

LC/MS/MS によるプロプラノロール API および 40 mg 錠剤中の変異原性 NDSRI N-ニトロソプロプラノロールの高感度定量分析

医薬品製造工程における規制対象遺伝毒性不純物の検出

著者

Kartheek Srinivas Chidella,
Gaurav Kulkarni, Saikat Banerjee,
and Kannan Balakrishnan
Agilent Technologies, Inc.



概要

ニトロソアミン不純物は、ICH M7 ガイドラインにあるように「懸念すべきコーホート」のカテゴリに入る変異原性不純物で、人が安全に医薬品の摂取をするために管理が必要です。ニトロソアミン原薬関連不純物（NDSRI：Nitrosamine drug substance related impurities）は、構造類似性を API と共有するニトロソアミン不純物に分類され、製剤の製造中または保管中に生成される可能性があります。2018 年以降、許容摂取量を超えるニトロソアミン不純物のために製剤のリコールが複数回ありました。2021 年 7 月以降、さまざまな製剤で、ニトロソアミン原薬関連不純物（NDSRI）に特化したリコールが複数回ありました。最近の例では、ファイザーカナダが、許容摂取量を超える N-ニトロソプロプラノロールの存在のために、さまざまな強度のプロプラノロール錠剤をリコールしました。このため、プロプラノロール API および錠剤中の N-ニトロソプロプラノロールを定量するための高感度 LC/MS/MS メソッドを開発する必要があります。このアプリケーションノートでは、Agilent 6470 LC/TQ を使用した、N-ニトロソプロプラノロールに対して 25 pg/mL の定量下限の高感度の LC/MS/MS メソッドを解説し、メソッド性能に関わるすべての重要なパラメータをプロプラノロール API と錠剤の両方で確立しました。

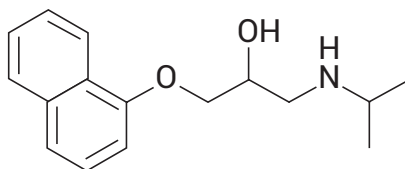
はじめに

医薬品中のニトロソアミン不純物汚染は、重大な安全性への懸念となり、ICH M7 ガイドラインの「懸念すべきコーホート」のカテゴリに入りました。¹ 2018 以降、許容摂取量を超えるニトロソアミンの存在が原因で、サルタン、ラニチジン、メトホルミンなどの製剤のリコールが幾度か発生しました。²⁻⁴ USFDA および EMEA などの規制機関は、ニトロソアミンを形成する可能性がある製剤中のニトロソアミン不純物を管理するためのガイドラインを公開しました。^{5,6} 2021 年 7 月以降は、許容摂取限度を超えるニトロソアミン原薬関連不純物 (NDSRI) の存在が原因で複数回、さまざまなカテゴリの製剤のリコールが発生しました。⁷ その一例として、NDSRI に起因するファイザーカナダのプロプラノロール錠剤のリコールがあります。前述した限度を超える N-ニトロソプロプラノロールがさまざまな強度で存在しました。⁸

このため、プロプラノロール API および錠剤中の N-ニトロソプロプラノロールを定量するための高感度の分析メソッドの開発が必要です。LC/MS/MS は本質的に、選択的かつ感度の高い分析手法で、非常に低い濃度の変異原性不純物の同定および定量に最適なため、医薬品業界で広く採用されています。マルチブルリアクションモニタリング (MRM) モードは、目的の化合物のプリカーサイオンとプロダクトイオンを選択的にフィルタリングし、この結果、分析の感度と選択性が向上するため、定量に使用されています。このアプリケーションノートで使用される Agilent Jet Stream (AJS) イオン源は、サーマルグラジエントフォーカシングテクノロジーを活用し、機器の感度を向上してより低い検出下限を達成します。

N-ニトロソプロプラノロールの許容摂取限度に関する情報が少ないため、プロプラノロールサンプルの濃度に関して広く受け入れられている 0.03 ppm を限度値として、メソッドを開発しました。そして、この限度値よりも大幅に低い 0.005 ppm の定量下限を達成しました。このプロプラノロールサンプル濃度は、N-ニトロソプロプラノロールでは絶対濃度 25 pg/mL に相当します。本研究では、Agilent 6470 LC/TQ を使用して N-ニトロソプロプラノロールを定量し、検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)、特異性、回収率、再現性、直線性などメソッドの性能に関連するすべての重要なパラメータを確立しました。

A



B

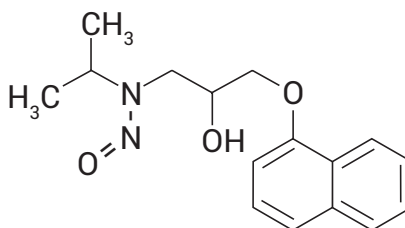


図 1. (A) プロプラノロールおよび (B) N-ニトロソプロプラノロール不純物の化学構造

材料および試薬

N-ニトロソプロプラノロール不純物の標準およびプロプラノロール API は製薬会社から入手しました。プロプラノロール 40 mg 錠剤は地域の薬局から調達しました。その他の LC/MS-グレード溶媒 (メタノール、水) は、Honeywell (シャーロット、ノースカロライナ州、米国) から購入しました。酢酸アンモニウムおよびギ酸は、Fluka (現在の Honeywell) から購入しました。

実験方法

プロプラノロール API (5 mg/mL) のサンプル前処理:

1. 医薬品 API を 25 mg 正確に計量し、15 mL 遠心分離チューブに入れます。
2. サンプル希釈液 5 mL を添加します。
3. 溶液を 1 分間ボルテックスし、次に 15 分間超音波処理をして、API を完全に溶解させます。
4. 溶液を HPLC バイアルに移し、分析のために LC/MS/MS にロードします。

プロプラノロール 40 mg 錠剤の前処理 (API の最終サンプル濃度 5.0 mg/mL):

1. 表示された濃度を使用し、錠剤を十分に砕いて API ターゲット重量の 3 倍以上を得ます。
2. 錠剤 1 錠あたりの平均重量を確認し、25 mg API に相当する重量を正確に計量します。
3. 15 mL 遠心分離チューブに移して 5 mL の希釈液を添加します。
4. 溶液を 1 分間ボルテックスし、次に 40 分間、シェーカーで振とうさせます。
5. 抽出後、サンプルを 4,500 rpm で 15 分間遠心分離します。
6. 0.22 μm PVDF メンブレンを使用して上澄み溶液をフィルタリングし、HPLC サンプルバイアルに移して、分析のために LC/MS/MS にロードします。

LCの構成とパラメータ

表 1. UHPLC の構成と設定

パラメータ	設定値																																								
装置	Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A) Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B) Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B) Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (G7114B)																																								
ニードル洗浄	メタノール/水 (80/20)																																								
サンプル希釈液	100 % メタノール																																								
マルチサンブラ温度	5 °C																																								
注入量	10 µL																																								
分析カラム	Agilent InfinityLab Pursuit Diphenyl XRS, 3.0 × 150 mm, 2.7 µm (p/n A6021150X030)																																								
カラム温度	40 °C																																								
移動相 A	5 mM 酢酸アンモニウム																																								
移動相 B	0.1 % 酢酸メタノール溶液																																								
流量	0.4 mL/min																																								
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> <th>流量 (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>90</td><td>10</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>90</td><td>10</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>5.0</td><td>50</td><td>50</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>9.0</td><td>30</td><td>70</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>13.0</td><td>25</td><td>75</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>13.2</td><td>10</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>15.2</td><td>10</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>15.3</td><td>90</td><td>10</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>18.0</td><td>90</td><td>10</td><td>0.4</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	% A	% B	流量 (mL/min)	0	90	10	0.4	2.0	90	10	0.4	5.0	50	50	0.4	9.0	30	70	0.4	13.0	25	75	0.4	13.2	10	90	0.4	15.2	10	90	0.4	15.3	90	10	0.4	18.0	90	10	0.4
時間 (分)	% A	% B	流量 (mL/min)																																						
0	90	10	0.4																																						
2.0	90	10	0.4																																						
5.0	50	50	0.4																																						
9.0	30	70	0.4																																						
13.0	25	75	0.4																																						
13.2	10	90	0.4																																						
15.2	10	90	0.4																																						
15.3	90	10	0.4																																						
18.0	90	10	0.4																																						
ストップタイム	18 分																																								
波長	230 nm																																								

トリプル四重極質量分析装置の構成およびパラメータ

表 2. 質量分析計の構成とイオン源の設定

パラメータ	設定値
機器	Agilent 6470 トリプル四重極質量分析計
イオン源	Agilent Jet Stream イオン源 (AJS) エレクトロスプレーイオン化
MS/MS モード	MRM
イオンモード	ポジティブ
ガス温度	200 °C
ガス流量	10 L/min
ネフライザ圧力	45 psi
シースガスヒーター	350 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧、ポジティブ	5,500 V
ノズル電圧	1,000 V
MS1/MS2 分解能	0.7/0.7 (unit/unit)

成分の MS/MS 化合物情報

表 3. Agilent 6470 LC/TQ MRM モードの詳細設定

化合物	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	ドウェルタイム (ms)	フラグメンタ (V)	コリジョンエネルギー (V)	CAV (V)	極性
N-ニトロソプロプラノロール (定量イオン)	289.1	259.2	200	60	2	5	+
N-ニトロソプロプラノロール (定性イオン)	289.1	259.2	200	60	4	5	+

データ解析

データの取り込みと解析には、Agilent MassHunter ソフトウェアのバージョン 10.1 MS/MS を使用しました。トランジションは、Agilent MassHunter Acquisition Optimizer ソフトウェアを使用し、フローインジェクションモードで濃度 1,000 ng/mL の原液を 1 µL 注入することにより、最適なプリカーサイオンとプロダクトイオン、フラグメンタ電圧、およびコリジョンエネルギーを測定し最適化しました。

結果と考察

ポジティブモードで Agilent Jet Stream イオン源を使用し、目的の感度が得られるようにプリカーサイオンおよびプロダクトイオン、キャピラリ電圧、フラグメンタ電圧、およびコリジョンエネルギーを含む、N-ニトロソプロプラノールの質量分析パラメータを最適化して、メソッド開発を実施しました。ガス温度、ガス流量、ドウェルタイムを最適化してレスポンスの再現性を確立しました。MRM トランジションを注意深く選択してマトリックス干渉を回避

しました。Agilent InfinityLab Pursuit XRs Diphenyl カラムを使用し、N-ニトロソプロプラノールとプロプラノールとの間でクロマトグラフィーによる分離を達成しました。また、同じ最適化されたカラムとメソッド条件を用いて、プロプラノール N-ホルミル不純物に対する特異性も確立しました。

抽出溶媒および時間に関してサンプル前処理を最適化し、プロプラノール API および錠剤中の N-ニトロソプロプラノールの目的の回収率を達成しました。

特異性、再現性、直線性、回収率、定量下限、および検出下限などの重要なパラメータが確立されます。

表 4 に、得られた定量下限と検出下限および S/N 値を示します。表 5 および 6 に、0.03 ppm のリミットレベルおよび定量下限で得られたブラケットティング標準を含む、再現性データを示します。

キャリブレーション濃度は 0.025 ng/mL ~ 10 ng/mL の範囲で、表 4 に具体的な詳細内容を示します。R² 値は N-ニトロソプロプラ

ノールで 0.99 を超えており、濃度範囲全体にわたり直線的レスポンスを示しています。

表 7 および 8 に、プロパノール API 中の許容限度および定量下限レベル、およびプロプラノール 40 mg 錠剤に含まれる 0.12 ppm レベルにおける、N-ニトロソプロプラノールの回収率の実験の概要を示します。

図 2 ~ 4 に、6470 LC/TQ からの代表的な抽出イオン MRM クロマトグラムを表示し、標準、定量下限、スパイク済み製剤における N-ニトロソプロプラノールの溶出および分離を示しました。DAD クロマトグラムが採取され、質量分析計の汚染を回避するために、廃棄を必要とするより高い濃度のプロプラノール API に相当するリテンションタイムを除外しました。表 9 に示すようにダイバートバルブプログラムを作成することによって、内蔵されたダイバートバルブを用いてこの高い濃度のプロプラノール API を廃棄します。

表 4. N-ニトロソプロプラノールの定量下限、検出下限における、代表的な S/N 比データ、および直線性データ

S. No.	化合物	LOD		LOD (S/N)	LOQ		LOQ (S/N)	R ²	直線性範囲	
		ng/mL	ppm		ng/mL	ppm			ng/mL	ppm
1	N-ニトロソプロプラノール	0.0075	0.0015	34.7	0.025	0.005	107.3	0.99504	0.025 ~ 10	0.005 ~ 2

*S/N 比は、Agilent MassHunter Quantitative ソフトウェアバージョン 10.1 を使用し、RMS アルゴリズム、ノイズ幅 (0.5 分) でサンプルとして選択したリファレンスを用いて計算しました。

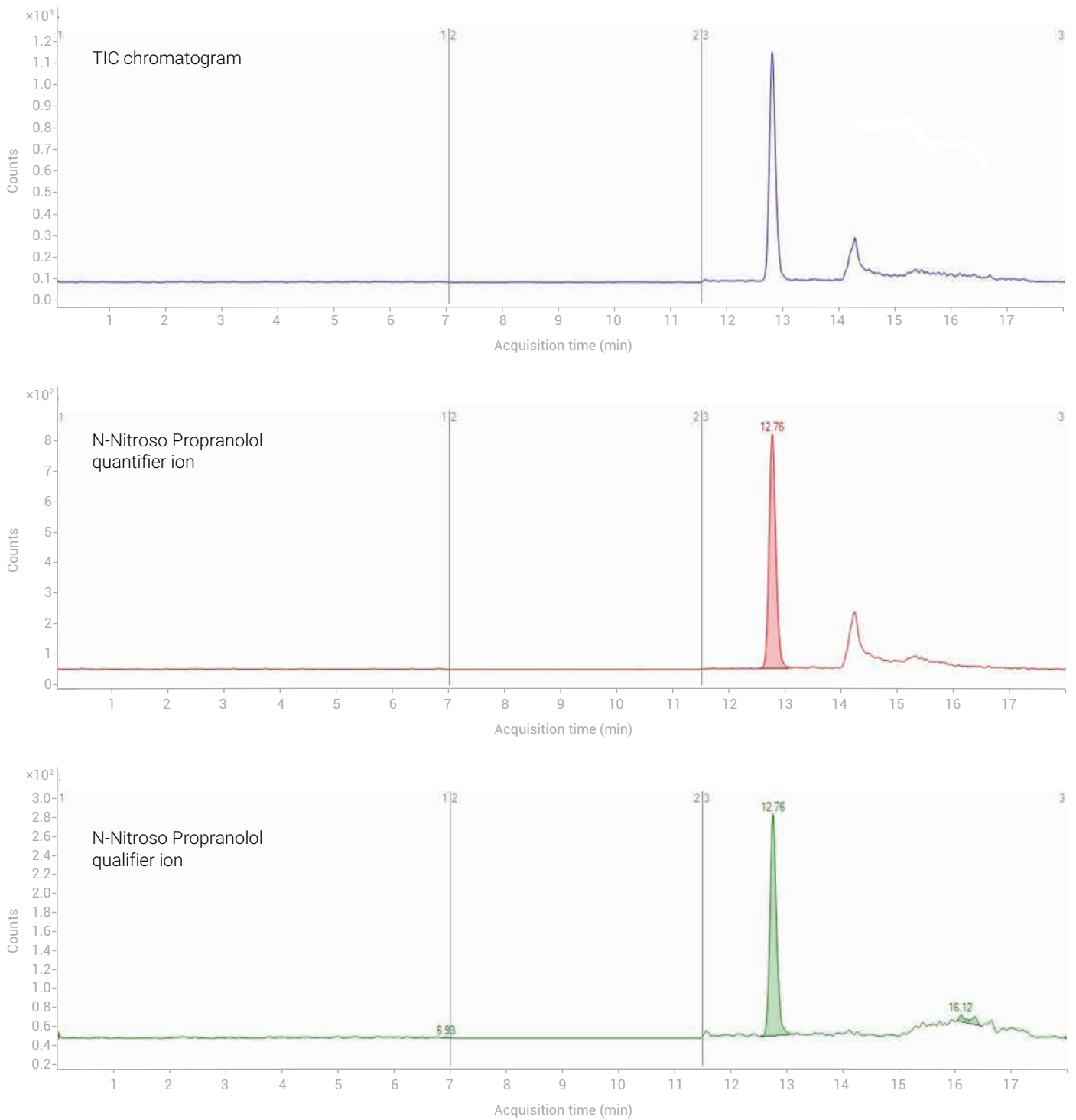


図 2. N-ニトロソプロプラノロール 0.15 ng/mL (API 濃度 5.0 mg/mL に対して 0.03 ppm) における代表的な標準クロマトグラム

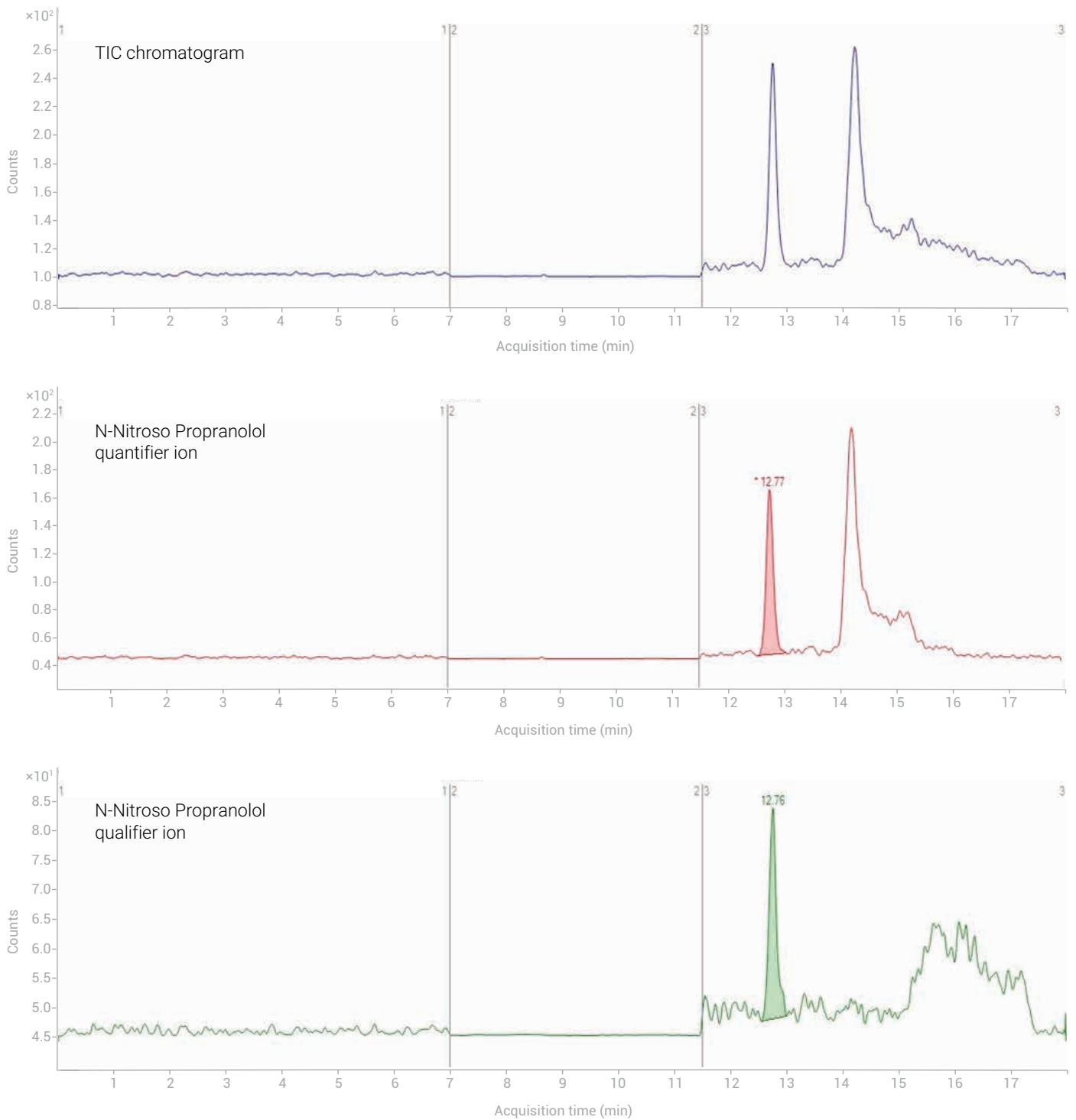


図 3. N-ニトロソプロプラノロール 0.025 ng/mL (API 濃度 5.0 mg/mL に対して 0.005 ppm) における代表的な定量下限クロマトグラム

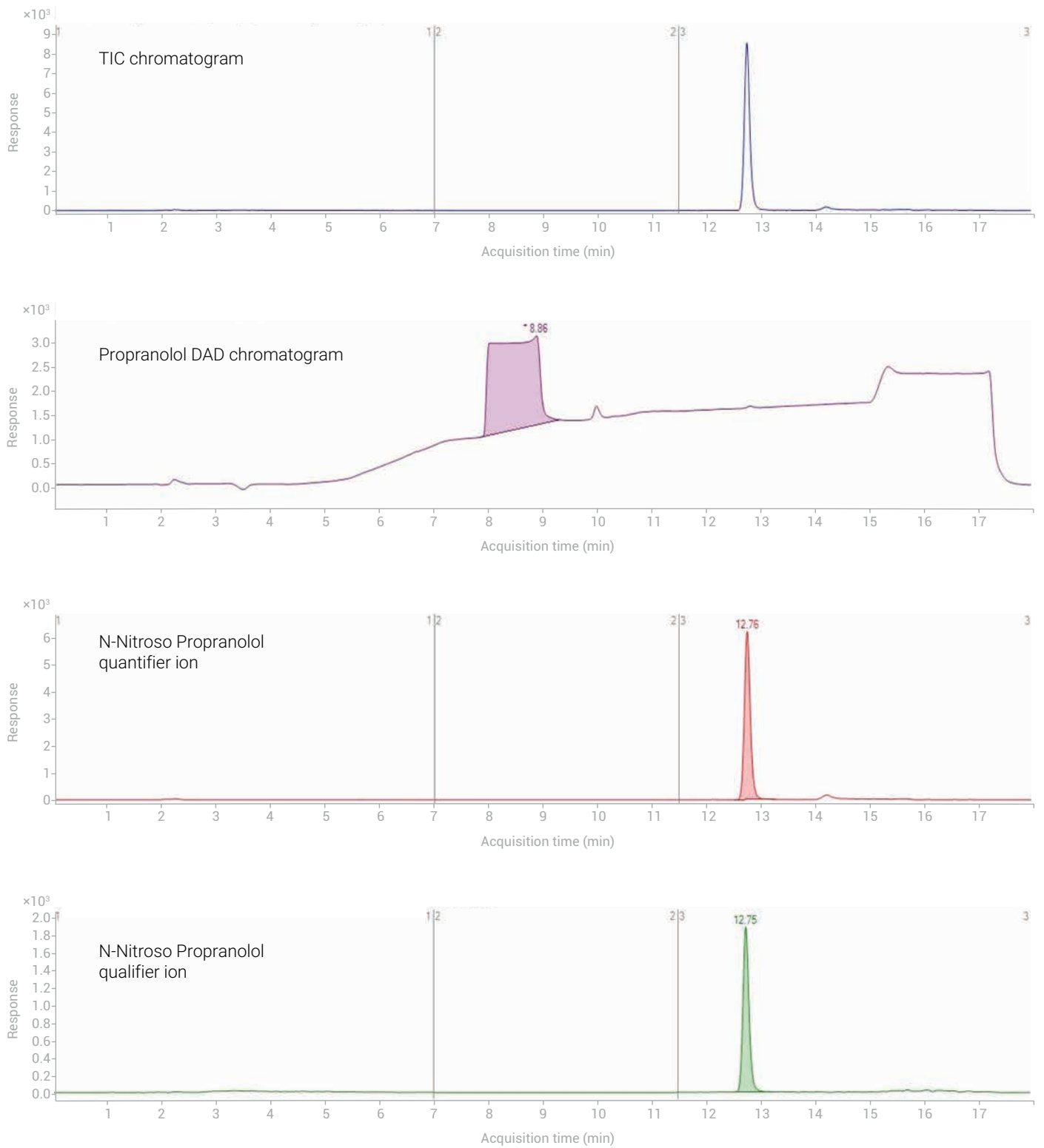


図 4. プロプラノロール 40 mg 錠剤に添加された標準 N-ニトロソプロプラノロール 0.6 ng/mL (API 濃度 5.0 mg/mL に対して 0.12 ppm) における代表的なクロマトグラム

精度および再現性

N-ニトロソプロプラノールの検量線は、予想される濃度の15%以内の精度を示しました。キャリブレーションレベルを表4に示します。すべてのレベルにおいて再現性は変動係数(CV)が15%未満でした。次の図は、6470 LC/TQ システムで作成した検量線を示します。

プロプラノロール N-ホルミル不純物に対する N-ニトロソプロプラノール不純物の特異性

プロプラノロール N-ホルミル不純物の準備

1. プロプラノロールを正確に25 mg 計量して15 mL 遠心分離チューブに入れます。
2. 5 mL の2 N ギ酸を加えます。
3. 遠心分離チューブを高温槽に配置し、70 °Cで90 分間、反応させます。
4. LC/MS 分析のために、混合物を HPLC バイアルに移します。

データをフルスキャンモードで取り込み、ポジティブモードで、288 m/z でクロマトグラムを抽出しました (プロプラノロールホルミル不純物の分子量: 287)。

図6. プロプラノロールホルミル不純物 (EIC) と N-ニトロソプロプラノール 0.6 ng/mL (API 濃度 5.0 mg/mL に対して 0.12 ppm) の分離を示して特異性を明らかにする、代表的なクロマトグラム

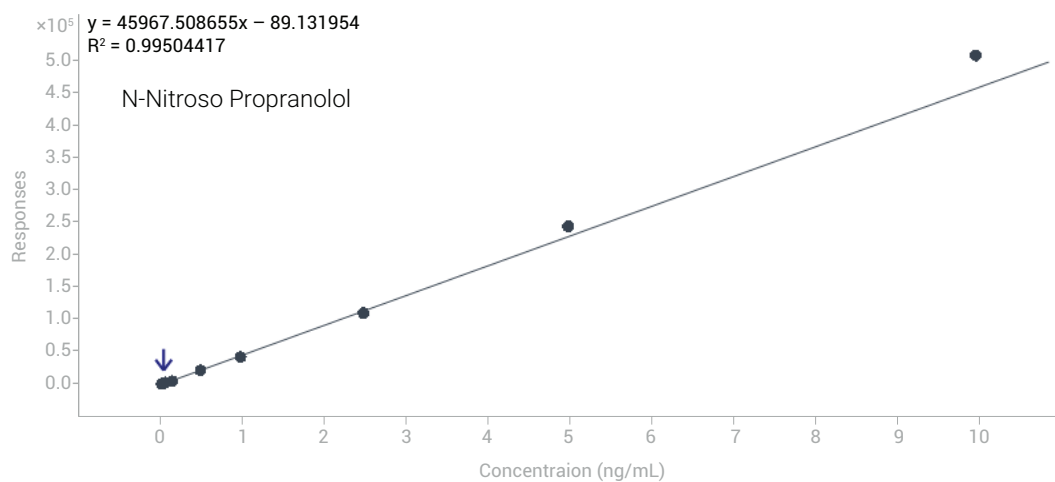


図5. Agilent 6470 LC/TQ で得られたクロマトグラム全体に分散した N-ニトロソプロプラノールの代表的な検量線。検量線では、1/x 2 重み付け係数を用いました。

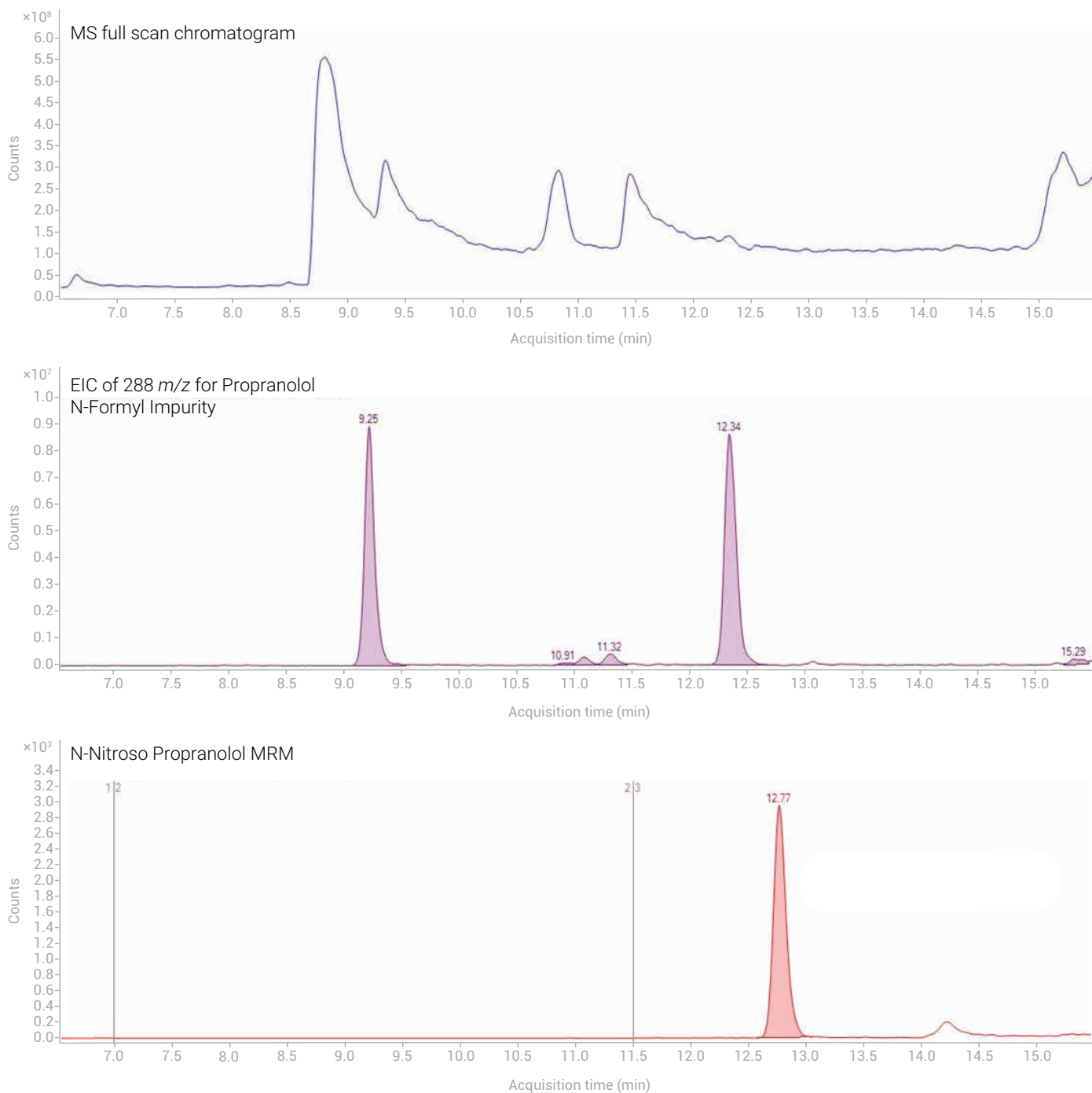


図 6. プロプラノロールホルミル不純物 (EIC) と N-ニトロソプロプラノロール 0.6 ng/mL (API 濃度 5.0 mg/mL に対して 0.12 ppm) の分離を示して特異性を明らかにする、代表的なクロマトグラム

表 5. ブラケッティング標準を含む、0.15 ng/mL (API 濃度 5 mg/mL に対して 0.03 ppm) におけるメソッドの再現性の代表的なデータ

	S. No.	N-ニトロソプロプラノロール
最初の繰り返し分析	1	6450
	2	6582
	3	6424
	4	6461
	5	6679
	6	6139
ブラケッティング標準	7	6492
	平均	6461.0
	標準偏差	167.5
	%RSD	2.6

表 6. API 濃度 5.0 mg/mL に対して定量下限 0.025 ng/mL (0.005 ppm) におけるメソッドの再現性の代表的なデータ

	S. No.	N-ニトロソプロプラノロール
最初の繰り返し分析	1	1041
	2	1088
	3	1063
	4	1101
	5	1109
	6	1155
	平均	1092.8
	標準偏差	39.5
	%RSD	3.6

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE95718405

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, August 10, 2022

5994-5161JAJP

表 7. プロプラノロール API 中の濃度 0.15 ng/mL (API 濃度 5.0 mg/mL に対して 0.03 ppm) における回収率実験の概要

S. No.	不純物の名前	プロプラノロール API 中の 0.15 ng/mL (0.03 ppm) の回収率
1	N-ニトロソプロプラノロール	100.6 %

表 8. プロプラノロール API 中の濃度 0.6 ng/mL (API 濃度 5.0 mg/mL に対して 0.12 ppm) における回収率実験の概要

S. No.	不純物の名前	プロプラノロール 40 mg 錠剤中の 0.6 ng/mL (0.12 ppm) の回収率
1	N-ニトロソプロプラノロール	99.4 %

回収率実験は、プロプラノロール API (表 7) と 40 mg 錠剤 (表 8) の両方で 2 回実施しました。錠剤ではサンプル中に N-ニトロソプロプラノロールがすでに存在するために、より高い濃度で回収率実験を実施しました。

表 9. すべてのサルタン API を廃棄するために使用されたダイバータルブプログラム

番号	開始時間 (分)	スキャンタイプ	ダイバータルブ
1	0	MRM	MS
2	7	MRM	廃液
3	11.5	MRM	MS

結論

以上より、プロプラノロール API および錠剤中の N-ニトロソプロプラノロールを高感度かつ選択的に定量するメソッドを開発し、Agilent 6470 LC/TQ を用いてメソッド性能のすべての重要なパラメータを確立できました。このアプリケーションノートは、ニトロソプロプラノロールの定量のための 6470 LC/TQ の再現性および感度を示すことを目的としています。

参考文献

1. ICH Harmonised Guideline. https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf
2. US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
3. US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-metformin>
4. US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-zantac-ranitidine>
5. US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/media/141720/download>
6. US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. [https://www.edqm.eu/en/n-nitrosamine-contamination-in-brief#\(%22335059%22:\[3\]\)](https://www.edqm.eu/en/n-nitrosamine-contamination-in-brief#(%22335059%22:[3]))
7. US Food and Drug Administration Updates and Press Announcements. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-nitrosamine-varenicline-chantix>
8. Government of Canada Recalls and Safety Alerts Home Page. <https://recalls-rappels.canada.ca/en/alert-recall/pfizer-recalls-inalderal-propranolol-hydrochloride-capsules-due-nitrosamine-impurity>