

# 令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告 薬局方各条における有害試薬の可及的排除に関する研究（第4報）\*2

辻 巖一郎\*1, 内山 奈穂子\*1, 合田 幸広\*1, 出水 庸介\*1

Study on the Elimination of Harmful Reagents on the Testing Methods in Japanese Pharmacopoeia IV

Genichiro TSUJI \*1, Nahoko UCHIYAMA \*1, Yukihiro GODA \*1 and Yosuke DEMIZU \*1

## 1 諸言

日本薬局方 (JP) は、医薬品の性状及び品質の適正を図るために定められた、日本の医薬品の公的な規範書であり、JPで規定される医薬品の試験法には普遍性が要求される。JPは5年ごとに改正が行われており、科学技術の進展並びに国際調和に対応するため、部分改正等を適宜行っている。

筆者らは、第十八改正日本薬局方作成基本方針に掲げられた「保健医療上重要な医薬品の全面的収載」、「最新の学問・技術の積極的導入による質的向上」、「医薬品のグローバル化に対応した国際化の一層の推進」、「必要に応じた速やかな部分改正及び行政によるその円滑な運用」、「日本薬局方改正過程における透明性の確保及び日本薬局方の普及」の5本柱<sup>1)</sup>の中で、「最新の学問・技術の積極的導入による質的向上」として、薬局方試験法における有害試薬の可及的排除を目的とした代替試験法、定量法改定等の検討を行ってきた。令和元年度は、各条（クロニジン塩酸塩<sup>2)</sup>）を対象として、低毒性溶媒への検討<sup>3,4)</sup>を行うとともに、定量法として設定されている電位差滴定法<sup>5)</sup>をより簡便なHPLC法への変更（米国薬局方 (USP)<sup>6)</sup>や欧州薬局方 (EP)<sup>7)</sup>では既にHPLC法が設定されている）についての検討を行った。このように、USPやEPなど他局で規定されているより優れた試験方法についてJPでの採用

の可能性を検討し、国内外の関係者に利用されるようにJPの普及を図ることは、医薬品各条の国際調和という観点で重要である。第十九改正日本薬局方作成基本方針（案）においても、引き続き「最新の学問・技術の積極的導入による質的向上」が5本の柱として掲げられている。また、「日本薬局方改正過程における透明性の確保及び日本薬局方の国内外への普及」も挙げられている。

令和2年度は、ロラゼパム<sup>8)</sup>を対象として、合成した類縁物質の定量NMR (qNMR) による純度決定、定量法の設定に向けたHPLCクロマトグラム上における各化合物の完全分離の条件を検討した<sup>9)</sup>。更に、トリヘキシフェニジル塩酸塩<sup>10)</sup>及びクロモグリク酸ナトリウム<sup>11)</sup>についても同様に、試験法の設定を目的として類縁物質の合成、qNMRによる純度決定、HPLCにおける各化合物の完全分離条件の検討を行った。

## 2 実験方法

### 2.1 実験用試薬類、器具及び方法

qNMR測定用の試薬には、ロラゼパム (for Biochemistry, 富士フイルム和光純薬, Code No. 122-04591, Lot. KCL2967, 純度 98.0+%(Titration)) を使用した。

qNMR用基準物質には、認証標準物質 (NMIJ

\*1 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)

National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 210-9501, Japan

\*2 本研究は一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」事業により行ったものである。

CRM)であるDSS- $d_6$  (Sodium 3- (trimethylsilyl) -1-propane-1,1,2,2,3,3- $d_6$ -sulfonate, Mw=224.36, Lot. KPE1040, 純度92.3%)もしくは1,4-BTMSB- $d_4$  (1,4-bis (trimethylsilyl) benzene- $d_4$ , Mw= 226.50, Lot. TWN2900, 純度99.9%) (富士フイルム和光純薬)を使用した。qNMR測定用重溶媒には、重ジメチルスルホキシド (DMSO- $d_6$ ) (Acros (Geel), Lot. A0401114) を用いた。

HPLC分析用の製剤試料には、ロラゼパム錠1mg「サワイ」(沢井製薬 (大阪), 製造番号 720201) を使用した。

天秤は、最小表示値が0.0001 mgのウルトラミクロ天秤 (Mettler Toledo XPR2UV (Columbus)) を使用した。NMRは、JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子 (株)) を使用し、化学シフト値は、qNMR用基準物質を基準シグナル (0 ppm) とし、 $\sigma$  値を ppm 単位で表した。NMR試料管はWilmad-LabGlass (Vineland) 製528-ppを使用した。

HPLCのシステムとしては、PDA検出器 (MD-4015), ポンプ (PU-4100), カラムオープン (CO-4060), オートサンプラー (AS-4050) を備えたEXTREMA (日本分光 (東京)) を使用し、分析用カラムとしては、①ODSカラムCAPCELL PAK (C18, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, 大阪ソーダ (大阪)), ②PBrカラムCOSMOSIL PBr (C18, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, ナカライテスク (京都)), ③ODSカラムMightysil RP-18 GP II (C18, 4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m, 関東化学 (東京)), もしくは④ODSカラムJASCO Vario ASB C18 (C18, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, 日本分光 (東京)) を使用した。HPLC分析に使用した移動相溶媒としては、蒸留水 (関東化学, Code No. 11307-2B) 及びシアセトニトリル (Sigma-Aldrich, Code No.34888-2.5L) を使用した。

トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質及びクロモグリク酸ナトリウム類縁物質の合成には富士フイルム和光純薬社製の溶媒を使用した。試薬類は以下に示すものを試薬会社から購入することで入手した。トリヘキシフェニジル塩酸塩 (東京化成Code No.T3303, Lot.PW4KD-JI, 純度 98.0+%), 3-クロロプロピオフェノン (東京化成), ピペリジン (Sigma-Aldrich), 4M塩酸-1, 4-ジオキサソラン溶液 (富士フイルム和光純薬), 酢酸 (富士フイルム和光純薬), 2',6'-ジヒドロキシアセトフェノン (東京化成Code

No.D1716, Lot.JCFFG-MM, 純度 >97.0%), クロモグリク酸ナトリウム (富士フイルム和光純薬Code No.193-15231, Lot.APM2019, 純度 98.0+%)

## 2.2 qNMRの試料溶液の調製及び測定条件

各試薬約5 mg, qNMR用基準物質約1 mgをそれぞれ精密に量り採り、風袋ごと同一の容器に入れNMR測定溶媒1 mLに溶解した。この溶液0.6 mLをNMR試料管に封入したものを試料溶液とした。

観測スペクトル幅は20 ppm, デジタルフィルタを使用し、スペクトル中心は5 ppmの位置に設定、パルス幅は90度パルスとなる時間に設定し、取り込み時間4秒, デジタル分解能 (Resolution) 0.25 Hz, 遅延時間60秒, オートFGシムによるシム調整, 測定温度は室温 (20~30°C) とし, MPF8による $^{13}\text{C}$ デカップル実施, ダミースキャン2回とし, 積算回数はS/N>200になる回数として8回行った。内部標準法 (AQARI:Accurate quantitative NMR with internal reference substance) により, 原則として各試料について3回秤量, 調製した後, 非連続に3回測定を行った。

NMRデータの処理には, 日本電子 (株) 製Purity Proを使用, qNMR用基準物質のトリメチルシリルピークを0 ppmとし, マニュアル法で位相補正, オートベースライン補正を行い, マニュアル法で各ピークの積分範囲を決定した。また, 本報告では積分値は, 全て純度換算 (%) により表示した。試薬の純度は以下のEq. (1) を用いて算出した。

$$P_{\text{sample}} = \left[ \frac{I_{\text{sample}}}{I_{\text{std}}} \times \frac{H_{\text{std}}}{H_{\text{sample}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{W_{\text{sample}}} \times \frac{M_{\text{sample}}}{M_{\text{std}}} \right] \times P_{\text{std}} \quad (1)$$

$I$  = シグナル強度 (積分値),  $H$  = プロトン数 (官能基の水素の数),  $W$  = 質量 (秤量値),  $M$  = 分子量,  $P$  = 純度 (%),  $std, sample$  = qNMR用基準物質及びサンプル

DSS- $d_6$ の特定基のプロトン数 (DSS- $d_6$  =  $\text{CH}_3 \times 3$ ), 1,4-BTMSB- $d_4$ の特定基のプロトン数 (1,4-BTMSB- $d_4$  =  $\text{CH}_3 \times 6$ ), 分子量 (MW); DSS- $d_6$ : MW 224.36, 1,4-BTMSB- $d_4$ : MW 226.50, ロラゼパム: MW 321.16, ロラゼパム類縁物質A: MW 266.12, ロラゼパム類縁物質B: MW 363.19, ロラゼパム類縁物質C: MW 321.16, ロラゼパム類縁物質D: MW 321.16, ロラゼパム類縁物質E: MW 303.14, トリヘキシフェニジル塩酸塩: MW

337.93, トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質 A : MW 217.31, クロモグリク酸ナトリウム : MW 512.33, クロモグリク酸ナトリウム類縁物質 A : MW 152.15, クロモグリク酸ナトリウム類縁物質 B : MW 524.48

## 2.3 HPLC測定における試料の調製及び分析条件

### 2.3.1 ロラゼパム類縁物質

各試料を蒸留水/アセトニトリル混液 (1:1, v/v) にて溶解させることで2.5mMの濃度とし, 0.45  $\mu$ mのシリンジフィルターでろ過した溶液を分析用の試料溶液とした。測定条件は以下のとおりである。流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出波長: 230もしくは235 nm, 試料導入量: 25  $\mu$ L, USP記載の条件を参考にした移動相: アセトニトリル:酢酸:水 = 50:1.2:50 (v/v/v), EP記載の条件を参考にした移動相: A = 20mMリン酸緩衝液 (pH6.0), B = アセトニトリル, グラジエント: B = 0% to 5% (0-10 min), 5% to 60% (10-20 min), 60% (20-60 min)。製剤については, 10錠を粉体化したものから成分1mgに相当する重量分を量りとり, 蒸留水/アセトニトリル混液 (1:1, v/v) (1 mL) を加えてボルテックスミキサーで振とう (20分間, 室温) させた。得られた懸濁液を遠心分離し, 上澄みを0.45  $\mu$ mのシリンジフィルターでろ過した溶液を分析用の試料溶液とした。

### 2.3.2 トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質

各試料を Table 7 中記載の移動相 A にて溶解 (終濃度: トリヘキシフェニジル塩酸塩: 6mM, 類縁物質 A: 2mM) させ, 0.45  $\mu$ mのシリンジフィルターでろ過した溶液を分析用の試料溶液とした。試料導入量は10  $\mu$ Lとし, カラム③を使用して分析を行った。測定条件は Table 7 に記載のとおりである。

### 2.3.3 クロモグリク酸ナトリウム類縁物質

各試料を Table 9 中記載の移動相 A と B の混液 (1:1, v/v) にて溶解 (終濃度: クロモグリク酸ナトリウム: 1mM, 類縁物質 A: 5mM, 類縁物質 B: 0.3mM) させ, 0.45  $\mu$ mのシリンジフィルターでろ過した溶液を分析用の試料溶液とした。試料導入量は10  $\mu$ Lとし, カラム④を使用して分析を行った。測定条件は Table 9 に記載のとおりである。

## 2.4 トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質及びクロモグリク酸ナトリウム類縁物質の合成

反応の追跡は薄層クロマトグラフィー (TLC) (60 F254, Merck 社) を使用し, スポットの可視化はハンディ UV ランプ (254/365 nm) (UVP 社) による紫外線照射, 及びヨウ素蒸気によって行った。カラムクロマトグラフィー用の NH シリカゲルには, 中圧カラムクロマトグラフィー装置 (Smart Flash) (山善), 及び中圧カラムクロマトグラフィー用充填カラム (Inject column Amino/Hi-Flash column Amino, 40  $\mu$ m) (山善) を使用した。融点 (Mp) の測定は MP-500V (ヤナコ株式会社) を使用し, 補正せずに測定を行った。高分解能質量分析 (HRMS) は Shimadzu IT-TOF MS (島津) にて, エレクトロスプレーイオン化法にて測定した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 ロラゼパム類縁物質の qNMR による純度決定

HPLC 分析に使用した試薬及び合成した化合物 (Fig. 1) は  $^1\text{H}$ -qNMR によって純度を決定した (Table 1)。代表例として, 類縁物質 C (4) の NMR チャートを Fig. 2 に示している。各試料の定量シグナルは, 不純物由来のシグナルなど妨害ピークが観測されないシグナルを選択した。ロラゼパムについては 9 位 (7.28 ppm, d) 及び 6 位 (6.96 ppm, d) を定量シグナルとして絶対純度を求めた結果,  $99.24 \pm 0.09\%$  であった。同様にして類縁物質 A (1) については, 3 位 (6.94 ppm, d) 及び 6 位 (6.87 ppm, d) を定量シグナルとした結果, 絶対純度は  $99.30 \pm 0.30\%$  であった。類縁物質 C (4) については, 6 位 (6.81 ppm, d) を定量シグナルとした結果, 絶対純度は  $97.92 \pm 0.21\%$  であった。これら 3 化合物は, いずれの試料においても標準偏差 (S.D.) が 0.1~0.3% 程度とばらつきが小さく良好な結果であった。類縁物質 B (5) については, 6 位 (7.00 ppm, d) 及び 3 位 (5.85 ppm, s) を定量シグナルとした結果, 絶対純度は  $87.82 \pm 0.26\%$  であり, 類縁物質 E (8) については, 8 位 (8.43 ppm, d) を定量シグナルとした結果, 絶対純度は  $90.82 \pm 0.09\%$  であった。この両試料は, 絶対純度の S.D. は, 0.26, 0.9% とばらつきが小さく

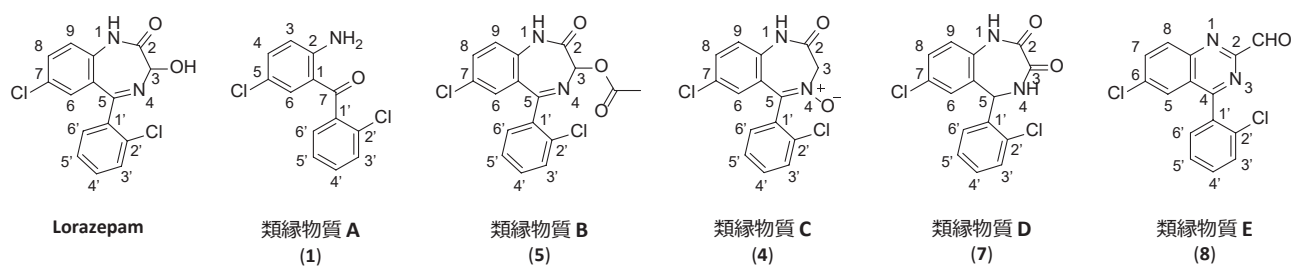


Fig. 1 ロラゼパム及び類縁物質A-Eの化学構造

Table 1 <sup>1</sup>H-qNMRにより値付けしたロラゼパム及び類縁物質A-Eの純度

Sample	NMR solvent	Internal standard	Target signals (ppm)	Average ± S.D. (%) of target signals
Lorazepam	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-9 (7.28, d) H-6 (6.96, d)	99.24 ± 0.09
類縁物質 A (1)	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-3 (6.94, d) H-6 (6.87, d)	99.30 ± 0.30
類縁物質 B (5)	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-6 (7.00, d) H-3 (5.85, s)	87.82 ± 0.26
類縁物質 C (4)	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-6 (6.81, d)	97.92 ± 0.21
類縁物質 D (7)	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-9 (7.26, d)	95.57 ± 0.20
類縁物質 E (8)	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-8 (8.43, d)	90.82 ± 0.09

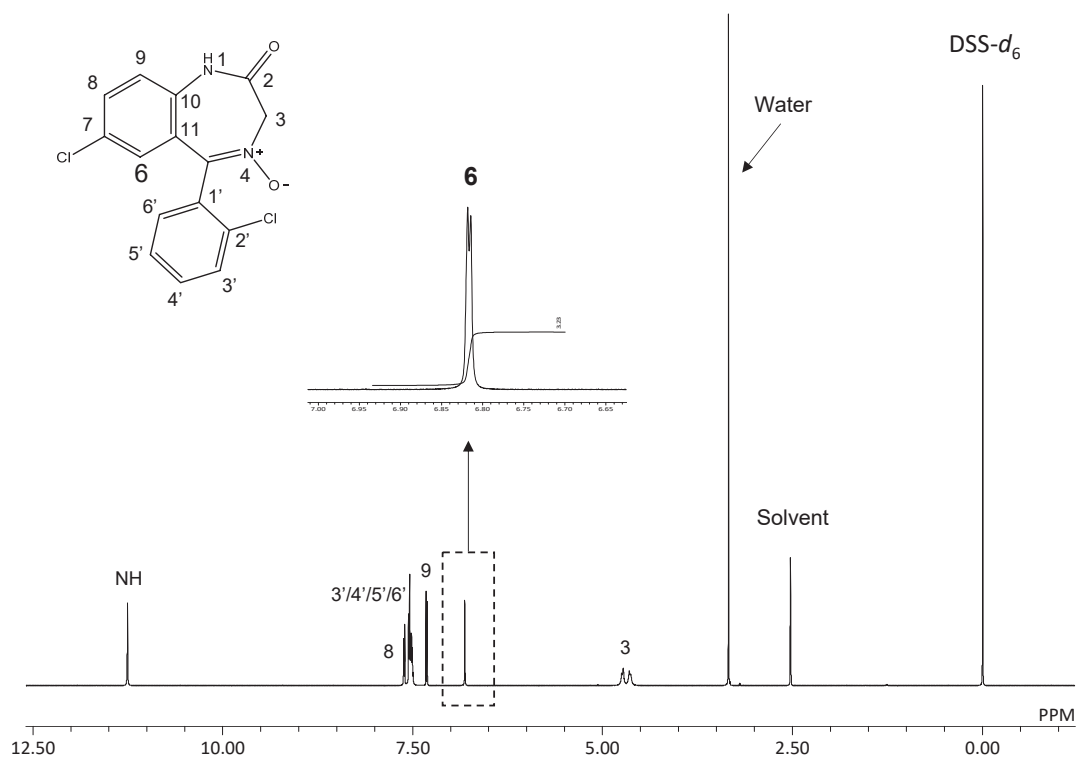


Fig. 2 ロラゼパム類縁物質C(4)の<sup>1</sup>H-qNMRスペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

定量自体は良好な結果であったが、純度が低いのは、合成時の不純物が多く含まれているためと考えられる。類縁物質D (7) については、40°Cにおいて9位 (7.26 ppm, d) を定量シグナルとした結果、絶対純度は95.57 ± 0.20%であった。

### 3.2 ロラゼパム類縁物質のHPLC分析

各分析対象のHPLC分析では、まずUSP (USP42-NF37) やEP (9<sup>th</sup> ed) に記載の分析条件<sup>12, 13)</sup> (Table 2, 3) を参考に検討を行った。USPでは約1%の酢酸を含む水/アセトニトリル溶液系を移動相としており、EPではリン酸緩衝液を移動相としているが、いずれも分析カラムにおける固定相はオクタデシルシリル (ODS, C18) である。初めに、ODSカラムを使用したHPLC分析によって各化合物の保持時間を確認した。その後、それぞれの化合物の混合溶液について一斉分析を行った。その結果、USPの移動相条件では、類縁物質Eのピーク形状が不良であ

り、各ピークの分離が不十分であった (Fig. 3)。一方で、EP記載の条件では、各化合物のピークが検出できたものの、ロラゼパムと類縁物質Dとが分離せず、類縁物質Bと類縁物質Eがクロマトグラム上で近接した位置に溶出した (分離度1.1) (Fig. 4, Table 4)。複数他社のODSカラムの使用、移動相の組成やグラジエントについても検討したが、JPで完全分離を示す分離度1.5を達成することができなかった。そこで、カラムの分離特性を変更するために、固定相にペンタプロモベンジル基 (PBr) で修飾されたカラム (分子の疎水性及び分散力の違いを分離モードとしているカラム) を使用して分析を行った。PBrカラムを用いた検討の結果、ベースラインが若干上昇するものの、類縁物質Bと類縁物質Eとの分離度を改善することができた (分離度1.8) (Fig. 5, Table 4)。次に、この分析条件が製剤 (錠剤) からの抽出液に対して適用可能であるかを検討した。ロラゼパム製剤 (Lorazepam Tablets) の定

Table 2 USP (USP42-NF37) と本研究で使用したHPLC条件の比較

	USP condition	USP modified condition (This study)
1) Column	ODS, 4.6 × 250 mm, 5 μm	ODS, 4.6 × 250 mm, 5 μm
2) Column temperature	5°C	40°C
3) Mobile phase	acetonitrile, glacial acetic acid, and water (50:1.2:50, v/v/v)	acetonitrile, glacial acetic acid, and water (50:1.2:50, v/v/v)
4) Flow rate	1.0 mL/min	1.0 mL/min
5) Detection	230 nm	230 nm

Table 3 EP (9<sup>th</sup> ed) と本研究で使用したHPLC条件の比較

	EP condition	EP modified condition (This study)
1) Column	ODS (end-capped, resistant to bases up to pH 11.5), 4.6 × 250 mm, 5 μm	ODS (end-capped, resistant to bases up to pH 10), 4.6 × 250 mm, 5 μm
2) Column temperature	Not listed	40°C
3) Mobile phase	A : 20 mm aqueous K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /acetonitrile (95:5, v/v) (adjust to pH 10.5 with NaOH) B : acetonitrile	A : 20 mm aqueous NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (adjust to pH 8.0 with NaOH) B : acetonitrile
4) Gradient table (Solution B conc.)	20% to 70% (5-35 min) to 70% (35-50 min) to 20% (50-60 min)	30% to 55% (0-20 min), 55% hold (20-40 min), 55% to 80% (40-50 min)
5) Flow rate	1.0 mL/min	1.0 mL/min
6) Detection	235 nm	235 nm

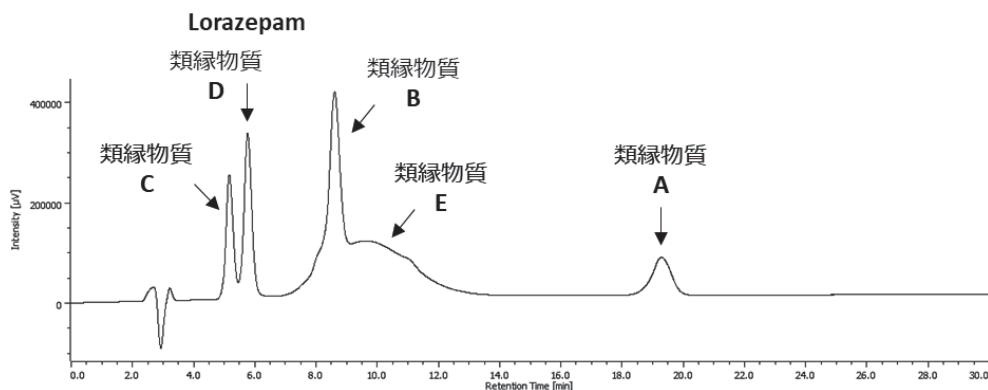


Fig. 3 ロラゼパム及び類縁物質A-EのHPLCによる一斉分析（USP改変法）

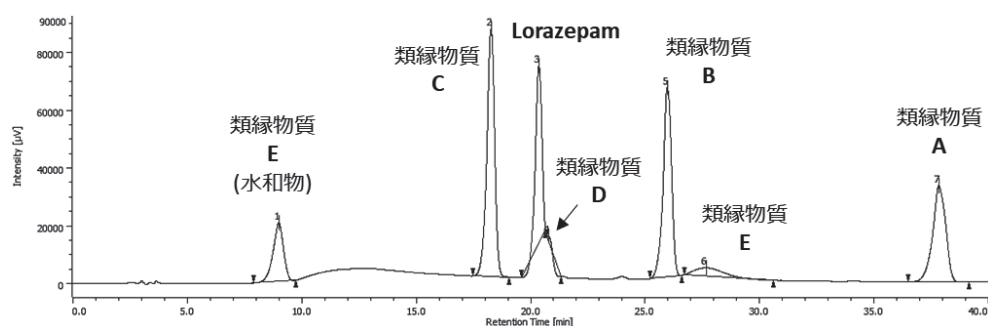


Fig. 4 ロラゼパム及び類縁物質A-EのHPLCによる一斉分析（EP改変法, ODSカラム）

Table 4 HPLCクロマトグラム上の各ピークの保持時間及び分離度

Specific peaks	Column			
	ODS		PBr	
	Retention time (min)	Resolution*	Retention time (min)	Resolution*
類縁物質E (hydrate)	9.0	13.1	6.8	32.9
類縁物質C	18.3	3.7	20.0	5.5
Lorazepam	20.3	1.0	22.1	3.8
類縁物質D	20.8	10.9	23.6	19.0
類縁物質B	25.9	1.1	31.2	1.8
類縁物質E	27.6	6.0	35.5	5.0
類縁物質A	37.8	N/A	47.7	N/A

N/A : Not available

量において、USPでは90.0-110.0%の範囲が設定されており、分析法として移動相や製剤の抽出溶媒について原薬とは異なる条件<sup>12)</sup>が設定されているが、同条件で実施できることがより望ましいと考えられる。今回検討した分析条件を製剤（錠剤）からの抽

出液に適用したところ、Fig. 6に示すクロマトグラムが得られた。また、qNMRによって純度を定量したロラゼパム（99.24%）から標準試料を調製し、製剤抽出液（1 mg/mL）の一点検量線における定量値を求めたところ、1.08 mg/mLとなりUSPで設定

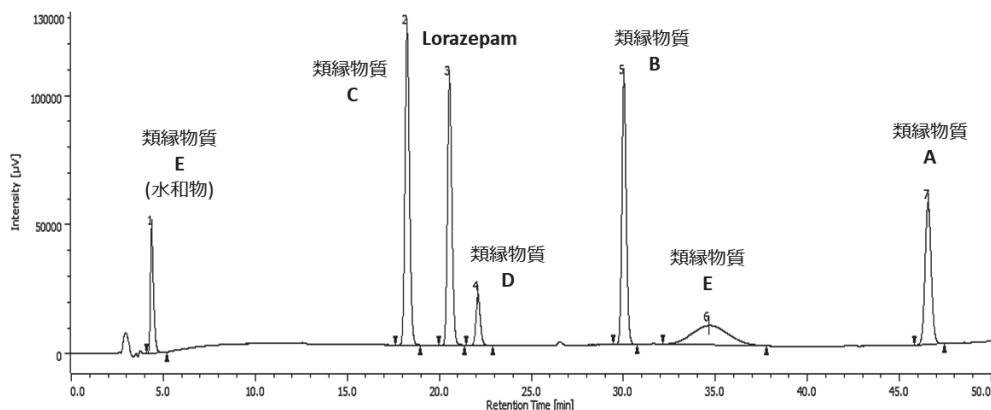


Fig. 5 ロラゼパム及び類縁物質A-EのHPLCによる一斉分析（EP改変法，PBrカラム）

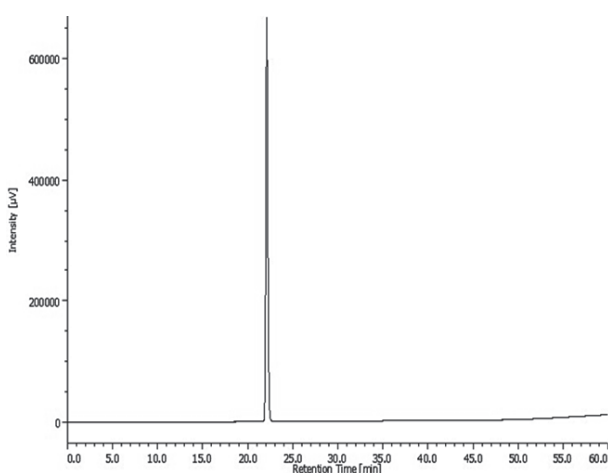


Fig. 6 ロラゼパム製剤抽出液のHPLCクロマトグラム

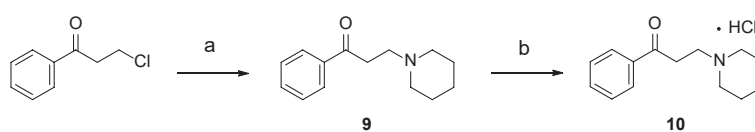
された数値の範囲内であった。この結果はUSP記載の方法で得られた製剤抽出液を使用した場合（1.05 mg/mL）と同等であったことから、本研究で検討した分析条件は製剤に対しても適用可能であることが明らかになった。

### 3.3 トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質の合成

Scheme 1に示す合成経路にてトリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質A・HCl (10) (Fig. 7) を合成した。

### 3.4 クロモグリク酸ナトリウム類縁物質の合成

Scheme 2に示す合成経路でクロモグリク酸ナト



a) Piperidine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; b) 4M HCl in 1,4-dioxane

Scheme 1 トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質A(9)及びA・HCl(10)の合成

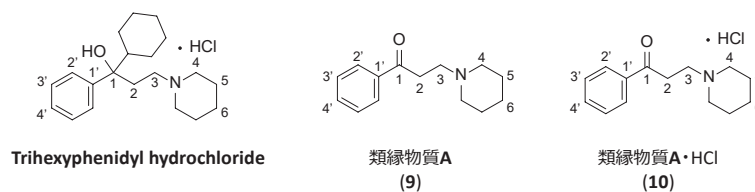
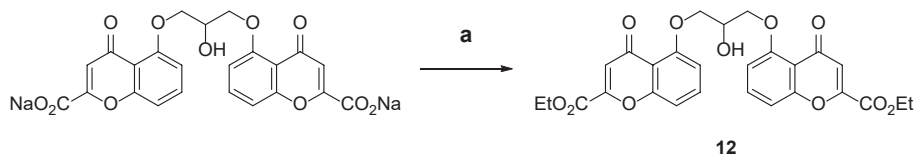


Fig. 7 トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質の化学構造



a) 4M HCl in 1,4-dioxane, EtOH, 80°C

Scheme 2 クロモグリク酸ナトリウム類縁物質B(12)の合成

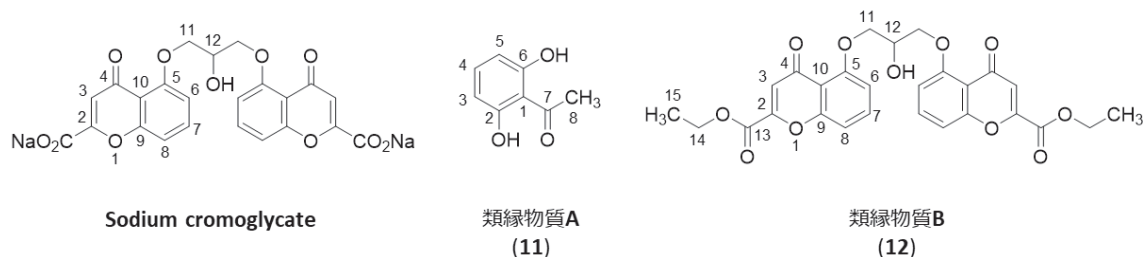


Fig. 8 クロモグリク酸ナトリウム及び類縁物質の化学構造

リウム類縁物質B (12) (Fig. 8) を合成した。

トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質Aの合成：3-クロロプロピオフェノン (1) をジクロロメタン中、ピペリジンと反応させることでトリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質A (9) を得た。また、トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質A・HCl (10) を合成した。

クロモグリク酸ナトリウム類縁物質Bの合成：クロモグリク酸ナトリウムをエタノール中、4M塩酸-ジオキサン溶液を加えて加熱還流することでクロモグリク酸ナトリウム類縁物質B (12) を得た。

これらの化合物の構造決定は核磁気共鳴法 ( $^1\text{H-NMR}$  及び  $^{13}\text{C-NMR}$ )、質量分析にて行った。合成した各化合物の合成プロトコル、機器データ及びスペクトルデータ (Fig. 9~14) を以下に記載する。  
1-Phenyl-3- (piperidin-1-yl) propan-1-one (9) 及び 1-Phenyl-3- (piperidin-1-yl) propan-1-one hydrochloride (10)

3-クロロプロピオフェノン (1.0 g, 5.93 mmol) のジクロロメタン溶液 (12 mL) にピペリジン (294  $\mu\text{L}$ , 2.97 mmol) を加えて、室温にて20時間攪拌した後、反応液を減圧留去した。残渣をジエチルエーテルに懸濁させ、濾取、洗浄して真空乾燥することで無色固体として得た (710 mg)。得られた固体に2M水酸化ナトリウム水溶液を加えてジクロロメタンで3回抽出し、合わせた有機層を無水硫酸ナトリウム上で

乾燥、濾過して減圧留去した。得られた油状物質をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 100:0 to 15:85) に付すことで遊離のアミン体9を淡黄色油状物質として得た (979 mg, 76%)。

$^1\text{H-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$  : 8.00 (2H, dd,  $J$  = 8.4, 1.2 Hz), 7.60 (1H, t,  $J$  = 8.4 Hz), 7.50 (2H, dd,  $J$  = 8.4, 8.4 Hz), 3.25-3.19 (3H, m), 2.78 (2H, t,  $J$  = 7.5 Hz), 2.49 (4H, br), 1.62 (4H, ddd,  $J$  = 16.8, 10.8, 5.4 Hz), 1.48 (2H, br);  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOH- $d_4$ )  $\delta$  : 200.7, 138.2, 134.4, 129.8, 129.1, 55.5, 54.8, 36.5, 26.6, 25.1; ESI-HRMS  $m/z$  218.1540 (Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}$ : 218.1539 [M+H] $^+$ )

遊離のアミン体9 (2.12 mmol) を4M塩酸-1,4-ジオキサン溶液に溶解させ、溶媒を減圧留去して生じた固体をジエチルエーテルに懸濁させ、濾取、洗浄して真空乾燥することで塩酸塩10を無色固体として得た (536 mg, 96%)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  : 10.0 (1H, brs), 8.02 (2H, dd,  $J$  = 7.8, 0.9 Hz), 7.69 (1H, t,  $J$  = 4.8 Hz), 7.58 (2H, dd,  $J$  = 7.8, 7.8 Hz), 3.64 (2H, d,  $J$  = 4.8 Hz), 3.49 (2H, d,  $J$  = 12.0 Hz), 3.38 (2H, d,  $J$  = 5.4 Hz), 2.93 (1H, dd,  $J$  = 10.8, 10.8 Hz), 1.82-1.80 (2H, m), 1.74-1.69 (3H, m), 1.41-1.37 (1H, m);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  : 196.7, 135.9, 133.7,



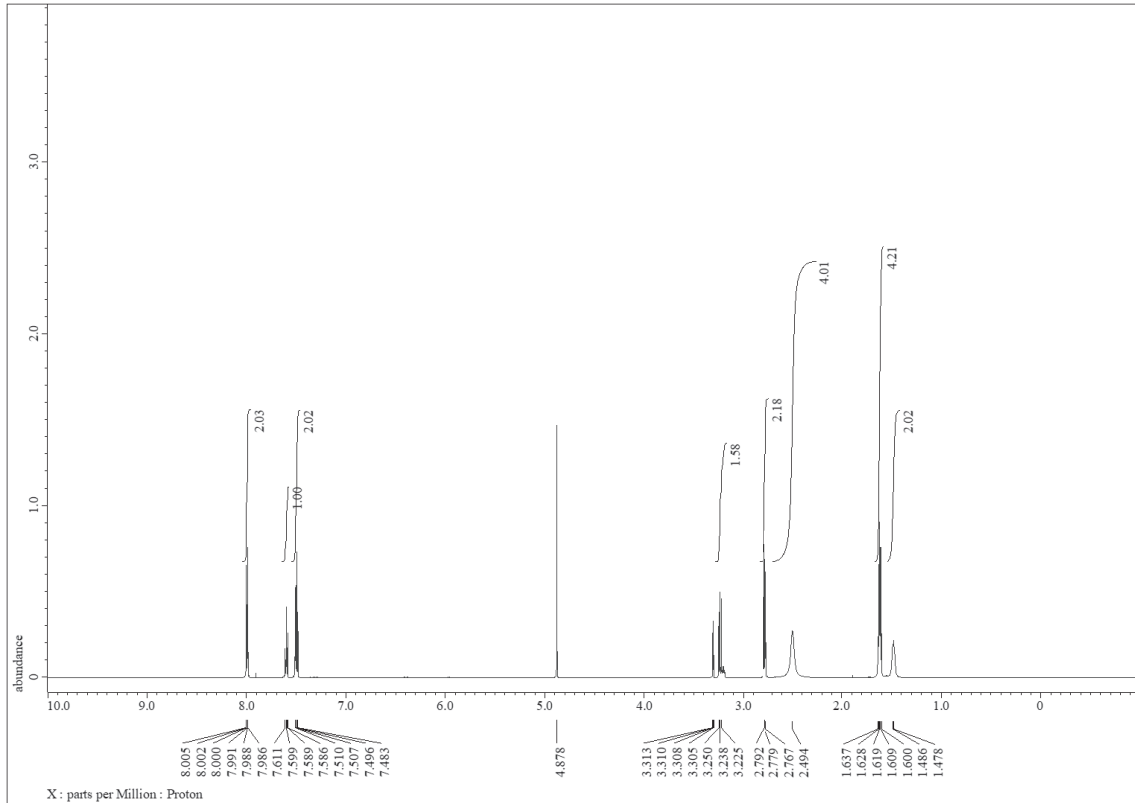


Fig. 9 化合物9の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

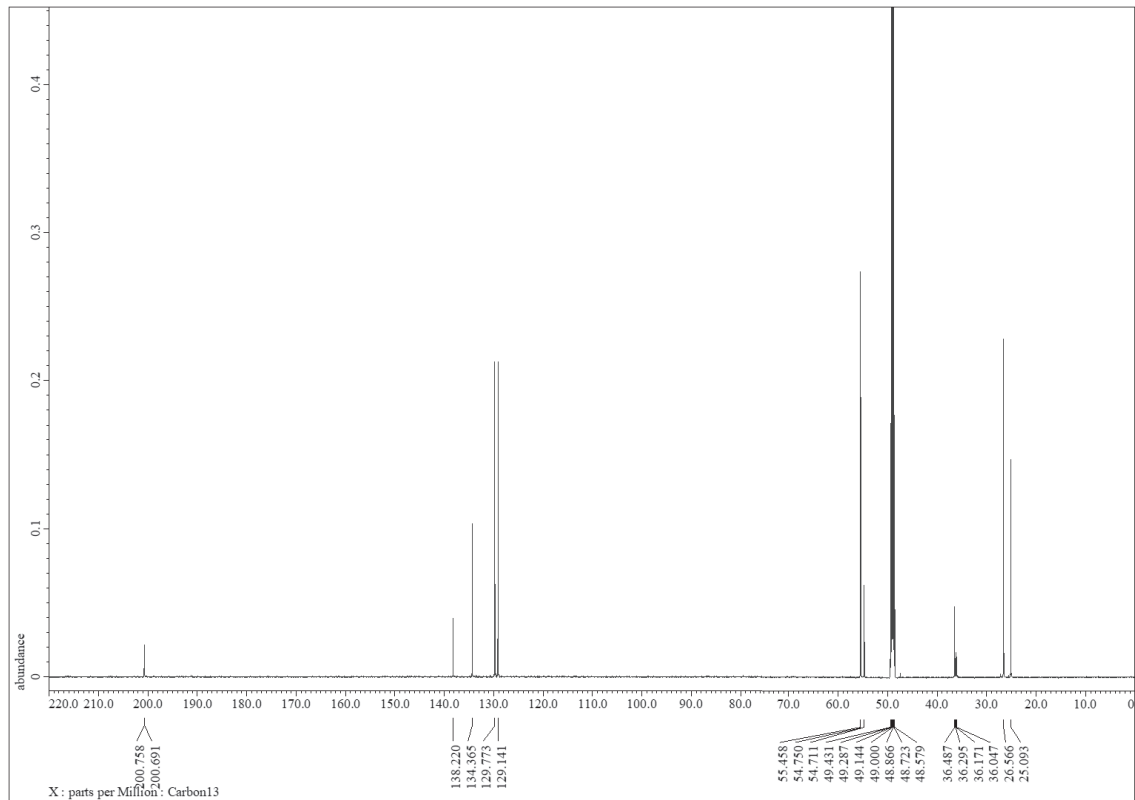


Fig. 10 化合物9の<sup>13</sup>C-NMRスペクトル

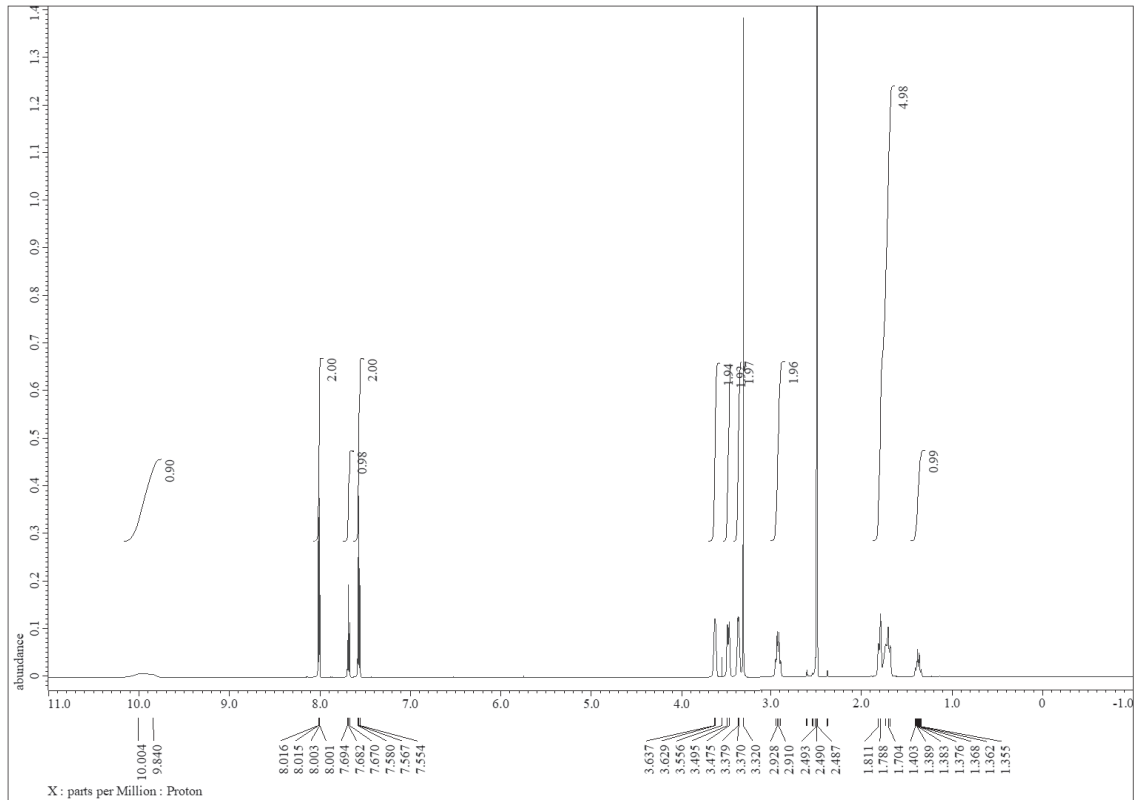


Fig. 11 化合物10の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

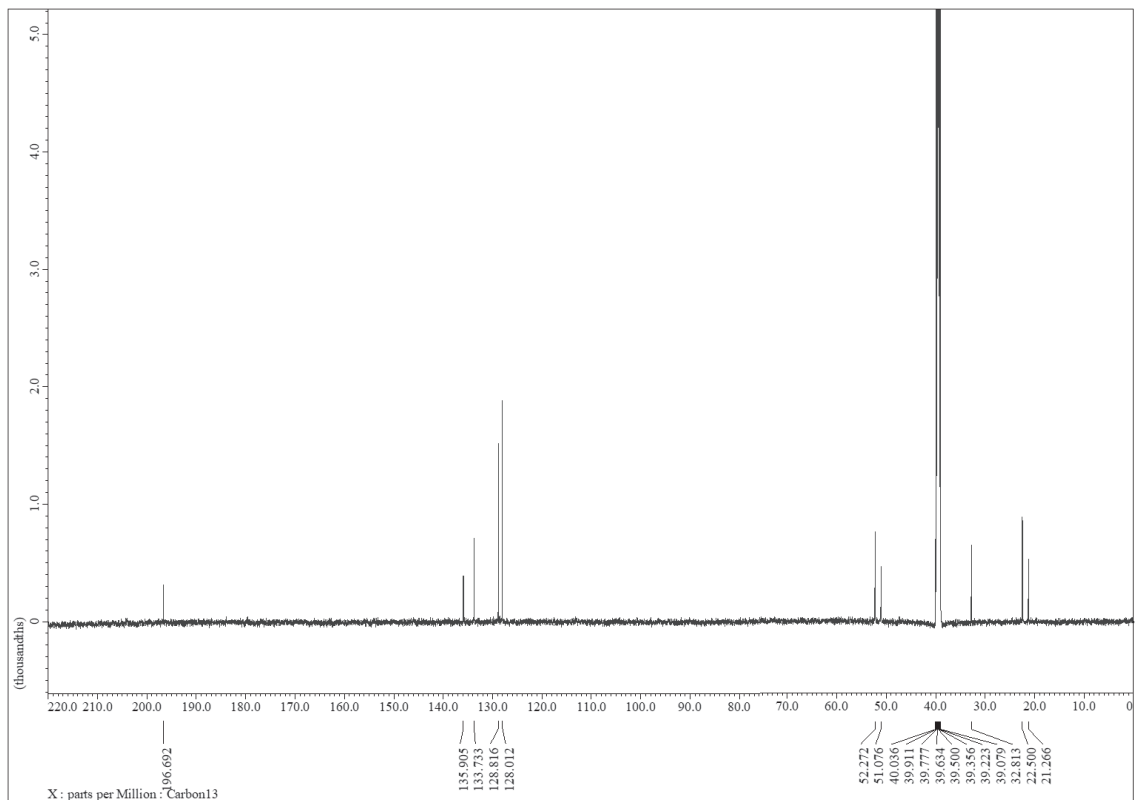


Fig. 12 化合物10の<sup>13</sup>C-NMRスペクトル

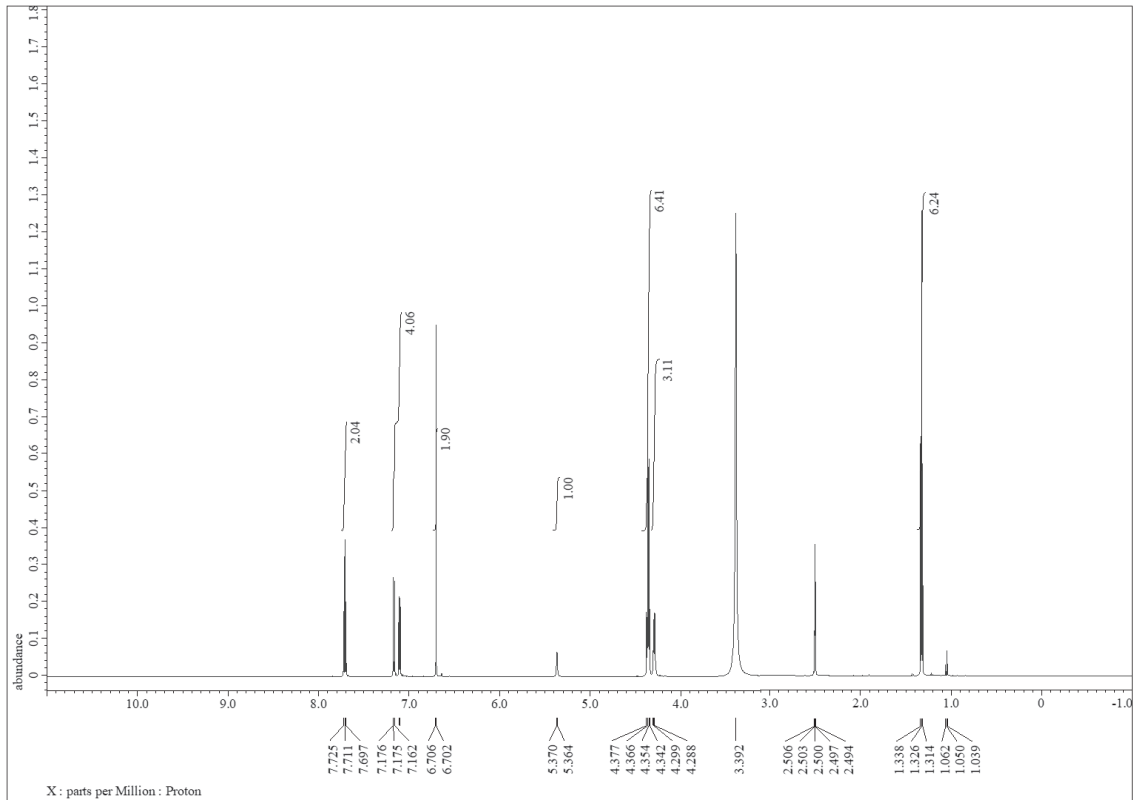


Fig. 13 化合物12の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

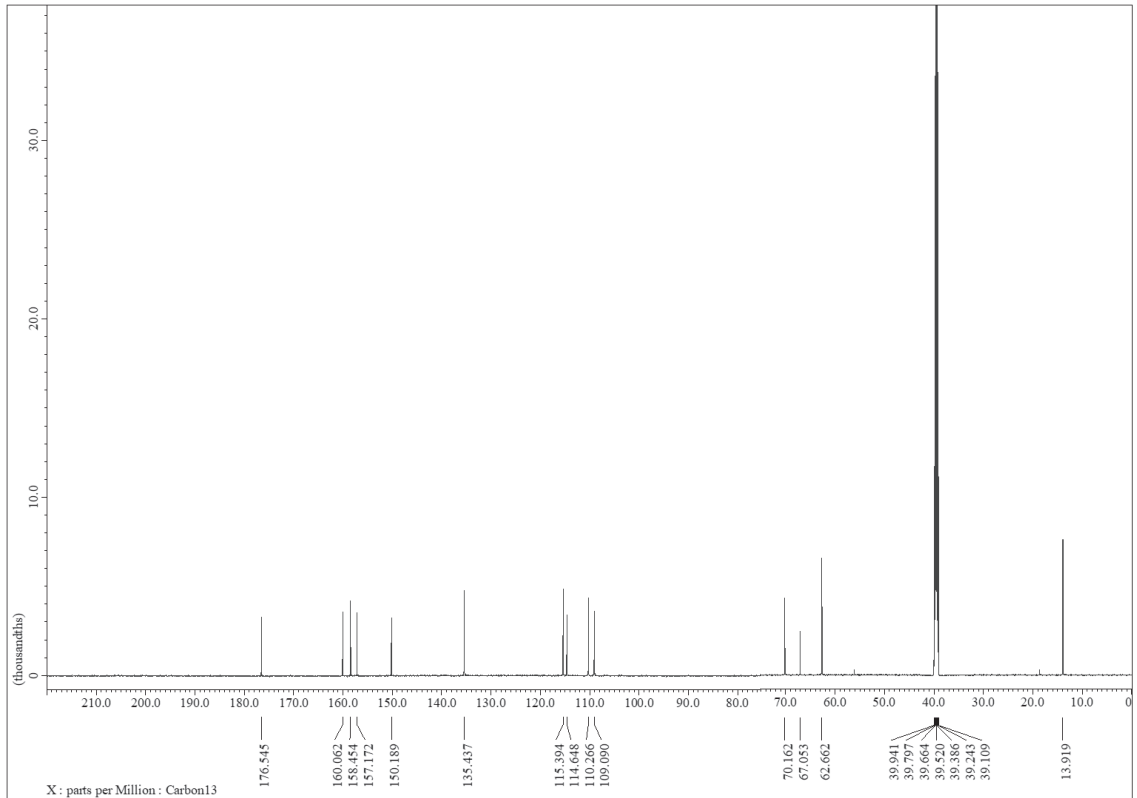


Fig. 14 化合物12の<sup>13</sup>C-NMRスペクトル

128.8, 128.0, 52.3, 51.1, 32.8, 22.5, 21.3; Mp : 199–201°C.

Diethyl 5,5'-((2-hydroxypropane-1,3-diyl) bis (oxy)) bis (4-oxo-4H-chromene-2-carboxylate) (12)

クロモグリク酸ナトリウム (5.12 g, 10.0 mmol) のエタノール懸濁液 (160 mL) に4M塩酸-1,4-ジオキササン溶液 (40 mL) を加えて, 80°Cにて36時間加熱攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 乾固するまで溶媒を減圧留去した. 残渣を熱エタノール (250 mL/g) から再結晶し, 無色綿状結晶固体として得た (4.77 g, 91%). この化合物の一部に対して更に再結晶を行い, 得られた固体をサンプルとした.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 7.70 (2H, dd, *J* = 8.4, 7.8 Hz), 7.17 (2H, dd, *J* = 8.4, 0.6 Hz), 7.10 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.71 (2H, s), 5.37 (1H, d, *J* = 3.6 Hz), 4.38–4.34 (2H, m), 4.36 (4H, d, *J* = 7.2 Hz), 4.31–

4.29 (3H, m), 1.33 (6H, t, *J* = 7.2 Hz) ; <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 176.55, 160.1, 158.5, 157.2, 150.2, 135.4, 115.4, 114.6, 110.3, 109.1, 70.2, 67.1, 62.7, 13.9; ESI-HRMS *m/z* 525.1394 (Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>O<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 525.1391) ; Mp (EtOH) : 182–185°C.

3.5 トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質の qNMRによる純度決定

HPLC分析に使用した試薬及び合成した化合物 (Fig. 7) は<sup>1</sup>H-qNMRによって純度を決定した (Table 5). 代表例として, 類縁物質 A (9) のNMRチャートを Fig. 15に示している. 各試料の定量シグナルは, 不純物由来のシグナルなど妨害ピークが観測されないシグナルを選択した. トリヘキシフェニジル塩酸塩については, 2', 6'位 (7.40, d), 3', 5'位 (7.34, t) 及び4位 (7.24, t) を選択して絶対純度を算出した結果, 99.46% ± 0.26%であった. 今回,

Table 5 <sup>1</sup>H-qNMRにより値付けしたトリヘキシフェニジル塩酸塩及び類縁物質 Aの純度

Sample	NMR solvent	Internal standard	Target signals (ppm)	Average ± S.D. (%) of target signals
Trihexyphenidyl hydrochloride	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-2',6' (7.40, d) H-3',5' (7.34, t) H-4 (7.24, t)	99.46 ± 0.26
類縁物質 A (9)	MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	1,4-BTMSB- <i>d</i> <sub>4</sub>	H-2',6' (8.05, d) H-4' (7.72, t) H-3',5' (7.60, t)	99.39 ± 0.26*

\*分解物が確認されている条件下であるため, 参考値として記載している.

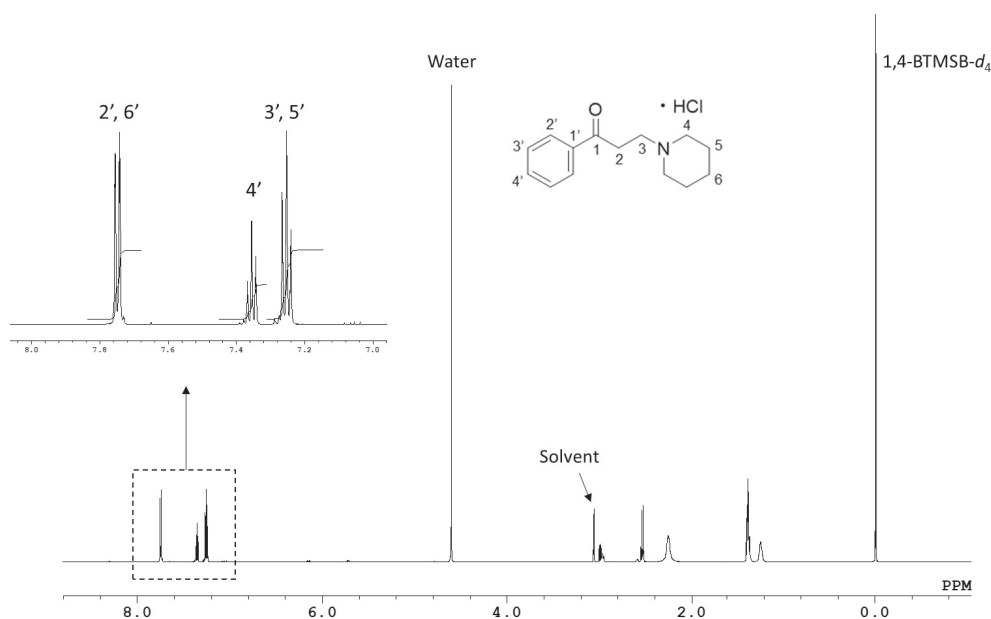


Fig. 15 トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質 A(9)の<sup>1</sup>H-qNMRスペクトル (MeOH-*d*<sub>4</sub>)

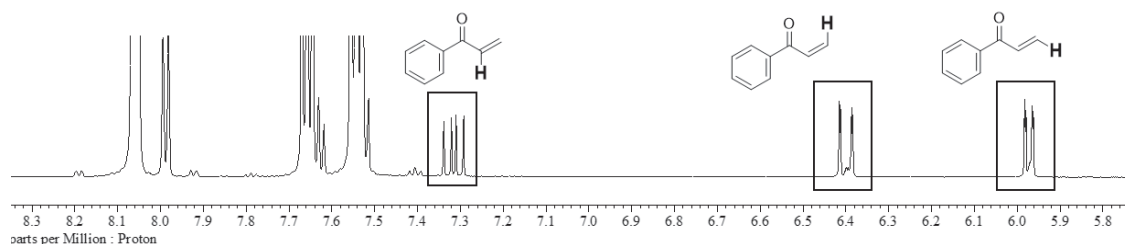


Fig. 16 溶液中における10の経時的な分解  
<sup>1</sup>H-NMRチャート (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 室温, 2時間)

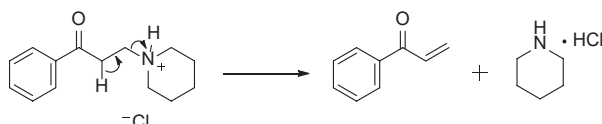


Fig. 17 10から生じた分解産物の推定生成機構

類縁物質Aは塩酸塩10とすることで固体化できたため、保存や秤量における取り扱いが容易となった。しかしながら、NMR測定の結果から塩酸塩10は溶液中での経時的な分解が観測された (Fig. 16)。<sup>1</sup>H-NMR測定の結果から、Fig. 17に示すような反応が起きていることが推測された。この経時的な分解反応は重ジメチルスルホキシドの他、複数の測定溶媒中においても確認された。一方で遊離のアミン体である9では観測されなかったことから、この顕著な分解反応はアミン塩の溶液中における特有の現象であることが分かった。そのため類縁物質Aをアミン塩として使用する場合には、溶液中での安定性について検討する必要があることが分かった。

### 3.6 クロモグリク酸ナトリウム類縁物質のqNMRによる純度決定

HPLC分析に使用した試薬及び合成した化合物 (Fig. 8) は<sup>1</sup>H-qNMRによって純度を決定した (Table 6)。代表例として、類縁物質B (12) のNMRチャートをFig. 18に示している。各試料の定量シグナルは、不純物由来のシグナルなど妨害ピークが観測されないシグナルを選択した。クロモグリク酸ナトリウムにおいては芳香環のプロトン (7位 (7.65, t), 8位 (7.16, d), 6位 (7.04, d) 及び3位 (6.50, s)) を定量シグナルとして選択し純度を求めた結果、絶対純度は83.93% ± 0.46%と算出された。今回使用したクロモグリク酸ナトリウムは試薬会社から購入した試薬 (純度98%) であり、<sup>1</sup>H-NMRから、水以外の不純物は検出されなかったことから測定に供したサンプルは吸湿していたことが考えられた。JP17記載の方法 (乾燥減量; 減圧, 105°C, 4時間) でサンプルを乾燥させた後、乾燥重量を測定して計算したところ、qNMR測定で得られた純度と良く一致した。このことからクロモグリク酸ナトリウムのqNMRでの純度の値付けが適切に実施できていると考えられた。また類縁物質A (11) については

Table 6 <sup>1</sup>H-qNMRにより値付けしたクロモグリク酸ナトリウム及び類縁物質A-Bの純度

Sample	NMR solvent	Internal standard	Target signals (ppm)	Average ± S.D. (%) of target signals
Sodium cromoglycate	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-7 (7.65, t) H-8 (7.16, d) H-6 (7.04, d) H-3 (6.50, s)	83.93 ± 0.46
類縁物質A (11)	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-4 (7.27, t) H-3,5 (6.39, d)	99.29 ± 0.34
類縁物質B (12)	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	H-7 (7.75, t) H-15 (1.34, t)	94.90 ± 0.18

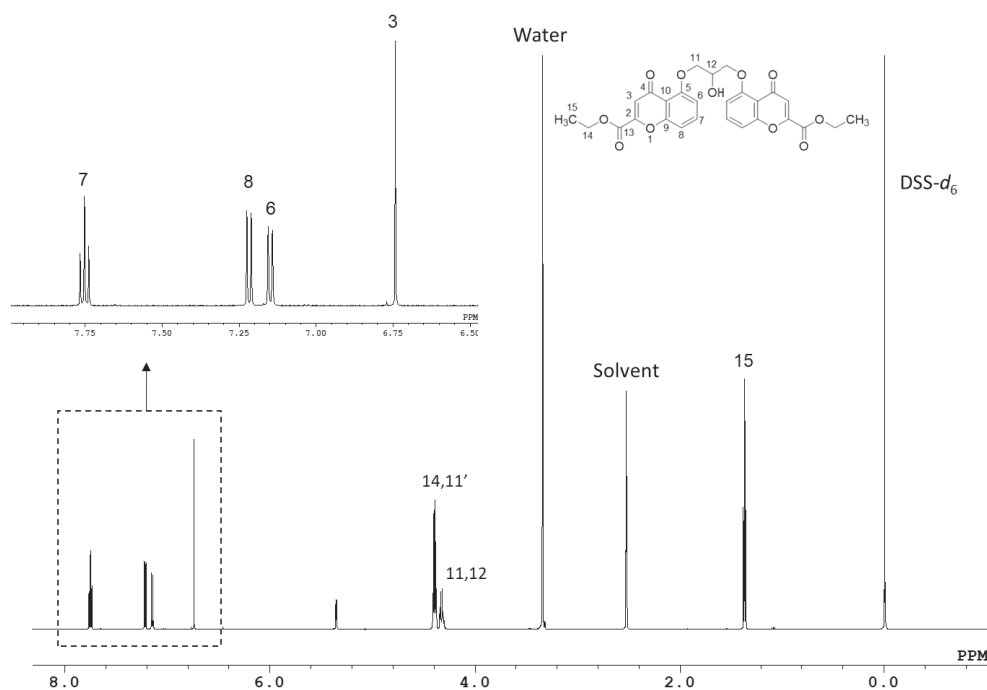


Fig. 18 クロモグリク酸ナトリウム類縁物質B(12)の<sup>1</sup>H-qNMRスペクトル (DMSO-d<sub>6</sub>)

Table 7 USP (USP42-NF37) と本研究で使用したHPLC条件の比較

	USP condition	USP modified condition (This study)
1) Column	ODS, 3.9 × 150 mm, 5 μm	ODS, 4.6 × 150 mm, 5 μm
2) Column temperature	30°C	40°C
3) Mobile phase	A : 0.1% triethylamine in water (adjust to pH 4.0 with phosphoric acid) B : acetonitrile	A : 0.1% triethylamine in water (adjust to pH 3.8 with phosphoric acid) B : acetonitrile
4) Gradient table (Solution B conc.)	A/B = 25 : 75 (isocratic)	20% to 55% (0-20 min)
5) Flow rate	1.0 mL/min	1.0 mL/min
6) Detection	210 nm	210 nm

4位 (7.27, t) 及び3.5位 (6.39, d) を定量シグナルとした結果、絶対純度は99.29 ± 0.34%であった。類縁物質B (12) については7位 (7.75, t) 及び15位メチルプロトン定量シグナルとした結果、絶対純度は94.90 ± 0.18%であった。

### 3.7 トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質のHPLC分析

トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質のHPLC分析においては、まずUSP (USP42-NF37) に記載の分析条件<sup>14)</sup> (Table 7左, USP condition) を参考に実施した。

USP記載の移動相グラジエントでは化合物の保持が不良であり分析が困難であったため、移動相のグラジエントを変更した条件にて分析を検討した。結果として、Table 7右に示すグラジエント条件 (USP modified condition) にて、トリヘキシフェニジル塩酸塩と類縁物質Aとの一斉分析が実施可能であった (Fig. 19, Table 8)。

### 3.8 クロモグリク酸ナトリウム類縁物質のHPLC分析

クロモグリク酸ナトリウム類縁物質のHPLC分析では、当初、ODSカラムを使用し、蒸留水とアセ

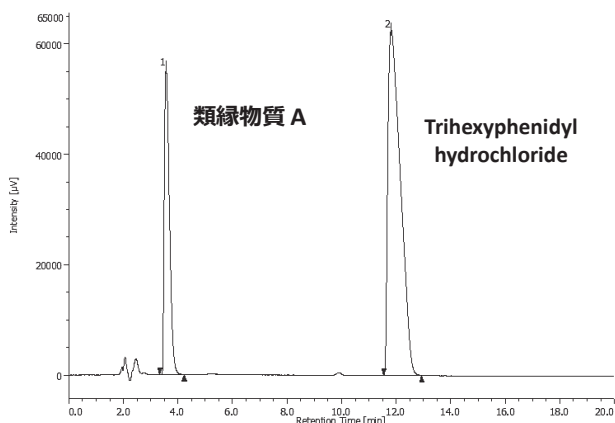


Fig. 19 トリヘキシフェニジル塩酸塩及び類縁物質AのHPLCによる一斉分析（USP改変法）

トニトリルを移動相とした条件にて分析を実施した。しかしながら、この条件ではクロモグリク酸ナトリウムのピークが保持されず保持時間が安定しない結果となった。これはクロモグリク酸ナトリウムがカルボン酸構造を有することから、緩衝能のない移動相中においてはカルボキシル基のイオン形と分

Table 8 HPLCクロマトグラム上の各ピークの保持時間及び分離度

Specific peaks	Retention time (min)	Resolution
類縁物質 A (9)	3.6	13.2
Trihexyphenidyl hydrochloride	11.8	N/A

N/A : Not available

子系が混在しているためと考えられた。そこで、カルボキシル基のプロトン (H<sup>+</sup>) の解離を抑制するために酸性 (pH2.0) の移動相 (Table 9) を使用し、低pH条件に耐性のあるODSカラムを用いて分析したところ、ピークの保持を改善することができた。この条件を類縁物質との一斉分析に適用すること

Table 9 クロモグリク酸ナトリウム及び類縁物質のHPLC分析条件

Conditions	
1) Column	ODS (resistant to acidic pH ~2), 4.6 × 250 mm, 5 μm
2) Column temperature	40°C
3) Mobile phase	A : 20 mm sodium phosphate (adjust to pH 2.0 with phosphoric acid) B : acetonitrile
4) Gradient table (Solution B conc.)	0% to 20% (0-5 min), 20% to 100% (5-10 min), 100% hold (10-30 min)
5) Flow rate	1.0 mL/min
6) Detection	230 nm

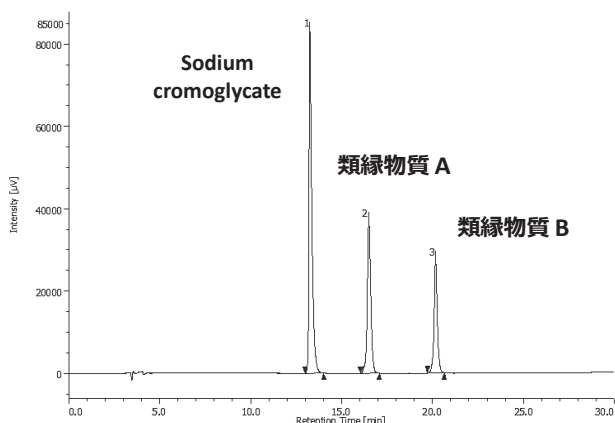


Fig. 20 クロモグリク酸ナトリウム及び類縁物質A, BのHPLCによる一斉分析

Table 10 HPLCクロマトグラム上の各ピークの保持時間及び分離度

Specific peaks	Retention time (min)	Resolution
Sodium cromoglycate	13.6	11.0
類縁物質 A (11)	16.8	11.5
類縁物質 B (12)	20.3	N/A

N/A : Not available

で、各化合物の完全分離を達成できた (Fig. 20, Table 10).

## 4 結語

筆者らは、「有害試薬の可及的排除」と並び重要な課題である「JPの国際化」を目指し、令和2年度は、定量法としてJPでは電位差滴定法、USP、EPではHPLC法が設定されているロラゼパムをモデルとし、JPにおけるHPLC法設定に向けた検討を行った。合成した各類縁物質の純度決定は<sup>1</sup>H-qNMRにより行い、それらの純度は88~99%であった。これらの化合物についてHPLC上での各類縁物質の分離条件について検討した結果、PBrを固定相としたカラムを使用し、EPの分析条件を改変することで、各化合物の一斉分析による完全分離を達成できた。また、この分析条件はロラゼパム製剤の分析においても適用可能であることが明らかとなった。更に、トリヘキシフェニジル塩酸塩及びクロモグリク酸ナトリウムについても同様の試験法の検討を行うために、各類縁物質の合成、qNMR測定による純度決定及びHPLCによる一斉分析を実施した。分析条件を検討した結果、各化合物のHPLC上での完全分離条件を見出すことができた。トリヘキシフェニジル塩酸塩類縁物質Aについてはアミン塩酸塩とすることで溶液中での安定性が低下したものの、保管や秤量などにおいては固体として取り扱い可能であることが望ましい。今後は塩酸とは異なる酸により適切な塩を調整し、溶液中においても安定な標品の調製についても検討したい。

### 文 献

- 1) 第十八改正日本薬局方作成基本方針. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000->

Iyakushokuhinkyoku/jp18kihonsousin.pdf, (accessed 2020-11-08).

- 2) Maniwa, A.; Tsuji, G.; Ito, T.; Uchiyama, N.; Hosoe, J.; Ohtsuki, T.; Matsufuji, T.; Demizu, Y.; Goda, Y. Changes in Test Methods for Internationalization in the Japanese Pharmacopoeia (Part 1): Establishment of a Quantitative Test Method for Clonidine Hydrochloride Using HPLC Analysis. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2021, **141**, p.591-598.
- 3) 出水庸介, 辻巖一郎, 合田幸広. 日本薬局方各条における有害試薬の可及的排除に関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2019, **50** (5), p.280-285.
- 4) 辻巖一郎, 出水庸介, 合田幸広. 薬局方各条における有害試薬の可及的排除に関する研究 (第2報). 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2020, **51** (11), p.618-627.
- 5) 第十七改正日本薬局方. クロニジン塩酸塩, p.727-728, 厚生労働省告示第64号, 平成28年3月7日.
- 6) United States Pharmacopoeia, the National Formulary (USP42-NF37), p.1081-1082.
- 7) European Pharmacopoeia 9.0, p.2127-2128.
- 8) 第十七改正日本薬局方. ロラゼパム, p.1726, 厚生労働省告示第64号, 平成28年3月7日.
- 9) Maniwa, A.; Tsuji, G.; Ito, T.; Uchiyama, N.; Hosoe, J.; Ohtsuki, T.; Matsufuji, T.; Demizu, Y.; Goda, Y. Changes in Test Methods for Internationalization in the Japanese Pharmacopoeia (Part 2): Establishment of a Quantitative Method for Lorazepam Using HPLC Analysis. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2021, **141**, p.961-970.
- 10) 第十七改正日本薬局方. トリヘキシフェニジル塩酸塩, p.1152, 厚生労働省告示第64号, 平成28年3月7日.
- 11) 第十七改正日本薬局方. クロモグリク酸ナトリウム, p.738, 厚生労働省告示第64号, 平成28年3月7日.
- 12) United States Pharmacopoeia, the National Formulary (USP42-NF37), p.2629-2635.
- 13) European Pharmacopoeia 9.0, p.2924-2925.
- 14) United States Pharmacopoeia, the National Formulary (USP42-NF37), p.4477-4481.