

高分解能 Agilent 6546 LC/Q-TOF を用いた ラニチジン原薬および医薬品中の 遺伝毒性 NDMA 不純物の測定

著者

Chander Mani and
Saikat Banerjee
Agilent Technologies, Inc.



概要

医薬品中の不純物は、FDA に承認された安全かつ有効な医薬品を服用する患者や消費者にとって、大きな懸念事項です。ラニチジンおよびニザチジンは胃の中の酸の量を減少させる H₂ 受容体拮抗薬であり、胃炎（胃壁の炎症）および消化性潰瘍の治療に用いられています。ラニチジン原薬および医薬品には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、問題とされ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。最近リコールされた医薬品は、N-ニトロソジメチルアミン（NDMA）の存在が疑われるラニチジンです。このアプリケーションノートでは、Agilent 6546 LC/Q-TOF を用いてラニチジン原薬および医薬品中の NDMA を検出して定量する高感度・高分解能 LC/MS/MS メソッドについて説明します。

はじめに

ラニチジン医薬品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、NDMA 不純物（図 1）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に分類されており、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。USFDA は先ごろ、ラニチジン医薬品の特定のバッチに NDMA が存在することを発見しました。

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、ラニチジン原薬および医薬品中の NDMA を検出して定量できるメソッドの開発の基本となる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 6546 LC/Q-TOF で実施したメソッドについて説明し、きわめて低い検出限界での NDMA 不純物を包括的に検出した分析について示します。また、高分解能 6546 LC/Q-TOF の感度についても示します。

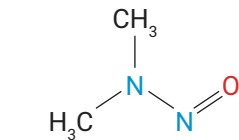


図 1. NDMA の化学構造

実験方法

試料および試薬

この研究で用いた NDMA 標準は、PS3 Labs LLP（ハイデラバード、TS、インド）から入手しました。メタノールや水など、その他の LC/MS グレードの溶媒は Honeywell（シャーロット、ノースカロライナ州、米国）から購入しました。ギ酸は Fluka（現在の Honeywell）から購入しました。

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)
	Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (G7114B)
ニードル洗浄	メタノール:水 (80:20、v/v)
サンプル希釈液	水:メタノール (95:5、v/v)
マルチサンブラ温度	6 °C
注入量	20 µL
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18、4.6 × 150 mm、2.7 µm (p/n 693975-702)
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	0.3 mL/min
グラジエント	時間 (分) % A % B 流量 (mL/min)
	0 95 5 0.3
	6 92 8 0.3
	6.1 92 8 0.5
	11 5 95 0.5
	11.1 5 95 0.3
	11.2 95 5 0.3
	14 95 5 0.3
ストップタイム	14 分
波長	300 nm、320 nm

Q-TOF 質量分析計の構成およびパラメータ

表 2. 質量分析計の構成とイオンソースの設定

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
ネプライザ圧力	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	<i>m/z</i> 70~170

成分の MS 化合物情報

表 3. Agilent 6546 LC/Q-TOF の詳細な MS 設定

タイムセグメント	開始時間 (分)	質量範囲 (<i>m/z</i>)	フラグメンタ電圧 (V)	ダイバートバルブ位置
1	0	70 ~ 170	120	廃液
2	6.5	70 ~ 170	120	MS
3	8.2	70 ~ 170	120	廃液

データ解析

データの取り込みと解析には、6546 LC/Q-TOF の Agilent MassHunter LC/MS Data Acquisition ソフトウェアバージョン 10 を使用しました。NDMA は、Agilent MassHunter Quantitative Analysis (TOF 用) バージョン 10 を用いて定量しました。

結果と考察

キャリブレーション濃度の範囲は 0.25 ～ 100 ng/mL でした (表 4)。NDMA (m/z 75.0553) の R^2 値は 0.9997 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 2 は、NDMA 5 ng/mL における代表的な NDMA の抽出イオンクロマトグラムと、

ラニチジン UV クロマトグラムを示しています。表 3 に示すダイバータバルブプログラムを用いて、高濃度のラニチジンを廃液に流しました。

表 4. Agilent 6546 LC/Q-TOF の結果のまとめ。S/N 比、定量下限 (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。NDMA では、一次関数および $1/x$ 重み付け検量線を用いました。

化合物	検出限界 (ng/mL)	検出限界 (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R^2	検量線	直線性範囲 (ng/mL)
NDMA	0.15	18.8	0.25	47.48	0.9997	一次	0.25 ～ 100

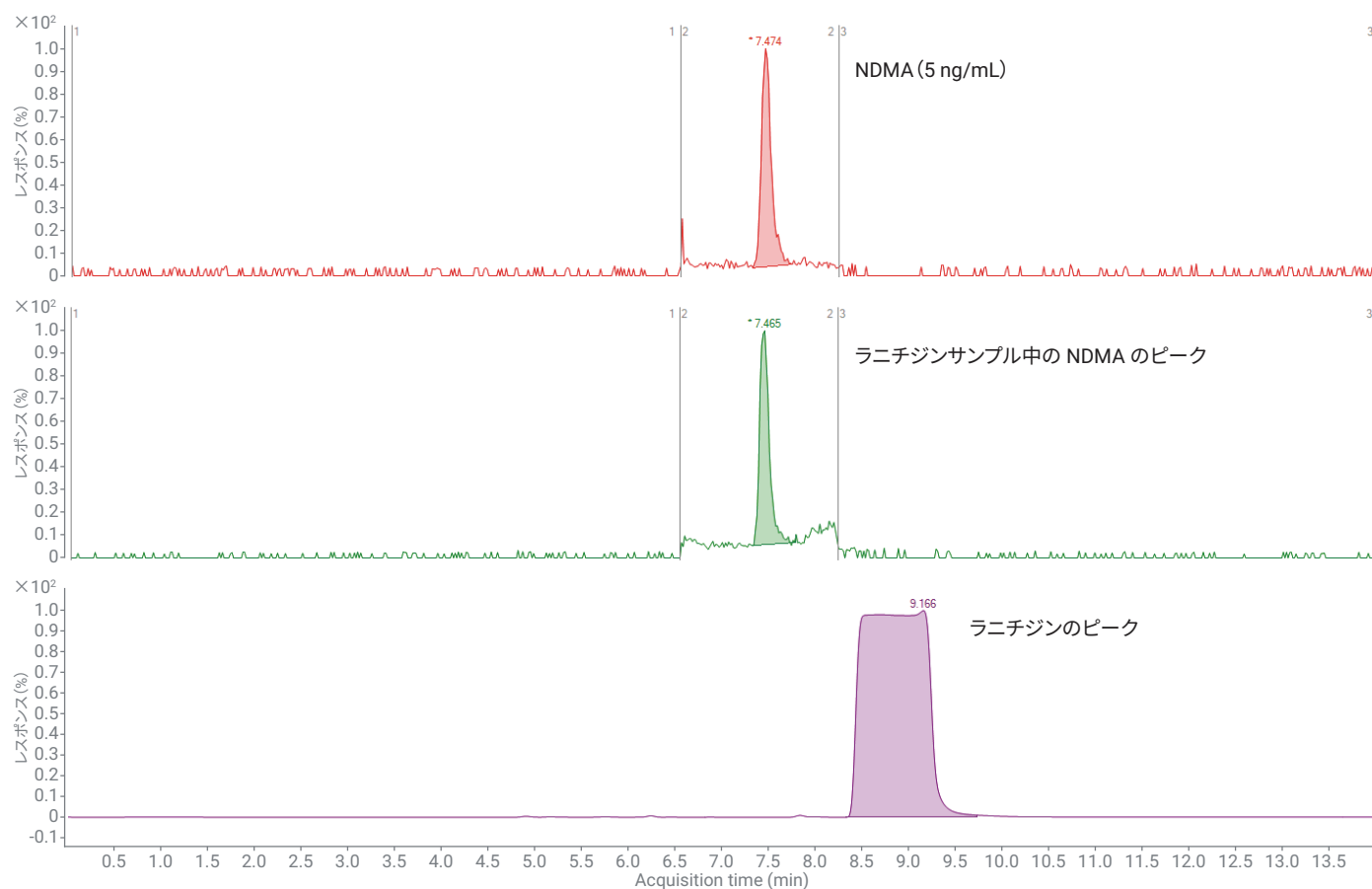


図 2. 代表的な NDMA (5 ng/mL) MRM クロマトグラムと、溶出パターンを示すラニチジン UV クロマトグラム

精度および再現性

NDMA 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変動係数 (CV) が 15 % 未満でした (図 3)。図 4A、4B、および表 5 では、異なる濃度における精度と再現性を詳細に比較しました。

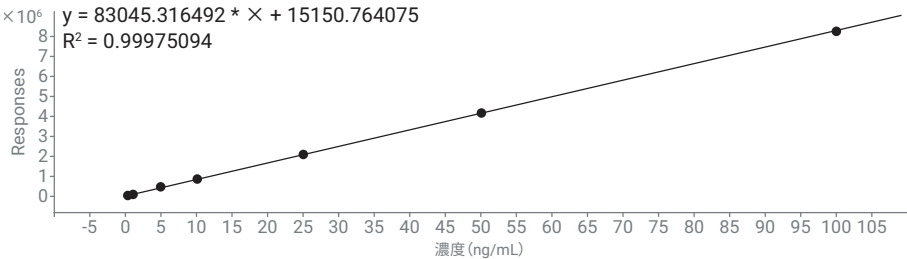


図 3. クロマトグラムで得られた NDMA の代表的な検量線。NDMA 検量線では、一次関数および 1/x 重み付け係数を用いました。

Sample					NDMA M...	NDMA Results							
Name	Data File	Type	Level	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Mass Accuracy	S/N
Blank	Blank-r002.d	Blank		1.0000				☐					
0.25 ppb	0.25 ppb-r001.d	Cal	1	1.0000	0.2500	7.496	33707	☐	0.2061	0.2061	82.4	-1.3770	47.46
0.5 ppb	0.5 ppb-r001.d	Cal	2	1.0000	0.5000	7.497	53629	☐	0.4461	0.4461	89.2	-0.2417	92.22
0.5 ppb	0.5 ppb-r002.d	Cal	2	1.0000	0.5000	7.465	53993	☐	0.4505	0.4505	90.1	-2.0896	140.60
1 ppb	1 ppb-r001.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.476	104775	☐	1.0625	1.0625	106.2	-2.0565	184.65
1 ppb	1 ppb-r002.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.480	104836	☐	1.0632	1.0632	106.3	-2.0449	230.68
1 ppb	1 ppb-r003.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.481	104316	☐	1.0569	1.0569	105.7	-1.7189	368.90
1 ppb	1 ppb-r004.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.482	100169	☐	1.0070	1.0070	100.7	-2.2917	99.90
1 ppb	1 ppb-r005.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.483	100928	☐	1.0161	1.0161	101.6	-1.2478	357.81
1 ppb	1 ppb-r006.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.480	105196	☐	1.0675	1.0675	106.8	-1.3829	160.20
5 ppb	5 ppb-r001.d	Cal	4	1.0000	5.0000	7.474	452997	☐	5.2586	5.2586	105.2	-0.8311	1209.04
5 ppb	5 ppb-r002.d	Cal	4	1.0000	5.0000	7.475	445129	☐	5.1637	5.1637	103.3	-1.3531	560.45
10 ppb	10 ppb-r001.d	Cal	5	1.0000	10.0000	7.474	856882	☐	10.1254	10.1254	101.3	-0.9374	1438.92
10 ppb	10 ppb-r002.d	Cal	5	1.0000	10.0000	7.489	864754	☐	10.2203	10.2203	102.2	-1.7301	1477.89
25 ppb	25 ppb-r001.d	Cal	6	1.0000	25.0000	7.471	2063008	☐	24.6593	24.6593	98.6	-1.2186	2690.34
25 ppb	25 ppb-r002.d	Cal	6	1.0000	25.0000	7.469	2114326	☐	25.2777	25.2777	101.1	-0.8898	2937.14
50 ppb	50 ppb-r001.d	Cal	7	1.0000	50.0000	7.470	4190567	☐	50.2965	50.2965	100.6	-1.0925	4673.75
50 ppb	50 ppb-r002.d	Cal	7	1.0000	50.0000	7.470	4149707	☐	49.8042	49.8042	99.6	-1.9279	6299.63
100 ppb	100 ppb-r001.d	Cal	8	1.0000	100.0000	7.468	8266473	☐	99.4115	99.4115	99.4	-1.4094	12159.20
100 ppb	100 ppb-r002.d	Cal	8	1.0000	100.0000	7.468	8286854	☐	99.6571	99.6571	99.7	-1.5509	11701.05

図 4A. 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

Sample					NDMA M...	NDMA Results								
Name	Data File	Type	Level	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Mass Accuracy	S/N	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r001.d	Sample		0.0333		7.468	664819	☐	7.8110	0.2601		-2.3708	839.15	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r002.d	Sample		0.0333		7.452	668811	☐	7.8591	0.2617		-2.6682	568.31	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r003.d	Sample		0.0333		7.466	663197	☐	7.7915	0.2595		-2.5419	989.69	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r0001.d	Sample		0.0333		7.465	692599	☐	8.1458	0.2713		-2.7911	825.24	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r0002.d	Sample		0.0333		7.449	685728	☐	8.0630	0.2685		-0.2582	893.10	
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r0003.d	Sample		0.0333		7.450	698539	☐	8.2173	0.2736		-2.6450	1686.68	
1 ppb	1 ppb-r008.d	Sample		1.0000		7.463	102906	☐	1.0399	1.0399		-1.9600	133.72	
1 ppb	1 ppb-r009.d	Sample		1.0000		7.464	100057	☐	1.0056	1.0056		-1.0172	232.91	
1 ppb	1 ppb-r010.d	Sample		1.0000		7.481	101921	☐	1.0281	1.0281		-1.7069	157.19	
API 1	API 1-r001.d	Sample		0.0333		7.461	174701	☐	1.9051	0.0634		-1.4023	339.36	
API 1	API 1-r002.d	Sample		0.0333		7.452	175971	☐	1.9204	0.0639		-1.6121	296.57	
API 2	API 2-r001.d	Sample		0.0333		7.451	330214	☐	3.7790	0.1258		-2.0371	603.20	
API 2	API 2-r002.d	Sample		0.0333		7.452	331673	☐	3.7966	0.1264		-2.2190	813.07	
API 3	API 3-r001.d	Sample		0.0333		7.449	272822	☐	3.0874	0.1028		-1.4437	500.36	
API 3	API 3-r002.d	Sample		0.0333		7.450	271769	☐	3.0748	0.1024		-1.5514	482.95	
API 4	API 4-r001.d	Sample		0.0333		7.451	203712	☐	2.2547	0.0751		-0.9700	351.73	
API 4	API 4-r002.d	Sample		0.0333		7.449	206482	☐	2.2880	0.0762		-1.4015	360.87	
Tablet 1	Tablet 1-r001.d	Sample		0.0333		7.448	1781536	☐	21.2675	0.7082		-0.6552	3700.62	
Tablet 1	Tablet 1-r002.d	Sample		0.0333		7.447	1790194	☐	21.3719	0.7117		-0.7234	2645.69	
Tablet 2	Tablet 2-r001.d	Sample		0.0333		7.448	4235224	☐	50.8346	1.6928		-0.8068	9141.63	
Tablet 2	Tablet 2-r002.d	Sample		0.0333		7.449	4232781	☐	50.8052	1.6918		-0.1469	7276.58	

図 4B. Agilent 6546 LC/Q-TOF により測定した各サンプル濃度における代表的な再現性。注：API 1、API 2、API 3、および API 4 は異なるロットの原薬で、API 1 は回収の添加に関する実験に用いました。同様に、Ranitidine Tablet、Tablet 1、および Tablet 2 は異なるロットのランチジン錠剤で、Tablet 1 は回収の添加に関する実験に用いました。

表 5. Agilent 6546 LC/Q-TOF により測定した 1 ng/mL における代表的な再現性

番号	1 ng/mL での応答
1	104775
2	104836
3	104316
4	100169
5	100928
6	105196
7 (ブラケットティング)	102906
8 (ブラケットティング)	100057
9 (ブラケットティング)	101921
平均	102789
SD	2086.22
RSD (%)	2.03

Sample					NDMA M...	NDMA Results							
Name	Data File	Type	Level	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Mass Accuracy	S/N
API 1	API 1-r001.d	Sample		0.0333		7.461	174701	☐	1.9051	0.0634		-1.4023	339.36
API 1	API 1-r002.d	Sample		0.0333		7.452	175971	☐	1.9204	0.0639		-1.6121	296.57
Tablet 1	Tablet 1-r001.d	Sample		0.0333		7.448	1781536	☐	21.2675	0.7082		-0.6552	3700.62
Tablet 1	Tablet 1-r002.d	Sample		0.0333		7.447	1790194	☐	21.3719	0.7117		-0.7234	2645.69
Spike Standard 6 ppb	Spike Standard 6 ppb-r001.d	Sample		1.0000		7.466	457476	☐	5.3125	5.3125		-0.3589	882.27
Spike Standard 6 ppb	Spike Standard 6 ppb-r002.d	Sample		1.0000		7.464	485174	☐	5.6463	5.6463		-1.0769	1221.93
Spike Standard 48 ppb	Spike Standard 48 ppb-r001.d	Sample		1.0000		7.462	3653515	☐	43.8250	43.8250		0.5924	6178.42
Spike Standard 48 ppb	Spike Standard 48 ppb-r002.d	Sample		1.0000		7.461	3625056	☐	43.4821	43.4821		0.6249	6459.37
Blank	Blank-r00001.d	Sample		1.0000				☐					
API 1_Spike 6 ppb	API 1_Spike 6 ppb-r001.d	Sample		0.0333		7.434	615840	☐	7.2208	0.2405		1.6787	934.18
API 1_Spike 6 ppb	API 1_Spike 6 ppb-r002.d	Sample		0.0333		7.434	620887	☐	7.2816	0.2425		0.9507	1130.88
API 1_Spike 6 ppb	API 1_Spike 6 ppb-r003.d	Sample		0.0333		7.432	616494	☐	7.2287	0.2407		1.5689	1995.76
Tablet1_Spike 48 ppb	Tablet1_Spike 48 ppb-r001.d	Sample		0.0333		7.428	5197274	☐	62.4274	2.0788		1.6808	10813.26
Tablet1_Spike 48 ppb	Tablet1_Spike 48 ppb-r002.d	Sample		0.0333		7.429	5216955	☐	62.6646	2.0867		1.7166	10814.71
Tablet1_Spike 48 ppb	Tablet1_Spike 48 ppb-r003.d	Sample		0.0333		7.435	5224481	☐	62.7553	2.0898		1.4057	6946.74

図 5. Agilent 6546 LC/Q-TOF により測定した各濃度における代表的な回収率データ

注：回収率実験は、十分な量の NDMA が含まれている原薬と医薬品の両方で高濃度において実施しました。

表 6A. ラニチジン原薬の濃度 6 ng/mL おける回収率実験のまとめ。

ニトロソアミン 不純物	添加濃度 (ng/mL) ラニチジン API (30 mg/mL)	回収率 %
NDMA	6	93.86

表 6B. ラニチジン医薬品の濃度 48 ng/mL おける回収率実験のまとめ

ニトロソアミン 不純物	添加濃度 (ng/mL) ラニチジン API (30 mg/mL)	回収率 %
NDMA	48	94.16

結論

Agilent 6546 LC/Q-TOF 高分解能 LC/MS/MS では、低濃度で NDMA ニトロソアミン不純物を分析することが可能です。高分解能質量分析では、ラニチジン原薬と医薬品中に存在するニトロソアミン化合物を高い信頼性で検出しています。このアプリケーションノートでは、低濃度で NDMA を検出するための 6546 LC/Q-TOF 機器の感度について示しています。このメソッドでの質量精度は優れており、ラニチジン中の NDMA をきわめて高い信頼性で定量しています。またこのメソッドは、ラニチジン錠剤分析時の高濃度の NDMA 存在下であっても、ラニチジン原薬と医薬品中の微量の NDMA を検出する際の USFDA の要件に適切に対応しています。

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.
3. Determination of Nitrosamine Impurities Using the High-Resolution Agilent 6546 LC/Q-TOF. Agilent Technologies Application Note, publication number 5994-1372EN, **2019**.
4. FDA guidance document: Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Drug Product.
5. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/statement-alerting-patients-and-health-care-professionals-ndma-found-samples-ranitidine>

謝辞

NDMA 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, December 19, 2019

5994-1626JAJP

DE.4242476852