

# 1 ヘパリンカルシウム

## 2 基原の項を次のように改める。

3 本品は、健康な食用ブタの腸粘膜から得たD-グルコサミン及びウロン酸(L-イズロン酸又はD-グルクロン酸)の二糖単位からなる硫酸化グリコサミノグリカンのカルシウム塩である。

7 本品は、血液の凝固を遅延する作用を有する。

8 本品は定量するとき、換算した乾燥物に対し、1 mg中180ヘパリン単位以上を含み、また、カルシウム(Ca：40.08) 10 8.0～12.0 %を含む。

## 11 エンドトキシンの項の次に次を加える。

12 抗第Xa因子活性・抗第 a因子活性比 次の方法により測定した抗第Xa因子活性を、定量法で得た抗第 a因子活性で除し、  
14 抗第Xa因子活性・抗第 a因子活性比を求めるとき、0.9～  
15 1.1である。

16 抗第Xa因子活性測定法

17 ( ) 基質液 N-ベンゾイル-L-イソロイシル-L-グルタミル( -OR)-グリシル-L-アルギニル-p-ニトロアニリド塩酸塩25 mgを水33.3 mLに溶かす。

20 ( ) アンチトロンピン液 定量法(1)を準用する。

21 ( ) 第Xa因子液 第Xa因子試液1200 μLに緩衝液1200 μLを加える。

23 ( ) 緩衝液 定量法(1)を準用する。

24 ( ) 反応停止液 定量法(1)を準用する。

25 ( ) ヘパリン標準液 定量法(1)を準用する。

26 ( ) ヘパリン試料液 定量法(1)を準用する。

27 ( ) 操作法 各濃度のヘパリン標準液をそれぞれ2本、各濃度のヘパリン試料液をそれぞれ2本及び空試験液として緩衝液を5本の1.5 mLチューブに、50 μLずつ分注する。各溶液が分注されたチューブ計21本、アンチトロンピン液、第Xa因子液及び基質液を37 で一斉に加温し、加温開始2分後から、空試験液、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>、空試験液、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、空試験液、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、空試験液、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>、空試験液の順に以下のように操作する。各溶液が分注されたチューブにアンチトロンピン液50 μLを加え、よく混和し、37 で正確に4分間加温する。これに第Xa因子液100 μLを加え、よく混和し、37 で正確に12分間加温した後、基質液100 μLを加え、よく混和する。37 で正確に4分間加温した後、反応停止液50 μLを加え、直ちに混和する。別に反応停止液50 μLに基質液100 μL、第Xa因子液100 μL、アンチトロンピン液50 μL及び緩衝液50 μLを加えて混和する。この液を対照として、分光光度計により、波長405 nmにおける各溶液の吸光度を測定する。空試験液の測定値の相対標準偏差が10 %以下であることを確認する。

45 ( ) 計算法 吸光度の対数値をy、ヘパリン標準液濃度をx<sub>s</sub>、ヘパリン試料液濃度をx<sub>t</sub>として、回帰式 $y = I_c + Ax_s + Bx_t$ を導くとき、効力比 $R = B/A$ である。

48 I<sub>c</sub>: 共通切片

49 A: 標準溶液の回帰直線の傾き

50 B: 試料溶液の回帰直線の傾き

51 次式により本品1 mg中の抗第Xa因子活性を計算する。

52 本品1 mg中の抗第Xa因子活性 =  $100 \times R \times V/M$

53 V: 本品を水に溶かし、1 mL中に約100単位を含む液を製したときの全容量(mL)

55 M: 本品の秤取量 (mg)

56 ただし、回帰式 $y = I_c + Ax_s + Bx_t + D$ を導くとき、空試験液の測定結果と2直線から想定される切片の差を示す定数項Dの90 %信頼区間が-0.2～0.2の範囲内でない場合は、空試験液の測定結果を除外して解析する。

60 試験成立条件は定量法(1)を準用する。条件が満たされないとき、得られた力価を仮力価として効力比が約1となるように希釈倍数を見直して、再度試験を行う。

## 63 定量法(1)の項を次のように改める。

64 定量法

65 (1) ヘパリン

66 ( ) 基質液 H-D-フェニルアラニル-L-ピペリジル-L-アルギニル-p-ニトロアニリド二塩酸塩25 mgを水32.0 mLに溶かす。

69 ( ) アンチトロンピン液 ヒト由来アンチトロンピンを水に溶かし、1 mL中に1単位を含む液を調製する。この液150 μLに緩衝液2250 μLを加える。

72 ( ) 第 a因子液 第 a因子を緩衝液に溶かし、1 mL中に20単位を含む液を調製する。この液150 μLに緩衝液150 μL及び水300 μLを加える。

75 ( ) 緩衝液 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール6.1 g、塩化ナトリウム10.2 g、エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム二水和物2.8 g、ポリエチレングリコール6000 1.0gを水800 mLに溶かし、1 mol/L塩酸試液を加えてpH 8.4に調整した後、水を加えて1000 mLとする。

81 ( ) 反応停止液 酢酸(100) 2 mLに水を加え、10 mLとする。

83 ( ) ヘパリン標準液 ヘパリンナトリウム標準品を水に溶かし、1 mL中に100単位を含む液を調製し、標準原液とする。標準原液を正確に緩衝液で希釈して1 mL中に0.1単位を含む液を調製し、標準溶液とする。次の表に従い、緩衝液に標準溶液を加え、ヘパリン標準液S<sub>1</sub>、ヘパリン標準液S<sub>2</sub>、ヘパリン標準液S<sub>3</sub>及びヘパリン標準液S<sub>4</sub>を調製する。

ヘパリン標準液		緩衝液 (μL)	標準溶液 (μL)
No.	ヘパリン濃度 (単位/mL)		
S <sub>1</sub>	0.005	950	50
S <sub>2</sub>	0.010	900	100
S <sub>3</sub>	0.015	850	150
S <sub>4</sub>	0.020	800	200

90

91 ( ) ヘパリン試料液 本品の適量を精密に量り、水に溶かし、1 mL中に約100単位を含む液を調製し、試料原液とす

92

93 る。試料原液を正確に緩衝液で希釈して1 mL中に0.1単位を  
94 含む液を調製し、試料溶液とする。次の表に従い、緩衝液に  
95 試料溶液を加え、ヘパリン試料液T<sub>1</sub>、ヘパリン試料液T<sub>2</sub>、  
96 ヘパリン試料液T<sub>3</sub>及びヘパリン試料液T<sub>4</sub>を調製する。  
97

ヘパリン試料液		緩衝液 (μL)	試料 溶液 (μL)
No.	ヘパリン濃度 (単位/mL)		
T <sub>1</sub>	0.005	950	50
T <sub>2</sub>	0.010	900	100
T <sub>3</sub>	0.015	850	150
T <sub>4</sub>	0.020	800	200

98  
99 ( ) 操作法 各濃度のヘパリン標準液をそれぞれ2本、各  
100 濃度のヘパリン試料液をそれぞれ2本及び空試験液として緩  
101 衝液を5本の1.5 mLチューブに、50 μLずつ分注する。各溶  
102 液が分注されたチューブ計21本、アンチトロンピン液、第  
103 a因子液及び基質液を37 で一斉に加温し、加温開始2分  
104 後から、空試験液、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>、空試験液、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、  
105 T<sub>4</sub>、空試験液、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、空試験液、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>、  
106 空試験液の順に以下のように操作する。各溶液が分注された  
107 チューブにアンチトロンピン液100 μLを加え、よく混和し、  
108 37 で正確に4分間加温する。これに第 a因子液25 μLを  
109 加え、よく混和し、37 で正確に4分間加温した後、基質液  
110 50 μLを加え、よく混和する。37 で正確に4分間加温した  
111 後、反応停止液50 μLを加え、直ちに混和する。別に反応停  
112 止液50 μLに基質液50 μL、第 a因子液25 μL、アンチトロ  
113 ンピン液100 μL及び緩衝液50 μLを加え、混和する。この液  
114 を対照として、分光光度計により、波長405 nmにおける溶  
115 液の吸光度を測定する。空試験液の測定値の相対標準偏差が  
116 10 %以下であることを確認する。  
117 ( ) 計算法 吸光度の対数値をy、ヘパリン標準液濃度をx<sub>s</sub>、  
118 ヘパリン試料液濃度をx<sub>t</sub>として、回帰式 $y = I_c + Ax_s + Bx_t$   
119 を導くとき、効力比 $R = B/A$ である。

120 I<sub>c</sub>: 共通切片  
121 A: 標準溶液の回帰直線の傾き  
122 B: 試料溶液の回帰直線の傾き

123 次式により本品1 mg中の抗第 a因子活性を計算する。

124 本品1 mg中の抗第 a因子活性 =  $100 \times R \times V/M$

125 V: 本品を水に溶かし、1 mL中に約100単位を含む液を製  
126 したときの全容量(mL)  
127 M: 本品の秤取量(mg)

128 ただし、回帰式 $y = I_c + A'x_s + B'x_t + D$ を導くとき、  
129 空試験液の測定結果と2直線から想定される切片の差を示す  
130 定数項Dの90 %信頼区間が-0.2~0.2の範囲内でない場合は、  
131 空試験液の測定結果を除外して解析する。

132 試験成立条件は、下記(1)~(3)の3項目とする。

133 (1)2直線から想定される切片の一致に関する判定

134 空試験液を除く標準溶液及び試料溶液のデータから、回帰  
135 式 $y = I_s + A''x_s + B''x_t + I_{t-s}$ を導くとき、定数項I<sub>t-s</sub>の  
136 90 %信頼区間が-0.2~0.2の範囲内である。

I<sub>s</sub>: 標準溶液の回帰直線の切片

I<sub>t-s</sub>: 2直線から想定される切片の差

139 (2)直線性に関する判定

140 標準溶液及び試料溶液のデータから、回帰式 $y = I_c +$   
141  $A'''x_s + B'''x_t + Q_sx_s^2 + Q_tx_t^2$ を導くとき、2次係数Q<sub>s</sub>及びQ<sub>t</sub>  
142 の90 %信頼区間が-1000~1000の範囲内である。

143 Q<sub>s</sub>: 標準溶液の回帰曲線の2次係数

144 Q<sub>t</sub>: 試料溶液の回帰曲線の2次係数

145 (3)相対力価の算出結果が本試験法について事前にバリデ  
146 ーションされた範囲内であることの判定

147 算出された効力比が0.8以上1.2以下である。

148 これらの条件が満たされないとき、得られた力価を仮力価  
149 として効力比が約1となるように希釈倍数を見直して、再  
150 度試験を行う。

#### 152 9.41 試薬・試液の項に次を追加する。

153 H-D-フェニルアラニル-L-ピペリジル-L-アルギニル-  
154 p-ニトロアニリド二塩酸塩 白色の粉末で、水に溶けにく  
155 い。

156 吸光度 2.24 E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>(316 nm): 192~214 (10 mg, 水,  
157 300 mL)。

158 ヒト由来アンチトロンピン 健康なヒトの血漿から得たセリン  
159 プロテアーゼ阻害因子で、活性化血液凝固第 因子(トロ  
160 ンピン)及び活性化血液凝固第X因子の活性を阻害するタ  
161 ンパク質である。タンパク質1 mg当たり6国際単位以上を  
162 含む。

163 第 a因子 ヒト血漿から精製された第 a因子を凍結乾燥し  
164 たもので、白色~微黄色の粉末である。タンパク質1 mg当  
165 たり2000国際単位以上を含む。