比拉斯汀中两个亚硝胺药物相关杂质的 UPLC-MS/MS 法检查

陈小伟[1]，郝泽华[2]，卢红华[1]，刘纪法[1]，唐　娇[1]，郝贵周[1]*

（1. 鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东临沂 273400；
2. 大邱加图立大学，韩国庆尚北道庆山市 38430）

摘要：建立了超高效液相色谱 - 串联质谱法测定比拉斯汀（**1**）中的亚硝胺药物相关杂质（NDSRIs）[2-（1- 亚硝基哌啶 -4- 基）-1*H*- 苯并咪唑（**2**）和 1-（2- 乙氧基乙基）-2-（1- 亚硝基哌啶 -4- 基）-1*H*- 苯并咪唑（**3**）] 的检测方法。采用 Hypersil Gold 柱（2.1 mm×100 mm，3 μm），以 0.1% 甲酸溶液为流动相 A、乙腈为流动相 B，线性梯度洗脱；质谱采用电喷雾电离源，正离子模式，以选择性反应监测模式进行测定。结果显示，**2**、**3** 在 0.2 ～ 4.0 ng/mL 内线性关系良好；定量限分别为 0.020 6 和 0.021 0 ng/mL，检测限分别为 0.006 2 和 0.006 3 ng/mL；平均回收率（*n*=9）分别为 100.98%、101.25%，RSD 分别为 0.95%、1.25%。该研究可为 **1** 中 NDSRIs 的控制和研究提供参考。

关键词：超高效液相色谱 - 串联质谱法；比拉斯汀；亚硝胺药物相关杂质；质量控制

中图分类号：R917；R976　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2025)12-1566-04

引用：陈小伟，郝泽华，卢红华，等．比拉斯汀中两个亚硝胺药物相关杂质的 UPLC-MS/MS 法检查 [J]．中国医药工业杂志，2025, **56**(12)：1566-1569．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.12.010

Determination of Two Nitrosamine Drug Substance-related Impurities in Bilastine by UPLC-MS/MS

CHEN Xiaowei[1], HAO Zehua[2], LU Honghua[1], LIU Jifa[1], TNAG Jiao[1], HAO Guizhou[1]*

(*1. National Chiral Pharmaceutical Engineering and Technology Research Center, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 273400;
2. Daegu Catholic University, Gyeongsan City, North Gyeongsang Province, the Republic of Korea 38430*)

ABSTRACT: A UPLC-MS/MS method was established for the determination of nitrosamine drug substance-related impurities (NDSRIs), 2-(1-nitrosopiperidin-4-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole (**2**) and 1-(2-ethoxyethyl)-2-(1-nitrosopiperidin-4-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole (**3**) in bilastine (**1**). A Hypersil Gold column (2.1 mm×100 mm, 3 μm) was used with 0.1% formic acid solution as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B under linear gradient elution conditions. Mass spectrometry was performed using an electrospray ionization (ESI) source in positive ion mode with selective reaction monitoring (SRM) for detection. The results showed that good linear relationships were obtained for **2** and **3** in the range of 0.2 − 4.0 ng/mL. The limits of quantification were 0.020 6 and 0.021 0 ng/mL, and the limits of detection were 0.006 2 and 0.006 3 ng/mL, respectively. The average recoveries (*n*=9) were 100.98% and 101.25% , with the RSDs of 0.95% and 1.25% , respectively. This study can provide a reference for the NDSRIs control of **1**.

Key Words: UPLC-MS/MS; bilastine; nitrosamine drug substance-related impurity; quality control

比拉斯汀（bilastine，**1**，图 1），化学名为 2-[4-[2-[4-[1-（2- 乙氧基乙基）苯并咪唑 -2- 基］哌啶 -1- 基］乙基］苯基]-2- 甲基丙酸，是由西班牙 Faes Farma 公司研制的第二代抗组胺药，于 2012 年获欧盟批准上市。**1** 作为 H_1 受体拮抗药，临床用于治疗季节性或慢性过敏性鼻炎及慢性特发性荨麻疹[1—2]。在 **1** 的不同合成工艺中，通常都含有具有仲胺结构

收稿日期：2025-05-23
作者简介：陈小伟，高级工程师，从事药物制剂的研究与开发。
通信作者：郝贵周，正高级工程师，从事新药的研究与开发。

的中间体，如 2-(4- 哌啶)-1*H*- 苯并咪唑、1- 乙氧基甲基 -[2-(4- 哌啶)]-1*H*- 苯并咪唑等 [3—4]。在溶剂、辅料等可能含有的微量亚硝酸盐作用下，这些中间体可产生亚硝胺类化合物 2-(1- 亚硝基哌啶 -4- 基)-1*H*- 苯并咪唑 (**2**，图 1)、1-(2- 乙氧基乙基)-2-(1- 亚硝基哌啶 -4- 基)-1*H*- 苯并咪唑 (**3**，图 1)。

缬沙坦事件后，小分子亚硝胺杂质已在药物质量研究中受到严格监控，但与药物结构相关的亚硝胺类杂质尚未引起足够重视。2024 年 8 月，FDA 发布了《人用药物中亚硝胺杂质控制指南》[5]，让亚硝胺药物相关杂质 (nitrosamine drug substance-related impurities，NDSRIs) 的研究备受关注。目前，关于这方面的研究鲜有报道。根据《亚硝胺类药物相关杂质的推荐可接受摄入量限度》行业指导原则 [6]，基于对 **2**、**3** 亚硝胺结构中 *α*- 氢、活性指数、去活性指数的分析，确定 **2**、**3** 的活性级别为 3 级，每日允许摄入量 (acceptable daily intake，ADI) 为 400 ng。另根据 **1** 的最大日用剂量 20 mg，计算得 **2**、**3** 的限度为 0.002%。

本研究建立了超高效液相色谱 - 串联质谱法检测 **1** 中 **2**、**3** 的含量，采用选择性反应监测 (selective reaction monitoring，SRM) 模式进行定量分析，以期为 **1** 中 NDSRIs 的研究提供依据。

1 仪器与试药

Vanquish-Altis 型液质联用仪 (美国 Thermo Scientific 公司)；XS205DU 型电子分析天平 (瑞士 Mettler 公司)。

1 原料药 (含量 ≥ 98.5 %，批号 230301、230302、230303)、**2** 对照品 (含量 98.5%，批号 231101) 和 **3** 对照品 (含量 97.8%，批号 231101) 均由山东新时代药业有限公司提供；其他试剂均为色谱纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

空白溶剂：水。

对照品贮备液：取 **2**、**3** 对照品适量，分别用 50% 乙腈溶解并定容，制成每 1 mL 中各约 20 ng 的溶液，即得各组分对照品贮备液。

对照品混合溶液：取上述对照品贮备液适量，置同一量瓶中，加水稀释制成每 1 mL 中约含 **2**、**3** 各约 2 ng 的混合溶液。

供试品溶液：精密称取 **1** 适量，加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.1 mg 的溶液，即得。

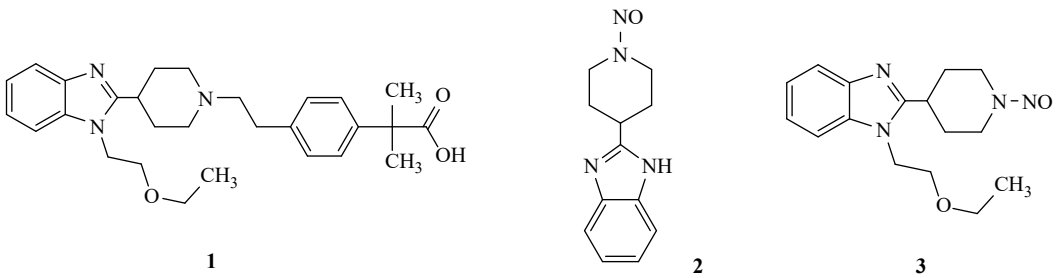
灵敏度试验溶液：精密量取对照品混合溶液适量，用水定量稀释制成每 1 mL 中含 **2**、**3** 各约 0.4 ng 的溶液。

线性系列标准溶液：分别精密量取 **2**、**3** 对照品贮备液适量，加水定量稀释制成每 1 mL 中含 **2**、**3** 各约 0.2、0.4、1.0、2.0、3.0、4.0 ng 的混合溶液。

回收率试验溶液：精密称取本品 10 mg，置 10 mL 量瓶中，用 50% 乙腈溶解并定容，摇匀；精密量取 1 mL，共 9 份，各置 10 mL 量瓶中，分别精密加入对照品贮备溶液 0.8、1.0、1.2 mL，用水定容，摇匀，每个考察水平制备 3 份，作为 80%～ 120% 回收率试验溶液。

2.2 色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 Hypersil Gold 柱 (2.1 mm× 100 mm，3 μm)；流动相 A 为 0.1% 甲酸，B 为乙



1 **2** **3**

图 1 1 及其杂质 2 和 3 的化学结构

Fig.1 Chemical Structures of **1** and Its Impurities **2** and **3**

腈，线性梯度洗脱（0—3 min，A 95%；3—5 min，A 65%；5—8 min，A 95%）；流速 0.3 mL/min；柱温 40 ℃；进样量 2 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源，正离子模式（ESI^+）；电喷雾电压 3 500 V；离子源温度 325 ℃；雾化温度 350 ℃；SRM 模式；定量离子对 *m/z* 231.10→*m/z* 145.10（**2**），*m/z* 303.15→*m/z* 217.21（**3**）。

2.3 专属性试验

取“**2.1**”项下空白溶剂、对照品混合溶液、灵敏度试验溶液和供试品溶液，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，记录色谱图。结果如图 2 所示。可见，**2**、**3** 的保留时间分别为 3.0、4.4 min；在灵敏度试验溶液图谱中，**2**、**3** 的信噪比 *S/N* 分别为 160.6、208.5，符合要求；空白溶剂对待测组分无干扰。

2.4 精密度与重复性试验

取“**2.1**”项下的对照品混合溶液，按“**2.2**”项下色谱质谱条件连续测定 6 次，记录色谱图。结果显示，**2**、**3** 保留时间的 RSD（*n*=6）均为 0；峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 1.03%、0.82%，说明精密度良好。

按“**2.1**”项下 100% 回收率溶液的配制方法，平行配制 6 份回收率试验溶液，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，记录色谱图。结果表明，**2**、**3** 含量的 RSD（*n*=6）分别为 1.89%、0.91%，说明重复性良好。

2.5 线性试验

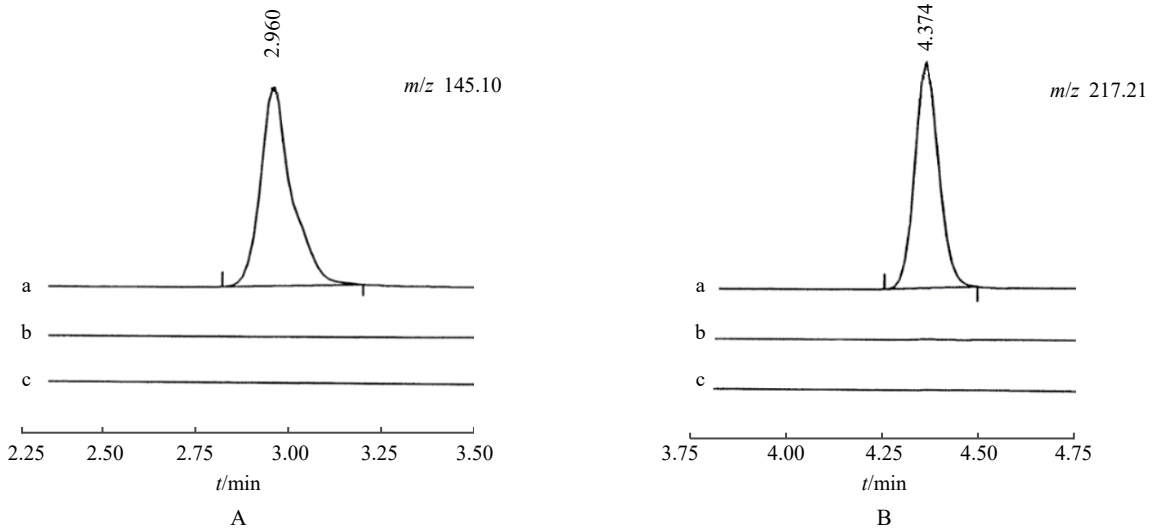
取“**2.1**”项下线性系列标准溶液，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，记录色谱图。以各组分的质量浓度 *c* 为横坐标、峰面积 *A* 为纵坐标进行线性回归。结果显示，**2**、**3** 的标准曲线方程分别为：*A*=2 601.48*c* − 78.78，*r*=0.999 7；*A*=2 213.33*c* − 78.18，*r*=0.999 8，表明 **2** 和 **3** 在 0.2 ～ 4.0 ng/mL 线性关系良好。

2.6 回收率试验

取“**2.1**”项下回收率试验溶液（**1** 批号 230301）、对照品混合溶液与供试品溶液（**1** 批号 230301），按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，记录各组分的峰面积。结果显示，**2**、**3** 的平均回收率（*n*=9）分别为 100.98%、101.25%，RSD 分别为 0.95%、1.25%，提示方法准确度高。

2.7 定量限与检测限

取对照品贮备溶液，加水逐级稀释，分别以信噪比 *S/N* 为 10 和 3 时的溶液作为定量限溶液与检测限溶液，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，重复测



a—对照品混合溶液；b—供试品溶液（批号 230301）；c—空白溶剂。

图 2　2（A）**和 3**（B）**的典型色谱图**

Fig.2　Typical Chromatograms of **2**（A）and **3**（B）

定 6 次。结果显示，**2**、**3** 峰面积的 RSD（n=6）分别为 1.34%、1.73%，定量限分别为 0.020 6、0.021 0 ng/mL，检测限分别为 0.006 2、0.006 3 ng/mL，表明本法灵敏度高。

2.8 稳定性试验

取“**2.1**”项下对照品混合溶液与供试品溶液（**1** 批号 230301），分别于室温放置 0、1、2、4、6、8、10、12、14 h 时取样，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定。结果显示，14 h 内 **2**、**3** 峰面积的 RSD（n=6）均小于 10%，保留时间的 RSD（n=6）均小于 2%，表明对照品混合溶液与供试品溶液在 14 h 内稳定性良好。

2.9 耐用性试验

取空白溶剂、对照品混合溶液与加标供试品溶液（同 100%回收率溶液方法配制），在“**2.2**”项下色谱质谱条件基础上，先后改变柱温（±2 ℃）、流速（±0.01 mL/min）、初始流动相比例（±1%）、同型号不同批次色谱柱、喷雾电压（±100 V），进行耐用性试验。结果显示，**2**、**3** 含量的 RSD（n=11）为 2.16%、3.35%，提示该法耐用性良好。

2.10 样品测定

取 3 批 **1** 原料药，按“**2.1**”项下方法配制供试品溶液，按“**2.2**”项下色谱质谱条件进样测定，按外标法以峰面积计算。结果显示，3 批样品中均未检出 **2**、**3**。

3 总结

本研究建立了 UPLC-MS/MS 法测定 **1** 中 **2**、**3** 的含量。专属性试验结果表明，空白溶剂对 **2**、**3** 的测定无干扰。方法学验证结果显示，本法的线性、重复性、准确性、溶液稳定性好，定量限约相当于供试品浓度的 0.000 02%，即限度的 1%，灵敏度高，可用于 **1** 中 **2**、**3** 的检测。在含有胺类结构药物的合成中，反应条件控制不当、亚硝化试剂残留或反应不完全，就会生成亚硝胺杂质。此外，药物合成过程中使用的催化剂、溶剂、辅料（尤其是纤维素类）等均可能残留微量的亚硝酸盐，在一定温度、湿度或某些微生物作用下，含有胺类结构的药物分子可与之反应，产生亚硝胺类杂质。随着相关法规的密集出台及研究的持续推进，人们将更深入地了解药物中亚硝胺杂质的来源，从而制定相应的控制策略，实现药物质量与安全性的显著提升。

参考文献：

[1] CORCÓSTEGUI R, LABEAGA L, INNERÁRITY A, *et al*. Preclinical pharmacology of bilastine, a new selective histamine H_1 receptor antagonist: receptor selectivity and *in vitro* antihistaminic activity [J]. *Drugs R D*, 2005, **6**(6): 371-384.

[2] CARTER N J. Bilastine: in allergic rhinitis and urticaria [J]. *Drugs*, 2012, **72**(9): 1257-1269.

[3] 孙平华, 郭嘉亮, 陈卫民, 等. 一种制备 α,α- 二甲基 -4-(2- 卤乙基）苯乙酸酯及合成比拉斯汀的方法：中国, 104326909 [P]. 2015-02-04.

[4] 赵 军. 比拉斯汀重要中间体的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 2016, **47**(11): 1363-1365.

[5] U. S. Food and Drug Administration. Guidance of industry: control of nitrosamine impurities in human drugs [EB/OL]. (2024-08-30) [2025-05-23]. https://www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs.

[6] U. S. Food and Drug Administration. Recommended acceptable intake limits for nitrosamine drug substance-related impurities [EB/OL]. (2023-08-04) [2025-05-23]. https://www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/recommended-acceptable-intake-limits-nitrosamine-drug-substance-related-impurities.