

HPLC测定小儿氨酚匹林片含量的不确定度评价

陈建琴 (南宁食品药品检验所, 南宁 530001)

摘要:目的 对小儿氨酚匹林中阿司匹林、对乙酰氨基酚的含量进行不确定度评价。方法 建立评价高效液相色谱法测定小儿氨酚匹林片含量不确定度的数学模型,对测定中的各影响因素进行考察。结果 阿司匹林、对乙酰氨基酚的扩展不确定度分别为 1.4%、1.2%,相对扩展不确定度分别为 1.5%、1.2%,含量测定结果分别为 $(91.7 \pm 1.4)\%$ 、 $(98.1 \pm 1.2)\%$ 。结论 供试品溶液峰面积是定量分析的测量不确定度的主要因素。

关键词:高效液相色谱法;小儿氨酚匹林片;不确定度

中图分类号:R917.72;R917.101 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2008)05-0438-05

Evaluation of Uncertainty for Determination of Pediatric Aspirin and Paracetamol Tablets by HPLC

CHEN Jian-Qin (Nanning Institute for Food and Drug Control, Nanning 530001, China)

作者简介:陈建琴,女,主管药师

Tel: 13507715101

E-mail: cjq3280@yahoo.com.cn

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate uncertainty in measures of the content of pediatric aspirin and paracetamol tablets. **METHODS** The model for evaluation of the uncertainty was established based on the measures of content of pediatric aspirin and paracetamol tablets by HPLC. The factors influenced upon the measurement were analysed. **RESULTS** The relative expanded uncertainty U_{95} of pediatric and paracetamol was 1.4%、1.2% and the related expanded uncertainty U_{rel} was 1.5%、1.2%, respectively. The result of content determination of pediatric and paracetamol was (91.7 ± 1.4)%、(98.1 ± 1.2)%. **CONCLUSION** The peak area of sample was the primary factor for the measurement uncertainty. **KEY WORDS:** HPLC; pediatric aspirin and paracetamol tablets; uncertainty

中国实验室认可委员会于 2003 年颁布了测量不确定度政策 (CNAL/AR11)^[1],为了客观地评价测量结果的可靠性引入了测量不确定度的概念,对申请认可的实验室在测量不确定度方面提出了明确要求。在实际工作中,测量不确定度的分析评价在药品检验领域的应用还很少,实验人员对测量不确定度的评定过程往往缺少足够的理论基础知识和实际经验。为了更好地适应实验室认可的需要,提高实验室的检测能力水平,本实验建立了高效液相色谱法^[2]测定小儿氨酚匹林片中阿司匹林、对乙酰氨基酚的含量不确定度评价的方法,以考察在测定过程中的各不确定度来源对含量测定的影响,使小儿氨酚匹林的定量分析得到有效地控制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-10AT 型高效液相色谱仪,SPD-10A 型紫外检测器(日本岛津公司)。AE240 电子天平(双量程,梅特勒托利多仪器公司)。

1.2 试剂

小儿氨酚匹林片(市售品,规格:阿司匹林 0.059 3 g·片⁻¹;对乙酰氨基酚 0.034 4 g·片⁻¹);阿司匹林(批号:100113-200302,纯度:100%)、对乙酰氨基酚对照品(批号:100018-200408,纯度:100%),中国生物制品检定所;甲醇为色谱纯,水为高纯水,磷酸二氢钾为分析纯。

2 方法及结果

2.1 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 0.5 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液-甲醇(85:15)为流动相;流速 0.8 mL·min⁻¹;检测波长为 225 nm。理论板数按阿司匹林峰计算应不低于 5 000,各组分峰及其相邻杂质峰的分离度应符合规定。

2.2 供试品溶液的配制

取本品 20 片,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于阿司匹林 60 mg),置 100 mL(V_1)量瓶中,加流动相适量,超声使阿司匹林与对乙酰氨基酚溶解,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过。精密量取续滤液 2 mL(V_3)置 25 mL(V_2)量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的配制

精密称取对乙酰氨基酚对照品约 17 mg(经 105 °C 干燥恒重)与阿司匹林对照品约 30 mg,置 50 mL(V_4)量瓶中,加适量流动相超声处理溶解,加流动相稀释至刻度,摇匀,再精密量取 2 mL(V_3),置 25 mL(V_2)量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.4 测定法

分别取对照品溶液与供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪(于 2 h 内进样完毕),记录色谱图。按外标法以峰面积计算即得。

计算公式:阿司匹林标示量 % = $A_X W_0 M V_X \times 100\% / (A_0 W_X V_0 \times \text{标示量})$,对乙酰氨基酚标示量 % = $A_X W_0 M V_X \times 100\% / (A_0 W_X V_0 \times \text{标示量})$ 。

测定结果:阿司匹林标示量 % 为 91.7%,对乙酰氨基酚标示量 % 为 98.1%。

其中 A_X —供试液的峰面积;

W_0 —对照品的称样量;

M —平均片重;

V_X —供试液的稀释倍数;

A_0 —对照液的峰面积;

W_X —供试品的称样量;

V_0 —对照液的稀释倍数;

3 不确定度评价

3.1 建立数学模型

阿司匹林 $X = A_X W_0 M V_X \times 100\% / (A_0 W_X V_0 \times 0.0593)$

对乙酰氨基酚 $X = A_X W_0 M V_X \times 100\% / (A_0 W_X V_0 \times 0.0344)$ 。

3.2 方差和灵敏系数

方差:

$$u_{c2}(X) = c^2(A_X)u^2(A_X) + c^2(W_0)u^2(W_0) + c^2(M)u^2(M) + c^2(V_X)u^2(V_X) + c^2(A_0)u^2(A_0) + c^2(W_X)u^2(W_X) + c^2(V_0)u^2(V_0)$$

灵敏系数(阿司匹林):

$$c(A_X) = W_0 M V_X / (A_0 W_X V_0 \times 0.0593) = 7.26 \times 10^{-7}$$

$$c(W_0) = A_X M V_X / (A_0 W_X V_0 \times 0.0593) = 28.73$$

$$c(M) = A_X W_0 V_X / (A_0 W_X V_0 \times 0.0593) = 9.11$$

$$c(V_X) = A_X W_0 M / (A_0 W_X V_0 \times 0.0593) = 7.28 \times 10^{-4}$$

$$c(A_0) = -A_X W_0 M V_X / (A_0^2 W_X V_0 \times 0.0593) = -6.39 \times 10^{-7}$$

$$c(W_X) = -A_X W_0 M V_X / (A_0 W_X^2 V_0 \times 0.0593) = -8.82$$

$$c(V_0) = -A_X W_0 M V_X / (A_0 W_X V_0^2 \times 0.0593) = -1.46 \times 10^{-3}$$

灵敏系数(对乙酰氨基酚):

$$c(A_X) = W_0 M V_X / (A_0 W_X V_0 \times 0.0344) = 8.21 \times 10^{-7}$$

$$c(W_0) = A_X M V_X / (A_0 W_X V_0 \times 0.0344) = 53.13$$

$$c(M) = A_X W_0 V_X / (A_0 W_X V_0 \times 0.0344) = 9.82$$

$$c(V_X) = A_X W_0 M / (A_0 W_X V_0 \times 0.0344) = 7.85 \times 10^{-4}$$

$$c(A_0) = -A_X W_0 M V_X / (A_0 W_X V_0 \times 0.0344) = -7.76 \times 10^{-7}$$

$$c(W_X) = -A_X W_0 M V_X / (A_0 W_{X2} V_0 \times 0.0344) = -9.51$$

$$c(V_0) = -A_X W_0 M V_X / (A_0 W_X V_{02} \times 0.0344) = -1.57 \times 10^{-3}$$

4 不确定度分量

4.1 对照品称量引入的不确定度 $u(W_0)$

4.1.1 对照品纯度引入的不确定度 $u(W_{01})$

阿司匹林 对乙酰氨基酚对照品均由中国生物制品检定所提供,未提供纯度数据,按纯度为 100.0% 来计,其不确定度 $u(W_{01}) = 0$ 。

4.1.2 天平示值的不确定度 $u(W_{02})$

AE240 电子天平 ($d=0.01$ mg), 检定证书给出的最大允差为 ± 0.06 mg, 假设为正态分布 ($k=3$), 其标准不确定度 $u(W_{02}) = 0.06/3 = 0.020$ mg。

4.1.3 天平称量重复性的不确定度 $u(W_{03})$

AE240 电子天平 ($d=0.01$ mg), 检定证书给出的重复性误差为 ± 0.05 mg, 假设为正态分布 ($k=3$), 其标准不确定度 $u(W_{03}) = 0.05/3 = 0.0167$ mg。

4.1.4 单次称量的标准不确定度

$(0.02^2 + 0.0167^2)^{1/2} = 0.0261$ mg, 因称量使用减重法, $u(W_0) = (2 \times 0.0261^2)^{1/2} = 0.037$ mg。

4.2 供试品称量引入的不确定度 $u(W_X)$

4.2.1 天平示值的不确定度 $u(W_{X1})$

AE240 电子天平 ($d=0.1$ mg), 检定证书给出的最大允差为 ± 0.10 mg, 假设为正态分布 ($k=3$), 其标准不确定度 $u(W_{X1}) = 0.10/3 = 0.0333$ mg。

4.2.2 电子天平称量重复性的不确定度 $u(W_{X2})$

AE240 电子天平 ($d=0.1$ mg), 检定证书给出的重复性误差为 ± 0.10 mg, 假设为正态分布 ($k=3$), 其标准不确定度 $u(W_{X2}) = 0.10/3 = 0.0333$ mg。

4.2.3 单次称量的标准不确定度

$(0.0333^2 + 0.0333^2)^{1/2} = 0.0471$ mg, 因称量使用减重法, $u(W_X) = (2 \times 0.0471^2)^{1/2} = 0.0666$ mg。

4.3 平均片重引入的不确定度 $u(M)$

$$u(M) = u(W_X) = 0.0666 \text{ mg}$$

4.4 供试品溶液的稀释倍数引起的不确定度 $u(V_X)$

4.4.1 数学模型

$$V_X = V_1 V_2 / V_3$$

方差:

$$u_{c2}(V_X) = c^2(V_1) u^2(V_1) + c^2(V_2) u^2(V_2) + c^2(V_3) u^2(V_3)$$

灵敏系数:

$$c(V_1) = V_2 / V_3 = 12.5$$

$$c(V_2) = V_1 / V_3 = 50$$

$$c(V_3) = -V_1 V_2 / V_{32} = -625$$

4.4.2 玻璃量器 (100 mL 单标线量瓶) 引入的不确定度

$$u(V_1)$$

4.4.2.1 校准引入的不确定度 $u(V_{1.1})$ 量瓶经检定为 A 级, 由《常用玻璃量器检定规程》^[3] 查得, 容量允差为 ± 0.10 mL, 假设为正态分布 ($k=3$), 其标准不确定度 $u(V_{1.1}) = 0.10/3 = 0.0333$ mL。

4.4.2.2 溶液温度与校正时的温度不同引入的不确定度 $u(V_{1.2})$ 设溶液温度为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$, 假设为正态分布 ($k=3$), 则 $u(V_{1.2}) = 2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 100/3 = 0.0350$ mL。则 $u(V_1) = [u(V_{1.1})^2 + u(V_{1.2})^2]^{1/2} = (0.0333^2 + 0.0350^2)^{1/2} = 0.0483$ mL。

4.4.3 玻璃量器 (25 mL 单标线量瓶) 引入的不确定度 $u(V_2)$

4.4.3.1 校准引入的不确定度 $u(V_{2.1})$ 量瓶经检定为 A 级, 容量允差为 ± 0.030 mL, 假设为正态分布 ($k=3$), 其标准不确定度 $u(V_{2.1}) = 0.030/3 = 0.01$ mL。

4.4.3.2 溶液温度与校正时的温度不同引入的不确定度 $u(V_{2.2})$ 设溶液温度为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$, 假设为正态分布 ($k=3$), 则 $u(V_{2.2}) = 2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 25/3 = 8.75 \times 10^{-3}$ mL。则 $u(V_2) = [u(V_{2.1})^2 + u(V_{2.2})^2]^{1/2} = [0.01^2 + (8.75 \times 10^{-3})^2]^{1/2} = 0.0133$ mL。

4.4.4 玻璃量器 (2 mL 单标线吸管) 引入的不确定度 $u(V_3)$

4.4.4.1 校准引入的不确定度 $u(V_{3.1})$ 量瓶经检定为 A 级, 容量允差为 ± 0.010 mL, 假设为正态分布 ($k=3$), 其标准不确定度 $u(V_{3.1}) = 0.010/3 = 0.0033$ mL。

4.4.4.2 溶液温度与校正时的温度不同引入的不确定度 $u(V_{3.2})$ 设溶液温度为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$, 假设为正态分布 ($k=3$), 则 $u(V_{3.2}) = 2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 2/3 = 7 \times 10^{-4}$ mL。则 $u(V_3) = [u(V_{3.1})^2 + u(V_{3.2})^2]^{1/2} = [0.0033^2 + (7 \times 10^{-4})^2]^{1/2} = 3.08 \times 10^{-3}$ mL。

4.4.5 合成标准不确定度 $u(V_X)$

$$u(V_X) = [c^2(V_1) u^2(V_1) + c^2(V_2) u^2(V_2) + c^2(V_3) u^2(V_3)]^{1/2} = 2.124$$

4.5 对照品溶液的稀释倍数引起的不确定度 $u(V_0)$

4.5.1 数学模型

$$V_0 = V_4 V_2 / V_3$$

方差:

$$u_{c2}(V_0) = c^2(V_4) u^2(V_4) + c^2(V_2) u^2(V_2) + c^2(V_3) u^2(V_3)$$

灵敏系数:

$$c(V_4) = V_2 / V_3 = 12.5$$

$$c(V_2) = V_4 / V_3 = 25$$

$$c(V_3) = -V_4 V_2 / V_{32} = -312.5$$

4.5.2 玻璃量器 (50 mL 单标线量瓶) 引入的不确定度 $u(V_4)$

4.5.2.1 校准引入的不确定度 $u(V_{4.1})$ 量瓶经检定为 A 级, 容量允差为 ± 0.05 mL, 假设为正态分布 ($k=3$), 其标准不确定度 $u(V_{4.1}) = 0.05/3 = 0.0167$ mL。

4.5.2.2 溶液温度与校正时的温度不同引入的不确定度 $u(V_{4.2})$ 设溶液温度为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$, 假设为正态分布 ($k=3$), 则 $u(V_{4.2}) = 2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 50/3 = 0.0175 \text{ mL}$. 则 $u(V_4) = [u(V_{4.1})^2 + u(V_{4.2})^2]^{1/2} = (0.0167^2 + 0.0175^2)^{1/2} = 0.0242 \text{ mL}$.

4.5.3 玻璃量器 (25 mL 单标线量瓶) 引入的不确定度 $u(V_2) = 0.0133 \text{ mL}$.

4.5.4 玻璃量器 (2 mL 单标线吸管) 引入的不确定度 $u(V_3) = 3.08 \times 10^{-3} \text{ mL}$.

4.5.5 合成标准不确定度 $u(V_0)$

$$u(V_0) = [c^2(V_4)u^2(V_4) + c^2(V_2)u^2(V_2) + c^2(V_3)u^2(V_3)]^{1/2} = 1.062$$

4.6 供试品溶液测定重复性引入的不确定度 $u(A_X)$

称取 2 份供试品, 按“2.2”项下配成供试品溶液, 在 LC-10AT 型高效液相色谱仪上每份测定 5 次, 得到 10 个峰面积数据, 是随机测量, 属 A 类不确定度, 结果见表 1.

表 1 供试品溶液的测定结果

Tab 1 Results of sample solution

测定次数	阿司匹林		对乙酰氨基酚	
	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 1	峰面积 2
1	1 263 282	1 205 472	1 194 646	1 162 352
2	1 245 846	1 193 904	1 198 084	1 165 863
3	1 250 478	1 198 531	1 191 268	1 169 541
4	1 253 687	1 195 620	1 188 696	1 158 498
5	1 257 359	1 213 857	1 186 538	1 160 897
标准差 s	6 640	8 209	4 615	4 335

表 3 标准不确定度分析一览表

Tab 3 Table of standard uncertainty

分量	不确定度来源	分布	类型	标准不确定度
$u(W_0)$	对照品纯度引扩的不确定度	正态	B类	0
	天平示值的不确定度	正态	B类	0.020 mg
	天平称量重复性的不确定度	正态	B类	0.0167 mg
$u(W_X)$	天平示值的不确定度	正态	B类	0.0333 mg
	天平称量重复性的不确定度	正态	B类	0.0333 mg
$u(M)$	天平示值的不确定度	正态	B类	0.0333 mg
	天平称量重复性的不确定度	正态	B类	0.0333 mg
$u(V_X)$	100 mL 单标线量瓶的不确定度	正态	B类	0.0483 mL
	25 mL 单标线量瓶的不确定度	正态	B类	0.0133 mL
	2 mL 单标线吸管的不确定度	正态	B类	3.08×10^{-3} mL
$u(V_0)$	50 mL 单标线量瓶的不确定度	正态	B类	0.0242 mL
	25 mL 单标线量瓶的不确定度	正态	B类	0.0133 mL
	2 mL 单标线吸管的不确定度	正态	B类	3.08×10^{-3} mL
$u(A_X)$	供试液中阿司匹林测定重复性的不确定度	正态	A类	7.466
	供试液中对乙酰氨基酚测定重复性的不确定度	正态	A类	4.477
$u(A_0)$	阿司匹林对照液测定重复性的不确定度	正态	A类	6.169
	对乙酰氨基酚对照液测定重复性的不确定度	正态	A类	4.173

4.9 合成标准不确定度

阿司匹林:

$$u_c(X) = c^2(A_X)u^2(A_X) + c^2(W_0)u^2(W_0) + c^2(M)$$

$$\text{阿司匹林: } u(A_X) = [(6640^2 + 8209^2) / 2]^{1/2} = 7.466$$

$$\text{对乙酰氨基酚: } u(A_X) = [(4615^2 + 4335^2) / 2]^{1/2} = 4.477$$

$$\text{自由度 } \nu = 2 \times (5-1) = 8$$

4.7 对照品溶液测定重复性引入的不确定度 $u(A_0)$

阿司匹林、对乙酰氨基酚对照品各称取 2 份, 按“2.3”项下配成对照品溶液, 在 LC-10AT 型高效液相色谱仪上每份测定 5 次, 得到 10 个峰面积数据, 是随机测量, 属 A 类不确定度, 结果见表 2.

表 2 对照品溶液的测定结果

Tab 2 Results of sample solution

测定次数	阿司匹林		对乙酰氨基酚	
	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 1	峰面积 2
1	1 432 706	1 378 512	1 264 764	1 232 653
2	1 425 634	1 375 471	1 260 378	1 239 148
3	1 430 275	1 379 426	1 268 253	1 230 842
4	1 428 465	1 392 060	1 259 689	1 228 313
5	1 418 358	1 386 554	1 258 167	1 230 012
标准差 s	5 521	6 755	4 156	4 190

$$\text{阿司匹林: } u(A_0) = [(5521^2 + 6755^2) / 2]^{1/2} = 6169$$

$$\text{对乙酰氨基酚: } u(A_0) = [(4156^2 + 4190^2) / 2]^{1/2} = 4173$$

$$\text{自由度 } \nu = 2 \times (5-1) = 8$$

4.8 不确定度各分量分析一览表

见表 3.

$$u^2(M) + c^2(V_X)u^2(V_X) + c^2(A_0)u^2(A_0) + c^2(W_X)$$

$$u^2(W_X) + c^2(V_0)u^2(V_0)$$

$$u_c(X) = 7.18 \times 10^{-3} \rightarrow 0.72\%$$

对乙酰氨基酚:

$$u_{c2}(X) = c^2(A_X)u^2(A_X) + c^2(W_0)u^2(W_0) + c^2(M)u^2(M) + c^2(V_X)u^2(V_X) + c^2(A_0)u^2(A_0) + c^2(W_X)u^2(W_X) + c^2(V_0)u^2(V_0)$$

$$u_c(X) = 5.85 \times 10^{-3} \rightarrow 0.59\%$$

4.10 扩展不确定度

在95%置信水平下,取扩展因子 $K=2$,扩展不确定度:阿司匹林: $U=K \cdot u_c=2 \times 0.72\%=1.4\%$;对乙酰氨基酚: $U=K \cdot u_c=2 \times 0.59\%=1.2\%$ 。相对扩展不确定度:阿司匹林: $U_{rel}=1.4\%/91.7\%=1.5\%$;对乙酰氨基酚: $U_{rel}=1.2\%/98.1\%=1.2\%$ 。

4.11 小儿氨酚匹林片的测量不确定度报告

高效液相色谱法测定小儿氨酚匹林中阿司匹林、对乙酰氨基酚的含量,阿司匹林、对乙酰氨基酚的扩展不确定度分别为1.4%、1.2%,相对扩展不确定度分别为1.5%、1.2%,阿司匹林、对乙酰氨基酚标示量的%可表示为:(91.7 \pm 1.4)%、(98.1 \pm 1.2)%。

5 讨论

采用高效液相色谱法测定小儿氨酚匹林中阿司匹林、对乙酰氨基酚的含量,参考《化学分析中不确定度的评估指南》^[4]及JJF1059-1999^[5],对含量测定过程中的不确定度来源进行分析评价,结果供试品溶液峰面积的测定重复性引入的标准不确定度分量是各不确定度分量中最大的。同时,在文献^[2]中规定阿司匹林、对乙酰氨基酚的低限为90.0%,由

不确定度评价结果:阿司匹林标示量的%为(91.7 \pm 1.4)%、对乙酰氨基酚标示量的%为(98.1 \pm 1.2)%。阿司匹林的测定结果处在边缘值,因此在实验过程中,按照“2.4”项下严格控制进样时间,可以最有效地减小供试品溶液峰面积的测定重复性给测定结果带来的影响,并能准确地评价该药品的质量状况。

REFERENCES

- [1] China National Accreditation Board for Laboratories. Basic knowledge of laboratory accreditation and management(实验室认可与管理基础知识)[M]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2003.
- [2] WS-10001-(HD-0921)-2002[S]:42.
- [3] JJG196-90, Verification Regulation of Working Glass Container(常用玻璃量器检定规程)[S]. Administration of Quality and Technology Supervision of People's Republic of China, 1990.
- [4] Guidance for Evaluation of Uncertainty of Chemical analysis(化学分析中不确定度的评估指南)[M]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2002.
- [5] GB/T15481-2000, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories(检测和校准实验室能力的通用要求)[S]. Administration of Quality and Technology Supervision of People's Republic of China, 2000.
- [6] JJF1059-1999, Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement(测量不确定度评定与表示)[S]. Administration of Quality and Technology Supervision of People's Republic of China, 1999.