

1 ヘパリンナトリウム

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ナトリウム塩である。

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
9 ヘパリン単位以上を含む。

10 発熱性物質の項の次に次を加える。

11 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、
12 抗第Xa因子活性・抗第 a因子活性比を求めるとき、0.9～
13 1.1である。

14 抗第Xa因子活性測定法

15 () 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。

16 () アンチトロンピン液 定量法を準用する。

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

18 () 緩衝液 定量法を準用する。

19 () 反応停止液 定量法を準用する。

20 () ヘパリン標準液 定量法を準用する。

21 () ヘパリン試料液 定量法を準用する。

22 () 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、S₁、S₂、S₃、S₄、空試験液、T₁、T₂、T₃、T₄、空試験液、T₁、T₂、T₃、T₄、空試験液、S₁、S₂、S₃、S₄、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。

42 () 計算法 吸光度の対数値を y 、ヘパリン標準液濃度を x_s 、ヘパリン試料液濃度を x_t 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。

47 I_c : 共通切片

48 A : 標準溶液の回帰直線の傾き

49 B : 試料溶液の回帰直線の傾き

50 次式により本品1 mg中の抗第Xa因子活性を計算する。

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

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

54 M : 本品の秤取量 (mg)

55 ただし、回帰式 $y = I_c + A'x_s + B'x_t + D$ を導くとき、空
56 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
57 数項 D の90 %信頼区間が -0.2～0.2の範囲内でない場合は、
58 空試験液の測定結果を除外して解析する。

59 試験成立条件は定量法を準用する。条件が満たされないとき、
60 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
61 釈倍数を見直して、再度試験を行う。

62 定量法の項を次のように改める。

63 定量法

64 () 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。

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

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

71 () 緩衝液 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-ブ
72 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
73 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
74 グリコール6000 1.0gを水800 mLに溶かし、1 mol/L塩酸試
75 液を加えてpH 8.4に調整した後、水を加えて1000 mLとす
76 る。

77 () 反応停止液 酢酸(100) 2 mLに水を加え、10 mLとす
78 る。

79 () ヘパリン標準液 ヘパリンナトリウム標準品を水に溶
80 かし、1 mL中に100単位を含む液を調製し、標準原液とす
81 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
82 含む液を調製し、標準溶液とする。次の表に従い、緩衝液に
83 標準溶液を加え、ヘパリン標準液S₁、ヘパリン標準液S₂、ヘ
84 パリン標準液S₃及びヘパリン標準液S₄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 ₁	0.005	950	50
S ₂	0.010	900	100
S ₃	0.015	850	150
S ₄	0.020	800	200

87 () ヘパリン試料液 本品の適量を精密に量り、水に溶か
88 し、1 mL中に約100単位を含む液を調製し、試料原液とす
89 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
90 含む液を調製し、試料溶液とする。次の表に従い、緩衝液に
91 試料溶液を加え、ヘパリン試料液T₁、ヘパリン試料液T₂、

92 ヘパリン試料液 T_3 及びヘパリン試料液 T_4 を調製する。

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_1	0.005	950	50
T_2	0.010	900	100
T_3	0.015	850	150
T_4	0.020	800	200

93 () 操作法 各濃度のヘパリン標準液をそれぞれ2本、各
94 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
95 衝液を5本の1.5 mLチューブに、50 μL ずつ分注する。各溶
96 液が分注されたチューブ計21本、アンチトロンピン液、第
97 a因子液及び基質液を37 で一斉に加温し、加温開始2分
98 後から、空試験液、 S_1, S_2, S_3, S_4 、空試験液、 $T_1, T_2, T_3,$
99 T_4 、空試験液、 T_1, T_2, T_3, T_4 、空試験液、 S_1, S_2, S_3, S_4 、
100 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
101 チューブにアンチトロンピン液100 μL を加え、よく混和し、
102 37 で正確に4分間加温する。これに第 a因子液25 μL を
103 加え、よく混和し、37 で正確に4分間加温した後、基質液
104 50 μL を加え、よく混和する。37 で正確に4分間加温した
105 後、反応停止液50 μL を加え、直ちに混和する。別に反応停
106 止液50 μL に基質液50 μL 、第 a因子液25 μL 、アンチトロ
107 ンピン液100 μL 及び緩衝液50 μL を加えて混和する。この液
108 を対照として、分光光度計により、波長405 nmにおける溶
109 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
110 10 %以下であることを確認する。
111 (ix) 計算法 吸光度の対数値を y 、ヘパリン標準液濃度を x_s 、
112 ヘパリン試料液濃度を x_t として、回帰式 $y = I_c + A x_s + B x_t$
113 を導くとき、効力比 $R = B/A$ である。

114 I_c : 共通切片

115 A : 標準溶液の回帰直線の傾き

116 B : 試料溶液の回帰直線の傾き

117 次式により本品1 mg中の抗第 a因子活性を計算する。

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

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

121 M : 本品の秤取量 (mg)

122 ただし、回帰式 $y = I'_c + A' x_s + B' x_t + D$ を導くとき、空試
123 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
124 項 D の90 %信頼区間が $-0.2 \sim 0.2$ の範囲内でない場合は、空
125 試験液の測定結果を除外して解析する。

126 試験成立条件は、下記(1)~(3)の3項目とする。

127 (1)2直線から想定される切片の一致に関する判定

128 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
129 式 $y = I_s + A'' x_s + B'' x_t + I_{t-s}$ を導くとき、定数項 I_{t-s} の
130 90%信頼区間が $-0.2 \sim 0.2$ の範囲内である。

131 I_s : 標準溶液の回帰直線の切片

132 I_{t-s} : 2直線から想定される切片の差

133 (2)直線性に関する判定

134 標準溶液及び試料溶液のデータから、回帰式 $y = I_c +$
135 $A'' x_s + B'' x_t + Q_s x_s^2 + Q_t x_t^2$ を導くとき、2次係数 Q_s 及び Q_t
136 の90 %信頼区間が $-1000 \sim 1000$ の範囲内である。

137 Q_s : 標準溶液の回帰曲線の2次係数

138 Q_t : 試料溶液の回帰曲線の2次係数

139 (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
140 ーションされた範囲内であることの判定
141 算出された効力比が0.8以上1.2以下である。

142 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
143 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
144 試験を行う。

9. 41 試薬・試液の項に次を追加する。

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

150 吸光度 2.24 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (316 nm): 192~214 (10 mg, 水,
151 300 mL)。

152 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
153 プロテアーゼ阻害因子で、活性化血液凝固第 因子(トロン
154 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ン
155 パク質である。タンパク質1 mg当たり6国際単位以上を
156 含む。

157 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
158 たもので、白色~微黄色の粉末である。タンパク質1 mg当
159 たり2000国際単位以上を含む。