Sitagliptin 原料藥中 7-Nitroso-3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazine (NTTP)之檢驗方法

Method of Test for 7-Nitroso-3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazine (NTTP) in Sitagliptin Drug Substance

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於 sitagliptin 原料藥中亞硝胺類化合物 7-nitroso-3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazine (NTTP)之檢驗。

2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。

2.1. 裝置：

2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：

2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。

2.1.1.2. 層析管：Hypersil GOLD C8，3.0 μm，內徑 4.6 mm × 10 cm，或同級品。

2.1.2. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。

2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.1.4. 離心機(Centrifuge)：可達 3000 ×g 以上者。

2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；甲酸銨採用試藥級；去離子水(比電阻於 25℃可達 18 MΩ · cm 以上)；7-nitroso-3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazine (NTTP)對照用標準品；7-nitroso-3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazine-d_4 (NTTP-d_4)同位素內部標準品。

2.3. 器具及材料：

2.3.1. 容量瓶：10 mL，褐色。

2.3.2. 離心管：15 mL，PP 材質。

2.3.3. 濾膜：孔徑 0.22 μm，PVDF 材質。

2.4. 移動相溶液之調製：

2.4.1. 移動相溶液 A：

取甲酸銨 0.63 g，加去離子水溶解使成 1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 A。

2.4.2. 移動相溶液 B：乙腈。

2.5. 內部標準溶液之配製：

取 NTTP-d_4 同位素內部標準品約 2 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至 10 mL，作為內部標準原液。臨用時取適量內部標準原液，以甲醇稀釋至 5 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

取 NTTP 對照用標準品約 5 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至 10 mL，作為標準原液。臨用時取適量標準原液與內部標準溶液混合，以甲醇稀釋至 0.5～20 ng/mL (含內部標準品濃度 0.5 ng/mL)，供作標準溶液。

2.7. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各 5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就 NTTP 與內部標準品之波峰面積比，與對應之 NTTP 濃度，製作標準曲線。

液相層析串聯質譜分析測定條件(註)：

層析管：Hypersil GOLD C8，3.0 μm，內徑 4.6 mm × 10 cm。

層析管溫度：30℃。

移動相溶液：A 液與 B 液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 1.0	70 → 70	30 → 30
1.0 → 6.0	70 → 60	30 → 40
6.0 → 6.1	60 → 5	40 → 95
6.1 → 7.0	5 → 5	95 → 95
7.0 → 7.1	5 → 70	95 → 30
7.1 → 10.0	70 → 70	30 → 30

移動相流速：0.5 mL/min。

注入量：5 μL。

離子噴灑電壓(Ion spray voltage)：4.0 kV。

離子化模式：ESI 正離子。

加熱溫度(Temperature)：500℃。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：50 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：70 psi。

氣簾氣體(Curtain gas)：40 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：high。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)及碰撞能量

(collision energy)如下表：

分析物	離子對 前驅離子(*m/z*)＞ 產物離子(*m/z*)	去集簇電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
NTTP	222 ＞ 192*	30	24
	222 ＞ 165	30	30
NTTP-d_4 (I.S.)	226 ＞ 196	30	20

*定量離子對

註：1. 如有轉向閥，可設定以下參數：

時間(min)	移動相流向
0.0 → 3.5	廢液
3.5 → 4.5	偵測器
4.5 → 10.0	廢液

2. 上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.8. 檢液之調製：

取檢體約 0.1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液 1 mL 及甲醇 9 mL，混合均勻，超音波振盪 5 分鐘，以 3000 ×g 離心 5 分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各 5 μL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依 2.7.節條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中 NTTP 之含量(μg/g)：

$$\text{檢體中 NTTP 之含量}(\mu g/g) = \frac{C \times V}{M} \times 10^{-3}$$

C：由標準曲線求得檢液中 NTTP 之濃度(ng/mL)

V：檢體調製之體積(10 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得(≤ 100%)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
＞ 50	± 20
＞ 20～50	± 25

＞ 10～20	± 30
≤ 10	± 50

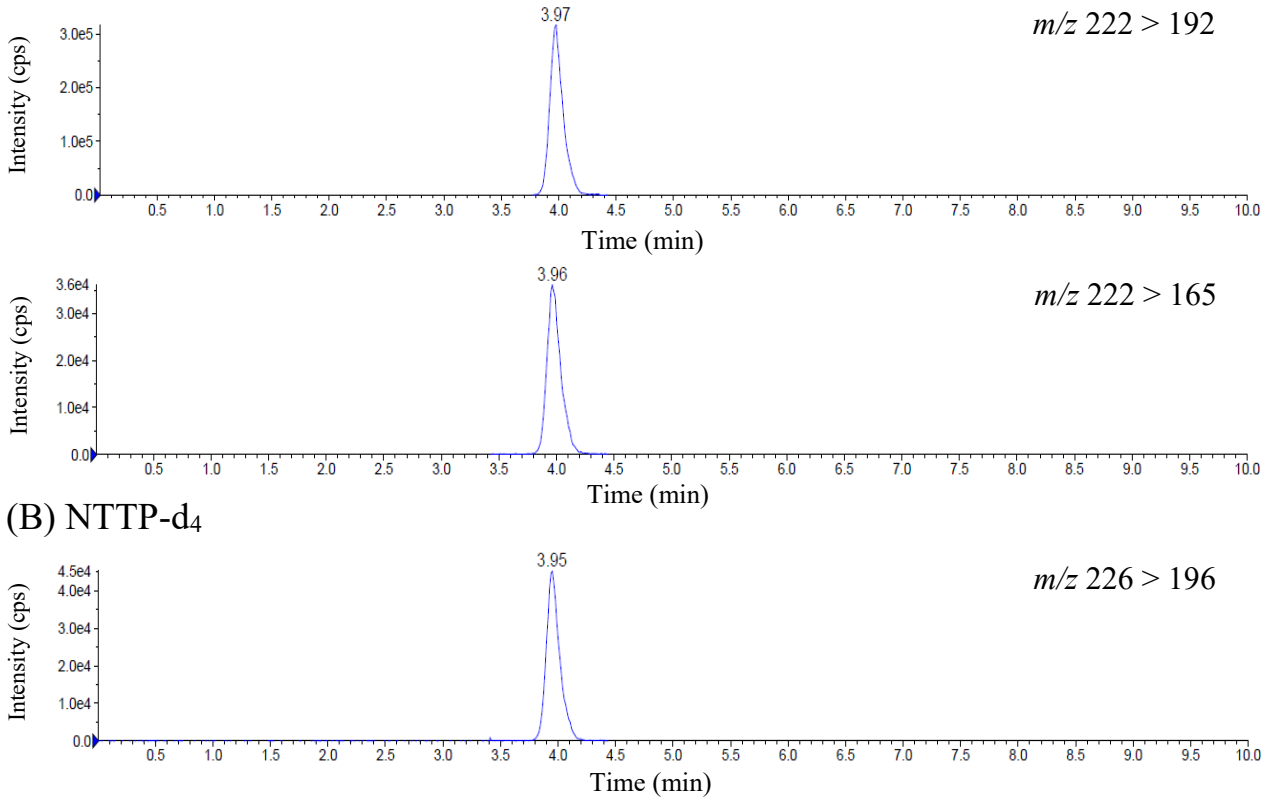
附註：1. 本檢驗方法之定量極限為 0.05 μg/g。
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻

1. Wang, Z., Hu, S., Wu, X., He, Z., Ke, C. and Hu, M. 2023. A highly sensitive LC-MS/MS method for the determination and quantification of a recently identified *N*-nitrosamine impurity in the sitagliptin phosphate monohydrate active pharmaceutical ingredient. Analytical Methods 15: 256-260.
2. Chittireddy, H. N. P. R., Kumar, J. V. S., Bhimireddy, A., Shaik, M. R., Khan, M., Adil, S. F., Khan, M. and Aldhuwayhi, F. N. 2022. Development and validation for quantification of 7-nitroso impurity in sitagliptin by ultraperformance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. Molecules 27: 8581.

參考層析圖譜

(A) NTTP



(B) NTTP-d_4

圖、以LC-MS/MS分析NTTP標準品(A)及NTTP-d_4內部標準品(B)之MRM圖譜