

LC-MS/MS 法测定磷酸西格列汀中亚硝胺遗传毒性杂质 NTTP

LCMSMS-880

摘要： 本方法采用岛津三重四极杆液质联用仪检测磷酸西格列汀中 NTTP。实验结果显示：在本色谱质谱系统下，空白溶液不干扰含量测定，方法专属性好；在 0.5~50 ng/mL 线性范围内，相关系数 R 均 > 0.999；对 1 ng/mL 的对照品溶液，重复进样 6 次，NTTP 所得峰面积的相对标准偏差为 2.77%，重复性好、仪器精密度良好；加标量为 10~250 ng 时，回收率在 104.3% 到 107.2% 之间。该分析方法灵敏度高，重复性好，可供相关行业检测人员参考使用。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 磷酸西格列汀 NTTP

技术特点：

- ❖ LC-MS/MS 法测定亚硝胺类化合物，普适性强，操作简单，稳定性高。
- ❖ 实现磷酸西格列汀中 NTTP 的检测，为磷酸西格列汀监管提供参考。

磷酸西格列汀适用于 2 型糖尿病患者，可与二甲双胍配合使用。磷酸西格列汀属于二肽基肽酶 -4(DPP-4) 抑制剂，能通过抑制该酶活性而相对提高天然发生肠促胰岛素，包括胰高血糖素样肽 -1 和葡萄糖依赖性促胰岛素肽的水平，提高胰岛素生产、停止葡萄糖产生，最终达到降低血糖浓度的临床效果。

亚硝胺类杂质属于 ICH M7(R1) 指南中提及的“关注队列”物质，长期受到国际监管机构的密切关注。美国食品药品监督管理局 (FDA) 发现西格列汀的某些样品中含有亚硝胺类遗传毒性杂质 NTTP (结构式见图 1)，要求相关企业对产品进行检测。FDA 规定西格列汀中 NTTP 短期 AI 限值最多为 246.7 ng/天，终身暴露 AI 限值为 37 ng/天。

本文采用 LC-40 超高效液相色谱与 LCMS-8045 三重四极杆串联质谱联用系统，建立了一种分析西格列汀中的遗传毒性杂质 NTTP 的方法。该方法灵敏度远优于 37 ng/天，且具有很好的系统适应性和准确度，适用于西格列汀原料药与制剂中 NTTP 的常规分析。

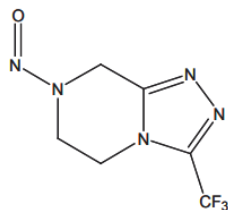


图 1 NTTP 结构式

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045，配置信息如下：

系统控制器：	SCL-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D XS×2	柱温箱：	CTO-40C
自动进样器：	SIL-40C XS	色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.123

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (150 mm x 3.0 mm I.D., 3 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-30009-07)

流动相：A 10 mM 甲酸铵 -0.1% 甲酸水溶液；B 0.1% 甲酸乙腈溶液
 进样体积：5 μ L 柱温：30 $^{\circ}$ C
 流速：0.35 mL/min 洗针液：甲醇 / 水 =1:1 (v:v)
 洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 40%，时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
2.75	柱温箱	CTO.RVR	0*
8.00	泵	B Conc	100
8.00	柱温箱	CTO.RVR	1*
8.10	泵	B Conc	40
12.00	控制器	STOP	

注：“0”表示进质谱，“1”表示流路切换至废液；

质谱条件

离子化模式：ESI+ 雾化气流速：3.0 L/min
 接口温度：300 $^{\circ}$ C 干燥气流速：10.0 L/min
 D L 温度：250 $^{\circ}$ C 加热气流速：10.0 L/min
 加热模块温度：400 $^{\circ}$ C 扫描模式：多反应监测 (MRM)
 MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

序号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	NTTP	222.05	192.15*	-11.0	-11.0	-20.0
			165.10	-12.0	-24.0	-30.0

* 代表定量离子对

■ 样品前处理

供试品溶液：取某品牌磷酸西格列汀 10 片，精密称定，研细，混匀，精密称取细粉适量（约相当于磷酸西格列汀 100 mg），置 10 mL 量瓶中，加水适量，超声 10 min，放置室温，用水稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

对照品溶液：精密称取 NTTP 对照品适量，加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 NTTP 0.5、1、4、10、25、50 ng 的溶液。

■ 结果与讨论

3.1 专属性

溶剂空白样品与标准样品 MRM 重叠谱图显示，目标峰保留时间处未见明显干扰，方法专属性好。浓度为 0.5 ng/mL 的 NTTP 对照品溶液的信噪比为 76.68，其结果如图 2 所示。

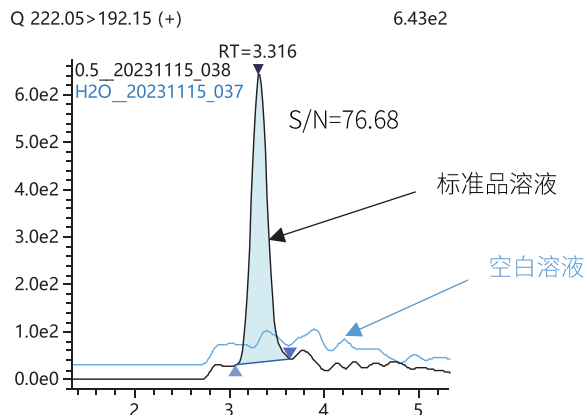


图 2 空白与 0.5 ng/mL NTTTP 标准样品的色谱图

3.2 校准曲线

分别配制 0.5、1、4、10、25、50 ng/mL 的 NTTTP 标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，以外标法绘制标准曲线，所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数大于 0.999，准确度在 95.94%-105.11% 之间。

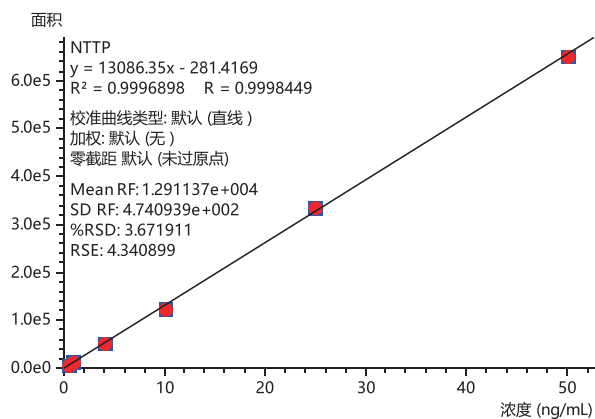


图 3 NTTTP 校准曲线

3.3 重复性实验

取 1、10 和 50 ng/mL NTTTP 标准溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 3。

表 3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

序号	化合物	RSD% (1 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	NTTTP	0.13	2.77	0.09	1.54	0.05	0.65

3.4 加标回收率

对供试品溶液进行上机分析，定量结果为每 100 mg 磷酸西格列汀检出 NTTTP 为 93.12 ng。向供试品样品中加入标准品溶液进行回收率试验，使加标量为 10 ng、100 ng 和 250 ng，其回收率分别为 104.3%、107.2% 和 104.3%。

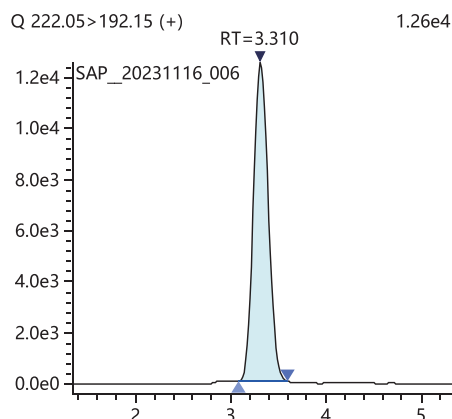


图4 供试品溶液色谱图

■ 结论

本文参使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了检测磷酸西格列汀中 NTTP 的方分析法。在 0.5~50 ng/mL 线性范围内，相关系数 R 均 > 0.999。在 1、10 和 50 ng/mL 三个浓度下，连续 6 针进样，化合物的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.05~0.13% 和 0.65~2.77% 之间，仪器精密度良好。加标量为 10~250 ng 时，回收率在 104.3~107.2% 之间。该分析方法灵敏度高，重复性好，分析时间短，稳定可靠，可供相关行业检测人员参考使用。

岛津应用云

