

2020 年度 課程博士学位論文

液液抽出法を用いたデルゴシチニブ中の

微量ベンゼンの分離濃縮と

高速液体クロマトグラフィー法による定量分析への展開

【薬学】薬品分析学分野

野村 信吉

本論文は以下の内容を総括したものである。

Shinkichi Nomura, Yoshiharu Ito, Shigehiko Takegami, Tatsuya Kitade. Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* **2019**, 73, 673-681. [第 1、2 章]

## 目次

序論.....	1
第1章 デルゴシチニブ中の微量ベンゼンの効率的な分離濃縮を可能にする液液抽出法の検討及び液液抽出-HPLC-UV法の妥当性の評価 .....	7
1-1 緒言.....	7
1-2 実験材料及び実験方法.....	9
1-2-1 試薬及び試料 .....	9
1-2-2 測定機器 .....	9
1-2-3 HPLC-UVの操作条件 .....	9
1-2-4 試料溶液及び標準溶液の調製方法 .....	10
1-2-5 スクリーニングの際に使用した試料溶液及び標準溶液の調製方法.....	11
1-2-6 デルゴシチニブ溶出位置確認用試料溶液の調製方法.....	12
1-2-7 分析法バリデーションの際に使用した試料溶液の調製方法.....	12
1-3 結果及び考察.....	13
1-3-1 液液抽出条件の最適化 .....	13
1-3-2 分析法バリデーション .....	26
1-4 結論.....	34
1-5 小括.....	35
第2章 米国薬局方（USP）及び欧州薬局方（EP）で提案されている微量ベンゼンの分析法との比較.....	36
2-1 緒言.....	36
2-2 実験材料及び実験方法.....	37
2-2-1 試薬及び試料 .....	37
2-2-2 測定機器 .....	37
2-2-3 HPLCの操作条件 .....	38
2-2-4 USP/EP法におけるヘッドスペースGCの操作条件.....	38
2-2-5 液液抽出-HPLC-UV法における感度比較の際に使用した試料溶液の調製方法... ..	38

2-2-6 USP/EP 法（ヘッドスペース GC 法）における感度比較の際に使用した試料溶液の調製方法.....	39
2-2-7 液液抽出-HPLC-UV 法の汎用性の確認の際に使用した試料溶液の調製方法.....	39
2-3 結果及び考察.....	40
2-3-1 本分析法及び USP/EP 法におけるベンゼンの感度の比較.....	40
2-3-2 微量ベンゼンの定量分析における液液抽出-HPLC-UV 法の汎用性の確認.....	43
2-4 結論.....	46
2-5 小括.....	47
総括及び今後の展望.....	48
引用文献.....	51
謝辞.....	55
Appendices.....	56

## 本論文で使用した略語一覧

QOL	Quality of Life (クオリティ オブ ライフ)
CMC	Chemistry, Manufacturing and Control (医薬品の生産開発部門の総称)
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (医薬品規制調和国際会議)
QbD	Quality by Design (クオリティ バイ デザイン)
NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine ( <i>N</i> -ニトロソジメチルアミン)
NDEA	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine ( <i>N</i> -ニトロソジエチルアミン)
WHO	World Health Organization (世界保健機関)
IARC	International Agency for Research on Cancer (国際がん研究機関)
USP	United States Pharmacopeia (米国薬局方)
EP	European Pharmacopoeia (欧州薬局方)
GC	Gas Chromatography (ガスクロマトグラフィー)
MS	Mass Spectrometer (質量分析計)
SPME	Solid Phase Micro Extraction (固相マイクロ抽出)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
UV	Ultraviolet (紫外吸光光度)
ODS	Octa Decyl Silyl (オクタデシルシリル基)
S/N	Signal-Noise (シグナル-ノイズ)
pKa	Acid dissociation constant (酸解離定数)
FID	Flame ionization detector (水素炎イオン化検出器)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DBN	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene
MMS	Methyl methanesulfonate (メタンスルホン酸メチル)
EMS	Ethyl methanesulfonate (メタンスルホン酸エチル)
IPMS	Isopropyl methanesulfonate (メタンスルホン酸イソプロピル)
[BMIM]Cl	1-Butyl-3-methylimidazolium chloride (1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド)

## 序論

医薬品は患者の Quality of Life (QOL) を向上させるためにあり、有効性、安全性及び品質が確保されているものでなければならない<sup>1</sup>。製薬企業は、有効性、安全性及び品質が担保された医薬品を開発するために、Figure 1 に示すような流れに沿って一般的に開発を行う。薬物ターゲットの同定／リード化合物の発見から販売までの期間は9年から17年、医薬品候補化合物が製品化される確率は約1/25000と言われている中<sup>2</sup>、医薬品開発のグローバル化に伴う競争激化や薬価引き下げに対応するため、製薬企業の生産開発 (Chemistry, Manufacturing and Control : CMC) 部門は、製造及び品質管理のコストを極限まで低減した製造工程をデザインし、かつ、医薬品の製造販売承認後の長期間に亘る生産においても、常に高品質の医薬品を世界市場に向けて供給し続けなければならないという使命を担っている。

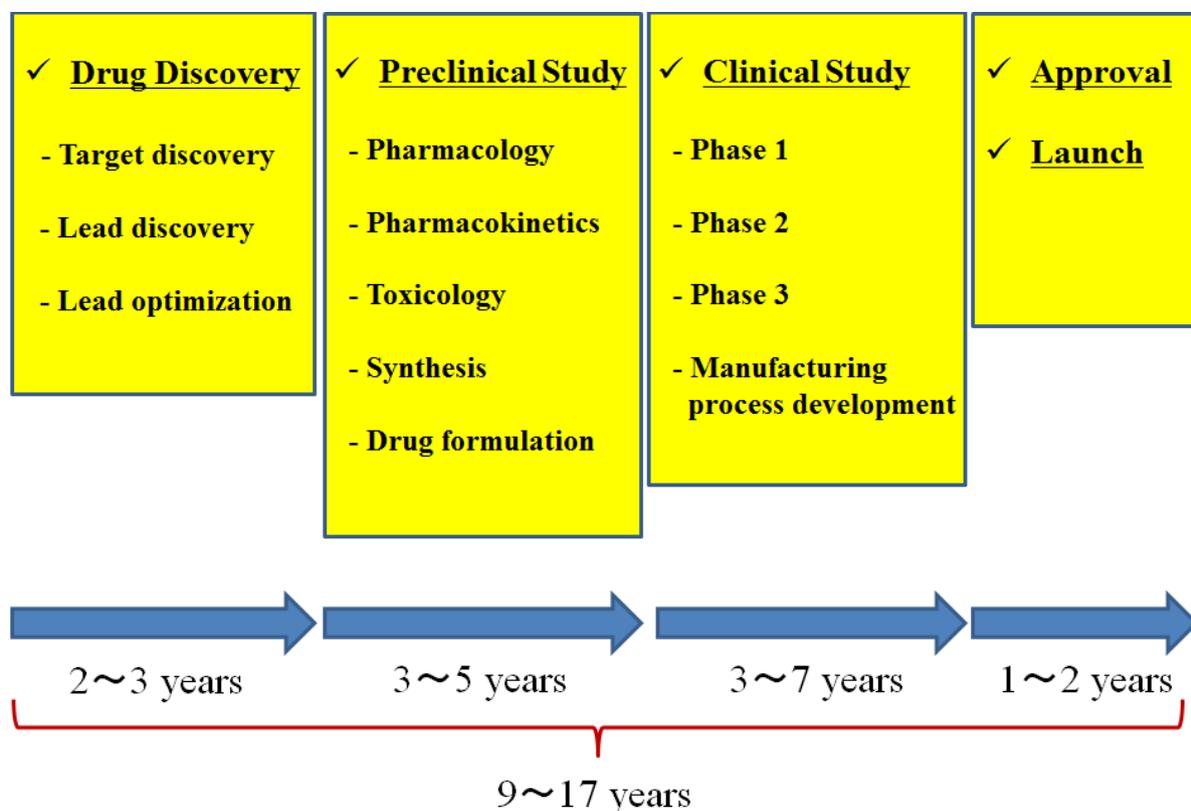
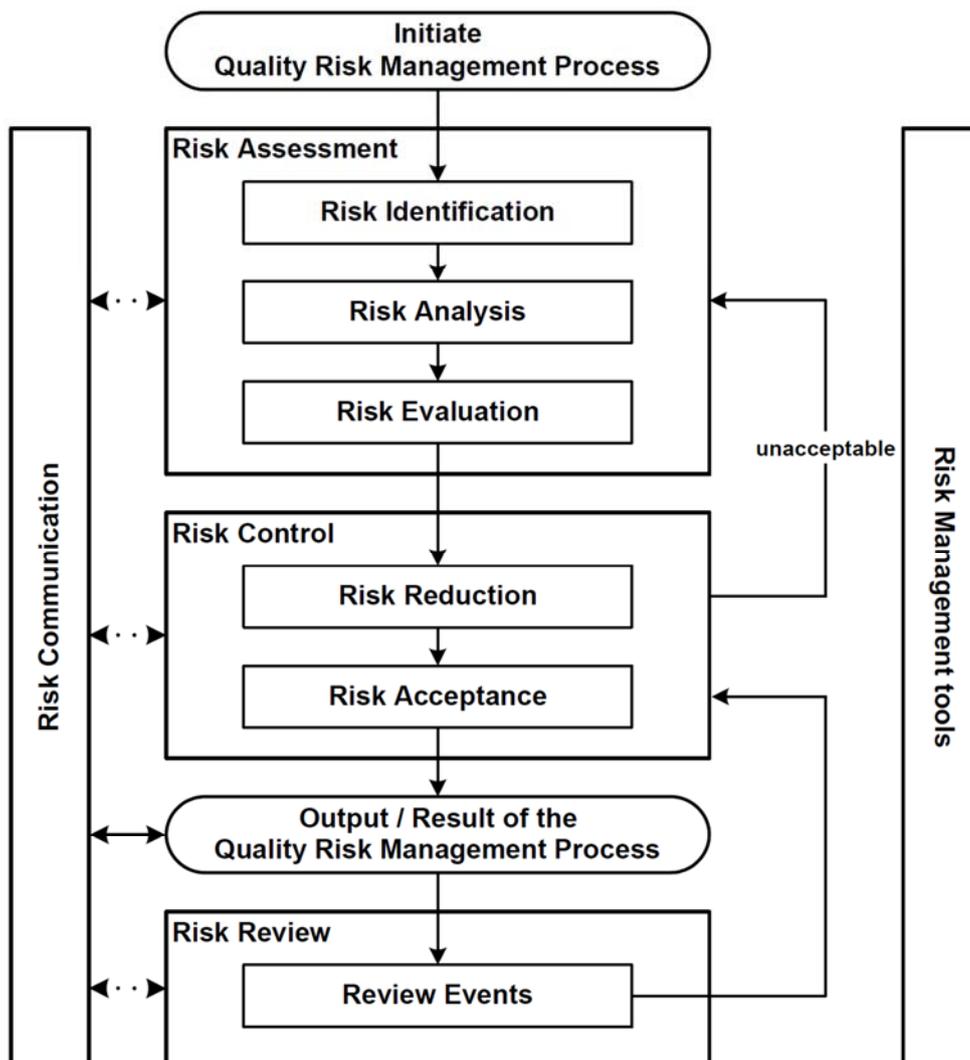


Figure 1 Typical drug development process

このような事業環境の中、医薬品規制調和国際会議 (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use : ICH) が品質に関わる4つのガイドライン、ICH Q8 (製剤開発に関するガイドライン)<sup>3</sup>、ICH Q9 (品質リスクマネジメントに関するガイドライン)<sup>4</sup>、ICH Q10 (医薬品品質システムに関するガイドライン)<sup>5</sup>及びICH Q11 (原薬の開発と製造 (化学薬品及びバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) ガイドライン)<sup>6</sup>を近年発出し、医薬品の製造及び品質管理のアプローチについて、クオリティバ

イ デザイン (Quality by Design : QbD)、すなわち品質リスクマネジメントの手法を利用した製品開発が推奨されるようになった。従来では、例えば医薬品の最も重要な構成成分である医薬品原薬においては、製剤の見た目を左右する性状 (外観)、バイオアベイラビリティや製剤の製造性に影響を与えてしまう可能性のある結晶形や粒子径、残留溶媒に代表される揮発性不純物、重金属やナトリウムに代表される無機不純物、製造工程で生じる副生成物や分解生成物に代表される有機不純物等、これらの項目について規格及び試験方法を設定し、規格を満足する医薬品原薬を製造・出荷すること、すなわち医薬品原薬を品質規格に適合させることを重要視していた。一方、医薬品の製造販売承認後の商業生産においては、長期間に亘り大規模スケールでの製造が要求されるものの、開発段階において大規模スケールでの製造が行われるのは、一般的に開発最終段階である承認申請前の数ロットのみである。したがって、製法検討の最終段階である工業化検討時に、生産スケール変更による品質劣化のリスクを予見できず、最終製品である医薬品において、予期しない品質の劣化を招くことも散見される。しかし、現在では「原薬や製剤等の製品が品質規格に適合していれば良いのではなく、医薬品の開発段階から製造工程に関する知識を積み重ね、開発期間を通して徐々に製造工程への理解を深め、製品の品質を作り込んでいく」という QbD のコンセプトに基づき<sup>6</sup>、製薬企業の CMC 部門は製法検討を行っている。製法検討においては、ICH Q9 (品質リスクマネジメントに関するガイドライン)<sup>4</sup>の提示する Figure 2 に示す流れに沿って製造工程の詳細なリスク評価を実施し、検出されたリスクに対しては検証を繰り返すことによって、それらをコントロールしていく。この取り組みにより、医薬品の製造方法の頑健性を向上させ、品質劣化による医薬品の回収及び欠品リスク、さらには患者を危険に晒すリスクを未然に回避できる可能性が高まる。



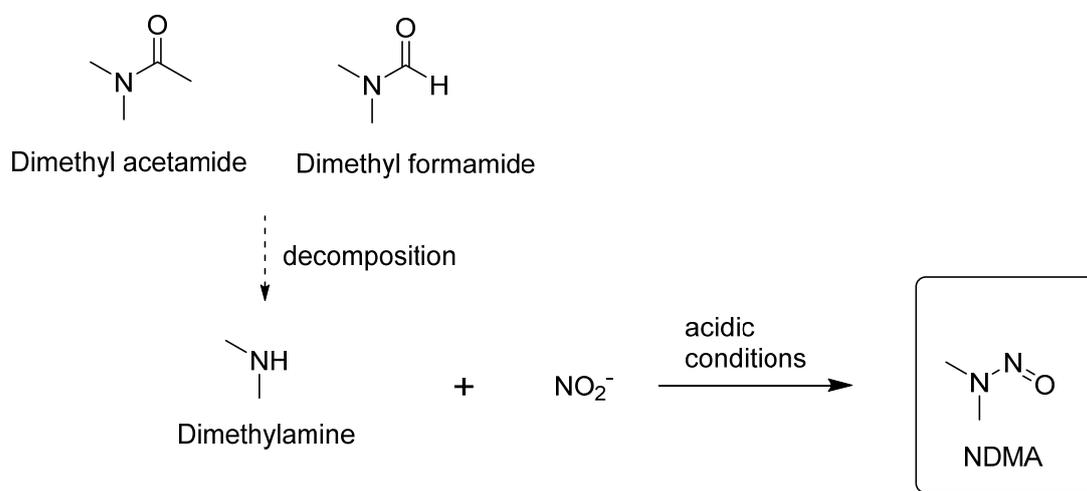
**Figure 2 Overview of a typical quality risk management**  
 (Source: ICH Q9 Quality Risk Management <sup>4)</sup>)

医薬品の製造工程のリスク評価を実施する上で最も重要視されているのが、製造工程内における不純物の生成と除去に関する知見であり、これは近年 ICH M7（潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドライン）<sup>7</sup>が 発出されたことに端を発する。本ガイドラインにより、製薬企業は、化学的な見地から製造工程で生成する可能性があると考えられる不純物については、発がんリスク等の毒性を考慮した上で、不純物の生成過程と除去に関して検証し、発がんリスクの低い安全な医薬品を供給していく必要がある。

本件に関しては、近年 *N*-ニトロソジメチルアミン（*N*-Nitrosodimethylamine : NDMA）や *N*-ニトロソジエチルアミン（*N*-Nitrosodiethylamine : NDEA）に代表される *N*-ニトロソアミン系不純物の混入による、バルサルタン、イルベサルタン及びロサルタン等のサルタン系医薬品の製品回収が話題になっている。NDMA 及び NDEA は、世界保健機関（World Health

Organization : WHO) の外部組織である国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer : IARC) における発がん性分類において「ヒトに対する発癌性がおそらくある (Probably Carcinogenic)」とされるグループ 2A に分類され、それぞれ 0.0959  $\mu\text{g}/\text{day}$  及び 0.0265  $\mu\text{g}/\text{day}$  という非常に厳しい濃度限度値が設定されている<sup>8</sup>。N-ニトロソアミン系不純物は、アルキルアミンと亜硝酸が酸性条件下で共存することにより生成する可能性のある不純物であるが、例えば製造工程でジメチルアミンを使用していなくとも、ジメチルホルムアミドやジメチルアセトアミドを使用していれば、これらが製造の過程で分解されてジメチルアミンが生成する可能性があり、この時亜硝酸が共存すれば NDMA が生成する可能性がある (Figure 3)。亜硝酸に関しても、製造工程で亜硝酸塩を使用していなくとも、例えば上流工程で使用している亜硝酸塩が残留して、製造の次工程で亜硝酸源となり、N-ニトロソアミン系不純物が生成してしまう可能性がある。NDMA 及び NDEA が非常に厳しい濃度限度値を設定されていることから、このような場合に製造の過程で N-ニトロソアミン系不純物が完全に生成しないと断言することは難しく、濃度限度値以下である分析結果を示す必要がある。

上記のような昨今の状況から、CMC 部門は医薬品の製造工程で想定されるすべての不純物について生成過程と除去について十分な検証を行い、毒性リスクのある不純物を特定し、個々の潜在的な毒性不純物について適切な感度を有した分析法を開発した上で、各々について残留量を評価する必要がある。そして、現行のガイドライン下では、医薬品中に毒性不純物が認められた場合は、前述のサルタン系医薬品の事例のように製品回収という事態に発展するため、製薬会社にとって、不純物の生成過程と除去の検証は、医薬品の製造方法のリスク評価を行う際の最重要タスクとなっている。



**Figure 3 General generation scheme of NDMA**

本研究で取り扱うベンゼンも、N-ニトロソアミン系不純物と同様の毒性不純物である<sup>9</sup>。ベンゼンは特有の芳香臭を有する、無色で揮発性の液体であり、原油やガソリンに含まれている。有機化合物への溶解性が優れていることから、有機溶媒としてよく使用されるが、化学構造が単純であることから、プラスチック、接着剤、ナイロン等の化学製品の原材料として

もよく使用されている<sup>10</sup>。一方、WHOの外部組織であるIARCにおける発がん性分類において、「ヒトに対する発癌性が認められる (Carcinogenic)」とされるグループ1に分類されており<sup>11</sup>、また、医薬品のガイドラインにおいてもTable 1に示す通り、ICH Q3C (医薬品の残留溶媒ガイドライン)<sup>12</sup>において、ベンゼンは最も毒性の強いクラス1に分類されている。ベンゼンの医薬品中の許容限度値は2 ppm以下であり、クラス1の残留溶媒の中で最も厳しい限度値を設定されている。

**Table 1 Class 1 solvents in pharmaceutical products**  
(Source: ICH Q3C Guideline for residual solvents<sup>12</sup>)

Solvent	Concentration limit (ppm)	Concern
Benzene	2	Carcinogen
Carbon tetrachloride	4	Toxic and environmental hazard
1,2-Dichloroethane	5	Toxic
1,1-Dichloroethene	8	Toxic
1,1,1-Trichloroethane	1500	Environmental hazard

医薬品の製造工程でベンゼンを使用することは、医薬品にベンゼンが残留するリスクがあるだけでなく、製造作業員への暴露や、環境汚染の問題にもつながる。したがって、昨今のグリーンケミストリーの観点からも、医薬品の製造工程でベンゼンが使用されることは基本的にはない。しかし、上述の通りベンゼンは様々な化学物質の原材料として汎用されており、医薬品の製造工程で一般的に使用されるトルエン、アセトン、メタノール及びエタノール等の有機溶媒にも原材料として使用されている。そのため、これらの有機溶媒には不純物として微量のベンゼンが含有されていることが知られている<sup>13-16</sup>。これらの溶媒を製造工程で使用する際には、発がん性を有するというベンゼンの毒性も考慮すると、上述した製造工程のリスク評価の観点から、ベンゼンの濃度限度値を十分に下回る感度を有する分析法を構築し、残留している微量ベンゼンの量を評価する必要がある。

微量ベンゼンの定量分析法については、米国薬局方 (United States Pharmacopeia : USP) の Chapter 467 “Residual Solvents”<sup>17</sup> 及び欧州薬局方 (European Pharmacopeia : EP) の Chapter 2.4.24 “Identification and Control of Residual Solvents”<sup>18</sup> 内で、ICH Q3C (医薬品の残留溶媒ガイドライン)<sup>12</sup> において規定されている残留溶媒の一斉分析法が、ヘッドスペースガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography : GC) によって提案されている (USP/EP 法)。しかし、ベンゼンは濃度限度値が他の残留溶媒と比べて低く、試料溶液中の試料が対象溶媒の定量を妨害するというマトリックス効果<sup>19</sup>の影響を受けやすいことから、微量ベンゼンの定量分析については USP/EP 法が適用できないことがある。このような場合は、検出器に質量分析計 (Mass Spectrometer : MS) を備えたガスクロマトグラフィー (GC-MS) や固相マイクロ抽出法 (Solid

Phase Micro Extraction : SPME) 等の技術を利用して微量ベンゼンの定量分析法を開発するのが一般的であり、分析法開発の報告もいくつか認められているが<sup>20-22</sup>、これらの技術は世界中の製薬関連施設で容易に使用できるものではなく、かつ高度な分析技術が要求される。自社で微量ベンゼンの定量分析を実施できない場合は、外部の分析機関に委託する必要がある、委託費用による開発コスト増、分析期間の長期化に伴う開発スピードの遅延につながる。したがって、あらゆる製薬関連施設が所有している汎用的な分析機器を用いて微量ベンゼンの定量分析を実現することは、需要の大きい課題である。また、本技術の開発は、「品質の良い製品を安価に消費者のもとに届けるために、あらゆる製造プロセスを最適化していく」という化学工学の概念に、分析化学からアプローチするという観点から、学術的にも意義は大きいと考えられる。

本研究では、あらゆる製薬関連施設が所有していると考えられる汎用的な分析機器である紫外吸光光度 (Ultraviolet : UV) 検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV) を用いて、デルゴシチニブにおける微量ベンゼンの定量分析を実現するという目的のもと、従来の分析前処理を簡略化させたシンプルな液液抽出法を活用し、USP/EP 法よりも操作性・経済性に優れた、有用性の高い分析法を開発した。

デルゴシチニブは、日本たばこ産業株式会社がアトピー性皮膚炎を適応症として開発し、2020 年に日本にて製造販売承認を取得したコレクチム軟膏の有効成分であり<sup>23-27</sup>、その製造工程ではトルエンが使用されていることから、デルゴシチニブは潜在的にベンゼンを不純物として含む可能性がある。第 1 章では、デルゴシチニブ中の微量ベンゼンの効率的な分離濃縮を可能にする液液抽出法の検討及び液液抽出-HPLC-UV 法の妥当性の評価について検証した。第 2 章では、米国薬局方 (USP) 及び欧州薬局方 (EP) で提案されている微量ベンゼンの分析法と今回開発した分析法を比較し、その有用性について検証した。以下、得られた結果を 2 章に亘り論述する。

# 第1章 デルゴシチニブ中の微量ベンゼンの効率的な分離濃縮を可能にする液液抽出法の検討及び液液抽出-HPLC-UV法の妥当性の評価

## 1-1 緒言

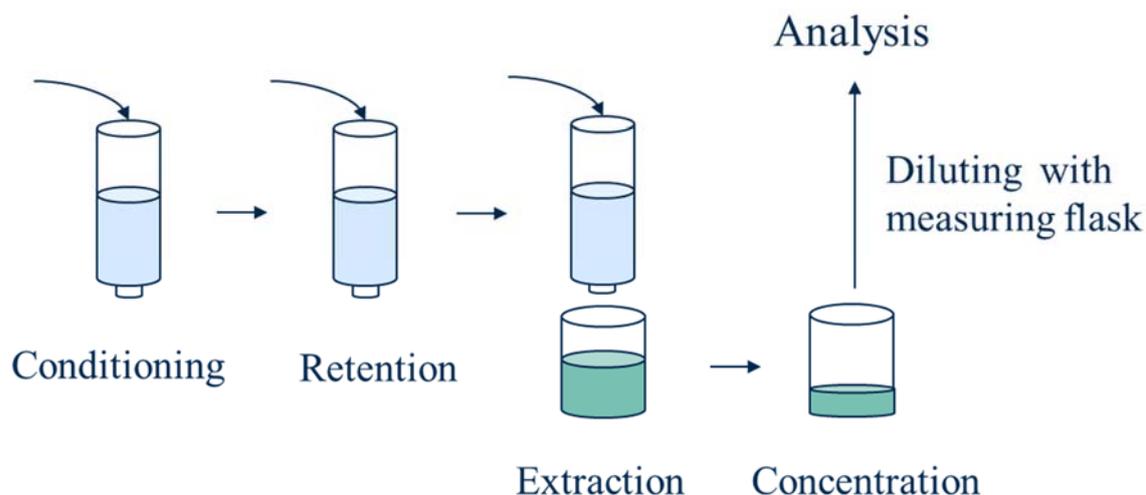
微量ベンゼンの定量分析を通常通りに HPLC-UV を用いて実施する場合、ICH Q3C (医薬品の残留溶媒ガイドライン)<sup>12</sup>において規定されている濃度限度値である 2 ppm を十分に満足する検出感度が必要となるため、試料溶液中のデルゴシチニブの試料濃度を高濃度に設定し、大量の試料を注入して分析する必要がある。しかし、これはカラムへの負荷が大きく、また HPLC-UV システムの配管等への吸着が懸念されることから、HPLC-UV が汎用的に他の試料の分析でも使用されていることを考慮すると、現実的な選択肢ではない。

ベンゼンは単純な芳香族炭化水素化合物であり、水への溶解度が  $1.8 \times 10^{-3}$  g/mL、分配係数が 2.13 (1-オクタノール/水) である<sup>28</sup>。ネルンストの分配律によれば、互いに混合しない二つの溶媒 (相) の間に、ある溶質が希薄溶液として両相において平衡にあるとき、両相におけるその溶質の濃度の比は、温度と圧力が定まった条件下ならばその分配係数に従い一定となることから<sup>29</sup>、ベンゼンの分配係数を考慮すれば、ベンゼンは水と有機溶媒で液液分配をすると有機層に分配される。水と有機溶媒で液液分配を行い、デルゴシチニブを水層に分配することができれば、濃縮効果によるベンゼンの相対的な高感度化及び試料溶液中の試料が対象溶媒の定量を妨害するマトリックス効果の回避が期待できる。したがって、HPLC-UV を用いて微量ベンゼンの定量分析を実現するためには、HPLC 分析の前に微量ベンゼンを抽出する前処理を実施する必要があると考えられた。

微量定量分析の分析前処理は、Figure 1-1 に示す通り各種分析メーカーから販売される固相抽出カートリッジを利用した固相抽出を採用するのが一般的である<sup>30</sup>。この分析前処理操作を詳述すると、

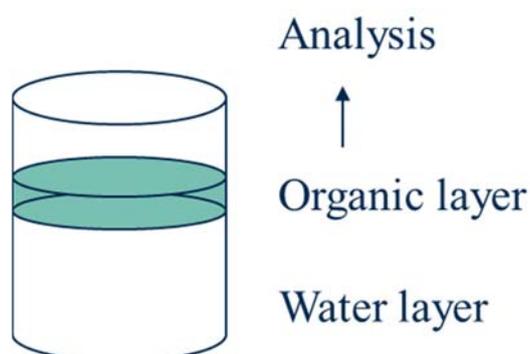
1. コンディショニングによる固相担体の活性化
2. 試料溶液を供することによる定量対象物質の固相担体への保持
3. 溶出溶媒を通液させることによる定量対象物質の抽出
4. 濃縮効果を得るための、3.の濃縮操作
5. 定量分析のための標線合わせ

となり、操作ステップ数も多く、非常に煩雑である。このような煩雑な分析前処理操作は、熟練度の低い分析担当者の操作ミス誘引しやすく、また、操作ステップ数の多さは最終結果のばらつきにも影響を及ぼす。したがって、微量定量分析における煩雑な分析前処理操作は、化学工学の見地からも推奨されない。



**Figure 1-1 Typical pretreatment scheme for trace quantitative analysis aimed at concentration effect**

そこで、今回の微量ベンゼンの定量分析法の開発においては、分析前処理の操作性を向上させるべく、Figure 1-2 に示す 1 ステップ液液抽出による分析前処理スキームを採用することを企図した。通常、定量分析における液液抽出による前処理といえば、分液漏斗で複数回に亘り液液分配を行い、定量対象物質が抽出されている層を集め、濃縮後に各種分析に供するのが一般的である。しかし、小スケールでの 1 回の液液分配において、正確な量の有機溶媒をホールピペット等に加え、そのとき微量ベンゼンの大部分が有機層に抽出されていれば、Figure 1-1 で示した煩雑な分析前処理を Figure 1-2 で示した簡便な 1 ステップ液液抽出で置き換えることができると想定した。本分析前処理が実現可能であれば、上述した固相抽出法による従来の分析前処理の欠点をすべてキャンセルすることが可能である。また、本分析前処理を微量定量分析に実装可能であることを示すということは、化学工学の見地からも大きな意義を有していると考えられた。



**Figure 1-2 Typical pretreatment scheme for trace quantitative analysis by one step liquid-liquid extraction**

本章では、最初にデルゴシチニブを共存試料として微量ベンゼンを効率的に分離濃縮可能とする、操作性に優れた 1 ステップ液液抽出法について、水系溶媒と有機溶媒の組み合わせをスクリーニングにより検討した。次いで、スクリーニング結果より導き出した、液液抽出-HPLC-UV 法による微量ベンゼンの定量分析法について、ICH Q2A（分析法バリデーションに関するテキスト（実施項目）について）<sup>31</sup> 及び ICH Q2B（分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）について）<sup>32</sup> に従い、分析法バリデーションを実施し、分析法の妥当性を確認した。

## 1-2 実験材料及び実験方法

### 1-2-1 試薬及び試料

8 mol/L 水酸化カリウム溶液（容量分析用）、6 mol/L 塩酸（容量分析用）、*n*-ヘキサン（特級）、トルエン（特級）、ジエチルエーテル（特級）、エタノール（99.5）（特級）及びアセトニトリル（HPLC 用）は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。クロロホルム（有機合成用）及びベンゼン（有機合成用）は関東化学株式会社から購入した。蒸留水（HPLC 用）及びクメン（特級）はナカライテスク株式会社より購入した。酢酸エチル（特級）はシグマアルドリッチジャパンから購入した。デルゴシチニブは塩野フィネス株式会社にて治験用に製造されたロットを使用した。

### 1-2-2 測定機器

HPLC-UV は LC-10 シリーズ（オートインジェクター：SIL-10A、バイナリーポンプ：LC-10AD、デガッサー：DGU-14A、カラムオーブン：CTO-10A、検出器：SPD-M10A または SPD-M20A にて構成、いずれも株式会社島津製作所）を用いて測定した。LC カラムは XBridge Shield RP18（4.6 mm×25 cm、3.5 μm、日本ウォーターズ株式会社）を使用した。セミマイクロ天秤は AT261（メトラー・トレド株式会社）を使用した。

### 1-2-3 HPLC-UV の操作条件

移動相 A には水、移動相 B にはアセトニトリルを用いた。グラジエントは、開始時の移動相 B を 40% とし、15 分保持した後、2 分間で移動相 B を 90% とし、そのまま 2 分間保持した。流量は毎分 0.9 mL、カラム温度は 45°C、注入量は 20 μL とした。検出器には紫外吸光光度 (UV) 検出器を用い、測定波長を 205 nm とした。HPLC-UV の操作条件を Table 1-1 に示す。

**Table 1-1 Operating condition of HPLC-UV**

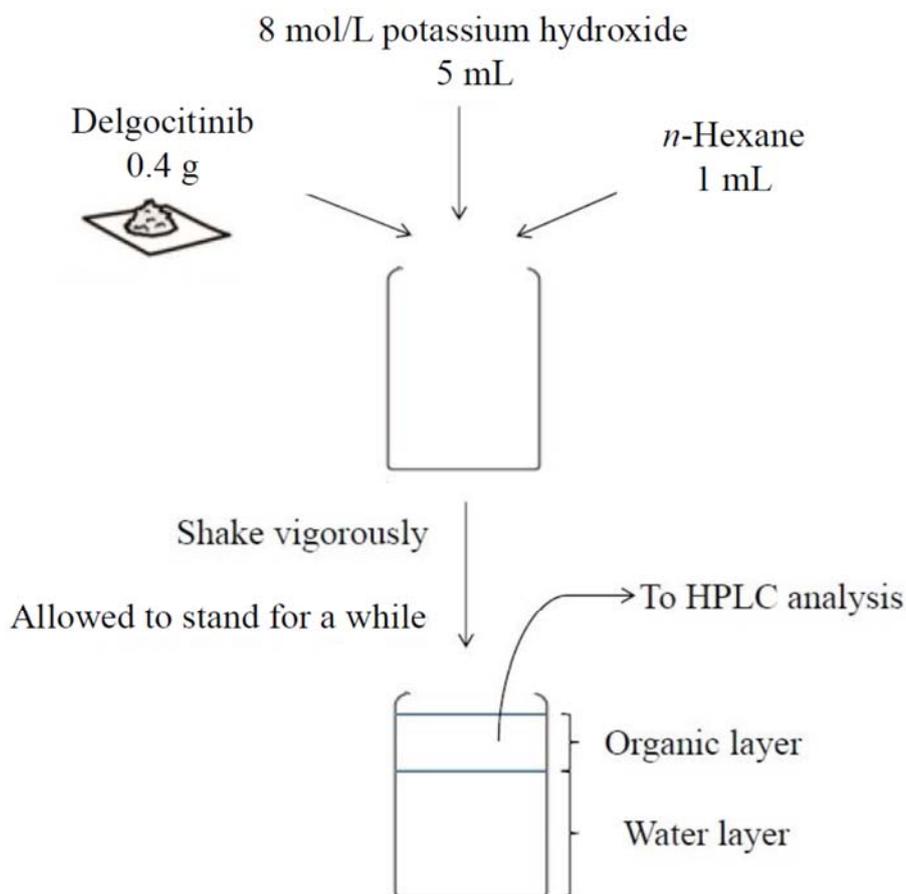
<b>Detector</b>	Ultraviolet detector (Wavelength: 205 nm)		
<b>Column</b>	XBridge Shield RP18 (4.6 mm×25 cm, 3.5 μm)		
<b>Column temperature</b>	45°C		
<b>Mobile phase A</b>	Water		
<b>Mobile phase B</b>	Acetonitrile		
<b>Gradient program</b>	Time (min.)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
	0 – 15	60	40
	15 – 17	60 → 10	40 → 90
	17 – 19	10	90
<b>Flow rate</b>	0.9 mL/min. (Retention time of benzene: about 13 min.)		
<b>Injection volume</b>	20 μL		

(Table 1 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)

#### 1-2-4 試料溶液及び標準溶液の調製方法

試料溶液：デルゴシチニブ約 0.4 g を精密に量り，8 mol/L 水酸化カリウム溶液 5 mL 及び *n*-ヘキサン 1 mL を正確に加え，よく振り混ぜたのち，静置して分層し，上層（有機層）を試料溶液とした。試料溶液の調製スキームを Figure 1-3 に示す。

標準溶液：ベンゼン約 0.4 g を精密に量り，*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とする。この液 2.5 mL を正確に量り，*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り，*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り，*n*-ヘキサンを加えて正確に 20 mL とし，標準溶液とした。



**Figure 1-3 Preparation scheme of sample solution**

(Fig. 1 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)

#### 1-2-5 スクリーニングの際に使用した試料溶液及び標準溶液の調製方法

スクリーニング用標準溶液：ベンゼン約 0.4 g を精密に量り，*n*-ヘキサンまたは酢酸エチルまたはジエチルエーテルまたはクロロホルムを加えて正確に 100 mL とする。この液 2.5 mL を正確に量り，使用した希釈溶媒を加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り，使用した希釈溶媒を加えて正確に 50 mL とし，この液を *n*-ヘキサンまたは酢酸エチルまたはジエチルエーテルまたはクロロホルムのスクリーニング用標準溶液とした。

デルゴシチニブ存在下のベンゼン添加試料溶液：デルゴシチニブ約 0.4 g を精密に量り，8 mol/L 水酸化カリウム溶液または 6 mol/L 塩酸 5 mL 及び *n*-ヘキサンまたは酢酸エチルまたはジエチルエーテルまたはクロロホルムのスクリーニング用標準溶液 1 mL を正確に加え，よく振り混ぜたのち，静置して分層し，上層（有機層）をデルゴシチニブ存在下のベンゼン添加試料溶液とした。

デルゴシチニブ非存在下のベンゼン添加溶液：8 mol/L 水酸化カリウム溶液または 6 mol/L 塩酸 5 mL 及び *n*-ヘキサンまたは酢酸エチルまたはジエチルエーテルまたはクロロホルムの

スクリーニング用標準溶液 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層し、上層（有機層）をデルゴシチニブ非存在下のベンゼン添加溶液とした。

エタノール添加標準溶液：ベンゼン約 0.4 g を精密に量り、酢酸エチルを加えて正確に 100 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、酢酸エチルを加えて正確に 100 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、エタノール（99.5）を加えて正確に 10 mL とし、この液をエタノール添加標準溶液とした。

#### 1-2-6 デルゴシチニブ溶出位置確認用試料溶液の調製方法

デルゴシチニブ溶出位置確認用試料溶液：デルゴシチニブ約 5 mg を精密に量り取り、水／アセトニトリル混液（1：1）を加えて正確に 50 mL とする。この液 2 mL を正確に量り、水／アセトニトリル混液（1：1）を加えて正確に 10 mL とし、デルゴシチニブ溶出位置確認用試料溶液とした。

#### 1-2-7 分析法バリデーションの際に使用した試料溶液の調製方法

特異性評価用試料溶液：ベンゼン、トルエン及びクメン約 0.4 g をそれぞれ精密に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とする。この液 2.5 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とし、特異性評価用試料溶液とした。

ベンゼン希釈原液：ベンゼン約 0.4 g を精密に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とする。この液 2.5 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とし、ベンゼン希釈原液とした（10 ppm 相当）。

真度及び併行精度評価用ベンゼン添加原液：ベンゼン希釈原液 3 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 10 mL とし、この液を真度及び併行精度評価用ベンゼン添加原液-1 とした。ベンゼン希釈原液 2 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 10 mL とし、この液を真度及び併行精度評価用ベンゼン添加原液-2 とした。ベンゼン希釈原液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 20 mL とし、この液を真度及び併行精度評価用ベンゼン添加原液-3 とした。

真度及び併行精度評価用試料溶液：デルゴシチニブ約 0.4 g を精密に量り、8 mol/L 水酸化カリウム溶液 5 mL 及び真度及び併行精度評価用ベンゼン添加原液-1 または真度及び併行精度評価用ベンゼン添加原液-2 または真度及び併行精度評価用ベンゼン添加原液-3 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層し、上層（有機層）をそれぞれ、真度及び併行精度評価用試料溶液-1（3 ppm 相当）、真度及び併行精度評価用試料溶液-2（2 ppm 相当）、真度及び併行精度評価用試料溶液-3（0.5 ppm 相当）とした。

定量限界評価用試料溶液：上記で調製したベンゼン希釈原液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 20 mL とし、この液を定量限界評価用試料溶液（0.5 ppm 相当）とした。

検出限界評価用試料溶液：上記で調製したベンゼン希釈原液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とし、この液を検出限界評価用試料溶液 (0.1 ppm 相当) とした。

直線性評価用試料溶液：上記で調製したベンゼン希釈原液 5 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 10 mL とし、この液を直線性評価用試料溶液-1 (5 ppm 相当) とした。上記で調製したベンゼン希釈原液 3 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 10 mL とし、この液を直線性評価用試料溶液-2 (3 ppm 相当) とした。上記で調製したベンゼン希釈原液 2 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 10 mL とし、この液を直線性評価用試料溶液-3 (2 ppm 相当) とした。上記で調製したベンゼン希釈原液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 20 mL とし、この液を直線性評価用試料溶液-4 (0.5 ppm 相当) とした。上記で調製したベンゼン希釈原液 3 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とし、この液を直線性評価用試料溶液-5 (0.3 ppm 相当) とした。

### 1-3 結果及び考察

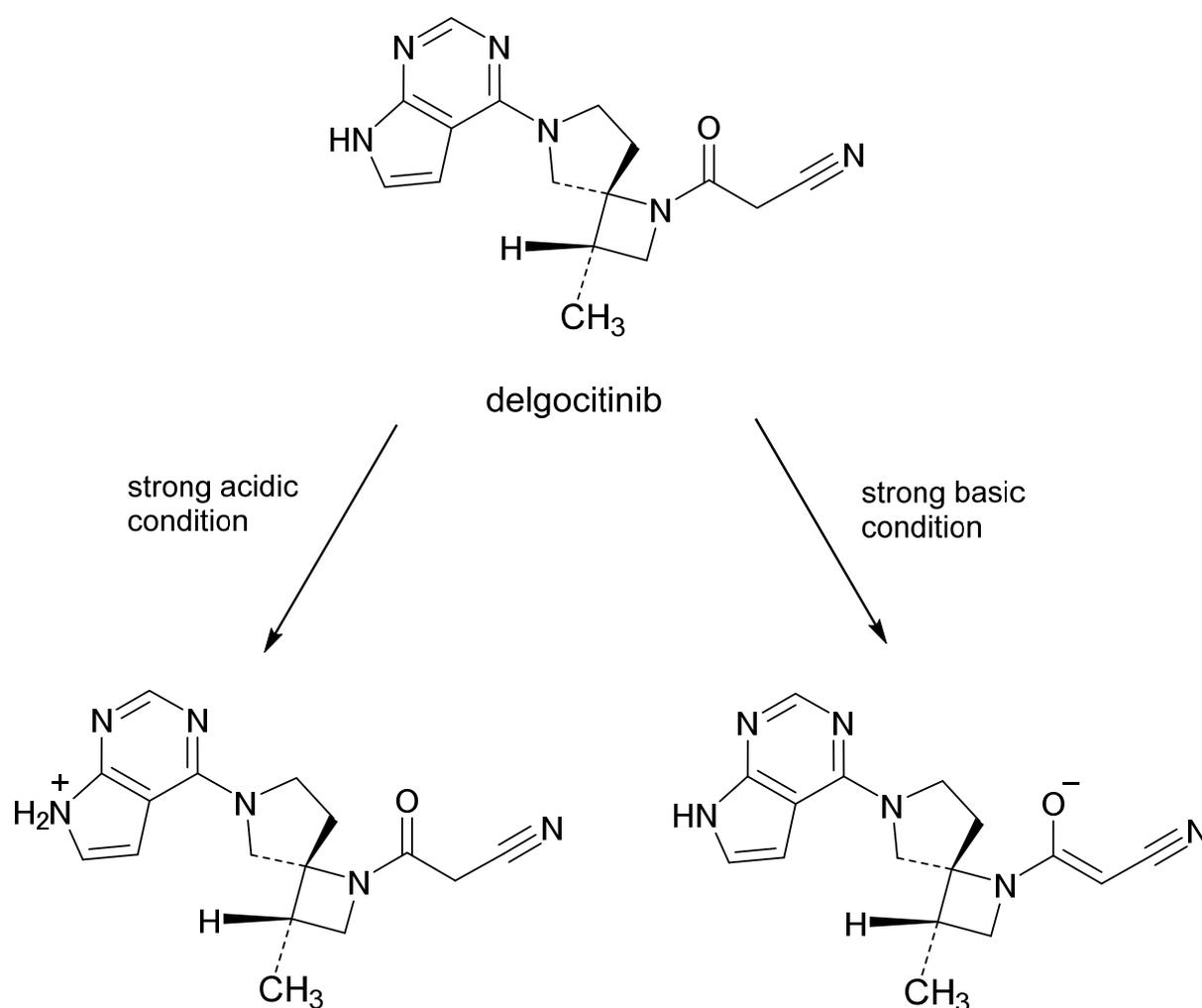
#### 1-3-1 液液抽出条件の最適化

##### 1-3-1-1 スクリーニング条件の設定

Figure 1-2 に示した 1 ステップ液液抽出法を活用してベンゼンの濃縮効果を得る場合、抽出に使用する有機溶媒の量を削減すればするほど、相対的なベンゼンの感度向上が期待できる。しかし、「液液抽出後に有機層を HPLC 分析用バイアルに移し、HPLC-UV を用いて分析を行う」という分析操作を考慮すると、有機溶媒の量は少なくとも 1 mL は必要であると考えられたことから、ベンゼンの抽出に用いる有機溶媒の量を 1 mL に設定し、スクリーニングを実施することとした。この場合、例えば水系溶媒 5 mL にデルゴシチニブ 0.1 g を溶解させ、1 ステップ液液抽出法を適用すると、形式的に 1 mL の有機溶媒に 0.1 g のデルゴシチニブを溶解させたことに相当する感度でベンゼンを分析できることになる。したがって、小スケールで 1 ステップ液液抽出法を実施するという分析前処理操作の操作性を維持しつつ、ベンゼンの相対的な感度向上を獲得するためには、デルゴシチニブを高濃度に水系溶媒に溶解させる必要があると考えられた。

デルゴシチニブの化学構造及び各種 pH 溶液に対する溶解度情報を Figure 1-4 及び Table 1-2 に示す。デルゴシチニブは水に対して 3 mg/mL 未満の溶解度であることから、各種 pH 溶液に対する溶解度について確認したところ、酸性度の上昇に伴い、溶解性が上昇する傾向が認められた。これはデルゴシチニブが化学構造内に第 2 級アミンを有し、アミノ基がイオン化するためと考えられた (Figure 1-4)。また、pH 12 までの塩基性度の上昇に伴う溶解性の上昇は認められなかったものの、デルゴシチニブの構造内のカルボニル基は、規定度の高い強塩基性条件下でケト-エノール互変異性によりエノール体となり、イオン化することにより、溶解すると考えられた (Figure 1-4)。以上より、pH の一般的な測定範囲である 0~14 の範囲を超える規定度の高い強酸及び強塩基の水系溶媒を使用することにより、デルゴシチニブを

高濃度で水系溶媒に溶解可能であると考えられた。一般的に定量対象物質が加水分解してしまう懸念があることから、試料溶解溶媒に強酸及び強塩基の水系溶媒を使用することはないが、ベンゼンは化学構造的に加水分解されることはなく<sup>33</sup>、強酸及び強塩基の影響を受ける可能性は低い。また、デルゴシチニブは強酸及び強塩基下で加水分解により経時的にシアノアセチル基が脱離していくが、デルゴシチニブがすべて分解したとしても分解生成物がベンゼンの定量を妨害しない限り、微量ベンゼンの定量分析法として成立することから、測定対象であるデルゴシチニブの安定性を考慮する必要はない。今回、水系溶媒の候補として選択した 6 mol/L 塩酸及び 8 mol/L 水酸化カリウム溶液は、いずれもデルゴシチニブを 0.5 g/mL 以上溶解させることが可能であり、試薬メーカーから入手可能であるため、用時調製する必要もない。



**Figure 1-4 Chemical structure of delgocitinib and indicated ionization of delgocitinib under strong acidic and basic condition**

**Table 1-2 Solubility of delgocitinib to aqueous pH solutions (20°C)**

Aqueous pH solutions	Solubility
pH 2 Britton-Robinson buffer	31.6 mg/mL
pH 3 Britton-Robinson buffer	18.3 mg/mL
pH 4 Britton-Robinson buffer	14.1 mg/mL
pH 5 Britton-Robinson buffer	6.9 mg/mL
pH 6 Britton-Robinson buffer	3.7 mg/mL
pH 7 Britton-Robinson buffer	2.9 mg/mL
pH 8 Britton-Robinson buffer	2.7 mg/mL
pH 9 Britton-Robinson buffer	2.7 mg/mL
pH 10 Britton-Robinson buffer	2.6 mg/mL
pH 11 Britton-Robinson buffer	2.6 mg/mL
pH 12 Britton-Robinson buffer	2.5 mg/mL

Britton-Robinson buffers: 0.04 mol/L phosphoric acid, 0.04 mol/L acetic acid and 0.04 mol/L boric acid adjusted with 0.2 mol/L NaOH solution as necessary to obtain desired pH.

ベンゼンの抽出に使用する有機溶媒については、ベンゼンの比誘電率が 2.274 (25°C) であり低極性であることから<sup>34</sup>、親和性が高いと考えられる低極性溶媒を中心に *n*-ヘキサン、酢酸エチル、クロロホルム及びジエチルエーテルを検討することにした。各有機溶媒の比誘電率及び水への溶解度を Table 1-3 に示した。

Table 1-3 Organic solvents used in the screening study

Organic solvents	Relative permittivity	Solubility to water
<i>n</i> -Hexane	1.88 (25°C) <sup>34</sup>	$1.3 \times 10^{-5}$ g/mL <sup>35</sup>
Ethyl acetate	6.02 (25°C) <sup>34</sup>	$8.0 \times 10^{-2}$ g/mL <sup>36</sup>
Chloroform	4.81 (20°C) <sup>34</sup>	$8.0 \times 10^{-3}$ g/mL <sup>37</sup>
Diethyl ether	4.20 (25°C) <sup>34</sup>	$6.0 \times 10^{-2}$ g/mL <sup>38</sup>

以上の水系溶媒及び有機溶媒の候補につき、それぞれ 5 mL 及び 1 mL ずつ用いて 1 ステップ液液抽出法による抽出操作を行い、溶媒選択のためのスクリーニングを実施した。抽出操作時に 10 ppm 相当のベンゼンを添加し、調製したスクリーニング用試料溶液から得られるベンゼンのピーク面積と、抽出操作を行わずに調製した 10 ppm 相当のベンゼンが含まれるスクリーニング用標準溶液から得られるベンゼンのピーク面積を比較することによって、ベンゼンの添加回収率を算出し、1 ステップ液液抽出法の成否の判断とした。Table 1-3 に示す通り、有機溶媒によっては水への溶解性がある程度は認められるものの、ベンゼンの分配係数が 2.13 (1-オクタノール/水) であることを考慮すると、ベンゼンは有機層に分配されることから、水系溶媒及び有機溶媒の候補について相溶性が認められた場合、ベンゼンの添加回収率に影響が認められると考えられる。したがって、1 ステップ液液抽出法の成否の判断として、ベンゼンの添加回収率を指標とするのは妥当であると考えられた。

HPLC-UV の操作条件については、抽出操作によってベンゼン以外の UV 吸収のある化合物が除去されていることを期待し、汎用性の高い、シルカゲル担体にオクタデシルシリル基 (Octa Decyl Silyl : ODS) を化学結合した充填剤が詰められた HPLC 用カラム (ODS カラム) や、移動相に添加剤を使用しない水及びアセトニトリルを使用するという、経済性及び操作性に優れた Table 1-1 に示す操作条件を適用した。

本研究では、実際にベンゼンを含有しているデルゴシチニブが存在しないことから、試料溶液調製時に疑似的にベンゼンを添加し、検討を行った。デルゴシチニブにベンゼンが残留しているケースとして、以下の 2 パターンが想定できる。

- ベンゼン分子がデルゴシチニブから独立して存在している。
- デルゴシチニブの結晶格子にベンゼン分子が入り込み、包接化合物 (クラスレート) を形成している。

試料溶液調製時にデルゴシチニブの試料が溶解して澄明な溶液が調製されていれば、前者のケースではもともと独立して存在しているベンゼン分子がその分配係数に応じて溶液中に分配されると考えられる。一方、後者のケースではデルゴシチニブを強酸または強塩基の水系溶媒に溶解させた段階で結晶格子が崩れ、放出されたベンゼン分子はその分配係数に応じて溶液中に分配されて存在することになる。したがって、試料溶液調製時に試料が溶解して

いれば、ベンゼンがデルゴシチニブに由来するか、別途に添加しているかに係らず、試料溶液中に存在している全ベンゼン量を反映した状態になっていると考えられる。すなわち、試料溶液調製時に疑似的にベンゼンを添加する検討アプローチは、デルゴシチニブに実際にベンゼンが残留している状態を模していると考えるのが妥当である。

また、HPLC 等のクロマトグラム上では、試料溶液中の定量対象化合物の溶出位置が本来の定量対象化合物の溶出位置から変化することがあり、本事象は定量対象化合物と試料における相互作用によるものと考えられている<sup>39</sup>。しかし、本アプローチでは抽出操作によって試料溶液からデルゴシチニブを含むベンゼン以外のほとんどの成分が除去されることから、試料溶液において定量対象化合物であるベンゼンの溶出位置が変化することは想定しづらい。なお、前述の通り試料溶液調製時に疑似的にベンゼンを添加する検討アプローチは、デルゴシチニブに実際にベンゼンが残留している状態を模していることから、試料溶液中のベンゼンの溶出位置が変化する場合、ベンゼンを添加して調製した試料溶液で再現されることになる。

医薬品中の残留溶媒等の不純物の定量分析法を検討する際に、定量対象化合物を試料溶液に添加し、その添加回収率を確認することで分析法の成否を判断するという検討アプローチは一般的に実施されているが<sup>40, 41</sup>、分析前処理に 1 ステップ液液抽出法を採用したデルゴシチニブ中の微量ベンゼンの定量分析法検討においても、同様の検討アプローチを取ることが妥当であると考えられた。

### 1-3-1-2 スクリーニング結果

試料溶解溶媒に用いる水系溶媒及び抽出に用いる有機溶媒のスクリーニング結果について、Table 1-4 に示した。本スクリーニング結果より、有機溶媒に *n*-ヘキサンを用いて抽出操作を行うと、強酸である 6 mol/L 塩酸または強塩基である 8 mol/L 水酸化カリウム溶液のいずれの水系溶媒を試料溶解溶媒として用いても、ベンゼンの添加回収率が良好であった。したがって、有機溶媒に *n*-ヘキサン、水系溶媒に 6 mol/L 塩酸または 8 mol/L 水酸化カリウムを使用する、小スケールでの 1 ステップ液液抽出法により、ベンゼンの大部分を有機層に抽出可能であることが確認された。本スクリーニング結果の詳細について、1-3-1-2-1 に分層時の外観、1-3-1-2-2 に水系溶媒：8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒：酢酸エチル使用時の液液抽出結果、1-3-1-2-3 に水系溶媒：8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒：ジエチルエーテル使用時の液液抽出結果、1-3-1-2-4 に水系溶媒：8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒：*n*-ヘキサン使用時の液液抽出結果、1-3-1-2-5 に水系溶媒：6 mol/L 塩酸、有機溶媒：*n*-ヘキサン使用時の液液抽出結果及び 1-3-1-2-6 に 1 ステップ液液抽出操作によるデルゴシチニブの除去について考察する。

**Table 1-4 Summary of the screening study for selecting the combination of aqueous medium and organic solvents**

Aqueous medium (5 mL)	Organic solvent (1 mL)	Recovery (%) of spiked benzene at 10 ppm	
		Sample solution with drug substance	Sample solution without drug substance
	<i>n</i> -Hexane	99.0	99.4
8 mol/L potassium hydroxide	Ethyl acetate	72.2	69.7
	Chloroform		NOT tested <sup>a</sup>
	Diethyl ether	129.0	96.3
	<i>n</i> -Hexane	98.2	99.1
6 mol/L hydrochloric acid	Ethyl acetate		NOT tested <sup>a</sup>
	Chloroform		NOT quantitated <sup>b</sup>
	Diethyl ether		NOT tested <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Not separated between organic and aqueous layer in extraction with drug substance.

<sup>b</sup>: Not be able to quantitate benzene due to the obstruction peak derived from chloroform.

(Modified Table 2 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)

### 1-3-1-2-1 分層時の外観

試料溶解溶媒に用いる水系溶媒及び抽出に用いる有機溶媒のスクリーニングにおいて、以下の3条件につき、デルゴシチニブ存在下にて、有機層と水層が分層せず、エマルジョンの形成が認められた。

- ・水系溶媒に 8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒にクロロホルム使用時
- ・水系溶媒に 6 mol/L 塩酸、有機溶媒に酢酸エチル使用時
- ・水系溶媒に 6 mol/L 塩酸、有機溶媒にジエチルエーテル使用時

なお、他の条件については、すべて明確に分層した。ただし、水系溶媒に 6 mol/L 塩酸、有機溶媒にクロロホルムを使用した条件については、クロロホルム中の夾雑成分がベンゼンのピークを著しく妨害したことから、ベンゼンのピークを捉えることができなかった。

デルゴシチニブは、1-3-1-1 で述べた通り、強酸または強塩基の水系溶媒中においてイオン

化することで、高濃度に存在していると示唆されるが、デルゴシチニブの化学構造において、イオン化して存在している官能基付近が親水性を有し、それ以外の部分が疎水性を有することによって、デルゴシチニブが両親媒性を有する界面活性剤のような働きを示し、液液分配時にエマルジョンを形成したと示唆された。ただし、有機溶媒に *n*-ヘキサンを使用した時には、強酸及び強塩基の水系溶媒のいずれにおいてもエマルジョンは形成されなかった。デルゴシチニブの化学構造を確認すると、イオン化して存在していると示唆される官能基付近以外の構造において、炭素より電気陰性度の大きい窒素が含まれており、電荷の偏りが生じることから、比誘電率の低い無極性溶媒である炭化水素化合物の *n*-ヘキサンに対して親和性を示さなかったと考えられた。

### 1-3-1-2-2 水系溶媒：8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒：酢酸エチル使用時の液液抽出結果

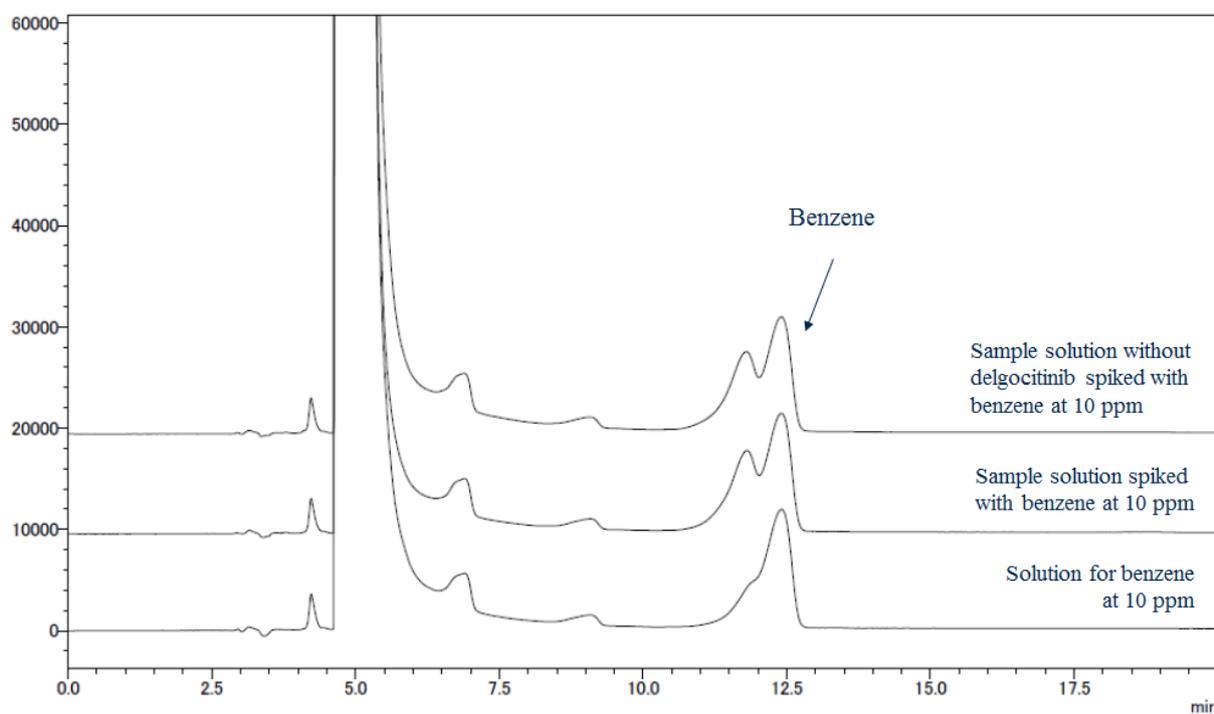
試料溶解溶媒に用いる水系溶媒及び抽出に用いる有機溶媒のスクリーニングにおいて、水系溶媒に 8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒に酢酸エチルを使用した時の結果について以下に示す。

まず、液液分配時の酢酸エチル層の量が 0.8~0.9 mL 程度と、明らかに添加量 (1 mL) よりも減じていた。前述の通り、酢酸エチルは  $8.0 \times 10^{-2}$  g/mL<sup>36</sup> で水に溶解可能であるが、エステル系の有機溶媒を用いて強酸や強塩基の水系溶媒と液液分配を行うと加水分解を受けることが知られていることから<sup>42</sup>、本事象は酢酸エチルが強塩基である 8 mol/L 水酸化カリウム溶液によって加水分解を受け、エタノールと酢酸を生成したことが主な理由であると考えられた。今回のスクリーニングに用いた有機溶媒の中で最も比誘電率が高いにもかかわらず本スクリーニング条件で分層したのは、酢酸エチルの加水分解により生じた酢酸と水酸化カリウムにより生成した酢酸カリウムによる塩析効果の影響が大きいと推察された。

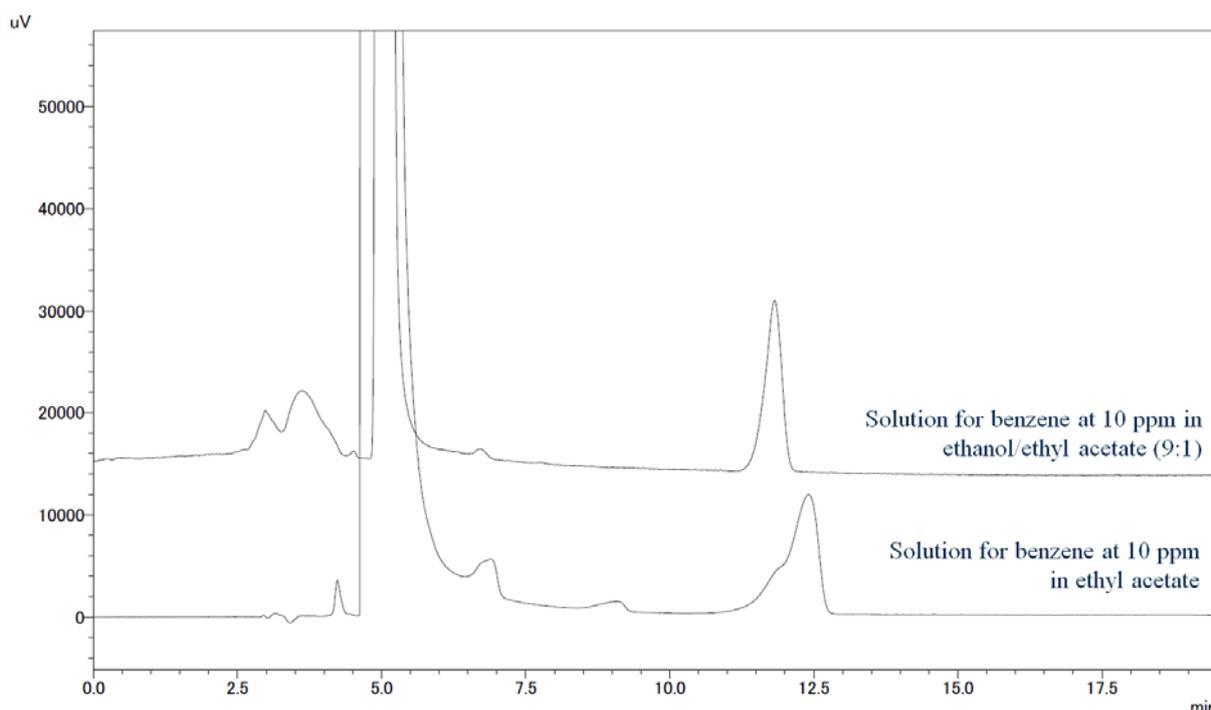
また、本スクリーニング条件においては、液液分配時に 8 mol/L 水酸化カリウム溶液と酢酸エチル以外に、エタノール、酢酸及び酢酸カリウムも存在していたと考えられることから、試料溶液には酢酸エチル以外の溶媒も共存していたことが想定される。試料溶液のクロマトグラムを Figure 1-5 に示すが、クロマトグラムを確認すると、液液抽出操作を行った試料溶液には、デルゴシチニブの有無に関わらずベンゼンのピーク直前にピークが認められた。試料溶解溶媒に溶出力の異なる溶媒が共存する場合にピーク割れが認められることから<sup>43</sup>、本事象は、試料溶液に酢酸エチル以外の溶媒が混入したことにより、ベンゼンのピークが割れて溶出されたと考えられた。そこで、エタノール添加標準溶液 (試料溶解溶媒：エタノール/酢酸エチル混液 (9 : 1)、ベンゼン濃度：10 ppm) を調製し、得られたクロマトグラムを確認したところ (Figure 1-6)、ベンゼンのピーク位置が前方にシフトした。したがって、水系溶媒に 8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒に酢酸エチルを使用した時の試料溶液には、エタノールが混入していると示唆された。

酢酸エチルは 8 mol/L 水酸化カリウム溶液によって加水分解を受けエタノールと酢酸を生成し、また、今回のスクリーニングに用いた有機溶媒の中で最も水への溶解度及び比誘電率

が高く、ベンゼンの比誘電率との差も大きいことから、効率的な 1 ステップ液液抽出を実現するために使用する有機溶媒としては、相応しくないと考えられた。



**Figure 1-5 HPLC chromatograms of the solution for benzene at 10 ppm, the sample solution spiked with benzene at 10 ppm and the sample solution without delgocitinib spiked with benzene at 10 ppm using 8 mol/L potassium hydroxide and ethyl acetate**



**Figure 1-6 HPLC chromatograms of the solution for benzene at 10 ppm diluted by ethyl acetate and the solution for benzene at 10 ppm diluted mixture ethanol and ethyl acetate (9 : 1)**

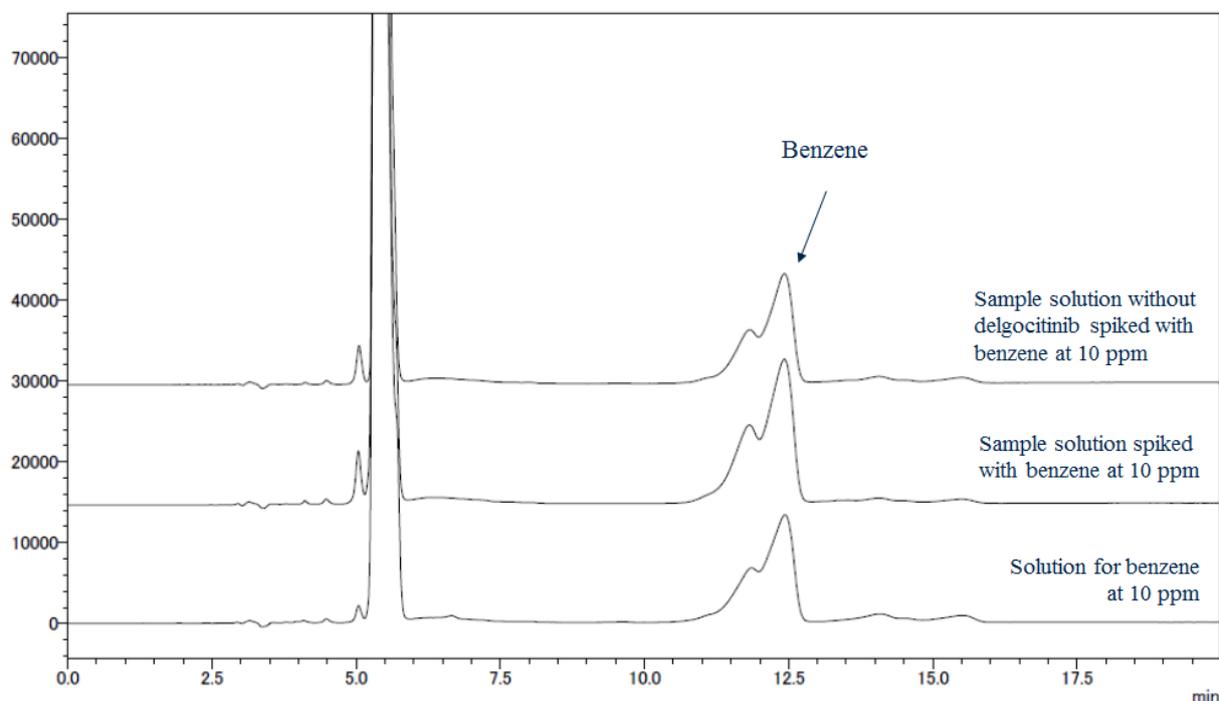
### 1-3-1-2-3 水系溶媒：8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒：ジエチルエーテル使用時の液液抽出結果

試料溶解溶媒に用いる水系溶媒及び抽出に用いる有機溶媒のスクリーニングにおいて、水系溶媒に 8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒にジエチルエーテルを使用した時の結果について以下に示す。

液液分配時の有機層の液量については、目視では添加量（1 mL）と同等であった。ジエチルエーテルは  $6.04 \times 10^{-2}$  g/mL<sup>38</sup> で水へ溶解するが、ジエチルエーテル/水の二成分系の相互溶解度を確認すると、20°C では有機層におけるジエチルエーテルの質量分率が 0.9880 であったことから<sup>44</sup>、添加したジエチルエーテルのほぼ全量が有機層に存在することになる。したがって、分層は良好であったと考えられた。

試料溶液のクロマトグラムを Figure 1-7 に示す。クロマトグラムを確認すると、ベンゼンのピーク形状が不良であったものの、抽出操作によってベンゼンを妨害するような夾雑成分のピークも認められず、HPLC-UV の操作条件を改良すれば、良好なクロマトグラムが得られると考えられた。次に、Table 1-4 よりベンゼンの添加回収率を確認したところ、デルゴシチニブ存在時にベンゼンの添加回収率の高値が認められた。これは、ジエチルエーテルの沸点（34.48°C<sup>45</sup>）が *n*-ヘキサン、酢酸エチル及びクロロホルムの沸点（それぞれ 68.74°C<sup>46</sup>、76.82°C<sup>47</sup> 及び 61.2°C<sup>48</sup>）に比べ低いことから、液液抽出の操作中にジエチルエーテルが揮発し、添加回収率の高値につながったと示唆された。冷蔵条件下で液液抽出を行う等、抽出溶媒であ

るジエチルエーテルが揮発しないような配慮をすれば、本条件においても 1 ステップ液液抽出法を用いた定量分析は適用可能であると考えられた。



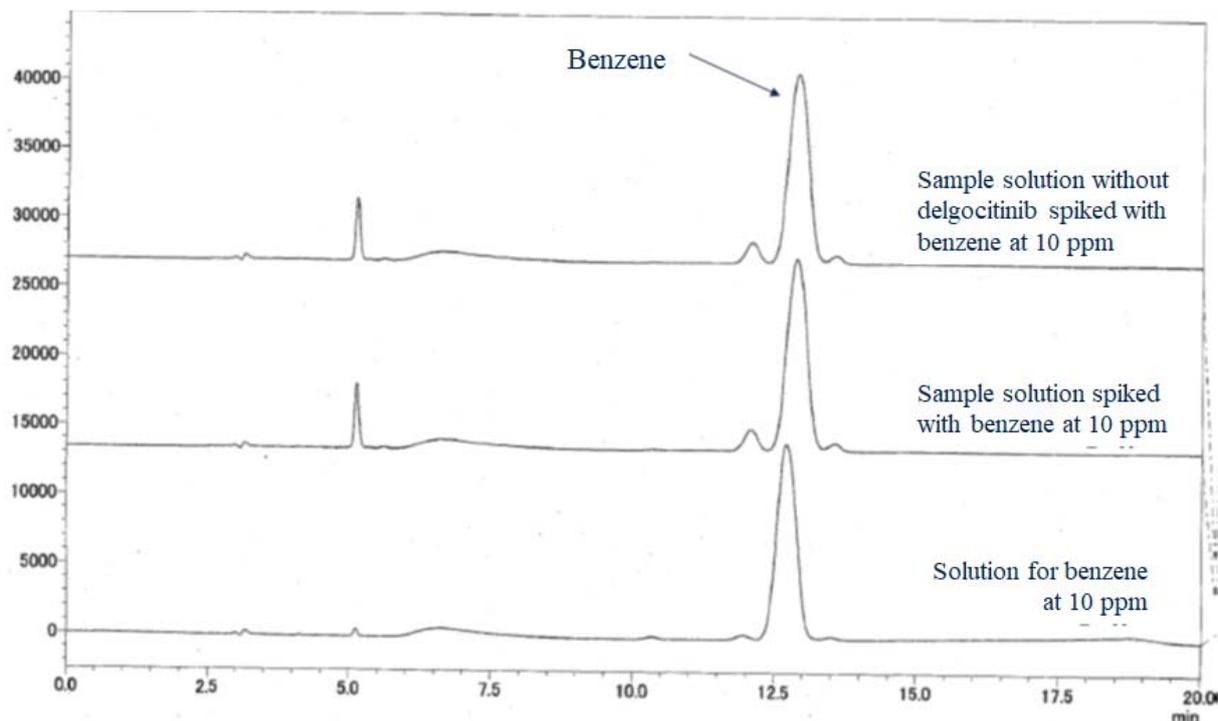
**Figure 1-7 HPLC chromatograms of the solution for benzene at 10 ppm, the sample solution spiked with benzene at 10 ppm and the sample solution without delgocitinib spiked with benzene at 10 ppm using 8 mol/L potassium hydroxide and diethyl ether**

#### 1-3-1-2-4 水系溶媒：8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒：*n*-ヘキサン使用時の液液抽出結果

試料溶解溶媒に用いる水系溶媒及び抽出に用いる有機溶媒のスクリーニングにおいて、水系溶媒に 8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒に *n*-ヘキサンを使用した時の結果について以下に示す。

液液分配時の有機層の液量については、目視では添加量（1 mL）と同等であった。*n*-ヘキサンは無極性分子であり、水への溶解度は  $1.3 \times 10^{-5}$  g/mL と著しく低い。したがって、添加した *n*-ヘキサンのほぼ全量が有機層に存在することになり、分層は良好であったと考えられた。

試料溶液のクロマトグラムを Figure 1-8 に示す。クロマトグラムを確認すると、ベンゼンのピーク形状は良好であり、抽出操作を実施してもベンゼンを妨害するような夾雑成分のピークは認められなかった。また、Table 1-4 よりベンゼンの添加回収率を確認したところ、抽出操作時のデルゴシチニブの有無に関わらず、99%以上の回収率が認められた。以上より、本条件においては経済性及び操作性に優れた HPLC-UV の操作条件を変更する必要もなく、1 ステップ液液抽出法を用いた定量分析が適用可能であると考えられた。



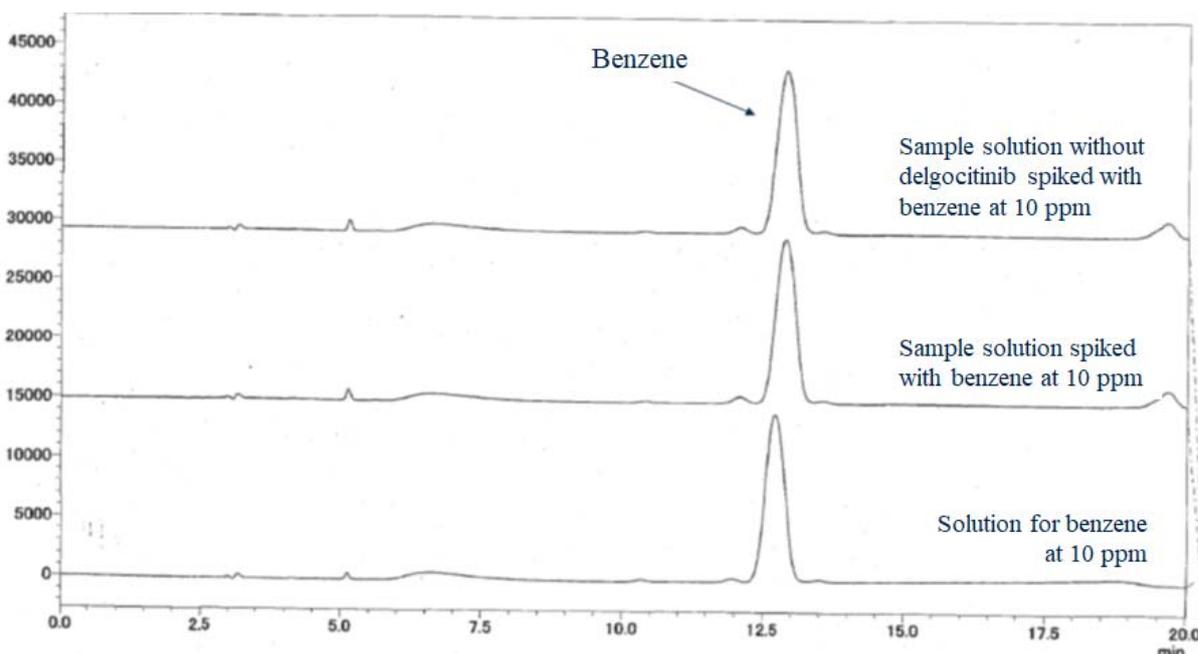
**Figure 1-8 HPLC chromatograms of the solution for benzene at 10 ppm, the sample solution spiked with benzene at 10 ppm and the sample solution without delgocitinib spiked with benzene at 10 ppm using 8 mol/L potassium hydroxide and *n*-hexane**

#### 1-3-1-2-5 水系溶媒：6 mol/L 塩酸、有機溶媒：*n*-ヘキサン使用時の液液抽出結果

試料溶解溶媒に用いる水系溶媒及び抽出に用いる有機溶媒のスクリーニングにおいて、水系溶媒に 6 mol/L 塩酸、有機溶媒に *n*-ヘキサンを使用した時の結果について以下に示す。

液液分配時の有機層の液量については、目視では添加量 (1 mL) と同等であった。1-3-1-2-4 に記載した通り、*n*-ヘキサンは無極性分子であり、水への溶解度は  $1.3 \times 10^{-5}$  g/mL と著しく低いことから、添加した *n*-ヘキサンのほぼ全量が有機層に存在することになり、分層は良好であったと考えられた。

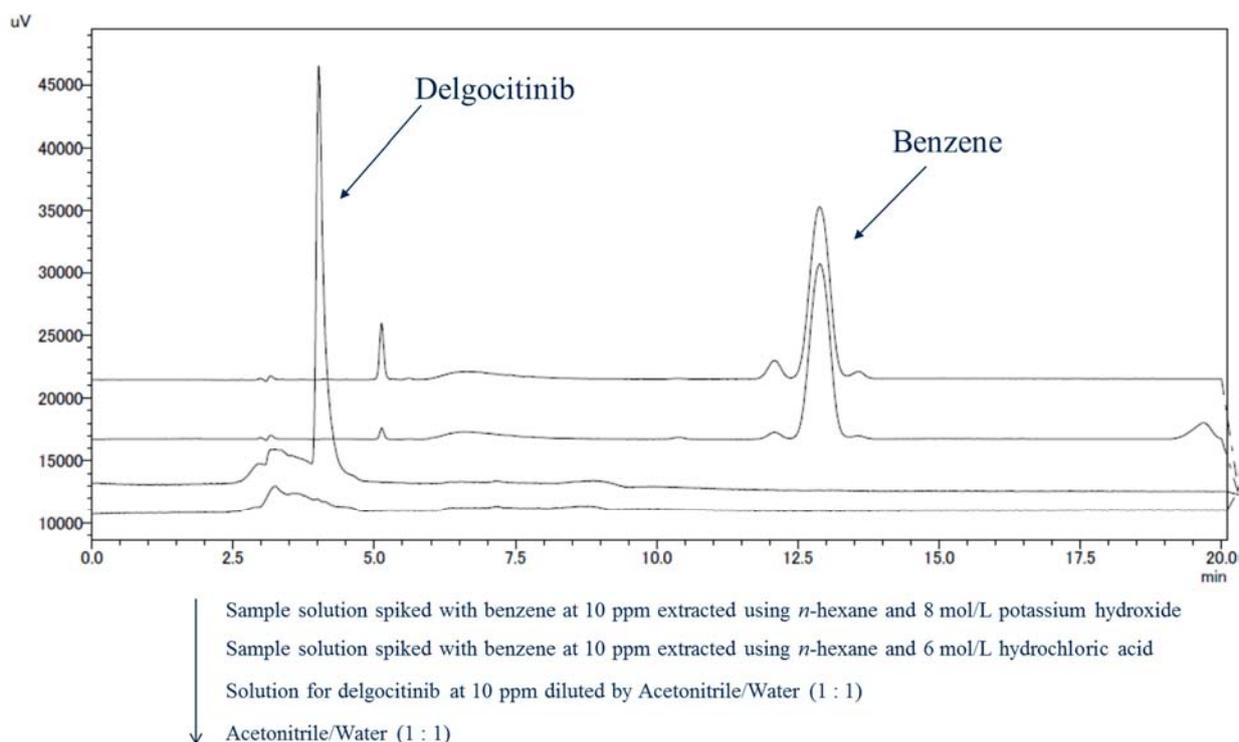
試料溶液のクロマトグラムを Figure 1-9 に示す。クロマトグラムを確認すると、ベンゼンのピーク形状は良好であり、抽出操作を実施してもベンゼンを妨害するような夾雑成分のピークは認められなかった。また、Table 1-4 よりベンゼンの添加回収率を確認したところ、抽出操作時のデルゴシチニブの有無に関わらず、98%以上の回収率が認められた。以上より、本条件においては経済性及び操作性に優れた HPLC-UV の操作条件を変更する必要もなく、1 ステップ液液抽出法を用いた定量分析が適用可能であると考えられた。



**Figure 1-9 HPLC chromatograms of the solution for benzene at 10 ppm, the sample solution spiked with benzene at 10 ppm and the sample solution without delgocitinib spiked with benzene at 10 ppm using 6 mol/L hydrochloric acid and *n*-hexane**

#### 1-3-1-2-6 1ステップ液液抽出操作によるデルゴシチニブの除去

試料溶解溶媒に用いる水系溶媒及び抽出に用いる有機溶媒のスクリーニング結果より、水系溶媒に 6 mol/L 塩酸または 8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒に *n*-ヘキサンを使用した時、クロマトグラム及びベンゼンの添加回収率が良好であり、経済性及び操作性に優れた HPLC-UV 操作条件を変更する必要なく、微量ベンゼンを定量可能であると示唆された。これらの溶媒を用いた 1 ステップ液液抽出操作において、試料溶液からデルゴシチニブが除去されているか確認するために、10 ppm 相当のデルゴシチニブを溶解させたデルゴシチニブ溶出位置確認試料溶液を調製し、本クロマト上でのデルゴシチニブの溶出位置を確認した。デルゴシチニブは *n*-ヘキサンに溶解しないため、試料溶解溶媒として水/アセトニトリル混液 (1 : 1) を用いた。得られたクロマトグラムを Figure 1-10 に示す。その結果、1 ステップ液液抽出の水系溶媒に 6 mol/L 塩酸または 8 mol/L 水酸化カリウム溶液、有機溶媒に *n*-ヘキサンを使用して調製した試料溶液のクロマトグラムには、デルゴシチニブのピークは認められず、1 ステップ液液抽出によってデルゴシチニブが水層へ取り除かれていることが示唆された。



**Figure 1-10 HPLC chromatograms of the solution for acetonitrile/water (1 : 1), the solution for delgocitinib at 10 ppm diluted by acetonitrile/water (1 : 1), the sample solution spiked with benzene at 10 ppm using *n*-hexane and 6 mol/L hydrochloric acid and the sample solution spiked with benzene at 10 ppm using *n*-hexane and 8 mol/L potassium hydroxide**

### 1-3-1-3 1ステップ液液抽出-HPLC-UV法による微量ベンゼンの定量分析条件

1-3-1-2に示したスクリーニング結果より、有機溶媒に *n*-ヘキサン、水系溶媒に 6 mol/L 塩酸または 8 mol/L 水酸化カリウム溶液を使用する小スケールでの1ステップ液液抽出法により、ベンゼンの大部分を有機層に抽出可能であることが確認された。本結果は *n*-ヘキサンの以下の特性によるものと考えられた。

1. *n*-ヘキサンが無極性溶媒であり、水への溶解度が著しく低かったこと。
2. *n*-ヘキサンとベンゼンの比誘電率の差が小さく、親和性が高かったこと。
3. *n*-ヘキサンが室温で容易に揮発することなく、溶媒としての操作性に優れていたこと。
4. *n*-ヘキサンの比誘電率が非常に小さく、有機層に抽出されるベンゼン以外の夾雑成分が極めて少なかったこと。

以上より、微量ベンゼンを効率的に濃縮可能な1ステップ液液抽出条件につき、ベンゼンを抽出する有機溶媒に *n*-ヘキサン、試料溶解溶媒に用いる水系溶媒にはベンゼンの添加回収率が若干優れていた 8 mol/L 水酸化カリウム溶液を選択し、Figure 1-3に示すと通りの試料溶液の調製スキームを作成した。

HPLC-UVの操作条件に関しては、ベンゼンの抽出に用いる有機溶媒に *n*-ヘキサンを使用することで、スクリーニング時に使用した HPLC 操作条件にて微量ベンゼンを分析可能であっ

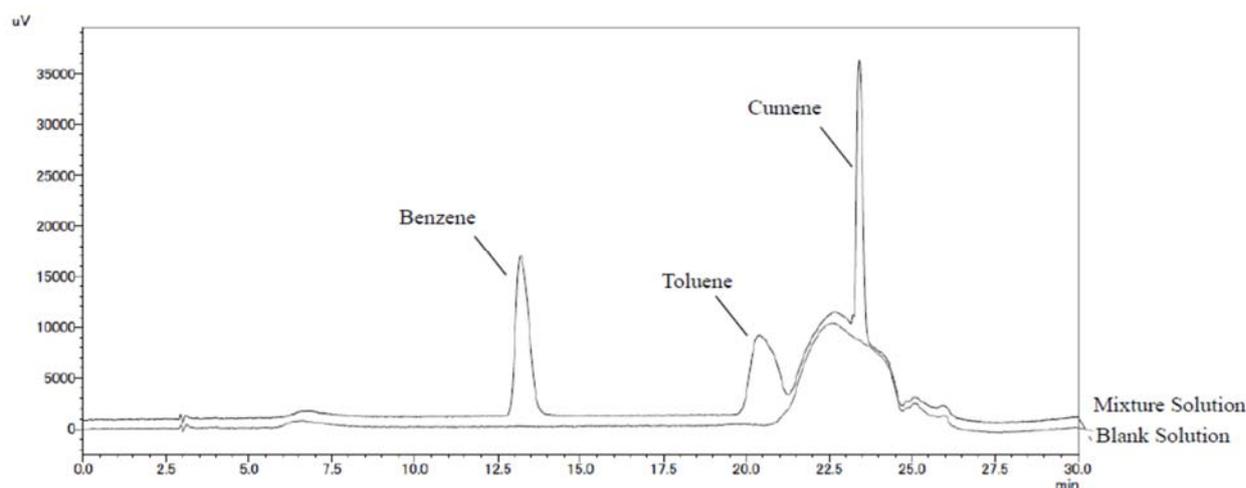
たことから、経済性及び操作性に優れた Table 1-1 に示す HPLC 操作条件を採用した。ベンゼンの定量値については、試料溶液とは別に 0.5 ppm 相当のベンゼンを含有する標準溶液を *n*-ヘキサンを用いて調製し、試料溶液と標準溶液から得られるベンゼンのピーク面積を比較することによって算出することにした。

### 1-3-2 分析法バリデーション

1-3-1 で条件設定した 1 ステップ液液抽出-HPLC-UV 法による微量ベンゼンの定量分析条件（以下、「本分析法」とする）について、ICH Q2A（分析法バリデーションに関するテキスト（実施項目）について）<sup>31</sup> 及び ICH Q2B（分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）について）<sup>32</sup> に従い、分析法バリデーションを実施し、特異性、真度、併行精度、定量限界、検出限界、直線性及びシステム適合性について評価した。

#### 1-3-2-1 特異性

本分析法の検出器には UV を用いていることから、特異性については、UV 吸収を有する溶媒のうちベンゼンの定量時に共存する可能性の高い溶媒として、トルエン及びクメンとの分離を確認することで評価した。トルエンは医薬品の製造工程で汎用される溶媒であるが、不純物として微量のベンゼンを含有することが知られている。クメンについては、不純物としてベンゼンを含有するアセトン中に、ベンゼン同様に含有される不純物であり、アセトンは医薬品の製造工程で頻繁に使用される溶媒である。10 ppm 相当のベンゼン、トルエン及びクメンの混合溶液である特異性評価用試料溶液及びブランク溶液（*n*-ヘキサン）の重ね書きクロマトグラムを Figure 1-11 に示す。その結果、トルエン及びクメンのピークは、ベンゼンと明確に分離しており、また、ブランク溶液にはベンゼンの定量を妨害するピークは認められなかった。

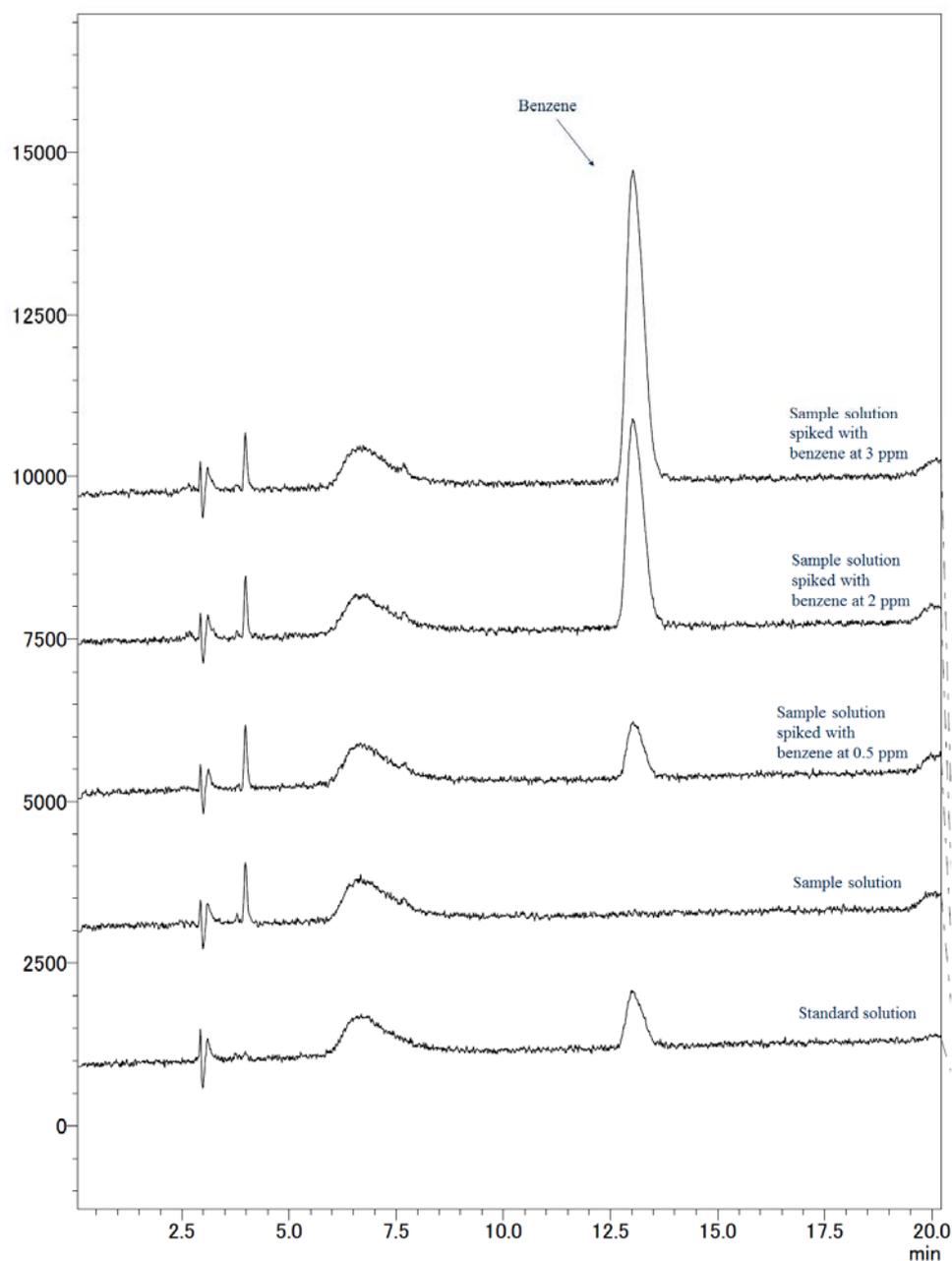


**Figure 1-11 HPLC chromatograms of the blank solution (*n*-hexane) and the mixture solution included benzene, toluene and cumene at 10 ppm**

(Fig. 4 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)

### 1-3-2-2 真度及び併行精度

本分析法の真度及び併行精度については、デルゴシチニブに 0.5, 2 及び 3 ppm 相当のベンゼンを添加した真度及び併行精度評価用試料溶液、本法に従い調製した試料溶液及び標準溶液を調製し、ベンゼンの添加回収率及び添加回収率の相対標準偏差を求めることで評価した。0.5, 2 及び 3 ppm 相当のベンゼンを添加した真度及び併行精度評価用試料溶液、本法に従い調製した試料溶液及び標準溶液の重ね書きクロマトグラムを Figure 1-12 に、真度及び併行精度の結果の一覧表を Table 1-5 に示す。その結果、いずれのクロマトグラムもベンゼンのピークを妨害する夾雑成分は認められず、良好なクロマトグラムが得られた。また、ベンゼンの添加回収率は、0.5 ppm 添加では 96.9~99.6% (平均値 98.4%)、2 ppm 添加では 95.1~97.2% (平均値 95.9%)、3 ppm 添加では 93.3~98.2% (平均値 95.0%) であり (判定基準：各水準の添加回収率 80.0~120.0%)、添加回収率の相対標準偏差は、各濃度では 1.2~2.9% (判定基準：各水準の添加回収率の相対標準偏差 5.0%以下) であった。



**Figure 1-12 HPLC chromatograms of the standard solution, the sample solution and the sample solutions spiked with benzene at 0.5, 2 and 3 ppm**

(Modified Fig. 5 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)

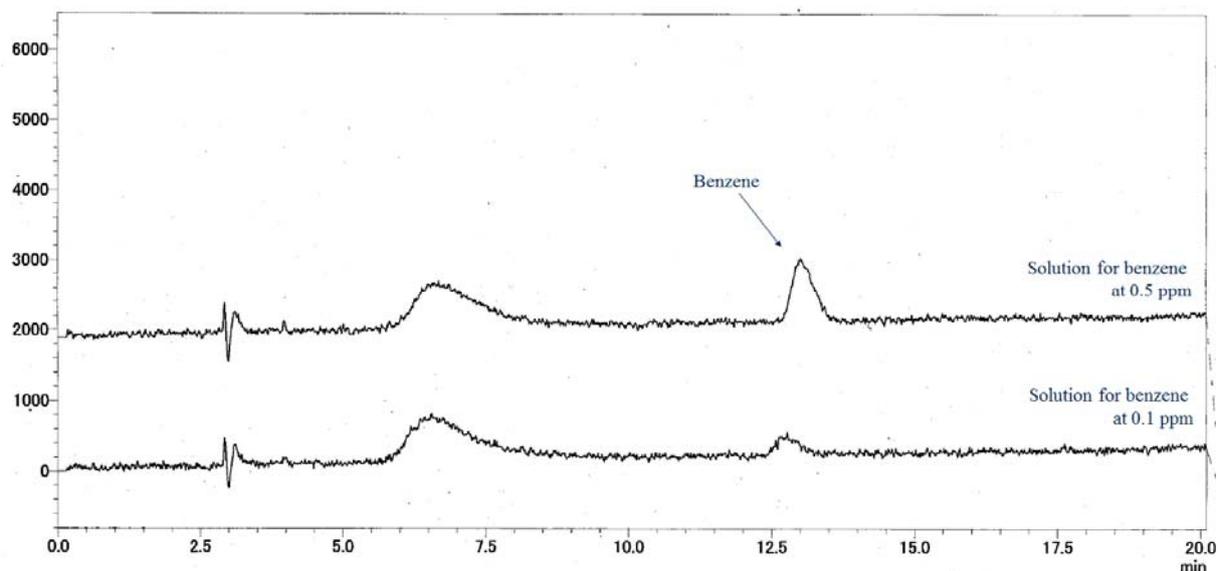
**Table 1-5 Summary of accuracy and precision for the validation study**

Replicate	Peak area of benzene				Recovery (%) of spiked benzene		
	Weight of benzene (g)				0.5 ppm	2 ppm	3 ppm
	Standard	0.5 ppm	2 ppm	3 ppm			
1	22435	22971	88635	130503	98.6	95.1	93.3
	0.38489	0.39987	0.39987	0.39987			
2	23566	25297	96918	142456	99.6	95.4	93.4
	0.39829	0.42946	0.42946	0.42946			
3	22730	21388	85825	130047	96.9	97.2	98.2
	0.40014	0.38858	0.38858	0.38858			
<b>Average (%)</b>					98.4	95.9	95.0
<b>RSD (%)</b>					1.4	1.2	2.9
<b>95% lower limit (%)</b>					95.0	93.1	88.0
<b>95% upper limit (%)</b>					101.8	98.7	102.0
<b>Acceptance criteria</b>					Recovery (%): 80.0 – 120.0 RSD (%): Not more than 5.0		

(Modified Table 3 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)

### 1-3-2-3 定量限界及び検出限界

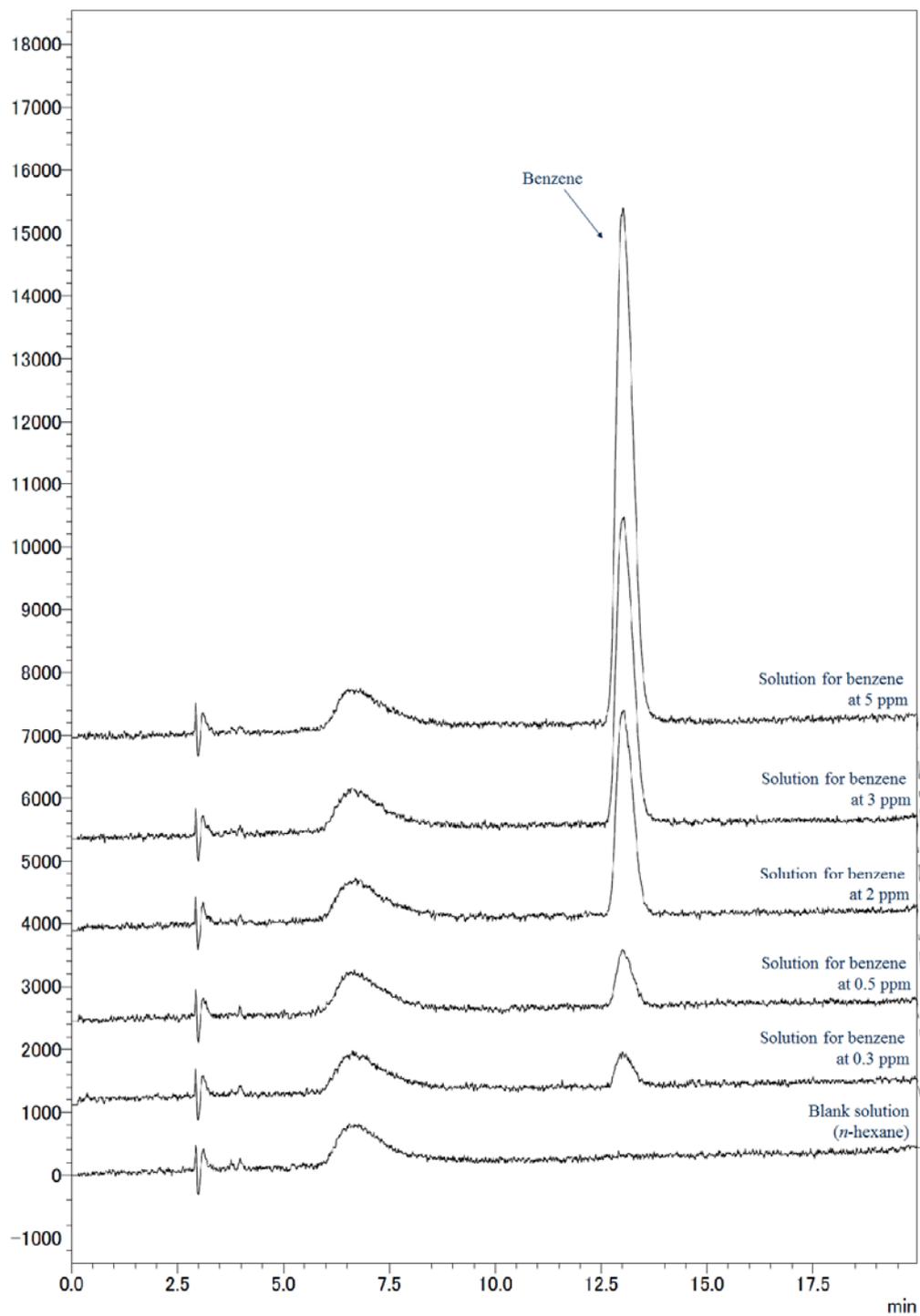
本分析法の定量限界及び検出限界については、ベンゼン濃度が 0.5 ppm 相当である定量限界評価用試料溶液及びベンゼン濃度が 0.1 ppm 相当である検出限界評価用試料溶液を調製し、ベンゼンのピークのシグナル-ノイズ (Signal-Noise : S/N) 比を求めることで評価した。定量限界評価用試料溶液及び検出限界評価用試料溶液の重ね書きクロマトグラムを Figure 1-13 に示す。その結果、ベンゼン濃度 : 0.5 ppm のピークの S/N 比は 11.4 (判定基準 : S/N 比 10 以上)、ベンゼン濃度 : 0.1 ppm のピークの S/N 比は 3.9 (判定基準 : S/N 比 2 以上) であった。以上より、本分析法のベンゼンの定量限界を 0.5 ppm、検出限界を 0.1 ppm とした。



**Figure 1-13 HPLC chromatograms of the solution for benzene at 0.5 ppm and the solution for benzene at 0.1 ppm**

#### 1-3-2-4 直線性

本分析法の直線性については、ベンゼン濃度が 0.3、0.5、2、3 及び 5 ppm 相当である直線性評価用試料溶液をそれぞれ調製し、各溶液中のベンゼンの濃度に対するベンゼンのピーク面積について回帰分析を行い、評価した。直線性評価用試料溶液及びブランク溶液のクロマトグラムを Figure 1-14 に、回帰分析の結果の一覧表を Table 1-6 に、ベンゼン濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) に対するベンゼンのピーク面積の回帰直線を Figure 1-15 に、ベンゼン濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) に対する残差プロットを Figure 1-16 に示す。その結果、いずれのクロマトグラムもベンゼンのピークを妨害する夾雑成分は認められず、良好なクロマトグラムが得られた。また、相関係数は 1.00 であった (判定基準: 相関係数 0.99 以上)。さらに、Y 切片の 95%信頼区間にゼロを含み、残差に偏りは認められなかったことから、本直線は原点付近を通る良好な直線であると示唆された。

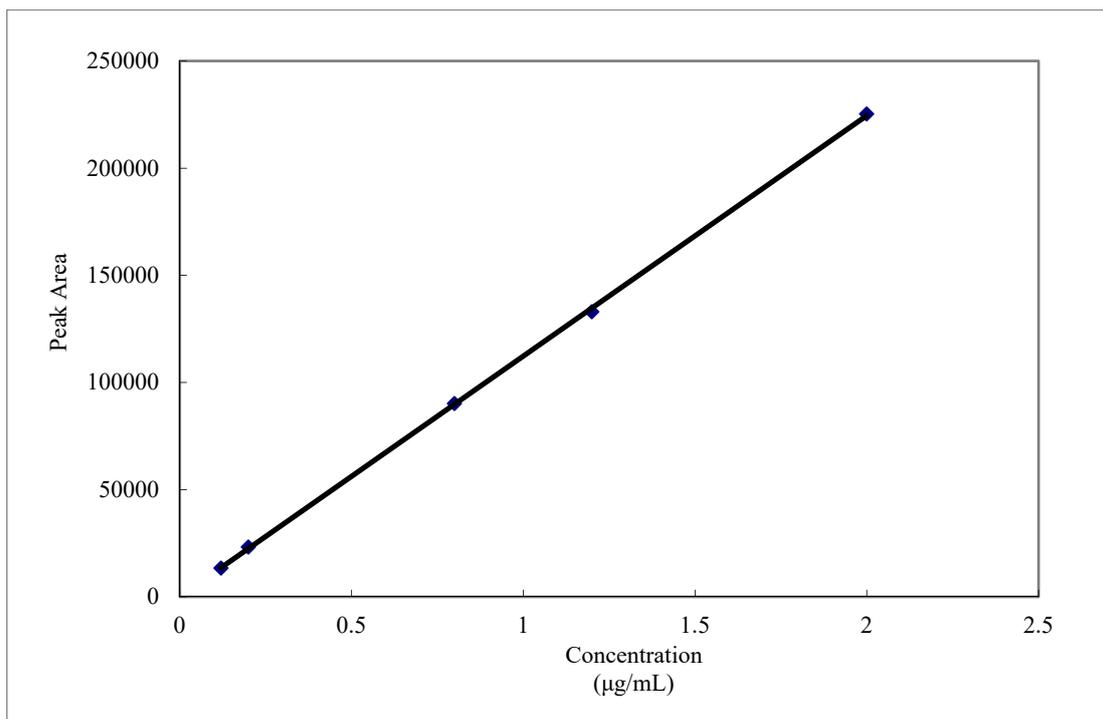


**Figure 1-14 HPLC chromatograms of the blank solution (n-hexane) and the solutions for benzene at 0.3, 0.5, 2, 3 and 5 ppm**

**Table 1-6 Summary of linearity for the validation study**

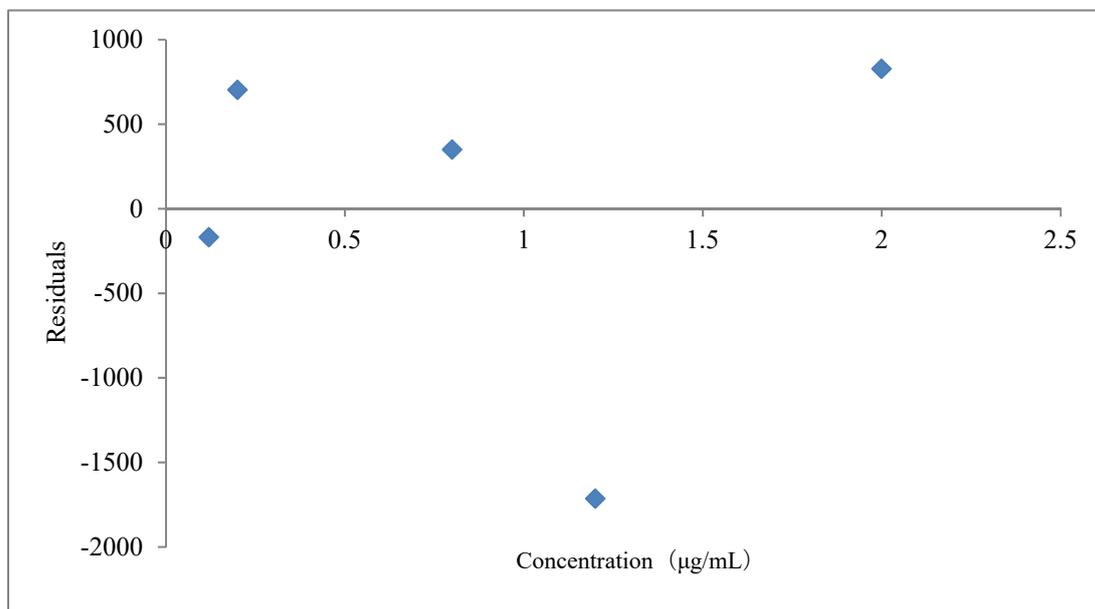
<b>Concentration (ppm)</b>	<b>Concentration (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Peak area of benzene</b>
0.3	0.11996	13400
0.5	0.19994	23246
2	0.79974	90200
3	1.1996	133006
5	1.9994	225298
<b>r</b> <b>(coefficient of correlation)</b>		1.00
<b>Slope</b>		112216
<b>Y-intercept</b>		106.30
<b>95% confidence interval of</b> <b>Y-intercept</b>		$-2.6069 \times 10^3 \leq Y \leq 2.8195 \times 10^3$
<b>Acceptance criteria</b>		$r \geq 0.99$

(Table 4 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)



**Figure 1-15** Linear plot for benzene concentrations ranging from 0.12 to 2 µg/mL (equivalent to 0.3 to 5 ppm in the delgocitinib)

(Fig. 6 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)



**Figure 1-16** Residual plot for benzene concentrations ranging from 0.12 to 2 µg/mL (equivalent to 0.3 to 5 ppm in the delgocitinib)

(Fig. 6 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)

### 1-3-2-5 システム適合性

本分析法に従い、標準溶液を分析したところ、ベンゼンのピークのシンメトリー係数は 1.2 であり、理論段数は 5509 であった。また、標準溶液を 6 回連続で分析したところ、ベンゼンの保持時間及びピーク面積の相対標準偏差はそれぞれ 0.2% 及び 3.4% であった (Table 1-7)。以上より、ベンゼンのピーク形状及びシステムの再現性について、いずれも良好であることが確認された。

Table 1-7 Summary of system suitability for the validation study

Replicate	Retention time of benzene (min.)	Peak area of benzene
1	12.978	21602
2	13.028	22248
3	13.012	23466
4	12.974	23506
5	13.007	22178
6	12.990	22435
Average	12.998	22573
RSD (%)	0.2	3.4

### 1-4 結論

デルゴシチニブから微量ベンゼンの分離濃縮を可能とする分析前処理法について、水系溶媒と有機溶媒の組み合わせをスクリーニングにより検討し、ベンゼンを抽出する有機溶媒に *n*-ヘキサン、試料溶解溶媒に用いる水系溶媒に 6 mol/L 塩酸または 8 mol/L 水酸化カリウム溶液を使用して、小スケールでの 1 ステップ液液抽出法を適用することにより、ベンゼンを効率的に分離濃縮可能であることが確認された。本スクリーニング結果に基づき、ベンゼンを抽出する有機溶媒に *n*-ヘキサン、試料溶解溶媒に用いる水系溶媒に 8 mol/L 水酸化カリウム溶液を選択し、液液抽出-HPLC-UV 法によるデルゴシチニブ中の微量ベンゼンの定量分析法を作成した。次いで、本分析条件について ICH Q2A (分析法バリデーションに関するテキスト (実施項目) について)<sup>31</sup> 及び ICH Q2B (分析法バリデーションに関するテキスト (実施方法) について)<sup>32</sup> に従い、分析法バリデーションを実施し、特異性、真度、併行精度、定量限界、検出限界、直線性及びシステム適合性について評価したところ、本分析法の妥当性が確認された。

## 1-5 小括

本分析法により、あらゆる製薬関連施設が所有していると考えられる汎用的な分析機器である HPLC-UV を用いて、デルゴシチニブ中の微量ベンゼンを定量分析可能であることが示された。本分析法の分析前処理については、煩雑な操作を必要とする従来の固相抽出法ではなく、操作性に優れた簡便な 1 ステップ液液抽出法を適用可能であり、HPLC-UV の操作条件については、汎用性の高い ODS カラムや、移動相に添加剤を使用しない水及びアセトニトリルを使用するという、経済性及び操作性に優れた操作条件を適用可能であった。本分析法のバリデーション結果はいずれも良好であったが、上記のように分析条件の操作性を向上させたことが、分析結果の質の向上にもつながったと示唆された。以上より、本分析法は微量ベンゼンの定量分析法として、生産性の高い分析法であると考えられた。

序章でも述べたように、微量ベンゼンの定量分析については、USP/EP 法を適用できない場合は、GC-MS や SPME 等の高価で高度な技術を使用して分析しなければならなかった。しかし、微量ベンゼンの定量分析法として、分析の質を落とさずに低コスト化を実現した生産性の高い本分析条件を適用できたことは、「品質の良い製品を安価に消費者のもとに届けるために、あらゆる製造プロセスを最適化していく」という化学工学の概念にも合致しており、大きな意義を有していると考えられた。

## 第2章 米国薬局方 (USP) 及び欧州薬局方 (EP) で提案されている微量ベンゼンの分析法との比較

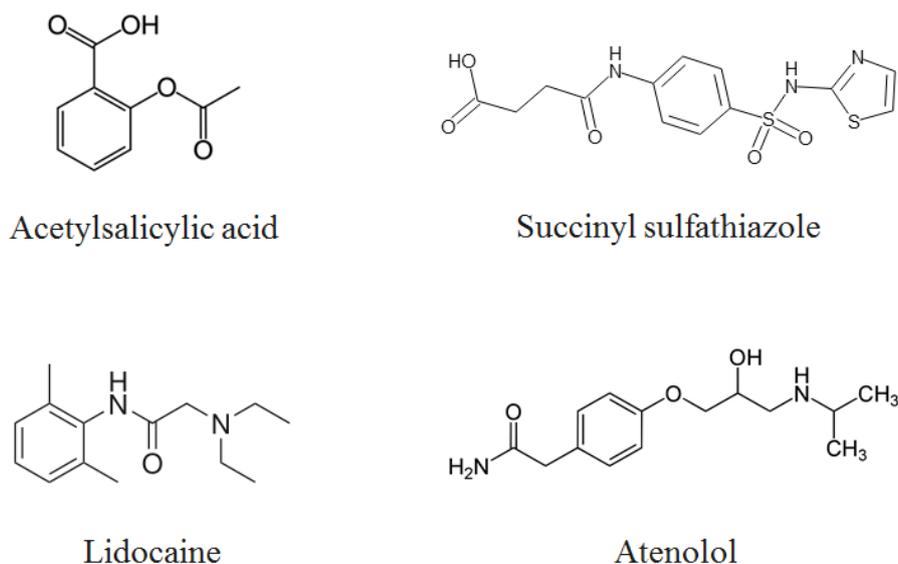
### 2-1 緒言

序章でも述べたように、微量ベンゼンの定量分析法については、米国薬局方 (USP) の Chapter 467 “Residual Solvents”<sup>17</sup> 及び欧州薬局方 (EP) の Chapter 2.4.24 “Identification and Control of Residual Solvents”<sup>18</sup> 内で、ヘッドスペース GC によって、ICH Q3C (医薬品の残留溶媒ガイドライン)<sup>12</sup> において規定されている残留溶媒の一斉分析法が提案されている (USP/EP 法)。しかし、USP/EP 法は以下の問題を有している。

1. 多くの場合で試料溶液中の試料が対象溶媒の定量を妨害する (マトリックス効果)。  
(ベンゼンは濃度限度値が他の残留溶媒と比べて極めて低く、マトリックス効果の影響を受けやすい。)
2. 試料溶液の調製に制限がある。  
(10 mg/mL で水に溶解させる、または 50 mg/mL でジメチルスルホキシドあるいはジメチルホルムアミドに溶解させる必要がある。)
3. 分析時間が長い。  
(ヘッドスペースバイアルの加温に 60 分、昇温プログラムに 60 分を要する。)

そこで本章では、第 1 章で開発した分析法 (本分析法) と USP/EP 法を比較し、本分析法の有用性を検証した。

また、微量ベンゼンの定量分析における液液抽出-HPLC-UV 法の汎用性を確認するために、他の医薬品原薬に本分析法を適用可能か検証した。本分析法を他の医薬品原薬に適用するには、試料を高濃度で水溶液に溶解させる必要があるが、Paul らの報告によると、市販薬の半数以上の酸解離定数 (pKa) は 4 以下もしくは 9 以上であり<sup>49</sup>、また、David らの報告によると、ほとんどの医薬品原薬が 1 つ以上の酸または塩基の官能基を有していることから<sup>50</sup>、本分析法の試料溶解溶媒として提案した水系溶媒である強塩基の 8 mol/L 水酸化カリウム溶液または強酸の 6 mol/L 塩酸について、多くの医薬品原薬がいずれかの水溶液には高濃度で溶解可能であることが想定された。検証に使用する医薬品原薬は、Figure 2-1 に示す通り、アセチルサリチル酸、スクシニルスルファチアゾール、リドカイン及びアテノロールを選択した。



**Figure 2-1 Active pharmaceutical ingredients used the feasibility study of trace quantitative analysis for benzene described in Chapter 1**

## 2-2 実験材料及び実験方法

### 2-2-1 試薬及び試料

8 mol/L 水酸化カリウム溶液 (容量分析用)、6 mol/L 塩酸 (容量分析用)、*n*-ヘキサン (特級)、アセトニトリル (HPLC 用)、リドカイン (特級) 及びアセチルサリチル酸 (特級) は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。蒸留水 (HPLC 用) はナカライテスク株式会社より購入した。ベンゼン (有機合成用) は関東化学株式会社から購入した。ジメチルスルホキシド (特級) 及びアテノロール (研究用) は東京化成工業株式会社から購入した。スクシニルスルファチアゾール (研究用) はシグマアルドリッチジャパンから購入した。

### 2-2-2 測定機器

HPLC は LC-10 シリーズ (オートインジェクター: SIL-10A、バイナリーポンプ: LC-10AD、デガッサー: DGU-14A、カラムオーブン: CTO-10A、検出器: SPD-M10A または SPD-M20A にて構成、いずれも株式会社島津製作所) を用いて測定した。LC カラムは XBridge Shield RP18 (4.6 mm×25 cm、3.5 μm、日本ウォーターズ株式会社) を使用した。ヘッドスペース GC は島津の GC-2010 シリーズ (本体: GC-2010 (株式会社島津製作所)、ヘッドスペース部: TurboMatrix HS-40 (株式会社パーキンエルマージャパン) にて構成) を用いて測定した。GC カラムは DB-624 (0.32 mm×30 m、1.8 μm、アジレント・テクノロジー株式会社) を使用した。セミマイクロ天秤は AT261 (メトラー・トレド株式会社) を使用した。

### 2-2-3 HPLC の操作条件

1-2-3 HPLC の操作条件を参照とする。

### 2-2-4 USP/EP 法におけるヘッドスペース GC の操作条件

ヘッドスペース部については、バイアル内平衡温度を 80°C、バイアル内平衡時間を 60 分、注入ライン温度を 85°C、加圧時間を 0.5 分、注入時間を 0.2 分とした。ガスクロマトグラフ部については、注入口温度を 140°C、検出器温度を 250°C とし、検出器には水素炎イオン化検出器 (Flame ionization detector : FID) を用いた。昇温プログラムは、40°C を 20 分間、その後、毎分 10°C で 240°C まで昇温し、240°C を 20 分間保持した。スプリット比を 1 : 5、流量 (線速度) を毎秒 35 cm とし、キャリアーガスにはヘリウムを用いた。ヘッドスペース GC の操作条件を Table 2-1 に示す。

Table 2-1 Operating condition of head space GC

<b>Detector</b>	A hydrogen flame-ionization detector		
<b>Column</b>	DB-624 (0.32 mm×30 m, 1.8 μm)		
<b>Column temperature</b>	<b>Time (min.)</b>	<b>Speed</b>	<b>Temperature</b>
	0 - 20	—	40°C
	20 - 40	10°C/min.	40°C → 240°C
	40 - 60	—	240°C
<b>Injection port temperature</b>	140°C	<b>Detector temperature</b>	250°C
<b>Carrier gas</b>	Helium	<b>Split ratio</b>	1 : 5
<b>Flow rate (Linear velocity)</b>	35 cm/sec.	<b>Equilibration temperature</b>	80°C
<b>Equilibration time</b>	60 min.	<b>Transfer-line temperature</b>	85°C
<b>Pressurization time</b>	0.5 min.	<b>Injection time of sample</b>	0.2 min.

### 2-2-5 液液抽出-HPLC-UV 法における感度比較の際に使用した試料溶液の調製方法

HPLC 感度評価用試料溶液 (2 ppm 相当) : ベンゼン約 0.4 g を精密に量り, *n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とする。この液 2.5 mL を正確に量り, *n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL

とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 2 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 10 mL とし、HPLC 感度評価用試料溶液 (2 ppm 相当) とした。

HPLC 感度評価用試料溶液 (0.5 ppm 相当) : ベンゼン約 0.4 g を精密に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とする。この液 2.5 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 20 mL とし、HPLC 感度評価用試料溶液 (0.5 ppm 相当) とした。

HPLC 感度評価用試料溶液 (0.1 ppm 相当) : ベンゼン約 0.4 g を精密に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とする。この液 2.5 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とし、HPLC 感度評価用試料溶液 (0.1 ppm 相当) とした。

#### 2-2-6 USP/EP 法 (ヘッドスペース GC 法) における感度比較の際に使用した試料溶液の調製方法

ヘッドスペース GC 感度評価用試料溶液 (2 ppm 相当) : ベンゼン約 0.1 g を精密に量り、ジメチルスルホキシドを加えて正確に 100 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とする。この液 2 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とし、ヘッドスペース GC 感度評価用試料溶液 (2 ppm 相当) とした。

ヘッドスペース GC 感度評価用試料溶液 (0.5 ppm 相当) : ベンゼン約 0.1 g を精密に量り、ジメチルスルホキシドを加えて正確に 100 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とする。この液 2 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、水を加えて正確に 20 mL とし、ヘッドスペース GC 感度評価用試料溶液 (0.5 ppm 相当) とした。

ヘッドスペース GC 感度評価用試料溶液 (0.1 ppm 相当) : ベンゼン約 0.1 g を精密に量り、ジメチルスルホキシドを加えて正確に 100 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とする。この液 2 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、水を加えて正確に 20 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、水を加えて正確に 25 mL とし、ヘッドスペース GC 感度評価用試料溶液 (0.1 ppm 相当) とした。

各試料溶液は 20 mL ヘッドスペース用バイアルにそれぞれ正確に 2 mL を量り取り、測定に供した。

#### 2-2-7 液液抽出-HPLC-UV 法の汎用性の確認の際に使用した試料溶液の調製方法

アセチルサリチル酸試料溶液 : アセチルサリチル酸約 0.4 g を精密に量り、8 mol/L 水酸化カリウム溶液 5 mL 及び *n*-ヘキサン 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層

し、上層（有機層）をアセチルサリチル酸試料溶液とした。

スクシニルスルファチアゾール試料溶液：スクシニルスルファチアゾール約 0.4 g を精密に量り、8 mol/L 水酸化カリウム溶液 5 mL 及び *n*-ヘキサン 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層し、上層（有機層）をスクシニルスルファチアゾール試料溶液とした。

リドカイン試料溶液：リドカイン約 0.4 g を精密に量り、6 mol/L 塩酸 5 mL 及び *n*-ヘキサン 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層し、上層（有機層）をリドカイン試料溶液とした。

アテノロール試料溶液：アテノロール約 0.4 g を精密に量り、6 mol/L 塩酸 5 mL 及び *n*-ヘキサン 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層し、上層（有機層）をアテノロール試料溶液とした。

汎用性確認用ベンゼン添加原液：ベンゼン約 0.4 g を精密に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とする。この液 2.5 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 20 mL とし、この液を汎用性確認用ベンゼン添加原液とした。

ベンゼン添加アセチルサリチル酸試料溶液：アセチルサリチル酸約 0.4 g を精密に量り、8 mol/L 水酸化カリウム溶液 5 mL 及び汎用性確認用ベンゼン添加原液 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層し、上層（有機層）をベンゼン添加アセチルサリチル酸試料溶液とした。

ベンゼン添加スクシニルスルファチアゾール試料溶液：スクシニルスルファチアゾール約 0.4 g を精密に量り、8 mol/L 水酸化カリウム溶液 5 mL 及び汎用性確認用ベンゼン添加原液 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層し、上層（有機層）をベンゼン添加スクシニルスルファチアゾール試料溶液とした。

ベンゼン添加リドカイン試料溶液：リドカイン約 0.4 g を精密に量り、6 mol/L 塩酸 5 mL 及び汎用性確認用ベンゼン添加原液 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層し、上層（有機層）をベンゼン添加リドカイン試料溶液とした。

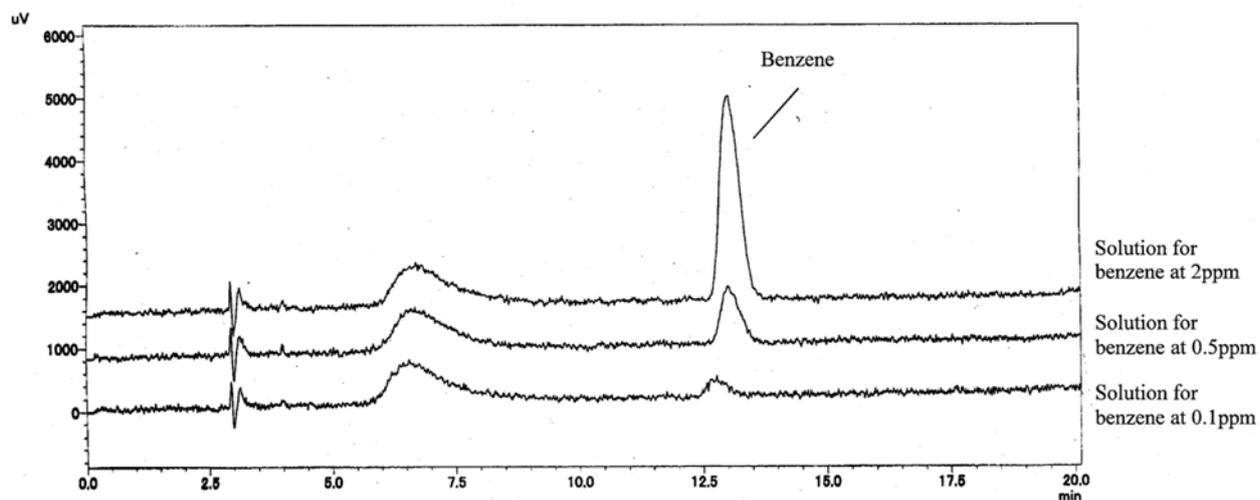
ベンゼン添加アテノロール試料溶液：アテノロール約 0.4 g を精密に量り、6 mol/L 塩酸 5 mL 及び汎用性確認用ベンゼン添加原液 1 mL を正確に加え、よく振り混ぜたのち、静置して分層し、上層（有機層）をベンゼン添加アテノロール試料溶液とした。

標準溶液：ベンゼン約 0.4 g を精密に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とする。この液 2.5 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 20 mL とし、この液を標準溶液とした。

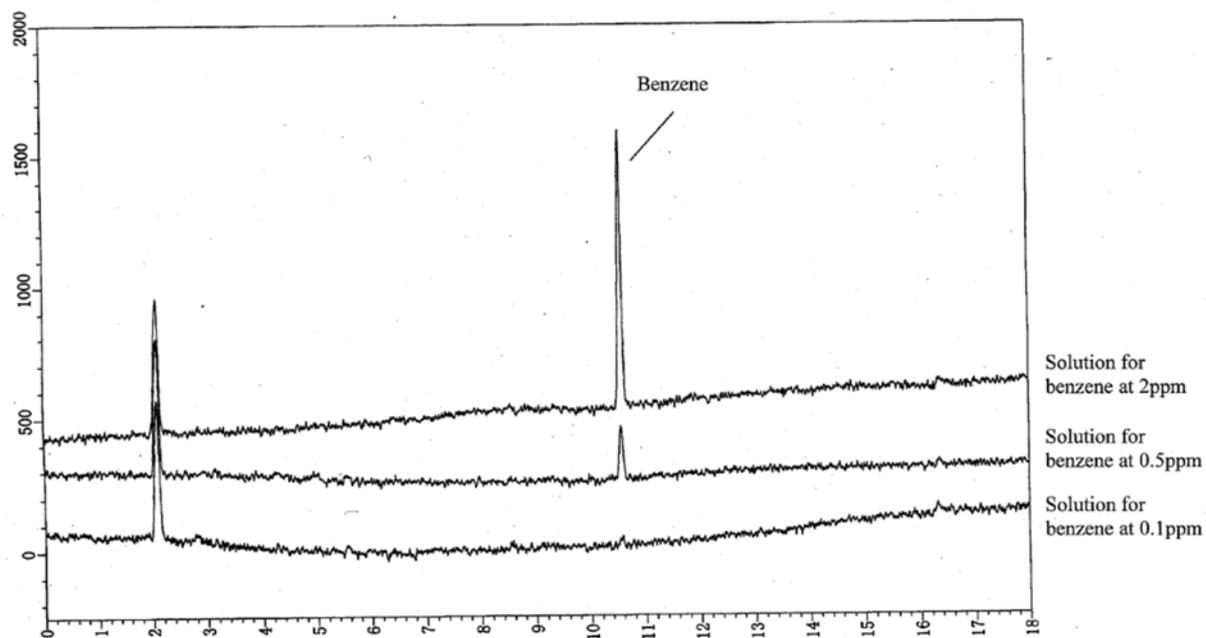
## 2-3 結果及び考察

### 2-3-1 本分析法及び USP/EP 法におけるベンゼンの感度の比較

本分析法及び USP/EP 法につき、ベンゼン濃度が 0.1、0.5 及び 2 ppm 相当になるように *n*-ヘキサンを用いて調製した、HPLC 感度評価用試料溶液及びヘッドスペース GC 感度評価用試料溶液を用いて、それぞれの分析法によるベンゼンの感度を比較した。本分析法によるクロマトグラムを Figure 2-2 に、USP/EP 法によるクロマトグラムを Figure 2-3 に示す。



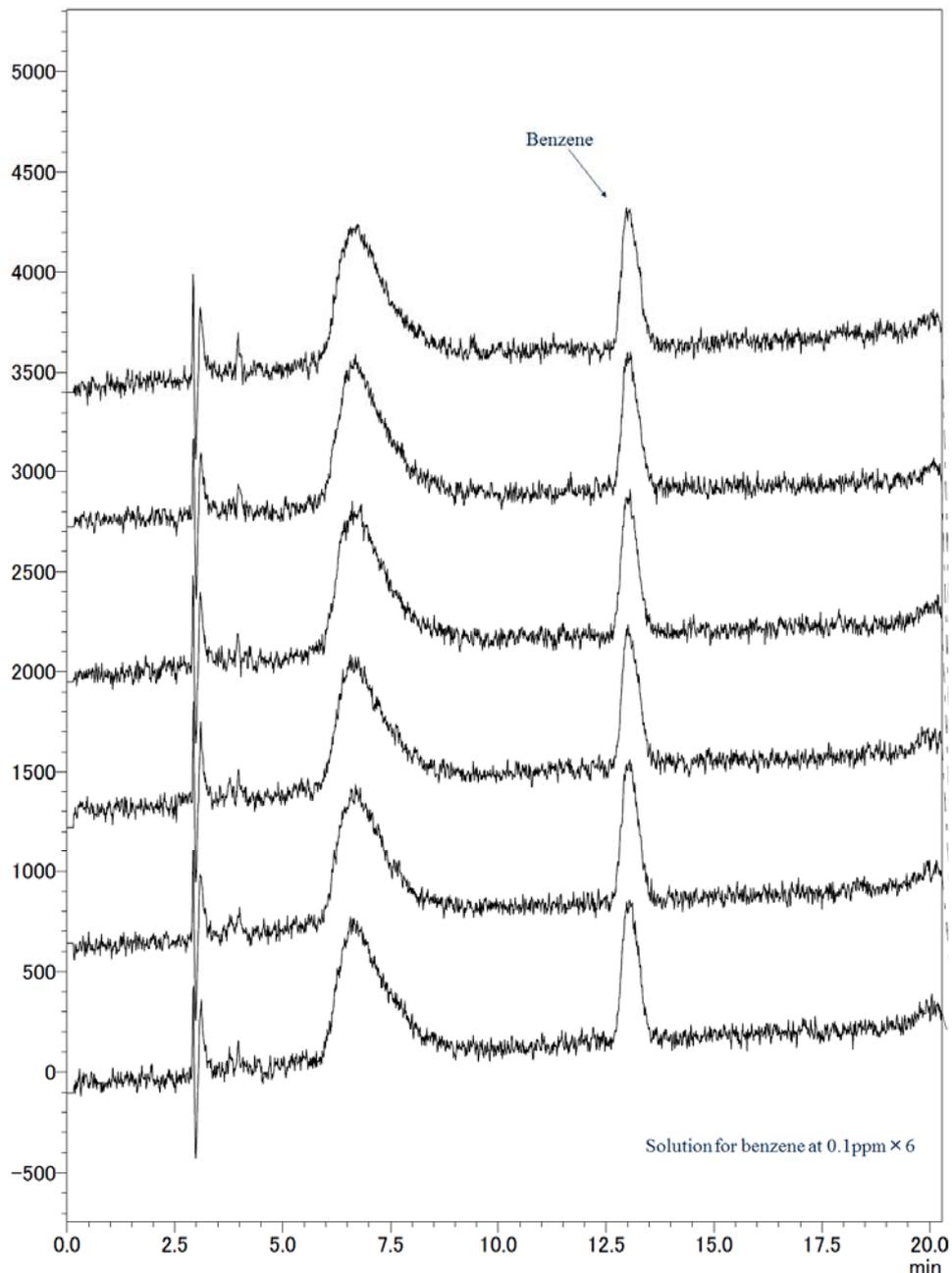
**Figure 2-2** HPLC chromatograms of the solutions for benzene at 0.1, 0.5 and 2 ppm  
(Fig. 2 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)



**Figure 2-3** GC chromatograms of the solutions for benzene at 0.1, 0.5 and 2 ppm  
(Fig. 3 in Nomura S *et al.* Development and validation of an assay method for benzene in the delgocitinib drug substance using conventional HPLC. *Chem. Pap.* 2019, 73, 673-681.)

ベンゼンのピーク形状については USP/EP 法の方が本分析法よりも良好であったが、ベンゼン濃度：0.1 ppm 相当の感度比較用試料溶液において、USP/EP 法ではベンゼンのピークが検出されていないのに対し、本分析法ではベンゼンのピークが明らかに検出されていた。したがって、本分析法は USP/EP 法よりも高い感度を有していると示唆された。

次いで、本分析法において 0.1 ppm 相当のベンゼンを再現良く検出可能であるかを確認するため、ベンゼン濃度：0.1 ppm 相当の HPLC 感度評価用試料溶液を 6 回注入した。得られたクロマトグラムを Figure 2-4 に示す。



**Figure 2-4** HPLC chromatograms of the solution for benzene at 0.1 ppm injected six times

クロマトグラムより、ベンゼン濃度：0.1 ppm 相当の HPLC 感度比較用試料溶液におけるベンゼンのピークは、6 回とも同程度のピーク高さで検出された。以上より、0.1 ppm 相当のベンゼンのピークであっても、再現良く検出されることが確認された。

### 2-3-2 微量ベンゼンの定量分析における液液抽出-HPLC-UV 法の汎用性の確認

液液抽出-HPLC-UV 法における分析条件が各種医薬品原薬の微量ベンゼンの定量分析に適用可能か、Figure 2-1 で示した医薬品原薬を用いて検証した。デルゴシチニブの pKa は 5.6 であるが、幅広い pKa の化合物に本分析条件が適用可能であることを示すため、ベンゼンが潜在的な不純物として含有されているか否かに関わらず、アセチルサリチル酸 (pKa: 3.5<sup>51</sup>)、スクシニルスルファチアゾール (pKa: 4.5<sup>52</sup>)、リドカイン (pKa: 7.9<sup>53</sup>) 及びアテノロール (pKa: 9.6<sup>54</sup>) を選択した。最初にこれらの化合物が 6 mol/L 塩酸もしくは 8 mol/L 水酸化カリウム溶液に 0.1 g/mL で溶解可能か確認した。得られた結果を Table 2-2 に示す。

**Table 2-2 Dissolution study at 0.1 g/mL in 6 mol/L hydrochloric acid and 8 mol/L potassium hydroxide for active pharmaceutical ingredients used in the feasibility study of trace quantitative analysis for benzene**

Name of active pharmaceutical ingredients	Dissolution study at 0.1 g/mL	
	6 mol/L hydrochloric acid	8 mol/L potassium hydroxide
Acetylsalicylic acid (pKa: 3.5)	insoluble	soluble
Succinyl sulfathiazole (pKa: 4.5)	insoluble	soluble
Lidocaine (pKa: 7.9)	soluble	insoluble
Atenolol (pKa: 9.6)	soluble	insoluble

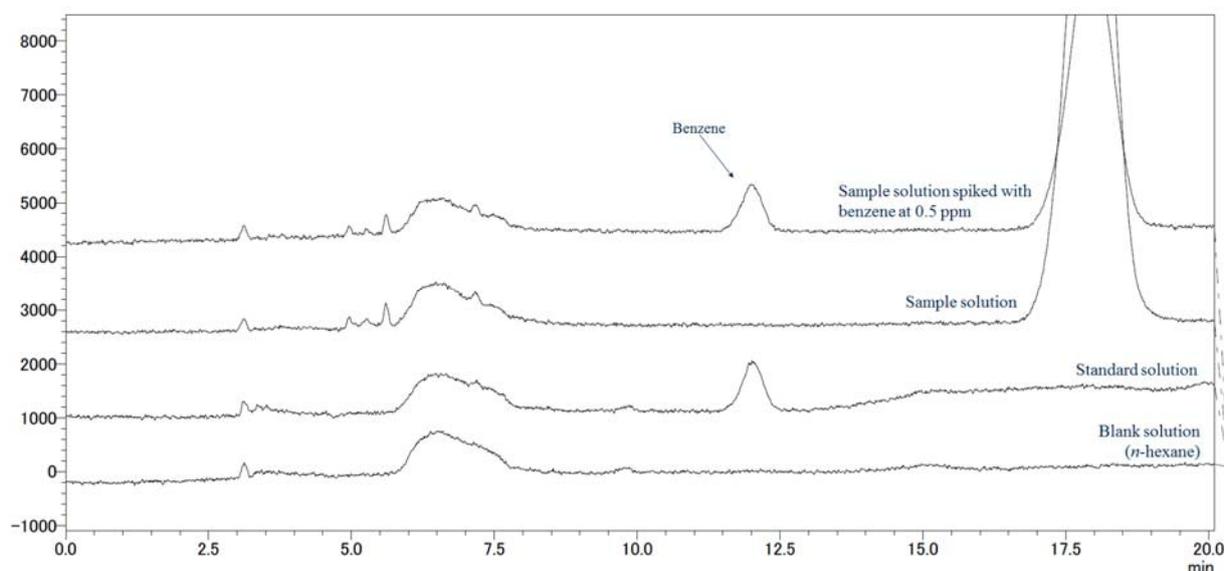
その結果、アセチルサリチル酸及びスクシニルスルファチアゾールは 8 mol/L 水酸化カリウム溶液に 0.1 g/mL で溶解可能であり、リドカイン及びアテノロールは 6 mol/L 塩酸に 0.1 g/mL で溶解可能であった。各医薬品原薬の pKa を考慮すると、これらは妥当な結果であると考えられた。以上より、アセチルサリチル酸及びスクシニルスルファチアゾールについては、試料溶解溶媒に用いる水系溶媒として 8 mol/L 水酸化カリウム溶液を選択し、リドカイン及びアテノロールについては、試料溶解溶媒に用いる水系溶媒として 6 mol/L 塩酸を選択することにした。

本分析条件の適用可否については、抽出操作時に 0.5 ppm 相当のベンゼンを添加し、調製

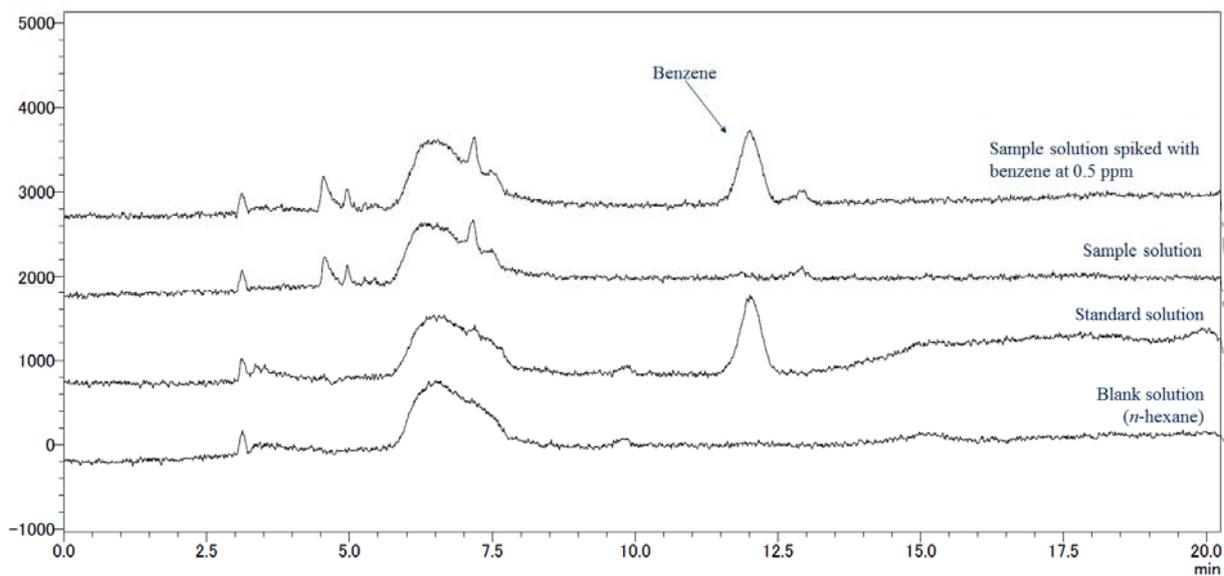
した汎用性確認用添加試料溶液から得られるベンゼンのピーク面積と、本分析法に従い調製した標準溶液（ベンゼン濃度：0.5 ppm 相当）から得られるベンゼンのピーク面積を比較することによって、ベンゼンの添加回収率を算出し、適用可否を判断することとした。各医薬品有効成分に本分析条件を適用した際のベンゼンの添加回収率の一覧表を Table 2-3 に、アセチルサリチル酸に本分析条件を適用した際のクロマトグラムを Figure 2-5 に、スクシニルスルファチアゾールに本分析条件を適用した際のクロマトグラムを Figure 2-6 に、リドカインに本分析条件を適用した際のクロマトグラムを Figure 2-7 に、アテノロールに本分析条件を適用した際のクロマトグラムを Figure 2-8 にそれぞれ示す。

**Table 2-3 Recovery of benzene in the feasibility study of trace quantitative analysis for benzene**

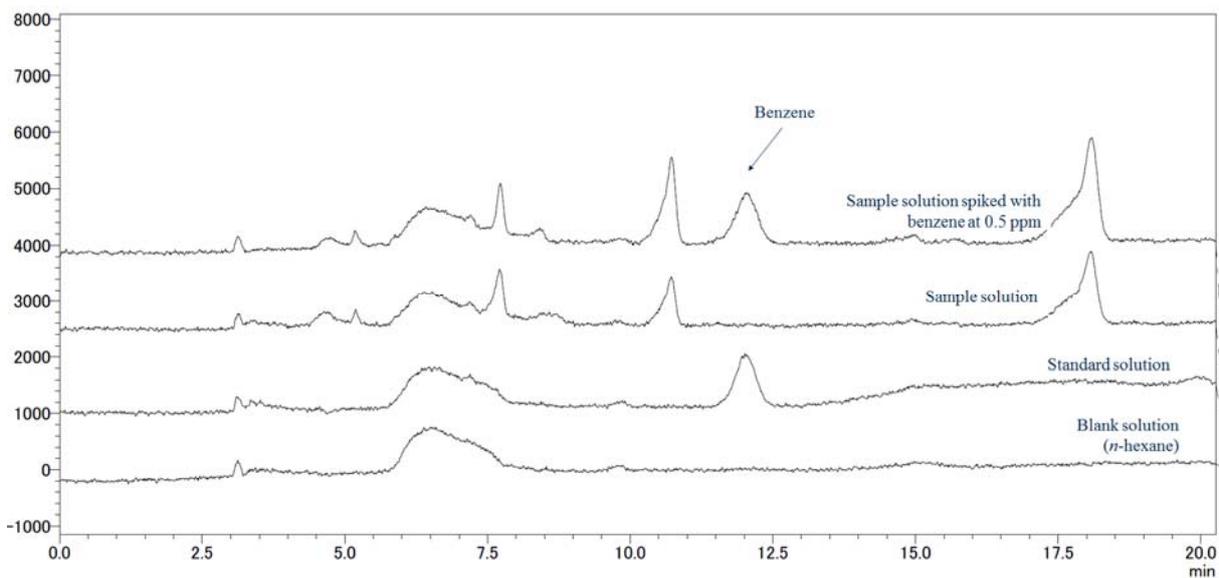
Name of active pharmaceutical ingredients	Aqueous media used in the analytical method	Recovery (%) of spiked benzene at 0.5 ppm
Acetylsalicylic acid (pKa: 3.5)	8 mol/L potassium hydroxide	98.7
Succinyl sulfathiazole (pKa: 4.5)	8 mol/L potassium hydroxide	95.9
Lidocaine (pKa: 7.9)	6 mol/L hydrochloric acid	99.0
Atenolol (pKa: 9.6)	6 mol/L hydrochloric acid	99.7



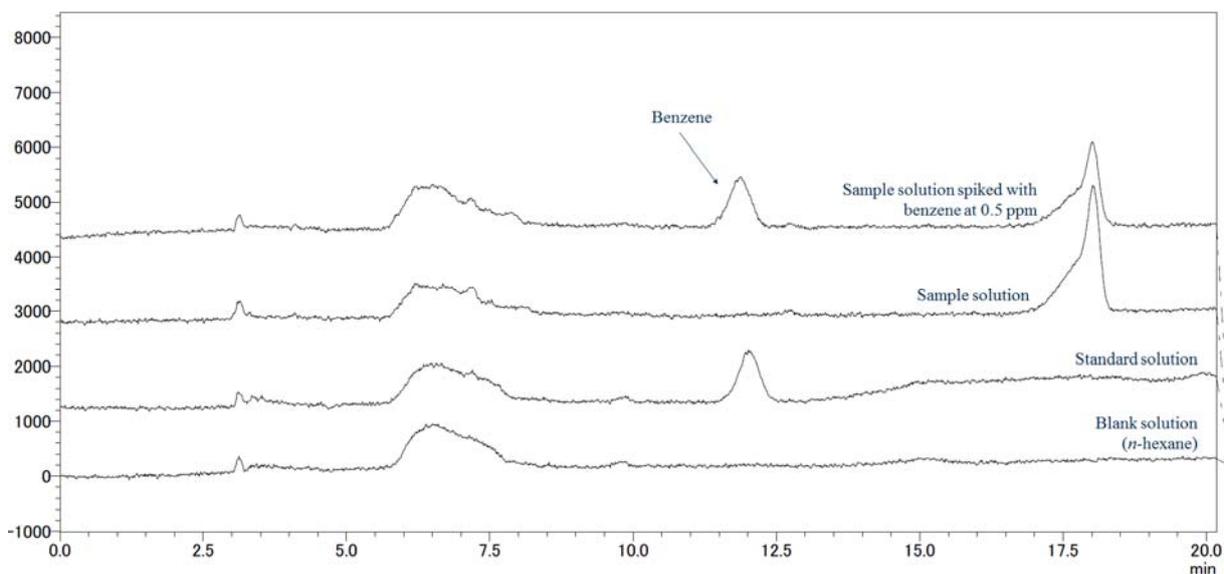
**Figure 2-5 HPLC chromatograms of the blank solution (*n*-hexane), the standard solution, the sample solution and the sample solution spiked benzene at 0.5 ppm  
(Active pharmaceutical ingredient: Acetylsalicylic acid)**



**Figure 2-6 HPLC chromatograms of the blank solution (*n*-hexane), the standard solution, the sample solution and the sample solution spiked benzene at 0.5 ppm (Active pharmaceutical ingredient: Succinyl sulfathiazole)**



**Figure 2-7 HPLC chromatograms of the blank solution (*n*-hexane), the standard solution, the sample solution and the sample solution spiked benzene at 0.5 ppm (Active pharmaceutical ingredient: Lidocaine)**



**Figure 2-8 HPLC chromatograms of the blank solution (*n*-hexane), the standard solution, the sample solution and the sample solution spiked benzene at 0.5 ppm  
(Active pharmaceutical ingredient: Atenolol)**

0.5 ppm 相当のベンゼンの添加回収率については、アセチルサリチル酸：98.7%、スクシニルスルファチアゾール：95.9%、リドカイン：99.0%及びアテノロール：99.7%となり、いずれの医薬品有効成分においても良好な結果が得られた。また、それぞれの医薬品原薬に本分析条件を適用した際の各医薬品原薬の試料溶液、ベンゼンを添加した各医薬品原薬の試料溶液及び標準溶液のクロマトグラムを確認すると、ベンゼンのピークを妨害する夾雑成分のピークは認められず、いずれも良好なクロマトグラムが得られた。以上より、微量ベンゼンの定量分析法として、液液抽出-HPLC-UV 法がアセチルサリチル酸、スクシニルスルファチアゾール、リドカイン及びアテノロールに適用可能であることが確認された。

## 2-4 結論

第 1 章で開発した液液抽出-HPLC-UV 法による微量ベンゼンの定量分析法とヘッドスペース GC による USP/EP 法の有用性を比較した。ベンゼンの感度については、本分析法の方が良好であり、0.1 ppm 相当のベンゼンを再現良く検出できることが確認された。また、本分析法の使用性については、以下の点より、USP/EP 法を上回っていると考えられた。

- ・本分析法は分析前処理を実施しているが、第 1 章で述べた通り、操作性に優れていると結論できる。したがって、試料溶液及び標準溶液の調製に要する時間は本分析法及び USP/EP 法で大きく変わらないものの、本分析法の分析装置における分析時間は USP/EP 法の 1/3 以下であった。
- ・第 1 章で述べた通り、本分析法の抽出操作によりデルゴシチニブは水層に除去されることから、USP/EP 法と異なり、本分析法においてマトリックス効果が生じることはない。

・本分析法の分析装置は、あらゆる製薬関連施設が所有していると考えられる HPLC-UV であり、USP/EP 法の分析装置であるヘッドスペース GC よりも汎用性が高い。

以上より、液液抽出-HPLC-UV 法による微量ベンゼンの定量分析法は、操作性及び経済性の側面から、ヘッドスペース GC による USP/EP 法よりも高い有用性を有していることが示唆された。

さらに、液液抽出-HPLC-UV 法については、アセチルサリチル酸、スクシニルスルファチアゾール、リドカイン及びアテノロールの微量ベンゼンの定量分析に適用可能であると確認され、幅広い pKa の医薬品有効成分に適用可能であることが示唆された。したがって、液液抽出-HPLC-UV 法は微量ベンゼンの定量分析法として、高い汎用性を有していることが示唆された。

## 2-5 小括

医薬品原薬中の微量ベンゼンを定量する際には、まずはヘッドスペース GC による USP/EP 法で実施するのが一般的であり、USP/EP 法の長所としては、ICH Q3C（医薬品の残留溶媒ガイドライン）<sup>12</sup> において規定されている残留溶媒の一斉分析を実施できるところにある。しかし、序章でも述べたように、微量ベンゼンの定量分析は、医薬品開発の流れにおいて、承認申請前の工業化検討の中で、製造工程のリスク評価の一環として実施することになるため、既に他の残留溶媒を評価済みの試料を対象に、追加で評価を行うケースが多い。したがって、微量ベンゼンの定量分析を他の残留溶媒と同時に実施する必要性は必ずしも大きくなく、今回提案した液液抽出-HPLC-UV 法による微量ベンゼンの定量分析法は、有用性及び汎用性を考慮すると、医薬品原薬中における微量ベンゼンの定量分析の第一選択になりうると考えられた。

## 総括及び今後の展望

本研究では、あらゆる製薬関連施設が所有していると考えられる汎用的な分析機器である HPLC-UV を用いて、デルゴシチニブにおける微量ベンゼンの定量分析を実現するという目的のもと、従来の分析前処理を簡略化させた 1 ステップ液液抽出法を活用した、液液抽出-HPLC-UV 法を開発した。

第 1 章では、デルゴシチニブから微量ベンゼンを効率的に分離濃縮可能とする、操作性に優れた 1 ステップ液液抽出法の分析前処理としての適用可否について、水系溶媒と有機溶媒の組み合わせをスクリーニングにより検討した。その結果、ベンゼンを抽出する有機溶媒に *n*-ヘキサン、試料溶解溶媒に用いる水系溶媒に 6 mol/L 塩酸または 8 mol/L 水酸化カリウム溶液を使用することで、1 ステップ液液抽出法により、ベンゼンを効率的に分離濃縮可能であることが確認された。次いで、スクリーニング結果より導き出した、液液抽出-HPLC-UV 法によるデルゴシチニブにおける微量ベンゼンの定量分析法について、ICH Q2A（分析法バリデーションに関するテキスト（実施項目）について）<sup>31</sup> 及び ICH Q2B（分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）について）<sup>32</sup> に従い、分析法バリデーションを実施し、特異性、真度、併行精度、定量限界、検出限界、直線性及びシステム適合性について評価した。その結果、いずれの項目も良好な結果が得られ、本分析法の妥当性が確認された。

第 2 章では、液液抽出-HPLC-UV 法による微量ベンゼンの定量分析法とヘッドスペース GC による USP/EP 法の有用性を比較した。その結果、本分析法におけるベンゼンの感度については、0.1 ppm 相当のベンゼンを再現良く検出可能であり、USP/EP 法よりも良好であることが確認された。本分析法の使用性については、分析時間の短縮化、使用する分析装置の汎用性、マトリックス効果の回避を考慮すると、USP/EP 法を上回っていると考えられた。また、液液抽出-HPLC-UV 法による微量ベンゼンの定量分析法が他の医薬品有効成分にも適用可能であることが確認された。以上より、液液抽出-HPLC-UV 法は、微量ベンゼンの定量分析法として、高い有用性及び汎用性を有していることが示唆された。

本研究により、あらゆる製薬関連施設が所有していると考えられる汎用的な分析機器である HPLC-UV を用いて、デルゴシチニブ中の微量ベンゼンを定量分析可能であることが示された。本分析法の分析前処理については、煩雑な操作を必要とする従来の固相抽出法ではなく、操作性に優れた簡便な 1 ステップ液液抽出法を適用可能であり、HPLC-UV の操作条件については、汎用性の高い ODS カラムや、移動相に添加剤を使用しない水及びアセトニトリルを使用するという、操作性及び経済性に優れた操作条件を適用可能であった。本分析法のバリデーション結果はいずれも良好であったが、分析前処理の操作性を向上させたことが、分析結果の質の向上にもつながったと示唆された。以上より、本分析法は、分析の質を落とさずに低コスト化を実現した、生産性の高い分析法であると考えられた。また、液液抽出-HPLC-UV 法による微量ベンゼンの定量分析法は、USP/EP 法と比較して、高い有用性を有しており、広範な医薬品原薬にも適用可能な汎用性を有していることから、医薬品原薬中における微量ベンゼンの定量分析の第一選択になりうると考えられた。本研究は、「安心・安全な医薬品を安価に患者に届ける」という製薬企業の使命に対して、「品質の良い製品を安価に消

費者のもとに届けるために、あらゆる製造プロセスを最適化していく」という化学工学の概念を適用し、分析化学からアプローチすることによって、従来の分析法を操作性・経済性の面で上回る、生産性の高い分析法の構築を実現したという点で、意義は大きいと考えられた。

また、液液抽出-HPLC-UV 法による微量ベンゼンの定量分析法が広範な医薬品原薬に適用可能であり、汎用性に優れていることは既に述べているが、試料溶解溶媒に用いる水系溶媒については、今回提案した 6 mol/L 塩酸または 8 mol/L 水酸化カリウム溶液中においてベンゼンが安定に存在していたことから、上記以外の強酸または強塩基、例えば、濃塩酸または濃硫酸といった強酸や、1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) または 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene (DBN) といった有機強塩基を水系溶媒に適用可能であると示唆され、本分析法は様々な試料にも応用可能であると考えられた。序章でも述べた通り、ベンゼンは毒性の強い化合物であり、様々な産業界で管理が求められていることから、応用性・生産性の高い液液抽出-HPLC-UV 法は、微量ベンゼンの定量分析法として、様々な産業界で採用可能な分析法であると考えられた。

今回提案した液液抽出-HPLC-UV 法を微量ベンゼンの定量分析法として適用できない場合として、試料があらゆる水系溶媒に不溶であること以外に、HPLC-UV 分析において、ベンゼンのピークを妨害する夾雑ピークが認められることが挙げられる。今回提案した HPLC-UV の操作条件におけるカラムは、夾雑ピークが出現した場合にベンゼンと分離する可能性が上がるように、カラム長さ 25 cm の ODS カラムを採用した。しかし、第 1 章で述べたように、*n*-ヘキサン誘電率は非常に小さく、有機層に抽出されるベンゼン以外の夾雑成分は極めて少ないことから、カラム長さをさらに短くすることが可能であると考えられた。カラム長さを短くすることにより、分析時間が短縮され、有機溶媒の使用量も削減できることから、分析法の生産性向上につながる。本件については、今後、再考していく必要がある。

水系溶媒に強酸または強塩基を用いる液液抽出-HPLC-UV 法については、定量対象が加水分解されない化合物であり、UV 吸収を有していれば、抽出に用いる有機溶媒を上手く選択することで、ベンゼン以外の様々な定量対象の微量定量分析に適用可能である。本分析法で提示した定量限界：0.5 ppm 及び検出限界：0.1 ppm は、今回設定した分析条件に従って、デルゴシチニブ：0.4 g、*n*-ヘキサン：1 mL、8 mol/L 水酸化カリウム溶液：5 mL を用いた時の数値であり、例えば、デルゴシチニブ：0.8 g、*n*-ヘキサン：1 mL、8 mol/L 水酸化カリウム溶液：10 mL を用いて分析を実施した場合は、定量限界：0.25 ppm、検出限界：0.05 ppm での評価が可能になる。定量対象ピークの感度が低い場合、分析装置のパラメータを最適化することにより、感度を向上させるのが一般的であるが、液液抽出-HPLC-UV 法の場合は、使用する試料量及び水系溶媒の容量を増量させることで、分析装置側のパラメータを全く変更する必要なく、簡便に定量対象ピークの感度を相対的に高めることができる。したがって、液液抽出-HPLC-UV 法のアプローチは、微量定量分析法の検討を簡略化させることも可能である。

しかし、定量対象が加水分解される化合物の場合、水系溶媒に強酸または強塩基を用いる液液抽出-HPLC-UV 法は適用できない。そこで、リグニン等の複雑な極性化合物を溶解可能というイオン液体を混合させた水系溶媒を試料溶解溶媒に用いることで<sup>55, 56</sup>、加水分解を受ける定量対象を感度良く定量分析可能か、検証したいと考えた。イオン液体は、アニオン及

びカチオンのイオンのみで構成される、融点が 100°C以下の塩であると定義されており、一般的に、高い耐熱性、極めて低い蒸気圧、不揮発性、不燃性といった特徴を有している<sup>57</sup>。アニオン及びカチオンの組み合わせによって、多様な構造や物性をデザインすることができることから、新しい溶媒として、電気化学<sup>58</sup>、合成化学<sup>59</sup>、分離化学<sup>60</sup>、生物再利用<sup>61</sup>、レアメタル回収<sup>62</sup>等の様々な研究分野で注目されており、イオン液体を利用した研究報告は増加の一途をたどっている。イオン液体は、難溶性試料を溶解可能という特性だけでなく、極性をコントロール可能という特性も有していることから、濃縮効果を得るために分析前処理として抽出を行うというアプローチには、最適の試料溶解溶媒と考えられた。

本件については、加水分解を受ける定量対象化合物として、遺伝毒性を有する、メタンスルホン酸メチル (Methyl methanesulfonate : MMS)、メタンスルホン酸エチル (Ethyl methanesulfonate : EMS) 及びメタンスルホン酸イソプロピル (Isopropyl methanesulfonate : IPMS) をリストアップし、デルゴシチニブにおける定量分析法を検討した。その結果、イオン液体を混合させた水系溶媒にデルゴシチニブを高濃度に溶解させることが可能であり、MMS、EMS 及び IPMS を加水分解させることなく有機層に分離濃縮することに成功した。ただし、夾雑成分による妨害のため、MMS、EMS 及び IPMS の分離濃縮に今回提案した操作性に優れた 1 ステップ液液抽出を適用することはできず、従来 of 固相抽出法による分析前処理を適用せざるを得なかった。定量分析法としては、試料溶解溶媒にイオン液体 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド (1-Butyl-3-methylimidazolium chloride : [BMIM]Cl) を混合させた水系溶媒を、抽出溶媒にジエチルエーテルを採用することにより、汎用性の高い分析装置である直接注入 GC-FID においても、MMS、EMS 及び IPMS を感度良く定量可能であった<sup>63</sup>。

今後はイオン液体のユニークな特性に着目しつつ、化学工学の見地を満たす生産性及び汎用性の高い分析法開発研究を引き続き実施し、医薬品分析の更なる低コスト化及びスピードアップを実現していきたいと考える。

## 引用文献

- (1) 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号、平成 28 年 12 月 16 日（平成 28 年法律第 108 号）改正）
- (2) 日本製薬工業協会 てきすとぶっく製薬産業 2016-2017.
- (3) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q8 (R2), PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT. **2009.**／製剤開発のガイドラインについて（平成 22 年 6 月 28 日 薬食審査発 0628 第 1 号）
- (4) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q9, QUALITY RISK MANAGEMENT. **2005.**／品質リスクマネジメントに関するガイドライン（平成 18 年 9 月 1 日 薬食審査発第 0901004 号、薬食監麻発第 0901005 号）
- (5) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q10, PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM. **2008.**／医薬品品質システムに関するガイドラインについて（平成 22 年 2 月 19 日 薬食審査発 0219 第 1 号、薬食監麻発 0219 第 1 号）
- (6) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q11, DEVELOPMENT AND MANUFACTURE OF DRUG SUBSTANCES (CHEMICAL ENTITIES AND BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL ENTITIES). **2012.**／原薬の開発と製造（化学薬品及びバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）ガイドラインについて（平成 26 年 7 月 10 日 薬食審査発 0710 第 9 号）
- (7) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic M7, ASSESSMENT AND CONTROL OF DNA REACTIVE (MUTAGENIC) IMPURITIES IN PHARMACEUTICALS TO LIMIT POTENTIAL CARCINOGENIC RISK. **2014.**／潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインについて（平成 27 年 11 月 10 日 薬生審査発 1110 第 3 号）
- (8) サルタン系医薬品における発がん性物質に関する管理指標の設定について（平成 30 年 11 月 9 日 薬生審発 1109 第 6 号、薬生安発 1109 第 4 号、薬生監麻発 1109 第 1 号）
- (9) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological Profile for Benzene. **2007.**
- (10) The Merck Index 13th edition. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Merck and Co. Inc., White house Station, NJ. **2001**, 182-183.
- (11) International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans volume 120 – Benzene. **2018.**
- (12) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q3C (R6), IMPURITIES: GUIDELINE

FOR RESIDUAL SOLVENTS. **2016.**／医薬品の残留溶媒ガイドラインの改正について  
(平成 30 年 7 月 19 日 薬生薬審発 0719 第 3 号)

- (13) Jörg F.; Ulrich G.; Thomas A. S. Toluene in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim. **2005.**
- (14) Berg L. Separation of Benzene from Acetone by Azeotropic Distillation. US Patent 4,931,145, 5 June **1990.**
- (15) Wu-Hsun C.; Harold H. K. Methanol production and use. Marcel Dekker, New York. **1994.**
- (16) Santosh K.; Neetu S.; Ram P. Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2010**, *14*(7), 1830-1844.
- (17) United States Pharmacopoeia (USP) 39 NF-34 General Chapter <467> Residual Solvents. Rockville, MD, USA. **2016.**
- (18) European Pharmacopoeia (EP) Ed 9.0 General Chapter 2.4.24. Identification and Control of Residual Solvents. Strasbourg, France, Council of Europe. **2016.**
- (19) Katharina S.; Ulrich O.; Thomas B.; Werner W. Changes in recovery due to drug product matrix ageing as a source of mass imbalances. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *74*(23), 117-125.
- (20) Djavanshir D.; Abolghasem J.; Jamal N. Ultrasonic assisted SPME coupled with GC and GC-MS using pencil lead as a fiber for monitoring the organic volatile impurities of ceftazidime. *J. Chromatogr. Sci.* **2008**, *46*(8), 680-685.
- (21) Tien D. H.; Manishkumar D. J.; Mark A. S.; Jared L. A. Selective extraction of genotoxic impurities and structurally alerting compounds using polymeric ionic liquid sorbent coatings in solid-phase microextraction: Alkyl halides and aromatics. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1240*(1), 29-44.
- (22) Sayeeda S.; Balaji N. Simultaneous trace level determination of benzene and 1,2-dichloroethane by GC-HS/GC-MS in several pharmaceutical drug substances. *Int. App. Pharm.* **2019**, *11*(1), 82-88.
- (23) Amano W.; Nakajima S.; Kunugi H.; Numata Y.; Kitoh A.; Egawa G.; Dainichi T.; Honda T.; Otsuka A.; Kimoto Y.; Yamamoto Y.; Tanimoto A.; Matsushita M.; Miyachi Y.; Kabashima K. The Janus kinase inhibitor JTE-052 improves skin barrier function through suppressing signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *136*(3), 667-677.
- (24) Tanimoto A.; Ogawa Y.; Oki C.; Kimoto Y.; Nozawa K.; Amano W.; Noji S.; Shiozaki M.; Matsuo A.; Shinozaki Y.; Matsushita M. Pharmacological properties of JTE-052: a novel potent JAK inhibitor that suppresses various inflammatory responses *in vitro* and *in vivo*. *Inflamm. Res.* **2015**, *64*(1), 41-51.
- (25) Amano W.; Nakajima S.; Yamamoto Y.; Tanimoto A.; Matsushita M.; Miyachi Y.; Kabashima K. JAK inhibitor JTE-052 regulates contact hypersensitivity by downmodulating T cell activation and differentiation. *J. Dermatol. Sci.* **2016**, *84*(3), 258-265.
- (26) Nakagawa H.; Nemoto O.; Igarashi A.; Nagata T. Efficacy and safety of topical JTE-052, a

- Janus kinase inhibitor, in Japanese adult patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: a phase II, multicentre, randomized, vehicle-controlled clinical study. *Br. J. Dermatol.* **2017**, *178*(2), 424-432.
- (27) Tanimoto A.; Shinozaki Y.; Yamamoto Y.; Katsuda Y.; Taniyai-Riya E.; Toyoda K.; Kakimoto K.; Kimoto Y.; Amano W.; Konishi N.; Hayashi M. A novel JAK inhibitor JTE-052 reduces skin inflammation and ameliorates chronic dermatitis in rodent models: Comparison with conventional therapeutic agents. *Exp. Dermatol.* **2018**, *27*(1), 22-29.
- (28) 厚生労働省 職場の安全サイト 安全データシート ベンゼン
- (29) 化学便覧 基礎編Ⅱ 改訂5版 日本化学会 **2004**, 168-169.
- (30) Joseph C. A. *Beginner's Guide to SPE*. Waters Corp. Milford MA, **2012**.
- (31) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2A, TEXT ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES. **1994**. / 分析法バリデーションに関するテキスト(実施項目)について(平成7年7月20日 薬審第755号)
- (32) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2B, VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY. **1996**. / 分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について(平成9年10月28日 医薬審第338号)
- (33) CERI 有害性評価書 ベンゼン 財団法人化学物質評価研究機構
- (34) 化学便覧 基礎編Ⅱ 改訂5版 日本化学会 **2004**, 620-621.
- (35) 厚生労働省 職場の安全サイト 安全データシート ノルマル-ヘキサン
- (36) 厚生労働省 職場の安全サイト 安全データシート 酢酸エチル
- (37) 厚生労働省 職場の安全サイト 安全データシート クロロホルム
- (38) 厚生労働省 職場の安全サイト 安全データシート ジエチルエーテル
- (39) Pedro F. M. S.; Angela W.; Magnus A. Elucidation of chromatographic peak shifts in complex samples using a chemometrical approach. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 5229-5235.
- (40) Abhishek G.; Yogendra S.; Kona S. S.; Garima J.; Sreekumar V. B.; Vinod P. S. Development and validation of a headspace gas chromatographic method for the determination of residual solvents in arterolane (RBx11160) maleate bulk drug. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2010**, *2*(1), 32-37.
- (41) Chandrakant S.; Ajay T.; Chintan D.; Padmaja S.; Sameer A.; Kumar K. S. Development and validation of residual solvent determination by headspace gas chromatography in Imatinib Mesylate API. *SN Appl. Sci.* **2019**, *1*, 233-241.
- (42) Ogden R. P.; George G. Acid-catalyzed hydrolysis of Ethyl acetate. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*(7), 1749-1750.
- (43) HPLC / ガスクロ分析 ~ トラブル・異常事例とその発生原因、解決法 ~ 技術情報協会 **2004**

- (44) 化学便覧 基礎編Ⅱ 改訂5版 日本化学会 **2004**, 164-165.
- (45) 化学便覧 基礎編Ⅰ 改訂5版 日本化学会 **2004**, 439.
- (46) 化学便覧 基礎編Ⅰ 改訂5版 日本化学会 **2004**, 561.
- (47) 化学便覧 基礎編Ⅰ 改訂5版 日本化学会 **2004**, 432.
- (48) 化学便覧 基礎編Ⅰ 改訂5版 日本化学会 **2004**, 429.
- (49) Paul S. C.; Walters W. P. Acidic and Basic Drugs in Medicinal Chemistry: A Perspective. *J. Med. Chem.* **2014**, 57(23), 9701-9717.
- (50) David T. M. The pK<sub>a</sub> Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspect Medicin. Chem.* **2007**, 1, 25-38.
- (51) 医薬品インタビューフォーム 日本薬局方アスピリン「アスピリンバイエル」
- (52) David G. W.; Pharmaceutical Chemistry, International Edition. Elsevier Health Sciences UK. **2011**.
- (53) 医薬品インタビューフォーム 日本薬局方リドカイン注射液「静注用キシロカイン2%」
- (54) 医薬品インタビューフォーム 心臓選択性β遮断剤 「アテノロール錠25・50mg サワイ」
- (55) Jonathan G. H.; Heather D. W.; Richard P. S.; Ann E. V.; Robin D. R. Room temperature ionic liquids as novel media for ‘clean’ liquid-liquid extraction. *Chem. Commun.* **1998**, 16, 1765-1766.
- (56) Neil W. Solubilization of polymers by ionic liquids. *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 4281-4293.
- (57) Ionic Liquids. Aldrich ChemFiles. **2005**, 5(6).
- (58) Changsheng D.; Nohira T.; Hagiwara R. A high-capacity TiO<sub>2</sub>/C negative electrode for sodium secondary batteries with an ionic liquid electrolyte. *J. Mater. Chem. A* **2015**, 3, 20767-20771.
- (59) Peter W.; Thomas W. Ionic Liquids in Synthesis, 2<sup>nd</sup> edition, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- (60) Paul S.; Jesse K.; Daniel A. F.; Carl K.; Daniel L. D.; Richard N. Gas separations using non-hexafluorophosphate [PF<sub>6</sub>]-anion supported ionic liquid membranes. *J. Membrane Sci.* **2004**, 238(1-2), 57-63.
- (61) Anthe G.; Agnieszka B.; Kim T.; Shahrul M. S.; Nizan S. Z.; Daniel K. M.; Ning S.; Noppadon S.; Jian S.; Vitalie S.; Ramakrishnan P.; Seema S.; Bradley M. H.; Tom W.; Blake A. S.; Jason P. H. Design of low-cost ionic liquids for lignocellulosic biomass pretreatment. *Green Chem.* **2015**, 17, 1728-1734.
- (62) Daphne D.; Arne V. B.; Wim D.; Koen B. Metal extraction with a short-chain imidazolium nitrate ionic liquid. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 5271-5274.
- (63) Nomura S.; Ito Y.; Takegami S.; Kitade T. Development and validation of trace analysis for alkyl methanesulfonates in the delgocitinib drug substance using GC-FID and liquid-liquid extraction with ionic liquid. *Open Chem.* **2020**, 18, 1020-1029.

## 謝辞

本研究を行うにあたって終始御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学薬品分析学分野 武上茂彦教授ならびに北出達也元教授に謹んで深謝申し上げます。

また、種々の貴重な御指導ならびに御助言を賜りました、京都薬科大学薬剤学分野 山本昌教授ならびに京都薬科大学代謝分析学分野 安井裕之教授に心から感謝の意を表します。

さらに、本研究を遂行するにあたり、多大なる助言及び協力を賜りました日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所生産技術研究所 伊藤佳治主任研究員、植原秀人副所長、小野木照二所長ならびに稲葉隆之元所長に謹んで感謝致します。

末筆ながら、研究に専念できるよう、時間や自由を与えてくださると共に始終暖かいサポートをいただいた家族に心から感謝の意を捧げます。

## **Appendices**

## ヘッドスペース GC 装置メソッド (1/2)

SHIMADZU\_HS-GC Method D:\Nomura\851\benzene.gcm

### [ファイル情報]

作成者 : Admin  
 編集者 : Admin  
 [コメント]

### <分析ライン 1>

#### [全般]

< Readyチェック 温調 >  
 カラムオープン : する  
 SPL1 : する  
 FID1 : する  
 < Readyチェック 検出器(FTD) >  
 < Readyチェック ヘースライドリフト >  
 FID1 : しない  
 < Readyチェック 気化室流量 >  
 SPL1 キャリア : しない  
 SPL1 パージ : しない  
 < Readyチェック 追加フロー >  
 < Readyチェック 検出器用APC >  
 FID1 メイクアップ : する  
 FID1 H2 : する  
 FID1 Air : する  
 外部信号の待機 : しない  
 自動点火 : する  
 自動消火 : しない  
 自動再点火 : する  
 Ready後に自動ゼロ補正 : する

#### [オートサンブラ Turbo Matrix HS]

ヘッドスペースモード : コンスタント  
 注入モード : 時間  
 注入時間 : 0.20 min  
 ゾーン温度設定 : O/N/T  
 オープン温度 : 80 °C  
 ニートル温度 : 85 °C  
 トランスファー温度 : 85 °C  
 バイアルヘンディング : OFF  
 保温時間 : 60 min  
 加圧時間 : 0.5 min  
 引き抜き時間 : 0.2 min  
 GCサイクル時間 : 90 min  
 HSキャリアガス圧力 : 59.8 kPa

#### [試料気化室 SPL1]

注入モード : スプリット  
 気化室温度 : 140.0 °C  
 キャリアガス : He  
 制御モード : 圧力  
 圧力 : 69.8 kPa  
 全流量 : 16.0 mL/min  
 カラム流量 : 2.16 mL/min  
 線速度 : 35.0 cm/sec  
 パージ流量 : 3.0 mL/min  
 スプリット比 : 5.0  
 高圧注入 : OFF  
 キャリアガスセーブ : OFF  
 スプリット比保持 : OFF

#### [カラムオープン]

カラム温度 : 40.0 °C  
 平衡時間 : 3.0 min  
 =カラムオープン温度プログラム=  
 合計時間 : 60.00 min  

レート(°C/min)	温度(°C)	ホールド時間(min)
1	40.0	20.00
10.0	240.0	20.00

## ヘッドスペース GC 装置メソッド (2/2)

### [カラム情報]

カラム名称 : DB-624  
 シリアル番号 : USD617255H  
 液相の膜厚 : 1.80  $\mu$ m  
 長さ : 30.0 m  
 内径 : 0.32 mm ID  
 カラム上限温度 : 260  $^{\circ}$ C  
 取付け日 : 2014/10/29

### [検出器 チャンネル 1 FID1]

検出器温度 : 250.0  $^{\circ}$ C  
 検出器信号を採取する : する  
 サンプリングレート : 40 msec  
 終了時間 : 26.58 min  
 遅れ時間 : 0.00 min  
 差分信号の検出器 : なし  
 メイクアップガス : He  
 メイクアップ流量 : 30.0 mL/min  
 H2流量 : 50.0 mL/min  
 Air流量 : 400.0 mL/min

### [カラムパフォーマンスパラメータ - チャンネル 1]

計算方法	: USP	カラム長さ	: 30000 mm
デッドタイム	: 時間指定	時間指定	: 0 min
同定ピークのみ計算	: OFF		

### [波形処理パラメータ - チャンネル 1]

Width	: 5 sec	Slope	: 500 $\mu$ V/min
Drift	: 0 $\mu$ V/min	T.DBL	: 1000 min
Min.Area/Height	: 200 カウント		

### =波形処理タイムプログラム=

有効	時間(min)	処理命令	値
1 [Yes]	0.000	Integration Off	*****
2 [Yes]	9.000	Integration On	*****
3 [Yes]	12.000	Integration Off	*****

HPLC 装置メソッド (1/3)

==== Shimadzu LCsolution メソッドファイル ====

ファイル名: D:\Data\Nomura\052\052\_benzene.lcm

<<システムコントローラ>>

型名 : CBM-20A  
 電源オン : ON  
 イベント1 : OFF  
 イベント2 : OFF  
 イベント3 : OFF  
 イベント4 : OFF

<<データ採取時間>>

LC終了時間 : 32.00 min  
 --PDA 検出器--  
 名称 : PDA  
 サンプリング(周期) : 640 msec  
 開始時間 : 0.00 min  
 終了時間 : 20.00 min  
 時定数 : 0.640 sec

<<ポンプ>>

モード : Binary gradient  
 PumpA 型名 : LC-10AD  
 PumpB 型名 : LC-10AD  
 Total Flow : 0.900 mL/min  
 B.Conc : 40.0 %  
 B.Curve : 0  
 圧力の限界(P.Max) : 30.0 MPa  
 圧力の限界(P.Min) : 0.0 MPa  
 電磁弁A : FCV-11AL  
 ハルファ : A-A-A

<<オートサンプラ>>

型名 : SIL-10A  
 オートサンプラの使用 : 使用する  
 サンプルラック : クーリングラックS  
 リンス量 : 2000 uL  
 ニードルストローク : 39 mm  
 洗浄液吸引速度 : 150 uL/sec  
 サンプル吸引速度 : 3 uL/sec  
 注入量補正係数 : 1.00  
 サンプル過剰吸引量 : 50 uL

<<前処理プログラム>>

モード : 前処理プログラム  
 <プログラム>File #0  
 irinse rv,rs  
 vial sn  
 air.a 3,ss  
 n.strk ns  
 a0=iv+ev  
 aspir a0,ss  
 air.a 5,ss  
 inj.p  
 disp 0,ss  
 v.load  
 disp iv,ss  
 s.inj  
 irinse rv,rs  
 rinse rv,rs  
 home  
 end  
 File #1  
 irinse rv,rs  
 vial sn  
 air.a 3,ss

## HPLC 装置メソッド (2/3)

```
n.strk ns
a0=iv+ev
aspir a0,ss
air.a 5,ss
inj.p
disp 0,ss
v.load
disp iv,ss
s.inj
irrinse rv,rs
rinse rv,rs
irrinse rv,rs
rinse rv,rs
home
end
```

### <<オープン>>

```
型名 : CTO-10A
オープンの使用 : 使用する
オープン温度 : 45 °C
上限温度 : 85 °C
```

### <<PDA>>

```
型名 : SPD-M20A
ランプタイプ : D2
開始波長 : 190 nm
終了波長 : 400 nm
セル部温調温度を使用 : 使用する
セル部温調温度 : 40 °C
スリット幅 : 1.2 nm
Ref. 補正 : 使用しない
アナログ出力1 波長 : 250 nm
アナログ出力1 バンド幅 : 4 nm
アナログ出力1 出力レンジ : 1.0 AU/V
アナログ出力1 極性 : +
アナログ出力2 波長 : 250 nm
アナログ出力2 バンド幅 : 4 nm
アナログ出力2 出力レンジ : 1.0 AU/V
アナログ出力2 極性 : +
アナログ出力3 波長 : 250 nm
アナログ出力3 バンド幅 : 4 nm
アナログ出力3 出力レンジ : 1.0 AU/V
アナログ出力3 極性 : +
アナログ出力4 波長 : 250 nm
アナログ出力4 バンド幅 : 4 nm
アナログ出力4 出力レンジ : 1.0 AU/V
アナログ出力4 極性 : +
```

### <<LCプログラム>>

時間	ユニット	処理命令	数値	コメント
15.00	ポンプ	B.Conc	40	
17.00	ポンプ	B.Conc	90	
19.00	ポンプ	B.Conc	90	
19.10	ポンプ	B.Conc	40	
32.00	コントローラ	Stop		

### <<波形処理>>

#### <PDA>

```
チャンネル名 : 切出しクロマトグラム
Width : 5 sec
Slope : 1000 uV/min
Drift : 0 uV/min
T.DBL : 1000 min
最大スライス数 : 0
ピーク頂点検出モード : 標準
RT補正モード : 標準
最小面積/高さ : 500 カウント
```

## HPLC 装置メソッド (3/3)

使用データ	: 面積	
検出ピークのスペクトルをテーブルに登録する		: OFF
チャンネル名	: Ch1 205nm	
Width	: 5 sec	
Slope	: 1000 uV/min	
Drift	: 0 uV/min	
T.DBL	: 1000 min	
最大スライス数	: 0	
ピーク頂点検出モード	: 標準	
RT補正モード	: 標準	
最小面積/高さ	: 1000 カウント	
使用データ	: 面積	
検出ピークのスペクトルをテーブルに登録する		: OFF

### <<波形処理タイムプログラム>>

#### <PDA>

チャンネル : 切出しクロマトグラム

なし

チャンネル : Ch1 205nm

なし

### <<波形処理タイムプログラム(データ)>>

#### <PDA>

チャンネル : 切出しクロマトグラム

なし

チャンネル : Ch1 205nm

なし

### <<UVスペクトル>>

スペクトルフィルター タイプ : なし

スペクトルの補間 : OFF

スペクトルのバックグラウンド補正 : OFF

スムージングポイント数 : 0

λ min/max 計算開始波長 : 190 nm

λ min/max 計算終了波長 : 800 nm

λ min/max 小数点以下 : 0

類似度計算開始波長 : 190 nm

類似度計算終了波長 : 800 nm

類似度小数点以下 : 4