

HPLC法测定比沙可啶肠溶片含量的测量不确定度评定

孙婷*,姜建国,张菁,耿韞(河北省药品检验研究院,石家庄 050011)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3428-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.36

摘要 目的:建立测定比沙可啶肠溶片含量的测量不确定度的评定方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)外标法测定比沙可啶肠溶片的含量,并建立评定其不确定度的数学模型,对来自于溶液配制过程和仪器测定过程的各种不确定度影响因素进行系统分析并予以评估。结果:HPLC外标法测定比沙可啶肠溶片的含量为97.8%,置信概率为95%时,其扩展测量不确定度为2.8%,测量结果表示为 $(97.8 \pm 2.8)\%$, $k=2$ 。结论:建立的方法适用于HPLC外标法测定比沙可啶肠溶片含量的测量不确定度评定。HPLC仪器的定期校准检定和称量过程的严格控制有利于提高HPLC法测定的准确度。

关键词 高效液相色谱法;比沙可啶肠溶片;含量测定;测量不确定度评定

Evaluation of Measurement Uncertainty for the Content of Bisacodyl Enteric-coated Tablet by HPLC

SUN Ting, JIANG Jianguo, ZHANG Jing, GENG Yun (Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To a evaluation method for the measurement uncertainty for the content of Bisacodyl enteric-coated tablet. METHODS: HPLC external standard method was conducted for content determination of Bisacodyl enteric-coated tablet, and mathematical model for uncertainty evaluation was established to systematically analyze and evaluate the influential factors in processes of solution preparation and instrument measurement. RESULTS: HPLC external standard method showed the content was 97.8%, confidence probability was 95%, expanded uncertainty was 2.8%, and determination result was $(97.8 \pm 2.8)\%$, $k=2$. CONCLUSIONS: The established method is suitable for the evaluation of measurement uncertainty for the content of Bisacodyl enteric-coated tablet. Regularly calibrated verification for HPLC equipment and strict control of the weighing process will help to improve the accuracy measured by HPLC.

KEYWORDS HPLC; Bisacodyl enteric-coated tablet; Content determination; Evaluation of measurement uncertainty

比沙可啶肠溶片为2015年版《中国药典》(二部)收载的品种,是国外20世纪50年代末上市的优良缓泻药,临床上主要通过与其肠黏膜直接接触刺激其感觉神经末梢而增强肠反射性蠕动,导致排便^[1]。笔者在前期研究中对比沙可啶肠溶片的含量进行了测定。本研究中,笔者参考相关文献^[2-6],依次按照建立数学模型、分析不确定度来源以及计算不确定度分量、合成标准不确定度和扩展不确定度的过程,对高效液相色谱(HPLC)外标法测定比沙可啶肠溶片含量的测量不确定度进行了评定,旨在为提高比沙可啶肠溶片的质量评价与控制水平提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括1260泵、UV检测器和EZChrom色谱工作站(美国安捷伦公司);XS105型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);50 ml量瓶级别为A级。

1.2 药品与试剂

比沙可啶对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100181-200402,纯度:100.0%);比沙可啶肠溶片(A公司,批号:30901,规格:5 mg);乙腈(色谱纯,美国Fisher Chemical公司);乙酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);冰乙酸(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

- [6] 王莉宁,徐必学,林华容,等.蓝布正化学成分的研究[J].时珍国医国药,2009,20(4):798.
- [7] 杨威,郑明善,吕惠子.路边青化学成分的研究[J].延边大学学报,2013,36(1):32.
- [8] 欧阳玉祝,陈小东,唐红玉,等.路边青中总多酚的提取与分离研究[J].食品科学,2009,30(16):44.
- [9] 张飞.蓝布正的化学成分及质量控制研究[D].上海:上海交通大学,2012.
- [10] 李龙,翁恭峰,白玉春,等.复方穿心莲片质量标准的研究[J].广东药学院学报,2014,30(5):595.
- [11] 张慧晔,潘雪峰,徐小飞,等.复方穿心莲片的薄层鉴别研究[J].中成药,2015,37(2):460.
- [12] 胡强,周勇.HPLC法测定复方穿心莲片中脱水穿心莲内酯的含量[J].中国当代医药,2013,20(3):62.
- [13] 刘蕾,张瑜,韩光,等.HPLC法测定大鼠血浆中穿心莲内酯类衍生物的含量及其药动学研究[J].中国药房,2013,24(11):967.
- [14] 黄秀展,潘民儒,朱正英,等.HPLC法测定复方穿心莲片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J].中国社区医师,2012,14(7):28.

(收稿日期:2016-02-29 修回日期:2016-05-13)

(编辑:刘柳)

* 主管药师。研究方向:药物检验和杂质鉴定。E-mail:122547652@qq.com

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent ZORBAX C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-20 mmol/L 乙酸铵(冰乙酸调 pH 至 5.0)(55:45, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:265 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。在上述色谱条件下,比沙可啶峰与相邻杂质峰的分度符合要求。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取比沙可啶对照品适量,精密称定,加冰乙酸-乙腈-水(4:30:66, V/V/V)溶解并制成每 1 ml 中约含 0.2 mg 比沙可啶的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品 20 片,除去包衣后,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于比沙可啶 10 mg),置于 50 ml 量瓶中,加冰乙酸-乙腈-水(4:30:66, V/V/V)溶解并定容,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.3 空白辅料溶液 精密称取生产企业处方中包含的所有辅料适量,按“2.2.2”项下方法进行操作,制成空白辅料溶液。

2.3 方法学验证

本部分内容参见文献[9]。

2.4 样品含量测定

分别精密量取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液各 20 μl,注入 HPLC 仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算含量。结果,比沙可啶肠溶片的含量测量结果为 97.8%

3 测量不确定度评定

3.1 建立数学模型

以比沙可啶肠溶片含量计算公式作为测量不确定度评定的数学模型。根据测定的原理和过程,比沙可啶肠溶片含量计算公式为:

$$Y = \frac{A_x \times W_R \times P_R \times V_x \times \bar{W}}{A_R \times W_x \times V_R \times \text{标示量}} \times 100\%$$

式中, Y: 供试品中比沙可啶的标示百分含量; A_x: 供试品的峰面积; A_R: 对照品的峰面积; W_x: 供试品的称样量; W_R: 对照品的称样量; V_x: 供试品溶液的稀释体积; V_R: 对照品溶液的稀释体积; P_R: 对照品的纯度; \bar{W} : 供试品平均片质量; 标示量: 5 mg/片。由上式可知,比沙可啶肠溶片含量测定的不确定度来源于对照品的纯度、对照品的称样量、对照品溶液的稀释体积、对照品的峰面积、供试品的峰面积、供试品的称样量、供试品溶液的稀释体积、供试品平均片质量。

3.2 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。

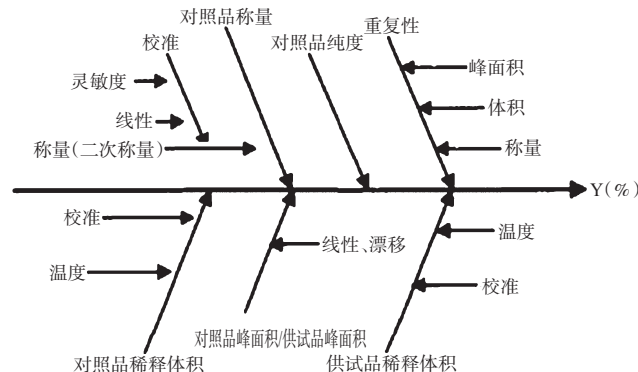


图 1 测量不确定度分量因果图

Fig 1 Cause-effect diagram of uncertainty components

3.3 测量不确定度分量的量化分析

3.3.1 P_R的相对标准不确定度 u_{rel}(P_R) 属 B 类测量不确定

度。P_R的不确定度包括由定值的测量方法引入的不确定度、协作标定试验的不确定度、由非均匀性和不稳定性引入的不确定度等^[10]。比沙可啶对照品由中国食品药品检定研究院提供,纯度为 100.0%,其分散区间的半峰宽 α=0.05%, P=100%),按矩形分布(均匀分布)计算, $u_{rel}(P_R) = \frac{\sqrt{3}}{100.0\%} = 2.88 \times 10^{-4}$ 。

3.3.2 W_R相对标准不确定度 u_{rel}(W_R) 其不确定度来源有 2 个:天平示值和天平称量的重复性。(1)天平示值的不确定度分析:属 B 类不确定度。根据所用电子天平的计量检定证书所述,该天平最大允许误差为 ±0.1 mg,按矩形分布计算, k=√3,经计算其标准不确定度 u(W_{R1})=0.1/√3=5.77×10⁻² mg。(2)天平称量重复性的不确定度分析:属 B 类不确定度。根据所用电子天平的计量检定证书所述,该天平的称量重复性误差为 0.02 mg,按矩形分布计算,其标准不确定度 u(W_{R2})=0.02/√3=1.16×10⁻² mg。则天平单次称量的标准不确定度为:√[(1.16×10⁻²)²+(5.77×10⁻²)²]=5.88×10⁻² mg。因称量过程使用减重法,故其不确定度 u(W_R)=√2×(5.88×10⁻²)²=8.31×10⁻² mg。对照品称取 2 份,称样量分别为 10.22 mg 和 10.25 mg,则 $u_{rel}(W_R) = \sqrt{\left(\frac{8.31 \times 10^{-2}}{10.22}\right)^2 + \left(\frac{8.31 \times 10^{-2}}{10.25}\right)^2} = 1.14 \times 10^{-2}$ 。

3.3.3 V_R的相对标准不确定度 u_{rel}(V_R) 供试品溶液和对照品溶液制备过程中均用到 50 ml 量瓶。其不确定度来源有 3 个:(1)量瓶体积校准的不确定度。属 B 类不确定度。查阅《常用玻璃量器检定规程》JJG-2006^[5],给出的 50 ml A 级量瓶的容量允差为 ±0.05 ml,按三角形分布换算成标准偏差,则其标准不确定度 u(V_{R1})=0.05/√6=2.04×10⁻² ml。(2)量瓶体积重复性的不确定度。属 A 类不确定度。对典型的 50 ml 量瓶采用冰乙酸-乙腈-水(4:30:66, V/V/V)充满 10 次并称量的试验,用贝塞尔公式评定^[11],得出标准偏差为 0.027 3 ml,则其标准不确定度 $u(V_{R2}) = \frac{0.0273}{\sqrt{10}} = 8.63 \times 10^{-3}$ ml。(3)温度系数引起的不确定度。属 B 类不确定度。依据《常用玻璃量器检定规程》JJG-2006^[5]规定,常用玻璃量器检定或校准要求在室温 20 ℃ 环境温度下进行。本次试验中,实验室环境温度为 25 ℃。液体的体积膨胀系数远大于玻璃的体积膨胀系数,因此只需考虑前者即可。水的体积膨胀系数为 2.1×10⁻⁴ ℃⁻¹,按矩形分布计算,其标准不确定度 $u(V_{R3}) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 50 \times (25 - 20)}{\sqrt{3}} = 3.03 \times 10^{-2}$ ml。由以上 3 项合成得到 $u(V_R) = \sqrt{(2.04 \times 10^{-2})^2 + (8.63 \times 10^{-3})^2 + (3.03 \times 10^{-2})^2} = 3.75 \times 10^{-2}$ ml,则

$$u_{rel}(V_R) = \frac{3.75 \times 10^{-2}}{50} = 7.50 \times 10^{-4}$$

3.3.4 A_R的相对标准不确定度 u_{rel}(A_R) 其不确定度来源为进样重复性。属 A 类不确定度。样品溶液测定过程中受进样体积重复性、泵流速稳定性、分离重复性、组分在色谱柱等滞留变化、检测器稳定性、积分变动性等随机变化的影响。以上在进样、分离、检测过程中产生的随机影响,可合并为进样重复性进行测量^[10]。对照品两个平行样,分别连续进样 5 次和 2 次。对照品峰面积测定结果见表 1。

用极差法^[11]计算对照品峰面积的相对标准不确定度,得

$$u_{rel}(A_{R1}) = \frac{R_1}{C_1 \times A_1} = \frac{1.39}{2.33 \times 1823411} = 3.30 \times 10^{-7}, u_{rel}(A_{R2}) =$$

$$\frac{R_2}{C_2 \times A_2} = \frac{0.87}{1.13 \times 1818976} = 4.23 \times 10^{-7}。则 u_{rel}(A_R) =$$

$$\sqrt{u_{rel}^2(A_{R1})+u_{rel}^2(A_{R2})}=5.36\times 10^{-7}$$

表1 对照品峰面积测定结果

Tab 1 Determination result of the peak area for the standard

对照品	平均峰面积 \bar{A}	极差R	进样次数n	极差系数C
对照品平行样1	1 823 411	1.39	5	2.33
对照品平行样2	1 818 976	0.87	2	1.13

3.3.5 W_x 的相对标准不确定度 $u_{rel}(W_x)$ 此不确定度分量的分析同“3.3.2”项。其标准不确定度 $u(W_x)=u(W_R)=8.31\times 10^{-2}$ mg。2份供试品的称样量分别为217.20、216.80 mg,则

$$u_{rel}(W_x)=\sqrt{\left(\frac{8.31\times 10^{-2}}{217.20}\right)^2+\left(\frac{8.31\times 10^{-2}}{216.80}\right)^2}=5.41\times 10^{-3}$$

3.3.6 V_x 的不确定度 $u_{rel}(V_x)$ 供试品稀释过程与对照品相同,此不确定度分量的分析同“3.3.3”项。则 $u_{rel}(V_x)=7.50\times 10^{-4}$ 。

3.3.7 A_x 的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_x)$ 此不确定度分量的分析同“3.3.4”项。供试品2个平行样,每个样进2针,所用HPLC仪检定证书给出的定量测量重复性RSD=0.4%(n=6)。供试品峰面积测定结果见表2。

表2 供试品峰面积测定结果

Tab 2 Determination result of the peak area for the test sample

供试品	平均峰面积 \bar{A}	极差R	进样次数n	极差系数C
供试品平行样1	1 788 411	1.15	2	1.13
供试品平行样2	1 785 632	1.27	2	1.13

因检测次数较少,采用极差法计算 A_x 引入的不确定度。

当n=2时,极差系数C=1.13。计算得到 $u_{rel}(A_{R1})=\frac{R_1}{C_1\times A_1}=\frac{1.15}{1.13\times 1\ 788\ 411}=5.69\times 10^{-7}$, $u_{rel}(A_{R2})=\frac{R_2}{C_2\times A_2}=\frac{1.27}{1.13\times 1\ 785\ 632}=6.29\times 10^{-7}$ 。则 $u_{rel}(A_R)=\sqrt{(u_{rel}(A_{R1}))^2+(u_{rel}(A_{R2}))^2}=8.48\times 10^{-7}$ 。

3.3.8 \bar{W} 的相对标准不确定度 $u_{rel}(\bar{W})$ 其不确定度主要有两个来源:(1)天平称量过程引入的测量不确定度分析同“3.3.2”项。其标准不确定度 $u_1(\bar{W})=u(W_R)=8.31\times 10^{-2}$ mg。(2)药片质量差异的标准不确定度。按照2015年版《中国药典》(四部)通则中重量差异检查法^[12],取供试品20片,精密称定每片质量,计算得到 $\bar{W}=108.57$ mg,标准偏差 $s(\bar{W})=1.01$ mg,则药片质量差异的标准不确定度 $u_2(\bar{W})=\frac{s(\bar{W})}{\sqrt{n}}=\frac{1.01}{\sqrt{20}}=0.22$ mg。

因此, \bar{W} 的标准不确定度 $u(\bar{W})=\sqrt{u_1^2(\bar{W})+u_2^2(\bar{W})}=\sqrt{(8.31\times 10^{-2})^2+0.22^2}=0.23$ mg,则 $u_{rel}(\bar{W})=\frac{u(\bar{W})}{\bar{W}}=\frac{0.23}{108.57}=2.11\times 10^{-3}$ 。

3.4 计算不确定度各分量的合成相对标准不确定度 $u_{c,rel}$

不确定度各分量的相对标准不确定度见表3。

经计算,含量测定的合成相对标准不确定度 $u_{c,rel}=[(u_{rel}(P_R))^2+(u_{rel}(W_R))^2+(u_{rel}(V_R))^2+(u_{rel}(A_R))^2+(u_{rel}(W_x))^2+(u_{rel}(V_x))^2+(u_{rel}(A_x))^2+(u_{rel}(W))^2]^{\frac{1}{2}}=[(2.88\times 10^{-4})^2+(1.14\times 10^{-2})^2+(7.50\times 10^{-4})^2+(5.36\times 10^{-7})^2+(5.41\times 10^{-3})^2+(7.50\times 10^{-4})^2+(8.48\times 10^{-7})^2+(2.11\times 10^{-3})^2]^{\frac{1}{2}}=1.44\times 10^{-2}$ 。因测得比沙可啶肠溶片含量=97.8%,则合成标准不确定度 $u_c(X)=97.8\%\times 1.44\times 10^{-2}=1.41\%$ 。

3.5 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 $U=2\times 1.41\%=2.8\%$ 。

表3 不确定度各分量的相对标准不确定度

Tab 3 Relative standard uncertainty of the each component

参数	名称	分布及类型	相对标准不确定度
$u_{rel}(P_R)$	对照品的纯度	矩形B类	2.88×10^{-4}
$u_{rel}(W_R)$	对照品的称样量	矩形B类	1.14×10^{-2}
$u_{rel}(V_R)$	对照品溶液的稀释体积	三角B类	7.50×10^{-4}
		正态A类	
$u_{rel}(A_R)$	对照品的峰面积	正态A类	5.36×10^{-7}
$u_{rel}(W_x)$	供试品的称样量	矩形B类	5.40×10^{-3}
$u_{rel}(V_x)$	供试品溶液的稀释体积	三角B类	7.50×10^{-4}
		正态A类	
		矩形B类	
$u_{rel}(A_x)$	供试品的峰面积	正态A类	8.48×10^{-7}
$u_{rel}(\bar{W})$	供试品平均片质量	正态A类	2.11×10^{-3}

3.6 测量不确定度报告

HPLC外标法测定比沙可啶肠溶片含量的测量结果表示为: $X=(97.8\pm 2.8)\%$, $k=2$ 。

4 讨论

研究结果显示,采用HPLC外标法测定比沙可啶肠溶片含量的不确定度主要来自于对照品称量的相对不确定度,且HPLC仪器的定期校准检定和称量过程的严格控制有利于提高HPLC法测定的准确度。

笔者所采用的色谱条件属于测定比沙可啶肠溶片含量的新方法,在进行方法学验证的基础上,建立其测量不确定度评定方法十分重要,可为同品种不同剂型不确定度模型建立及评定提供可靠的参考依据。

参考文献

- [1] 李颖,刘世宽,郝志刚.结肠定位给药制剂-比沙可啶速释片的研制[J].山东医药工业杂志,2000,19(3):7.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:74.
- [3] 国家质量技术监督局.测量不确定度评定与表示JJF1059-1999[S].北京:中国计量出版社,1999:1 569-1 587.
- [4] 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CNAS-GL06[S].北京:中国计量出版社,2006:6-38.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局.常用玻璃量器检定规程JJG196-2006[S].北京:中国计量出版社,2006:6-8.
- [6] 倪育才.实用测量不确定度评定[M].北京:中国计量出版社,2004:27-34.
- [7] 陆明,范国荣,汪杨,等.测量不确定度在药品领域的应用[J].医药导报,2013,32(8):1 053.
- [8] 秦立,王莹,张利,等.HPLC测定氯氮平片含量的测量不确定度评定[J].中国现代应用药学,2015,32(2):189.
- [9] 张西如,孙婷,姜建国,等.HPLC法测定比沙可啶肠溶片的含量及含量均匀度[J].中国药房,2016,27(18):2 573.
- [10] 孙婷,韩学静,姜建国,等.HPLC测定注射用长春西汀含量的不确定度评定[J].华西药学杂志,2013,28(4):401.
- [11] EURACHEM/CITAC Guide.量化分析测量不确定度指南[M].刘立,译.北京:中国计量出版社,2003:129.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:通则0101 3-4.

(收稿日期:2015-12-10 修回日期:2016-07-18)

(编辑:周 箐)