

HPLC测定青霉素 V 钾片含量的不确定度分析

范能全¹, 彭兰² (1. 重庆市药品检验所, 重庆 400021; 2. 重庆医药高等专科学校, 重庆 400030)

摘要:目的 使青霉素 V 钾片含量测定的测量受控。方法 建立 HPLC 法测定青霉素 V 钾片含量的不确定度评定方法。结果 对各个不确定度分量进行量化, 提出了该法的合成不确定度评估结果。结论 计算出扩展不确定度 $U = 0.70\% (k = 2)$, 称样量是测定结果的最主要影响因素。

作者简介: 范能全, 男, 工程师

Tel: (023) 86072740

E-mail: fannengquan@sohu.com

The Analysis of Measurement Uncertainty for Assay of Phenoxymethylpenicillin Potassium Tablets with HPLC

FAN Neng-quan¹, PENG Lan² (1. Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 400021, China; 2. Chongqing Pharmaceutical School, Chongqing 400030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Evaluate the measurement uncertainty in the assay of phenoxymethylpenicillin potassium tablets with HPLC. **METHODS** Establish the evaluation method of the measurement uncertainty for the assay of phenoxymethylpenicillin potassium tablets with HPLC. **RESULTS** The various measurement of uncertainty were quantized, and the measurement uncertainty was drawn. **CONCLUSION** The expanded measurement uncertainty $U=0.70\%$ ($k=2$), the weight is the primary factors for the result. **KEY WORDS:** HPLC; phenoxymethylpenicillin potassium tablets; measurement uncertainty

为了使测量数据的处理、测量结果的表达以及测量结果的质量评定等方面更准确、更科学,根据中国实验室国家认可委员会对认可实验室在测量不确定度方面的要求,对HPLC法测定青霉素V钾片含量的不确定度进行了测量和评估,从而找出影响不确定度的因素,为检验报告提供科学依据,使实验的结果数据更准确,实验结论更确定。下面介绍了该评估方法及结果。

1 测定过程^[1]

1.1 色谱条件与系统适用性试验

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以水-乙腈-冰醋酸(65:35:1)为流动相,检测波长为268 nm。

1.2 对照品溶液的制备

精密称取青霉素V对照品(M_0)50.98 mg和50.12 mg,分别置50 mL量瓶中(V_0),用pH 6.5的磷酸盐缓冲液(取表1 实验结果记录表

Tab1 The record of the experiments results

名称	称样量 /mg	定容体积 /mL	峰面积			平均值	标准偏差 s	平均装量
对照品 1	50.98	50	5 187.01	5 192.72	5 189.98	5 189.90	2.856	274.2 mg
对照品 2	50.12	50	5 089.76	5 092.35	5 091.22	5 091.11	1.299	平均标示含量
供试品 1	54.23	50	4 728.36	4 733.42		4 730.89	3.578	
供试品 2	53.89	50	4 698.77	4 696.35		4 697.56	1.711	

根据上述计算公式得测量数学模型: $X=(A_x M_0 V_x \times \text{含量}_{\text{对}} \times \text{平均装量 } M_p)/(A_0 V_0 M_x \times \text{标示量})$ 公式中标示量=0.236 g/片,含量_对=89.3%,X为供试品的含量,供试品的标示量和含量_对为常数,故导出方差, $u_{(x)}/x=\{[u_{(A_x)}/A_x]^2+[u_{(M_0)}/M_0]^2+[u_{(V_x)}/V_x]^2+[u_{(M_p)}/M_p]^2+[u_{(A_0)}/A_0]^2+[u_{(V_0)}/V_0]^2+[u_{(M_x)}/M_x]^2\}^{1/2}$ 。

2 不确定度的评估^[2]

2.1 不确定度的来源

根据以上的计算公式,分析测定的每一步骤的主要影响因素,在每一个主要影响因素以外,考虑在增加有贡献的影响因素,直至影响因素变得足够小,对结果的影响可忽略。

0.2 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液 125 mL,加水 250 mL,混匀,用氢氧化钠试液调节 pH 值至 6.5,再用水稀释至 500 mL)溶解并稀释至刻度。本实验所用试剂水均为超纯水。环境条件:温度:20℃;湿度:50%。

1.3 供试品溶液的制备

精密称取供试品(M_x)54.23 mg和53.89 mg,分别置50 mL量瓶中(V_x),用pH 6.5的磷酸盐缓冲液溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

1.4 测定方法与数据

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,测得对照品溶液的峰面积为(A_0),供试品溶液的峰面积为(A_x)。由计算公式:平均标示含量=($A_x M_0 V_x \times \text{含量}_{\text{对}} \times \text{平均装量 } M_p)/(A_0 V_0 M_x \times \text{标示量}) \times 100\%$,计算得青霉素V($C_{16}H_{18}N_2O_5S$)的含量为:89.0%。见表1。

2.2 不确定度的量化分析

2.2.1 对照品溶液引起的不确定度

2.2.1.1 青霉素V钾对照品纯度

青霉素V钾对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号:1304490-200503,含量为89.3%。

2.2.1.2 天平称重的相对标准不确定度

天平示值的不确定度:使用的METTLER TOLEDO AX205电子天平($d=0.01$ mg),检定证书给出的最大允差为±0.1 mg,按矩形分布,属B类不确定度,其标准不确定度为 $0.1/3^{1/2}=0.0577$ mg。

天平称量重复性的不确定度:使用的METTLER TOLE-

DO AX205电子天平 (d=0.01 mg), 检定证书给出的重复性误差为 ±0.02 mg。

单次称量的标准不确定度: $(0.057^2 + 0.02^2)^{1/2} = 0.0611 \text{ mg}$, 因为称量使用的是增重法, $u_{(AX)} = (2 \times 0.0611^2)^{1/2} = 0.0864 \text{ mg}$ 。

两份对照品称样量的相对标准不确定度分别为 $0.0864/50.98 = 1.695 \times 10^{-3}$ 和 $0.0864/50.12 = 1.724 \times 10^{-3}$, 对照品称量的相对标准不确定度 $= [(1.695 \times 10^{-3})^2 + (1.724 \times 10^{-3})^2]^{1/2} = 2.418 \times 10^{-3}$ 。

2.2.1.3 玻璃仪器的相对标准不确定度

校准: 由《常用玻璃量器检定规程》JJG196-90^[3]查得, A等品的 50 mL量瓶的允差为 ±0.05 mL, 按三角分布, 属 B类不确定度, 其标准不确定度为 $0.05/6^{1/2} = 0.0204 \text{ mL}$ 。

重复性: 对 50 mL量瓶充满水至刻度称量, 重复 10次, 得出标准偏差为 0.01 mL。

温度: 由制造商提供的信息, 该量瓶在 20℃校准, 而实验室的温度为 ±5℃, 在 95%置信概率下, 按矩形分布, 属 B类不确定度, 其标准不确定度为 $(50 \times 5 \times 2.1 \times 10^{-4})/3^{1/2} = 0.0303 \text{ mL}$ 。

以上 3种分量合成得 $(0.0204^2 + 0.01^2 + 0.0303^2)^{1/2} = 0.0379 \text{ mL}$ 。

相对标准不确定度为 $0.0379/50 = 7.58 \times 10^{-4}$, 则对照品稀释的相对标准不确定度为 $2^{1/2} \times 7.58 \times 10^{-4} = 1.072 \times 10^{-3}$ 。

2.2.2 供试品溶液引起的不确定度

2.2.2.1 天平称重的相对标准不确定度

天平示值的不确定度: 使用的 METTLER TOLEDO AX205电子天平 (d=0.01 mg), 检定证书给出的最大允差为 ±0.1 mg, 按矩形分布, 属 B类不确定度, 其标准不确定度为 $0.1/3^{1/2} = 0.0577 \text{ mg}$ 。

天平称量重复性的不确定度: 使用的 METTLER TOLEDO AX205电子天平 (d=0.01 mg), 检定证书给出的重复性误差为 ±0.02 mg。

单次称量的标准不确定度: $(0.0577^2 + 0.02^2)^{1/2} = 0.0611 \text{ mg}$, 因为称量使用的是增重法, $u_{(AX)} = (2 \times 0.0611^2)^{1/2} = 0.0864 \text{ mg}$ 。

两份供试品称样量的相对标准不确定度 $u_{(A)}/A_X$ 分别为 $0.0864/54.23 = 1.593 \times 10^{-3}$ 和 $0.0864/53.89 = 1.603 \times 10^{-3}$, 则供试品称样量的相对标准不确定度为 $u_{(AX)}/A_X = [(1.593 \times 10^{-3})^2 + (1.603 \times 10^{-3})^2]^{1/2} = 2.260 \times 10^{-3}$ 。

2.2.2.2 玻璃容量 (50 mL)的相对标准不确定度

同前可得, 供试品稀释的相对标准不确定度为 1.072×10^{-3} 。

2.2.3 对照品溶液进样复现性的不确定度

称取 2份对照品, 各配成对照品溶液, 每份进样 3次, 测得 6个峰面积数据, 为随机测量, 属 A类不确定度, 结果见表 1。2份对照品各自的相对标准偏差分别为 $2.856/5189.90 = 5.503 \times 10^{-4}$ 和 $1.299/5091.11 = 2.552 \times 10^{-4}$, 则对照品

的相对标准偏差为 $[(5.503 \times 10^{-4})^2 + (2.552 \times 10^{-4})^2]^{1/2} = 6.066 \times 10^{-4}$ 。

2.2.4 供试品溶液进样复现性的不确定度

称取 2份供试品, 配成供试品溶液, 每份进样 2次, 测得 4个峰面积数据, 为随机测量, 属 A类不确定度, 结果见表 1。2份供试品各自的相对标准偏差分别为 $3.578/4730.89 = 7.563 \times 10^{-4}$ 和 $1.711/4697.56 = 3.642 \times 10^{-4}$, 则供试品的相对标准偏差为 $[(7.563 \times 10^{-4})^2 + (3.642 \times 10^{-4})^2]^{1/2} = 8.394 \times 10^{-4}$ 。

2.2.5 使用高效液相色谱引入的不确定度

Agilent液相色谱仪检定证书给出的定量测量重复性 RSD=0.8%, 查 JJF1059-1999概率分布情况的估计为矩形分布, 标准不确定度为 $0.8\%/3^{1/2} = 4.619 \times 10^{-3}$ 。

2.2.6 重量差异检查引入的不确定度

2.2.6.1 天平称重的相对标准不确定度

天平示值的不确定度: 使用的 METTLER TOLEDO AX205电子天平 (d=0.01 mg), 检定证书给出的最大允差为 ±0.1 mg, 按矩形分布, 属 B类不确定度, 其标准不确定度为 $0.1/3^{1/2} = 0.0577 \text{ mg}$ 。

2.2.6.2 天平称量重复性的不确定度: 使用的 METTLER TOLEDO AX205电子天平 (d=0.01 mg), 检定证书给出的重复性误差为 ±0.02 mg。

单次称量的标准不确定度: $(0.0577^2 + 0.02^2)^{1/2} = 0.0611 \text{ mg}$ 。

每 1片称量的相对标准不确定度为 $0.0611/274.2 = 2.228 \times 10^{-4}$, 则重量差异的相对标准不确定度 $= [20 \times (2.228 \times 10^{-4})^2]^{1/2} = 9.964 \times 10^{-4}$ 。

2.3 不确定度各分量及分析

结果见表 2。

表 2 不确定度各分量的分析结果

Table 2 the analysis results of the measurement uncertainty components)

分量	不确定度来源	分布	类型
$u_{(M_0)}, u_{(M_X)}$	天平示值的不确定度	矩形	B类
	天平称量重复性的不确定度	正态	A类
$u_{(V_0)}, u_{(V_X)}$	校准量瓶的不确定度	三角	B类
	定容重复性的不确定度	正态	A类
	量瓶定容时温差的不确定度	矩形	B类
	对照品溶液进样复现性的不确定度	正态	A类
$u_{(A_0)}$	对照品溶液进样复现性的不确定度	正态	A类
$u_{(AX)}$	供试品溶液进样复现性的不确定度	正态	A类
$u_{(仪器)}$	液相色谱仪引入的不确定度	矩形	B类
$u_{(MP)}$	天平示值的不确定度	矩形	B类

2.4 合成标准不确定度

$u_{(x)}/x = \{ [u_{(AX)}/A_X]^2 + [u_{(M_0)}/M_0]^2 + [u_{(V_X)}/V_X]^2 + [u_{(MP)}/M_P]^2 + [u_{(A_0)}/A_0]^2 + [u_{(V_0)}/V_0]^2 + [u_{(MX)}/M_X]^2 \}^{1/2}$, 即 $u_{(x)} = x \cdot \{ [u_{(AX)}/A_X]^2 + [u_{(M_0)}/M_0]^2 + [u_{(V_X)}/V_X]^2 + [u_{(MP)}/M_P]^2 + [u_{(A_0)}/A_0]^2 + [u_{(V_0)}/V_0]^2 + [u_{(MX)}/M_X]^2 \}^{1/2}$

$$= 89.0 \times [(2.418 \times 10^{-3})^2 + (1.072 \times 10^{-3})^2 + (2.260 \times 10^{-3})^2 + (1.072 \times 10^{-3})^2 + (6.066 \times 10^{-4})^2 + (8.394 \times 10^{-4})^2 + (9.964 \times 10^{-4})^2]^{1/2} = 0.348$$

$$u_x = [u_{(x)}^2 + u_{(仪器)}^2]^{1/2} = [0.348^2 + (4.619 \times 10^{-3})^2]^{1/2} = 0.348$$

2.5 扩展不确定度

$U = k u_x$, k 取 2, $P = 95\%$, $U = 2 \times 0.348\% = 0.70\%$ 。则青霉素 V 钾片中青霉素 V 的标示含量为: $A = (89.0 \pm 0.70)\%$, ($k = 2$)。

3 讨论

由以上的评定可看出,本方法测量结果的不确定度主要来自对照品和供试品的称量的影响,同时和所用的玻璃仪器有关,而其他几个因素的影响较小。因此,在测定样品时,必须严格控制实验条件,并规范实验操作。我们在检测过程

中,有时会遇到一些检品的实际测得含量总是处于标准规定的下限周围,究竟这类产品是判定它合格还是不合格呢?笔者认为应在进行了不确定度分析后才能给出一个确定的答案,只有对实验结果进行不确定度分析以后,才能使测定的结果既准确又科学。

参考文献

- [1] Ch. P(2005) VolIII (中国药典 2005年版.二部) [S]. 2005.
- [2] 中华人民共和国国家计量技术规范 JJF1059-1999,测量不确定度评定与表示 [S].国家质量技术监督局发布.
- [3] JJG196-90,中华人民共和国常用玻璃量器检定规程 [S].国家质量技术监督局发布.

收稿日期: 2007-04-03