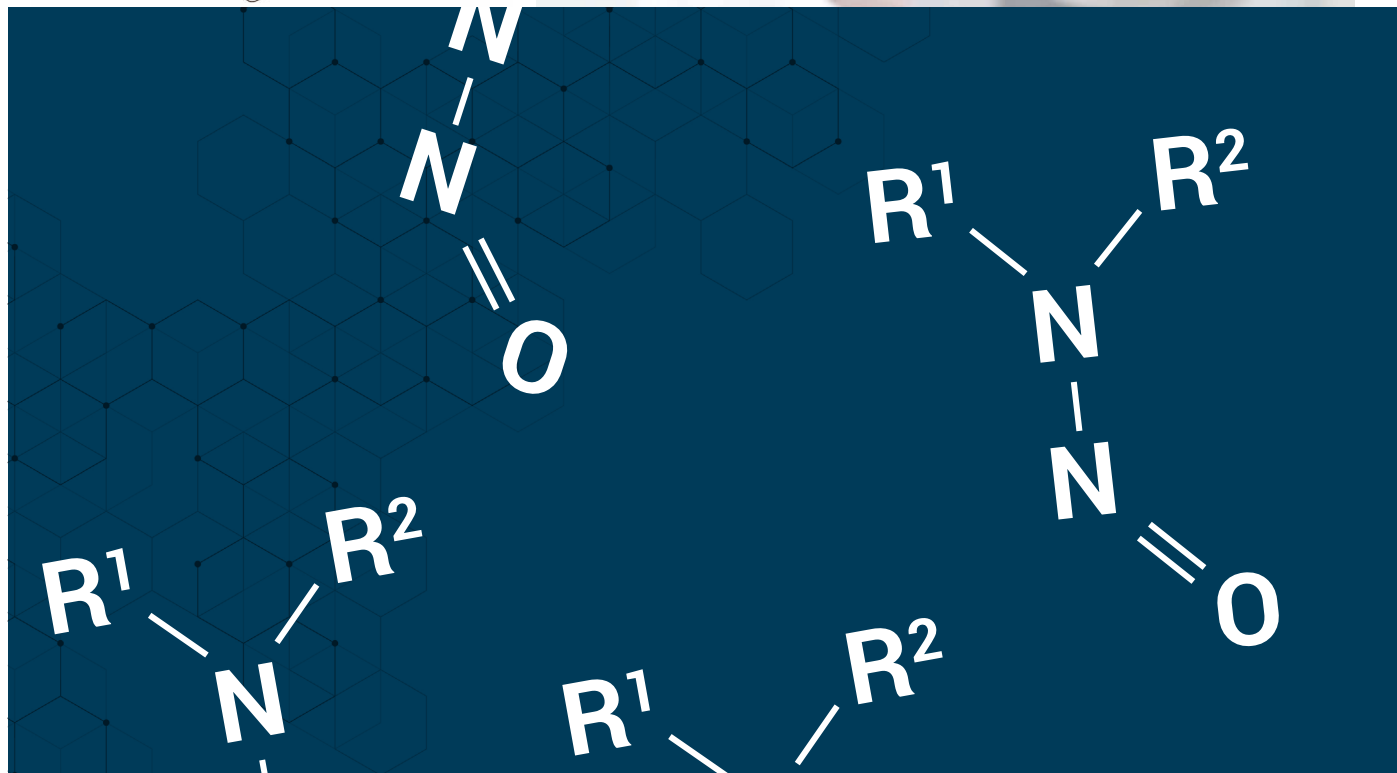


# 医薬品中の ニトロソアミン分析

トリプル四重極 LC/MS/MS、四重極飛行時間型 LC/MS  
ワークフローと消耗品ガイド



API および医薬品中の変異原性不純物は、少量であっても健康や安全上の重大なリスクとなるため、製薬会社にとっての大きな懸念事項です。変異原性不純物は DNA を破壊する可能性があるため、突然変異やがんの誘発につながります。微量の変異原性不純物の存在に対処および制御する取り組みは、各国の規制当局の大きな関心事です。このため、米国FDAやその他の規制機関は、医薬品に含まれる変異原性不純物の問題を解決するための対策に取り組んでいます。API や医薬品に含まれる微量のニトロソアミンの検出と定量は困難であり、高度な高感度ツールを使用して規制要件を満たすことが必要な場合があります。

ニトロソアミンの測定を必要とする API および医薬品のリストは、アンギオテンシン II 容体拮抗薬（ARB）サルタン系医薬品のリストからさらに拡大し、経口糖尿病薬のメトホルミンやラニチジンなどのヒスタミン-2 受容体拮抗薬を含んでいます。これを裏付けるものとして、近年、米国食品医薬品局（FDA）、欧州医薬品品質部門（EDQM）、保健科学庁（HSA）などのさまざまな規制機関が、N-ニトロソジメチルアミン（NDMA）の存在を理由にメトホルミンのリコールを求めました。ニトロソアミン不純物には、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-ニトロソジイソプロピルアミン（NDIPA）、N-ニトロソエチルイソプロピルアミン（NEIPA）、N-ニトロソジブチルアミン（NDBA）があります。これらは、おそらくヒトに対する発がん性がある物質に分類され、API の製造工程中に生じる化学反応に起因して最終製品に取り込まれたものと考えられています。

これらの不純物は、シングル四重極 GC/MS（GC/MSD）またはトリプル四重極 GC/MS/MS（GC/TQ）（1）、トリプル四重極 LC/MS/MS（LC/TQ）または四重極飛行時間型 LC/MS（LC/Q-TOF）（2-7）のいずれかを使用して検出できます。LC/MS/MS-ベースのメソッドは一般的に、非常に特異的で、高い感度を提供します。このため、これらの機器は、原薬およびメトホルミン、バルサルタン、ロサルタン、イルベサルタンなどの医薬品中のニトロソアミン不純物を検出し定量化するメソッドの開発のための基盤として使用されています。



図 1. 左から右へ：1260 Infinity II LC システム、6470B トリプル四重極 LC/MS、6550 iFunnel Q-TOF LC/MS、Ultivo トリプル四重極 LC/MS

<sup>1</sup>米国食品医薬品局：[www.fda.gov/media/131868/download](http://www.fda.gov/media/131868/download) 欧州評議会：[www.edqm.eu/en/news/omcls-release-three-methods-determination-ndma-sartans](http://www.edqm.eu/en/news/omcls-release-three-methods-determination-ndma-sartans)  
カナダ保健省：[Healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2020/72963a-eng.php](http://Healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2020/72963a-eng.php) 台湾 FDA：[www.fda.gov.tw/ENG/siteList.aspx?sid=10360](http://www.fda.gov.tw/ENG/siteList.aspx?sid=10360)

## カラムの選択肢

メソッド 2 (表 1) (8) で使用される **InfinityLab Poroshell 120 PFP カラム**のペンタフルオロフェニル (PFP) リガンドは、C18 結合相との直交型分離メカニズムを提供します。PFP 結合相では、構造、置換基、極性部への立体アクセスのわずかな違いをもとに化合物を分離することができます。これにより得られる位置異性体、ハロゲン化合物、および極性化合物に対する優れた選択性は、特に複雑な混合物の分析で威力を発揮します。NDIPA と NDPA は位置異性体であるため、InfinityLab Poroshell 120 PFP は、簡単な操作でこの分離を実現する最適な推奨カラムです。

**InfinityLab Poroshell HPH-C18 カラム**もこの分析のメソッド 1 (表 1) (8) で使用しています。粒子の堅牢性を幅広い pH 域で高めるハイブリッド粒子技術を取り入れており、カラム寿命を長くしてカラムの交換頻度を低減できます。しかし、このカラムを使用する場合、メソッドの長期持続性、安定性、および信頼性を確保するには、堅牢なメソッド開発プロセスが不可欠です。イオン性化合物の保持力と選択性は pH に応じて大きく変化するため、メソッド開発時には、pH を低、中、高と変えて分析を実施するのが一般的です。グラジエント条件の最適化に加えて、位置異性体の NDIPA と NDPA を分離させるために、MS/MS 機器のパラメータを最適化して感度を最大限に高める必要もあります。

## LC の構成とパラメータ

表 1. UHPLC の構成と設定。メソッドの詳細については、参考文献 8 を参照してください。

| パラメータ      | 設定値                                                                           |      |                                                                            |             |          |     |     |             |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------|-------------|----------|-----|-----|-------------|
|            | メソッド 1                                                                        |      | メソッド 2                                                                     |             |          |     |     |             |
| 装置         | Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)                                   |      | 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 マルチカラムサーモスタット (G7116B)                            |             |          |     |     |             |
|            | Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G1315C)                                    |      | Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G1315C)                                 |             |          |     |     |             |
|            |                                                                               |      |                                                                            |             |          |     |     |             |
| ニードル洗浄     | メタノール: 水 (80:20)                                                              |      | メタノール: 水 (80:20)                                                           |             |          |     |     |             |
| サンプル希釈液    | 水: メタノール (95:5)                                                               |      | メタノール                                                                      |             |          |     |     |             |
| マルチサンブラの温度 | 10 °C                                                                         |      | 10 °C                                                                      |             |          |     |     |             |
| 注入量        | 20 µL                                                                         |      | 5 µL                                                                       |             |          |     |     |             |
| 分析カラム      | Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18、4.6 × 150 mm、2.7 µm (p/n 693975-702(T)) |      | Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP、3.0 × 150 mm、2.7 µm (p/n 693975-308) |             |          |     |     |             |
| カラム温度      | 40 °C                                                                         |      | 40 °C                                                                      |             |          |     |     |             |
| 移動相 A      | 0.1 % 酢酸水溶液                                                                   |      | 0.1 % 酢酸水溶液                                                                |             |          |     |     |             |
| 移動相 B      | 0.1% 酢酸メタノール溶液                                                                |      | 0.1% 酢酸メタノール溶液                                                             |             |          |     |     |             |
| 流量         | 0.5 mL/min                                                                    |      | 0.5 mL/min                                                                 |             |          |     |     |             |
| グラジエント     | 時間 (min)                                                                      | % A  | % B                                                                        | 流量 (mL/min) | 時間 (min) | % A | % B | 流量 (mL/min) |
|            | 0                                                                             | 95   | 5                                                                          | 0.5         | 0        | 95  | 5   | 0.5         |
|            | 2                                                                             | 95   | 5                                                                          | 0.5         | 3        | 95  | 5   | 0.5         |
|            | 7                                                                             | 40   | 60                                                                         | 0.5         | 14       | 40  | 60  | 0.5         |
|            | 10                                                                            | 25   | 75                                                                         | 0.5         | 17       | 10  | 90  | 0.5         |
|            | 11                                                                            | 10   | 90                                                                         | 0.5         | 19       | 10  | 90  | 0.5         |
|            | 16.5                                                                          | 10   | 90                                                                         | 0.5         | 19.1     | 95  | 5   | 0.5         |
|            | 16.6                                                                          | 95   | 5                                                                          | 0.5         | 22       | 95  | 5   | 0.5         |
|            | 20.0                                                                          | 95   | 5                                                                          | 0.5         |          |     |     |             |
|            | ストップタイム                                                                       | 20 分 |                                                                            | 22 分        |          |     |     |             |
| UV 波長      | 230 nm                                                                        |      | 230 nm                                                                     |             |          |     |     |             |

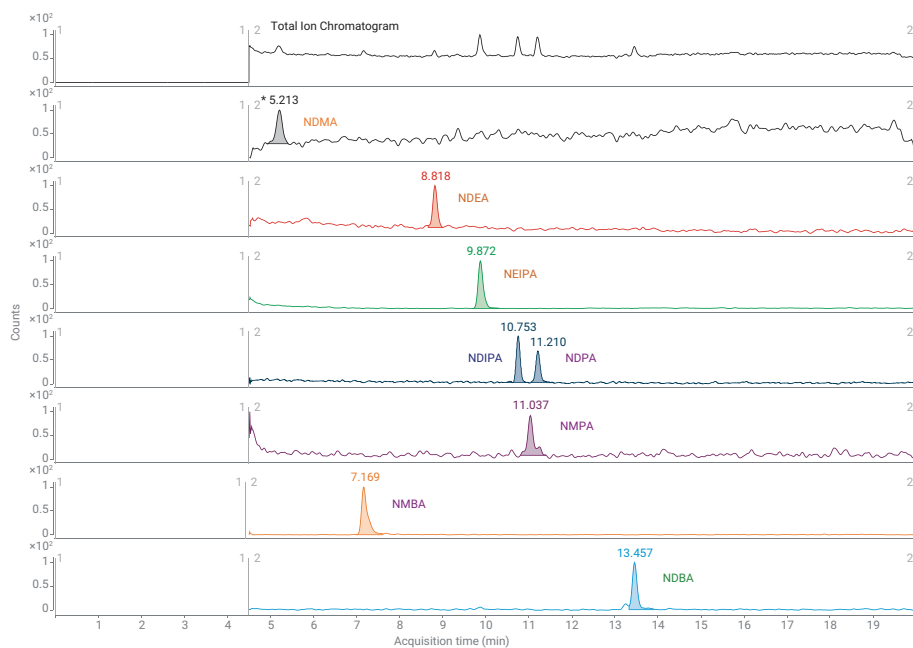


図 2. メソッド 1 による、8 種類のニトロソアミン不純物 (0.5 ng/mL) の代表的な MRM クロマトグラム (メソッドの詳細は参考文献 8 を参照)

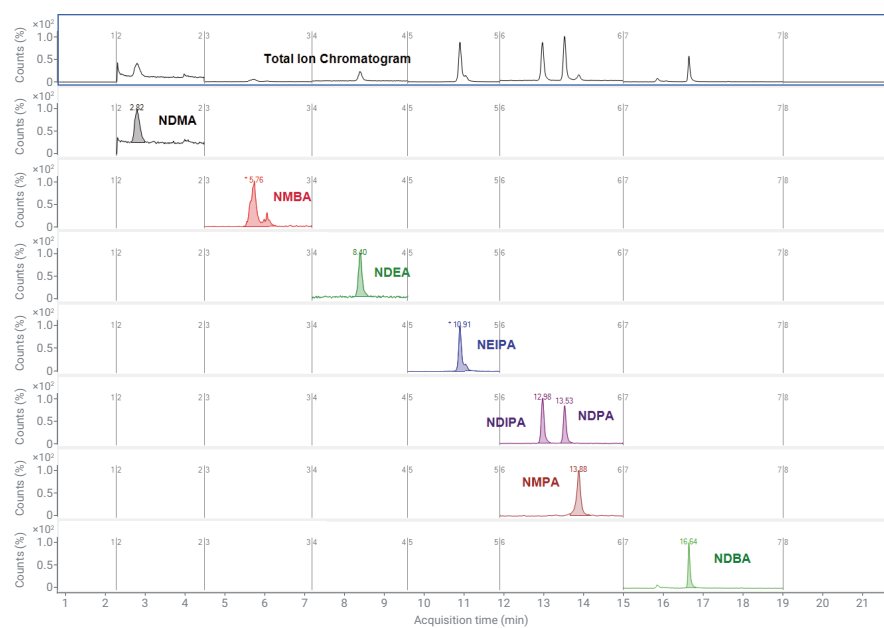
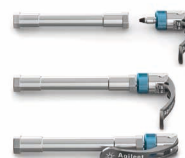


図 3. メソッド 2 による、8 種類のニトロソアミン不純物 (3 ng/mL) の代表的な MRM クロマトグラム (メソッドの詳細は参考文献 8 を参照)

## 標準品、カラム、消耗品などの情報

本ガイドは、ニトロソアミン分析での使用が推奨されるアジレント製品を紹介しており、ご要望の製品をすぐに見つけることができます。

| 製品概要                                                                            | 製品番号                   |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>ニトロソアミン標準と溶媒</b>                                                             |                        |
| ニトロソアミン標準（塩化メチレン溶液）                                                             | US-113N-1              |
| InfinityLab Ultrapure LCMS MeOH                                                 | 5191-4497              |
| InfinityLab Ultrapure LC/MS 用超純水                                                | 5191-4498              |
| ギ酸、5 mL                                                                         | G2453-85060            |
| <b>ニトロソアミン - サンプル前処理</b>                                                        |                        |
| 15 mL 遠心分離チューブおよびキャップ、50 個                                                      | 5610-2039              |
| Captiva エコノフィルタ、PVDF メンブレン、直径 13 mm、ポアサイズ 0.2 µm、1000 個                         | 5190-5261              |
| Captiva プレミアムシリンジフィルタ、PES メンブレン、直径 15 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個（LC/MS 認証）           | 5190-5096 <sup>1</sup> |
| Captiva プレミアムシリンジフィルタ、ナイロンメンブレン、直径 15mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個（HPLC 認証）             | 5190-5088 <sup>2</sup> |
| Captiva ディスポーザブルシリンジ、5 mL、100 個                                                 | 9301-6476              |
| Captiva ディスポーザブルシリンジ、10 mL、100 個                                                | 9301-6474              |
| <b>ニトロソアミン - LC カラム</b>                                                         |                        |
| InfinityLab Poroshell 120 PFP、3.0 x 150 mm、2.7 µm（推奨）                           | 693975-308             |
| InfinityLab Poroshell 120 PFP ガードカラム、3.0 mm、2.7 µm（推奨）                          | 823750-915             |
| InfinityLab Poroshell HPH-C18、4.6 x 150 mm、2.7 µm                               | 693975-702             |
| InfinityLab Poroshell HPH-C18、4.6 mm、2.7 µm、UHPLC ガードカラム、3 個                    | 820750-922             |
| <b>ニトロソアミン - LC 消耗品</b>                                                         |                        |
| InfinityLab クイックコネクタアセンブリ、0.12 x 105 mm、UHPLC のカラム入口接続用                         | 5067-5957              |
| InfinityLab クイックコネクタアセンブリ、0.17 x 105 mm、UHPLC のカラム入口接続用                         | 5067-6166              |
| InfinityLab クイックターンフィッティング、カラム出口用                                               | 5067-5966              |
| クイックターンキャピラリー、0.12 x 280 mm、カラムから検出器への接続用                                       | 5500-1191              |
| 4 ポート付きセーフティ廃液キャップ GL45 と 6 L 廃液ボトルのキット                                         | 5043-1221              |
| 廃液ボトル用タイムストリップ付きチャコールフィルタ                                                       | 5043-1193              |
| InfinityLab セーフティキャップ、スターターキット                                                  | 5043-1222              |
| ステンレス溶媒インレットフィルタ、ポアサイズ 10 µm                                                    | 01018-60025            |
| InfinityLab 溶媒フィルタアセンブリ、250 mL ガラスファネル、メンブレンホルダガラスベース、1 L ガラスフラスコ、アルミニウムクランプを含む | 5191-6776 <sup>3</sup> |
| 再生セルロースメンブレン、47 mm、0.20 µm、100 個                                                | 5191-4340 <sup>3</sup> |



| ニトロソアミン - バイアルおよびキャップ                                                  |             |
|------------------------------------------------------------------------|-------------|
| バイアル、スクリーントップ、茶色、ラベル付、認定、2 mL、<br>100 個バイアルサイズ：12 x 32 mm (12 mm キャップ) | 5182-0716   |
| キャップ、スクリュー、緑、スリット入り PTFE/シリコンセパタム、100 個。<br>キャップサイズ：12 mm              | 5183-2077   |
| バイアルインサート、250 µL、不活性化ガラス、樹脂足付、100 個                                    | 5181-8872   |
| ニトロソアミン - MS 用消耗品                                                      |             |
| APCI ニードル交換キット                                                         | G1946-68704 |
| APCI ニードル                                                              | G1960-20030 |
| キャピラリー、高速切り替え、0.6 mm                                                   | G1960-80060 |

1. PVDF に近い性能を得られるよう、このメンブレンはタンパク質との結合を低くしているため、タンパク質分析に最適です。小型バックサイズ（100 個）で購入でき、LC/MS 認証されています。
2. 一般ろ過のニーズに適しています。タンパク質分析には使用できません。小型バックサイズ（100 個）で購入でき、HPLC 認証されています。
3. 溶媒ろ過アセンブリおよび付随するフィルタメンブレンは、InfinityLab UltraPure LC/MS 溶媒との使用を推奨していません。

## 参考文献

1. シングル四重極 GC/MS、トリプル四重極 GC/MS による医薬品中のニトロソアミン分析：ワークフローと消耗品ガイド, Agilent publication ([5994-2979JAJP](#))
2. Nitrosamine Impurities Application Guide – Confidently detect and quantify mutagenic impurities in APIs and Drug Products ([5994-2393EN](#))
3. 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([5994-1626JAJP](#))
4. Simultaneous Determination of Eight Nitrosamine Impurities in Metformin Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS ([5994-2286EN](#))
5. 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 ([5994-1383JAJP](#))
6. Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS を 用いたラニチジン中の NDMA 不純物の測定 ([5994-1668JAJP](#))
7. 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 ([5994-1372JAJP](#))
8. Simultaneous Determination of Eight Nitrosamine Impurities in Metformin Extended-Release Tablets Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS ([5994-2533EN](#))



## アジレントの標準試薬

この他のアプリケーション用に高品質の標準をお探しの場合は、[5000 種類の標準試薬のカタログを検索して](#)、メソッド、アプリケーション、ワークフローに最適な標準を見つけることができます。カタログにお探しの標準がない場合は、アジレントのウェブサイトですぐのカスタム標準見積りツールをご利用ください。お客様のニーズに合った標準の開発をお手伝いします。

## Agilent LC セレクタツール

アプリケーションに最適な LC カラムをお探しですか？アジレントの [LC カラムセレクターツール](#)を使用して、最適な LC カラムを選択できます。

## Agilent CrossLab:「見えない価値」を「目に見える成果」へ

機器という枠を越えて、サービス、消耗品、ラボ全体のリソース管理を対象とするCrossLab は、ラボの効率の向上、運用の最適化、機器の稼働時間の延長、ユーザースキルの開発などを支援します。



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

**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. 2021  
Printed in Japan, March 10, 2021  
5994-2977JAJP  
RA44239.5764236111

