

GC/MS/MSを用いたニトロソアミン類の 高感度・高精度分析

北野 理基

ユーザーベネフィット

- ◆ 最新の検出器の搭載により、微量のニトロソアミン類の分析を実現します。
- ◆ MRM測定がマトリックスの影響を取り除き、対象化合物を確実に検出します。
- ◆ 優れた再現性が安定したラボ運営をサポートします。

■はじめに

2018年にバルサルタン原薬において、基準値を超える発がん性物質NDMA (N-nitrosodimethylamine) とNDEA (N-nitrosodiethylamine)が検出されました。その後、原薬に限らず、製剤においてもニトロソアミン類の分析需要が高まっています。

NDMA及びNDEAは、国際がん研究機関 (IARC : International Agency for Research on Cancer) では人に対して恐らく発がん性を有する、グループ 2Aに属しています。ICH M7ガイドライン¹⁾では発がん性を有する不純物管理として、NDMA及びNDEAはM7のクラス 1に相当し、その化合物に特異的な許容限度値以下で管理することが求められています。

GC/MSを用いて分析する場合、NDMA及びNDEAのみならず、他のニトロソアミン類を含めた一斉分析には直接注入法が適しています。本アプリケーションニュースでは、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた5種のニトロソアミン類の一斉分析法とその分析結果についてご紹介します。

■測定試料

・標準試料

以下のニトロソアミンの混合標準試料を、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200 ng/mLとなるようにジクロロメタンを用いて調製しました。

NDMA : N-nitrosodimethylamine
NDEA : N-nitrosodiethylamine
NEIPA : N-nitrosoethylisopropylamine
NDIPA : N-nitrosodiisopropylamine
NDBA : N-nitrosodibutylamine

・原薬試料

原薬は計5種 (API i ~ iii と難溶性の iv ~ v) を準備しました。原薬0.1 gをガラス製の遠心チューブに測り取り、5 mLのジクロロメタンを加えました。その後、1分間ボルテックスし遠心分離 (4000 rpm, 2.5 分) しました。そして、ジクロロメタン層をガラス製シリンジを用いてPTFE フィルタ (0.45 μm) に1 mL 通液させました。

標準試料と強度比較を行うため、この抽出溶液にニトロソアミン類が0.5、5、50 ng/mL (溶液中濃度) となるように標準試料を添加しました。原薬中濃度としては、0.025、0.25、2.5 ppmとなります。

■分析条件

表1 使用装置と分析条件

使用装置	
GCMS:	GCMS-TQ8050 NX
オートサンプラ:	AOC-20i+s Plus
カラム:	SH-I-624Sil MS (30 m x 0.25 mmID, df = 1.4 μm)
インサートライナー:	Split-less Deactivated Liner w/ Low Wool
GC 条件	
気化室温度:	250 °C
注入量:	2 μL
注入モード:	スプリットレス (高圧注入 : 250 kPa, 1.5 min)
キャリアガス制御:	線速度 (39.7 cm/sec)
カラムオープン温度:	50 °C (1 min) → (20 °C/min) → 250 °C (3 min)
MS 条件	
インターフェース温度:	250 °C
イオン源温度:	230 °C
イオン化法:	EI
測定モード:	MRM
測定 m/z:	NDMA 74>44 CE = 6, 74>42 CE = 18 NDEA 102>85 CE = 6, 102>56 CE = 16 NEIPA 116>99 CE = 6, 116>70 CE = 14 NDIPA 130>88 CE = 6, 130>42 CE = 12 NDBA 158>99 CE = 10, 158>141 CE = 4
イベント時間:	0.3 秒
分解能:	Unit - Unit (Q1 - Q3)



図1 GCMS-TQ™8050 NX

■分析結果

・標準試料 (検量線及び再現性)

まず検量線については、全5種のニトロソアミン類において、相関係数Rが0.999以上と良好な結果が得られました (図2)。各検量点にて再現性 (n = 3) も確認しており、全ての検量点において面積%RSDが8%以下という結果が得られました (表2)。0.2 ng/mLから200 ng/mLと広いダイナミックレンジにも関わらず、高感度かつ高精度の分析が可能であることが分かりました。

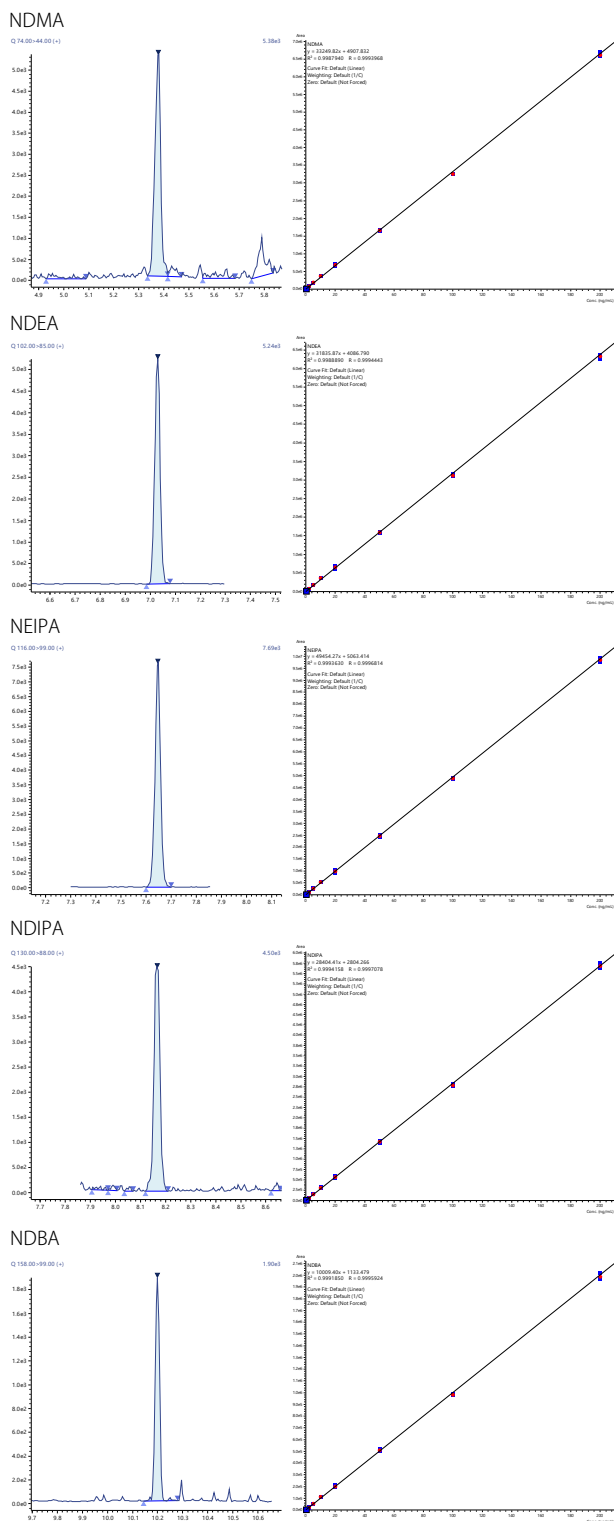


図2 0.2 ng/mL標準試料のクロマトグラムおよび検量線

表2 標準試料での繰り返し面積再現性 (%RSD)

標準試料濃度	NDMA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NDBA
0.2 ng/mL	0.4	6.3	3.4	6.7	7.9
0.5 ng/mL	2.4	0.8	2.1	1.6	4.6
1 ng/mL	1.1	2.3	2.3	4.2	1.7
2 ng/mL	1.3	4.5	0.8	1.7	2.9
5 ng/mL	1.6	0.8	1.2	1.5	2.2
10 ng/mL	1.2	0.9	1.2	1.6	1.2
20 ng/mL	2.4	5.8	5.4	4.7	3.9
50 ng/mL	1.7	1.5	1.6	1.9	1.1
100 ng/mL	0.3	1.2	0.7	1.0	0.7
200 ng/mL	1.0	0.8	0.7	0.9	1.3

• 原薬抽出溶液（分離および再現性）

原薬由来のマトリックスによるイオンサプレッションやベースラインへの影響を確認するために、各原薬抽出溶液にニトロソアミン類を0.5、5、50 ng/mL（溶液中濃度）となるように添加した試料と標準試料の信号強度を比較しました。図3に、0.5 ng/mL試料におけるクロマトグラムの比較を示します。

面積比（添加試料/標準試料）は、75~106%と良好な値を示し、マトリックスの影響が少ないことがわかりました（表3）。併せて面積再現性（%RSD, n=3）を確認したところ、全て10%以下となり、安定した微量分析が可能であることが示されました（表4）。

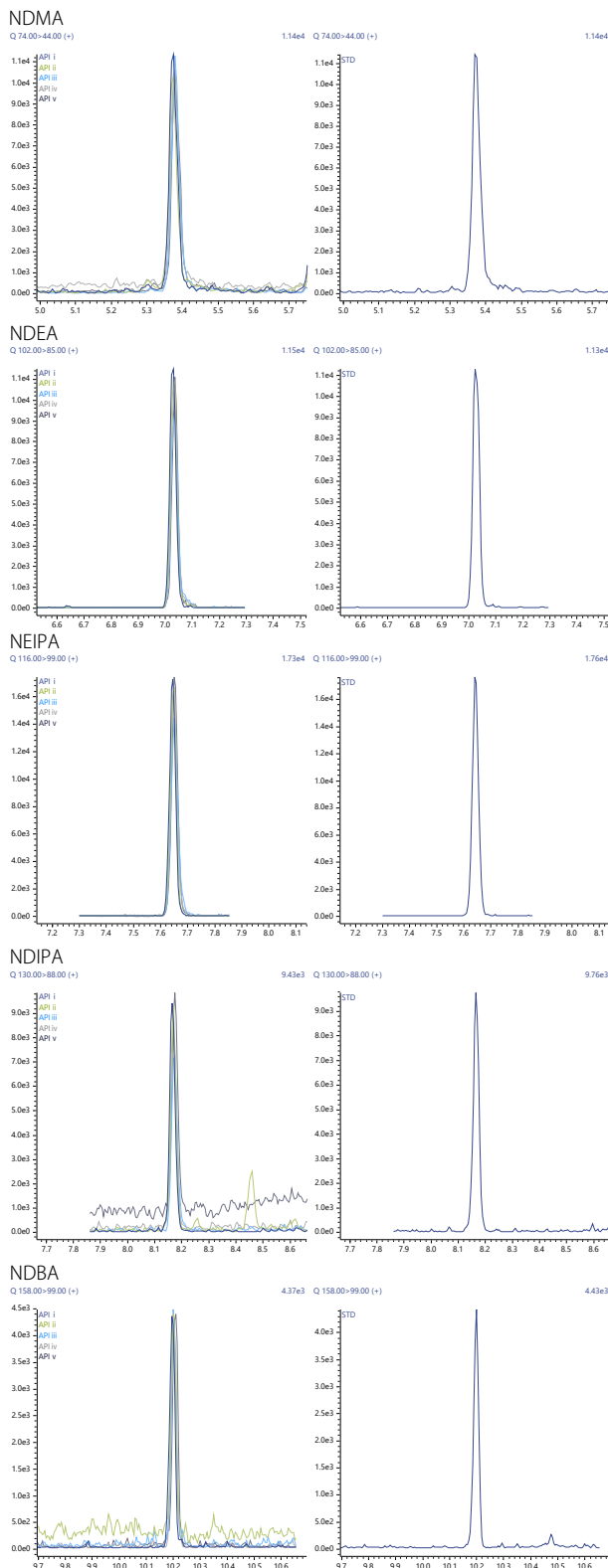


図3 0.5 ng/mL添加試料（左）と標準試料（右）のクロマトグラム

表3 添加試料と標準試料の面積比 (%)

	溶液中濃度	原薬中濃度	NDMA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NDBA
API i	0.5 ng/mL	0.025 ppm	94	94	94	96	102
	5 ng/mL	0.25 ppm	85	88	90	85	97
	50 ng/mL	2.5 ppm	91	94	95	86	97
API ii	0.5 ng/mL	0.025 ppm	102	94	97	95	101
	5 ng/mL	0.25 ppm	90	90	96	87	101
	50 ng/mL	2.5 ppm	94	95	98	88	105
API iii	0.5 ng/mL	0.025 ppm	91	91	90	84	98
	5 ng/mL	0.25 ppm	88	89	89	77	95
	50 ng/mL	2.5 ppm	94	91	89	75	93
API iv	0.5 ng/mL	0.025 ppm	96	93	100	95	105
	5 ng/mL	0.25 ppm	90	87	93	84	101
	50 ng/mL	2.5 ppm	94	90	94	81	100
API v	0.5 ng/mL	0.025 ppm	87	91	100	104	106
	5 ng/mL	0.25 ppm	79	82	90	84	95
	50 ng/mL	2.5 ppm	85	83	90	80	98

表4 添加試料の繰り返し面積再現性 (%RSD)

	溶液中濃度	原薬中濃度	NDMA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NDBA
API i	0.5 ng/mL	0.025 ppm	4.8	5.7	3.4	3.9	5.8
	5 ng/mL	0.25 ppm	4.2	0.6	2.0	0.6	4.8
	50 ng/mL	2.5 ppm	0.8	0.6	0.2	0.4	0.6
API ii	0.5 ng/mL	0.025 ppm	4.2	3.1	9.4	4.5	4.1
	5 ng/mL	0.25 ppm	0.5	1.0	0.7	2.2	1.9
	50 ng/mL	2.5 ppm	1.5	2.1	2.4	2.7	1.2
API iii	0.5 ng/mL	0.025 ppm	7.6	3.0	3.9	3.3	3.3
	5 ng/mL	0.25 ppm	1.4	0.2	0.7	2.1	3.8
	50 ng/mL	2.5 ppm	1.1	0.5	1.3	2.1	1.7
API iv	0.5 ng/mL	0.025 ppm	1.7	3.5	2.3	7.3	2.1
	5 ng/mL	0.25 ppm	1.4	2.0	1.1	2.5	2.4
	50 ng/mL	2.5 ppm	7.0	7.9	8.6	9.5	7.9
API v	0.5 ng/mL	0.025 ppm	6.8	2.8	1.3	1.2	2.1
	5 ng/mL	0.25 ppm	2.1	1.5	0.8	0.8	0.6
	50 ng/mL	2.5 ppm	0.7	0.8	0.7	0.6	0.3

■まとめ

GCMS-TQ8050 NXを用いることで、広いダイナミックレンジにおいても高い直線性を示し、再現性も良好であることが分かりました。更に、マトリックスの影響を受けることなく、高精度の定量分析が可能であることが示されました。

ニトロソアミン類の中には、高極性で揮発性の乏しい成分も存在します。それらを測定する際には、高速液体クロマトグラフ質量分析計LC/MS/MSが適しています。LC/MS/MSを用いたニトロソアミン類の分析例をアプリケーションニュース「トリプル四重極LC/MS/MSを用いたニトロソアミン類の高感度定量分析 (01-00188-JP)」にて紹介していますので参照ください。

<参考文献>

- 1) International Council for Harmonisation M7 (R1), Addendum: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk

GCMS-TQは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00242-JP 初版発行：2021年10月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員情報サービス Shim-Solutions Club に登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021