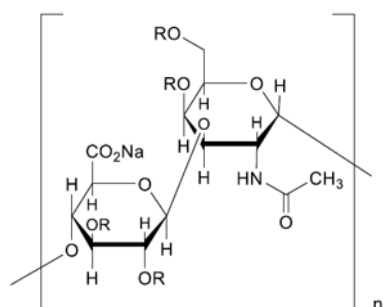


1 ヘパリン類似物質

2 Heparinoid



R = H or SO₃Na

二糖単位あたりの硫酸基数は
3を超えない

3

4 [391208-81-4]

5 本品は、健康なブタの気管軟骨(喉頭軟骨を含む場合もある)
6 由来のコンドロイチン硫酸を硫酸化して得たグリコサミノ
7 グリカンのナトリウム塩である。

8 本品を乾燥したものは定量するとき、D-グルクロン酸
9 (C₆H₁₀O₇: 194.14) 19.0 ~ 25.0%, 窒素(N: 14.01) 1.6 ~
10 2.0%及び有機硫酸基(SO₄: 96.06) 28.0 ~ 37.3%を含む。

11 **性状** 本品は帯黄白色の無晶性の粉末である。

12 本品は水に溶けやすく、エタノール(99.5)にほとんど溶け
13 ない。

14 本品の水溶液(1→20)のpHは5.3 ~ 7.6である。

15 本品は1 mol/L塩酸試液又は1 mol/L水酸化ナトリウム液に
16 溶ける。

17 本品は吸湿性である。

18 確認試験

19 (1) 本品の水溶液(1→20) 0.1 mLを、トルイジンブルーO
20 溶液(1→100000) 10 mLに加えて振り混ぜるとき、液の色は
21 青色から、直ちに紫色に変わる。

22 (2)

23 (i) ニンヒドリン試液、ヘパリン類似物質用 ニンヒドリン
24 4 gにピリジン8 mLを加えて溶かし、更に水を加えて100
25 mLとする。用時製する。

26 (ii) アニリン・フタル酸試液 アニリン0.91 mL及びフタル
27 酸1.66 gに水飽和1-ブタノール100 mLを加えて溶かす。

28 (iii) 操作法 本品55 mgに0.5 mol/L硫酸試液2 mLを加えて溶かし、
29 封管中で100℃で16時間加熱する。冷後、炭酸バリウム0.5 gを加え、
30 遠心分離した後、ろ過する。ろ液0.5 mL及びD-ガラクトサミン塩酸塩溶液(1→1000) 0.5 mLに、
31 それぞれヘパリン類似物質用ニンヒドリン試液0.5 mLを加え、
32 水浴中で30分間加熱する。冷後、強酸性イオン交換樹脂0.5 gを加え10分間放置した後、ろ過し、ろ液を試料溶液
33 及び標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー (2.03) により試験を行う。試料溶液及び標準溶液
34 10 µLずつを薄層クロマトグラフィー用セルロースを用いて調製した薄層板にスポットする。次に1-ブタノール/水/エタノール(95)混液(4:1:1)を展開溶媒として約10 cm展

40 開した後、薄層板を風乾する。これにアニリン・フタル酸
41 試液を均等に噴霧した後、105℃で5分間加熱するとき、試
42 料溶液及び標準溶液から得たスポットは赤色を呈し、それ
43 らのR_f値は等しい。

44 (3)

45 (i) バルビタール・アンモニア試液 バルビタール18.42 g
46 を水200 mL及びアンモニア水(28) 10 mLに溶かし、水を加えて1000 mLとする。

47 (ii) 操作法 本品の水溶液(1→5000)及びコンドロイチン硫酸Cナトリウム溶液(1→5000)をそれぞれ試料溶液及び比較液とする。陰極側から約1 cmのところに原線を引いたセルロースアセテート膜を薄めたメタノール(3→10)に浸し、更にバルビタール・アンモニア試液に30分間以上浸し、セルロースアセテート膜電気泳動装置のバルビタール・アンモニア試液を入れた支持台の上に固定する。試料溶液及び比較液1 µLずつを原線にスポットし、0.7 mA/cmの条件で50分間泳動した後、セルロースアセテート膜をトルイジンブルーO溶液(1→1000)に1分間浸して染色し、次に薄めた酢酸(100) (1→100)で時々振り混ぜながら5分間脱色し、最後に水で洗う。試料溶液及び比較液から得た青色～淡紅色のバンドのそれぞれの中心部と原線からの距離を測定するとき、次の式によって計算される本品のコンドロイチン硫酸Cナトリウムに対する相対易動度は1.07 ~ 1.16である。また、試料溶液を試験するとき本品以外のバンドを認めない。

64 相対易動度=原線から試料溶液のバンドの中心部までの距離
65 (cm)/原線から比較液のバンドの中心部までの距離(cm)

66 (4) 本品の水溶液(1→20)はナトリウム塩の定性反応(1)
67 (1.09) を呈する。

68 旋光度 (2.49) $[\alpha]_D^{20}$: -11.7 ~ -14.7° (乾燥後, 0.5 g,
69 水, 50 mL, 100 mm)。

70 粘度 (2.53) 本品を乾燥し、その約0.4 gを精密に量り、0.5
71 mol/L塩化ナトリウム試液を加えて溶かし、正確に100 mLとし、
72 試料溶液とする。試料溶液及び0.5 mol/L塩化ナトリウム試液につき、
73 25±0.1℃で第1法により試験を行うとき、
74 次の式によって計算される極限粘度は0.09 ~ 0.18である。

$$\text{極限粘度} = \frac{\ln \frac{\text{試料溶液の流下時間(秒)}}{0.5 \text{ mol/L塩化ナトリウム試液の流下時間(秒)}}}{\text{試料の量(g)}}$$

76 純度試験

77 (1) 溶状 本品0.5 gを水10 mLに溶かすとき、液は帯赤黄色澄明である。

78 (2) 塩化物 (1.03) 本品0.10 gをとり、試験を行う。比較液には0.01 mol/L塩酸0.50 mLを加える(0.178%以下)。

80 (3) タンパク質

81 (i) 炭酸ナトリウム溶液 無水炭酸ナトリウムが20 mg/mLとなるように無水炭酸ナトリウムに水酸化ナトリウム溶液(1→250)を加える。

82 (ii) 硫酸銅溶液 硫酸銅(II)五水和物溶液(1→100) 1容量と酒石酸ナトリウム二水和物溶液(1→50) 1容量を混和する。

83 (iii) ヘパリン類似物質用アルカリ性銅溶液 炭酸ナトリウム溶液50容量と硫酸銅溶液1容量を混和する。用時製する。

84 (iv) 操作法 本品の水溶液(1→500)を試料溶液とする。別に、ウシ血清アルブミン溶液(1→50000)を調製し、標準溶

90

液とする。試料溶液及び標準溶液1 mLずつを正確にとり、それぞれにヘパリン類似物質用アルカリ性銅溶液5 mLを正確に加えて振り混ぜ、室温で10分間放置する。薄めたフォルリン試液(1→2) 0.5 mLずつを正確に加えて振り混ぜ、室温で30分間放置する。これらの液につき、水を対照とし、紫外可視吸光度測定法 (2.24) により試験を行い、波長750 nmにおける吸光度を測定するとき、試料溶液から得た吸光度は標準溶液から得た吸光度より大きくない。

(4) 遊離硫酸基 本品を乾燥し、その約0.5 gを精密に量り、水に溶かし、正確に50 mLとする。この液1 mLを正確に量り、水を加えて正確に50 mLとし、試料溶液とする。別に硫酸カリウムを105℃で1時間乾燥し、その約0.18 gを精密に量り、水に溶かし、正確に200 mLとする。この液10 mLを正確に量り、水を加えて正確に100 mLとし、標準原液とする。標準原液12 mLを正確に量り、水を加えて正確に20 mLとし、30 ppm標準溶液とする。標準原液10 mLを正確に量り、水を加えて正確に20 mLとし、25 ppm標準溶液とする。標準原液8 mLを正確に量り、水を加えて正確に20 mLとし、20 ppm標準溶液とする。標準原液6 mLを正確に量り、水を加えて正確に20 mLとし、15 ppm標準溶液とする。標準原液10 mLを正確に量り、水を加えて正確に50 mLとし、10 ppm標準溶液とする。孔径0.45 μm以下のメンブランフィルターでろ過した試料溶液及び10 ~ 30 ppm標準溶液30 μLずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行い、それぞれの液の硫酸イオンのピーク面積 A_T 及び A_S を求める。標準溶液から得られた検量線及び A_T から遊離硫酸基の量(%)を算出するとき、その量は13.0%以下である。

遊離硫酸基の量(%)

$$= \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4 \times a \times (c - A_T)}}{2a} \times \frac{1}{M_T} \times 250$$

M_T : 本品の秤取量(mg)

a, b, c : 検量線($Y = aX^2 + bX + c$)の係数

X : 各標準溶液の硫酸イオン濃度(ppm)

Y : 各標準溶液の硫酸イオンのピーク面積

30 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$= M_S \times P \times 0.5513 \times 3 / 1000$$

25 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$= M_S \times P \times 0.5513 \times 1 / 400$$

20 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$= M_S \times P \times 0.5513 \times 1 / 500$$

15 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$= M_S \times P \times 0.5513 \times 3 / 2000$$

10 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$= M_S \times P \times 0.5513 \times 1 / 1000$$

M_S : 硫酸カリウムの秤取量(mg)

P : 硫酸カリウムの純度(%)

試験条件

定量法(3)の試験条件を準用する。

システム適合性

定量法(3)のシステム適合性を準用する。

(5) 過硫酸化コンドロイチン硫酸 本品の水溶液(1→500)

を試料溶液とする。陰極側から約1 cmのところに原線を引いたセルロースアセテート膜を泳動液に30分間以上浸し、セルロースアセテート膜電気泳動装置の泳動液を入れた支持台の上に固定する。試料溶液1 μLを原線にスポットし、0.7 mA/cmの条件で3時間泳動する。泳動後、セルロースアセテート膜をトルイジンブルーO溶液(1→1000)に1分間浸して染色し、次に薄めた酢酸(100) (1→100)で時々振り混ぜながら5分間脱色し、最後に水で洗う。試料溶液のバンドを確認するとき、過硫酸化コンドロイチン硫酸のバンドを認めない。

泳動液: 酢酸カルシウム水和物52.8 gを水に溶かし、1000 mLとする。

システム適合性

検出の確認: システム適合性試験用過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品を1 mL中に0.1 mgを含む液となるように水に溶かし、システム適合性試験用過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液とする。システム適合性試験用過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液0.1 mLに水0.1 mLを加えた液1 μL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バンドが検出される。

システムの性能: 本品の水溶液(1→250) 0.1 mL及びシステム適合性試験用過硫酸化コンドロイチン硫酸標準溶液0.1 mLを混和する。この液1 μLにつき、上記の条件で操作するとき、ヘパリン類似物質と過硫酸化コンドロイチン硫酸のバンドは分離して検出される。

乾燥減量 (2.41) 8.5%以下(1 g, 減圧, 0.67 kPa以下, 酸化リン(V), 24時間)。

強熱残分 (2.44) 38 ~ 48%(乾燥後, 0.5 g)。

定量法

(1) D-グルクロン酸 本品を乾燥し、その約50 mgを精密に量り、水に溶かし、正確に10 mLとする。この液1 mLを正確に量り、水を加えて正確に50 mLとし、試料溶液とする。別にD-グルクロノラクトン標準品を本品と同様の条件で乾燥し、その約40 mgを精密に量り、水に溶かし、正確に100 mLとする。更にこの液5 mLを正確に量り、水を加えて正確に100 mLとし、標準溶液とする。四ホウ酸ナトリウム・硫酸試液5 mLを正確に量り、十分氷冷する。試料溶液及び標準溶液それぞれ1 mLを正確に量り、四ホウ酸ナトリウム・硫酸試液の上にそれぞれ注意して層積し、室温に保つように冷却しながら振り混ぜ、次に水浴中で10分間加熱した後、流水中で室温まで冷却する。それぞれにカルバゾール試液0.2 mLを正確に加えて振り混ぜ、水浴中で15分間加熱した後、流水中で室温まで冷却する。これらの液につき、水1 mLを正確に量り、同様に操作して得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法 (2.24) により試験を行う。試料溶液及び標準溶液から得たそれぞれの液の波長530 nmにおける吸光度 A_T 及び A_S を測定する。

本品中のD-グルクロン酸($C_6H_{10}O_7$)の量(%)

$$= M_S / M_T \times A_T / A_S \times 25 \times 1.1023$$

M_S : D-グルクロノラクトン標準品の秤取量(mg)

M_T : 本品の秤取量(mg)

(2) 窒素 本品を乾燥し、その約0.1 gを精密に量り、窒素定量法 (1.08) により試験を行う。

195 (3) 有機硫酸基 以下の手順に従い算出した総硫酸基の量
196 (%)から、純度試験(4)で得た遊離硫酸基の量(%)を差し引い
197 て求める。

198 本品を乾燥し、その約0.5 gを精密に量り、1 mol/L塩酸試
199 液に溶かし、正確に5 mLとする。この液をアンプルに入れ、
200 封管し、105℃で3時間加熱した後、放冷する。この液2 mL
201 を正確に量り、1 mol/L水酸化ナトリウム液2 mLを加えた後、
202 水を加えて正確に50 mLとする。この液1 mLを正確に量り、
203 水を加えて正確に100 mLとし、試料溶液とする。別に硫酸
204 カリウムを105℃で1時間乾燥し、その約0.18 gを精密に量り、
205 水に溶かし、正確に200 mLとする。この液10 mLを正確に
206 量り、水を加えて正確に100 mLとし、標準原液とする。標
207 準原液12 mLを正確に量り、水を加えて正確に20 mLとし、
208 30 ppm標準溶液とする。標準原液10 mLを正確に量り、水
209 を加えて正確に20 mLとし、25 ppm標準溶液とする。標準
210 原液8 mLを正確に量り、水を加えて正確に20 mLとし、20
211 ppm標準溶液とする。標準原液6 mLを正確に量り、水を加
212 えて正確に20 mLとし、15 ppm標準溶液とする。標準原液
213 10 mLを正確に量り、水を加えて正確に50 mLとし、10
214 ppm標準溶液とする。孔径0.45 μm以下のメンブランフィル
215 ターでろ過した試料溶液及び10～30 ppm標準溶液30 μLず
216 つを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィー
217 (2.01)により試験を行い、それぞれの液の硫酸イオンのピー
218 ク面積 A_T 及び A_S を求める。標準溶液から得られた検量線及
219 び A_T から総硫酸基の量(%)を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{総硫酸基の量(\%)} \\ & = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4 \times a \times (c - A_T)}}{2a} \times \frac{1}{M_T} \times 1250 \end{aligned}$$

222 M_T : 本品の秤取量(mg)

223 a, b, c : 検量線($Y = aX^2 + bX + c$)の係数

224 X : 各標準溶液の硫酸イオン濃度(ppm)

225 Y : 各標準溶液の硫酸イオンのピーク面積

226 30 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$227 = M_S \times P \times 0.5513 \times 3/1000$$

228 25 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$229 = M_S \times P \times 0.5513 \times 1/400$$

230 20 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$231 = M_S \times P \times 0.5513 \times 1/500$$

232 15 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$233 = M_S \times P \times 0.5513 \times 3/2000$$

234 10 ppm標準溶液の硫酸イオン濃度

$$235 = M_S \times P \times 0.5513 \times 1/1000$$

236 M_S : 硫酸カリウムの秤取量(mg)

237 P : 硫酸カリウムの純度(%)

238 試験条件

239 検出器: 電気伝導度検出器

240 カラム: 内径4.6 mm, 長さ10 cmのポリエーテルエー
241 テルケトン管に3.5 μmの液体クロマトグラフィー用
242 第四級アンモニウム基を結合した親水性ビニルポリマ
243 ーゲルを充填する。

244 カラム温度: 40℃付近の一定温度

245 移動相: 無水炭酸ナトリウム0.64 g及び炭酸水素ナトリ

ウム0.64 gを水に溶かし、2000 mLとする。

流量: 毎分1.5 mL

システム適合性

システムの性能: 20 ppm標準溶液30 μLにつき、上記の
条件で操作するとき、硫酸イオンのピークの理論段数
及びシンメトリー係数は、それぞれ4000段以上、1.8
以下である。

システムの再現性: 20 ppm標準溶液30 μLにつき、上記
の条件で試験を6回繰り返すとき、硫酸イオンのピー
ク面積の相対標準偏差は2.0%以下である。

貯法 容器 気密容器。

9. 41 試薬・試液の項に次を追加する。

塩化ナトリウム試液, 0.5 mol/L 塩化ナトリウム29.2 gを水に
溶かし、1000 mLとする。

コンドロイチン硫酸Cナトリウム サメ軟骨より抽出したもの。
減圧下(0.67 kPa以下)、酸化リン(V)で24～72時間乾燥した
ものにつき、以下の試験を実施するとき、規格に適合するも
のをを用いる。

窒素含量 (1.08) 2.3～4.0%

グルクロン酸含量 23～40%(カルバゾール反応を用いる比
色法による)。

旋光度 (2.49) $[\alpha]_D^{20}$: -10～-20° (0.2 g, 水, 20 mL,
100 mm)。

炭酸バリウム BaCO₃ 白色の粉末又は結晶である。

含量 99.0%以上