

HPLC 法测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素及其不确定度评定

魏惠珍¹, 谢菲², 饶毅^{1*}, 李新南², 张红红¹, 金浩鑫¹

1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西中医学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 建立元胡止痛胶囊中延胡索乙素的定量测定方法, 并对所建立方法进行不确定度评定。方法 采用 HPLC 法测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素, 再根据方法学验证数据, 对测定过程中引入的不确定度进行评估, 由此计算合成不确定度, 最终给出测量结果在 95%置信区间下的扩展不确定度。结果 采用本方法定量测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素的扩展不确定度为 4.10%。结论 建立的延胡索乙素定量测定方法, 结果准确且重现性好, 可用于元胡止痛胶囊的质量控制; 建立的不确定度评定法适用于 HPLC 法测定中药有效成分的不确定度分析。

关键词: 元胡止痛胶囊; 延胡索乙素; 高效液相色谱法; 不确定度; 方法学验证

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)02-0299-04

Determination of tetrahydropalmatine in Yuanhu Zhitong Capsule by HPLC and evaluation of its measurement uncertainty

WEI Hui-zhen¹, XIE Fei², RAO Yi¹, LI Xin-nan², ZHANG Hong-hong¹, JIN Hao-xin¹

1. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Materia Medica, Nanchang 330006, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Key words: Yuanhu Zhitong Capsule; tetrahydropalmatine; HPLC; uncertainty; method validation

元胡止痛胶囊由延胡索(醋制)和白芷两味中药组成, 具有理气、活血、止痛等功效, 用于行经腹痛、胃痛、肋痛、头痛^[1]。元胡止痛胶囊原标准中有白芷的主要成分欧前胡素的定量测定, 方中延胡索为君药, 现代研究表明, 其主要有效成分为延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丙素等, 其中延胡索乙素的镇痛作用较强^[2]。本课题组曾采用 HPLC 法测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素的量^[3], 发现延胡索乙素受杂峰干扰性强, 影响其定量测定结果的准确性。因此本实验对元胡止痛胶囊样品前处理方法进行系统研究, 采用醋酸乙酯对样品除杂后, 在碱性条件下用乙醚萃取, 延胡索乙素峰分离度较好, 该方法重现性好, 能准确测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素的量, 可用于元胡止痛胶囊的质量控制。

测量不确定度是表征合理地赋予被测量值的分散性, 与测量结果相关联的参数。本实验对所建立的测定方法进行方法学验证的同时, 根据中国实

验室国家认可委员会颁布的《分析测量中不确定度的评定》^[4]并参考中药^[5-6]及化药^[7]定量测定中不确定度评定方法, 对测定结果进行不确定度评定研究, 建立一套合理、完善的元胡止痛胶囊质量评价方法。

1 仪器与材料

岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪 (SPD-M10Avp 检测器、CLASS-VP 软件); 岛津 AUW220D 型十万分之一电子天平; pH-10 型 pH 酸度计 (赛多利斯公司)。

延胡索乙素对照品 (批号 110726-200610) 由中国药品生物制品检定所提供, 流动相所用的试剂为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。元胡止痛胶囊 (批号 081022、081103、081122, 江西荣裕药业集团有限公司); 元胡止痛胶囊 (批号 080501, 安徽省天康药业有限公司); 元胡止痛胶囊 (批号 080301, 四川泰乐制药有限公司提供)。

收稿日期: 2011-07-06

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BAI08B03-05)

作者简介: 魏惠珍 (1965—), 女, 江西南昌人, 副教授, 研究方向为中药复方质量控制。Tel: (0791)7119651 E-mail: weiuihuzhen101@126.com

*通讯作者 饶毅 Tel: (0791)7119609 E-mail: raoyi99@126.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-0.1%磷酸 (三乙胺调 pH 值至 6.0) (36:9:55), 体积流量 1 mL/min, 检测波长 280 nm, 进样量 10 μL, 柱温 25 °C。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取延胡索乙素对照品适量, 加甲醇制成含延胡索乙素 0.1 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取装量差异项下的元胡止痛胶囊内容物约 2 g, 置锥形瓶中, 加甲醇 50 mL, 加热回流 30 min, 滤过, 蒸干, 残渣加 1%盐酸 30 mL 溶解, 并转移至分液漏斗中, 加

醋酸乙酯洗涤 2 次, 每次 20 mL, 分取酸水液, 合并醋酸乙酯层, 醋酸乙酯层用 1%盐酸洗涤 2 次, 每次 20 mL, 合并酸水液, 加 50%氢氧化钠调 pH 至 10~11, 用乙醚振摇提取 5 次, 每次 30 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 以相同的处方比例制得不含延胡索的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制成阴性空白对照溶液。

2.3 系统适应性考察

分别精密吸取上述 3 种溶液各 10 μL, 按上述色谱条件分别测定, 见图 1。结果表明, 阴性样品对测定无干扰。

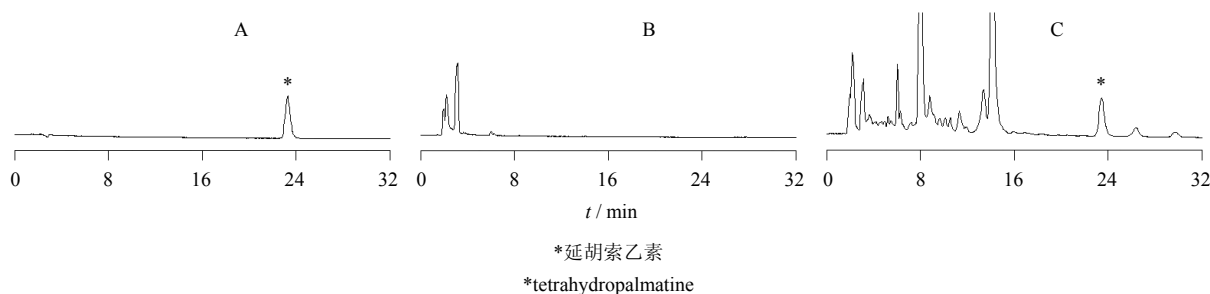


图 1 延胡索乙素对照品 (A)、缺延胡索阴性对照 (B) 和供试品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of tetrahydropalmatine reference substance (A), negative control without *Corydalis Rhizoma* (B), and sample (C)

2.4 线性关系考察

精密吸取延胡索乙素对照品溶液 2、5、8、10、15、20 μL, 按上述色谱条件进行测定, 记录峰面积。以进样量 (X) 对峰面积 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=868\,247X-152$ ($r=0.999\,9$), 结果表明延胡索乙素在 0.192~1.920 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取延胡索乙素对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件进行测定, 记录峰面积, 计算得延胡索乙素峰面积的 RSD 为 0.87%。

2.6 稳定性试验

将批号为 081022 的样品按“2.2.2”项方法制得供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μL, 按上述的色谱条件进行测定, 记录峰面积, 计算得峰面积的 RSD 为 0.86%, 结果表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

2.7 重现性试验

对 3 个批次 (批号 081022、081103、081122)

样品分别进行重现性试验, 每批次按上述供试品溶液的制备方法制备 6 份样品, 按上述色谱条件进行测定, 结果延胡索乙素质量分数的 RSD 分别为 1.21%、0.82%、0.93%。

2.8 加样回收率试验

取批号 081022 的元胡止痛胶囊内容物 1 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 共 6 份, 分别精密量取延胡索乙素对照品溶液 0.5 mL (0.21 mg), 按供试品溶液制备方法制备, 按上述色谱条件进行色谱分析和测定, 计算加样回收率, 平均回收率为 99.63%, RSD 为 1.81%。

2.9 样品测定

按上述色谱条件对不同厂家不同批次元胡止痛胶囊进行测定, 结果见表 1。

3 不确定度评定

3.1 不确定度来源分析

不确定度分量主要来源于测量过程中样品与对照品的质量不确定度、体积引入的不确定度、萃取

表 1 元胡止痛胶囊中延胡索乙素测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of tetrahydropalmatine in Yuanhu Zhitong Capsule ($n=3$)

批号	延胡索乙素 / (mg·g ⁻¹)	扩展不确定度 / (mg·g ⁻¹)
081022	0.215 7	0.008 8
081103	0.317 8	0.013 0
081122	0.181 4	0.007 4
080501	0.385 3	0.015 8
080301	0.393 9	0.016 1

浓缩过程对样品回收率的影响所引入的不确定度、液相测试过程随机效应带来的不确定度。通过方法学验证数据进行不确定度评定, 可以采用评定实验方法精密度的重复性研究数据研究, 将涵盖所有样品制备与检测过程中的随机效应所引入的不确定度进行评定; 通过评定实验方法准确度的回收率实验数据, 可以对仪器操作、样品基质等因素的系统误差所引起的不确定度进行评定。

3.2 量化不确定度分量

3.2.1 实验方法精密度相对标准不确定度 根据实验方法学验证中重复性实验数据, 按照公式 (1) 对测定方法精密度不确定度进行评定。

$$u(P)/P = \left[\sum_{i=1}^k (n_i - 1) \text{RSD}_i^2 / \sum_{i=1}^k (n_i - 1) \right]^{1/2} = 0.010 0 \quad (1)$$

$u(P)/P$ 为相对标准不确定度, RSD_i 为样本 i 的相对标准偏差, n_i 为样本 i 的重复测定次数

3.2.2 实验方法准确度相对标准不确定度 由“2.8”项可知, 实验方法的准确度通过加样回收率试验进行测定, 其回收率不确定度按公式 (2) 评定得出。

$$u(R_m)/R_m = \bar{R}_m \times \{ [s_{\text{obs}}/(n^{1/2} \times \bar{m}_{\text{obs}})]^2 + [u(m_{\text{spike}})/m_{\text{spike}}]^2 \}^{1/2} \quad (2)$$

$u(R_m)/R_m$ 为回收率不确定度, $\bar{R}_m$ 为平均回收率, $s_{\text{obs}}/(n^{1/2} \times \bar{m}_{\text{obs}})$ 为回收率实验测定过程不确定度, 其中 s_{obs} 为对照品实际测得量的方差, $\bar{m}_{\text{obs}}$ 为对照品平均测得量; n 为回收率测定次数, $u(m_{\text{spike}})/m_{\text{spike}}$ 为对照品加入量的相对标准不确定度

回收率标准溶液配制过程使用十万分之一天平精密称量 10.5 mg 并定容于 25 mL 量瓶中, 通过 0.5 mL 刻度移液管移取 0.5 mL 溶液加于样品中, 所引入的不确定度 $u(m_{\text{spike}})/m_{\text{spike}}$ 包括对照品称量 $u(m)$ 、对照品溶液配制 $u(V_1)$ 与对照品溶液的移取 $u(V_2)$ 3 部分所引入的不确定度。

根据天平附带说明, 称量允许误差为 ± 0.1 mg, 对允许误差采用矩形分布计算示值不确定度, 说明

中同时规定称量重现性 (标准偏差) ≤ 0.05 mg, 对标准偏差采用正态分布计算称量重复性不确定度。国家计量检定规程 JJG 196-2006 规定 25 mL 量瓶、0.5 mL 刻度移液管的容量允差分别为 0.30、0.005 mL, 样品稀释过程中校准不确定度以量器允差按三角分布进行计算; 定容重复性不确定度, 采用实验中各规格量器重复吸取各标称容量蒸馏水 6 次, 以重量得出的标准偏差按正态分布计算不确定度。各项目按式 (3) 评定, 结果见表 2。

$$u(X)/X = \left\{ \sum_{i=1}^k [u(X_i)]^2 \right\}^{1/2} = \left\{ \sum_{i=1}^k [s(X_i)/k_i]^2 \right\}^{1/2} \quad (3)$$

因而对照品加入量的相对标准不确定度为

$$u(m_{\text{spike}})/m_{\text{spike}} = \left\{ \sum_{i=1}^n [u(m_i)/m_i]^2 + \sum_{i=1}^n [u(V_i)/V_i]^2 \right\}^{1/2} = 0.016 3。$$

实验方法准确度不确定度 $u(R_m)$ 根据公式 (2) 评定, 结果 $\bar{R}_m = 99.63\%$, $m_{\text{obs}} = 0.209 2$ mg, $s_{\text{obs}} = 0.003 8$ mg, $u(m_{\text{spike}})/m_{\text{spike}} = 0.016 3$, $u(R_m)/R_m = 0.017$ 。

3.3 计算合成不确定度

由上述各不确定度分量合成元胡止痛胶囊中延胡索乙素定量相对标准不确定度为: $U_{\text{cref}}(W) = [U^2(R_m) + U^2(p)]^{1/2} = 0.020 5$ 。

3.4 扩展不确定度及报告不确定度

95%置信概率下取包含因子 $k=2$, 则相对扩展不确定度 $U_{95}(W) = k \times U_{\text{cref}}(W) = 0.041 0 = 4.10\%$ 。

由实验所测批号为 081022 元胡止痛胶囊的延胡索乙素质量分数 $W = 0.215 7$ mg/g, 故其扩展不确定度为: $U_{95} = 0.215 7 \times 0.041 0 = 0.008 8$ mg/g, 其他批次的扩展不确定度见表 1。

4 讨论

延胡索乙素是叔胺类生物碱, 难溶于水而易溶于有机溶剂。本实验根据其性质考察了甲醇、乙醚以及酸水等溶剂对元胡止痛胶囊中延胡索乙素的提取效率, 实验结果表明, 乙醚提取时残渣易结块, 较难提取完全; 采用酸水提取时, 提取液浑浊, 较难滤过; 甲醇提取效果最好。在确定提取溶媒的前提下, 分别对提取方式和提取时间进行考察, 最终确定采用甲醇提取, 加热回流 30 min。

实验中采用甲醇提取的元胡止痛胶囊供试品溶液的色谱峰较多, 延胡索乙素峰受杂峰干扰, 因此需对样品进行纯化处理。本实验对采用二氯甲烷萃取、醋酸乙酯萃取以及通过中性氧化铝小柱的除杂效果进行比较, 结果表明, 样品经过醋酸乙酯萃取

表 2 对照品溶液配制的相对不确定度

Table 2 Relative uncertainty of reference substance solution preparation

项 目	分量	不确定度来源	分布	误差或标准偏差	不确定度 $u(x)/x$
十万分之一天平称量	$u(m_1)$	天平示值	矩形	0.1 mg	0.076 mg
	$u(m_2)$	天平称量重复性	正态	0.05 mg	
25 mL 量瓶	$u(V_{11})$	校准	三角	0.030 mL	0.024 mL
	$u(V_{12})$	定容重复性	正态	0.021 mL	
0.5 mL 刻度移液管	$u(V_{21})$	校准	三角	0.005 mL	0.007 3 mL
	$u(V_{22})$	定容重复性	正态	0.007 mL	

除杂后,在碱性条件下用乙醚萃取得到的供试品溶液能够有效消除杂质干扰,延胡索乙素峰的分离度较好。

本实验以元胡止痛胶囊为研究对象,建立其有效成分延胡索乙素的定量测定方法,根据《中国药典》规定,方法学验证的内容有准确度、精密度等,但这些试验并未对实验具体测定结果的可信度进行量化。本实验根据不确定度理论对方法的重复性及回收率试验进行不确定度评定,并在 95% 的置信区间下,得出本方法所测质量分数结果的扩展不确定度为 $(W \times 4.10\%) \text{ mg/g}$,定量描述实验方法的可信度,可作为元胡止痛胶囊中延胡索乙素定量测定方法学验证的一种补充。

在计算标准不确定度时,公式(3)中的 k 值,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、天平示值误差等,可认为其值在区间内分布概率相同,即按矩形分布($k=3^{1/2}$)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($k=6^{1/2}$)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,如天平称量的重复性、量瓶定容的重复性等引入的不确定度,通常采用实验的标准偏差表示。

目前在分析测试领域中,常采用对每个测定步骤的分析以得出测定结果的不确定度。但由于化学

分析操作复杂,需要附加实验进行 B 类不确定度评定,且其测定过程的 A 类不确定度也难以评定,制约了不确定度评定在分析化学领域的推广。本实验中建立的不确定度评定方法根据实验室内部测定方法学验证的数据进行评定,通过方法学考察的精密度与准确度实验,从整体考察检测方法的不确定度,适合于中药分析中的实际应用。

参考文献

- [1] 徐 征. 元胡止痛胶囊质量标准的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(3): 18-19.
- [2] 李进英, 涂文升, 黄其春, 等. 高效液相色谱法测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素的含量 [J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(8): 659-660.
- [3] 吴立成, 包玮鸳. HPLC 测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素的含量 [J]. 中成药, 2004, 26(11): 960-961.
- [4] 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.
- [5] 魏惠珍, 李新南, 龚建平, 等. 紫外分光光度法测定罗银胶囊中总黄酮含量的不确定度评定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 39-43.
- [6] 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.
- [7] Dabalus I M, Schweikert T M, Cannavan A. Comparison of methods for the estimation of measurement uncertainty for an analytical method for sulphonamides [J]. Food Addit Contam, 2008, 25(12): 1439-1450.