 示差色谱图中理论板数按葡萄糖峰计算为 22077, 葡萄糖峰和葡聚糖 2000 峰分离度为 9.22; 依诺肝素钠 CRS、EP 对照品和 WHO 对照品示差色谱图中主峰保留时间在葡萄糖(保留时间为 22.200 min)和葡聚糖 2000 (保留时间为 11.964 min)的保留时间之间。色谱图见图 2。



2(a) 空白溶剂; 2(b) 系统适用性溶液 2; 2(c) EP 对照品溶液 2; 2(d) WHO 对照品溶液 2; 2(e) 依诺肝素钠 CRS 供试品溶液 2

**Figure 2.** Chromatogram 2 of specificity and system suitability tests of ammonium acetate system  
**图 2.** 醋酸铵体系专属性和系统适用性试验色谱图 2

样品测定精密量取“2.2”项下依诺肝素钠 CRS 供试品溶液 2、EP 对照品溶液 2、WHO 对照品溶液 2 各 25  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 记录紫外和示差色谱图。根据 EP 对照品( $M_n = 3800$ ), 采用手工取 18 个点, 以  $\log M$  对保留时间  $T$  作三阶校正曲线, 计算各供试品溶液的分子量和分子量分布; 根据 WHO 对照品宽分布标样表, 以  $\log M$  对保留时间  $T$  作三阶校正曲线, 计算各供试品溶液的分子量和分子量分布; EP 对照品和 WHO 对照品的校正曲线见表 3, 样品测定结果见表 4。

**Table 3.** Reference calibration curve of ammonium acetate system

**表 3.** 醋酸铵体系校正曲线

选点个数	WHO 对照品		EP 对照品	
	保留时间(min)	分子量	保留时间(min)	分子量
1	12.571	18,000	12.605	16,285
2	12.779	15,600	12.842	14,480
3	13.046	13,600	13.208	12,509
4	13.304	12,000	13.600	10,634
5	13.829	9600	13.950	9407
6	14.139	8400	14.300	8020
7	14.629	7200	14.503	7533
8	14.888	6600	14.742	6956
9	15.154	6000	15.010	6228
10	15.454	5400	15.311	5502
11	15.771	4800	15.642	4811
12	16.121	4200	16.012	4209
13	16.496	3600	16.413	3403
14	16.913	3000	16.851	2912
15	17.371	2400	17.345	2409
16	17.938	1800	17.934	1906
17	18.663	1200	18.614	1185
18	19.821	600	19.749	584
校正曲线	$\log M = -0.002409928T^3 + 0.1095525T^2 - 1.823136T + 14.62927$		$\log M = -0.002151357T^3 + 0.09614305T^2 - 1.59638T + 13.36678$	
相关系数 R	0.99964		0.99964	
离差	0.0103785		0.0100719	

**Table 4.** Determination results of samples by ammonium acetate system**表 4.** 醋酸铵体系样品测定结果

批号	EP 对照品计算结果			WHO 对照品计算结果			差值		
	重均分子量(Da)	小于 2000 Da (%)	2000 Da ~8000 Da (%)	重均分子量(Da)	小于 2000 Da (%)	2000 Da ~8000 Da (%)	重均分子量(Da)	小于 2000 Da (%)	2000 Da ~8000 Da (%)
依诺肝素钠 CRS	4388	16.24	73.97	4381	16.17	73.78	7	0.07	0.19
5SL48	4242	17.54	73.75	4236	16.77	74.38	6	0.77	0.63
5SA66	4224	17.55	73.91	4252	16.95	74.02	28	0.60	0.11
4SC98	4236	17.32	74.10	4252	16.93	74.02	16	0.39	0.08
160202	4265	17.50	73.46	4259	17.20	73.55	6	0.30	0.09
160203	4294	17.48	73.19	4294	17.15	73.27	0	0.33	0.08
150402	4245	17.61	73.50	4250	17.42	73.36	5	0.19	0.14
150403	4294	17.55	73.11	4289	17.22	73.25	5	0.33	0.14

### 3. 结果讨论

伯小霞等[4]对比研究了依诺肝素钠分子量测定的 EP 和 USP 的方法, 由于 USP 的分子量标准品采用七个窄分布的对照品, 取点太少, 存在一定误差, 因此测定结果较 EP 的方法有一定偏离。而本文通过对比研究 EP 对照品和 WHO 对照品分别在两种流动相体系下(硫酸钠流动相和醋酸铵流动相), 对依诺肝素钠 CRS (EP, bacth 5)、依诺肝素钠注射液(克赛®批号: 4SC98、5SA66、5SL48)、依诺肝素钠(批号: 150402、150403)、依诺肝素钠注射液(批号: 160202、160203)的分子量和分子量分布进行计算, 两种宽分布对照品对依诺肝素钠重均分子量差值均在 100 Da 以内, 其分布差值在 1%以内, 表明两种宽分布对照品计算结果无显著性差异。李京[14]等通过对比高效体积排阻色谱法和体积排阻色谱法和多角激光光散射联用测定低分子量肝素分子量和分子量分布的结果接近, 测定结果和本文所述结果一致。

从计算过程中不难发现, EP 对照品需串联紫外检测器和示差检测器, 并计算两个检测器的延迟时间, 且取点过程非常复杂, 还需应用 EXCEL 协助计算; 而 WHO 对照品只需根据宽分布标表即可计算, 相对简单, 易于操作。目前, 中国药典 2015 年版二部仅收录了肝素钠, 其分子量对照品为类似于 WHO 的宽分布对照品并提供了分子量表。包括依诺肝素钠在内的低分子量肝素还没有分子量测定国家对照品, 本文研究结果对该品种国家对照品的研制有重要意义。

### 致 谢

本文在研究过程中得到校企合作单位鲁南制药集团大力支持, 在此表示感谢。

### 参考文献

- [1] USP 42 (2018) Enoxaparin Sodium. USP.
- [2] EP 9.7 (2018) Enoxaparin Sodium. EP.
- [3] BP 2018 (2018) Enoxaparin Sodium. BP.
- [4] 伯小霞, 崔慧斐. 依诺肝素钠相对分子量的 EP 与 USP 分析方法对比研究[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(6): 818-821.
- [5] 李文茂, 马志华, 张惠, 等. 低分子量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.

- [6] 宋志新, 丁建文, 管惠娟, 等. 达肝素钠分子量及分子量分布的测定及计算方法改进[J]. 食品与药品, 2014, 16(3): 171-173.
- [7] 李京, 王悦, 李颖颖, 等. 低分子肝素质量标准研究[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(24): 2210-2218.
- [8] 李京, 范慧红. 欧洲药典低分子肝素分子量测定用国际对照品协作标定[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(21): 1864-1869.
- [9] 李京, 范慧红. 低分子肝素分子量测定用国际对照品协作标定[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(10): 1715-1717.
- [10] 李京, 王悦, 范慧红. 全国低分子肝素分子量与活性检测培训班讲义[Z]. 天津: 中国食品药品检定研究院, 2013.
- [11] Guo, X., Condra, M., Kimura, K., *et al.* (2003) Determination of Molecular Weight of Heparin by Size Exclusion Chromatography with Universal Calibration. *Analytical Biochemistry*, **312**, 33-39. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00428-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00428-1)
- [12] Sommers, C.D., Ye, H., Kolinski, R.E., *et al.* (2011) Characterization of Currently Marketed Heparin Products: Analysis of Molecular Weight and Heparinase-I Digest Patterns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **401**, 2445-2454. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5362-z>
- [13] Bisio, A., Mantegazza, A., Vecchiotti, D., *et al.* (2015) Determination of the Molecular Weight of Low-Molecular-Weight Heparins by Using High-Pressure Size Exclusion Chromatography on Line with a Triple Detector Array and Conventional Methods. *Molecules*, **20**, 5085-5098. <https://doi.org/10.3390/molecules20035085>
- [14] 李京, 范慧红. 高效体积排阻色谱与多角激光光散射仪联机测定低分子肝素分子量及分子量分布[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(2): 140-142.

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2163-1557, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>  
期刊邮箱: [aac@hanspub.org](mailto:aac@hanspub.org)