

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）

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

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

Tetsuya YONEDA, Nobuyuki TAKAYAMA, Hideo OGISO, 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6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、0.1~1000 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、10種類の医薬品化合物（純度：>98.0%）について、ニトロソアミン類が検出されないか分析を行いロサルタンからNMBAとNDEAが検出された。

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 six nitrosoamines. Good linearity with a correlation coefficient (R^2) >0.998 was achieved at the concentration range of 0.1-1000 ng/mL.

By this method, we analyzed ten kinds of commercially available chemical reagents, which are also used for pharmaceutical compounds, and detected NMBA and NDEA in losartan.

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、

NDMAの分析方法について報告を行った¹³。今年度は、6種類のニトロソアミン類の一斉分析の分析条件の構築を行った。さらに、10種類の医薬品化合物（純度：>98.0%）について、今回構築した分析方法を用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
NIPEA (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)

昨年度構築したNDMAの分析条件を参考に、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、FDAが規制している6種類 (NDMA, NDEA, NDBA, NMBA, NEIPA, NDIPA) とした。

標準溶液の調製

ニトロソアミン類の標準品を10 mg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標準原液を作成 (1 mg/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。LC条件で、図1のように6成分のニトロソアミン類すべてが分離することを確認した。なお、NMBA及びNEIPAは、ピークが2本に割れることが確認された。これは既報¹⁴と一致する結果であり、異性体の影響によると思われる。

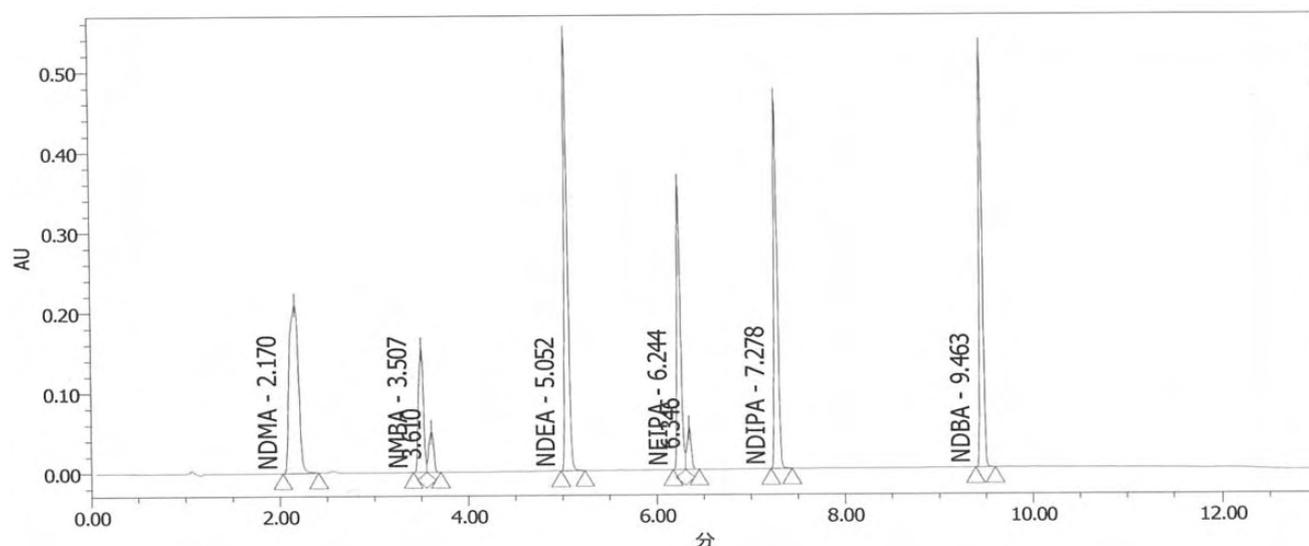


図1 LC条件によるクロマトグラム (254nm)

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 μ m, 3.0 \times 100 mm
カラム温度：40 $^{\circ}$ C
注入量：10 μ L
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 \rightarrow 5% (B) 5% \rightarrow 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 $^{\circ}$ C

表2 MRM条件

sample	m/z		Cone (V)	Collision (eV)
NDMA	75.1	43	25	10
		58		
NDEA	103.2	46.9	30	15
		74.9		10
NDBA	159.2	57.1	30	16
		103.2		12
NMBA	147.1	44	20	11
		117.1		4
NEIPA	117.2	43.1	20	17
		74.9		11
NDIPA	131.2	47.1	15	12
		89.1		8

②直線性の確認

6種類のニトロソアミン類が入った標準溶液を5点(0.1, 1, 10, 100, 1000 ng/mL)調製し、今回構築した上記の分析条件の直線性(0.1 ng/mL ~ 1000 ng/mL)を確認した。

表3 6種類のニトロソアミン類の直線性
(0.1 ng/mL ~ 1000 ng/mL)

sample	m/z		決定係数
NDMA	75.1	43	$R^2 = 0.9997$
		58	$R^2 = 0.9996$
NDEA	103.2	46.9	$R^2 = 0.9998$
		74.9	$R^2 = 0.9998$
NDBA	159.2	57.1	$R^2 = 0.9999$
		103.2	$R^2 = 0.9999$
NMBA	147.1	44	$R^2 = 0.9987$
		117.1	$R^2 = 0.9989$
NEIPA	117.2	43.1	$R^2 = 1.0000$
		74.9	$R^2 = 1.0000$
NDIPA	131.2	47.1	$R^2 = 0.9999$
		89.1	$R^2 = 0.9999$

結果

0.1~1000 ng/mLの濃度の6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、0.1~1000 ng/mLの濃度において6種類のニトロソアミンは、一斉分析により定量が可能となった。

③医薬品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化合物10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 分析化合物一覧(試薬メーカーより購入)

テトラゾール基	
セファゾリン	シロスタゾール
グアニジノ基	
クロニジン	チザニジン
サルタン系	
ロサルタン	
その他	
2-イソニトロソプロピオフェノン	2-アミノ4,6-ジメチルピリミジン
クロラムフェニコール	ジフェンヒドラミン
リファンピシン	

試料調製方法

試料を約500 mg量り遠沈管に入れた。この遠沈管にメタノール1 mL, 精製水4 mLを入れ、その後振り混ぜて超音波処理を15分間行った。この液を12,000 rpmで5分間遠心分離し、上清をフィルター過し試料とした(100 mg/mL)。

本分析条件では、ニトロソアミン類のピークが検出される時間のみを流路を変えて質量分析計へ入れて分析しているため、分析条件における医薬品化合物とニトロソアミン類の溶出時間を調べた。その結果、医薬品化合物とニトロソアミン類の溶出時間が近いものについては、医薬品化合物も同時に質量分析計に入ること、質量分析計を汚して感度が低下する恐れがあるため分析は行わなかった。分析を行ったニトロソアミン類の種類は表5のとおり(○:測定可, ×:測定不可)。

表5 分析を行ったニトロソアミン類の一覧

	NDMA	NMBA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NDBA	測定を行ったニトロソアミンの数
セファゾリン	○	○	○	×	×	○	4
シロスタゾール	○	○	○	○	○	×	5
クロニジン	○	○	×	×	○	○	4
チザニジン	○	○	×	×	○	○	4
ロサルタン	○	○	○	○	○	×	5
2-イソニトロソプロピ オフェノン	○	○	○	○	○	×	5
2-アミノ-4,6-ジメチル ピリミジン	×	×	○	○	○	○	4
クロラムフェニコール	○	○	○	○	×	×	4
ジフェンヒドラミン	○	○	○	○	×	×	4
リファンピシン	○	○	○	○	○	×	5

結 果

医薬品化合物とニトロソアミン類の溶出時間が近く、6種類を同時に分析することはできなかった。しかしながら、4～5種類のニトロソアミン類については一斉分析が可能であった。分析の結果、ロサルタンからNDEAとNMBAが検出された。それ以外の試料からは、ニトロソアミン類は検出されなかった。ロサルタンについては、過去にアメリカで許容摂取量以上のNMBAが検出され、自主回収を行った事例がある¹⁵。

④ロサルタンの試薬から検出されたNDEAとNMBAの定量

ロサルタンの試薬からNDEAとNMBAが検出されたことから、その含量について測定を行った (n = 3)。検量線 (0.1~50 ng/mL) による定量及び添加回収試験 (n = 3) も併せて行った。

NDEA及びNMBAについて、0.1~50 ng/mLの濃度において良好な直線性が得られた (図2)。この検量線をもとにNDEA及びNMBAの定量を行った。

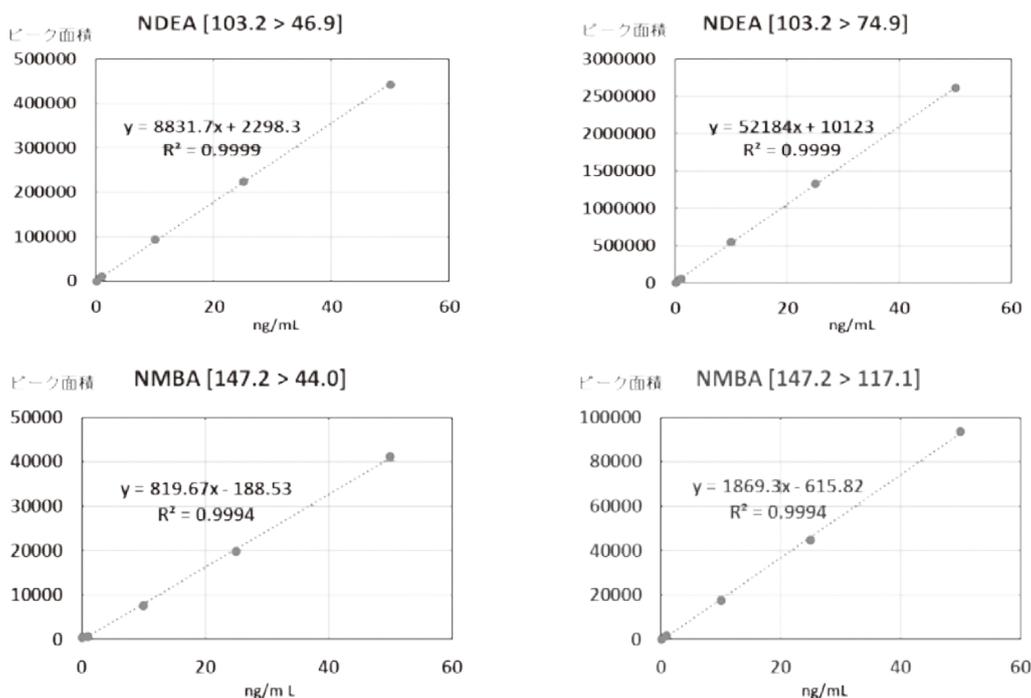


図2 検量線

試料調製方法

ロサルタンを約500 mg量り遠沈管に入れた。この遠沈管にメタノールを2 mL入れ、添加回収試験を行う試料にはNDEA及びNMBA標準溶液を加え（添加濃度10 ng/mL）、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15分間行った。この液を12,000 rpmで5分間遠心分離し、上清をフィルターろ過し、試料とした（50 mg/mL）。

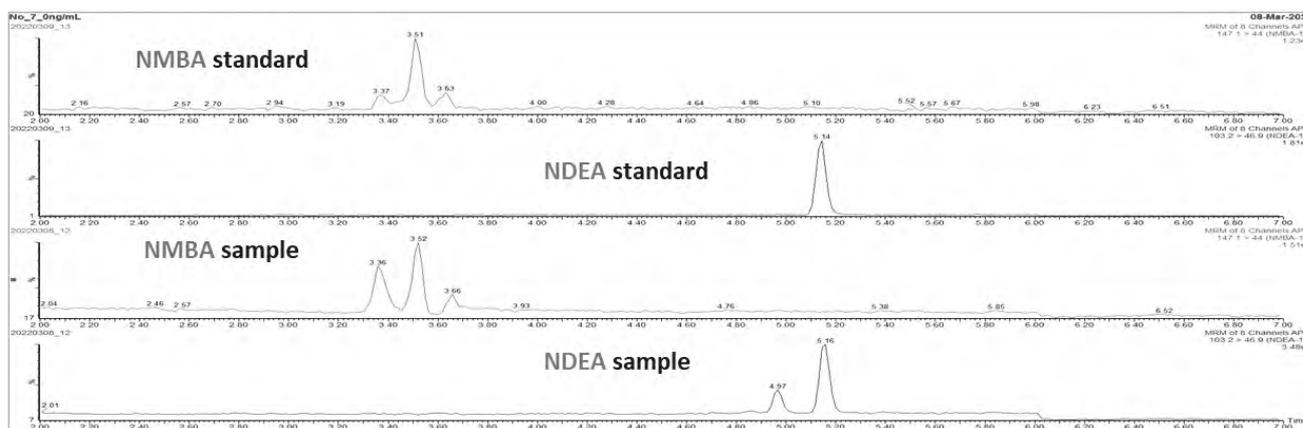


図3 LC-MS/MSのクロマトチャート (standard, sample)

結果

図3のクロマトチャートの標準溶液と試料溶液を比較すると、同じm/zとRTにピークが確認された。

表6 ロサルタン中のNDEAの定量

NDEA [103.2 > 46.9]

ロサルタン	全量	ピーク面積	定量濃度 ng/mL	添加濃度 ng/mL	平均回収率	許容摂濃度 ng/mL
①498.6 mg	10 mL	14454	1.38	0	97.4%	13.2
②499.5 mg		12707	1.18			
③500.6 mg		13063	1.22			
①501.5 mg		100475	11.12	10		
②500.6 mg		100145	11.08			
③501.3 mg		97651	10.80			

NDEA [103.2 > 74.9]

ロサルタン	全量	ピーク面積	定量濃度 ng/mL	添加濃度 ng/mL	平均回収率	許容摂濃度 ng/mL
①498.6 mg	10 mL	85884	1.45	0	98.6%	13.2
②499.5 mg		74288	1.23			
③500.6 mg		76091	1.26			
①501.5 mg		606482	11.43	10		
②500.6 mg		584078	11.00			
③501.3 mg		589426	11.10			

結 果

NDEAの添加回収試験を行った結果、回収率が約98%と良好な回収率が得られ、問題なく定量できること

が確認された。ロサルタンより検出されたNDEAは、約1.3 ng/mLであった(表6)。ロサルタンの許容摂取濃度を計算し比較すると、許容摂取濃度よりも低く約10分の1の濃度であった。

表7 ロサルタン中のNMBAの定量

NMBA [147.2 > 44.0]

ロサルタン	全量	ピーク面積	定量濃度 ng/mL	添加濃度 ng/mL	平均回収率	許容摂取濃度 ng/mL
①498.6 mg	10 mL	11910	14.76	0	45.8%	48
②499.5 mg		7659	9.57			
③500.6 mg		8546	10.66			
①501.5 mg		15437	19.06	10		
②500.6 mg		11144	13.83			
③501.3 mg		12793	15.84			
①0 mg		9341	11.63			

NMBA [147.2 > 117.1]

ロサルタン	全量	ピーク面積	定量濃度 ng/mL	添加濃度 ng/mL	平均回収率	許容摂取濃度 ng/mL
①498.6 mg	10 mL	27563	15.07	0	48.6%	48
②499.5 mg		19125	10.56			
③500.6 mg		23285	12.79			
①501.5 mg		37722	20.51	10		
②500.6 mg		27864	15.24			
③501.3 mg		31609	17.24			
①0 mg		21098	11.62			

結 果

ロサルタンから約12 ng/mLの濃度のNMBAが検出された。しかしながら、NMBAの添加回収試験の結果は、回収率が約47%と悪かった(表7)。ブランク溶液からは、116%の添加回収率が得られているため、試料が原因でNMBAの回収率が低下したのではないかと考えられる。また、定量したNMBAの濃度のバラツキが大きかった。その要因として、試料を採取する試薬瓶内の位置によりNMBAの濃度が異なるのではないかと考えている。このことについては、試料を秤量する前に試薬瓶内の試料を均一に混和して分析を行うなどの検討が必要であると思われる。

ま と め

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(0.1~1000 ng/mL)が得られ6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にアンケートを行い、その結果をもとに10種類の医薬品化合物を選定し、今回構築した分析条件で分析を行った。その結果、ロサルタンからNDEA及びNMBAが検出された。定量濃度としては、NDEAは、約1.3 ng/mL、NMBAは、約12 ng/mLであった。ロサルタンにおける、NDEA及びNMBAの許容摂取濃度と比較すると許容摂取濃度以下であった。

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，竹林憲司，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，富山県薬事総合研究開発センター年報，48，52-56（2021）
 - 14) 「UPLC-MS/MS を用いたサルタンおよびラニチジン原薬中のニトロソアミン不純物の高感度で頑健な定量分析」（Waters社，technology brier）
 - 15) <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/teva-pharmaceuticals-usa-inc-issues-voluntary-nationwide-recall-losartan-potassium-25-mg-and-100-mg>