

# Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラと Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いた ニトロソアミン不純物の測定

医薬品製造工程からの規制対象の遺伝毒性不純物の検出

## 著者

軸丸裕介

アジレント・テクノロジー  
株式会社

## 概要

最近の研究により、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) 製剤の一部に発がん性のニトロソアミン不純物が含まれることが示されました。その結果、これらの製品の多くが回収され、問題となる目標濃度を超えるニトロソアミン不純物を検出できる分析メソッドの必要性が浮き彫りになりました。このアプリケーションノートでは、溶出力の強い溶媒に溶解したサンプルの大容量注入を可能にする Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラと高感度の Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS によるメソッドを用いて、ニトロソアミンを良好なピーク形状で検出する方法を紹介します。

## はじめに

ARB 薬であるバルサルタン、ロサルタン、イルベサルタンのリコールの発表を受け、FDA<sup>1</sup> や EMA<sup>2</sup>、PMDA<sup>3</sup> などの規制当局が、N-ニトロソ基を含む不純物に注目しています。ニトロソアミン不純物は、こうした医薬品の製造工程中にごく微量に発生する副生成物です。これらの不純物は発がん物質の可能性（すなわち、遺伝毒性不純物である可能性）があるものとして分類されます。このアプリケーションノートに記載の LC/MS によるメソッドは、Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラと Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS で実行しました。Agilent Infinity II ハイブリッドマルチサンブラは従来の注入機構（フロースルー）とは全く異なる Feed 注入が使用可能です。各モードの概念図を図 1 に示しました。Feed 注入は吸引した試料溶液を一定速度で移動相と混合しながらカラムに送液するため、試料溶液の有機溶媒が希釈され化合物がカラム先端に保持されるようになります。

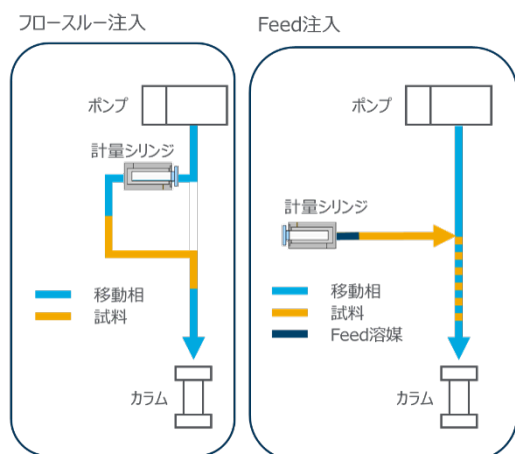


図 1. フロースルー注入と FEED 注入の概念図

このメソッドでは、逆相クロマトグラフィーにおいて溶出力が強いメタノールに溶解した試料を、ピーク形状の劣化を抑えながら大容量注入することが可能です。このアプリケーションノートで分析するニトロソアミンは以下のとおりです。

- 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 (NDEA)
- N-ニトロソメチルフェニルアミン (NMPA)
- N-ニトロソイソプロピルエチルアミン (NIPEA)
- N-ニトロソジイソプロピルアミン (NDIPA)
- N-ニトロソジプロピルアミン (NDPA)
- N-ニトロソジブチルアミン (NDBA)
- N-ニトロソモルホリン (NMOR)

## 実験方法

### 材料および試薬

本研究に用いたニトロソアミン標準品は、富士フィルム和光純薬の混合標準液（145-10051）を用いました。LC/MS グレードのメタノールとギ酸も富士フィルム和光純薬から購入しました。

### データ解析

データは Agilent MassHunter Data Acquisition ソフトウェア バージョン 12.1 を用いて測定しました。MS/MS トランジションと測定パラメータは既報の通りとし<sup>4</sup>、フラグメンタは下記のように設定しました。NDMA：60, NDEA：70, NMOR：80, NEIPA：80, NMPA：90, NDPA：90, NDIPA：90, NDBA：100

## 結果と考察

Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドサンブラは、標準的なフロースルーインジェクション (FI) と Feed 注入を選択することが可能です。一般的な化合物を用いた試験では、Feed 注入を用いることで、逆相クロマトグラフィーにおけるメタノール等の溶出力が強い試料溶媒の影響を抑制できることが示されています<sup>5</sup>。極性が異なるさまざまな原薬や製剤を対象とし、抽出や溶解の条件が多様なニトロソアミンについても同様の効果が期待できます。ハイブリッドサンブラを含む、今回用いた LC システムの分析条件を表 1 に示しました。

表 1. UHPLC の構成と設定

パラメータ	設定値
装置	Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
	Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラ (G7167C)
	Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
ハイブリッドサンブラ S1	メタノール
ハイブリッドサンブラ S2	0.2 % ギ酸水溶液
Inner wash	S1, 150 uL
Seat wash	S1, 150 uL
Outer wash	S1, 5 sec
FEED Speed	10 %
Flush Out Volume	14 uL
サンプル希釈剤	メタノール
マルチサンブラ温度	10 °C
注入量	可変
分析カラム	Agilent Pursuit XR <sub>s</sub> C18, 4.6 x 150 mm, 3 um (A6001150X046)
カラム温度	40 °C
移動相 A	0.2 % ギ酸水溶液
移動相 B	メタノール
流速	0.6 mL/min
グラジエント	1 % B--- (10 min) ---95 % B
ストップタイム	14 分
ポストタイム	5 分

はじめに、ニトロソアミンの中でも溶出時間が比較的早い NDMA について、メタノール溶解試料における FI と Feed 注入の比較を行いました。結果を図 2 に示しました。黒で示した 4 uL 注入と赤で示した 8 uL 注入においては、FI (左)、Feed (右) ともに良好なピーク形状となりました。一方で、緑で示した 20 uL 注入では FI でピーク割れが観察されるのに対し、Feed 注入ではピークの対称性が維持されています。さらに注入量を 40 uL に増やした青のクロマトグラムでは、FI が著しいリーディングを示したのに対し Feed 注入はリーディングを抑え、対称性を維持しています。以上のことから、ニトロソアミン分析においても、Feed 注入を行うことで試料溶媒の溶出力に由来するリーディングの抑制とピーク形状の維持が可能であることが示されました。

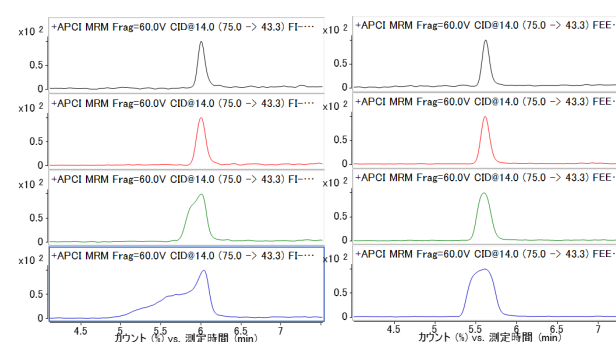


図 2. 異なる注入量での NDMA のピーク形状

左 : FI、右 : Feed

黒 : 4 uL、赤 : 8 uL、緑 : 20 uL、青 : 40 uL

次に、Feed 注入が NDMA 以外のニトロソアミンを一斉分析する際にどのような影響を与えるかを確認しました。濃度 10 ng/mL の試料を 40 uL 注入した際のクロマトグラムを図 3 に示しました。上段に示した FI では、溶出時間が早い NDMA だけでなく、NMOR、NDEA、NEIPA まで、リーディングやピーク割れが観察されました。一方で、下段に示した Feed 注入では、FI で見られたピーク形状の著しい劣化は認められず、保持の強さと相関して NDMA、NMOR、NDEA、NEIPA の順にピーク幅の減少が見られました。このことから、Feed 注入の効果は溶出時間が著しく早いものだけでなく、中程度のものにまで改善がみられると考えられました。また、NDPA 以降の溶出時間が遅い成分についても、FI と比較してピーク形状の劣化は見られませんでした。

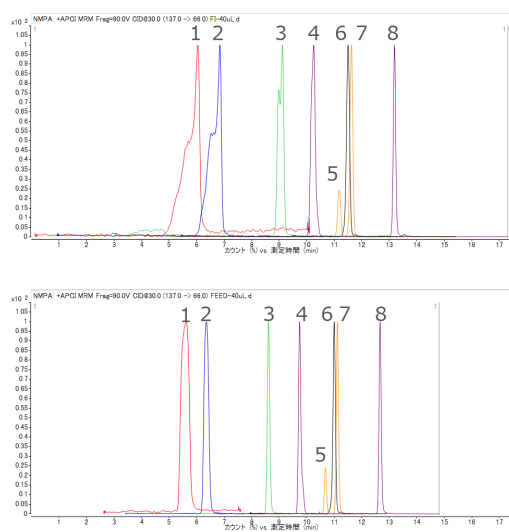


図 3. 注入量 40 uL でのニトロソアミンのクロマトグラム  
 上：FI、下：Feed  
 1：NDMA、2：NMOR、3：NDEA、4：NEIPA、5 NDPA、  
 6：NMPA、7：NDIPA、8：NDBA

続いて、0.1 から 50 ng/mL までの標準溶液をメタノール希釈液として調製し、5 回繰り返しでの直線性と再現性を確認しました。各成分の検量線を図 4 に示しました。今回検討したすべての成分で決定係数は 0.997 以上となりました。以上の結果から、Feed 注入は FI と同様に広い濃度範囲において適用可能であることが示されました。

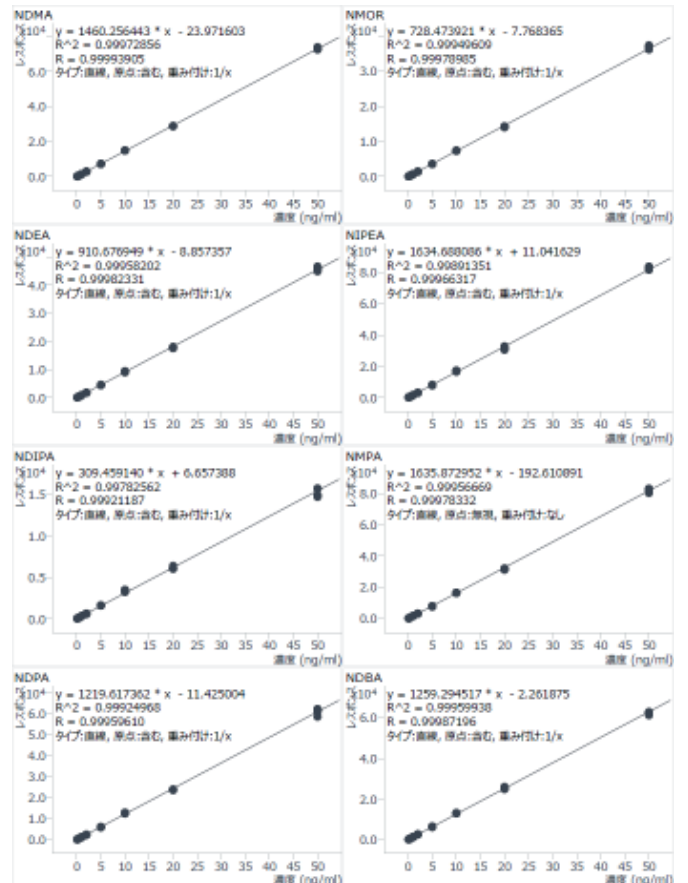


図 4. 濃度範囲 0.1-50 ng/mL のニトロソアミンの検量線

## 結論

原薬や製剤中のニトロソアミンの分析においてはメタノールなどの溶出力が強い溶媒による抽出が効果的である一方、逆相クロマトグラフィーでは保持が弱い成分があるため、抽出後に水希釈を行う場合がほとんどです。しかしながらニトロソアミンは水中で分解しやすく、また抽出溶媒の希釈により検出下限が上がってしまうことから、抽出時の溶媒のまま、できるだけ多くの注入量を確保することが理想的でした。Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラによる Feed 注入と Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いて、溶出力が強い溶媒であるメタノールに溶解した試料を、ピーク形状の劣化を抑制しながら大容量注入することが可能であることが示されました。このことから、このアプリケーションノートで用いたシステムは、ニトロソアミン分析における重要な課題の一つを解消することができると考えられます。

## 参考文献

- 1) <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs>
- 2) <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities>
- 3) <https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/0371.html#1>
- 4) Agilent 6495 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, 5994-5635JAJP (2022)
- 5) Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラの性能特性, 5994-5952JAJP (2023)

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

**email\_japan@agilent.com**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-000574

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, August 27, 2024

5994-7813JAJP