

紫外分光光度法测定维生素 B₁ 注射液含量的不确定度评价

马秋冉,张璐,董玲玲,杨星,赵富华,于晓辉*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-07-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 11-0040-04 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为建立紫外分光光度法测定维生素 B₁ 注射液含量的不确定度评价方法,利用数学模型分析溶液配置过程和仪器测定过程的不确定度来源,并对各分量进行评价,最后计算了扩展不确定度并给出测量不确定度报告。维生素 B₁ 注射液含量测定结果可表示为 $(93.9 \pm 0.9)\%$ ($k=2$)。测量结果不确定度的主要来源为紫外分光光度计和小容量量器。

[关键词] 不确定度;维生素 B₁ 注射液;紫外分光光度法

Evaluate the Uncertainty of Determination the Content of Vitamin B₁ Injection by Ultraviolet Spectrophotometry

MA Qiu-ran, ZHANG Lu, DONG Ling-ling, YANG Xing, ZHAO Fu-hua, YU Xiao-hui*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Establish a method for evaluate the uncertainty of determination the content of vitamin B₁ injection by UV method. A mathematical model of uncertainty of Vitamin B₁ injection was established and the uncertainty of each variable was calculated, at last calculated the expanded uncertainty and showed the report of uncertainty of determination. The result of content determination can be expressed as $(93.9 \pm 0.9)\%$ ($k=2$). The main sources of measurement uncertainty were ultraviolet spectrophotometry and small capacity measuring vessel.

Key words: uncertainty; vitamin B₁ injection; ultraviolet spectrophotometry

药品检测结果是出具检验报告的主要依据,其准确性和可靠性至关重要,但由于测量本身的不确定性,导致检验中无法获知其真值,所能提供的测量值只能是当前检测水平下的一个最佳估计值。因此,使检测结果更准确,检验结论更科学、可靠,是我们药检工作所追求的目标。

测量不确定度是表征合理地赋予被测值的分

散性,与测量结果相关联的参数^[1]。它是被测客观值在某一量值范围内的一个评定,是对测量结果与水平的定量表征,其大小表征了被测值的可信度。对测量结果临界值的判断、检测方法的确和测量结果与国际接轨具有重要意义。试验根据 CNAS-G106:2006《化学分析中不确定度的评估指南》及相关规定^[2-4],并参考相关文献^[5-7],对紫外分光

作者简介:马秋冉,硕士,从事化学药品检验检测工作。

通讯作者:于晓辉。E-mail:yuxiaohui@ivdc.org.cn

光度法测定维生素 B₁ 注射液含量的不确定度进行评估, 分析影响不确定度的各因素, 为优化试验方法及准确认识测量结果提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 紫外分光光度计(普析通用, TU-1901); 电子天平(METTLER TOLEDO, AT201); 200 mL 单标线容量瓶(A级); 100 mL 单标线容量瓶(A级); 2 mL 单标线移液管(A级); 5 mL 单标线移液管(A级); 盐酸溶液: 量取 9 mL 盐酸(批号: 20150930, 国药集团化学试剂有限公司)置 1000 mL 单标线容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。维生素 B₁ 注射液(批号: 20160101, 规格: 10 mL: 250 mg)。

1.2 样品测定方法 取 3 支供试品混匀, 精密量取 2 mL(约相当于维生素 B₁ 50 mg), 置 200 mL 单标线容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 5 mL, 置 100 mL 单标线容量瓶中, 用盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀。照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 年版附录 26 页), 在 246 nm 的波长处测定吸光度, 按 C₁₂H₁₇ClN₄OS·HCl 的吸光系数($E_{1cm}^{1\%}$)为 421 计算, 即得。紫外室温度: 26 ℃, 实验室温度: 26 ℃。

1.3 数学模型 本试验数学模型为:

$$X = \frac{\frac{A}{\frac{V_1 \times \text{规格}}{V_3} \times \frac{V_2}{V_4} \times 100}}{E_{1cm}^{1\%}} \times 100\%}{\frac{A \times V_3 \times V_4}{V_1 \times V_2 \times \text{规格} \times 100 \times E_{1cm}^{1\%}}} \times 100\%$$

式中: X 为供试品中维生素 B₁ 占标示量的百分含量(%); A 为供试品溶液的吸光度; V₁ 和 V₂ 分别为 2 和 5 mL 单标线移液管的体积, mL。V₃ 和 V₄ 分别为 200 mL 单标线容量瓶和 100 mL 单标线容量瓶的体积, mL。 $E_{1cm}^{1\%}$ 为维生素 B₁ 的吸收系数; 规格为 0.025 g/mL。

2 结果与分析

2.1 测量不确定度主要来源及分析 测量过程中不确定度的来源主要有以下三个方面(图 1): (1)

供试品溶液配制过程的不确定度($V_1/V_2/V_3/V_4$); (2) 供试品溶液吸光度(A)的不确定度; (3) 维生素 B₁ 吸收系数($E_{1cm}^{1\%}$)的不确定度。

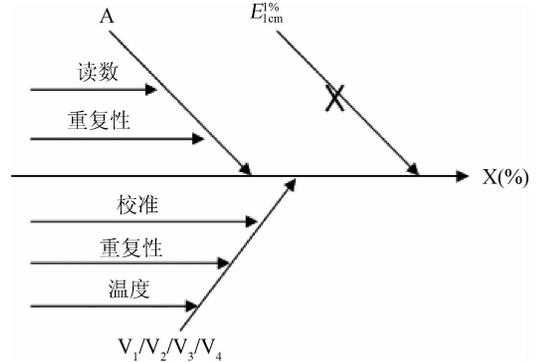


图 1 测量不确定度来源

2.2 最佳估值 测量结果即为被测量的最佳估值。本试验最佳估值为 93.9%; 其中 $A = 0.494$, $V_1 = 2$ mL, $V_2 = 5$ mL, $V_3 = 200$ mL, $V_4 = 100$ mL, 规格为 0.025 g/mL, $E_{1cm}^{1\%} = 421$ 。

2.3 不确定度分析与评价

2.3.1 供试品溶液配制过程的不确定度 供试品溶液配制过程的不确定度主要由 4 种分量组成: (1) 2 mL 单标线移液管的不确定度; (2) 5 mL 单标线移液管的不确定度; (3) 200 mL 单标线容量瓶的不确定度; (4) 100 mL 单标线容量瓶的不确定度。

2.3.1.1 单标线移液管的不确定度 单标线移液管的标准不确定度主要受三种因素影响: ①玻璃量具校准的不确定度 $u(V_{11})$ 、 $u(V_{21})$: 2、5 mL 单标线移液管经检定均为 A 级, 其容量允差分别为 ± 0.010 、 ± 0.015 , 属于 B 类不确定度, 按三角分布估计, 则标准不确定度分别为: $u(V_{11}) = 0.01/\sqrt{6} = 4.08 \times 10^{-3}$ mL、 $u(V_{21}) = 0.015/\sqrt{6} = 6.12 \times 10^{-3}$ mL。②重复性的不确定度 $u(V_{12})$ 、 $u(V_{22})$: 属于 A 类不确定度, 分别采用同一 2、5 mL 单标线移液管吸取 2、5 mL 水放入量瓶, 称重, 重复操作 10 次, 用贝塞尔公式法评定, 得到标准偏差分别为: 4.16×10^{-3} mL、 2.79×10^{-3} mL, 可直接用作标准不确定度, 即 $u(V_{12}) = 4.16 \times 10^{-3}$ mL、 $u(V_{22}) = 2.79 \times 10^{-3}$ mL。③温度

的不确定度 $u(V_{13})$ 、 $u(V_{23})$ ：属于 B 类不确定度，容量器皿校准温度为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，实验室温度为 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，在 $(20 \pm 6)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内变化近似矩形分布，水的膨胀系数为 2.1×10^{-4} ，则标准不确定度分别为：

$u(V_{13}) = 2 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 6 / \sqrt{3} = 1.45 \times 10^{-3}\text{ mL}$ 、
 $u(V_{23}) = 5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 6 / \sqrt{3} = 3.64 \times 10^{-3}\text{ mL}$ 。
 将上述各分量合成得： 2 mL 单标线移液管标准不确定度为：

$$u(V_1) = \sqrt{u^2(V_{11}) + u^2(V_{12}) + u^2(V_{13})}$$

$$= \sqrt{(4.08 \times 10^{-3})^2 + (4.16 \times 10^{-3})^2 + (1.45 \times 10^{-3})^2} = 6.00 \times 10^{-3}\text{ mL}$$

相对标准不确定度为： $u_{\text{rel}}(V_1) = \frac{u(V_1)}{2} = 3.00 \times 10^{-3}$ 。 5 mL 单标线移液管标准不确定度为：

$$u(V_2) = \sqrt{u^2(V_{21}) + u^2(V_{22}) + u^2(V_{23})}$$

$$= \sqrt{(6.12 \times 10^{-3})^2 + (2.79 \times 10^{-3})^2 + (3.64 \times 10^{-3})^2} = 7.65 \times 10^{-3}\text{ mL}$$

相对标准不确定度为： $u_{\text{rel}}(V_2) = \frac{u(V_2)}{5} = 1.53 \times 10^{-3}$ 。

2.3.1.2 单标线容量瓶的不确定度 单标线容量瓶的标准不确定度主要受三种因素影响：①玻璃量具校准的不确定度 $u(V_{31})$ 、 $u(V_{41})$ ： 200 、 100 mL 单标线容量瓶经检定均为 A 级，其容量允差分别为 ± 0.15 、 ± 0.10 ，属于 B 类不确定度，按三角分布估计，则标准不确定度分别为： $u(V_{31}) = 0.15 / \sqrt{6} = 6.12 \times 10^{-2}$ 、 $u(V_{41}) = 0.10 / \sqrt{6} = 4.08 \times 10^{-2}\text{ mL}$ 。②重复性的不确定度 $u(V_{32})$ 、 $u(V_{42})$ ：属于 A 类不确定度，分别将同一 200 、 100 mL 单标线容量瓶用水充至刻度，称重，重复操作 10 次，用贝塞尔公式

法评定，得到标准偏差分别为： 2.81×10^{-2} 、 $3.42 \times 10^{-2}\text{ mL}$ ，可直接用作标准不确定度，即 $u(V_{32}) = 2.81 \times 10^{-2}\text{ mL}$ 、 $u(V_{42}) = 3.42 \times 10^{-2}\text{ mL}$ 。③温度的不确定度 $u(V_{33})$ 、 $u(V_{43})$ ：容量器皿校准温度为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，实验室温度为 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，在 $(20 \pm 6)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内变化近似矩形分布，水的膨胀系数为 2.1×10^{-4} ，其标准不确定度分别为： $u(V_{33}) = 200 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 6 / \sqrt{3} = 1.45 \times 10^{-1}\text{ mL}$ 、 $u(V_{43}) = 100 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 6 / \sqrt{3} = 7.27 \times 10^{-2}\text{ mL}$ 。上述各分量合成得 200 mL 单标线容量瓶标准不确定度为：

$$u(V_3) = \sqrt{u^2(V_{31}) + u^2(V_{32}) + u^2(V_{33})}$$

$$= \sqrt{(6.12 \times 10^{-2})^2 + (2.81 \times 10^{-2})^2 + (1.45 \times 10^{-1})^2} = 1.60 \times 10^{-1}\text{ mL}$$

相对不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_3) = \frac{u(V_3)}{200} = 8.00 \times 10^{-4}$ 。 100 mL 单标线容量瓶标准不确定度为：

$$u(V_4) = \sqrt{u^2(V_{41}) + u^2(V_{42}) + u^2(V_{43})}$$

$$= \sqrt{(4.08 \times 10^{-2})^2 + (3.42 \times 10^{-2})^2 + (7.27 \times 10^{-2})^2} = 9.01 \times 10^{-2}\text{ mL}$$

相对不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_4) = \frac{u(V_4)}{100} = 9.01 \times 10^{-4}$ 。

2.3.1.3 供试品溶液配制过程的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$ 由以上 4 种分量合成得：

$$u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_1) + u_{\text{rel}}^2(V_2) + u_{\text{rel}}^2(V_3) + u_{\text{rel}}^2(V_4)}$$

$$= \sqrt{(3.00 \times 10^{-3})^2 + (1.53 \times 10^{-3})^2 + (8.00 \times 10^{-4})^2 + (9.01 \times 10^{-4})^2} = 3.58 \times 10^{-3}$$

2.3.2 供试品溶液吸光度的不确定度 供试品溶液吸光度引起的不确定度主要受两种因素影响：①紫外

分光光度计读数的不确定度 $u(A_1)$ ；②紫外分光光度计测量重复性的不确定度 $u(A_2)$ 。根据本试验中所用

紫外分光光度计(TU-1901)的检定证书可知,其示值误差的最大值为0.3%,示值重复性误差的最大值为0.1%,对这两项的不确定度分别计算(按95%置信概率计算),然后合成即得供试品溶液吸光度引起的不确定度: $u(A_1) = 0.003 \div 1.96 = 1.53 \times 10^{-3}$, $u(A_2) = 0.001 \div 1.96 = 5.10 \times 10^{-4}$ 。合成得:

$$u(A) = \sqrt{u^2(A_1) + u^2(A_2)} =$$

$$\sqrt{(1.53 \times 10^{-3})^2 + (5.10 \times 10^{-4})^2} = 1.61 \times 10^{-3}$$

相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(A) = u(A) \div 0.494 =$

$$3.26 \times 10^{-3}。$$

2.3.3 吸收系数引起的不确定度 维生素 B₁ 的吸收系数 421 由测定标准提供,其不确定度可忽略不计,即 $u_{\text{rel}}(E_{1\text{cm}}^{1\%}) = 0$

2.3.4 计算合成标准不确定度 $u(X)$ 合成标准不确定度是测定结果标准差的估计值,是将所有测量不确定度分量合成为总体方差的正平方根。根据本试验中各分量相对标准不确定度(表1),计算合成相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V) + u_{\text{rel}}^2(A) + u_{\text{rel}}^2(E_{1\text{cm}}^{1\%})} = \sqrt{(3.58 \times 10^{-3})^2 + (3.26 \times 10^{-3})^2 + (0)^2} = 4.84 \times 10^{-3}。$$

试验测得维生素 B₁ 注射液的百分含量 $X = 93.9\%$, 则合成标准不确定度为 $u(X) = u_{\text{rel}}(X) \times 93.9\% = 4.84 \times 10^{-3} \times 93.9\% = 0.45\%$ 。

表1 各分量相对标准不确定度一览表

分量	不确定度来源	分布	类型	相对标准不确定度
$u_{\text{rel}}(V)$	校准	三角	B类	3.58×10^{-3}
	重复性	正态	A类	
	温度	矩形	B类	
$u_{\text{rel}}(A)$	读数	矩形	B类	3.26×10^{-3}
	量重复性	正态	A类	
$u_{\text{rel}}(E_{1\text{cm}}^{1\%})$	/	/	/	0

2.3.5 扩展不确定度与测量不确定度报告 测量结果以测定值 \pm 扩展不确定度表示,扩展不确定度为合成标准不确定度与包含因子的乘积,即 $U = k \cdot u(X) = 2 \times 0.45\% = 0.9\%$ (包含因子 $k = 2$, 置信区间为 95%), 因此,最终结果可表示为 $(93.9 \pm 0.9)\%$, $k = 2$ 。

3 讨论与小结

测量不确定的计算,是以可能带入不确定度的各试验环节作为分量,再将各分量的相对标准不确定度加合而成。因此,反过来,通过比较各分量的相对标准不确定度大小,可发现对检测结果影响程度较大的试验环节,进而重点控制该环节的不确定度来源,从而为进一步提高检验结果的准确性奠定基础。

通过上述评定过程可知,测定维生素 B₁ 注射液含量的不确定度主要源于吸光度的测定和小容量量器的使用。吸光度测定的不确定度可通过选用精度高、性能先进的仪器,对仪器进行定期维护,期间核查以及送计量机构检测和校准,提高检验人员对仪器性能、操作规程的掌握程度等方法来降低。小容量量器的不确定度,可通过控制实验室温度尽可能接近校准温度或选用 A 级大容量量器来降低。

引入测量不确定度后,检测结果不再是单一数值,而变为被测值可能分布的区间范围,由“检测值 \pm 扩展不确定度(U)”表示,此时将检测结果与限值比较,会出现 3 种情况:①“检测值 $\pm U$ ”不在限值内,则检测结果判定为不合格。②“检测值 $\pm U$ ”在限值内,则检测结果判定为合格。③“检测值 $\pm U$ ”横跨在限值两侧,则检测结果判定存在不确定性,具有一定风险。此时应重点关注,首先可通过选择更有经验的人员重复检验,确保检测结果的准确性。如反复验证后,“检测值 $\pm U$ ”仍横跨在限值两侧,这种情况该如何判定,目前未有明确规定。有文献^[8]认为比较稳妥的办法是判定为符合规定的同时给出风险提示。所以,只有当“检测值 $\pm U$ ”不在限值内时,才判定为不符合规定,这样可避免将可能合格的结果误判为不合格,从而有效提高检验结论的科学性和可靠性。

参考文献:

- [1] 国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家计量技术规范 JJF1059-2012 测量不确定度评定与表示[S].
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL06 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京:中国计量出版社,2006:34.
- [3] 中国兽药典委员会. 《中华人民共和国兽药典》2010 年版[S].
- [4] 国家质量监督检验检疫总局. JJG196-2006 常用玻璃量器检定规定[S].
- [5] 于晓辉,董玲玲,马秋冉,等. 紫外吸收系数法测定阿苯达唑片含量的不确定度[J]. 中国饲料,2011,15:25-27.
- [6] 李秀珍,刘凤琴,吕光宇,等. 紫外分光光度法测定维生素 B₁₂ 注射液含量的不确定度分析[J]. 齐鲁药事,2012,31(2):90-91.
- [7] 杨锡洋. 紫外-可见分光光度法测定药物含量不确定度评定[J]. 安徽医药,2008,12(1):29-30.
- [8] 赵昕,温瑞卿,王鑫,等. 不确定度评估在双黄连口服液定量检测中的应用探讨[J]. 中国药事,2015,29(9):951-957.