

文章编号:1672-058X(2013)01-0081-05

HPLC 法测定片剂中双氢青蒿素含量的不确定度评估

朱 凯

(重庆第二师范学院 生化系,重庆 400067)

摘 要:分析 HPLC 法测定双氢青蒿素哌嗪片中双氢青蒿素含量的不确定度构成及其大小。通过对不确定度分量进行分析和评定,计算含量测定中各条件的合成不确定度和扩展不确定度。最终得出扩展不确定度 $U=0.8 \text{ mg}$ ($k=2$)。HPLC 法测定双氢青蒿素哌嗪片中双氢青蒿素含量的不确定度评估中供试品溶液色谱峰面积所引起的不确定度分量对合成不确定度影响最大。

关键词:不确定度评估;高效液相色谱法;双氢青蒿素

中图分类号:R927.2

文献标志码:A

药品中有效成分的定量分析是药物质量控制的重要研究领域,其定量分析结果是否准确可靠直接决定了药物的安全性和有效性。传统上判定测量结果是否准确,主要是通过测量误差来表示。近些年,国际标准化组织(ISO)制定了《测量不确定度表达指南》,方法能够更客观、准确的评价测定结果的质量,不确定度是测量的重要质量特性之一^[1,2]。在分析测量中,不确定度评价正在成为一种常规要求^[3]。不确定度越小,则测量方法水平越高,其测量的结果使用价值越大。测量的不确定度是定量分析结果中重要组成部分之一,可用于评估定量方法是否可靠,测量结果是否可信。双氢青蒿素哌嗪片为双氢青蒿素和磷酸哌嗪组成的复方片剂,是一种治疗疟疾的优良药物^[4,5]。双氢青蒿素及磷酸哌嗪均为中国药典(2010年版)收载^[6]。对 HPLC 法测定双氢青蒿素哌嗪片中双氢青蒿素含量的不确定度构成进行分析,计算不确定度的大小,为评价 HPLC 法测定片剂含量的结果、提高测定质量提供科学依据和参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Shimadzu LC-2010A 高效液相色谱仪(包括自动进样器),SPD-M10Avp 二极管阵列检测器,CLASS-VP 色谱工作站;Mettler AE240 电子分析天平。

双氢青蒿素哌嗪片(重庆华立控股股份有限公司,每片含双氢青蒿素 40 mg、磷酸哌嗪 0.32 g,批号 20050403),双氢青蒿素对照品(中国药品生物制品检定所,含量 100.0%,批号 100184-200401),乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

(1) 色谱条件与系统适用性试验。色谱柱为 Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-甲醇-0.02 mol/L 硫酸铵(50:10:40,稀硫酸调 pH4.8),流速 1.0 mL/min,检测波长 210 nm,柱温 30 ℃,

收稿日期:2012-09-18;修回日期:2012-10-12。

作者简介:朱凯(1977-),男,重庆人,硕士,讲师,国家执业药师,从事药物分析,药物制剂研究。

进样量 10 μL 。理论板数按双氢青蒿素 α 异构体峰或 β 异构体峰计算均不低于 10 000。

(2) 测定法。取双氢青蒿素哌嗪片 10 片,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于双氢青蒿素 20 mg),置 25 mL 量瓶中,加甲醇约 20 mL,振摇 5 min,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,静置 30 min,作为供试品溶液;另取双氢青蒿素对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.8 mg 的溶液,静置 30 min,作为对照溶液。精密量取供试品溶液与对照溶液各 10 μL ,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以 α 异构体和 β 异构体的峰面积之和计算供试品中双氢青蒿素的含量。

2 测量不确定度的分析

2.1 测量不确定度的构成及相对合成标准不确定度的数学表达式

根据 HPLC 外标法以峰面积计算含量的基本原理,双氢青蒿素哌嗪片中双氢青蒿素含量的数学表达式为:

$$X = \frac{\bar{f} \times A_X \times V_X \times \bar{m}}{m_X} \quad (1)$$

式中, X 为双氢青蒿素哌嗪片中双氢青蒿素的含量(mg/片), \bar{f} 为 HPLC 法的校正因子(mg/mL), A_X 为供试品溶液中双氢青蒿素的峰面积, V_X 为供试品溶液的体积(mL), \bar{m} 为平均片重(g/片), m_X 为供试品重(g)。

由式(1)可知, X 的测量不确定度由彼此独立的 \bar{f} 、 A_X 、 V_X 、 \bar{m} 和 m_X 的测量不确定度构成,即:HPLC 法测定双氢青蒿素哌嗪片中双氢青蒿素含量的相对合成标准不确定度 $u_{\text{rel}}(X)$ 由 $u_{\text{rel}}(\bar{f})$ 、 $u_{\text{rel}}(A_X)$ 、 $u_{\text{rel}}(V_X)$ 、 $u_{\text{rel}}(m_X)$ 和 $u_{\text{rel}}(\bar{m})$ 共 5 个不确定度分量构成,其数学表达式为^[7]:

$$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(\bar{f}) + u_{\text{rel}}^2(A_X) + u_{\text{rel}}^2(V_X) + u_{\text{rel}}^2(m_X) + u_{\text{rel}}^2(\bar{m})} \quad (2)$$

2.2 不确定度分量的评定

2.2.1 HPLC 法校正因子 \bar{f} 的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\bar{f})$

因为 $\bar{f} = \frac{C_S}{A_S}$, 其中 C_S 为对照溶液中双氢青蒿素的浓度(mg/mL), A_S 为对照溶液中双氢青蒿素的峰面积,

则 $u_{\text{rel}}(\bar{f}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(C_S) + u_{\text{rel}}^2(A_S)}$ 。

2.2.1.1 对照溶液浓度的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_S)$

由于 $C_S = \frac{m_S \times P}{V_S}$, 其中 m_S 为对照品重(mg), P 为对照品纯度(%), V_S 为对照溶液的体积(mL), 所以 $u_{\text{rel}}(C_S)$ 来源于对照品称量的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m_S)$ 、对照品纯度的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(P)$ 和对照溶液体积的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_S)$ 。

(1) 对照品称量的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m_S)$ 。主要来自天平精度的标准不确定度 $u_1(m_S)$ 和天平称量重复性的标准不确定度 $u_2(m_S)$ 。

① 天平精度的标准不确定度 $u_1(m_S)$ 。从天平校准证书查得,所用量程范围内天平的精度为 0.01 mg。按矩形分布计算,取包含因子 $k = \sqrt{3}$, 则 $u_1(m_S) = \frac{0.01 \text{ mg}}{\sqrt{3}} = 5.8 \times 10^{-3} \text{ mg}$ 。

② 天平称量重复性的标准不确定度 $u_2(m_S)$ 。从天平校准证书查得,所用天平的重复性(标准偏差)为 0.02 mg, 则 $u_2(m_S) = s(m_S) = 2 \times 10^{-2} \text{ mg}$ 。

因对照溶液含对照品 20.93 mg, 故对照品称量的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m_S) = \frac{\sqrt{u_1^2(m_S) + u_2^2(m_S)}}{m_S} = \frac{\sqrt{(5.8 \times 10^{-3} \text{ mg})^2 + (2 \times 10^{-2} \text{ mg})^2}}{20.93 \text{ mg}} = 9.9 \times 10^{-4}$$

(2) 对照品纯度的相对标准不确定度 $u_{rel}(P)$ 。由于双氢青蒿素对照品的纯度为 100.0%, 即分散区间半宽 $a=0.05\%$, 纯度 $p=0.9995 \pm 0.0005$ 。按矩形分布计算, 取包含因子 $k=\sqrt{3}$, 则对照品纯度的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(P) = \frac{0.0005/\sqrt{3}}{0.9995} = 2.9 \times 10^{-4}$$

(3) 对照溶液体积的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_S)$ 。主要来自量瓶体积的标准不确定度 $u_1(V_S)$ 、定容重复性的标准不确定度 $u_2(V_S)$ 和溶液温度与量瓶校正温度不同引起的标准不确定度 $u_3(V_S)$ 。

① 量瓶体积的标准不确定度 $u_1(V_S)$ 。查表^[2]得, A级 25 mL 量瓶的最大允许误差 MPE 为 ± 0.03 mL。按矩形分布计算, 取包含因子 $k=\sqrt{3}$, 则 $u_1(V_S) = \frac{\text{MPE}}{k} = \frac{0.03 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.02 \text{ mL}$ 。

② 定容重复性的标准不确定度 $u_2(V_S)$ 。将 A 级 25 mL 量瓶用溶液定容, 精密称定, 重复操作 10 次, 则标准偏差 $s(V_S)=0.01$ mL, 故 $u_2(V_S)=s(V_S)=0.01$ mL。

③ 溶液温度与量瓶校正温度不同引起的标准不确定度 $u_3(V_S)$ 。溶液温度 $T_t=26$ °C, 量瓶校正温度 $T_0=20$ °C, 查得甲醇和玻璃的体积膨胀系数分别为 $\alpha_{\text{醇}}=1.19 \times 10^{-3}$ 和 $\alpha_{\text{玻}}=1.5 \times 10^{-5}$, 故 25 mL 量瓶因温度不同产生的体积变化^[2] $\Delta V = (\alpha_{\text{醇}} - \alpha_{\text{玻}}) \times V_{20} \times (T_t - T_0) = (1.19 \times 10^{-3} - 1.5 \times 10^{-5}) \times 25 \times (26 - 20) = 0.18$ mL。按矩形分布计算, 取包含因子 $k=\sqrt{3}$, 则 $u_3(V_S) = \frac{\Delta V}{k} = \frac{0.18 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.10 \text{ mL}$ 。

故对照溶液体积的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_S) = \frac{\sqrt{u_1^2(V_S) + u_2^2(V_S) + u_3^2(V_S)}}{V_S} = \frac{\sqrt{(0.02 \text{ mL})^2 + (0.01 \text{ mL})^2 + (0.10 \text{ mL})^2}}{25 \text{ mL}} = 4.1 \times 10^{-3}$$

因此, 对照溶液浓度的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(C_S) = \sqrt{u_{rel}^2(m_S) + u_{rel}^2(P) + u_{rel}^2(V_S)} = \sqrt{(9.9 \times 10^{-4})^2 + (2.9 \times 10^{-4})^2 + (4.1 \times 10^{-3})^2} = 4.2 \times 10^{-3}$$

2.2.1.2 对照溶液色谱峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_S)$

对照溶液连续进样 10 次, 测得峰面积为: 251 638, 250 540, 249 386, 251 880, 252 519, 251 173, 248 497, 250 321, 251 707, 250 892。计算得, 均值为 250 855, 标准偏差 $s(A_S)=1 219$, 则 $u(A_S)=s(A_S)=1 219$ 。

测定校正因子 f 时, 对照溶液平行进样 6 次, 测得峰面积为: 253 656, 253 483, 251 628, 251 880, 252 519 和 251 707。故对照溶液色谱峰面积的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(A_{S1}) = \frac{u(A_S)}{A_{S1}} = \frac{1 219}{253 656} = 4.8 \times 10^{-3}$$

同理计算 $u_{rel}(A_{S2}), u_{rel}(A_{S3}), u_{rel}(A_{S4}), u_{rel}(A_{S5})$ 和 $u_{rel}(A_{S6})$, 均为 4.8×10^{-3} 。

所以, $u_{rel}(f) = \sqrt{u_{rel}^2(C_S) + u_{rel}^2(A_S)} = \sqrt{(4.2 \times 10^{-3})^2 + (4.8 \times 10^{-3})^2} = 6.4 \times 10^{-3}$ 。

因为 $f_1 = \frac{C_S}{A_{S1}} = \frac{20.93 \text{ mg}/25 \text{ mL}}{253 656} = 3.3 \times 10^{-6} \text{ mg/mL}$, 则 $u(f_1) = f_1 \times u_{rel}(f) = (3.3 \times 10^{-6} \text{ mg/mL}) \times (6.4 \times 10^{-3}) = 2.1 \times 10^{-8} \text{ mg/mL}$; 同理计算 $u(f_2), u(f_3), u(f_4), u(f_5)$ 和 $u(f_6)$, 均为 $2.1 \times 10^{-8} \text{ mg/mL}$ 。则有^[7]:

$$u(\bar{f}) = \sqrt{\left(\frac{1}{6}\right)^2 \times [u^2(f_1) + u^2(f_2) + u^2(f_3) + u^2(f_4) + u^2(f_5) + u^2(f_6)]} =$$

$$\sqrt{\left(\frac{1}{6}\right)^2 \times 6 \times (2.1 \times 10^{-8} \text{ mg/mL})^2} = 8.6 \times 10^{-9} \text{ mg/mL}$$

又因为 $\bar{f} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n f_i = 3.3 \times 10^{-6} \text{ mg/mL}$, 故 HPLC 法校正因子的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(\bar{f}) = \frac{u(\bar{f})}{\bar{f}} = \frac{8.6 \times 10^{-9} \text{ mg/mL}}{3.3 \times 10^{-6} \text{ mg/mL}} = 2.6 \times 10^{-3}$$

2.2.2 供试品溶液色谱峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_X)$

供试品溶液平行进样 2 次, 测得峰面积为 243 799 和 241 057, 均值 $A_X = 242 428$, 极差 $R = 2 742$ 。当平行测定次数 $n = 2$ 时, 查得^[7]极差系数 $C = 1.13$, 则 $u(A_X) = \frac{R}{C} = \frac{2 742}{1.13} = 2.4 \times 10^3$, 故供试品溶液色谱峰面积的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(A_X) = \frac{u(A_X)}{A_X} = \frac{2.4 \times 10^3}{242 428} = 9.9 \times 10^{-3}$$

2.2.3 供试品溶液体积的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_X)$

供试品溶液的体积为 25 mL。按“2.2.1.1 对照溶液体积的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_S)$ ”项下计算, 供试品溶液体积的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(V_X) = 4.1 \times 10^{-3}$$

2.2.4 供试品称量的相对标准不确定度 $u_{rel}(m_X)$

供试品溶液中, 供试品重 0.265 1 g。按“2.2.1.1 对照品称量的相对标准不确定度 $u_{rel}(m_S)$ ”项下计算, 供试品称量的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(m_X) = 7.9 \times 10^{-5}$$

2.2.5 供试品平均片重的相对标准不确定度 $u_{rel}(\bar{m})$

2.2.5.1 天平精度的标准不确定度 $u_1(\bar{m})$

按“2.2.1.1 天平精度的标准不确定度 $u_1(m_S)$ ”项下计算, $u_1(\bar{m}) = 5.8 \times 10^{-3} \text{ mg}$ 。

2.2.5.2 称量重复性的标准不确定度 $u_2(\bar{m})$

按“2.2.1.1 称量重复性的标准不确定度 $u_2(m_S)$ ”项下计算, $u_2(\bar{m}) = 2 \times 10^{-2} \text{ mg}$ 。

2.2.5.3 片重差异的标准不确定度 $u_3(\bar{m})$

根据中国药典(2010 年版)二部附录 I A 片剂重量差异检查法^[6], 取供试品 20 片, 精密称定, 每片的重量分别为 0.530 3, 0.530 7, 0.532 8, 0.526 4, 0.529 7, 0.530 4, 0.534 1, 0.527 3, 0.528 3, 0.531 4, 0.528 0, 0.527 3, 0.535 9, 0.529 7, 0.532 4, 0.534 1, 0.529 9, 0.531 4, 0.526 3 g 和 0.5264 g。计算得, 平均片重 $\bar{m} = 0.530 1 \text{ g}$, 标准偏差 $s(\bar{m}) = 2.7 \text{ mg}$, 则片重差异的标准不确定度为^[8]:

$$u_3(\bar{m}) = \frac{s(\bar{m})}{\sqrt{n}} = \frac{2.7 \text{ mg}}{\sqrt{20}} = 6.0 \times 10^{-1} \text{ mg}$$

因此, 供试品平均片重的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(\bar{m}) = \frac{\sqrt{u_1^2(\bar{m}) + u_2^2(\bar{m}) + u_3^2(\bar{m})}}{\bar{m}} = \frac{\sqrt{(5.8 \times 10^{-6} \text{ g})^2 + (2 \times 10^{-5} \text{ g})^2 + (6.0 \times 10^{-4} \text{ g})^2}}{0.530 1 \text{ g}} = 1.2 \times 10^{-3}$$

2.3 合成不确定度的评定

根据式(2), 供试品中双氢青蒿素含量测定的相对合成标准不确定度为:

$$u_{rel}(X) = \sqrt{u_{rel}^2(f) + u_{rel}^2(A_X) + u_{rel}^2(V_X) + u_{rel}^2(m_X) + u_{rel}^2(\bar{m})} =$$

$$\sqrt{(2.6 \times 10^{-3})^2 + (9.9 \times 10^{-3})^2 + (4.1 \times 10^{-3})^2 + (7.9 \times 10^{-5})^2 + (1.2 \times 10^{-3})^2} = 1.1 \times 10^{-2}$$

因为双氢青蒿素含量测定结果 $X = 40.1 \text{ mg}$, 故合成标准不确定度为:

$$u_c(X) = X \times u_{rel}(X) = 40.1 \text{ mg} \times (1.1 \times 10^{-2}) = 0.4 \text{ mg}$$

2.4 扩展不确定度的评定

按 95% 置信概率, 取包含因子 $k = 2$, 实验扩展不确定度为:

$$U = k \times u_c(X) = 2 \times 0.4 \text{ mg} = 0.8 \text{ mg}$$

3 结 论

根据以上不确定度的评估计算, 双氢青蒿素哌嗪片中双氢青蒿素的含量测定结果可表示为 $X \pm U$, 即 $40.1 \text{ mg} \pm 0.8 \text{ mg}$ 。

HPLC 法测定供试品中双氢青蒿素含量的不确定度分量及其权重见表 1。

表 1 不确定度分量及其权重

Factors	u_{rel}	u_{rel}^2	%
\bar{f}	2.6×10^{-3}	6.76×10^{-6}	5.5
A_X	9.9×10^{-3}	9.80×10^{-5}	79.7
V_X	4.1×10^{-3}	1.68×10^{-5}	13.6
m_X	7.9×10^{-5}	6.24×10^{-9}	0.0
\bar{m}	1.2×10^{-3}	1.44×10^{-6}	1.2
Total	1.8×10^{-2}	1.23×10^{-4}	100.0

从表 1 可看出, HPLC 法测定双氢青蒿素哌嗪片中双氢青蒿素含量的不确定度由彼此独立的 \bar{f} 、 A_X 、 V_X 、 \bar{m} 和 m_X 的不确定度分量构成。其中, 供试品溶液色谱峰面积 A_X 所引起的不确定度分量对合成不确定度影响最大。

参考文献:

- [1] LEITO S, MÖLDER K, KÜNNAPAS, et al. Uncertainty in liquid chromatographic analysis of pharmaceutical product: Influence of various uncertainty sources [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 121(1):55-63
- [2] 李慎安, 王玉莲, 范巧成. 化学实验室测量不确定度[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007
- [3] ELLISON S L R, ROSSLEIN M, WILLIAMS A. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement[M]. Berlin: Eurachem, 2000
- [4] 国家食品药品监督管理局药品标准[S]. WS-899 (X-664)-2002
- [5] 宋建平. 双氢青蒿素哌嗪复方治疗无并发症恶性疟的临床观察[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(12):1099-1100
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010
- [7] 国家质量技术监督局. 测量不确定度评定与表示[M]. 北京: 中国计量出版社, 1999
- [8] 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):706-708

(下转第 99 页)