

高分解能 Agilent 6546 LC/Q-TOF を用いた ニトロソアミン不純物の測定



著者

Chander Mani and
Saikat Banerjee
Agilent Technologies, Inc.

概要

アンジオテンシン II 受容体拮抗薬（ARB）は、高血圧および心不全の治療に広く用いられています。近年、一部の ARB に発がん性のニトロソアミン不純物が含まれていることがわかり、結果的に多くの製品がリコールされました。そのため、問題のあるニトロソアミン不純物を検出できる分析メソッドが求められています。このアプリケーションノートでは、USFDA が指定する 6 種類のニトロソアミンの検出と定量を実施するための Agilent 6546 LC/Q-TOF を用いた高感度で高分解能の LC/MS/MS メソッド、さらに 11 種類のニトロソアミン不純物の同時検出法について説明します。

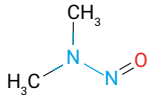
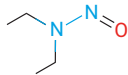
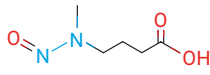
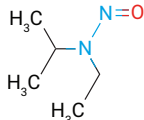
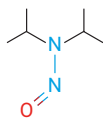
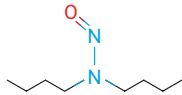
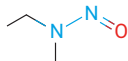
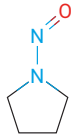
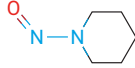
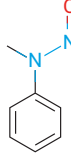
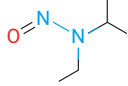
はじめに

バルサルタン、ロサルタン、イルベサルタンのような一部の ARB にニトロソアミン不純物が含まれている可能性があるため、FDA がこれらの製品のリコールを発表するなど、近年 N-ニトロソ不純物は FDA や EMA などの規制機関から注目されるようになりました。これらのニトロソ化合物は人間に対して発がん性の疑いがある物質として分類されており、製造プロセスの微量副生成物として最終医薬品に混入してきたと考えられています。

このアプリケーションノートは、Agilent 6546 LC/Q-TOF を用いた低い検出下限での 11 種類のニトロソアミン不純物の分析について述べています。これらの不純物は、分子量 74 ~ 158 の範囲の低分子化合物です。以下のものが含まれます。

- 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-4-メチル-4-アミノ酪酸 (NMBA)
- N-エチル-N-ニトロソ-2-プロパンアミン (NEIPA)
- 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 (NDBA)
- N-ニトロソエチルメチルアミン (NMEA)
- N-ニトロソピロリジン (NPyR)
- N-ニトロソピペリジン (NPIP)
- N-メチル-N-ニトロソアニリン (NMPHA)
- N-イソプロピルメチルニトロソアミン (NMIPA)

液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) ベースのメソッドは、一般的に特異性と感度が非常に高く、これらすべての不純物を検出して定量できる単一メソッドの開発基盤としての役割を果たしています。このアプリケーションノートでは、高分解能 Agilent 6546 LC/Q-TOF の感度を実証します。

ニトロソアミン化合物	化学構造
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-4-メチル-4-アミノ酪酸 (NMBA)	
N-エチル-N-ニトロソ-2-プロパンアミン (NEIPA)	
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 (NDBA)	
N-ニトロソエチルメチルアミン (NMEA)	
N-ニトロソピロリジン (NPyR)	
N-ニトロソピペリジン (NPIP)	
N-メチル-N-ニトロソアニリン (NMPHA)	
N-イソプロピルメチルニトロソアミン (NMIPA)	

実験方法

材料および試薬

本研究に用いた 11 種類のニトロソアミン標準物質はすべて、PS3 Labs LLP（ハイデラバード、TS、インド）から調達しました。メタノールや水など、その他の LC/MS グレードの溶媒は Honeywell から購入しました。ギ酸は Fluka から購入しました。

データ解析

データの取り込みと解析には、Agilent 6546 LC/Q-TOF のAgilent MassHunter ソフトウェア 10 を使用しました。Find by Formula アルゴリズムによる同定にパーソナル化合物データベースライブラリ（PCDL）をカスタマイズして使用した後、定量を実施しました。

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 1290 Infinity II ハイスピードポンプ（G7120A） Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ（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、v/v）
サンプル希釈剤	水
マルチサンブラ温度	6 °C
注入量	40 µL
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell HPH C18, 2.1 × 100 mm, 1.9 µm (p/n 695675-702)
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
流量	0.4 mL/min
グラジエント	時間（分） %B 0 1 2 13 5.5 80 8 95 10 95
ストップタイム	10 分
ポストタイム	3 分

Q-TOF 質量分析計の構成およびパラメータ

表 2. MS の構成およびソース設定

機器	Agilent 6546 LC/Q-TOF
イオン源	APCI（大気圧化学イオン化）
MS モード	MS
イオン化モード	ポジティブ
ドライガス温度	300 °C
ドライガス流量	6 L/min
ネブライザ圧力	45 psi
APCI ヒーター	350 °C
APCI ニードル、ポジティブ	4 µA
キャピラリー電圧、ポジティブ	3,000 V
質量範囲	70 ~ 170 m/z

成分の MS 化合物情報

表 3. Agilent 6546 LC/ Q-TOF の詳細な MS 設定

時間セグメント	開始時間 (分)	質量範囲 (m/z)	採取レート (スペクトル/秒)	フラグメンタ電圧 (V)
1	0	70 ~ 170	1.5	120
2	1.6	70 ~ 170	1.5	90
3	2.8	70 ~ 170	2	120

結果と考察

キャリブレーション濃度の範囲は 0.05 ～ 100 ng/mL でした (表 4)。R² 値は全成分で 0.996 を超えており、濃度範囲全体にわたり高い直線性を示しました。図 1 は、試験対象のすべてのニトロソアミン化合物の 10 ng/mL における代表的な抽出イオンクロマトグラムを重ね表示したものです。

表 4. Agilent 6546 LC/Q-TOF の解析結果の概要。S/N 比、LOQ 計算値、回帰係数、検量線近似、および直線性範囲を示します。標準はすべて、一次関数および 1/x の重み付き検量線を用いて計算しました。

化合物	検出下限 (ng/mL)	検出下限 (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R ²	検量線	直線性範囲 (ng/mL)
NDMA	0.1	16.54	0.25	35.72	0.999	直線	0.1 ～ 100
NDEA	0.05	29.56	0.1	79.2	0.999	直線	0.1 ～ 100
NMBA	0.25	12.16	0.5	27.88	0.996	直線	0.5 ～ 100
NEIPA	0.1	11.22	0.25	80.6	0.998	直線	0.1 ～ 100
NDIPA	0.075	16.65	0.15	21.99	0.999	直線	0.075 ～ 100
NDBA	0.1	44.60	0.25	61.56	0.997	直線	0.1 ～ 100
NMEA	0.05	18.42	0.1	23	0.998	直線	0.05 ～ 100
NPyr	0.1	29.73	0.15	50.39	0.999	直線	0.1 ～ 100
NPIP	0.075	12.18	0.1	25.30	0.998	直線	0.075 ～ 100
NMPhA	0.25	24.22	0.5	32.30	0.997	直線	0.5 ～ 100
NMIPA	0.075	29.79	0.1	47.46	0.997	直線	0.075 ～ 100

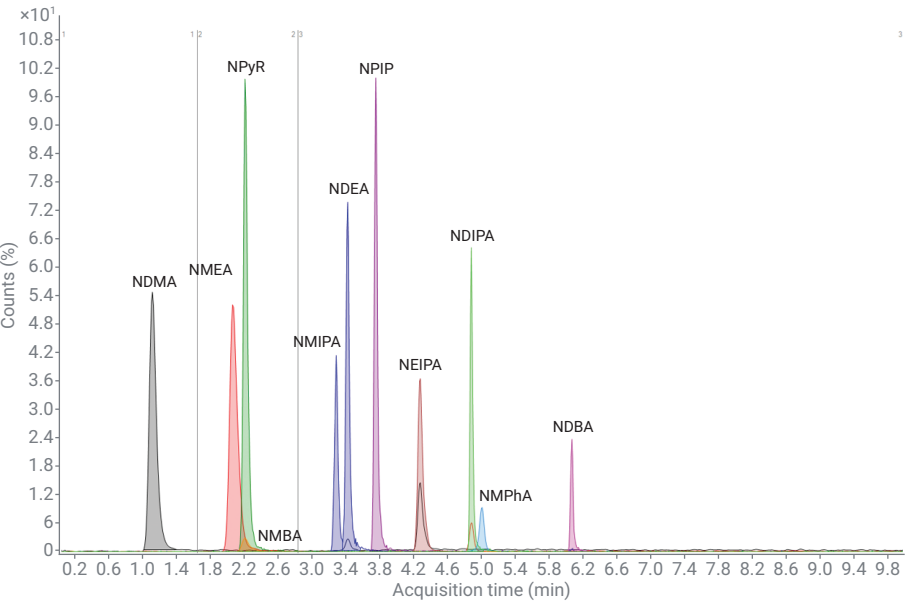


図 1. 11 種類のニトロソアミン化合物 (10 ng/mL) の溶出を示す代表的な抽出イオンクロマトグラムの重ね表示

精度および再現性

11 種類の各化合物の検量線は、各キャリブレーションレベルで予測された濃度の 20 % 以内の精度で収まっており、すべてのレベルでの再現性は CV < 15 % でした (図 4)。表 5 では、各化合物における各濃度の精度と再現性を詳細に比較しました。

Compound Name	Formula	Mass	Anion	Cation	RT (min)	CAS
N-Nitrosodimethylamine(NDMA)	C2H6N2O	74.04801	☐	☒	1.131	62-72-9
N-Nitrosoethylmethylamine(NMEA)	C3H8N2O	88.06366	☐	☒	2.075	10595-95-6
N-Nitrosopyrrolidine(NPyR)	C4H8N2O	100.06366	☐	☒	2.222	930-55-2
N-Nitrosodiethylamine(NDEA)	C4H10N2O	102.07931	☐	☒	3.426	55-18-5
N-Isopropylmethyl nitrosamine(NMIPA)	C4H10N2O	102.07931	☐	☒	3.297	30553-08-5
N-Nitrosopiperidine(NPIP)	C5H10N2O	114.07931	☐	☒	3.766	100-75-4
N-Ethyl-N-Nitroso-2-propanamine(NEIPA)	C5H12N2O	116.09496	☐	☒	4.289	16339-04-1
N-Nitrosodiisopropylamine(NDIPA)	C6H14N2O	130.11061	☐	☒	4.886	601-77-4
N-methyl-n-nitrosoaniline(NMPhA)	C7H8N2O	136.06366	☐	☒	5.009	614-00-6
N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyricacid(NMBA)	C5H10N2O3	146.06914	☐	☒	2.219	61445-55-4
N-Nitrosodibutylamine(NDBA)	C8H18N2O	158.14191	☐	☒	6.059	924-16-3

図 2. Find by Formula 機能と PCDL による同定と定量結果

Name	Transition
N-Nitrosodimethylamine(NDMA)	75.0552
N-Nitrosoethylmethylamine(NMEA)	89.0709
N-Nitrosopyrrolidine(NPyR)	101.0710
N-Nitrosodiethylamine(NDEA)	103.0866
N-Isopropylmethyl nitrosamine(NMIPA)	103.0866
N-Nitrosopiperidine(NPIP)	115.0866
N-Ethyl-N-Nitroso-2-propanamine(NEIPA)	117.1022
N-Nitrosodiisopropylamine(NDIPA)	131.1179
N-methyl-n-nitrosoaniline(NMPhA)	137.0709
N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyricacid(NMBA)	147.0766
N-Nitrosodibutylamine(NDBA)	159.1492

図 3. 各ニトロソアミン不純物の定量で抽出された m/z

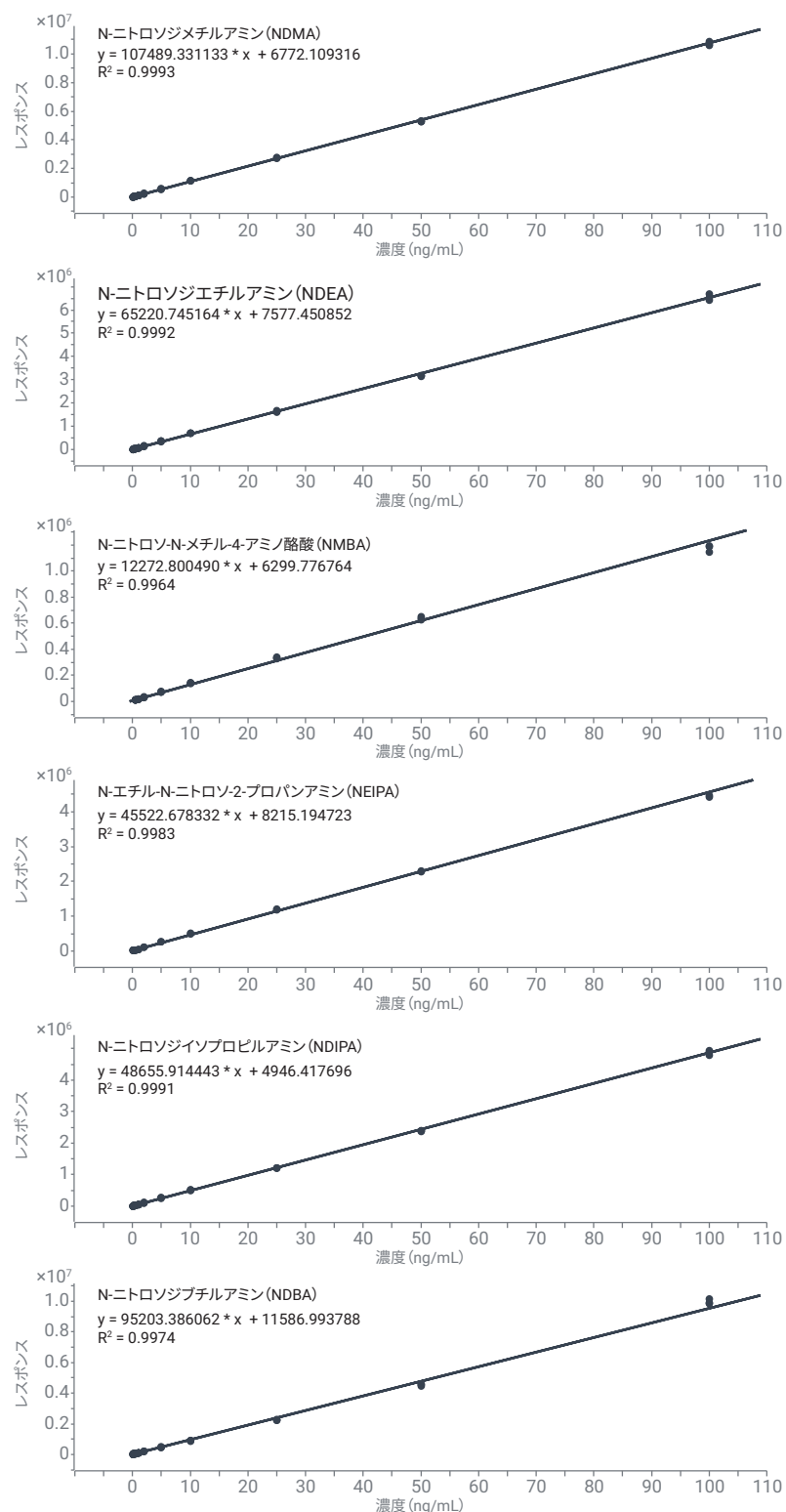


図 4. クロマトグラムで得られた化合物の代表的な検量線。すべての検量線で、一次関数および $1/x$ 荷重係数を用いました。

表 5. Agilent 6546 LC/Q-TOF により測定した各濃度における代表的な精度および再現性 (n = 3)

濃度 (ng/mL)	NDMA		NDEA		NMBA		NDIPA		NDBA		NMEA	
	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
0.1	86.67	5.57	83.53	1.59	NA	NA	91.30	0.55	101.03	6.19	93.93	1.67
0.25	87.00	3.96	88.33	2.58	NA	NA	91.33	4.67	95.13	5.69	89.40	4.55
0.5	97.23	4.51	101.17	3.62	92.40	1.96	94.6	2.27	102.30	3.38	102.53	3.28
1.0	104.93	2.44	110.80	2.47	98.37	5.80	109.83	2.13	101.80	1.15	103.23	0.78

結論

Agilent 6546 LC/Q-TOF LC/MS/MS は低濃度のニトロソアミン不純物を分析することが可能で、製剤中に存在するニトロソアミン化合物を確実に検出しています。このアプリケーションノートでは、これらの低濃度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。また、このメソッドを用いることで、さまざまな ARB 中のニトロソアミン不純物を、その製剤の溶出パターンに基づいて、一部の条件を変更したクロマトグラフィーにより定量し、確実にその製剤のピーク部分を取り除いて質量分析計の汚染を回避できます。

参考文献

1. USFDA guidance document: Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine impurities.
2. USFDA guidance document: Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC/HRMS) method for the determination of Six nitrosamine impurities in ARB drugs.

謝辞

ニトロソアミン標準をご提供いただいた PS3 Labs LLP (ハイデラバード、TS、インド) に謝意を表します。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, November 4, 2019

5994-1372JAJP