

# 溶出物、浸出物 (Extractables and Leachables, E&L) 試験の概要と、液体クロマトグラフィー/イオントラップ-フーリエ変換型質量分析法による溶出物質の同定・解析

一般財団法人化学物質評価研究機構

## キーワード

医療機器、E&L、高分子用添加剤、液体クロマトグラフィー、高分解能質量分析

## 目的

本アプリケーションノートでは、医療用材料の E&L 試験に関する背景と、E&L 試験の手順を紹介し、主に液体クロマトグラフィー/イオントラップ-フーリエ変換型質量分析により得られた分析結果について解析例を示します。

## はじめに

医薬品保管用包装、貼付薬剤用基材、吸引薬剤用器具など、薬剤周辺には多種のプラスチック、エラストマー材料が用いられています。これらの材料は主成分のポリマー以外にも複数の添加剤が配合されています。また、配合された原料は各種成形加工や洗浄工程を経て製品となりますが、その過程でポリマーや添加剤は構造変化を生じます。薬剤存在下において、これらの高分子材料中の化合物が医薬品へ浸出することで体内に投与され、結果的に治癒効果に影響を及ぼすことや、毒性を発現することなどが懸念されています。

医薬品の容器についてはアメリカ食品医薬局 (FDA) の FDA 21 CFR 211.94 Drug Product container and closures. (a)において、「医薬品の容器や包装は、公的または確立された要件を超えて、同一性、効力、品質、純度を損なうような反応、添加、吸収性を有してはならない。」とされています。実際に溶出物が異臭や毒性発現等の問題となり、製品回収に発展する例も散見されています。

E&L 試験は対象材料のリスクアセスメントの過程で必要となります。図 1 は E&L 試験のワークフローです。安全性の疑われる添加剤が使用されている、材料に関する情報の少ない場合など、状況に応じて溶出試験を実施します。溶出物の検出量とその毒性に基づき、必要に応じて浸出試験を実施する手順となります。浸出

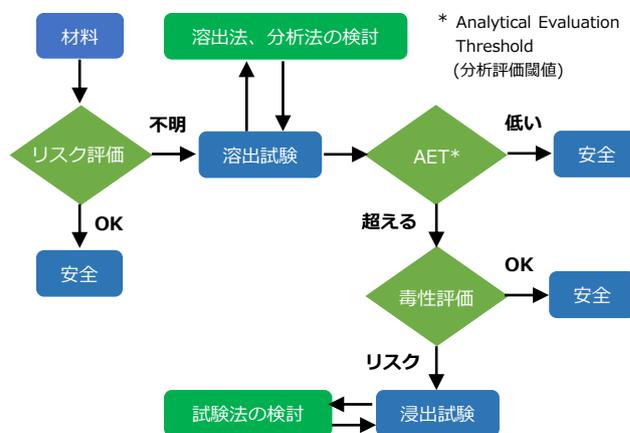


図 1 E&L 試験のワークフロー

表 1 各種ガイドラインで使用される溶出溶媒の例

ガイドライン	溶媒の例
PQRI	ヘキサン、イソプロパノール、水
BPOG	エタノール、ポリソルベート、リン酸
USP	ジクロロメタン、ヘキサン、水
ISO	生理食塩水、精製植物油、エタノール

試験は実環境の製品に対して実施するため、共存する薬剤の関係で、溶出試験と同様の方法では分析を実施できない場合があります。そのため、試験法の構築と分析法のバリデーションが重要な要素となります。

溶出試験の条件は現状において明確に確立されていません。基本的には、試験対象となる材料の特性や使用方法に基づき、ワーストケースを想定した溶出条件を構築して実施するオーダーメイド形式で試験が実施されます。一方で、Product Quality Research Institute (PQRI)、BioPhorum Operations Group (BPOG)等の団体や、USP、ISO 等の規格において、溶出試験のガイドラインが発行されています。その中には表 1 に示す溶出溶媒のほか、処理時間、温度、ソックスレーや還流下などの溶出方法などが明示されています。使用した溶媒による抽出物の極性との関係、副反応の可能性、毒性の高い留意する化合物などの記述もあることから、これらのガイドラインの情報も加味して、溶出条件を決定していくことが推奨されます。

プラスチック製品を対象として溶出試験を実施した際には、その溶出物は触媒、残留溶媒、機能性付与のための添加剤、成形加工時の劣化物、表面処理や洗浄操作残留物など、有機化合物から金属まで様々な物質が挙げられます。これらの物質は適切な前処理を行った後、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC-MS)、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS)、誘導結合プラズマ/質量分析 (ICP-MS) などの分析法を用いて同定し、含有量を求める必要があります。有機化合物ではヘッドスペース GC-MS、溶液 GC-MS、LC-MS を主とした分析法がガイドラインに定められています。対象物質の分子量や極性により適した分析法が異なるため複数法の実施が求められますが、その他にも、注入方法の差異、誘導体化の有無などにより、検出される物質の種類と量に影響を及ぼしますので、複数の手段を用いて検出物質の妥当性を確認する必要があります。GC-MS、LC-MS で検出された物質の同定は、質量スペクトルライブラリや保持時間データとの照合が主な手段となります。GC-MS については NIST などの市販の EI 質量スペクトルライブラリが充実しており、多数の物質が同定可能です。一方、LC-MS については、独自のライブラリを準備する必要があります。そのライブラリ掲載量が同定可否の決め手となります。同定できなかった未知化合物については、その化学構造を特定あるいは推定するため、飛行時間型質量分析 (TOF-MS) やフーリエ変換型質量分析 (FTMS) による精密質量測定と、MS/MS やイオントラップ (IT) による多段階 MS 測定が有効な方法となります。原料の主鎖構造や合成時に使用される触媒や反応経路、加工時の劣化物、成形物の洗浄処理など、材料特性を把握し、発生する不純物の構造を予測した上で、精密質量による組成式推定とフラグメンテーション解析、さらには GC-MS の解析結果も合わせることで、未知化合物の構造推定が可能となります。

本アプリケーションノートでは、溶出物の同定において最も困難な LC-MS データの解析において、精密質量取得と多段階 MS を可能とする LC/IT-FTMS を用いた例を示します。

## 試験方法と結果

注射器の包装で 사용되는ポリエチレンテレフタレート (PET) /ポリエチレン (PE) 積層フィルムのソックスレー抽出を行い、得られたジクロロメタン溶出物を LC/IT-FTMS により分析しました。表 2 に示す条件で分析を実施し、精密質量のクロマトグラムを取

得するとともに、検出強度の高い  $m/z$  のピークについて MS/MS スペクトルを取得しました。ピークの同定・解析は Thermo Scientific Compound Discoverer™ 2.0 ソフトウェア (CD2) により実施しました。化学物質評価研究機構ではプラスチック、ゴム等の高分子製品の評価、分析のため、1000 種以上の高分子用添加剤と、約 800 種のポリマーを標準物質として保有しています。これら添加剤主成分とその関連物質 (例: 多量体、劣化物)、ポリマー不純物 (例: モノマー、オリゴマー) について、プリカーサ

表 3 LC/IT-FTMS の分析条件

LC 条件			
装置	Dionex™ Ultimate™ 3000 (Thermo Fisher SCIENTIFIC™)		
カラム	L-Column 2 ODS 長さ 150 mm, 内径 2.1 mm, 粒径 3mm (化学物質評価研究機構)		
流量	0.4 mL/min		
カラム温度	40 °C		
注入量	5 µL		
移動相	A: 2-プロパノール/アセトニトリル = 1/1		
	B: 5mM 酢酸アンモニウム水溶液		
	時間 (min)	A (%)	B (%)
	0	20	80
	20	95	5
	40	20	80
	50	20	80
MS 条件			
装置	LTQ Orbitrap™ XL (Thermo Fisher SCIENTIFIC)		
イオン化法	ESI		
極性	Positive, Negative		
ヒーター温度	450 °C		
スプレー電圧	3000 V		
キャピラリー温度	230 °C		
キャピラリー電圧	40 V		
フルスキャン MS 条件			
質量範囲	$m/z = 100 - 2000$		
分解能	30,000 ( $m/z=400$ )		
データ依存 MS/MS Top 2 data			
コリジョン	衝突誘起解離 (CID)		
衝突エネルギー	35 eV		
分解能	7,500 ( $m/z=400$ )		
ピーク検出条件			
最小ピーク強度	100,000		
質量許容差	5 ppm		
S/N 閾値	3		

ーイオンの精密質量と、保持時間、MS/MS スペクトルの特徴的なフラグメントイオンをCD2に独自に収録しました。その他にCD2に予め登録されているE&L関連物質と、外部化合物フリーデータベース(ChemSpider)を併せた網羅的解析を実施しました。

図2はジクロロメタン溶出物をESI positiveの条件で測定して得られたベースイオンピーククロマトグラムです。溶出物中にはブランク操作後に検出される物質も存在しますので、ブランクの

クロマトグラムも併せて解析を行い、ブランクに由来するピークを除外し、溶出物特有として検出したピークの解析を実施しました。表3にはライブラリ及びデータベース検索により同定された物質とその用途、未知化合物については組成式を示しました。組成式はPositiveとNegativeモードの測定結果、プリカーサーイオンと考えられる精密質量、付加イオン、MS/MSスペクトルのフラグメントイオン、同位体分布を基に、CD2により妥当性を検証

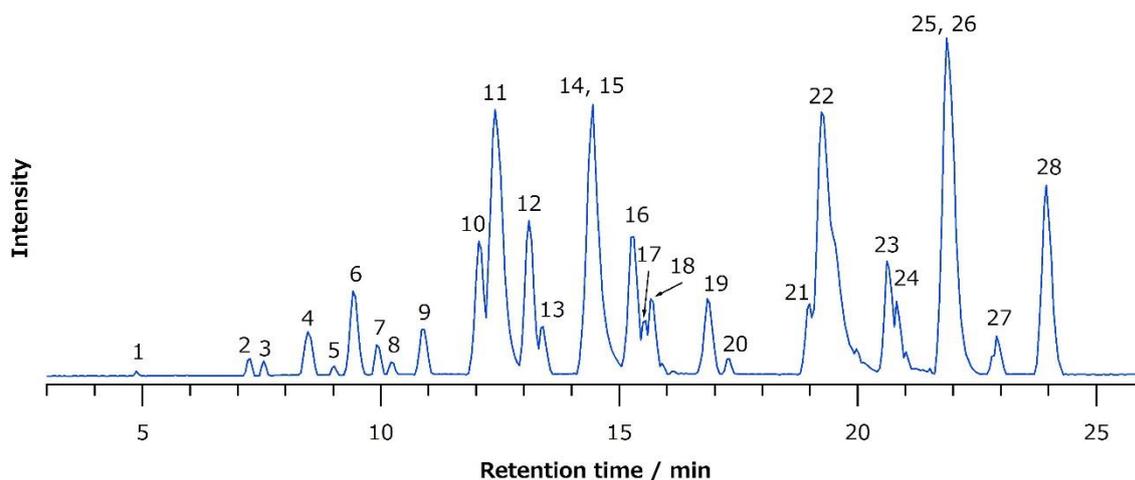


図2 ジクロロメタン溶出物のLC/MSクロマトグラム(ESI, positive)

表3 溶出物の同定・解析結果

No.	組成式	物質名	用途
1	C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	不明	—
2	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	PET直鎖オリゴマー(n=2)(ジエチレングリコール構造含む)	PET不純物
3	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	PET直鎖オリゴマー(n=3)	PET不純物
4	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	不明	—
5	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	PET直鎖オリゴマー(n=2)(2つのジエチレングリコール構造含む)	PET不純物
6	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	PET環状オリゴマー(n=2)(ジエチレングリコール構造含む)	PET不純物
7	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	PET直鎖オリゴマー(n=3)(ジエチレングリコール構造含む)	PET不純物
8	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	不明	—
9	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>11</sub>	不明	—
10	C <sub>32</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	PET環状オリゴマー(n=3)(ジエチレングリコール構造含む)	PET不純物
11	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	PET環状オリゴマー(n=3)	PET不純物
12	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>8</sub>	不明(C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> 単位を有する化合物)	—
13	C <sub>42</sub> H <sub>36</sub> O <sub>17</sub>	PET直鎖オリゴマー(n=4)	PET不純物
14	C <sub>52</sub> H <sub>44</sub> O <sub>21</sub>	PET直鎖オリゴマー(n=5)	PET不純物
15	C <sub>40</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	PET環状オリゴマー(n=4)	PET不純物
16	C <sub>50</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	PET環状オリゴマー(n=5)	PET不純物
17	C <sub>60</sub> H <sub>48</sub> O <sub>24</sub>	PET環状オリゴマー(n=6)	PET不純物
18	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>12</sub>	不明(C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> 単位を有する化合物)	—
19	C <sub>28</sub> H <sub>41</sub> O <sub>4</sub> P	6-[3-(3- <i>t</i> -ブチル-4-ヒドロキシ-5-メチルフェニル)プロポキシ]-2,4,8,10-テトラ- <i>t</i> -ブチルジベンズ[d,f][1,3,2]ジオキサホスフェピン(AO)の分解物	酸化防止剤劣化物
20	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>16</sub>	不明(C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> 単位を有する化合物)	—
21	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO	パルミチン酸アミド	滑剤、アンチブロッキング剤
22	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	オレイン酸アミド	滑剤、アンチブロッキング剤
23	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO	ステアリン酸アミド	滑剤、アンチブロッキング剤
24	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> NO	エイコセン酸アミド	滑剤、アンチブロッキング剤
25	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO	エルカ酸アミド	滑剤、アンチブロッキング剤
26	C <sub>42</sub> H <sub>61</sub> O <sub>5</sub> P	AOの酸化物	酸化防止剤劣化物
27	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> NO	ベヘン酸アミド	滑剤、アンチブロッキング剤
28	C <sub>42</sub> H <sub>63</sub> O <sub>5</sub> P	トリス(2,4-ジ- <i>t</i> -ブチルフェニル)ホスフェート	酸化防止剤劣化物

して決定しました。

溶出物からは PET 由来と考えられるオリゴマー、酸化防止剤由来の化合物、滑剤又はアンチブロッキング剤、可塑剤が検出されました。PET は合成や成型加工の過程で直鎖状オリゴマーのほか、環状オリゴマーも生成します。ほかに、PET には結晶化による白濁防止を目的に、ジエチレングリコールを微量添加されていますが、実際にエチレングリコールがジエチレングリコールに置き換わった構造を含むオリゴマーも検出されています。PET のオリゴマーについては、その低分子量成分は GC-MS 法でも検出でき、ポリマー不純物として事前に登録済みであったことから、容易に同定可能でした。これらの PET オリゴマーは酸・塩基性等の溶出条件によっては、元々の含有量より多量に検出される可能性があることから、他の溶出条件と比較しながら慎重に解析を行う必要があります。

一方で、酸化防止剤である 6-[3-(3-*t*-ブチル-4-ヒドロキシ-5-メチルフェニル)プロポキシ]-2,4,8,10-テトラ-*t*-ブチルジベンズ[d,f][1,3,2]ジオキサホスフェピン (AO) に関しては、添加剤自体は登録済みでしたが、その劣化物は未登録であり、当初同定されませんでした。未同定となった物質は劣化や分解等の結果、生成された化合物の可能性のあることから、酸化や水素脱離等の反応経路を加味して、再解析を行った結果、図2の No.26 ピークである  $C_{42}H_{61}O_5P$  が AO の酸化物であることが判明しました。さらに、No.19 については、化合物中にリンを含む構造であることを考慮して解析した結果、図3の MS、MS/MS スペクトルに示すように AO の分解物であることが予測されました。AO は加工安定性を目的としたリン系酸化防止剤であることから、これらの分解物は成型加工の過程で酸化され、その際に分解反応も同時に生じたものと考えられます。

## まとめ

本アプリケーションノートでは E&L 試験の概要と、LC/IT-FTMS を用いた溶出物の分析を紹介しました。E&L 試験の重要性は、そのリスクアセスメントの観点から、今後さらに高まると考えられます。本機構では今回紹介したソリューションのほかに、ダイナミックヘッドスペース GC/MS、GC/TOF-MS や LC/MS/MS などの微量分析技術、長年にわたる高分子材料の分析実績に基づく添加剤や劣化物に関する豊富な知識と膨大なデータベース、分

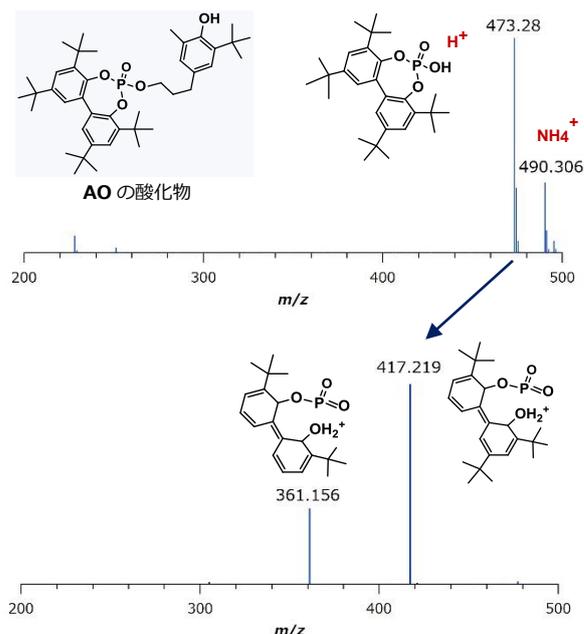


図3 AO 分解物の MS(上段)、MS/MS スペクトル(下段)とフラグメントイオンの予測構造

析法のノウハウ、微量分析、未知構造の解析、毒性評価など E&L 試験に関する高い技術を有しております。また、E&L 試験に限らず、分析法開発、洗浄操作のバリデーション支援などのご相談にも対応しておりますので、お気軽に問合せ願います。

## 参考文献

Douglas J. Ball, Daniel L. Norwood, Cheryl L. M. Stults, Lee M. Nagao, Leachables and Extractables Handbook: Safety Evaluation, Qualification, and Best Practices Applied to Inhalation Drug Products. Wiley-VCH (2012)

<問い合わせ先>

一般財団法人化学物質評価研究機構 高分子技術部

三輪伶史、山内朋子

TEL: 0480 (37) 2601 FAX: 0480 (37) 2521

WEB: <http://www/cerij.or.jp/>

2017.1 ©CERI 無断複写、転写を禁じます。  
記載した内容は予告なく変更することがあります。