

HPLC法测定赖诺普利片含量及含量均匀度的不确定度评定

谢琼玉*(汕头市药品检验所,广东 汕头 515041)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)40-3827-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.40.29

摘要 目的:建立测定赖诺普利片含量及含量均匀度的不确定度的评定方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法测定赖诺普利片中主药的含量和含量均匀度,并建立评定其不确定度的数学模型,确定影响不确定度的因素并对各个不确定度因素进行评估。结果:置信概率为95%时,两种规格的赖诺普利片含量及含量均匀度测定的扩展不确定度分别为0.4%、0.5%和1.5%、2.5%。结论:该方法适用于HPLC法测定赖诺普利片含量及含量均匀度的不确定度评定。

关键词 赖诺普利片;高效液相色谱法;含量;含量均匀度;不确定度;评定

Evaluation of Uncertainty for the Determination of Lisinopril Tablets and Content Uniformity by HPLC

XIE Qiong-yu(Shantou Institute for Drug Control, Guangdong Shantou 515041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the uncertainty evaluation for the determination of Lisinopril tablets and content uniformity by HPLC. METHODS: HPLC was adopted for the determination of the content and content uniformity of Lisinopril tablets and mathematical model was established for the evaluation of uncertainty to identify influential factors of uncertainty and evaluate the uncertainty factors. RESULTS: The expanded uncertainty for determination of content and content uniformity of Lisinopril tablets with two specifications were 0.4%, 0.5% and 1.5%, 2.5%, respectively ($P=95\%$). CONCLUSIONS: The method is suitable for the uncertainty evaluation of HPLC determination of content and content uniformity of Lisinopril tablets.

KEY WORDS Lisinopril tablets; HPLC; Content; Content uniformity; Uncertainty; Evaluation

在实验工作中,报告测量结果不仅要给出测定的量值是多少,还应给出以数量表示的该值的分散程度,它是测量质量的指标,用于判断该测定值的可靠程度。过去习惯用误差、准确度概念来描述测量的准确程度,从1995年开始国际上正式使用不确定度来表达测量结果的分散程度。赖诺普利片为《中国药典》2010年版(二部)新增补的品种^[1],其标示量规格有5、10、20 mg 3种。根据《中国药典》要求,除另有规定外,片剂每片标示量不大于25 mg的应检查含量均匀度;且赖诺普利片的含量和含量均匀度的测定按标准均采用高效液相色谱(HPLC)法。因此,本次笔者根据《测量不确定度评定与表示》、《化学分析中不确定度的评估指南》、《中国药典》2010年版(二部)及相关的文献^[2-7],对生产企业送检的2种规格(5、10 mg)赖诺普利片的含量及含量均匀度测定结果进行不确定度评定,以评估影响不确定度的因素及其各个不确定度分量对测定结果的影响大小,建立适用于HPLC法测定该药含量及含量均匀度的不确定度评定的方法。

1 材料

LC-20A HPLC仪,包括Prominence SPD-M20A PDA检测器及LCsolution工作站等(日本岛津公司);XS205DU电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司, $d=0.01$ mg)。

赖诺普利对照品(中国食品药品检定研究院提供,批号:100814-200701,质量分数:91.2%);赖诺普利片(汕头金石制药总厂生产,样品1的规格:5 mg,批号:110102;样品2的规格:10 mg,批号:110103);乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,实验用水为纯化水。

2 试验方法

2.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱:Accurasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:磷酸盐缓冲液(0.02 mol/L磷酸二氢钠溶液,用氢氧化钠试液调节pH至5.0)-乙腈(92:8, V/V);检测波长:215 nm;流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl;柱温:30 ℃。在上述色谱条件下,赖诺普利峰与2-氨基-4-苯基丁酸峰的分离度大于3.0,理论板数按

分表告依春在大鼠体内的药代动力学[J].中国药科大学学报,2006,37(6):519.

[6] 王瑞,杨海英,杨琪伟,等.板蓝根的质量标准研究[J].中草药,2010,41(3):478.

[7] 安益强,贾晓斌,袁海建,等.HPLC测定板蓝根药材及其制剂中表告依春的含量[J].中国中药杂志,2008,33(18):2074.

[8] 安益强,贾晓斌,陈彦,等.RP-HPLC测定不同厂家板蓝根颗粒中表告依春的含量[J].中华中医药杂志,2009,24(4):529.

[9] 莫迎.不同的提取方法对板蓝根中(R,S)-告依春的影响[J].中医药导报,2011,17(6):89.

[10] 范春芳,张枚.高效液相色谱法测定板蓝根颗粒中表告依春的含量[J].武警后勤学院学报:医学版,2012,21(5):346.

*主管药师。研究方向:药品质量标准及药物检验技术。电话:0754-88391242。E-mail:18923663166@189.cn

(收稿日期:2013-01-17 修回日期:2013-05-27)

赖诺普利峰计算均大于2000。

2.2 溶液的制备

精密称取赖诺普利对照品0.011 60、0.011 55 g(约相当于赖诺普利无水物10 mg),分别置于50 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,制备成每1 ml约含赖诺普利0.2 mg的对照品溶液。

取样品1、2各20片,精密称定,分别为1.697 4、1.748 9 g,研细,各精密称取两份,分别为0.330 8、0.330 1 g和0.170 3、0.171 3 g(约相当于赖诺普利无水物20 mg),分别置于100 ml量瓶中,加水适量,振摇使赖诺普利溶解,并加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为含量测定用供试品溶液。

取样品1、2各1片,样品1置于25 ml量瓶中,样品2置于50 ml量瓶中,分别加水适量振摇使其中的赖诺普利溶解,并加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为含量均匀度测定用供试品溶液。

2.3 样品测定

分别精密量取上述溶液各20 μl,注入HPLC仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算其含量与含量均匀度。

3 不确定度评定方法与结果

3.1 建立数学模型

按《中国药典》规定,赖诺普利片含量测定的计算公式为:

$$S_1 = \frac{f \times A_1}{C_1} = \frac{f \times A_1 \times M}{m_1 \times \frac{m_{\text{标}}}{V_1}} \times 100\% \quad \text{公式1}$$

$$\text{其中 } C_1 = \frac{m_1 \times m_{\text{标}}}{M \times V_1}$$

含量均匀度测定的计算公式为:

$$S_2 = \frac{f \times A_2}{C_2} = \frac{f \times A_2}{\frac{m_{\text{标}}}{V_2}} \times 100\% \quad \text{公式2}$$

$$\text{其中 } C_2 = \frac{m_{\text{标}}}{V_2}$$

式中, M :平均片重; m_1 :供试品称样量; $m_{\text{标}}$:每片规格标示量; V_1 :含量测定中供试品溶液的稀释体积; V_2 :含量均匀度测定中供试品溶液的稀释体积; A_1 :含量测定供试品溶液中赖诺普利的色谱峰面积; A_2 :含量均匀度测定供试品溶液中赖诺普利的色谱峰面积; f :HPLC法校正系数。则:

$$f = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{C_{\text{对}}}{A_i} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{A_i} \times \frac{m_{\text{对}}}{V_{\text{对}}} \quad \text{公式3}$$

$$\text{其中 } C_{\text{对}} = \frac{m_{\text{对}}}{V_{\text{对}}}$$

式中: $m_{\text{对}}$:对照品取样量; $V_{\text{对}}$:对照品溶液的稀释体积; A_i :对照品溶液中赖诺普利的色谱峰面积。

3.2 各分量的不确定度分析

根据含量及含量均匀度的计算公式1、2,分析每一测定步骤的影响因素,绘制因果关系图^[6],如图1所示。

3.3 测量不确定度来源的量化

3.3.1 对照品引起的不确定度 赖诺普利对照品溶液浓度的不确定度 $u(C_{\text{对}})$ 和对照品溶液色谱峰面积的不确定度 $u(A_{\text{对}})$ 是HPLC法校正系数 f 的不确定度来源。

(1)对照品溶液浓度的不确定度 $u(C_{\text{对}})$ 。赖诺普利对照品纯度的相对标准不确定度属于B类不确定度。按照赖诺普利对照品的说明书标示,纯度(质量分数)为91.2%,使用前不需

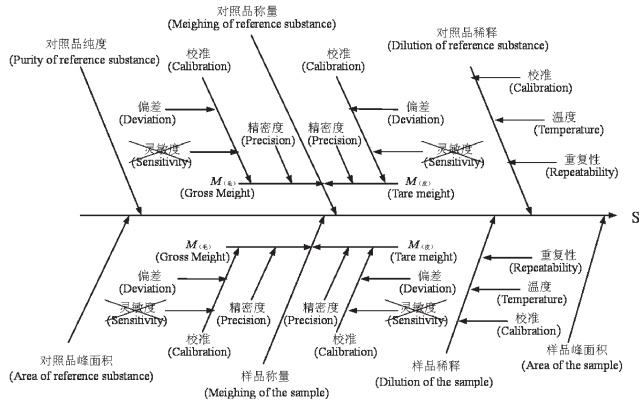


图1 因果关系图

Fig 1 Cause and effect diagram

要干燥,对照品说明书未给出不确定度,假定其分布区间为 $\pm 0.05\%$,按矩形分布换算,对照品纯度的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(p_{\text{对}}) = 0.05\% / \sqrt{3} / 0.912 = 3.17 \times 10^{-4}$ 。

对照品称量的相对标准不确定度来源于天平校准和重复称样的不确定度,均属B类不确定度。天平校准主要受灵敏度和读数误差的不确定度影响,由于天平校准称量时采用减差称量法,故灵敏度可忽视。本试验所用电子天平检定证书给出的最大允差 $\Delta m = 0.02 \text{ mg}$,属于B类不确定度。按矩形分布,取包含因子 $k = \sqrt{3}$,其相对标准不确定度为: $0.02 / \sqrt{3} = 0.011 5 \text{ mg}$ 。天平称量重复性的不确定度方面,由于所用电子天平检定证书列出的重复性误差为 0.0 mg ,故其标准不确定度为0。由于对照品和样品的称量均采用减差称量法,因此天平的标准不确定度为^[7]: $\sqrt{2 \times 0.011 5^2} = 0.016 3 \text{ mg}$,则对照品称样的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m_{\text{对}}) = \sqrt{(0.016 3 / 11.60)^2 + (0.016 3 / 11.55)^2} = 1.99 \times 10^{-3}$ 。

对照品溶液稀释的不确定度是由50 ml容量瓶引入的。玻璃仪器的不确定度包括校准、精密度和温度三方面的影响。A级50 ml量瓶的容量允差为 $\pm 0.05 \text{ ml}^{[8]}$,假设为三角分布,取包含因子 $k = \sqrt{6}$,则其相对标准不确定度 $u_{\text{rel}} = 0.05 / \sqrt{6} / 50 = 4.08 \times 10^{-4}$ 。

50 ml量瓶体积重复性不确定度^[9]为A类不确定度。用称量法对50 ml量瓶的体积进行重复性评估,重复10次操作,结果分别为49.854 2、49.851 2、49.851 7、49.849 9、49.850 2、49.851 4、49.852 2、49.851 9、49.850 9、49.852 9 g,按贝塞尔公式^[10]计算得到标准偏差为0.001 3 ml,则其相对标准不确定度 $u_{\text{rel}} = 0.001 3 / 50 = 2.60 \times 10^{-5}$ 。

此外,还有温度引起的不确定度。由于实验室温度与玻璃仪器校准时温度不同引起体积差异而引入的不确定度为B类不确定度。纯水的体积膨胀系数($2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$)比玻璃的体积膨胀系数($2.5 \times 10^{-5} / ^\circ\text{C}$)明显要大^[8],故忽略后者。设定实验中温度变化为 $\pm 2 ^\circ\text{C}$,按矩形分布,取包含因子 $k = \sqrt{3}$,其相对标准不确定度 $u_{\text{rel}} = (2 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 50 / \sqrt{3}) / 50 = 2.42 \times 10^{-4}$ 。因此,对照品稀释过程的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{\text{对}}) = \sqrt{(4.08 \times 10^{-4})^2 + (2.60 \times 10^{-5})^2 + (2.42 \times 10^{-4})^2} = 4.75 \times 10^{-4}$;则对照品浓度的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_{\text{对}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(m_{\text{对}}) + u_{\text{rel}}^2(V_{\text{对}}) + u_{\text{rel}}^2(p_{\text{对}})} = \sqrt{(1.99 \times 10^{-3})^2 + (4.75 \times 10^{-4})^2 + (3.17 \times 10^{-4})^2} = 2.07 \times 10^{-3}$ 。

(2)对照品溶液色谱峰面积的不确定度 $u(A_{\text{对}})$ 。 $u(A_{\text{对}})$ 的

不确定度主要由 HPLC 仪进样的重复性引起^[7],由仪器测出的峰面积标准偏差属于 A 类不确定度。精密称取的两份对照品所制备的对照品溶液各进样 3 次,峰面积分别为 6 247 103、6 248 769、6 248 924 和 6 149 086、6 150 396、6 149 331。用极差法分别计算其标准不确定度^[10];当 $n=3$ 时,极差系数 $C=1.69$ 。峰面积平均值 $\bar{A}_1=6\ 248\ 265$, $\bar{A}_2=6\ 149\ 604$,极差 $R_1=1\ 821$, $R_2=1\ 310$,标准不确定度 $S_1=R_1/C=1\ 077.5$, $S_2=R_2/C=775.1$;则其相对标准不确定度 $u(A_{对1})=S_1/\bar{A}_1=1.72\times 10^{-4}$, $u(A_{对2})=S_2/\bar{A}_2=1.26\times 10^{-4}$,故对照品峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_{对})=\sqrt{u^2(A_{对1})+u^2(A_{对2})}=2.13\times 10^{-4}$ 。因此,校正因子 f 的相对标准不确定度 $u_{rel}(f)=\sqrt{u_{rel}^2(C_{对})+u_{rel}^2(A_{对})}=\sqrt{(2.07\times 10^{-3})^2+(2.13\times 10^{-4})^2}=2.08\times 10^{-3}$ 。

3.3.2 供试品含量测定的不确定度 $u(S_1)$ 供试品含量测定的不确定度主要包括供试品溶液浓度的不确定度 $u(C_1)$ 和供试品溶液峰面积的不确定度 $u(A_1)$ 。

(1) 供试品溶液浓度的不确定度 $u(C_1)$ 。 $u(C_1)$ 由供试品取样引起的不确定度 $u(m_1)$ 和供试品溶液稀释引起的不确定度 $u(V_1)$ 组成。其中 $u(m_1)$ 由平均片重和称样引起的不确定度组成。参见“3.3.1(1)”所述,所用电子天平的标准不确定度为 0.016 3 mg。因此,样品 1 的平均片重及其取样的相对标准不确定度 $u_{rel}(M)=0.016\ 3/1\ 697.4=9.60\times 10^{-6}$, $u_{rel}(m_1)=\sqrt{(0.016\ 3/330.8)^2+(0.016\ 3/330.1)^2}=6.98\times 10^{-5}$;样品 2 的平均片重及其取样的相对标准不确定度 $u_{rel}(M)=0.016\ 3/1\ 748.9=9.32\times 10^{-6}$, $u_{rel}(m_1)=\sqrt{(0.016\ 3/170.3)^2+(0.016\ 3/171.3)^2}=1.35\times 10^{-4}$ 。

含量测定中供试品溶液稀释引起的不确定度是由 100 ml 量瓶引入。A 级 100 ml 量瓶的容量允差为 ± 0.10 ml^[8],其相对标准不确定度 $u_{rel}=0.10/\sqrt{6}/100=4.08\times 10^{-4}$ 。用称量法进行重复性评估,重复 10 次操作,结果分别为 99.704 5、99.705 5、99.709 2、99.702 4、99.707 6、99.706 7、99.710 1、99.701 1、99.702 9、99.701 3 g,按贝塞尔公式^[10]计算得出的标准偏差为 0.003 2 ml,则其相对标准不确定度 $u_{rel}=0.003\ 2/100=3.2\times 10^{-5}$ 。参见“3.3.1(1)”所述,温度引起的相对标准不确定度 $u_{rel}=(2\times 2.1\times 10^{-4}\times 100/\sqrt{3})/100=2.42\times 10^{-4}$ 。故含量测定中供试品溶液稀释过程的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_1)=\sqrt{(4.08\times 10^{-4})^2+(3.2\times 10^{-5})^2+(2.42\times 10^{-4})^2}=4.75\times 10^{-4}$ 。因此,样品 1 含量测定中供试品溶液浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_1)=\sqrt{u_{rel}^2(m_1)+u_{rel}^2(V_1)+u_{rel}^2(M)}=\sqrt{(6.98\times 10^{-5})^2+(4.75\times 10^{-4})^2+(9.60\times 10^{-6})^2}=4.80\times 10^{-4}$;样品 2 含量测定中供试品溶液浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_1)=\sqrt{u_{rel}^2(m_1)+u_{rel}^2(V_1)+u_{rel}^2(M)}=\sqrt{(1.35\times 10^{-4})^2+(4.75\times 10^{-4})^2+(9.32\times 10^{-6})^2}=4.94\times 10^{-4}$ 。

(2) 供试品溶液峰面积的不确定度 $u(A_1)$ ^[7]。精密称取的两份样品所制备的供试品溶液分别进样 2 次,样品 1 峰面积结果分别为 5 725 369、5 722 127 和 5 704 306、5 704 576,用极差法分别计算其标准不确定度^[10];当 $n=2$ 时,极差系数 $C=1.13$ 。峰面积平均值 $\bar{A}_{01}=5\ 723\ 748$, $\bar{A}_{02}=5\ 704\ 441$,极差 $R_{01}=3\ 242$, $R_{02}=270$,标准不确定度 $S_{01}=R_{01}/C=2\ 869.0$, $S_{02}=R_{02}/C=238.9$;则相对标准不确定度 $u(A_{01})=S_{01}/\bar{A}_{01}=5.01\times 10^{-4}$, $u(A_{02})=S_{02}/\bar{A}_{02}=4.19\times 10^{-5}$,故样品 1 峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_1)=\sqrt{u^2(A_{01})+u^2(A_{02})}=5.03\times 10^{-4}$ 。样品 2 峰面积为 5 669 808、5 678 435 和 5 751 101、5 744 402。如上所述,用极

差法分别计算其标准不确定度 $S_{01}=R_{01}/C=7\ 634.5$, $S_{02}=R_{02}/C=5\ 928.3$;则相对标准不确定度 $u(A_{01})=S_{01}/\bar{A}_{01}=1.35\times 10^{-3}$, $u(A_{02})=S_{02}/\bar{A}_{02}=1.03\times 10^{-3}$,故样品 2 峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_1)=\sqrt{u^2(A_{01})+u^2(A_{02})}=1.70\times 10^{-3}$ 。由公式 1 计算得样品 1 和样品 2 的平均标示百分含量为 100.0% 和 99.6%。

3.3.3 供试品含量均匀度测定的不确定度 $u(S_2)$ 供试品含量均匀度测定的不确定度主要包括其供试品溶液浓度的不确定度 $u(C_2)$ 和供试品溶液峰面积的不确定度 $u(A_2)$ 。

(1) 供试品溶液浓度不确定度 $u(C_2)$ 。 $u(C_2)$ 由供试品取样的不确定度 $u(m_2)$ 和供试品溶液稀释引起的不确定度 $u(V_2)$ 所组成。测定含量均匀度时不需要称样,按《中国药典》方法操作,取 1 片加水使溶解并定容至刻度,摇匀,滤过后取续滤液直接进样。因此,供试品取样量的不确定度只取决于重量差异^[2],即 $u(m_2)=u(M)$ 。参见“3.3.2(1)”所述,则样品 1 取样的相对标准不确定度 $u(m_2)=9.60\times 10^{-6}$;样品 2 取样的相对标准不确定度 $u(m_2)=9.32\times 10^{-6}$ 。

按《中国药典》方法操作,赖诺普利片含量均匀度项下,样品的稀释为“取 1 片,置 25 ml(5 mg 规格)或 50 ml(10 mg 规格)量瓶中,加水适量溶解并稀释至刻度,滤过,续滤液作为供试品溶液”。则样品 1 供试品溶液稀释引起的不确定度由 25 ml 量瓶引入。A 级 25 ml 量瓶的容量允差为 ± 0.03 ml^[8],其相对标准不确定度 $u_{rel}=0.03/\sqrt{6}/25=4.90\times 10^{-4}$ 。用称量法进行重复性评估,重复 10 次操作,结果分别为 24.925 6、24.920 1、24.922 3、24.921 9、24.926 0、24.924 4、24.926 3、24.920 9、24.923 7、24.923 8 g,按贝塞尔公式^[10]计算得到标准偏差为 0.002 2 ml,则其相对标准不确定度 $u_{rel}=0.002\ 2/25=8.8\times 10^{-5}$ 。参见“3.3.1(1)”所述,温度引起的相对标准不确定度 $u_{rel}=(2\times 2.1\times 10^{-4}\times 25/\sqrt{3})/25=2.42\times 10^{-4}$ 。故样品 1 含量均匀度测定中由溶液稀释引起的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_2)=\sqrt{(4.90\times 10^{-4})^2+(8.8\times 10^{-5})^2+(2.42\times 10^{-4})^2}=5.54\times 10^{-4}$ 。同理,样品 2 供试品溶液稀释引起的不确定度由 50 ml 量瓶引入。如前所述,样品 2 含量均匀度测定中由溶液稀释引起的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_2)=\sqrt{(4.08\times 10^{-4})^2+(2.6\times 10^{-5})^2+(2.42\times 10^{-4})^2}=4.75\times 10^{-4}$ 。因此,样品 1 含量均匀度测定中供试品溶液浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_2)=\sqrt{u_{rel}^2(m_2)+u_{rel}^2(V_2)}=\sqrt{(9.60\times 10^{-6})^2+(5.54\times 10^{-4})^2}=5.54\times 10^{-4}$;样品 2 含量均匀度测定中供试品溶液浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_2)=\sqrt{u_{rel}^2(m_2)+u_{rel}^2(V_2)}=\sqrt{(9.32\times 10^{-6})^2+(4.75\times 10^{-4})^2}=4.75\times 10^{-4}$ 。

(2) 供试品溶液色谱峰面积的不确定度 $u(A_2)$ 。测定含量均匀度时,取 10 片样品依法操作制备供试品溶液,各进样 1 次,则样品 1 峰面积结果分别为 5 848 924、5 819 629、5 892 988、5 842 291、5 881 702、5 875 266、5 788 529、5 881 303、5 939 558、5 888 769,平均峰面积 $\bar{A}=5\ 865\ 896$;按贝塞尔公式^[10]计算得到供试品溶液峰面积测量的标准不确定度 $s=\sqrt{\frac{\sum(A_i-\bar{A})^2}{n-1}}=42\ 465$,则其相对标准不确定度 $u(A_2)=s/\bar{A}=7.24\times 10^{-3}$ 。同时,计算出样品 1 含量均匀度测定的平均标示百分含量为 99.9%。同法操作,样品 2 的峰面积结果分别为 5 732 584、5 747 876、5 906 382、5 840 452、5 778 520、5 865 198、5 884 659、5 704 848、5 898 952、5 780 300,平均峰面积 $\bar{A}=5\ 813\ 977$;按贝塞尔公式^[10]计算得到供试品溶液峰面积测量的标准不确定度 $s=$

$\sqrt{\frac{\sum(A_i - \bar{A})^2}{n-1}} = 74.068$, 则其相对标准不确定度 $u(A_2) s/\bar{A} = 1.27 \times 10^{-2}$ 。同时, 计算出样品 2 含量均匀度测定的平均标示百分含量为 99.0%。

3.4 合成标准不确定度

合成标准不确定度由 HPLC 法的校正因子 f 的不确定度 $u(f)$ 、供试品溶液浓度的不确定度 $u(C_1)$ 和供试品溶液色谱峰面积的不确定度 $u(A_1)$ 合成。

3.4.1 含量测定的合成相对标准不确定度 含量测定的合成相对标准不确定度 $u_{rel}(S_1) = \sqrt{u_{rel}^2(f) + u_{rel}^2(C_1) + u_{rel}^2(A_1)}$ 。则样品 1 含量测定的合成相对标准不确定度 $u_{rel}(S_1) = \sqrt{(2.08 \times 10^{-3})^2 + (4.80 \times 10^{-4})^2 + (5.03 \times 10^{-4})^2} = 2.19 \times 10^{-3}$; 其测定结果的合成标准不确定度 $u_c(S_1) = 2.19 \times 10^{-3} \times 100.0\% = 0.22\%$ 。样品 2 含量测定的合成相对标准不确定度 $u_{rel}(S_1) = \sqrt{(2.08 \times 10^{-3})^2 + (4.94 \times 10^{-4})^2 + (1.70 \times 10^{-3})^2} = 2.73 \times 10^{-3}$; 其测定结果的合成标准不确定度 $u_c(S_1) = 2.73 \times 10^{-3} \times 99.6\% = 0.27\%$ 。

3.4.2 含量均匀度测定的合成相对标准不确定度 含量均匀度测定的合成相对标准不确定度 $u_{rel}(S_2) = \sqrt{u_{rel}^2(f) + u_{rel}^2(C_2) + u_{rel}^2(A_2)}$ 。则样品 1 含量均匀度测定的合成相对标准不确定度 $u_{rel}(S_2) = \sqrt{(2.08 \times 10^{-3})^2 + (5.54 \times 10^{-4})^2 + (7.24 \times 10^{-3})^2} = 7.55 \times 10^{-3}$; 其测定结果的合成标准不确定度 $u_c(S_2) = 7.55 \times 10^{-3} \times 99.9\% = 0.75\%$ 。样品 2 含量均匀度测定的合成相对标准不确定度 $u_{rel}(S_2) = \sqrt{(2.08 \times 10^{-3})^2 + (4.75 \times 10^{-4})^2 + (1.27 \times 10^{-2})^2} = 1.29 \times 10^{-2}$; 其测定结果的合成标准不确定度 $u_c(S_2) = 1.31 \times 10^{-2} \times 99.0\% = 1.27\%$ 。

3.5 扩展不确定度及结果表述

取包含因子 $K=2$ (置信概率为 95%), 则两种规格的样品含量测定的扩展不确定度及其结果为: $U = ku_c(S_1)$, 即样品 1 扩展不确定度 $U = 2 \times 0.22\% = 0.4\%$, 含量 $S_1 = (100.0 \pm 0.4)\%$ [$k=2$ (95% 置信区间)]; 样品 2 扩展不确定度 $U = 2 \times 0.27\% = 0.5\%$, 含量 $S_1 = (99.6 \pm 0.5)\%$ [$k=2$ (95% 置信区间)]。

同理, 两种规格样品含量均匀度测定的扩展不确定度及其结果为: $U = ku_c(S_2)$, 即样品 1 扩展不确定度 $U = 0.75\% \times 2 = 1.5\%$, 含量 $S_2 = (99.9 \pm 1.5)\%$ [$k=2$ (95% 置信区间)]; 样品 2 扩展不确定度 $U = 1.27\% \times 2 = 2.5\%$, 含量 $S_2 = (99.0 \pm 2.5)\%$ [$k=2$ (95% 置信区间)]。

3.6 不确定度各分量的分析

以样品 1 (5 mg) 含量及含量均匀度测定结果的不确定度评定结果为例, 分析其不确定度各分量及贡献率, 详见表 1 和表 2。

由表 1、表 2 可看出, 含量测定中对照品称量引起的不确定度分量对结果的影响最大, 其他因素对合成不确定度的贡献均不显著。而含量均匀度测定中供试品溶液色谱峰面积的不确定度对合成不确定度的贡献起决定作用。

4 讨论

在赖诺普利片含量测定中, 对照品称量带入的不确定度分量影响最大, 这是由于实验室日常操作中对对照品的取样量都比较小, 通常是 10~25 mg, 因此其称量准确性的误差比较明显, 如果适当地增大对照品的取样量, 即对测量结果有较大影响的不确定度分量能得到相对控制, 可以得到较可靠的结

表 1 含量测定的不确定度分量及其贡献率

Tab 1 The uncertainty item and contribution ratio of content determination

不确定度分量	不确定度来源	相对标准不确定度	不确定度贡献率, %
$u(f)$	对照品纯度 $u(p)$	3.17×10^{-4}	2.1
	对照品称量 $u(m_{st})$	1.99×10^{-3}	82.2
	对照品溶液配制 $u(V_{st})$	4.75×10^{-4}	4.7
	对照品峰面积 $u(A_{st})$	2.14×10^{-4}	1.0
$u(C_1)$	平均片重 $u(M)$	9.60×10^{-6}	0.002
	供试品称量 $u(m_1)$	6.98×10^{-5}	0.1
	供试品溶液配制 $u(V_1)$	4.75×10^{-4}	4.7
$u(A_1)$	供试品峰面积 $u(A_1)$	5.03×10^{-4}	5.3

表 2 含量均匀度测定的不确定度分量及其贡献率

Tab 2 The uncertainty item and contribution ratio of content uniformity determination

不确定度分量	不确定度来源	相对标准不确定度	不确定度贡献率, %
$u(f)$	对照品纯度 $u(p)$	3.17×10^{-4}	0.2
	对照品称量 $u(m_{st})$	1.99×10^{-3}	7.0
	对照品溶液配制 $u(V_{st})$	4.75×10^{-4}	0.4
	对照品峰面积 $u(A_{st})$	2.14×10^{-4}	0.1
$u(C_2)$	供试品称量 $u(m_2)$	9.60×10^{-6}	0.000 2
	供试品溶液配制 $u(V_2)$	5.54×10^{-4}	0.5
$u(A_2)$	供试品峰面积 $u(A_2)$	7.24×10^{-3}	91.9

果。含量均匀度测定中供试品溶液的色谱峰面积的不确定度受片剂的非均匀性影响, 这也表明含量均匀度测定结果的分散程度确实反映了样品每片的含量符合标示量的程度。而含量测定的取样是来自供试品 20 片研磨混合的细粉, 减少了片重差异带来的误差。本文所建立的测定赖诺普利片含量及含量均匀度不确定度的评定方法, 可为 HPLC 法测定其他药品含量及含量均匀度的不确定度评定提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1 064.
- [2] 孙莉. HPLC 法测定伏诺酮片含量及含量均匀度的不确定度分析[J]. 中国药房, 2009, 20(4): 295.
- [3] 粟晓黎, 李冠民, 金少鸿. 药品检验一般检测项目不确定度评定研究-1.B 类评定[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(6): 699.
- [4] 王玉, 潘晞陵. 药品检测中的片剂重量差异不确定度估算[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(6): 706.
- [5] 郝玉林. 化学分析测量不确定度评定应用实例[M]. 北京: 中国质检出版社, 2011: 176.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. 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: 38.
- [7] 倪晓丽. 化学分析测量不确定度评定指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2008: 96.
- [8] 国家技术监督局. JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S]. 2007.
- [9] 王惠娟, 王力, 刘艳新. 牛黄解毒片中黄芩苷的 HPLC 法测定结果的不确定度评定研究[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1 326.
- [10] 国家质量技术监督局. JJF 1059-1999 测量不确定度的评定与表示[S]. 1999.

(收稿日期: 2013-03-06 修回日期: 2013-08-15)