



点眼医薬品中の抽出物と浸出物

高分解能 LC/MS/MS による検出および同定

アプリケーションノート

医薬品

著者

Syed Salman Lateef
Agilent Technologies, Ltd.
India

概要

容器施栓系から溶出する化合物は、原薬や医薬品の汚染源になり得ることから、リスク評価の一環としてこれらの化合物を同定し、医薬品の用途への適合性を確認することが不可欠です。ところが、こういった化合物は一般に低濃度で存在するため、より高濃度の医薬品マトリックスの影に隠れ、検出が容易ではありません。これらの化合物を確実に検出、同定するためには、感度と選択性の高いメソッドが必要です。この目的には、優れた分解能と精密質量測定能力を備える四重極飛行時間型 (Q-TOF) 質量分析計が最適です。本アプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity LC システムおよび Agilent 6540 Q-TOF システムと統計解析ソフトウェアを組み合わせて使用し、点眼医薬品中の抽出および浸出 (E&L) 不純物の検出と同定を行いました。統計データ解析には Agilent Mass Profiler (MP) ソフトウェアを使用し、コントロールとの対比にもとづいてサンプル中の化合物を特定しました。カスタム精密質量データベースを使用した E&L の同定には、MP ソフトウェアのデータベース検索ツールが役立ちました。未知 E&L の同定には、MS/MS データと構造予測ソフトウェア Molecular Structural Correlator (MSC) を使用しました。本分析では、各 E&L サンプルで約 50 種類の化合物が検出されました。



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。容器施栓系から直接抽出することのできる化合物は抽出物と呼ばれます。また、製剤中で実際に検出された化合物は浸出物と呼ばれ、そのほとんどが抽出物の一部です。こういった不純物が消費者の健康を脅かす潜在的リスクになり得ることから、アメリカ食品医薬品局 (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公表し¹、保護、安全性、および適合性に関するガイドラインを定めています。一般に、次のような要因により、抽出物および浸出物 (E&L) のプロファイリングには分析上の複雑な課題が伴います。

- 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
- サンプル中の濃度範囲が広い (pg/mL から µg/mL)
- 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、LC/MS、GC/MS、ICP/MS などの複数の分析法を、多くの場合は補完的に使用する必要があります。最近のアプリケーションノートでは、GC/MS メソッドの有効性が実証されています^{2,3,4}。また、E&L の分析に対する多数の LC および LC/MS メソッドの適合性を評価した結果も Norwood らにより発表されています⁵。

不純物のスクリーニングでは、ブランク溶媒中に容器由来の E&L が存在する可能性もあります。データ解析時にこういった化合物を単純なバックグラウンド減算で排除しようとする、通常、サンプル中の潜在的な E&L も排除されてしまいます。そのため、サンプルを相互に対比し、強度差にもとづいて化合物を維持することが重要になります。Agilent Mass Profiler (MP) 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として、2つの異なるサンプル、同じサンプルのレプリケート、または2つのサンプルグループのレプリケートを使用できます。また、高分解能質量分析で得られた結果をもとにデータベース検索と分子式生成を組み合わせて使用することで、ノンターゲット分析による化合物の同定を行えます。

今回の試験では、E&L を分離、検出、同定するために Agilent 1290 Infinity UHPLC システムと Agilent 6540 Q-TOF 質量分析計を使用しました。データ解析には、Agilent MP を (ユーザー作成の) カスタム E&L データベースと組み合わせて使用しました。また、既知および未知化合物の両方について、Agilent MSC ソフトウェアで MS/MS スペクトルを照合し、理論的に最も可能性の高い分子構造を特定しました。

図 1 に、点眼医薬品 (ODP) 中の E&L の分析に使用したメソッドを示します。このメソッドにより、E&L をすばやく正確に同定することができました。

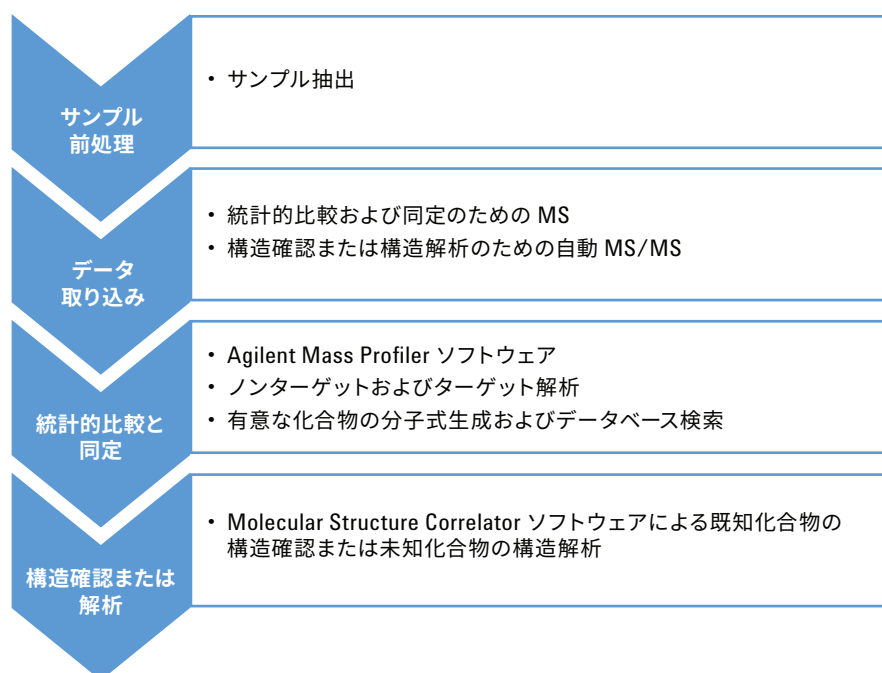


図 1. Agilent MassHunter Acquisition、Agilent Mass Profiler、および Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator ソフトウェアによるデータ解析ワークフロー

実験方法

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はSigma-Aldrich 社から購入しました。測定では、MS グレードのメタノールと脱イオン水 (Millipore 社 Milli-Q) を使用しました。

サンプル前処理

抽出物サンプル

ボトル入り点眼薬をインド国内の地域の薬局から購入しました。ボトルを水で洗浄して抽出溶媒 (1:1のメタノール:水) で満たし、55 °C のオーブンで 72 時間インキュベーションしました。その後、抽出液を LC/MS/MS システムに直接注入しました。2 つ目のサンプルには純粋な抽出溶媒を使用し、ブランクとして分析しました。

浸出物サンプル

最初の浸出物サンプルにはストレスを加えたサンプルを使用しました。点眼薬とその容器を 60 °C で 24 時間加熱し、加熱後の点眼薬を LC/MS/MS システムに直接注入しました。2 つ目の浸出物サンプルにはストレスを加えていないサンプルを使用しました。点眼薬を推奨条件下で保管し、同様に LC/MS/MS システムに直接注入しました。

すべてのサンプルは 3 つずつ用意して分析しました。

機器の設定

LC/MS/MS 分析には、Agilent 1290 Infinity バイナリ LC システムと、デュアル Agilent Jet Stream イオン源を搭載した Agilent Q-TOF G6540A システムを使用しました。Agilent 1290 Infinity バイナリ UHPLC 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 (p/n G4220A)
- Agilent 1290 Infinity ALS サーモスタット (p/n G4226A)
- Agilent 1290 Infinity ALS サーモスタット (p/n G1330B)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (p/n G1316A)

表 1. 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	
オートサンプリング温度	6 °C	
MS 条件		
イオン化モード	デュアル AJS-ESI	
乾燥ガス	150 °C で 10 L/min	
ネプライザ圧力	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	MS および自動 MS/MS	
セグメントと CE (V)	スキャンセグメント番号	CE (V)
	1	5
	2	15
	3	30
極性	ポジティブおよびネガティブ	
質量範囲	50-1,300 m/z	
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	

表 1 に、分析に使用した LC および MS 条件を示します。イオン源条件は、E&L を高感度で検出できるように最適化しました。LC/MS 分析は、ポジティブおよびネガティブイオン化モードで実施しました。

データ解析

データ解析には次のソフトウェアを使用しました。

- Agilent MassHunter Data Acquisition B.06.01
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00
- Agilent MassHunter PCDL Manager B.07.00

- Agilent MassHunter Mass Profiler B.07.01
- Agilent MassHunter Profinder B.06.00
- Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator ソフトウェア B.07.00

パーソナル化合物データベース ライブラリ (PCDL)

文献で報告されている E&L の分子式および分子構造を使用してカスタムデータベースを作成しました。このデータベースには 1,840 種類の化合物を登録しました。

Agilent MassHunter Mass Profiler ソフトウェア ストレスを加えた抽出物または浸出物サンプルを実験グループとし、溶媒ブランクまたはストレスを加えていない浸出物サンプルをコントロールグループとしました。統計解析および倍率変化解析は、レプリケートグループに対して実行しました。倍率変化解析は、少なくとも 1 つのグループで発生頻度が 50 % を超えていた化合物を対象に実施しました。2 バッチ間の比較では、倍率変化が 2.0 以上、すなわち実験グループでのアバンドンスがコントロールグループの 2 倍以上であることを基準としました。倍率変化解析により得られた差分の化合物を、質量精度基準を 5 ppm 未満としてカスタムデータベースで照合しました。

浸出物のターゲット分析

ノンターゲット分析に加え、浸出物サンプルでターゲット分析を行い、既知の浸出不純物を同定しました。MassHunter Profinder ソフトウェアによるバッチターゲットフィーチャー抽出解析には、カスタム E&L データベースの分子式を使用しました。Profinder ソフトウェアでは、解析データをもとに抽出イオンクロマトグラム

がグループごとに色分けされて示され、ピーク積分が表示されます。ピークの積分を確認し、その結果を統計解析 (前述) のために MP にエクスポートしました。

MSC 解析

PCDL に登録されていない未知化合物を同定するために、MSC 解析を行いました。自動 MS/MS データを Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの Find by Formula ツールで解析しました。Find by Formula アルゴリズムでは、MP で生成した化合物の差分リストを分子式ソースとして使用し、差分リストにある化合物の選択したプリカーサから MS/MS フラグメントを抽出しました。その後、自動 MS/MS フラグメントの結果を MSC ソフトウェアにエクスポートしました。ここでは、既知化合物の構造確認のための構造ソースとして PCDL データベースを選択し、未知化合物の解析のための構造ソースとしてオンラインデータベース ChemSpider を選択しました。

半定量

抽出溶媒にフタル酸ジオクチルを溶解した標準液を使用して検量線を作成しました。濃度範囲は 1 pg/ μ L ~ 50 ng/ μ L です。この検量線をもとに、芳香環を持つ浸出物のおおよその濃度を推定しました。各化合物そのものの標準物質を使用しなかったため、濃度値には 30 % の誤差を見込みました。

結果と考察

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

空の点眼薬ボトルからの抽出物をポジティブイオン化モードで分析した結果、200 種類の化合物が検出されました。そのうち、溶媒ブランクと比較してアバンドンスが大幅に高かった化合物は 45 種類でした。抽出物サンプルおよび溶媒ブランクコントロールでは、フタル酸ジオクチルおよびフタル酸ジニルが検出されましたが、強度差の倍率変化はそれぞれ 0.05 と 2 でした。単純なブランク減算では、どちらの化合物もサンプルから排除されてしまいます。MP ソフトウェアでは、倍率変化が 2.0 より大きいという基準を適用したため、フタル酸ジニルの存在がサンプルで確認されました。図 2 は、抽出物の測定で検出された化合物のアバンドンスを示す対数プロットです。グラフ中の直線は、強度の 1 倍、2 倍、および 4 倍の倍率変化を表す境界線です。

浸出物の測定では、ポジティブおよびネガティブイオン化分析により、合計で 54 種類の化合物が検出されました。検出された 54 種類の化合物のうち、30 % がネガティブイオン化モードで検出されたものです。

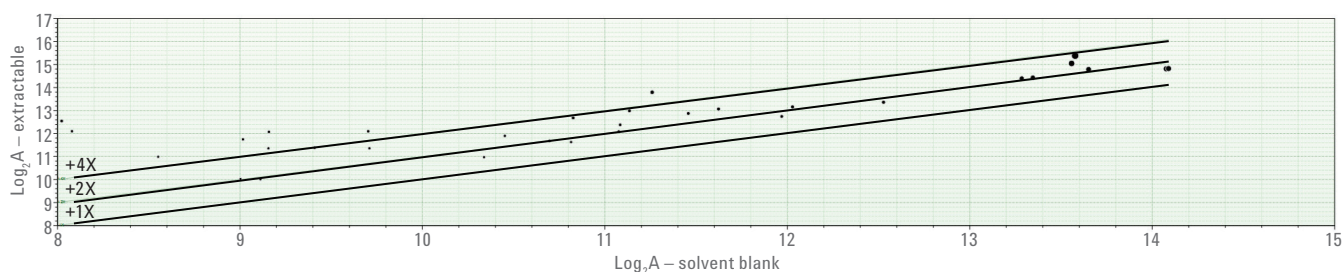


図 2. 抽出物と溶媒ブランクのアバンドンスを示す Agilent Mass Profiler 対数プロット。1 倍、2 倍、および 4 倍のアバンドンス線は、溶媒ブランクコントロールに対する実験サンプル中の化合物のアバンドンス閾値を示します。

MP ソフトウェアの同定機能を用いて、精密質量をもとにこれらの化合物を同定しました。MassHunter では、既存の (文献の) データから独自の PCDL を簡単に作成することができます。図 3 は、ユーザー作成のデータベースの一例です。空の点眼薬ボトルの抽出物で検出されたフタル酸ジノニルの同定結果、同位体分布、および構造が示されています。ユーザー作成のデータベースにより、11 種類の抽出物が同定されました。表 2 に、ポジティブおよびネガティブイオン化モードで同定された抽出物および浸出物のリストを示します。

浸出物のターゲット分析

ノンターゲット分析は、ストレス条件により新たに生成された未知化合物 (分解物または反応物) の同定に役立ちます。このような化合物も潜在的な浸出物になる可能性があります (表 2)。また、データベースに保存されている抽出物情報を適用することで、浸出物サンプルのターゲット分析を行うこともできます。

図 4 は、浸出物サンプルで検出された有意な抽出物のアバンダンスを示す対数プロットです。このデータから、45 種類の有意な抽出物のうち 16 種類が浸出物サンプル中でも検出されたことが明らかになりました。ストレスを加えたサンプルとストレスを加えていないサンプルでは、検出された化合物の濃度に違いはありませんでした (1x のアバンダンス線にある)。このアバンダンスプロットから、熱ストレスによって濃度が大きく変化した化合物は 3 種類のみであることがわかります。

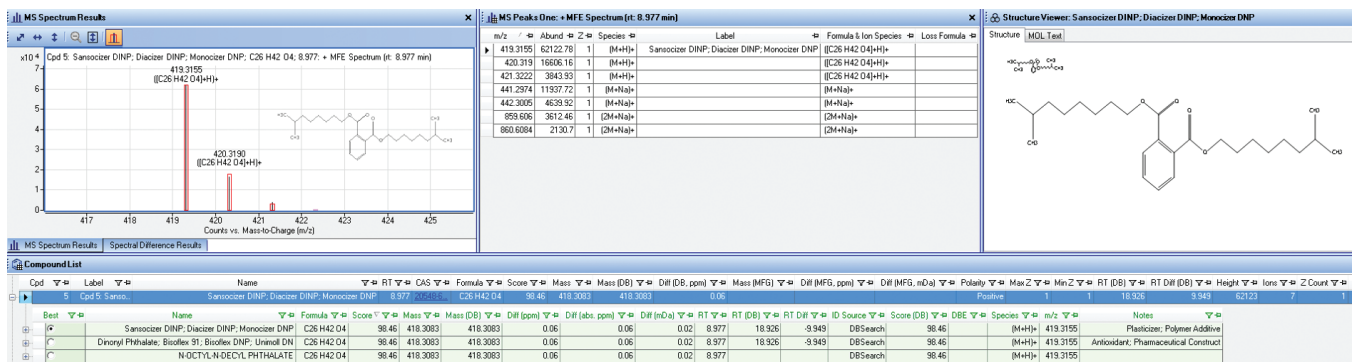


図 3. データベースにもとづく解析により得られたフタル酸ジノニルの同定結果。この結果には、異性体であるフタル酸ジイソノニルおよび *n*-デシルフタル酸-*n*-オクチルもターゲット候補であることが示されています。

表 2. カスタム (ユーザー作成) 精密質量データベースにより同定された 抽出物および浸出物 (E&L)

化合物	質量誤差 (ppm)	CAS 番号	サンプルの種類
ジエチレングリコール	1.42	111-46-6	抽出物
リンノール酸ナトリウム	4.89	5323-95-5	抽出物
1,3-プロパンジオン、1,3-ジフェニル (RHODIASTAB 83)	0.39	120-46-7	抽出物
イソプロピル-9H-チオキサンテン-9-オン	0.89	75081-21-9	抽出物
IRGACURE 651	1.17	24650-42-8	抽出物
イソ-メタクリル酸オクチル (A58)	0.37	28675-80-1	抽出物
1-ドコセン	1.37	1599-67-3	抽出物
4-(ジメチルアミノ)-安息香酸2-エチルヘキシル	1.03	21245-02-03	抽出物
IRGACURE 907	0.74	71868-10-5	抽出物および浸出物
13-ドコセンアミド、(13Z) (エルカ酸アミド)	0.11	112-84-5	抽出物および浸出物
フタル酸ジノニル	0.06	84-76-4	抽出物および浸出物
ミリスチルジメチルアミノキシド	0.33	3332-27-2	浸出物
酢酸、プロピルエステル	1.92	109-60-4	浸出物

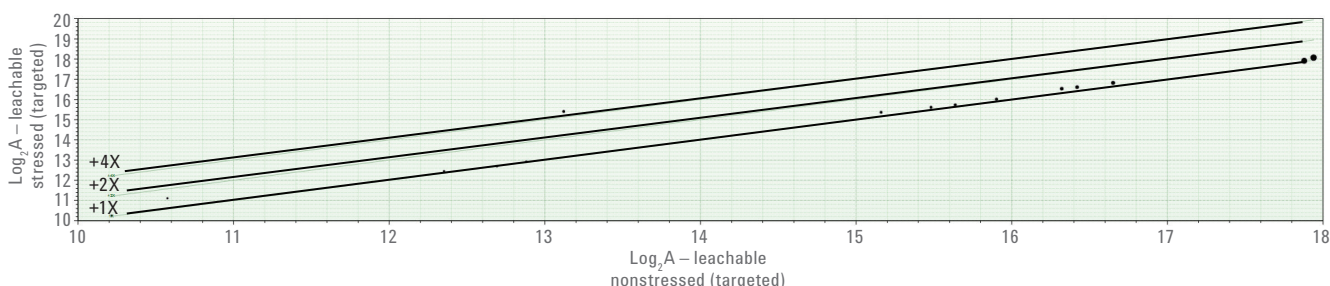


図 4. Agilent Mass Profiler による解析結果。ストレスを加えたサンプルとストレスを加えていないサンプルに含まれる浸出物のアバダンスを示す対数プロットを示しています (ターゲット化合物)。複数の化合物のプロットが1倍のアバダンス線上にあります。

化合物のノンターゲット同定、 化合物の確認、構造解析

構造確認と未知化合物の構造解析には、標準物質で得られた MS/MS スペクトルを使用しました。ただし、E&L の研究では標準物質が入手困難な場合もあります。このような場合、ソフトウェア支援構造解析が未知化合物の化学構造を特定するための有効な手段となります。Agilent MSC ソフトウェアでは、標準物質を利用できない化合物の暫定的な同定を容易に行えます。MSC ソフトウェアは、実験により得られた MS/MS フラグメントの精密質量/分子式とコンピュータで得られたフラグメントイオンを相互に関連付けるこ

とにより構造データベースを生成し、候補を提示します。構造の候補のソースには、ユーザー作成のカスタム PCDL、ChemSpider、または PubChem データベースが使用されます。

化合物の確認には PCDL データベースの構造を使用し、未知化合物の特定には Web ベースのデータベースを使用しました。図 5 は、フタル酸ジイソノニル (DINP、潜在的な内分泌攪乱物質) の確認結果と、関連する異性体が表示された画面です。

この他、エルカミド、イソプロピル-9H-チオキサンテン-9-オン、および IRGACURE 907 (光重合開始剤) が確認されました。E&L として同定された未知化合物には、次のものが含まれます。

- (9E)-N-ブチル-9-オクタデセンアミド (0.1 ppm、MSC スコア: 85)
- 3-オキソ-2,3-ジフェニルプロパナール (0.4 ppm、MSC スコア: 75)
- ピロリジンカルボキシレート誘導体 (0.2 ppm、MSC スコア: 81)
- 3,4-0-イソプロピリデン-D-リビトール誘導体 (0.3 ppm、MSC スコア: 84)

#	Mass	Intensity	Weight(%)	No. of candid.	Best score
1	149.0226	1319.90	37.1	2	96.9
2	71.0857	1246.50	8.0	4	97.5
3	57.0700	784.73	3.2	4	97.6
4	85.1010	601.30	5.5	4	97.6
5	127.1488	321.33	6.6	1	97.1
6	71.0933	134.64	0.9	0	0.0
7	275.1637	114.33	11.0	5	97.9
8	129.0182	65.63	1.4	2	50.8

図 5. Agilent Molecular Structure Correlator ソフトウェアによるフタル酸ジイソノニル (DINP) の確認。実験で得られた MS/MS フラグメントが理論構造フラグメントと照合され、最大文献引用件数にもとづいて結果がソートされています。

半定量

ストレスを加えた浸出物サンプル中の浸出物の濃度を大まかに推定するために、外部標準としてフタル酸塩を使用して半定量を行いました。分析評価スレッシュホールド (AET) は、毒性評価の必要性を報告する閾値です。PQRI ワーキンググループによる最新レポート⁶では、ODP の AET が濃度 (ppm) にもとづいて報告されています。1 ppm を超える濃度で検出された浸出物は規制機関に報告され、10 ppm を超える場合はその化合物の同定が行われ、20 ppm を超える場合はリスク評価の対象となります。ストレスを加えた浸出物サンプルの半定量結果を表 3 に示します。この結果から、フタル酸ジイソノニル、フタル酸ジ-n-オクチル、およびエルカミドの 3 種類の浸出物が 1 ppm を超え、E&L 調査の一環として報告する必要があることがわかりました。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity UHPLC システムと Agilent 6540 Q-TOF を組み合わせて使用し、点眼医薬品とその容器の E&L 化合物を分析しました。これにより得られたデータを 2 ステップのワークフローで厳密に解析しました。最初のステップでは、Agilent MP ソフトウェアを用いた統計的比較により、コントロールサンプルの E&L 化合物を区別しました。サンプル間で差異が大きかった化合物は、精密質量 PCDL データベースを使用して同定しました。第 2 ステップでは、MSC ソフトウェアを使用して既知および未知化合物を解析しました。これにより、既知化合物を確認し、未知化合物の構造解析を容易に行うことができました。今回の分析では、約 50 種類の化合物が各 E&L サンプルに存在していることがわかりました。また、解析により、健康リスクをもたらす可能性のある数種類の化合物が特定されました。さらに、浸出物の分析の半定量結果から、ストレスを加えた医薬品中にフタル酸ジイソノニル、フタル酸ジ-n-オクチル、およびエルカミドの 3 種類の化合物が 1 µg/mL を超える濃度で溶出した可能性があり、規制機関への報告が必要ながわかりました。

表 3. ストレスを加えた点眼液中の浸出物の半定量推定値

浸出物	ppm ± 30 % (µg/mL)
フタル酸ジイソノニル (DINP)	1.4 ± 0.4
フタル酸ジ-n-オクチル (DOP、DEHP)	2.5 ± 0.7
無水フタル酸	0.14 ± 0.04
2-ベンゾイル安息香酸メチル	0.11 ± 0.03
IRGACURE 907	0.02 ± 0.005
ヘキシルアミン	0.04 ± 0.01
lonox 100	0.03 ± 0.01
エルカミド	1.68 ± 0.50
ジラウリン酸グリセロール	0.08 ± 0.02
1,2-ベンゼンジカルボン酸、1,2-bis(8-メチルノニル)エステル	0.16 ± 0.05
ミリスチルジメチルアミノオキシド	0.0009 ± 0.0003
酢酸、プロピルエステル	0.10 ± 0.03

参考文献

1. 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**.
2. 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**.
3. 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**.
4. 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**.
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, 1768–1827.
6. Houston, C. T. The PQRI PODP Approach: Understanding Threshold Concepts and Their Application To Different Routes of Administration, *Talk present at E&L Europe 2015*, November **2015**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

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. 2016

Printed in Japan, May 1, 2016

5991-6828JAJP



Agilent Technologies