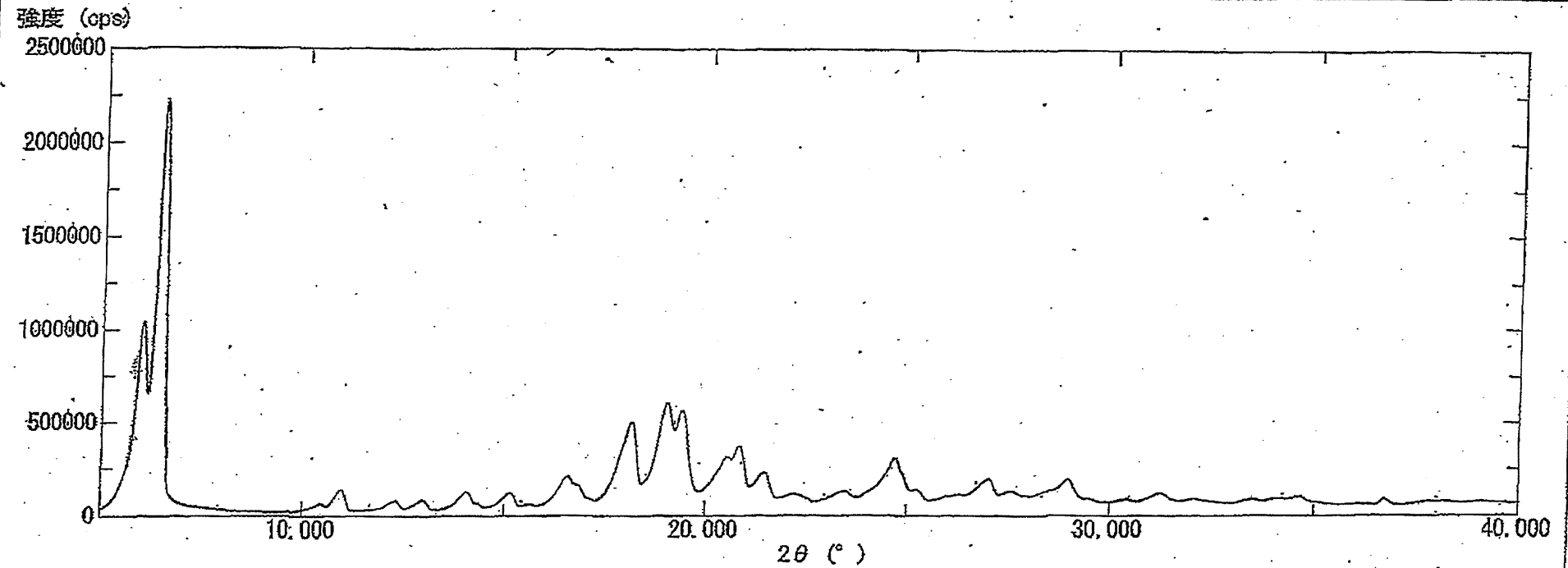


生データ

サンプル名	: 標準品 (P092)	ファイル	: 標準品-3-1419-1.raw	コメント	: P092
測定者	: Administrator	測定日	: 10-March-14 14:20:53		
X線	: Cu / 30-kV / 15 mA				
モニター	: MiniFlex II (D/teX) モニター				
アタッチメント	: ミニフレックス 6 サンプルホルダー				
試料番号	: 3				
試料回転	: 制御なし				
フィルタ	: 不使用	発散スリット	: 1.25°		
インテグレーション	: 不使用	散乱スリット	: 1.25°		
カウンタモニター	: 不使用	受光スリット	: 0.15mm		
カウンタ	: D/teX Ultra				
走査モード	: 連続	スキャンスピード	: 2.000 °/min.	サンプル幅	: 0.020 °
走査軸	: 2θ/θ	走査範囲	: 5.000 ~ 40.000 °	θオフセット	: 0 °
積算回数	: 1				



### 3. 製剤検討

## 製剤設計検討報告書

文 書 番 号	P092-001
対 象 品 目	P092
実 施 項 目	P092 初期検討 ① 水への溶解性の確認 ② 溶解度の pH 依存性の確認 ③ クエン酸ナトリウムを用いた溶解検討
実 施 部 門	株式会社富士薬品 富山第二工場 技術開発部
実 施 責 任 者	氷見長夫
実 施 担 当 者	畠山精介 渡邊 剛
実 施 期 間	2014年03月07日 ~ 2014年03月12日
備 考	

作 成 者	2014/03/24	畠山精介
実 施 担 当 者	2014/03/24	畠山精介
実 施 担 当 者	2014/03/24	渡邊 剛
実 施 責 任 者	2014/03/24	氷見長夫
技術部門責任者	2014/03/24	野上俊彦

## 1. 目的

P092 を含む注射剤は、岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科 桑田一夫教授より株式会社富士薬品富山第二工場へ新たに製造委託を受ける治験薬である。本製剤は、主薬である P092 を 1g/バイアル含む注射剤としてデザインされている。

本報告書では、P092 の製剤化の可能性について検討した結果を報告する。

## 2. 対象品目

P092 (N,N'-((シクロヘキシルメチレン)ジ-4,,1-フェニル)ビス(2-(1-ヒドロキシ)アセトアミド)ニアルイン酸塩)

## 3. 実施担当

高山 精介 渡邊 剛

## 4. 実施期間

2014年03月07日～2014年03月12日

## 5. 使用機器・器具

機器	型式	メーカー
pHメーター		
複合電極	9618-10D	(株)堀場製作所
指示計	F-71	(株)堀場製作所
上皿電子天秤	HTR-220	メトラー・トレド(株)
	FZ2001WP	A&D(株)

## 6. 使用原薬

2014.03.04 に岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科 桑田一夫教授より受領した P092 (N,N'-((シクロヘキシルメチレン)ジ-4,,1-フェニル)ビス(2-(1-ヒドロキシ)アセトアミド)ニアルイン酸塩)を使用した。

## 7. 使用試薬及び試液

試薬, 試液	メーカー	規格	Lot
1mol/L 水酸化ナトリウム	和光純薬工業(株)	日本薬局方	PDF3935
1mol/L 塩酸	和光純薬工業(株)	日本薬局方	PDL4455
注射用水	(株)富士薬品	日本薬局方	140307, 140312
クエン酸ナトリウム	小堺製薬工業(株)	日本薬局方	SI-02

## 8. 検討の概要

No.	検討項目	検討概要
①	水への溶解性の確認	P092の水への溶解度は0.2 g/mL以下であることが明らかとなった。
②	溶解度のpH依存性の確認	P092の溶解度のpH依存性を確認した。その結果、P092はpH1.8以下及びpH5.6から6.8の間であれば溶解できることが確認できた。
③	クエン酸ナトリウムを用いた溶解検討	①及び②の結果を踏まえ、P092のpH6.0での製剤化の可能性を検討した。pH6.0に調整したクエン酸ナトリウム水溶液にP092を投入したところ、pHが4.9まで低下してしまい、溶解できなかった。しかしながら、pHを5.4にまで上昇させると溶解できることが確認できた。

## 9. 検討結果

## ① 水への溶解性の確認

## 1) 目的

P092の物性評価として、水への溶解性を確認した。なお、1g/5mL/バイアルでの製剤化を想定し、2.0から0.2g/mLまでの溶解性を確認した。

## 2) 実施方法

2gのP092に注射用水を1mLずつ添加し、溶解状態を目視にて確認した。注射用水は全量10mLまで添加した。

## 3) 結果

P092の水への溶解度を確認した。注射用水1mL及び2mL添加時点では、P092の嵩に対して注射用水の量が足りずに溶液状態とすることができなかった。3mL添加以降は溶液状態となったが、10mL添加後も白濁した状態であった(表-1及び図-1)。

以上より、P092を注射用水に投入するだけでは溶解できないことが明らかとなった。

表-1 P092の水への溶解性

P092 濃度 (g/mL)	2	1	0.67	0.5	0.4	0.33	0.29	0.25	0.22	0.2
観察結果	溶媒量 不足	溶媒量 不足	白濁	白濁	白濁	白濁	白濁	白濁	白濁	白濁

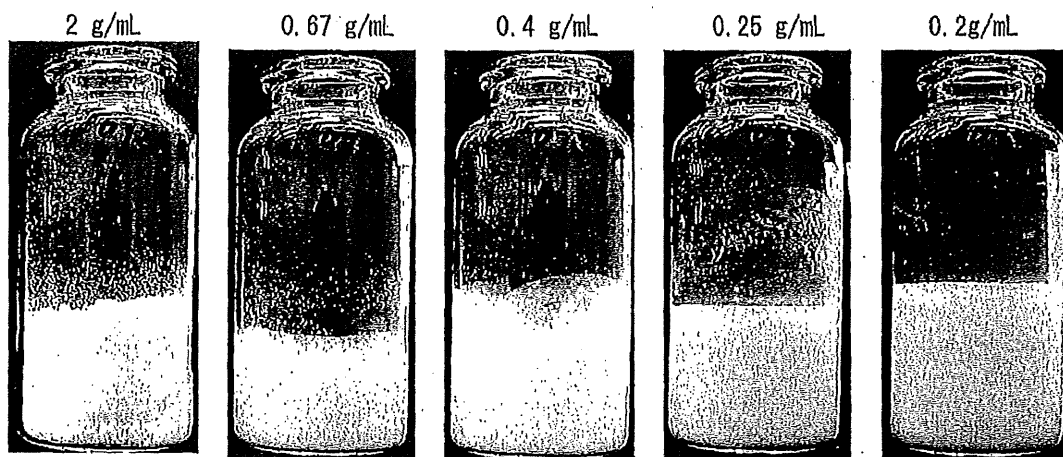


図-1 P092の水への溶解性

## ② 溶解度の pH 依存性の確認

## 1) 目的

①の結果より、P092の水への溶解度が低い(0.2 g/mL未満)ことが明らかとなった。今回の検討では、P092の溶解度のpH依存性を確認した。

## 2) 実施方法

①の検討にて調製した0.2 g/mL P092を二等分し、一方には1 mol/L 塩酸溶液を添加し、目視による溶解状況の確認及びpHを確認した。また、もう一方には1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加し、目視による溶解状況の確認及びpHを確認した。

## 3) 結果

## 3-1) 酸性側での溶解確認

0.2 g/mL P092水溶液のpHは3.7であり、水へは不溶であった。この溶液に1 mol/L 塩酸を添加し、酸性側での溶解性を確認したところ、pH1.8以下であれば溶解できることが確認された(図-2及び4)。

## 3-2) アルカリ性側での溶解確認

一方、1 mol/L 水酸化ナトリウムを添加し、アルカリ性側での溶解性を確認したところ、pH5.6から6.8の間であれば微黄色澄明な液となり、溶解できることが確認できた。しかしながら、pH6.8以上となると再び析出が起こってしまうことが明らかとなった(図-3及び4)。

なお、pH8.3以上となるとさらに析出が激しくなり、粘性が増し攪拌子による攪拌ができなくなってしまうため、この時点で溶解性確認は中止とした。

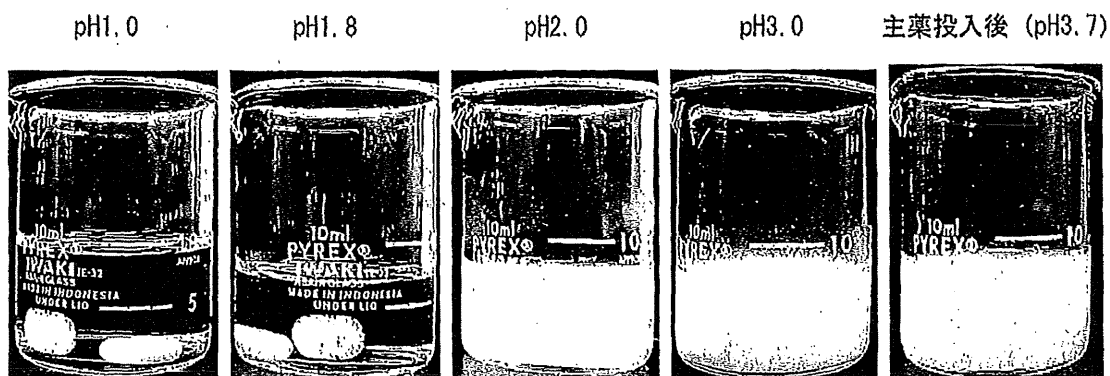


図-2 P092の溶解度のpH依存性の確認(酸性側)

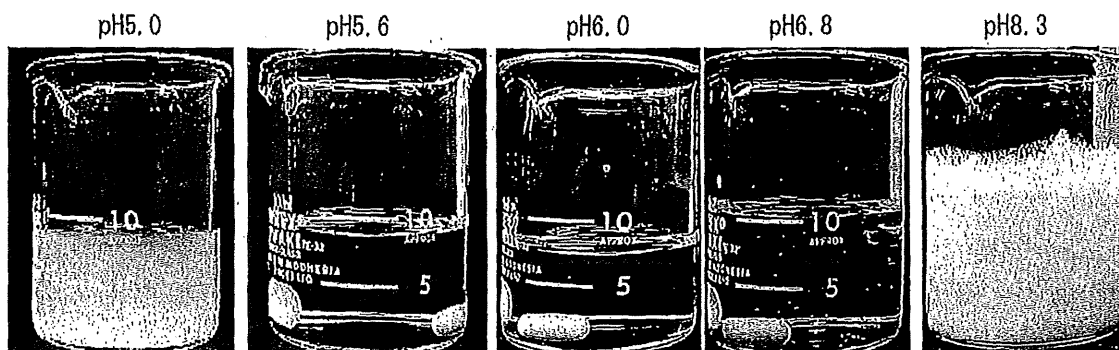


図-3 P092 の溶解度の pH 依存性の確認 (アルカリ性側)

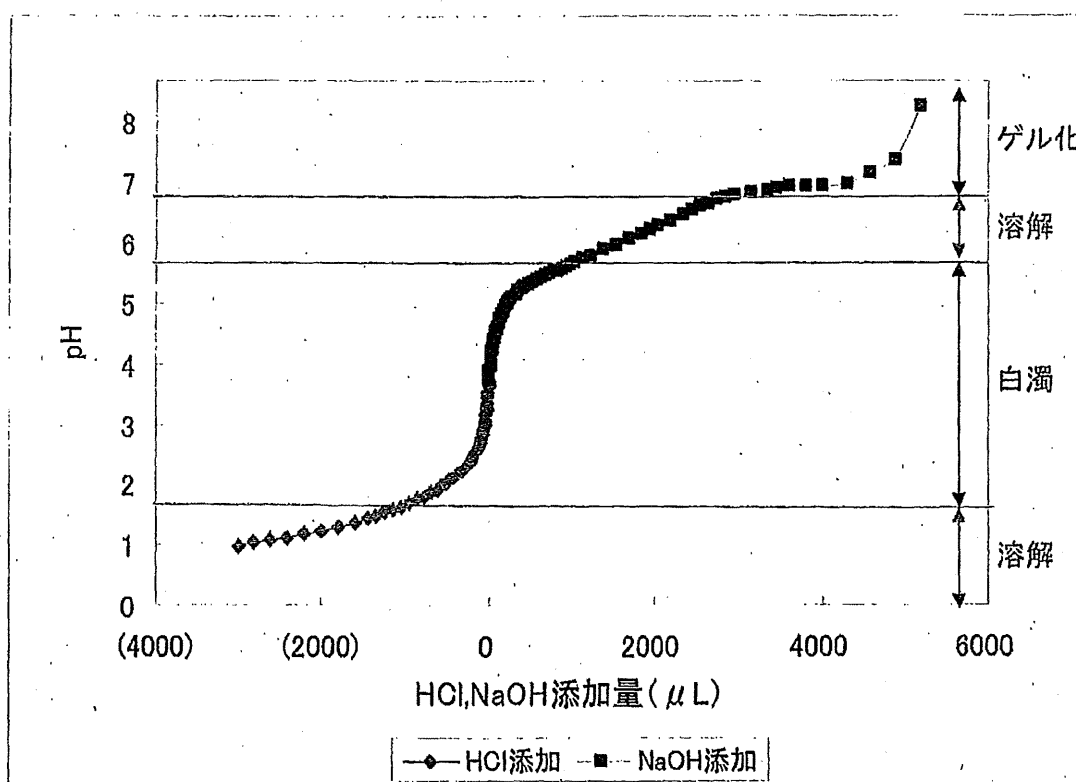


図-4 P092 の溶解度の pH 依存性の確認



### ③ クエン酸ナトリウムを用いた溶解検討

#### 1) 目的

②の結果より、P092はpH6付近では溶解するが、pH6.8以上では再析出することがわかった。今回の検討では、pH6付近に緩衝能を持つ添加剤としてクエン酸ナトリウムを選定し、P092の溶解性を確認した。

#### 2) 実施方法

P092 0.2gにpH6.0に調整した20 mg/mL クエン酸ナトリウム水溶液1 mLを投入し、目視にて溶解性を確認した。その後、1mol/Lの水酸化ナトリウム溶液を添加し、アルカリ性側での溶解性を目視にて確認した。

#### 3) 結果

P092のpH6.0に調整した20 mg/mL クエン酸ナトリウム水溶液への溶解性を確認したが、白濁が起こってしまい溶解させることができなかった(図-5)。この溶液のpHを測定してみたところpHは4.9にまで低下していた。これは、P092のカウンターイオンであるマレイン酸の影響によりpHが低下し、P092が析出してしまったと考えられる。

このように、pH6.0に調整した20 mg/mL クエン酸ナトリウム水溶液にて溶解させることはできなかったが、水酸化ナトリウムにてpHを上昇させていったところ、pH5.4でこの析出物を溶解できることが確認できた(図-5)。

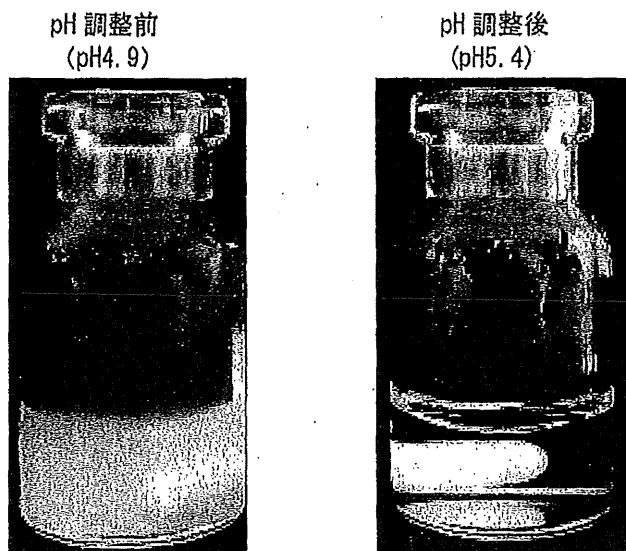


図-5 クエン酸ナトリウムを用いた溶解検討

## 10. 考察

今回の検討では、P092を1gバイアル含む注射剤の製剤化の可能性について検討した。

まず、P092の水への溶解性を確認したが、水への溶解度は0.2 g/mL未満であることが明らかとなった。そこで、溶解度のpH依存溶解性を確認したところ、pH1.8以下及びpH5.6から6.8の間であれば溶解できることが確認できた。

以上の結果を踏まえ、pH6.0での製剤化の可能性について検討を進めた。添加剤としてpH6付近に緩衝能を持つクエン酸ナトリウムを選定して溶解を試みた。しかしながら、P092投入前のpHを6.0に調整してしまうとP092のカウンターイオンであるマレイン酸の影響によりpHが低下し、P092が析出してしまう結果となった。しかしながら、pHを5.4にまで上昇させればこの析出物を溶解できることが確認された。

今回の検討から、想定できる処方を表-2に示す。しかしながら、製剤の安定性などを踏まえた最適化は今後必要であると考えられる。

表-2 P092 想定処方

成分	1バイアルあたり
P092	1 g
クエン酸ナトリウム	100 mg
水酸化ナトリウム	適量 (pH6.0)
塩酸	適量 (pH6.0)
注射用水	15 mL

## 11. 参考文献

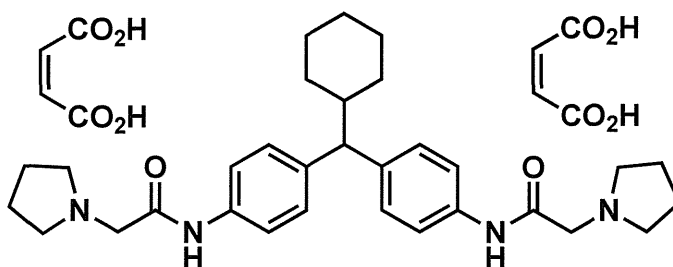
第十六改正日本薬局方

医薬品添加物辞典 2007. 薬事日報社

## 4. 規格

1. 物理的・化学的性質ならびに規格及び試験法に関する資料  
(積水メディカル株式会社)

1. P092・2 マレイン酸塩



化学名 : N,N'-[[(Cyclohexylmethylene)di-4,1-phenylene]bis[2-(1-pyrrolidinyl)acetamide]Dimalate

$C_{31}H_{42}N_4O_2 \cdot 2C_4H_4O_4$  : 734.84

本品を乾燥したものは定量するとき、P092・2 マレイン酸塩( $C_{31}H_{42}N_4O_2 \cdot 2C_4H_4O_4$ )98～102%を含む。

1.1.1. 原薬の規格および試験方法

本試験方法は、別に規定するもののほか、日本薬局方一般試験法を準用するものとする。

1. 性状

本品は、白色の結晶性の粉末である。

本品は、メタノールにやや溶けやすく、水及びエタノール(99.5)に溶けにくい。

本品は、吸湿性が強い。

2. 確認試験

(1) 本品を乾燥し、赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法による試験を行い、本品のスペクトルと本品の参照スペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。

(2) 本品 0.10g をメタノール 3mL に溶かし、試料溶液とする。マレイン酸 105.3mg に水 5mL を加えて溶かし、さらに水で正確に 10mL とし、標準溶液とする。これらの液につき、

薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液及び標準溶液 5  $\mu$ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板に原点にスポットする。次にジエチルエーテル/メタノール/酢酸(100)/水混液(70:20:7:3)を展開溶媒として約 12cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線(主波長 254nm)を照射するとき、試料溶液から得た2個のスポットのうち1個のスポットは標準溶液から得たスポットと同程度の濃さであり、それらの Rf 値は等しい。

### 3. pH

本品 1.0g に水 100mL を加え、70°Cの温水中で溶かした後、室温まで冷却した液の pH は 3.5~5.0 である。

### 4. 純度試験

#### (1) 溶状

本品 1.0g に水 20mL を加え、70°Cの温水中で溶かすとき、液は無色澄明である。

#### (2) 塩化物

本品 1.0g に水 30mL 及び希硝酸 6mL を加えて溶かし、水を加えて 50mL とする。これを検液とし、試験を行う。比較液は、0.01mol/L 塩酸 0.28mL に希硝酸 20mL 及び水を加えて 50mL とする(0.01%以下)。

#### (3) 重金属

本品 1.0g をとり、第3法により操作し、試験を行う。比較液には、鉛標準液 2.0mL を加える(20ppm 以下)。

#### (4) 砒素

本品 1.0g をとり、第3法により検液を調製し、試験を行う(2ppm 以下)。

#### (5) 類縁物質

本品約 0.01g を精密に量り、移動相 A 液/移動相 B 液混液(1:1)を加えて正確に 10mL とし、試料溶液とする。試料溶液、ブランク溶液[移動相 A 液/移動相 B 液混液(1:1)]につき、5  $\mu$ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液の各々の類縁物質の P092 のピーク面積を自動積分法により測定する。試料溶液については、ブランク溶液から得たピークに該当するピーク並びに P092 のピークを除外し、それ以外の各々のピーク(類縁物質)の面積を測定する。すべてのピーク面積に対する各々のピーク面積比を求めたとき、P092 のピーク面積以外のピーク面積比合計は 1%以下かつ各々のピーク面積比は 0.15%以下である。

[試験条件]

検出器:紫外吸光光度計(測定波長:254nm)

カラム:GLサイエンス社製 Inertsil ODS-2 (4.6mm i.d.×250mm、5 $\mu$ m)又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度:40℃付近の一定温度

移動相A:水 1000mL にLにトリフルオロ酢酸 2mL を加える。

移動相 B:アセトニトリル 1000mL にトリフルオロ酢酸 2mL を加える。

移動相条件:移動相 A:移動相 B を 80:20 から開始し、20 分の直線グラジエント法で 40:60 にし、その後 30 分間保つ。

流量:約 1.0mL/min. (P092 の保持時間は 14-17 分)。

面積測定範囲:約 4 分から 50 分。(マレイン酸のピークは除外)。

[システム適合性]

試料溶液 1mL を正確に量り、移動相 A 液/移動相 B 液混液(1:1)を加えて正確に 100mL とする。この液 1mL を正確に量り、移動相 A 液/移動相 B 液混液(1:1)を加えて正確に 10mL とし、標準溶液(0.1%)とする。上記分析条件で標準溶液を 6 回くりかえし測定するとき、P092 のピーク面積の相対標準偏差(RSD)は 2%以下であることを確認する、また、初めの 1 回について、P092 のピーク理論段数が 2000 段以上及びシンメトリー係数が 2.0 以下であることを確認する。以上の数値がすべて規格内であるとき、システム適合性は適合と判断する。

(6) 残留溶媒

本品約 0.5g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 5mL とし、試料溶液とする。

①エタノール

エタノール約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 $\mu$ Lにつき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々のエタノールのピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、エタノールの量は、5000ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量(ppm)} = \text{基準物質の量(g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{5}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT:本品の秤量値(g)

a:標準液の希釈倍率(1000)

1000000:ppm への換算係数

[試験条件]

検出器:水素炎イオン化検出器

カラム:Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX(0.53mm i.d.×30m、1.00 μm) 又は、  
これと同等の性能を有するカラム

カラム温度:60°Cで開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10°C/min で 180°Cま  
で上昇させる。

気化室温度:200°C

検出器温度:220°C

キャリアーガス:ヘリウム

流量:約 40mL/min

スプリット比:1:10

②THF

THF 約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10mL とする。  
この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100mL とし、標準溶液  
とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μL につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試  
験を行う。各々の THF のピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、THF の  
量は、720ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量(ppm)} = \text{基準物質の量(g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{5}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT:本品の秤量値(g)

a:標準液の希釈倍率(1000)

1000000:ppm への換算係数

[試験条件]

検出器:水素炎イオン化検出器

カラム:Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX(0.53mm i.d.×30m、1.00 μ m) 又は、  
これと同等の性能を有するカラム

カラム温度:60℃で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10℃/min で 180℃ま  
で上昇させる.

気化室温度:200℃

検出器温度:220℃

キャリアーガス:ヘリウム

流量:約 40mL/min

スプリット比:1:10

③トルエン

トルエン約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10mL と  
する。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100mL とし、標準  
溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μ L につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試  
験を行う。各々のトルエンのピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、トル  
エンの量は、890ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{5}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT:本品の秤量値(g)

a:標準液の希釈倍率(1000)

1000000:ppm への換算係数

[試験条件]

検出器:水素炎イオン化検出器

カラム:Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX(0.53mm i.d.×30m、1.00 μ m) 又は、  
これと同等の性能を有するカラム

カラム温度:60℃で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10℃/min で 180℃ま



で上昇させる.

気化室温度:200℃

検出器温度:220℃

キャリアーガス:ヘリウム

流量:約 40mL/min

スプリット比:1:10

#### ④ジクロロメタン

ジクロロメタン約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1μL につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々のジクロロメタンのピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、ジクロロメタンの量は、600ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量(ppm)} = \text{基準物質の量(g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{5}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT:本品の秤量値(g)

a:標準液の希釈倍率(1000)

1000000:ppm への換算係数

#### [試験条件]

検出器:水素炎イオン化検出器

カラム:Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX(0.53mm i.d.×30m、1.00μm) 又は、  
これと同等の性能を有するカラム

カラム温度:60℃で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10℃/min で 180℃まで上昇させる。

気化室温度:200℃

検出器温度:220℃

キャリアーガス:ヘリウム

流量:約 40mL/min

スプリット比:1:10

⑤CPME

CPME 約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 $\mu$ L につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々の CPME のピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、CPME の量は、5000ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{5}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT: 本品の秤量値(g)

a: 標準液の希釈倍率(1000)

1000000: ppm への換算係数

[試験条件]

検出器: 水素炎イオン化検出器

カラム: Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX(0.53mm i.d. × 30m, 1.00  $\mu$ m) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度: 60 $^{\circ}$ C で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10 $^{\circ}$ C/min で 180 $^{\circ}$ C まで上昇させる。

気化室温度: 200 $^{\circ}$ C

検出器温度: 220 $^{\circ}$ C

キャリアーガス: ヘリウム

流量: 約 40mL/min

スプリット比: 1:10

⑥酢酸エチル

酢酸エチル 約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μLにつき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々の酢酸エチルのピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、酢酸エチルの量は、5000ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{5}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT:本品の秤量値(g)

a:標準液の希釈倍率(1000)

1000000:ppm への換算係数

[試験条件]

検出器:水素炎イオン化検出器

カラム:Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX(0.53mm i.d.×30m、1.00 μm) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度:60℃で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10℃/min で 180℃まで上昇させる。

気化室温度:200℃

検出器温度:220℃

キャリアーガス:ヘリウム

流量:約 40mL/min

スプリット比:1:10

⑦IPE

IPE 約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μLにつき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々の IPE のピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、IPE の量は、5000ppm 以下である。

$$A_t \quad 5 \quad 1$$

$$\text{残留溶媒の量(ppm)} = \frac{\text{基準物質の量(g)}}{As} \times \frac{\text{WT}}{\text{WT}} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT:本品の秤量値(g)

a:標準液の希釈倍率(1000)

1000000:ppm への換算係数

[試験条件]

検出器:水素炎イオン化検出器

カラム:Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX(0.53mm i.d.×30m、1.00 μm) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度:60℃で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10℃/min で 180℃まで上昇させる。

気化室温度:200℃

検出器温度:220℃

キャリアーガス:ヘリウム

流量:約 40mL/min

スプリット比:1:10

(7) エンドトキシン

本品 0.1g をとり、エンドトキシン試験用水約 10mL を加え、70℃温浴槽で加温して溶かす。この液 0.1mL をとり、エンドトキシン試験用水で全量 4mL としたものを試料溶液とし、ライセート試薬を用い、ゲル化法によって試験を行う。(エンドトキシン 0.5EU/mg 以下)。

5. 水分

本品約 0.1g を精密に量り、水分測定法(カールフィッシャー法)により試験を行う。(10%以下)。

6. 強熱残分

0.1%以下(1.0g)。

7. 定量法

本品を乾燥し、その約 0.5g を精密に量り、酢酸(100) 2.5 mL を正確に加えて溶かした後、アセトニトリル 2.5 mL を正確に加えてよくかき混ぜる。この試料を用いて 0.1mol 過塩素酸/酢酸溶液で電位差滴定を行う。同様の方法で空試験を行い