

事 務 連 絡

平成22年9月29日

(独) 医薬品医療機器総合機構 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

第十五改正日本薬局方の一部改正に係る英文版
(ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムに係る一部改正) について

標記について、別添写しのとおり各都道府県衛生主管部(局)薬務主管課宛に連絡
いたしましたので、その写しを送付いたします。





事 務 連 絡

平成22年9月29日

各都道府県衛生主管部（局）

薬務主管課 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

第十五改正日本薬局方の一部改正に係る英文版
(ヘパリンナトリウム、ヘパリンカルシウムに係る一部改正) について

標記について、平成20年7月31日厚生労働省告示第417号及び平成22年7月30日厚生労働省告示第322号により、第十五改正日本薬局方の一部改正をしたところですが、今般、別添のとおり英文版を作成しましたので御連絡いたします。

なお、当該英文版に対応する邦文版を参考として添付いたします。

Heparin Sodium

ヘパリンナトリウム

Add the following next to Description:

Identification Dissolve 1 mg each of Heparin Sodium and Heparin Sodium Reference Standard for physicochemical test in 1 mL of water, and use these solutions as the sample solution and standard solution, respectively. Perform the test with 20 μ L each of the sample solution and standard solution as directed under Liquid Chromatography <2.01> according to the following conditions: the retention times for the major peak from the sample solution and the standard solution are identical.

Operating conditions-

Detector, column, column temperature, mobile phase A, mobile phase B, flowing of the mobile phase and flow rate: Proceed as directed under the operating conditions in Purity (6).

System suitability-

System performance: Dissolve 1.0 mg of Heparin Sodium Reference Standard for physicochemical test in 0.60 mL of water. Dissolve 0.10 mg of Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard in 0.20 mL of water. Dissolve 1.0 mg of dermatan sulfate in 2.0 mL of water. To 90 μ L of the solution of Heparin Sodium Reference Standard add 30 μ L each of the solutions of over-sulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate, and mix. When the procedure is run with 20 μ L of the mixture under the above operating conditions, dermatan sulfate, heparin and over-sulfated chondroitin sulfate are eluted in this order with the resolution between the peaks of dermatan sulfate and heparin being not less than 1.0 and that between the peaks of heparin and over-sulfated chondroitin sulfate being not less than 1.5.

Change the Purity (5) to read:

Purity (5) Over-sulfated Chondroitin Sulfate-Dissolve 20 mg of Heparin Sodium in 0.60 mL of a solution of sodium 3-trimethylsilylpropionate- d_4 for nuclear magnetic resonance spectroscopy in heavy water for nuclear magnetic resonance spectroscopy (1 in 10000). Determine the spectrum of this solution as directed under Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy <2.21> (^1H) in accordance with the following conditions, using sodium 3-trimethylsilylpropionate- d_4 for nuclear magnetic resonance spectroscopy as an internal reference compound: it exhibits no signal corresponding to *N*-acetyl proton of over-sulfated chondroitin sulfate at δ 2.15 \pm 0.02 ppm, or the signal disappears when determining the spectrum of the sample solution as directed under ^1H with ^{13}C -decoupling.

Operation conditions-

Spectrometer: (1) FT-NMR, Not less than 400 MHz

Temperature: 25°C

Spinning: Off

Number of data points: 32,768

Spectral range: Signal of DHO \pm 6.0 ppm

Flip angle: 90°

Delay time: 20 seconds

Dummy scan: 4

Number of scans: S/N ratio of the signal of *N*-acetyl proton of heparin is not less than 1000

Window function: Exponential function (Line broadening factor = 0.2 Hz)

System suitability-

System performance: Dissolve 20 mg of Heparin Sodium Reference Standard for physicochemical test in 0.40 mL of a solution of sodium 3-trimethylsilylpropionate- d_4 for nuclear magnetic resonance spectroscopy in heavy water for nuclear magnetic resonance spectroscopy (1 in 10000). Dissolve 0.10 mg of Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard in 1.0 mL of a solution of sodium 3-trimethylsilylpropionate- d_4 for nuclear magnetic resonance spectroscopy in heavy water for nuclear magnetic resonance spectroscopy (1 in 10000). To the solution of Heparin Sodium Reference Standard for physicochemical test add 0.2 mL of the solution of Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard. When determining the spectrum of this solution under the above conditions, it exhibits the signal of *N*-acetyl proton of heparin and the signal of *N*-acetyl proton of over-sulfated chondroitin sulfate at δ 2.04 \pm 0.02 ppm and δ 2.15 \pm 0.02 ppm, respectively.

Add the following next to Purity (5)

Purity (6) Related substances- Dissolve 2.0 mg of Heparin Sodium in 0.1 mL of water, and perform the test with exactly 20 μ L of this solution as directed under Liquid Chromatography <2.01> according to the following conditions: it exhibits no peaks after the heparin peak.

Operating conditions-

Detector: An ultraviolet absorption photometer (wavelength: 202 nm).

Column: A stainless steel column 2.0 mm in inside diameter and 7.5 cm in length, packed with diethylaminoethyl group bound to synthetic polymer for liquid chromatography (10 μ m in particle diameter).

Column temperature: A constant temperature of about 35°C.

Mobile phase A: Dissolve 0.4 g of sodium dihydrogenphosphate dihydrate in 1000 mL of water and adjust to a pH of 3.0 with diluted phosphoric acid (1 in 10).

Mobile phase B: Dissolve 0.4 g of sodium dihydrogenphosphate dihydrate and 106.4 g of lithium perchlorate in 1000 mL of water and adjust to a pH of 3.0 with diluted phosphoric acid (1 in 10).

Flowing of the mobile phase: Control the gradient by mixing the mobile phases A and B as directed in the following table.

Time after injection of sample (min)	Mobile phase A (vol%)	Mobile phase B (vol%)
0 - 3	90	10
3 - 15	90→0	10→100

Flow rate: 0.2 mL per minute.

Time span of measurement: About 2 times as long as the retention time of heparin, beginning after the solvent peak.

System suitability-

Test for required detectability: Dissolve 10 mg of Heparin Sodium Reference Standard for physicochemical test in 0.40 mL of water, and use this solution as the Heparin Sodium standard stock solution. Separately, dissolve 0.10 mg of Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard in 0.20 mL of water, and use this solution as the over-sulfated chondroitin sulfate standard solution. To 60 μ L of the Heparin Sodium standard stock solution add 3 μ L of the over-sulfated chondroitin sulfate standard solution and 12 μ L of water, and mix. When the procedure is run with 20 μ L of the mixture under the above operating conditions, it exhibits a peak for over-sulfated chondroitin sulfate.

System performance: To 120 μ L of the Heparin Sodium standard stock solution add 30 μ L of the over-sulfated chondroitin sulfate standard solution, mix and use this solution as the solution for system suitability test. When the procedure is run with 20 μ L of the solution for system suitability test under the above operating conditions, heparin and over-sulfated chondroitin sulfate are eluted in this order with the resolution between these peaks being not less than 1.5.

System repeatability: When the test is repeated 6 times with 20 μ L of the solution for system suitability test under the above operating conditions, the relative standard deviation of the peak area of over-sulfated chondroitin sulfate is not more than 2.0%.

Purity (7) Galactosamine- Dissolve 2.4 mg of Heparin Sodium in 1.0 mL of water and hydrochloric acid (7 : 5), and use this solution as the Heparin Sodium stock solution. Dissolve 8.0 mg of D-glucosamine hydrochloride in water and hydrochloric acid (7 : 5) to make exactly 10 mL. Dissolve 8.0 mg of D-galactosamine hydrochloride in water and hydrochloric acid (7 : 5) to make exactly 10 mL. To 99 volumes of the solution of D-glucosamine add 1 volume of the solution of D-galactosamine, and use this solution as the standard stock solution. Transfer 500 μ L each of the Heparin Sodium stock solution and the standard stock solution to a glass-stoppered test tube, stopper tightly, and heat at 100°C for 6 hours. After cooling to room temperature, evaporate 100 μ L each of the reaction solutions to dryness. Add 50 μ L of methanol to each of the residues and evaporate to dryness at room temperature. Dissolve each of the residues in 10 μ L of water, add 40 μ L of aminobenzoate derivatization TS, and heat at 80°C

for 1 hour. After cooling to room temperature, evaporate the reaction solutions to dryness. Add 200 μ L each of water and ethyl acetate to each of the residues, shake vigorously, and then centrifuge. After remove the upper layers, add 200 μ L of ethyl acetate to each of the lower layers, shake vigorously, and then centrifuge. These lower layers are used as the sample solution and standard solution. Perform the test with 5 μ L each of the sample solution and standard solution as directed under Liquid Chromatography <2.01> according to the following conditions: the peak area ratio of galactosamine to glucosamine of the sample solution is not larger than that of the standard solution.

Operating conditions-

Detector: A fluorescence photometer (excitation wavelength: 305 nm; emission wavelength: 360 nm).

Column: A stainless steel column 4.6 mm in inside diameter and 15 cm in length, packed with octadecylsilanized silica gel for liquid chromatography (3 μ m in particle diameter).

Column temperature: A constant temperature of about 45°C.

Mobile phase: To 100 mL of water and trifluoroacetic acid (1000 : 1) add 100 mL of acetonitrile. Add 140 mL of the solution to 860 mL of water and trifluoroacetic acid (1000 : 1).

Flow rate: 1.0 mL per minute.

Time span of measurement: About 50 minutes after injected.

System suitability-

Test for required detectability: Dissolve 8.0 mg of D-mannosamine hydrochloride in 10 mL of water and hydrochloric acid (7 : 5), and use this solution as the mannosamine standard solution. Transfer 500 μ L of the standard stock solution and the mannosamine standard solution (100 : 1) to a glass-stoppered test tube, stopper tightly, and heat at 100°C for 6 hours. After cooling this solution to room temperature, evaporate 100 μ L of the reaction solution to dryness. Add 50 μ L of methanol to the residue and evaporate to dryness at room temperature. Dissolve the residue in 10 μ L of water, add 40 μ L of the ethyl aminobenzoate derivatization TS, and heat at 80°C for 1 hour. After cooling this solution to room temperature, evaporate the reaction solution to dryness. Add 200 μ L each of water and ethyl acetate to the residue, shake vigorously, and then centrifuge. After remove the upper layer, add 200 μ L of ethyl acetate to the lower layer, shake vigorously, and then centrifuge. The lower layer is used as the solution for system suitability test. When the procedure is run with 5 μ L of the solution for system suitability test under the above operating conditions, the ratio of the peak area of galactosamine to that of glucosamine is 0.7 – 2.0%.

System performance: When the procedure is run with 5 μ L of the solution for system suitability test under the above operating conditions, glucosamine, mannosamine and galactosamine are eluted in this order, with the resolution each between the peaks of glucosamine and mannosamine and between the peaks of mannosamine and galactosamine being not less than 1.5.

System repeatability: When the test is repeated 6 times with 5 μ L of the solution for system suitability test under the above operating conditions, the relative standard deviation of the ratio of the peak area of galactosamine to that of glucosamine is not more than 4.0%.

Heparin Calcium

ヘパリンカルシウム

Change the Identification (2) to Identification (3) and add the following next to Identification (1)

Identification (2) Dissolve 1 mg each of Heparin Calcium and Heparin Sodium Reference Standard for physicochemical test in 1 mL of water, and use these solutions as the sample solution and standard solution, respectively. Perform the test with 20 μ L each of the sample solution and standard solution as directed under Liquid Chromatography <2.01> according to the following conditions: the retention times for the major peak from the sample solution and the standard solution are identical.

Operating conditions-

Detector, column, column temperature, mobile phase A, mobile phase B, flowing of the mobile phase and flow rate: Proceed as directed under the operating conditions in Purity (9).

System suitability-

System performance: Dissolve 1.0 mg of Heparin Sodium Reference Standard for physicochemical test in 0.60 mL of water. Dissolve 0.10 mg of Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard in 0.20 mL of water. Dissolve 1.0 mg of dermatan sulfate in 2.0 mL of water. To 90 μ L of the solution of Heparin Sodium Reference Standard add 30 μ L each of the solutions of Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard and dermatan sulfate, and mix. When the procedure is run with 20 μ L of the mixture under the above operating conditions, dermatan sulfate, heparin and over-sulfated chondroitin sulfate are eluted in this order with the resolution between the peaks of dermatan sulfate and heparin being not less than 1.0 and that between the peaks of heparin and over-sulfated chondroitin sulfate being not less than 1.5.

Change the Purity (8) to read:

Purity (8) Over-sulfated Chondroitin Sulfate-Dissolve 20 mg of Heparin Calcium in 0.60 mL of a solution of sodium 3-trimethylsilylpropionate- d_4 for nuclear magnetic resonance spectroscopy in heavy water for nuclear magnetic resonance spectroscopy (1 in 10000). Determine the spectrum of this solution as directed under Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy <2.21> (^1H) in accordance with the following conditions, using sodium 3-trimethylsilylpropionate- d_4 for nuclear magnetic resonance spectroscopy as an internal reference compound: it exhibits no signal corresponding to *N*-acetyl proton of over-sulfated chondroitin sulfate at δ 2.18 \pm 0.05 ppm, or the signal disappears when determining the spectrum of the sample solution as directed under ^1H with ^{13}C -decoupling.

Operating conditions-

Spectrometer: (1) FT-NMR, Not less than 400 MHz

Temperature: 25°C

Spinning: Off

Number of data points: 32,768

Spectral range: Signal of DHO \pm 6.0 ppm

Flip angle: 90°

Delay time: 20 seconds

Dummy scan: 4

Number of scans: S/N ratio of the signal of *N*-acetyl proton of heparin is not less than 1000

Window function: Exponential function (Line broadening factor = 0.2 Hz)

System suitability-

System performance: Dissolve 20 mg of Heparin Calcium in 0.40 mL of a solution of sodium 3-trimethylsilylpropionate- d_4 for nuclear magnetic resonance spectroscopy in heavy water for nuclear magnetic resonance spectroscopy (1 in 10000). Dissolve 0.10 mg of Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard in 1.0 mL of a solution of sodium 3-trimethylsilylpropionate- d_4 for nuclear magnetic resonance spectroscopy in heavy water for nuclear magnetic resonance spectroscopy (1 in 10000). To the solution of heparin calcium add 0.20 mL of the solution of Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard. When determining the spectrum of this solution under the above conditions, it exhibits the signal of *N*-acetyl proton of heparin and the signal of *N*-acetyl proton of over-sulfated chondroitin sulfate at δ 2.04 \pm 0.02 ppm and δ 2.18 \pm 0.05 ppm, respectively.

Add the following next to Purity (8)

Purity (9) Related substances- Dissolve 2.0 mg of Heparin Calcium in 0.1 mL of water, and perform the test with exactly 20 μ L of this solution as directed under Liquid Chromatography <2.01> according to the following conditions: it exhibits no peaks after the heparin peak.

Operation conditions-

Detector: An ultraviolet absorption photometer (wavelength: 202 nm).

Column: A stainless steel column 2.0 mm in inside diameter and 7.5 cm in length, packed with diethylaminoethyl group bound to synthetic polymer for liquid chromatography (10 μ m in particle diameter).

Column temperature: A constant temperature of about 35°C.

Mobile phase A: Dissolve 0.4 g of sodium dihydrogenphosphate dihydrate in 1000 mL of water and adjust to a pH of 3.0 with diluted phosphoric acid (1 in 10).

Mobile phase B: Dissolve 0.4 g of sodium dihydrogenphosphate dihydrate and 106.4 g of lithium perchlorate in 1000 mL of water and adjust to a pH of 3.0 with diluted phosphoric acid (1 in 10).

Flowing of the mobile phase: Control the gradient by mixing the mobile phases A and B as directed in the following table.

Time after injection of sample (min)	Mobile phase A (vol%)	Mobile phase B (vol%)
0 – 3	90	10
3 – 15	90→0	10→100

Flow rate: 0.2 mL per minute.

Time span of measurement: About 2 times as long as the retention time of heparin, beginning after the solvent peak.

System suitability-

Test for required detectability: Dissolve 10 mg of Heparin Sodium Reference Standard for physicochemical test in 0.40 mL of water, and use this solution as the Heparin Sodium standard stock solution. Separately, dissolve 0.10 mg of Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard in 0.20 mL of water, and use this solution as the over-sulfated chondroitin sulfate standard solution. To 60 μ L of the Heparin Sodium standard stock solution add 3 μ L of the over-sulfated chondroitin sulfate standard solution and 12 μ L of water, and mix. When the procedure is run with 20 μ L of the mixture under the above operating conditions, it exhibits an over-sulfated chondroitin sulfate peak.

System performance: To 120 μ L of the Heparin Sodium standard stock solution add 30 μ L of the over-sulfated chondroitin sulfate standard solution, mix and use this solution as the solution for system suitability test. When the procedure is run with 20 μ L of the solution for system suitability test under the above operating conditions, heparin and over-sulfated chondroitin sulfate are eluted in this order with the resolution between these peaks being not less than 1.5.

System repeatability: When the test is repeated 6 times with 20 μ L of the solution for system suitability test under the above operating conditions, the relative standard deviation of the peak area of over-sulfated chondroitin sulfate is not more than 2.0%.

9.01 Reference Standards

Change the following to read:

Over-sulfated Chondroitin Sulfate Reference Standard: Identification, Purity

Add the following:

Heparin Sodium Reference Standard for physicochemical test: Identification, Purity

9.41 Reagents, Test Solutions

Add the following:

Aminobenzoate derivatization TS Dissolve 280 mg of ethyl aminobenzoate in 600 μ L of methanol by heating at about 50°C, and add 170 μ L of acetic acid and 145 μ L of borane-pyridine complex.

Lithium perchlorate LiClO₄ White, crystals or crystalline powder.

Content: not less than 98%. *Assay* - Accurately weigh about 0.2 g of lithium perchlorate, dissolve in 30 mL of water. Transfer the solution to a chromatographic column, prepared by pouring about 25 mL of strongly acidic ion-exchange resin (H type) for column chromatography into a chromatographic tube about 11 mm in inside diameter and about 300 mm in height (after adding 200 mL of 1 mol/L hydrochloride TS and flowing at a flow rate of 3-4 mL per minute, wash the chromatographic column with water until the color of the rinse water changes to yellowish red when adding methyl orange TS to the eluate), and flow at a flow rate of 3-4 mL per minute. Then, wash the column with about 30 mL of water at a flow rate of 3-4 mL per minute 5 times. Combine the rinse water and the eluate, and titrate <2.50> with 0.1 mol/L sodium hydroxide VS (indicator: 3 drops of bromothymol blue TS). Perform a blank determination, and make any necessary correction.

Each mL of 0.1 mol/L sodium hydroxide VS = 10.64 mg LiClO₄

D-Galactosamine hydrochloride C₆H₁₃NO₅·HCl White, powder. Melting point: about 180°C (decomposition).

Optical rotation <2.49> $[\alpha]_D^{20}$: +90 - +97° (1 g, water, 100 mL, 100 mm).

D-Glucosamine hydrochloride C₆H₁₃NO₅·HCl White, crystals or crystalline powder.

Content: not less than 98%. *Assay* - Accurately weigh about 0.4 g of D-Glucosamine hydrochloride, dissolve in 50 mL of water, add 5 mL of diluted nitric acid (1 in 3) and titrate <2.50> with 0.1 mol/L silver nitrate VS (potentiometric titration).

Each mL of 0.1 mol/L silver nitrate VS = 21.56 mg C₆H₁₃NO₅·HCl

Calcium acetate monohydrate (CH₃COO)₂Ca·H₂O [K8364, Special class]

Dermatan sulfate Dermatan sulfate is mucopolysaccharide purified from the skin and small intestines of pigs by alkaline extraction, followed by digestion with protease and fractionation by alcohol. When cellulose acetate membrane electrophoresis of dermatan sulfate is performed and the membrane is stained in a toluidine blue O solution (1 in 200), a single band appears.

Operation conditions of cellulose acetate membrane electrophoresis -

Cellulose acetate membrane: 6 cm in width and 10 cm in length

Mobile phase: Dissolve 52.85 g of calcium acetate monohydrate in water to make 1000 mL.

Run time: 3 hours (1.0 mA/cm)

Borane-pyridine complex C_5H_8BN

Content: not less than 80%. *Assay* - Accurately weigh about 30 mg of borane-pyridine complex, dissolve in 40 mL of 0.05 mol/L iodine solution, add 10 mL of diluted sulfuric acid (1 in 6), and titrate <2.50> with 0.1 mol/L sodium thiosulfate VS (indicator: starch TS). Perform a blank determination, and make any necessary correction.

Each mL of 0.1 mol/L sodium thiosulfate VS = 1.549 mg C_5H_8BN

D-Mannosamine hydrochloride $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$ White, powder. Melting point: about 168°C (decomposition).

Optical rotation <2.49> $[\alpha]_D^{20}$: -4.2 - -3.2° (0.4 g, water, 20 mL, 100 mm).

(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 μ 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 1.0 mg を水 0.60 mL に溶かした液 90 μ 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 μ L 及びデ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 μ L を混和する。この液 20 μ 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 (2.21) により、プロトン共鳴周波数 400 MHz 以上の装置(1)を用いて ^1H を測定するとき、 δ 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 ^{13}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 $^{\circ}\text{C}$

スピニング: オフ

データポイント数: 32,768

スペクトル範囲: DHO のシグナルを中心に \pm 6.0 ppm

パルス角: 90 $^{\circ}$

繰り返しパルス待ち時間: 20 秒

ダミースキャン: 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

ウィンドウ関数: 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、 δ 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 δ 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へ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 μ 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 μ 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 \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 0.4 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 \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 0.2 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 μ L、過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液 3 μ L 及び水 12 μ L を混和した液 20 μ 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 μ L に過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液 30 μ L を混和し、システム適合性試験用溶液とする。この液 20 μ 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 μ 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。

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 μ 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 μ 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 μ 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 μ L ずつに溶かし、アミノ安息香酸誘導体化試液 40 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ L をとり、減圧乾固する。残留物にメタノール 50 μ L を加え、室温で減圧乾固する。残留物を水 10 μ L に溶かし、アミノ安息香酸誘導体化試液 40 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 1.0 mg を水 0.60 mL に溶かした液 90 μ 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 μ L 及びデルマトン硫酸エステル 1.0 mg を水 2.0 mL に溶かした液 30 μ L を混和する。この液 20 μ L につき、上記の条件で操作するとき、デルマトン硫酸エステル、ヘパリン、過硫酸化コンドロイチン硫酸の順に溶出し、デルマト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(2.21)により、プロトン共鳴周波数 400 MHz 以上の装置(1)を用いて ^1H を測定するとき、 δ 2.18 \pm 0.05 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 ^{13}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

スピニング: オフ

データポイント数: 32,768

スペクトル範囲: DH0 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

ダミースキアン: 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

ウィンドウ関数: 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、 δ 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 δ 2.18 \pm 0.05 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 μ L を正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.0A) 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 μ 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 0.4 g を水 1000 mL 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 0.4 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 \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 0.2 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 μ L, 過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液 3 μ L 及び水 12 μ L を混和した液 20 μ 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 μ L に過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液 30 μ L を混和し、システム適合性試験用溶液とする。この液 20 μ 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 μ 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 μ L を加え, 約 50°C に加温して溶かし, 酢酸 170 μ L 及びボラン-ピリジン錯体 145 μ L を加える。

過塩素酸リチウム LiClO_4 白色の結晶又は結晶性の粉末である。

含量 98%以上。 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ー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ー管に注入し, 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 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 (2.49) $[\alpha]_D^{20}$: +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。 定量法 本品約 0.4 g を精密に量り, 水 50mL 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, トルイジンプルー0 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_8BN 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_8BN

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 (2.49) $[\alpha]_D^{20}$: -4.2~-3.2° (0.4 g, 水, 20 mL, 100 mm)。