

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

川嶋 美帆

ユーザーベネフィット

- ◆ 高感度分析により、ニトロソアミン類に求められる厳しい混入リスク評価に寄与します。
- ◆ LC/MS/MSならではの幅広い検量線範囲と優れた直線性により、正確な定量が可能です。

■はじめに

ニトロソアミン類のうち、NDMAおよびNDEAは、国際がん研究機関 (IARC) の分類によると、グループ2A (ヒトでおそらく発がん性を示す) とされます。ICH M7ガイドライン¹⁾の不純物管理としては、クラス1に相当し、化合物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。

米国食品医薬品局 (FDA) および欧州医薬品庁 (EMA) から公開されているニトロソアミン類の分析法の一つとして、LC/MS/MS法があります。本稿では、NDMAおよびNDEAを含む6成分のニトロソアミン類について、LC/MS/MS法による高感度分析を行った例をご紹介します。

■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 (図1) 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 Scepter™ C18-120*1 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
Mobile phases	: A) 0.05 % formic acid in H ₂ O B) 0.05 % formic acid in Methanol
Gradient Program	: B conc. 1.0 % (0.00-1.50 min) – 40.0 % (2.50 min) – 80.0 % (7.00-8.50 min) – 1.0 % (8.51-12.50 min)
Flow rate	: 0.40 mL/min
Column Temp.	: 45 °C
Injection volume	: 10 μL
[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 : 227-31011-05

*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)



図1 LCMS™-8060NXの外観図

表2 MS/MSパラメータ

Compound	Ret. Time (min)	Precursor ion m/z	Product ion m/z	Collision Energy (V)
NDMA	1.968	75.05	43.0	-17.0
		75.05	58.1	-12.0
NMBA	3.361	147.05	43.4	-16.0
		147.05	116.9	-11.0
NDEA	4.053	103.10	28.8	-16.0
		103.10	74.7	-13.0
NEIPA	4.637	117.10	75.0	-12.0
		117.10	43.1	-21.0
NDIPA	5.269	131.10	43.0	-15.0
		131.10	88.9	-9.0
NDBA	7.121	159.10	57.0	-13.0
		159.10	41.2	-23.0

■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のものを図2に示しました。また、定量下限値付近のクロマトグラムおよび外部標準法により作成した検量線を図3に、検量線範囲および寄与率 (R²) を表3にまとめました。

全成分において、寄与率 (R²) が0.998以上の良好な直線性が得られました。

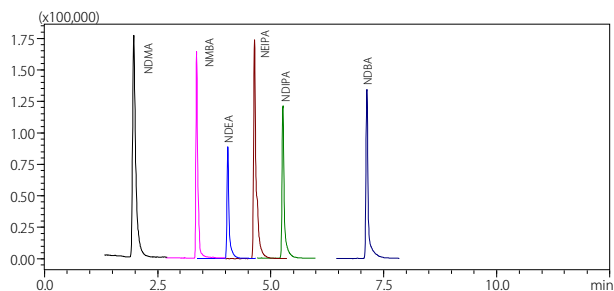


図2 10 ng/mL標準試料のクロマトグラム

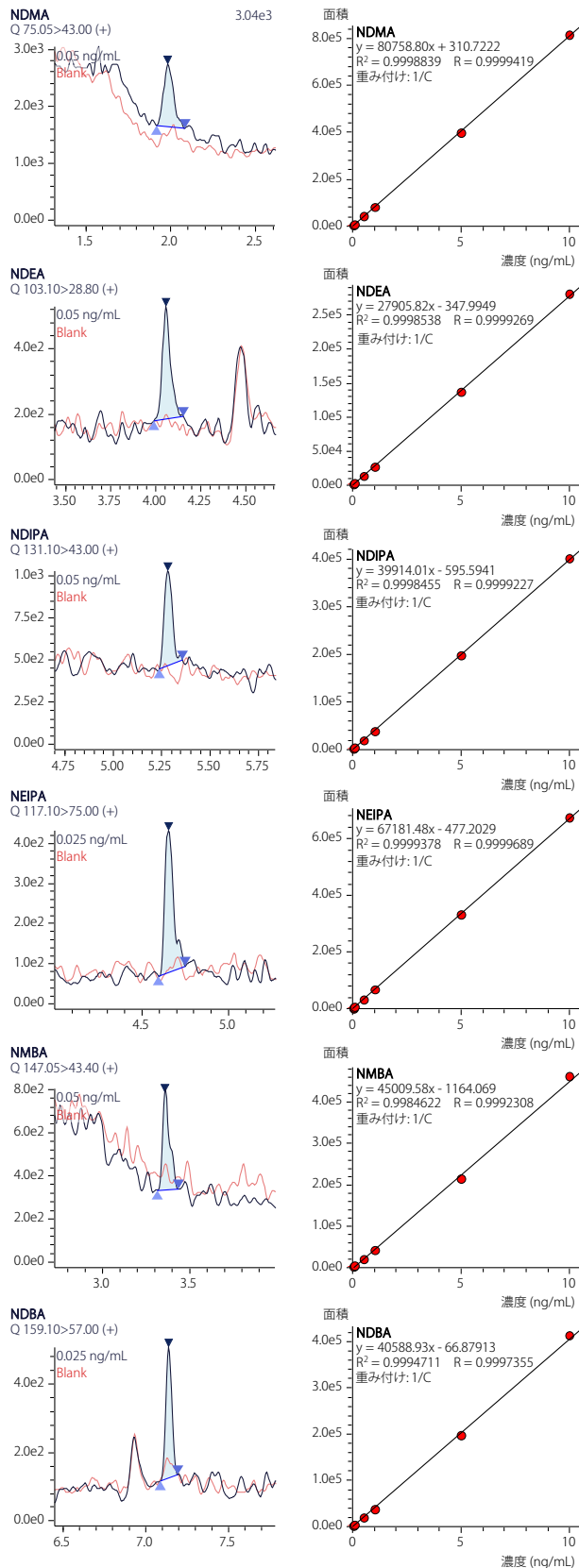


図3 定量下限値付近のクロマトグラムおよび検量線

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。
LCMS、Nexera、およびShim-pack Scepter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。

表3 検量線範囲と寄与率 (R²)

Compound	Calibration curve (ng/mL)	Contribution ratio (R ²)
NDMA	0.05 - 10	0.999
NDEA	0.05 - 10	0.999
NDIPA	0.05 - 10	0.999
NEIPA	0.025 - 10	0.999
NMBA	0.05 - 10	0.998
NDBA	0.025 - 10	0.999

■ 再現性および正確さ

6回繰り返し分析における検量点最低濃度の再現性（濃度%RSD）および正確さを表4に示しました。

全成分で再現性10%以下かつ正確さ102.0~114.5%となり、定量下限として十分な信頼性を有することが示されました。

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)
NDMA	0.05	4.99	106.1
NDEA	0.05	2.17	102.0
NDIPA	0.05	5.30	108.5
NEIPA	0.025	3.48	104.7
NMBA	0.05	3.70	114.5
NDBA	0.025	6.49	107.4

■ まとめ

- 測定対象としたニトロソアミン6成分全てについて、注入量10 μLで定量下限0.05 ng/mL以下の測定が可能であることが確認されました。
- 検量線の寄与率 (R²) は全成分で0.998以上となり、優れた直線性を示しました。

<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