

スピロノラク톤錠の溶出試験に用いるポリソルベート80の品質に関する研究*2

川口 正美*1, #, 土井 崇広*1, 東 雄貴*1, 田中 未紗*1, 田上 貴臣*1

(受付：令和4年10月28日, 受理：令和5年2月9日)

Study on the Quality of Polysorbate 80 Used for Dissolution Test of Spironolactone Tablets*2

Masami KAWAGUCHI*1, #, Takahiro DOI*1, Yuki AZUMA*1, Misa TANAKA*1
and Takaomi TAGAMI*1

Summary

Dissolution tests of spironolactone tablets were conducted by UV-visible spectrophotometry using six different polysorbate 80 (PS80) reagents purchased, which were conformed to the specification of The Japanese Pharmacopoeia. Four of six PS80 were used in the dissolution media, spironolactone could not be measured due to interference by high absorbance around 230 nm, which is derived from the used PS80 reagents.

On the other hand, the HPLC method was able to measure spironolactone in the PS80 solution used for dissolution medium without any particular interference.

Analysis of these PS80 samples by LC-PDA and LC-QTOFMS revealed that there were differences in chromatographic patterns between products, which showed high absorbance around UV 230 nm or not.

In addition, ¹H-NMR measurements demonstrated some characteristic signals in the product with high absorbance around UV230 nm.

To use PS80 a test solution for dissolution test employing UV-visible spectrophotometry as the measurement method, it was necessary to confirm PS80 have no interference at the measurement wavelength. In case any interference are observed, it may be preferable to perform dissolution tests using HPLC as the detection method.

Key words

Polysorbate 80, Spironolactone tablet, Dissolution test, UV spectrum, LC-PDA, LC-QTOFMS, ¹H-NMR

1. 緒言

医薬品の規格試験や生物学的同等性ガイドライン

で用いる溶出試験において、対象成分が難水溶性の場合には試験液に界面活性剤を添加することが認められており、最初に選択する界面活性剤としてはポ

*1 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 大阪市東成区中道1-3-3 (〒537-0025)

Osaka Institute of Public Health, 1-3-3 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, 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3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。

責任著者 Corresponding author

リソルベート80 (PS80) が規定されている¹⁻³⁾。

著者らはこれまで溶出試験に用いる界面活性剤に関する研究を行ってきた⁴⁻⁶⁾。PS80について市販の試薬を用い、溶出性への影響及び第十六改正日本薬局方(日局16)の医薬品各条(各条)等に規定する品質の比較を行ったところ、溶出性の検討を行ったナブメトン錠、リボフラビン酪酸エステル錠及びア ril エストレノール錠については、PS80の製品間で溶出性への差は確認されなかったが、PS80の品質のうち、酸価及びHPLCクロマトグラムのパターンには差が認められた⁶⁾。

スピロラクトン (Sp) 錠は、日局16で各条に記載されており、溶出試験の試験液にはPS80を添加している。日局18 Sp錠溶出試験では、試料溶液の測定に吸光度法(UV法)を採用しているが⁷⁾、使用するPS80によっては260nm付近の吸収が測定結果に影響を及ぼす可能性が報告されている⁸⁾。

Sp錠の試験に用いるPS80は、Sp錠の日局16記載後の日局16第二追補において、国際調和により規格の一部が変更された⁹⁾。このため、規格変更後のPS80を用いたSp錠の溶出試験において、PS80が測定結果に影響を与えることが懸念された。そこで、現在流通しているPS80がSp錠の溶出試験に与える影響について検討を行うこととした。

2. 実験方法

2.1 試薬等

PS80；以下に示す6種類(PS80-A~F)。PS80-A:ポリソルベート80(HX2)(日油株式会社製,3局適合),ポリソルベート80(純正化学株式会社製,日本薬局方(製造)),ポリソルベート80(関東化学株式会社製,医薬品試験用),Tween 80(Polysorbate)EMPROVE(Merck製,Ph.Eur.,JP,NF),Polysorbate 80 VG(SERVA Electrophoresis GmbH製,Ph.Eur.,USP/NF),Tween 80(USP-NF,BP,Ph.Eur.)pure(AppliChem GmbH製,pharma grad)。

使用したPS80は、製造者の試験成績書を確認するか、実際に試験を実施することで、すべて日局18の各条に適合することを確認した。

Sp錠；アルトダクトンA錠50mg(ファイザー株式会社製,製造番号FG4954)を使用した。

標準品；Sp標準品(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製,日本薬局方標準品)

その他の試薬；エタノール(95)(試薬特級),メタノール(LC/MS用),アセトニトリル(LC/MS用),ギ酸(LC/MS用),ジメチルスルホキシド-*d*₆,99.9%(0.05vol%TMS含有)(NMR用)

上記について製造業者名の記載がないものは、全て富士フイルム和光純薬株式会社製を使用した。

2.2 使用機器

溶出試験装置：RT-3 Auto Dissolution System,大日本精機製,紫外可視分光光度計：UV-1900i,島津製作所製,液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出器(LC-PDA)：①LC-2040C 3D Plus,島津製作所製,②LC-2030C 3D Plus,島津製作所製,液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析計(LC-QTOFMS)：LC部1290VL Infinity,質量分析部6530B Q-TOF LC/MS,Agilent Technologies製,NMR：ECZS-400,JEOL製

2.3 Sp錠の溶出試験

日局18⁷⁾に従い、溶出試験を実施した。条件；パドル法,毎分50回転,試験液；6種類の0.2%PS80溶液を45℃2時間加温し,脱気を行った。試験時間；溶出試験開始5,10,15,30,45,60,90分。試料溶液；それぞれの時間に採取した溶出液を試験液で4倍に希釈した。標準溶液；標準品を乾燥(105℃,2時間)し,約28mgをエタノール(95)20mLで溶かし,0.2%PS80溶液で正確に100mLとした。この液5mLを正確にとり,0.2%PS80溶液で正確に100mLとした。

測定条件；①UV法 測定波長 243nm

②HPLC法⁷⁾ Sp錠の定量法の一部(測定波長及び注入量)を変更し,次の通りとした。波長範囲；200~400nm(表示波長243nm),カラム；YMC-Pack ODS A-302(4.6×150mm,5μm),カラム温度；25℃,移動相；メタノール/水(3:2),流量；1.27mL/min,注入量；50μL。試料溶液の測定前に標準溶液の20,40,60,80,100,120,140%の溶液を用い,直線性を確認した。

試料溶液及び標準溶液について,UV法とHPLC法で吸光度及びピーク面積値を測定し,溶出率を算出した。なお,溶出率はすべてn=6の平均値とし

た。

2.4 紫外吸収スペクトルの測定

測定溶液：①Sp標準溶液（対照：0.2%PS80溶液），②0.2%PS80溶液（対照：水），③0.02%PS80溶液（対照：水），測定波長範囲；200～400 nm

2.5 PS80のLC分析

検出器1及び検出器2を用い，以下の条件¹⁰⁾で測定を行った。

試料溶液；PS80 10 μ Lにアセトニトリル：水（1:9）5 mLを加え，よく攪拌した。測定条件 カラム；Waters Acquity UPLC Protein BEH C4（2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m），移動相A；0.1%ギ酸水溶液，移動相B；アセトニトリル，グラジエント条件；Bの濃度10%→100%（0→15 min）→100%→10%（15→15.5 min）→10%（15.5→35min），流量0.4 mL/min，カラム温度35 $^{\circ}$ C，注入量2 μ L。

検出器1；PDA検出器，測定範囲190～400 nm，検出波長243 nm

検出器2；QTOFMS検出器，MS条件 イオン化法；ESI法，ポジティブモード，スキャンモード走査範囲； m/z 100-3000，ネブライザー；30 psig，フラグメンター電圧；380 V，Vcap電圧；3000 V，乾燥ガス流量；14 L/min，乾燥ガス温度；200 $^{\circ}$ C，シースガス温度；300 $^{\circ}$ C，シースガス流量；12 L/min，キャピラリー電圧；4000 V，ノズル電圧；500 V

2.6 $^1\text{H-NMR}$ 分析¹⁰⁾

試料溶液；PS80 20 mgをとり，DMSO- d_6 600 μ Lで溶解した溶液をNMR測定に用いた。測定条件；データポイント16384，スペクトル範囲-2.5～12.5 ppm，積算回数8回，測定温度25 $^{\circ}$ C。

3. 実験結果

3.1 溶出試験及びUV吸収スペクトル

溶出試験液にPS80-A及びPS80-Bを添加し，UV法で測定した場合の溶出試験結果をFig. 1に示した。これら2種類以外のPS80を使用した場合，標準溶液及び試料溶液の両方について，測定中に吸光度が大きく変動し，安定した吸光度を測定することができなかった。そこで6種類の0.2%PS80溶液で希

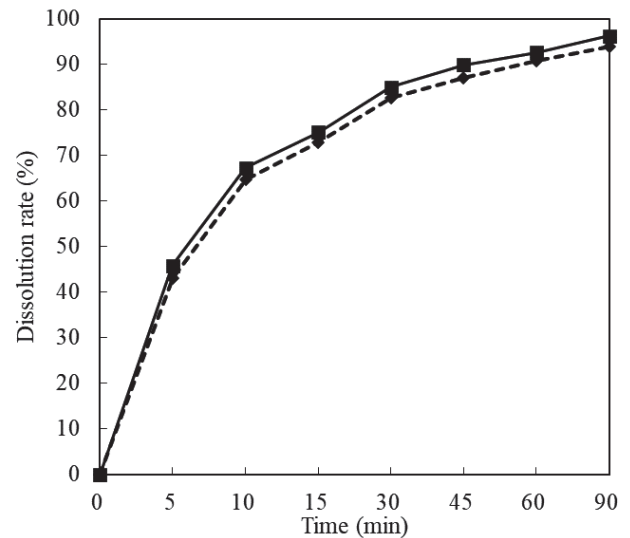


Fig. 1 Dissolution Profile of Spirinolactone Tablets Using UV Method (■ PS80-A, ◆ PS80-B)

釈した標準溶液について，それぞれ希釈に用いた0.2%PS80溶液を対照として吸収スペクトルを測定した。PS80-A又はPS80-Bを用いて調製した標準溶液のスペクトルが日局18の参照紫外可視吸収スペクトル¹¹⁾と同様の形状を示したのに対し，PS80-C～Fの吸収スペクトルは250 nm以下の形状が大きく異なっていた（Fig. 2）。

また，0.2%PS80溶液の吸収スペクトルを測定したところ，PS80-A以外は250 nm付近から低波長側に非常に強い吸収が認められた（Fig. 3a）。それぞ

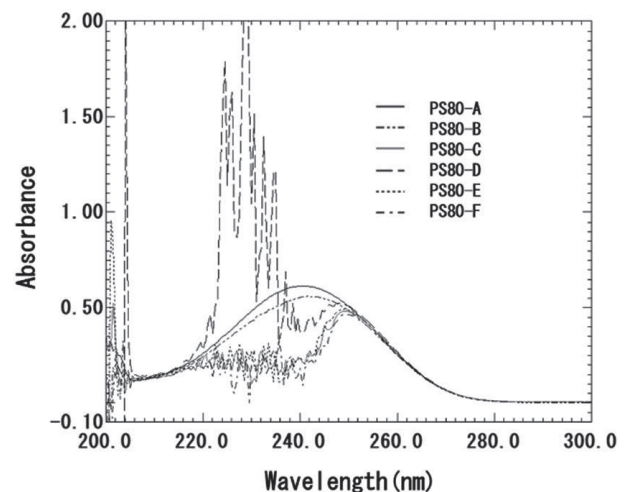


Fig. 2 Differences in UV Spectra of Spirinolactone Standard Solutions (14 μ g/mL) Prepared with Each PS80 Solution

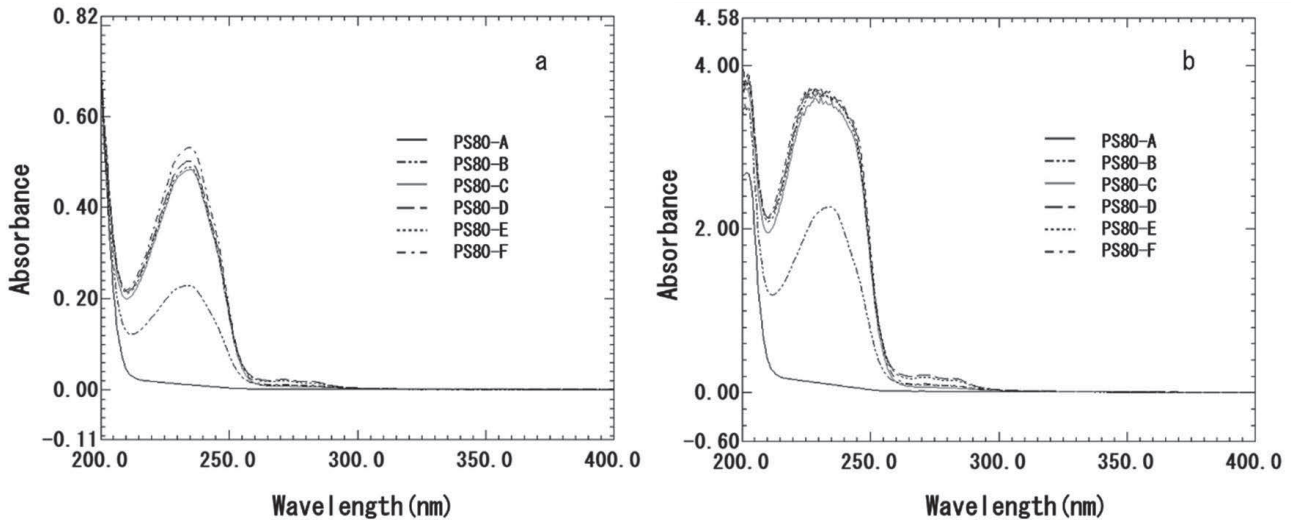


Fig. 3 Differences in UV Spectra of PS80
a) 0.2% solution b) 0.02% solution

れの吸収スペクトル上で243nmの吸光度を検出すると、PS80-Aが0.061であるのに対し、PS80-Bは1.648、PS80-C～Fの吸光度は3.161～3.330であった。PS80-C～Fの場合、230～250nm付近において使用機器のダイナミックレンジを越えており、スペクトル形状が確認できなかった。そこで、10倍に希釈した0.02%PS80溶液の吸収スペクトルを測定したところ、吸収の極大値が234nmを示す吸収スペクトルを示した (Fig. 3b)。

一方、溶出試験液に6種類のPS80を添加し、HPLC法で測定した場合の溶出試験結果をFig. 4aに示した。各条の規格である30分後の溶出率は、溶出曲線上の数値でPS80-A～Fでそれぞれ84、81、84、80、85、82%を示し、各条の規格に適合した。PS80-Aを基準として、他のPS80を用いた場合の溶出率を比較すると、PS80-Aと同程度の溶出率を示すもの (PS80-C及びE) 及びPS80-Aより低い溶出率を示すもの (PS80-B、D、F) が存在した。

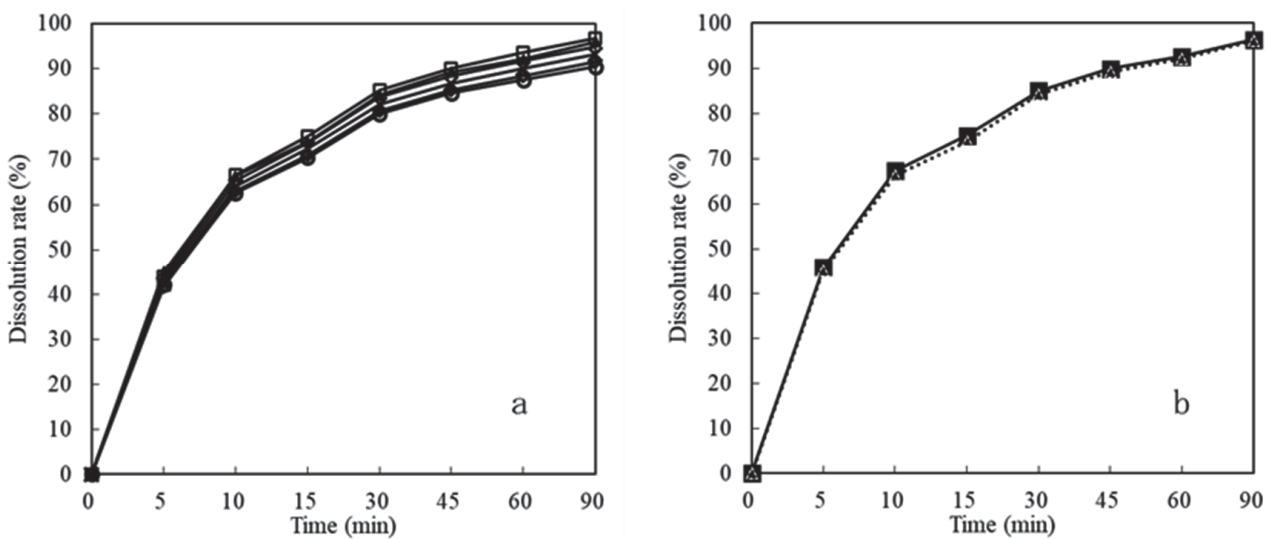


Fig. 4a Differences in Dissolution Profiles between Different PS80 Using HPLC Method
(△ PS80-A, ◇ PS80-B, * PS80-C, ○ PS80-D, □ PS80-E, × PS80-F)
Fig. 4b Dissolution Profile Using PS80-A
(■ UV method, △ HPLC method)

吸光度が高いPS80を用いると、製剤の溶出率が高くなる等、特定の傾向は確認されなかった。UVクロマトグラムには、Spのピークの極大波長とほぼ等しい243 nmを用い、注入量を50 μ Lとした。

なお、PS80-Aの場合、UV法及びHPLC法で溶出曲線が一致した (Fig. 4b)。

3.2 PS80のLC分析

PS80の品質を比較するためにLC分析を行った。LC分析の移動相に添加したギ酸は243 nmに吸収を持つため、PDA検出器を用いた測定においては、ブランク溶液 (PS80の希釈溶液である水:アセトニトリルの混液) のクロマトグラムを減算し、243 nmにおけるクロマトグラムを示した (Fig. 5)。その結果、PS80-Aではほとんどピークが確認できなかったが、PS80-B~Fにおいては8.5分~16分にピークが確認された。それぞれのピークのスペクトルのうち、代表例として、PS80-Fの9.6分のUVスペクトルをFig. 5aに示した。PS80-B~Fのクロマトグラ

ム上で確認できたピークの多くが232.2 nmに吸収極大を示すスペクトル形状であった。また、それぞれのクロマトグラムのピーク面積値の合計を比較すると、PS80-Aの面積値に対して、PS80-Bは約20倍、PS80-C~Fは約60~80倍のピーク面積値であった。

また、QTOFMS検出器を用いて、PS80の各条において含量比を規定される脂肪酸7種、ミリスチン酸、パルミトレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、リノール酸、オレイン酸、ステアリン酸のマーカイオンである m/z 255.23, 281.25, 283.26, 305.25, 307.26, 309.28及び311.29で抽出したイオンクロマトグラムを確認した。その結果、リノール酸のマーカイオンを示す m/z 307.26の抽出イオンクロマトグラムにおいて、PS80-Aとそれ以外のPS80の間で最も大きな違いが認められた (Fig. 6)。

3.3 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定

6種類の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを確認すると、

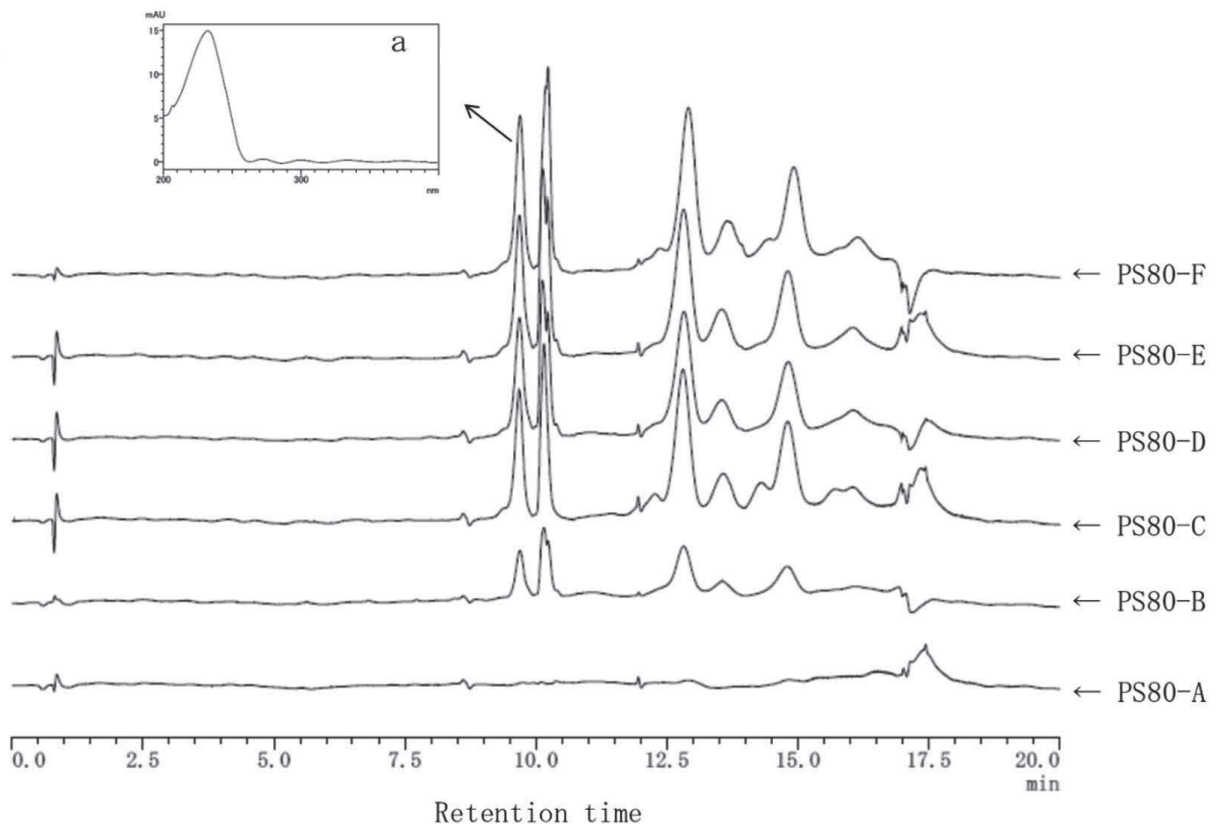


Fig. 5 Chromatogram of PS80 in acetonitrile/water (1:9) Solution (0.2 vol%) Minus Blank Solution at 243 nm

Fig. 5a UV Spectrum of the 9.6 min Peak in the Chromatogram of PS80-F

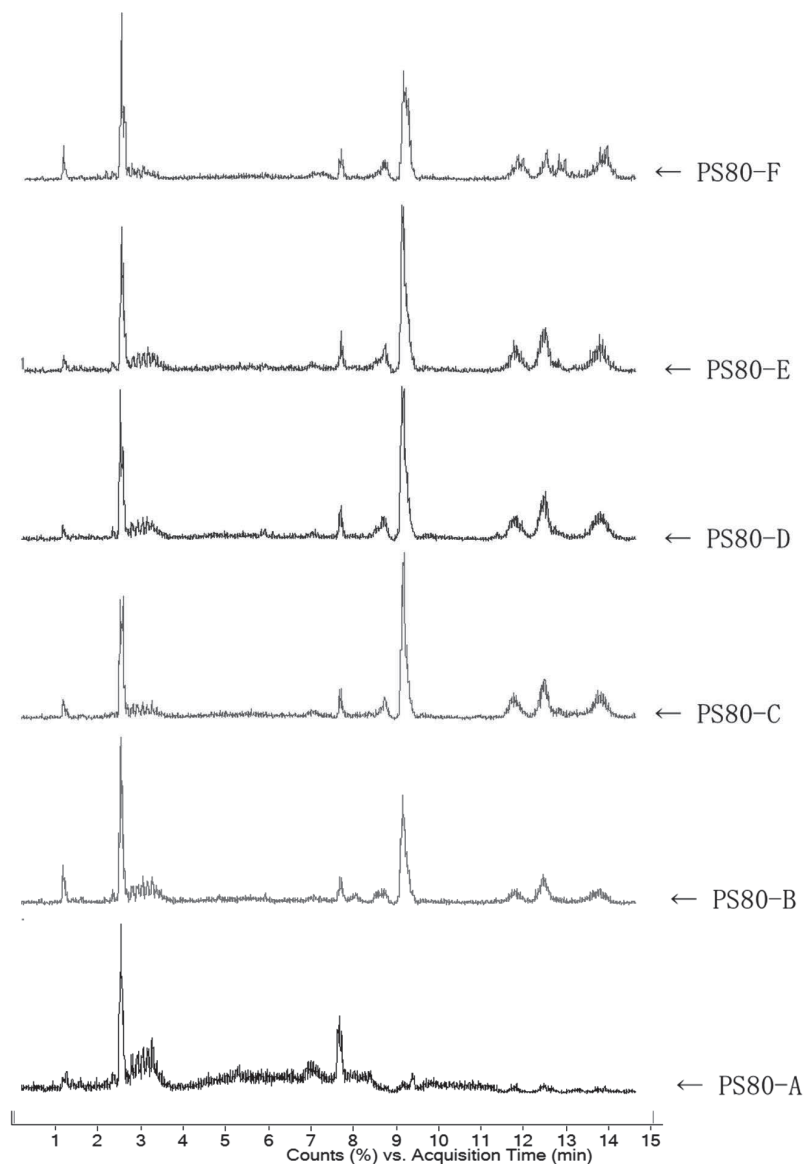


Fig. 6 Extracted Ion Chromatogram of PS80 in acetonitrile/water (1:9) Solution (0.2 vol%) (m/z 307.26)

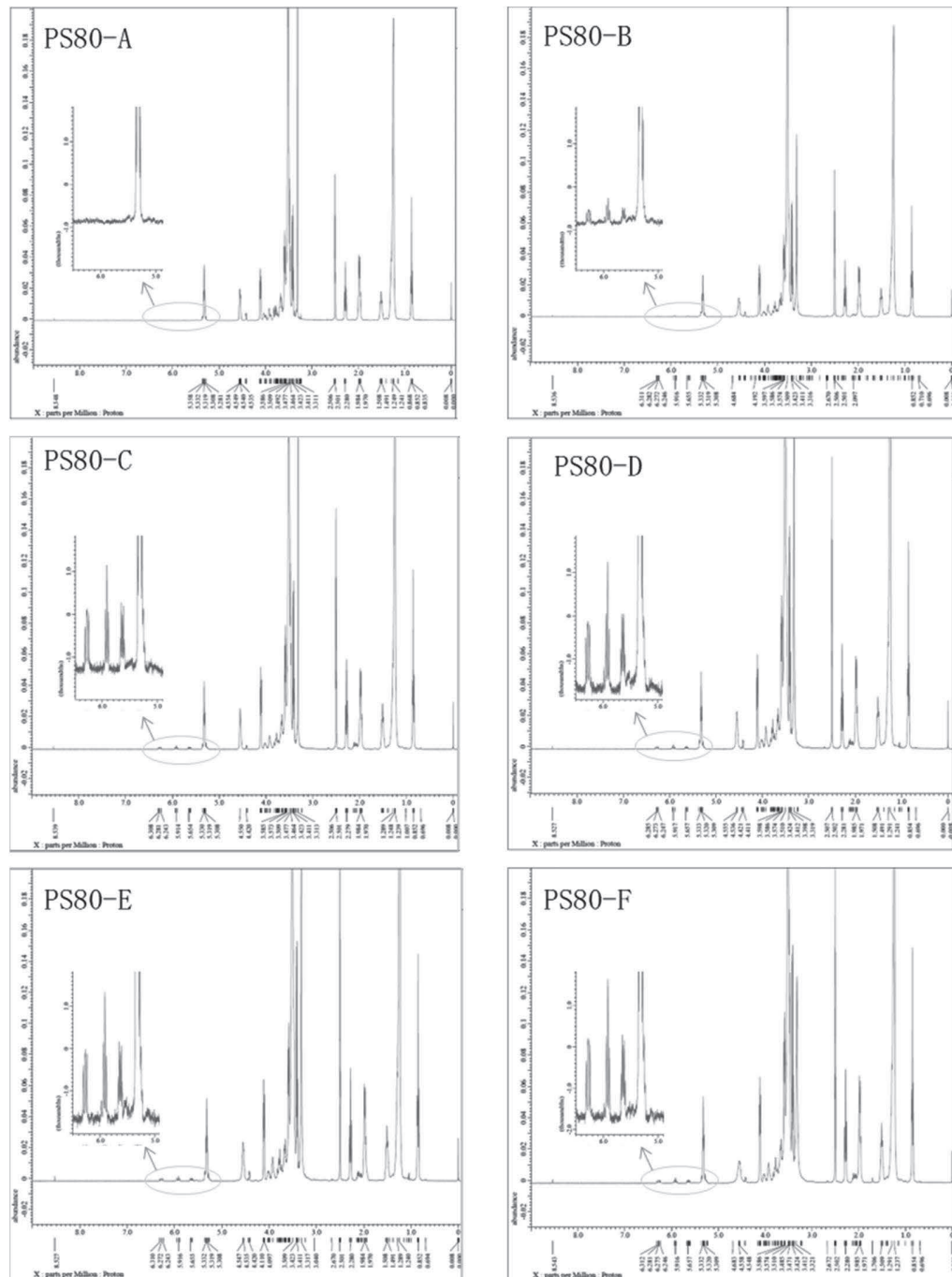
5.32 ppm 付近にオレフィン結合の特徴的なプロトンシグナルがすべてに確認された。また、PS80-A以外のPS80においては5.6~6.3 ppmとオレフィン結合のプロトンシグナルに重なっているものの5.2 ppm 付近の4組のシグナルが確認された (Fig. 7)。

4. 考察

日局18各条に適合する6種類のPS80を用いて検討したところ、PS80-C~Fを用いて調製した標準溶液や試料溶液は、吸光度の測定中に吸光度が大きく変動し、安定した吸光度を測定することができな

かったため、Sp錠の溶出試験が実施できない事例が確認された。海外で流通するPS80に関する報告では¹²⁾、PS80に由来する高い吸光度が妨害となることから、PS80を添加した溶出試験液はUV法の測定に適しないことが報告されているが、これらの報告で用いられているPS80が日局18に適合するかについては確認されていない。一方、今回の検討は日局18に適合するPS80を使用した。本研究の分析では吸光度を測定できない事例が確認されており、日局適合品であってもUV法による溶出試験に適しない製品があることが示された。

PS80の構造は理論上エチレンオキシドの付加モル

Fig. 7 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of PS80

数が20の構造で示される Polyoxyethylene sorbitan monooleate であるが、単一化合物として合成することは困難であり、Fig. 8に示した様々な化合物を含有する¹⁰⁾。更に、PS80の原料が、「主としてオレイン酸からなる脂肪酸」であるため、合成時はオレイン酸以外に他の脂肪酸を含有する場合もあり、オレイン酸以外の脂肪酸がエステル化した化合物も存在する。

PS80-A以外のUV吸収スペクトルや、LC-PDAのクロマトグラム上のピークのスペクトルが230 nm付近に極大吸収を示した。共役脂肪酸は約230 nmに極大波長を持つことが知られている¹³⁾ことから、PS80-A以外には共役脂肪酸が存在することが推測された。PS80の合成時に使用する脂肪酸にリノール酸を含有する場合、PS80中には、エステル化されたりノール酸が存在する場合があります、エス

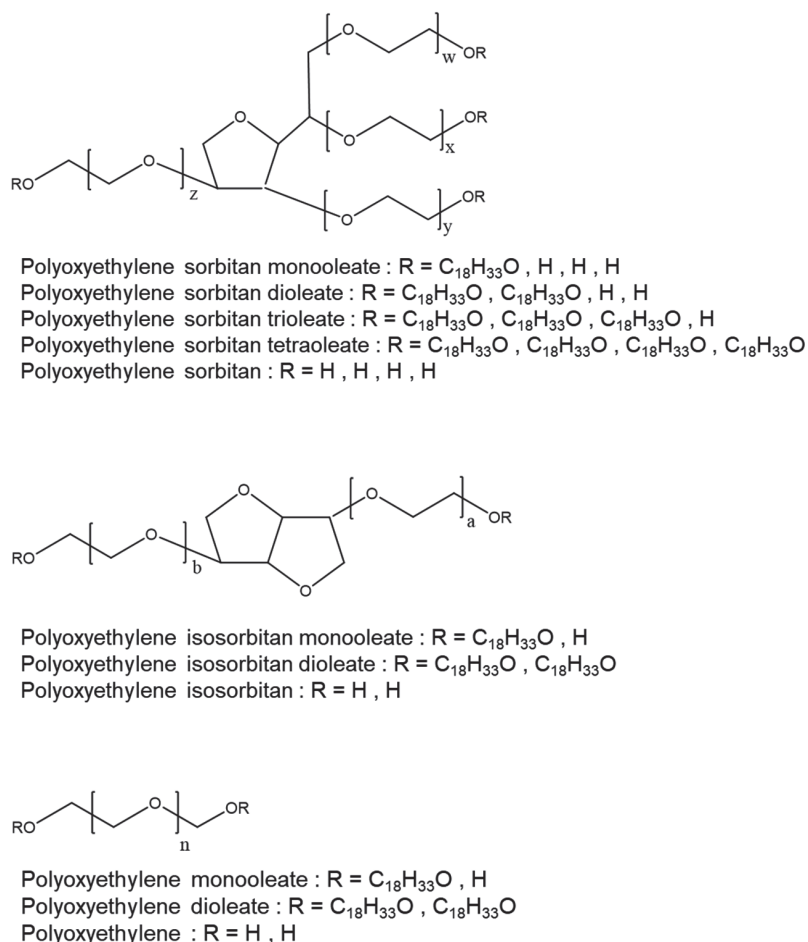


Fig. 8 Chemical Structures of PS80
 (The theoretical structure of PS80 is polyoxyethylene sorbitan monooleate, w+x+y+z=20)

テル化されたりノール酸の大部分が共役二重結合を含むことが報告されている¹⁴⁾。この中で示された¹H-NMRスペクトルは、5.17~5.29 ppmを非共役脂肪酸二重結合のプロトン、5.13~6.15 ppm付近の共鳴が共役二重結合に基づくことが示されている。

今回の検討では、PS80-A以外の¹H-NMRスペクトル中に特徴的に確認された5.6~6.3 ppm及び5.2 ppm付近のシグナルは、上記の報告と比較して、全体的に低磁場側にシフトしているものの、同様のパターンを示した。

PS80-Aは99%高純度オレイン酸を使用して製造しており、酸化されやすい高度不飽和脂肪酸や炭素数の異なる脂肪酸等の不純物をほとんど含まない製品として販売されている^{15, 16)}。本研究の測定データはPS80-Aの製品の特徴を裏付けるものであった。

以上の結果を考慮すると、PS80-A以外はリノール酸等に由来する共役脂肪酸がエステル化した化合

物含有しており、PS80-B中の量はPS80-C~F中の量と比較すると、少ないことが推測された。なお、PS80の保存により生成した成分についてLC-MS等を用いて測定を行った報告もあるが^{17, 18)}、今回のLC-QTOFMS等の結果では、具体的な成分を特定することはできなかった。

今回、UV法においてはSp錠の溶出試験液にPS80を添加した場合、2種類の製品において適切に試料溶液中のSpを測定することが可能であった。一方、Sp錠の溶出試験の測定条件にHPLC法を用いることで、PS80を用いた溶出試験における試料溶液中のSpを測定することは可能であった。このことから、PS80を溶出試験液に添加した溶出試験においては、測定条件をHPLCとすることにより、分析時のPS80の妨害を除くことが可能となることが示唆された。しかし、PS80中の各成分はカラムへの保持が非常に強く、標準溶液等中のPS80に由

来するピークが、それ以降の分析時に検出される事例が確認された。そこで、Elisabettaらの報告¹³⁾に従い、分析終了時にアセトニトリルを用い、一夜カラム洗浄を行った。したがって、吸光度が高いPS80を用いた溶出試験であっても、溶出率の算出が可能であったHPLC法の結果において、吸光度が高いPS80を用いると、製剤の溶出率が高くなる等、特定の傾向は確認されなかったことを考慮し、簡便性の観点からSp錠の場合は、UV法で測定を行うことが好ましいと考える。一方、吸光度の測定において吸光度が1.5以上になると迷光の影響が強くて誤差の原因となることが知られている¹⁹⁾。このため溶出試験に使用する試薬のPS80の規格として、測定に用いる243 nm付近の波長に吸収を持たないことを規定する必要がある。吸収をもつ場合には、「使用する濃度のPS80を含む溶液の吸光度が1.0程度以下となること」を規格としておけば、Sp標準溶液や試料溶液の吸光度が、水を対照として測定した場合において1.5以下となり、測定できるかもしれない。

日局18各条の収載製剤中、溶出試験においてPS80を添加する試験液を用い、測定法にUV法を使用する製剤は、Sp錠以外に2種類収載されている^{20,21)}。しかし、測定波長が高い(331 nm)あるいはPS80濃度が低い(0.02%)ため、測定時にPS80のUV吸収の影響を受けにくく、本報告の事例のような問題は生じにくいと推測される。

近年、日局ではNMR等の新しい機器による測定が取り込まれるようになってきている。今回の検討においても、LC-QTOFMSや¹H-NMRの結果に違いが認められていることから、日局の規格設定等における新たな機器の活用が期待される。

5. 結論

6製品の日局18適合PS80を用い、Sp錠の溶出試験を実施したところ、そのうち4製品でPS80由来する高い吸光度が妨害となり、標準溶液や試料溶液の吸光度の測定中に吸光度が大きく変動し、安定した吸光度の測定ができなかった。原因はPS80溶液の230 nm付近の吸収であり、日局18のSp錠定量法を参考にしたHPLC分析法を用いたところ、すべてのPS80製品で測定可能となった。

今後、医薬品の溶出試験においてPS80を添加する試験液を用いる場合には、使用するPS80を含有する溶液の吸光度について、測定に用いる波長に吸収を持たないことあるいは使用する濃度のPS80を含む溶液の吸光度が1.0程度以下となること規格として設定することによりUV法で測定を行うか、HPLCによる測定を実施する必要があると考えられた。

文献

- 1) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構審査マネジメント部長. 第十九改正日本薬局方原案作成要領について. 薬機審マ発第0329001号, 令和4年3月29日.
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長. 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について. 薬生薬審発0319第1号, 令和2年3月19日.
- 3) 厚生省医薬安全局審査管理課長. 医療用医薬品の品質にかかる再評価の予試験について. 医薬審第599号, 平成10年7月15日.
- 4) 梶村計志, 川口正美, 四方田千佳子. 難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用されるラウリル硫酸ナトリウムの品質に関する研究(第1報). 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2011, 42(7), p.626-632.
- 5) 梶村計志, 川口正美, 四方田千佳子. 難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用されるラウリル硫酸ナトリウムの品質に関する研究(第2報). 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2012, 43(2), p.194-199.
- 6) 梶村計志, 川口正美, 四方田千佳子. 難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用されるポリソルベート80の品質に関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2012, 43(7), p.650-655.
- 7) 厚生労働省. 第十八改正日本薬局方. 2021, p.975-976.
- 8) 岸本清子, 鈴木郁雄, 坂本美穂, 守安貴子, 保坂三継, 四方田千佳子. 難溶性薬物の溶出試験における界面活性剤の可溶化能について—ソフアルコン錠—. 東京健安研七年報. 2016, 67, p.91-99.
- 9) Pharmacopoeial Discussion Group Meeting Meeting Highlights 6 November 2020; PHARMACOPOEIAL DISCUSSION GROUP CORRECTION OF SIGN-OFF COVER SHEET CODE:E-31 NAME:POLYSORBATE80 (Correction 2 of the sign-off cover sheet sined on July 2016), November, 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000240393.pdf>, (accessed 2022-09-28).
- 10) Zhe, Wang; Yanan, Wang; Cai, Tie; Jinlan, Zhang. A fast strategy for profiling and identifying pharmaceutical excipient polysorbates by ultra-high performance liquid chromatography coupled with high-resolution

- mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2020, **109**, 460450.
- 11) 厚生労働省. 第十八改正日本薬局方. 参照紫外可視吸収スペクトル. 2021, p.2160.
 - 12) Wuelfing, W.Peter; Kosuda, Kathryn; Templeton, Allen C.; Harman, Amy; Mowery, Mark D.; Reed, Robert A. Polysorbate 80 UV/vis spectral and chromatographic characteristics defining boundary conditions for use of the surfactant in dissolution analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, **41**, p.774-782.
 - 13) Angioni, Elisabetta; Lercker, Giovanni; Frega, Natale G.; Carta, Gianfranca; Melis, Maria Paola; Murru, Elisabetta; Spada, Simona; Banni, Sebastiano. UV spectral properties of lipids as a tool for their identification. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002, **104**, p.59-64.
 - 14) Hvattuma, Erlend; Yipb, Wai Lam; Gracea, David; Hvattum, Knut Dyrstada Erlend. Characterization of polysorbate 80 with liquid chromatography mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy: Specific determination of oxidation products of thermally oxidized polysorbate 80. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, **62**, p.7-16 .
 - 15) Drug Delivery Systems PRODUCT CATALOG. Ver.24, 日油株式会社. p.61.
 - 16) 日油株式会社ホームページ. 高純度ポリソルベート80. <https://www.nof.co.jp/business/dds/quality>, (accessed 2023-01-04).
 - 17) Kishore, Ravuri S. K.; Kiese, Sylvia; Fischer, Stefan; Pappenberger, Astrid; Grauschopf, Ulla; Mahler, Hanns-Christian. The Degradation of Polysorbates 20 and 80 and its Potential Impact on the Stability of Biotherapeutics. *Pharm. Res.* 2011, **28**, p.1194-1210.
 - 18) Borisov, Oleg V.; Ji, Junyan A.; Wang, Y. John. Oxidative Degradation of Polysorbate Surfactants Studied by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Pharm. Sci.* 2015, **104**, p.1005-1018.
 - 19) 釜谷美則. 入門講座“はかる”ための基礎知識_吸光度法. ぶんせき. 2008, **4**, p.158-162.
 - 20) 厚生労働省. 第十八改正日本薬局方. 2021, p.1268.
 - 21) 厚生労働省. 第十八改正日本薬局方. 2021, p.1703-1704.