

# 扬州市职业大学

## 毕业设计说明书

题目：HPLC 法测定阿比特龙含量的  
分析方法验证

学 院： 生物与化工工程学院  
专 业： 生物制药技术  
班 级： 制药 1402  
姓 名： 叶 涛  
学 号： 140702234  
指导教师： 韦林洪  
陈玉庆（企业）  
完成时间： 2017 年 5 月

## 摘要

为了证明 HPLC 法检测阿比特龙含量的可靠性，根据 ICH 指南 Q2A&Q2B《分析方法验证程序》、中国药典（2015 版）《分析方法验证》、USP<1225>《法定方法的验证》，制定验证试验方案。通过对该分析方法的系统适用性、专属性、线性/范围、准确度和精密度等项目进行验证，并将验证结果与接受标准进行比较，证明采用的 HPLC 法检测阿比特龙含量具有有效性与可行性。

**关键字：**阿比特龙；检测方法验证；高效液相色谱（HPLC）

# 目 录

摘 要.....	I
1 前 言.....	1
2 材料与amp;方法.....	2
2.1 实验材料.....	2
2.2 实验仪器.....	2
2.3 色谱条件.....	2
2.4 系统适应性验证.....	2
2.4.1 系统适用性溶液的制备.....	2
2.4.2 测定方法.....	2
2.5 含量测定方法.....	2
2.5.1 溶液制备.....	2
2.5.2 检测.....	3
2.5.3 含量计算.....	3
2.6 专属性试验.....	3
2.7 线性/范围验证.....	3
2.7.1 溶液的配制.....	3
2.7.2 分析方法.....	3
2.8 准确度验证.....	4
2.8.1 溶液配制.....	4
2.8.2 测定方法.....	4
2.8.3 回收率的计算.....	4
2.9 方法精确度.....	4
2.9.1 溶液配置.....	4
2.9.2 测定方法.....	4
3 结果与分析.....	5
3.1 系统适应性结果.....	5
3.2 专属性验证结果.....	6
3.3 线性/范围验证结果.....	6
3.4 准确度.....	8
3.5 精密度.....	9
4 结 论.....	10
参考文献.....	10
致 谢.....	10

# 1 前 言

我国《药品生产质量管理规范（2010 版）》中规定：应采用经过验证的检验方法进行药品检验，并保持持续验证状态<sup>[1]</sup>。检验方法验证的是证明所采用的方法适合于相应的检测要求。药物含量测定的验证主要指标包括准确度、精密度、专属性、检测限、定量限、线性/范围和耐用性 8 个方面<sup>[2]</sup>。准确度表示检测结果与可接受的参考值的接近程度，通常用回收率来表示方法的准确度；精密度指在规定的测试条件下，同一个均匀供试品，经多次取样测定所得结果之间的接近程度。一般用偏差、标准偏差、相对标准偏差表示；专属性指在其它可能的成分(如杂质、降解产物、辅料等)存在的情况下，采用的分析方法能够正确测定目的成分的能力；检测限指在已经确定要求的实验条件下，样品中被测物质能够被检测的最低量；定量限系指样品中被分析物能够被定量检测的最低量；线性/范围研究是用来证明在规定浓度范围内样品溶液的浓度与系统响应值成线性比例关系。耐用性是指测定的环境和试剂条件发生微小变动时，测定结果不受微小变动影响的程度<sup>[3]</sup>。

药典收载的方法具有时效性，需检验的内容与新开发的检验方法有很大的出入。某一方法需要进行哪些项目的验证的要求，应根据实际情况而定，并不是所有的方法都必须进行以上 8 个方面的验证实验<sup>[3]</sup>。方法验证的范围，一般来说，可分为以下三种情况的区别对待。

第一，对于直接引用有法定依据的方法，如药典标准和部颁标准，仅做系统适应性试验即可<sup>[4]</sup>。但若将法定方法用于测定新药，或将某一品种的法定方法用于另一种品种，就需进行系统的方法验证。

第二，对于已在实验室验证过，由于需要在另一实验室使用的分析方法，可采取对照试验法。即取同一批样品，按此方法在两实验室分别进行检验，将结果进行比较，判断是否有显著差异<sup>[5]</sup>。

第三，其他分析方法可分为 4 种类型，类型一：用于原料药中主要成分或制剂中活性组分的定量分析方法；类型二：用于原料药中杂质或抑制剂中降解产物测定的分析方法，包括定量分析和限度试验；类型三：用于测定性能特性（如溶解度、溶出度）的分析方法；类型四：鉴别试验<sup>[6]</sup>。

根据 ICH 指南 Q2A&Q2B《分析方法验证程序》、中国药典（2015 版）《分析方法验证》、USP<1225>《法定方法的验证》，本文制定高效液相色谱法（HPLC）测量阿比特龙含量的验证试验方案，从系统适应性、专属性、线性/范围、准确度和精确度五个方面对 HPLC 检测阿比特龙含量的检验方法进行验证，并根据分析方法验证方中的要求和接受标准对验证的结果进行汇总分析，拟证明 HPLC 法检测阿比特龙含量的有效性与可行性。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 实验材料

阿比特龙原料药（扬州联澳生物医药有限公司，20161101，20161102）  
乙腈（分析纯，济南仁源化工有限公司）

### 2.2 实验仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪（可变波长检测器、C.01.04 Agilent Chemstation 化学工作站、色谱柱：C<sub>18</sub>，150mm×4.6mm，3.5μm）

TG128 分析天平，上海精密科学仪器有限公司

验证实施过程中所需要用到的容量瓶、移液管、均已经过校验，且在有效期内。

### 2.3 色谱条件

检测波长：254nm

柱温：30℃

流速：1.2 ml/min

流动相：乙腈：水=50：50(V/V)

进样量：20 μl

积分参数：斜率灵敏度= 1.000；最小峰宽 = 0.100；最小峰高= 0.000 ；肩峰 =关闭。

### 2.4 系统适应性验证

#### 2.4.1 系统适用性溶液的制备

精确称取阿比特龙工作对照品约 20mg 置 50mL 容量瓶中，加入约 20mL 稀释剂，超声 1 分钟使溶解，冷却后用稀释剂稀释至刻度，摇匀，备用。同时平行制备两份，分别为系统适用性溶液 A、B。

#### 2.4.2 测定方法

启动仪器，设定好色谱参数，待仪器平衡约 1 小时稳定后，根据 2.3 项下所述的色谱条件，将稀释液（乙腈：水=70：30(V/V)），系统适用性溶液 A，系统适用性溶液 B，按顺序进样，记录色谱图和数据，其中系统适用性溶液 A 进样 5 次，其他进样 1 次。

### 2.5 含量测定方法

#### 2.5.1 溶液制备

工作对照品溶液（1mg/mL）：精密称取阿比特龙工作对照品约 20mg 置 50mL 容量瓶中，加入约 20mL 稀释剂，超声 1 分钟使溶解，冷却后用稀释剂（1mg/mL）稀释至刻度，摇匀，备用。

样品溶液（1mg/mL）：精密称取阿比特龙样品约 20mg 置 50mL 容量瓶中，加入约 20mL 稀释剂，超声 1 分钟使溶解，冷却后用稀释剂稀释至刻度，摇匀，备用。样品溶液必须平行制备两份。

## 2.5.2 检测

一旦系统适用性被确认有效，按 2.3 项下所述同样色谱条件，按空白溶液、工作对照品标准溶液、空白溶液、样品溶液、样品溶液的顺序对各溶液进行检测，记录色谱图和数据，其中工作对照品标准溶液进样 3 次，其余溶液进样 1 次。

## 2.5.3 含量计算

$$\text{含量} = \frac{A_x \times W_s \times P}{A_s \times W_x (1 - \text{Water \%})} \times 100\%$$

式中：含量为样品的检测含量，%；

A<sub>x</sub> 为样品峰面积；

A<sub>s</sub> 为工作对照品平均峰面积；

W<sub>x</sub> 为样品重量，mg；

W<sub>s</sub> 为工作对照品重量，mg；

P 为工作对照品纯度，%；

Water%为样品的水分，%。

## 2.6 专属性试验

按 2.3 项所示的色谱条件，按稀释剂、流动相、工作对照品溶液、阿比特龙样品溶液的顺序对各溶液进行检测，得到每个测试溶液的色谱图和数据，所有溶液进样 1 次。

## 2.7 线性/范围验证

### 2.7.1 溶液的配制

储备液的制备（C=800μg/mL）：准确称取 40.0mg 阿比特龙工作对照品置 50.0mL 容量瓶中，加入约 20mL 稀释剂，在超声波中超声约 1 分钟使溶解后，冷却至室温，再用稀释剂稀释至刻度，摇匀，备用。

70%的溶液（C=280μg/mL）：精密移取储备液 3.5mL 置 10.0mL 容量瓶中，加入稀释剂溶液稀释至刻度线，摇匀，备用。

80%的溶液（C=320μg/mL）：精密移取储备液 4.0mL 置 10.0mL 容量瓶中，加入稀释剂溶液稀释至刻度线，摇匀，备用。

90%的溶液（C=360μg/mL）：精密移取储备液 4.5mL 置 10.0mL 容量瓶中，加入稀释剂溶液稀释至刻度线，摇匀，备用。

100%的溶液（C=400μg/mL）：精密移取储备液 5.0mL 置 10.0mL 容量瓶中，加入稀释剂溶液稀释至刻度线，摇匀，备用。

110%的溶液（C=440μg/mL）：精密移取储备液 5.5mL 置 10.0mL 容量瓶中，加入稀释剂溶液稀释至刻度线，摇匀，备用。

120%的溶液（C=480μg/mL）：精密移取储备液 6.0mL 置 10.0mL 容量瓶中，加入稀释剂溶液稀释至刻度线，摇匀，备用。

130%的溶液（C=520μg/mL）：精密移取储备液 6.5mL 置 10.0mL 容量瓶中，加入稀释剂溶液稀释至刻度线，摇匀，备用。

### 2.7.2 分析方法

在 2.3 所述的色谱条件下，将上述 7 个不同浓度的溶液依次进样，每个样品

重复 3 次，记录色谱图和记录各峰面积的数据。确定每个浓度 3 次进样的平均峰面积并绘制线性关系图。

## 2.8 准确度验证

### 2.8.1 溶液配制

对照品溶液 (C=400 $\mu$ g/mL): 准确称取 20mg 阿比特龙对照品置 50mL 容量瓶中, 加入 20mL 稀释剂, 超声 1 分钟进行溶解。冷却后用稀释剂溶液稀释至刻度线, 摇匀, 备用。

80%的溶液 (C=320 $\mu$ g/mL): 准确称取 16mg 阿比特龙样品于 50mL 容量瓶中, 加入 20mL 稀释剂, 超声 1 分钟进行溶解。冷却后用稀释剂溶液稀释至刻度线, 摇匀, 备用。平行制备 3 份。

100%的溶液 (C=400 $\mu$ g/mL): 准确称取 20mg 阿比特龙样品 50mL 容量瓶中, 加入 20mL 稀释剂, 超声 1 分钟进行溶解。冷却后用稀释剂溶液稀释至刻度线, 摇匀, 备用。平行制备 3 份。

120%的溶液 (C=480 $\mu$ g/mL): 准确称取 24mg 阿比特龙样品于 50mL 容量瓶中, 加入 20mL 稀释剂, 超声 1 分钟进行溶解。冷却后用稀释剂溶液稀释至刻度线, 摇匀, 备用。平行制备 3 份。

### 2.8.2 测定方法

在 2.3 所述的色谱条件下, 将 80%的溶液、100%的溶液、120%的溶液每种 3 份分别进样, 2.5.1 中所述的对照品溶液连续进样 5 次, 记录峰面积并计算回收率。

### 2.8.3 回收率的计算

$$\text{回收率} = \frac{C_x}{C_s} \times 100\%$$

式中:  $C_x$  为测得的阿比特龙样品浓度, %;

$C_s$  为阿比特龙对照品溶液实际浓度, %。

## 2.9 方法精确度

### 2.9.1 溶液配置

准确称取 20mg 阿比特龙样品置 50mL 容量瓶中, 加入 20mL 稀释剂, 超声 1 分钟进行溶解。冷却后用稀释剂稀释至刻度 (C=400 $\mu$ g/mL), 摇匀, 备用。平行制备 6 份。

### 2.9.2 测定方法

在 2.3 所述的色谱条件下, 每个样品溶液进样 2 次。记录峰面积。

### 3 结果与分析

#### 3.1 系统适应性结果

按 2.4 的方法进行系统适应性试验，试验结果如表 3-1 和 3-2 所示。

表 3-1 系统适用性检测数据

重量(mg)	浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	纯度(%)	主峰面积	平均峰面积
			12993.8	
			12999.8	
20.46	410	99.65	13030.7	13041.7
			13077.4	
			13106.8	

表 3-2 系统适用性检测结果

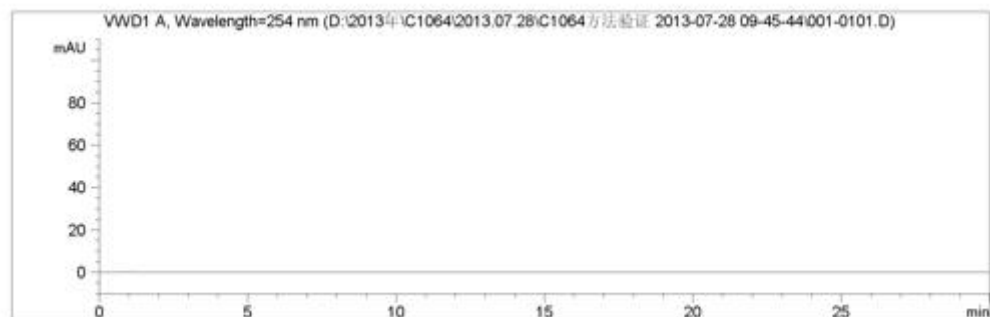
参数	检测内容	验收标准	检测结果
柱效	理论塔板数(H)	$\geq 2000$	8808
拖尾因子	拖尾因子 (T)	0.7~1.3	0.76
一致性	相似因子	0.95~1.05	1.0006
系统重复性	相对标准偏差(RSD)	$\leq 2.0\%$	0.38

从表 3-2 可以看出：该法系统适用性的所有检测结果都符合验收标准。

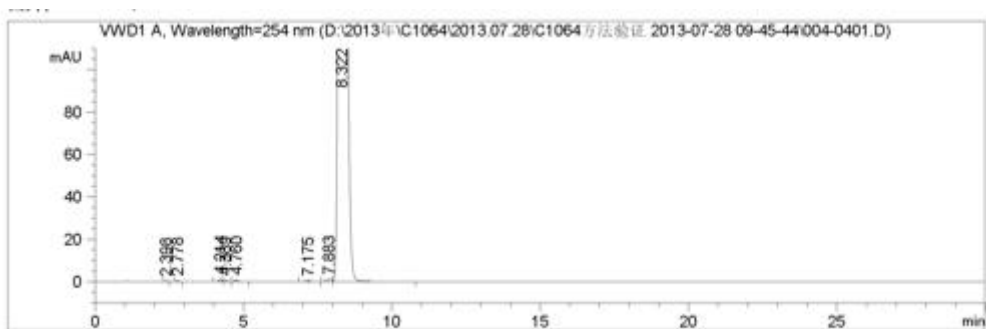


### 3.2 专属性验证结果

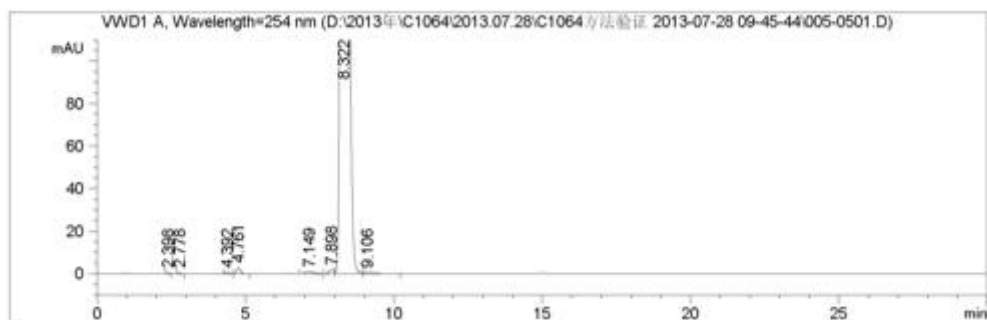
按 2.6 的方法进行专属性验证，色谱图如图 3-1 所示。



A 稀释剂图谱



B 对照品图谱



C 样品图谱

图 3-1 专属性试验 HPLC 图谱

从图 3-1 可以看出：稀释剂没有与对照品溶液保留时间相同的峰，样品溶液与对照品溶液主峰保留时间相同。因此，溶剂、流动相主峰位置均无干扰峰出现，样品溶液与对照品溶液保留时间一致。专属性验证符合要求。

### 3.3 线性/范围验证结果

按 2.7 的方法进行试验，试验数据见表 3-3。以浓度为横坐标，平均峰面积为纵坐标，绘制验证线性关系图（图 3-2）。

表 3-3 线性/范围验证数据

序号	相对目标 值%	理论浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	实际重量 ( $\text{mg}$ )	实际浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	主峰 面积	平均峰 面积
					9098.5	
1	70	280	2.81	280	9104.6	9103.0
					9106.0	
					10297.9	
2	80	320	3.21	320	10301.5	10298.9
					10297.3	
					11597.1	
3	90	360	3.62	360	11588.8	11596.9
					11604.7	
					12882.5	
4	100	400	4.02	400	12892.7	12888.5
					12890.2	
					14219.0	
5	110	440	4.42	440	14230.6	14231.1
					14243.8	
					15555.6	
6	120	480	4.82	480	15563.4	15562.2
					15567.6	
					16829.5	
7	130	520	5.22	520	16808.8	16819.0
					16818.6	

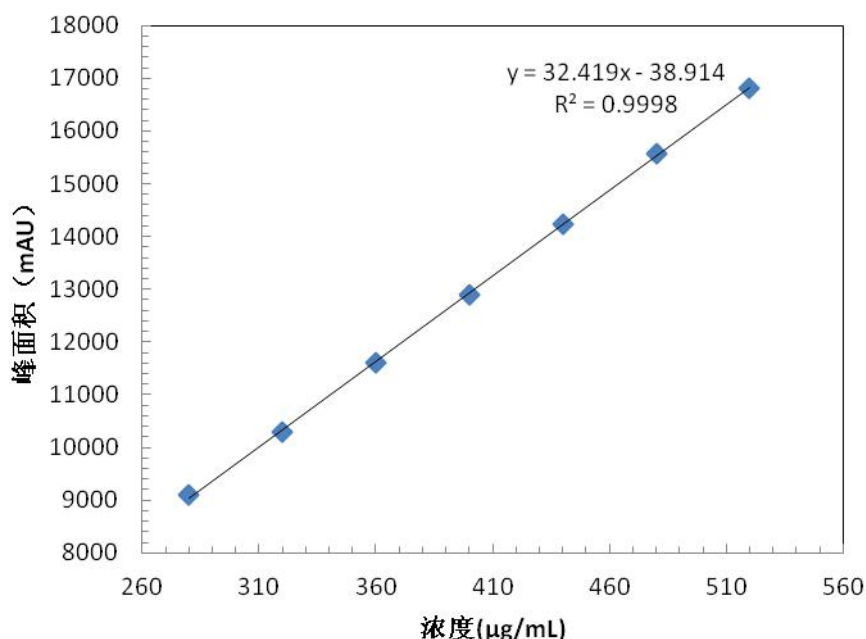


图 3-2 阿比特龙验证方法线性图

从图 3-2 可以看出：阿比特龙浓度在 280 ~ 520 μg/mL 范围内，线性关系良好，线性方程为  $Y=32.419x-38.914$ ，相关系数 ( $R^2$ ) 为 0.9998。因此线性/范围验证通过。

### 3.4 准确度

按 2.8 的方法进行试验,试验结果见表 3-4。

表 3-4 准确度验证检测数据

浓度限度 (%)	实际重量 (mg)	实际浓度 (μg/mL)	主峰面积	平均峰面积	回收率 (%)	平均回收率 (%)
80	16.37	330	10669.7	10678.6	99.51	99.45
			10687.5			
	16.19	320	10574.7	10562.6	99.51	
			10577.6			
100	16.07	320	10511.7	10498.5	99.32	99.44
			10485.3			
	20.62	410	13548.6	13538.8	99.47	
			13528.9			
20.16	400	13172.3	13168.3	99.36		

			13164.3			
	19.93	400	13002.6	13001.2	99.50	
			12999.8			
	24.76	500	16122.0	16115.2	99.72	
			16108.5			
120	24.03	480	15630.2	15618.2	99.88	99.78
			15606.2			
	24.27	490	15799.4	15792.4	99.75	
			15785.3			

从表 3-4 可以看出:在各目标值的浓度范围内,回收率均在 98.0%~102.0% 范围内,回收率之间的 RSD≤1.00%,因此,准确度符合要求,验证通过。

### 3.5 精密度

参照 2.9 方法进行试验,实验结果如表 3-5。

表 3-5 方法精密度检测数据和验收结果

序号	重量 (mg)	浓度 (mg/mL)	峰面积	平均峰面积	RSD%
1	19.55	0.39	12650.0	12648.6	
			12647.3		
2	19.38	0.39	12544.6	12531.1	
			12517.6		
3	19.19	0.38	12381.4	12391.1	
			12400.8		
4	18.95	0.38	12183.6	12177.2	0.27
			12170.9		
5	19.09	0.38	12356.0	12350.1	
			12344.2		
6	19.13	0.38	12402.9	12377.4	
			12351.9		

从表 3-5 可以看出:六组不同浓度的样品溶液,各重复进样两次,组间平均峰面积 RSD≤1.50%,因此方法精密度验证通过。

## 4 结论

本文根据 ICH 指南 Q2A&Q2B《分析方法验证程序》、中国药典（2015 版）《分析方法验证》、USP<1225>《法定方法的验证》，制定验证试验方案。通过对分析方法的系统适用性、专属性、线性/范围、准确度和精密度等项目进行验证，证明了 HPLC 法检测阿比特龙含量的有效性与可行性。因此该方法满足阿比特龙含量的测定要求。

## 参考文献

- [1]《药品生产质量管理规范（2010 版）》，2013.12.31
- [2]夏振华, 王颖异, 王赞朋. HPLC 法验证中有关问题探讨[J]. 药学与临床研究, 2016, 24(3):268-272.
- [3]霍秀敏. 化学药物分析方法验证的内容和评价[J]. 中国新药杂志, 2009(10):883-886.
- [4]荣晓阳, 梁毅. HPLC 检查非残溶杂质分析方法验证的实例解析[J]. 中国执业药师, 2008, 5(11):36-40.
- [5]吴青松. 乙酸阿比特龙酯的合成及其质量检测[D]. 西南交通大学, 2015.
- [6]于泳, 司马哲超. 心脑血管片紫外分光光度计法的分析方法验证[J]. 现代制造, 2015(5):33-39.

## 致 谢

在本次的论文撰写中，韦林洪老师从选题，构思到最后定稿的各个环节，耐心地进行指导和帮助。在修改的过程中，花费了韦老师很多宝贵的时间和精力，使我在总结学业及撰写论文方面都有了较大的提高；同时也显示了老师高度的敬业精神和责任感。在此向导师致以诚挚的谢意和崇高的谢意！导师高度的责任心都将是使学生受益终生。

在此，我还要感谢在一起愉快的度过大学生活的每个同学们和尊敬的老师们，正是由于你们的帮助和支持，我才能克服一个一个的困难和疑惑。与同伴们的相处，学到了许多道理和能力，通过努力去学习成为一个更好的人。

大学生活即将结束，回顾几年的历程，老师们给我们很多指导和帮助。他们严谨的治学，优良的作风和敬业的态度，为我们树立为人师表的典范。在此，我对所有的生化学院的老师表示感谢，祝你们身体健康，工作顺利！