

HPLC法测定拉米夫定片剂含量的不确定度评定^Δ

林 珍^{1*}, 姚文松², 吴娜梅¹, 林新华^{1#} (1. 福建医科大学药学院药物分析系, 福州 350004; 2. 福建广生堂药业股份有限公司, 福州 350003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)21-2968-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.21.32

摘要 目的: 建立HPLC法测定拉米夫定片剂含量的不确定度评定方法。方法: 建立HPLC法测定拉米夫定片剂含量的数学模型, 分析不确定度来源, 并对各个不确定度分量、合成不确定度进行评估, 得出扩展不确定度。结果: HPLC法测定拉米夫定片剂含量的不确定度主要来自于对照品的纯度、对照品的称量、玻璃器皿的允差。含量测定的标准不确定度为0.21%, 扩展不确定度为0.42%。含量测定结果表示为 $(99.76 \pm 0.42)\%$, 包含因子 $k=2$ 。结论: 该方法适用于HPLC法测定拉米夫定片剂含量的不确定度评定, 可为拉米夫定片的实验室质量控制和客观评价提供参考。

关键词 不确定度; 拉米夫定; 片剂; 含量测定

Uncertainty Evaluation for Content Determination of Lamivudine Tablets by HPLC

LIN Zhen¹, YAO Wen-song², WU Na-mei¹, LIN Xin-hua¹ (1. Dept. of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2. Fujian Cosunter Pharmaceutical Co., Ltd., Fuzhou 350003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the uncertainty evaluation of determining content of Lamivudine tablets by HPLC. METHODS: HPLC was established to determine the mathematical model of Lamivudine tablets contents, analyze the uncertainty sources in detail and evaluate each uncertainty components and combined uncertainty to obtain the expanded uncertainty. RESULTS: Uncertainty of Lamivudine tablets contents determined by HPLC was mainly from reference purity, weighing standard and glassware tolerance. Standard uncertainty was 0.21% and expanded uncertainty was 0.42%. The range of content determination was $(99.76 \pm 0.42)\%$, $k=2$. CONCLUSIONS: The method is suitable for uncertainty evaluation of Lamivudine tablets by HPLC, and provides reference for the quality control in laboratory and objective evaluation of Lamivudine tablets.

KEYWORDS Uncertainty; Lamivudine; Tablet; Content determination

药品检验是评价药品质量、保障用药安全的重要手段。含量测定是药品质量控制中的重要内容, 其检测过程涉及的每一环节都会产生一定的误差, 均可影响到检验结果的准确性。拉米夫定片是核苷类抗病毒药, 可有效抑制乙型肝炎病毒(HBV)复制, 在我国已得到广泛应用^[1]。本文分析了高效液相色谱(HPLC)法测定拉米夫定片剂含量的误差来源及不确定度分量, 为实验室质量控制和客观评价拉米夫定片的含量测定结果提供科学依据。

1 材料

1260型液相色谱仪(美国Agilent公司); BT125D电子天平(德国Sartorius公司); KQ-400 KDE型超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。拉米夫定对照品(福建药品检验所, 批号: RM140101, 纯度: 99.9%); 拉米夫定片(福建广生堂药业股份有限公司, 批号: 1405104Y, 规格: 100 mg/片); 甲醇为色谱纯, 醋酸铵为分析纯, 水为超纯水。

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.21305015); 福建省自然科学基金资助项目(No.2014J05014); 2012年福建医科大学博士科研启动基金

* 讲师, 博士。研究方向: 药物分析。电话: 0591-122862016。E-mail: zhenlin12@fjmu.edu.cn

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 药物分析。E-mail: xhl1963@sina.com

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.025 mol/L 醋酸铵(pH=3.9 ± 0.1)-甲醇溶液(90:10, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 277 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μl^[2]。

2.2 溶液的配制

2.2.1 供试品溶液 取本品20片, 研细, 称取约含拉米夫定100 mg的细粉, 精密称定, 置于100 ml量瓶中, 加适量水, 超声(功率: 400 W, 频率: 40 kHz)处理5 min使之完全溶解, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过; 精密量取续滤液5 ml, 置于25 ml量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 即得。

2.2.2 对照品溶液 称取对照品20 mg, 精密称定, 置于100 ml量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密称取拉米夫定对照品14、20、26 mg, 加流动相制成质量浓度分别为0.14、0.20、0.26 mg/ml的标准溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $y=56\ 733x-185.6$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明, 拉米夫定质量浓度在0.14~0.26 mg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液20 μl,

按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,RSD为0.06% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取供试品溶液20 μl ,分别于放置0、2、4、6、8、12 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,拉米夫定峰面积的RSD为0.13%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.3.4 加样回收率试验 按处方比例精密称取拉米夫定对照品70、100、130 mg,各3份分别置于100 ml量瓶中,加适量水与空白辅料超声(功率:400 W,频率:40 kHz)处理5 min使之完全溶解,用流动相稀释至刻度、摇匀、滤过。精密量取续滤液5 ml,置于25 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,即得新的供试品溶液。再按“2.2.2”项下方法制备对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,低、中、高浓度的供试品溶液回收率分别为99.76%、100.02%、99.80% (n 均为3),平均加样回收率为99.86% ($n=9$),RSD为0.11%。

2.3.5 样品含量测定 按“2.2”项下方法配制2份供试品溶液和2份对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,每份溶液进样2次,按外标一点法以峰面积计算含量。

3 结果

3.1 数学模型

片剂中拉米夫定含量按下式计算:

$$X = A_s \times m_r \times V_s \times M / A_r \times V_r \times m_s \times 20$$

式中, X 为片剂含量(%); A_r 、 A_s 分别为对照品、样品稀释体积; m_r 、 m_s 分别为对照品、样品的质量; M 为20片片剂总质量。

3.2 测量不确定度的来源分析

实验过程涉及的每一因素如称量、定容、试剂、人员操作、环境变化、仪器设备、对照品定值等均是不确定度的来源,详见图1。

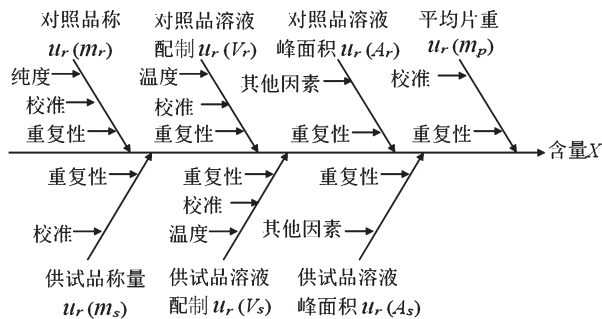


图1 不确定度来源分析图

Fig 1 Analysis of uncertainty sources

4 各分量不确定度的分析和评定

4.1 对照品引入的不确定度

4.1.1 纯度引入的不确定度(B类不确定度) 拉米夫定对照品由福建省药品检验所提供,纯度(P_r)为99.9%(以干燥品计),未给出不确定度。假定其分布区间半宽度 $\alpha=0.25\%$,按矩形分布($k=\sqrt{3}$)计算^[3],相对标准不确定度为:

$$u_r(P_r) = \frac{\alpha}{kP_r} = \frac{0.25\%}{\sqrt{3} \times 99.9\%} = 0.0014$$

4.1.2 质量引入的不确定度(B类不确定度) 采用减重法

称取对照品20 mg,其标准不确定度由天平校准误差和重复性引起。

(1)天平校准引入的不确定度。采用减重法称量,天平灵敏度带来的不确定度可以忽略不计且天平量程范围内的系统偏移将被抵消,故天平的误差来源包括线性不确定度及非线性不确定度。依据天平计量证书,天平 $e=0.03$ mg,按矩形分布计算。每完成1次称样,需称量1次皮重、1次毛重,每次称量均为独立的观测结果,两者的线性影响间是不相关的^[4]。因此,对照品称量的标准不确定度按矩形分布计算,其中:

$$u(m_r)_1 = \sqrt{2} \times \frac{e}{\sqrt{3}} = \sqrt{2} \times \frac{0.03}{\sqrt{3}} = 0.0245 \text{ mg}$$

天平的相对标准不确定度为:

$$u_r(m_r)_1 = \frac{u(m_r)_1}{m_r} = \frac{0.0245}{20} = 0.0012$$

(2)称量重复性引入的不确定度。计量检定证书上,重复性误差为0.02 mg,按矩形分布计算,其中:

$$u(m_r)_2 = \frac{0.02}{\sqrt{3}} = 0.0115 \text{ mg}$$

称量重复性引入的相对标准不确定度为:

$$u_r(m_r)_2 = \frac{u(m_r)_2}{m_r} = \frac{0.0115}{20} = 0.0006$$

对照品质量的相对标准不确定度为:

$$u_r(m_r) = \sqrt{[u_r(m_r)_1]^2 + [u_r(m_r)_2]^2} = \sqrt{(0.0012)^2 + (0.0006)^2} = 0.0013$$

4.1.3 配制体积引入的不确定度(B类不确定度) 对照品配制时仅用到1次100 ml量瓶,由于配制体积引入的误差较小,其不确定度来源同“4.2.2”项。体积校准和重复性引入的标准不确定度分别为 ± 0.041 ml、 ± 0.011 ml。因此,对照品配制体积的相对标准不确定度为:

$$u_r(V_r) = \sqrt{\left(\frac{0.041}{100}\right)^2 + \left(\frac{0.011}{100}\right)^2} = 0.0004$$

4.1.4 峰面积重复性引入的不确定度(A类不确定度) 峰面积的不确定度来源有进样重复性、泵流速稳定性、分离重复性、检测器响应、积分变动等随机影响。将这些反映各种随机影响因素的重复性分量合并考虑,通过对某一对照品溶液重复测量10次,得到合并重复性标准不确定度。峰面积平均值为11 093.2 mAU,标准偏差为3.6 mAU,相对不确定度 $u_r(A_r)$ 为0.0003。

在含量测定时,通常测定2个对照品,每个对照品进样2次,故由对照品引入的相对标准不确定度为:

$$u_r(r) = \sqrt{u_r(P_r)^2 + \frac{u_r(m_r)^2 + u_r(V_r)^2}{2} + \frac{u_r(A_r)^2}{4}} \\ = \sqrt{(0.0014)^2 + \frac{(0.0013)^2 + (0.0004)^2}{2} + \frac{(0.0003)^2}{4}} \\ = 0.0017$$

4.2 供试品引入的不确定度

4.2.1 质量引入的不确定度(B类不确定度) 同“4.1.2”项,精密称取供试品100 mg,供试品质量的相对标准不确定度为:

$$u_r(m_s) = \sqrt{\left(\frac{0.0245}{100}\right)^2 + \left(\frac{0.0115}{100}\right)^2} = 0.0003$$

4.2.2 配制体积引入的不确定度(B类不确定度) 量瓶及吸量管的不确定度有3个来源:

(1) 体积校准引入的不确定度。检定证书给出的A级100、25 ml量瓶和5 ml单标线吸量管的允许误差分别为±0.10、±0.03、±0.015 ml,按三角分布计算^[5],包含因子为 $\sqrt{6}$,其标准不确定度分别为0.041、0.012、0.006 1 ml,则其相对标准不确定度为:

$$u_r(V_s)_1 = \sqrt{\left(\frac{0.041}{100}\right)^2 + \left(\frac{0.012}{25}\right)^2 + \left(\frac{0.0061}{5}\right)^2} = 0.0014$$

(2) 重复性引入的不确定度。20℃下,加水至量瓶刻度,称量,重复操作10次。用贝塞尔公式评定,以标准偏差表示,100、25 ml量瓶和5 ml单标线吸量管的标准不确定度分别为0.011、0.004 6、0.001 5 ml,则其相对标准不确定度为:

$$u_r(V_s)_2 = \sqrt{\left(\frac{0.011}{100}\right)^2 + \left(\frac{0.0046}{25}\right)^2 + \left(\frac{0.0015}{5}\right)^2} = 0.0004$$

(3) 温度引入的不确定度。不同温度下水的体积膨胀系数不同,因量瓶是在20.0℃下校准,实验室温度为25.0℃,水的体积膨胀系数为 2.1×10^{-4} 。按矩形分布计算,则50 ml量瓶和5 ml吸量管的不确定度分别为0.015、0.003 ml。由于对照品溶液和供试品溶液是在相同的条件下配制,均用到1次100 ml量瓶,温差和溶剂膨胀系数相同,故100 ml量瓶温度引起的体积偏差可抵消。则其相对标准不确定度为:

$$u_r(V_s)_3 = \sqrt{\left(\frac{0.015}{25}\right)^2 + \left(\frac{0.003}{5}\right)^2} = 0.0008$$

配制供试品溶液时体积引入的相对标准不确定度为:

$$u_r(V_s) = \sqrt{[u_r(V_s)_1]^2 + [u_r(V_s)_2]^2 + [u_r(V_s)_3]^2} \\ = \sqrt{(0.0014)^2 + (0.0004)^2 + (0.0008)^2} = 0.0017$$

4.2.3 峰面积重复性引入的不确定度(A类不确定度) 同“4.1.4”项,相对不确定度 $u_r(A_s)$ 为0.000 3。在含量测定时,通常配制2份供试品溶液,每份供试品进样2次,故由供试品引入的相对标准不确定度为:

$$u_r(s) = \sqrt{\frac{u_r(m_s)^2 + u_r(V_s)^2}{2} + \frac{u_r(A_s)^2}{4}} \\ = \sqrt{\frac{(0.0003)^2 + (0.0017)^2}{2} + \frac{(0.0003)^2}{4}} = 0.0012$$

4.3 平均片重引入的不确定度(B类不确定度)

取拉米夫定片剂20片,总质量为4 261.3 mg,平均质量为213.1 mg。不确定度分析同“4.1.2”项,片剂片重的相对标准不确定度为:

$$u_r(m_p) = \frac{1}{20} \sqrt{\left(\frac{0.0245}{213.1}\right)^2 + \left(\frac{0.0115}{213.1}\right)^2} = 7 \times 10^{-6}, \text{可忽略不计。}$$

4.4 含量的合成不确定度和扩展不确定度的评定

合成相对不确定度各分量互不相关,故拉米夫定片剂含量的相对标准不确定度为:

$$u_r(X) = \sqrt{[u_r(r)]^2 + [u_r(s)]^2} = \sqrt{(0.0017)^2 + (0.0012)^2} = 0.0021$$

片剂含量测定的标准不确定度为 $u_r(X) = 99.76\% \times 0.0021 = 0.21\%$,取包含因子 $k=2$ 时,此时对应的置信概率为95%,拉米夫定片剂含量测定的扩展不确定度为 $u_c(X) = 0.0042$ 。拉米夫定片剂测定结果可表示为: $X = (99.76 \pm 0.42)\%$, $k=2$ 。

通过对不确定度测量的评定,把握测量过程中影响结果准确度的主要因素,可为检验方法准确性和可靠性提供参考。由不确定度评定结果可知,HPLC法测定拉米夫定片含量不确定度主要来源于对照品的纯度、对照品的称量、玻璃器皿的允差等。因此,对照品来源应可靠;选用精度符合要求的分析天平,且不能随意减少称样量;使用的玻璃器皿应为经过检定的A级器皿。不确定度评定可为评估测定结果的可信度、规定质量控制范围提供科学依据,是一份完整药品检验报告书不可或缺的内容。

参考文献

- [1] 魏欣,张旭东,王莉.拉米夫定联合用药治疗慢性乙型肝炎的应用进展[J].中国药房,2008,19(17):1 351.
- [2] 李萌,刘有平,鲁静,等.RP-HPLC法测定拉米夫定的含量及有关物质[J].药物分析杂志,2009,29(7):1 216.
- [3] 孙婷,韩学静,姜建国,等.HPLC测定注射用长春西汀含量的不确定度评定[J].华西药学杂志,2013,28(4):4 013.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会.CNAS-GL06:化学分析中不确定度的评估指南[S].2006.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局.JJG 196:常用玻璃量器检定规程[S].2006.

(收稿日期:2014-11-08 修回日期:2015-06-05)

(编辑:刘 柳)

孙咸泽出席全国食品安全宣传周“中国科协主题日”活动

本刊讯 2015年6月19日,全国食品安全宣传周“中国科协主题日”活动在中国科技馆举行。国家食品药品监督管理总局党组成员、药品安全总监孙咸泽出席活动并讲话。

孙咸泽强调,此次举办以“尚德守法 全面提升食品安全法治化水平”为主题的全国食品安全宣传周活动,旨在通过一系列主题宣传教育实践活动,进一步凝聚全社会共识,在法治轨道上不断提升我国食品安全整体水平。

孙咸泽指出,解决好食品安全问题,既需要法律、监管、市场等多种手段综合治理,也需要社会公众不断提高知识水平和媒介素养,正确认知食品安全问题,理性对待食品安全风

险,提升自我防范能力,积极参与社会监督。

活动现场,中国食品科学技术学会启动了“科普中国食品安全万里行”主题活动,旨在为消费者提供及时的在线购物科普信息服务,树立理性消费观念;正式开通了“食今不昧”微信公众号,定期发布有关食品安全、食品营养的科普信息,为消费者答疑解惑,破解食品安全谣言;开设“食品安全科学沙龙”,组织食品安全专家与现场观众共同讨论了“不消化的方便面”“黄曲霉毒素风险”“农残超标草莓”“食品添加剂”“转基因”等食品安全热点问题。