



# 高分解能 LC/MS および Mass Profiler による 医薬容器施栓系からの抽出物の検出と同定

## アプリケーションノート

### 著者

Srividya Kailasam and  
Syed Salman Lateef  
Agilent Technologies, India Pvt. Ltd.

### 概要

Agilent 1290 Infinity LC システムおよび Agilent 6530 Q-TOF システムとデータマイニングソフトウェアを組み合わせて使用し、点眼薬容器施栓系からの抽出物を同定しました。医薬品の包装材料から溶出する抽出物は、その多くが多様な物理化学的性質を持つ有害化合物です。こういった不純物をすべて幅広く検出するためには、通常、多元的な分析法が必要になります。いくつかのアプリケーションノートでは、このアプリケーションに対する GC/MS メソッドの有効性が実証されています<sup>1, 2, 3</sup>。今回は、この分析が LC/MS でも可能なことを示します。まず、Agilent 6530 Q-TOF でデータ非依存型 All Ions MS/MS 取り込みモードを使用し、ポジティブおよびネガティブイオン化モードによりサンプルを分析しました。この分析データをもとに、Agilent MassHunter Profinder と Agilent Mass Profiler ソフトウェアを組み合わせて使用し、溶媒コントロールと対比することで有意な抽出物を区別しました。その後、Mass Profiler ソフトウェアのデータベース検索機能により、抽出物/浸出物用のカスタムパーソナル化合物精密質量データベースを使用して抽出物を同定しました。



**Agilent Technologies**

## はじめに

原薬および医薬品は、一次および二次包装材料から溶出する化学物質によって汚染される可能性があります。こういった不純物が患者の健康を脅かす可能性があることから、アメリカ食品医薬品局 (US FDA) は、人体用医薬品および生物製剤の包装に用いられる容器施栓系に関するガイダンスを医薬品業界に向けて公表しています<sup>4</sup>。包装材料から抽出することのできる化合物または原薬や医薬品に実際に溶出した化合物のプロファイリングは、次のような要因により複雑な作業になります。

- 一次および二次包装材料に幅広い材料が使用されている
- 抽出および浸出不純物の物理化学的性質が多様である
- サンプル中の検出レベルが広い (ng から µg)
- これらの化合物を多様なマトリックスで検出しなければならない

これらの課題を克服するには、複数の、また多くの場合は多元的な分析法を使用する必要があります。その例として、抽出物および浸出物の分析用に開発された多数の HPLC および LC/MS メソッドを評価した結果が Norwood らにより発表されています<sup>5</sup>。

今回の試験では、可塑剤、光重合開始剤、安定剤、酸化防止剤などさまざまなクラスに分類される一連の分析対象物を検出するための汎用メソッドを開発しました。これらの化合物の分離、検出、および同定には、Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6530 Q-TOF 質量分析計を組み合わせ使用しました。また、Agilent MassHunter Profinder および Agilent Mass Profiler ソフトウェアプログラムを抽出物および浸出物のカスタムデータベースと組み合わせ使用することで、分析データをすばやく解析し、検出された化合物を高い信頼性で同定することができました。

Agilent MassHunter Profinder ソフトウェアでは、複数の高分解能 MS データファイルに対してすばやくデータマイニングを行えます。ノンターゲットデータ解析の場合は、このソフトウェアの再帰的バッチモレキュラーフィーチャー抽出データマイニング機能を使用することで、偽陽性および偽陰性の同定を最小限に抑えることができます。データ解析結果は、グループごとに色分けされた抽出イオンクロマトグラムとして確認できます。また、差分解析を行うためにデータを Compound Exchange Format (.cef) ファイルとして Mass Profiler プログラムに容易にエクスポートできるため、複数のサンプルをそのまま比較し、差異を特定することができます。一方、ターゲット抽出物をモニタリングするターゲットデータ解析の場合は、Profinder ソフトウェアの Find by Formula アルゴリズムを使用します。その後、データを同定済みリストとして Mass Profiler ソフトウェアにエクスポートし、サンプルの相互比較に用いることができます。

Mass Profiler ソフトウェアは、データセット間の類似性および差異の比較に役立つ統計プログ

ラムです。比較するデータセットには次のものを使用できます。

- 2つの異なるサンプル
- 同じサンプルのレプリケート
- 2つのサンプルグループのレプリケート

また、スチューデントの t 検定およびサンプル相関を用いたサンプルの主成分分析 (PCA) も可能です。ノンターゲット分析における化合物の同定には、ビルトイン ID Browser プログラムのデータベース検索および分子式生成機能を組み合わせて使用します。

このアプリケーションノートでは、図 1 に示すノンターゲット分析ワークフローに従うことで、抽出物をすばやく正確に同定することができました。

## 実験方法

表 1 に、パーソナル化合物データベースを構築するために使用した試薬を示します。これらの試薬は Sigma-Aldrich 社から購入しました。その他、MS グレードのメタノール、イソプロピルアルコール (Fluke 社)、および脱イオン水 (Millipore 社 Milli-Q) を使用しました。

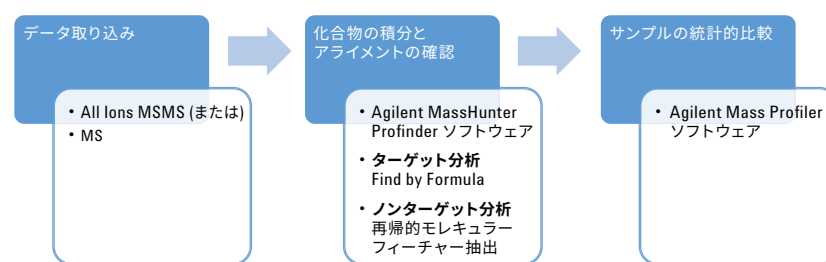


図 1. Agilent MassHunter Acquisition、Agilent Profinder、および Agilent Mass Profiler ソフトウェアによるデータ解析ワークフロー

表 1. 添加サンプルに用いたターゲット化合物

番号	分析対象物	CAS	分子式	モノアイソトピック質量
1	エチルパラベン	120-47-8	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166.063
2	Irgacure 184	947-19-3	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	204.115
3	Irgacure 651	24650-2-8	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	256.1099
4	フタル酸ジプロピル	131-16-8	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	250.1205
5	4- <i>n</i> -オクチルフェノール	1806-26-4	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206.1671
6	フタル酸ジエチルヘキシル	117-81-7	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.277
7	Irganox 1010	6683-19-8	C <sub>73</sub> H <sub>108</sub> O <sub>12</sub>	1176.7841
8	Irganox 1076	2028-79-3	C <sub>35</sub> H <sub>62</sub> O <sub>3</sub>	530.4699
9	Iragafos 168	31570-04-4	C <sub>42</sub> H <sub>63</sub> O <sub>3</sub> P	646.4515

## サンプル前処理

### 原液

標準物質をイソプロピルアルコール (IPA) に溶解し、各分析対象物 (表 1) の 1,000 ppm 原液を調製しました。この原液をさらに水で希釈し、9 種類の分析対象物がすべて含まれる混合液を調製しました。

### 標準混合液

各ターゲット化合物の濃度が約 1 ppm になるように、原液を混合して希釈しました。

### 抽出サンプル

空の点眼薬ボトルを地域の薬局で購入し、水で洗浄しました。ボトルの縁まで 1:1 のメタノール:水で満たし、55 °C のオープンで 72 時間インキュベーションしました。その後 200 µL を分取して分析に使用しました。

### 添加サンプル

ターゲット化合物の濃度が約 0.05 ppm になるように、標準混合液 10 µL を抽出サンプル 190 µL に加えました。

## 機器

表 2 に、今回の実験に用いた LC および MS 条件の詳細を示します。

- Agilent 1290 Infinity バイナリ LC システムは次のコンポーネントで構成しました。
  - Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
  - Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A)
  - Agilent 1200 シリーズ ALS サーマスタット (G1330B)
  - Agilent 1200 シリーズカラムコンパートメント (G1316A)
  - Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)
  - Agilent Max-Light カートリッジ、光路長 60 mm のフローセル搭載 (G4212-60007)

- Agilent 1260 バイナリポンプ VL G1312C、1:100 スプリッタによるリファレンスマス導入用 (G1607-60000)
- Agilent Q-TOF G6530A および Agilent Jet Stream デュアルスプレーイオン源 (G1959A)

表 2. LC および MS の分析条件

LC 条件		
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8、3.0 × 100 mm、1.8 µm (p/n 959758-306)	
カラム温度	50 °C	
移動相 A	100 mg/L 酢酸アンモニウム水溶液	
移動相 B	メタノール	
流量	0.5 mL/min	
グラジエント	時間 (分)	メタノール %
	0	40
	8	100
	11	100
ストップタイム	11 分	
ポストタイム	1.5 分	
注入量	5 µL	
ニードル洗浄	1:1 のメタノール:水で 10 秒間	
オートサンブラ温度	6 °C	
MS 条件		
イオン化モード	デュアルスプレー AJS-ESI	
乾燥ガス	150 °C で 10 L/min	
ネブライザ圧力	30 psi	
シースガス	200 °C で 11 L/min	
キャピラリー電圧	3,500 V	
ノズル電圧	300 V	
フラグメンタ電圧	145 V	
取り込みパラメータ		
取り込みモード	All Ions MS スキャン	
セグメントと CE (V)	実験	
	セグメント番号	CE (V)
	1	0
	2	15
	3	40
極性	ポジティブおよびネガティブ	
質量範囲	50-1,300 m/z	
MS スキャンレート	7 スペクトル/秒	
参照イオン	ポジティブ: 121.0507 および 922.0098 ネガティブ: 112.9856 および 1033.9881	

## ソフトウェア

- Agilent MassHunter Data Acquisition B.05.01
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00
- Agilent MassHunter Profinder B.06.00
- Agilent MassHunter Mass Profiler B.07.00

## 結果と考察

化合物の添加混合液を使用して医薬品容器からの抽出物を検出する高分解能 LC/MS メソッドを新たに開発しました。添加サンプルは、システム性能テストにも使用しました。テスト混合物のデータ解析により、システムの感度と分離能を確保することができます。表 1 に示した抽出サンプルに添加した化合物は幅広い極性を持っています。表 2 に示したようにメソッドパラメータを最適化した後、ブランク、添加サンプル、および抽出サンプルのそれぞれについて 3 つのレプリケートを注入し、ポジティブおよびネガティブイオン化モードでデータを採取しました。図 2 は、ポジティブイオン化モード (図 2A) およびネガティブイオン化モード (図 2B) で得られた抽出化合物クロマトグラムです。図 2A および 2B からわかるように、多くの分析対象物がポジティブモードで検出され、数種類の化合物はネガティブモードでより明確なレスポンスが得られました。

### 抽出サンプルのデータ解析

LC/MS メソッドを使用して、空の点眼薬ボトルから溶出した抽出物を分析しました。図 3 に、ポジティブおよびネガティブモードで得られたサンプルのトータル化合物クロマトグラム (TCC) を示します。

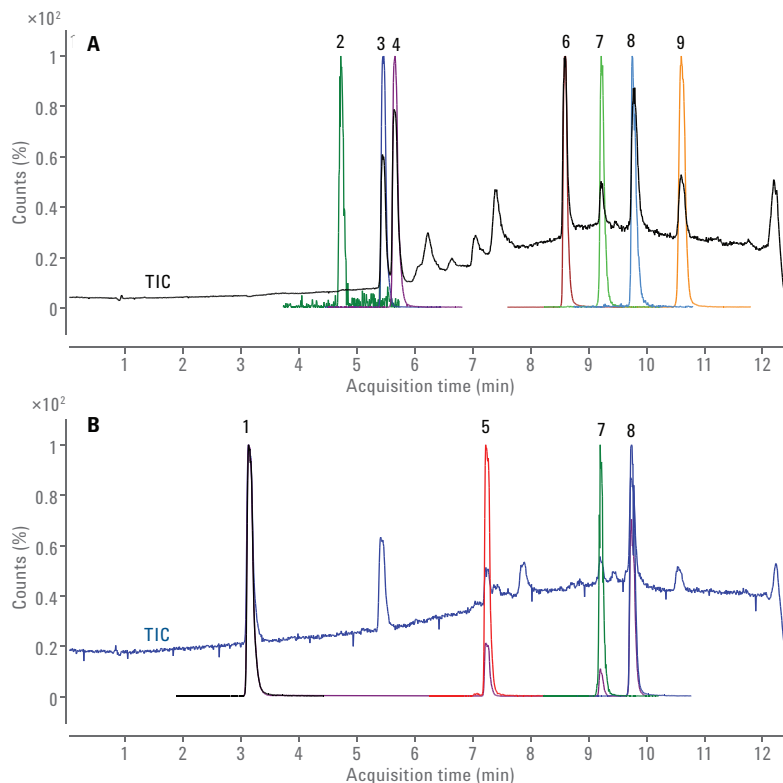


図 2. 既知標準物質を添加した抽出サンプルのポジティブモード (A) およびネガティブモード (B) での分析により得られたトータルイオンクロマトグラムとターゲット化合物の抽出化合物クロマトグラム

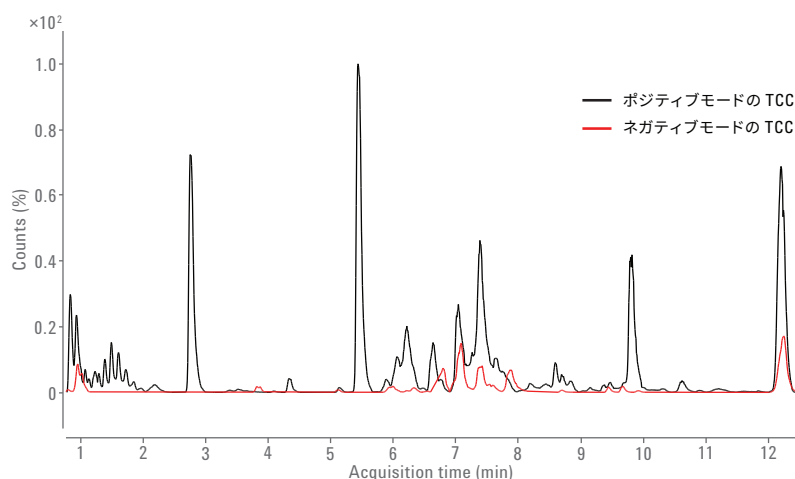


図 3. 空の点眼薬ボトル抽出液で得られたポジティブおよびネガティブトータル化合物クロマトグラム (TCC)

## Agilent MassHunter Profinder ソフトウェアによるデータアライメント

MassHunter Profinder ソフトウェアを使用して、取り込みデータからの化合物の抽出、アライメント、および積分を行いました。積分できなかった化合物もすべて視覚的に検出し、積分することができます。ポジティブおよびネガティブ取り込みモードにより、合計 175 種類の化合物がサンプルから抽出され、積分されました。

## Agilent MassHunter Mass Profiler ソフトウェアによるデータ比較と同定

抽出された化合物情報を Mass Profiler ソフトウェアにインポートしました。Mass Profiler ソフトウェアでは、データの統計的比較と、データベース検索による化合物の同定を行えます。図 4 は、Mass Profiler での解析により得られた、実験レプリケートとコントロールレプリケート中の化合物のアバンドンス比を示す対数プロットです。倍率変化が 4 倍以上 (有意な差異)、アバンドンスが 3,000 を超える化合物のみを表示するように設定されています。この解

析により、ポジティブおよびネガティブイオン化モードで得られたデータから、抽出サンプル中に 66 種類の化合物が有意な濃度で存在することが判明しました。

また、Mass Profiler の ID Browser 機能を用いることで、化合物の暫定的な同定結果をデータベース検索と分子式生成により確認できました。図 5 には、空の点眼薬ボトル抽出サンプルで検出された可塑剤であるジエチレングリコールジベンゾエートの同定結果、同位体分布、および構造が示されています。

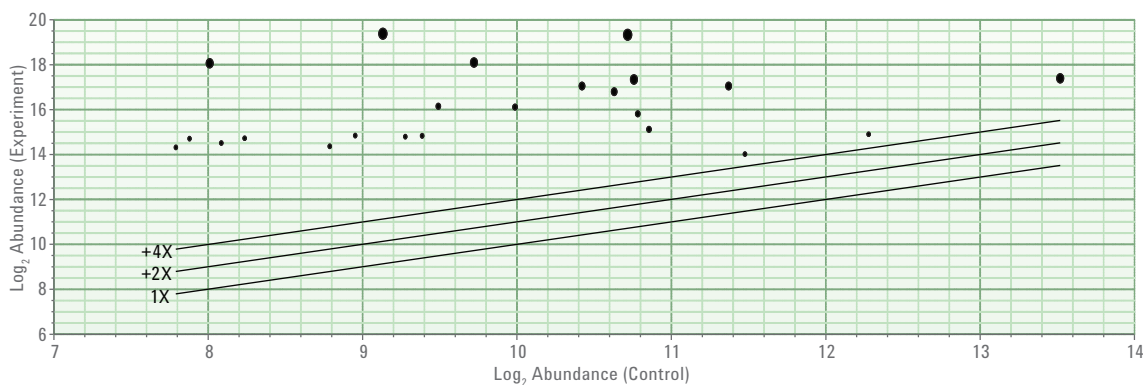


図 4. Agilent Mass Profiler での解析により得られたサンプルおよびブランク中の化合物のアバンドンス比を示す対数プロット。4 倍の倍率変化を示すアバンドンス線は、溶媒ブランクコントロールに対する実験サンプル中の化合物のアバンドンス閾値を示しています。

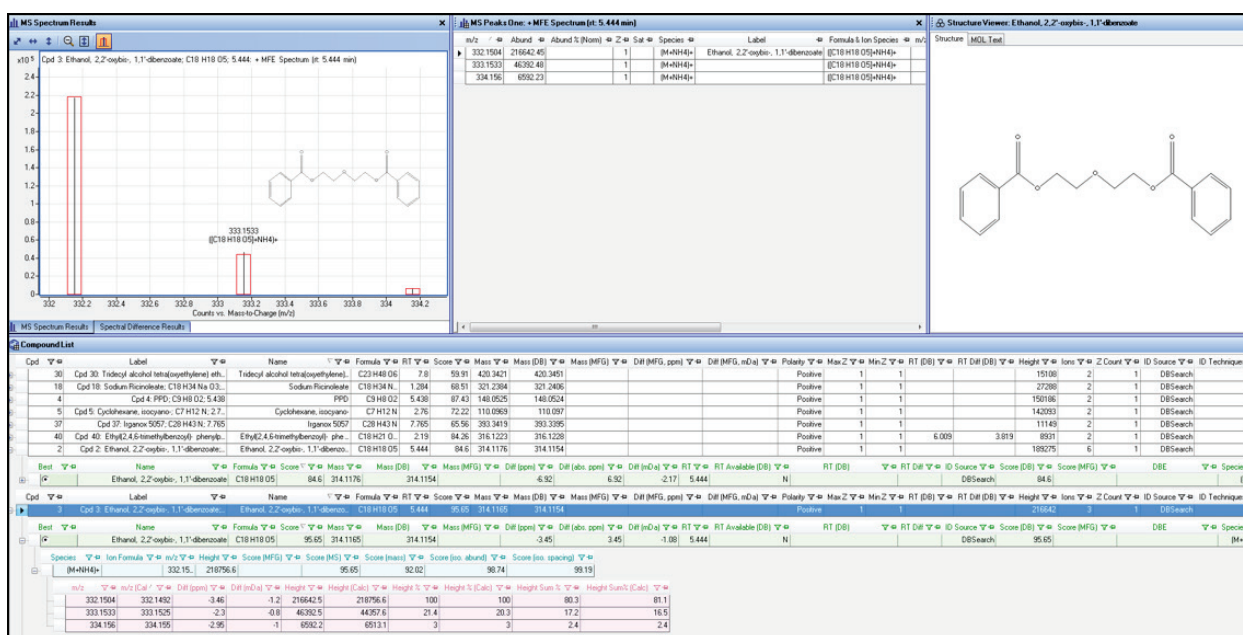


図 5. データベース検索および分子式生成機能による化合物の同定。ハイライト表示されている化合物はジエチレングリコールジベンゾエートです。

データベース検索には、1,560 種類の化合物が登録されたカスタムデータベースを使用しました。差分として特定された 66 種類の化合物のうち、トリデシルアルコール (オキシエチレン) エタノール、リシノール酸ナトリウム、Irganox 5057、フェニル(2,4,6-トリメチルベンゾイル)ホスフィン酸エチル、イソシアノシクロヘキサン、Irganox の分解物、ヘキサデカン酸 (パルミチン酸) など一部の化合物が精密質量データベースにより同定されました。

## 結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6530 Q-TOF を組み合わせて使用し、医薬品容器施栓系から溶出した抽出物を分析しました。9 種類の可塑剤が含まれる標準混合液の分析から、多数の抽出物を検出するためには、ポジティブおよびネガティブエレクトロスプレーイオン化がどちらも必要なことがわかりました。分析データは、2 ステップのワークフローに従うことで効率的に解析できました。最初のステップでは、抽出物およびそのブランク溶媒のレプリケートについて、Agilent MassHunter Profinder ソフトウェアで積分とアライメントの確認を行いました。第 2 ステップでは、Agilent MassHunter Mass Profiler ソフトウェアを使用して 2 つのグループの統計的比較を行いました。さらに、Mass Profiler のデータベース検索および分子式生成機能により、化合物を暫定的に同定し、分子式を特定しました。今回の分析の結果、Irganox などの酸化防止添加剤やリシノール酸塩など皮膚刺激物を含む 66 種類の化合物が空のボトルからの抽出液中に有意な濃度で存在することが判明しました。ベンダーによる医薬品容器施栓系の適格性評価や製剤の抽出物および浸出物の研究に応用することができます。

## 参考文献

1. Wong, D. M; Firor, R. L. Analysis of Extractable/Leachable Compounds from Transdermal Patches Using GC/MSD Systems, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5605EN (2015).
2. Wong, D. M; Firor, R. L. Analysis of Extractable/Leachable Compounds From Plastic Intravenous Bag Sets Using GC/MSD Systems, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5616EN (2015).
3. Wong, D. M; Firor, R. L. Analysis of Extractable/Leachable Compounds from Generic Liquid Drug Formulations Using GC/MSD Systems, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5632EN (2015).
4. U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration - Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), *Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics; Guidance for Industry; May 1999*.
5. Norwood, D. L; *et al.* HPLC and LC/MS Analysis of Pharmaceutical Container Closure System Leachables and Extractables, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2009, 32, pp 1768-1827.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan, November 1, 2015

5991-6244JAJP



Agilent Technologies