

HPLC法测定泼尼松龙原料药含量的测量不确定度评定

秦立^{1*},肖英²,王莹¹,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研究院,济南 250101)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4737-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.46

摘要 目的:建立测定泼尼松龙原料药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)内标法测定泼尼松龙原料药的含量,并建立评定其不确定度的数学模型,分析测量不确定度的影响因素并对各因素进行评估。结果:HPLC内标法测定泼尼松龙原料药含量为98.8%,其扩展测量不确定度为1.6%,测量结果表示为(98.8±1.6)%, $k=2$ 。结论:该方法适用于评定HPLC内标法测定泼尼松龙原料药含量的不确定度。

关键词 泼尼松龙原料药;高效液相色谱内标法;含量测定;测量不确定度

Uncertainty Measurement Evaluation of the Content Determination of Prednisolone API by HPLC

QIN Li¹, XIAO Ying², WANG Ying¹, FAN Ya-gang¹(1.Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650011, China;2.Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the uncertainty measurement evaluation of the content determination of prednisolone API. METHODS: HPLC internal standard method was adopted to determine the content of prednisolone API, establish mathematical model for uncertainty evaluation, analyze influential factors and evaluate the factors. RESULTS: HPLC internal standard method showed the content was 98.8%, and expanded uncertainty of prednisolone API was 1.6%, and the determination result was(98.8±1.6)%, $k=2$. CONCLUSIONS: The method is suitable for the uncertainty measurement evaluation of the content determination of prednisolone API by HPLC internal standard method.

KEYWORDS Prednisolone API; HPLC internal standard method; Content determination; Uncertainty measurement

测量不确定度是表征赋予被测量值分散性的非负参数^[1],是对测量结果可能误差的度量,也是定量说明测量结果质量好坏的参数^[2]。测量不确定度评定已经在药物分析领域广泛应用^[3-5]。

泼尼松龙收载于2010年版《中国药典》(二部)^[6],是肾上腺皮质激素类药物,其含量测定方法为高效液相色谱(HPLC)内标法。本研究中,笔者根据有关规定^[1,7-8],对该方法测定泼尼松龙原料药含量的测量不确定度进行评定,分析影响其不确定度的因素,为客观评价泼尼松龙原料药的含量测定结果提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695 HPLC仪,包括Waters 2998二极管阵列检测器及Waters Empower工作站(美国Waters公司);BP-211D型电子天平(德国Sartorius公司,精度:0.01 mg);50 ml容量瓶、5 ml移液管均检定A级。

1.2 药品与试剂

泼尼松龙原料药(丽江映华生物药业有限公司,批号:IS38-141101);泼尼松龙对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100153-201004,纯度:99.4%);炔诺酮对照品(内标物质,

中国食品药品检定研究院,批号:100053-201206,纯度:99.4%);甲醇为色谱纯,水为超纯水。

2 试验方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(65:35, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:240 nm;柱温:25℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 内标溶液 精密称取炔诺酮对照品54.91 mg,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得。

2.2.2 供试品溶液与对照品溶液 取本品约50 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取该溶液与内标溶液各5 ml,置于同一50 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。另取泼尼松龙对照品50.39 mg,同法稀释,即得质量浓度约为0.1 mg/ml的对照品溶液。

2.3 样品测定

精密量取供试品溶液和对照品溶液各10 μl,注入HPLC仪,记录色谱,按内标法以峰面积计算样品含量。

3 测量不确定度评定

3.1 建立数学模型

含量测定方法为HPLC内标法,样品含量的计算公式为:

$$X = \frac{A_s \times W_R \times P_R \times V_S \times A_x \times W'_s \times V_x}{A_R \times W_S \times P_S \times V_R \times A'_s \times V'_s \times W_x \times (1 - L\%)}$$

式中, X :按干燥品计算,供试品中泼尼松龙的百分含量;

* 副主任药师,硕士。研究方向:药品质量分析。电话:0871-63130536。E-mail:qinli2112@gmail.com

A_S : 对照品溶液中内标物质的峰面积; A'_S : 供试品溶液中内标物质的峰面积; W_S : 对照品溶液中内标物质的称取量; W'_S : 供试品溶液中内标物质的称取量; P_S : 内标物质的纯度; V_S : 对照品溶液中内标物质的稀释倍数; V'_S : 供试品溶液中内标物质的稀释倍数; A_R : 对照品的峰面积; W_R : 对照品的称取量; P_R : 对照品的纯度; V_R : 对照品的稀释倍数; A_X : 供试品的峰面积; W_X : 供试品的称取量; V_X : 供试品稀释倍数; L : 干燥失重。其中:

$$\frac{A_S \times W_R \times P_R \times V_S}{A_R \times W_S \times P_S \times V_R} = \text{校正因子}(f)$$

3.2 识别测量不确定度的来源

各测量不确定度分量的来源见图1。

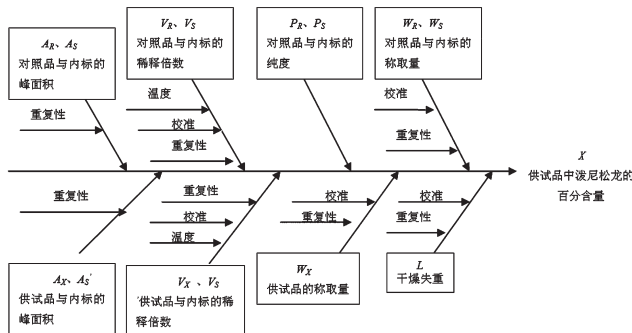


图1 测量不确定度分量因果图

Fig 1 Cause-effect diagram of uncertainty of measurement

3.3 测量不确定度分量的量化分析

3.3.1 对照品纯度的相对标准不确定度 $u_{rel}(P_R)$ 与内标物质纯度的相对标准不确定度 $u_{rel}(P_S)$ 属于B类测量不确定度。泼尼松龙对照品和炔诺酮对照品(内标物质)均由中国食品药品检定研究院提供,含量均为99.4%。未给出其不确定度等相关信息,假定其分布区间为 $\pm 0.05\%$,按矩形分布计算,相对标准不确定度 $u_{rel}(P_R) = \frac{0.05\%}{\sqrt{3}} = 2.90 \times 10^{-4}$ 。同理, $u_{rel}(P_S) = 2.90 \times 10^{-4}$ 。

3.3.2 对照品称取量的相对标准不确定度 $u_{rel}(W_R)$ 与内标物质称取量的相对标准不确定度 $u_{rel}(W_S)$ 有2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(精度:0.01 mg)的检定证书给出的最大允差为 ± 0.05 mg,按矩形分布计算, $u(W_{R1}) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-2}$ mg。(2)天平称量重复性的不确定度分析:所用电子天平(精度:0.01 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, $u(W_{R2}) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-3}$ mg。则天平单次称量的标准不确定度为: $\sqrt{(2.89 \times 10^{-2})^2 + (5.77 \times 10^{-3})^2} = 2.94 \times 10^{-2}$ mg。因称量过程使用减重法,故其不确定度 $u(W_R) = \sqrt{2 \times (2.94 \times 10^{-2})^2} = 4.16 \times 10^{-2}$ mg。对照品的称取量为50.39 mg时,其相对标准不确定度 $u_{rel}(W_R) = \frac{4.16 \times 10^{-2}}{50.39} = 8.26 \times 10^{-4}$;同理,内标物质的称取量为54.91 mg时,其相对标准不确定度 $u_{rel}(W_S) = \frac{4.16 \times 10^{-2}}{54.91} = 7.58 \times 10^{-4}$ 。

3.3.3 对照品稀释倍数的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_R)$ 与内标物质稀释倍数的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_S)$ 由稀释过程看出有2个不确定度分量,分别来自50 ml量瓶和5 ml移液管。(1)50 ml量瓶的不确定度主要有3个来源:①校准:属B类不确定度。查阅《常用玻璃量器检定规程》^[9],50 ml A级量瓶的容量允差为 ± 0.05 ml,按三角分布计算, $u(V_{R1}) = \frac{0.05}{\sqrt{6}} = 2.04 \times 10^{-2}$ ml。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 $u(V_{R2}) = \frac{0.0246}{\sqrt{10}} = 7.78 \times 10^{-3}$ ml。③温度:属B类不确定度。50 ml量瓶在20℃下校准,实验室环境温度温度为10.9℃,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 $u(V_{R3}) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 50 \times (10.9 - 20)}{\sqrt{3}} = -5.52 \times 10^{-2}$ ml。由以上3项合成得到使用1次50 ml量瓶的不确定度为: $\sqrt{(2.04 \times 10^{-2})^2 + (7.78 \times 10^{-3})^2 + (-5.52 \times 10^{-2})^2} = 5.93 \times 10^{-2}$ ml。因稀释过程中使用到2次50 ml量瓶,故其不确定度为: $\sqrt{2 \times (5.93 \times 10^{-2})^2} = 8.39 \times 10^{-2}$ ml。则使用50 ml量瓶稀释的相对标准不确定度为: $\frac{8.39 \times 10^{-2}}{50} = 1.68 \times 10^{-3}$ 。(2)5 ml移液管的不确定度分析过程与上述相同,分别为:①5 ml A级移液管的容量允差为 ± 0.015 ml,则 $u(V_{R4}) = \frac{0.015}{\sqrt{6}} = 6.12 \times 10^{-3}$ ml。②将同一5 ml移液管吸取5 ml水放入量瓶,称量,重复操作10次,得到标准偏差为0.0185 ml,则不确定度 $u(V_{R5}) = \frac{0.0185}{\sqrt{10}} = 5.85 \times 10^{-3}$ ml。③温度引入的不确定度 $u(V_{R6}) = \frac{2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times (10.9 - 20)}{\sqrt{3}} = -5.52 \times 10^{-3}$ ml。由以上3项合成得到不确定度为: $\sqrt{(6.12 \times 10^{-3})^2 + (5.85 \times 10^{-3})^2 + (-5.52 \times 10^{-3})^2} = 1.01 \times 10^{-2}$ ml,则使用5 ml移液管稀释的相对标准不确定度为: $\frac{1.01 \times 10^{-2}}{5} = 2.02 \times 10^{-3}$ 。由(1)、(2)合成得到对照品稀释倍数的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_R) = \sqrt{(1.68 \times 10^{-3})^2 + (2.02 \times 10^{-3})^2} = 2.63 \times 10^{-3}$ 。内标物质稀释过程与对照品相同,因此内标物质稀释倍数的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_S) = 2.63 \times 10^{-3}$ 。

3.3.4 对照品峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_R)$ 与内标物质峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_S)$ 即进样重复性,属A类不确定度。取对照品溶液连续进样6次,分别得到泼尼松龙和内标物质的峰面积,用贝塞尔公式法评定,得到泼尼松龙峰面积的标准偏差为1142.7,平均峰面积为2264197.6,则不确定度 $u(A_R) = \frac{1142.7}{\sqrt{6}} = 466.5$,相对标准不确定度 $u_{rel}(A_R) = \frac{466.5}{2264197.6} = 2.06 \times 10^{-4}$;同理,内标物质峰面积的标准偏差为1202.2,平均峰面积为3558565.8,则不确定度 $u(A_S) = \frac{1202.2}{\sqrt{6}} = 490.8$,相对标准不确定度 $u_{rel}(A_S) = \frac{490.8}{3558565.8} = 1.38 \times 10^{-4}$ 。

3.3.5 供试品称取量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。不确定度 $u(W_X)=u(W_R)=4.16\times 10^{-2}$ mg。2份供试品的称取量分别为 50.37、51.19 mg,则其相对标准不确定度 $u_{rel}(W_X)=\sqrt{\left(\frac{4.16\times 10^{-2}}{50.37}\right)^2+\left(\frac{4.16\times 10^{-2}}{51.19}\right)^2}=1.16\times 10^{-3}$ 。

3.3.6 供试品稀释倍数的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_X)$ 与内标物质稀释倍数的相对标准不确定度 $u_{rel}(V'_S)$ 此项分析同“3.3.3”项。相对标准不确定度 $u_{rel}(V_X)=u_{rel}(V'_S)=2.63\times 10^{-3}$ 。

3.3.7 供试品峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_X)$ 与内标物质峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A'_S)$ 采用极差法^[1]计算色谱峰面积引入的不确定度。当 $n=2$ 时,极差系数 $C=1.13$ 。平行配制 2 份供试品溶液,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 ($n=2$)

Tab 1 Results of the peak area of test samples ($n=2$)

项目	泼尼松龙		内标	
	供试品 1	供试品 2	供试品 1	供试品 2
峰面积 1	2 245 981	2 332 423	3 567 554	3 631 608
峰面积 2	2 239 845	2 323 289	3 555 000	3 618 262
平均值 \bar{A}	2 242 913	2 327 856	3 561 277	3 624 935
极差 R	6 136	9 134	12 554	13 346

由 $u_{rel}(A)=\frac{R}{C\times\bar{A}}$ 可以计算出: $u_{rel}(A_{X1})=2.42\times 10^{-3}$, $u_{rel}(A_{X2})=3.47\times 10^{-3}$; $u_{rel}(A'_{S1})=3.12\times 10^{-3}$, $u_{rel}(A'_{S2})=3.26\times 10^{-3}$, 则供试品峰

面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_X)=\sqrt{u_{rel}^2(A_{X1})+u_{rel}^2(A_{X2})}=4.23\times 10^{-3}$; 内标物质峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A'_S)=\sqrt{u_{rel}^2(A'_{S1})+u_{rel}^2(A'_{S2})}=4.51\times 10^{-3}$ 。

3.3.8 干燥失重的相对标准不确定度 $u_{rel}(L)$ 由供试品干燥前后称量的不确定度合成^[4]。从“3.3.2”项的分析得知,天平单次称量的标准不确定度为 2.94×10^{-2} mg。供试品干燥前、后的称量值分别为 18.680 81、18.678 33 g,则干燥失重的相对标准不确定度 $u_{rel}(L)=\sqrt{\left(\frac{2.94\times 10^{-2}}{18.680\ 81\times 10^3}\right)^2+\left(\frac{2.94\times 10^{-2}}{18.678\ 33\times 10^3}\right)^2}=2.23\times 10^{-6}$ 。

3.4 计算合成相对标准不确定度 $u_{c,rel}$

测量不确定度各分量的分析结果见表 2。

表 2 各分量相对标准不确定度一览

Tab 2 List of components of relative standard uncertainty

分量	相对标准不确定度	排序
$u_{rel}(A'_S)$	4.51E-03	1
$u_{rel}(A_X)$	4.23E-03	2
$u_{rel}(V)$	2.63E-03	3
$u_{rel}(W_X)$	1.16E-03	4
$u_{rel}(W_R)$	8.26E-04	5
$u_{rel}(W_S)$	7.58E-04	6
$u_{rel}(P)$	2.90E-04	7
$u_{rel}(A_R)$	2.06E-04	8
$u_{rel}(A_I)$	1.38E-04	9
$u_{rel}(L)$	2.23E-06	10

则含量测定的合成相对标准不确定度 $u_{c,rel}=\sqrt{u_{rel}^2(A'_S)+$

$$\frac{u_{rel}^2(A_X)+4\times u_{rel}^2(V)+u_{rel}^2(W_X)+u_{rel}^2(W_R)+u_{rel}^2(W_S)+2\times u_{rel}^2(P)+u_{rel}^2(A_R)+u_{rel}^2(A_I)+u_{rel}^2(L)}{A_R}=8.29\times 10^{-3}$$

试验测得泼尼松龙的百分含量 $X=98.8\%$, 则合成标准不确定度为:

$$u_c(X)=u_{c,rel}\times X=8.29\times 10^{-3}\times 98.8\%=0.8\%$$

3.5 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:

$$U=k\cdot u_c(X)=2\times 0.8\%=1.6\%$$

3.6 测量不确定度报告

HPLC 内标法测定泼尼松龙的含量为 $X=(98.8\pm 1.6\%)$, $k=2$ 。

4 讨论

由以上测量不确定度的评定结果可知,HPLC 内标法测定泼尼松龙原料药含量的不确定度主要来自于稀释过程,其次是液相色谱峰面积和天平称量过程。内标法的计算公式中,当对照品溶液中内标浓度与供试品溶液中内标浓度相等即 $C_S=C'_S$ 时,计算时可以相互抵消。但是在评定其测量不确定度时,应分别计算每一次稀释过程所引入的不确定度分量,不能忽略不计。本次评定结果提示,应使用经校正合格的容量仪器进行稀释,并应定期做好液相色谱仪的计量检定和期间核查工作,选用精度符合要求的分析天平进行称量,以确保测定结果准确可靠。

参考文献

- [1] 全国法制计量管理计量技术委员会.测量不确定度评定与表示 JJF1059.1-2012[S].北京:中国质检出版社,2013.
- [2] 倪育才.实用测量不确定度评定[M].3版.北京:中国计量出版社,2009:1-35.
- [3] 姚尚辰,常艳,胡昌勤.HPLC 用于 β -内酰胺类抗生素化学对照品的不确定度分析[J].药物分析,2010,30(11):2104.
- [4] Liu SY, Hu CQ. A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance methods[J]. Anal Chim Acta, 2007, 60(2): 114.
- [5] 秦立,肖英,范亚刚.HPLC 法测定卡托普利片含量的测量不确定度评定[J].中国药房,2014,15(12):1140.
- [6] 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,2010:506.
- [7] 全国法制计量管理计量技术委员会.化学分析测量不确定度评定:JJF1135-2005[S].北京:中国计量出版社,2005.
- [8] 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.
- [9] 全国流量容量计量技术委员会.常用玻璃量器检定规程:JJG196-2006[S].北京:中国计量出版社,2006.

(收稿日期:2015-01-09 修回日期:2015-10-15)

(编辑:周 箫)