

Ultivo 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

Chander Mani and
Saikat Banerjee
Agilent Technologies, Inc.

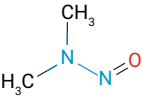
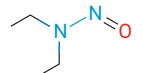
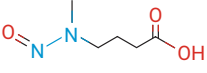
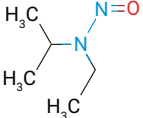
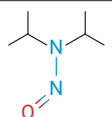
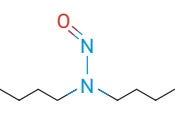
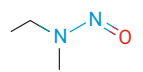
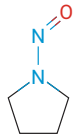
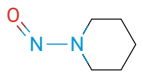
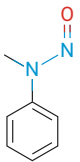
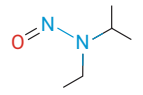
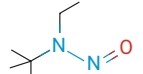
概要

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¹ が含まれることが示されました。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、高感度の Agilent Ultivo LC/TQ によるメソッドを用いて、米国食品医薬品局 (FDA) が指定したニトロソアミン 6 種だけでなく、変異原性の可能性のあるその他のニトロソアミン不純物 6 種についても同時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 や欧州医薬品庁 (EMA) 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。このアプリケーションノートに記載の LC/MS によるメソッドは、Ultivo トリプル四重極 LC/MS で実行しました。このメソッドでは、きわめて低い検出限界でニトロソアミン化合物 12 種の包括的な分析が可能です。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。

- 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-ニトロソエチルイソプロピルアミン (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 (NMPaA)
- N-イソプロピルメチルニトロソアミン (NMIPA)
- N-tert-ブチル-N-エチルニトロソアミン

ニトロソアミン化合物	化学構造
NDMA	
NDEA	
NMBA	
NEIPA	
NDIPA	
(NDBA)	
NMEA	
NPyR	
NPIP	
NMPaA	
NMIPA	
N-tert-ブチル-N-エチルニトロソアミン	

実験方法

材料および試薬

本研究に用いた 12 種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の LC/MS グレード溶媒は Honeywell 社から購入したものです。分析に使用したギ酸は Fluka 社から購入しました。

データ解析

データは Ultivo 用 Agilent MassHunter ソフトウェア バージョン 1.1 を用いて測定および分析しました。MS/MS トランジションは Agilent MassHunter Acquisition Optimizer ソフトウェアを用いて、プリカーサイオンやプロダクトイオン、フラグメンタ電圧、およびコリジョンエネルギーを、原液の希釈溶液 (個々の化合物の濃度 1,000 ng/mL をフローインジェクションモードで 1 µL 注入) の注入により測定し最適化しました。

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
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

トリプル四重極質量分析装置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

パラメータ	設定値
機器	Agilent Ultivo 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	300 °C
ドライガス流量	6 L/min
ネブライザ圧力	55 psi
APCI ヒーター	350 °C
APCI ニードル、ポジティブ	4 µA
キャピラリ電圧、ポジティブ	3,000 V
MS1/MS2 分解能	0.7/0.7 (unit/unit)
ドウェルタイム	可変

成分の MS/MS 化合物情報

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

化合物	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
NDEA	103.1	75.1	3.484	1.5	85	8	+
NDEA	103.1	47.1	3.484	1.5	85	16	+
NDMA	75.1	58	1.143	1.24	65	10	+
NDMA	75.1	43.1	1.143	1.24	65	17	+
NMBA	147.1	44.2	2.247	1.2	50	7	+
NMBA	147.1	87.2	2.247	1.2	50	7	+
NEIPA	117.1	75.1	4.325	1.0	70	7	+
NEIPA	117.1	47.1	4.325	1.0	70	15	+
NDIPA	131.1	89.1	4.916	1.0	50	5	+
NDIPA	131.1	43.1	4.916	1.0	50	7	+
NDBA	159.1	57.2	6.096	1.0	70	7	+
NDBA	159.1	41.1	6.096	1.0	70	24	+
NMEA	89.1	61.1	2.109	1.37	75	10	+
NMEA	89.1	43.1	2.109	1.37	75	10	+
NPyR	101.1	55.1	2.248	1.43	55	18	+
NPyR	101.1	41	2.248	1.43	55	26	+
NPIP	115.1	69.1	3.809	1.0	85	9	+
NPIP	115.1	41.2	3.809	1.0	85	26	+
NMPhA	137	66.1	5.029	1.32	45	18	+
NMPhA	137	107	5.029	1.32	45	10	+
NMIPA	103.1	61	3.358	1.0	60	8	+
NMIPA	103.1	43	3.358	1.0	60	8	+
N-tert-ブチル-N-エチルニトロソアミン	131	75.1	4.897	1.0	40	4	+
N-tert-ブチル-N-エチルニトロソアミン	131	57.1	4.897	1.0	40	6	+

結果と考察

キャリブレーション濃度は 0.05 ～ 100 ng/mL の範囲でした。表 4 に具体的な詳細内容を示します。R² 値は全成分で 0.996 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。図 1 は Ultivo TQ による代表的な dMRM クロマトグラムの重ね表示です。10 ng/mL でのニトロソアミン化合物 12 種すべての溶出が示されています。

表 4. Agilent Ultivo TQ の結果。S/N 比、LOQ 計算値、回帰係数、および検量線近似を示します。標準はすべて、1/x の重み付き検量線を用いて計算しました。

化合物	Agilent Ultivo TQ					
	LOD (ng/mL)	LOD (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R ²	直線性範囲 (ng/mL)
NDMA	0.05	9.74	0.1	13.49	0.997	0.05 ～ 100
NDEA	0.025	22.68	0.05	53.82	0.998	0.025 ～ 100
NMBA	0.05	23.88	0.1	31.18	0.998	0.05 ～ 100
NEIPA	0.025	57.37	0.05	69.67	0.999	0.025 ～ 100
NDIPA	0.025	15.72	0.05	45.18	0.998	0.025 ～ 100
NDBA	0.05	225.18	0.1	323.11	0.999	0.025 ～ 100
NMEA	0.075	7.84	0.1	12.10	0.999	0.1 ～ 100
NPyR	0.075	30.02	0.1	41.72	0.999	0.1 ～ 100
NPIP	0.1	11.60	0.15	14.11	0.998	0.15 ～ 100
NMPhA	0.075	29.58	0.1	45.34	0.994	0.075 ～ 100
NMIPA	0.025	42.17	0.05	208.86	0.996	0.025 ～ 100
N-tert-ブチル-N-エチルニトロソアミン	0.075	54.92	0.1	81.62	0.999	0.075 ～ 100

* S/N 比は Agilent MassHunter Quantitative 10 ソフトウェアを用いて自動 RMS アルゴリズムを用いて計算し、ノイズリファレンスはサンプルとして選択しました。

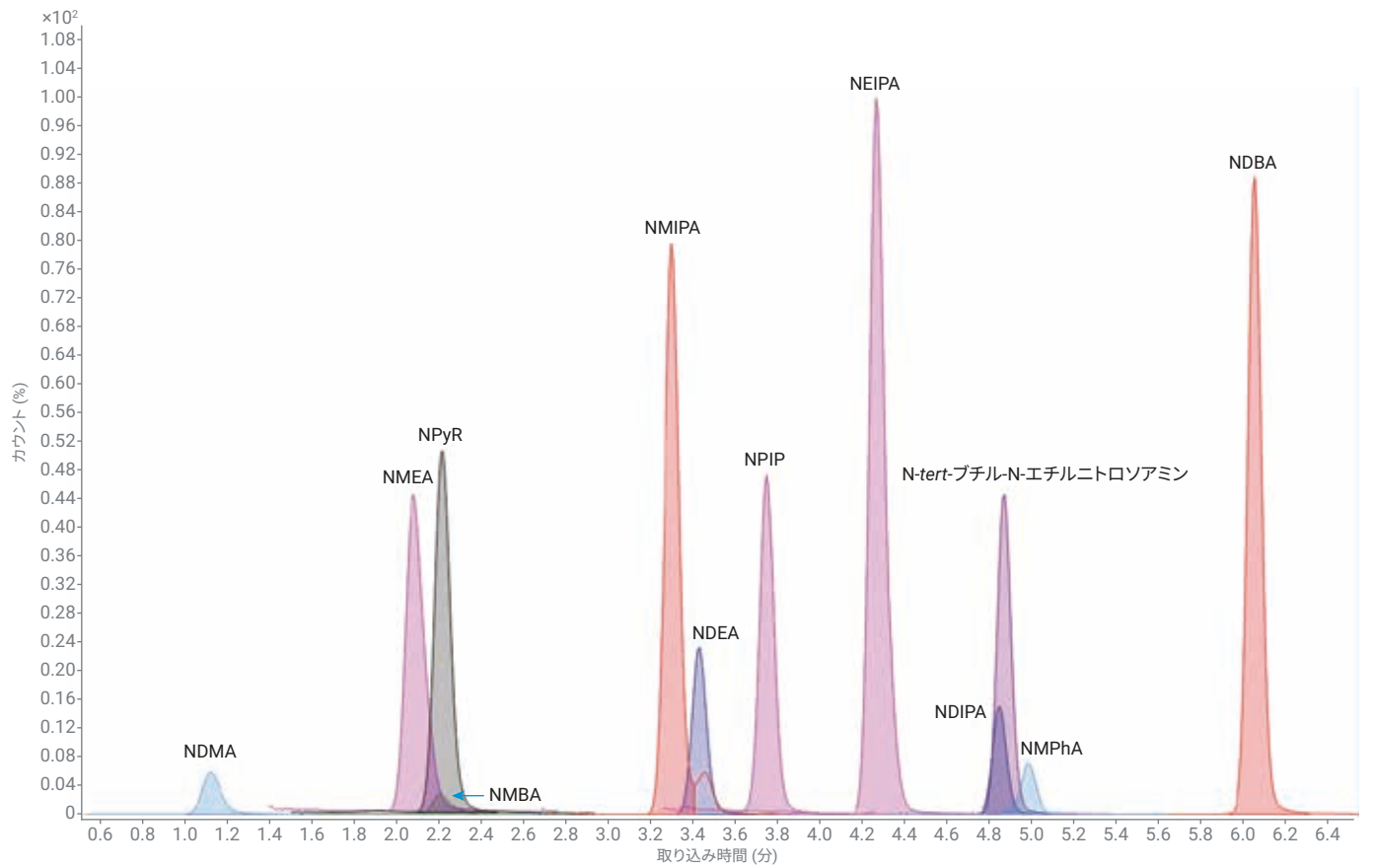


図 1. 12 種のニトロソアミン化合物の溶出を示す dMRM クロマトグラムの重ね表示

精度および再現性

化合物 12 種それぞれの検量線は、定量下限 (LOQ) での想定濃度限度から 20 % 以内の精度を示しました。検出限界、定量下限、および計算した統計値は、測定された線形のキャリブレーション範囲に対して示されており (表 4)、全キャリブレーションポイントで CV <15 % の

再現性を示しています。表 5 では、さまざまな濃度での結果の精度と再現性を詳細にまとめました。図 2 に Ultivo LC/TQ システムで測定した代表的な検量線を示します。

表 5. Agilent Ultivo LC/TQ のさまざまな濃度での精度および再現性 (n = 3)

濃度 (ng/mL)	NDMA		NDEA		NMBA		NEIPA		NDIPA		NDBA	
	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
0.1	95.53	5.63	96.23	5.78	84.73	0.00	96.37	5.82	107.9	9.01	99.63	6.47
0.25	102.47	2.79	98.53	4.77	95.53	4.31	101.43	5.16	101.6	3.59	105.53	3.60
0.5	100.00	2.68	98.53	2.15	105.67	1.15	95.30	3.15	95.30	1.06	95.77	2.07
1.0	104.27	4.70	99.47	1.22	105.67	1.80	98.47	4.59	97.63	3.88	95.77	2.39

濃度 (ng/mL)	NMEA		NPyR		NPIP*		NMPHA		NMIPA		N-tert-ブチル-N-エチルニトロソアミン	
	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV	平均	CV
0.1	110.97	7.27	97.7	6.56	112.27	4.52	100.6	8.81	105.23	2.58	105.27	4.56
0.25	105.1	5.64	103.63	6.66	101.43	4.79	106.43	6.59	107.5	7.97	106.47	5.27
0.5	91.87	6.20	96.20	3.19	93.07	5.83	84.40	3.35	90.50	5.61	96.77	0.26
1.0	93.80	5.39	99.97	2.36	102.67	0.79	108.03	2.25	100.23	2.94	94.83	1.10

* NPIP の最初の濃度は 0.1 ng/mL ではなく 0.15 ng/mL です。

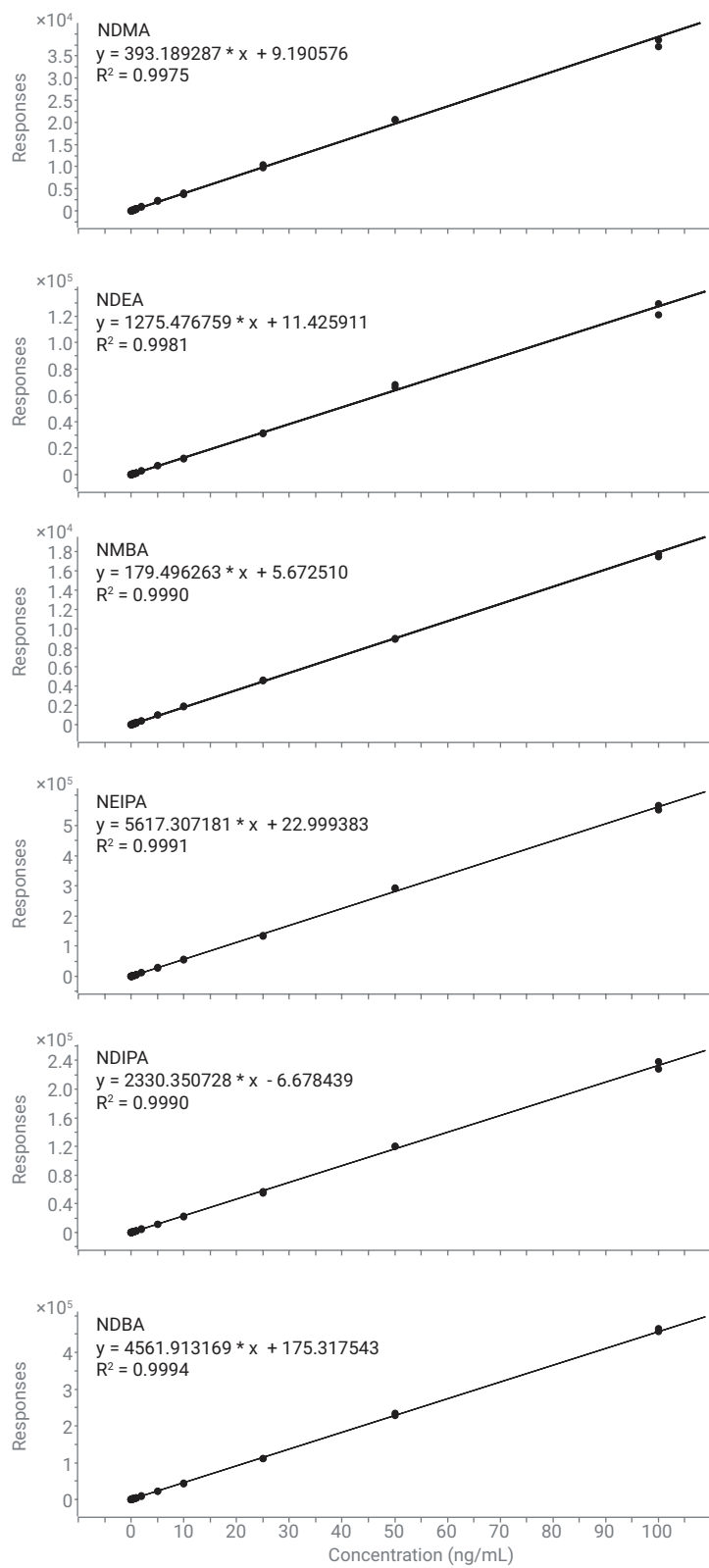


図 2. Agilent Ultivo LC/TQ で得られた代表的な検量線。すべて 1/x 荷重係数を用いました。

結論

Agilent Ultivo 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、低濃度ニトロソアミン不純物の検出における Ultivo 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、さまざまな ARB 製剤中のクロマトグラフィー条件が一部異なるこれらの不純物を溶出パターンに従って定量することができます。

参考文献

1. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
2. FDA guidance document: Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine impurities.
3. FDA 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, September 20, 2019

5994-1383JAJP