

トリプル四重極質量分析計を用いた 原薬中ニトロソアミン10成分の一斉分析

川嶋 美帆、久保田 諒

ユーザーベネフィット

- ◆ 日米欧各地域で求められる、ニトロソアミン類の混入リスク評価の管理基準に対応することができます。
- ◆ 原薬中においてもニトロソアミン類の安定した定量分析が可能です。

■はじめに

ニトロソアミン類は強い遺伝毒性を示し、国際がん研究機関(IARC)により、NDMAやNDEAはグループ2A（ヒトに対しておそらく発がん性がある）に分類されています。医薬品中の変異原性不純物の評価および管理を定めるICH M7は、N-ニトロ化合物を極めて強い発がん性を示す可能性がある（cohort of concern）としており¹⁾、化合物特異的な許容限度値以下で管理することが必要です。各国規制当局から許容摂取量が示された既知のニトロソアミン類の数は拡大傾向にあり、より多くのニトロソアミンを測定する手法が求められています。

本稿では、米国食品医薬品局(FDA)または欧州医薬品庁(EMA)で規制されているニトロソアミン類9成分に、ヨーロッパ薬局方(Ph. Eur.)で規制されているN-Nitrosodi-n-propylamine (NDPA)を加えた10成分を、トリプル四重極質量分析計LCMS-8060NXで一斉分析した例をご紹介します。

■測定試料

標準試料

市販の標準品をメタノールで溶解・混合し、混合標準原液を調製しました。これを超純水/メタノール=9：1で段階希釈し、0.1~25 ng/mLで検量線用標準試料を調製しました。

原薬

原薬（API i）の前処理は、台湾衛生福利部食品薬品管理署(TFDA : Taiwan Food and Drug Administration)の手法²⁾を参考に実施しました。ただし、内部標準物質は使用せず外部標準法で評価し、抽出時間等に変更を加えました。前処理のワークフローを表1に示しました。（原薬抽出濃度 50 mg/mL）

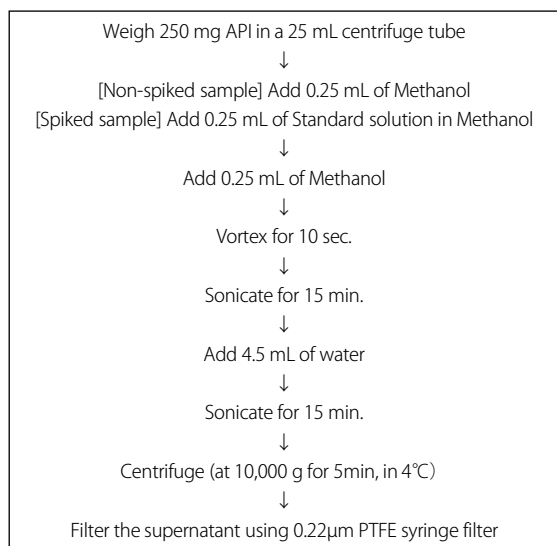


図1 前処理のワークフロー

■分析条件

分析条件を表1および表2に示しました。質量分析計はLCMS-8060NXを使用し、イオン化ユニットにはAPCIプローブを使用しました。

表1 LCMS分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X3)	
Column	: Shim-pack Velox™ Biphenyl ¹⁾ (100mmL. x 2.1mmL.D., 2.7µm)
Mobile phases	: A) H ₂ O/Formic acid=1000 : 0.5 B) Methanol/Formic acid=1000 : 0.5
Gradient Program	: B conc. 1.0% (0.00-1.20 min) – 35.0% (2.00 min) – 60.0% (5.30-7.00 min) – 98.0% (7.01-10.00 min) – 1.0% (10.01-14.00 min) Valve position : loading (0 min) - analysis (0.25 min) - loading (4.65 min) - analysis (4.9 min) - loading (7.0 min)
Flow rate	: 0.60 mL/min
Column Temp.	: 45°C
Injection volume	: 20 µL
Detection	: 254 nm (SPD-M40, Semi micro cell)
[MS conditions] (LCMS-8060NX ²⁾	
Ionization	: APCI (Positive mode)
Probe Voltage	: 4.0 kV
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 4.0 L/min
Drying gas flow	: 3 L/min
DL Temp.	: 150°C
Heat Block Temp.	: 200°C
Interface Temp.	: 300°C

¹⁾ P/N: 227-32015-03

²⁾ 窒素ガスラインに炭化水素フィルタを使用 (P/N: 225-42793-01)

表2 MS/MSパラメータ

Compound	Polarity	Precursor ion m/z	Product ion m/z	Collision Energy (V)
MeNP	+	130.1	58.0	-21
		130.1	100.1	-11
NDMA	+	75.1	42.9	-16
		75.1	57.6	-15
NMOR	+	117.1	87.2	-12
		117.1	73.1	-13
NMBA	+	147.1	43.6	-16
		147.1	116.4	-10
NDEA	+	103.1	29.1	-14
		103.1	74.8	-12
NEIPA	+	117.1	75.2	-10
		117.1	43.0	-16
NDIPA	+	131.1	43.1	-13
		131.1	89.2	-11
NDPA	+	131.1	89.2	-10
		131.1	43.1	-15
NMPA	+	137.1	66.1	-21
		137.1	107.1	-16
NDBA	+	159.1	57.2	-14
		159.1	41.2	-22

■ 標準試料の分析結果

調製した検量線用標準試料を6回繰り返し分析し、直線性および繰り返し再現性を確認しました。

代表的なクロマトグラムとして、10 ng/mLの分析結果を図2に示しました。また、外部標準法により作成した検量線を図3に、検量線範囲および相関係数(R)を表3にまとめました。全成分において、相関係数(R)>0.99の良好な直線性が得られました。

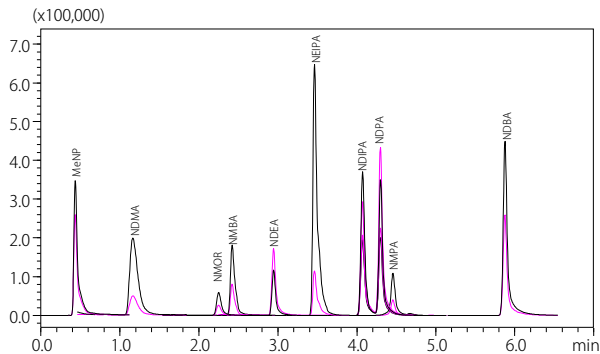


図2 10 ng/mL標準試料のクロマトグラム

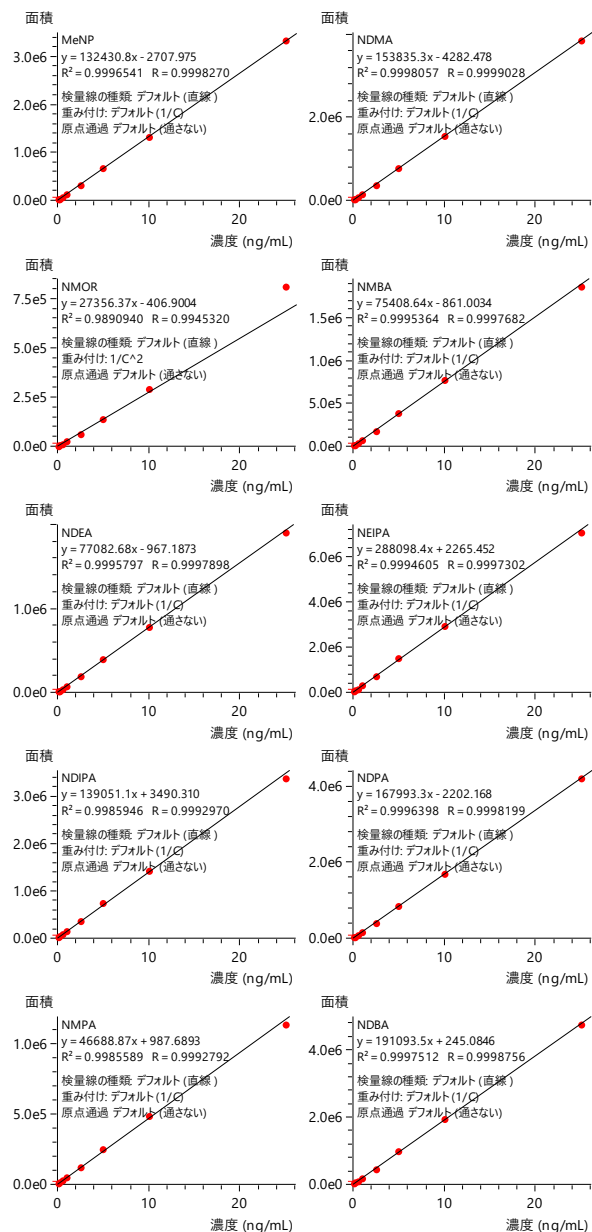


図3 検量線

表3 検量線範囲と相関係数(R)

Compound	Calibration curve (ng/mL)	Correlation coefficient (R)
MeNP	0.1 - 25	0.999
NDMA	0.1 - 25	0.999
NMOR	0.1 - 25	0.994
NMBA	0.1 - 25	0.999
NDEA	0.1 - 25	0.999
NEIPA	0.1 - 25	0.999
NDIPA	0.1 - 25	0.999
NDPA	0.1 - 25	0.999
NMPA	0.1 - 25	0.999
NDBA	0.1 - 25	0.999

※検量線の重みづけは、NMOR以外は1/C、NMORは1/C²としました。

0.1 ng/mLにおける6回繰り返し分析の再現性(濃度%RSD)および正確さを表4に示しました。全成分で正確さは80-120%の範囲に、繰り返し再現性は10%以内に収まりました。

表4 再現性(濃度%RSD)および正確さ平均値

Compound	Concentration (ng/mL)	Repeatability (Conc.%RSD, n=6)	Accuracy (Average, n=6)
MeNP	0.1	7.7	110.5
NDMA	0.1	6.9	109.3
NMOR	0.1	9.6	104.3
NMBA	0.1	6.4	105.2
NDEA	0.1	8.3	104.7
NEIPA	0.1	4.0	97.0
NDIPA	0.1	7.1	85.8
NDPA	0.1	3.3	109.4
NMPA	0.1	7.8	83.7
NDBA	0.1	7.2	101.5

■ 原薬中での分析結果

原薬(API i)に対して0.01 ppm, 0.02 ppm, 0.1 ppmの濃度になるようニトロソアミンを添加し、添加回収試験を行いました。0.1 ppm添加試料のPDAおよびMSによるクロマトグラムを図4に示しました。本分析条件により、API iと各ニトロソアミンが十分に分離していることが確認できました。

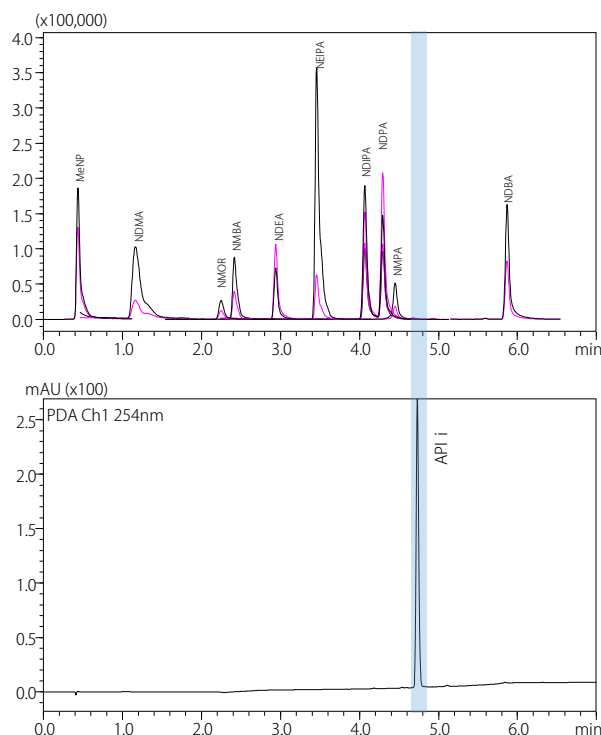
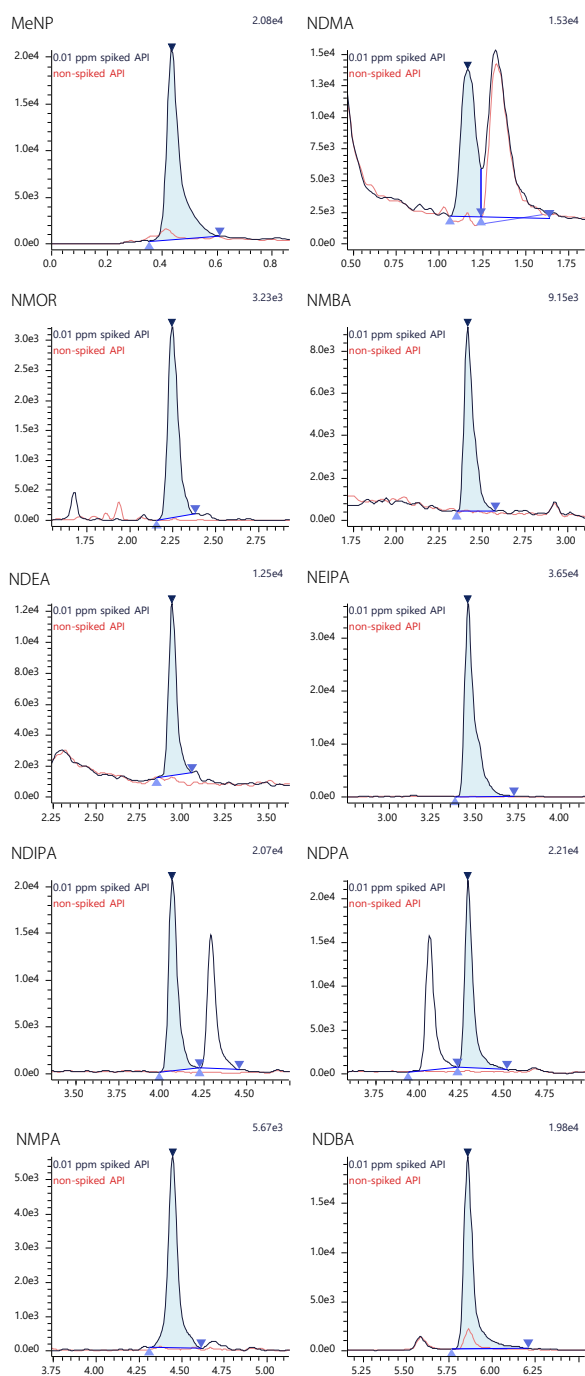


図4 0.1 ppm添加試料のクロマトグラム

原薬抽出試料と0.01 ppm添加試料の各成分のクロマトグラム重ね描きを図5に示しました。NDMAのMRMトランジションからは原薬由来のピークが確認されましたが、Shim-pack Velox Biphenylカラムにより分離可能でした。NDMAと原薬由来のピークは、垂直分離しNDMAを同定・定量しました。



黒：0.01 ppm添加 原薬抽出試料
赤：添加なし 原薬抽出試料

図5 原薬抽出試料と0.01 ppm添加試料のクロマトグラム(MRM)

各濃度における添加回収試験の結果を表5、6にまとめました。NDBA以外は、添加回収率が±15%以内の良好な結果が得られました。NDBAについては70%台となり、回収率を上げるためには前処理のさらなる検討が必要です。

LCMS、NexeraおよびShim-pack Veloxは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

また原薬中サンプルにおいても、全成分・全濃度において10%以下と優れた繰り返し再現性が得られました。

表5 添加回収率のまとめ

Compound	0.5 ng/mL (in vial) 0.01 ppm (in API)	1 ng/mL (in vial) 0.02 ppm (in API)	5 ng/mL (in vial) 0.1 ppm (in API)
MeNP	105.0	104.2	104.4
NDMA	96.0	95.3	92.0
NMOR	93.6	94.5	98.7
NMBA	92.0	95.6	98.6
NDEA	102.5	101.3	100.6
NEIPA	98.4	101.3	100.1
NDIPA	96.8	98.9	99.2
NDPA	90.9	90.0	91.3
NMPA	91.6	92.3	89.0
NDBA	77.0	73.4	70.9

表6 添加回収試験における再現性のまとめ (n=6, 濃度%RSD)

Compound	0.5 ng/mL (in vial) 0.01 ppm (in API)	1 ng/mL (in vial) 0.02 ppm (in API)	5 ng/mL (in vial) 0.1 ppm (in API)
MeNP	3.0	2.1	3.0
NDMA	1.8	2.2	2.1
NMOR	6.2	5.6	4.0
NMBA	4.5	3.7	1.6
NDEA	7.2	8.7	6.7
NEIPA	6.6	4.6	6.0
NDIPA	7.6	4.4	6.6
NDPA	6.6	5.4	5.8
NMPA	3.8	6.5	4.9
NDBA	5.6	2.8	2.7

■ まとめ

- トリプル四重極質量分析計LCMS-8060NXを使用して、原薬中ニトロソアミン10成分の定量法を開発しました。
- 試料溶液中 0.1 ng/L-25 ng/mL (原薬中0.002 ppm-0.5 ppm相当) の範囲で、相関係数R>0.99の良好な直線性が得られました。
- 0.1 ng/mLにおいて正確さは80-120%、再現性は10%以内となり、微量なニトロソアミンの定量分析にも対応します。
- 本分析法にて、測定対象としたニトロソアミン10成分全てを原薬 API i 中 0.03ppm以下で定量可能であることが確認されました。

■ 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
- 2) Method of Test for Nitrosamines in Medicines - Multiple Analysis (LC-MS/MS Method) (RA011004.002) <https://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.aspx?id=f637417502730979011> (2022年5月15日参照)

※使用環境等の違いにより結果は異なります。
掲載のデータは一例であり、結果を保証するものではありません。