

内标多控法测定枳实中黄酮类成分及其不确定度评定研究

陈燕军¹, 余琦¹, 饶毅², 魏惠珍²

1. 江西师范大学, 江西 南昌 330027

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 建立 HPLC 内标多控法测定枳实药材中黄酮类成分的方法, 并对测定结果进行不确定度评定。方法 以柚皮苷为内标, 建立柚皮苷与橙皮苷、新橙皮苷的相对校正因子, 计算枳实中黄酮类成分的含量, 再根据数学模型, 对测定过程中引入的不确定度进行评估, 由此计算测定结果不确定度。结果 采用本方法测定枳实中柚皮苷与橙皮苷、新橙皮苷含量的扩展不确定度分别为 $W \times 2.94\%$ 、 $W \times 3.49\%$ 、 $W \times 3.34\%$ 。结论 建立的不确定度评定法可为内标多控法测定中药有效成分的不确定度分析提供参考。

关键词: 枳实; 黄酮; 内标多控法; 不确定度评定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)01-0039-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.01.010

Determination of flavonoids in *Aurantii Immaturus Fructus* and their uncertainty evaluation by internal standard multi-control method

CHEN Yan-jun¹, YU Qi¹, RAO Yi², WEI Hui-zhen²

1. Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, China

2. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To establish an HPLC internal standard multi-control method for the determination of flavonoids in *Aurantii Immaturus Fructus* and to evaluate the uncertainty of the results. **Methods** Using naringin as internal standard, the relative correction factor of naringin to hesperidin and neohesperidin was established. The contents of flavonoids in *Aurantii Immaturus Fructus* were determined. Through the mathematical mode, the factors affecting the uncertainty were deduced and evaluated. **Results** The expanded standard uncertainties for the determined contents of naringin, hesperidin, and neohesperidin in *Aurantii Immaturus Fructus* were $W \times 2.94\%$, $W \times 3.49\%$, and $W \times 3.34\%$, respectively. **Conclusion** The established mathematic model is applicable to the uncertainty analysis of HPLC internal standard multi-control method in the determination of active components in Chinese materia medica.

Key words: *Aurantii Immaturus Fructus*; flavonoids; internal standard multi-control method; uncertainty evaluation

内标多控法根据有效成分间内在关系建立数学函数关系, 采用易得对照品替代难获得对照品进行质量控制, 实现一标多控。由于中药化学对照品分离难度较大, 且有些对照品化学性质不稳定, 致使对中药中某些有效成分进行测定时成本较高, 因而采用内标多控法具有很高的实用价值。

枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* L. Osbeck 的干燥幼果, 主要含有黄酮类物质。目前研究结果表明, 此类植物的黄酮成分具有抗癌、抗氧化、抗炎症、

预防心血管疾病以及抗菌、抗病毒作用^[1]。本实验以枳实中黄酮类成分为例, 采用内标多控法, 建立柚皮苷与橙皮苷、新橙皮苷的相对校正因子, 并计算枳壳中黄酮类成分的量, 采用不确定度理论对检测结果的可靠性进行评估。对药品检测方法的测量不确定度的分析评定, 能够为评价分析方法、评定试验室及分析测试人员的技术水平和准确判定药品质量提供依据。本实验根据国家技术监督局发布的《测量不确定度评定和表示》^[2] (JJF1059-1999) 和 Eurachem 颁布的 *Quantifying Uncertainty in Analytical*

收稿日期: 2012-12-18

作者简介: 陈燕军(1973—), 女, 主管药师, 硕士研究生, 研究方向为药物质量控制研究。Tel: (0791)88506260 E-mail: chemyj197302@yahoo.com.cn

Measurement^[3], 对 HPLC 内标多控法测定枳实中黄酮类成分的测量不确定度进行了评定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC—10ATvp 高效液相色谱仪 (SPD—M10Avp 检测器、CLASS-VP 软件), AUW220D 型十万分之一电子天平 (日本岛津公司), AB104—N 型万分之一天平 (瑞士梅特勒-托利多公司)、pB—10 型 pH 酸度计 (德国赛多利斯公司)。

1.2 试剂

柚皮苷 (批号 110722-200309, 中国食品药品检定研究院, 供定量测定用, 质量分数 >98%)、橙皮苷 (批号 110721-200512, 中国食品药品检定研究院, 供定量测定用, 质量分数 95.1%)、新橙皮苷 (中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 经光谱确定结构, HPLC 面积归一法计算质量分数为 99.34%); 流动相所用试剂为色谱纯、水为 MiLLi-Q 超纯水、其他试剂均为分析纯; 枳实药材及饮片均购自药材市场, 经江西中医学院付小梅副教授鉴定, 为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果。

2 方法与结果

2.1 基本原理^[4]

根据紫外分光光度法郎伯-比尔定律, 吸光物质与浓度或厚度之间存在简单的正比关系, 且不同吸光物质具有不同吸光系数, 因而 HPLC-DAD/VWD 检测分析过程中, 一定质量或浓度的吸光物质与检测器响应值成正比, 即存在固定的线性关系。在中药质量控制过程中常因对照品难以得到而导致成本较高, 因而可以在一定色谱条件下, 以药材中易得对照品为指标, 根据各组分间线性关系, 建立该成分与被测成分间的相对校正因子, 然后通过易得对照品的浓度和相对校正因子计算被测组分含量。

在一定色谱条件下, 配制一系列浓度对照品和替代对照品的溶液, 以浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 分别测定对照品和替代对照品的标准曲线, 将校正曲线校正为 0 后, 根据公式 (1) 计算两条标准曲线斜率 k 的比值, 即为校正因子 f 。

$$f = k_i/k_r \quad (1)$$

f 为对照品与替代对照品标准曲线斜率比; k_r 为替代对照品标准曲线斜率; k_i 为对照品标准曲线斜率

测定样品时, 替代对照品柚皮苷根据外标一点法进行测定, 药材中的柚皮苷含量用公式 (2) 计算。

被替代物橙皮苷与新橙皮苷按 (3) 式计算含量。

$$W = \frac{m_i \cdot A_s \cdot V_s}{A_i \cdot V_i \cdot m_s} \times 100\% \quad (2)$$

W 为药材中柚皮苷含量; m_i 为柚皮苷对照品质量 (mg); A_s 为样品峰面积; V_s 为样品稀释体积; A_i 为柚皮苷对照品峰面积; V_i 为柚皮苷对照品稀释体积; m_s 为样品称样量 (g)。

$$W = \frac{m_i \cdot A_r \cdot V_r}{f \cdot A_i \cdot V_i \cdot m_r} \times 100\% \quad (3)$$

式中 W 为药材中橙皮苷或新橙皮苷含量; m_i 为柚皮苷对照品质量 (mg); A_r 为样品峰面积; V_r 为样品稀释体积; A_i 为柚皮苷对照品峰面积; V_i 为柚皮苷对照品稀释体积; m_r 为样品称样量 (g)。

2.2 方法学考察

2.2.1 色谱条件 经优化, 所采用的液相条件使 4 种药材中黄酮类成分能够较好分离。色谱柱为 Hypersil ODS₂-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (17:83, 磷酸调至 pH 3.0), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 283 nm, 柱温 25 °C。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称定样品粉末 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 1.5 h, 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 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品、橙皮苷对照品和新橙皮苷对照品适量, 加甲醇分别制成柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品溶液, 质量浓度分别为 0.085 2、0.027 0、0.108 6 mg/mL。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、20 μL 进样, 以进样量对峰面积值进行回归, 得截距校正后的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的回归方程及相对校正因子 (RCF), 见表 1。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.55%、0.63%、0.60%。

2.2.6 稳定性试验 精密称定枳实饮片粉末 0.2 g, 按“2.2.2”项下方法制备样品, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定, 记录峰面积, 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.77%、0.97%、0.89%。实验结果表明, 24 h 之内供试品溶液稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称定枳实饮片粉末 0.2 g, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备样品, 测定柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷质量分数分别为 12.03%、3.17%、

表1 3种化合物回归方程、线性范围、相关系数、斜率及其校正因子

Table 1 Regression equation, linear range, correlation coefficient, slope, and RCF of three components

化合物	回归方程	线性范围	相关系数 (r)	斜率 (k)	校正因子 (f)
柚皮苷	$Y=1\ 611\ 555 X$	0.085 2~1.704 0	0.999 948	1 611 555	1
橙皮苷	$Y=184\ 24\ 86 X$	0.027 0~0.540 8	0.999 940	1 842 486	1.143 297
新橙皮苷	$Y=1\ 885\ 474 X$	0.108 6~2.172 0	0.999 975	1 885 474	1.169 971

14.97%, RSD 分别为 0.41%、0.81%、0.91%。

2.2.8 加样回收试验 精密称定枳实饮片粉末 0.1 g, 共 6 份, 分别加入柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷对照品适量, 按“2.2.2”项下方法制备, 进行测定。计算柚皮苷回收率为 99.06%, RSD=1.81%; 橙皮苷回收率为 97.36%, RSD=2.59%; 新橙皮苷回收率为 98.93%, RSD=2.25%。

3 枳实药材中多种黄酮类成分测定结果

分别精密吸取枳实药材供试品溶液和对照品溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪测定。采用外标法和内标多控法计算枳实药材、枳实饮片和麸炒枳实中柚皮苷、橙皮苷以及新橙皮苷的量, 结果见表 2。

表2 枳实药材中黄酮类成分的测定

Table 2 Contents of flavonoids in *Aurantii Immaturus Fructus*

样品	外标一点法测得			内标多控法测得	
	质量分数/%			质量分数/%	
	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
枳实原药材	11.14	3.16	15.70	3.17	15.65
枳实饮片	12.47	2.62	15.75	2.62	15.77
麸炒枳实	11.91	4.26	13.91	4.27	13.93

4 内标多控法测定枳实药材黄酮类成分不确定度评定

4.1 不确定度来源分析

由公式 (2) 可知, 替代物柚皮苷采用外标一点法进行测定, 其不确定度主要来源于以下方面。1) 对照品柚皮苷称量质量的不确定度 $u(m_i)$; 2) 药材溶解、稀释、定容过程中引入的不确定度 $u(V_s)$; 3) 药材称量产生的不确定度 $u(m_s)$; 4) 对照品柚皮苷溶解、稀释、定容过程引入的不确定度 $u(V_i)$; 5) 对照品柚皮苷液相测定过程中引入的不确定度 $u(A_i)$; 6) 药材液相测定过程引入的不确定度 $u(A_s)$

根据公式 (1) 与公式 (3) 可知, 被替代检测成分橙皮苷或新橙皮苷不确定度分量除上述来源外, 还包括以下因素。7) 柚皮苷成分标准曲线拟合

过程中的斜率不确定度 $u(k_i)$; 8) 被替代检测成分橙皮苷或新橙皮苷标准曲线拟合过程中的斜率不确定度 $u(k_r)$ 。

4.2 不确定度计算

在计算标准不确定度时, 根据 *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* 要求, 对证书或其他说明书给出区间, 而未说明置信水平的, 如对照品的纯度、温度对定容体积的影响等, 按矩形分布 ($k=\sqrt{3}$) 计算不确定度; 对给出区间、未说明置信水平, 但有理由认为不大可能为极端值的, 如量瓶、移液管等玻璃仪器的校正不确定度, 采用三角分布 ($k=\sqrt{6}$) 计算不确定度; 通过对随机变化过程的重复观测得到的估计值, 如天平称量、量瓶定容、液相测定的重复性等引入的不确定度, 采用实验的标准偏差表示。

4.2.1 源自对照品柚皮苷制备过程标准不确定度、 $u(m_i)$ 、 $u(V_i)$ 、 $u(A_i)$ 柚皮苷标准溶液配制过程使用十万分之一天平精密称量 21.3 mg 并定容于 25 mL 量瓶中, 采用单标移液管精密吸取 2 mL 续滤液于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 精密吸取对照品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪测定即得, 所引入的不确定度包括对照品称量 $u(m_i)$ 、溶液配制 $u(V_i)$ 与液相测定峰面积 $u(A_i)$ 3 部分, 其分量评定结果见表 3。

4.2.2 源自供试品溶液制备测定过程不确定度、 $u(m_s)$ 、 $u(V_s)$ 、 $u(A_s)$ 药材供试品溶液配制过程采用万分之一天平精密称量 0.202 4 g 置具塞锥形瓶中, 采用单标移液管精密加入甲醇 50 mL, 称质量, 回流, 补足质量, 滤过, 采用单标移液管精密吸取 2 mL 续滤液于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 取溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪测定即得, 所引入的不确定度包括样品称量 $u(m_s)$ 、溶液配制 $u(V_s)$ 与液相测定峰面积 $u(A_s)$ 3 部分确定度, 其分量评定结果见表 4。

4.2.3 源自校正因子 f 测定过程不确定度 $u(f)$ 校正因子 f 测定过程不确定度 $u(f)$ 由计算替代对照品

与对照品的斜率计算得到, 因而其不确定度通过拟合得到, 所得斜率不确定度按 (4) 式计算^[5]。

$$u(b) = \frac{u(y)}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (4)$$

$$\text{其中 } y \text{ 值不确定度 } (u) = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

本实验采用贮备液经精密稀释, 制备 5 份供试样品进行测定, 以测得的信号作为被测物浓度的函数作图, 用最小二乘法进行线性回归, 并要求截距为 0。所得各线性方程斜率不确定度见表 5。

根据表 5 结果可知测定过程橙皮苷校正因子 f 引起的相对标准不确定度为柚皮苷与橙皮苷斜率不确定度的拟合。

$$\frac{u(f_{\text{橙皮}})}{f_{\text{橙皮}}} = \sqrt{\left[\frac{u(p_{\text{柚皮}})}{p_{\text{柚皮}}}\right]^2 + \left[\frac{u(p_{\text{橙皮}})}{p_{\text{橙皮}}}\right]^2} = 0.0059 \quad (5)$$

新橙皮苷校正因子 f 引起的相对标准不确定度为柚皮苷与新橙皮苷斜率不确定度的拟合。

$$\frac{u(f_{\text{新橙皮}})}{f_{\text{新橙皮}}} = \sqrt{\left[\frac{u(p_{\text{柚皮}})}{p_{\text{柚皮}}}\right]^2 + \left[\frac{u(p_{\text{新橙皮}})}{p_{\text{新橙皮}}}\right]^2} = 0.0046 \quad (6)$$

4.3 合成不确定度及扩展不确定度计算

实验过程中采用外标一点测定, 根据以上计算得出的相对不确定度分量后按公式 (7) 求得枳实药材中柚皮苷测定的合成不确定度, 按公式 (8) 计算枳实药材中橙皮苷测定的合成不确定度, 按公式 (9) 计算枳实药材中新橙皮苷测定的合成不确定度。

表 3 标准溶液的不确定度评定

Table 3 Uncertainty evaluation of standard solution

项目	来源	不确定度分量	误差或标准偏差	标准不确定度 $u(x)$	相对标准不确定度 $u(x)/x$
称量 $u(m_i)$	十万分之一天平	天平示值 $u(m_{i1})$	0.1 mg	$\sqrt{\left(\frac{0.1}{\sqrt{3}}\right)^2 + (0.05)^2} = 0.076 \text{ mg}$	0.0072
		天平称量重复性 $u(m_{i2})$	0.05 mg		
溶液配制 $u(V_i)$	25 mL 量瓶	校准 $u(V_{i1})$	0.030 mL	$\sqrt{\left(\frac{0.03}{\sqrt{6}}\right)^2 + (0.021)^2} = 0.024 \text{ mL}$	0.0010
		定容重复性 $u(V_{i2})$	0.021 mL		
	10 mL 量瓶	校准 $u(V_{s21})$	0.020 mL	$\sqrt{\left(\frac{0.02}{\sqrt{6}}\right)^2 + (0.008)^2} = 0.019 \text{ mL}$	0.0019
		定容重复性 $u(V_{s22})$	0.008 mL		
	2 mL 单标移液管	校准 $u(V_{s31})$	0.015 mL	$\sqrt{\left(\frac{0.015}{\sqrt{6}}\right)^2 + (0.012)^2} = 0.0135 \text{ mL}$	0.0067
		定容重复性 $u(V_{s32})$	0.012 mL		
液相测定 $u(A_i)$	峰面积	液相测定重复性 $u(A_i)$	7 546	7 546	0.0055

表 4 供试品溶液的相对不确定度

Table 4 Relative uncertainty of test solution

项目	来源	不确定度分量	误差或标准偏差	标准不确定度 $u(x)$	相对标准不确定度 $u(x)/x$
称量 $u(m_s)$	万分之一天平	天平示值 $u(m_{s1})$	0.001 g	$\sqrt{\left(\frac{0.001}{\sqrt{3}}\right)^2 + (0.0003)^2} = 0.00065 \text{ g}$	0.0032
		天平称量重复性 $u(m_{s2})$	0.0003 g		
溶液配制 $u(V_s)$	50 mL 量瓶	校准 $u(V_{s11})$	0.05 mL	$\sqrt{\left(\frac{0.03}{\sqrt{6}}\right)^2 + (0.021)^2} = 0.0559 \text{ mL}$	0.0012
		定容重复性 $u(V_{s12})$	0.021 mL		
	10 mL 量瓶	校准 $u(V_{s21})$	0.020 mL	$\sqrt{\left(\frac{0.02}{\sqrt{6}}\right)^2 + (0.017)^2} = 0.0189 \text{ mL}$	0.0019
		定容重复性 $u(V_{s22})$	0.017 mL		
	2 mL 单标移液管	校准 $u(V_{s31})$	0.015 mL	$\sqrt{\left(\frac{0.015}{\sqrt{6}}\right)^2 + (0.012)^2} = 0.0135 \text{ mL}$	0.0067
		定容重复性 $u(V_{s32})$	0.012 mL		
液相测定 $u(A_s)$	柚皮苷峰面积	液相测定重复性 $u(A_{s1})$	8 190	8 190	0.0050
	橙皮苷峰面积	液相测定重复性 $u(A_{s2})$	3 500	3 500	0.0088
	新橙皮苷峰面积	液相测定重复性 $u(A_{s3})$	19 911	19 911	0.0081

表5 斜率拟合过程的相对不确定度
Table 5 Relative uncertainty of slope fitting

检测成分	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	吸收值	斜率	u(y)	u(b)	u(b)/b
柚皮苷	0.085 2	146 283	1 611 555	5 731	4 428	0.002 7
	0.426 0	686 848				
	0.852 0	1 376 769				
	1.278 0	2 058 859				
	1.704 0	2 744 229				
橙皮苷	0.027 0	50 117	1 842 486	3 970	9 663	0.005 2
	0.135 2	247 318				
	0.270 4	501 765				
	0.405 6	751 061				
	0.540 8	992 258				
新橙皮苷	0.108 6	220 428	1 885 474	11 511	6 977	0.003 7
	0.543 3	1 029 657				
	1.086 0	2 053 378				
	1.629 0	3 075 578				
	2.172 0	4 087 021				

$$U_{crel}(W) = \sqrt{\left[\frac{u(m_i)}{m_i}\right]^2 + \left[\frac{u(V_i)}{V_i}\right]^2 + \left[\frac{u(A_i)}{A_i}\right]^2 + \left[\frac{u(m_s)}{m_s}\right]^2 + \left[\frac{u(V_s)}{V_s}\right]^2 + \left[\frac{u(A_s)}{A_s}\right]^2} = 0.014 7 \quad (7)$$

$$U_{crel}(W) = \sqrt{\left[\frac{u(m_i)}{m_i}\right]^2 + \left[\frac{u(V_i)}{V_i}\right]^2 + \left[\frac{u(A_i)}{A_i}\right]^2 + \left[\frac{u(m_s)}{m_s}\right]^2 + \left[\frac{u(V_s)}{V_s}\right]^2 + \left[\frac{u(A_s)}{A_s}\right]^2 + \left[\frac{u(f_{橙皮})}{f_{橙皮}}\right]^2} = 0.017 4 \quad (8)$$

$$U_{crel}(W) = \sqrt{\left[\frac{u(m_i)}{m_i}\right]^2 + \left[\frac{u(V_i)}{V_i}\right]^2 + \left[\frac{u(A_i)}{A_i}\right]^2 + \left[\frac{u(m_s)}{m_s}\right]^2 + \left[\frac{u(V_s)}{V_s}\right]^2 + \left[\frac{u(A_s)}{A_s}\right]^2 + \left[\frac{u(f_{新橙皮})}{f_{新橙皮}}\right]^2} = 0.016 7 \quad (9)$$

4.4 扩展不确定度及报告测定不确定度

取 95%的置信概率, 包含因子 k=2, 按照公式 (10)、(11) 计算扩展不确定度。各批次枳实含量测定结果的不确定度见表 6。枳实原药材中橙皮苷含量测定过程各来源不确定度评定结果见表 7。枳实

原药材中橙皮苷按外标一点法测定其不确定度评定结果见表 8。

$$U(W) = W \times k \times U_{crel}(W) \quad (10)$$

报告不确定度表示方式为:

$$W \pm U(W) \quad (11)$$

表6 枳实药材含量测定的扩展不确定度与报告不确定度
Table 6 Expanded uncertainty and report uncertainty in determination of *Aurantii Immaturus Fructus*

样品	不确定度分量	柚皮苷/%	橙皮苷/%	新橙皮苷/%
枳实原药材	扩展不确定度	0.33	0.11	0.52
	报告不确定度	11.14±0.33	3.17±0.11	15.65±0.52
枳实饮片	扩展不确定度	0.37	0.09	0.53
	报告不确定度	12.47±0.37	2.62±0.09	15.77±0.53
麸炒枳实	扩展不确定度	0.35	0.15	0.47
	报告不确定度	11.91±0.35	4.27±0.15	13.93±0.47

表7 HPLC 内标多控法测定枳实原药材中橙皮苷
不确定度分量评定表

Table 7 Uncertainty evaluation of hesperidin in *Aurantii Immaturus Fructus* by HPLC internal standard multi-control method

不确定度分量	相对标准不确	不确定度贡
	定度 $u(y_i)/y_i$	献率/%
对照品柚皮苷称量 $u(m_i)$	0.007 2	16.89
对照品柚皮苷溶液配制 $u(V_i)$	0.007 1	16.38
对照品柚皮苷液相测定 $u(A_i)$	0.005 5	9.77
供试品称量 $u(m_s)$	0.003 2	3.40
供试品溶液配制 $u(V_s)$	0.007 1	16.48
供试品液相测定 $u(A_s)$	0.008 8	25.56
校正因子拟合 $u(f)$	0.005 9	11.51
合成不确定度 $u(W)$	0.017 4	100

表8 HPLC 外标一点法测定枳实原药材中橙皮苷
不确定度分量评定表

Table 8 Uncertainty evaluation of hesperidin in *Aurantii Immaturus Fructus* by HPLC one-point external standard method

不确定度分量	相对标准不确	不确定度贡
	定度 $u(y_i)/y_i$	献率/%
对照品橙皮苷称量 $u(m_i)$	0.004 5	8.32
对照品橙皮苷溶液配制 $u(V_i)$	0.006 9	19.32
对照品橙皮苷液相测定 $u(A_i)$	0.006 3	16.15
供试品称量 $u(m_s)$	0.003 2	4.21
供试品溶液配制 $u(V_s)$	0.007 1	20.39
供试品液相测定 $u(A_s)$	0.008 8	31.61
合成不确定度 $u(W)$	0.015 7	100

不确定度贡献率计算方法为:

$$\left[\frac{u(y_i)}{y_i} \right]^2 / \sum_{i=1}^n \left[\frac{u(y_i)}{y_i} \right]^2 \quad (12)$$

5 讨论

本实验以枳实药材为例,进行内标多控法在中药质量控制中应用研究。选择内标多控法进行含量测定的一个前提条件为待测物浓度与吸收值拟合曲线的截距必须通过原点,而实际的拟合曲线截距为

非零常数或接近于零(由于仪器或其他系统误差造成),因而在绝大部分内标多控法测定中药有效成分的文献中,对于校正因子的计算通常在固定或指定的内标与待测浓度下进行计算得到,实际测量中内标物与待测物的浓度在很大情况下是不同的,此时应用得到的校正因子进行计算将产生较大的误差(或不确定度)。故本实验在计算校正因子时,将内标物与待测物标准曲线强制过原点,并由两种物质标准曲线斜率比值计算得到校正因子。

本实验采用不确定度理论对内标多控法进行评定研究。表7为枳实原药材中橙皮苷含量测定过程各来源不确定度评定结果。从表7的各标准不确定度分量所占比例可以看出,供试品溶液中橙皮苷成分液相测定的不确定度贡献最大,由于采用自动进样,因而此不确定度主要与液相色谱仪稳定性有关;其次是来自供试品溶液的配制过程,供试品溶液制备过程不确定度。校正因子 f 的不确定度贡献占11.51%,说明按内标多控法进行检测其结果的不确定度并非为主要不确定度。

表8为枳实原药材中橙皮苷按外标一点法测定其不确定度评定结果,从不确定度评定角度可以看出枳实中橙皮苷含量采用内标多控法测定结果的不确定度稍大于外标一点法的测定结果,但结合测定成本考虑,内标多控法结果在可接受范围内。

参考文献

- [1] 赵国华,陈宗道. 柑桔类黄酮生物活性的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(3): 71-75.
- [2] 国家质量技术监督局. 测量不确定度评定与表示 [M]. JJF1059-1999, 北京: 中国计量出版社, 1999.
- [3] Ellison S L R, Rosslein M, Williams A. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* [M]. 2nd Ed. UK: Teddington EURACHEM/CITAC, 2000.
- [4] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [5] 金正一,李凤岐. 一元线性参数最小二乘法中斜率及截距的不确定度 [J]. 沈阳工业学院学报, 2000, 19(1): 73-76.