

· 药学研究 ·

HPLC法测定地塞米松磷酸钠注射液含量的不确定度分析

朱静毅, 房克慧

江苏省扬州药品检验所, 扬州 225009

摘要 目的: 建立 HPLC 法测定地塞米松磷酸钠注射液含量的不确定度分析方法。方法: 通过建立 HPLC 含量测定法的数学模型, 找出影响不确定度的因素并对各个不确定度分量进行评估。结果: 计算各变量的不确定度, 由此计算合成不确定度, 最终给出测定结果的扩展不确定度。结论: 测量不确定度可用于对地塞米松磷酸钠含量测定结果的评价, 测量不确定度的评定对于药品检验具有重要意义。

关键词 地塞米松磷酸钠; 含量; HPLC 法; 不确定度

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1673-7806(2008)04-258-04

Uncertainty analysis assay for dexamethasone sodium phosphate injection with HPLC

ZHU Jing-yi FANG Ke-hui

Yangzhou Institution for Drug Control of Jiangsu Province, Yangzhou 225009 China

Abstract **Objective** To establish an uncertainty analysis method for assay of dexamethasone sodium phosphate injection with HPLC. **Methods** A mathematic model was established with HPLC to identify the influence factors impacting uncertainty and each component of uncertainty was also evaluated. **Results** Each component of uncertainty was calculated by analyzing the various variable parameters in the procedure; the combined uncertainty and expanded uncertainty were finally obtained. **Conclusion** The mathematic model of uncertainty was established in this paper is applicable to evaluate the accuracy of assay of dexamethasone sodium phosphate injection. The establishment of the methodology for the evaluation of measurement uncertainty is important in drug control.

Keywords Dexamethasone sodium phosphate; Content; HPLC; Measurement uncertainty

测量不确定度是“表征合理地赋予被测量值的分散性, 与测量结果相关联的参数”, 不确定度越小, 测量结果的质量越高, 使用价值越大。不确定度信息是一个完整的定量分析结果的重要组成部分, 可用于评估定量方法的可靠性和测量结果的准确性, 在药品检验工作中有着非常重要的作用。

本文根据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059-1999)中有关规定, 对 2005 年版《中国药

典》二部 HPLC 法测定地塞米松磷酸钠注射液含量的不确定度进行分析, 找出影响不确定度的因素, 初步建立了适用于评估 HPLC 法测定含量的不确定度方法。

1 仪器与试剂

美国 Waters 2695 高效液相色谱仪; Waters 2996 二极管阵列检测器; Empower 化学工作站; 瑞

士 Mettler 公司 AG 135 型电子分析天平。

地塞米松磷酸钠对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 100016-200011B); 地塞米松磷酸钠注射液 (规格: 1 mL: 5 mg 金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂, 批号: 060905); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯, 水为纯化水。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate™ C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 三乙胺溶液 (取三乙胺 7.5 mL, 加水至 1000 mL, 用磷酸调节 pH 值至 3.0 ± 0.05) - 甲醇 - 乙腈 (55:40:5); 检测波长: 242 nm; 柱温: 27°C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。理论板数按地塞米松磷酸钠峰计算为 7000。地塞米松磷酸钠与地塞米松的分离度应大于 4.0。

2.2 对照品溶液的制备

取地塞米松磷酸钠对照品 12.5 mg 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度。对照品平行称取两份, 分别为 $W_1 = 12.84$ mg, $W_2 = 12.21$ mg。

2.3 供试品溶液的制备

精密量取本品 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 即得。

2.4 测定法

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 按外标法以峰面积计算含量。

3 不确定度的评估

测量不确定度的评估程序主要有以下几个步骤: 确定数学模型; 分析直接测量分量的不确定度来源并计算各分量的合成标准不确定度; 计算最终测量值的合成标准不确定度; 计算扩展不确定度; 正确表示最终测量值结果。按上述几个步骤对本次实验的测量不确定度进行评估。

3.1 建立数学模型

根据测量原理和过程, 含量的计算公式为:

$$Q = C_y / C_{\text{标}} = \frac{C_d A_y}{C_{\text{标}} A_d} \times 100\%$$

$$= \frac{W_d \times \rho_{\text{纯}} / V_d \times A_y \times V_y}{C_{\text{标}} \times A_d} \times 100\%$$

式中各符号分别代表:

Q : 地塞米松磷酸钠注射液标示百分含量; C_y : 地塞米松磷酸钠注射液测定浓度 (mg mL^{-1}); $C_{\text{标}}$: 地塞米松磷酸钠注射液标示浓度 (mg mL^{-1}); C_d : 对照品溶液浓度 (mg mL^{-1}); A_y : 供试品溶液的峰面积; A_d : 对照品溶液的峰面积; W_d : 对照品称量; $\rho_{\text{纯}}$: 对照品的纯度; V_d : 对照品稀释倍数 = 250; V_y : 供试品稀释倍数 = 100。

3.2 识别不确定度来源

见图 1。

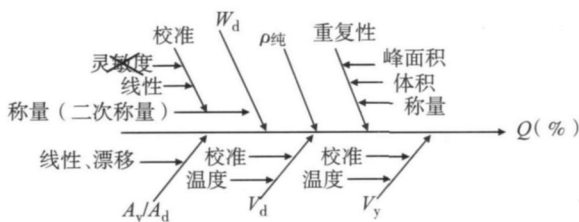


图 1 因果关系图。

Fig 1 Cause and effect diagram.

3.3 不确定度分量的识别

3.3.1 对照品纯度引起的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(\rho)$

属 B 类不确定度。地塞米松磷酸钠对照品由中国药品生物制品检定所提供, 使用前不需干燥处理, 纯度为 91.5%, 由于目前尚未给出不确定度, 暂假定其分散区间的半宽度 $\alpha = 0.25\%$, 按矩形分布 (取包含因子 $k = \sqrt{3}$) 换算:

$$u_{\text{rel}}(\rho) = \frac{0.25\%}{\sqrt{3} \times 91.5\%} = 1.58 \times 10^{-3}$$

3.3.2 对照品称量引起的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(W_d)$

来源有两个:

(1) 天平校准的不确定度: 属 B 类不确定度。该校准操作可能有两个不确定度来源, 其一灵敏度, 减重法两次称量, 每次称量都在同一台天平上进行, 灵敏度带来的不确定度可以忽略不计 (即天平量程范围内的系统漂移将被抵消); 其二校准的线性, 依据说明书, 线性为 ± 0.03 mg, 按矩形分布计算, 则相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(W_1)_1 = \frac{0.03}{\sqrt{3} \times 12.84} = 1.35 \times 10^{-3}$$

$$u_{\text{rel}}(W_2)_1 = \frac{0.03}{\sqrt{3} \times 12.21} = 1.42 \times 10^{-3}$$

(2) 称量的重复性: 说明书中标明, $u(m) = 0.02 \text{ mg}$

$$u_{\text{rel}}(W_1)_2 = \frac{0.02}{12.84} = 1.56 \times 10^{-3}$$

$$u_{\text{rel}}(W_2)_2 = \frac{0.02}{12.21} = 1.64 \times 10^{-3}$$

由于减重称量都是由相对独立的两次称量所得, 即总重称量 (m_{gross}) 扣除净重称量 (m_{tare}), 每一次称重都会受随机变化和天平校准带来的不确定度影响。故:

$$u_{\text{rel}}(W_d) = \sqrt{2 \times u_{\text{rel}}(W_1)_1^2 + 2 \times u_{\text{rel}}(W_2)_1^2 + u_{\text{rel}}(W_1)_2^2 + u_{\text{rel}}(W_2)_2^2} = 3.58 \times 10^{-3}$$

3.3.3 对照品稀释引起的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_d)$ 来源有两个:

(1) 玻璃仪器校准的不确定度: 属 B 类不确定度。根据国家计量检定规程规定, A 级 50 mL 容量瓶的容量允差为 $\pm 0.05 \text{ mL}$, A 级 10 mL 移液管的容量允差为 $\pm 0.04 \text{ mL}$, 按三角分布, 取包含因子 $k = \sqrt{6}$ 则对照品稀释定容的相对不确定度:

$$u_1(V_d) = \sqrt{4 \left(\frac{0.05}{50 \times \sqrt{6}} \right)^2 + \left(\frac{0.04}{10 \times \sqrt{6}} \right)^2} = 1.83 \times 10^{-3}$$

(2) 配置溶液时的室温与量瓶和移液管的校正温度不同产生的不确定度: 属 B 类不确定度。在实验中测定温度 $T_1 = 22^\circ\text{C}$, 玻璃仪器校正温度 $T_0 = 20^\circ\text{C}$, 查得甲醇和玻璃体积膨胀系数 (α) 为 1.19×10^{-3} 和 1.5×10^{-5} , 则 $\Delta V = V_1 - V_{20} = (\alpha_{\text{甲醇}} - \alpha_{\text{玻璃}}) \times V \times (T_1 - T_{20})$ 。按矩形分布, 由温度引起的相对标准不确定度为

$$u_2(V_d) = \sqrt{4 \times \left(\frac{\Delta V_{50}}{50 \times \sqrt{3}} \right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{10}}{10 \times \sqrt{3}} \right)^2} = 3.03 \times 10^{-3}$$

对照品稀释引起的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(V_d) = \sqrt{u_1^2(V_d) + u_2^2(V_d)} = 3.54 \times 10^{-3}$$

3.3.4 对照品溶液色谱峰面积的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(A_d)$

$u(A_i)$ 的不确定度主要由峰面积重复性与仪器环境、进样体积等其它因素的不确定度共同引起。峰面积重复性属 A 类不确定度, 可通过重复进样测定而得; 仪器环境、进样体积等其它因素引

起的不确定度属 B 类不确定度, 由于对照品和供试品采用相同的进样体积, 且峰面积是在相同条件下测得, 所以此项可以忽略不计。

通过测量对照品溶液 5 次的峰面积, 得 $\bar{A} = 1600345$, 按贝赛尔公式计算:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (A_r - \bar{A})^2}{5 - 1}} = 2.027, \text{ 则相对不确定度为:}$$

$$u_{\text{rel}}(A_d) = \frac{s}{\bar{A}} = 1.27 \times 10^{-3}$$

3.3.5 供试品溶液稀释引起的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_y)$ 不确定度分析同“3.3.3”。

(1) 玻璃仪器校准的不确定度: A 级 100 mL 容量瓶的容量允差为 $\pm 0.10 \text{ mL}$, A 级 1 mL 移液管的容量允差为 $\pm 0.007 \text{ mL}$, 则供试品稀释定容的相对不确定度:

$$u_1(V_y) = \sqrt{2 \left(\frac{0.10}{100 \times \sqrt{6}} \right)^2 + \left(\frac{0.007}{1 \times \sqrt{6}} \right)^2} = 2.92 \times 10^{-3}$$

(2) 配置溶液时的室温与量瓶和移液管的校正温度不同产生的不确定度:

$$u_2(V_y) = \sqrt{2 \left(\frac{\Delta V_{100}}{100 \times \sqrt{3}} \right)^2 + \left(\frac{\Delta V_1}{1 \times \sqrt{3}} \right)^2} = 2.35 \times 10^{-3}$$

供试品稀释引起的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(V_y) = \sqrt{u_1^2(V_y) + u_2^2(V_y)} = 3.75 \times 10^{-3}$$

3.3.6 供试品溶液色谱峰面积的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(A_y)$ 供试品溶液的色谱峰面积 (S) 采用双样两平行进行测定, 测定的结果用极差法 $\mu = \frac{R}{C \times S}$ 计算, 记录双样测量峰面积为: 1571700, 1569290, 1588373, 1590917, 因此:

$$S_1 = \frac{1571700 + 1569290}{2} = 1570495, R_1 = 2410$$

$$S_2 = \frac{1588373 + 1590917}{2} = 1589645, R_2 = 2544$$

取 $n = 2$ 时极差系数 $C = 1.13$, 则相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(A_y) = \sqrt{u_1(A_y)^2 + u_2(A_y)^2} = \sqrt{\left(\frac{2410}{1.13 \times 1570495} \right)^2 + \left(\frac{2544}{1.13 \times 1589645} \right)^2} = 1.96 \times 10^{-3}$$

计算出的平均含量为 93.6%。

3.4 合成相对标准不确定度 $u_c(Y)$

当被测定的量 Y 是若干个直接测量 X_1, X_2, \dots, X_n 的函数, 且 X_i 与 X_j 函数互相独立时, 合成标准不

$$u_c(Y) = \sqrt{u_{rel}^2(\rho) + u_{rel}^2(W_d) + u_{rel}^2(V_d) + u_{rel}^2(A_d) + u_{rel}^2(V_y) + u_{rel}^2(A_y)}$$

$$= \sqrt{(1.58 \times 10^{-3})^2 + (3.58 \times 10^{-3})^2 + (3.54 \times 10^{-3})^2 + (1.27 \times 10^{-3})^2 + (3.75 \times 10^{-3})^2 + (1.96 \times 10^{-3})^2}$$

$$= 6.88 \times 10^{-3}$$

合成标准不确定度为: $u_c(Y) = 6.88 \times 10^{-3} \times 93\% = 0.64\%$

3.5 扩展不确定度 $u(Y)$

扩展不确定度是用合成不确定度的倍数来表示的, 即 $u(Y) = ku$, k 通常为 2 或 3, 取决于测量的重要性、效益和风险。本实验结果的扩展不确定度取包含因子 $k = 2$ (置信概率为 95%), 则含量测定扩展不确定度为 $u(Y) = 2 \times 0.64\% = 1.3\%$, 含量测定结果可表示为 $Y \pm u(Y) = 93.6\% \pm 1.3\%$ 。

4 讨论

4.1 在评估总不确定度时, 须分析不确定度的每一个来源并分别处理, 以确定其对总不确定度的贡献。本品测定过程分析中, 影响测量不确定度结果的 6 个因素, 见表 1。

表 1 各分量所占比例
Table 1 The percent of factors

相对标准不确定度分量	相对标准不确定度 u	u^2	u^2 所占百分比 (%)
对照品纯度 $u_{rel}(\rho)$	1.58×10^{-3}	2.496×10^{-6}	5.3
对照品称量 $u_{rel}(W_d)$	3.58×10^{-3}	1.282×10^{-5}	27.1
对照品稀释 $u_{rel}(V_d)$	3.54×10^{-3}	1.253×10^{-5}	26.5
对照品溶液色谱峰面积 $u_{rel}(A_d)$	1.27×10^{-3}	1.613×10^{-6}	3.4
供试品溶液稀释 $u_{rel}(V_y)$	3.75×10^{-3}	1.406×10^{-5}	29.7
供试品溶液色谱峰面积 $u_{rel}(A_y)$	1.96×10^{-3}	3.842×10^{-6}	8.1

由表 1 可以看出, 称量和稀释引起的不确定度分量对含量测定的影响最大, 而对照品的纯度和色谱峰峰面积等因素对合成不确定度的贡献均不显著。因此应定期对实验仪器检定和维护, 保持稳定的状态, 加强实验过程的控制以及标准操作训练, 以减少随机变化和人为因素对实验结果的影响。

4.2 由于液体样品本身的均匀性较好, 且取样时为 10 瓶混合后量取, 因此样品非均匀性引入的不

确定度的传播公式为: $u_c^2(Y) = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial Y}{\partial X_i}\right)^2 \times u_c^2(X_i)$,

则可推导出本方法的合成相对标准不确定度为:

确定度可忽略不计。

4.3 目前在药品检验工作中通常在以下几个方面给测量不确定度提出要求: 一是客户提出要求时检验机构应提供测量不确定度; 二是出现边缘值时应确定测量不确定度。在检验过程中, 通常要对检验结果是否符合标准 (如药典标准) 规定作出判断 (见表 2)。当检测结果向上 (或向下) 扩展不确定度半宽度后, 其结果仍在规定的限度之内, 则符合要求, 如表 2 之 A 批; 当向上 (或向下) 扩展不确定度半宽度后, 其结果仍超出下限 (或上限), 则不符合要求, 如表 2 之 D 批。所以当检验结果恰好是标准要求的极限值时, 应充分考虑测量不确定度的影响。出现此种情况时, 除非样品很少, 都应进行重试。当必须做出合格或不合格的判定时, 虽然以实际测得值来判定, 但在给定结果时应注明其不确定度, 如表 2 之 B 批和表 2 之 C 批。

表 2 含量测定结果的不确定度
Table 2 Uncertainty of the assay results

批号 (Lot No)	Y (%)	$u_c(Y)$ (%)	$u(Y)$ (%)	$Y \pm u(Y)$ (%)	结果判定 (Result Determination)
A 060905	93.6	0.64	1.3	93.6 ± 1.3	符合规定
B 061024	90.4	0.62	1.3	90.4 ± 1.3	符合规定
C 060711	89.0	0.60	1.2	89.0 ± 1.2	不符合规定
D 060517	83.7	0.58	1.2	83.7 ± 1.2	不符合规定

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 186

[2] 国家质量技术监督局. JJF 1059-1999 测量不确定度评定与表示 [M]. 北京: 中国计量出版社, 1999

[3] 中国实验室国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2002

[4] 张河战. 测量不确定度及其在药品检验中的应用简介 [J]. 中国药师, 2004, 7(12): 969-971.

(收稿日期: 2008-04-15)