

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 ~ 3	90	10
3 ~ 15	90 → 0	10 → 100

流量：毎分0.2mL

測定範囲：溶媒のピークの後からヘパリンの保持時間の2倍の範囲

#### システム適合性

検出の確認：理化学試験用ヘパリンナトリウム標準品10mgを水0.40mLに溶かし、ヘパリンナトリウム標準原液とする。別に、過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品0.10mgを水0.20mLに溶かし、過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液とする。ヘパリンナトリウム標準原液60 $\mu$ L、過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液3 $\mu$ L及び水12 $\mu$ Lを混和した液20 $\mu$ Lにつき、上記の条件で操作するとき、過硫酸化コンドロイチン硫酸のピークを認める。

システムの性能：ヘパリンナトリウム標準原液120 $\mu$ Lに過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液30 $\mu$ Lを混和し、システム適合性試験用溶液とする。この液20 $\mu$ Lにつき、上記の条件で操作するとき、ヘパリン、過硫酸化コンドロイチン硫酸の順に溶出し、その分離度は1.5以上である。

システムの再現性：システム適合性試験用溶液20 $\mu$ Lにつき，上記の条件で試験を6回繰り返し返すとき，過硫酸化コンドロイチン硫酸のピーク面積の相対標準偏差は2.0%以下である。

第十五改正日本薬局方医薬品各条の部くパリンナトリウムの条性状の項の次に次の一項を加える。  
確認試験 本品及び物理化学試験用ヘパリンナトリウム標準品1mgずつを水1mLに溶かし，試料溶液及び標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液20 $\mu$ Lずつをとり，次の条件で液体クロマトグラフィー<2.01>により試験を行うとき，試料溶液及び標準溶液から得た主ピークの保持時間は等しい。

#### 試験条件

検出器，カラム，カラム温度，移動相A，移動相B，移動相の送液及び流量は純度試験(6)の試験条件を準用する。

#### システム適合性

システムの性能：理化学試験用ヘパリンナトリウム標準品1.0mgを水0.60mLに溶かした液90 $\mu$ L，過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品0.10mgを水0.20mLに溶かした液30 $\mu$ L及びデルマタン硫酸エステル1.0mgを水2.0mLに溶かした液30 $\mu$ Lを混和する。この液20 $\mu$ Lにつき，上記の条件で操作するとき，デルマタン硫酸エステル，ヘパリン，過硫酸化コンドロイチン硫酸の順に溶出し，デルマタン硫酸エステルとヘパリンとの分離度は1.0以上，ヘパリンと過硫酸化コンドロイチン硫酸との分離度は1.5以上である。

第十五改正日本薬局方医薬品各条の部へパリンナトリウムの条純度試験の項(5)の目中「溶かし、試料溶液とする。この液につき核磁気共鳴スペクトル測定用」を「溶かす。この液につき、」に改め、「(2.21)」のトビ「により、」を加え、「用いる方法により」を「用いて」に、「 $\delta 2.13 \sim 2.17 \text{ppm}$ 」を「 $\delta 2.15 \pm 0.02 \text{ppm}$ 」に、「認めない。」を「認めないか、又は認めることがあつても、 $^{13}\text{C}$ をデカップリングして測定するとき、そのシグナルは消失する。」に改め、回目試験条件中「200」を「1000」に改め、回目システム適合性を次のように改める。

#### システム適合性

システムの性能： 理化学試験用ヘパリンナトリウム標準品20mgを核磁気共鳴スペクトル測定用3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム- $d_4$ の核磁気共鳴スペクトル測定用重水溶液（1→10000）0.40mLに溶かした液に、過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品0.10mgを核磁気共鳴スペクトル測定用3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム- $d_4$ の核磁気共鳴スペクトル測定用重水溶液（1→10000）1.0mLに溶かした液0.20mLを加える。この液につき、上記の条件で操作するとき、 $\delta 2.04 \pm 0.02 \text{ppm}$ にヘパリンのN-アセチル基に由来するシグナルを、 $\delta 2.15 \pm 0.02 \text{ppm}$ に過硫酸化コンドロイチン硫酸のN-アセチル基に由来するシグナルを、それぞれ認める。

第十五改正日本薬局方医薬品各条の部へパリンナトリウムの条純度試験の項に次の二目を加える。

(6) 類縁物質 本品2.0mgを水0.1mlに溶かした液20 $\mu$ Lを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行うとき、ヘパリンのピーク以降にピークを認めない。

試験条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：202nm)

カラム：内径2.0mm, 長さ7.5cmのステンレス管に10 $\mu$ mの液体クロマトグラフィー用ジエチルアミノエチル基を結合した合成高分子を充てんする。

カラム温度：35 $^{\circ}$ C付近の一定温度

移動相 A：リン酸二水素ナトリウム二水和物0.4gを水1000mlに溶かし、薄めたリン酸 (1 $\rightarrow$ 10) を加えてpH3.0に調整する。

移動相 B：リン酸二水素ナトリウム二水和物0.4g及び過塩素酸リチウム106.4gを水1000mlに溶かし、薄めたリン酸 (1 $\rightarrow$ 10) を加えてpH3.0に調整する。

移動相の送液：移動相 A及び移動相 Bの混合比を次のように変えて濃度勾配制御する。

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 ~ 3	90	10
3 ~ 15	90 $\rightarrow$ 0	10 $\rightarrow$ 100

流量：毎分0.2mL

測定範囲：溶媒のピークの後からヘパリンの保持時間の2倍の範囲

#### システム適合性

検出の確認：理化学試験用ヘパリンナトリウム標準品10mgを水0.40mLに溶かし，ヘパリンナトリウム標準原液とする。別に過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品0.10mgを水0.20mLに溶かし，過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液とする。ヘパリンナトリウム標準原液60 $\mu$ L，過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液3 $\mu$ L及び水12 $\mu$ Lを混和した液20 $\mu$ Lにつき，上記の条件で操作するとき，過硫酸化コンドロイチン硫酸のピークを認める。

システムの性能：ヘパリンナトリウム標準原液120 $\mu$ Lに過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液30 $\mu$ Lを混和し，システム適合性試験用溶液とする。この液20 $\mu$ Lにつき，上記の条件で操作するとき，ヘパリン，過硫酸化コンドロイチン硫酸の順に溶出し，その分離度は1.5以上である。

システムの再現性：システム適合性試験用溶液20 $\mu$ Lにつき，上記の条件で試験を6回繰り返すとき，過硫酸化コンドロイチン硫酸のピーク面積の相対標準偏差は2.0%以下である。

(7) ガラクトサミン 本品2.4mgを水/塩酸混液（7：5）1.0mLに溶かし，試料原液とする。D-ガラクトコサミン塩酸塩8.0mgを水/塩酸混液（7：5）に溶かして正確に10mLとした液99容量に，D-ガラクト

トサミン塩酸塩8.0mgを水/塩酸混液（7：5）に溶かして正確に10mlとした液1容量を加え、標準原液とする。試料原液及び標準原液500 $\mu$ Lずつを共栓試験管にとり、それぞれを密栓して100°Cで6時間加熱する。これらの液を室温まで冷やし、100 $\mu$ Lずつをとり、減圧乾固する。それぞれの残留物にメタノール50 $\mu$ Lずつを加え、室温で減圧乾固する。それぞれの残留物を水10 $\mu$ Lずつに溶かし、アミノ安息香酸誘導体化試液40 $\mu$ Lずつを加え、80°Cで1時間加熱する。これらの液を室温まで冷やし、減圧乾固する。それぞれの残留物に水及び酢酸エチル200 $\mu$ Lずつを加え、激しく振り混ぜ、遠心分離する。上層を除去し、それぞれの下層に酢酸エチル200 $\mu$ Lずつを加え、激しく振り混ぜ、遠心分離する。下層をそれぞれ試料溶液及び標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液5 $\mu$ Lずつにつき、次の条件で液体クロマトグラフィー（2.01）により試験を行うとき、試料溶液のグルコサミンのピーク面積に対するガラクトサミンのピーク面積の比は、標準溶液のグルコサミンのピーク面積に対するガラクトサミンのピーク面積の比より大きくない。

#### 試験条件

検出器：蛍光光度計（励起波長：305nm，蛍光波長：360nm）

カラム：内径4.6mm，長さ15cmのステンレス管に3 $\mu$ mの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：45°C付近の一定温度

移動相：水/トリフルオロ酢酸混液（1000：1）100mLにアセトニトリル100mLを加える。この液140mLを水/トリフルオロ酢酸混液（1000：1）860mLに加える。

流量：毎分1.0mL

面積測定範囲：注入後50分間

#### システム適合性

検出の確認：D-マンノサミン塩酸塩8.0mgを水/塩酸混液（7：5）10mLに溶かし、マンノサミン標準溶液とする。標準原液/マンノサミン標準溶液混液（100：1）500 $\mu$ Lを共栓試験管にとり、密栓して100 $^{\circ}$ Cで6時間加熱する。この液を室温まで冷やし、100 $\mu$ Lをとり、減圧乾固する。残留物にメタノール50 $\mu$ Lを加え、室温で減圧乾固する。残留物を水10 $\mu$ Lに溶かし、アミノ安息香酸誘導体化試液40 $\mu$ Lを加え、80 $^{\circ}$ Cで1時間加熱する。この液を室温まで冷やし、減圧乾固する。残留物に水及び酢酸エチル200 $\mu$ Lずつを加え、激しく振り混ぜ、遠心分離し、減圧乾固する。残留物に水及び酢酸エチル200 $\mu$ Lを加え、激しく振り混ぜ、遠心分離する。上層を除去し、下層に酢酸エチル200 $\mu$ Lを加え、激しく振り混ぜ、遠心分離するとき下層をシステム適合性試験用溶液とする。この液5 $\mu$ Lにつき、上記の条件で操作するとき、グルコサミンのピーク面積に対するガラクトサミンのピーク面積の比は、0.7～2.0%である。

システムの性能：システム適合性試験用溶液5 $\mu$ Lにつき、上記の条件で操作するとき、グル

コサミン、マンノサミン、ガラクトサミンの順に溶出し、グルコサミンとマンノサミンとの分離度及びマンノサミンとガラクトサミンとの分離度は、それぞれ1.5以上である。

システムの再現性：システム適合性試験用溶液 5  $\mu$ Lにつき、上記の条件で試験を6回繰り返し返すとき、グルコサミンのピーク面積に対するガラクトサミンのピーク面積の比の相対標準偏差は4.0%以下である。