

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.01.09

金苓芍注射液含量测定的不确定度分析

张璐, 龚旭昊, 范强*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-06-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 01-0056-07 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了探讨金苓芍注射液含量测定的不确定度分析评定, 通过分析测量过程, 建立数学模型, 确定不确定度来源, 评价各标准不确定度分量合成标准不确定度, 评定扩展不确定度, 给出不确定度评定结果报告。金苓芍注射液含量测定结果可表示为 (2.96 ± 0.04) mg/mL ($k=2$)。测量结果不确定度的主要来源为天平称量、高效液相色谱仪和小体积玻璃量具。

[关键词] 不确定度; 金苓芍注射液; 高效液相色谱法

Evaluate the Uncertainty of Content Determination of Jinqinshao Injection

ZHANG Lu, GONG Xu-hao, FAN Qiang*

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

Corresponding author: FAN Qiang, E-mail: fanqiang@ivdc.org.cn

Abstract: Evaluate the uncertainty of content determination of Jinqinshao Injection. The effects on measuring are discussed, a mathematical model of uncertainty of Jinqinshao Injection was established, 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 (2.96 ± 0.04) mg/mL ($k=2$). The main sources of measurement uncertainty were balance range, high performance liquid chromatography and small capacity measuring vessel.

Key words: uncertainty; Jinqinshao Injection; high performance liquid chromatography

在进行兽药检验时, 检验环境的变化、仪器的限制、方法的不完善及操作的不规范等, 使检验结果产生误差。正确表达含有误差的检验结果及评价检验结果的可信程度, 可使检验结果更准确, 检验结论更科学可靠。

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性, 与测量结果相联系的参数, 用来定量表

示测量结果的可信程度^[1]。测量不确定度对测量结果临界值的判断、检测方法的确证和测量结果与国际接轨具有重要意义。试验根据 CNAS-GL06: 2006《化学分析中不确定度的评估指南》及相关规定^[2], 参考相关文献, 对高效液相色谱法测定金苓芍注射液含量的不确定度进行评价^[3], 探讨其在中药注射剂定量检验中的应用, 提高检验结论的准确

作者简介: 张璐, 从事中兽药的检验和研究工作。

通讯作者: 范强。E-mail: fanqiang@ivdc.org.cn

性和科学性。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪 (Waters e2695, 2489UV/Vis Detector); 电子天平 (METTLER TOLEDO, XS205); 250 mL 单标线容量瓶 (A 级); 25 mL 单标线容量瓶 (A 级); 5 mL 单标线移液管 (A 级); 乙腈 (色谱级, 默克公司); 0.4% 磷酸水溶液: 量取 4 mL 磷酸 (批号: 20161215, 国药集团化学试剂有限公司) 置试剂瓶中, 加水至 1000 mL, 摇匀。绿原酸对照品 (批号: Z0261702, 98.3%, 中国兽医药品监察所); 金苓芍注射液 (批号: 20160701, 规格: 10 mL)。

1.2 色谱条件 色谱柱: XBridge™ C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4% 磷酸水 (13 : 87); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 327 nm。

1.3 对照品溶液的制备 取绿原酸对照品 12.50

mg, 精密称定, 置 250 mL 容量瓶中, 加流动相适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

1.4 供试品溶液的制备 取 3 支供试品混匀^[4], 精密量取 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

1.5 数学模型 本试验数学模型为:

$$C_x = \frac{A_x \times W \times p \times V_2}{A_s \times V_s \times V_1}$$

式中: C_x 为供试品中绿原酸的浓度; A_x 为供试品溶液的峰面积; A_s 为对照品溶液的峰面积; W 为对照品的称样量 (mg); p 为对照品的纯度; V_s 为对照品溶液的体积 (mL); V_1 为供试品的量取体积 (mL); V_2 为供试品的定容体积 (mL)。

1.6 测定步骤分析及结果计算模型 在上述条件下, 分别测定供试品溶液与对照品溶液, 并按公式计算绿原酸含量。具体步骤如图 1。

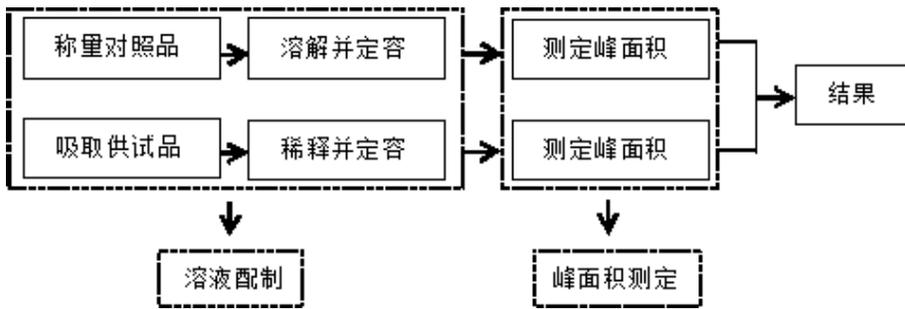


图 1 金苓芍注射液含量测定试验步骤

Fig 1 Steps of mensuration of the content of Jinqinshao Injection

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 2): (1) 对照品称量过程引入的不确定度 (W); (2) 供试品溶液、对照品溶液配制过程引入的不确定度 ($V_1/V_2, V_s$); (3) 供试品溶液、对照品溶液峰面积测定引入的不确定度 (A_x, A_s)。中国兽医药品监察所提供该批绿原酸对照品的纯度为 98.3%, 但未提供其不确定度的信息, 结合查阅文献结果可知, 对照品纯度的不确定度对试验结果影响可忽略不计, 故本

文不予评定。

2.2 量化不确定度分量

2.2.1 对照品称量过程的不确定度 $u(W)$ 分析天平 (型号 XS205) 的检定证书标明, 在 0.01 mg 档, 其示值误差为 0.09 mg, 重复性标准偏差为 0.07 mg。上述两项限值没有给定置信水平, 认为是极限值^[5]。假定其为矩形均匀分布 ($k = \sqrt{3}$), 按照矩形均匀分布公式评定上述两项不确定度: $u_1(W) = \frac{0.09}{\sqrt{3}} = 5.20 \times 10^{-2}$ mg, $u_2(W) = \frac{0.07}{\sqrt{3}} = 4.04 \times 10^{-2}$ mg

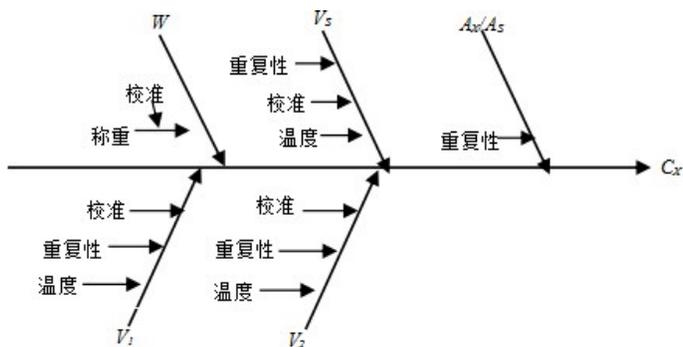


图 2 测量不确定度来源

Fig 2 The source of measurement uncertainty

称量采用减重法进行,2 次读数独立而不相关,故天平的示值误差应计算 2 次,所以对对照品称量过程中引入的标准不确定度为:

$$u(W) = \sqrt{u_1(W)^2 \times 2 + u_2(W)^2}$$

$$= \sqrt{(5.20 \times 10^{-2})^2 \times 2 + (4.04 \times 10^{-2})^2} = 8.39 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

相对标准不确定度为: $u_{rel}(W) = \frac{u(W)}{12.50} = 6.71 \times 10^{-3}$

2.2.2 对照品溶液配制过程的不确定度 $u(V_s)$

对照品溶液配制过程的不确定度主要源于 250 mL 单标线容量瓶的不确定度,其不确定度主要源自三个因素:①玻璃量具校准的不确定度 $u(V_{s1})$: 250 mL 单标线容量瓶经检定 A 级,其容量允差为 $\pm 0.15^{[6]}$,属于 B 类不确定度,按三角分布估计,则标准不确定度为: $u(V_{s1}) = 0.15/\sqrt{6} = 6.12 \times 10^{-2} \text{ mL}$ 。②重复读数的不确定度 $u(V_{s2})$:由读数差异导致的量取体积变化引入的不确定度可通过重复性试验来评估。通过重复测定充满液体后容量瓶的重量,再除以该液体的密度,即得出体积重复性测定的结果。考虑到实际操作中,定容后即盖上磨口瓶塞称重,溶剂挥发性对结果影响较人对刻度读数判断影响引入的误差可忽略不计,故改用水充满 250 mL

容量瓶至刻度,称重,重复操作 10 次。按水的密度 1.0 mg/mL 折算体积,数据见表 1。读数重复性属于 A 类不确定度,用贝塞尔公式法评定, $u(V_{s2}) =$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n=10} (V_{s2i} - \overline{V_{s2}})^2}{n-1}}$$

得到标准偏差为 $8.16 \times 10^{-2} \text{ mL}$,可直接用作标准不确定度。即 $u(V_{s2}) = 8.16 \times 10^{-2} \text{ mL}$ 。

③温度的不确定度 $u(V_{s3})$:属于 B 类不确定度。容量器皿校准温度在 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 范围内变化近似矩形分布。0.4% 的磷酸水溶液采用水的膨胀系数为 2.10×10^{-4} ,乙腈的膨胀系数为 1.37×10^{-3} 。按流动相比乙腈-0.4%磷酸水 (13 : 87) 计算,20 °C 时,流动相的膨胀系数为 3.61×10^{-4} 。其标准不确定度为:

$$u(V_{s3}) = 250 \times 3.61 \times 10^{-4} \times 5/\sqrt{3} = 2.60 \times 10^{-1} \text{ mL}$$

将上述分量合成得 250 mL 单标线容量瓶标准不确定度为:

$$u(V_s) = \sqrt{u(V_{s1})^2 + u(V_{s2})^2 + u(V_{s3})^2}$$

$$= \sqrt{(6.12 \times 10^{-2})^2 + (8.16 \times 10^{-2})^2 + (2.60 \times 10^{-1})^2}$$

$$= 2.79 \times 10^{-1} \text{ mL}$$

相对标准不确定度为 $u_{rel}(V_s) = \frac{u(V_s)}{250} = 1.12 \times 10^{-3}$

表 1 250 mL 容量瓶的重复量取结果 (n=10)

Tab 1 The results of repeated measuring of 250 mL volumetric flask (n=10)

| 量取次数 The number of measuring | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 体积/mL Volume/mL | 249.922 | 249.865 | 249.866 | 249.957 | 249.912 | 249.942 | 249.930 | 250.045 | 250.063 | 250.099 |

2.2.3 供试品溶液配制过程的不确定度 $u(V_1)$ 、 $u(V_2)$ 供试品溶液配制过程的不确定度主要源于 5 mL 单标线移液管 $u(V_{11})$ 、25 mL 单标线容量瓶 $u(V_{21})$ 的不确定度。二者的不确定度均主要源自三个因素：①玻璃量具校准的不确定度 $u(V_{11})$ 、 $u(V_{21})$ ；5 mL 单标线移液管、25 mL 单标线容量瓶经检定为 A 级，其容量允差分别为 ± 0.015 、 ± 0.03 ，属于 B 类不确定度，按三角分别估计，则标准不确定度为： $u(V_{11}) = 0.015/\sqrt{6} = 6.12 \times 10^{-3}$ mL， $u(V_{21}) = 0.03/\sqrt{6} = 1.22 \times 10^{-2}$ 。②重复读数的不确定度 $u(V_{12})$ 、 $u(V_{22})$ ：同 2.2.2②，属于 A 类不确定度，同一 5 mL 单标线移液管吸取 5 mL 水放入量瓶，称重，重复操作 10 次，用贝塞尔公式法评定， $u(V_{12}) =$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n=10} (V_{12i} - \bar{V}_{12})^2}{n-1}}$$

，得到标准偏差为 3.80×10^{-3} mL，

可直接用作标准不确定度，即 $u(V_{12}) = 3.80 \times 10^{-3}$ mL。数据见表 2。另将同一 25 mL 单标线容量瓶注水至刻度，称重，重复操作 10 次，用贝塞尔公式法评定，

$$u(V_{22}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n=10} (V_{22i} - \bar{V}_{22})^2}{n-1}}$$

，得到标准偏差为

6.68×10^{-3} mL，可直接用作标准不确定度，即 $u(V_{22}) = 6.68 \times 10^{-3}$ mL。数据见表 3。③温度的不确定度 $u(V_{13})$ 、 $u(V_{23})$ ：属于 B 类不确定度。同 2.2.2③，流动相的膨胀系数为 3.61×10^{-4} 。其标准不确定度分别为 $u(V_{13}) = 5 \times 3.61 \times 10^{-4} \times 5/\sqrt{3} = 5.21 \times 10^{-3}$ mL， $u(V_{23}) = 25 \times 3.61 \times 10^{-4} \times 5/\sqrt{3} = 2.60 \times 10^{-2}$ mL。

将上述分量合成得 5 mL 单标线移液管标准不确定度为：

$$u(V_1) = \sqrt{u(V_{11})^2 + u(V_{12})^2 + u(V_{13})^2} = \sqrt{(6.12 \times 10^{-3})^2 + (3.80 \times 10^{-3})^2 + (5.21 \times 10^{-3})^2} = 8.89 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

$$\text{相对标准不确定度为 } u_{\text{rel}}(V_1) = \frac{u(V_1)}{5} = 1.78 \times 10^{-3}$$

将上述分量合成得 25 mL 单标线容量瓶标准不确定度为：

$$u(V_2) = \sqrt{u(V_{21})^2 + u(V_{22})^2 + u(V_{23})^2} = \sqrt{(1.22 \times 10^{-2})^2 + (6.68 \times 10^{-3})^2 + (2.60 \times 10^{-2})^2} = 2.95 \times 10^{-2} \text{ mL}$$

$$\text{相对不确定度为 } u_{\text{rel}}(V_2) = \frac{u(V_2)}{25} = 1.18 \times 10^{-3}$$

表 2 5 mL 重复量取结果 (n=10)

Tab 2 The results of repeated measuring of 5 mL volumetric flask (n=10)

| 量取次数 The number of measuring | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 体积/mL Volume/mL | 4.9874 | 4.9896 | 4.9876 | 4.9953 | 4.9947 | 4.9969 | 4.9882 | 4.9924 | 4.9969 | 4.9940 |

表 3 25 mL 容量瓶的重复量取结果 (n=10)

Tab 3 The results of repeated measuring of 25 mL volumetric flask (n=10)

| 量取次数 The number of measuring | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 体积/mL Volume/mL | 24.9926 | 24.9813 | 24.9789 | 24.9963 | 24.9860 | 24.9951 | 24.9786 | 24.9921 | 24.9928 | 24.9896 |

2.2.4 对照品溶液重复性测试引入的不确定度 $u(A_S)$ 在测定峰面积时,仪器引入的不确定度如电信号的转换,由于被检浓度远远大于检测限,可忽略不计。对测量产生的影响体现在重复性中。取对照品溶液在高效液相色谱仪上连续测定 6 次,测定结果为随机测量, $u(A_S)$ 属于 A 类不确定度,应

用贝塞尔公式法计算,数据见表 4。

$$u(A_S) = \frac{s(A_S)}{\sqrt{3}} = \frac{604.70}{\sqrt{3}} = 3.49 \times 10^2, \text{ 相对不确定度为 } u_{rel}(A_S) = \frac{u(A_S)}{\sqrt{A_S}} = 2.36 \times 10^{-4}$$

表 4 绿原酸对照品峰面积的重复测定结果 (n=6)

Tab 4 The results of repeated measuring of chlorogenic acid (n=6)

| 测定次数 The number of measuring | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 峰面积($\times 10^6$) Peak area($\times 10^6$) | 1.4759 | 1.4774 | 1.4775 | 1.4766 | 1.4765 | 1.4770 |

2.2.5 供试品溶液峰面积的不确定度 $u(A_X)$ 同 2.2.4,取供试品溶液在高效液相色谱仪上连续测定 6 次,应用贝塞尔公式法计算,数据见表 5。

$$u(A_X) = \frac{s(A_X)}{\sqrt{3}} = \frac{100961}{\sqrt{3}} = 5.83 \times 10^4, \text{ 相对不确定度为 } u_{rel}(A_X) = \frac{u(A_X)}{A_X} = 2.28 \times 10^{-3}$$

表 5 供试品峰面积的重复测定结果 (n=6)

Tab 5 The results of repeated measuring of Jinqinshao Injection

| 测定次数 The number of measuring | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 峰面积($\times 10^7$) Peak area($\times 10^7$) | 1.7738 | 1.7689 | 1.7743 | 1.7879 | 1.7635 | 1.7884 |

2.2.6 计算合成标准不确定度 $u(C_X)$ 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。将上述各分量的相对标准不确定度 $u(C_X)/C_X$ 汇总在表 6,计算合成相对不确定度:

测得金苓芍注射液中绿原酸的含量:

$$C_X = \frac{A_X \times W \times p \times V_2}{A_S \times V_S \times V_1} = \frac{17761333}{1476917} \times \frac{12.5}{250} \times 98.3\% \times \frac{25}{5} = 2.96 \text{ mg/mL}$$

则合成相对不确定度为:

$$u_{rel}(C_X) = \sqrt{u_{rel}(W)^2 + u_{rel}(V_S)^2 + u_{rel}(V_1)^2 + u_{rel}(V_2)^2 + u_{rel}(A_S)^2 + u_{rel}(A_X)^2} = \sqrt{(0.00671)^2 + (0.00112)^2 + (0.00178)^2 + (0.00118)^2 + (0.000236)^2 + (0.00228)^2} = 7.49 \times 10^{-3}$$

合成标准不确定度为:

$$u(C_X) = u_{rel}(C_X) \times 2.96 \text{ mg/mL} = 0.0075 \times 2.96 \text{ mg/mL} = 0.02 \text{ mg/mL}$$

表 6 数据与相对标准不确定度

Tab 6 Standard uncertainty and relative standard uncertainty

| 不确定度来源 The main sources of measurement uncertainty | 标准不确定度 Standard uncertainty | 相对标准不确定度 Relative standard uncertainty |
|---|--------------------------------|---|
| 对照品称量 (W/mg) | 8.39×10^{-2} | 6.71×10^{-3} |
| 对照品体积 (V_s/mL) | 2.79×10^{-1} | 1.12×10^{-3} |
| 供试品取样体积 (V_1/mL) | 8.89×10^{-3} | 1.78×10^{-3} |
| 供试品定容体积 (V_2/mL) | 2.95×10^{-2} | 1.18×10^{-3} |
| 对照品峰面积 ($\times 10^6$) | 3.49×10^2 | 2.36×10^{-4} |
| 供试品峰面积 ($\times 10^7$) | 5.83×10^4 | 2.28×10^{-3} |

2.2.7 扩展不确定度与测量不确定度报告 扩展不确定度为合成标准不确定度与包含因子的乘积, $U = u(C_X) \cdot k = 0.02 \times 2 = 0.04 \text{ mg/mL}$ (包含因子 $k = 2$, 置信区间为 95%)。测量结果由测定值 \pm 扩展不确定度表示^[7]。最终结果可表示为 $(2.96 \pm 0.04) \text{ mg/mL}$, $k = 2$ 。

3 讨论

试验采用高效液相色谱法测定金苓芍注射液中绿原酸的含量。根据 CNAS-GL06:2006《化学分析中不确定度的评估指南》及相关规定,并参考相关文献,对高效液相色谱法测定金苓芍注射液含量的不确定度进行评价。通过比较各分量的相对标准不确定度的大小,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。

试验中,对照品称量引入的相对标准不确定度为 6.71×10^{-3} ,属最大分量;供试品峰面积测定引入的相对标准不确定度为 2.28×10^{-3} ,属第二大分量;供试品取样体积引入的相对标准不确定度为 1.78×10^{-3} ,属第三大分量。因而,对于中药注射剂的定量检验中的风险环节,需重点关注天平、高效液相色谱仪及移液管的使用和维护。

对具体操作的指导意义有:①对照品的称量为毫克级,称量会引起较大的误差,为减小称量引入的不确定度,可根据天平的精度和量程范围选择适宜的天平,并根据所称样品的性质适当增加称样

量。②应加强对高效液相色谱仪的保养,使其保持稳定的状态;加强试验过程的控制及标准操作训练,以减少随机变化和人为因素对试验结果的影响。另外应尽量确保色谱峰峰面积控制在百万级内。若色谱峰峰面积超过千万级可能会引入较大的测定误差。③玻璃量器中体积越小的量器引入的不确定度越大,建议使试验温度接近校准温度或选用 A 级大容量量器来降低误差。

引入测量不确定度后,检测结果由单一数值转变为被测值可能分布的区间范围,通过“检测值 \pm 扩展不确定度 (U)”表示,若“检测值 $\pm U$ ”不在限值内,则检测结果判定为不合格;若在限值内,则检测结果判定为合格;若横跨在限值两侧,则检测结果判定存在不确定性,具有一定风险,应重点关注。可通过选择更有经验的检验人员重复检验,确保检测结果的准确性^[8]。如反复检测验证后,“检测值 $\pm U$ ”仍横跨在限值两侧,比较稳妥的办法是判定为符合规定的同时给出风险提示。

试验为高效液相色谱法测定中药注射液有效成分含量不确定度评价提供了可靠的方法,并为提高中药注射液含量测定结果的准确性提供了参考依据。

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].
AQSIQ. JJF1059-2012 Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement [S].

- [2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL06 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.
CNAS. CNAS-CL06 Guidance on Evaluating the Uncertainty in Chemical Analysis [M]. Beijing: China metrology press, 2006; 34.
- [3] 农业部兽药评审中心. 兽药国家标准汇编[S].
IVDC. The national standard of veterinary medicine[S].
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版[S].
Chinese veterinary Pharmacopoeia Committees. Chinese veterinary Pharmacopoeia, 2010 edition[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.
Yu X H, Dong L L, Ma Q R, *et al.* A procedure for the evaluation of uncertainty in the assay of Albendazole tablet by UV absorption coefficient method[J]. Chinese Journal of Feed, 2011, 15: 25-27.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局. JJG196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
AQSIQ. Verification Regulation of JJG196-2006[S].
- [7] 倪玉才. 实用测量不确定度评定[M]. 第 3 版. 北京: 中国计量出版社, 2009; 103-113.
Ni Y C. Practical measurement uncertainty evaluation[M]. third edition. Beijing: China metrology press, 2009; 103-113.
- [8] 马秋冉, 张璐, 于晓辉, 等. 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[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(11): 40-43.
Ma Q R, Zhang L, Yu X H, *et al.* Evaluate the Uncertainty of Determination the Content of Vitamin B1 Injection by Ultraviolet Spectrophotometry [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(11): 40-43.

(编辑: 陈希)