

LC-MS/MS 用于格列齐特中遗传毒性杂质 B (N-亚硝基-3-氮杂双环[3,3,0]辛烷) 的测定

LCMSMS-1002

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了格列齐特中遗传毒性杂质 B (N-亚硝基-3-氮杂双环[3,3,0]辛烷) 的测定方法。方法学实验表明，杂质 B 在 1-250 ng/mL 范围内线性良好，相关系数大于 0.999；低中高三个不同浓度点对照溶液，连续进样 6 次，保留时间 RSD 在 0.04%~0.09% 范围内，峰面积 RSD% 在 0.75%~3.26% 范围内，表明仪器精密度良好；杂质 B 在低中高三个不同加标浓度，回收率在 93~102% 范围内，方法准确可靠。该方法可为相关从业人员提供参考。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 N-亚硝基-3-氮杂双环[3,3,0]辛烷

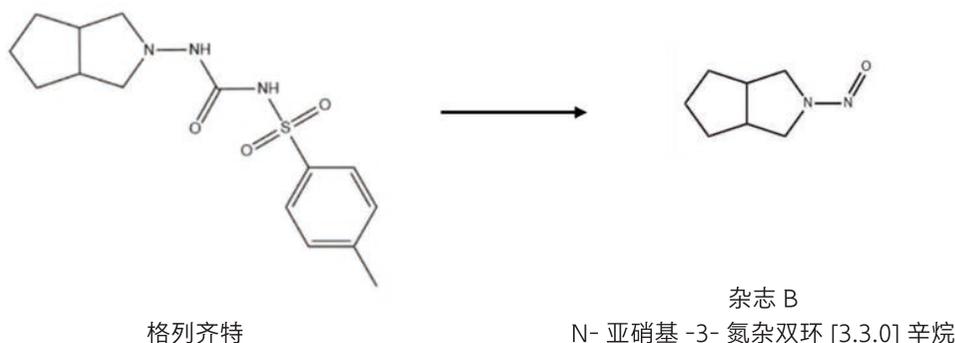
技术特点：

- ❖ 采用 LCMS-8050 建立了格列齐特中杂质 B 的检测方法，有效拓展了 NDSRI 的检测范围。
- ❖ 该方法样品前处理操作简便，仅需进行浸泡后过滤。

格列齐特为第 2 代口服磺脲类降血糖药，其分子中的仲胺结构与在制备过工程中的试剂、生产环境中引入微量的亚硝酸盐，可能会形成亚硝胺类药物相关杂质 (NDSRI)。FDA 发布的“Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug Substance Related Impurities (NDSRIs) Guidance for Industry”指南，基于化合物分子结构中的活化特征和去活化特征，建立了针对 NDSRI 杂质的五个活性级别分类体系，并确定了相应的 AI 值。其中，杂质 B (N-亚硝基-3-氮杂双环[3,3,0]辛烷) 被归为第 4 级活性

级别，其每日最大摄入量不得超过 1500 ng。根据格列齐特的最大服用剂量 320 mg 计算，杂质 B 的可接受限度为 5 ppm。

本文参照中国食品药品检定研究院检测方法使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 建立了格列齐特中遗传毒性杂质 B 含量测定方法，该方法前处理简便，灵敏度高，稳定性好，可用于格列齐特中遗传毒性杂质 B 的含量测定，供相关实验人员参考使用。



■ 结果讨论

2.1 分离度考察

为避免高浓度格列齐特进入质谱，造成污染，本研究成功实现了杂质 B 与格列齐特的完全分离。4.25 分钟后切换进样至质谱，其余时间则将样品导入废液。这一方法有效避免了格列齐特主成分对目标遗传毒性杂质分析检测的干扰，如下图 1 所示。

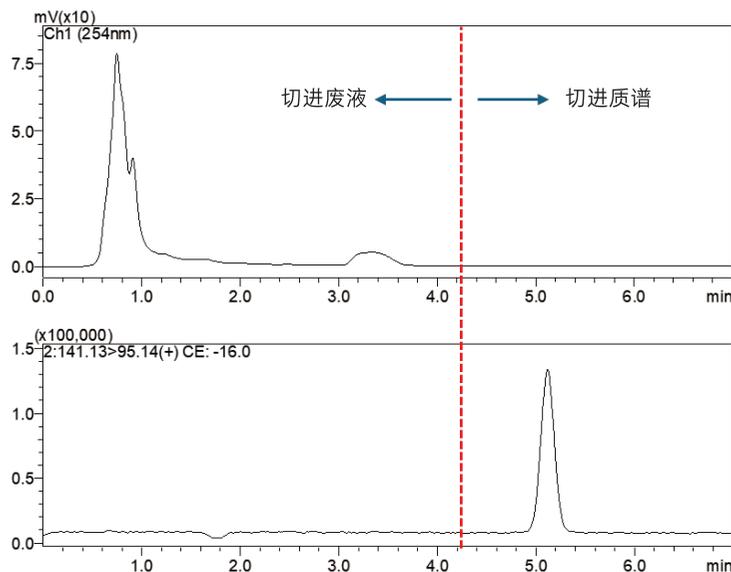


图 1 格列齐特供试品溶液 (40 mg/mL) UV 色谱图 (上) 及杂质 B (10 ng/mL) 的 MRM 色谱图 (下)

2.2 专属性考察

溶剂空白与 1 ng/mL 标准溶液 MRM 重叠谱图显示，目标峰处，未见明显干扰，方法专属性良好。

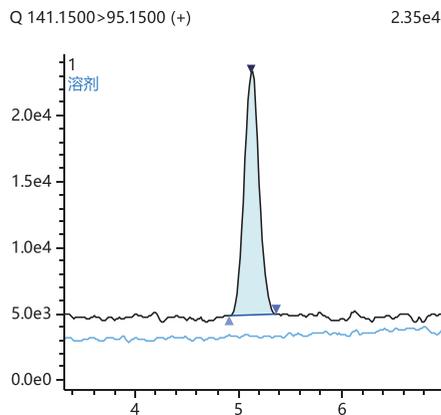


图 2 溶剂空白和 1 ng/mL 杂质 B 标准溶液 MRM 重叠色谱图

2.3 校准曲线

按照 1.3 项下配制方法配制校准曲线溶液。以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，杂质 B 在 1~250 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.999，准确度在 90.55%~106.40% 之间。

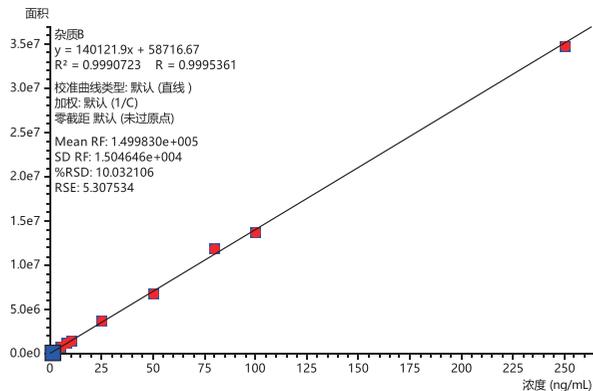


图3 杂质 B 校准曲线

2.4 精密度实验

取校准曲线低中高，三个不同浓度点对照溶液，连续进样 6 次，考察仪器的精密度，保留时间 RSD 在 0.04%~0.09% 范围内，峰面积 RSD 在 0.75%~3.26% 范围内。具体结果见表 5，仪器精密度良好。

表 3 精密度结果 (RSD%, n=6)

化合物名称	1 ng/mL		80 ng/mL		250 ng/mL	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
杂质 B	0.09	3.26	0.04	0.84	0.07	0.75

2.5 加标回收率实验

按照以上建立的方法对市售某品牌格列齐特胶囊进行测定，其色谱图如图 4 所示。根据格列齐特中杂质 B 的含量，向格列齐特样品中分别加入含量为 0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg 的标准品，按照 1.4 进行前处理，测定不同水平样品的加标回收率在 93~102% 范围内，如表 4 所示。

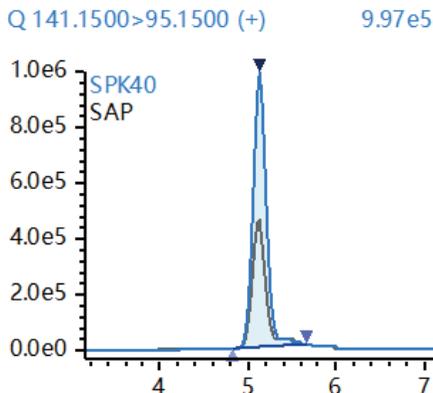


图 4 样品及加标样品 (加标量 1 mg/kg) 中杂质 B 的 MRM 色谱图

表 4 不同浓度水平杂质 B 添加回收率结果

化合物名称	样品含量 mg/kg	加标量 mg/kg	实测浓度 mg/kg	回收率 %
杂质 B	0.83	0.5	1.34	102%
		1	1.83	100%
		2	2.68	93%

■ 结论

本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了格列齐特中遗传毒性杂质 B(N-亚硝基-3-氮杂双环 [3,3,0] 辛烷) 的测定方法。结果显示: 对杂质 B 对照品溶液进行重复性测试, 三个不同浓度杂质 B 的保留时间及峰面积的 RSD 均小于 0.09% 和 3.26%; 使用 MRM 模式采集, 进行外标法定量, 其结果显示校准曲线相关系数大于 0.999。使用格列齐特胶囊作为加标基质, 考察三个不同浓度水平加标回收, 结果显示, 三个不同水平的加标回收率在 93~102% 之间, 实验结果表明, 该方法前处理简单, 专属性强, 能够满足杂质 B 的含量测定需要, 可为相关从业人员提供参考。

参考文献:

[1] 中国食品药品检定研究院. 格列齐特片 (II)、格列齐特片、格列齐特缓释片、格列齐特胶囊基因毒杂质 B (N-亚硝基-3-氮杂双环 [3,3,0] 辛烷) 测定方法 [EB/OL]. <https://www.nifdc.org.cn/nifdc/bshff/gjchj/yjxglj/jyfftweleve/20240620142427179.html>, 2024-06-20.

[2] Center for Drug Evaluation and Research, The Food and Drug Administration. Recommended Acceptable Intake Limits for Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities [EB/OL]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/recommended-acceptable-intake-limits-nitrosamine-drug-substance-related-impurities>, 2023-08.

岛津应用云

