

HPLC 法测定枸橼酸喷托维林片含量的测量不确定度评定

秦立¹ 肖英² 陈诗慧³ 范亚刚¹ (1. 云南省食品药品检验所 昆明 650011; 2. 山东省食品药品检验所; 3. 云南中医药大学)

摘要 目的: 评定 HPLC 法测定枸橼酸喷托维林片含量的测量不确定度。**方法:** 建立 HPLC 法测定含量的数学模型, 分析测量不确定度的来源并对各分量进行量化分析和评估, 合成标准测量不确定度, 给出扩展测量不确定度报告。**结果:** HPLC 法测定枸橼酸喷托维林片含量的扩展测量不确定度为 2.4%, 测量结果表示为 $(99.3 \pm 2.4)\%$, $k=2$ 。**结论:** 分析产生不确定度的主要来源, 为有效地控制该含量测定方法的准确性提供可靠的理论依据。

关键词 测量不确定度; 高效液相色谱法; 枸橼酸喷托维林片; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: B 文章编号: 1008-049X(2014)03-0505-03

Uncertainty Evaluation for Determination of Pentoxifyverine Citrate Tablets by HPLC

Qin Li¹, Xiao Ying², Chen Shihui³, Fan Yagang¹ (1. Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650011, China; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control; 3. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective: To evaluate the measurement uncertainty for the determination of pentoxifyverine citrate tablets by HPLC.

Methods: The mathematical model of content determination by HPLC was established. The uncertainty sources were analyzed. Each active component of uncertainty was calculated, and the extended uncertainty was obtained. **Results:** The extended uncertainty for the HPLC determination of pentoxifyverine citrate was 2.4%, and the result of content determination was $(99.3 \pm 2.4)\%$ ($k=2$). **Conclusion:** The main sources of uncertainty are analyzed, which provides the reliable theoretical basis for the effective control of the method.

KEY WORDS Measurement uncertainty; HPLC; Pentoxifyverine citrate tablets; Determination

测量不确定度是表征赋予被测量值分散性的非负参数^[1]。它与测量误差有着本质的区别。测量误差表示测量结果对真值的偏离, 是一个确定的差值, 在数轴上表示为一个点。测量不确定度表示被测量值的分散性, 以分布区间的半宽度表示, 在数轴上表示为一个区间。在相同的条件下进行测量时, 合理赋予被测量的任何值, 均具有相同的测量不确定度, 即测量不确定度仅与测量方法有关^[2]。

枸橼酸喷托维林片是《中国药典》2010 年版二部收载品种^[3], 为镇咳类非处方药品, 具有中枢及外周性镇咳作用, 适用于各种原因引起的干咳, 其镇咳作用强度约为可待因的 1/3。枸橼酸喷托维林片的含量测定方法为 HPLC 外标法, 本文根据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059. 1-2012) 及有关规定^[4,5]并参考有关文献^[6-9], 对 HPLC 法测定枸橼酸喷托维林片含量的测量不确定度进行评估, 分析影响不确定度的各因素, 为客观评价枸橼酸喷托维林片的含量测定结果提供科学依据。

1 仪器与试药

Waters 2695 高效液相色谱仪; Sartorius BP-211D 电子天平; 梅特勒 DELTA320 酸度计; 100 ml 和 50 ml 量瓶均检定为 A 级。

枸橼酸喷托维林对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100432-200401); 枸橼酸喷托维林片(昆明振华制药厂有限公司, 批号: 20130303); 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水(取三乙胺 10 ml, 用水稀释至 1 000 ml, 用磷酸调节 pH 至 3.0)-甲醇(45:55); 流速: 1.0 ml · min⁻¹; 检测波长: 215 nm; 进样量: 20 μl。

2.2 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

枸橼酸喷托维林 25 mg),置 100 ml 量瓶中,加流动相适量溶解并定容。摇匀,滤过,取续滤液即得。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取枸橼酸喷托维林对照品 13.04 mg,置 50 ml 量瓶中,加流动相适量溶解并稀释至刻度。

2.4 测定法

注入液相色谱仪,进样量 20 μl,记录色谱图,按外标法以峰面积计算含量。

2.5 测量不确定度的评估

化学分析中的测量不确定度评估过程主要分为以下步骤^[2,4]:被测量的技术规定;识别测量不确定度的来源;测量不确定度分量的量化;计算合成标准测量不确定度;扩展测量不确定度的给出;报告测量不确定度。

2.5.1 数学模型 根据测定原理和过程,样品的标示百分含量计算公式为:

$$X = \frac{A_X \times W_R \times P_R \times V_X \times \bar{W}}{A_R \times W_X \times V_R \times \text{标示量}} \times 100\%$$

式中: X 为供试品中枸橼酸喷托维林的标示百分含量; A_X 为供试品的峰面积; A_R 为对照品的峰面积; W_X 为供试品的称取量; W_R 为对照品的称取量; V_X 为供试品溶液的配制体积; V_R 为对照品溶液的配制体积; P_R 为对照品的纯度; $\bar{W}$ 为平均片重;标示量:25 mg/片。

2.5.2 识别测量不确定度的来源 有关测量不确定度的来源见图 1。

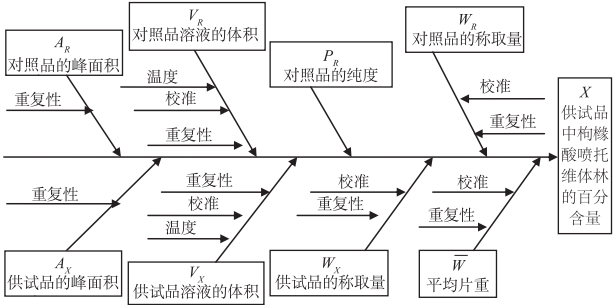


图 1 测量不确定度分量因果图

2.5.3 测量不确定度分量的量化分析

2.5.3.1 对照品纯度的相对标准不确定度 $u_{rel}(P_R)$ 属于 B 类测量不确定度。枸橼酸喷托维林对照品由中国食品药品检定研究院提供,未标明含量,视为 100.0%。未给出其不确定度等相关信息,假定其分布区间为 $\pm 0.05\%$,按矩形分

$$u_{rel}(P_R) = \frac{0.05\%}{100.0\%} = 2.89 \times 10^{-4}$$

2.5.3.2 对照品称量的相对标准不确定度 $u_{rel}(W_R)$ 有两个来源,均属于 B 类测量不确定度。①天平示值的不确定度分析:所用电子天平($d = 0.01\text{ mg}$)的检定证书给出的最大允差为 $\pm 0.05\text{ mg}$,按矩形分布计算, $u(W_{R1}) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-2}\text{ mg}$ 。

②天平称量重复性的不确定度分析:所用电子天平($d = 0.01\text{ mg}$)的检定证书给出的重复性误差为 0.01 mg ,按矩

形分布计算, $u(W_{R2}) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-3}\text{ mg}$ 。

单次称量的标准不确定度为: $\sqrt{(2.89 \times 10^{-2})^2 + (5.77 \times 10^{-3})^2} = 2.94 \times 10^{-2}\text{ mg}$ 。因称量过程使用减重法,故其不确定度 $u(W_R) = \sqrt{2 \times (2.94 \times 10^{-2})^2} = 4.16 \times 10^{-2}\text{ mg}$ 。称取对照品 13.04 mg,则相对标准不确定度 $u_{rel}(W_R) = \frac{4.16 \times 10^{-2}}{13.04} = 3.19 \times 10^{-3}$ 。

2.5.3.3 对照品溶液稀释的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_R)$ 主要有 3 个不确定度来源:①校准:属 B 类不确定度。查阅《常用玻璃量器检定规程》JJG-2006^[10], 50 ml A 级量瓶的容量允差为 $\pm 0.05\text{ ml}$,按三角分布计算, $u(V_{R1}) = \frac{0.05}{\sqrt{6}} = 2.04 \times 10^{-2}$ 。②重复性:属 A 类不确定度。将 50 ml 量瓶加水至刻度,称量,重复操作 10 次,用贝塞尔公式法评定,得到标准偏差为 0.0246 ml ,则不确定度 $u(V_{R2}) = \frac{0.0246}{\sqrt{10}} = 7.78 \times 10^{-3}\text{ ml}$ 。③温度:属 B 类不确定度。50 ml 量瓶在 20°C 下校准,实验室环境温度为 22.1°C ,水的体积膨胀系数为 2.1×10^{-4} ,按矩形分布计算,则不确定度 $u(V_{R3}) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 50 \times (22.1 - 20)}{\sqrt{3}} = 1.27 \times 10^{-2}\text{ ml}$ 。由以上三

项合成得到 $u(V_R) = \sqrt{(2.04 \times 10^{-2})^2 + (7.78 \times 10^{-3})^2 + (1.27 \times 10^{-2})^2} = 2.53 \times 10^{-2}\text{ ml}$,则 $u_{rel}(V_R) = \frac{2.53 \times 10^{-2}}{50} = 5.06 \times 10^{-4}$ 。

2.5.3.4 对照品峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_R)$ 主要有 2 个不确定度来源:①系统影响:因对照品与供试品在相同条件下测定,进样器、泵、色谱柱、检测器、积分条件等产生的系统偏差能够相互抵消,因此暂不考虑系统影响。②进样重复性:属 A 类不确定度。取对照品溶液连续进样 6 次,用贝塞尔公式法评定,得到峰面积的标准偏差为 5 120.3,平均峰面积为 3 001 641.3,则不确定度 $u(A_R) = \frac{5\ 120.3}{\sqrt{6}} = 2\ 090.4$,

相对标准不确定度 $u_{rel}(A_R) = \frac{2\ 090.4}{3\ 001\ 641.3} = 6.96 \times 10^{-4}$ 。

2.5.3.5 供试品称量的相对标准不确定度 $u_{rel}(W_X)$ 测量不确定度的分析同“2.5.3.2”项。不确定度 $u(W_X) = u(W_R) = 4.16 \times 10^{-2}\text{ mg}$ 。供试品 2 份的称取量分别为 199.3 mg、199.0 mg,则供试品称量的相对标准不确定度 $u_{rel}(W_X) = \sqrt{\left(\frac{4.16 \times 10^{-2}}{199.3}\right)^2 + \left(\frac{4.16 \times 10^{-2}}{199.0}\right)^2} = 2.95 \times 10^{-4}$ 。

2.5.3.6 供试品溶液稀释的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_X)$ 主要有 3 个不确定度来源:①校准:属 B 类不确定度。查阅《常用玻璃量器检定规程》JJG-2006^[10], 100 ml A 级量瓶的容量允差为 $\pm 0.10\text{ ml}$,按三角分布计算, $u(V_{R1}) = \frac{0.10}{\sqrt{6}} = 4.08 \times 10^{-2}$ 。②重复性:属 A 类不确定度。将 100 ml 量瓶加水至刻度,称量,重复操作 10 次,用贝塞尔公式法评定,得

到标准偏差为0.048 5 ml,则不确定度 $u(V_{R2}) = \frac{0.048\ 5}{\sqrt{10}} = 1.53 \times 10^{-2}$ ml。③温度:属 B 类不确定度。100 ml 量瓶在 20℃ 下校准,实验室环境温度为 22.1℃,水的体积膨胀系数为 2.1×10^{-4} ,按矩形分布计算,则不确定度 $u(V_{R3}) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 100 \times (22.1 - 20)}{\sqrt{3}} = 2.55 \times 10^{-2}$ ml。由以上三项合成得到 $u(V_R) = \sqrt{(4.08 \times 10^{-2})^2 + (1.53 \times 10^{-2})^2 + (2.55 \times 10^{-2})^2} = 5.05 \times 10^{-2}$ ml,则 $u_{rel}(V_R) = \frac{5.05 \times 10^{-2}}{100} = 5.05 \times 10^{-4}$ 。

2.5.3.7 供试品峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_X)$ 因检测次数较少,故采用极差法^[3]计算供试品峰面积引入的不确定度。当 $n=2$ 时,极差系数 $C=1.13$ 。精密称取 2 份枸橼酸喷托维林片供试品,分别配制成供试品溶液,每份溶液重复进样 2 次。结果见表 1。

表 1 供试品峰面积测定结果($n=2$)				
编号	峰面积 1	峰面积 2	平均值 $\bar{A}$	极差 R
供试品 1	2874416	2876623	2875520	2207
供试品 2	2865842	2868083	2866963	2241

$u_{rel}(A_{X1}) = \frac{R_1}{C \times \bar{A}} = \frac{2\ 207}{1.13 \times 2\ 875\ 520} = 6.79 \times 10^{-4}$, $u_{rel}(A_{X2}) = \frac{R_2}{C \times \bar{A}} = \frac{2\ 241}{1.13 \times 2\ 866\ 963} = 6.92 \times 10^{-4}$, 则 $u_{rel}(A_X) = \sqrt{u_{rel}^2(A_{X1}) + u_{rel}^2(A_{X2})} = 9.69 \times 10^{-4}$ 。

2.5.3.8 供试品平均片重的相对标准不确定度 $u_{rel}(\bar{W})$ 主要有 2 个来源:①天平称量过程引入的测量不确定度分析同“2.5.3.2”项。 $u_1(\bar{W}) = u(W_R) = 4.16 \times 10^{-2}$ mg。②药片重量差异的标准不确定度:按照《中国药典》2010 年版二部附录片剂重量差异检查法^[3],取供试品 20 片,精密称定每片重量,计算平均片重 $\bar{W} = 191.3$ mg,标准偏差 $s(\bar{W}) = 10.1$ mg,则药片重量差异的标准不确定度 $u_2(\bar{W}) = \frac{s(\bar{W})}{\sqrt{n}} = \frac{10.1}{\sqrt{20}} = 2.26$ mg。因此,供试品平均片重的标准不确定度 $u(\bar{W}) = \sqrt{u_1^2(\bar{W}) + u_2^2(\bar{W})} = \sqrt{(4.16 \times 10^{-2})^2 + 2.26^2} = 2.26$,其相对标准不确定度 $u_{rel}(\bar{W}) = \frac{u(\bar{W})}{\bar{W}} = \frac{2.26}{191.3} = 1.18 \times 10^{-2}$ 。

2.5.4 计算合成相对标准不确定度 $u_{c,rel}$ 不确定度各分量的分析结果见表 2。

合成相对标准不确定度 $u_{c,rel} = [u_{rel}^2(P_R) + u_{rel}^2(W_R) + u_{rel}^2(V_R) + u_{rel}^2(A_R) + u_{rel}^2(W_X) + u_{rel}^2(V_X) + u_{rel}^2(A_X) + u_{rel}^2(\bar{W})]^{-2} = 1.23 \times 10^{-2}$

试验测得枸橼酸喷托维林的百分含量 $X = 99.3\%$,则合成标准不确定度为: $u_c(X) = u_{c,rel} \times X = 1.23 \times 10^{-2} \times 99.3\% = 1.2\%$ 。

2.5.5 给出扩展不确定度 U 测量结果符合正态分布,取置信概率为 95%,包含因子 $k=2$,则: $U = k_{uc}(X) = 2 \times 1.2\% = 2.4\%$ 。

2.5.6 测量不确定度报告 HPLC 法测定枸橼酸喷托维林

表 2 相对标准不确定度一览表					
分量	不确定度来源	分布	类型	相对标准不确定度	排序
$u_{rel}(P_R)$	对照品纯度	矩形	B 类	2.89×10^{-4}	8
$u_{rel}(W_R)$	天平示值 称量重复性	矩形 矩形	B 类 B 类	3.19×10^{-3}	2
$u_{rel}(V_R)$	校准 重复性 温度	三角 正态 矩形	B 类 A 类 B 类	5.06×10^{-4}	5
$u_{rel}(A_R)$	色谱峰面积	正态	A 类	6.96×10^{-4}	4
$u_{rel}(W_X)$	天平示值 称量重复性	矩形 矩形	B 类 B 类	2.95×10^{-4}	7
$u_{rel}(V_X)$	校准 重复性 温度	三角 正态 矩形	B 类 A 类 B 类	5.05×10^{-4}	6
$u_{rel}(A_X)$	色谱峰面积	正态	A 类	9.69×10^{-4}	3
$u_{rel}(\bar{W})$	天平示值和 称量重复性 片重差异	矩形 正态	B 类 A 类	1.18×10^{-2}	1

片的含量为 $X = (99.3 \pm 2.4)\%$, $k=2$ 。

3 讨论

不确定度的评定是一份完整的药品检验报告书应包括的内容,任何检验方法都不可避免会引入不确定度。不确定度对检测结果临界值的判断和检验方法的确认具有重要意义。由上述不确定度的分析评定结果可知,HPLC 法测定枸橼酸喷托维林片含量的不确定度主要来自于药片的重量差异,其次是对照品的称取量以及液相色谱峰面积。提示在测定糖衣片的含量时应谨慎对待药片重量差异对测定结果的影响;此外应选用精度符合要求的分析天平称量,不能随意减少取样量,减少操作的随意性和人为因素对检验结果造成不利影响;应定期做好液相色谱仪的计量检定和期间核查工作,使液相色谱仪的技术性能处于良好工作状态,以确保测定结果准确可靠。

参 考 文 献

1 国家质量技术监督局. 测量不确定度评定与表示[M]. 北京:中国质检出版社,2013. 4

2 倪育才. 实用测量不确定度评定[M]. 北京:中国计量出版社,2004. 9

3 中国药典[S]. 2010 年版. 二部. 525

4 国家质量技术监督局. 化学分析测量不确定度评定[S]. 北京:中国计量出版社,2005. 4-9

5 国家质量技术监督局. 化学分析中不确定度的评估指南[S]. 北京:中国计量出版社,2006. 14-38

6 周燕,金佩芬,薛磊冰. HPLC 法测定双黄连胶囊中黄芩苷含量不确定度评定[J]. 中国药师,2011,14(2):221-223

7 屈蓉. HPLC 法测定注射用美洛西林钠含量的不确定度分析[J]. 中国药师,2011,14(4):581-583

8 翁雪萍,黄丹莹. HPLC 法测定保健食品中芦荟苷含量不确定度的评定[J]. 药物分析杂志,2011,31(6):1193-1196

9 Quintela M, Báguena J, Gotor G, et al. Estimation of the uncertainty associated with the results based on the validation of chromatographic analysis procedures: Application to the determination of chlorides by high performance liquid chromatography and of fatty acids by high resolution gas chromatography[J]. J Chromatogr A, 2012, 1223: 107-117

10 国家质量技术监督局. 常用玻璃量器检定规程[S]. 北京:中国计量出版社,2006. 7-8

(2013-10-15 收稿 2013-12-10 修回)