

中图分类号: R927.2; R975+.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)17-0104-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.17.024



电位滴定法测定能力验证样品含量的不确定度评定*

杨梅, 伍良涌, 李玮玲, 邱娟

(广东省广州市药品检验所, 广东 广州 510160)

摘要:目的 评定电位滴定法测定能力验证样品含量的不确定度, 探讨影响测定的不确定度分量。方法 采用电位滴定法测定门冬酰胺一水合物及门冬氨酸含量。建立测量模型, 分析不确定度来源, 计算各分量的相对标准不确定度及2种样品的合成不确定度。结果 门冬酰胺一水合物含量为87.53%, 合成标准不确定度为0.24%; 门冬氨酸含量为99.68%, 合成标准不确定度为0.22%。结论 建立了电位滴定法测定能力验证样品含量的不确定度评定方法, 且验证结果满意, 可为能力验证样品含量测定结果的可信度提供支持。
关键词: 电位滴定法; 不确定度; 能力验证; 门冬酰胺一水合物; 门冬氨酸; 含量测定

Evaluation of Uncertainty for the Determination of Proficiency Testing Samples by the Potentiometric Titration

YANG Mei, WU Liangyong, LI Weiling, QIU Juan

(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou, Guangdong, China 510160)

Abstract: Objective To evaluate the uncertainty for the determination of proficiency testing samples by potentiometric titration, and to investigate the uncertainty components affecting the evaluation. **Methods** Potentiometric titration was used to determine the content of asparagine monohydrate and aspartic acid. The evaluation model was established to analyze the sources of uncertainty, and calculate the relative standard uncertainty of sub-scales and the composite uncertainty of two samples. **Results** The content of asparagine monohydrate was 87.53%, and the combined standard uncertainty was 0.24%. The content of aspartic acid was 99.68%,

* 基金项目: 欧洲药品质量管理局(EDQM)能力验证项目[PTS236]。

第一作者: 杨梅, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药品检验与药品质量标准, (电子邮箱)273779284@qq.com。

生物的真实状态^[14]。本研究中由于样品抑菌活性和冲洗的理化特性, 存在大量抑制或破坏微生物生长的因素, 故只能在最后1次冲洗时加菌, 这也符合薄膜过滤法的试验要求。

抗菌药物的方法适用性研究中, 曾使用大环内酯酶作为中和抑制剂^[7], 其主要是通过酶解作用去除有抑菌作用的生物型中和剂, 但也要通过试验回收来确定酶解时间及用量, 且大环内酯酶价格高, 从成本控制、酶使用量、方法适用性普及等综合考虑, 应首选《中国药典》收录的方法。

参考文献

[1] 刘玉芬. 罗红霉素产品的质量分析[J]. 中国抗生素杂志, 1996, 21(5): 25-28.
[2] 范巧云, 陆赛花, 刘莉, 等. 罗红霉素分散片有关物质分析方法优化及一致性评价研究[J]. 药物评价研究, 2022, 45(6): 1099-1107.
[3] 牛萌萌, 王立云, 姬俊, 等. 2种大环内酯类抗生素干混悬剂微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国药事, 2023, 37(2): 205-209.
[4] 沈锐, 周剑, 严海元, 等. 罗红霉素片的微生物限度研究[J], 海峡药学, 2022, 34(1): 81-84.

[5] 张石革, 马国辉. 第二代大环内酯类抗生素的代表药物与临床应用[J]. 首都医药, 2003, 10(6): 31-34.
[6] 冯璐, 曹敏, 钮晓淑, 等. 甲硝唑凝胶微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国药业, 2022, 31(18): 69-72.
[7] 闵红, 杨晓莉, 李翠, 等. 阿莫西林胶囊微生物检查方法学研究[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(2): 218-223.
[8] 解慧, 刘洪祥, 杨倩, 等. 《美国药典》(USP42-NF372S)通则药品微生物回收的验证[J]. 中国药品标准, 2020, 21(2): 146-149.
[9] 庞云娟, 樊文研, 刘康连, 等. 药品微生物限度检查方法学验证的研究进展[J]. 中成药, 2017, 39(10): 2137-2140.
[10] 闵红, 杨晓莉, 贺聪莹, 等. 丙泊酚乳状注射液抑菌效力评价及抑菌效力检查法解析[J]. 中国药业, 2019, 28(17): 28-31.
[11] 李翠, 闵红, 谢毓华, 等. 莫匹罗星软膏微生物限度检查方法适用性研究及水分活度测定[J]. 中国药业, 2022, 31(5): 76-79.
[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 160-170.
[13] 杨美琴, 蔡春燕, 刘鹏, 等. 盐酸莫西沙星片微生物限度检查方法讨论[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(3): 245-251.
[14] 马仕洪, 刘鹏, 杨利红, 等. 药品微生物限度检查方法适用性试验中加菌方式的实验研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 877-882.

(收稿日期: 2024-03-25; 修回日期: 2024-05-10)

and the combined standard uncertainty was 0.22%. **Conclusion** The method of the uncertainty evaluation for the determination of proficiency testing samples is established, and the results of the proficiency testing are satisfied, which can provide a support for the credibility of the results of the content determination of proficiency testing samples.

Key words: potentiometric titration; uncertainty; proficiency testing; asparagine monohydrate; aspartic acid; content determination

测量不确定度是表征赋予被测量值分散性的非负参数,由若干分量构成,是与测量结果相关联的参数,用于评定测量结果的可信程度^[1-2]。为实现检验结果的可靠性,中国合格评定国家认可委员会对检测和校准实验室提出了应做测量不确定度的要求,指出一个完整的定量分析结果应包含测量值和测量不确定度^[3-4]。欧洲药品监督管理局(EDQM)是全球权威的实验室能力验证组织机构^[5-7],每年组织药品领域不同检测方法的能力验证,国内越来越多实验室尤其是药品检验检测机构积极参与该能力验证^[8-9]。近年来,该机构组织的能力验证要求参与的实验室报告测定结果的不确定度值,并对各实验室报告的不确定度值给出评价,正确表达和评定测量不确定度将逐步成为国际通用要求^[10-13]。本研究为实验室参加EDQM电位滴定法能力验证项目,以《欧洲药典》(EP)通则2.2.20. 电位滴定法^[14]和EDQM能力验证文件^[15]为指导原则,对电位滴定法测定门冬酰胺一水合物和门冬氨酸含量的不确定度进行分析,并报告了含量测定的标准不确定度值,为今后各实验室参加EDQM能力验证时评定不确定度提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

905型自动电位滴定仪(瑞士Metrohm公司,配有20 mL滴定管单元);XSE204型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.1 mg);P300H型超声波清洗仪(Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG,功率为1 580 W,频率为80 kHz)。

1.2 试剂

门冬酰胺一水合物(样品A,400 mg,批号为PTS23601),门冬氨酸(样品B,370 mg,批号为PTS23602),均来源于EDQM;氢氧化钠滴定液(化学室配制,浓度为0.1 mol/L,标定日期为2023年3月7日,有效期至2023年6月6日,标定温度为24.0℃);高氯酸滴定液(化学室配制,浓度为0.1 mol/L,标定日期为2023年3月9日,有效期至2023年6月8日,标定温度为24.0℃);醋酐(分析纯,利安隆博华<天津>医药化学有限公司,批号为20171220);无水甲酸(批号为20190601 12),冰醋酸(批号为20220701 22),均为分析纯,购于广州化学试剂厂;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 门冬酰胺一水合物含量测定方法

取样品A 0.11 g,精密称定,加无水甲酸5 mL使溶解,加无水冰醋酸50 mL,照EP通则2.2.20. 电位滴定法,用0.1 mol/L高氯酸滴定液滴定,每1 mL 0.1 mol/L高氯酸滴定液相当于13.21 mg门冬酰胺($C_4H_8N_2O_3$)。结果见表1。

表1 门冬酰胺一水合物含量测定结果($n=3$)

Tab. 1 Results of the content determination of asparagine monohydrate ($n=3$)

取样量(g)	滴定体积(mL)	含量(%)	\bar{X} (%)	SD	RSD(%)
0.109 8	7.377 6	87.61			
0.109 4	7.320 6	87.25	87.53	0.25	0.29
0.108 9	7.327 4	87.73			

2.2 门冬氨酸含量测定方法

取样品B 0.1 g,精密称定,加无二氧化碳的水50 mL,超声使溶解,照EP通则2.2.20. 电位滴定法,用0.1 mol/L氢氧化钠滴定液滴定,每1 mL 0.1 mol/L氢氧化钠滴定液相当于13.31 mg门冬氨酸($C_4H_7NO_4$)。结果见表2。

表2 门冬氨酸含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Results of the content determination of aspartic acid ($n=3$)

取样量(g)	滴定体积(mL)	含量(%)	\bar{X} (%)	SD	RSD(%)
0.100 9	7.499 4	99.62			
0.103 1	7.664 8	99.64	99.68	0.09	0.09
0.103 3	7.689 8	99.78			

2.3 不确定度评定

2.3.1 测量模型建立

根据测定原理及公式(1)计算样品的百分含量(Y)。

$$Y = [(V \times F \times T) / (m \times 1000)] \times 100\% \quad (1)$$

式中, V 为消耗滴定液的体积(mL); F 为滴定液浓度的校正因子(相当于理论浓度0.1 mol/L); T 为滴定度,门冬酰胺一水合物为每1 mL 0.1 mol/L高氯酸滴定液相当于13.21 mg $C_4H_8N_2O_3$,门冬氨酸为每1 mL 0.1 mol/L氢氧化钠滴定液相当于13.31 mg $C_4H_7NO_4$; m 为样品取样量(g)。由于样品的百分含量(Y)是3份平行样品的平均值,故不确定度评定还应加入重复性修正值 R , $Y' = Y + R$ 。

2.3.2 不确定度来源分析

由上述测量模型可知,影响电位滴定法测定样品含量结果的不确定度因素有以下5个方面。1)消耗滴定液的体积引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$,包括滴定管的容量误差、测定温度与标定温度差的体积膨胀和自动电位滴定仪终点判定误差引入;2)滴定液浓度的校正因子引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(F)$;3)滴定度引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(T)$;4)样品称量引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$,包括样品称量天平的示值误差和重复性误差;5)样品测定重复性引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(R_{\text{样}})$ 。按测量不确定度评估程序分别对各分量进行不确定度的分析与评估。

2.3.3 不确定度评定

消耗滴定液的体积引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$:1)滴定管的容量误差引入的相对标准不确定度 $u_{1\text{rel}}(V)$ 。自动电位滴定仪检定证书给出的20 mL滴定管的容量误差为0.001 mL(0~10 mL),按三角分布 $k = \sqrt{6}$ 计算,则其标准不确定度为 $u_1(V) = 0.001 / \sqrt{6} = 0.00040825$ mL。样品A消耗滴定液体积约为7.3 mL,故样品A滴定管的容量误差引入的相对标准不确定度 $u_{1\text{rel}}(V_A) = 0.00040825 / 7.3 = 5.59 \times 10^{-5}$;样品B消耗滴定液体积约为7.6 mL,故样品B滴定管的容量误差引入的相对标准不确定度 $u_{1\text{rel}}(V_B) = 0.00040825 / 7.6 = 5.37 \times 10^{-5}$ 。2)测定温度与标定温度差的体积膨胀引入的相对标准不确定度 $u_{2\text{rel}}(V)$ 。本次测量过程中的实验室标定温度为24.0℃,样品测定温度为24.0℃,由于样品测定和标定温度一致,故本研究中不再考虑温度的影响。3)自动电位滴定仪终点判定引入的相对标准不确定度 $u_{3\text{rel}}(V)$ 。自动电位滴定仪检定证书给出电极电位的重复性为0.12%,未提供其不确定度,按均匀分布 $k = \sqrt{3}$ 计算,则终点判定引入的相对标准不确定度为 $u_{3\text{rel}}(V) = 0.12\% / \sqrt{3} = 6.93 \times 10^{-4}$ 。将以上合成得到 $u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{u_{1\text{rel}}^2(V) + u_{3\text{rel}}^2(V)}$,故样品A体积引入的相对标准不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_A) = \sqrt{(5.59 \times 10^{-5})^2 + (6.93 \times 10^{-4})^2} = 6.95 \times 10^{-4}$;样品B引入的相对标准不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_B) = \sqrt{(5.37 \times 10^{-5})^2 + (6.93 \times 10^{-4})^2} = 6.95 \times 10^{-4}$ 。

滴定液浓度的校正因子引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(F)$:0.1 mol/L高氯酸滴定液(测定样品A)和0.1 mol/L氢氧化钠滴定液(测定样品B)均照EP 11.0滴定液项下的要求进行标定,并计算其相对标准不确定度。得0.1 mol/L高氯酸滴定液浓度校正因子 $F = 0.98682$,则相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(F_A) = 9.82 \times 10^{-4}$;

得0.1 mol/L氢氧化钠滴定液浓度校正因子 $F = 1.00651$,则相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(F_B) = 1.11 \times 10^{-3}$ 。

滴定度引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(T)$:样品A滴定度(T_A)指每1 mL滴定液相当于13.21 mg $C_4H_8N_2O_3$,样品B滴定度(T_B)指每1 mL滴定液相当于13.31 mg $C_4H_7NO_4$,则滴定度 $T_A = 0.1 \text{ mol/L} \times m_{C_4H_8N_2O_3} = 13.21 \text{ mg/mL}$, $T_B = 0.1 \text{ mol/L} \times m_{C_4H_7NO_4} = 13.31 \text{ mg}$ 。滴定度的相对标准不确定度由分子量引入,查询最新国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)原子量表,碳(C)、氢(H)、氧(O)、氮(N)元素的原子量分别为12.0107,1.00794,15.9994,14.0067,不确定值分别为 ± 0.0008 , ± 0.00007 , ± 0.0003 , ± 0.0002 ,则 $C_4H_8N_2O_3$ 的分子量为132.11792 g/mol, $C_4H_7NO_4$ 的分子量为133.10268 g/mol。故滴定度引入的相对标准不确定度分别为 $u_{\text{rel}}(T_A) = \sqrt{(4 \times 0.0008)^2 + (8 \times 0.00007)^2 + (2 \times 0.0002)^2 + (3 \times 0.0003)^2} / 132.11792 = 2.57 \times 10^{-5}$; $u_{\text{rel}}(T_B) = \sqrt{(4 \times 0.0008)^2 + (7 \times 0.00007)^2 + (1 \times 0.0002)^2 + (4 \times 0.0003)^2} / 133.10268 = 2.60 \times 10^{-5}$ 。

样品称量引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$:万分之一天平的检定证书给出的示值误差为0.0 mg(0~50 g), $u_1 = 0$ mg;称量重复性误差为0.2 mg,按均匀分布 $k = \sqrt{3}$ 计算,标准不确定度为 $u_2 = (0.2 / \sqrt{3}) \times 10^{-3} = 0.00011547$ g。则天平引入的标准不确定度 $u = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = 0.00011547$ g。采用减量法称样,由2次称量操作所得,因每次称量均为独立观测结果,故计算2次称量的不确定度。样品A的取样量为0.11 g,故称量引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m_A) = \sqrt{2 \times u^2} / 0.11 = 1.48 \times 10^{-3}$;样品B的取样量为0.10 g,故称量引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(m_B) = \sqrt{2 \times u^2} / 0.10 = 1.63 \times 10^{-3}$ 。

样品测定重复性引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$:取3份样品,以结果的平均值作为测定值。平行样本量较少,采用极差法分析较合理,当 $n = 3$ 时极差系数为 $C = 1.69$ 。样品A测定结果分别为87.61%,87.25%,87.73%,平均为87.53%,则 $u_{\text{rel}}(R_A) = (87.73\% - 87.25\%) / (1.69 \times \sqrt{3} \times 87.53\%) = 1.87 \times 10^{-3}$;样品B测定结果分别为99.62%,99.64%,99.78%,平均为99.68%,则 $u_{\text{rel}}(R_B) = (99.78\% - 99.62\%) / (1.69 \times \sqrt{3} \times 99.68\%) = 5.48 \times 10^{-4}$ 。

2.3.4 合成相对标准不确定度

各相对标准不确定度分量见表3。故样品A和样品B的合成相对标准不确定度分别为 $u_{\text{rel}}(Y_A) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_A) + u_{\text{rel}}^2(F_A) + u_{\text{rel}}^2(T_A) + u_{\text{rel}}^2(m_A) + u_{\text{rel}}^2(R_A)} =$

$$0.002 \quad 7; \quad u_{\text{rel}} \quad (Y_B) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_B) + u_{\text{rel}}^2(F_B) + u_{\text{rel}}^2(T_B) + u_{\text{rel}}^2(m_B) + u_{\text{rel}}^2(R_B)} = 0.0022。$$

表3 相对标准不确定度分量

Tab. 3 Sub - scales of the relative standard uncertainty

分量	不确定度来源	门冬酰胺一水合物	门冬氨酸
$u_{\text{rel}}(V)$	消耗滴定液体积	6.95×10^{-4}	6.95×10^{-4}
$u_{\text{rel}}(F)$	滴定液浓度的校正因子	9.82×10^{-4}	1.11×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(T)$	滴定度	2.57×10^{-5}	2.60×10^{-5}
$u_{\text{rel}}(m)$	样品称量	1.48×10^{-3}	1.63×10^{-3}
$u_{\text{rel}}(R)$	样品测定重复性	1.87×10^{-3}	5.48×10^{-4}

2.3.5 合成标准不确定度

试验测得样品 A 的含量(以 $C_4H_8N_2O_3$ 计) $Y_A = 87.53\%$, 则合成标准不确定度 $u(Y_A) = u_{\text{rel}}(Y_A) \times Y_A = 0.0027 \times 87.53\% = 0.24\%$; 样品 B 的含量(以 $C_4H_7NO_4$ 计) $Y_B = 99.68\%$, 则合成标准不确定度 $u(Y_B) = u_{\text{rel}}(Y_B) \times Y_B = 0.0022 \times 99.68\% = 0.22\%$ 。

3 讨论

分析不确定度来源, 以及确定其对测量结果不确定度的影响是不确定度评定中最困难的部分。部分不确定度来源可能被忽略或被重复计算。本研究结果显示, 影响不确定度的来源主要有样品称量(m)、滴定液消耗体积(V)、滴定液浓度的校正因子(F)、3次测量的重复性(R)、滴定度(T)。故试验过程中应定期检定电子天平和自动电位滴定仪, 确认性能合格, 确保仪器处于良好、稳定的工作状态, 并加强仪器的日常维护; 分析过程中使用经校准合格的容量仪器; 合理控制试验时的环境温度, 尤其进行高氯酸滴定时环境温度对滴定的结果影响较大, 滴定过程中应严格控制并记录环境温度。本研究中滴定液的标定滴定温度与测定温度一样, 故无须校正, 不用考虑温度不确定度分量的影响。

本研究为实验室参加 EDQM 电位滴定法能力验证项目, 由于以 EP 通则 2.2.20 电位滴定法^[14]和 EDQM 能力验证文件^[15]为作业指导书, 门冬酰胺一水合物的含量测定采用高氯酸滴定, 滴定液的标定及样品的测定均未进行空白校正, 而 2020 年版《中国药典(四部)》中高氯酸滴定液的标定及门冬酰胺一水合物的含量测定均应进行空白校正。故同时考察了不考虑空白校正和考虑空白校正的结果, 发现 2 种方法的结果相当(分别为 87.53%, 87.49%), 考虑为 EDQM 能力验证, 试验结果最终以 87.53%(EP 方法)报告。

本研究中对电位滴定法测定门冬酰胺一水合物和门冬氨酸含量的不确定度进行评定, 通过分析各不

确定度分量并进行合成, 最终得到门冬酰胺一水合物和门冬氨酸含量测定的合成标准不确定度分别为 0.24% 和 0.22%, 实验室本次能力验证结果为“满意”, 不确定度评定结果被组织方评价为“正确评估”。本研究中建立的不确定度评定方法可为实验室在参加 EDQM 能力验证时评定和报告不确定度提供参考。但 EDQM 能力验证文件中要求参与实验室提供的是标准不确定度, 而非扩展不确定度, 注意报告不确定度时不要混淆。

参考文献

- [1] JJF1059.1—2012, 中华人民共和国国家计量技术规范: 测量不确定度评定与表示[S].
- [2] 中国实验室国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2002: 4-5.
- [3] 陆明, 范国荣, 汪杨, 等. 测量不确定度在药品检测领域的研究进展[J]. 中国药事, 2013, 27(5): 485-492.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL01: 检测和校准实验室能力认可准则(ISO/IEC 17025:2017) [A/OL]. (2018-03-01)[2023-09-08]. <https://cdepc.gd.gov.cn/attachment/0/320/32047313437486.pdf>.
- [5] 王岩. EDQM 机构与职能的简介[J]. 中国药事, 2008, 22(12): 1134-1135.
- [6] 黄宝斌, 许明哲. 欧洲官方药品质量控制实验室联盟管理机制介绍[J]. 中国药事, 2019, 33(4): 408-415.
- [7] 黄宝斌, 许明哲. 欧洲官方药品质量控制实验室联盟的运行和管理[J]. 中国药事, 2019, 33(4): 416-421.
- [8] 鹿赛, 鹿发根, 江坤, 等. 电位滴定法测定甘氨酸含量的不确定度评定[J]. 中国医药导刊, 2022, 24(8): 836-839.
- [9] 鹿赛, 鹿发根, 江坤, 等. 阿司匹林中 对羟基苯甲酸杂质测定不确定度评定方法的建立[J]. 中国合理用药探究, 2021, 18(8): 99-105.
- [10] 朱清丽, 李鹏, 郭梦倩, 等. 高效液相色谱法测定盐酸吗啡片含量的不确定度评定[J]. 中国药业, 2021, 30(18): 60-64.
- [11] 刘文杰, 井良义, 郝运伟, 等. 板蓝根颗粒需氧菌总数测定不确定度分析[J]. 中国药业, 2022, 31(20): 69-72.
- [12] 张莉敏, 李墨耕, 王晓梅. 肾宝片需氧菌总数测量不确定度评定[J]. 中国药业, 2022, 31(5): 93-95.
- [13] 李潇, 周长明, 丁锐, 等. 复方营养混悬剂中铁元素的测定及其不确定度评定[J]. 中国药业, 2022, 31(4): 75-79.
- [14] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia 11.0 [M]. Strasbourg: European Directorate Health Care, 2022: 41-42.
- [15] EDQM. Department of Biological Standardisation, OMCL Network & Health Care, Proficiency Testing Scheme on Potentiometric titration (PTS236) [M]. European: Proficiency Testing Study, 2023: 1-5.

(收稿日期: 2023-10-07; 修回日期: 2024-03-14)