

牛黄解毒片中黄芩苷的 HPLC 法测定结果的不确定度评定研究

王惠娟¹, 王力^{2*}, 刘艳新²

1. 佳木斯大学附属第一医院 药剂科, 黑龙江 佳木斯 154002
2. 佳木斯市药品检验所, 黑龙江 佳木斯 154007

摘要: 目的 对牛黄解毒片中黄芩苷的 HPLC 法测定结果的不确定度进行评定。方法 按照《中国药典》2010 年版一部牛黄解毒片的测定方法, 通过建立数学模型, 对测定结果的不确定度进行评定。结果 分析和量化了各不确定度分量, 并合成了标准不确定度和扩展不确定度。结论 对照品的质量不确定度是牛黄解毒片中黄芩苷的 HPLC 法测定主要的不确定度来源。

关键词: 牛黄解毒片; 黄芩苷; 高效液相色谱; 不确定度; 数学模型

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)07-1326-04

Uncertainty evaluation on baicalin content determination of Niu Huang Jiedu Tablets by HPLC

WANG Hui-juan¹, WANG Li², LIU Yan-xin²

1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, China
2. Jiamusi Institute for Drug Control, Jiamusi 154007, China

Key words: Niu Huang Jiedu Tablets; baicalin; HPLC; uncertainty; mathematical model

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性, 与测量结果相联系的参数, 它是对测量结果质量的定量表征^[1-2]。中国合格评定认可委员会 (CNAL) 在对实验室认可时, 都要求开展测量不确定度的评定。本实验依据国家质量技术监督局发布的计量技术规范《测量不确定度评定与表示》^[3], 并参考其他文献报道^[4-5], 对 HPLC 法测定牛黄解毒片中黄芩苷的测量不确定度进行了分析并考察了不确定度的主要来源^[6-7], 为该实验过程的控制和检验报告的评估提供了科学的依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent 公司) 经黑龙江省计量检定测试院检定合格为合格计量器具; 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 赛多利斯 BS110S 电子天平 ($d=0.1$ mg) 和瑞士 Mettler AE240 电子天平 ($d=0.1$ mg/0.01 mg) 经佳木斯市计量检定测试所检定合格为 1 级工作天平; 实验

所用玻璃器皿均为天玻牌 A 级。

黄芩苷对照品 (批号 110715-200514) 购自中国药品生物制品检定所; 牛黄解毒片 (批号 070428、070446、070304, 小片) 由贵州百灵企业集团制药有限公司生产; 所用水为超纯水; 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 牛黄解毒片中黄芩苷的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 Agilent TC C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-磷酸 (45:55:0.2), 检测波长 315 nm。理论板数按黄芩苷峰计算不低于 3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品 8.41 mg (M_0), 置 100 mL 单标线量瓶中, 加甲醇适量, 振摇使溶解并稀释至刻度 (V_0), 摇匀, 得对照品储备液。用单标线吸管精密量取对照品储备液 10 mL (V_1), 置 25 mL 单标线量瓶中, 用甲醇

收稿日期: 2010-09-11

作者简介: 王惠娟 (1966—), 女, 黑龙江佳木斯人, 主管药师, 从事中药质量控制研究工作。

Tel: 13124545174 E-mail: wanghuijuan1962@163.com

*通讯作者 王力 Tel: (0454)6878209 E-mail: liuyanxin1965@163.com

稀释至刻度 (V_2), 摇匀, 用 0.25 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取牛黄解毒片 20 片, 除去包衣, 精密称定为 4.542 3 g (M_T), 研细, 精密称取药品粉末 0.617 2 g (M_x), 置锥形瓶中, 加 70% 乙醇 30 mL, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 20 min, 放冷, 滤过, 滤液置 100 mL 单标线量瓶中, 用少量 70% 乙醇分次洗涤容器和残渣, 洗液滤入同一量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度 (V_{x1}), 摇匀; 用单标线吸管精密量取 2 mL (V_{x2}), 置 10 mL 单标线量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度 (V_{x3}), 摇匀, 用 0.25 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 测定和计算 精密量取对照品溶液和供试品溶液各 2 μL , 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 计算, 测定结果见表 1。在实际操作中, 对照品溶液制备 2 份, 分别进样 3 次, 峰面积均折合成称量 8.41 mg (M_0) 对照品计算, 平均峰面积 (A_0 平均) 为 144.30; 供试品 (批号 070428) 溶液平行制备 2 份, 分别进样 3 次, 峰面积均折合成称量药品粉末 0.617 2 g (M_x) 计算, 平均峰面积 (A_x 平均) 为 97.58, 按照建立的数学模型计算, 牛黄解毒片每片含黄芩以黄芩苷计为 4.2 mg。

表 1 牛黄解毒片中黄芩苷的测定结果 ($n=3$)
Table 1 Determination of baicalin of Niu Huang Jiedu Tablets ($n=3$)

批号	黄芩苷/(mg·片 ⁻¹)	RSD/%
070428	4.2	0.36
070304	4.1	0.38
070446	4.2	0.36

2.2 不确定度的评定

2.2.1 数学模型和不确定度计算公式

$X=C_x \times V_{x1} \times f$, 而 $C_x=(A_x/A_0) \times C_0 \times [M_T/(20 \times M_x)]$, $C_0=(M_0/V_0) \times (V_1/V_2)$, $f=V_{x3}/V_{x2}$
代入则有: $X=(A_x \times M_0 \times V_1 \times M_T \times V_{x3} \times V_{x1}) / (A_0 \times V_0 \times V_2 \times 20 \times M_x \times V_{x2})$

式中 X 为牛黄解毒片每片以黄芩苷计算的质量, C_x 为供试品溶液的质量浓度, V_{x1} 为供试品第一次定容体积, f 为供试品溶液稀释倍数, C_0 为对照品溶液的质量浓度, A_x 为供试品溶液峰面积, A_0 为对照品溶液峰面积, M_0 为精密称取对照品的质量, M_T 为 20 片药品的质量, M_x 为精密称取供试品的质量, V_0 为对照品第 1 次定容体积, V_1 为稀释时

量取对照品储备液体积, V_2 为对照品第 2 次定容体积, V_{x2} 为稀释时量取供试品溶液的体积, V_{x3} 为供试品溶液第 2 次定容体积。

假设 $u[X]$ 、 $u[A_x]$ 、 $u[V_1]$ 、 $u[M_T]$ ……分别为 X 、 A_x 、 V_1 、 M_T ……的不确定度, $u[X]/X$ 、 $u[A_x]/A_x$ 、 $u[V_1]/V_1$ 、 $u[M_T]/M_T$ ……分别为 X 、 A_x 、 V_1 、 M_T ……的相对标准不确定度, 则相对标准不确定度计算公式为: $(u[X]/X)^2=(u[A_x]/A_x)^2+(u[A_0]/A_0)^2+(u[M_0]/M_0)^2+(u[V_0]/V_0)^2+(u[V_1]/V_1)^2+(u[V_2]/V_2)^2+(u[M_T]/M_T)^2+(u[M_x]/M_x)^2+(u[V_{x3}]/V_{x3})^2+(u[V_{x2}]/V_{x2})^2+(u[V_{x1}]/V_{x1})^2$ 。

2.2.2 不确定度因果关系分析 根据以上数学模型和不确定度计算公式, 可以得出测定结果 (X) 的不确定度分量分别来源于 A_x 、 M_0 、 V_1 、 M_T 、 V_{x3} 、 V_{x1} 、 A_0 、 V_0 、 V_2 、 M_x 、 V_{x2} , 对这 11 个不确定度来源, 按性质又可以分为体积类不确定度 (V_0 、 V_1 、 V_2 、 V_{x3} 、 V_{x2} 、 V_{x1})、峰面积类不确定度 (A_x 、 A_0)、质量类不确定度 (M_0 、 M_T 、 M_x)。体积类不确定度主要来源 4 种: ①体积校准允差; ②体积重复性; ③温度影响; ④人员读数。峰面积类不确定度主要来源于峰面积重复性; 质量类不确定度主要来源 2 种: ①天平校准; ②天平称量重复性。每一个不确定度分量中又应考虑每一个影响因素, 直至影响因素变得足够小, 对结果的影响可以忽略时为止。

2.3 不确定度分量的量化

2.3.1 对照品质量分数的不确定度 黄芩苷对照品因未给出质量分数和限度标识, 故此项不考虑。

2.3.2 体积类不确定度

(1) 对照品第 1 次定容体积 (V_0) 的不确定度: ①100 mL 单标线量瓶体积校准: 单标线量瓶 (100 mL) A 级品的法定允差为 ± 0.10 mL, 按三角形分布进行计算, 不确定度为 $0.10 \text{ mL}/6^{0.5}=0.040 9 \text{ mL}$ 。②100 mL 单标线量瓶体积重复性: 体积重复性不确定度来源于连续核查排出的满刻度体积液体的标准偏差, 为 A 类不确定度, 通常用称量法确定。对单标线量瓶 (100 mL) A 级品的重复性进行评估, 称得液体的质量分别为 99.607、99.598、99.605、99.596、99.598、99.598、99.609、99.606、99.595、99.608 g; 按照 Bessel 公式计算, 不确定度为 0.001 8 mL。③温度: 温度引起的不确定度来源于与校准温度不同时引起的体积差别。本空调实验室温度在 $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ 波动, 水溶液的体积膨胀系数约 $2.1 \times 10^{-4}/^\circ\text{C}$, 按照矩形分布计算, 不确定度为 $3^\circ\text{C} \times 2.1 \times 10^{-4}/^\circ\text{C} \times$

100 mL/3^{0.5}=0.036 4 mL。④人员读数：实际使用体积容器允许有≤1%的读数误差，假设为三角形分布，则由人员读数引起的不确定度为1%×100 mL/6^{0.5}=0.408 3 mL。⑤合成以上不确定度来源，计算对照品第 1 次定容体积 (V_0) 的不确定度 $u[V_0]=(0.040 9^2+0.001 8^2+0.036 4^2+0.408 3^2)^{0.5}=0.412 0$ mL，则相对标准不确定度 $u[V_0]/V_0=0.412 0$ mL/100 mL=4.12×10⁻³。

(2) 对照品第 2 次定容体积 (V_2) 的不确定度：所用单标线量瓶为 25 mL，A 级品。①体积校准：单标线量瓶 (25 mL) A 级品的法定允差为±0.03 mL，不确定度为 0.03 mL/6^{0.5}=0.012 3 mL。②温度：25 mL 单标线量瓶温度引起的不确定度为 3 °C×2.1×10⁻⁴/°C×25 mL/3^{0.5}=0.009 1 mL。③体积重复性：对 25 mL 单标线量瓶 A 级品的重复性进行评估，称得液体质量分别为 24.926、24.932、24.930、24.921、24.933、24.926、24.932、24.936、24.929、24.927 g；按照 Bessel 公式计算，不确定度为 0.001 4 mL。④人员读数：由人员读数引起的不确定度为 1%×25 mL/6^{0.5}=0.102 1 mL。⑤合成以上不确定度来源，计算 $u[V_2]=(0.012 3^2+0.009 1^2+0.001 4^2+0.102 1^2)^{0.5}=0.103 3$ mL，则相对标准不确定度 $u[V_2]/V_2=0.103 3$ mL/25 mL=4.13×10⁻³。

(3) 稀释时量取对照品储备液体积 (V_1) 的不确定度：所用单标线吸管为 10 mL，A 级品。①体积校准：单标线吸管 (10 mL) A 级品的法定允差为±0.020 mL，不确定度为 0.020 mL/6^{0.5}=0.008 2 mL。②温度：10 mL 单标线吸管由温度引起的不确定度为 3 °C×2.1×10⁻⁴/°C×10 mL/3^{0.5}=0.003 7 mL。③体积重复性：对 10 mL 单标线吸管 A 级品的重复性进行评估，排出液体质量分别为 9.974 7、9.973 2、9.973 2、9.976 1、9.975 9、9.974 9、9.974 9、9.973 2、9.974 7、9.975 2 g；按照 Bessel 公式计算，不确定度为 0.000 4 mL。④人员读数：由人员读数引起的不确定度为 1%×10 mL/6^{0.5}=0.040 9 mL。⑤合成以上不确定度来源，计算 $u[V_1]=(0.008 2^2+0.003 7^2+0.000 4^2+0.040 9^2)^{0.5}=0.041 9$ mL，则相对标准不确定度 $u[V_1]/V_1=0.041 9$ mL/10 mL=4.19×10⁻³。

(4) 供试品第 1 次定容体积 (V_{x1}) 的不确定度：使用单标线量瓶 (100 mL) A 级品定容， $u[V_{x1}]/V_{x1}=4.12\times 10^{-3}$ 。

(5) 供试品第 2 次定容体积 (V_{x3}) 的不确定度：

所用单标线容量瓶为 10 mL，A 级品。①体积校准：单标线量瓶 (10 mL) A 级品的法定允差为±0.020 mL，不确定度为 0.020 mL/6^{0.5}=0.008 2 mL。②温度：10 mL 单标线量瓶由温度引起的不确定度为 3 °C×2.1×10⁻⁴/°C×10 mL/3^{0.5}=0.003 7 mL。③体积重复性：对 10 mL 单标线量瓶 A 级品的重复性进行评估，称得液体质量分别为 9.974、9.971、9.980、9.983、9.976、9.991、9.982、9.970、9.975、9.979 g；按照 Bessel 公式计算，不确定度为 0.002 0 mL。④人员读数：由人员读数引起的不确定度为 1%×10 mL/6^{0.5}=0.040 9 mL。⑤合成以上不确定度来源，计算 $u[V_{x3}]= (0.008 2^2+0.003 7^2+0.002 0^2+0.040 9^2)^{0.5}=0.042 0$ mL，则相对标准不确定度 $u[V_{x3}]/V_{x3}=0.042 0$ mL/10 mL=4.20×10⁻³。

(6) 稀释时量取供试品溶液体积 (V_{x2}) 的不确定度：所用单标线吸管为 2 mL，A 级品。①体积校准：单标线吸管 (2 mL) A 级品的法定允差为±0.010 mL，不确定度为 0.010 mL/6^{0.5}=0.004 1 mL。②温度：2 mL 单标线吸管由温度引起的不确定度为 3 °C×2.1×10⁻⁴/°C×2 mL/3^{0.5}=0.000 8 mL。③体积重复性：对一单标线吸管 (2 mL) A 级品的重复性进行评估，排出液体质量分别为 2.001 5、2.000 6、2.002 4、2.002 1、2.002 5、2.002 1、2.001 0、2.002 5、2.001 9、2.002 0 g；按照 Bessel 公式计算，不确定度为 0.000 3 mL。④人员读数：由人员读数引起的不确定度为 1%×2 mL/6^{0.5}=0.008 2 mL。⑤合成以上不确定度来源，计算 $u[V_{x2}]= (0.004 1^2+0.000 8^2+0.000 3^2+0.008 2^2)^{0.5}=0.009 2$ mL，则相对标准不确定度 $u[V_{x2}]/V_{x2}=0.009 2$ mL/2 mL=4.60×10⁻³。

2.3.3 质量类不确定度

(1) 20 片药品质量 (M_T) 的不确定度：①天平校准：天平校准不确定度来源于天平校准时有限的准确度。使用的赛多利斯 (BS110S) 电子天平 ($d=0.1$ mg) 为 1 级工作天平，检定证书给出最大允差为±1.0 mg，按照矩形分布计算，不确定度为 1.0 mg/3^{0.5}=0.577 mg。②天平称量重复性：参考《化学分析中不确定度的评估指南》有关数据为 0.5×最后一位有效数字，由于赛多利斯 (BS110S) 电子天平的最后一位有效数字为 0.1 mg，所以不确定度为 0.5×0.1 mg=0.05 mg。③合成以上不确定度来源，计算单次称量不确定度为 (0.577²+0.050²)^{0.5}=0.579 mg，因称量使用减重法，因而 $u[M_T]= (2\times 0.579^2)^{0.5}=0.819$ mg，则相对标准不确定度

$u[M_T]/M_T=0.819\text{ mg}/4.542\text{ g}=1.81\times 10^{-4}$ 。

(2) 供试品质量 (M_x) 的不确定度: ①天平校准: 不确定度为 $1.0\text{ mg}/3^{0.5}=0.577\text{ mg}$ 。②天平称量重复性: 不确定度为 $0.5\times 0.1\text{ mg}=0.05\text{ mg}$ 。③合成以上不确定度来源, $u[M_x]=0.819\text{ mg}$, $u[M_x]/M_x=0.819\text{ mg}/0.617\text{ g}=1.33\times 10^{-3}$ 。

(3) 对照品质量 (M_0) 的不确定度: ①天平校准: 由于电子天平 ($d=0.01\text{ mg}$) 为 1 级工作天平, 检定证书给出最大允差为 $\pm 0.10\text{ mg}$, 按照矩形分布计算, 不确定度为 $0.10\text{ mg}/3^{0.5}=0.058\text{ mg}$ 。②天平称量重复性: 由于电子天平最后一位有效数字为 0.01 mg , 所以不确定度为 $0.5\times 0.01\text{ mg}=0.005\text{ mg}$ 。③合成以上不确定度来源, $u[M_0]=0.082\text{ mg}$, $u[M_0]/M_0=0.082\text{ mg}/8.41\text{ mg}=9.75\times 10^{-3}$ 。

2.3.4 峰面积类不确定度

(1) 对照品溶液峰面积 (A_0) 重复性不确定度: 来源主要是对照品重复进样时峰面积的标准偏差, 按照 Bessel 公式 $u[A_0]=\left(\sum(A_0-\bar{A}_0)^2/(n(n-1))\right)^{0.5}$ 计算。对照品溶液平行制备 2 份 (对照品取样量分别为 8.41 、 8.50 mg), 分别进样 3 次, 按照对照品取样量 8.41 mg 计算, 黄芩苷色谱峰的校正峰面积 (A_0) 分别为 144.05 、 144.15 、 144.10 、 144.50 、 144.52 、 144.49 , 平均值为 144.30 , $u[A_0]=9.12\times 10^{-2}$, 则相对标准不确定度 $u[A_0]/A_0=9.12\times 10^{-2}/144.30=6.32\times 10^{-4}$ 。

(2) 供试品溶液峰面积 (A_x) 重复性不确定度: 供试品溶液平行制备 2 份 (供试品取样量分别为 0.617 g 、 0.617 g), 分别进样 3 次, 按照供试品取样量 0.617 g 计算, 黄芩苷色谱峰的校正峰面积 (A_x) 分别为 97.73 、 96.92 、 97.52 、 97.79 、 97.80 、 97.70 , 平均值为 97.58 , 按照 Bessel 公式计算 $u[A_x]=0.137\text{ g}$, $u[A_x]/A_x=0.137\text{ g}/97.58=1.41\times 10^{-3}$ 。

2.4 不确定度的合成

根据计算公式合成各不确定度分量后, 得到牛黄解毒片每片以黄芩苷计算的量 (X) 的相对标准不确定度 $u[X]/X=\left((4.12\times 10^{-3})^2+(4.19\times 10^{-3})^2+(4.13\times 10^{-3})^2+(4.12\times 10^{-3})^2+(4.60\times 10^{-3})^2+(4.20\times 10^{-3})^2+(1.81\times 10^{-4})^2+(1.33\times 10^{-3})^2+(9.75\times 10^{-3})^2+(6.32\times 10^{-4})^2+(1.41\times 10^{-3})^2\right)^{0.5}=14.37\times 10^{-3}$, 则质量分数的不确定度 $u[X]=$

$14.37\times 10^{-3}\times 4.2\text{ mg}=0.1\text{ mg}$ 。

2.5 扩展不确定度的评定

扩展不确定度 $U=K\times u[X]$, 取包含因子 $K=2$, 则有 $U=2\times 0.1\text{ mg}=0.2\text{ mg}$ 。

2.6 结果的表示

根据评定结果, 最后牛黄解毒片每片含黄芩苷计算的量可表示为 $X=(4.2\pm 0.2)\text{ mg}$ ($K=2$)。

3 讨论

从各不确定度分量可看出, 本实验中对对照品质量不确定度是主要的不确定度来源, 其次是体积类不确定度, 再次是供试品质量不确定度和供试品溶液峰面积重复性不确定度。因此, 对照品的称量是影响本实验测定结果的主要因素, 应重点加以控制。一般影响质量类不确定度的因素有: 称量物品的质量和天平的精度。称量物品的质量越大, 天平的精度越高, 由天平不确定度导致的对测定结果的影响就越小, 因此增大对照品的取样量和使用高精度天平有利于降低不确定度, 提高检测结果的可靠性。

体积类和峰面积类不确定度主要和使用的玻璃容器及 HPLC 色谱仪的级别有关。一般使用刚刚经过校准的 A 级玻璃容器并且尽量减小读数误差及使用检定参数稳定的 HPLC 色谱仪, 均有利于降低体积和峰面积类不确定度对实验结果的影响; 此外, 控制好实验室的温、湿度, 使之与仪器校正时的环境参数相近, 也有利于改善体积类和峰面积类不确定度对检测结果的影响。

参考文献

- [1] 国家质量技术监督局计量司. 测量不确定度评定与表示指南 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2000.
- [2] 王丽楠, 杨美华, 陈建民. 不确定度分析在药物研究中的应用 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 464-467.
- [3] 测量不确定度评定与表示 (JJF 1059—1999) [S]. 1999.
- [4] 金鹏飞, 邹定, 姜文清, 等. 格列吡嗪片高效液相法含量测定结果的不确定度评定 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1136-1140.
- [5] 饶毅, 张洁, 李新南, 等. HPLC 法测定大豆异黄酮的不确定度评定 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1667-1670.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [7] 潘桂玲. HPLC 法测定小儿咳喘颗粒中黄芩苷 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 291-292.