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

米田 哲也，高山 信幸，竹林 憲司，小笠原 勝，薬事研究会分析部会

An LC-MS/MS Method for Quantitative Determination of NDMA in Drug Products and Substances of Valsartan, Ranitidine and Metformin.

YONEDA T，TAKAYAMA N，TAKEBAYASHI K，OGASAWARA M，

The Chemical Analysis Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要　　約

ニトロソアミンは，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を用いた，バルサルタン，ラニチジン及びメトホルミン中の*N*－ニトロソジメチルアミン（NDMA）の定量分析法の構築を目指し検討を行った．その結果，0.5~10ng/mLの濃度範囲において，相関係数（R）>0.999の良好な直線性が得られた．検出および定量限界濃度は，それぞれ0.1ng/mL，0.5ng/mLであった．バルサルタン，ラニチジン及びメトホルミンについて添加回収試験を行った結果，回収率は89.6～110.3％であり良好な回収率であった．以上から，LC-MS/MSを用いた医薬品中のNDMAの分析方法を構築することができた．

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 NDMA in drug products and substances of valsartan, ranitidine, and metformin. Good linearity with a correlation coefficient (R) > 0.999 was achieved at the concentration range of 0.5–10ng/mL. The limits of detection and quantification were 0.1ng/mL and 0.5ng/mL, respectively. Recovery tests were carried out by applying NDMA to valsartan, ranitidine and metformin. The recovery rates were determined to be 89.6–110.3%, which were well acceptable in the validation process. In conclusion, a practical LC-MS/MS method for the determination of NDMA in drug matrices was established.

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することが知られている[1]．潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価及び管理（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，ニトロソアミンの一つである*N*－ニトロソジメチルアミン（以下，NDMAと示す）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を原薬とする様々な製剤からもニトロソアミンが検出され，世界的に医薬品の回収が行われた[3-11]．その後，ニトロソアミンの混入が排除できない製剤については，厳格な管理が求められている．なお製剤中のニトロソアミンの許容摂取限度量は，表１のとおり設定されている[12]．従って，ニトロソアミンのリスク管理を行うには，表中の許容摂取限度量を正確に定量できる分析方法を構築しなければならない．この点において，許容摂取限度量は極めて微量であるため，製剤中に含まれる微量のニトロソアミンを検出するには，高感度な分析機器と分析技術が不可欠であることが示されている[13]．

そこで本研究では，これまでの報告[14]を参考に，製剤中に許容摂取限度量以上の混入が報告されたNDMAに焦点を当て，当センターのLC-MS/MSを

使用し，NDMAの分析条件の最適化，バルサルタン錠，ラニチジン塩酸塩及びメトホルミン錠を用いたNDMAの添加回収試験を通じて，NDMAの分析方法を構築することを目的とした．以下にその検討内容を報告する．

表１．ニトロソアミンの一日摂取量の許容摂取限度量

ニトロソアミン	許容摂取限度量（ng/day）
N-nitrosodimethylamine（NDMA）	96
N-nitrosodiethylamine（NDEA）	26.5
N-nitroso-*N*-methyl-4-aminobutyric acid（NMBA）	96
N-nitrosomethylphenylamine（NMPA）	26.5
N-nitrosoisopropylethylamine（NIPEA）	26.5
N-nitrosodiisopropylamine（NDIPA）	26.5

方法及び結果

分析には，ACQUITY UPLC H-Class PLUSシステム，及びXevo TQ-XSタンデム四重極型質量分析計を用いた．なお，定量限界濃度の評価及び直線性の検討はグラジエント条件①，バルサルタン錠及びラニチジン塩酸塩についての添加回収試験はグラジエント条件②，メトホルミン錠についての添加回収試験はグラジエント条件③により分析を行った．

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 T3,
1.8 μm, 3.0×100 mm
カラム温度：30 ℃
注入量：10 μL
流量：0.5mL/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
分析時間：５分 or ７分
グラジエント条件①：（A）95%　（B）5%
グラジエント条件②：０～3.6分　（A）95%　（B）5%
3.6～5分（A）95%→5%
（B）5%→95%
4.5～7分（A）5%　（B）95%
グラジエント条件③：0～4分（A）97%　（B）3%
4～4.5分（A）97%→3%
（B）3%→97%
4.5～7分（A）3%　（B）97%

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 ℃

MRM条件

成分名	プリカーサーイオン（m/z）	プロダクトイオン（m/z）	Cone	Collision energy
NDMA	75	58	25	10
		43		
d6-NDMA	81	64		
		49		

①　定量限界濃度の評価

NDMA標準溶液の希釈液を作成し，上記分析条件において定量及び検出が可能な濃度範囲について検討した．その結果より定量限界濃度を算出した．定量限界濃度の評価については，各希釈溶液のS/N比を算出し，その値が10以上となる最も低い濃度を定量限界濃度とした．定量限界濃度については再現性を確認するため，６回繰返し注入によるRSDを算出した．

標準原液の調製

NDMA（東京化成）を10 μL（10mg）量り，10 mLのメスフラスコに入れメタノールでメスアップした（1 mg/mL）．1 mg/mLのNDMA溶液を精製水で希釈し，10 ng/mL，1 ng/mL，0.1 ng/mLのNDMA標準原液をそれぞれ調製した．

内標準原液の調製

d6-NDMA標準溶液（100μg/mL）（関東化学）を1mL量り，10 mLのメスフラスコに入れメタノールでメスアップした（10μg/mL）．10μg/mLを精製水で希釈し，100 ng/mLのd6-NDMA標準原液を調製した．

標準溶液の調製

上記で調製した標準原液と内標準原液を用いて，NDMAの濃度が 0.01～1 ng/mL，d6-NDMAの濃度が10 ng/mLとなるよう標準溶液を調製した．なお，希釈には精製水を用いた．

結果

プリカーサーイオン75に対してプロダクトイオン58及び43を比較すると，プロダクトイオン58の方が，感度が良いことが分かった（表2）．プロダクトイオン58で分析した場合，0.5 ng/mLのNDMA標準溶液がS/N比10以上で最も低い濃度であったため，0.5 ng/mLを定量限界濃度と設定した．0.5 ng/mLの6回繰返し注入のRSDは2.98%と十分な再現性が得られた．なお，プロダクトイオン43で分析した場合S/N比が10以上になるのは，5 ng/mLであった．

表2．定量限界濃度の検討

NDMA 75>58 (d6-NDMA 81>64)

標準溶液濃度	ピーク面積比	S/N
1 ng/mL	0.113	30
0.5 ng/mL	0.062	22
0.1 ng/mL	0.023	3
0.05 ng/mL	N.D.	N.D.
0.01 ng/mL	N.D.	N.D.

NDMA 75>43 (d6-NDMA 81>49)

標準溶液濃度	ピーク面積比	S/N
1 ng/mL	0.118	5
0.5 ng/mL	0.031	2
0.1 ng/mL	N.D.	N.D.
0.05 ng/mL	N.D.	N.D.
0.01 ng/mL	N.D.	N.D.

N.D.=　検出不可

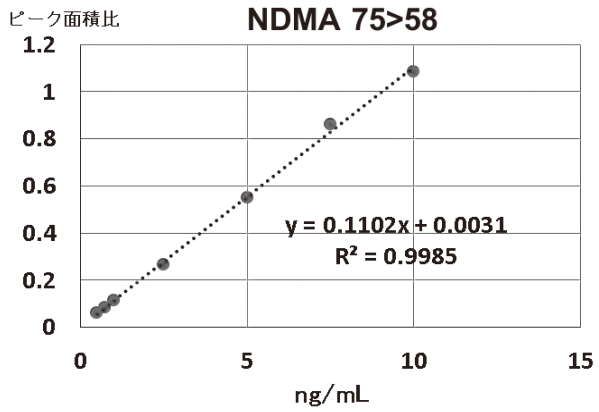
②　直線性の確認

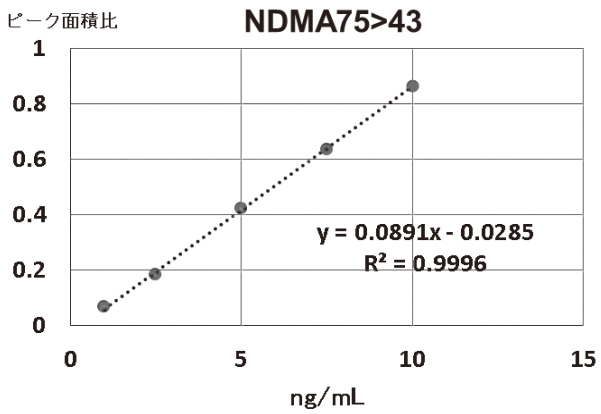
定量限界濃度と設定した0.5 ng/mLから10 ng/mLまでのNDMA標準溶液を調製し，直線性の確認を行った．

結果

プロダクトイオン58で分析した場合，0.5 ng/mL～10 ng/mLの範囲では，相関係数0.9992となり良好な直線性が得られた（図1）．プロダクトイオン43で分析した場合，1 ng/mL～10 ng/mLの範囲では，相関係数0.9998となり良好な直線性が得られた．従ってプロダクトイオン58で分析を行った方が，より低濃度までNDMAを検出できることが分かった．以下の添加回収試験では，プロダクトイオン58を指標に分析することとした．

図1．直線性の検討





③　バルサルタン錠の添加回収試験

市販のバルサルタン錠を使用し，添加回収試験を行った．添加するNDMA標準溶液の濃度は，試料300 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（6.3 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①と試料300 mgを溶媒５mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（12.6 ng/mL）の１/10を含む濃度を添加する条件②の２パターンで検討を行った．なお，それぞれの試料についてRSD（n=３）も算出した．

試料調製方法

バルサルタン錠を乳鉢・乳棒で粉末にし，約300 mgを量り遠沈管に入れた．この遠沈管にメタノールを加え振り混ぜた．ここにNDMA標準溶液を加え，さらにd6-NDMA標準溶液を入れ，全量が10 mLまたは５mLとなるように精製水を加えた．その後，振り混ぜて超音波処理を５分間行った．この液を12,000 rpmで10分間遠心分離し，上清をフィルターでろ過し，試料とした．添加したNDMAの濃度は，条件①では2.5，５，７，５ng/mL，条件②では１，2.5，５ng/mLとなるよう調製した．

結果

試料300 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（6.3 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①では，回収率95.51～97.52％と良好な結果となった．それぞれの添加濃度のRSD（n=３）は，2.5 ng/mLでは0.52%，５ng/mLでは0.08%，7.5 ng/mLでは0.19%であった．試料300 mgを溶媒５mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（12.6 ng/mL）の１/10を含む濃度を添加する条件②では，回収率92.78～101.56％と良好な結果となった．それぞれの添加濃度のRSD（n=３）は，１ng/mLでは4.54%，2.5 ng/mLでは1.46%，５ng/mLでは1.47%であった．

④　ラニチジン塩酸塩の添加回収試験

市販のラニチジン塩酸塩錠は，すべて自主回収となっており入手が不可能であったため，ラニチジン塩酸塩原薬からの添加回収試験を想定し，「ラニチジン塩酸塩」（東京化成）の試薬を使用し添加回収試験を行った．添加するNDMA標準溶液の濃度は，バルサルタン錠の添加回収試験と同様に試料200 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（6.4 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①と試料400 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（12.8 ng/mL）の１/10を含む濃度を添加する条件②の２パターンにおいて検討を行った．なお，それぞれの試料についてRSD（n=３）も算出した．LC-MS/MS分析条件については，上記で行ったバルサルタン錠の添加回収試験と同様とした．

試料調製方法

ラニチジン塩酸塩を，約200 mgまたは約400 mgを量り遠沈管に入れた．この遠沈管にメタノールを加え振り混ぜた．ここにNDMA標準溶液を加え，さらにd6-NDMA標準溶液を添加し，全量が10 mLとなるように精製水を加えた．その後，振り混ぜて超音波処理を５分間行った．この液の上清をフィルターでろ過し，試料とした．添加したNDMAの濃度は，条件①では０，４，６，８ng/mL，条件②では０，１，2.5，５ng/mLとなるよう調製した．

結果

試料200 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（6.4 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①では，回収率98.64～107.05％と良好な結果となった．それぞれの添加濃度のRSD（n=３）は，０ng/mLでは3.00%，４ng/mLでは0.66%，６ng/mLでは2.13%，８ng/mLでは0.64%であった．試料400 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（12.8 ng/mL）の１/10を含む濃度を添加する条件②では，回収率89.64～110.32％と良好な結果となった．それぞれの添加濃度のRSD（n=３）は，０ng/mLでは5.20%，１ng/mLでは0.43%，2.5 ng/mLはで1.38%，５ng/mLでは3.67%であった．

⑤　メトホルミン錠の添加回収試験

市販のメトホルミン錠を使用し，添加回収試験を行った．添加したNDMA標準溶液の濃度は，バルサルタン錠やラニチジン塩酸塩と同様に試料900 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（3.3 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①と試料３,000 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（11 ng/mL）の１/10を含む濃度を添加する条件②の２パターンにおいて検討を行った．なお，それぞれの試料についてRSD（n=３）も算出した．LC-MS/MS分析条件については，上記で行ったバルサルタン錠やラニチジン塩酸塩の添加回収試験の条件から移動相のグラジエント条件を変更して分析を行った．

試料調製方法

メトホルミン錠を乳鉢・乳棒で粉末にし，約900 mgまたは約3,000 mgを量り遠沈管に入れた．この遠沈管にNDMA標準溶液を加え，さらにd6-NDMA標準

溶液を添加し，全量が10 mLとなるように精製水を加えた．その後，振り混ぜて超音波処理を５分間行った．この液を12,000 rpmで10分間遠心分離し，上清をフィルターでろ過し，試料とした．添加したNDMAの濃度は，条件①では２，３，４ng/mL条件②では１，2.5，５ng/mLとなるよう調製した．

結果

試料900 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（3.3 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①では，回収率100.24～108.21％と良好な結果となった．それぞれの添加濃度のRSD（n=３）は０ng/mLでは1.56%，２ng/mLでは1.07%，３ng/mLでは1.14%，４ng/mLでは0.61%であった．試料3,000 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（11 ng/mL）の１/10を含む濃度を添加する条件②では，回収率98.37～105.68％と良好な結果となった．それぞれの添加濃度のRSD（n=３）は，０ng/mLでは6.95%，１ng/mLでは2.91%，2.5 ng/mLでは2.76%，５ng/mLでは1.16%であった．

ま と め

0.5 ng/mL ～10 ng/mLの濃度のNDMAにおいて，良好な直線性と再現性を得ることができた．この分析条件を用いて，添加回収試験（バルサルタン錠，ラニチジン塩酸塩，メトホルミン錠）を行った．その結果，許容摂取限度濃度のNDMAを添加しても，良好な回収率が得られた．さらに，その許容摂取限度濃度の１/10の濃度を添加しても良好な回収率が得られることがわかった．従って，当センターにおけるLC-MS/MSを用いてのNDMAの分析条件を構築することができた．今後，NDMA以外のニトロソアミン類についても分析方法の構築を進めていく予定である．

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）Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry: https://www.fda.gov/media/141720/download
13）https://www.pmda.go.jp/files/000232925.pdf
14）https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-method.