

質量分析計を活用した医薬品中のニトロソアミン不純物の分析（第3報）

米田 哲也, 高山 信幸, 小笠原 勝, 薬事研究会分析部会

An LC-MS/MS Method for Quantitative Determination of ten nitrosoamines in pharmaceutical compounds.

Tetsuya YONEDA, Nobuyuki TAKAYAMA, Masaru OGASAWARA,
The Chemical Analysis Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

ニトロソアミン類は、高い発がん性を有すると考えられている。近年、医薬品中に許容摂取限度量以上のニトロソアミン類が検出される事例が相次ぎ、世界中で医薬品の自主回収が行われた。医薬品中のニトロソアミン類の定量分析方法を確立することは、医薬品の安全性を確保するために非常に重要である。

本研究では、LC-MS/MSを用いて10種類のニトロソアミン類の一斉分析法の構築を目指し検討を行った。その結果、0.5～10 ng/mLの濃度範囲において、決定係数 (R^2) > 0.998の良好な直線性が得られた。また、12種類の医薬品関連化合物について、ニトロソアミン類が検出されないか分析を行った。本分析においては、規制対象のニトロソアミン類は検出されなかった。

Summary

Nitrosoamines are considered to have high carcinogenic potency, and several medications have been subject to recall worldwide due to the presence of these impurities. To ensure the safety of pharmaceutical products, it is important to establish an analytical method for the quantitative detection of nitrosoamines.

In this study, an LC-MS/MS method was validated for the quantitative detection of ten nitrosoamines. Good linearity with a correlation coefficient (R^2) > 0.998 was achieved at the concentration range of 0.5–10 ng/mL.

By this method, we analyzed twelve kinds of commercially available chemical reagents, which are also used for pharmaceutical compounds, but nitrosamines were not detected.

キーワード： 医薬品, ニトロソアミン, 液体クロマトグラフ質量分析計

Key words : drug, Nitrosoamine, Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry

緒 言

ニトロソアミン類はアミンにニトロソ基をもつ化合物の総称であり、古くから発がん性を有していることが知られている¹⁾。医薬品中の変異原性不純物の評価及び管理を定めたICH-M7では、クラス1（既知の変異原性発がん物質）に分類されている²⁾。

2018年6月にバルサルタン原薬において、ニトロソアミン類の1種であるN-ニトロソジメチルアミン（以下NDMA）が検出されたことを皮切りに、ラニチジンやメトホルミンなど様々な製剤からもニトロソアミン類が検出され、世界的に医薬品の回収が行われた³⁻¹¹⁾。現在、ニトロソアミン類は製剤中に混入しないように厳格な管理が求められており、その許容摂取量は、令和3年10月8日付の厚労省からの通知で表1のとおり示されている¹²⁾。

昨年度は、当センターのLC-MS/MSを用いて、6種類のニトロソアミン類（NDMA, NDEA, NMBA,

NDBA, NEIPA, NDIPA）の一斉分析の分析条件の構築を行った¹³⁾。今年度は、昨年度構築した方法に4種類のニトロソアミン類（NMPA, MeNP, NMOR, NDPA）を追加し、10種類のニトロソアミン類の一斉分析法の検討を行った。さらに、12種類の医薬品関連化合物について、ニトロソアミン類が含まれていないか分析を行ったので、以下にその内容を報告する。

表1. ニトロソアミン類の一日当たりの許容摂取量

ニトロソアミン類	許容摂取量 (ng/日)
NDMA	96.0
NDEA	26.5
NMBA	96.0
NMPA	34.3
NEIPA	26.5
NDIPA	26.5
MeNP	26.5
NDBA	26.5
NMOR	127

試験方法及び結果

① ニトロソアミン類の分析条件の最適化 (MRM条件の最適化)

ニトロソアミン類の分析を行う上で最適なMRM条件の検討(最適な「cone」及び「collision energy」の決定)を行った。「cone」及び「collision energy」の値を変更し、より感度が高く分析できる値の組み合わせを決定した。

組み合わせの決定方法は、検出されたニトロソアミン類のピーク高さが最も大きいものが感度がよいと考え、ピーク高さが最も高くなる「cone」及び「collision energy」の組み合わせとした。また、今回一斉分析の対象とするニトロソアミン類は、日本やEMAが規制している9種類にNDPAを追加して計10種類とした。

ニトロソアミン類の標準品

10種ニトロアミン類混合標準液(2 µg/mL Methanol Solution)【富士フイルム和光純薬】

標準溶液の調製

10種ニトロアミン類混合標準液(2 µg/mL)を1 mLと精製水1 mLを混合し標準原液を作成(1 µg/mL)。この標準原液を精製水で希釈し、標準溶液を調製した。

今回構築した分析条件は下記のとおり、図1のように10種類のニトロソアミン類すべてが分離することを確認した。

LC-MS/MS分析条件

LC条件

装置：ACQUITY UPLC H-Class PLUS システム
カラム：ACQUITY UPLC HSS T 3, 1.8 µm, 3.0 × 100 mm
カラム温度：40 °C
注入量：10 µL
流量：0.5 mL/min
移動相A：0.1 %ギ酸水溶液
移動相B：0.1 %ギ酸メタノール
グラジエント条件：
0~0.5分 (A) 95 % (B) 5 %
0.5~10分 (A) 95 % → 5 % (B) 5 % → 95 %

MS条件

装置：Xevo TQ-XSタンデム四重極型質量分析計
イオン化モード：APCI
Voltages
mode : current
corona : 1.0 [uA]
cone : 25 [V]
Gas Flow
desolvation : 800 [L/hr]
cone : 150 [L/hr]
nebulizer : 4.0 [Bar]
APCI probe temp : 450°C

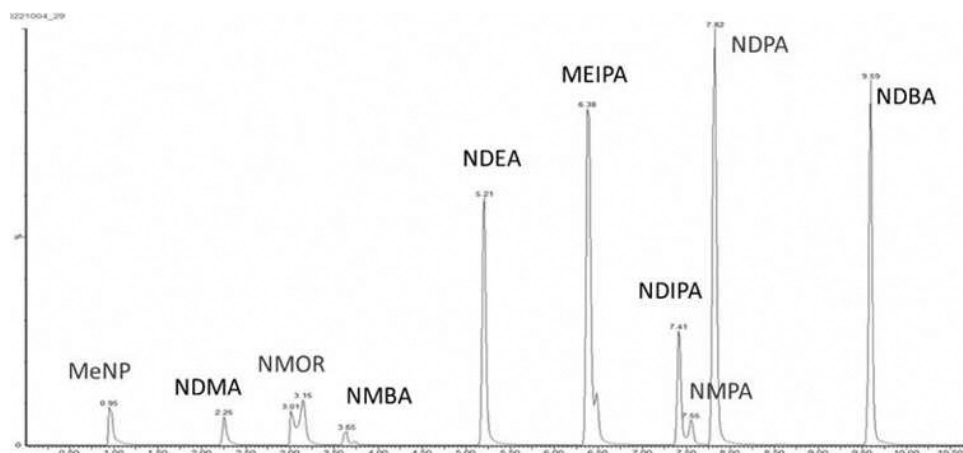


図1. ニトロソアミン類(10種類)のTICクロマトグラム

表2. MRM条件

sample	R.T (min)	m/z		Cone (V)	Collision (eV)
MeNP	1.0	130.1	57.7	10	15
NDMA	2.2	75.1	58.0	30	10
NMOR	3.1	117.1	86.3	30	10
NMBA	3.6	147.1	117.1	10	5
NDEA	5.1	103.2	74.9	30	10
NEIPA	6.3	117.2	74.9	20	10
NDIPA	7.3	131.2	89.1	20	20
NMPA	7.5	137.1	66.1	30	10
NDPA	7.8	131.1	89.2	30	10
NDBA	9.5	159.2	57.1	30	10

② 直線性の確認

10種ニトロアミン類混合標準液を5点(0.5, 1, 2.5, 5, 10 ng/mL)調製し, 分析条件の直線性を確認した。

表3. ニトロソアミン類(10種類)の直線性(0.5 ng/mL ~ 10 ng/mL)

sample	決定係数
MeNP	$R^2 = 1.0000$
NDMA	$R^2 = 0.9986$
NMOR	$R^2 = 0.9995$
NMBA	$R^2 = 0.9985$
NDEA	$R^2 = 1.0000$
NEIPA	$R^2 = 0.9999$
NDIPA	$R^2 = 1.0000$
NMPA	$R^2 = 0.9999$
NDPA	$R^2 = 0.9998$
NDBA	$R^2 = 0.9999$

結果

0.5~10 ng/mLの濃度の10種類のニトロソアミン標準溶液において, すべての成分で決定係数 $R^2 = 0.998$ 以上の良好な直線性が得られた(表3)。従って, 0.5~10 ng/mLの濃度において10種類のニトロソアミンは, 一斉分析により定量が可能である。

③ 医薬品関連化合物についての分析

分析部会の参加者へ今回構築した上記の分析条件を用いて, 分析を検討したい医薬品関連化合物のアンケートを行った。その結果をもとに, 試薬として購入が可能である医薬品関連化合物12種類を選び(表4), ニトロソアミン類が含まれていないか検討を行った。

表4. 分析を行った医薬品関連化合物一覧

化合物名(純度)	
No.1	メトホルミン (>98.0%)
No.2	イルベサルタン (>98.0%)
No.3	クロルヘキシジン二塩酸塩 (>96.0%)
No.4	エバスチン (>98.0%)
No.5	レボセチリジン (>98.0%)
No.6	フェキソフェナジン塩酸塩 (>98.0%)
No.7	カルピノキサミン (>98.0%)
No.8	クロルフェニラミンマレイン酸塩 (>99.0%)
No.9	トリメプチンマレイン酸塩 (>98.0%)
No.10	トロキシピド (>98.0%)
No.11	ヒドロキシプロピルセルロース
No.12	ヒドロキシエチルセルロース

試料調製方法①

試料を約 300 mg量り, メタノール 1 mL, 精製水 9 mLを入れ, 超音波処理を30分行う。この液を, エッペンチューブに入れて, 12,000 rpmで遠心分離を行う。この上清をフィルターろ過し, 試料溶液とした(30 mg/mL)。

No.11(ヒドロキシプロピルセルロース)及びNo.12(ヒドロキシエチルセルロース)については, 精製水を加えるとゲル状に固まる性質がみられた。従って, 試料からニトロソアミン類を抽出することが困難であったため, 下記の調製方法②に変更した。

試料調製方法②

試料約 1.5 g を量り, メタノール10 mLを入れ, 超音波処理を30分行う。この液を 4,000 rpmで遠心分離を行う。この上清 1 mLを正確に量り, 精製水 9 mLを入れて希釈。この液をフィルターろ過し, 試料溶液とした(15 mg/mL)。

本分析では, 測定対象の試料濃度(15及び30 mg/mL)と試料に含まれる可能性があるニトロソアミン類の濃度(数ng/mL)が大きく異なることから, 事前にHPLCを用いて溶出時間の確認を行った。その結果をもとに, 試料溶液中の主成分とニトロソアミン類の溶出時間が近いものについては, 質量分析計の感度に影響を与えることから, 分析は行わなかった(表5, 表6)。

表5. ニトロソアミン類と医薬品関連化合物の溶出時間

	MeNP	NDMA	NMOR	NMBA	NDEA	NIPEA	NDIPA	NMPA	NDPA	NDBA
1	1.06	2.2	3.0	3.6	5.1	6.3	7.3	7.5	7.8	9.5
2	0.95	2.2	3.0	3.6	5.1	6.3	7.3	7.5	7.8	9.2
3	0.95	2.2	3.0	3.6	5.1	6.3	7.0			9.5
4	0.95	2.2	3.0	3.6	5.1	6.3	7.3	7.5	7.8	9.6
5	0.95	2.2	3.0	3.6	5.1	6.3	7.3	7.5	7.8	8.7
6	0.95	2.2	3.0	3.6	5.1	6.3	7.3			9.5
7	0.95	2.2	3.0	3.6	5.4		7.3	7.5	7.8	9.5
8	0.95	2.2	3.0	3.6	5.4		7.3	7.5	7.8	9.5
9	0.95	2.2	3.0	3.6	5.1	6.3	6.8			9.5
10	0.95	2.2	3.0	3.6	4.4	6.3	7.3	7.5	7.8	9.5
11	0.95	2.2	3.0	3.6	5.1	6.3	7.3	7.5	7.8	9.5
12	0.95	2.2	3.0	3.6	5.1	6.3	7.3	7.5	7.8	9.5

表6. 分析を行ったニトロソアミン類一覧 (○：測定可，×：測定不可)

	MeNP	NDMA	NMOR	NMBA	NDEA	NIPEA	NDIPA	NMPA	NDPA	NDBA	測定を行ったニトロソアミンの数
1	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	9
2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	9
3	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	7
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	9
5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	9
6	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	7
7	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○	8
8	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○	8
9	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	7
10	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	9
11	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10
12	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10

結果

10種類のニトロソアミン類を一斉分析できたのは、No.11, No.12であった。しかしながら、少なくとも7種類のニトロソアミン類について、一斉分析が可能であった。分析の結果、今回測定を行った12種類の医薬品関連化合物からは、規制対象のニトロソアミン類は検出されなかった。

まとめ

当センターのLC-MS/MSを用いて、10種類のニトロソアミン類の一斉分析方法の検討を行った。その結果、良好な直線性 (0.5~10 ng/mL) が得られ10種類のニトロソアミン類の一斉分析が可能となった。さらに分析部会の参加者からアンケートを行い、12種類の医薬

品関連化合物を選定し、今回構築した分析条件で分析を行った。本分析においては、規制対象のニトロソアミン類は検出されなかった。

参考文献

- 1) <https://www.uspharmacist.com/article/fda-update-on-recent-voluntary-arb-drug-recalls>.
- 2) ICH M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, International Conference on Harmonization, March 2018.
- 3) <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-reviewing-medicines-containing-valsartan>

- zhejiang-huahai-following-detection-impurity.
- 4) <https://www.mhlw.go.jp/content/11126000/000308146.pdf>
 - 5) <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announces-voluntary-recall-several-medicines-containing-valsartan-following-detection-impurity>.
 - 6) <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/statement-new-testing-results-including-low-levels-impurities-ranitidine-drugs>.
 - 7) https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/ranitidine-article-31-referralema-review-ranitidine-medicines-following-detection-ndma_en.pdf
 - 8) <https://www.pmda.go.jp/files/000231528.pdf>
 - 9) <https://www.hsa.gov.sg/announcements/news/hsa-recalls-three-out-of-46-metformin-medicines>
 - 10) <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-alerts-patients-and-health-care-professionals-nitrosamine-impurity-findings-certain-metformin>.
 - 11) <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-update-metformin-diabetes-medicines>.
 - 12) 「医薬品におけるニトロソアミン類の混入リスクに関する自主点検について」（令和3年10月8日付薬生薬審発1008第1号,薬生安発1008第1号,薬生監麻発1008第1号）
 - 13) 米田哲也, 高山信幸, 小木曾英夫, 小笠原勝, 薬事研究会分析部会, 質量分析計を活用した医薬品中のニトロソアミン不純物の分析（第2報）, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 49, 35-41 (2022)