

HPLC 法测定头孢曲松含量的不确定度评估

杜 珍(解放军海军总医院,北京 100037)

[摘要] 目的 对高效液相色谱法(HPLC)测定头孢曲松含量的测量不确定度进行评估。方法 采用 HPLC 法测定头孢曲松的含量,建立数学模型,分析不确定度来源。结果 通过对各变量的分析,计算各变量的不确定度,最后计算出合成标准不确定度。结论 本方法建立的数学模型合理、可靠。

[关键词] 高效液相色谱法;头孢曲松;测量不确定度

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)04-0281-03

Evaluation of measurement uncertainty method for determination of Ceftriaxone by HPLC

DU Zhen(Department of Pharmacy, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the uncertainty of measurement for determination of Ceftriaxone by HPLC. **Methods** The content of Ceftriaxone was determined by HPLC. The mathematical model was established to analyze the source of uncertain. **Results** Every component of uncertainty was evaluated through the variable parameters among the procedures. The combined standard uncertainty was finally obtained by synthesizing the uncertainties of all variables. **Conclusion** The statistical approach of measurement uncertainty established in this paper was reasonable and reliable.

[Key words] HPLC, Ceftriaxone; measurement uncertainty

检测或质量控制人员根据产品的标准对抽样检测结果进行分析,并根据分析的结果判定产品质量,因此抽样检测结果的质量将对产品质量判定产生重要影响。对测量结果质量的判定,传统常用的方法是通过测量误差来表示,测量误差是一个理想化的概念,因为它的真值常常不能确切地知道。其定义为测量结果与真值之间的差值。为了能更客观准确的评价测量结果的质量,国际标准化组织(ISO)制定了《测量不确定度表达指南》,我国也制定了计量技术规范 JJF 1059-1999《测量不确定度评定与表示》^[1]。测量不确定度的来源有很多,包括定义不完整、取样、基体效应和干扰、质量和容量仪器的不确定度、环境条件、参考值、测量方法和程序中的估计和假定以及随机变化等。目前关于色谱法的测量不确定度评估还不成熟,本文参考相关文献^[2-6],以头孢曲松的含量测定为例,对高效液相色谱法的测量不确定度进行分析和探讨。

1 仪器、试剂及实验方法

1.1 仪器及试剂 Agilent 1100 型高效液相色谱仪;Sartorius CP225D 电子天平;Metrohm 卡氏水分滴

定义;100 ml 容量瓶经检定等级为 B 级;头孢曲松对照品(中国药品生物制品检定所,批号 130480-200302,含量 84.1%);头孢曲松供试品(哈药集团制药总厂,批号 B100942509,含量 2.0 g)。

1.2 实验方法 参照中国药典 2010 版二部头孢曲松钠项下含量测定方法^[7]。

色谱条件:Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×150 mm,5 μm)色谱柱;以 0.02 mol/L 正辛胺溶液(用磷酸调 pH 值至 6.5):乙腈(75:25)为流动相;检测波长为 245nm。

测定方法:取头孢曲松供试品约 22 mg,置 100 ml 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 20 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图;另取头孢曲松对照品适量,同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中 C₁₈H₁₈N₈O₇S₃ 的含量。

2 测量不确定度的评估

2.1 建立数学模型
$$X = (A_x \times W_R \times P \times V_x) / [A_R \times W_x \times (1-Q) \times V_R] \times 100\% \quad (1)$$

式中:

- X-供试品中头孢曲松的百分含量(以干燥品计);
- A_x(A_R)-供试品(对照品)的峰面积;
- W_x(W_R)-供试品(对照品)的称样量;
- V_x(V_R)-供试品(对照品)溶液的配制体积;

[作者简介] 杜 珍(1980-),女,本科,主管药师。Tel: 13581970960, E-mail:bbwendy2000@hotmail.com.

P-对照品的纯度;
Q-供试品水分含量。

2.2 不确定度来源的识别 相关不确定度来源见图1。

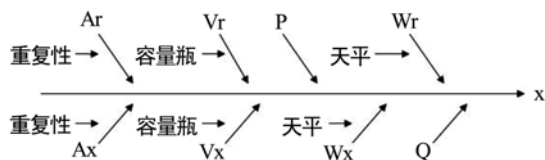


图1 不确定度来源

2.3 不确定度分量的量化

2.3.1 对照品纯度的相对标准不确定度 $u_{rel}(P)$

头孢曲松对照品纯度:对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号 130480-200302,含量 84.1%,无给出限度标识。假定其分散区间的半宽度 $\alpha = 0.5\%$,按矩形分布换算:

$$u_{rel}(P) = 0.5\% / 3^{1/2} = 0.0029$$

2.3.2 对照品称量的相对标准不确定度 $u_{rel}(W_r)$

称量的相对标准不确定度即为天平校准的不确定度,主要是两个来源:①使用的 CP225D 电子天平($d = 0.01 \text{ mg}$),检定证书给出的本实验使用称量范围的称量误差为 $\pm 0.02 \text{ mg}$;假设为矩形分布,换算成标准不确定度为 $0.02/3^{1/2} = 0.0115 \text{ mg}$;②天平称量重复性的不确定度:CP225D 电子天平($d = 0.01 \text{ mg}$),检定证书给出的重复性误差为 $\pm 0.04 \text{ mg}$;假设为矩形分布,换算成标准不确定度为 $0.04/3^{1/2} = 0.0231 \text{ mg}$ 。

天平的标准不确定度 $u(W_r) = (0.0115^2 + 0.0231^2)^{1/2} = 0.0258$

对照品称样 2 份,分别为 22.04、22.08 mg,则对照品称样的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(W_r) = [(u(W_r)/22.04)^2 + (u(W_r)/22.08)^2]^{1/2} = 0.00165$$

2.3.3 对照品溶液配制体积的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_r)$

即为容量瓶体积校准的相对标准不确定度,100 ml 容量瓶(B 级)的不确定度为 $\pm 0.2 \text{ ml}$,按矩形分布换算成标准偏差为 $0.2/3^{1/2} = 0.115 \text{ ml}$ 。

$$u_{rel}(V_r) = 0.115/100 = 0.00115$$

2.3.4 对照品峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_r)$

样品溶液测定过程中受进样体积重复性、泵流速稳定性、分离重复性、组分在色谱柱等滞留变化、检测器稳定性、积分变动性等随机变化的影响。以上在进样、分离、检测过程中产生的随机影响,可合并为进样重复性进行测量。称取对照品 2 份,分别为 22.04、22.08 mg,配制成对照品溶液,每份分别连续进样 3

次,结果见表 1。

表 1 对照品峰面积测定结果 ($n=3$)

	峰面积 1	峰面积 2	峰面积 3	平均值	极差
对照品 1	10 908	10 913	10 911	10 911	5
对照品 2	10 805	10 798	10 813	10 805	15

由上表,按每一份的重复次数 $n=3$,用极差法分别计算其标准不确定度。当 $n=3$ 时极差系数 $C=1.64$,

$$u_{rel}(A_{r1}) = R_1/C/A_{r1} = 5/1.64/10911 = 2.79 \times 10^{-4}$$

$$u_{rel}(A_{r2}) = R_2/C/A_{r2} = 15/1.64/10805 = 8.46 \times 10^{-4}$$

$$u_{rel}(A_r) = [u_{rel}^2(A_{r1}) + u_{rel}^2(A_{r2})]^{1/2} = 0.00089$$

综上,对照品的不确定度

$$u_{rel}(R) = [u_{rel}^2(P) + u_{rel}^2(W_r) + u_{rel}^2(V_r) + u_{rel}^2(A_r)]^{1/2} = 0.0036$$

2.3.5 溶液称量的相对标准不确定度 $u_{rel}(W_x)$

不确定度分析同 2.3.2。供试品称样 2 份,分别为 21.91、22.05 mg,则对照品称样的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(W_x) = [(u(W_x)/21.91)^2 + (u(W_x)/22.05)^2]^{1/2} = 0.00166$$

2.3.6 供试品溶液配制体积的相对标准不确定度 $u_{rel}(V_r)$

不确定度分析同 2.3.3。 $u_{rel}(V_x) = 0.115/100 = 0.00115$ 。

2.3.7 供试品峰面积的相对标准不确定度 $u_{rel}(A_x)$

称取供试品 2 份,分别为 21.91、22.05 mg,配制成供试品溶液,每份分别连续进样 2 次,测得峰面积数据,结果见表 2。

表 2 供试品峰面积测定结果 ($n=2$)

	峰面积 1	峰面积 2	平均值	极差
供试品 1	10 628	10 624	10 626	4
供试品 2	10 722	10 733	10 728	11

由上表,按每一份的重复次数 $n=2$,用极差法分别计算其标准不确定度。当 $n=2$ 时极差系数 $C=1.13$,

$$u_{rel}(A_{x1}) = R_1/C/A_{x1} = 4/1.13/10626 = 3.33 \times 10^{-4}$$

$$u_{rel}(A_{x2}) = R_2/C/A_{x2} = 11/1.13/10728 = 9.07 \times 10^{-4}$$

$$u_{rel}(A_x) = [u_{rel}^2(A_{x1}) + u_{rel}^2(A_{x2})]^{1/2} = 0.00097$$

2.3.8 供试品溶液水分含量的相对标准不确定度 $u_{rel}(Q)$

卡氏水分滴定仪的校准证书给出扩展不确定度为 3% ($k=2$)。因此供试品水分的合成相对标准不确定度 $u_{rel}(Q) = 1.5\%$ 。综上,供试品测定的

不确定度

$$u_{rel}(X) = [u_{rel}^2(W_x) + u_{rel}^2(V_x) + u_{rel}^2(A_x) + u_{rel}^2(Q)]^{1/2} = 0.015$$

3 计算合成相对标准不确定度 $u(X)$

将各测定数值代入公式(1),由此计算出的头孢曲松含量,得到所测样品的含量,计算结果取2个样品溶液测定的平均值,(其中供试品水份含量另外测得8.8%)得到所测样品含量为91.0%。

$u(X)$ 由对照品引入的不确定度 $u_{rel}(R)$ 和供试品引入的不确定度 $u_{rel}(X)$ 所构成, $u(X) = u_c(X) / X = [u_{rel}^2(R) + u_{rel}^2(X)]^{1/2} = 0.0154$

合成标准不确定度 $u_c(X) = 0.0154 \times 91.0\% = 1.40\%$

4 计算扩展不确定度 U

假设测量结果符合正态分布,在置信概率为95%时,选择包含因子 $K=2$ 。

$$U = K \times u_c(X) = 2 \times 1.40\% = 2.80\%$$

5 不确定度报告

HPLC法测定头孢曲松的含量(以干燥品计)为: $X = 91.0\% \pm 2.8\%$ 。

6 讨论

(上接第277页)

给药可显著抑制二甲苯引起的鼠耳肿胀,抑制率分别是56.3%,39.2%和14.5%^[4],而本实验发现120mg/kg秦艽、龙胆挥发油在小鼠肿胀实验模型中同样表现出显著地抗炎活性,抑制率分别达到37.2%和37.8%。可见,龙胆苦苷和挥发油成分在秦艽、龙胆药材的抗炎活性中均扮演着很重要的角色,因此挥发油也应该得到重视以便更好的控制药材质量。

【参考文献】

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1988:62.
- [2] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社.1991:9.
- [3] 刘占文,陈长勋,金若敏,等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药,2002,33(1):47.
- [4] 陈长勋,刘占文,孙峥嵘,等. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究[J]. 中草药,2003,34(9):814.
- [5] 陈雷,王海波,孙晓丽,等. 龙胆苦苷镇痛抗炎药理作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2008,20:903.

本文评估出头孢曲松含量测定的扩展不确定度为6.0%,表明供试品测定结果的分散程度符合HPLC法对准确度的要求,测定结果准确、可靠。在分析评估不确定度时,因为合成不确定度的数值几乎完全取决于重要的不确定度分量,所以应尽量考虑到产生不确定度的全部来源。根据上述评定得知本方法测量结果的不确定度主要来自对照品以及供试品溶液的重复测定和水分测定。在分析了上述影响测量不确定度的原因后,通过采取相应的措施,完全可以将测量结果的不确定度进一步减小。

【参考文献】

- [1] 国家质量技术监督局. JJF1059-1999,测量不确定度评定与表示[S]. 北京:中国计量出版社,1999.
- [2] 王立云,卢京光,HPLC法测定头孢硫脒含量的不确定度分析[J]. 齐鲁药事,2007,26,(4):217.
- [3] 陈汝红,杨梁,HPLC法测定头孢羟氨苄含量的不确定度评估[J]. 中国药事,2007,21(7):488.
- [4] 陈星,费休氏法测定注射用头孢曲松钠水分的不确定度评定[J]. 海峡药学,2010,22(12):63.
- [5] 王洪家,马兰,贾志刚. 注射用头孢曲松钠含量测定的不确定度分析[J]. 天津药学,2010,22(1):24.
- [6] 申安,HPLC法测定头孢氨苄胶囊含量的测量不确定度评定[J]. 药物分析杂志,2009,29(8):1384.
- [7] 中国药典2010版. 二部[S]. 2010:181.

[收稿日期]2011-05-16

[修回日期]2011-05-25

- [6] Tubaro A, Florio C, Luxich E, et al. Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels[J]. Toxicon, 1996, 34: 965.
- [7] Jeong GS, Lee DS, Kim YC. Cudraticusxanthone A from *Cudrania tricuspidata* suppresses pro-inflammatory mediators through expression of anti-inflammatory heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages[J]. Int J Immunopharmacol, 2009, 9: 241.
- [8] Kim JB, Han AR, Park EY, et al. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30: 2345.
- [9] Kou JP, Sun Y, Lin YY, et al. Anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicus* and its two constituents[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28: 1234.
- [10] Girona J, Vallvé JC, Ribalta J, et al. 2,4-Decadienal downregulates TNF- α gene expression in THP-1 human macrophages[J]. Atherosclerosis, 2001, 158: 95.
- [11] 肖寄平,张炜煜. 脂肪酸在地龙抗炎作用研究中的指示作用[J/OL], 长春中医药大学, 中医中药网.

[收稿日期] 2010-08-31

[修回日期] 2010-11-14