

## 附件：注射用比伐芦定公示稿

### 注射用比伐芦定

Zhusheyong Bifaluding  
Bivalirudin for Injection

本品为比伐芦定加适量赋形剂制成的无菌冻干品。含比伐芦定（ $C_{98}H_{138}N_{24}O_{33}$ ）应为标示量的 90.0%~110.0%；如为过量灌装产品，含比伐芦定（ $C_{98}H_{138}N_{24}O_{33}$ ）应为标示量的 105.0%~115.0%。

**【性状】** 本品为白色或类白色冻干块状物或粉末。

**【鉴别】**（1）在含量测定项下记录的色谱图中，供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

（2）取本品，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 1mg 的溶液，照紫外-可见分光光度法（中国药典 2020 年版四部通则 0401）测定，在 275nm 的波长处有最大吸收，在 249nm 的波长处有最小吸收。

**【检查】复溶时间** 取本品 1 瓶，加注射用水 5ml，轻轻振摇，内容物应在 3 分钟内完全溶解。

**酸度** 取本品，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 50mg 的溶液，依法测定（中国药典 2020 年版四部通则 0631），pH 值应为 5.0~6.0。

**溶液的澄清度与颜色** 取本品，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 50mg 的溶液，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 0901 第一法和通则 0902 第一法），溶液应澄清无色；如显浑浊，与 1 号浊度标准液比较，不得更浓。

**有关物质** 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0512）测定。

**供试品溶液** 取本品 1 瓶，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 2.5mg 的溶液。

**对照溶液** 精密量取供试品溶液 1ml，置 100ml 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

**系统适用性溶液** 取比伐芦定与杂质 I、杂质 II、杂质 III、杂质 IV、杂质 V、杂质 VI、杂质 VII、杂质 VIII、杂质 IX、杂质 X 和杂质 XI 对照品各适量，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 2.5mg 与各杂质 25 $\mu$ g 的混合溶液。

**灵敏度溶液** 精密量取对照溶液 1ml，置 20ml 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

**色谱条件** 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Welch Xtimate C18，4.6mm $\times$ 250mm，5 $\mu$ m 或效能相当的色谱柱）；以 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液（用冰醋酸调节 pH 值至 6.5）-水（50:50）为流动相 A，以 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液（pH6.5）-乙腈（50:50）为流动相 B，按下表进行梯度洗脱；柱温为 40 $^{\circ}$ C；进样器温度为 5 $^{\circ}$ C；流速为每分钟 1.2ml；检测波长为 215nm；进样体积 40 $\mu$ l。

时间（分）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
-------	----------	----------

0	90	10
5	85	15
55	70	30
65	65	35
75	60	40
75.1	90	10
85	10	10

系统适用性要求 系统适用性溶液色谱图中，出峰顺序为杂质 I 峰至杂质 VI 峰、比伐芦定峰、杂质 VII 峰至杂质 XI 峰，比伐芦定峰的保留时间应在 50~60 分钟之间（必要时适当调整流动相 A 和流动相 B 的比例），理论板数按比伐芦定峰计算不低于 12000，杂质 VI 峰与比伐芦定峰之间的分离度应不小于 2.5，比伐芦定峰与杂质 VII 峰之间的分离度应符合要求。灵敏度溶液色谱图中，比伐芦定峰的信噪比应不小于 10。

测定法 精密量取供试品溶液与对照溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。

限度 供试品溶液色谱图中如有杂质峰，除溶剂峰、三氟乙酸峰和甘露醇峰外，各杂质峰面积与对照溶液主峰面积比较，均不得过表1中的限度值，各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的3倍(3.0%)。

表 1 有关物质杂质限度

杂质名称	限度 (%)	杂质名称	限度 (%)
杂质 I	0.5	杂质 VI	0.5
杂质 II	0.5	中性梯度杂质 <sup>b</sup>	0.5
杂质 III	0.5	杂质 IX	0.5
杂质 IV	0.5	杂质 X	0.5
杂质 V	0.5	杂质 XI	0.5
片段杂质总和 <sup>a</sup>	1.0	其他单个杂质	0.5

注：表中限度0.5%、1.0%，即为杂质的峰面积不得大于对照溶液主峰面积的0.5倍和1倍。

a 杂质I与杂质V之间（包括杂质I、杂质V）的所有杂质。

b 比伐芦定主峰后至杂质 VIII 之间（包括杂质 VIII）的所有杂质。

聚合物 照分子排阻色谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0514）测定。

供试品溶液 取本品 1 瓶，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 1mg 的溶液。

对照溶液 精密量取供试品溶液1ml，置200ml量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

系统适用性溶液 取比伐芦定，置 120℃烘箱放置 2 小时。取适量，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的溶液。

灵敏度溶液 精密量取对照溶液 1ml，置 20ml 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

色谱条件 以亲水改性硅胶为填充剂（TSK gel G2000SWXL，7.8mm×300mm，5μm 或效能相当的色谱柱）；乙腈-水-三氟乙酸（25:75:0.1）为流动相；柱温为 30℃；流速为每分钟 0.5ml；检测波长为 214nm；进样体积 10μl。

系统适用性要求 在系统适用性溶液色谱图中，比伐芦定峰与比伐芦定峰前相邻色谱峰（相对比伐芦定峰的相对保留时间为 0.92）之间的分离度应符合要求。灵敏度溶液色谱图中，比伐芦定峰信噪比应不小于 10。

测定法 精密量取供试品溶液与对照溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间的 2 倍。

限度 供试品溶液的色谱图中如有杂质峰，除溶剂峰外，比伐芦定峰前所有杂质峰面积的和不得大于对照溶液的主峰面积（0.5%）。

水分 取本品，照水分测定法（中国药典 2020 年版四部通则 0832 第一法 2）测定，含水分不得过 4.0%。

细菌内毒素 取本品，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 1143），每 1mg 比伐芦定中含内毒素的量应小于 1.0EU。

#### 生物活性

试剂（1）缓冲液 取三羟甲基氨基甲烷 6.06g，氯化钠 10.23g，乙二胺四醋酸二钠 2.8g，聚乙二醇 6000 1.0g，加水 800ml 使溶解，用稀盐酸调节 pH 值至 8.4，用水稀释至 1000ml。

（2）凝血酶溶液 取凝血酶，加缓冲液溶解并稀释制成每 1ml 中约含 3.78IU 的溶液。如实验中空白管的吸光度值小于 0.6，则调整凝血酶溶液浓度使其达到 0.6。

（3）底物溶液 取发色底物 S-2238 适量，加水溶解并稀释制成 5mol/L 的溶液，临用前用水稀释至 2mmol/L。

（4）终止液 50%醋酸溶液。

对照品溶液 取比伐芦定对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 0.6mg 的溶液，作为对照品贮备液。以水为空白，在 275nm 波长处测定其吸光度，按公式计算：

$$C_{\text{对照品}} (\text{mg/ml}) = A_{275}/0.62$$

根据计算结果，精密量取对照品贮备液适量，用缓冲液分别定量稀释制成 4 个不同浓度的溶液（S1、S2、S3、S4），使最高浓度抑制率为 65%±10%。相邻两浓度之比值（r）应相同，一般为 2~3。

供试品溶液 取本品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 0.6mg 的溶液，作为供试品贮备液。以水为空白，在 275nm 波长处测定其吸光度，按公式计算：

$$C_{\text{供试品}} (\text{mg/ml}) = A_{275}/0.62$$

根据计算结果，精密量取供试品贮备液适量，用缓冲液分别定量稀释制成 4 个不同浓度的溶液（T1、T2、T3、T4），相邻两浓度之比值（r）应与对照品溶液相同。

测定法 取对照品管、供试品管和三支空白管，分别按表 2，加入缓冲液、不同浓度的对照品或供

试品系列溶液（每个浓度分别取两份样品进行测定）、凝血酶溶液，混匀，37℃平衡 2 分钟；加入底物溶液，混匀，37℃准确保温 4 分钟后，再精密加入终止液，放至室温后用酶标仪或紫外分光光度计在 405nm 波长处测定各管吸光度。

表 2 生物活性测定法

	缓冲液 体积	对照品/供试品溶液 体积	凝血酶溶液 体积	底物溶液 体积	终止液 体积
空白管	7V	0	V	V	V
对照品管/ 供试品管	6V	V	V	V	V

注：V 为加入溶液体积，范围为 25~200 $\mu$ l。

系统适用性要求 空白管吸光度 RSD $\leq$ 5%；以抑制百分率（TI%）为纵坐标，对照品系列溶液（或供试品系列溶液）浓度的自然对数值为横坐标分别进行线性拟合，相关系数 R<sup>2</sup> 应不小于 0.98。

$$\text{抑制百分率 (TI\%)} = [1 - r_u/r_s] * 100\%$$

r<sub>u</sub>=对照品溶液或供试品溶液测定吸光度（取每个浓度两份样品测定的平均值）。

r<sub>s</sub>=空白溶液测定吸光度（取三次空白测定的平均值）。

根据对照品回归方程，计算 TI%=47%时的对照品浓度，将该浓度代入供试品回归方程，计算得到比伐芦定凝血酶抑制百分率（TI%）。

限度 比伐芦定对凝血酶抑制百分率应为 42%~52%。

其他 应符合注射剂项下有关的各项规定（中国药典 2020 年版四部通则 0102）。

【含量测定】照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0512）测定。

供试品溶液 取本品 2 瓶，分别加水适量使溶解，并用水定量转移至同一量瓶中，再用水定量稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 0.25mg 的溶液。

对照品溶液 取比伐芦定对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 0.25mg 的溶液。

系统适用性溶液 取比伐芦定、杂质 VI 和杂质 VII 对照品各适量，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 0.25mg、杂质 VI 与杂质 VII 各 5 $\mu$ g 的混合溶液。

色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Welch Xtimate C18，4.6mm $\times$ 250mm，5 $\mu$ m 或效能相当的色谱柱）；以 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液（用冰醋酸调节 pH 值至 6.5 $\pm$ 0.1）-水（50:50）为流动相 A，以 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液（pH6.5）-乙腈（50:50）为流动相 B，按下表进行梯度洗脱；柱温为 40℃；进样器温度为 5℃；流速为每分钟 1.2ml；检测波长为 215nm；进样体积 40 $\mu$ l。

时间（分）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	90	10
5	85	15
50	65	35

60	60	40
60.1	90	10
70	90	10

**系统适用性要求** 系统适用性溶液色谱图中，出峰顺序为杂质 VI 峰、比伐芦定峰和杂质 VII 峰，杂质 VI 峰与比伐芦定峰之间的分离度应不小于 2.5，比伐芦定峰与杂质 VII 峰之间的分离度应符合要求。

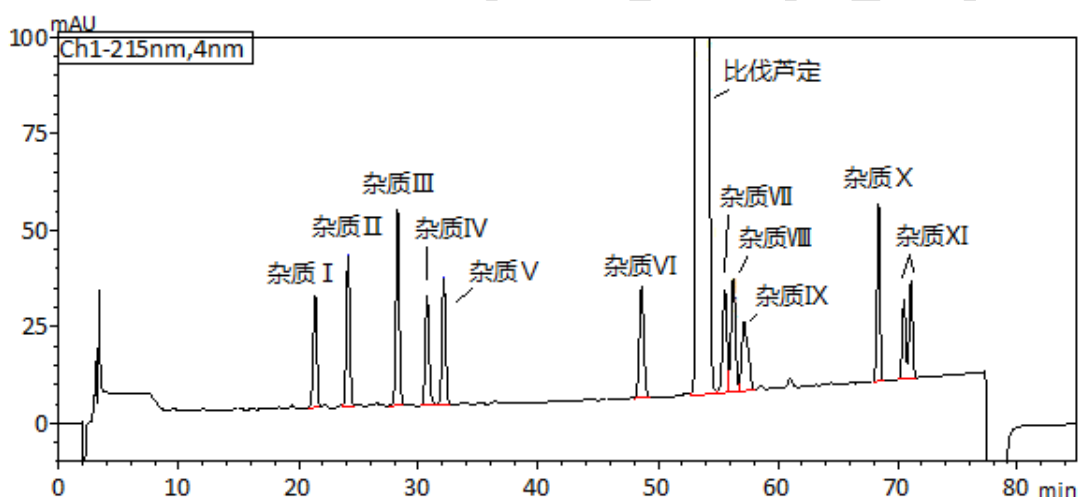
**测定法** 精密量取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法以峰面积计算。

**【类别】** 抗凝血药。

**【规格】** 0.25g（按  $C_{98}H_{138}N_{24}O_{33}$  计）

**【贮藏】** 遮光，密闭，25℃以下保存。

附 1 典型色谱图



有关物质—系统适用性色谱图

附 2

杂质 I: [1-11]-比伐芦定

D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-OH

$C_{43}H_{63}N_{15}O_{15}$  1030.05

杂质 II: [6-20]-比伐芦定

Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

$C_{71}H_{100}N_{16}O_{28}$  1625.67

杂质 III: [12-20]-比伐芦定

Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

C<sub>55</sub>H<sub>77</sub>N<sub>9</sub>O<sub>19</sub> 1168.25

杂质 IV: [3-20]-比伐芦定

Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

C<sub>84</sub>H<sub>122</sub>N<sub>22</sub>O<sub>31</sub> 1935.99

杂质 V: [2-20]-比伐芦定

Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

C<sub>89</sub>H<sub>129</sub>N<sub>23</sub>O<sub>32</sub> 2033.11

杂质 VI: [Asp<sup>9</sup>]-比伐芦定

D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

C<sub>98</sub>H<sub>137</sub>N<sub>23</sub>O<sub>34</sub> 2181.27

杂质 VII: 杂质 T

D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly



C<sub>98</sub>H<sub>136</sub>N<sub>24</sub>O<sub>32</sub> 2162.27

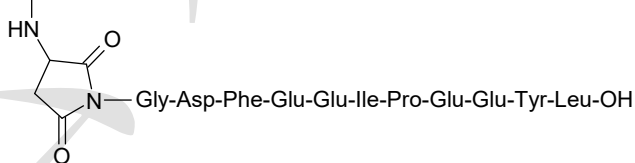
杂质 VIII: [D-Phe<sup>12</sup>]-比伐芦定

D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-D-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

C<sub>98</sub>H<sub>138</sub>N<sub>24</sub>O<sub>33</sub> 2180.29

杂质 IX: [环亚酰胺<sup>9</sup>]-比伐芦定

D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly



C<sub>98</sub>H<sub>135</sub>N<sub>23</sub>O<sub>33</sub> 2163.29

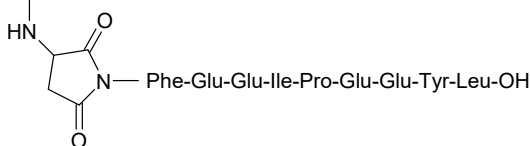
杂质 X: [Des-Glu<sup>13</sup>]-比伐芦定

D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

C<sub>93</sub>H<sub>131</sub>N<sub>23</sub>O<sub>30</sub> 2051.17

杂质 XI: [环亚酰胺<sup>11</sup>]-比伐芦定

D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly



C<sub>98</sub>H<sub>136</sub>N<sub>24</sub>O<sub>32</sub> 2162.27

---

起草单位：江苏省食品药品监督检验研究院

联系电话：025-86251230/025-86251220

联系人：薛敏华/陆益红

复核单位：广东省药品检验所

江苏省药品监督管理局