

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.09.05

高效液相色谱法测定兽药伊维菌素注射液含量的不确定度评定

陈锡龙, 赵贵, 杨强, 周泽晓, 孙真峥, 王庆红, 谢丽丽

(贵州省兽药饲料检测所, 贵阳 550003)

[收稿日期] 2022-03-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 09-0029-09 [中图分类号] S859.83

[摘要] 通过建立数学模型,对高效液相色谱法测定兽药伊维菌素注射液中伊维菌素的含量进行不确定度评定,分析不确定度来源及其对测定过程中不确定度的相对贡献,并计算合成不确定度,最终得到兽药伊维菌素注射液中伊维菌素含量的扩展不确定度。当伊维菌素注射液含量为 101.5% 时,在 95% 的置信区间下,扩展不确定度为 3.0% ($k=2$)。实验过程中的不确定度主要来源于标准工作曲线系列溶液的配制、样品前处理及对照品贮备液配制环节,测量过程中应重点关注并严格加以控制。研究可为兽药检测机构测定兽药伊维菌素注射液含量的质量控制提供参考。

[关键词] 高效液相色谱法;伊维菌素注射液;不确定度

Uncertainty Evaluation for Determination of the Content of Ivermectin in Ivermectin Injection by HPLC

CHEN Xi-Long, ZHAO Gui, YANG Qiang, ZHOU Ze-Xiao, SUN Zhen-zheng,
WANG Qing-Hong, XIE Li-Li

(Guizhou Provincial Inspecting Institute of Veterinary Drug and Feeds, Guiyang 550003, China)

Abstract: Through establishing a mathematical model, the uncertainty of determination of the content of ivermectin injection by HPLC was evaluated. The source of uncertainty and its relative contribution to the uncertainty in the determination process were analyzed, and the synthetic uncertainty was calculated as well. Finally, the extension uncertainty of ivermectin in ivermectin injection was obtained. Within the 95% confidence interval, while the ivermectin content was 101.5%, the extension uncertainty was 3.0% ($k=2$). The evaluation shows that the uncertainties of the experiment are mainly derived from preparations of serial standard working solutions, samples, and the standard storage solution, which should be paid more attention to and be controlled carefully when measuring. The article could provide suggestion for veterinary drug testing institutes to control its quality when measure the content of ivermectin in ivermectin injection.

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2019]2320号)

作者简介: 陈锡龙, 正高级兽医师, 从事兽药、饲料及畜产品质量安全检测及研究。E-mail: cxlofyjs@163.com

Key words: HPLC; ivermectin injection; uncertainty

伊维菌素 (Ivermectin, IVM) 是大环内酯类抗寄生虫药,用途极为广泛。国内临床上常用于治疗牛、羊、骆驼、猪等多种家畜的寄生虫病,也被用于治疗鱼类中华鲩、锚头鲩、车轮虫感染等疾病^[1-4]。一些非洲国家则使用伊维菌素来治疗人的疟疾、疥疮以及传染性寄生虫病^[5-7]。新冠肺炎暴发后,伊维菌素还被用于预防和治疗新冠病毒^[8-9]。兽药伊维菌素注射液被收载于《中华人民共和国兽药典》一部中,目前,关于伊维菌素含量测定不确定度的评定鲜有报道。而测量不确定度评定是日常检验工作的重要组成部分,可为进一步提高检测数据的质量提供技术支撑,对实验室管理和质量控制具有重要意义。本实验参考 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》和 CNAS-GL006-2019《化学分析中不确定度的评估指南》的要求,采用标准曲线定量,对高效液相色谱法测定伊维菌素注射液含量实验过程中的不确定度来源进行分析评估,以为实验室科学、准确测量伊维菌素注射液的含量提供质量控制依据。

1 材料和方法

1.1 仪器设备 Thermo Scientific Ultimate 3000 高效液相色谱仪配 DAD 检测器(美国赛默飞公司);BP211D 型电子分析天平(感量:0.01 mg,德国塞多利斯公司);电子分析天平(感量:0.1 mg,瑞士梅特勒-托利多公司);Milli-Direct-Q8UV-R 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

1.2 材料和试剂 伊维菌素对照品(批号:K0192007,含量 92.0%,中国兽医药品监察所);伊维菌素注射液(贵州省兽药饲料检测所监督抽检样品,由 C 公司生产,批号:20200301;规格:按伊维菌素($H_2B_{1a} + H_2B_{1b}$)计算 5 mL:50 mg);甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱:Zorbax SB C₁₈(5 μm, 4.6 × 250 mm);柱温为 30 ℃;流动相:水-甲醇-

乙腈(12:35:53);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 254 nm;进样体积为 20 μL。

1.3.2 对照品溶液的制备 精密称取伊维菌素对照品 54.24 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,混匀,即得伊维菌素为 0.9980 mg/mL 对照品贮备液。精密量取伊维菌素对照品贮备液 1.00、2.00、3.00、5.00、10.00 和 25.00 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得伊维菌素浓度为 0.03992、0.07984、0.11976、0.1996、0.3992 和 0.9980 mg/mL 的标准工作曲线系列溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备 精密吸取伊维菌素注射液样品 5.00 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀。另取上述稀释液 5.00 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀,即得。

1.3.4 数学模型和不确定度来源分析 本实验的数学模型为:

$$\omega = \frac{c \times V_{25} \times \frac{V_{50}}{V'_{\text{样}2}}}{V'_{\text{样}1} \times \text{样品规格}} \times 100\% \times f_{\text{重复测量}}$$

$$c_0 = \frac{m_0 \times \rho}{V_0}, c_0 \rightarrow c_{\text{std}1-6}$$

其中: ω - 试样中伊维菌素的百分含量(%); c - 利用标准工作曲线查得的伊维菌素测试样品的质量浓度(mg/mL); V_{25} - 试样最终定容体积(mL); V_{50} - 试样第一次稀释定容的体积(mL); $V'_{\text{样}1}$ - 5 mL 单标线吸量管第一次吸取伊维菌素供试样品的体积(mL); $V'_{\text{样}2}$ - 5 mL 单标线吸量管第二次吸取伊维菌素供试样品稀释液的体积(mL);样品规格 - 伊维菌素注射液供试样品的规格; $f_{\text{重复测量}}$ - 测量重复性; c_0 为伊维菌素对照品贮备液的浓度(mg/mL); m_0 - 伊维菌素对照品的质量(mg); ρ - 伊维菌素对照品的含量(%); V_0 - 伊维菌素对照品贮备液配制时的定容体积(mL); $c_{\text{std}1-6}$ - 拟合标准工作曲线系列对照品溶液的质量浓度(mg/mL)。

根据数学模型,可知不确定度来源主要包括:

对照品溶液配制引入的不确定度;标准工作曲线拟合引入的不确定度;样品前处理引入的不确定度;样品重复测量 $f_{\text{重复测量}}$ 引入的不确定度。

2 结果与分析

2.1 对照品溶液配制引入的不确定度

2.1.1 对照品贮备液配制浓度 c_0 引入的不确定度

2.1.1.1 对照品贮备液浓度 c_0 的标准不确定度 $u(c_0)$ 分量分析 精密称取含量为 92.0% 伊维菌素($H_2B_{1a} + H_2B_{1b}$)对照品 54.24 mg。用 0.01 mg 电子天平称两次,即首先回零,然后称量得到净重(m_0),加甲醇溶解并定容至 50 mL 容量瓶中,混匀。对照品贮备液浓度的计算公式为 $c_0 = \frac{m_0 \times \rho}{V_0}$,该分量的数学模型可表示为 $c_0 = \frac{m_0 \times \rho}{V_0} \times f_{\text{(结果重复)}} \times C_{\text{(校准)}}$ 。故对照品贮备液配制引入的不确定度包括称取对照品质量、对照品稀释定容、对照品含量、量器校准及结果重复性引入的不确定度。

2.1.1.2 称取对照品质量 m_0 引入的不确定度

天平的校准、重复性、可读性、灵敏度和线性均可引入不确定度。由于是数字电子天平,故可忽略可读性引入的不确定度;因称量时为两次称量值相减,其灵敏度和线性变化小,故只考虑校准和重复性引入的不确定度。天平校准证书显示 $0 < m \leq 50,000$ mg,最大允许误差为 ± 0.05 mg。故 $a = 0.05$ mg,因此,天平校准分量引入的不确定度 $u(m_{\text{校}}) = \frac{a}{k} = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.02887$ mg。重复称量 50 mg 标准砝码 10 次,结果分别为:49.99、50.01、50.02、49.98、49.97、49.99、50.01、49.98、50.00、49.99 mg。

$$\bar{m} = \sum_{n=1}^{10} \frac{m_1 + m_2 + \dots + m_{10}}{10} = \frac{499.94}{10} = 49.994 \text{ mg}$$

$$s(m_{\text{重}}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (m_i - \bar{m})^2}{n - 1}} = 0.00499 \text{ mg}$$

$$u(m_{\text{重}}) = s(\bar{m}) = \frac{s(m_{\text{重}})}{\sqrt{n}} = \frac{0.00499}{\sqrt{10}} =$$

$$1.578 \times 10^{-3} \text{ mg}$$

$$u_{\text{rel}}(m_{\text{重}}) = \frac{u(m_{\text{重}})}{m} = \frac{1.578 \times 10^{-3}}{49.994} = 3.156 \times 10^{-5}$$

称取对照品质量合成标准不确定度 $u(m_0)$ 的计算:

$$\text{因: } u(m_0) = \sqrt{u(m_{\text{校}})^2 + u(m_{\text{重}})^2} = \sqrt{0.02887^2 + (1.578 \times 10^{-3})^2} = 0.02891 \text{ mg。}$$

由于称取对照品质量需要通过两步操作才能完成,即回零和称样,故:

$$\text{称取对照品质量相对合成标准不确定度 } u_{\text{rel}}(m_0) = \sqrt{2} \frac{u(m_0)}{m} = \sqrt{2} \frac{0.02891}{49.994} = 8.18 \times 10^{-4}。$$

2.1.1.3 对照品贮备液定容(V_0)引入的不确定度

对照品贮备液定容不确定度主要来源于容量瓶校准、重复性及温度变化引起的液体体积膨胀和容量瓶体积膨胀,容量瓶体积膨胀引起的不确定度可忽略。根据 JJG 196-2006,50.0 mL 容量瓶最大允许误差 $MPE = \pm 0.05$ mL,按矩形分布, $u(V_{\text{校}}) = \frac{a}{k} =$

$$\frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289 \text{ mL;}$$

由重复性引入的不确定度,通过下述实验获得^[10]:取一经过检定的 50 mL 容量瓶,用万分之一的天平(感量为 0.1 mg,以下重复性实验均使用该级别的天平)先称量空瓶的质量,再用甲醇充满至刻度后称量质量,后者减去空瓶质量即得 50 mL 甲醇的净质量(实验过程均在 20 °C 环境条件下完成,下同)。如此重复测量 10 次,分别得到 50 mL 容量瓶充满甲醇的质量为:39.6546、39.6495、39.6457、39.6267、39.6273、39.6130、39.6234、39.6332、39.6295 和 39.6290 g。求得平均质量为 39.6332 g。计算重复测量数据的相对标准偏差得: $s(m_{\text{甲醇}}) =$

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (m_{\text{甲醇}i} - \bar{m}_{\text{甲醇}})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{0.00149}{9}} = 0.01287 \text{ g,}$$

故 50 mL 甲醇称量重复性的标准不确定度为:

$$u(m_{\text{甲醇重}}) = s(\bar{m}_{\text{甲醇}}) = \frac{s(m_{\text{甲醇}})}{\sqrt{10}} = \frac{0.01287}{\sqrt{10}} =$$

4.0699 × 10⁻³ g。因甲醇在 20 ℃ 时的相对密度为 0.7917,把上述实验获得的质量换算为相应的体积,可得因重复性引入的不确定度 $u(V_{重}) = u(m_{重})/0.7917 = 0.00514 \text{ mL}$ 。由甲醇体积膨胀引入的不确定度可由相关资料求得:甲醇的体积膨胀系数^[11]为 $1.19 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$,容量瓶校准温度为 20 ℃,实验室温度变动区间(20 ± 5) ℃,5 ℃ 50 mL 甲醇产生的体积变化为: $50 \times 5 \times 1.19 \times 10^{-3} =$

$$0.30 \text{ mL}。按矩形分布, u(V_{甲醇温}) = \frac{a}{k} = \frac{0.30}{\sqrt{3}} =$$

0.1732 mL。故对照品贮备液定容(V₀)引入的合成

$$\text{标准不确定度 } u(V_0) = \sqrt{V_{校}^2 + V_{甲醇重}^2 + V_{甲醇温}^2} = \sqrt{0.0289^2 + 0.01287^2 + 0.1732^2} = 0.1761 \text{ mL},$$

从而,对照品贮备液定容相对合成标准不确定度为: $u_{rel}(V_0) = \frac{u(V_0)}{V} = \frac{0.1761}{m/0.7917} = \frac{0.1761 \times 0.7917}{39.6332} =$

$$0.00352。$$

2.1.1.4 对照品含量引入的不确定度 $u_{rel}(\rho)$ 根据标准物质证书提供的信息,对照品伊维菌素(H₂B_{1a} + H₂B_{1b})的含量为 92.0%。使用前无需干燥。开封后一次使用。包装及装量:棕色安瓿装,每支约 100 mg;贮存条件:严封,避光,5 ℃ 以下保存。测定时使用的对照品为新购入且按贮存条件保存的未开封对照品,未给出不确定度量值,故不考虑含量引入的不确定度。

2.1.1.5 配制对照品贮备液浓度 c₀ 的合成相对不确定度 不考虑含量时,伊维菌素对照品贮备液配制引入的不确定度包括:称量对照品质量、稀释定容引入的不确定度。相对合成标准不确定度 $u_{rel}(c_0) = \sqrt{u_{rel}(V_0)^2 + u_{rel}(m_0)^2} = \sqrt{0.00352^2 + (8.18 \times 10^{-4})^2} = 0.00361。$

2.1.2 配制标准工作曲线系列溶液引入的不确定度 配制标准工作曲线系列溶液引入的不确定度包括对照品贮备液量取、稀释定容引入的不确定度。其中稀释定容(共 5 次),即分别用适当的单标线吸量管量取相应体积的对照品贮备液置 25 mL

量瓶中,然后稀释定容得到 std1 ~ std5 共 5 个标准曲线系列溶液,std6 实际上只是转移,不涉及定容,此处不会引入不确定度。

2.1.2.1 量取对照品贮备液引入的不确定度 量取引入的不确定度包括校准、重复性及温度变化引起的液体体积膨胀带来的不确定度。以量取 5 mL 对照品贮备液为例计算引入的不确定度。根据 JJG 196-2006,5 mL 单标线吸量管的最大允差 MPE 为 ±0.015 mL,按矩形分布, $u(V'_{校}) = \frac{a}{k} = \frac{0.015}{\sqrt{3}} = 0.00866 \text{ mL}$;由重复性引入的不确定度,通过实验称量经过检定的某 5 mL 单标线吸量管吸取甲醇的质量,然后利用甲醇的相对密度换算得到体积值,重复 10 次的体积平均值为:5.0093 mL,标准偏差为 $1.49 \times 10^{-3} \text{ mL}$ 。则:

$$u(V'_{重}) = s(\bar{V}) = \frac{s(V')}{\sqrt{10}} = \frac{1.49 \times 10^{-3}}{\sqrt{10}} = 3.45 \times 10^{-4} \text{ mL}。$$

甲醇体积膨胀引入的不确定度由相关资料求得:甲醇的体积膨胀系数为 $1.19 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$,5.00 mL 单标线吸量管校准温度为 20 ℃,实验室温度变动区间(20 ± 5) ℃,5 ℃ 5 mL 甲醇产生的体积变化为: $5 \times 5 \times 1.19 \times 10^{-3} = 0.030 \text{ mL}$ 。按矩形分布, $u(V'_{甲醇温}) = \frac{a}{k} = \frac{0.030}{\sqrt{3}}$ 。量取引入的合成标准不确定度 $u(V') = \sqrt{u(V'_{校})^2 + u(V'_{重})^2 + u(V'_{甲醇温})^2} = \sqrt{0.00866^2 + (3.45 \times 10^{-4})^2 + 0.01732^2} \approx 0.0194 \text{ mL}$,因 $u(V'_{重}) \ll u(V'_{校})$ 或 $u(V'_{甲醇温})$,如忽略 $u(V'_{重})$,则 $u(V') = \sqrt{u(V'_{校})^2 + u(V'_{甲醇温})^2} = \sqrt{0.00866^2 + 0.01732^2} \approx 0.0194 \text{ mL}$,即:此处可忽略取样重复性引入的不确定度,故量取 5.00 mL 对照品贮备液引入的相对合成标准不确定度 $u_{rel}(V') = \frac{u(V')}{V} = \frac{0.0194}{5.0093} = 3.87 \times 10^{-3}$ 。忽略重复性引入的不确定度,则量取对照品贮备液配制标准工作曲线系列溶液引入的不确定度见表 1。

表 1 不同规格单标线吸量管吸取对照品贮备液引入的不确定度

Tab 1 Uncertainty from preparation of working standard solutions with different pipette

取样量/mL	最大允差/mL	$u(V'_{校})$ (mL) *	$u(V'_{温})$ (mL) **	$u(V')$ (mL)	$u_{rel}(V')$
1.00	±0.007	4.04×10^{-3}	3.46×10^{-3}	5.32×10^{-3}	5.32×10^{-3}
2.00	±0.010	5.77×10^{-3}	6.93×10^{-2}	6.95×10^{-2}	3.48×10^{-3}
3.00	±0.015	8.66×10^{-3}	1.0×10^{-2}	1.32×10^{-2}	4.40×10^{-3}
5.00	±0.015	8.66×10^{-3}	1.73×10^{-2}	1.93×10^{-2}	3.87×10^{-3}
10.00	±0.020	1.15×10^{-2}	3.46×10^{-2}	3.65×10^{-2}	3.65×10^{-3}
25.00	±0.030	1.73×10^{-2}	6.93×10^{-2}	0.0714	-

* 按矩形分布; ** 温度变动区间为 $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.1.2.2 标准工作曲线系列溶液定容引入的不确定度 因定容引入的不确定度包括校准、重复性及温度变化引起液体体积膨胀引入的不确定度。根据 JJG 196-2006, 25 mL 容量瓶的最大允差 MPE 为 $\pm 0.03 \text{ mL}$, 按矩形分布, $u(V_{校}) = \frac{a}{k} = \frac{0.03}{\sqrt{3}} = 0.0173 \text{ mL}$; 由重复性引入的不确定度, 通过实验称量经过检定的某 25 mL 容量瓶充满甲醇的质量, 然后利用甲醇的相对密度换算得到体积值, 重复 10 次, 得到体积平均值为: 25.0567 mL, 标准偏差为 0.0127 mL。则:

$$u(V_{\text{甲醇重}}) = s(\bar{V}_{\text{甲醇}}) = \frac{s(V_{\text{甲醇}})}{\sqrt{10}} = \frac{0.0127}{\sqrt{10}} = 4.02 \times 10^{-3} \text{ mL}。$$

由甲醇体积膨胀引入的不确定度可由相关资料求得: 甲醇的体积膨胀系数为 $1.19 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, 容量瓶校准温度为 $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 实验室温度变动区间 $(20 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$, $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 25 mL 甲醇产生的体积变化为: $25 \times 5 \times 1.19 \times 10^{-3} = 0.15 \text{ mL}$ 。按矩形分布, $u(V_{\text{甲醇温}}) = \frac{a}{k} = \frac{0.15}{\sqrt{3}} = 0.08660 \text{ mL}$ 。所以, 定容引入的合成标准不确定度: $u(V_{25}) = \sqrt{u(V_{校})^2 + u(V_{\text{甲醇重}})^2 + u(V_{\text{甲醇温}})^2} = \sqrt{0.0173^2 + (4.02 \times 10^{-3})^2 + 0.08660^2} = 0.0884 \text{ mL}$, 故定容引入的相对合成标准不确定度 $u_{rel}(V_{25}) = \frac{u(V_{25})}{V} = \frac{0.0884}{25.0567} = 3.53 \times 10^{-3}$ 。因有 5 次定容, 结

合 2.1.2.1 的结果。可知配制标准工作曲线系列溶

液引入的合成标准不确定度为: $u_{rel}(c_{std}) = \sqrt{(5.32 \times 10^{-3})^2 + (3.48 \times 10^{-3})^2 + (4.40 \times 10^{-3})^2 + (3.87 \times 10^{-3})^2 + (3.65 \times 10^{-3})^2 + 5 \times (3.53 \times 10^{-3})^2} = 1.23 \times 10^{-2}$ 。

2.2 标准工作曲线拟合引入的不确定度^[12-13] 标准工作曲线系列溶液配制好后, 上机测定, 每个浓度点进样 3 次, 记录色谱图, 通过积分计算各色谱峰的峰面积, 求出各次进样伊维菌素 H_2B_{1a} 峰及 H_2B_{1b} 峰峰面积之和。以峰面积 A 为纵坐标, 相应的系列对照品溶液浓度 c 为横坐标, 进行线性回归, 求得伊维菌素色谱峰峰面积关于浓度的线性回归方程。对伊维菌素注射液分别取样测量 10 次, 每次进样 3 针。其浓度平均值 \bar{c} 为 0.203 mg/mL 。

根据 $u(\text{curve}) = \frac{S_R}{B_1} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{(\bar{c} - \bar{c}_0)^2}{\sum_{j=1}^{n_2} (c_{sj} - \bar{c}_0)^2}}$ 计算标准工作曲线拟合引入的不确定度, 其中: S_R 为回归曲线的剩余残差(残差的标准差); B_1 为标准工作曲线的斜率; n_1 为待测样品重复测量次数 ($n_1 = 10 \times 3$); n_2 为回归曲线的点数 ($n_2 = 6 \times 3$); \bar{c} 为待测样品溶液浓度均值; \bar{c}_0 为系列对照品溶液浓度的平均值; c_{sj} 为各系列对照品溶液浓度值。

$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n_2} [A_{sj} - (B_0 + B_1 c_{sj})]^2}{n_2 - 2}}$, 其中: A_{sj} 为各系列对照品溶液实测峰面积; B_0 为标准工作曲线的截距。标准工作曲线拟合引入的不确定度见表 2。

表 2 标准曲线拟合引入的不确定度

Tab 2 Uncertainty from working curve fitting

	对照品溶液浓度/(mg · mL ⁻¹)									
	0.03992	0.07984	0.11976	0.1996	0.3992	0.9980				
峰面积(mAu · min)	16.212	32.812	48.883	82.514	163.696	407.188				
	16.330	32.772	49.460	82.387	164.092	407.961				
	16.324	32.789	48.845	82.580	163.847	407.684				
标准曲线	$A = 408.29 \times c + 0.3958$									
相关系数 r^2	1.000									
S_R	0.4644									
样品含量(%)	101.8	101.7	101.0	101.2	101.5	100.9	101.1	101.8	102.5	101.6
\bar{c}	0.203(101.5%)									
$u(\text{curve})$	3.4926×10^{-4}									
$u_{rel}(\text{curve})$	1.72×10^{-3}									

2.3 样品前处理引入的不确定度 样品前处理引入的不确定度包括样品取量、稀释定容及温度变化引起的液体体积膨胀引入的不确定度。样品的处理:取 15 支同一批号的伊维菌素注射液倒入一清洁小烧杯中,混匀,用 5 mL 单标线吸量管吸取 5.00 mL 置 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释定容至刻度,混匀;另取上述稀释液 5.00 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释定容至刻度,混匀,即得。

2.3.1 样品前处理引入的不确定度分量分析 样品前处理引入的不确定度包括第一次吸取伊维菌素注射液并定容及第二次吸取稀释液并定容引入的不确定度。

2.3.1.1 吸取伊维菌素注射液引入的不确定度 第一次取样,吸量管校准引入的不确定度,因

$MPE = \pm 0.015$ mL,按矩形分布, $u(V'_{校}) = \frac{a}{k} =$

$\frac{0.015}{\sqrt{3}} = 0.00886$ mL;测量重复性引入的不确定度,

由以下实验获得:准确吸取 5 mL 伊维菌素注射液,用电子天平称得其净质量,重复 10 次;同时,用比重瓶测得伊维菌素注射液的相对密度为 $\rho = 1.0279$ ($n = 3$) (因比重瓶未给出不确定度相关数据,故此忽略相对密度测量引入的不确定度)。根据相对密度把上述称量的质量转换为相应的体积,结果,

10 次测量的体积平均值为:5.0063 mL,标准偏差为:0.011 mL,则:

$$u(V'_{伊重}) = s(\bar{V}'_{伊}) = \frac{s(V'_{伊})}{\sqrt{10}} = \frac{0.011}{\sqrt{10}} = 3.48 \times$$

10^{-3} mL;由于不知道伊维菌素注射液的体积膨胀系数,故在此不考虑温度变化对伊维菌素注射液体积膨胀带来的不确定度。所以,量取伊维菌素注射液引入的合成标准不确定度: $u(V'_{样1}) = \sqrt{0.00866^2 + 0.00348^2} = 0.00933$ mL, $u_{rel}(V'_{样1}) = \frac{0.00933}{5.0063} = 0.0019$ 。

2.3.1.2 第一次稀释定容引入的不确定度 稀释定容引入的不确定度,包括容量瓶校准、重复性及温度变化引起的溶液体积膨胀引入的不确定度。根据量器标示,50 mL 量瓶的最大允差为: ± 0.05 mL,

按矩形分布, $u(V_{校}) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0289$ mL。定容重复

性引入的不确定度同 2.1.1.3 对照品溶液定容引入的不确定度 $u(V_{重}) = 0.00514$ mL;定容后伊维菌素注射液仅占总体积的 10%,甲醇占 90%,在此视为 50 mL 纯甲醇受温度变化影响产生体积膨胀,实验室的温度变动区间为 $20 \pm 5^\circ\text{C}$,故体积变化 = $50 \times 5 \times 1.19 \times 10^{-3} = 0.24$ mL,按矩形分布, $u(V_{甲醇温}) = \frac{0.30}{\sqrt{3}} = 0.1732$ mL。合成标准不确定度为: $u(V_{50}) =$

$$\sqrt{0.0289^2 + 0.00514^2 + 0.1732^2} = 0.1757 \text{ mL}, u_{rel}$$

$$(V_{50}) = \frac{0.1757}{50} = 3.51 \times 10^{-3}.$$

2.3.1.3 第二次取样稀释定容引入的不确定度

第二次取样稀释定容引入的不确定度包括取样 5 mL 和定容到 25 mL 量瓶引入的不确定度。因经过稀释处理后,伊维菌素注射液原液理论上仅占稀释后体积的十分之一,故此处仅考虑为相当于处理甲醇的情况。故第二次取样稀释定容引入的不确定度包括 5 mL 单标线吸量管校准、重复性和甲醇受温度变化体积膨胀以及 25 mL 量瓶校准、重复性和甲醇受温度变化体积膨胀引入的不确定度。相关数据同 2.1.2.1 和 2.1.2.2,故 $u_{rel}(V'_{\text{样}2}) = 3.87 \times 10^{-3}$, $u_{rel}(V_{25}) = 3.53 \times 10^{-3}$ 。

结合 2.3.1.1 ~ 2.3.1.3 可得到样品前处理的合成相对标准不确定度: $u_{rel}(V_{\text{样}}) = \sqrt{u_{rel}(V'_{\text{样}1})^2 + u_{rel}(V_{50})^2 + u_{rel}(V'_{\text{样}2})^2 + u_{rel}(V_{25})^2} = 6.59 \times 10^{-3}$ 。

2.4 样品测量重复性引入的不确定度 在重复性条件下,对伊维菌素注射液分别取样测量 10 次,每次进样 3 针。测量结果见表 3。

表 3 样品测量重复性引入的不确定度结果

Tab 3 Uncertainty of samples measuring repeatability										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
样品	101.9	101.6	101.1	101.2	101.5	100.9	101.1	101.7	102.4	101.7
含量	101.8	101.6	101.0	101.1	101.5	100.9	101.3	101.7	102.7	101.7
$\omega(\%)$	101.7	101.8	101.0	101.2	101.6	100.9	101.0	102.0	102.4	101.6
均值	101.5									
$\bar{\omega}(\%)$	101.5									
$S(\bar{\omega})$	$S(\bar{\omega}) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n_1} (\omega_j - \bar{\omega})^2}{n_1 - 2}} = \sqrt{\frac{0.243}{28}} = 0.093\%$									
$u(f_r)$	$u(f_r) = S(\bar{\omega}) / \sqrt{n_1} = 0.017\%$									
$u_{rel}(f_r)$	$u_{rel}(f_r) = S(\bar{\omega}) / \sqrt{n_1} / \bar{\omega} = 1.67 \times 10^{-4}$									

2.5 合成相对标准不确定度及扩展相对标准不确定度

2.5.1 合成相对不确定度 由上述对照品贮备液

及标准工作曲线系列溶液配制、标准工作曲线拟合、样品前处理及样品重复测量等项引入的相对不确定度分量合成总相对不确定度为: $u_{rel}(\bar{\omega}) =$

$$\sqrt{u_{rel}(c_0)^2 + u_{rel}(c_{std})^2 + u_{rel}(curve)^2 + u_{rel}(V_{\text{样}})^2 + u_{rel}(f_r)^2}$$

$$u_{rel}(\bar{\omega}) = \sqrt{(3.61 \times 10^{-3})^2 + (1.23 \times 10^{-2})^2 + (1.72 \times 10^{-3})^2 + (6.59 \times 10^{-3})^2 + (1.67 \times 10^{-4})^2} = 1.46 \times 10^{-2}.$$

2.5.2 扩展相对标准不确定度 取置信水平 $p = 95\%$, $k = 2$ 。则扩展相对标准不确定度 $U_{rel} = 2 \times 1.46 \times 10^{-2} = 2.92 \times 10^{-2}$ 。

2.5.3 报告检测结果 实验测得伊维菌素的平均含量为 101.5%, 则扩展标准不确定度 $U(\bar{\omega}) = 101.5 \times 2.92 \times 10^{-2} = 3.0$ 。故伊维菌素的含量 = $(101.5 \pm 3.0)\%$ ($k = 2$)。

2.6 主要不确定度来源及相对贡献 主要不确定度来源及相对贡献统计结果见表 4。

表 4 主要不确定度来源及相对贡献

Tab 4 Components of relative standard uncertainty

不确定度来源	相对标准不确定度符号	相对标准不确定度	相对贡献/%
对照品贮备液配制	$u_{rel}(c_0)$	0.00361	14.80
标准工作曲线系列溶液配制	$u_{rel}(c_{std})$	0.0123	50.44
标准工作曲线拟合	$u_{rel}(curve)$	0.00172	7.05
样品前处理	$u_{rel}(V)$	0.00659	27.02
样品测量重复性	$u_{rel}(f_r)$	0.000167	0.68

由表中可以看出,不确定度主要来源于标准工作曲线系列溶液的配制、样品前处理及对对照品贮备液配制环节。

3 结论与讨论

本研究依据《中华人民共和国兽药典》2020 年版一部兽药伊维菌素注射液含量测定的高效液相色谱法,采用标准曲线定量,对高效液相色谱法测定伊维菌素注射液含量的实验过程中的不确定度来源进行分析评定。参考不确定度评估相关要求,构建不确定度评估模型,分析了不确定度的来源,

并对其进行评定,计算了各分量的相对不确定度,同时给出扩展相对不确定度。通过分析不确定度的相对贡献可知,不确定度主要来源于标准工作曲线系列溶液的配制、样品前处理及对照品贮备液配制环节,测量过程中应重点关注并严格控制检测风险。

评定高效液相色谱法测定伊维菌素注射液含量的不确定度,除了采用标准曲线法定量之外,还可采用单标多测定量法^[14]和双标平行测定定量法^[10, 15]。单标多测定量法是根据待测样品的标示含量预估出样品经处理后的上机浓度,如本研究中伊维菌素的预估上机浓度为 0.2 mg/mL,据此配制相应浓度的单份对照品溶液,在高效液相色谱仪上连续测定多次(一般 6 次~10 次),使对测量产生的影响体现在重复性中。因测定结果为随机变量,被测对照品溶液相应峰面积的不确定度 $u(A_s)$ 属于 A 类不确定度,用贝塞尔公式计算,不确定度

$$u(A_s) = \frac{s(A_s)}{\sqrt{3}}, \text{相对不确定度 } u_{rel}(A_s) = \frac{u(A_s)}{A_s}。$$

双标平行测定定量法也是根据预估浓度,配制两份浓度相近的标准溶液,分别平行测定两次,计算峰面积。每份标准溶液可得到两个峰面积值,分别计算其相应极差和平均值,可得 R_{A_1} 和 R_{A_2} 及 \bar{A}_1 和 \bar{A}_2 。n=2 时,取极差系数 $C = 1.13$ 。则标准不确定度

$$u_1(A_1) = \frac{R_{A_1}}{C\sqrt{2}}, u_2(A_2) = \frac{R_{A_2}}{C\sqrt{2}}。相对合成标准不$$

$$\text{确定度为 } u_{rel}(A) = \sqrt{\left(\frac{u_1(A_1)}{A_1}\right)^2 + \left(\frac{u_2(A_2)}{A_2}\right)^2} =$$

$$\frac{1}{\sqrt{2}C} \sqrt{\frac{R_{A_1}^2}{A_1^2} + \frac{R_{A_2}^2}{A_2^2}}。三种定量方法各有特点,不确$$

定度评定方法也不尽相同,这里不再赘述。

参考文献:

[1] 陆静,袁慧平,李荣顺,等. 2 种伊维菌素浇泼剂在牛体内的药动学比较试验[J]. 中国兽医杂志,2020,56(10):93-96.

Lu J, Yuan H P, Li R S, et al. Comparative Study on Pharmacokinetics of Two Kinds of Ivermectin Casters in Bovine[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 56(10): 93-96.

[2] 苗艳,朱庆贺,陈曦,等. 伊维菌素纳米乳中伊维菌素含量 HPLC 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(8): 60-65.

Miao Y, Zhu Q H, Chen X, et al. Content Determination of Ivermectin Nano-emulsion by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(8): 60-65.

[3] 邢一丹,蔡云鹏,张亚峰,等. 伊维菌素在不同动物中安全性、药效学和药代动力学的差异性研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(5): 72-78.

Xing Y D, Cai Y P, Zhang Y F, et al. Research Progress on the Difference of Safty, Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Ivermectin in Various Animals [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(5): 72-78.

[4] 段培强,潘方燕,曾杨梅,等. 长效伊维菌素注射液在山羊体内的药动学研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2021, 43(1): 75-80.

Duan P Q, Pan F Y, Zeng Y M, et al. Pharmacokinetical study of a long-acting Ivermectin Injection in Goat[J]. Journal of the Southwest University (Nature Science edition), 2021, 43(1): 75-80.

[5] Felmingham, Claire, Tilakaratne, et al. Overdiagnosis of scabies and overprescribing of scabies treatment in a scabies-endemic region[J]. Australian Journal of Rural Health, 2020, 28(4): 394-398.

[6] Diggle, Peter J., Giorgi, et al. A Tale of Two Parasites: Statistical Modelling to Support Disease Control Programmes in Africa [J]. Statistical Science, 2020, 35(1): 42-50.

[7] Frank O R, Robert E K, Oscar D L, et al. A Knowledge, Attitudes and Practices Survey Conducted Three Years after Halting Ivermectin Mass Treatment for Onchocerciasis in Guatemala. [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2016. DOI:10.1371/journal.pntd.0004777.

[8] Pierre K, Gianfranco U M, Joseph V, et al. Review of the Emerging Evidence Demonstrating the Efficacy of Ivermectin in the Prophylaxis and Treatment of COVID-19[J]. American Journal of Therapeutics, 2021, 28(3): e299-e318.

[9] Lopez-medina E, Lopez P, Hurtado I C. et al. Effect of Ivermectin on Time to Resolution of Symptoms Among Adults With Mild COVID-19 A Randomized Clinical Trial[J]. Jama - Journal of the American Medical Association, 2021, 325(14): 1426-1435.

[10] 黄婧. 高效液相色谱法测定头孢呋辛酯片含量的不确定度评定[J]. 中国药品标准, 2021, 22(6): 583-586.

Huang J. Evaluation of uncertainty in the determination of cefu-

- roxime axetil tablets by HPLC. Drug Standards of China, 2021, 22(6): 583-586.
- [11] 周芳梅, 陈茹, 罗小宝, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定凉茶中对乙酰氨基酚的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9): 3514-3521.
- Zhou F M, Chen R, Luo X B, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of paracetamol in herbal tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(9): 3514-3521.
- [12] 高娜, 王文兰, 郭军, 等. 高效液相色谱法测定鳕鱼中孔雀石绿含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 10(3): 653-657.
- Gao N, Wang W L, Guo J, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of malachite green in *Gadus* by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 10(3): 653-657.
- [13] 刘洁容. 高效液相色谱法测定复合维生素片中维生素 D₃ 含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(5): 1840-1844.
- Liu J R. Uncertainty evaluation for determination of cholecalciferol in multivitamin by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(5): 1840-1844.
- [14] 张璐, 龚旭昊, 范强. 金苓芍注射液含量测定的不确定度分析[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(1): 56-62.
- Zhang L, Gong X H, Fan Q. Evaluate the uncertainty of content determination of Jinqinshao Injection [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(1): 56-62.
- [15] 朱清丽, 李鹏, 郭梦倩, 等. 高效液相色谱法测定盐酸吗啡瓜片含量及其不确定度评定[J]. 中国药业, 2021, 30(18): 60-64.
- Zhu Q L, Li P, Guo M Q, *et al.* Content determination of Moroxydine Hydrochloride in Moroxydine Hydrochloride Tablets by HPLC and evaluation of its uncertainty [J]. China Pharm, 2021, 30(18): 60-64.

(编辑: 侯向辉)