

ACQUITY™ Premier システムと組み合わせた Xevo™ TQ Absolute タンデム四重極質量分析計を使用するメトホルミン中のニトロソアミンの高感度定量

Margaret Maziarz, Paul D. Rainville, Amy Bartlett

Waters Corporation

要約

医薬品に含まれるニトロソアミン不純物の存在は、ng/mL 以下の濃度でも人の健康に重大なリスクを及ぼすため、感度および選択性の高い分析法を用いてモニタリングする必要があります。本研究では、メトホルミン原薬中の 9 種のニトロソアミン不純物 (NDMA、NDEA、NEIPA、NMOR、NDIPA、NDPA、NMPA、NMBA、NDBA) の検出および定量のための、タンデム四重極質量分析計を使用する超高性能液体クロマトグラフィー (UPLC™) メソッドの開発および性能について紹介します。Atlantis™ Premier™ BEH C₁₈ AX カラムを使用してクロマトグラフィー分離を実施しました。ACQUITY Premier システムに Waters Xevo TQ Absolute 質量分析計を使用して、感度が高く正確な定量が達成されました。ニート溶媒中のニトロソアミンの定量限界 (LOQ) は 0.01 ~ 0.1 ng/mL の範囲で、メトホルミン原薬中では 0.025 ~ 0.1 ng/mL でした。正確な定量性能が 0.025 ng/mL (あるいはメトホルミン原薬 20 mg/mL に対して 0.00125 ppm) で達成され、回収率は 85 ~ 110% でした。

アプリケーションのメリット

- Xevo TQ Absolute タンデム四重極質量分析計を MRM 取り込みモードで使用した、メトホルミン原薬中における微量レベルのニトロソアミンの検出
- Atlantis Premier BEH C₁₈ AX カラムと ACQUITY Premier システムを使用したニトロソアミンとメトホルミン医薬品の頑健な分離
- メトホルミン原薬中のニトロソアミンの、精密で再現性が高く、直線性がよく正確な定量性能

はじめに

ニトロソアミン不純物は、ヒトに対する発がん性物質となる可能性があると考えられています^{1,2}。2018年、複数の市販薬にニトロソアミンが検出されて以来、アンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）、ヒスタミン拮抗薬であるラニチジン（ザンタック）で壊滅的な製品リコールが発生し、この動きはその後メトホルミンにも広がりました^{3,4}。医薬品中のニトロソアミンの存在を管理するため、米国FDAおよび欧州医薬品庁（EMA）は、医薬品中の許容可能な1日摂取限界量を確立しました^{4,5}。これらの限界を使用して、1日の推奨最大服用量に基づいて、特定の製品中のニトロソアミン濃度のスレッショールドが決定されています。

メトホルミンは2型糖尿病で血糖値の高い患者の治療に使用される処方薬です³。1日許容摂取量96ナノグラムを超えるNDMAの存在により、複数のメトホルミン医薬品がリコール対象となりました³。

規制で許可されているスレッショールドのレベルのニトロソアミンを測定するには、非常に感度と選択性の高い分析法が必要になります。液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）装置を適切に使用することで、さまざまな医薬品に含まれる低濃度のニトロソアミンの正確な同定および定量が行われています^{6,7}。

本研究で紹介するUPLC-MS/MS分析法では、メトホルミン原薬または医薬品有効成分（API）中の9種のニトロソアミンの非常に高感度で選択性の高い検出および定量が可能になります（表1）。今回開発した分析法ではXevo TQ Absolute タンデム四重極質量分析計とACQUITY Premier システムを採用しています。本研究では、メトホルミン原薬における検出限界および定量限界（LOD、LOQ）、再現性、直線性、正確性を含む分析法の性能特性が実証されました。

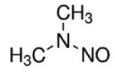
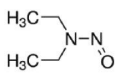
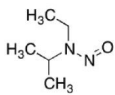
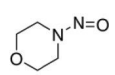
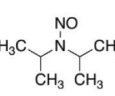
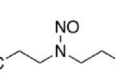
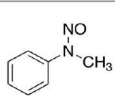
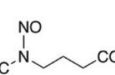
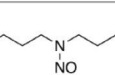
#	化合物	名前	化学式	MM	構造
1	N-ニトロソジメチルアミン	NDMA	$C_2H_6N_2O$	74.05	
2	N-ニトロソジエチルアミン	NDEA	$C_4H_{10}N_2O$	102.08	
3	N-ニトロソエチルイソプロピルアミン	NEIPA	$C_5H_{12}N_2O$	116.09	
4	N-ニトロソモルホリン	NMOR	$C_4H_8N_2O_2$	116.06	
5	N-ニトロソジイソプロピルアミン	NDIPA	$C_6H_{14}N_2O$	130.11	
6	N-ニトロソジプロピルアミン	NDPA	$C_6H_{14}N_2O$	130.11	
7	N-ニトロソエチルフェニルアミン	NMPA	$C_7H_8N_2O$	136.06	
8	N-ニトロソ-N-メチル-4-アミノ酪酸	NMBA	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.07	
9	N-ニトロソジブチルアミン	NDBA	$C_8H_{18}N_2O$	158.14	

表 1. ニトロソアミンおよびその化学情報のリスト。MM: モノアイソトピック質量 (Da)。

実験方法

ニトロソアミン標準試料は Toronto Research Chemicals (TRC) および Sigma-Aldrich から購入しました。質量分析グレードのギ酸アンモニウム、溶媒、ギ酸は Honeywell から入手しました。メトホルミン原薬は Sigma-Aldrich から購入しました。

ニート溶媒中の標準試料溶液

各ニトロソアミンを 5.0 ~ 10 mg/mL 含む個別のストック標準溶液を使用して、9 種の 100 µg/mL ニトロソアミンとメタノールを含む混合標準溶液を調製しました。この混合標準溶液を水で連続希釈し、LOD、LOQ、および直線性標準溶液を調製しました。

メトホルミン原薬 (DS)

20 mg/mL のメトホルミン原薬サンプル水溶液を調製し、0.2 µm/mL PVDF シリンジフィルター（製品番号：[WAT200806 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/wat200806-acrodisc-syringe-filter-pvdf-13-mm-02--m-aqueous-100-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/wat200806-acrodisc-syringe-filter-pvdf-13-mm-02--m-aqueous-100-pk.html)）を用いてろ過してから分析しました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY™ Premier システム
検出:	MS/MS
バイアル:	LCMS マキシマムリカバリ、容量 2 mL（製品番号：600000670CV）
カラム:	Atlantis™ Premier BEH C ₁₈ AX（2.1 × 100 mm、1.7 µm）、製品番号：186009368
カラム温度:	40°C
サンプル温度:	10°C
注入量:	30.0 µL
流速:	0.4 mL/分
移動相 A:	5 mM ギ酸アンモニウム水溶液 + 0.1% ギ酸
移動相 B:	5 mM ギ酸アンモニウムメタノール溶液 + 0.1% ギ酸
グラジエント:	グラジエントテーブルを参照

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期条件	0.400	98.0	2.0	初期条件
1.0	0.400	98.0	2.0	6
6.0	0.400	5.0	95.0	6
6.6	0.400	5.0	95.0	6
6.7	0.400	98.0	2.0	6
9.0	0.400	98.0	2.0	6

MS 条件

MS システム:	Xevo™ TQ Absolute タンデム四重極質量分析計
イオン化モード:	APCI+
データ取り込み:	MRM モード、表 2 を参照
コロナ:	2.5 (μA)
APCI プローブ温度:	325°C
脱溶媒ガス流量:	950 L/時間
コーンガス流量:	300 L/時間
ネブライザー:	300 L/時間
コリジョンガス流量:	0.20 mL/分
イオン源温度:	150°C

データ管理

データ管理:

装置コントロール: MassLynx™ v4.2

データ解析: TargetLynx™

化合物	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	ソフトイオン化
NDMA	75.05	58.05 (定量)	30	10	いいえ
		43.00 (定性)	30	10	
NDEA	103.20	74.90 (定量)	30	10	いいえ
		46.90 (定性)	30	14	
NMOR	117.10	86.93 (定量)	25	11	いいえ
		45.09 (定性)	25	14	
NEIPA	117.20	74.99 (定量)	20	9	はい
		43.10 (定性)	20	13	
		47.10 (定性)	20	13	
NDPA	131.16	89.16 (定量)	16	9	いいえ
		43.14 (定性)	16	12	
		47.11 (定性)	16	12	
NDIPA	131.20	89.10 (定量)	20	9	はい
		43.10 (定性)	20	12	
		47.10 (定性)	20	12	
NMPA	137.05	66.10 (定量)	26	15	いいえ
		107.15 (定性)	26	10	
NMBA	147.10	117.10 (定量)	20	5	はい
		44.00 (定性)	20	12	
NDBA	159.20	57.10 (定量)	30	12	いいえ
		41.10 (定性)	30	12	
		103.23 (定性)	30	10	

表 2. TQ Abs 質量分析計を使用した MRM トランジションの設定。すべてのニトロソアミンについて、取り込みはピークあたり 13 ポイントおよびオートデュエルに設定。

結果および考察

分析法開発時に、すべてのニトロソアミン、特に高濃度のメトホルミン API のピークと最も極性の強い NDMA のピーク間のクロマトグラフィー分離を確保するために、さまざまなカラムケミストリーを検討しました。高濃度の API のピークと低レベルの不純物の分離が確保できたことで、ダイバートバルブの組込みが可能になり、API を廃液に向け、

不純物を分析用に MS に向けることができました。API を廃液に送ることにより、マトリックスがイオン化抑制や微量レベルの不純物の増加に影響するのを最小限に抑えました。

ニトロソアミンおよびメトホルミンの分析のためのカラムのスクリーニングを図 1 に示します。メトホルミンのピーク溶出を評価するため、10 ng/mL のメトホルミン原薬に 1 ng/mL のニトロソアミンを含むサンプルを使用して、ダイバートバルブを使用せずに MS トレースを取り込みました。ACQUITY Premier HSS T3 および ACQUITY CSH™ Phenyl Hexyl の両方で、すべてのニトロソアミンについて適切な保持が得られ、ACQUITY Atlantis Premier BEH C₁₈ AX では、メトホルミンと NDMA の間の最良のクロマトグラフィー分離が得られました (図 1)。さらに、BEH C₁₈ AX カラムにより、NDPA、NDIPA、NMPA などの近接して溶出するニトロソアミンの分離が容易になりました。

6 種のニトロソアミン (NDMA、NDEA、NEIPA、NDIPA、NDBA、NMBA) の以前の研究に基づき、ポジティブモードの大気圧化学イオン化 (APCI) を使用して、ニトロソアミンの検出および定量を行いました⁸。ニトロソアミンの MRM トランジションおよび MS イオン化パラメーターは、MassLynx ソフトウェア内の IntelliStart™ 機能を使用して開発しました。

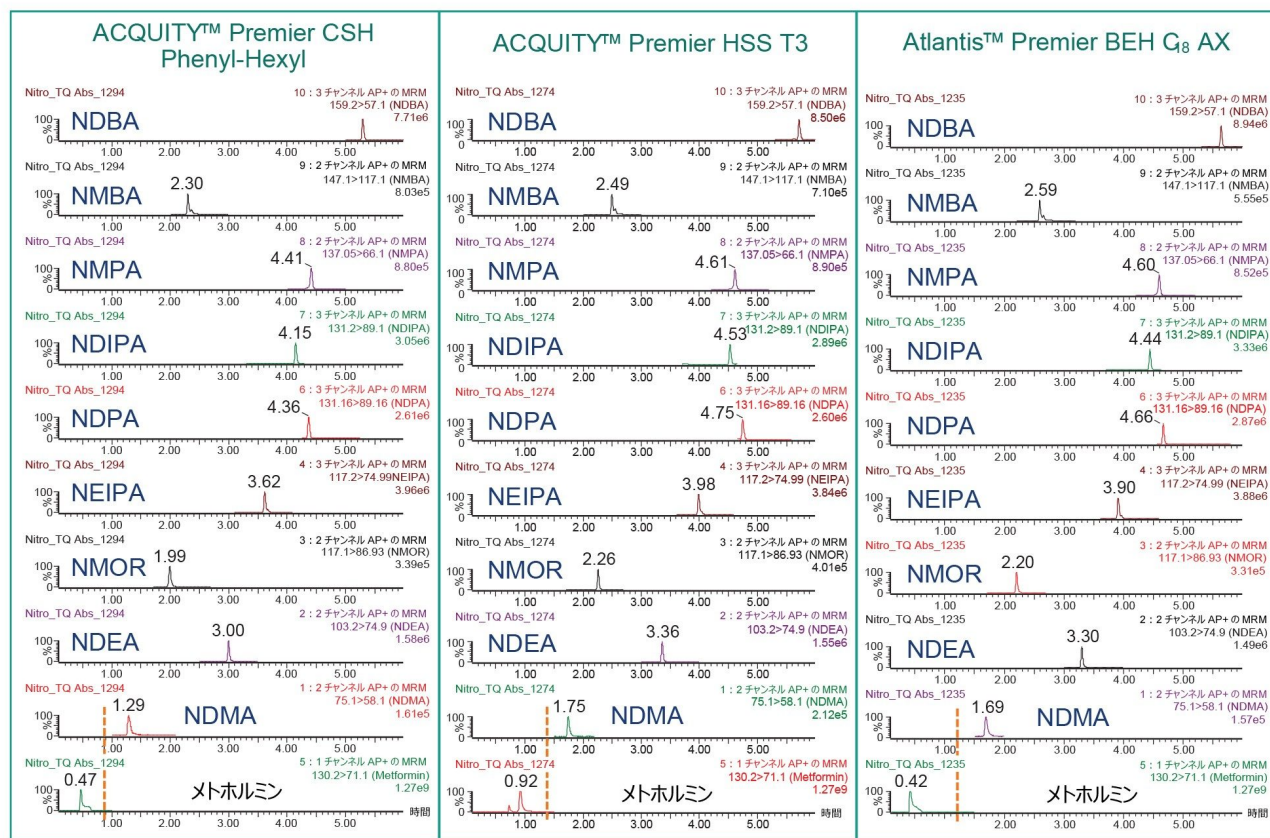


図 1. 複数のカラムでのニトロソアミンとメトホルミンの分離。ダイバートバルブを使用せず、Xevo TQ Absolute を使用して取り込んだ、10 ng/mL メトホルミン中に 1 ng/mL ニトロソアミンを含む溶液。

ニート溶媒中での定量

UPLC-MS/MS メソッドで達成できるニトロソアミンの LOD および LOQ が、それぞれ 3: 1 および 10: 1 のシグナル対ノイズ (S/N) 基準にしたがって決定されました。ニート溶媒中の LOQ 溶液の代表的なクロマトグラムを図 2 に示します。LOD、LOQ、直線性などの分析法の性能特性を表 3 にまとめています。NDMA の LOD および LOQ はそれぞれ 0.05 および 0.1 ng/mL であることがわかりました。さらに、NDEA、NMOR、NEIPA、NDPA、NDIPA、NMPA、NMBA、NDBA について、0.005 および 0.01 ng/mL の LOD および LOQ が達成されました。0.1 および 0.01 ng/mL という LOQ は、20 mg/mL のメトホルミン原薬 0.005 および 0.0005 ppm にそれぞれ対応します。ニトロソアミンについて LOQ レベルの優れた性能が達成され、6 回の繰り返し注入でのデータに基づくピーク面積の相対標準偏差 (RSD) は 10% 未満でした (表 3)。この研究では、データのばらつきを補正するための内部標準は使用しませんでした。さらに、この分析法では、MS レスポンスと濃度の間に直線的な関係が見られ、相関係数は 0.996 以上でした (図 3)。

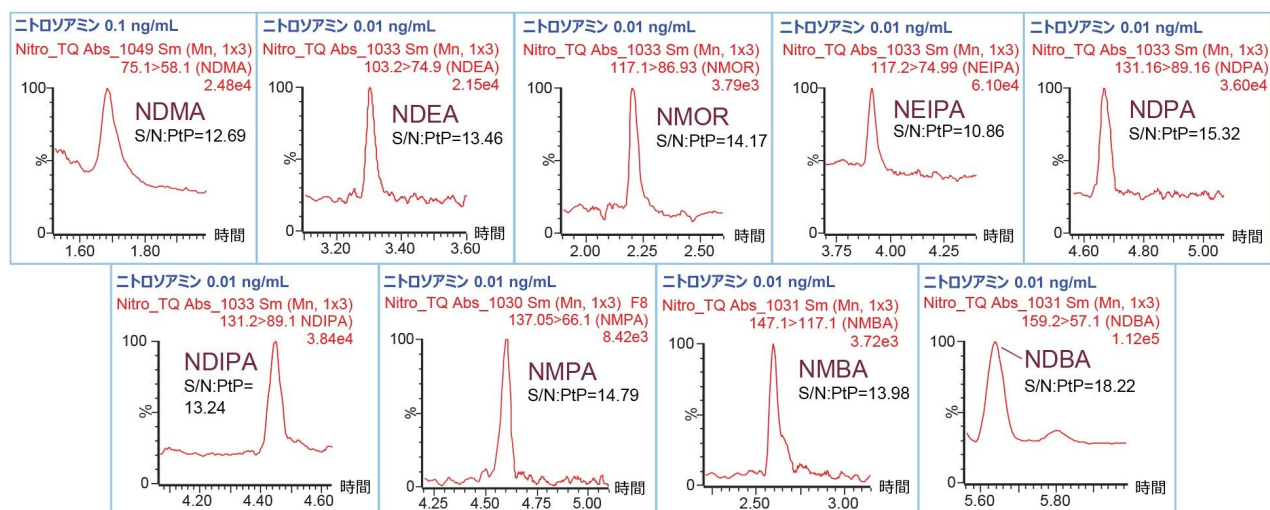


図 2. Xevo TQ Absolute を MRM モードで使用して得られた、ニート溶媒（水）中に調製した LOQ レベルのニトロソアミン標準試料溶液の代表的なクロマトグラム。PtP（ピーク間）の S/N。

#	名前	MRM トランジション	LOD 濃度 (ng/mL)	LOD (ppm) *	LOD (S/N)	LOQ 濃度 (ng/mL)	LOQ (ppm) *	LOQ (S/N)	ピーク面積の LOQ %RSD**	直線性濃度範囲 (ng/mL)	線形回帰 R ²
1	NDMA	75.05>58.05	0.05	0.0025	6.39	0.1	0.005	12.69	5.88	0.1~100	0.9996
2	NDEA	103.20>74.90	0.005	0.00025	4.92	0.01	0.0005	13.46	5.95	0.025~100	0.9997
3	NMOR	117.10>86.93	0.005	0.00025	5.61	0.01	0.0005	14.17	8.45	0.025~100	0.9996
4	NEIPA	117.20>74.99	0.005	0.00025	5.22	0.01	0.0005	10.86	7.83	0.025~100	0.9997
5	NDPA	131.16>89.16	0.005	0.00025	4.25	0.01	0.0005	15.32	7.58	0.025~100	0.9997
6	NDIPA	131.20>89.10	0.005	0.00025	6.03	0.01	0.0005	13.24	4.69	0.025~100	0.9997
7	NMPA	137.05>66.10	0.005	0.00025	5.28	0.01	0.0005	14.79	9.38	0.025~100	0.9996
8	NMBA	147.10>117.10	0.005	0.00025	3.44	0.01	0.0005	13.98	5.40	0.05~100	0.9959
9	NDPA	159.20>57.10	0.005	0.00025	8.01	0.01	0.0005	18.22	2.85	0.025~100	0.9998

表 3. Xevo TQ Absolute を MRM モードで使用したニート溶媒中のニトロソアミンの分析法の性能。* 20 mg/mL のメトホルミンについての ppm 単位での LOQ。** 6 回の繰り返し注入のデータに基づく。直線性は 1/x 重み付けを行っています。

メトホルミン原薬の定量

MRM 取り込みモードを使用して、20 mg/mL のメトホルミン原薬サンプル水溶液を、ニトロソアミンの有無について分析しました。分析法の正確性を評価するため、メトホルミンサンプルにニトロソアミンを 0.025、0.1、1 ng/mL に

なるようにスパイクしました。これにより、高濃度のメトホルミンを含む試験サンプル中のニトロソアミン不純物を正確に測定できることが確認されました。メトホルミン原薬中およびスパイクしたメトホルミン原薬サンプル中のニトロソアミン（NDMA、NDEA、NMOR、NEIPA）の分析を実証する代表的なクロマトグラムを図3に示します。この研究で試験した 20 mg/mL のメトホルミン原薬サンプルには検出可能なニトロソアミンがないことが、分析により確認されました。さらに、メトホルミン中にスパイクしたサンプル中のニトロソアミンの MS レスポンスおよび S/N は、ニート標準試料溶液中の値と同等であり、高濃度のメトホルミンのピークによるイオン化抑制がないことが示されました。

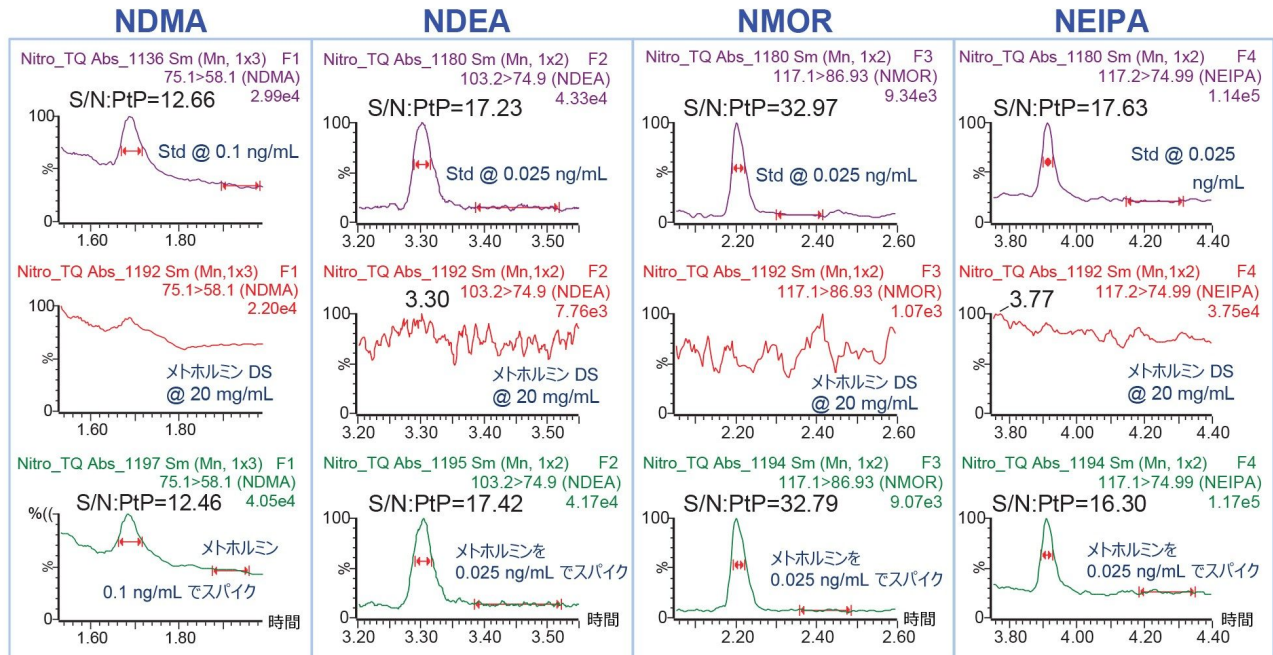


図 3. 20 mg/mL のメトホルミン原薬（DS）およびスパイクしたメトホルミン試験サンプル中のニトロソアミン分析の代表的なクロマトグラム

TargetLynx ソフトウェアを使用して、計算濃度と既知のスパイク濃度を比較することで回収率を計算しました。メトホルミン原薬中に調製したキャリブレーション標準溶液を使用して、ニトロソアミンの回収率を計算しました。正確な定量には、サンプルと同じマトリックスに含まれる標準試料を使用することが一般に推奨されます。マトリックスに分析種または干渉物質が含まれる場合、標準試料添加法を使用することができます。

メトホルミン原薬中のニトロソアミン標準試料の検量線は、MS レスポンスと濃度の間で直線的な関係を示し、 $R^2 \geq 0.999$ でした（図 4）。メトホルミン原薬中のすべてのニトロソアミンについて、優れた分析法の正確性が達成されました（表 4）。0.1 および 1 ng/mL の NDMA について、回収率はそれぞれ 89～98% および 93～98% でした。その他の不純物については、0.025 ng/mL（または 20 mg/mL のメトホルミン原薬中 0.00125 ppm）での回収率は 85～

110% で、5つのサンプル調製について RSD ≤ 6.50% でした。

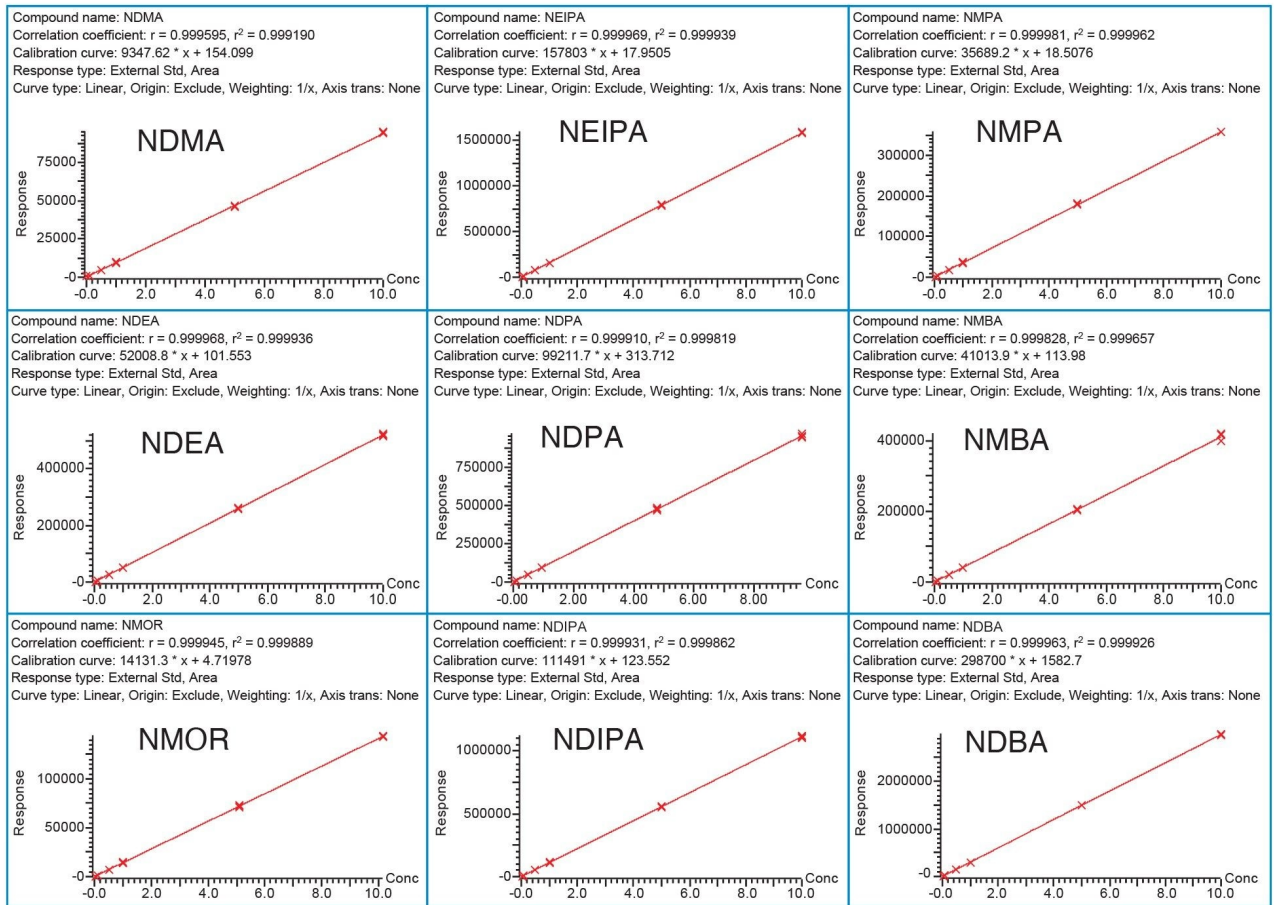


図 4. メトホルミン原薬中に調製したニトロソアミン標準試料の検量線 (NDMA: 0.1 ~ 10 ng/mL、その他の不純物 : 0.025 ~ 10 ng/mL)

名前	0.25 ng/mL での回収率 (%)	0.025 ng/mL での回収率の %RSD	0.1 ng/mL での回収率 (%)	0.1 ng/mL での回収率の %RSD	1 ng/mL での回収率 (%)	1 ng/mL での回収率 の %RSD
NDMA	n/a	n/a	89-98	3.45	93~103	1.95
NDEA	97~110	4.61	97-103	2.46	99~100	0.74
NMOR	93~103	3.67	100-105	2.06	97~101	1.50
NEIPA	97~103	2.60	102-106	1.65	98~101	0.94
NDPA	85~102	6.50	93-104	4.57	97~101	1.44
NDIPA	96~104	3.20	97-104	3.08	99~101	0.73
NMPA	95~110	6.39	96-100	2.70	99~102	1.20
NMBA	96~108	5.10	101-108	3.13	101~104	1.45
NDBA	105~110	2.19	100-103	0.92	96~99	1.22

表 4. 分析法の正確性。20 mg/mL メトホルミン原薬にさまざまなレベルでスパイクしたニトロソアミンの回収率（サンプル $n = 5$ ）。

結論

Xevo TQ Absolute 質量分析計および ACQUITY Premier システムを用いて、メトホルミン原薬中のニトロソアミンの非常に低濃度での検出および定量のための、非常に感度の高い分析法が開発できました。Atlantis™ Premier BEH C₁₈ AX カラムを使用して、優れたクロマトグラフィー分離が達成できました。LOQ 限界はそれぞれニート溶媒中で 0.01 ~ 0.1 ng/mL、20 mg/mL メトホルミン原薬中で 0.025 ~ 0.1 ng/mL に達し、この分析法の優れた定量性能が実証されました。メトホルミン原薬中のニトロソアミンの直線性および正確性はそれぞれ、 $R^2 \geq 0.999$ および回収率 85 ~ 110% となりました。

今回紹介した UPLC-MS/MS 分析法により、メトホルミン原薬中のニトロソアミンについて、感度および特異性が高く、正確な分析が可能になり、製品の品質および安全性に不可欠な、目的に適合した残留レベルのニトロソアミンの正確なモニタリングが実現します。

参考文献

1. ICH M7(R1) Assessment and Control of NDMA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk, International Conference on Harmonization.
2. G. Brambilla, A. Martelli, Genotoxic and Carcinogenic Risk to Humans of Drug-Nitrite Interaction Products, *Mutat.Res.*635 (2007) 17–52.
3. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-alerts-patients-and-health-care-professionals-nitrosamine-impurity-findings-certain-metformin> <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-alerts-patients-and-health-care-professionals-nitrosamine-impurity-findings-certain-metformin>> .
4. FDA, Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), February 2021.
5. European Medicines Agency, *Nitrosamine impurities in human medicinal products, Procedure number: EMEA/H/A-5(3)/1490*, 25 June 2020.
6. Parr MK and Joseph JF. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *JPBA* 2018;164(2019):536–549.
7. Gushargi AJ and Halden RU. Critical Review of Major Sources of Human Exposure to N-nitrosamines. *Chemosphere* 2018;210:1124-1136.
8. Lame ME, Lindsay H. High sensitivity quantification of Nitrosamines Genotoxic Impurities: LC-MS Analysis of Ranitidine Drug Product Using the Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-XS Tandem Quadrupole Mass Spectrometer. Waters Application Note, [720006899](#), 2020.

ソリューション提供製品

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ Absolute タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007725JA、2022年9月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)