

医薬品中のニトロソアミン類 第2報 (Nitrosamines)

令和7年7月24日、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後の対応について通知がありました([医薬審発0724第1号](#)、[医薬安発0724第3号](#)、[医薬監麻発0724第1号](#))。今後も適切に管理するためには、迅速かつ正確な分析が必要です。

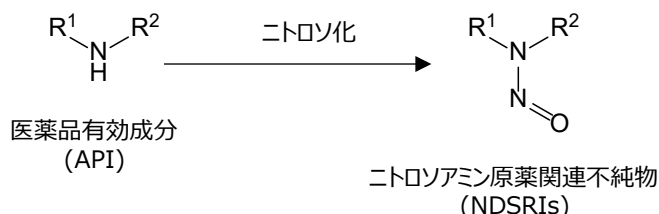
医薬品中のニトロソアミン類は、ニトロソアミン原薬関連不純物と低分子ニトロソアミン不純物があります。ここでは、主に医薬品有効成分とニトロソアミン原薬関連不純物の同時分析について、溶離液が保持挙動に及ぼす影響を確認しました。

Key words : L-column3 アルカリ性溶離液 ニトロソアミン類 Nitrosamines
Column : USP category: L1

■ ニトロソアミン原薬関連不純物(Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities, NDSRIs)

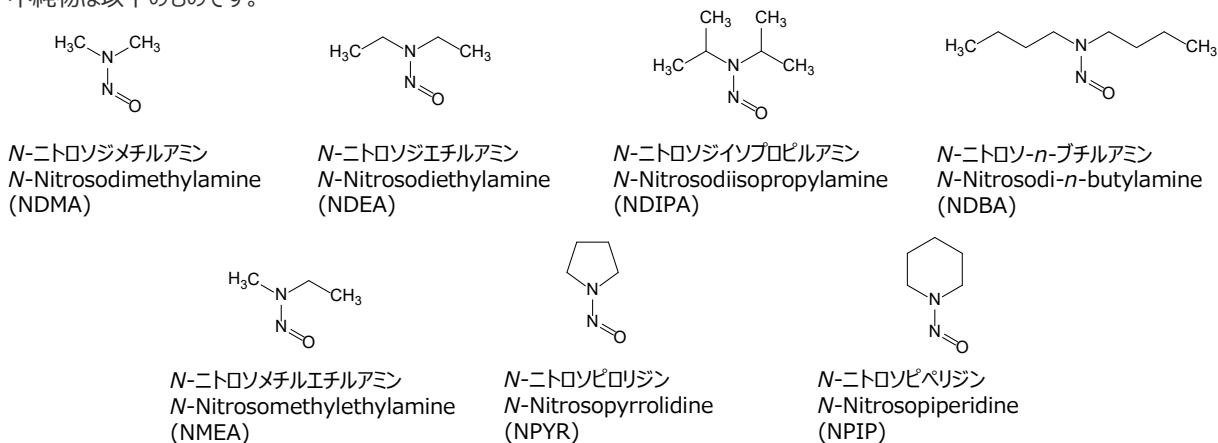
NDSRIsは、アミンを有する医薬品有効成分(Active Pharmaceutical Ingredient, API)がニトロソ化することで生成します。NDSRIsは、APIと化学構造的に類似しています。

NDSRIsを生成しやすいAPIは塩基性物質です。塩基性物質は、pKaより高いpHでは分子形で存在する割合が多くなるため、逆相カラムへの保持が強くなり、保持時間が長くなります。



■ 低分子ニトロソアミン不純物(参照: [L3050](#))

低分子ニトロソアミン不純物は、アミン類がニトロソ化することで生成します。本アプリケーションで分析対象とした低分子ニトロソアミン不純物は以下のものです。



■ 溶離液に用いた水系溶媒について

本アプリケーションで用いた水系溶媒は以下のように作成しました。(pHは実測値、小数点以下四捨五入)

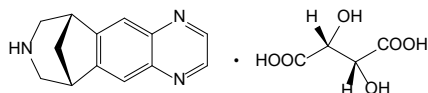
ギ酸水溶液	10 mmol/L	pH 3	: ギ酸 (分子量 46.03) 0.46 g ^{※1} を水1000 mLで溶解
酢酸アンモニウム水溶液	10 mmol/L	pH 7	: 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液10 mLを水1000 mLで溶解
炭酸水素アンモニウム水溶液	10 mmol/L	pH 8	: 炭酸水素アンモニウム (分子量 79.06) 0.79 g ^{※1} を水1000 mLで溶解
アンモニア水溶液	10 mmol/L	pH 10	: 0.1 mol/L アンモニア水 100 mLを水1000 mLで溶解

※1 試薬の濃度(又は純度)が100%の場合

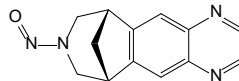
【2025LC&LCMSテクノ, 2025薬学会, HPLC2025】

【バレニクリン】

API

1. バレニクリン酒石酸塩
Varenicline Tartrate

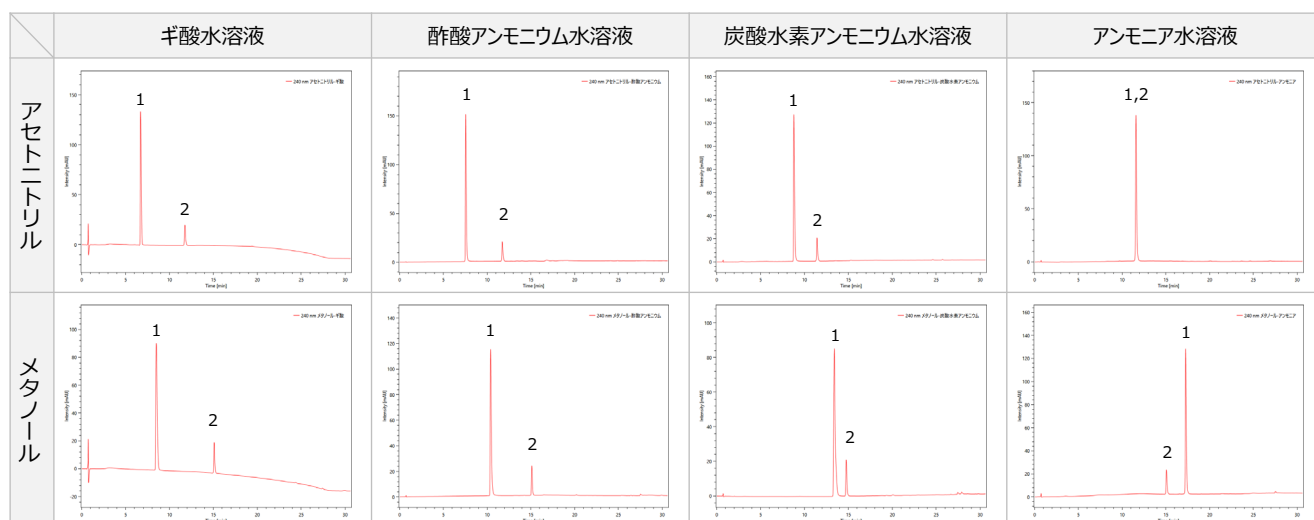
NDSRI

2. N-ニトロソバレニクリン
N-Nitrosovarenicline

■ 溶離液の違いによる保持挙動の比較

[Analytical conditions]

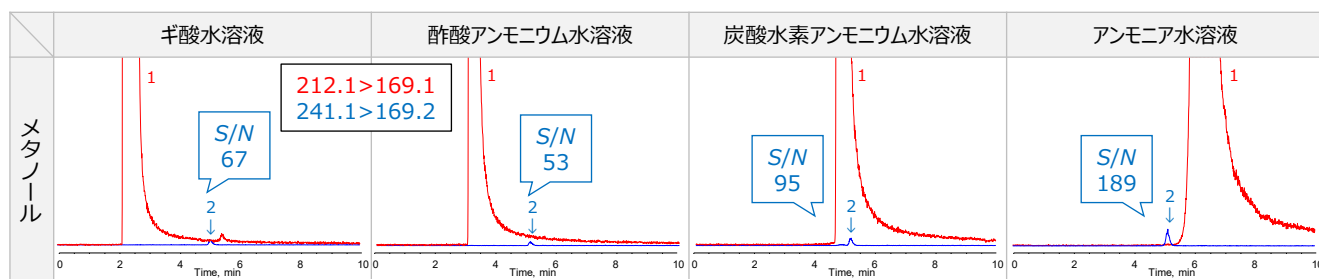
Column : L-column3 C18 (3 μ m, 12 nm); 3.0 mm I.D. $\times$ 50 mm L.; Cat. No. 821490
 Eluent : A: アセトニトリル or メタノール, B: 水系溶媒, A%: 0-20-70-80-80% (0-10.6-23.9-25.6-30.6 min)
 Flow rate : 0.4 mL/min
 Temperature : 40°C
 Detection : UV 240 nm
 Injection volume : 1 μ L
 Sample : バレニクリン酒石酸塩 (100 μ g/mL); N-ニトロソバレニクリン (10 μ g/mL) in 80%メタノール
 System : Agilent 1260 Infinity II



■ 溶離液の違いによる保持挙動の比較(API中の微量NDSRIの分析を想定し、バレニクリン酒石酸塩を過剰量添加)

[Analytical conditions]

Column : L-column3 C18 (3 μ m, 12 nm); 2.0 mm I.D. $\times$ 50 mm L. Metal-free; Cat. No. 861140
 Eluent : A: メタノール, B: 水系溶媒, A%: 10-70% (0-10 min)
 Flow rate : 0.2 mL/min
 Temperature : 40°C
 Detection : ESI-MS/MS (+)
 Injection volume : 5 μ L
 Sample : バレニクリン酒石酸塩 (1.7 mg/mL); N-ニトロソバレニクリン (10 ng/mL) in 80%メタノール
 System : LC: Ultimate 3000 Bio RS (Thermo Fisher Scientific K.K.); MS/MS: 3200 QTRAP (SCIEX)



- 水系溶媒のpHが高くなると、バレニクリンの保持は大きくなりました。溶離液にメタノールとアンモニア水溶液を用いると、N-ニトロソバレニクリン、バレニクリンの順で溶出しました。
- カラム内径に対しバレニクリンを過剰量添加した試料では、バレニクリンのピークが大きくテーリングします。溶離液にメタノールとアンモニア水溶液を使用すると、バレニクリンの前に溶出するN-ニトロソバレニクリンとの分離が可能です。

【2025LC&LCMSテクノ, 2025薬学会, HPLC2025】

【検量線・システム適合性(溶離液にメタノールとアンモニア水溶液を用いた場合)】

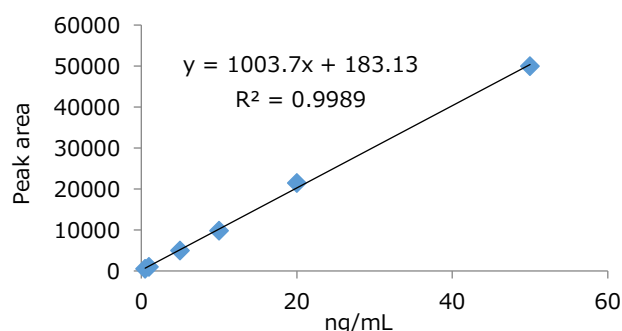
[Analytical conditions]

Column : L-column3 C18 (3 μm, 12 nm); 2.0 mm I.D. × 50 mm L. Metal-free; Cat. No. 861140
 Eluent : A: メタノール, B: アンモニア水溶液, A%: 10-70% (0-10 min)
 Flow rate : 0.2 mL/min
 Temperature : 40°C
 Detection : ESI-MS/MS (+)
 Injection volume : 5 μL
 System : LC: Ultimate 3000 Bio RS (Thermo Fisher Scientific K.K.); MS/MS: 3200 QTRAP (SCIEX)

■ 検量線

N-ニトロソバレニクリンを80%メタノールに溶解し、6回ずつ分析し検量線を作成しました。RSDは0.5 ng/mLでも10%以内であり、定量が可能な値でした。0.5-50 ng/mLの範囲内で直線性を確認できました。

ng/mL	ピーク面積		
	AVERAGE	SD	RSD(%)
0.5	581	38.9	6.7
1	1044	61.1	5.9
5	4966	267.3	5.4
10	9845	321.1	3.3
20	21516	332.2	1.5
50	49967	982.9	2.0



■ バレニクリン中のN-ニトロソバレニクリンの分析法における“システム適合性”

アメリカ食品医薬品局(FDA)は、溶離液にメタノールとギ酸水溶液を用いた試験法を示していますが※2、溶離液にメタノールとアンモニア水溶液を用いても“システム適合性(System Suitability)”を満たしました。ここで用いた試料はFDAの試験法と同様に調製し、回収率は以下のように計算しました。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{(\text{試料2のN-ニトロソバレニクリンのピーク面積}) - (\text{試料1のN-ニトロソバレニクリンのピーク面積})}{(\text{標準試料のN-ニトロソバレニクリンのピーク面積})} \times 100$$

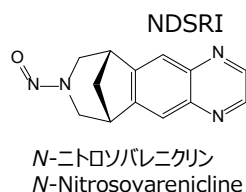
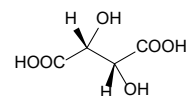
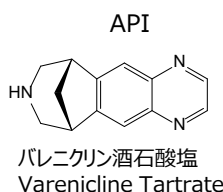
標準試料 : 1 ng/mL N-ニトロソバレニクリン in メタノール

試料1 : 0.5 mg/mL バレニクリン酒石酸塩 in メタノール

試料2 : 0.5 mg/mL バレニクリン酒石酸塩, 1 ng/mL N-ニトロソバレニクリン in メタノール

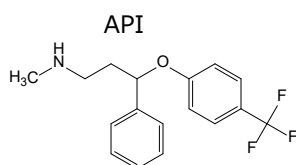
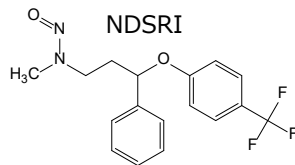
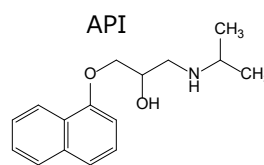
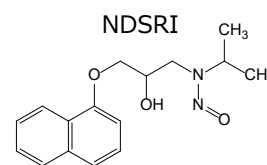
System Suitability	Criteria	Result
The % RSD(n=6) of 1 ng/mL N-Nitrosovarenicline	≤ 10%	5.1%
The % RSD(n=6) of 1 ng/mL N-Nitrosovarenicline	85-115%	99.1%

※2 “Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-ESI-HRMS) Method for the Determination of Varenicline Nitroso-Drug Substance Related Impurity (NDSRI) in Chantix™ Drug Product and Varenicline Drug Substance”.
<https://www.fda.gov/media/151470/download> (accessed 2025-10-15)



【2025薬学会】

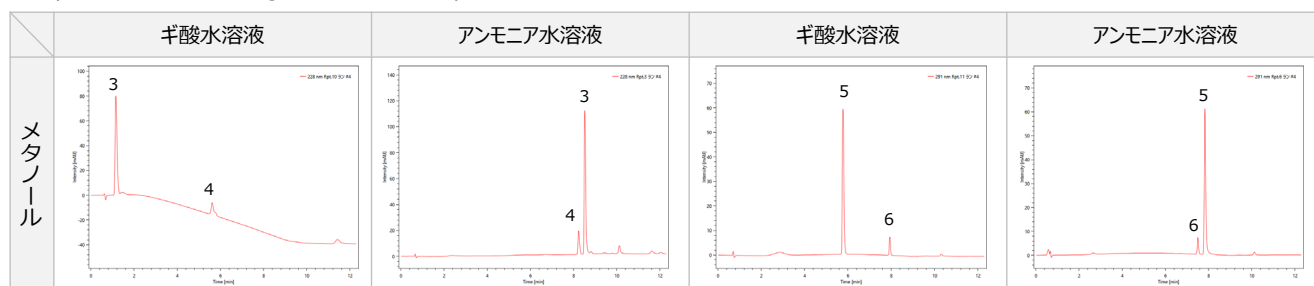
【フルオキシセチン, プロプラノロール】

3. フルオキシセチン
Fluoxetine4. *N*-ニトロフルオキシセチン
N-Nitrosofluoxetine5. プロプラノロール
Propranolol6. *N*-ニトロプロプラノロール
N-Nitrosopropranolol

■ 溶離液の違いによる保持挙動の比較

[Analytical conditions]

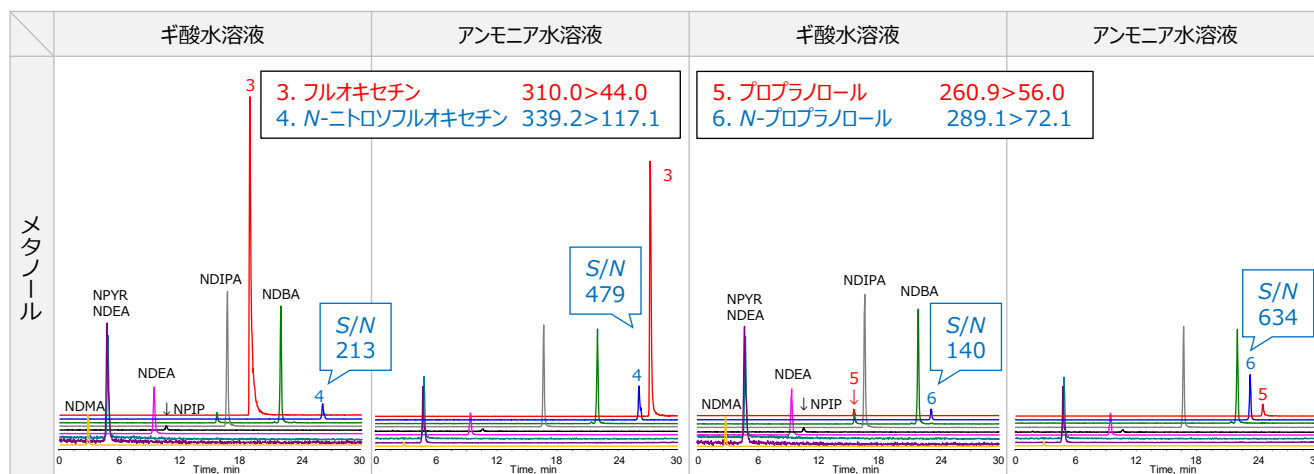
Column : L-column3 C18 (3 μ m, 12 nm); 3.0 mm I.D. $\times$ 50 mm L.; Cat. No. 821490
 Eluent : A: メタノール, B: 水系溶媒, グラジエント溶離
 Flow rate : 0.4 mL/min
 Temperature : 40°C
 Detection : UV 240 nm
 Injection volume : 1 μ L
 Sample : API (100 μ g/mL); NDSRI (10 μ g/mL) in 80%メタノール
 System : Agilent 1260 Infinity II



■ 溶離液の違いによる保持挙動とS/Nの比較(APCI)

[Analytical conditions]

Column : L-column3 C18 (3 μ m, 12 nm); 2.1 mm I.D. $\times$ 150 mm L. ; Cat. No. 811020
 Eluent : A: メタノール, B: 水系溶媒, A%: 10-50-90% (0-15-30 min)
 Flow rate : 0.2 mL/min
 Temperature : 40°C
 Detection : APCI-MS/MS (+)
 Injection volume : 5 μ L
 Sample : 各1-2 μ g/mL in メタノール
 System : LC: Ultimate 3000 Bio RS (Thermo Fisher Scientific K.K.); MS/MS: 3200 QTRAP (SCIEX)



- 溶離液にメタノールとアンモニア水溶液を用いると、パレニグリンと同様にNDSRI、APIの順で溶出しました。このデータシートでのAPI、NDSRIは、溶離液のpHによって溶出順をコントロールできることが確認できました。
- 低分子ニトロソアミン不純物は、ギ酸水溶液とアンモニア水溶液のどちらを用いても、保持挙動・検出感度はほとんど変わりませんでした。アンモニア水溶液では低分子ニトロソアミン不純物の後にAPIとNDSRIが溶出しました。

【2025LC&LCMSテクノ, HPLC2025】