

# Agilent 6546 LC/Q-TOF 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、問題となる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 6546 LC/Q-TOF 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、FDA<sup>1</sup> や EMA<sup>2</sup>、PMDA<sup>3</sup>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 6546 LC/Q-TOF 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-ニトロソジプロピルアミン (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)

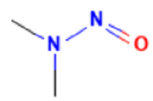
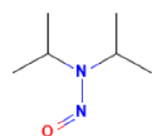
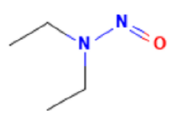
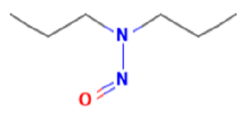
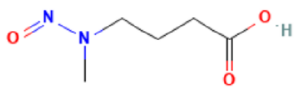
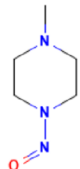
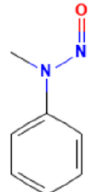
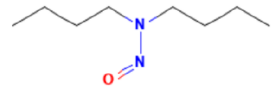
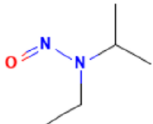
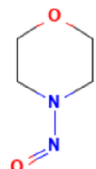
NDMA 	NDIPA 
NDEA 	NDPA 
NMBA 	MeNP 
NMPA 	NDBA 
NIPEA 	NMOR 

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。

### データ採取

今回の測定に用いた LC の設定を表 1 に、MS の設定を表 2 に示しました。また、MassHunter PCDL Manager 8.0 を用いて表 3 に示した化合物ライブラリを作成し、化合物のイオン強度や溶出時間を最適化しました。

### データ採取

データは Agilent MassHunter Data Acquisition ソフトウェア バージョン 11.0 を用いて測定しました。定量は Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis TOF ソフトウェアバージョン 11.1 を用いました。クロマトグラムの抽出は、理論値  $\pm 0.01$  Da としました。

## 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 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
	Agilent 1260 Infinity II マルチサンブラ (G7167A)
	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
マルチサンブラ温度	10 °C
注入量	40 mL
分析カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm x 150 mm, 1.8 $\mu$ m (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	時間 (分), %B
	0, 1
	10, 95
	15, 95
ストップタイム	15 分
ポストタイム	5 分

## LC/Q-TOF 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 6546 LC/Q-TOF
イオン源	大気圧化学イオン化 (APCI)
イオンモード	正イオンモード
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 $\mu$ A
キャピラリ電圧、ポジティブ	3000 V
フラグメンタ電圧	90 V
データ採取範囲	$m/z$ 70-1000
データ採取レート	500 msec/cycle
参照質量	$m/z$ 121.0509 および 922.0098

## 化合物情報

表 3. MassHunter PCDL Manager の例

	Name	Fomula	Mass	Retention Time
▶	NDMA	C2H6N2O	74.04801	5.16
	NDEA	C4H10N2O	102.07931	8.22
	NMBA	C5H10N2O3	146.06914	6.37
	NMPA	C7H8N2O	136.06366	10.61
	NIPEA	C5H12N2O	116.09496	9.38
	NDIPA	C6H14N2O	130.11061	10.37
	NDPA	C6H14N2O	130.11061	10.81
	MeNP	C5H11N3O	129.09021	2.52
	NDBA	C8H18N2O	158.14191	12.45
	NMOR	C4H8N2O2	116.05858	6

## 結果と考察

キャリブレーション濃度は 0.05 (NMBA のみ 0.2) ~ 50 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。R<sup>2</sup> 値は全成分で 0.991 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、NMPA は、今回調製した最低濃度である 0.05 ng/mL から精度・真度 ±15 % 以内を満たしました。図 2 は Agilent 6546 LC/Q-TOF による代表的なマス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。

図 3 にはスペクトル解析の例を示しました。1 ng/mL で得られたスペクトルについて組成式推定を行った結果、*m/z* が最も小さい NDMA で一致スコア 99.94 % の解析が可能でした。また、この時の分解能は 25,000 以上となっており、極めて高い信頼性でニトロソアミン化合物のスクリーニングが可能であることが示されました。

表 4. Agilent 6546 LC/Q-TOF の分析結果

	LOD (ng/mL)	LOD (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R <sup>2</sup>	直線性範囲 (ng/mL)
NDMA	0.1	16.8	0.2	40.3	0.996	0.05 ~ 50
NDEA	0.05	8	0.2	27.1	0.995	0.05 ~ 50
NMBA	0.2	5.8	0.5	6.4	0.996	0.2 ~ 50
NMPA	0.05	15.7	0.05	15.7	0.998	0.05 ~ 50
NIPEA	0.05	8	0.1	13.7	0.996	0.05 ~ 50
NDIPA	0.05	35.4	0.1	51.9	0.991	0.05 ~ 50
NDPA	0.05	10.3	0.1	23	0.994	0.05 ~ 50
MeNP	0.05	12	0.1	28.3	0.996	0.05 ~ 50
NDBA	0.05	21.8	0.1	32.8	0.991	0.05 ~ 50
NMOR	0.05	7.7	0.2	15.1	0.993	0.05 ~ 50

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。

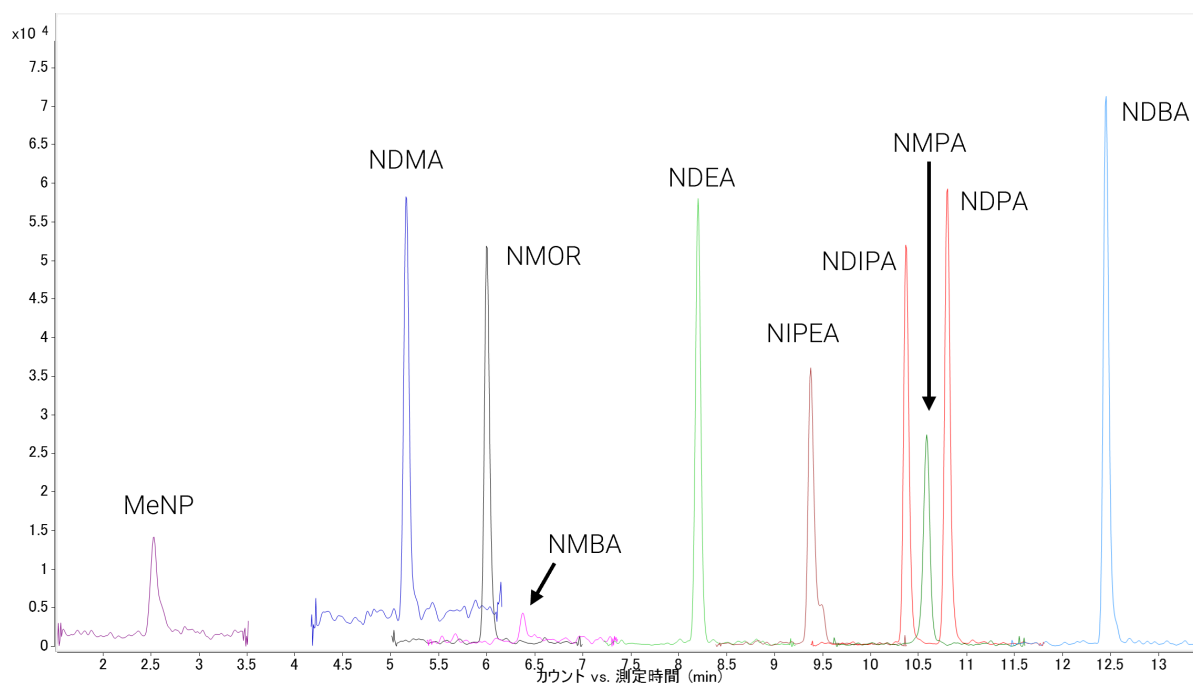


図 2. 10 種のニトロソアミン化合物の溶出を示すマスクロマトグラム重ね表示

### 精度および再現性

NMBA を含むすべての化合物が、今回用いた溶液のうち 0.5 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 20 % 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<15 の再現性を示しています。図 4 にいくつかの化合物の低濃度域のマスキロマトグラム、図 5 に Agilent 6546 LC/Q-TOF システムで測定した検量線を示します。

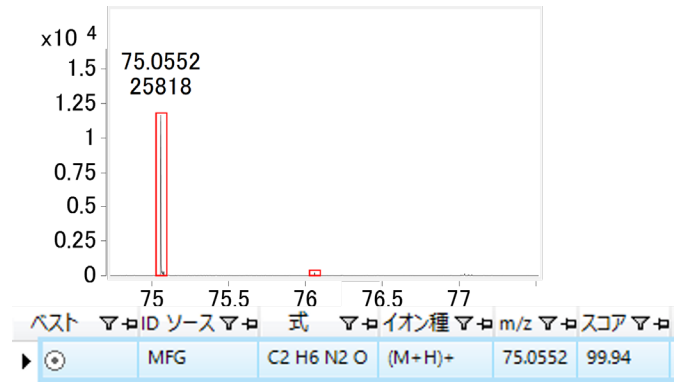


図 3. スペクトル解析の例 NDMA  
 上段：m/z 下段：分解能、赤枠は理論値  
 下表：データベース解析の結果

表 5. Agilent 6546 LC/Q-TOF 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
0.5	101	3.1	103.4	1.5	96.5	10.5	106.2	6.9	101.4	3
1	110.6	3.3	107.3	5	85.6	14.3	102.4	4.3	104.1	6.6
2	105.5	3.8	110.5	2.4	102.7	9.7	105.4	5	107.5	2.8
5	108.3	1.8	107.3	1.2	97	5.4	105.5	2.8	103.8	3

濃度 (ng/mL)	NDIPA		NDPA		MeNP		NDBA		NMOR	
	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
0.5	102.4	2.2	104.7	6.2	85.4	8.7	105	6	104.2	3.7
1	102.6	5.5	115.3	3.2	89.6	6.8	115.4	3	106.7	7.2
2	108.4	2.9	109.3	3.6	88.6	6.1	115.4	3.5	110.8	3.3
5	106.1	2.4	108.5	2.8	94.2	4.9	109.6	2	106.3	2.2

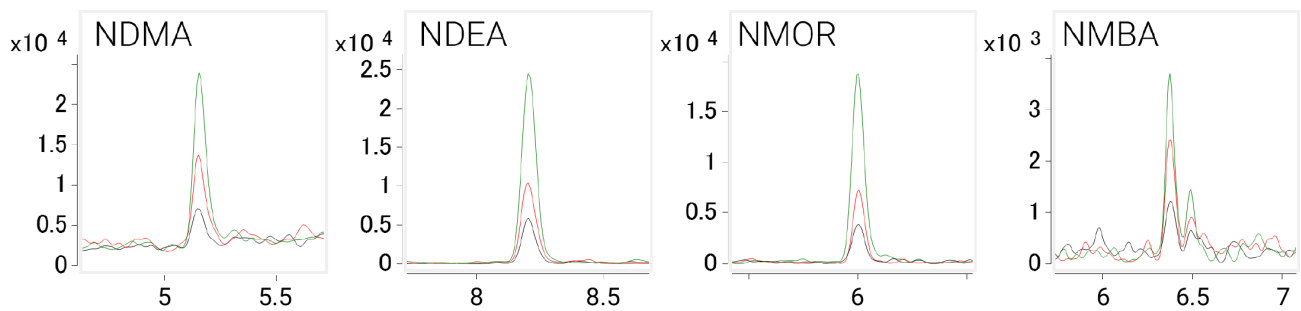


図 4. NDMA、NDEA、NMOR、NMBA について、低濃度領域の代表的なマスキロマトグラム

NDMA, NDEA, NMOR 黒：0.1 ng/mL、赤：0.2 ng/mL、緑：0.5 ng/mL

NMBA 黒：0.2 ng/mL、赤：0.5 ng/mL、緑：1.0 ng/mL

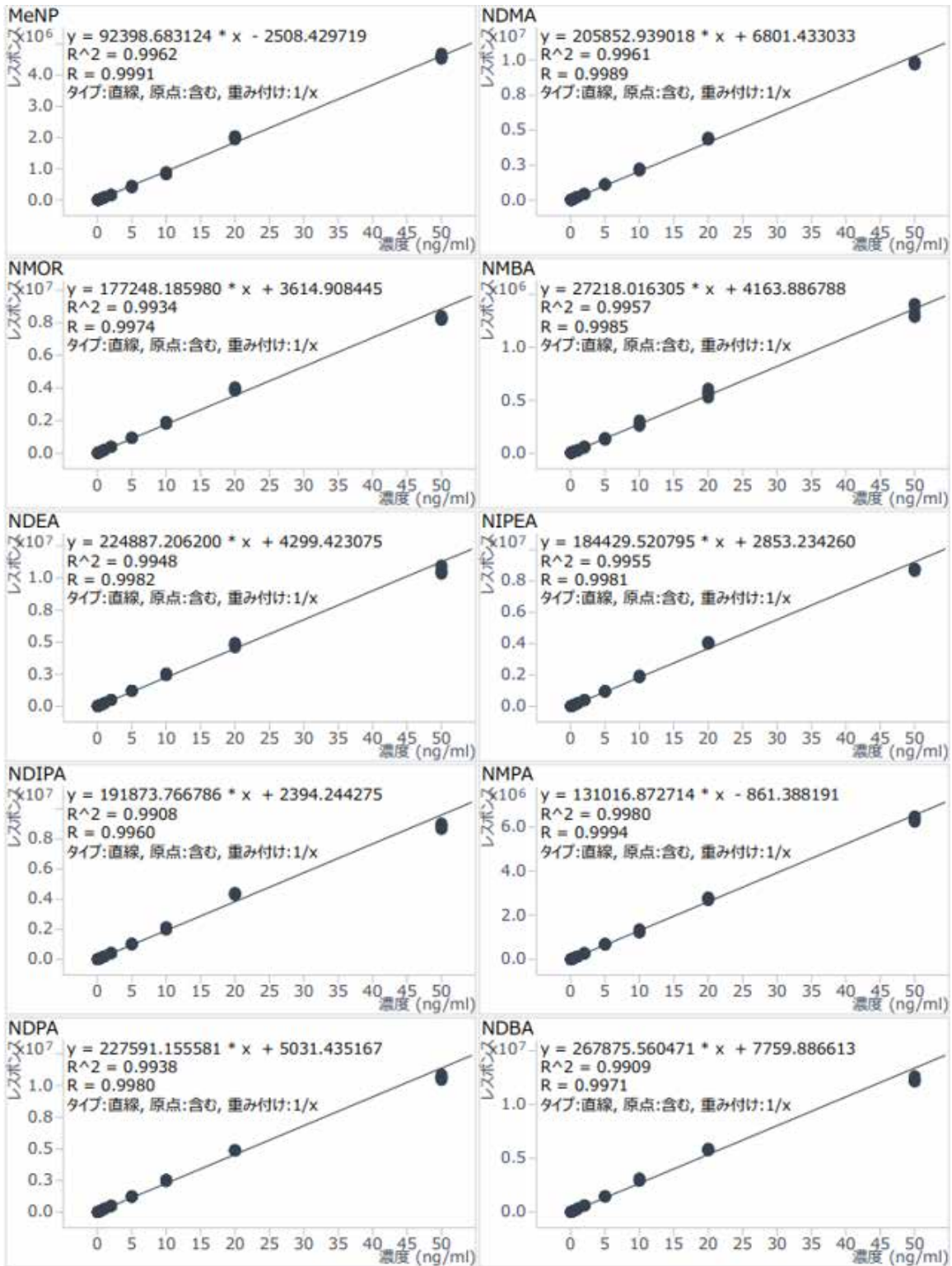


図 5. Agilent 6546 LC/Q-TOF で得られた検量線

## 結論

Agilent 6546 LC/Q-TOF 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 6546 LC/Q-TOF の感度を実証しました。このメソッドをベースとして試料に適した移動相・カラムを用いることで、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<sup>4)</sup>。

## 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>
- 4) [https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low\\_5994-1626JAJP.pdf](https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low_5994-1626JAJP.pdf)

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。

DE69852987

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, February 24, 2023

5994-5877JAJP