

ヘパリンナトリウム

確認試験及び純度試験(5)、(6)の項を次のように改める。

確認試験

(1) 本品は、ナトリウム塩の定性反応(1) (1.09) を呈する。

(2) 本品及び確認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：確認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、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0.50 mgを含むように水に溶かした液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。

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1.1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、又は認めることがあっても、 ^{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：32768

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SN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：確認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、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0.10 mgを含むように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)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を、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、それぞれ認める。

(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 (2.01) 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：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填する。

カラム温度：35 $^{\circ}\text{C}$ 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pH 3.0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pH 3.0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倍までの範囲

システム適合性

検出の確認：確認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、ヘパリンナトリウム標準原液とする。別に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0.50 mgを含むように水に溶かし、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。

102 システムの再現性：システム適合性試験用溶液20 μL に
103 つき，上記の条件で試験を6回繰り返すとき，過硫酸
104 化コンドロイチン硫酸のピーク面積の相対標準偏差は
105 2.0%以下である。
106
107