

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 μ 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 μ 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 μ 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 ^b	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 ^a	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，含水分不得超过 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（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（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 μ 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 R² 应不小于 0.98。

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

r_u=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_s=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 μ 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 μ 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 μ 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。

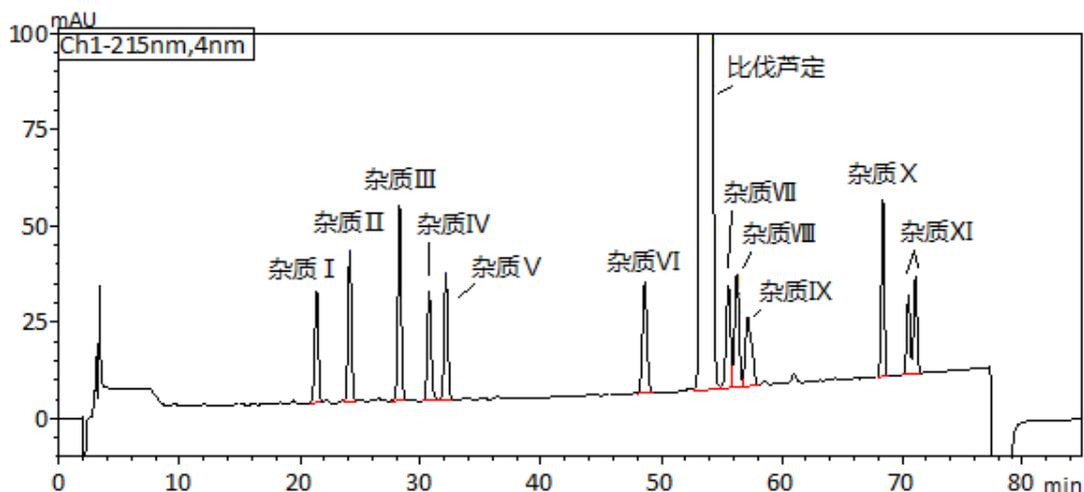
测定法 精密量取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法以峰面积计算。

【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

C₅₅H₇₇N₉O₁₉ 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

C₈₄H₁₂₂N₂₂O₃₁ 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

C₈₉H₁₂₉N₂₃O₃₂ 2033.11

杂质 VI: [Asp⁹]-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

C₉₈H₁₃₇N₂₃O₃₄ 2181.27

杂质 VII: 杂质 T

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



C₉₈H₁₃₆N₂₄O₃₂ 2162.27

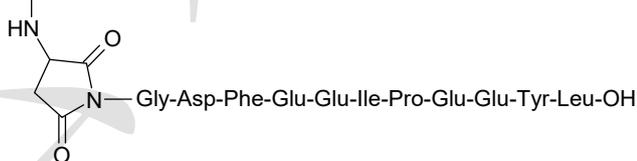
杂质 VIII: [D-Phe¹²]-比伐芦定

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

C₉₈H₁₃₈N₂₄O₃₃ 2180.29

杂质 IX: [环亚酰胺⁹]-比伐芦定

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



C₉₈H₁₃₅N₂₃O₃₃ 2163.29

杂质 X: [Des-Glu¹³]-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

C₉₃H₁₃₁N₂₃O₃₀ 2051.17

杂质 XI: [环亚酰胺¹¹]-比伐芦定

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



C₉₈H₁₃₆N₂₄O₃₂ 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