

HPLC法测定醋酸泼尼松片含量 3种不同计算方法的不确定度分析

谢元超¹, 王维剑¹, 牛冲¹, 王文笙²

(1. 山东省药品检验所, 济南 250101; 2. 山东鲁抗医药股份有限公司, 济宁 272021)

摘要 目的: 分析 HPLC法测定醋酸泼尼松片含量 3种不同计算方法的不确定度。方法: 建立 HPLC法测定醋酸泼尼松片含量的不确定度分析方法。结果: 通过对实验过程中各种不确定度因素的分析, 确定不确定度分量, 合成不确定度。比较 3种方法的不确定度大小。结论: 进样体积梯度标准曲线法与外标一点法的不确定度值非常接近, 均略小于经典标准曲线法。

关键词 不确定度; 醋酸泼尼松片; 高效液相色谱;

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254- 1793(2009) 04- 0648- 05

Evaluation of the uncertainty for the determination of prednisone acetate tablets by HPLC with 3 kinds of calculate methods

XIE Yuan- chao¹, WANG Wei- jian¹, NIU Chong¹, WANG Wen- sheng²

(1. Shandong Provincial Institute for Drug Control Jinan, 250101, China

2. Shandong Lukang Pharmaceutical co, Ltd Jinan 272021, China)

Abstract Objective To analyse the uncertainty for the determination of prednisone acetate tablets in 3 calculate methods **Methods** Methods were established to evaluate the uncertainty for the determination of prednisone acetate tablets by HPLC. **Results** The various measurement of uncertainty was quantized, and the uncertainty of the 3 methods was compared. **Conclusion** The uncertainty of the method of injection volume gradient standard curve is close to that of the method of one point external standard. And the uncertainty of the two methods mentioned before is less than that of the method of classical standard curve.

Key words uncertainty; Prednisone Acetate Tablets; HPLC

药品检测是药品监督执法、药品贸易、患者维权等工作的技术依托。检测结果的质量直接影响上述工作的公正性、科学性。因而当报告测量结果时, 必须对其质量给出定量的说明, 以确定测量结果的可信程度。测量不确定度就是对测量结果质量的定量表征, 测量结果的可用性很大程度上取决于其不确定度的大小。所以, 测量结果必须附有不确定度说明才是完整并有意义的^[1]。检测和校准实验室认可准则(ISO/IEC 17025-2005)要求检测和校准实验室, 都必须建立并实施测量不确定度的评估程序, 以评价测试结果的准确性和可靠性^[2]。

外标一点法是 HPLC法中较为常用的一种计算方法, 是中国药典 2005年版各论中收载最多的含量测定计算方法, 其操作和计算过程都较为简单, 但要求待测样品浓度与对照品溶液浓度较为接近, 适合于已知浓度范围的样品含量测定。标准曲线法相对

于外标一点法操作与计算都较为复杂, 但其测量范围广, 适合于线性范围内任何浓度样品的含量测定。近年来由于带有自动进样器的高效液相色谱仪的广泛应用, 进样精度得到很大提高, 使用相同浓度不同体积的对照品溶液进样制作标准曲线的方法(进样体积梯度标准曲线法)在药品含量测定的计算中也得到了广泛应用。因此本文根据国家质量技术监督局批准发布的 JJF1059-1999 计量技术规范《测量不确定度评定与表示》^[3], 并参考有关文献^[4-6], 以 HPLC法测定醋酸泼尼松片含量为例, 对上述 3种计算方法的不确定度进行了分析、比较, 为 HPLC测定样品含量的计算方法的选择提供参考。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 岛津-20A; 分析天平: BP211D(0.01 mg)。

醋酸泼尼松对照品: 由中国药品生物制品检定

(2) 曲线校正引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{curv})$ 由于外标一点法假设曲线过零点, 所以线性为 1, 故只考虑其进样重复性的不确定度, 则 $u_{\text{rel}}(\text{curv}) = 0$ 。

(3) 高效液相色谱仪进样重复性引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(A)$ Agilent 1100 高效液相色谱仪检定证书给出的定量测量重复性 $\text{RSD} = 0.6\%$ ($n = 5$), $u_{\text{rel}}(A) = 0.6\% \sqrt{5} = 0.00268$

合成: $u_{\text{rel}}(Cx) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(Cr) + u_{\text{rel}}^2(\text{curv}) + u_{\text{rel}}^2(A)} = 0.00658$

3.3.2 供试品质量的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(W_x)$ 、 $u_{\text{rel}}(\bar{W})$

干燥器与天平称量仓内均放置同质硅胶, 视为相同湿度, 称量时无吸潮。电子天平 (0.01 mg) 检定证书中天平称量允差为 $\pm 0.1 \text{ mg}$ 视为矩形分布 ($K = \sqrt{3}$), 则标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(W_x) = u(W_x) / W_x = 0.1 \sqrt{3} / 78.34 = 0.00074$$

$$u_{\text{rel}}(\bar{W}) / (\bar{W} \times 20) = 0.1 \sqrt{3} / 1600.91 = 0.00004$$

3.3.3 供试品溶液稀释过程中引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_x)$

实验中将称好的供试品置于 $V: 25 \pm 0.03 \text{ mL}$ (A 级) 量瓶定容过滤, 取续滤液作为供试品溶液。按矩形分布处理: $u_{\text{rel}}(V) = 0.03 \sqrt{3} / 25 = 0.00069$ 实验环境在空调条件下, 设室温为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 。溶剂水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, 按照矩形分布, 环境温度引入的不确定度为 $u_{\text{rel}}(Tx) = 5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times V_x \sqrt{3} / V_x = 0.00061$ 。供试品溶液稀释过程中引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_x) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V) + u_{\text{rel}}^2(Tx)} = 0.00092$ 。

3.3.4 合成标准不确定度

供试品溶液的浓度、质量、稀释体积等的不确定度相互独立, 故将上述数据合成得合成相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(x)$ 为

$$u_{\text{rel}}(x) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(Cx) + u_{\text{rel}}^2(W_x) + u_{\text{rel}}^2(\bar{W}) + u_{\text{rel}}^2(V_x)} = 0.00669$$

实验中测得 $x = 100.48\%$, 则

$$u(x) = u_{\text{rel}}(x) \times x = 0.00669 \times 100.48\% = 0.67\%$$

3.5.5 扩展不确定度 取包含因子 $K = 2$ 置信概率约 95%, 含量测定扩展不确定度为: $U = 2 \times 0.67\% = 1.34\%$ 。含量测定结果可表示为 $(100.48 \pm 1.34)\%$ ($K = 2$)。

4 标准曲线法不确定度的量化分析

4.1 经典标准曲线法 (方法 B) 标准曲线法与外

标一点法求算药品含量在不确定度分析中的区别为 C_x 的获取途径不同, 在标准曲线法中, C_x 由标准曲线回归方程计算得到, 所以数学模型中除 C_x 计算公式外, 其他均同外标一点法。

4.1.1 供试品溶液浓度的不确定度 $u_{\text{rel}}(Cx)$

(1) 标准储备液浓度的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(Cr)$

对照品由中国药品生物制品检定所提供, 未提供不确定度值, 视为 0。则对照品纯度的相对标准不确定度为 $u_{\text{rel}}(Pr) = 0$ 电子天平 (0.01 mg) 检定证书中天平称量允差为 $\pm 0.1 \text{ mg}$ 视为矩形分布 ($K = \sqrt{3}$), 则天平称重的相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(Wr) = u(Wr) / Wr = 0.1 \sqrt{3} / 48.92 = 0.00118$ 25 mL 量瓶为 A 级, 由《常用玻璃量器检定规程》JJG196-90^[7] 查得, 容量允差为 $\pm 0.03 \text{ mL}$ 分布状态视为矩形分布 ($K = \sqrt{3}$), 则玻璃量器引入的相对标准不确定度为 $u_{\text{rel}}(Vr_1) = u(Vr_1) / Vr_1 = 0.03 \sqrt{3} / 25 = 0.00069$ 合成以上不确定度分量得标准储备液浓度的相对标准不确定度: $u_{\text{rel}}(Cr) =$

$$\sqrt{u_{\text{rel}}^2(Pr) + u_{\text{rel}}^2(Wr) + u_{\text{rel}}^2(Vr_1)} = 0.00137$$

(2) 标准溶液配制过程中引入的相对标准不确定度

$u_{\text{rel}}(Vr_2)$ 实验中分别用 $10 \pm 0.05 \text{ mL}$ (A 级)、 $10 \pm 0.05 \text{ mL}$ (A 级)、 $10 \pm 0.05 \text{ mL}$ (A 级)、 $25 \pm 0.1 \text{ mL}$ (A 级)、 $10 \pm 0.05 \text{ mL}$ (A 级) 刻度吸管精密量取标准储备液 $Vr_{21}: 5, 7.5, 5, 12.5, 7.5 \text{ mL}$ 置 $Vr_{22}: 100 \pm 0.1 \text{ mL}$ (A 级)、 $100 \pm 0.1 \text{ mL}$ (A 级)、 $50 \pm 0.05 \text{ mL}$ (A 级)、 $100 \pm 0.1 \text{ mL}$ (A 级)、 $50 \pm 0.05 \text{ mL}$ (A 级) 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 作为标准曲线对照品溶液。按矩形分布处理:

$$u_{\text{rel}}(Vr_{21}) = u(Vr_{21}) / Vr_{21} = \text{移液管允差} \sqrt{3} / Vr_{21}$$

$$u_{\text{rel}}(Vr_{22}) = u(Vr_{22}) / Vr_{22} = \text{量瓶允差} \sqrt{3} / Vr_{22}$$

$$u_{\text{rel}}(Vr_2) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(Vr_{21}) + u_{\text{rel}}^2(Vr_{22})}$$

计算得 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准溶液配制过程中引入的相对标准不确定度分别为 0.00580, 0.00389, 0.00580, 0.00466, 0.00389 取其中最大的不确定度值, 则 $u_{\text{rel}}(Vr_2) = 0.00580$

(3) 环境温度引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(Tr)$

实验环境在空调条件下, 设室温为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 。溶剂水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, 按照矩形分布, 环境温度引入的不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(Tr) = 5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times Vr \sqrt{3} / Vr = 0.00061$$

(4) 高效液相色谱仪进样重复性引入的不确定度

同“3.3.1”项下, 高效液相色谱仪进样重复性引入

的相对标准不确定度:

$$u_{rel}(A) = 0.6\% \sqrt{5} = 0.00268$$

(5)标准曲线拟合过程中引入的相对标准不确定度

$u_{rel}(\text{curv})$ 本实验将浓度为 0.1, 0.15, 0.2, 0.25,

0.3 mg• mL⁻¹标准溶液分别上机测定 3 次, 结果见

表 1, 根据表 1 中数据拟合的标准工作曲线方程为:

$$A = bC + b_0 = 5.192 \times 10^7 C - 42546 \quad r = 1$$

通过标准工作曲线计算得供试品溶液的浓度 $c_1 =$

$$0.1976 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}.$$

表 1 标准溶液测定结果

Tab 1 Results of reference solution

标准溶液的浓度 (mg• mL ⁻¹) (concentration of reference solution)	峰面积 (peak area)		
	1	2	3
0.0978	5034220	5058340	5063901
0.1467	7561468	7584075	7596501
0.1956	1006591	410093176	10115414
0.2445	12587602	12628901	12649554
0.2934	15164404	15240815	15279808

$$s(A) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n [A_{ij} - (b_0 + bc_i)]^2}{mn - 2}} = 39735.9641$$

$$u(c_1) = \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{mn} + \frac{(c_1 - c_0)^2}{\sum_{i=1}^m (c_i - c_0)^2}} = 0.00043 \text{ mg} \cdot$$

$$\text{mL}^{-1}$$

$$u_{rel}(\text{curv}) = u(c_1) / c_1 = 0.00043 / 0.1976 = 0.00218$$

$s(A)$: 标准溶液峰面积的标准偏差

p : 供试品的平行测定次数 (4)

m : 标准溶液的个数 (5)

n : 每个标准溶液的测定次数 (3)

c_0 : 标准溶液的浓度 (mg• mL⁻¹)

c_i : 供试品溶液的浓度 (mg• mL⁻¹)

i 指第几个校准溶液

j 指校准溶液的第几次测量

(6)合成各不确定度分量得供试品溶液浓度的不确定度

$$u_{rel}(Cx) = \sqrt{u_{rel}^2(Cr) + u_{rel}^2(Vr_2) + u_{rel}^2(Tr) + u_{rel}^2(A) + u_{rel}^2(\text{curv})} = 0.00692$$

4.1.2 其他不确定度分量 供试品质量的相对标准不确定度 $u_{rel}(Wx)$ 、 $u_{rel}(\bar{W})$ 同“3.3.2”项下, 供试品稀释过程中引入的不确定度 $u_{rel}(V_x)$ 同“3.3.3”项下。

4.1.3 合成不确定度

$$u_{rel}(x) = \sqrt{u_{rel}^2(Cx) + u_{rel}^2(Wx) + u_{rel}^2(W) + u_{rel}^2(V_x)} = 0.00702$$

实验中测得 $x = 100.95\%$, 则

$$u(x) = u_{rel}(x) \times x = 0.00702 \times 100.95\% = 0.71\%$$

4.1.4 扩展不确定度 取包含因子 $K = 2$ 置信概率约 95%, 含量测定扩展不确定度为: $U = 2 \times 0.71\% = 1.42\%$, 含量测定结果可表示为 $100.95\% \pm 1.42\% (K = 2)$ 。

4.2 进样体积梯度标准曲线法 (方法 C) 本实验将浓度为 0.20 mg• mL⁻¹标准溶液分别进样 10, 15, 20, 25, 30 μL , 平行测定 3 次, 结果见表 2, 根据表 2 中数据拟合的标准工作曲线方程为:

$$A = bC + b_0 = 5.193 \times 10^7 C - 416 \quad r = 1$$

通过标准工作曲线计算得供试品溶液的浓度 $c_1 =$

$$0.1968 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}.$$

表 2 标准溶液测定结果

Tab 2 Results of reference solution

标准溶液的浓度 (mg• mL ⁻¹) (concentration of reference solution)	峰面积 (peak area)		
	1	2	3
0.0978	5080813	5085435	5084172
0.1467	7626031	7629096	7630811
0.1956	10157491	10160057	10162021
0.2445	12699043	12707036	12703437
0.2934	15251105	15258688	15252502

按照“4.1.1”项下方法计算得: $u_{rel}(\text{curv}) = 0.00063$, $u_{rel}(Cx) = 0.00659$, 其他不确定度分量同“3.3”项下, 最终合成不确定度为: $u_{rel}(x) = 0.00670$, 实验中测得 $x = 100.54\%$, 则

$$u(x) = u_{rel}(x) \times x = 0.00670 \times 100.54\% = 0.67\%$$

取包含因子 $K = 2$, 置信概率约 95%, 含量测定扩展不确定度为: $U = 2 \times 0.67\% = 1.34\%$ 。含量测定结果可表示为 $100.54\% \pm 1.34\% (K = 2)$ 。

表 3 相对标准不确定度一览表 (n = 3)
Tab 3 Table of reverse standard uncertainty (n = 3)

不确定度分量 (quantity)	不确定度来源 (sources of uncertainty in measurement)	相对标准不确定度 (reverse standard uncertainty)		
		方法 A (method A)	方法 B (method B)	方法 C (method C)
$u_{rel}(Cx)$	对照品纯度 (purity of reference substance)	0	0	0
	对照品天平称重 (balance)	0.00118	0.00118	0.00118
	玻璃量器校准 (flask and pipette)	0.00586	0.00583	0.00583
	实验室温度 (temperature)	0.00061	0.00061	0.00061
	HPLC 进样重复性 (HPLC injection)	0.00268	0.00268	0.00268
	标准曲线拟合 (curve)	0	0.00232	0.00071
	合成不确定度 (synthesis)	0.00659	0.00696	0.00660
$u_{rel}(Wx)$	天平称量 (balance)	0.00074	0.00074	0.00074
$u_{rel}(\overline{W})$	天平称量 (balance)	0.00004	0.00004	0.00004
$u_{rel}(Vx)$	玻璃量器的校准 (flask and pipette)	0.00069	0.00069	0.00069
	实验室温度 (temperature)	0.00061	0.00061	0.00061

5 小结

操作人员、实验环境、仪器、方法均保持不变,重复实验 3 次,求出各不确定度分量的均值,结果见表 3。由于 3 种方法计算公式中只有不确定度分量 $u_{rel}(Cx)$ 不同,所以比较 $u_{rel}(Cx)$ 的大小可以作为评估 3 种方法不确定度大小的依据,由表 3 可以看出进样体积梯度标准曲线法 [$u_{rel}(Cx) = 0.00660$] 与单点法 [$u_{rel}(Cx) = 0.00659$] 非常接近,均略小于经典标准曲线法 [$u_{rel}(Cx) = 0.00696$]。 $u_{rel}(Cx)$ 的值主要来自玻璃量器的允差、高效液相仪进样重复性以及标准曲线的拟合,所以在实验设计过程中应尽量选择精密的玻璃量器与仪器,减少稀释步骤,以降低其产生的不确定度值。另外,外标一点法由于假设曲线通过原点,所以未考虑曲线拟合过程中产生的不确定度,而进样体积梯度法标准曲线拟合时产生的不确定度值明显小于经典标准曲线法,说明高效液相仪器进样的精确度远远超出实验者的手动操作,这对实验方法的选择以及改进提供了参考。

由“4.1.1.5”项下公式可以看出,标准曲线的拟合过程产生的不确定度的大小,除了与标准溶液测量重复性有关,还与供试品溶液浓度与标准溶液浓度均值的接近程度有关,二者的值越接近,产生的不确定度就越小。

参考文献

1 SU X iao- li (粟晓黎), LI Guan- m in (李冠民), JIN Shao- hong (金少鸿). Studies on evaluation of uncertainty for general analysis methods for quality control of drugs (药品检验一般检测项目不确定度评定研究 - I. B 类评定). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005 25 (6): 699

2 China National Accreditation Board for Laboratories (中国实验室国家认可委员会), Accreditation Criteria for Testing and Calibration Laboratories (检测与校准实验室认可准则), ISO /IEC 17025: 2005

3 State quality and technique administration (国家质量技术监督局). Guide of evaluation and expression of uncertainty in measurement (测量不确定度评定与表示), JJF 1059• 1999

4 DAIX iang- dong (戴向东), TENG Nan- yan (滕南雁), SANG Tong (桑彤). Evaluation of uncertainty measurement in the content determination of andrographis tablets by TLCS [穿心莲片含量测定 (薄层色谱扫描法) 的测量不确定度评定]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005 25 (12): 1556

5 WANG Yu (王玉), PAN Xi- lin (潘晞陵). Uncertainty estimate of tablets weighing deviation (药品检测中的片剂重量差异不确定度估算). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005 25 (6): 706

6 SONG Ming- shun (宋明顺). Evaluation and mathematical analysis of uncertainty in measurement (测量不确定度评定与数据处理). Beijing (北京): China Metrology Press (中国计量出版社), 2000. 169

7 State quality and technique administration (国家质量技术监督局), Verification Regulation of Working Glass Container (常用玻璃量器检定规程). JJG 06- 90 1990

(本文于 2007 年 9 月 17 日收到)