

Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS システムを用いたニトロソアミン不純物の 測定



著者

Linfeng Wu and Lee Bertram
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, U.S.

Shan-An Chan
Agilent Technologies, Inc.
Taiwan

概要

ニトロソアミン不純物は、医薬品の製造工程中にごく微量に生成する副生成物です。これらの不純物は、遺伝毒性不純物となる可能性があり、また長期間摂取すると発がん性の可能性がある物質として分類されています。したがって、医薬品の最終製品において、この不純物の濃度を高い感度と信頼度で測定することが重要になります。このアプリケーションノートでは、Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS (LC/TQ) システムを Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムおよび大気圧化学イオン化 (APCI) イオン源と組み合わせて使用し、8 種類のニトロソアミン不純物の定量性能を評価します。

はじめに

一部のアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) 製品がリコールされたという最近の発表により、ニトロソアミン不純物に規制機関の注目が集まりました。¹ニトロソアミン不純物は、医薬品の製造工程中に生成する副生成物です。この不純物は「cohort of concern」に該当し、遺伝毒性不純物となる可能性があり、長期間摂取すると発がん性の可能性がある物質として分類されています。

このアプリケーションノートでは、Agilent 6475 LC/TQ システムを Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムおよび APCI イオン源と組み合わせて使用し、8 種類のニトロソアミン化合物の包括的な分析を行いました。低濃度において、次に示す化合物が測定できることを示します：

- N-ニトロソジメチルアミン (NDMA)
- N-ニトロソモルホリン (NMOR)
- N-ニトロソメチルエチルアミン (NMEA)
- N-ニトロソピロリジン (NPYR)
- N-ニトロソジエチルアミン (NDEA)
- N-ニトロソピペリジン (NPIP)
- N-ニトロソジ-n-プロピルアミン (NDPA)
- N-ニトロソジ-n-ブチルアミン (NDBA)

実験方法

試薬および標準試料

分析では、試薬と溶媒はすべて LC/MS グレードのものを使用しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 µm point-of-useメンブレンフィルタカートリッジ (MilliporeSigma、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。8 種類のニトロソアミン NDMA、NDEA、NMOR、NMEA、NPYR、NPIP、NDPA、および NDBA が含まれる標準物質は、アジレントから入手しました (部品番号 US-113N-1)。

サンプル調製

ニトロソアミン標準物質を、0.0125 ~ 10 ng/mL の範囲の 9 つの異なる濃度において、溶媒ブランク (10:90 メタノール:水) にスパイクしました。医薬品有効成分 (API) マトリックスの前処理を、次のステップに従って実行しました。100 mg のロサルタンカリウム医薬品を、2 mL の溶媒 (50:50 メタノール:水) に溶解した後、30 分間超音波処理しました。次に、サンプルを 12,000 rpm で 10 分間遠心分離しました。上澄みを採取し、水を加えて 1:5 の比で希釈しました。前処理した API マトリックスに 0.05 ~ 1 ng/mL の濃度範囲のニトロソアミン標準物質を添加しました。

装置

次のモジュールで構成される Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを使用してサンプルを分離しました。

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ、サーモスタット付き (G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)

LC システムと、Agilent APCI イオン源 (G1947B) を搭載した Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS (G6475AA) を組み合わせました。データ取り込みには、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア 12.0 を使用しました。

測定条件

液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC/MS) の条件とパラメータを、表 1 と 2 に示します。化合物のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) 設定を、表 3 に示します。検量線分析では、原点に対する直線近似ではなく、1/x の重み付けを使用しました。

表 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC メソッド

| パラメータ | 設定値 | |
|-------------|--|----|
| カラム | Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 3.0 × 150 mm、2.7 µm (部品番号 693975-302) | |
| サンブラ温度 | 4 °C | |
| 移動相 A | ddH ₂ O + 0.1 % 酢酸 | |
| 移動相 B | メタノール + 0.1 % 酢酸 | |
| 流速 | 0.5 mL/min | |
| 注入量 | 20 µL | |
| カラム温度 | 40 °C | |
| グラジエントプログラム | 時間 (分) | %B |
| | 0.0 | 5 |
| | 3.5 | 5 |
| | 7.0 | 45 |
| | 9.0 | 60 |
| | 11.0 | 60 |
| | 15.0 | 65 |
| | 16.0 | 90 |
| | 16.1 | 5 |
| 20.0 | 5 | |

表 2. Agilent 6475 LC/TQ パラメータ

| パラメータ | 設定値 |
|---------------|---|
| イオン源 | Agilent APCI イオン源 |
| 極性 | ポジティブモード |
| ガス温度 | 300 °C |
| ドライガス流量 | 7 L/min |
| ネブライザ | 25 psi |
| APCI ベーボライザ温度 | 350 °C |
| キャピラリー電圧 | 4,000 V |
| コロナ電流 | 4.0 µA |
| スキャンタイプ | タイムセグメント MRM |
| 検出器ゲイン係数 (+) | 10 |
| LC ダイバータから廃液 | 0 ~ 2 分、12 ~ 13 分、14 ~ 18 分 (他の時間は、ダイバータから MS) |

表 3. Agilent 6475 LC/TQ でのマルチプルリアクションモニタリング (MRM) の詳細な設定と化合物の情報

| 化合物名 | プリカーサ m/z | プロダクト m/z | ドウェル (ミリ秒) | フラグメンタ (V) | セル加速電圧 (V) | コリジョンエネルギー (V) | 極性 | 測定リテンションタイム (分) |
|------|--------------|--------------|---------------|---------------|------------|-------------------|----|--------------------|
| NDMA | 75 | 43 | 50 | 95 | 3 | 16 | + | 2.51 |
| | 75 | 58 | 50 | 95 | 3 | 10 | + | 2.51 |
| NMOR | 117 | 45 | 50 | 80 | 4 | 21 | + | 3.99 |
| | 117 | 87 | 50 | 80 | 4 | 11 | + | 3.99 |
| NMEA | 89 | 43 | 50 | 75 | 3 | 12 | + | 5.35 |
| | 89 | 61 | 50 | 75 | 3 | 10 | + | 5.35 |
| NPYR | 101 | 41 | 50 | 90 | 3 | 24 | + | 5.70 |
| | 101 | 55 | 50 | 90 | 3 | 19 | + | 5.70 |
| NDEA | 103 | 47 | 50 | 80 | 4 | 20 | + | 7.48 |
| | 103 | 75 | 50 | 80 | 4 | 12 | + | 7.48 |
| NPIP | 115 | 41 | 50 | 90 | 3 | 24 | + | 7.90 |
| | 115 | 69 | 50 | 90 | 3 | 12 | + | 7.90 |
| NDPA | 131 | 43 | 50 | 80 | 4 | 10 | + | 10.10 |
| | 131 | 89 | 50 | 80 | 4 | 16 | + | 10.10 |
| NDBA | 159 | 41 | 50 | 80 | 3 | 20 | + | 13.50 |
| | 159 | 57 | 50 | 80 | 3 | 12 | + | 13.50 |

結果と考察

検量線分析

ニトロソアミンに対する定量性能を評価するために、0.0125 ~ 10 ng/mL の濃度範囲において、溶媒中の 8 種類のニトロソアミン化合物の検量線分析を実施しました。

分析結果は次のとおりです。

- すべての成分についての、良好なクロマトグラフィー分離とピーク形状 (図 1)
- 定量下限 (LLOQ) の濃度を含め、すべての試験濃度における、非常に優れた精度と正確度 (表 4)
- すべてのターゲット化合物に対する、 $LLOQ \leq 0.025$ ng/mL という高い分析感度 (表 4)
- 8 種類すべての成分についての、試験濃度における $R^2 > 0.99$ という優れた定量直線性 (図 2)

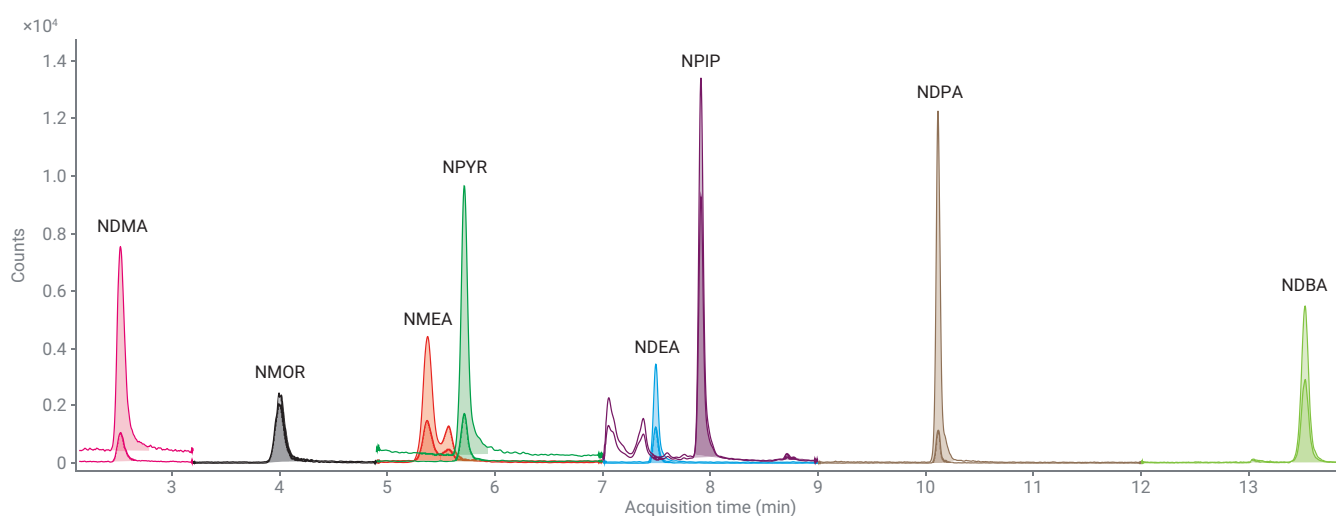


図 1. 1 ng/mL における 8 種類のニトロソアミン化合物のトータル MRM クロマトグラム

表 4. Agilent 6475 LC/TQ システムを用いた、0.025 および 0.05 ng/mL での平均レスポンス、定量イオンの S/N 比、%RSD、および正確度 (%) (n = 3)

| 濃度 | 0.025 ng/mL (n = 3) | | | | 0.05 ng/mL (n = 3) | | | | LLOQ* (ng/mL) | |
|------|---------------------|---------|-------|---------|--------------------|---------|--------|---------|---------------|---------|
| | 名前 | レスポンス | S/N | RSD (%) | 正確度 (%) | レスポンス | S/N | RSD (%) | | 正確度 (%) |
| NDMA | | 1145.08 | 14.63 | 1.28 | 113.86 | 2154.26 | 23.08 | 1.07 | 105.41 | 0.025 |
| NMOR | | 328.76 | 52.40 | 15.94 | 104.90 | 705.55 | 105.41 | 14.94 | 103.87 | 0.025 |
| NMEA | | 1057.38 | 40.79 | 3.86 | 116.86 | 1909.29 | 91.84 | 4.81 | 101.00 | 0.0125 |
| NPYR | | 918.54 | 24.31 | 2.65 | 115.47 | 1697.56 | 41.59 | 2.45 | 89.61 | 0.025 |
| NDEA | | 382.15 | 31.11 | 8.14 | 107.67 | 606.87 | 52.10 | 8.58 | 87.91 | 0.025 |
| NPIP | | 890.01 | 57.47 | 6.46 | 97.45 | 2106.81 | 111.72 | 5.30 | 98.29 | 0.025 |
| NDPA | | 795.93 | 95.62 | 12.01 | 106.13 | 1647.60 | 177.47 | 10.77 | 95.97 | 0.025 |
| NDBA | | 892.36 | 67.66 | 7.58 | 112.05 | 1581.52 | 123.78 | 7.83 | 101.33 | 0.025 |

* LLOQ は、定量イオンでは S/N > 10、定性イオンでは S/N > 3、RSD < 20 %、および正確度 80 ~ 120 % 以内という条件で決定しました。

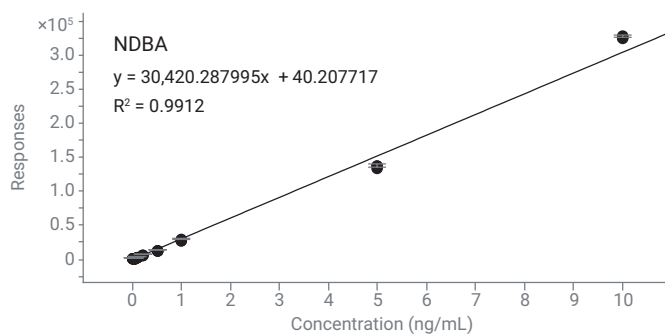
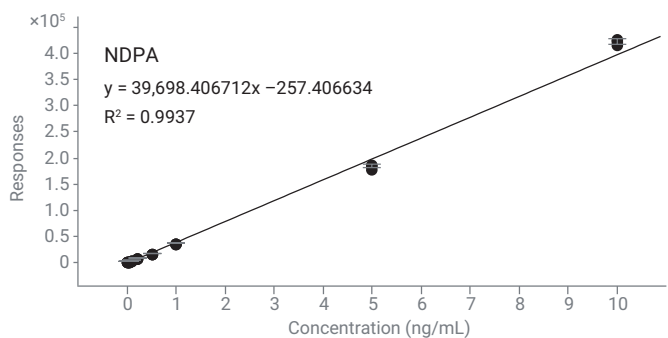
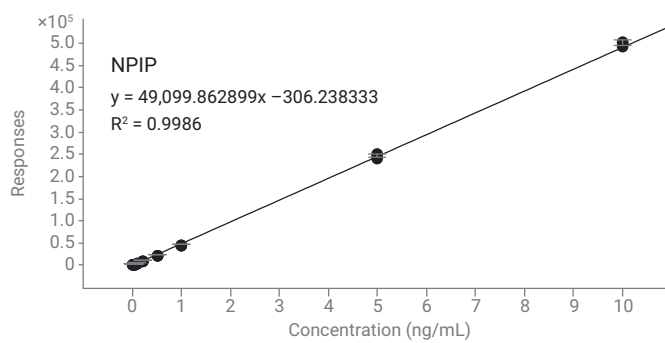
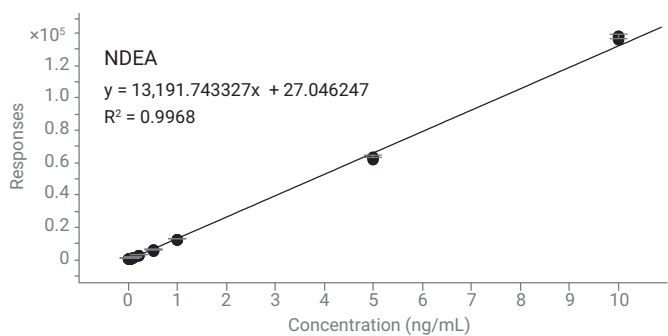
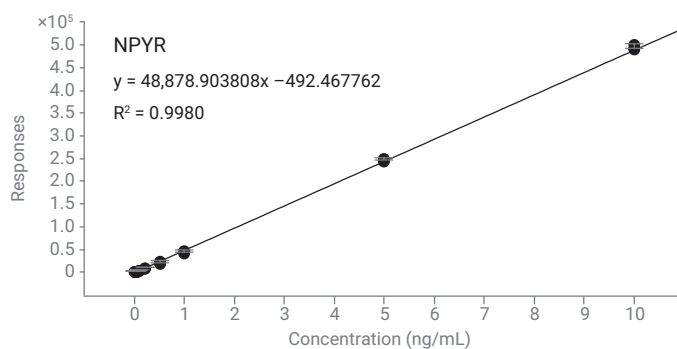
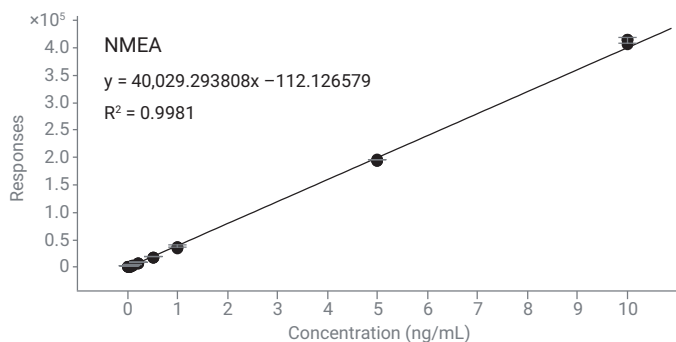
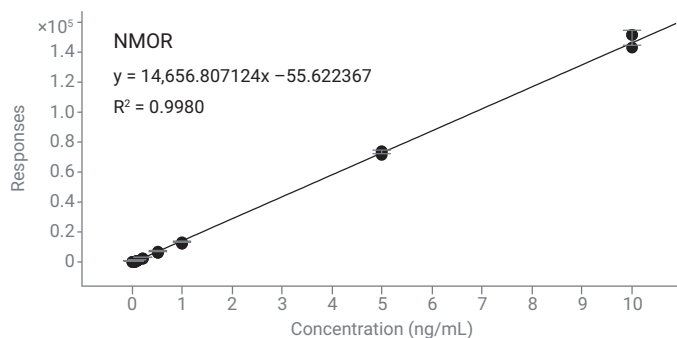
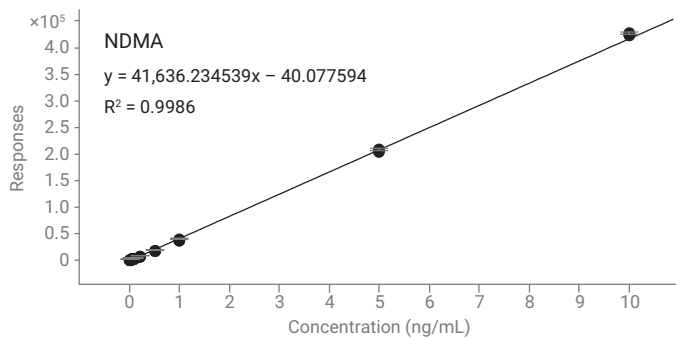


図 2. 濃度範囲 0.0125 ~ 10 ng/mL における 8 種類のニトロソアミン化合物の Agilent 6475 LC/TQ での検量線

ロサルタンカリウム医薬品マトリックスでの定量

医薬品製品中のニトロソアミン不純物についての分析性能を評価するために、0.05～1 ng/mL の濃度範囲において、ニトロソアミン標準物質をロサルタンカリウム医薬品抽出物に添加しました。測定結果は、0.05 ng/mL において、医薬品マトリックス中の 8 種類すべてのニトロソアミン化合物が、高い信頼度で定量できたことを示しています。8 種類すべての成分に対する分析感度は、規制機関が規定しているニトロソアミンの許容含有量を十分に下回っていました。^{2,3}

ニトロソアミン不純物の分析において、NDMA は一般的に分析困難な化合物です。図 3 に、10 mg/mL の医薬品抽出物の繰り返し分析による、マトリックスブランク、0.05 および 0.1 ng/mL における NDMA の代表的なクロマトグラムを示します。Agilent 6475 LC/TQ を使用することにより、低濃度において医薬品マトリックス中の NDMA が優れたレスポンス、S/N、および再現性を示すことが実証されました。

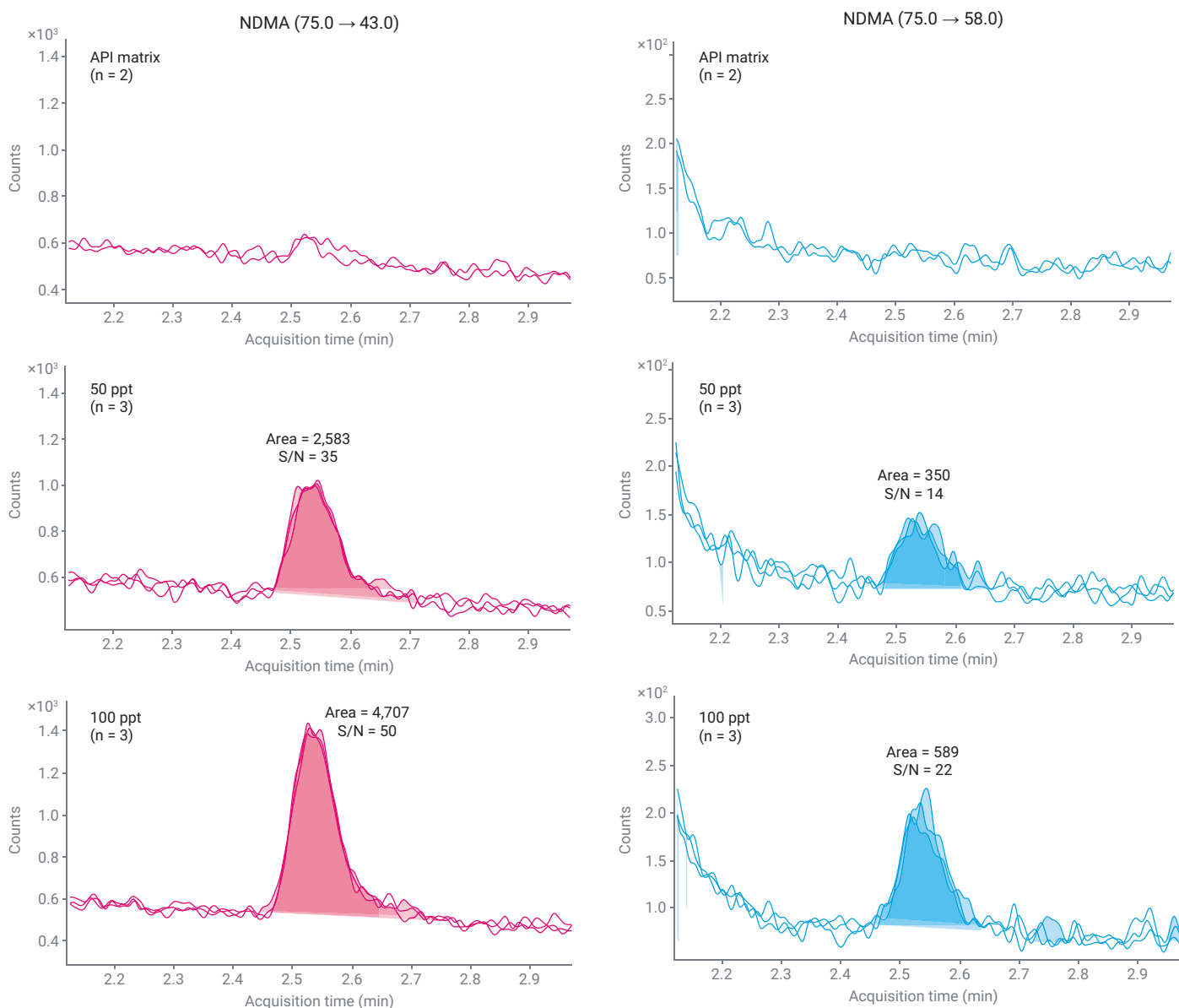


図 3. ロサルタンカリウム医薬品マトリックス中の低濃度における NDMA プロダクトイオンの繰り返し分析クロマトグラム

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS システムにおいて、ニトロソアミン不純物を規制項目で規定されている低濃度で正確に定量できることを示しました。この方法を用い、医薬品製品の溶出パターンに基づいてクロマトグラフィー条件を部分的に変更することで、さまざまな ARB 医薬品製品中のこれらの不純物を定量することができます。

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration. FDA Updates and Press Announcements on Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) Recalls (Valsartan, Losartan, and Irbesartan). Last revised March 2023. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
2. Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry. Last revised February 2021. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs | FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs>
3. Committee for Medicinal Products for Human Use, European Medicines Agency. Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004. Procedure number: EMEA/H/A-5(3)/1490. Nitrosamines Impurities in Human Medicinal Products. Last revised June 2020. Nitrosamines EMEA-H-A5(3)-1490 - Assessment Report (europa.eu)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

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。

DE41584454

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, March 21, 2023

5994-5919JAJP