

中图分类号: R927.2; R977.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)03-0085-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.03.018



碳酸钙 D₃ 颗粒(II) 中维生素 D₃ 含量测定的不确定度评定

朱晓月, 吴兆伟, 安京烨, 刘齐, 郑洁, 孙毅, 王琳[△]

(北京市药品检验研究院 <北京市疫苗检验中心> · 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室 · 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 建立测定碳酸钙 D₃ 颗粒(II) 中维生素 D₃ 含量不确定度的评定方法。方法 采用《国家药品标准》WS₁-XG-033-2021 中维生素 D₃ 含量测定方法进行测定, 同时依据《测量不确定度评定与表示》JJF 1059.1-2012 中的相关规定, 建立测定维生素 D₃ 的不确定度数学模型, 并对不确定度来源进行分析和评定。结果 维生素 D₃ 含量的不确定度来源主要有对照品纯度(P_R), 对照品称量(M_R), 对照品溶液制备(V_R), 对照品溶液测定(A_R), 样品称量(M_S), 供试品溶液制备(V_S), 样品平均装量(W), 样品溶液测定(A_S), 高效液相色谱仪(I)及方法偏倚(B)。高效液相色谱外标法测定碳酸钙 D₃ 颗粒(II) 中维生素 D₃ 含量的合成不确定度为 0.022 8, 扩展不确定度为 3.22% ($k=2$, 置信概率为 95%)。方法偏倚引入的相对标准不确定度为 1.83×10^{-2} , 为潜在风险点。结论 所建立的方法适用于高效液相色谱外标法测定碳酸钙 D₃ 颗粒(II) 中维生素 D₃ 含量测定的不确定度评定, 但测定方法回收率较低。建议对该方法进行影响因素试验考察, 以改进检验方法, 提高平均回收率。

关键词: 碳酸钙 D₃ 颗粒(II); 不确定度; 维生素 D₃; 含量测定

Evaluation of Content Uncertainty of Vitamin D₃ in Calcium Carbonate and Vitamin D₃ Granules(II)

ZHU Xiaoyue, WU Zhaowei, AN Jingye, LIU Qi, ZHENG Jie, SUN Yi, WANG Lin

(Beijing Institute for Drug Control < Beijing Center for Vaccine Control > · NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs · Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

Abstract: Objective To establish the evaluation method of content uncertainty of vitamin D₃ in Calcium Carbonate and Vitamin D₃ Granules (II). **Methods** The content of vitamin D₃ was determined by the method in the WS₁-XG-033-2021 National Drug Standard. According to the relevant provisions of JJF 1059.1-2012 Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement, a mathematical model for the content uncertainty of vitamin D₃ was established, and the sources of uncertainty were analyzed and evaluated. **Results** The content uncertainty of vitamin D₃ was mainly from purity of reference (P_R), mass of reference (M_R), preparation of reference solution (V_R), determination of reference solution (A_R), mass of samples (M_S), preparation of sample solution (V_S), average loading weight of samples (W), determination of sample solution (A_S), high-performance liquid chromatography (HPLC) instrument (I), and method bias (B). The synthesis uncertainty of vitamin D₃ content in Calcium Carbonate and Vitamin D₃ Granules (II) determined by the HPLC external standard method was 0.022 8, with an extended uncertainty of 3.22% ($k=2$, confidence probability of 95%), and the relative standard uncertainty introduced by method bias was 1.83×10^{-2} , which was a potential risk point. **Conclusion** The established method is suitable for evaluating the content uncertainty of vitamin D₃ content in Calcium Carbonate and Vitamin D₃ Granules (II) by HPLC external standard method, but the recovery rate of the determination method is relatively low. It is recommended to conduct factor testing on this method to improve the testing method and increase the average recovery rate.

Key words: Calcium Carbonate and Vitamin D₃ Granules (II); uncertainty; vitamin D₃; content determination

碳酸钙 D₃ 颗粒(II) 主要用于补钙和防治骨质疏松症, 较其他补钙制剂经济学评价好^[1], 临床应用广泛。但前期研究发现, 按现行标准《国家药品标准》WS₁-XG-033-2021 中的标准方法测定样品中维生素 D₃ 含量时, 2 份样品结果偏低且不平行。在药品检验领域, 通过对方法不确定度的研究, 可找出影响结果偏差的主要因素^[2-8]。为此, 依据《测量不确定度评定与表示》JJF 1059.1-2012^[9] 中的相关规定, 通过建立数学模型, 分析不确定度来源, 计算各分量合成不确定度及方法扩展不确定度, 对该标准方法进行不确定度评定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), 配有 SPD-M20A 型二极管阵列检测器(PDA); XA205DU 型电子天平(梅特勒-托利多国际贸易 <上海> 有限公司, 精度为 0.01 mg); SB25-12DT 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司, 功率为 500 W); HZQ-F 160 型振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 10 mL、25 mL、50 mL 玻璃容量瓶(BRAND Germany 公司, A 类); 5 mL、15 mL 单标线玻

第一作者: 朱晓月, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为药物分析与评价, (电子信箱) zhuxiaoyuebidc@163.com。

[△]通信作者: 王琳, 女, 博士, 副主任药师, 研究方向为药物分析与药品质量, (电子信箱) lindawang2225@163.com。

璃吸量管(SCRC公司,A类)。

1.2 试药

碳酸钙 D₃ 颗粒(Ⅱ)(批号为 20210403J),混合辅料,均购自 A 企业;维生素 D₃ 对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 100061-202110,含量为 100.0%);二甲基亚砜、正己烷、异丙醇(色谱纯,德国 Merck 公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

避光操作。色谱柱:SIGMAALDRICH SUPELCOSIL LC-SI 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:A 为异丙醇-正己烷(0.45:100, V/V),B 为异丙醇-正己烷(20:80, V/V),梯度洗脱(程序见表 1);流速:1.0 mL/min;检测波长:265 nm;柱温:30 °C;进样量:40 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution program of the mobile phase (%)

时间	流动相 A	流动相 B	时间	流动相 A	流动相 B
0 min	100	0	30 min	0	100
25 min	100	0	31 min	100	0
26 min	0	100	45 min	100	0

2.2 溶液制备

对照品溶液:取维生素 D₃ 对照品 20 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加稀释溶剂(75% 二甲基亚砜水溶液 1 mL,正己烷 20 mL,振摇,静置,取正己烷层)溶解并定容,摇匀;精密量取 5 mL,置 100 mL 容量瓶中,加稀释溶剂溶解并定容,摇匀;精密量取 5 mL,置 100 mL 容量瓶中,加稀释溶剂溶解并定容,摇匀,即得。

供试品溶液:取 20 粒样品内容物,混匀,研细,精密称取细粉(相当于维生素 D₃ 6.25 μg),加 75% 二甲基亚砜水溶液 20 mL,45 °C 水浴超声(功率为 500 W)提取 15 min,放冷,精密加入稀释溶剂 15 mL,密塞,置振荡培养箱(转速为 200 r/min)中振摇萃取 90 min,离心(转速为 3 000 r/min)10 min,取上清液,即得。

2.3 数学模型建立

根据公式(1)建立数学模型。式中,C 为样品中维生素 D₃ 的含量(%);A_S 为供试品溶液中维生素 D₃ 的校正峰面积;M_R 为对照品称样量(mg);P_R 为对照品含量(%);V_S 为样品稀释倍数;W 为样品平均装量(g);A_R 为对照品溶液中维生素 D₃ 的校正峰面积;M_S 为样品称样量(g);V_R 为对照品稀释倍数;Q 为维生素 D₃ 标示量(mg)。

$$C = \frac{A_S \times M_R \times P_R \times V_S \times W}{A_R \times M_S \times V_R \times Q} \times 100\% \quad (1)$$

2.4 相对不确定度计算

2.4.1 对照品对不确定度的贡献[u_{rel}(R)]

1)对照品纯度的相对标准不确定度[u_{rel}(P_R)]

对照品说明书无不确定度相关信息,按其置信区

间 α 为 ± 0.05%、P 为 100% 计^[10],视为矩形分布,则 $u_{rel}(P_R) = 0.05\% \div \sqrt{3} \div 100\% = 0.000289$ 。

2)对照品称量引入的相对标准不确定度[u_{rel}(M_R)]

分别取维生素 D₃ 对照品 20.44 mg 和 20.14 mg,精密称定,平行制备 2 份对照品溶液。称量过程中引入的不确定度有 3 个主要来源:(1)天平校准。依据天平的校准证书,天平检定分度(e)值为 0.1 mg,在 0~5 g 量程内,最大允许误差为 ± 0.5 e,即 ± 0.05 mg,视为矩形分布(k = √3),则天平校准引入的标准不确定度为 $0.05 \div \sqrt{3} = 0.0289 \text{ mg}$ 。(2)天平分辨率。所用电子天平最小有效数字为 0.01 mg,视为矩形分布(k = √3),则分辨率引入的标准不确定度为 $0.01 \div 2 \div \sqrt{3} = 0.00289 \text{ mg}$ 。(3)称量重复性。称量时重复性最大允许误差为 1.5 e,即 0.15 mg,视为矩形分布(k = √3),则重复性引入的不确定度为 $0.15 \div \sqrt{3} = 0.0866 \text{ mg}$ 。单次称量的相对标准不确定度为 $\sqrt{0.0289^2 + 0.00289^2 + 0.0866^2} = 0.0913 \text{ mg}$ 。天平共称量 2 次(对照品和纸重各 1 次),故 2 次称量的相对标准不确定度为 $\sqrt{2 \times 0.0913^2} = 0.129 \text{ mg}$ 。则 $u_{rel}(M_R) = \sqrt{(0.129 \div 20.44)^2 + (0.129 \div 20.14)^2} = 0.00899$ 。

3)对照品溶液制备引入的相对标准不确定度[u_{rel}(V_R)]

配制对照品溶液过程引入的不确定度主要有吸量管(A 级)校准不确定度、容量瓶(A 级)校准不确定度和温差导致溶液膨胀的不确定度。依照 JJF1059.1-2012^[9]和 JJF1135-2005^[11]的要求,吸量管、容量瓶的不确定度的估算应按三角分布(k = √6)。20 °C 正己烷体积膨胀系数为 $1.36 \times 10^{-3} \text{ mL} / \text{°C}$ ^[12],设实验室的温度在 ± 4 °C 范围内变动,取波动最大值 4 °C,温差导致溶液体积膨胀视为矩形分布(k = √3)。吸量管及容量瓶的容量允许误差^[13-14]见表 2,各分量不确定度见表 3。对照品溶液制备过程中,使用 5 mL 单标线吸量管 2 次,使用 100 mL 容量瓶 3 次,根据表 3 中各分量的结果,得 $u_{rel}(V_R) = \sqrt{2 \times 0.00337^2 + 3 \times 0.00317^2} = 0.00727$ 。

表 2 容量允许误差(mL)

Tab. 2 Admissible error of volume (mL)

玻璃仪器	规格	允许误差
单标线吸量管	5 mL	± 0.015
单标线吸量管	15 mL	± 0.025
容量瓶	100 mL	± 0.10

4)对照品溶液测定引入的相对标准不确定度[u_{rel}(A_R)]

对照品溶液测定的峰面积受进样量重复性、泵流速稳定性、分离度重复性、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,可合并

表3 各分量不确定度

Tab. 3 Uncertainty of each weight

玻璃仪器	规格	校准不确定度(mL)	溶液膨胀不确定度(mL)	各分量不确定度
单标线吸量管	5 mL	$0.015 \div \sqrt{6} = 0.00612$	$5 \times 1.36 \times 10^{-3} \times 4 \div \sqrt{3} = 0.0157$	$\sqrt{0.00612^2 + 0.0157^2} \div 5 = 0.00337$
单标线吸量管	15 mL	$0.025 \div \sqrt{6} = 0.0102$	$15 \times 1.36 \times 10^{-3} \times 4 \div \sqrt{3} = 0.0471$	$\sqrt{0.0102^2 + 0.0471^2} \div 15 = 0.00321$
容量瓶	100 mL	$0.10 \div \sqrt{6} = 0.0408$	$100 \times 1.36 \times 10^{-3} \times 4 \div \sqrt{3} = 0.314$	$\sqrt{0.0408^2 + 0.314^2} \div 100 = 0.00317$

为进样重复性^[15]。按外标法测定,通常平行制备2份对照品溶液,分别进样5次和2次。因此,采用极差法^[10]计算每份对照品溶液测定的相对标准不确定度,则 $u_{rel}(A_R) = \sqrt{0.00280^2 + 0.00374^2} = 0.00467$ 。详见表4。

表4 对照品溶液测定的不确定度

Tab. 4 Uncertainty of determination of reference solution

对照品	平均峰面积	极差	进样次数	极差系数	不确定度
1	53490	779	5	2.33	$779 \div 2.33 \div \sqrt{5} \div 53490 = 0.00280$
2	52688	315	2	1.13	$315 \div 1.13 \div \sqrt{2} \div 52688 = 0.00374$

5) 对照品引入的相对标准不确定度 $[u_{rel}(R)]$

$$u_{rel}(R) =$$

$$\sqrt{u_{rel}(P_R)^2 + u_{rel}(M_R)^2 + u_{rel}(V_R)^2 + u_{rel}(A_R)^2} = 0.0125。$$

2.4.2 样品对不确定度的贡献 $[u_{rel}(S)]$

1) 样品称量引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(M_S)$

分别取样品细粉4 003.57 mg和4 013.15 mg,精密称定,平行制备2份供试品溶液,称量过程中引入的不确定度来源与对照品一致,即天平校准、天平分辨率和称量重复性。样品称量使用的天平与对照品一致,则 $u_{rel}(M_S) = \sqrt{(0.129 \div 4 003.57)^2 + (0.129 \div 4 013.15)^2} = 0.0000455$ 。

2) 供试品溶液制备的相对标准不确定度 $[u_{rel}(V_S)]$

制备供试品溶液过程引入的不确定度来源分别为吸量管校准不确定度和温差导致溶液膨胀的不确定度。供试品溶液制备过程中,使用15 mL单标线吸量管1次,由表3可知, $u_{rel}(V_S) = 0.00321$ 。

3) 样品平均装量引入的相对标准不确定度 $[u_{rel}(W)]$

取样品20粒,精密称定质量,倾出内容物,囊壳用棉签拭净,再精密称定囊壳质量,求得平均装量。平均装量引入的不确定度来源为天平称量的不确定度,称量使用的天平与对照品一致,20粒胶囊总质量为73 074.01 mg,20粒囊壳总质量为11 446.13 mg,则 $u_{rel}(W) = \sqrt{(0.129 \div 73 074.01)^2 + (0.129 \div 11 446.13)^2} = 0.0000114$ 。

4) 供试品溶液测定引入的相对标准不确定度 $[u_{rel}(A_S)]$

平行制备2份供试品溶液,各进样1次,维生素D₃含量为70.32%和71.19%,标准偏差(S)为0.00615,根据标准不确定度A类评定方法^[3],则 $u_{rel}(A_S) = 0.00615 \div \sqrt{2} = 0.00435$ 。

5) 样品引入的相对标准不确定度 $[u_{rel}(S)]$

$$u_{rel}(S) = \sqrt{u_{rel}(M_S)^2 + u_{rel}(V_S)^2 + u_{rel}(W)^2 + u_{rel}(A_S)^2} = 0.00541。$$

2.4.3 高效液相色谱仪对不确定度的贡献 $[u_{rel}(I)]$

经查校准证书可知,高效液相色谱仪紫外检测器定量测量重复性为0.1%,视为矩形分布($k = \sqrt{3}$),则 $u_{rel}(I) = 0.1\% \div \sqrt{3} = 0.000577$ 。

2.4.4 方法偏倚对不确定度的贡献 $[u_{rel}(B)]$

分析方法的偏倚表示为分析回收率。采用加样回收试验法,制备相当于供试品溶液浓度60%,100%,160%的回收样品,各3份,回收率测定结果见表5。方法偏倚的标准不确定度为 $u_{rel}(B) = 4.60\% \div \sqrt{9} = 1.53\%$,则 $u_{rel}(B) = 1.53\% \div 83.82\% = 0.0183$ 。

表5 加样回收试验测定结果(% , n = 9)

Tab. 5 Results of the recovery test (% , n = 9)

相当于供试品溶液的浓度	回收率			$\bar{X}(\%)$	S(%)
	1	2	3		
60%	76.76	82.68	85.16		
100%	85.57	78.24	86.99	83.82	4.60
160%	81.39	91.67	85.88		

2.5 不确定度评定

计算方法的合成不确定度 $[u_C(C)]$ 为 $u_C(C) = \sqrt{u_{rel}(R)^2 + u_{rel}(S)^2 + u_{rel}(I)^2 + u_{rel}(B)^2} = 0.0228$ 。测得样品中维生素D₃平均含量为70.76%,则 $u_C(C) = 0.0228 \times 70.76\% = 1.61\%$ 。取扩展因子 $k = 2$,此时置信概率为95%,则扩展不确定度为 $U_{95} = ku_C(C) = 2 \times 1.61\% = 3.22\%$ 。由表6可知,影响该方法结果准确度的主要因素为方法偏倚。

3 讨论

采用《国家药品标准》WS₁-XG-033-2021中维生素D₃含量测定方法测定碳酸钙D₃颗粒(II)中维生素D₃,结果表示为(70.76 ± 3.22)%,置信概率为95%, $k = 2$ 。本研究中分析了不确定度的来源,计算各分量不确定度,并对结果进行综合评定,碳酸钙D₃颗粒(II)中维生素D₃含量测定的不确定度贡献主要来源于方法偏倚。该方法回收率较低,三水平回收样品的平均回收率仅为83.82%,相对标准偏差(RSD)为4.60%($n = 9$)。建议对该方法进行影响因素试验考察,制订准确、可靠的检