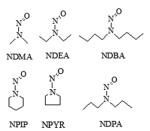




ニトロソアミン分析のポイント 本日の内容

- 1. 不純物の分類、ICHガイドライン、分析手法
- 2. ニトロソアミン類に対する最近規制動向
- 3. APIおよび医薬品中のニトロソアミン類分析
 - GC/MSおよびLC/MSアプローチ



Agilent

3

1. 不純物とICHガイドライン、分析手法

不純物	詳細	ICHガイドライン	主な分析方法
有機不純物	類縁物質 光学異性体 変異原性不純物	ICH Q3A/B ICH Q6A/Q3A ICH M7	HPLC, LC/MS HPLC, SFC, MS LC/MS, GC/MS
無機不純物	金属触媒·試薬 Class 1-3 元素	ICH Q3D	ICP-MS, ICP-OES
残留溶媒	Class 1-3 溶媒	ICH Q3C	HSS/GC

変異原性不純物

- DNAに損傷を与え、突然変異を引き起こす
- 発がん性と高い相関あり
- ppm(~ppb)レベルの管理が必要

新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインなど

1日最大投与量 *1	報告の必要な 閾値 *2,3	構造決定の必要な閾値 *3	安全性確認の必要な閾 値 *3	変異原性不純物
≦2g/日	0.05%	0.10%又は 1日摂取量1.0mg (どちらか低い方)	0.15%又は 1日摂取量1.0mg (どちらか低い方)	1日最大投与量100 mgで <mark>許容摂取量が1.5 μg/day</mark> の場合、許容限度は 1.5/0.1=15 ppm
>2g/目	0.03%	0.05%	0.05%	

- *1 1日当たりの原薬の摂取量

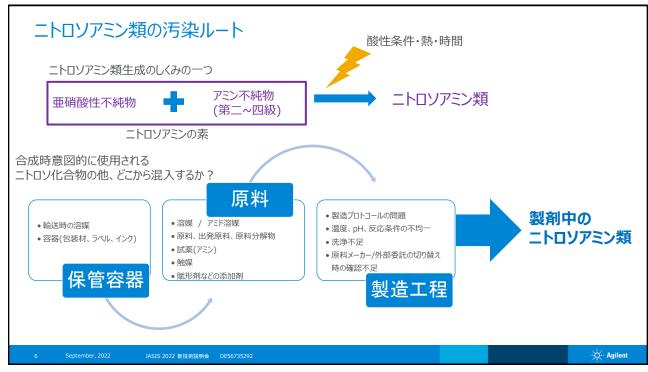


Legend: A = Alkyl, Aryl or H Halogen = F,Cl,Br, and I EWG = Electon withdrawing group

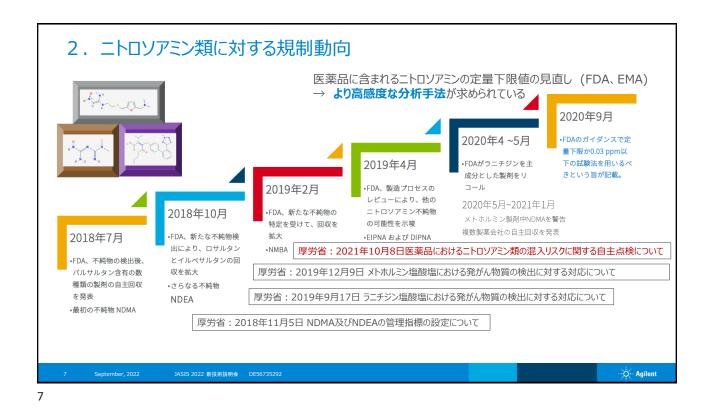
医薬品における構造アラート(変異原性)の一つ ニトロソアミン Group1: Aromatic groups ニトロソアミン類とは、アミン窒素上の水素がニトロソ基に置換 された構造を持つ化合物群 Amino arvls and alkylated Purines or pyrimi denes, intercalators, PNAs or PNAHs N-ニトロソジメチルアミン(NDMA)、N-ニトロソジエチルアミン Group 2: Alkyl and aryl group (NDEA)といった複数の化合物の総称 NO Nitro compounds 2018年7月中国の製薬会社で製造されたバルサルタン原薬か ら、発がん性が疑われる N-ニトロソジメチルアミン (NDMA)が 検出されたことが報告され、世界的な製品回収 Propiolactomes Propiosulptones Group 3: Heteroatomic groups → 2022年8月までにも 国内外の製薬会社においてニトロソアミン類の検出による

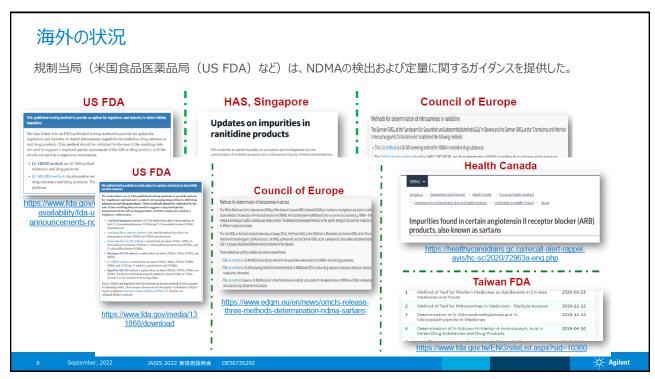
自主回収の事例が多数報告されている

5











ニトロソアミンの検出を目的に、FDAが公開した検査メソッド

日付	メソッド	システム	分析対象物 LOQ
2019年1月28日	<u> ヘッドスペースメソッド</u>	Agilent 7890B GC - 5977A MSD - 7697A HS	NDMA 0.10 ppm, NDEA 0.05 ppm
2019 年 4 月 19 日、 更新 2019 年 4 月 21 日	ダイレクト注入メソッド GC-MS ダイレクト 注入メソッド	Agilent 7890 GC - 7010 QQQ(文献では未発表)	NDMA 0.013 ppm, NDEA 0.08 ppm, NDIPA 0.08 ppm, NEIPA 0.08 ppm, NDBA 0.040 ppm
2019年4月29日	<u>GC-MS ヘッドスペース</u> <u>メソッド</u>	Agilent 7890B GC - 5977A MSD - 7697A HS	NDMA 0.05 ppm、NDEA 0.05 ppm、 NDIPA 0.05 ppm、NEIPA 0.05 ppm
2019年5月21日	LC-HRMS メソッド	UHPLC-Q Exactive/Q- Exactive HF-X	NDMA 0.05 ppm、NDEA 0.05 ppm、 NDIPA 0.05 ppm、NEIPA 0.05 ppm、 NMBA 0.05 ppm、NDBA 0.05 ppm
2019年7月24日	RapidFire-MS/MS メソッド	Agilent RapidFire-6460C	NDMA 25 ppm、NDEA 50 ppm、 NDIPA 0.25 ppm、NEIPA 0.1 ppm、 NMBA 0.1 ppm、NDBA 0.1 ppm
2019年9月13日	LC-HRMS メソッド ラニチジン	UHPLC-Q Exactive	NDMA 0.033 ppm
2019年10月17日	LC-MS/MSメソッド ラニチジン	UHPLC - Agilent 6420	NDMA 0.033 ppm

Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs

Guidance for Industry

U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

September 2020 Pharmaceutical Quality/ Manufacturing Standards/ Current Good Manufacturing Practice (CGMP)

Generally, sensitive methods with limits of quantitation (LOQ) in the parts-per-billion (ppb) range are needed to meet the low AIs recommended for nitrosamines. Manufacturers of APIs and drue products should use methods with LOOs at or below 0.03 nom. 35

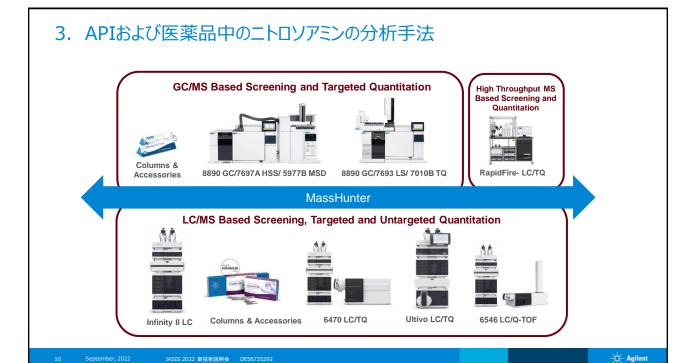
2020年9月に発表されたガイダンスで定量下限が 0.03ppm以下の試験法を用いるべきと記載されました。

https://www.fda.gov/media/141720/download

September, 2022

SIS 2022 新技術説明会 DE5673

Agilent Agilent





GC/MS USP1469における分析メソッド

7. The 8. Analytical Procedures section contains procedures that have been validated or verified in the USP laboratories.

- Procedure 1 is based on analyses performed with the Phenomenex Kinetex brand of 2.6-µm F5 100Å, 100 × 4.6-mm column with L43 packing. The
 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid brand of mass spectrometer (ThermoFisher Scientific) was used during validation.
- Procedure 2 is based on analyses performed with the following fused-silica columns with phase G16: a) Supelcowax 10 (Supelco #24211) (30 m × 0.32 mm × 1.0 μm); b) SH-Stabilwax (Shimadzu) (30 m × 0.32 mm × 1.0 μm); or c) DB-Wax (Agilent #123-7032) (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm). The MS detectors used were TSQ9000 VPI-HS 500 Triple Quadrupole GC-MS (ThermoFisher Scientific), TQ8040 NX mass spectrometer (Shimadzu), or the 7010B Triple Quadrupole GC/MS (Agilent).
- Procedure 3 is based on analyses performed with the Restek Raptor brand of 2.7
 µm ARC-18, 150-mm × 3.0-mm column with L1 packing. The LCMS-8050

 Triple Quadrupole brand of liquid chromatograph mass spectrometer (Shimadzu) was used during method validation. The Xevo TQD Triple Quadrupole brand of mass spectrometer (Waters) was used during method verification.
- Procedure 4 is based on analyses performed with the J&W VF-WAXms GC brand of fused-silica column (30 m × 0.25 mm × 1 μm) with phase G16. The
 TSQ 9000 GC-MS/MS brand of spectrometer (ThermoFisher Scientific) was used during method validation, and the 7000 Series Triple Quad GC/MS brand
 of spectrometer (Agilent) was used during method verification.

Procedure 2 ヘッドスペース-GC/MS/MS



Procedure 4 液体注入-GC/MS/MS



アジレントのGC/MS/MSを用いて分析メソッドのバリデーションが取られている

September, 2022

SIS 2022 新技術説明会 DE56735

Agilent

11

ヘッドスペースサンプラ-GC/TQを使用するメリットは?

- 1. サンプル前処理を簡略化できる
- 2. システムへの負荷を小さくすることが可能
- 3. 従来通りの残留溶媒試験の分析も同一システムで可能



GCによる分析の注意点

- 1. NMBA は沸点、極性が高いためGC/MS では分析が困難
- 2. ラニチジンは熱による分解でニトロソアミンが生成されるため定量できない

Agilent A

12

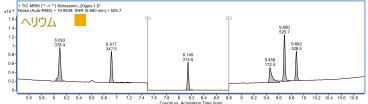
eptember, 2022

IASIS 2022 新技術説明会

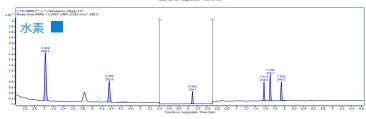


ヘリウム供給問題:水素をキャリアガスとして使用したニトロソアミン分析

ヘリウムキャリアと水素キャリアでの比較(使用カラム Agilent DB-Wax, 20 m x 0.18 mm x 0.18 μm) 20ppb標準品溶液 MRM TIC



No.	化合物	RT	面積	高さ	SN比
1	NDMA	6.093	16715	7565	378
2	NDEA	6.917	12316	6949	348
3	NDPA	8.145	9474	6290	315
4	NDBA	9.458	11757	3448	172



No.	化合物	RT	面積	高さ	SN比
1	NDMA	3.022	3676	1703	599
2	NDEA	4.352	1575	750	264
3	NDPA	6.085	581	438	154
4	NDBA	7.573	907	679	239

ヘリウムと水素をキャリアガスとして使用した場合に同程度のSN比が確認された

September, 202

SIS 2022 新技術説明会 DE567352

Agilent

13

日本国内(NDMA/NDEA)におけるGC/MS、LC/MSの対応

成分名	GC/MS (SQ)	GC/MS(TQ)	LC/MS (TQ)	LC/MS (QTOF)
バルサルタン	Δ	0	0	0
イルベサルタン	\triangle	0	0	0
オルメサルタン	0	0	0	0
ロサルタン	0	0	0	0
ラニチジン塩酸塩 ニザチジン	× 自身の熱分解によりニトロソアミ ンが生成するため定量困難	× 自身の熱分解によりニトロソアミ ンが生成するため定量困難	0	0
メトホルミン (メトグルコ錠及び その後発医薬品)	×	0	0	0

- システム構成次第では、各種不純物解析(残留溶媒や浸出物&溶出物等)との併用も可能です
- 近年、海外向けでは、対象成分が増えていることから、TQの採用が増えています
- LC/MS Q-TOFの場合は、類縁不純物の解析も可能です
- 2021年10月発出 厚生労働省によるガイドライン 対象となる医薬品。自主点検(医薬品に混入するニトロソアミン類の限界値)。確認事項・実施期限。などについて言及

14 September, 2022

JASIS 2022 新技術説明

DE44435.222523148



GC/MSを補うLC/MS - Agilent トリプル四重極LC/MS -

- 1. NMBA は沸点、極性が高いためGC/MS では分析が困難
- 2. ラニチジンは熱による分解でニトロソアミン(NDMA)が生成されるためGC/MSで定量できない



15

Agilent 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

Quantitation of NDMA on Agilent LC/TQ



	NDMA		US FDA 2019	Agilent 6470 LC/TQ
	LOD	ng/mL	0.32	0.1
	LOQ	ppm	0.011	0.0033
		ng/mL	1	0.25
		ppm	0.033	0.0083
	Lincority Dongs	ng/mL	1-100	0.1-100
	Linearity Range	ppm	0.033-3.33	0.0033-3.33
(5	Sample size 30mg/mL)			

2020年9月に発表されたガイダンスで定量下限が 0.03ppm以下の試験法を用いるべきと記載されました。

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 要集品施工程などから生じる規制対象の適生適性不純物の

https://www.fda.gov/media/141720/download

US FDA の要件 (LOD 0.03 ppm) を満たす分析性能

USP1469 (LOD 0.01~0.02 ppm) (Sample size 66.67mg/mL) も満たす分析性能

September, 2022 JASIS 2022 新技術説明会 DE567







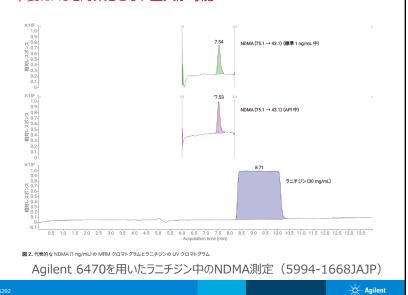
【分析のコツ】 LC/MS ダイバート(MS内蔵)バルブの利用による汚れの低減

表 4. ラニチジンのピークを廃液に流すために 用いたダイバータバルブプログラム

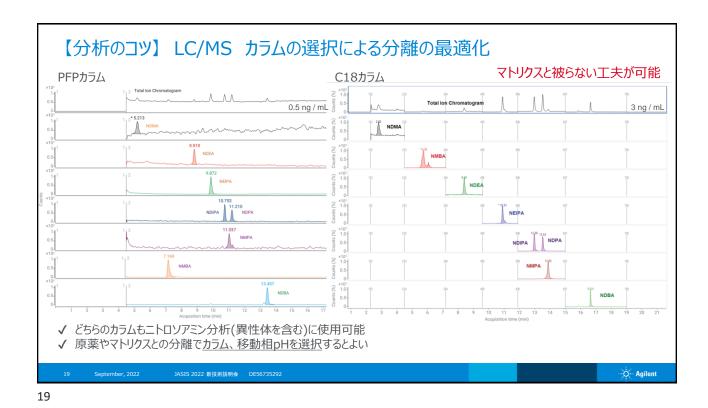
#	開始時間(分)	スキャンタイプ	ダイバータバルブ
1	0	MRM	廃液
2	6	MRM	MS
3	8.2	MRM	廃液

バラメータ			19	定値		
	Agilent 129	Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ(G7120A)				
	Agilent 129	Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ(G7167B)				
技管	Agilent 129	0 Infinity	マルチカ	ラムサーモスタット(G7116		
	Agilent 129	0 Infinity	可变波長	検出器 (G7114B)		
ニードル洗浄	80:20、×9.	ノール:オ				
サンブル希釈波	*					
マルチサンプラ温度	6 ± 2°C					
注入量	20 µL					
分析カラム		Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4.6 × 150 mm, 2.7 um (p/n 693975-702)				
カラム温度	40 ° C	40 ° C				
移動相A	0.1% 丰酸水	0.1% 丰酸水溶液				
移動相B	0.1% ギ酸メ	0.1% ギ酸メタノール溶液				
光量	0.3 mL/min					
	時間(分)	% A	% B	流量 (mL/min)		
	0	95	5	0.3		
	6	92	8	0.3		
W- start i	6.1	92	8	0.5		
グラジエント	11	5	95	0.5		
	11.1	5	95	0.3		
	11.2	95	5	0.3		
	14	95	5	0.3		

不要にMSを汚染させない工夫が可能









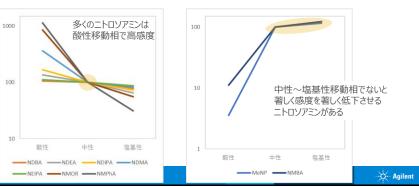
中性移動相時のピーク面積を

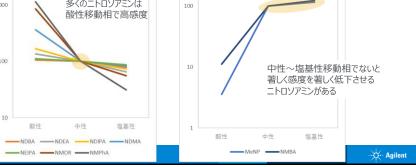
100%とした場合のグラフ →

✓ 移動相pHによりニトロソアミン類の感度が変動する

Pmdaガイドラインのニトロソアミン9種を網羅的に高感度に分析するには

→ 中性移動相(2mM 酢酸アンモニウム)条件が中庸といえる NMBAのピーク強度が最も低いので、分析条件最適化時のモニターとするとよい







【分析のコツ】ニトロソアミンの安定性

✓ 安定性の低いニトロソアミンに注意

NMPhA → 反応性が高い アルカリ条件で試料調製すると安定 NDBA → 光存在下で不安定 アルカリ条件で試料調製すると安定 MNOR → 脱ニトロソ化しやすい

- → ・遮光褐色バイアルなど遮光 (PPバイアルでも分析可です)
 - ・試料冷却の維持
 - ・要時調製および調製後の迅速な分析
 - ・調製溶液のpH管理
 - ・マイルドなMSイオン化条件 (APCIベーパライザ温度と乾燥ガス温度は上げすぎない方がよい)



21 September

ASIS 2022 新技術説明会 DE567352

Agilent

21

ニトロソアミン分析のポイント まとめ

- 1. 不純物の分類、ICHガイドライン、分析手法
- 2. ニトロソアミン類に対する最近規制動向
- 3. APIおよび医薬品中のニトロソアミン類分析
 - GC/MSおよびLC/MSアプローチ

Agilentがお手伝いできること

- ✓ 規制要件を満たすパフォーマンスの GC/MSとLC/MSシステムとメソッドの提供 (DI対応もご相談ください)
- ✓ よりよい分析を行うためのコツ
 - → 経験豊富なAgilentにご相談ください (消耗品・前処理・分析条件まで)

22 September, 202

JASIS 2022 新技術説明会 DE56735292

🔆 Agilent



アプリケーションノートの紹介

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) https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5994-1372JAJP

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)

https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5994-1383JAJP

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)

https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low 5994-1668JAJP.pdf

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) https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low 5994-1626JAJP.pdf

医薬品中の潜在的な変異原性不純物の微量レベルでの定量: Agilent Ultivo LC/TQ でのミックスモードデータ取り込みを用いた分析 (5994-1238JAJP)

https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5994-1238JAJP

Agilent ヘッドスペースサンプラ、8890/5977 GC/MSDを用いたN-ニトロソジメチルアミンおよびN-ニトロソジエチルアミンの分析 (5994-1132JAJP)

https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5994-1132JAJP

GC/Q-TOF システムを使用したベシル酸アムロジピン中の潜在的な遺伝毒性不純物の定量 (5994-6058JAJP)

https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5991-6058JAJP

23 September, 202

ASIS 2022 新技術説明会 DE

DE56735292

Agilent







元素分析のポイント 本日の内容

- 1. 製剤の元素不純物管理の概要
- 2. 製剤分析で注意すべきポイントと分析実例



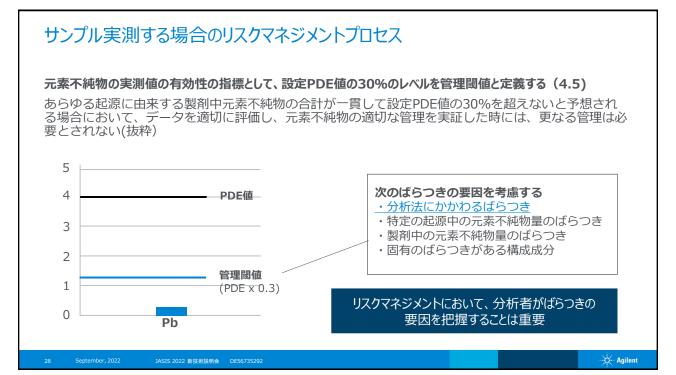
Agilent

September, 202

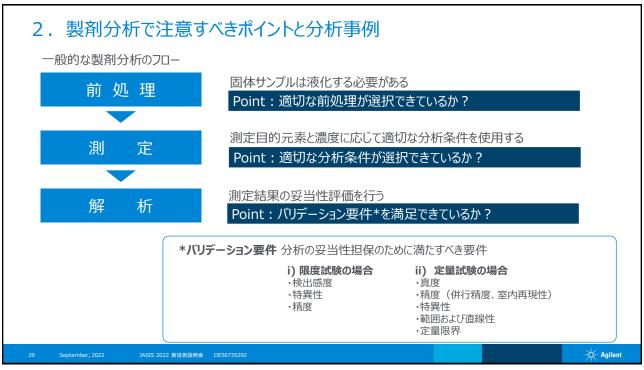
ASIS 2022 新技術問題会 DE56735

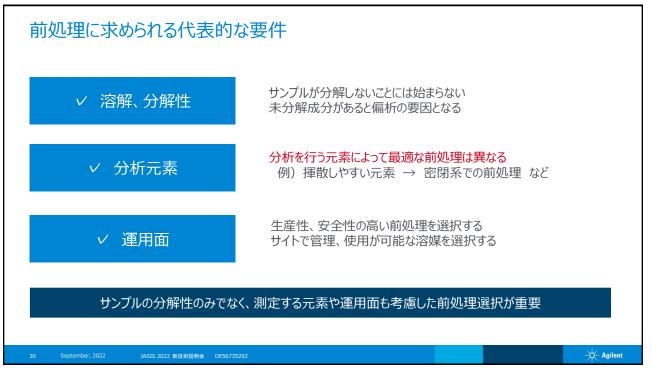














一般的な前処理の種類と概要

前処理方法	概要
溶解法 (酸性溶媒)	酸性溶媒によって溶解を行う
溶解法 (有機溶媒)	有機溶媒によって溶解を行う
乾式灰化法	電気炉等で有機物を灰化した後、残渣を酸分解する 元素によっては灰化した後に溶融操作が必要
湿式分解法	有機物を酸化性の溶媒で分解した後、測定対象元素に 合わせた溶媒に転溶する
マイクロウェーブ 分解法	密閉容器に試料と酸性溶媒を入れた後に密閉し、 マイクロウェーブで加熱する

31 September, 2

SIS 2022 新技術説明会 DE56735



31

一般的な前処理法と特徴

前処理方法	長 所	短 所
溶解法 (酸性溶媒)	操作がシンプル	適用可能なサンプルが限定される
溶解法 (有機溶媒)	操作がシンプル	元素によっては安定性が低い
乾式灰化法	難溶解物質でも対応できることが多い	揮散しやすい元素(As, Hg,Seなど)を損失する 比較的操作が複雑である
湿式分解法	比較的安価 幅広いサンプルに対応ができる	比較的時間を要する 過塩素酸は取扱いに注意が必要
マイクロウェーブ 分解法	高圧、密閉系であるため 環境汚染や揮散が少なく高速	分解中の試料の状態が確認できない (一部確認可能な装置もあり)

溶解性や分析元素などの様々な要因を考慮して前処理法を選択する必要がある

32 September, 2022

技術説明会 DE5673529



適切なサンプル導入系の選択

溶媒種による一般的な導入系の選択基準

溶媒	導 入 系	備考
酸性溶媒(HFを除く)	石英導入系	水溶性の酸性溶媒に広く用いられる
HF	イナート導入系	HFはSiO ₂ を溶解するため イナート(フッ素樹脂)の導入系を使用する
有機溶媒	石英導入系 + Option Gas	揮発性が高い有機溶媒の場合はインジェクタ内径の小さいトーチを選択 煤の堆積を抑制するため、導入系にOption $gas(O_2)$ を供給する



Q. HBF₄の場合石英導入系の使用はOKか?

A. HBF4は劇物指定の無機酸であり、HFの代わりに溶媒として使用される場合がある。(HFは指定毒物)一部がHFとして存在していると考えられるため、イナート導入系を使用することをお勧めします。

イナートスプレーチャンバ (ICP-OES用)

September, 2022

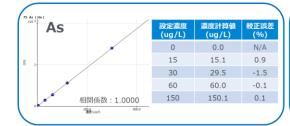
SIS 2022 新技術説明会 DE56735

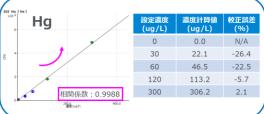


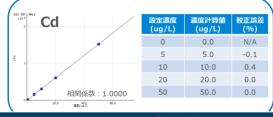
33

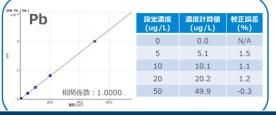
【事例紹介】Hg分析時の最適な溶媒の選択

ICP-MSによる検量線の一例(5 vol% 硝酸)









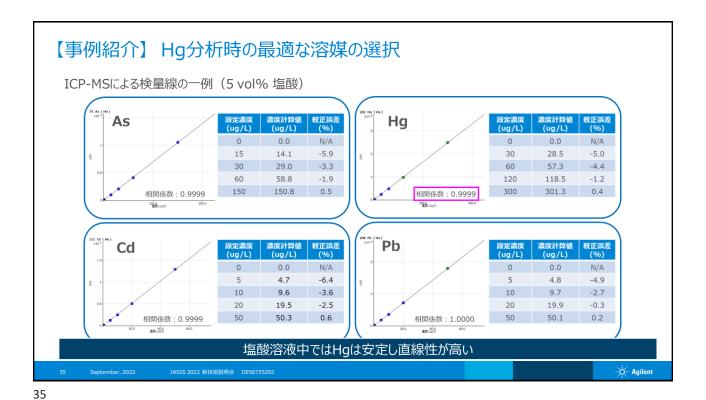
硝酸溶液中ではHgは不安定のため直線性が低い

September, 2022

SIS 2022 新技術説明会 DE5673529

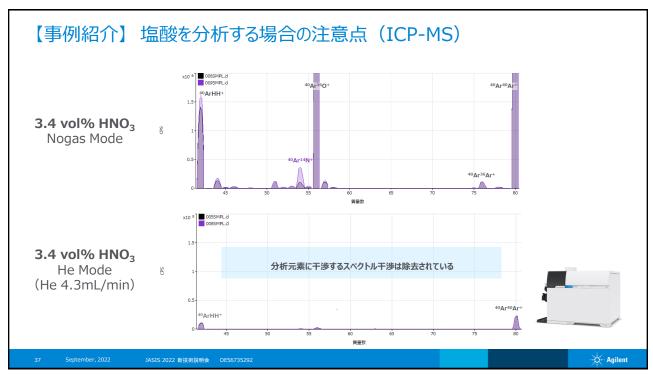


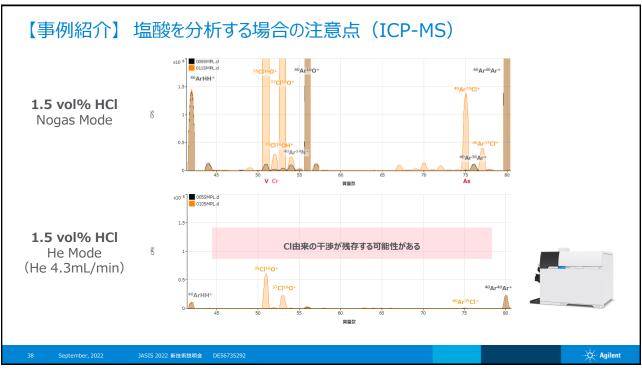




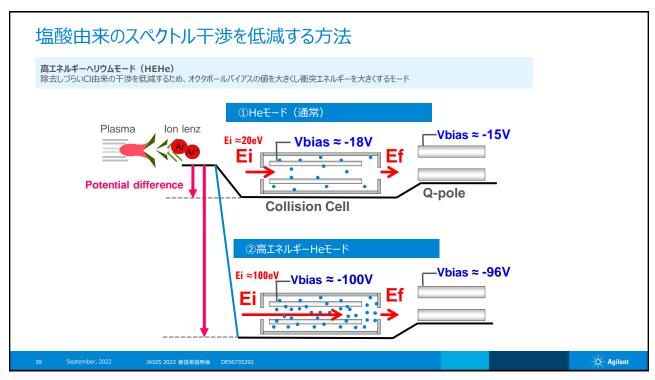
【事例紹介】Hg分析時の最適な溶媒の選択 ICP-MSによる検量線の一例(5 vol% 硝酸+塩酸) As Hg 濃度計算値 濃度計算値 較正誤差 (ug/L) (ug/L 0.0 N/A 0 0.0 N/A 15 15.0 -0.3 29.1 -3.1 30 29.3 -2.3 58.4 -2.6 60 58.3 -2.8 120 117.6 -2.0 150.8 301.4 0.5 相関係数:0.9999 相関係数:0.9999 Pb Cd 較正誤差 (%) 濃度計算個 (ug/L) 0 0 0.0 0.0 N/A N/A 5 4.9 -1.3 5 5.0 -0.2 10 9.8 -2.1 10 10.0 -0.4 20 19.8 -0.9 20 19.8 -0.9 50.1 0.2 相関係数:1.0000 相関係数:1.0000 硝酸と塩酸の混合溶媒中ではHgの直線性が高い Agilent .

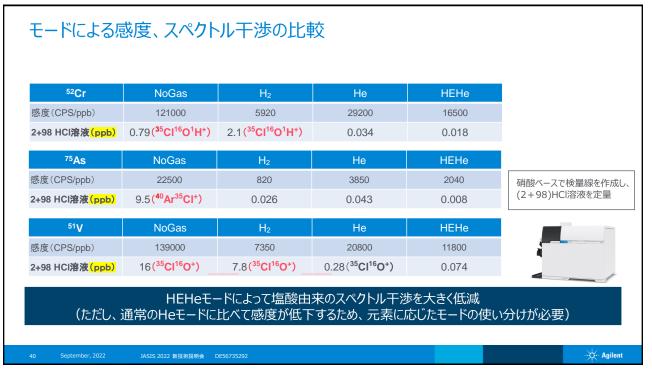














元素分析のポイント まとめ

本日ご紹介した元素分析のポイント

- ① サンプルの分解性に加えて、測定元素も考慮した 前処理・溶媒選択が重要である
- ② 塩酸由来の多原子イオン干渉は 高エネルギーヘリウムによって除去が可能
- ③ 運用を行う際は適切なバリデーションを行うこと



41 September, 2

JASIS 2022 新技術説明会 DE56

DE56735292

Agilent

41

アプリケーションノートの紹介

Agilent 7900 ICP-MS によるプラスチック製点眼薬容器における元素不純物の分析(5994-4340JAJP) https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5994-4340JAJP

Agilent 7900 ICP-MS でのUSP <232>/<233> および ICH Q3D/Q2(RI)プロトコルに準拠した無菌人工涙液点眼薬の元素不純物分析 (5994-1561JAJP)

https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5994-1561JAJP

USP ジェネラルチャプター <232 > / <233 > 草案に従った医薬品成分中の元素不純物測定における Agilent 7700x/7800 ICP-MS の バリデーション (5990-9365JAJP)

https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5990-9365JAJP

元素不純物に関する新たな ICH およびUSP メソッド案:医薬品分析におけるICP-MS および ICP-OES の適用 (5990-9382JAJP) https://www.chem-agilent.com/appnote/applinote.php?pubno=5990-9382JAJP

eptember, 202

SIS 2022 新技術説明会 DE

- Agilent







