

辅料的选择较为复杂,因为标记物经口服进入体内,通过消化道运输、排出而不被溶解。胃、小肠、结肠的 pH 都不相同,胃的 pH 为 1~3 小肠 pH 为 4~6 结肠的 pH 为 8,从酸性到弱碱性的变化,其间还有胃酶和胰酶的作用,还要考虑在运输过程中胃、肠蠕动的摩擦力。因此,辅料必须性质稳定,黏合力强,在酸性、弱酸性、弱碱性的条件下不溶解,对胃酶、胰酶不起作用。乙基纤维素具有难溶于水、酸、弱碱等性质,明胶也是一种黏合剂,加入明胶使乙基纤维素黏合力更强,并可使标记物增加弹性和张力,缓冲胃肠蠕动对标记物的摩擦。由于硫酸钡吸水性差,所以加入一定量的煅白矾,吸收部分水分,使软材更容易成型^[1-4]。

实验证明,标记物能显影,酸性、弱酸性、弱碱性、酶对标记物不起作用,胃肠蠕动影响。标记物具标记性,其性质非常稳定,完全符合制剂要求。

[DOI] 10.3870/yydh.2011.01.036

[参考文献]

- [1] 曾苏. 药物分析学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 245-252.
- [2] 范碧亭. 中药药剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 67-68, 392-396.
- [3] 刘红霞. 药物辅料速查手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 73-86.
- [4] 王镜岩. 生物化学 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 112-133.

高效液相色谱法测定 三黄片中盐酸小檗碱含量的不确定度分析

林远凤¹, 黄燕萍²

(1 广西壮族自治区北海市人民医院药剂科, 536000 2 广西壮族自治区北海市食品药品检验所, 536000)

[摘要] 目的 分析高效液相色谱 (HPLC) 法测定三黄片中盐酸小檗碱含量的不确定度。方法 通过建立 HPLC 法测定三黄片中盐酸小檗碱含量的数学模型, 找出影响不确定度的因素, 并对各个不确定度因素进行评估、计算, 由此计算合成不确定度, 最终确定测量结果的扩展不确定度和置信水平。结果 合成不确定度为 7.52×10^{-3} ; 扩展不确定度为 0.08。盐酸小檗碱含量测定结果为每片 $(4.68 \pm 0.08) \text{ mg}$ 。结论 该法可用于 HPLC 法测定药物含量的不确定度的分析。

[关键词] 三黄片; 小檗碱; 盐酸; 不确定度; 色谱法; 高效液相; 含量测定

[中图分类号] R286 R927.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2011)01-0106-04

药物分析的数据是否可靠准确,直接关系到检测结果的判断。测量不确定度 (measurement uncertainty) 是“与测量结果相关联的参数,表征合理地赋予被测量值的分散性”,它是被测量客观值在某一量值范围内的一个评定,其大小决定测量结果的实用价值。不确定度越小,测量结果的质量越高,使用价值越大。笔者根据国家质量技术监督局批准发布的 JJ1059-1999 技术规范《测量不确定度评定与表示》^[1] 和 CNAS-CL01:2006《检测和校准实验室认可准则》^[2] 中“5.4.6”有关测量不确定度评定的要求,对高效液相色谱 (HPLC) 法测定三黄片中盐酸小檗碱^[3] 含量的不确定度进行分析,找出影响其不确定度的因素并对各分量进行评估,最终得出测量结果的置信区间和置

信水平,初步建立适用于评估 HPLC 法测定含量的不确定度的方法,以期加强对含量测定的数据分析与测量结果的准确性和可信度的认识。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Waters HPLC 色谱仪; Waters515 HPLC 泵; Waters 2487 双波长检测器; Waters 717 自动加样器。威玛龙色谱数据工作站。盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品检定所; 批号: 110713-200609, 供含量测定用; 含 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_4$ 为 98.1%); 三黄片 (广西恒拓集团仁盛制药有限公司, 批号: 080601); 乙腈为色谱纯; 其他试剂为分析纯; 水为超纯水。

1.2 色谱条件 色谱柱: SHMADZU VP-ODS (250 mm × 4.6 mm); 流动相: 乙腈-0.05% 十二烷基硫酸钠 (含 0.1% 磷酸) (53:47); 流速: 0.8 mL · min⁻¹; 检测波长: 265 nm; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL。

1.3 样品的制备 对照品溶液的制备: 精密称取盐酸小檗碱对照品约 10 mg, 置 200 mL 量瓶中, 加甲醇溶

[收稿日期] 2010-02-09 [修回日期] 2010-03-15

[作者简介] 林远凤 (1966-), 女, 广西北海人, 副主任药师, 主要从事医院药品费用控制分析及药品不良反应收集工作。电话: 0779-2022201, E-mail: yuanfeng4@126.com。

解并稀释至刻度(制成每毫升含 50 μg 的溶液),摇匀即可。供试品溶液的制备:依据《药品检验补充检验方法和检验项目批准件》2007002^[3],取本品 10片(除去包衣),称定质量,研细,取相当于 1片质量的粉末,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)溶液 25 mL,称定质量,超声处理 30 min 放冷,再称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 mL,置中性氧化铝柱(5 g 100~200目,1.0 cm $\times$ 15.0 cm),以甲醇 40 mL洗脱,收集洗脱液,减压回收溶剂至干,精密加入甲醇 5 mL,摇匀,以孔径 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2 测量不确定度的评估

2.1 数学模型 $X = \frac{A_x \cdot C_0 \cdot V_x \bar{S}}{A_0 \cdot M}$, X 为样品中盐酸小檗碱含量(mg); A_x 为样品中盐酸小檗碱色谱峰面积; C_0 为盐酸小檗碱对照品的质量浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); A_0 为盐酸小檗碱对照品的色谱峰面积; M 为样品取样量(g); V_x 为样品稀释体积(mL); $\bar{S}$ 为平均片质量(g)。

2.2 不确定度分量的量化

2.2.1 对照品配制过程不确定度 $u(C_0)$

2.2.1.1 对照品纯度引起的不确定度 $u(C_0)_1$ 盐酸小檗碱对照品的标示含量为 98.1%,标准偏差为 0.05%,矩形分布 $k = \sqrt{3}$,因此: $u(C_0)_1 = \frac{\sqrt{2} \times 0.05\%}{0.981 \times \sqrt{3}} = 4.162 \times 10^{-4}$ 。

2.2.1.2 对照品称样量引起的不确定度 $u(C_0)_2$ 对照品称样量为 10 mg 每次称量均为 2次,天平校准证书给出校准的允差极值为 $\Delta = 0.00001 \text{ g}$,按矩形分布^[3],取包含因子 $k = \sqrt{3}$,称定质量按照减量法:则 $u(C_0)_2 = \frac{\sqrt{2} \times 0.00001}{0.01 \times \sqrt{3}} = 8.165 \times 10^{-4} \text{ g}$ 。

2.2.1.3 200 mL量瓶引起的不确定度 $u(C_0)_3$ ①校准不确定度:实验用 200 mL量瓶为 A类,限值为 0.15 假设为矩形分布, $k = \sqrt{3}$,得校准不确定度 $u_1(C_0)_3 = \frac{0.15}{\sqrt{3}} = 0.0866 \text{ mL}$; ②温度不确定度:温度的波动范围为 $\pm 8^\circ\text{C}$,钠钙玻璃的膨胀系数 α 为 2.5×10^{-5} ,按照矩形分布计算,故 $k = \sqrt{3}$,故 200 mL量瓶引起的温度不确定度: $u_2(C_0)_3 = \sqrt{2} \times 200 \times 8 \times 2.5 \times 10^{-5} / \sqrt{3} = 0.0327 \text{ mL}$,其相对不确定度为: $u(C_0)_3 = \sqrt{\left[\frac{u_1(C_0)_3}{200}\right]^2 + \left[\frac{u_2(C_0)_3}{200}\right]^2} =$

$\sqrt{\left[\frac{0.0866}{200}\right]^2 + \left[\frac{0.0327}{200}\right]^2} = 4.628 \times 10^{-4}$,则对照品浓度引入的不确定度为: $u_{rel}(C_0) = \frac{\sqrt{u(C_0)_1 + u(C_0)_2 + u(C_0)_3}}{\sqrt{(4.162 \times 10^{-4})^2 + (8.165 \times 10^{-4})^2 + (4.628 \times 10^{-4})^2}} = 1.027 \times 10^{-3}$ 。

2.2.2 供试品重复配制带入的不确定度

2.2.2.1 称量的不确定度 $u(Mx)$ 主要来源于天平引起的不确定度和重复称量引起的不确定度。①天平引起的不确定度 $u_1(Mx)$:属于 B类不确定度。天平校准证书给出校准的允差极值为 $\Delta = 0.0001 \text{ g}$,服从矩形分布^[3],包含因子 $k = \sqrt{3}$,称定质量按照减量法:

则标准不确定度 $u_1(Mx) = \frac{\sqrt{2} \times 0.0001}{\sqrt{3}} = 8.165 \times 10^{-5} \text{ g}$ 。称样量为 $M = 0.3 \text{ g}$ 则相对不确定度为 $u(M)_{rel} = \frac{u_m}{M} = \frac{8.165 \times 10^{-5}}{0.3} = 2.722 \times 10^{-4}$ 。

2.2.2.2 供试品平均片质量的不确定度 $u(\bar{S})$ 由于本测定方法是取供试品 10片称定质量,计算求出其平均值,因此其不确定度是来源于 10片质量的称定,其不确定度分析与供试品称定质量相同。①天平引起不

确定度: $u_1(\bar{S}) = u_1(Mx) = \frac{\sqrt{2} \times 0.0001}{\sqrt{3}} = 8.165 \times 10^{-5} \text{ g}$ 。②10片重复称定引起的不确定度:重复称定 10次结果: 3.0662, 3.0661, 3.0659, 3.0662, 3.0660, 3.0659, 3.0663, 3.0664, 3.0663, 3.0661 g $\bar{S} = 3.0661 \text{ g}$ 按贝赛尔公式计算其标准不确定度:

$u_2(\bar{S}) = \sqrt{\frac{\sum (S - \bar{S})^2}{n-1}} = 1.713 \times 10^{-4} \text{ g}$ 因采用减量法,故其平均片质量的相对标准不确定度: $u_{rel}(\bar{S}) = \frac{\sqrt{u_1^2(\bar{S}) + 2 \times u_2^2(\bar{S})}}{\bar{S}} = \frac{\sqrt{(8.165 \times 10^{-5})^2 + 2 \times (1.713 \times 10^{-4})^2}}{3.0661} = 1.46 \times 10^{-4}$ 。

2.2.2.3 供试品稀释的不确定度 $u(Vx)$ 主要来源于吸管的不确定度。①吸管的不确定度:由吸管校准引起的不确定度和由吸管及溶液的温度与校正时温度不同时引起的不确定度组成。根据《常用玻璃量器检定规程》JJG 19621990^[5]规定 A级 25.5 mL吸管的允许偏差 $\Delta = \pm 0.030 \text{ mL}, \pm 0.015 \text{ mL}$;服从三角分布,包

含因子 $k = \sqrt{6}$, 则其相对不确定度 $u_1(V_{x1})_{rel} = \sqrt{\left(\frac{0.030}{25 \times \sqrt{6}}\right)^2 + \left(\frac{0.015}{5 \times \sqrt{6}}\right)^2} = 1.319 \times 10^{-3}$ 。②实际温度与校准时温度不一致的影响: 因吸管校准的温度为 20℃, 实际使用时温度为 28℃, 钠钙玻璃的膨胀系数 $\alpha = 2.5 \times 10^{-5}$, 按照矩形分布计算, 故 $k = \sqrt{3}$, $u_2(V_{x2}) = \sqrt{2} \times 8 \times 2.5 \times 10^{-5} / \sqrt{3} = 1.633 \times 10^{-4}$, 吸管的相对不确定度为: $u(V)_{rel} = \sqrt{u_1^2(V_{x1}) + u_2^2(V_{x2})} = \sqrt{(1.319 \times 10^{-3})^2 + (1.633 \times 10^{-4})^2} = 1.329 \times 10^{-3}$ 。

2.2.2.4 测定带入的不确定度 6份供试品进行 HPLC 检测, 相应每片的含量为: 4.69, 4.72, 4.66, 4.64, 4.67, 4.69 mg 平均每片含量 $(\bar{x}) = 4.68$ mg

$$\text{由贝塞尔公式计算得: } S(x) = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} =$$

0.027 9 测量结果以平均值来表示, 故: $u(x) = \frac{S(x)}{\sqrt{n}}$
 $= \frac{0.0279}{\sqrt{6}} = 0.0114$, 则相对不确定度为: $u_{rel}(x) = \frac{0.0114}{4.68} = 2.436 \times 10^{-3}$ 。

由以上 4 项不确定度合成为样品重复配制带入的相对不确定度:

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

$$\sqrt{(2.722 \times 10^{-4})^2 + (1.46 \times 10^{-4})^2 + (1.329 \times 10^{-3})^2 + (2.436 \times 10^{-3})^2} = 2.792 \times 10^{-3}$$

2.2.3 其他因素带入的不确定度 样品提取、净化等操作过程的准确性以回收率显示。取 6 份已知盐酸小檗碱含量的样品 (每片 2.32, 2.45, 2.38, 2.51, 2.36, 2.50 mg), 精密加入一定量的对照品溶液 (2.45 mg), 制备供试品溶液, 测定。回收率分别为: 99.81%, 101.23%, 98.46%, 100.65%, 101.17%, 97.79%, 平均 99.83%。由贝塞尔公式计算得: $S(R) =$

$$\sqrt{\frac{\sum (R - \bar{R})^2}{n-1}} = 0.0145 \text{ 测量结果以平均值来表示, 故: } u(R) = \frac{S(R)}{\sqrt{n}} = \frac{0.0145}{\sqrt{6}} = 0.0059 \text{ 则相对不}$$

确定度为: $u_{rel}(R) = \frac{0.0059}{99.83\%} = 0.0059$ 。

2.2.4 测定精密度的不确定度 对照品重复进样 7 针, 得峰面积分别为: 2.202 723, 2.144 906, 2.195 532,

2.178 961, 2.157 786, 2.185 573, 2.166 633 平均: 2.176 016 由贝塞尔公式计算得: $S(A_0) = \sqrt{\frac{\sum (A_0 - \bar{A}_0)^2}{n-1}} = 20.746$

测量结果以平均值来表示, 故: $u(A_0) = \frac{S(A_0)}{\sqrt{n}} = \frac{20.746}{\sqrt{7}} = 7.8413$ 则相对不确定度为: $u_{rel}(A_0) = \frac{7.8413}{2.176016} = 0.0036$ 。

2.3 合成标准不确定度 $u(X)$ 评定

将 4 项相对标准不确定度用方和根法合成, 得到盐酸小檗碱含量的合成相对标准不确定度 $u_{rel}(\bar{X}) =$

$$\sqrt{u_{rel}(C_0)^2 + u_{rel}(x)^2 + u_{rel}(R)^2 + u_{rel}(A_0)^2} = \sqrt{(1.027 \times 10^{-3})^2 + (2.792 \times 10^{-3})^2 + (5.9 \times 10^{-3})^2 + (3.6 \times 10^{-3})^2} = 7.52 \times 10^{-3}$$

转化成盐酸小檗碱含量绝对不确定度: $u = c(X) \times u_{rel} = 7.52 \times 10^{-3} \times 4.68 = 0.0352$ 。

2.4 扩展不确定度的评定 $U = ku$, 取置信水平为 95% 时, 包含因子 $k_{(95)} = 2$ 则 $U = ku = 2 \times 0.0352 \approx 0.08$ mg。因此, 样品盐酸小檗碱含量为每片 (4.68 ± 0.08) mg $k=2$ 。

2.5 测量不确定度的结果表示 三黄片中小檗碱含量可表示为: 平均每片含量 $(X) = (4.68 \pm 0.01)$ mg

3 讨论

通过不确定度的分析, 可以为合理改进分析方法, 以期待将检验方案误差降至最小提供可靠依据。HPLC 按外标法测定含量时, 增加测定次数, 选用较大的定容体积、增加对照品取样量等均可以减小各步骤的不确定度分量, 从而提高药品检验结果的准确性和可信度。在药品检验过程中, 环境、人员、仪器、量具等都会对检验结果带来一定不准确因素, 故在进行合格的判定时应当考虑到不确定度, 把不确定度加入判定结果, 才能够保证结果的公平、公正。

[DOI] 10.3870/yydh.2011.01.037

[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] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2006: 1-148.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件 2007002 [S]. 2007.