

(参考)

## ヘパリンナトリウム

第十五改正日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウムの条に、次の項を加える。

**確認試験** 本品及び理化学試験用ヘパリンナトリウム標準品 1 mg ずつを水 1 mL 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(2.0f)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 1.0 mg を水 0.60 mL 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 0.10 mg を水 0.20 mL に溶かした液 30  $\mu$ L 及びゲルマタン硫酸エステル 1.0 mg を水 2.0 mL 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、ゲ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、ゲルマタン硫酸エステルとヘパリンの分離度は 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ヘパリンナトリウムの条純度試験の項(5)を次のように改める。

**純度試験(5)** 過硫酸化コンドロイチン硫酸 本品 20 mg を核磁気共鳴スペクトル測定用 3-トリメチルシリルフロピオン酸ナトリウム- $d_1$  の核磁気共鳴スペクトル測定用重水溶液 (1 $\rightarrow$ 10000) 0.60 mL に溶かし、この液につき、3-トリメチルシリルフロピオン酸ナトリウム- $d_1$  を内部基準物質として核磁気共鳴スペクトル測定法(2.2f)により、プロトン共鳴周波数 400 MHz 以上の装置(1)を用いて  $\delta$  を測定するとき、 $\delta$  2.15  $\pm$  0.02 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認めないか、シグナルを認める場合には  $\delta$  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。

試験条件

温度：25°C

スピニング：オフ

データポイント数：32,768

スペクトル範囲：DMSO のシグナルを中心に  $\pm$  6.0 ppm

パルス角：90°

繰り返しパルス待ち時間：20 秒

タミースキャン：4 回

積算回数：ヘパリンの N-アセチル基のプロトンのシグナルの S/N 比が 1000 以上得られる回数

ウインドウ関数：指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz)

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 20 mg を核磁気共鳴スペクトル測定用 3-トリメチルシリルフロピオン酸ナトリウム- $d_1$  の核磁気共鳴スペクトル測定用重水溶液 (1 $\rightarrow$ 10000) 0.40 mL に溶かした液に、過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品 0.10 mg を核磁気共鳴スペクトル測定用 3-トリメチルシリルフロピオン酸ナトリウム- $d_1$  の核磁気共鳴スペクトル測定用重水溶液 (1 $\rightarrow$ 10000) 1.0 mL に溶かした液 0.20 mL 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 ppm にヘパリンの N-アセチル基に由来するシグナル、及び  $\delta$  2.15  $\pm$  0.02 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認める。

**第十五改正日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウムの条純度試験の項(5)の次に次の二目を加える。**

**純度試験(6)** 類縁物質 本品 2.0 mg を水 0.1 mL 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 (2.0I) 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：紫外吸光光度計 (測定波長：202 nm)

カラム：内径 2.0 mm, 長さ 7.5 cm 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°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 0.4 g を水 1000 mL に溶かし、薄めたリン酸(1→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 0.4 g 及び過塩素酸リチウム 106.4 g を水 1000 mL に溶かし、薄めたリン酸(1→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均配制御する。

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

流量：毎分 0.2 mL

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 10 mg を水 0.40 mL に溶かして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 0.10 mg を水 0.20 mL 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、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。

**純度試験(7)** ガラクトサミン 本品 2.4 mg を水・塩酸混液 (7:5) 1.0 mL に溶かし、試料原液とする。D-グルコサミン塩酸塩 8.0 mg を水・塩酸混液 (7:5) に溶かして正確に 10 mL とした液 99 容量に、D-ガラクトサミン塩酸塩 8.0 mg を水・塩酸混液 (7:5) に溶かして正確に 10 mL 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 ずつを取り、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 (2.0I) 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：305 nm, 蛍光波長：360 nm)

カラム：内径 4.6 mm, 長さ 15 cm 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）100 mL にアセトニトリル 100 mL を加える。この液 140 mL を水／トリフルオロ酢酸混液（1000：1）860 mL に加える。

流量：毎分 1.0 mL

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 8.0 mg を水／塩酸混液（7：5）10 mL 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°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°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、遠心分離し、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、上記の条件で試験するとき、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、上記の条件で試験するとき、グルコサミン、マンノサミン及び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及びマンノサミンとガラクトサミン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。

## ヘパリンカルシウム

第十五改正日本薬局方医薬品各条ヘパリンカルシウムの条確認試験の項中(2)を(3)とし、(1)の次に次のように加える。

**確認試験(2)** 本品及び理化学試験用ヘパリンナトリウム標準品 1 mg ずつを水 1 mL 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(2.0f)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 1.0 mg を水 0.60 mL 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 0.10 mg を水 0.20 mL に溶かした液 30  $\mu$ L 及びゲルマタン硫酸エステル 1.0 mg を水 2.0 mL 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、ゲ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、ゲルマタン硫酸エステルとヘパリンの分離度は 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ヘパリンカルシウムの条純度試験の項中(8)を、次のように改める。

**純度試験(8)** 過硫酸化コンドロイチン硫酸 本品 20 mg 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 $\rightarrow$ 10000) 0.60 mL に溶かす。この液につき、3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム- $d_4$ を内部基準物質として核磁気共鳴スペクトル測定法(2.2f)により、プロトン共鳴周波数 400 MHz 以上の装置(1)を用いて  $\mu$ H を測定するとき、 $\delta$  2.18 $\pm$ 0.05 ppm に過硫酸化コンドロイチン硫酸の  $\Delta$ -アセチル基に由来するシグナルを認めないか、シグナルを認める場合には 15°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。

試験条件

温度: 25°C

スピンク: オフ

データポイント数: 32,768

スペクトル範囲: D10 のシグナルを中心に  $\pm$ 6.0 ppm

パルス角: 90°

繰り返しパルス待ち時間: 20 秒

ダミーキャン: 4 回

積算回数: ヘパリンの  $\Delta$ -アセチル基のプロトンのシグナルの S/N 比が 1000 以上得られる回数

ウインドウ関数: 指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz)

システム適合性

システムの性能: 本品 20 mg 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 $\rightarrow$ 10000) 0.40 mL に溶かした液に、過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品 0.10 mg 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 $\rightarrow$ 10000) 1.0 mL に溶かした液 0.20 mL 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 ppm にヘパリンの  $\Delta$ -アセチル基に由来するシグナル、及び  $\delta$  2.18 $\pm$ 0.05 ppm に過硫酸化コンドロイチン硫酸の  $\Delta$ -アセチル基に由来するシグナルを認める。

第十五改正日本薬局方医薬品各条ヘパリンカルシウムの条純度試験に、次の項を加える。

純度試験(9) 類縁物質 本品 2.0 mg を水 0.1 mL 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：紫外吸光光度計（測定波長：202 nm）

カラム：内径 2.0 mm、長さ 7.5 cm 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°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 0.4 g を水 1000 mL に溶かし、薄めたリン酸(1→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 0.4 g 及び過塩素酸リチウム 106.4 g を水 1000 mL に溶かし、薄めたリン酸(1→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 0.2 mL

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 10 mg を水 0.10 mL に溶かして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 0.10 mg を水 0.20 mL 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。

## 9.01 標準品

第十五改正日本薬局方医薬品一般試験法 9.01 標準品の条(1)の項過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品を、次のように改める。

過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品 確認試験, 純度試験

第十五改正日本薬局方医薬品一般試験法 9.01 標準品の条(1)の項に、次の目を加える。

理化学試験用ヘパリンナトリウム標準品 確認試験, 純度試験

## 9.41 試薬・試液

第十五改正日本薬局方一般試験法の部 9.41 試薬・試液の条に、次の項を加える。

アミノ安息香酸誘導体化試液 アミノ安息香酸エチル 280 mg にメタノール 600  $\mu$ L を加え、約 50°C に加温して溶かし、酢酸 170  $\mu$ L 及びボラン-ピリジン錯体 145  $\mu$ L を加える。

過塩素酸リチウム  $\text{LiClO}_4$  白色の結晶又は結晶性の粉末である。

含量 98%以上。一定量法 本品約 0.2 g を精密に量り、水 30 mL に溶かし、カラム(カラムクロマトグラフィ用強酸性イオン交換樹脂(H型)約 25 mL を内径約 11 mm、高さ 30 cm のクロマトグラフィ管に注入し、1 mol/L 塩酸試液 200 mL を加え 1 分間に 3~4 mL の流量で流出させた後、水を流し、流出液にメチルオレンジ試液を加えたときに色が黄みの赤になるまで繰り返し洗浄して調製したもの)に入れ、1 分間に 3~4 mL の流量で流出する。次に水約 30 mL ずつ 1 分間 3~4 mL の速度で 5 回洗う。洗液を流出液に合わせ、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム液で滴定する(指示薬:プロモチモールブルー試液 3 滴)。同様な方法で空試験を行い、補正する。

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム液 1 mL = 10.64 mg  $\text{LiClO}_4$

D-ガラクトサミン塩酸塩  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5 \cdot \text{HCl}$  白色の粉末である。融点: 約 180°C(分解)。

旋光度 ( $20^\circ$ )  $[\alpha]_D^{20}$ : +90 ~ +97° (1g, 水, 100mL, 100mm)。

D-グルコサミン塩酸塩  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5 \cdot \text{HCl}$  白色の結晶又は結晶性の粉末である。

含量 98%以上。一定量法 本品約 0.4 g を精密に量り、水 50 mL に溶かし、薄めた硝酸(1→3) 5 mL を加え、0.1 mol/L 硝酸銀液で滴定する(電位差滴定法)。

0.1 mol/L 硝酸銀 1 mL = 21.56 mg  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5 \cdot \text{HCl}$

酢酸カルシウム一水和物  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$  [K8364, 特級]

デルマタン硫酸エステル ブタ皮又はブタ小腸をアルカリ抽出後、プロテアーゼ消化し、アルコール分画法により精製したムコ多糖。セルロースアセテート膜電気泳動を行い、トルイジンブルーO 溶液(1→200)に浸して染色するとき、単一バンドである。

膜電気泳動条件

セルロースアセテート膜：幅 6 cm × 長さ 10 cm

移動相：酢酸カルシウム一水和物 52.85g を水に溶かし，1000mL とする。

泳動時間：3 時間(1.0 mA/cm)

**ボラン-ピリジン錯体**  $C_5H_5BN$  含量 80%以上. 定量法 本品 30 mg を精密に量り，0.05 mol/L ヨウ素溶液 40 mL に溶かし，薄めた硫酸 (1→6) 10 mL を加え，0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム液で滴定する (指示薬：デンプン試液)。同様の方法で空試験を行い補正する。

0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム液 1 mL = 1.549 mg  $C_5H_5BN$

**D-マンノサミン塩酸塩**  $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$  白色の粉末である。融点：約 168°C (分解)。

旋光度  $\langle 2.49 \rangle$   $[\alpha]_D^{20} : -4.2 \sim -3.2^\circ$  (0.4 g, 水, 20 mL, 100 mm)。