

HPLC法测定中药中掺入双氯芬酸钠含量的不确定度评定

王维剑, 凌霄, 谭会洁, 谢元超

(山东省药品检验所, 济南 250101)

摘要 目的: 建立中药中掺入的双氯芬酸钠的 HPLC法含量测定的不确定度评定方法。方法: 建立数学模型, 对含量测定过程中各影响因素进行分析评估。结果: 通过计算各变量的不确定度, 合成不确定度, 最终得出测定结果的扩展不确定度。结论: 该评定方法适用于 HPLC法测定中药中掺入的双氯芬酸钠含量的不确定度评定。

关键词: 高效液相色谱; 双氯芬酸钠; 不确定度

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0130-04

HPLC evaluation of uncertainty for determination of declofenac sodium in Chinese traditional medicine

WANG Wei-jian, LING Xiao, TAN Hui-jie, XIE Yuan-chao

(Shandong Provincial Institute for Drug Control, Jinan 250101, China)

Abstract Objective To establish a method of uncertainty evaluation for the determination of declofenac sodium in Chinese traditional medicine by HPLC. **Method** The uncertainty was evaluated by a established mathematical model and the analysis of various factors affecting sample detection. **Results** Each components of uncertainty was calculated and the combined uncertainty was then finally obtained by synthesizing the uncertainties of various component variables. **Conclusion** This method is appropriate to be used in the uncertainty evaluation for the determination of declofenac sodium in Chinese traditional medicine by HPLC.

Key words HPLC; declofenac sodium; uncertainty

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。多年来,药检系统均以经典误差理论方法计算检测结果的误差,这与目前国际标准化委员会要求的以“不确定度”表示方法不同^[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]。

中药中掺入西药的检验一般先通过 HPLC-MS 对掺入成分定性,然后通过 HPLC 对检出成分进行定量。有关测定中药中掺入的西药含量的不确定度评定,未见文献报道。本文以某消肿止痛类中药为例—经 HPLC-MS 鉴定,证实该中药中含有西药成分双氯芬酸钠(declofenac sodium),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^[4,5],对 HPLC法测定该消肿止痛类中药中双氯芬酸钠含量的不确定度进行了测量和评估。该评定方法可为 HPLC法测定中药中掺入的西药含量的不确定度评定提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent Zorbax-C₁₈ 色谱柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm); BP211D 电子天平($d = 0.01 \text{ mg}/0.1 \text{ mg}$)。

双氯芬酸钠对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100334-200302);样品(山东省药品检验所提供);乙腈为色谱纯;水为重蒸水;其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液(含 0.1% 醋酸)-乙腈(30:70)为流动相;流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长为 280 nm;柱温: 25 °C;进样量: 10 μL。

2.2 标准曲线对照品溶液的制备 精密称取双氯芬酸钠对照品 10.18 mg 置 100 mL 量瓶中, 加流动相超声 10 min 使其溶解, 放冷并定容至刻度, 混合均匀, 作为对照品储备液。分别精密量取储备液 1, 5, 10, 25, 50 mL 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得标准曲线对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取样品 20 片, 研细, 精密称取 319.2 mg 置 50 mL 量瓶中, 加流动相超声 10 min 使其溶解, 放冷并定容至刻度, 摇匀, 放置过夜, 取上层溶液离心 ($10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min), 精密量取上清液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得。

2.4 测量数学模型

标准曲线公式 $C = bA + b_0$ (1)

含量计算公式 $X = \frac{C \times V}{W} \times 100\%$ (2)

C : 供试品溶液中双氯芬酸钠的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),
 A : 供试品溶液峰面积, b 回归方程的斜率, b_0 : 回归

方程的截距, X : 双氯芬酸钠的含量 (%), V : 供试品溶液的稀释体积数 (mL), W : 样品的取样量 (mg)。

由供试品溶液的制备过程可知 $V = 500 \text{ mL}$, $W = 319.2 \text{ mg}$ 实验测得供试品溶液中双氯芬酸钠的浓度 $C = 0.003676 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 则灵敏系数为:

$$c(C) = \frac{V}{W} \times 100\% = 156.64\%$$

$$c(V) = \frac{C}{W} \times 100\% = 0.0011516\%$$

$$c(W) = -\frac{C \times V}{W^2} \times 100\% = -0.0018039\%$$

3 不确定度来源的识别及分析

3.1 不确定度的来源 从检测过程和数学模型分析, 双氯芬酸钠含量的不确定度来源, 主要包括对照品纯度, 对照品和样品的天平称重以及配制标准储备液、标准溶液、供试品溶液的玻璃量器校准, 实验室温度, HPLC 进样重复性, 标准曲线的拟合过程等方面, 详细分析见图 1。

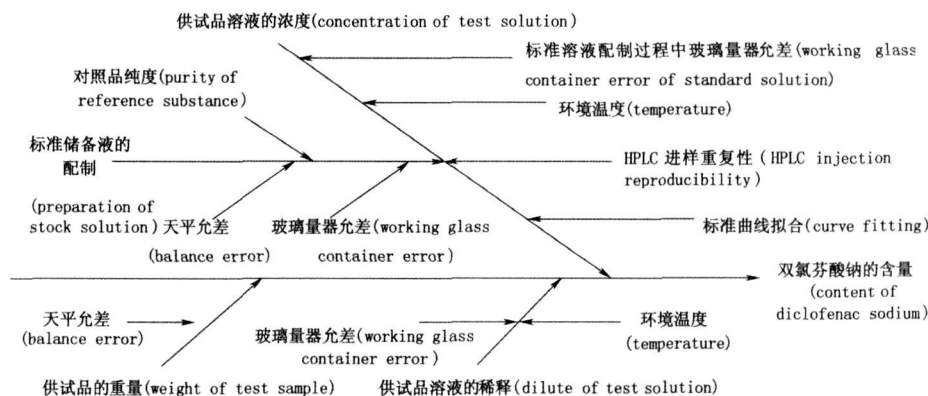


图 1 不确定度的来源分析图

Fig 1 Source of uncertainty

3.2 不确定度的量化分析

3.2.1 供试品溶液浓度的不确定度 $u(C)$

3.2.1.1 标准储备液浓度的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(c_0)$

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, 本实验参考基准物质的不确定度值, 假定对照品含量为 $100\% \pm 0.05\%$, 视为矩形分布 ($K = \sqrt{3}$), 则对照品纯度相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(p) = 0.05\% / \sqrt{3} = 0.00029$$

对照品称重时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 ($K = \sqrt{3}$), 则天平称重的相对标准不

确定度:

$$u_{\text{rel}}(w_0) = u(w_0) / w_0 = 0.1 / \sqrt{3} / 10.18 = 0.00567$$

稀释对照品用的 100 mL 量瓶为 A 级, 由《常用玻璃量器检定规程》JJG 196-90^[6] 查得, 容量允差为 $\pm 0.1 \text{ mL}$, 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:

$$u_{\text{rel}}(v_0) = u(v_0) / v_0 = 0.1 / \sqrt{3} / 100 = 0.00058$$

将上述不确定度分量合成得标准储备液浓度的相对标准不确定度:

$$\begin{aligned} u_{\text{rel}}(c_0) &= \sqrt{u_{\text{rel}}^2(p) + u_{\text{rel}}^2(w_0) + u_{\text{rel}}^2(v_0)} \\ &= \sqrt{0.00029^2 + 0.00567^2 + 0.00058^2} \\ &= 0.00571 \end{aligned}$$

3.2.1.2 标准溶液配制过程中引入的相对标准不

确定度 $u_{\text{rel}}(v_1)$ 实验中分别用 (1 ± 0.007) mL(A 级), (5 ± 0.015) mL(A 级), (10 ± 0.02) mL(A 级), (25 ± 0.03) mL(A 级), (50 ± 0.05) mL(A 级)移液管精密量取标准储备液 V_{11} : 1, 5, 10, 25, 50 mL置 V_{12} (100 ± 0.1) 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:

$$u_{\text{rel}}(v_{11}) = u(v_{11}) / v_{11} = \text{移液管允差} / \sqrt{3} / v_{11}$$

$$u_{\text{rel}}(v_{12}) = u(v_{12}) / v_{12} = \text{量瓶允差} / \sqrt{3} / v_{12}$$

$$u_{\text{rel}}(v_1) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(v_{11}) + u_{\text{rel}}^2(v_{12})}$$

计算得 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液配制过程中引入的相对标准不确定度分别为 0.00408, 0.00183, 0.00129, 0.00090, 0.00082。取其中最大的不确定度值,则 $u_{\text{rel}}(v_1) = 0.00408$ 。

3.2.1.3 环境温度引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(t)$ 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 $2.1 \times 10^{-4}^\circ\text{C}^{-1}$,按照矩形分布,环境温度引入的相对标准不确定度为:

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

3.2.1.4 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 $\text{RSD} = 0.6\%$ ($n = 5$),则: $u_{\text{rel}}(A) = 0.6\% / \sqrt{5} = 0.00268$ 。

3.2.1.5 标准曲线拟合过程中引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(c_1)$ 本实验将浓度为 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液分别上机测定 3 次,结果见表 1,对供试品溶液进行 5 次测定,结果见表 2。根据表 1 中数据拟合的标准工作曲线方程为:

$$A = bC + b_0 = 22738C + 0.0266 \quad r = 0.9999$$

表 1 对照品溶液测定结果

Tab 1 Results of reference solution

浓度 (concentration, c_0) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	峰面积 (peak area) A		
0.001018	23.21	23.46	23.01
0.00509	115.99	116.23	115.70
0.01018	231.04	230.52	231.48
0.02545	579.05	579.35	578.62
0.05090	1157.23	1157.91	1156.82

$$s(A) = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n [A_{ij} - (b_0 + bc_i)]^2}}{mn - 2} = 0.4567$$

表 2 供试品溶液测定结果

Tab 2 Results of test solution

测定次数 (No. of determination)	峰面积 (peak area) A	浓度 (concentration, c_1) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	84.1	0.003697
2	83.4	0.003667
3	83.8	0.003684
4	83.6	0.003675
5	83.2	0.003658
均值 (mean)	83.6	0.003676

$$u(c_1) = \frac{s(A)}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{mn} + \frac{(c_1 - c_0)^2}{\sum_{i=1}^m (c_i - c_0)^2}}$$

$$= 0.000061 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$u_{\text{rel}}(c_1) = u(c_1) / c_1 = 0.000061 / 0.003676 = 0.01659$$

$s(A)$: 对照品溶液峰面积的标准偏差, p : 供试品的测定次数 (5), m : 对照品溶液的个数 (5), n : 每个对照品溶液的测定次数 (3), c_0 : 对照品溶液的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), c_1 : 供试品溶液的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), i : 指第几个校准溶液, j : 指校准溶液的第几次测量。

将以上各不确定度分量合成得:

$$u_{\text{rel}}(C) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(c_0) + u_{\text{rel}}^2(v_0) + u_{\text{rel}}^2(A) + u_{\text{rel}}^2(c_0)}$$

$$= \sqrt{0.00571^2 + 0.00408^2 + 0.00061^2 + 0.00268^2 + 0.01659^2}$$

$$= 0.01822$$

$$u(C) = u_{\text{rel}}(C) \times C = 0.01822 \times 0.003676$$

$$= 0.000067 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

3.2.2 供试品重量的标准不确定度 $u(W)$ 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 (0.1 mg) 检定证书中天平称量允差为 $\pm 1 \text{ mg}$ 视为矩形分布 ($K = \sqrt{3}$),则供试品重量的标准不确定度为:

$$u(W) = 1 / \sqrt{3} = 0.577 \text{ mg}$$

$$u_{\text{rel}}(W) = u(W) / W = 0.577 / 319.2 = 0.00181$$

3.2.3 供试品溶液稀释过程中引入的标准不确定度 $u(V)$ 实验中分别用 (1 ± 0.007) mL(A 级)移液管转移,用 (50 ± 0.05) mL(A 级)与 (10 ± 0.02) mL(A 级)量瓶中定容,按矩形分布处理,按“3.2.1”项下方法计算得玻璃容器的校准引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(v_2) = 0.00424$ 。实验环境在空调条件下,设室温为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 。按“3.2.1”项下方法计算得 $u_{\text{rel}}(t) = 0.00061$ 。将不确定度分量合成得:

$$u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(v_2) + u_{\text{rel}}^2(t)}$$

$$= \sqrt{0.00424^2 + 0.00061^2} = 0.00428$$

$$u(V) = u_{\text{rel}}(V) \times V = 0.00428 \times 500 = 2.14 \text{ mL}$$

相对标准不确定度一览表见表 3。

表 3 相对标准不确定度一览表

Tab 3 Table of reverse standard uncertainty

不确定度分量 (quantity)	不确定度来源 (sources of uncertainty in measurement)	分布 (distribution)	类型 (type)	相对标准不确定度 (reverse standard uncertainty)
$u(C)$	对照品纯度 (purity of reference substance)	矩形 (rectangle)	B	0.00029
	天平允差 (balance error)	矩形 (rectangle)	B	0.00570
	配制标准储备液的玻璃量器允差 (working glass container error of stock solution)	矩形 (rectangle)	B	0.00058
	配制标准溶液的玻璃量器允差 (working glass container error of standard solution)	矩形 (rectangle)	B	0.00408
	实验室温度 (temperature)	矩形 (rectangle)	B	0.00061
	HPLC进样重复性 (HPLC injection reproducibility)	正态 (normal)	A	0.00268
	标准曲线拟合 (curve fitting)	正态 (normal)	A	0.01659
$u(W)$	天平允差 (balance error)	矩形 (rectangle)	B	0.00181
$u(V)$	玻璃量器的允差 (working glass container error)	矩形 (rectangle)	B	0.00424
	实验室温度 (temperature)	矩形 (rectangle)	B	0.00061

3.3 合成标准不确定度 供试品溶液的浓度、稀释体积以及样品的重量等的不确定度相互独立, 故将上述不确定度分量合成得合成标准不确定度 $u(X)$ 为:

$$u(X) = \sqrt{c^2(C)u^2(C) + c^2(W)u^2(W) + c^2(V)u^2(V)}$$

$$= \sqrt{156.64\%^2 \times 0.00067^2 + (-0.0018039\%)^2 \times 0.577^2 + 0.011516\%^2 \times 2.14^2}$$

$$= 0.01\%$$

3.4 扩展不确定度 计算得双氯芬酸钠的含量的测定结果 $X = 0.58\%$, 测量结果的合成标准不确定度 $u(X) = 0.01\%$ 。按惯例, 若取包含因子 $K = 2$ (95%的置信区间), 得测量结果的扩展不确定度:

$$U = K \times u(X) = 0.02\%$$

3.5 测量结果的表示 供试品中双氯芬酸钠的含量可表示为:

$$X = 0.58\% \pm 0.02\%, K = 2 (95\% \text{ 的置信区间})$$

即: 双氯芬酸钠的含量测定结果出现在 $(0.58 \pm 0.02)\%$ 区间的概率为 95%。

4 讨论

4.1 目前国内外药品检验领域所使用的药品对照品均未提供有关不确定度的资料, 这对不确定度评定带来一定困难, 相信随着药检行业的不断发展, 负责药品对照品标化的有关部门会逐步提供有关不确定度的资料, 以便我们更好地开展不确定度评定工作。

4.2 分析评估不确定度时, 首先要尽量考虑产生不确定度的所有来源, 因为合成不确定度的数值几乎完全取决于重要的不确定度分量。由以上的评定可看出, 本方法测量结果的不确定度主要来自标准曲线的拟和过程。因此, 在测定时, 必须严格控制实验条件, 尽量使平行测量实验环境相近, 并规范实验操作。

4.3 从标准曲线拟合过程中不确定度的计算公式可以看出, 标准曲线的拟和过程产生的不确定度的大小, 除了与对照品溶液测量重复性有关, 还与供试

品溶液浓度与对照品溶液浓度均值的接近程度有关, 二者越接近, 产生的不确定度就越小, 这对改进实验方法, 降低不确定度值具有参考意义。

4.4 灵敏系数反映了该输入量标准不确定度对输出量不确定度贡献的灵敏程度, 而且标准不确定度只有乘以该灵敏系数才能构成一个不确定度分量, 即和输出量有相同的单位, 因此在不确定度评定过程中灵敏系数不能被忽视。在不确定度分量较多而且其大小比较接近时, 可估计为正态分布, 这时 $K = 2$ 就决定了具有 95% 置信水平的区间, 故本文按照惯例取 $K = 2$ 对应 95% 的置信区间。

参考文献

- 1 SU Xiao-li (粟晓黎), LI Guan-min (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 - 1. 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/IEC17025:2005
- 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). JJF1059-1999
- 4 DAI Xiang-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 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
- 6 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). JJG196-90: 1990

(本文于 2008 年 11 月 25 日修改回)