

## 首批比伐芦定国家对照品的研制\*

任丽萍, 贺兰英, 廖海明, 王瑾, 杨洪淼, 范慧红\*\*

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

**摘要 目的:** 为有效控制比伐芦定注射剂的产品质量, 研制比伐芦定首批含量测定用国家对照品, 同时探索合成肽类标准物质定量赋值的其他方法。**方法:** 采用红外光谱、紫外光谱、液相色谱、质谱等技术对其进行结构确证, 利用高效液相色谱法进行有关物质的测定, 采用质量平衡法确定比伐芦定的含量, 同时通过经肽纯度校正的肽含量方法进行验证, 并对供试品进行均匀性和稳定性考察。**结果:** 首批比伐芦定国家对照品以  $C_{98}H_{138}N_{24}O_{33}$  计, 含量为 88.8%, 均匀性和稳定性考察结果符合规定。**结论:** 根据合成肽的结构特点, 采用不同方法进行定性与定量研究, 可以确保国家对照品赋值的准确性。

**关键词:** 比伐芦定; 国家对照品; 质量平衡法; 含量测定

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2025)05-0851-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0274

## Establishment of the first batch of national reference standards for bivalirudin\*

REN Li-ping, HE Lan-ying, LIAO Hai-ming,  
WANG Jin, YANG Hong-miao, FAN Hui-hong\*\*

(National institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**Abstract Objective:** To develop the first national reference standards for the quantitative determination of bivalirudin, in order to effectively control the product quality of bivalirudin injections, and to explore alternative methods for the quantitative characterization of synthetic peptide reference materials. **Methods:** Infrared (IR) spectroscopy, UV spectroscopy, HPLC, MS were used to confirm the structure of bivalirudin. Related substance were analyzed by HPLC. The mass balance method was used to determine the content of bivalirudin, which was further verified by a peptide content assay corrected for related peptide impurities. In addition, the stability and uniformity of the candidate reference material were evaluated. **Results:** The content of the first batch of bivalirudin national reference standard was 88.8%, calculated on  $C_{98}H_{138}N_{24}O_{33}$ , and the stability and uniformity tests met the required specifications. **Conclusion:** Based on the structural characteristics of the synthetic peptides, multiple qualitative and quantitative methods were used to ensure the accuracy of the content assignment for the national reference standard of bivalirudin.

**Keywords:** bivalirudin; national reference standard; mass balance method; assay

\* 中检院化药所重点实验室学科建设课题合成肽类药物标准物质研制标定关键技术研究课题(2024HYZX27)

\*\* 通信作者 Tel:(010)53851585; E-mail: fanhuihong@nifdc.org.cn

第一作者 Tel:(010)53851412; E-mail: renliping@nifdc.org.cn

比伐芦定为直接凝血酶抑制剂,临床上主要用于经皮冠状动脉介入(PCI)治疗的患者,比伐芦定PCI术后出血事件发生率明显低于肝素<sup>[1-2]</sup>。比伐芦定是化学合成的由20个氨基酸组成的多肽,是一种水蛭素衍生物。有研究表明,比伐芦定可以减少出血并发症的风险<sup>[3-4]</sup>。

比伐芦定、注射用比伐芦定尚未被2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)二部收录,EP、JP目前也均未收录,国家药典委员会于2024年8月12日在官网公示了比伐芦定和注射用比伐芦定的标准草案<sup>[5]</sup>。2018年,美国药典论坛在PF44(2)公布了比伐芦定原料和比伐芦定注射剂的征求意见稿,2023年12月1日生效<sup>[6-7]</sup>。

目前,中国已有近10家企业获得比伐芦定及注射剂的药品批准文号,各家企业标准虽不统一,但其生产工艺、质量控制和检测方法均已较为成熟。2020年,注射用比伐芦定(规格0.25g)被纳入第4批国家药品集中采购目录,但尚未有该产品的对照品发放。为更好地适应药品生产和监管的需要,本实验室开展了首批比伐芦定含量测定用国家对照品的研制。

## 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(LC-20AD泵, Sil-20AC自动进样器, SPD-20A检测器, LC Solution工作站, 岛津公司); ALPHA II 红外光谱仪(OPUS 7.8工作站, 布鲁克公司); UltiMate 3000/QEXACTIVE液相色谱质谱联用仪(赛默飞公司); UV2700紫外分光光度计(岛津公司); HP6890气相色谱仪(安捷伦公司); XPE205十万分之一电子天平(梅特勒托利多公司); KF水分测定仪(874 OVEN Sample Processor, 703 Ti Stand, 831 KF Coulometer, 万通公司); Autopol III 旋光仪(鲁道夫公司), 氮分析仪(FlashSmart/Protein, Eagersmart工作站, 赛默飞公司); MP230K酸度计(梅特勒托利多公司); iCAP6300电感耦合等离子体发射光谱仪(赛默飞公司); iCAP6000 series 电感耦合等离子体质谱联用仪(赛默飞公司); 动态水分吸附仪(DVS Adventure, Surface Measurement Systems公司)。

比伐芦定原料(批号141201), 成都圣诺生物制药有限公司; 比伐芦定对照品(批号F021K0, 每支5mg), USP; [ $\alpha$ -Asp9]-比伐芦定(批号C1-006e/D2001F03)、[ $\beta$ -Asp9]-比伐芦定(批号C1-006h/D2001F03)、[1-11]-比伐芦定(批号C1-006g/D2001F02)、[Des-Glu]-

比伐芦定(批号C1-006f/D2001F03)、[Plus-Gly]-比伐芦定(批号C1-006b/D1902F04)、[Des-Gly]-比伐芦定(批号C1-006c/D2101F02)、[12-20]-比伐芦定(批号C1-006a/D2001F03), 成都圣诺生物制药有限公司。

钠、钾元素标准溶液(批号203049-5, 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、多元标准溶液(批号213035-1, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、金元素标准溶液(批号207029-2, 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 国家有色金属及电子材料分析测试中心; 门冬氨酸(批号348450), Thermo Fisher公司; 谷氨酸(批号140690-202305)、丝氨酸(批号140688-202104)、组氨酸(批号140855-202001)、甘氨酸(批号140689-202308)、苏氨酸(批号140682-202103)、精氨酸(批号140685-202209)、丙氨酸(批号140680-202206)、酪氨酸(批号140609-202215)、胱氨酸(批号140632-202204)、缬氨酸(批号140681-202204)、甲硫氨酸(批号140684-201803)、苯丙氨酸(批号140676-202301)、异亮氨酸(批号140683-202103)、亮氨酸(批号140687-202103)、盐酸赖氨酸(批号140673-202211)、脯氨酸(批号140677-202310)、门冬氨酸(批号140691-201602) 17种氨基酸对照品, 中国食品药品检定研究院; 三氟醋酸、二甲基亚砜、异丙醇、乙腈、四氢呋喃、甲醇、*N,N*-二甲基甲酰胺均为色谱纯; 甲酸为质谱纯; 乙醚、三氯甲烷、丙酮、磷酸、氢氧化钠、碳酸钠、冰醋酸、十二水合磷酸氢二钠、十水合四硼氢钠、盐酸、三水合醋酸钠、正缬氨酸、硼酸、邻苯二甲醛、9-苄甲基氯甲酸盐、氯化铵均为分析纯; 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 结构确证

**2.1.1 红外光谱** 取供试品适量(至少约1mg), 采用溴化钾固体压片法, 在500~4 000  $\text{cm}^{-1}$  区间内进行红外光谱扫描, 并进行了谱峰归属。USP对照品和供试品的红外光谱图见图1, 红外光谱图中各吸收峰的谱峰归属见表1, 符合比伐芦定结构基团的红外吸收特征。

**2.1.2 高效液相色谱测定保留时间一致性** 取供试品和比伐芦定USP对照品适量, 用超纯水溶解配成1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液, 采用Vydac C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 以pH 6.5的0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的醋酸钠水溶液-水(1:1)为流动相A, 醋酸盐缓冲液-乙腈(1:1)为流动相B, 梯度洗脱(0~5 min, 90%A → 85%A);

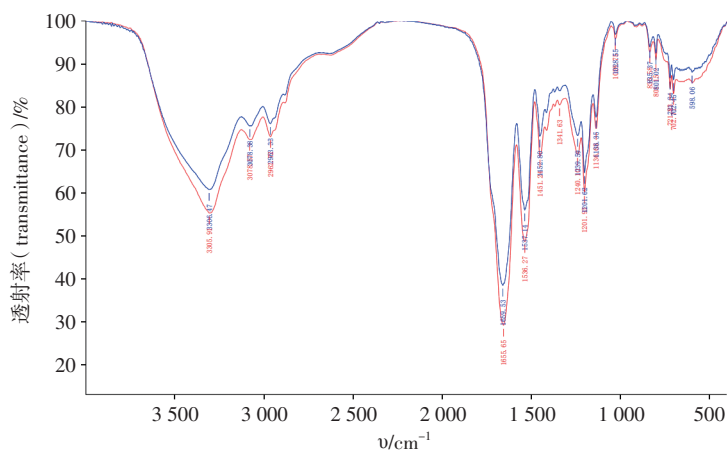


图 1 比伐芦定供试品(蓝)和 USP 对照品(红)的红外光谱叠加图

Fig. 1 Overlay of the IR spectra of the bivalirudin sample (blue) and reference standards from USP (red)

表 1 红外光谱图中各吸收峰谱峰归属

Tab. 1 Characteristic absorption peaks of bivalirudin in IR spectrum

样品吸收峰波数 (wavenumber of characteristic absorption peak)/cm <sup>-1</sup>	振动类型 (mode of vibration)	所属基团 (corresponding chemical group)
3 306.47	伸缩振动 (stretching vibration)	氨基及羟基 (amino and hydroxyl groups)
2 963.43	伸缩振动 (stretching vibration)	饱和烷烃碳氢 (carbon-hydrogen bond of saturated alkane)
1 659.53	伸缩振动 (stretching vibration)	羧基、酰胺和乙酰基 (carboxyl, amide and acetyl group)
1 537.14	伸缩振动 (stretching vibration)	芳环 (aromatic ring)
1 136.35	伸缩振动 (stretching vibration)	醇羟基、脂肪胺和脂肪烃 (alcohol hydroxyl, fatty amine and aliphatic hydrocarbon)

5~30 min, 85%A → 65%A; 30~35.1 min, 65%A; 35.1~40 min, 90%A), 流速 1.2 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 215 nm,

柱温 40 °C。供试品与 USP 对照品的保留时间一致, 见图 2。

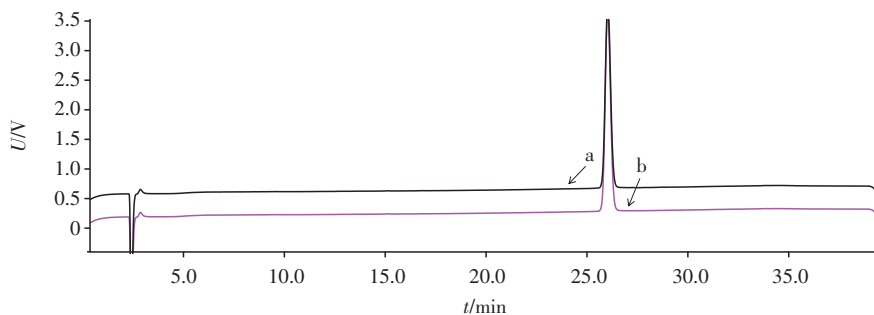


图 2 比伐芦定 USP 对照品 (a) 与供试品 (b) HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of bivalirudin reference substance from USP (a) and sample (b)

**2.1.3 质谱法测定平均分子量** 取比伐芦定适量, 用 0.1% 的甲酸水溶液溶解, 配成质量浓度为 20 μg · mL<sup>-1</sup> 的溶液, 直接进样分析。以 0.1% 甲酸水溶液 - 0.1% 甲酸乙腈溶液 (3 : 7) 为流动相, 等度洗脱。采用电喷雾电离 (ESI), 离子采集模式 (+), 四极杆质量检测器。结果供试品质谱图 (图 3) 中出现 m/z 2 180.855 47 的质谱峰, 为比伐芦定

的 [M+H]<sup>+</sup> 准分子离子峰, 与理论分子量 2 180.29 一致。

**2.1.4 紫外光谱法** 取供试品适量, 用水溶解并稀释制成 1 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液, 置于石英比色皿中, 用紫外可见分光光度计在 200~400 nm 波长进行扫描, 狭缝宽度 1 nm。比伐芦定在 275 nm 处有最大吸收, 在 249 nm 处有最小吸收。见图 4。

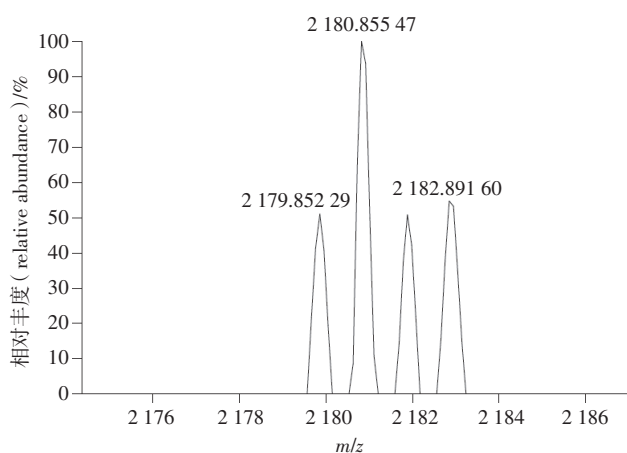


图3 比伐芦定供试品质谱图

Fig. 3 Mass spectrum of bivalirudin sample

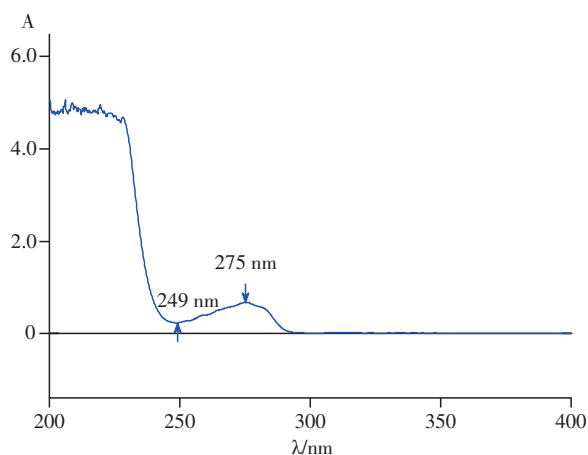


图4 供试品紫外分光光谱图

Fig. 4 UV spectrum of bivalirudin sample

**2.1.5 氨基酸比值** 参照2020年版《中国药典》第一增补本指导原则(9120),取17种氨基酸对照品,加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶解,分别配制成每种氨基酸质量浓度约为 $0.06 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,取 $0.5 \text{ mL}$ ,加入内标溶液(正缬氨酸溶液,质量浓度 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;肌氨酸溶液,质量浓度 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液配制) $50 \mu\text{L}$ ,作为混合对照品溶液;取供试品,用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸在 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 水解 $24 \text{ h}$ ,干燥后以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶解,取 $0.5 \text{ mL}$ ,加入内标溶液 $50 \mu\text{L}$ ,以Fmoc溶液(质量浓度 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,用乙腈配制)作为衍生化试剂进行衍生化。氨基酸测定法参照指导原则方法三,按内标法,以峰面积计算样品中各氨基酸的摩尔比值,结果见表2,比伐芦定所含9种氨基酸比值与理论值一致。

表2 比伐芦定氨基酸比值测定结果

Tab. 2 The ratio of amino acid of bivalirudin

氨基酸 (amino acid)	氨基酸比值 (amino acid ratio)	理论值 (theoretical value)
Asp	2.0	2.0
Glu	4.0	4.0
Gly	4.8	5.0
Arg	1.0	1.0
Tyr	1.0	1.0
Phe	2.0	2.0
Ile	1.0	1.0
Leu	1.0	1.0
Pro	3.1	3.0

## 2.2 理化分析

**2.2.1 酸碱度** 取供试品,加水溶解制成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,测得溶液的pH为2.9。

**2.2.2 无机杂质** 取供试品适量,加入硝酸 $2.5 \text{ mL}$ 消解后,以Li、Mg、Fe、Zn、Pb、Al等26种元素标准溶液为对照,采用ICP-MS法测得以上金属元素总含量为 $0.00032\%$ 。取供试品适量,加入硝酸 $2.5 \text{ mL}$ 消解后,以Na、K元素标准溶液为对照,采用OES-MS法测得Na、K含量为 $0.00032\%$ 。供试品中无机杂质的总含量为 $0.00064\%$ 。

**2.2.3 水分** 采用2020年版《中国药典》四部通则0832第一法(费休氏法)库伦滴定法,取供试品 $10 \text{ mg}$ ,精密称定,置于 $10 \text{ mL}$ 西林瓶中,轧盖,置于卡式炉中, $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热萃取,测得水分 $1.72\%$ 。

**2.2.4 三氟醋酸** 按照USP 43-NF 38“肽中三氟醋酸的测定”(503.1)<sup>[8]</sup>,取供试品 $25 \text{ mg}$ ,精密称定,采用Waters T3 C<sub>18</sub>( $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ )色谱柱,测得三氟醋酸的含量为 $8.885\%$ 。

**2.2.5 比旋度** 按照2020年版《中国药典》四部通则0621,取供试品 $25 \text{ mg}$ ,用 $1\%$ 的醋酸溶液溶解并制成 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,在 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下测定旋光度,按照无水、无三氟醋酸物计算比旋度,结果比旋度为 $-114.2^\circ$ 。

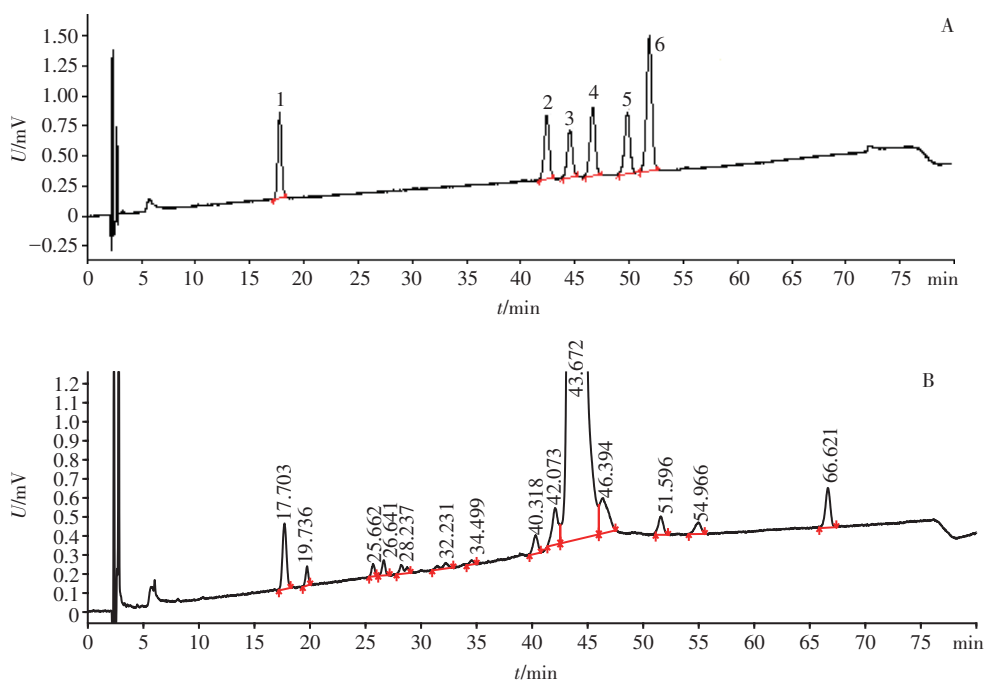
**2.2.6 肽含量** 取供试品和门冬氨酸对照品 $20 \text{ mg}$ ,精密称定,置于锡罐中,密封,置于氮分析仪中测定,左炉温度 $950 \text{ }^\circ\text{C}$ ,右炉温度 $840 \text{ }^\circ\text{C}$ ;柱温 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ,氧气流量 $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,以门冬氨酸对照品为外标,计算3份样品中氮的含量,以比伐芦定理论分子式计算肽含量的平均值为 $88.82\%$ 。

**2.2.7 残留溶剂** 采用气相色谱法检测供试品合

成工艺中使用的有机溶剂(甲醇、乙醚、异丙醇、乙腈)残留量。以DB-624毛细管柱(0.53 mm×30 m, 3.0 μm)为色谱柱,氮气为载气,程序升温(起始温度为50℃,维持7 min,以10℃·min<sup>-1</sup>的速率升温至200℃,保持10 min),顶空进样,平衡温度80℃,顶空平衡时间45 min。采用二甲基亚砜制备质量浓度为100 mg·mL<sup>-1</sup>的供试品溶液,按外标法以峰面积计算甲醇含量为0.002 07%,异丙醇含量为0.003 09%,乙醚、乙腈未检出。供试品中残留溶剂的总含量为0.005 2%。

2.2.8 有关物质I 采用Phenomenex Aeris™ PEPTIDE

C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 2.6 μm)色谱柱,以pH 3.5的0.025 mol·L<sup>-1</sup>的磷酸二氧钾水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~50 min, 80%A→78%A; 50~70 min, 78%A→76%A; 70~71 min, 76%A→80%A; 71~80 min, 80%A),流速0.6 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长210 nm,柱温45℃。用水配制[12-20]-BIVA、[Plus-Gly]-BIVA、BIVA、[Des-Gly]-BIVA、[β-Asp9]-BIVA和[α-Asp9]-BIVA质量浓度均为0.75 μg·mL<sup>-1</sup>的系统适用性溶液,以上5种杂质以已知杂质为外标,其他未知杂质以比伐芦定为外标,计算总杂为0.397 5%。色谱图见图5。



1. [12-20]-BIVA 2. [Plus-Gly]-BIVA 3. BIVA 4. [Des-Gly]-BIVA 5. [β-Asp9]-BIVA 6. [α-Asp9]-BIVA

A. 系统适用性溶液(system suitability solution) B. 供试品溶液(sample solution)

图5 比伐芦定有关物质I 色谱图

Fig. 5 Chromatograms of bivalirudin related substance I

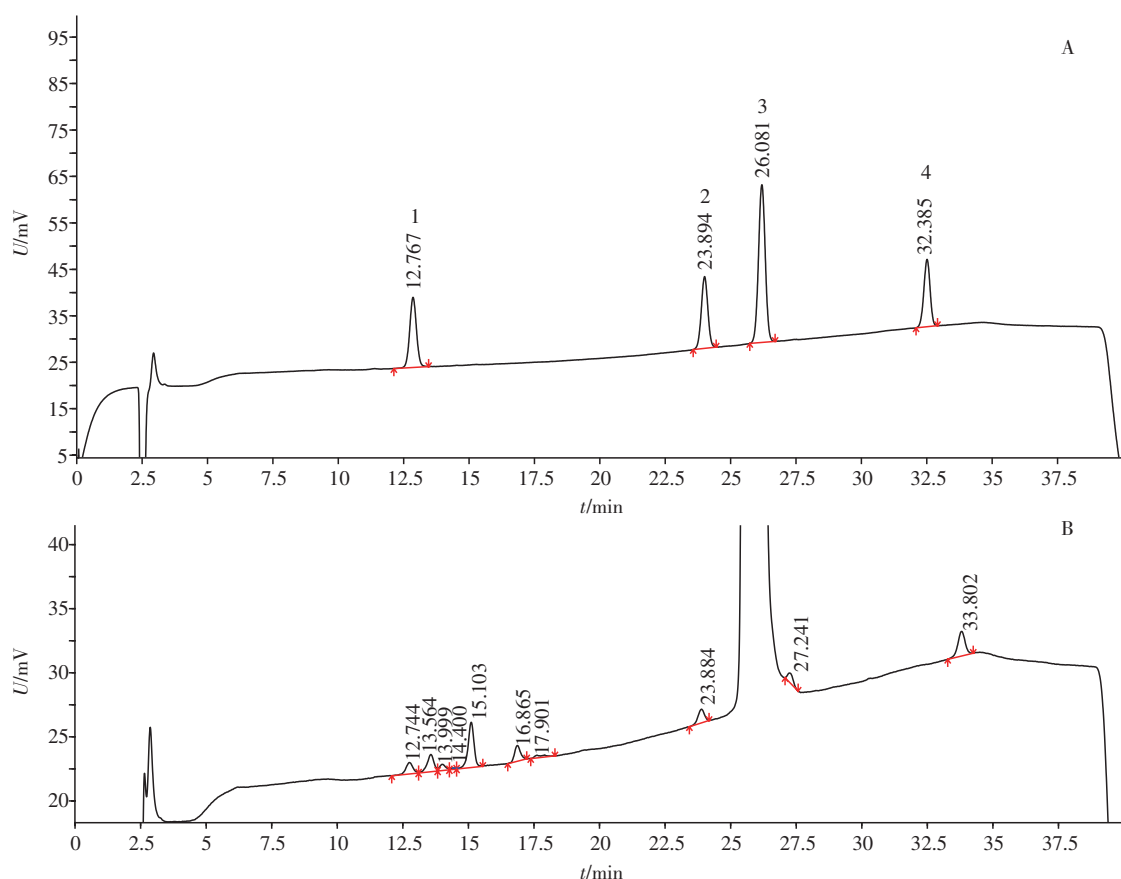
2.2.9 有关物质II 色谱条件参照“2.1.2”项下。取比伐芦定,用水配制质量浓度为1 mg·mL<sup>-1</sup>的供试品溶液(下同),用水配制[1-11]-BIVA、[α-Asp9]-BIVA、[Des-Glu10]-BIVA和比伐芦定质量浓度均为0.75 μg·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液,以上3种杂质以已知杂质为外标,其他未知杂质以比伐芦定为外标,计算总杂为0.279 1%。色谱图见图6。

2.2.10 有关物质III 采用高效液相色谱法。采用Waters Xbridge HILIC(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm)色谱柱,以0.04%TFA的乙腈水溶液[水-乙腈(15:85)]

为流动相A,0.04%TFA的乙腈溶液为流动相B,等度洗脱,流速1.2 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长207 nm,柱温45℃,进样量5 μL。采用面积归一化法计算总杂为0.194 5%。色谱图见图7。

2.3 含量赋值

2.3.1 质量平衡法 根据质量平衡法,采用以下公式计算比伐芦定的含量:比伐芦定含量=(100%-水分-残留溶剂-三氟醋酸-无机杂质)×(100%-有关物质I-有关物质II)=(100%-1.72%-0.005 2%-8.885%-0.000 64%)×(100%-0.397 5%-0.279 1%),



1. [1-11]-BIVA 2. [ $\alpha$ -Asp9]-BIVA 3. BIVA 4. [Des-Glu10]-BIVA

A. 系统适用性溶液 (system suitability solution) B. 供试品溶液 (sample solution)

图6 比伐芦定有关物质 II 色谱图

Fig. 6 Chromatograms of bivalirudin related substance II

结果为 88.8%。

**2.3.2 肽纯度校正后的肽含量验证** 采用肽纯度校正肽含量法,对质量平衡法赋值结果进行验证,通过该法计算比伐芦定的含量,计算公式为:比伐芦定含量 = 肽含量  $\times$  (100% - 有关物质) = 88.82%  $\times$  (100% - 0.3975% - 0.2791%),结果为 88.2%。

#### 2.4 均匀性和稳定性考察

比伐芦定原料分装后,随机抽取分装后的 12 支样品,按照随机列表顺序进样,以峰面积/称样量为判定指标,采用统计软件 JMP10 进行单因子方差分析,各瓶间通过均匀性检验,  $P=0.5746$  ( $> 0.05$ ),最小称样量为 10 mg,该批比伐芦定瓶间均匀性良好。

在 2~8  $^{\circ}\text{C}$  和 45  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行稳定性试验,将供试品分别放置 5、10 d,各取样品检测有关物质 II,结果见表 3。在 2~8  $^{\circ}\text{C}$  放置 10 d 时,杂质略有升高;45  $^{\circ}\text{C}$  放置 10 d 时,总杂明显升高。建议可多放置冰袋 2~8  $^{\circ}\text{C}$  运输,长期贮存建议参照原料贮藏温度设

定为 -20  $^{\circ}\text{C}$ 。

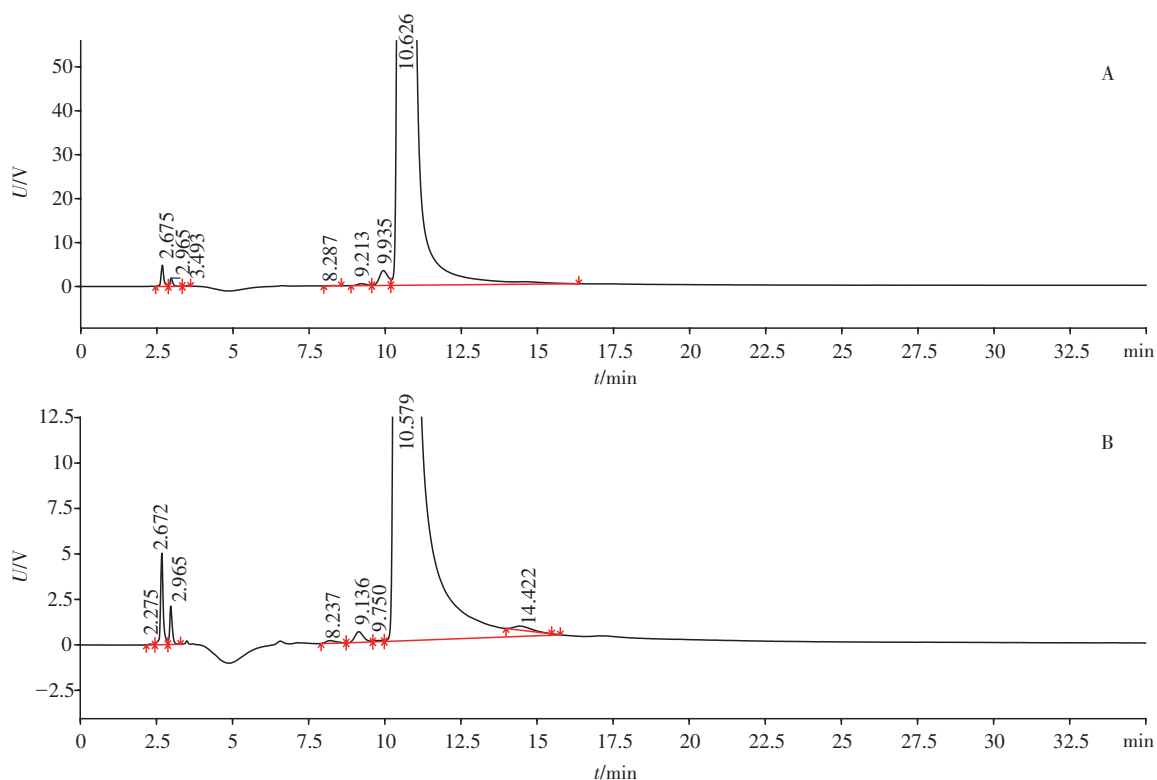
#### 2.5 引湿性

取供试品 25 mg,精密称定,采用动态水分吸附仪,随着湿度的增加,测定比伐芦定的增重量。结果表明:当湿度增加至 80% 时,增重率为 11.09%;湿度增加至 90% 时,增重率为 17.3%,表明该品种极具引湿性。

### 3 讨论

#### 3.1 HPLC 纯度分析

由于比伐芦定的质量标准尚未统一,各家企业执行标准中有关物质测定方法有所不同,为了更好地检出供试品中的杂质,分别考察了质量标准中涉及的 3 种有关物质测定方法。即 pH 3.5 的磷酸盐缓冲液 - 乙腈 (有关物质 I)、pH 6.5 的醋酸盐缓冲液 - 乙腈 (有关物质 II) 的反相色谱分离体系和三氟醋酸水乙腈的亲水作用色谱分离体系 (有关物质 III)。其中,有关物质 I 和有关物质 III 分析杂质的类型基本一致,



A. 系统适用性溶液 (system suitability solution) B. 供试品溶液 (sample solution)

图 7 比伐芦定有关物质 III 色谱图

Fig.7 Chromatogram of bivalirudin related substance III

表 3 稳定性考察结果

Tab. 3 The results of stability test

稳定性考察样品 (stability testing sample)	[ $\alpha$ -Asp9]-BIVA 的量 ( [ $\alpha$ -Asp9]-BIVA Content ) / %	总杂质 (total impurities) / %
2~8 °C 5 d	0.029 2	0.284 1
2~8 °C 10 d	0.031 3	0.295 0
45 °C 5 d	0.064 5	0.411 3
45 °C 10 d	0.106 9	0.556 1
-20 °C	0.029 6	0.277 8

鉴于有关物质 III 杂质的分离检出能力较差,最终赋值时以有关物质 I 和有关物质 II 之和计算。

### 3.2 稳定性考察

标准物质是控制药品质量实现量值溯源的重要工具,保证其稳定性十分重要。首批标准物质的稳定性考察主要是指短期稳定性,即标准物质特性量值在运输条件下的稳定性,也称作运输稳定性,应确定标准物质发生显著变化的温度和所选运输条件下能经受的最长运输时间<sup>[9-10]</sup>。该品种原料药的储存温度是 -20 °C,为对该标准品的运输条件和用户使用提供重要的参考依据,考察分装好的比伐芦定半成品

在 2~8 °C 和 45 °C 条件下 10 d 内有关物质的变化,以评估其稳定性。分析方法主要参照有关物质 II,选择对温度敏感的降解杂质 [ $\alpha$ -Asp9]-BIVA 作为指征性杂质,同时也考察了总杂的变化趋势。结果表明:在 45 °C 放置 5 d 和 10 d 时,稳定性明显发生变化;在 2~8 °C 放置 10 d,稳定性良好,表明比伐芦定对照品可以在 2~8 °C 条件下进行运输。

### 3.3 定量赋值方法

合成肽类药物的含量一般是以无水、无反离子(如醋酸或其他酸)计,以含量测定用对照品为外标计算主成分的含量,因此,对照品的准确赋值直接关

系到药品的有效性<sup>[11]</sup>。理化检测用药品标准物质质量测定,选择的定值方法应考虑到其相关的药品标准和预期用途,原则上应采用质量平衡法赋值。同时,可选用其他方式对特性量值进行验证<sup>[12-13]</sup>。USP 1503 通则指出,肽含量还可以通过氮元素测定法、凯氏定氮法或氮化学发光检测法测定,定量核磁共振光谱法也是测定肽含量的有用工具,但需要选择合适的内标,且内标的信号需要与肽的信号完全分离<sup>[14]</sup>。但是,由于化合物中氢的化学范围不同,一般药品的<sup>1</sup>H核磁共振谱中会产生多种响应峰,这些峰容易互相影响,使得样品定量峰选择的条件比较苛刻,也会使内标物质的选择受到一定的限制<sup>[15]</sup>。

在采用质量平衡法对该品种进行赋值时,本文首次探索性地采用氮分析法对肽含量进行测定,并采用肽相关杂质分析对所测肽含量进行校正,二者赋值结果基本一致。

#### 4 结论

本研究按照国家药品标准物质标定的一般技术要求进行标定,首次采用肽纯度校正后的肽含量进行验证,目前已通过药品标准物质专家委员会评审并于2024年3月开始发放,作为鉴别及HPLC含量测定用国家标准品,可以满足产品上市后监督、企业生产放行及产品质量监测的需求。

#### 参考文献

- [1] 陈三保,李毅,裘淼涵,等.肝素与比伐芦定对女性冠心病患者经皮冠状动脉介入治疗影响比较[J].临床军医杂志,2021,49(3):246  
CHEN SB, LI Y, QIU MH, *et al.* Comparison of the effects of heparin and bivalirudin on percutaneous coronary intervention in female patients with coronary heart disease[J]. *Clin J Med Off*, 2021, 49(3): 246
- [2] 刘育慧,李云贺,耿清峰,等.急诊高危行经皮冠脉介入术患者围手术期应用比伐芦定与肝素抗凝效果、主要心血管不良事件发生率及临床疗效比较[J].中国分子心脏病学杂志,2022,22(2):4561  
LIU YH, LI YH, GENG QF, *et al.* Anticoagulant effect, major adverse cardiovascular events incidence and clinical efficacy of perioperative application of bivalirudin versus heparin in emergency high-risk patients undergoing percutaneous coronary intervention[J]. *Mol Cardiol China*, 2022, 22(2): 4561
- [3] 李雪冬,胡业梅,王真,等.急性心肌梗死患者PCI延时与无延时应用比伐芦定的对照研究[J].中华全科医学,2022,20(8):1323  
LI XD, HU YM, WANG Z, *et al.* Randomised controlled trial of delayed versus undelayed bivalirudin in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention[J]. *Chin J Gen Pract*, 2022, 20(8): 1323
- [4] STONE G, VALGIMIGLI M, ERLINGE D, *et al.* Bivalirudin vs heparin anticoagulation in STEMI: confirmation of the BRIGHT-4 results[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2024, 84(16): 1512
- [5] 国家药典委员会.关于比伐芦定、注射用比伐芦定国家药品标准草案的公示[EB/OL]. [2024-08-12]. <https://www.chp.org.cn/#/business/standard?keyword=%E6%AF%94%E4%BC%90%E8%8A%A6%E5%AE%9A>  
Chinese Pharmacopoeia Commission, Public Announcement and Solicitation of Comments on the Draft National Drug Standards for Bivalirudin and Bivalirudin for Injection [EB/OL]. [2024-08-12]. <https://www.chp.org.cn/#/business/standard?keyword=%E6%AF%94%E4%BC%90%E8%8A%A6%E5%AE%9A>
- [6] USP. Bivalirudin [EB/OL]. [2023-12-01]. [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M9810\\_02\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M9810_02_01)
- [7] USP. Bivalirudin for Injection [EB/OL]. [2023-12-01]. [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M9813\\_02\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M9813_02_01)
- [8] USP. General Chapter 503.1, Trifluoroacetic Acid (TFA) in Peptides [S]. 2020
- [9] 陈亚飞,肖新月,何平,等.标准物质稳定性考察规范解读和有效期管理方式的研究[J].中国药事,2018,32(3):317  
CHEN YF, XIAO XY, HE P, *et al.* Interpretation of reference material stability investigation requirements and study on expiry date management methods [J]. *Chin Pharm Aff*, 2018, 32(3): 317
- [10] 常艳,马双成,胡昌勤.美洛西林标准物质短期稳定性研究[J].药物分析杂志,2013,33(4):684  
CHANG Y, MA SC, HU CQ. Short term stability study of mezlocillin reference material [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(4): 684
- [11] 任丽萍,范慧红.合成肽类药物的质量控制[J].中国药事,2023,37(8):925  
REN LP, FAN HH. The review of quality control of chemically synthetic peptides drug [J]. *Chin Pharm Aff*, 2023, 37(8): 925
- [12] 陈亚飞,李晓东,刘明理,等.药品标准物质基本特性与规范生产有关质量管理要求[J].中国药事,2017,31(2):134  
CHEN YF, LI XD, LIU ML, *et al.* Quality management requirements for pharmaceutical reference standards on essential characteristics and production specification [J]. *Chin Pharm Aff*, 2017, 31(2): 134
- [13] 吴先富,肖新月.核磁共振波谱在药物领域中的应用[J].药物分析杂志,2020,40(11):1907  
WU XF, XIAO XY. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in pharmaceutical application [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2020, 40(11): 1907
- [14] USP. General Chapter 1503. Quality Attributes of Synthetic Peptide Drug Substances [S]. 2021
- [15] 刘阳,魏宁漪,张琪,等.<sup>19</sup>F核磁共振定量技术测定酒石酸吉米格列汀倍半水合物含量[J].药物分析杂志,2014,34(7):1197  
LIU Y, WEI NY, ZHANG Q, *et al.* Quantitative analysis of gemigliptin tartrate sesquihydrate by <sup>19</sup>F quantitative NMR (<sup>19</sup>F-qNMR) [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(7): 1197

(本文于2024年4月24日收到)