

# Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS を 用いたニトロソアミン不純物測定

医薬品製造工程からの規制対象の遺伝毒性不純物の検出

## 著者

軸丸裕介  
アジレント・テクノロジー  
株式会社

## 概要

最近の研究により、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) 製剤の一部に、発がん性のニトロソアミン不純物が含まれることが報告されています。その結果、これらの製品の多くが回収され、目標濃度を超えるニトロソアミン不純物を検出できる分析メソッドの必要性が浮き彫りになりました。このアプリケーションノートでは、Agilent 6495 LC/TQ によるメソッドを用いて、医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceutical and Medical Devices Agency, PMDA) などが指定したニトロソアミン 10 種を同時にかつ高感度に検出する方法を説明します。

## はじめに

ARB 薬であるバルサルタン、ロサルタン、イルベサルタンのリコールの発表を受け、FDA1 や EMA2、PMDA3 などの規制当局が、N-ニトロソ基を含む不純物に注目しています。ニトロソアミン不純物は、こうした医薬品の製造工程中にごく微量に発生する副生成物です。これらの不純物は発がん物質の可能性（すなわち、遺伝毒性不純物である可能性）があるものとして分類されます。本アプリケーションノートでは、Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS を用い、ニトロソアミン化合物 10 種を包括的かつ高感度に分析するメソッドを検討しました。ニトロソアミン不純物はすべて、分子量 74 ~ 158 の範囲の低分子物質です。該当する化合物は以下のとおりです。また、本アプリケーションノートで用いる名称と構造を図 1 に示しました。

- N-ニトロソジメチルアミン (NDMA)
- N-ニトロソジエチルアミン (NDEA)
- N-ニトロソ-N-メチル-4-アミノ酪酸 (NMBA)
- N-ニトロソメチルフェニルアミン (NMPA)
- N-ニトロソイソプロピルエチルアミン (NIPEA)
- N-ニトロソジイソプロピルアミン (NDIPA)
- N-ニトロソジブチルアミン (NDPA)
- メチルニトロソピペラジン (MeNP)
- N-ニトロソジブチルアミン (NDBA)
- N-ニトロソモルホリン (NMOR)

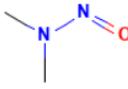
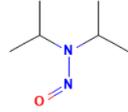
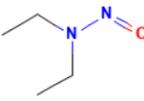
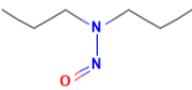
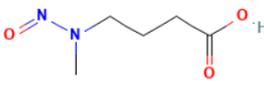
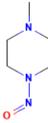
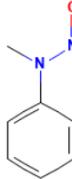
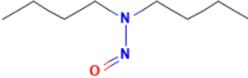
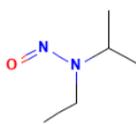
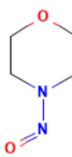
<p>NDMA</p> 	<p>NDIPA</p> 
<p>NDEA</p> 	<p>NDPA</p> 
<p>NMBA</p> 	<p>MeNP</p> 
<p>NMPA</p> 	<p>NDBA</p> 
<p>NIPEA</p> 	<p>NMOR</p> 

図 1. ニトロソアミンの名称と構造

## 実験方法

### 材料および試薬

本研究に用いた 10 種のニトロソアミン標準品は、富士フィルム和光純薬の 10 種ニトロソアミン類混合標準液 (145-10051) を用いました。LC/MS グレードのメタノールとギ酸は富士フィルム和光純薬から購入しました。

### データ解析

データは Agilent MassHunter Data Acquisition ソフトウェア バージョン 10.1 を用いて測定しました。MS/MS トランジションは Optimizer ソフトウェアを用いて最適化を行いました。

## LC の構成とパラメータ

表 1. UHPLC の構成と設定

パラメータ	設定値
装置	Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
	Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ (G7167B)
	Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
ニードル洗浄	メタノール：水/80:20
サンプル希釈剤	水
マルチサンプラ温度	10 °C
注入量	40 µL
分析カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm, 1.8 µm (959994-902)
カラム温度	40 °C
移動相 A	0.2 % ギ酸水溶液
移動相 B	メタノール
流速	0.6 mL/min
グラジエント	1 % B → (10 min) → 95 % B
ストップタイム	14 分
ポストタイム	4 分

## トリプル四重極装置の構成とパラメータ

表 2. MS の構成およびソース設定

パラメータ	設定値
機器	Agilent 6495C トリプル四重極 LC/MS
イオン源	大気圧化学イオン化 (APCI)
MS/MS モード	ダイナミック MRM (dMRM)
イオンモード	ポジティブ
ドライガス温度	290 °C
ドライガス流量	11 L/min
ネブライザ圧力	55 psi
APCI ヒーター	300 °C
APCI ニードル、ポジティブ	6 µA
キャピラリ電圧、ポジティブ	3000 V
ハイプレッシャー RF	50
ロープレッシャー RF	40
MS1/MS2 分解能	0.7/0.7 (unit/unit)
サイクルタイム	可変 (500 msec/cycle)

## 成分の MS/MS 化合物情報

表 3. Agilent 6495 のダイナミック MRM モードでの MRM の詳細設定

化合物名	定量イオン	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	リテンションタイム (分)	リテンションタイム ウィンドウ (分)	フラグメンタ (V)	コリジョン エネルギー (V)	極性
NDMA	○	75	43.3	4.59	2	166	14	+
		75	58.2	4.59	2	166	10	+
NDEA	○	103	75.1	7.52	2	166	10	+
		103	47.3	7.52	2	166	14	+
NMBA	○	147	117.1	5.69	2	166	2	+
		147	44.3	5.69	2	166	10	+
NMPA	○	137	107.1	9.82	2	166	10	+
		137	66	9.82	2	166	30	+
NIPEA	○	117	75.1	8.66	2	166	6	+
		117	47.3	8.66	2	166	18	+
NDIPA	○	131	89.1	9.61	2	166	6	+
		131	43.4	9.61	2	166	18	+
NDPA	○	131	89.1	10.03	2	166	6	+
		131	43.4	10.03	2	166	18	+
MeNP	○	130	100.2	2.55	2	166	6	+
		130	58.2	2.55	2	166	22	+
NDBA	○	159	57.4	11.57	2	166	14	+
		159	41.3	11.57	2	166	22	+
NMOR	○	117	87.1	5.35	2	166	10	+
		117	45.3	5.35	2	166	18	+

## 結果と考察

キャリブレーション濃度は 0.01 ~ 20 ng/mL の範囲としました。表 4 に具体的な詳細内容を示します。R2 値は全成分で 0.9975 を超えており、濃度範囲全体にわたり直線的レスポンスを示しています。また、表中アスタリスクで示した成分は、今回調整した最低濃度である 0.01 ng/mL から精度・真度 ±15 % 以内を満たしました。図 2 は Agilent 6495 TQ による代表的な dMRM クロマトグラムの重ね書き表示です。1 ng/mL でのニトロソアミン化合物 10 種すべての溶出が示されています。

表 4. UHPLC の構成と設定

	LOD (ng/mL)	LOD (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R <sup>2</sup>	直線性範囲 (ng/mL)
NDMA*	0.01	7.7	0.01	7.7	0.9998	0.01 ~ 20
NDEA	0.01	15.9	0.02	33.5	0.999	0.01 ~ 20
NMBA*	0.01	18.5	0.01	18.5	0.9993	0.01 ~ 20
NMPA*	0.01	32.7	0.01	32.7	0.9993	0.01 ~ 20
NIPEA	0.01	12.8	0.02	24.6	0.9987	0.01 ~ 20
NDIPA	0.01	20.8	0.02	31.6	0.9975	0.01 ~ 20
NDPA	0.01	20.5	0.02	32.2	0.9977	0.01 ~ 20
MeNP	0.01	66.6	0.02	151.1	0.998	0.01 ~ 20
NDBA	0.01	23.9	0.02	63.9	0.9988	0.01 ~ 20
NMOR*	0.01	65.7	0.01	65.7	0.9997	0.01 ~ 20

S/N 比の算出は Agilent MassHunter Quantitative Analysis 11.1 ソフトウェアを用い、ノイズアルゴリズム RMS、ノイズ範囲自動としました。

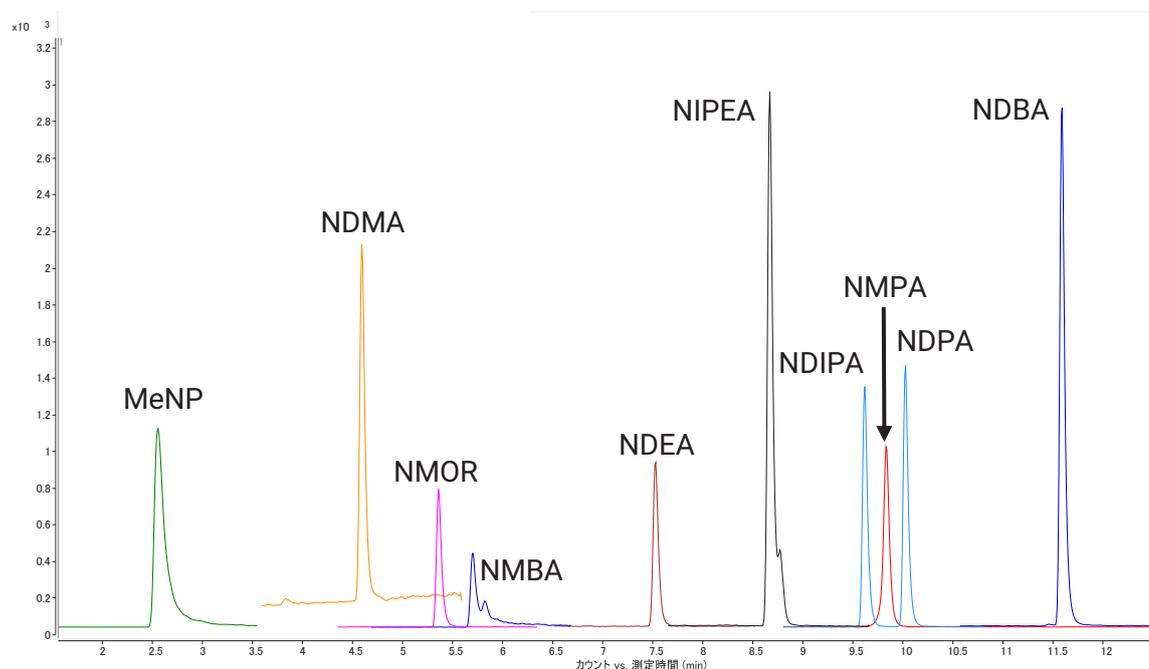


図 2. 10 種のニトロソアミン化合物の溶出を示す dMRM クロマトグラムの重ね表示

## 精度および再現性

すべての化合物が、今回用いた溶液のうち最低濃度の 0.01 ng/mL で検出されました。また、化合物 10 種全ての検量線は、定量下限 (LOQ) での想定濃度限度から 15 % 以内の真度を示しました。定量下限および計算した統計値は、測定した線形のキャリブレーション範囲に示されています (表 4)。また、表 5 に各濃度での真度と精度の詳細をまとめましたが、全ポイントで CV<10 の再現性を示しています。図 3 にいくつかの化合物の低濃度域のマスクロマトグラム、図 4 に Agilent 6495 LC/TQ システムで測定した検量線を示します。

表 5. Agilent 6495 トリプル四重極のさまざまな濃度での真度および精度 (n=5)

濃度 (ng/mL)	NDMA		NDEA		NMBA		NMPA		NIPEA	
	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
0.02	102	6.4	112.6	3.9	97.2	5.3	103.8	2.7	111.7	4.6
0.05	99.8	6.1	99.6	6.1	102	7.7	98.8	2.8	96.6	2.6
0.1	98.5	3.9	95.2	4.1	102.6	7	99.1	1.2	94.1	1.1
0.2	98.2	0.9	95.1	1.6	103	1.5	97	3	93.1	2.1

濃度 (ng/mL)	NDIPA		NDPA		MeNP		NDBA		NMOR	
	平均	CV								
0.02	113.9	4.4	112.2	1.6	114.9	1.4	106.6	4	103.5	9.8
0.05	101.8	4.3	98.6	2.8	96.8	3.2	96.9	1.7	93.7	3.3
0.1	92.8	2.6	92.3	3.1	91.9	1.4	93.4	2.9	101.7	5.2
0.2	91.5	2.1	89.1	2.7	93.2	3	92.3	1.4	98	2.1

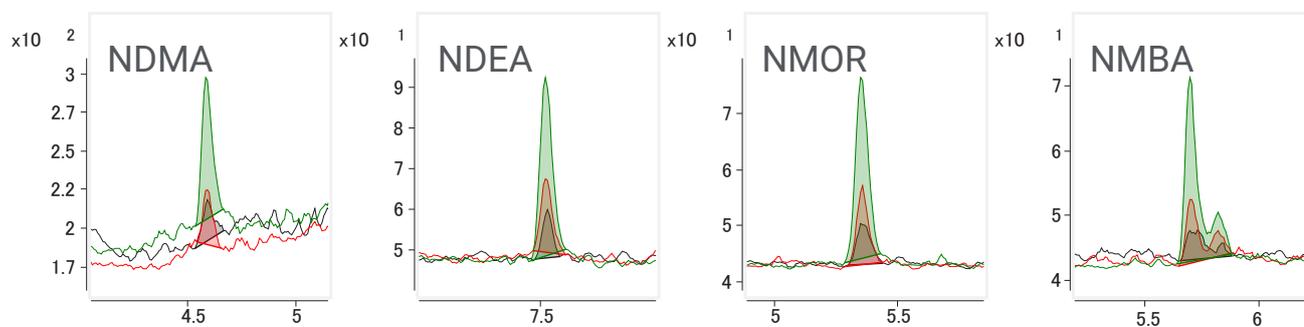


図 3. NDMA、NDEA、NMOR、NMBA について、低濃度領域の代表的なマスクロマトグラム  
黒 : 0.01 ng/mL、赤 : 0.02 ng/mL、緑 : 0.05 ng/mL

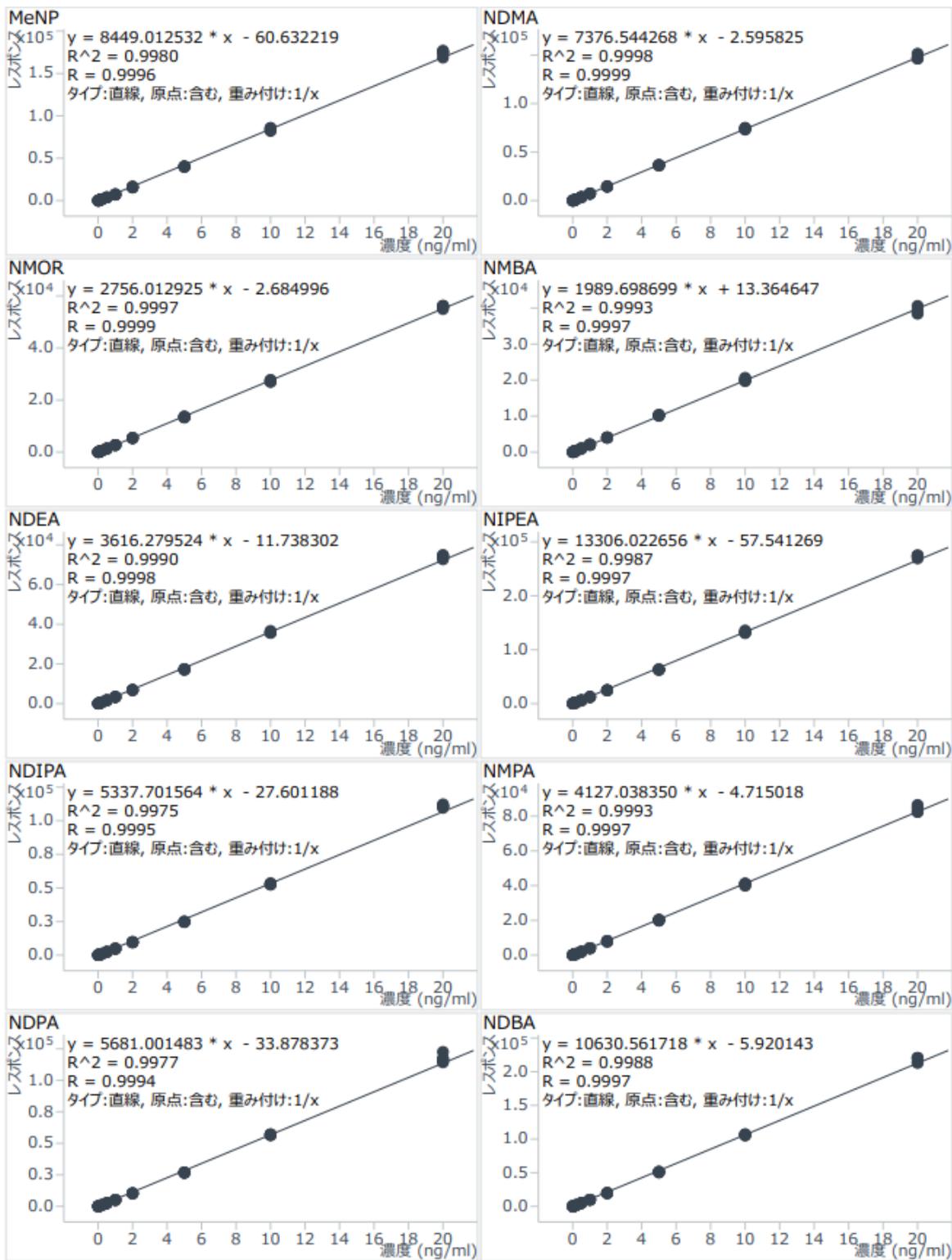


図 4. Agilent 6495トリプル四重極で得られた検量線

## 結論

Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS を用いて、規制項目で要求される低濃度のニトロソアミン不純物を分析することができます。このアプリケーションノートでは、低濃度のニトロソアミン不純物の検出における Agilent 6495 LC/TQ の感度を実証しました。このメソッドを用いることで、PMDA をはじめ各局が指定した 10 種類のニトロソアミンを包括的に定量することができます。

## 参考文献

1. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs>
2. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities>
3. <https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/0371.html#1>

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ー

**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いません。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。

DE53933777

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, December 26, 2022

5994-5635JAJP