

RP-HPLC 法测定苯磺酸氨氯地平片的不确定度评定

吴 贇¹, 张胜利², 王成港^{1*}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 施维雅(天津)制药有限公司 天津 300457

摘要: 目的 对苯磺酸氨氯地平片采用 RP-HPLC 测定方法的不确定度进行评估。方法 采用因果图分析方法和相关数据模型量化分析方法中各不确定度分量, 计算合成标准不确定度和扩展不确定度。结果 各不确定度分量中由对照品质量分数引入的分量最大, 测定的扩展不确定度为 0.009 6 ($k=2$), 应表示为 $(99.86 \pm 0.96)\%$ 。结论 通过不确定度的评估, 证明了苯磺酸氨氯地平片测定方法的科学、合理, 并可以根据各分量的大小优化方法, 为实验设计提供数据支持。

关键词: 苯磺酸氨氯地平; 测定; 不确定度; 高效液相色谱

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)04-0535-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.016

Uncertainty evaluation on determination of Amlodipine Besylate Tablets by RP-HPLC

WU Yun¹, ZHANG Sheng-li², WANG Cheng-gang¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Servier (Tianjin) Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300457, China

Abstract: **Objective** To evaluate the uncertainty of the determination of Amlodipine Besylate Tablets by RP-HPLC method. **Methods** Each component of uncertainty was evaluated by the causality analysis and related data model analysis method, and the combined standard uncertainty and expanded uncertainty were calculated individually. **Results** The maximal uncertainty component was caused by the purity of reference substance. The expanded uncertainty was 0.009 6 ($k=2$), and should be expressed as $(99.86 \pm 0.96)\%$. **Conclusion** The assay method of Amlodipine Besylate Tablets is scientific and reasonable, which could be optimized according to the uncertainty components and the data for the experimental design could be well supplied.

Key words: Amlodipine Besylate Tablets; determination; uncertainty; HPLC

药物分析工作一直是药品研发的重点内容, 建立一套科学、合理、有效的药品质量标准是保证药品质量的前提, 随着国内药品研发水平的不断提高, 市场对药品质量的要求也不断提高, 质量测定方法的建立也应更加科学和严谨。通过质量结果的可信度来证明测定结果的真实性, 这通常与所使用的分析方法无关, 度量该项内容的一个有用的方法就是不确定度。不确定度是表征合理地赋予被测量值的分散性与测量结果相联系的参数^[1]。苯磺酸氨氯地平片是用于治疗高血压的常用药物、本实验以苯磺酸氨氯地平片测定方法为模型, 依据《化学分析中不确定度的评估指南》中的有关要求对其测定方法的不确定度进行计算、评估。

1 仪器与试剂

安捷伦 1200 型高效液相色谱仪; 梅特勒托利多 MS105 型半微量天平及 AL104 型分析天平; 奥特赛恩斯 AS10200BD 型超声波清洗器。

苯磺酸氨氯地平原料药(浙江新赛科药业有限公司, 批号 110604), 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 100374200903); 乙腈(色谱纯, 批号 120924)、甲醇(色谱纯, 批号 121114)均购自天津康科德科技有限公司, 磷酸二氢钾(化学纯, 天津迪博化工股份有限公司, 批号 20110917)。

2 实验方法

2.1 样品测定

2.1.1 系统适用性与色谱条件 迪马 ODS 色谱柱

收稿日期: 2013-02-26

作者简介: 吴 贇, 助理研究员, 研究方向: 药物制剂与分析。Tel: (022) 23006879 E-mail: wuy@tjpr.com

*通信作者 王成港(1975—), 男, 副研究员, 从事新药制剂研究。Tel: (022)23006879 E-mail: wcg666@gmail.com

(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 以 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调 pH 3.0) - 乙腈 (60: 40) 为流动相, 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 238 nm; 柱温为 35 °C; 进样量为 20 μL。理论板数按氨氯地平峰计算不低于 2 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 称取苯磺酸氨氯地平对照品 17.3 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 超声处理使溶解, 放冷, 加甲醇稀释并加至刻度, 摇匀。精密移取 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并加至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品 20 片, 精密称定, 研细, 精密称取适量 (约相当于含氨氯地平 5 mg) 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理使其溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.1.4 测定方法 分别精密量取供试品和对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算, 即得。

2.2 不确定度评估

2.2.1 数学模型 依据测量过程和原理, 苯磺酸氨氯地平片中苯磺酸氨氯地平的测定由下式导出。

$$A_{ij} = (A_r W_0) / W_r \quad (1)$$

$$C_s = (A_s C_r) / A_{ij} \quad (2)$$

$$X = (C_s V W) / (W_s W_b) \quad (3)$$

A_{ij} 为对照品溶液的校准峰面积; A_r 为对照品溶液的峰面积; W_0 为对照品的理论称样量; W_r 为对照品的实际称样量; C_s 为对照品溶液质量浓度; A_s 为对照品溶液的峰面积; C_r 为供试品溶液质量浓度; X 为苯磺酸氨氯地平片中氨氯地平的的质量分数; V 为供试品溶液稀释体积; W_s 为供试品的实际称样量; W 为苯磺酸氨氯地平片平均片质量; W_b 为苯磺酸氨氯地平片标示量

将 (1) 式代入 (2) 式, 由于 W_0 、 W_b 为常量, 设 $P = 1 / (W_0 W_b)$, 再代入 (3) 式后得氨氯地平计算公式 $X = P \times (A_s C_r W_r V W) / (A_r W_s) \times 100\%$ 。

2.2.2 不确定度各分量的计算

(1) 对照品称量过程中引入的相对标准不确定度 称量过程中不确定度的引入来源主要包括 3 个方面: 天平校准产生的不确定度分量、对照品质量分数和称量重复性。校准操作有 2 个潜在的不确定度来源, 即天平的灵敏度和线性, 但由于称量采用减重法, 因此仪器灵敏度产生的影响可以忽略^[2-3]。

根据 MS 501 天平计量检定证书中提供的最大偏载误差为 0.04 mg, 属于 B 类不确定度, 依据矩形分布, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则天平精度引起的相对标

准不确定度为 $u_1(W_r) = 0.04 / (\sqrt{3} \times 50) = 4.62 \times 10^{-4}$ 。

由中国食品药品检定研究院提供的苯磺酸氨氯地平对照品的质量分数为 99.4%, 属于 A 类不确定度, 依据矩形分布, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则对照品纯度引起的标准不确定度为 $u_2(W_r) = 0.006 / \sqrt{3} = 3.46 \times 10^{-3}$ 。

依据 MS 501 天平说明书中提供的检定数据, 重复性测量误差为 0.02 mg, 属于 B 类不确定度, 依据矩形分布, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 称量重复性引起的相对标准不确定度为 $u_3(W_r) = 0.02 / (\sqrt{3} \times 50) = 2.31 \times 10^{-4}$ 。

综上则对照品称量过程中引入的相对标准不确定度为 $U_{W_r} = \sqrt{u_1^2(W_r) + u_2^2(W_r) + u_3^2(W_r)} = 4.19 \times 10^{-3}$ 。

(2) 供试品称量过程中引入的相对标准不确定度 供试品称量过程中不确定度的引入与对照品称量相似, 主要有两个方面的来源: MS 501 天平校准产生的不确定度分量和称量重复性。

根据 MS 501 天平计量检定证书中提供的最大偏载误差为 0.04 mg, 属于 B 类不确定度, 依据矩形分布, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则 MS 501 天平精度引起的相对标准不确定度为 $u_1(W_s) = 0.04 / (\sqrt{3} \times 200) = 1.15 \times 10^{-4}$ 。

依据天平说明书中提供的检定数据^[4], 重复性测量误差为 0.02 mg, 属于 B 类不确定度, 依据矩形分布, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则称量重复性引起的相对标准不确定度为 $u_2(W_s) = 0.02 / (\sqrt{3} \times 200) = 5.77 \times 10^{-5}$ 。

综上则对照品称量过程中引入的相对标准不确定度为 $U_{W_s} = \sqrt{u_1^2(W_s) + u_2^2(W_s)} = 1.29 \times 10^{-4}$ 。

(3) 平均片质量称量过程中引入的不确定度 含量测定过程中, 通常先随机抽取 20 个制剂单位的供试品, 测定获得其平均片质量, 作为计算片质量依据, 将计算得到的含量结果与产品标示量进行比较, 来判定产品是否合格。不确定度的来源和计算与供试品称量中引入的相对标准不确定度计算方法相同。因此平均片重称量过程中引入的相对标准不确定度为 $U_w = \sqrt{u_1^2(w) + u_2^2(w)} = 1.29 \times 10^{-4}$ 。

(4) 对照品稀释过程中引入的相对标准不确定度 对照品溶液的制备过程中, 稀释过程的不确定度来源主要有: 玻璃仪器的校准、操作重复性^[5]。

根据国家计量检定 A 级 50 mL 量瓶的容量允差为 ±0.05 mL; A 级 100 mL 量瓶的容量允差为 ±0.10 mL; A 级 5 mL 单标线移液管的容量允差为 ±0.015 mL, 依据三角形分布, 包含因子 $k = \sqrt{6}$, 则对照品稀释过程中引入的相对标准不确定度为:

$$u(v_r) = \sqrt{\left(\frac{0.05}{50\sqrt{6}}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{50\sqrt{6}}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{50\sqrt{6}}\right)^2} = 1.35 \times 10^{-3}$$

根据重复性试验结果, 50 mL 量瓶定容的标准偏差为 0.004 0 mL; 5 mL 单标线移液管移液的标准偏差为 0.001 1 mL, 则操作重复性引入的相对确定度为

$$u_2(v_r) = \sqrt{\left(\frac{0.0040}{50}\right)^2 + \left(\frac{0.0011}{5}\right)^2} = 2.42 \times 10^{-4}$$

综上则对照品稀释过程中引入的相对标准不确定度为 $U_{v_r} = \sqrt{u_1^2(v_r) + u_2^2(v_r)} = 1.37 \times 10^{-3}$ 。

(5) 供试品稀释过程中引入的相对标准不确定度 供试品溶液的制备过程中, 稀释过程的不确定度来源主要有: 玻璃仪器的校准、操作重复性。

根据国家计量检定 A 级 100 mL 量瓶的容量允差为 ± 0.10 mL, 依据三角形分布, 包含因子 $k = \sqrt{6}$, 则对照品稀释过程中引入的相对标准不确定度为

$$u(v_s) = \sqrt{\left(\frac{0.10}{100\sqrt{6}}\right)^2} = 4.08 \times 10^{-4}$$

根据重复性试验结果, 100 mL 量瓶定容的标准偏差为 0.006 3 mL; 则操作重复性引入的相对确定度为 $u_2(v_s) = \sqrt{\left(\frac{0.0063}{100}\right)^2} = 6.3 \times 10^{-4}$ 。

$$u_2(v_s) = \sqrt{\left(\frac{0.0063}{100}\right)^2} = 6.3 \times 10^{-4}$$

综上则对照品稀释过程中引入的相对标准不确定度为 $U_{v_s} = \sqrt{u_1^2(v_s) + u_2^2(v_s)} = 7.51 \times 10^{-4}$ 。

(6) 对照品色谱峰面积引入的相对标准不确定度 色谱峰面积引入的不确定度根据进样精密度试验数据进行计算, 按照方法要求配制对照品溶液后, 连续进样测定 6 次, 峰面积均值为 35 238.0, 标准偏差为 40.637, 则对照品色谱峰面积引入的相对标准不确定度为 $U_{A_r} = S/A = 40.637/35\ 238.0 = 1.15 \times 10^{-3}$ 。

(7) 供试品色谱峰面积引入的相对标准不确定度 色谱峰面积引入的不确定度根据进样精密度试验数据进行计算, 按照方法要求配制供试品溶液后, 连续进样测定 6 次, 峰面积均值为 35 062.7, 标准偏差为 50.4, 则对照品色谱峰面积引入的相对标准不确定度为 $U_{A_s} = S/A = 50.4/35\ 062.7 = 1.44 \times 10^{-3}$ 。

2.2.3 合成相对标准不确定度的计算 根据苯磺酸氨氯地平测定的公式, 与测量结果相关的分量只涉

及乘积或商的模式, 因此合成相对标准不确定度为

$$U_r(X) = \sqrt{U^2(w_r) + U^2(w_s) + U^2(w) + U^2(v_r) + U^2(v_s) + U^2(A_r) + U^2(A_s)} = 4.84 \times 10^{-3}$$

实际测定苯磺酸氨氯地平片的质量分数为 99.86%, 则合成相对标准不确定度 $U_c(X) = 99.86\% \times 4.84 \times 10^{-3} = 0.48\%$ 。

2.2.4 扩展不确定度的计算^[6-7] 取包含因子 $k=2$ (置信概率为 95%), 则扩展不确定度为 $U(X) = k \times U_c(X) = 2 \times 0.48\% = 0.96\%$ 。则苯磺酸氨氯地平片剂含量测定结果应表示为 $(99.86 \pm 0.96)\%$ 。

3 讨论

各不确定度分量对测定结果影响最大的是在对照品称量过程中引入的不确定度, 而在此过程中, 以对照品质量分数引入的不确定度分量为最大。因此, 应重点关注测定使用的对照品的质量分数, 必要时予以校正。结果提示在日常的分析工作中应注意对工作对照品的标定工作。

取样过程中由于片质量差异导致的不确定度会影响计算结果的不确定度, 但是本研究主要讨论该测定方法的不确定度, 因此暂不考虑取样过程中引入的不确定度。

本评估过程中暂不考虑溶剂的热膨胀系数的影响, 因为测定方法主要依据主药的溶解性、测定条件及设备等因素对溶剂进行选择。通常选用有机试剂如甲醇、乙腈等有机试剂的热膨胀系数相对较高, 本研究主要考察方法的合理性, 暂不计算该内容。

参考文献

- [1] 化学分析中不确定度的评估指南 [S]. NAS-GL06. 2006
- [2] 郑丽, 郭伟英. HPLC 法测定药物含量不确定度评定 [J]. 辽宁医学院学报, 2012, 33(3): 265-267.
- [3] 周雪晴, 张名楠, 谢艳丽, 等. 高效液相色谱法测定胡椒中胡椒碱的不确定度评定 [J]. 现代仪器, 2012, 18(3): 89-91.
- [4] 汪正宇. HPLC 法测定注射用哌拉西林钠含量的不确定度评估 [J]. 中国药房, 2012, 23(21): 1997-1999.
- [5] 郭伟英, 吴迪. HPLC 法测定缬沙坦氢氯噻嗪胶囊含量的不确定度分析 [J]. 中国药房, 2012, 23(5): 445-447.
- [6] 李志芬, 朱娜. HPLC 法测定头孢拉定胶囊含量的不确定度评定 [J]. 现代测量及实验室管理, 2012, 20(3): 23-24.
- [7] 王文昭, 王璐, 陈凯. HPLC 法测定诺氟沙星胶囊含量的不确定度分析 [J]. 中国药事, 2010, 24(6): 590-593.