
1 NOTE RELATIVE À LA MONOGRAPHIE

2 Suite aux accidents survenus en 2008 en raison d'une contamination, cette
3 monographie a fait l'objet d'une révision de fond visant à assurer un contrôle approprié
4 de la qualité de l'héparine non fractionnée. Le style et la présentation ont également été
5 mis en conformité avec la version actuelle du Guide de rédaction.
6

7 **Définition** : compte tenu de la qualité des lots d'héparine actuellement sur le marché,
8 l'activité minimale spécifiée a été relevée, après enquête auprès des fabricants
9 européens ; une seule qualité d'héparine est par ailleurs désormais décrite, la double
10 spécification du texte actuel ne reflétant plus la situation en Europe.

11 **Production** : les essais par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
12 (RMN) et électrophorèse capillaire qui avaient été introduits lors de la 1^{re} étape
13 de la révision (en application depuis le 1^{er} août 2008) ont été supprimés de cette
14 section, des essais détaillés étant désormais décrits sous Identification et Essai. Des
15 dispositions ont par ailleurs été introduites pour souligner la nécessité d'appliquer
16 un système de management de la qualité fiable pendant l'ensemble du processus de
17 production et, conformément à la pratique actuelle parmi les fabricants européens,
18 de confirmer l'identité de l'espèce source ainsi que l'absence de matériel provenant
19 d'espèces contaminantes potentielles. Cette monographie est également révisée en
20 vue d'harmoniser les informations relatives à ou aux espèces sources des substances
21 d'origine humaine ou animale ainsi que la présentation de ces informations dans les
22 monographies. Les indications relatives à l'origine de la substance sont par conséquent
23 déplacées sous Définition et un paragraphe est ajouté concernant la santé des animaux
24 utilisés pour préparer l'héparine sodique.
25

26 **Identification** : le pouvoir rotatoire spécifique et l'électrophorèse de zone ont été
27 remplacés par des méthodes hautement spécifiques, la RMN ¹H et une chromatographie
28 liquide à échange d'anions forts (CLHP-SAX). Le choix de la RMN ¹H a été motivé par
29 le fait qu'elle permet non seulement d'identifier l'héparine, mais aussi d'alerter les
30 utilisateurs sur la présence éventuelle de contaminants. L'identification du contre-ion
31 est désormais effectuée sur la base de l'essai du sodium par spectrométrie d'absorption
32 atomique figurant sous Essai.

33 **Impuretés nucléotidiques** : la limite a été renforcée au vu de la qualité actuelle des lots.
34

35 **Protéines** : la méthode de Lowry a été introduite en remplacement de la mesure de
36 l'absorbance.

37 **Substances apparentées** : un essai par CLHP-SAX a été introduit. Il permet de
38 différencier les contaminants naturels liés au procédé de production (tels que le sulfate
39 de dermatan et le sulfate de chondroïtine) des contaminants résultant d'une synthèse
40 chimique. Une limite, établie sur la base des données de lots actuelles, est proposée pour
41 la teneur totale en sulfate de dermatan et sulfate de chondroïtine, qui sont coélués.
42

43 **Azote** : une limite inférieure a été introduite au vu des données de lots actuelles.

44 **Métaux lourds** : la méthode C a été remplacée par la méthode F, conformément à la
45 politique générale définie pour l'essai des métaux lourds.

46 **Cendres sulfuriques** : compte tenu de la spécificité des nouveaux essais introduits dans
47 la monographie, cet essai, devenu redondant, a été supprimé.

HÉPARINE SODIQUE

Heparinum natricum

DÉFINITION

Préparation contenant le sel sodique d'un glycosaminoglycane sulfaté présent dans les tissus de mammifères. L'héparine sodique peut être préparée soit à partir de poumon de boeuf, soit à partir de muqueuse intestinale, soit de porc, soit de boeuf, soit de mouton. Par hydrolyse complète, l'héparine sodique libère de la D-glucosamine, de l'acide D-glucuronique, de l'acide L-iduronique, de l'acide acétique et de l'acide sulfurique. Elle possède la propriété de retarder la coagulation du sang.

Activité : au minimum 180 UI/mg (substance desséchée).

PRODUCTION

Les animaux à partir desquels l'héparine sodique est obtenue répondent aux exigences de santé pour les animaux destinés à la consommation humaine. Toutes les étapes de la production et de l'approvisionnement sont soumises à l'application d'un système de management de la qualité approprié. L'identité de l'espèce source et l'absence de matériel provenant des autres espèces sont vérifiées lors de la production, au moyen d'essais appropriés.

L'héparine sodique est produite par des méthodes permettant de réduire ou d'éliminer les substances hypotensives.

CARACTÈRES

Aspect : poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

Solubilité : facilement soluble dans l'eau.

IDENTIFICATION

A. L'héparine sodique retarde la coagulation du plasma de mouton citraté et recalciifié (voir Titrage).

B. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (2.2.33).

Solution A. Solution dans de l'oxyde de deutérium R contenant 20 µg/mL de triméthylsilylpropionate de sodium deutérié R et, si le signal à 5,22 ppm est inférieur à 80 pour cent du signal à 5,44 ppm, 12 µg/mL d'édétate de sodium R.

Préparation : dissolvez 20 mg d'héparine sodique dans 0,7 mL de solution A.

Comparaison : dissolvez 20 mg d'héparine sodique pour identification RMN SCR dans 0,7 mL de solution A.

Si elles sont stockées, les solutions d'édétate de sodium et de triméthylsilylpropionate de sodium deutérié doivent être conservées dans des bouteilles de polyéthylène naturel de haute densité.

Appareillage : spectromètre opérant à au minimum 300 MHz.

1 *Acquisition des spectres RMN ¹H :*

- 2 – *nombre d'impulsions* : au minimum 16 ; ajustez ce nombre de façon à obtenir
3 un rapport signal/bruit d'au moins 1000:1 pour le signal méthyle de l'héparine
4 à 2,04 ppm ;
5 – *température* : environ 25 °C ; les spectres de l'échantillon à examiner et de la
6 substance de référence sont enregistrés à la même température ;
7 – *temps d'acquisition* : au minimum 2 s ;
8 – *temps de répétition* (acquisition plus relaxation) : au minimum 4 s ;
9 – *largeur spectrale* : 10-12 ppm, centrée sur environ 4,5 ppm ;
10 – *largeur d'impulsion* : donnant un angle de basculement compris entre 30° et 90°.

11 *Traitement :*

- 12 – *fenêtre exponentielle décroissante* : 0,3 Hz,
13 – transformée de Fourier,
14 – *réglage du 0,00 ppm* : avec le signal de référence du triméthylsilylpropionate.

15 *Résultats :*

- 16 – les principaux signaux caractéristiques de l'héparine sodique sont présents ; ils
17 sont respectivement situés à 2,04 ppm, 3,27 ppm (doublet), 4,34 ppm, 5,22 ppm et
18 5,42 ppm, à ± 0,03 ppm près ;
19 – le spectre RMN ¹H obtenu avec l'échantillon à examiner et celui obtenu avec
20 l'héparine sodique pour identification RMN SCR sont comparés qualitativement
21 après que les 2 spectres aient été normalisés de façon à avoir une intensité
22 semblable. Du sulfate de dermatan, avec un signal méthyle à 2,08 ± 0,02 ppm, peut
23 être présent. Aucun signal non identifié de hauteur supérieure à 4 pour cent de
24 la hauteur du signal de l'héparine situé à 5,42 ppm n'est observé dans les plages
25 0,10-2,00 ppm, 2,10-3,10 ppm et 5,70-8,00 ppm. Des signaux dus au solvant ou à des
26 impuretés liées au processus peuvent être présents, et doivent être identifiés pour
27 être acceptables. Le signal peut être d'intensité variable dans certaines régions du
28 spectre. Ces régions, où l'allure du spectre est sensiblement conservée mais avec des
29 variations d'intensité, se situent entre 3,35 ppm et 4,55 ppm.

30 C. Chromatographie liquide (2.2.29) selon les indications de l'essai des substances
31 apparentées, avec les modifications suivantes.

32 *Injection* : solution à examiner (a) et solution témoin (c).

33 *Rétention relative* par rapport à l'héparine (temps de rétention = environ 26 min) :
34 sulfate de dermatan et sulfate de chondroïtine = environ 0,9 ; chondroïtine
35 persulfatée = environ 1,3.

36 *Conformité du système* : solution témoin (c) :

- 37 – *rapport pic/vallée* : au minimum 1,3, avec H_p = hauteur au-dessus de la ligne de base
38 du pic dû au sulfate de dermatan + sulfate de chondroïtine et H_v = hauteur au-dessus
39 de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui dû à l'héparine.

40 *Résultats* : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a)
41 est semblable quant à son temps de rétention et sa forme au pic principal du
42 chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c).

43 D. Sodium (voir Essai).

1 ESSAI

2 **Aspect de la solution.** La solution est limpide (2.2.1) et n'est pas plus fortement colorée
3 que la solution de degré 5 de la gamme des solutions témoins présentant la coloration la
4 plus appropriée (2.2.2, *Procédé II*).

5
6 Dissolvez une quantité d'héparine sodique correspondant à 50 000 UI dans de l'eau R et
7 complétez à 10 mL avec le même solvant.

8 **pH** (2.2.3) : 5,5 à 8,0.

9
10 Dissolvez 0,1 g d'héparine sodique dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R et
11 complétez à 10 mL avec le même solvant.

12 **Impuretés nucléotidiques.** Dissolvez 40 mg d'héparine sodique dans 10 mL d'eau R.
13 L'absorbance (2.2.25) mesurée à 260 nm n'est pas supérieure à 0,15.

14 **Protéines** : au maximum 0,5 pour cent (substance desséchée).

15
16 *Solution A.* Mélangez 2 volumes d'une solution d'hydroxyde de sodium R à 10 g/L et
17 2 volumes d'une solution de carbonate de sodium R à 50 g/L et complétez à 5 volumes
18 avec de l'eau R.

19
20 *Solution B.* Mélangez 2 volumes d'une solution de sulfate de cuivre R à 12,5 g/L et
21 2 volumes d'une solution de tartrate de sodium R à 29,8 g/L et complétez à 5 volumes
22 avec de l'eau R.

23 *Solution C.* Mélangez 1 volume de solution B et 50 volumes de solution A.

24 *Solution D.* Préparez une dilution au 1/2-1/4 d'un réactif phosphomolybdotungstique⁽¹⁾
25 dans de l'eau R. Des dilutions appropriées permettent d'obtenir des solutions à
26 pH $10,25 \pm 0,25$ après addition des solutions C et D aux solutions témoins et à examiner.

27 *Solution à examiner.* Dissolvez la substance à examiner dans de l'eau R pour obtenir
28 une concentration de 5 mg/mL.

29
30 *Solutions témoins.* Dissolvez de l'albumine bovine R dans de l'eau R pour obtenir une
31 concentration de 100 mg/mL. Préparez différentes dilutions de cette solution dans de
32 l'eau R selon les indications données dans le chapitre général 2.5.33, *méthode 2*.

33 *Solution à blanc* : eau R.

34
35 *Procédure.* A 1 mL de chaque solution témoin, de la solution à examiner et de la solution
36 à blanc, ajoutez 5 mL de solution C. Laissez reposer pendant 10 min. Ajoutez 0,5 mL
37 de solution D, mélangez et laissez reposer à température ambiante pendant 30 min.
38 Déterminez les absorbances (2.2.25) des solutions à 750 nm, en utilisant la solution
39 préparée à partir de la solution à blanc comme liquide de compensation.

40 *Calculs.* Selon les indications données dans le chapitre général 2.5.33, *méthode 2*.

41 **Substances apparentées.** Chromatographie liquide (2.2.29). *Les solutions témoins sont*
42 *stables pendant 24 h à température ambiante.*

43
44 *Solution à examiner (a).* Dissolvez environ 50 mg d'héparine sodique, exactement pesés,
45 dans 5,0 mL d'eau pour chromatographie R. Mélangez à l'aide d'un mélangeur de type
46 vortex jusqu'à dissolution complète.

47 (1) Réactif Folin-Ciocalteu pour dosage des phénols de Merck (référence 1.09001.0500) convient.

1 *Solution à examiner (b)*. Dissolvez environ 0,1 g d'héparine sodique, exactement pesés,
2 dans 1,0 mL d'eau pour chromatographie R. Mélangez à l'aide d'un mélangeur de
3 type vortex jusqu'à dissolution complète. Mélangez 500 µL de solution avec 250 µL
4 d'acide chlorhydrique 1 M, puis ajoutez 50 µL d'une solution de nitrite de sodium R⁽²⁾
5 à 250 mg/mL. Mélangez doucement et laissez reposer à température ambiante pendant
6 40 min, puis ajoutez 200 µL d'hydroxyde de sodium 1 M pour arrêter la réaction.

7
8 *Solution témoin (a)*. Dissolvez 250 mg d'héparine pour analyse physicochimique SCR
9 dans de l'eau pour chromatographie R et complétez à 2,0 mL avec le même solvant.
10 Mélangez à l'aide d'un mélangeur de type vortex jusqu'à dissolution complète.

11 *Solution témoin (b)*. Ajoutez 1200 µL de solution témoin (a) à 300 µL de sulfate de
12 dermatan et chondroïtine persulfatée SCR. Homogénéisez à l'aide d'un mélangeur de
13 type vortex.

14
15 *Solution témoin (c)*. Ajoutez 100 µL de solution témoin (b) à 900 µL d'eau pour
16 chromatographie R. Homogénéisez à l'aide d'un mélangeur de type vortex.

17 *Solution témoin (d)*. Ajoutez 400 µL de solution témoin (a) à 100 µL d'eau pour
18 chromatographie R et mélangez à l'aide d'un mélangeur de type vortex. Ajoutez
19 250 µL d'acide chlorhydrique 1 M, puis 50 µL d'une solution de nitrite de sodium R à
20 250 mg/mL. Mélangez doucement et laissez reposer à température ambiante pendant
21 40 min, puis ajoutez 200 µL d'hydroxyde de sodium 1 M pour arrêter la réaction.

22
23 *Solution témoin (e)*. A 500 µL de solution témoin (b), ajoutez 250 µL d'acide
24 chlorhydrique 1 M, puis 50 µL d'une solution de nitrite de sodium R à 250 mg/mL.
25 Mélangez doucement et laissez reposer à température ambiante pendant 40 min, puis
26 ajoutez 200 µL d'hydroxyde de sodium 1 M pour arrêter la réaction.

27 *Précolonne :*

28 – dimensions : $l = 0,05$ m, $\varnothing = 2$ mm,

29 – phase stationnaire : résine échangeuse d'anions R (13 µm)⁽³⁾.

30
31 *Colonne :*

32 – dimensions : $l = 0,25$ m, $\varnothing = 2$ mm,

33 – phase stationnaire : résine échangeuse d'anions R (9 µm)⁽⁴⁾,

34 – température : 40 °C.

35
36
37 *Phase mobile :*

38 – phase mobile A : dissolvez 0,40 g de phosphate monosodique R dans 1 L d'eau pour
39 chromatographie R et ajustez à pH 3,0 avec de l'acide phosphorique dilué R ;

40 – phase mobile B : dissolvez 0,40 g de phosphate monosodique R dans 1 L d'eau pour
41 chromatographie R ; ajoutez 140 g de perchlorate de sodium R⁽⁵⁾, puis ajustez à pH 3,0
42 avec de l'acide phosphorique dilué R ; filtrez et dégasez ;

43
44
45 (2) Nitrite de sodium, de qualité réactif analytique, de Fischer scientifique (lot 0886083) convient.

46 (3) AG11-HC de Dionex (référence 052963) convient.

47 (4) AS11-HC de Dionex (référence 052961) convient.

(5) Normapur de VWR/Prolabo (référence 27988.232) convient.

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent V/V)	Phase mobile B (pour cent V/V)
0 - 10	75	25
10 - 35	75 → 0	25 → 100
35 - 40	0	100

Débit : 0,22 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 202 nm.

Equilibrage : au moins 15 min.

Injection : 20 µL de solution à examiner (b) et des solutions témoins (d) et (e).

Rétention relative par rapport à l'héparine (temps de rétention = environ 26 min) : sulfate de dermatan et sulfate de chondroïtine = environ 0,9 ; chondroïtine persulfatée = environ 1,3.

Conformité du système :

- le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d) ne présente pas de pic au temps de rétention de l'héparine,
- *résolution* : au minimum 3,0 entre les pics dus au sulfate de dermatan + sulfate de chondroïtine et à la chondroïtine persulfatée dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (e).

Limites :

- *somme du sulfate de dermatan et du sulfate de chondroïtine* : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (e) (2,0 pour cent),
- *toute autre impureté* : aucun autre pic que celui dû au sulfate de dermatan + sulfate de chondroïtine n'est détecté.

Azote (2.5.9) : 1,5 pour cent à 2,5 pour cent (substance desséchée), déterminé sur 0,100 g d'héparine sodique.

Sodium : 9,5 pour cent à 12,5 pour cent (substance desséchée).

Spectrométrie d'absorption atomique (2.2.23, *Procédé I*).

Solution à examiner. Dissolvez 50 mg d'héparine sodique dans une solution de *chlorure de césium R* à 1,27 mg/mL dans de l'*acide chlorhydrique 0,1 M* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant.

Solutions de référence. Préparez des solutions de référence (25 ppm, 50 ppm et 75 ppm) à partir de la *solution à 200 ppm de sodium (Na) R*, diluée avec une solution de *chlorure de césium R* à 1,27 mg/mL dans de l'*acide chlorhydrique 0,1 M*.

Source : lampe à cathode creuse au sodium.

Longueur d'onde : 330,3 nm.

Dispositif d'atomisation : flamme de composition appropriée (par exemple 11 L d'air pour 2 L d'acétylène par minute).

Métaux lourds (2.4.8) : au maximum 30 ppm.

1,0 g d'héparine sodique satisfait à l'essai F. Préparez la solution témoin avec 3,0 mL de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R*.

1 **Perte à la dessiccation (2.2.32)** : au maximum 8,0 pour cent, déterminé à 60 °C sur du
2 *pentoxyde de diphosphore R* sous une pression ne dépassant pas 670 Pa pendant 3 h
3 sur 1,000 g d'héparine sodique.

4
5 **Endotoxines bactériennes (2.6.14)** : moins de 0,01 UI par Unité Internationale d'héparine,
6 si l'héparine sodique est destinée à la fabrication de préparations parentérales sans autre
7 procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes.
8

9
10
11 **TITRAGE**

12
13 Effectuez le titrage de l'héparine (2.7.5). L'activité mesurée n'est pas inférieure à 90 pour
14 cent, ni supérieure à 111 pour cent de l'activité indiquée. Les limites de confiance
15 ($P = 0,95$) de l'activité mesurée ne sont pas inférieures à 80 pour cent, ni supérieures à
16 125 pour cent de l'activité indiquée.

17
18
19 **CONSERVATION**

20
21 En récipient étanche. Si la substance est stérile, elle est conservée en récipient stérile,
22 étanche, à fermeture inviolable.
23

24
25
26 **ÉTIQUETAGE**

27
28 L'étiquette indique :

- 29
30 – le nombre d'Unités Internationales d'héparine par milligramme,
31
32 – l'espèce animale d'origine,
33
34 – dans les cas appropriés, que la substance convient à la fabrication de préparations
35 parentérales.
36

37
38
39 **Réactifs**

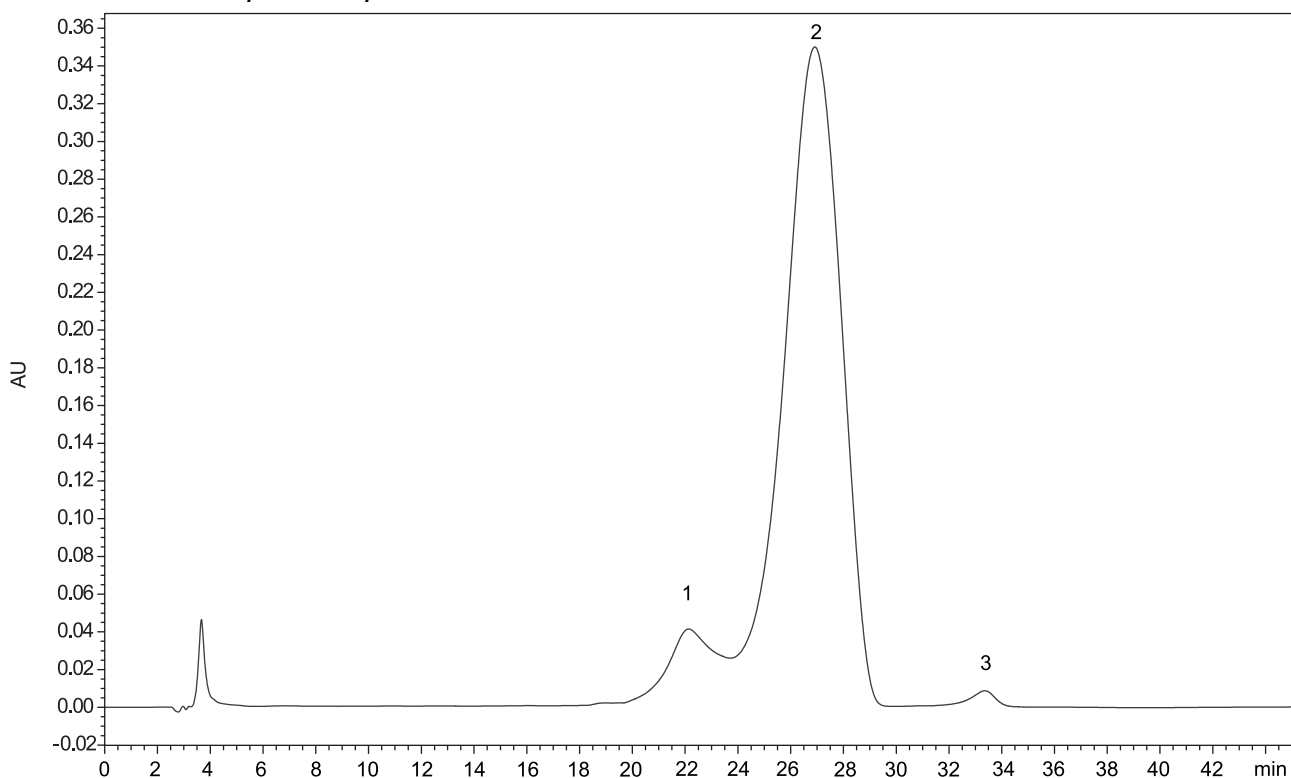
40
41 **Sodium (triméthylsilylpropionate de) deutérié.** $C_6H_9^2H_4NaO_2Si$. (M_r 172,3). XXXXXXXX.
42 [24493-21-8].

43 3-(Triméthylsilyl)(2,2,3,3- 2H_4)propionate de sodium. TSP- d_4 .

44
45 *Degré de deutériation* : au minimum 98 pour cent.

46
47 Poudre blanche ou sensiblement blanche.

1 *Le chromatogramme suivant est présenté pour information mais ne sera pas publié*
 2 *dans la Pharmacopée Européenne.*



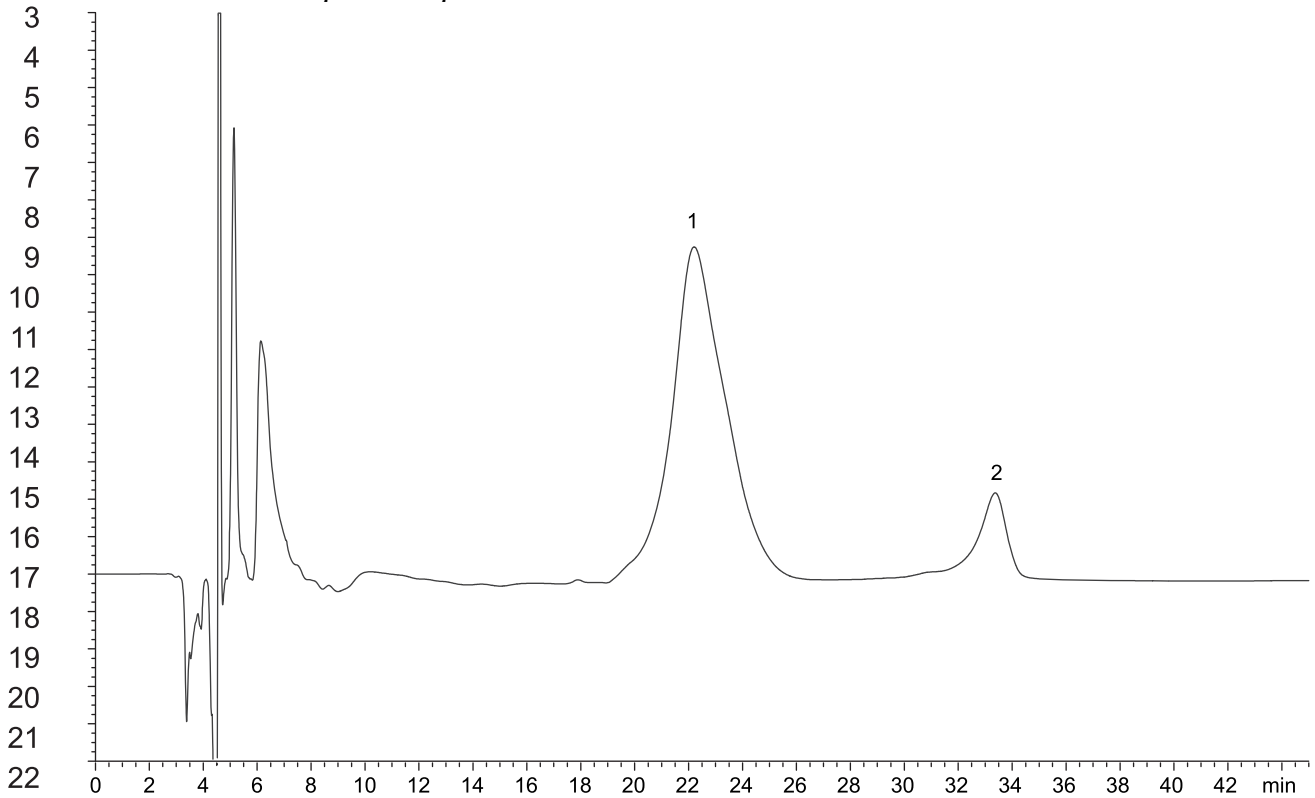
23 1. sulfate de dermatan + sulfate de
 24 chondroïtine

2. héparine

3. chondroïtine
 persulfatée

25 *Figure 0333.-1. – Chromatogramme pour l'identification C de l'héparine sodique :*
 26 *solution témoin (c) (chromatogramme obtenu après soustraction du blanc)*

1 *Le chromatogramme suivant est présenté pour information mais ne sera pas publié*
2 *dans la Pharmacopée Européenne.*



23
24 1. sulfate de dermatan + sulfate de chondroïtine

2. chondroïtine persulfatée

25 *Figure 0333.-2. – Chromatogramme pour l'essai des substances apparentées de*
26 *l'héparine sodique : solution témoin (e) (chromatogramme obtenu après soustraction*
27 *du blanc)*

28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47