



医薬品におけるニトロソアミン類生成の  
リスク軽減について:

## 医薬品添加剤の役割



**Ricarda Leister – Head of R&D**

MEGGLE Excipients, Wasserburg, Germany





## 1. はじめに

医薬品や添加剤の製造におけるニトロソアミン不純物の問題は、製薬業界や保健当局にとって重大な関心事となっている。2018年6月、FDAはアンジオテンシンII受容体拮抗薬であるバルサルタンから検出された不純物であるN-ニトロソジメチルアミン（NDMA）の存在を通知した。7月、EMAは不純物の検出に伴うバルサルタンの一部医薬品の回収に関するプレスリリースを発表した。その後、ラニチジン、ニザチジン、メトホルミンなど、いくつかの医薬品から許容できない量のニトロソアミン類が検出された。

ニトロソアミンという用語は、アミン（ $R_1N(-R_2)-N=O$ ）に結合したニトロソ基の化学構造を持つ化合物の一群を表す。この化合物は、アミンと亜硝酸（酸性条件下では亜硝酸塩）のニトロソ化反応によって生成される。最も懸念されるのは第2級アミンである。しかし、第3級アミンもまたより複雑な経路でニトロソ化を起こすことがある。したがって、試薬、触媒、溶媒、不純物として導入されるものと同様に、出発物質または中間体、最終構造の一部として存在するものも含め、すべての第2級および第3級脂肪族および芳香族アミンについて考慮する必要がある。反応は、熱や酸性条件によって触媒される。

ニトロソアミン類の一部は、国際がん研究機関（IARC）によりヒト発がん物質の可能性が高い、または可能性があるとして分類されている。これらの化合物は、産業界のためのICHガイダンスM7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk（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ガイドライン）において、「cohort of concern」化合物と呼ばれている。このガイダンスでは、ニトロソ化合物のような既知の変異原性発がん物質は、潜在変異原性不純物への曝露に伴うヒト発がんリスクが無視できるレベル以下に管理されるべきであると勧告している。

いくつかの当局は、ニトロソアミン不純物に関するガイダンス（EMA、FDA）や情報を発表し、医薬品製造販売業者（MAH）に対し、医薬品中のニトロソアミン生成に関するリスク評価を実施するよう要請した。

添加剤は、添加剤中に存在する前駆物質（亜硝酸塩、アミンなど）を介してニトロソアミン類の生成に寄与する可能性がある。亜硝酸塩の不純物は、一般的に使用される添加剤のほとんどに、少なくとも微量ながら含まれている。Boetzelら（2022）による最近の発表では、Lhasa社が構築したデータベースを参照し、一般的に使用される添加剤の亜硝酸塩の値が報告されている。しかし、元の製造者名は公表されていない。さらに注意すべき重要な点は、業界内の異なる企業によって測定または提供された値であり、使用された分析方法は標準化されていないことである。したがって、観測されたばらつきの一部は、採用された分析方法に起因する可能性が否定できない。

### アップデート

今回、乳糖中の微量亜硝酸塩を測定できる新しい分析法の開発にMEGGLEが取り組んだことがきっかけで、ホワイトペーパーを更新することとなった。この新しい分析法は、ミュンヘン工科大学（TUM）の協力のもと、検証に成功した。従って、この新しい測定法によって、弊社の幅広い乳糖製品群において微量濃度の亜硝酸塩の測定が可能になったことは重要な成果である。





## 2. 乳糖：亜硝酸塩含量と潜在的な発生源

乳糖の亜硝酸塩含量は一般的に非常に低い。Boetzelら(2022)の発表では、8社の乳糖の亜硝酸塩含量の範囲は0.07～1.7ppmで、平均は0.54ppmであった(表1)。微結晶セルロースも同様の範囲0.04～2.4ppmを示し、平均は0.70ppmであった。一方、クロスポビドンは平均8.3ppm、最大値14ppmの亜硝酸塩で、最も高い値を示した。

表 1. データベースから選択された8種類の添加剤中の亜硝酸塩の結果と、その添加剤を調達した添加剤供給業者の数。(Boetzel et al., 2022)

添加剤種類	亜硝酸塩含量 (µg/g)				供給業者数	結果数
	最小値	平均値	中央値	最大値		
コーンスターチ	0.055	0.21	0.15	0.61	6	20
クロスカルメロースナトリウム	0.17	0.42	0.33	1.0	4	14
クロスポビドン	0.79	6.5	8.3	14	5	15
ヒプロメロース	0.01	0.80	1	5.0	5	49
<b>乳糖水和物</b>	<b>0.07</b>	<b>0.54</b>	<b>0.5</b>	<b>1.7</b>	<b>8</b>	<b>34</b>
ステアリン酸マグネシウム	0.1	2.6	2.4	6.1	9	44
微結晶セルロース	0.04	0.70	0.5	2.4	9	73
ポビドン	0.10	0.83	0.5	2.3	5	52

しかし、亜硝酸塩の寄与は添加物と想定されるため、製剤中のすべての添加剤の合計と総量を考慮しなければならない。賦形剤／希釈剤は一般的に大きな割合で使用されるため、亜硝酸塩含量が比較的に少なくても重要な役割を果たす可能性がある。

添加剤中の亜硝酸塩の存在(USP Nitrosamine Exchange)に関する現在進行中の議論には混乱があるようだ。一方で亜硝酸塩の潜在的な起源に関して多くの不確実性がある。その一方で「亜硝酸塩フリー」という用語に関して誤解があり、これは絶対的な定義ではなく、むしろ分析法の感度や適用限界に依存する。例えば、米国や欧州連合では、アルコールの含有量が0.5%以下であれば「ノンアルコール」と表示することができる。重要な問題は、亜硝酸塩についてどのような基準値が適切かということである。





「亜硝酸塩フリー」の添加剤が達成できない可能性があることを念頭に置いて、亜硝酸塩濃度の科学的な限界値を、重要な有効成分について設定すべきである。これは単に手法の感度（検出限界）の問題である。水やその他の天然物質（植物性または動物性）には、少なくとも微量の亜硝酸塩が含まれている。

硝酸塩と亜硝酸塩の主な発生源のひとつは、硝酸アンモニウム、尿素、硫酸アンモニウムなどの窒素系肥料の使用で、作物の成長に必要な栄養素を供給するために一般的に使用されている。窒素循環の生化学反応に従って、アンモニウムが亜硝酸（ $\text{NO}_2^-$ ）に変換されることを硝化と呼ぶ。硝化は2段階の好気性生物学的プロセスで、アンモニウムを亜硝酸に酸化し、さらに亜硝酸を硝酸（ $\text{NO}_3^-$ ）に酸化する。これらの変換を担う細菌は硝化細菌と呼ばれ、通常、土壌、水、廃水中に様々な種や株で存在する。

水中の亜硝酸塩のもう一つの発生源は酸性雨である。窒素酸化物、具体的には二酸化窒素（ $\text{NO}_2$ ）と一酸化窒素（ $\text{NO}$ ）が大気汚染物質として大気中に放出される場合である。これらは雨水に溶けて硝酸（ $\text{HNO}_3$ ）を形成する。硝酸はさらに環境中の他の化合物と反応し、最終的には水中で亜硝酸（ $\text{NO}_2^-$ ）に変化する。窒素酸化物（ $\text{NO}_x$ ）は、空気中の窒素が酸素と高温で反応したもので、例えば燃焼時などに、通常摂氏1,000度以上で発生する。

### 3. MEGGLE の添加剤中の亜硝酸塩

弊社は長年にわたり、乳糖の亜硝酸塩含量を定期的にモニタリングしている。硝酸塩含量もまたベビーフードにとって重要であるため、乳製品用に特別に設計され、乳児用乳製品に要求される低亜硝酸塩含量を測定するのに十分な感度を持つ方法を導入した（ISO 14673-3:2007-05）。弊社の医薬品グレードの乳糖では、亜硝酸塩は通常、乳糖粉末から検出されない（検出限界0.2ppm以下）。注目すべきは、すべての値が、Boetzelら（2022）が乳糖について報告した平均値よりも低いことである。添加剤中の亜硝酸塩を測定する分析法に関するさらなる情報と考察は第4章に記載されている。

乳糖は天然の物質であり、化学合成されたものではない。二級、三級、四級アミンや亜硝酸塩の存在の原因となる有機溶媒、触媒、その他の試薬は使用していない。医薬品グレードの乳糖の製造には、数回の洗浄と精製工程、および二度の結晶化が含まれる。この製造工程では、ニトロソアミン類の生成に必要な強酸性条件はつくられず、乾燥には間接加熱のみが使用される。ここで燃焼による $\text{NO}_x$ 発生の可能性はない。

一方で、乳糖水和物はチーズ製造の副産物であるホエイから分離・精製される。従って、亜硝酸塩の起源は原料のホエイと水からの可能性がある。

硝酸塩と亜硝酸塩の検査は、ホエイの受入検査の一つとして行われる。合格基準は以下の通り：硝酸塩 < 50ppm、亜硝酸塩 < 5ppm。製造水はドイツのTrinkwVに従って定期的にモニターされており、過去3年間、0.02ppm以下の非常に低いレベルを示している。





それぞれの原料について関連する要因と実際の測定値は、サプライヤーステートメントにてIPEC Questionnaireとともに記載されている。

IPEC 連盟は最近、「Questionnaire for Excipient Nitrosamines Risk Evaluation」を更新した（2023年2月）。この質問票は、EMAのガイダンス「Questions and answers for marketing authorization holders（販売承認取得者/申請者向け質疑応答集）」やFDAのガイダンス「Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs（ヒト用医薬品中に含まれるニトロソアミン不純物の管理）」などから添加剤に関する考慮すべき事項が反映されている。IPEC Questionnaireには、亜硝酸塩とニトロソアミン類の測定値だけでなく、リスクの第一指標として添加剤の構造と起源を考慮するための基盤が含まれている。標準形式の使用により、添加剤供給業者からのデータ収集が容易になり、製薬メーカーのニトロソアミンリスク評価を支援する。

添加剤メーカーは、実際の医薬品製剤と活性物質の特性に関する具体的な知識が必要であるため、ニトロソアミンのリスク評価を行うことができないことに留意すべきである。

## アップデート - 新分析法 & 測定結果

有効性が確認された新しい分析法により、乳糖中の微量亜硝酸塩の測定が可能になった。新分析法はイオンクロマトグラフィー（IC）をベースにしており、これはイオン性溶質の分離と定量に使用される液体-固体クロマトグラフィーの手法である。IC分析では、固相として異なるカラム、液相として異なる溶離液系を選択することができる。イオンの交換と分離は、適用される固定相（イオン交換カラム）に対するイオンの電荷と親和性に依存し、分離されたイオンは、導電率測定やUV/VIS分光法を用いて検出・定量される。最もよく使用されるカラムは、水酸化物選択的陰イオン交換カラム、炭酸塩溶離液陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラム、イオン排除カラム、アミノ酸カラム、逆相カラムである。ラクトースマトリックス中の亜硝酸塩を良好な分離能で定量するために、カラム、溶離液システム、グラジエント、流速、およびサンプル前処理に関してICメソッドのセットアップを最適化した。乳糖を用いたメソッドバリデーションに基づく定量限界（LOQ）は0.03 ppm、検出限界（LOD）は0.01 ppmである。

新測定法の検証に成功した後、異なる製品群（篩過、粉碎、造粒、スプレードライおよび無水乳糖、ならびに粉碎および篩過した吸入グレード乳糖）から少なくとも3検体を分析した。その結果、すべて0.01 ppm以下との結果が得られた（表2）。





表2. 新分析によるMEGGLE添加剤中の亜硝酸塩濃度。定量限界 (LOQ) 0.03 ppm、検出限界 (LOD) 0.01 ppm

製品グループ	商品名	亜硝酸塩含有量	試験ロット数
篩過乳糖	SpheroLac® 100	< 0.01 ppm	3
粉碎乳糖	GranuLac® 200 GranuLac® 200 US	< 0.01 ppm	5
造粒乳糖	Tablettose® 70 Tablettose® 80 Tablettose® 100	< 0.01 ppm	3
スプレードライ乳糖	FlowLac® 90 FlowLac® 100	< 0.01 ppm	6
無水乳糖	DuraLac® H	< 0.01 ppm	3
吸入グレード 篩過乳糖	InhaLac® 120 InhaLac® 230 InhaLac® 251	< 0.01 ppm	3
吸入グレード 粉碎乳糖	InhaLac® 145 InhaLac® 300 InhaLac® 400	< 0.01 ppm	3

MEGGLEの医薬品グレードの乳糖製品群では、亜硝酸塩の値が0.01 ppm以下であるため検出されず、基本的に「亜硝酸塩フリー」であることを意味する。MEGGLEの直接打錠 (DC) 乳糖グレード (造粒乳糖、スプレードライ乳糖、無水乳糖) においても、亜硝酸塩の含有量は最低量であり、これは医薬品製造におけるニトロソアミン類生成のリスクを軽減/低減するための完璧なソリューションとなりえる。





## 4. 医薬品製造におけるリスク軽減戦略

第一段階として、原薬中のニトロソアミン生成または不純物のリスクを評価する必要がある。最近発表されたNandaらの論文 "Inhibition of N-Nitrosamine Formation in Drug Products investigating possible APIs and formation mechanisms"(2021)は貴重な知見を提供している。

EMAは、製造販売業者（MHA）に対し、以下のリスク評価段階を実施するよう求めている：

- 手順 1:** MAHは、原薬及び／又は最終製品にニトロソアミンが存在するリスクがあるかどうかを特定するために、リスク評価を実施する。
- 手順 2:** リスクが特定された場合：MAHは、ニトロソアミン類の存在を確認または否定するために確認試験を実施しなければならない。
- 手順 3:** ニトロソアミン類の存在が確認された場合：MAHは、変更申請を提出することにより、効果的なリスク軽減策を実施する必要がある。

ニトロソアミン生成の（潜在的な）リスクが特定された場合、最善のリスク軽減策を評価しなければならない。原薬の製造工程やその適応の可能性に加え、処方や使用される添加剤、医薬品製剤の製造工程を見直し、必要であれば変更申請を行う必要がある。詳細の説明と考慮すべき点はEMAのQ&Aに記載されているが、ここでは添加剤と医薬品製剤の製造工程に関する点のみを取り上げる。

リスクを軽減するために、以下のような処方や工程の変更が考えられる：

- 亜硝酸塩含有量の違いを評価するために、様々な供給業者からのバッチの試験を実施し、亜硝酸塩含有量に有意な違いがある場合には、供給業者の変更を検討する。
- 添加剤を同じ機能を有するが亜硝酸塩の値がより低い別のタイプの添加剤（例えば崩壊剤）と交換することを検討する。
- 亜硝酸塩を多く含む添加剤の量を原薬に対して減らす。  
適切な酸化防止剤、pH調整剤、亜硝酸塩捕捉剤の添加など、他の処方戦略を検討する。
- 医薬品製造時のニトロソアミン生成を促進する工程条件、特に水と熱は避ける。代わりに直接打錠法を使用する。
- 乳糖水和物のような水分活性の低い添加剤を使用するか、水蒸気バリア性の改善された包装を使用することにより、水分の取り込みを避ける。
- 包装の蓋となる箔にニトロセルロースが含まれていないことを確認する。





規制要件に関して、添加剤メーカーを変更することは既存製品にとって最も簡単な選択肢である。予期せぬ高値や差異がある場合は、供給業者と直接連絡を取ることが望ましい。

メトホルミン中の N-ニトロソジメチルアミンの生成に関する研究 (Schlingemannら, 2022) では、原薬の製造サイト現場間および添加剤供給業者間では大きな違いが確認された。

潜在的な阻害剤としては、例えばアスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、 $\alpha$ -トコフェロール、コヒー酸、フェルラ酸、ならびに捕捉剤としてアミノ酸（グリシン、リジン、ヒスチジン）が挙げられる (Nandaら, 2021; Bayneら, 2023)。

市販製品に問題がある場合には、直接打錠製剤へ処方変更することも良い選択肢かもしれない。医薬品の製造工程で水を添加すると、加工中や保管時の N-ニトロソアミン生成、増加のリスクが上昇する。Moserら (2023) は、最近発表した研究で、同様の原料を使用したシステムでの湿式造粒と比較して、直接打錠法が N-ニトロソアミン生成のリスクを軽減することを実証した。



**MEGGLEの製品ラインナップは、直接打錠工程をサポートするために設計された様々な添加剤を取り揃えています。私たちのInnovation & Formulation Campusで、潜在的な再処方に関する試みをお手伝いいたします。**

## 5. 亜硝酸塩測定の実験方法

添加剤の微量濃度の亜硝酸塩含有量は重要な役割を果たすため、分析方法に関していくつか考慮する必要がある。

ニトロソアミン類を ppb 濃度で測定する高感度の標準法の提供においては、大きな進歩が見られている。しかし、添加剤中の微量濃度の亜硝酸塩濃度を測定するための標準法はまだ確立されていない。Boetzelら (2022、Lhase Nitrite database) は、亜硝酸塩含有量を測定するための分析技術として、導電率検出を備えたイオンクロマトグラフィーが主に使用されていると報告した (67 %、異なるサンプル前処理技術を使用)。さらに、その結果の 29 % は、液体クロマトグラフィーと UV-Vis 検出器を組み合わせたグリース反応によって得られている。残りのわずかな分析では、グリース反応を伴う UV-Vis 分光法 (2 %) または UV-Vis 分光法のみ (2 %) が用いられた。

グリース反応は、さまざまなサンプル中の亜硝酸塩を検出するために一般的に使用される確立された方法である。この方法は、酸性条件下で亜硝酸塩とスルファニル酸および N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩を選択的に反応させることで、分光光度法を用いて測定できる赤紫色のアゾ色素を生成する。試料の 540nm における吸光度を所定の標準曲線と比較することにより、試料中の亜硝酸濃度を算出することができる。







乳製品中の亜硝酸塩および硝酸塩の定量にはISO規格が利用できる（乳および乳製品 - 硝酸塩および亜硝酸塩含量の定量、ISO 14673-1、-2、-3）。この方法は、グリース反応後の分光検出に基づいている。

方法2はセグメントフロー分析（SFA）、方法3はフローインジェクション分析（FIA）を用いる。カドミウムで硝酸塩を亜硝酸塩に還元した後に、硝酸塩はこれらの方法で測定できる。MEGGLEは、乳糖製品の定期モニタリングにISO 14673-3:2007-05の方法を使用している。

この分析法は、前処理としてインライン透析を用いた自動のフローインジェクション分析と、540nmでの赤色アゾ色素の分光検出（グリース反応）から構成されているこの方法は、厳格なベビーフード（粉ミルクおよびミルクベースの乳児用食品）の要件も満たすように設計されている。定量限界（LOQ）は0.5ppm、検出限界（LOD）は0.2ppmである。

水や環境の検査では、導電率とUV/VIS検出を備えたイオンクロマトグラフィーが、亜硝酸塩を含むさまざまな陰イオンを同時に測定するための標準法となっている（ISO 10304-1:200-07など）。イオンクロマトグラフィーは、イオンの電荷と固定相（イオン交換カラム）への親和性に応じてイオンを交換・分離することを基本とする。分離されたイオンは、導電率測定やUV/VIS分光法を用いて検出・定量される。しかし、イオンクロマトグラフィーの主な課題の1つは、ターゲットイオンの分離と定量を妨害するイオンを含む可能性のある製品マトリックスからの干渉（マトリックス効果）を受けやすいことであり、共溶出と同様に不正確な結果につながる。

例えば、マトリックス中に乳酸、酢酸、クエン酸などの有機酸が存在すると、亜硝酸塩に通常使用される低波長(210nm)での分離やUV/VIS検出に影響を与える可能性がある。同様に、塩化物のような陰イオンが存在すると導電率測定に支障をきたしたり、マトリックス中のナトリウム、カリウム、カルシウムのような陽イオンやタンパク質の分離を悪化させたり、カラムに過負荷をかけることがある。このようなマトリックス効果を最小限に抑えるために、インライン透析、沈殿、ろ過/プレカラムなどのサンプル前処理技術を使用することがある。選択的イオン交換樹脂と溶離液は、マトリックス中の妨害物質から標的イオンを分離するのに役立つ (Gapper et al., 200; Jireš, J. & Douša, M., 2022, Thermo Scientific Application Note 279)。

Gapperら(2004)は、カドミウムまたはバナジウムによるオンライン・ポストカラム還元を組み込んだ高性能イオン交換法を、グリース試薬による誘導体化と540nmでの検出を組み合わせ、乳製品とベビーフード用に報告した。このクロマトグラフィーによる硝酸塩と亜硝酸塩の分離は、発色性のアゾ誘導体への特異的なポストカラム変換と組み合わせられ、従来のアッセイの潜在的なマトリックス干渉の制限や、他に報告されているクロマトグラフィー検出方法の固有の欠点を回避している。





高圧イオン交換質量分析法 (Ngere et al., 2023) や質量分析計と超高速液体クロマトグラフィー法 (Jireš, J. & Douša, M., 2022) は、干渉の問題を克服するための代替参照法となりうる。とはいえ、これらの方法は費用が高く、定期的な検査法としては実用的でないことが多い。

他の有望な微量法は、Moorcroftら (2001) とWanら (2017) によって包括的にレビューされている。しかし、彼らのレビューで比較された方法は、ほとんどが水/廃水または生物学的流体マトリックスの亜硝酸塩測定に使用されていた。

最後に、正確で信頼できる結果を保証するために、マトリックスの種類ごとに方法を検証することが極めて重要である。

### アップデート- 亜硝酸塩定量へのIC応用研究

MEGGLEは、TUMとの新測定法の検証の成功に加え、Thermo Fischer Scientific社と共同でICの応用研究も実施した。

この研究では、微量濃度の亜硝酸塩測定のためのいくつかの可能性のあるICセットアップが評価された。ここでの主な課題のひとつが、製品マトリックスからの干渉 (マトリックス効果) であった。

乳糖にはppmの範囲でミネラル塩や有機酸のイオンが含まれているが、これらはターゲットイオンの分離と定量を妨害し、共溶出による不正確な結果に繋がる可能性がある。

Thermo Fischer Scientificのアプリケーションラボでは、炭酸塩システムやグラジエント水酸化物システムなど、導電率測定やUV検出と組み合わせたいくつかのICシステムの設定が評価された。テスト設定においては、マトリックス除去システムが使用された。

### 材料と方法

本研究では、濃度50 g/Lのラクトース溶液を調製した。本測定法の目標定量下限は、固形分に関する亜硝酸塩20 µg/kg (0.02 ppm) であり、試験溶液中の1 µg/Lに相当する。標準溶液には1 µg/Lの亜硝酸塩が含まれていた。

本研究で使用したさまざまなカラム、溶離液、検出システムを表3に示す。

表3. 使用したICシステムの材料と方法。定量下限 (LOQ) 0.02-0.05 ppm。

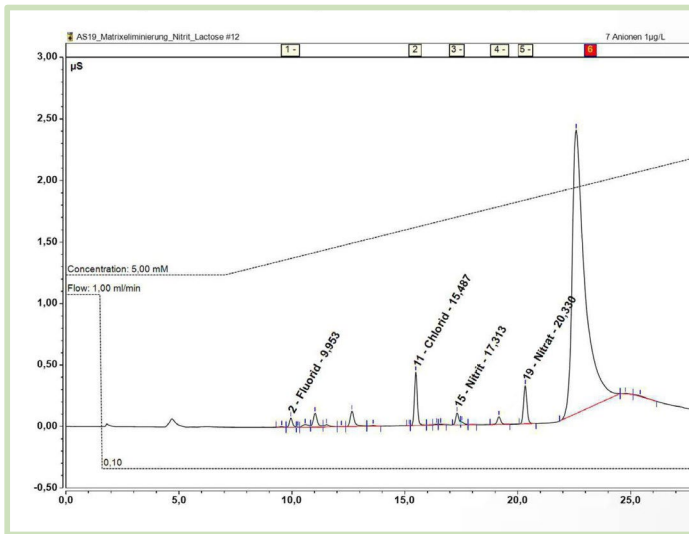
IC システム (Dionex™ Integriion™ and Dionex™ Aquion™)		
カラム	溶離液システム	検出
IonPac™ AS-14A	イソクラティック炭酸塩システム	導電率測定とUV検出 (210 nm)
IonPac™ AS11-HC, AS-15, AS-18, AS-19 and AS-30	グラジエント水酸化物システム	導電率測定とUV検出 (210 nm)



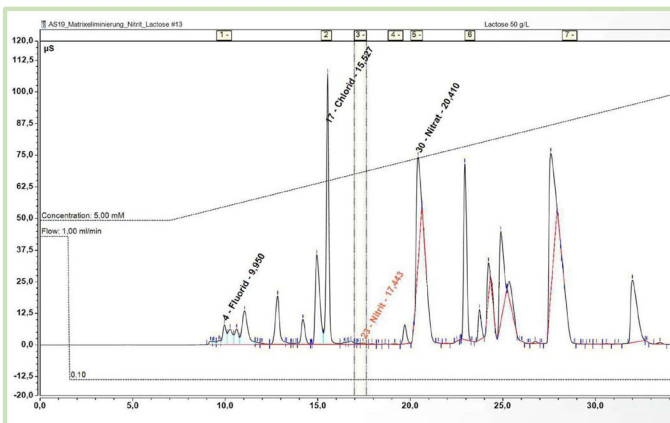
これらのカラムは通常、水分析などの無機陰イオンの分析に使用される。

標準溶液では、少量の亜硝酸塩の定量が可能であった(クロマトグラム1を参照)。一方、ラクトース溶液に関しては、共溶出の影響で、この低濃度で亜硝酸塩をUV検出でも導電率測定においても、信頼性のある定量をすることはできなかった(クロマトグラム2+3を参照)。

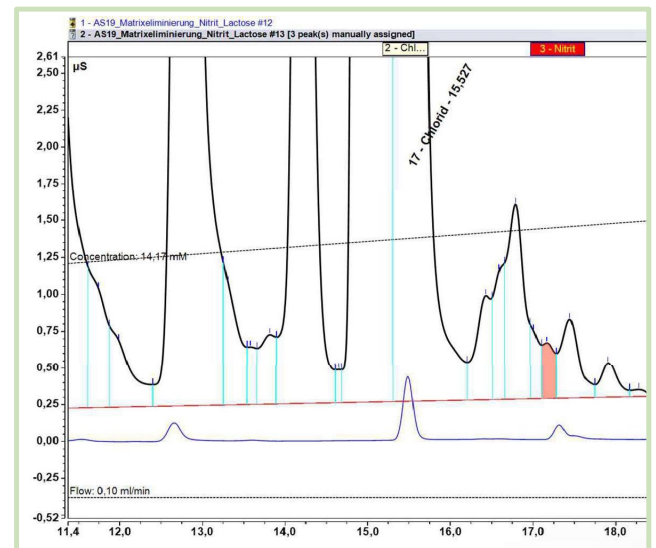
クロマトグラム1: 標準溶液 (1 µg/L 亜硝酸塩) を導電率で測定



クロマトグラム2: ラクトース溶液 (50 g/L) を導電率で測定



クロマトグラム3: ラクトース溶液 (50 g/L) と標準溶液の複合



そこで、代替アプローチとして、ICシステムをポストカラムグリース誘導体化および525 nmでのUV検出と組み合わせた。

またこの方法でも、濃度50 g/Lのラクトース溶液を調製した。

この方法の目標定量下限は0.1 µg/Lであった。固形分に関連する亜硝酸塩は、試験溶液中で1 µg/Lに相当する。標準液には1 µg/Lの亜硝酸塩が含まれていた。

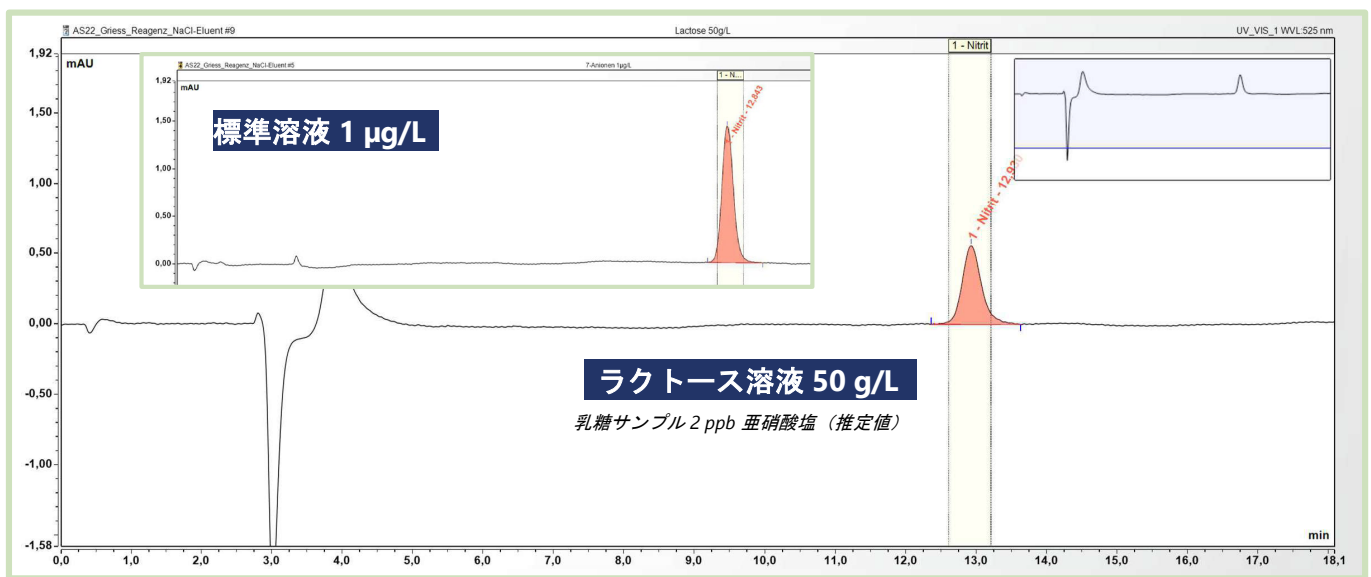


この研究では、NaClを溶離液とするIonPac™カラムAS-22を備えたDionex™ Integrion™を、カラム後のグリース誘導体化と525 nmでのUV検出と組み合わせた。

この方法では、ラクトース溶液中の亜硝酸塩1 µg/Lを安全に定量することができ、干渉ピークは存在しなかった(クロマトグラム3を参照)。試験したGranuLac® 200 サンプルの亜硝酸塩の量は2 ppb (0.002 ppm)と推定され、これは弊社の新しい測定方法での検証結果(検出限界 0.01 ppm 未満の乳糖の結果)と十分一致する。

#### クロマトグラム4:

標準溶液(亜硝酸塩 1 µg/L)とラクトース溶液(50 g/L)の比較(IC Plusポストカラムグリース反応および525 nmでのUV検出を使用)。



この応用研究から、微量濃度の亜硝酸塩含有量の測定は困難な可能性があり、製品のマトリックスを考慮する必要があることが判明した。

## 6.まとめと展望

医薬品中のN-ニトロソアミン生成のリスクを最小限に抑えるには、原薬と添加剤の種類と量を慎重に選択することが重要であり、特に原薬の製造工程と潜在的な不純物や前駆物質を第一に考慮する必要がある。しかし、医薬品の製造工程自体もニトロソアミン類の生成に影響を与える可能性があり、その点において直接打錠は、水と熱の使用を避けるため好ましいプロセスである。通常、既存処方はそれに応じて、処方変更することができる。

直接打錠用に特別に設計されたMEGGLEの添加剤は、湿式造粒から直接打錠への切り替え、製剤中の添加剤量の削減、必要な打錠圧の低減、または必要な崩壊剤の量の削減に寄与し、N-ニトロソアミン生成のリスクを軽減する。





IPEC questionnaireを用いたニトロソアミンのリスクステートメントは、添加剤選択の出発点として用いることができる。重要な製品の供給業者の選定と適格性確認の枠組みとして、異なる供給業者とバッチの亜硝酸塩を試験すべきである。しかしながら、亜硝酸塩含量を測定するために使用される分析法は、潜在的なマトリックス干渉に関して慎重に検討されなければならないことに注意することが重要である。さらに、固形製剤中のN-ニトロソアミン生成を促進するすべての固相相互作用がまだ完全に解明されていないわけではないため、実際の配合での事前試験を行うことが望ましい。局所的なpH勾配、反応性官能基の存在、対イオン効果、形態学的な型、粒子径、構成成分の表面積など、固相反応に影響を及ぼす可能性のある他の要因を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

亜硝酸塩を「含まない」添加剤は達成できない可能性があることを念頭に置き、重要な原薬については科学的な亜硝酸塩濃度の限界値を設定すべきである。これは単に分析法の感度（検出限界）の問題である。追加の試験や精製工程には追加費用がかかるだろう。さらに、添加剤中の亜硝酸塩試験の標準法を確立することは、比較可能で意味のある価値を保証することができ、顧客の添加剤の選択と評価工程をサポートするために強く推奨される。

## アップデート

このアップデートにより、適切な方法を用いれば、ICを用いた亜硝酸塩の定量が非常に微量濃度まで可能であることが示された。ただし、乳糖では共溶出が見られるため、これは課題となる可能性がある。多くの異なる ICの試験設定（6種の異なるカラムで評価）においても、この影響により、微量濃度（20 ppm）の亜硝酸塩においては信頼性の高い定量を行うことはできなかった。ラクトース溶液中の亜硝酸塩の定量のための最も感度の高い試験設定は、ICとポストカラムグリース誘導体化を組み合わせることによって達成された。この試験設定におけるMEGGLEの GranuLac® 200 サンプルの亜硝酸塩推定量は0.002 ppm（2 ppb）と極めて低い値であった。報告されている乳糖中の亜硝酸塩の値は、しばしばこの数値より著しく高い。したがって、MEGGLEは検証された新しい試験法により、弊社の乳糖全製品が「亜硝酸塩フリー」であることを示すことができた。

**MEGGLEがニトロソアミン類に関連するリスクを軽減するためにどのようなお手伝いができるか、さらに詳しくお知りになりたい方は、弊社までご連絡ください。**





## 参考資料

Bayne v. A.C., Mistic Z., Stemmler R.T., Wittner M., Frerichs M., Bird J.K., Besheer A. (2023). N-Nitrosamine mitigation with nitrite scavengers in oral pharmaceutical drug products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.03.022>

Boetzel, R., Schlingemann, J., Hickert, S., Korn, C., Kocks, G., Luck, B., Blom, G., Harrison, M., François, M., Allain, L. R., Wu, Y. & Bousraf, Y. (2022). A Nitrite Excipient Database: A useful Tool to Support N-Nitrosamine Risk Assessments for Drug Products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.04.016>

DIN EN ISO 10304-1:2009-07, Wasserbeschaffenheit\_ - Bestimmung von gelösten Anionen mittels Flüssigkeits-Ionenchromatographie\_ - Teil\_1: Bestimmung von Bromid, Chlorid, Fluorid, Nitrat, Nitrit, Phosphat und Sulfat (ISO\_10304-1:2007); Deutsche Fassung EN\_ISO\_10304-1:2009. (2019). Beuth Verlag. <https://doi.org/10.31030/1518948>

DIN EN ISO 14673-1:2004-05, Milch und Milchprodukte\_ - Bestimmung des Nitrat- und Nitritgehaltes\_ - Teil\_1: Verfahren mit Cadmiumreduktion und Spektrometrie (ISO\_14673-1:2004); Deutsche Fassung EN\_ISO\_14673-1:2004. (2019). Beuth Verlag. <https://doi.org/10.31030/9540983>

DIN EN ISO 14673-2:2004-05, Milch und Milchprodukte\_ - Bestimmung des Nitrat- und Nitritgehaltes\_ - Teil\_2: Verfahren mit segmentierter Fließanalyse (Routineverfahren) (ISO\_14673-2:2004); Deutsche Fassung EN\_ISO\_14673-2:2004. (2019). Beuth Verlag. <https://doi.org/10.31030/9540984>

DIN EN ISO 14673-3:2004-05, Milch und Milchprodukte\_ - Bestimmung des Nitrat- und Nitritgehaltes\_ - Teil\_3: Verfahren mit Cadmiumreduktion und Fließinjektionsanalyse mit In-line-Dialyse (Routineverfahren) (ISO\_14673-3:2004); Deutsche Fassung EN\_ISO\_14673-3:2004.(2019). Beuth Verlag. <https://doi.org/10.31030/9540985>

EMA. Nitrosamine impurities - European Medicines Agency. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/Nitrosamine-impurities#guidance-for-marketing-authorisation-holders-section>

EMA.Q&A :Questions and answers for marketing authorization holders/applicants on CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on Nitrosamine impurities in human medicinal products EMA/CHMP/409815/2020 Rev. 11. 29 July 2022.

EMA ICH M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk - Scientific guideline European Medicines Agency. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential>

Excipients | Lhasa Limited. Lhasa Limited. <https://www.lhasalimited.org/initiatives/nitrites.htm>

FDA ResearchControl of Nitrosamine Impurities in Human Drugs. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-Nitrosamine-impurities-human-drugs>

Fritzsche, M., Blom, G., Keitel, J., Goettsche, A., Seegel, M., Leicht, S., Guessregen, B., Hickert, S., Reifenberg, P., Cimelli, A., Baranowski, R., Desmartin, E., Barrau, E., Harrison, M., Bristow, T., O'Neill, N., Kirsch, A., Krueger, P., Saal, C., . . . Schlingemann, J. (2022). NDMA analytics in metformin products: Comparison of methods and pitfalls. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168, 106026. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106026>

Gapper, L. W., Fong, B., Otter, D., Indyk, H. E. & Woollard, D. C. (2004). Determination of nitrite and nitrate in dairy products by ion exchange LC with spectrophotometric detection. *International Dairy Journal*, 14(10), 881–887. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.015#>





IPEC Questionnaire for Excipient Nitrosamines Risk Evaluation, Feb 2023. <https://www.ipec-europe.org/articles/questionnaire-for-excipient-Nitrosamines-risk-evaluation.html>

Jireš, J. & Douša, M. (2022). Nitrites as precursors of N-nitrosation in pharmaceutical samples – A trace level analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 213, 114677. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114677>

Moorcroft, M. J., Davis, J. & Compton, R. G. (2001). Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta*, 54(5), 785–803. [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(01\)00323-x](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(01)00323-x)

Moser, J., Ashworth, I. W., Harris, L., Hillier, M. C., Nanda, K. K. & Scrivens, G. (2023). N-Nitrosamine Formation in Pharmaceutical Solid Drug Products: Experimental Observations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.027>

Nanda, K. K., Tignor, S., Clancy, J. W., Marota, M., Allain, L. R. & D'Addio, S. M. (2021). Inhibition of N-Nitrosamine Formation in Drug Products: A Model Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(12), 3773–3775. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.08.010>

Ngere, J. B., Ebrahimi, K. H., Williams, R., Pires, E., Walsby-Tickle, J. & McCullagh, J. S. O. (2023). Ion-Exchange Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Life Science, Environmental, and Medical Research. *Analytical Chemistry*, 95(1), 152–166. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04298>

Schlingemann, J., Boucley, C., Hickert, S., Bourasseau, L., Walker, M. L., Celdran, C., Chemarin, T., Pegues, C., Fritzsche, M., Keitel, J., Goettsche, A., Seegel, M., Leicht, S., Guessregen, B., Reifenberg, P., Wetzels, S. J., Müller, T. O., Schooren, F., Schuster, T., . . . Masanes, S. (2022). Avoiding N-nitrosodimethylamine formation in metformin pharmaceuticals by limiting dimethylamine and nitrite. *International Journal of Pharmaceutics*, 620, 121740. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121740>

Thermo Scientific, Application Note 279, Time Savings and Improved Reproducibility of Nitrate and Nitrite Ion Chromatography Determination in Milk Samples | SelectScience. SelectScience. <https://www.selectscience.net/application-notes/time-savings-and-improved-reproducibility-of-nitrate-and-nitrite-ion-chromatography-determination-in-milk-samples/?artID=23548>

USP Nitrosamines Exchange: Nitrosamines Exchange: A knowledge based community for all-things Nitrosamine. <https://Nitrosamines.usp.org/>

Wang, Q., Yu, L., Liu, Y., Lin, L. P., Lu, R., Zhu, J., He, L. & Lu, Z. (2017). Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review. *Talanta*, 165, 709–720. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.044>





世界各地からサポートいたします。

販売に関するご質問がございましたら、  
弊社の営業担当が世界各地で対応いたします：

**アフリカ・中東**

T +20 100 1486 826

hani.calache@megggle.com

**アジア地域**

T +65 9232 3378

siangmeng.chua@megggle.sg

**中国**

T +86 21 3393 2457 308

yi.kang@megggle-china.com

**日本**

T +81 3 3561 3491

yokomizo@megggle.co.jp

**欧州**

T +49 8071 73 118

info.exciipients@megggle.com

**アメリカ合衆国・カナダ**

T +1 845 289 0264

customer.service@megggle.com

**中南米地域**

T +55 11 2893 4831

carolina.almeida@megggle.com

技術サポートが必要でしたら、  
弊社の添加剤エキスパートが世界中でサポートいたします

**Technical department**

T +49 8071 73 623

**Research and Development**

T +49 8071 73 812

[www.megggle-exciipients.com](http://www.megggle-exciipients.com)

MEGGLE GmbH & Co. KG - Business Unit Exciipients

ここに記載された内容は、単に情報提供を目的としたものであり、法的拘束力を有するものではありません。従って、本情報に基づく申請により生じた損害について、弊社は一切の責任を負いません。また、本情報は特許権および実施権の侵害を許諾するものではありません。

