

## 长梗冬青苷标准样品的研制

马玉翠<sup>1</sup>, 王淳<sup>1</sup>, 王尉<sup>2</sup>, 吴翠<sup>1</sup>, 杜宁<sup>2</sup>, 李慧<sup>1</sup>, 巢志茂<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;  
2. 北京市理化分析测试中心, 北京 100094)

**[摘要]** **目的:**依据 GB/T 15000.3-2008《标准样品工作导则(3)标准样品:定值的一般原则和统计方法》,在国家标准化管理委员会批准立项的基础上,研制长梗冬青苷标准样品。**方法:**以冬青科植物铁冬青的干燥树皮为原料,通过大孔树脂吸附技术和高速逆流色谱技术,纯化和制备了长梗冬青苷样品,采用元素分析、紫外光谱、红外光谱、高分辨质谱、核磁共振谱和 X-单晶衍射进行了结构确定,进行了薄层色谱的鉴别,建立了高效液相色谱紫外检测分析技术。样品分装成 600 瓶,每瓶 5 mg,进行了均匀性检验、稳定性检验和 8 家实验室联合定值。**结果:**该样品在 95% 的置信区间范围内均匀性良好,在 0~8 ℃ 条件下 24 个月内稳定性良好,定值结果确定其纯度为 99.60%,扩展不确定度为 0.10%,通过了国家标准化管理委员会组织的验收,达到了国家标准样品的技术要求。**结论:**成功地研制了长梗冬青苷国家标准样品,纯度高于市售对照品,可用于长梗冬青苷的含量测定、检测方法评定和相关产品的检测与质量控制。

**[关键词]** 长梗冬青苷; 标准样品; 均匀性; 稳定性; 定值; 不确定度

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0065-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120065

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1443.074.html>

**[网络出版时间]** 2017-03-24 14:43

## Research and Development of Certified Reference Material of Pedunculoside

MA Yu-cui<sup>1</sup>, WANG Chun<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>2</sup>, WU Cui<sup>1</sup>, DU Ning<sup>2</sup>,

LI Hui<sup>1</sup>, CHAO Zhi-mao<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,  
Beijing 100700, China;

2. Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a certified reference material (CRM) of pedunculoside according to the Directives for *CRM General and Statistical Principle for Certification* (GB/T 15000.3-2008) based on the CRM project approved by Standardization Administration of the People's Republic of China (SAC). **Method:** Pedunculoside samples were obtained by means of macroporous resin enrichment, high speed counter-current chromatography, and recrystallization from the dried bark of *Ilex rotunda*, and their structures were confirmed by element analysis, UV, IR, HR-MS, NMR, and XRD. In addition, thin layer chromatography was carried out for identification, and high performance liquid chromatography ultraviolet detection and analysis technology was established. The pedunculoside samples divided into 600 bottles with 5 mg per bottle for homogeneity test, stability test, and cooperative certification by 8 laboratories. **Result:** The homogeneity of pedunculoside samples was excellent in 95% confidence interval, with good stability within 24 months at 0-8 ℃. The certified purity value of the pedunculoside samples was 99.60% with an expanded uncertainty of 0.10% (k = 2.00). They were approved

**[收稿日期]** 20160822(011)

**[基金项目]** 国家质量监督检验检疫总局行业科研专项(201210209);国家标准化委员会国家标准样品研制项目(S2012087)

**[第一作者]** 马玉翠,在读硕士,从事天然产物国家标准样品的研制,Tel:1590126328,E-mail:872018483@qq.com

**[通讯作者]** \*巢志茂,研究员,博士生导师,从事天然产物国家标准样品的研制,Tel:13522705161,E-mail:chaozhimao@163.com

by the National Standardization Management Committee, and consistent with the technical requirements of the national standard samples. **Conclusion:** National certified reference materials for pedunculoside were successfully studied and developed for the first time, and their purity was higher than that of samples purchased from markets, so this method can be used in the content determination, testing method validation, as well as testing and quality control of pedunculoside products.

[ **Key words** ] pedunculoside; certified reference material; homogeneity; stability; certification; uncertainty

长梗冬青苷为五环三萜的葡萄糖苷,主要存在于冬青科植物铁冬青的叶<sup>[1]</sup>和树皮<sup>[2]</sup>、毛冬青的根<sup>[3]</sup>、冬青和具柄冬青的叶中<sup>[1]</sup>。铁冬青的干燥树皮为中药救必应<sup>[4]</sup>,是岭南地区大量饮用的凉茶的主要组成<sup>[5]</sup>,对多种需氧菌和厌氧菌有较好的抑菌效果,添加于牙膏中可抑制口腔中的多种有害菌,具有抑制牙菌斑、减轻牙龈炎、促进复发性口腔溃疡愈合的显著效果<sup>[6]</sup>,极具开发价值。朱任宏等<sup>[7]</sup>首先从救必应中分离出救必应甙甲和甙乙。长谷纲男等从救必应中分得的苦味物质与救必应甙乙一致,命名为具柄冬青苷<sup>[1]</sup>。2010年版《中国药典》首次收载中药救必应时称该化合物为长梗冬青苷,并作为质量控制的指标性成分<sup>[8]</sup>。长梗冬青苷具有治疗心律失常、心肌缺血、脑缺血等心脑血管疾病的作用<sup>[9]</sup>,对冠心病有治疗作用<sup>[10]</sup>,能降低聚乙二醇诱导的高血脂大鼠血浆中总胆固醇水平<sup>[11]</sup>,可作为救必应药材质量控制的指标性成分<sup>[12]</sup>,用于救必应药材的真伪鉴别<sup>[13]</sup>。

长梗冬青苷,国外市场尚未见有对照品销售。国内市场质量良莠不齐,纯度介于 85% 到 99% 不等,既没有进行严格的定值实验,也没有提供不确定度的数据,均不符合现代测量理论对标准样品的要求,无法保证检测结果的准确性、可比性和可溯源性。为此,国家标准化委员会批准了长梗冬青苷国家标准样品的研制(批号 S2012087)。同时,作为具有紫外末端吸收的标准样品示范性研制,得到了质检总局的行业专项资助(201210209)。笔者参照 ISO Guide 35:2006,按照 GB/T 15000.3 标准样品系列工作导则<sup>[14]</sup>,创新性地研制了长梗冬青苷的国家标准样品。

## 1 材料

TBE-1000A 型高速逆流色谱仪(上海同田生物技术有限公司,包括 TBP50A 泵, TBD-2000 紫外检测器, TC-1050 循环恒温水浴), LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司, SPD-M20A 二极管阵列检测器, SIL-20A 自动进样器, DGU-20A 在线脱气,

CTO-10ASvp 柱温箱和 Shimadzu LC-solution 工作站), AV400 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司), Xcalibur-Eos-GeminiCCD 型单晶衍射仪(美国 Agilent 公司), Xevo G2 Q-TOF 型四极杆飞行时间串联质谱仪(美国 Waters 公司), FTIR-8400s 型红外光谱仪(日本岛津公司), RE-201D 型旋转蒸发器(河南予华仪器有限公司), CP225D 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。

乙腈、甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司),水为重蒸水,其他试剂为分析纯。SP825 型大孔吸附树脂(北京绿百草科技发展有限公司)。

救必应饮片购自广州采芝堂药业有限公司,经广州市药检所刘柏英专家鉴定是冬青科植物铁冬青 *Ilex rotunda* 的干燥树皮,样本存放在本实验室。

## 2 方法与结果

**2.1 样品的制备** 取救必应原料 1.0 kg 中加入 10 倍量 50% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 60 min,得到总苷提取物<sup>[15]</sup>。以 SP825 为填料,采用静态吸附洗脱,乙醇-水(30:70)洗脱出紫丁香苷后,以乙醇-水(60:40)洗脱得到纯度 31% 的长梗冬青苷粗品<sup>[16]</sup>。同时,总苷提取物在高速逆流色谱(HSCCC)仪上,以乙酸乙酯-正丁醇-水(1:6:7)溶剂系统进行分离,获得了少量纯度 97.3% 的长梗冬青苷<sup>[17]</sup>。将通过大孔树脂法和 HSCCC 法获得的长梗冬青苷粗品合并,采用 CH<sub>3</sub>OH 反复重结晶,获得纯度 99% 以上的长梗冬青苷样品,减压干燥,封装于 2 mL 棕色玻璃瓶中,每瓶 5 mg,共 600 瓶。

### 2.2 结构鉴定

**2.2.1 元素分析** 长梗冬青苷的分子式 C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>10</sub>, 元素分析的计算值为 C, 66.44%; H, 8.98%; 实际测定值为 C, 65.27%; H, 9.26%。测定值与分析值基本一致。

**2.2.2 UV 分析** λ<sub>max</sub> 为 210 nm (CH<sub>3</sub>OH), 为末端吸收。

**2.2.3 近红外光谱分析** 解析结果见表 1。

表 1 长梗冬青苷的红外光谱数据

Table 1 IR data of pedunculoside

吸收峰/cm <sup>-1</sup>	强度	基团
3 420	s	-OH
2 932, 1 741	s	-CH <sub>2</sub>
2 877, 1 386	s	-CH <sub>3</sub>
1 734	vs	C=O
1 652	m	C=C
1 074, 1 047	s	C-O-C
650	s	OH...O

表 2 长梗冬青苷的核磁共振数据 (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)

Table 2 NMR data of pedunculoside (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)

位置	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub>	<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY	HMQC (C→H)	HMBC (C→H)
1	38.6	1.87, m, 2.07, m	1.92, 2.07, 1.87, 1.92	1.87, 2.07	1.06
2	28.6	1.92, (2H), m	1.87, 2.07, 4.22	1.92	-
3	74.5	4.22, d, J=6 Hz	1.92	4.22	1.09, 3.73, 4.19
4	43.8	-	-	-	1.09, 4.19, 4.22
5	49.6	1.55, m	1.42, 1.65	1.55	1.06, 1.09, 4.22
6	19.7	1.42, m 1.65, m	1.46, 1.55, 1.65, 1.72 1.42, 1.46, 1.55, 1.72	1.42, 1.65	-
7	34.2	1.46, m 1.72, td, J=11.2, 2.8 Hz	1.42, 1.65, 1.72 1.42, 1.46, 1.65	1.46, 1.72	1.26
8	41.5	-	-	-	1.26, 1.67, 1.94
9	48.8	1.94, m	2.09	1.94	1.06, 1.26
10	38.1	-	-	-	1.06, 1.94
11	25.0	2.09, (2H), m	1.94, 5.59	2.09	-
12	129.4	5.59, s	2.09	5.59	2.96
13	140.2	-	-	-	1.67, 2.96
14	43.0	-	-	-	1.67, 2.96, 5.59
15	30.2	1.24, m 2.50, td, J=13.2, 3.2 Hz	2.02, 2.50, 3.10 1.24, 2.02, 3.10	1.24, 2.50	1.67
16	27.0	2.02, m 3.10, td, J=13.2, 3.2 Hz	1.24, 2.50, 3.10 1.24, 2.02, 2.50	2.02, 3.10	2.96
17	49.6	-	-	-	1.09, 2.96
18	55.4	2.96, s	-	2.96	1.42, 5.17
19	73.6	-	-	-	1.42, 2.96, 5.17
20	43.0	1.38, m	1.08, 2.02	1.38	1.08, 1.42
21	27.6	2.02, (2H), m	1.09, 1.38	2.02	1.08
22	39.8	1.09, m, 1.59, m	1.59, 2.02, 1.09	1.09, 1.59	-
23	69.0	3.73, d, J=10 Hz 4.19, d, J=10 Hz	4.19 3.73	3.72, 4.19	1.09
24	14.0	1.09, s	-	1.09	-
25	17.0	1.06, s	-	1.06	-
26	18.4	1.26, s	-	1.26	-
27	25.5	1.67, s	-	1.67	-
28	177.9	-	-	-	2.96, 6.34
29	27.9	1.42, s	-	1.42	-

2.2.4 MS HRESI-MS (+), [M + Na]<sup>+</sup> m/z 673.392 3 (理论值 673.392 8), 与长梗冬青苷的分子式 C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>10</sub> 符合。

2.2.5 NMR 以 C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N 为溶剂, 检测了<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC 数据, 归属后的数据结果见表 2, 与文献[2, 15-16]数据一致。

2.2.6 X-单晶衍射 (XRD) 甲醇室温中获得 0.24 mm × 0.17 mm × 0.15 mm 无色晶体, 经 XRD 测定认为, 该晶体为单斜晶系, 空间群为 P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, 晶胞参数为 a = 13.046(3), b = 21.038(4), c = 28.413(6) Å,

续表 2

位置	$\delta_c$	$\delta_H$	$^1H-^1H$ COSY	HMQC(C→H)	HMBC(C→H)
30	17.6	1.08, d, $J=5.6$ Hz	1.38	1.08	-
1'	96.8	6.34, d, $J=7.6$ Hz	4.26	6.34	4.26
2'	75.0	4.26, t, $J=8.4$ Hz	4.34, 6.34	4.26	4.34
3'	79.9	4.34, t, $J=8.8$ Hz	4.26, 4.40	4.34	4.26
4'	72.2	4.40, t, $J=8.6$ Hz	4.08, 4.34	4.40	4.34
5'	80.2	4.08, m	4.40, 4.45, 4.50	4.08	-
6'	63.3	4.45, m, 4.50, m	4.08, 4.50, 4.08, 4.45	4.45, 4.50	-
19-OH	-	5.17, s	-	-	-

$V=7\ 798.28(3)\ \text{\AA}^3$ ,  $Z=8$ ,  $D_c=1.109\ \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ,  $M_r=650.82$ ,  $F(000)=2\ 832$ ,  $\mu=0.080\ \text{mm}^{-1}$ , 最终的偏离因子为  $R=0.076\ 5$ ,  $wR=0.173\ 6$ , 是由 1 个吡喃葡萄糖环和 5 个六元环组成, 5 个六元环是以 A/B 反式, B/C 反式和 D/E 顺式连接。一个晶胞不对称单元中含有 2 个长梗冬青苷分子, 通过氢键堆积成二维层状结构<sup>[18]</sup>。结构鉴定见图 1。

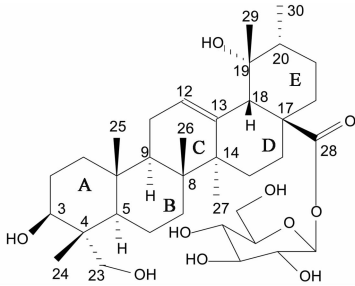


图 1 长梗冬青苷的结构

Fig.1 Structure of pedunculoside

**2.3 色谱条件** 采用迪马 Diamonsil- $C_{18}(2)$  色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈-水 (32:68), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 检测波长 210 nm, 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

**2.4 样品溶液的制备** 精密称取样品 5 mg, 精密加甲醇溶解, 并定容至 5 mL 量瓶中, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得 1 g·L<sup>-1</sup> 的样品溶液。

**2.5 薄层鉴别** 精密称取样品 5 mg, 加 0.25 mL 甲醇溶解摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得 20 g·L<sup>-1</sup> 对照品溶液。以定量毛细管吸取 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g}$  点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-甲酸 (16:4:1), 苯-丙酮-甲醇 (3:1:1), 三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (15:40:22:10) 为展开剂, 分别展开, 取出, 晾干, 喷 10% 香草醛浓硫酸溶液, 105  $^{\circ}\text{C}$  加热至斑点显色清晰。样品溶液在薄层色谱上, 均显示唯一的淡棕色斑点,  $R_f$  值分别为 0.52, 0.57, 0.67, 未见其他杂质的斑点, 说明该样品的纯度较高。

**2.6 均匀性检验** 按照标准样品工作导则<sup>[14]</sup> 第 7 章均匀性研究的要求进行。确定抽样数目 15 个, 按

3 种程序分别从每瓶中称取 1.0 mg 样品 3 份, 每份样品加色谱甲醇溶解, 并定容至 5 mL 量瓶中, 进行 HPLC 分析。第一次抽样 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 号瓶; 第二次抽样 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 号瓶; 第三次抽样 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15。按照 2.3 项下色谱条件对每个样品重复测定 3 次, 用峰面积归一化法计算纯度, 然后用方差分析法进行均匀性检验。结果见表 3, 4。

表 3 长梗冬青苷标准样品的均匀性检验

瓶号	第 1 份	第 2 份	第 3 份	平均值	总平均值
1	99.56	99.69	99.64	99.63	
2	99.58	99.66	99.62	99.62	
3	99.61	99.54	99.51	99.55	
4	99.54	99.67	99.57	99.59	
5	99.69	99.57	99.67	99.64	
6	99.64	99.55	99.59	99.59	
7	99.50	99.63	99.64	99.59	
8	99.58	99.67	99.66	99.64	99.60
9	99.55	99.65	99.57	99.59	
10	99.50	99.54	99.59	99.54	
11	99.61	99.55	99.50	99.55	
12	99.51	99.62	99.50	99.54	
13	99.57	99.59	99.68	99.61	
14	99.60	99.63	99.54	99.59	
15	99.66	99.61	99.65	99.64	

表 4 长梗冬青苷样品均匀性检验的方差分析

变差源	SS	自由度	MS
瓶间	0.051 51	14	0.003 679
瓶内	0.092 80	30	0.003 093
总和	0.144 3	44	

从表 4 可见, 以  $v_1$  (即组间) = 14 及  $v_2$  (即组内) = 30 查  $F$  界值表, 得  $F_{0.05}(14, 30) = 2.037$ , 由于  $F = MS_{\text{间}}/MS_{\text{内}} = 1.189 < F_{0.05}(14, 30)$ , 说明在 95% 置信区间, 长梗冬青苷标准样品的均匀性良好。

瓶间方差用下式计算:

$$s_A^2 = \frac{MS_{\text{间}} - MS_{\text{内}}}{n_0} = 0.000\ 195\ 3$$

瓶间标准偏差  $u_{\text{bb}} = s_{\text{bb}}$ :

$$s_{\text{bb}} = \sqrt{0.000\ 195\ 3} = 0.01\%$$

**2.7 稳定性检验** 标准样品的稳定性是用来描述标准样品的特性值随时间的变化。取本标准样品模拟市售包装,进行 0~8℃ 的条件下放置 24 个月的稳定性检验,分别于 0,1,2,3,6,9,12,18,24 个月时取 3 个样品,按照 2.3 项下色谱条件,每份样品连续进样 2 次,用峰面积归一化法求出纯度。结果见表 5。

表 5 长梗冬青苷样品纯度稳定性检验

时间/月	样品 1	样品 2	样品 3	平均值	标准偏差
0	99.63	99.59	99.61	99.61	0.02
1	99.62	99.59	99.62	99.61	0.03
2	99.64	99.73	99.69	99.69	0.05
3	99.62	99.62	99.63	99.62	0.04
6	99.52	99.57	99.59	99.56	0.04
9	99.53	99.54	99.52	99.53	0.01
12	99.62	99.59	99.63	99.61	0.02
18	99.62	99.63	99.58	99.61	0.03
24	99.64	99.64	99.63	99.64	0.01

注:性状均为白色粉末。

从表 5 看出,每次测得的平均值在测定时间内没有随时间的变化而明显的升高或降低,同时根据标准样品工作导则<sup>[14]</sup>的要求,笔者以直线模型作为经验模型,采用  $t$  检验和  $F$  检验对稳定性试验获得的数据进行分析。

$t$  检验中斜率由以下公式计算:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{0.08}{550} = 0.000\ 145\%$$

$X_i$  为每次检测时间/月,  $Y_i$  为次检测纯度/%,  $\bar{X}$  为每次检测时间总和/间隔检测次数,  $\bar{Y}$  为检测纯度结果的平均值。式中  $\bar{Y} = 99.61\%$ ,  $\bar{X} = 8.33$ 。截距由下式计算:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1\bar{X} = 99.61\%$$

直线上的点的标准偏差可由下式计算:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1X_i)^2}{n - 2} = \frac{0.014\ 88}{7} = 0.002\ 13$$

取其平方根  $s = 0.046\ 105\%$ , 与斜率相关的不确定度用下式计算:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = \frac{0.046\ 105}{\sqrt{550}} = 0.001\ 966\%$$

自由度为  $n - 2$  和  $P = 0.95$  (95% 置信水平) 的  $t$  因子等于 2.37。由于  $|b_1| = 0.000\ 145\% < t_{0.95, n-2} \times s(b_1) = 0.005\%$ , 故斜率是不显著的, 未观测到不稳定性。

$F$  检验: 该标准样品稳定性检验数据 (0~24 个月) 经线性拟合, 结果见表 6。

表 6 线性回归的方差分析

Table 6 Variance analysis of linear regression

差异来源	平方和	自由度	均方	$F$	$P$
回归分析	0.000 012	1	0.000 012	0.005 032	0.945 4
残差	0.016 188	7	0.002 313		
总计	0.016 2	8			

对线性回归进行方差分析, 从表 6 数据可以看到, 在测定时间内 (24 个月) 直线回归方程的拟合度较好。经直线回归的方差分析得到  $F = 0.005\ 032$ , 小于方差分析临界值  $F_{0.05(1,7)} = 5.59$ 。所以可以确定该标准样品在 0~8℃ 的条件下, 在 24 个月内是稳定的。

稳定性检验的稳定性不确定度贡献:  $u_{\text{ls}} = s(b_1) \times t = 0.001\ 966\% \times 24 = 0.05\%$ , 表明长梗冬青苷在 0~8℃ 的条件下保存两年仍稳定。

**2.8 定值分析** 按照标准样品工作导则<sup>[14]</sup>的规定, 采用多个实验室协作定值, 选择获得国家或者部门认可、具备资质的 8 家实验室进行定值。随机抽取 16 瓶样品, 每个实验室送 2 瓶, 按照 2.3 项下色谱条件, 每瓶重复测定 3 次, 应用峰面积归一化法进行定量。结果见表 7。

表 7 8 家实验室 6 次数据汇总

Table 7 Eight laboratories certification data collection %

实验室	1	2	3	4	5	6	平均值	标准偏差
1	99.51	99.51	99.51	99.52	99.53	99.52	99.52	0.01
2	99.57	99.60	99.68	99.65	99.60	99.61	99.62	0.04
3	99.40	99.46	99.66	99.55	99.21	99.63	99.49	0.17
4	99.66	99.53	99.57	99.66	99.68	99.70	99.63	0.07
5	99.65	99.67	99.63	99.66	99.64	99.66	99.65	0.01
6	99.66	99.56	99.55	99.69	99.67	99.62	99.63	0.06
7	99.65	99.60	99.70	99.62	99.59	99.62	99.63	0.04
8	99.66	99.63	99.67	99.65	99.64	99.65	99.65	0.01

对表 7 中每家检测单位的数据按大小顺序排列, 采用格拉布斯 (Grubb's) 检验法进行检验, 未发现异常值, 测定结果呈正态分布, 所得数据符合标准样品工作导则<sup>[14]</sup>中统计计算的要求。采用峰度法检验各家实验室数据的正态性, 没有检出异常值。然后再用格拉布斯 (Grubb's) 法对每家实验室的平均值进行检验, 将其看成一组测定值进行异常值检

验,结果无异常值,因此将各家实验室的数据作为无偏估计值。对表 7 的数据进行方差分析,结果见表 8。计算加权平均值作为该标准样品的定值结果,总平均值为  $\bar{x} = 99.60\%$ 。

表 8 定值数据的方差分析

Table 8 Analysis of variance of certification data

变源差	SS	自由度	MS
瓶间	0.169 8	7	0.024 26
组内	0.197 7	40	0.004 943
总和	0.367 5	47	

**2.9 定值分析的不确定度评定** 根据标准样品工作导则<sup>[14]</sup>的规定,定值结果由标准值和不确定度组成。标准样品特性标准值的测量不确定度  $u_{CRM}$  由测定得到的标准值的不确定度  $u(\bar{x})$ ,均匀性检验的不确定度  $u_{bb}$ 和稳定性检验的不确定度  $u_{ls}$ 组成。根据全部测定结果,计算长梗冬青苷标准样品的特性标准值  $s(\bar{x})$ (总平均值的标准偏差)为  $0.09\%$ ,  $s_r$ (实验室内重复性标准偏差)为  $0.07\%$ ,  $s_L$ (实验室间再现性标准偏差)为  $0.06\%$ ,  $u(\bar{x})$ (总平均值的不确定度)为  $0.02\%$ 。

### 3 结论

按照加权法计算得到标准样品定值结果的不确定度  $u(\bar{x}) = 0.02\%$ 。均匀性检验引入的不确定度为瓶间标准偏差  $u_{bb} = 0.01\%$ 。稳定性检验计算得到的不确定度  $u_{ls} = 0.01\%$ 。

取包含因子  $k = 2$ ,则该标准样品特性值的扩展不确定度:

$$u_{CRM} = k \sqrt{u(\bar{x})^2 + u_{bb}^2 + u_{ls}^2}$$

$$= 2 \sqrt{(0.02)^2 + (0.01)^2 + (0.05)^2} = 0.10\%$$

这样,长梗冬青苷标准样品的纯度为  $99.60\%$ ,扩展不确定度为  $0.10\%$ 。

### 4 结语

本研究按照标准样品工作导则<sup>[14]</sup>的要求,对其进行了均匀性检验、稳定性检验及定值分析,获得了定值结果和扩展不确定度分别为  $99.60\%$  和  $0.10\%$  的国家标准样品,并通过了专业工作组的专家验收。该标准样品可用于长梗冬青苷含量测定、检测方法评定、相关产品的检测与质量控制,对救必应相关制剂等方面的检测、科学研究和产品开发提供了技术支撑和量值溯源保证。为具有末端吸收的天然产物研制成国家标准样品起到了示范性效果,填补了国内外长梗冬青苷标准样品的空白。

#### [参考文献]

[1] 長谷綱男,萩井英彦,石津美智子,など. ナナミノ

キソ ヨゴ および クログネモチの苦味成分[J]. 日本化学会誌, 1973(4):778-785.

[2] 文东旭,陈仲良. 救必应化学成分研究(1)[J]. 中草药, 1991, 22(6):246-248.

[3] 赵钟祥,金晶,林朝展,等. 毛冬青根中三萜类成分的研究[J]. 中国药师, 2011, 14(5):599-601.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:312.

[5] 刘莉,刘强. 一种消暑利湿的凉茶及其制备方法:中国,201010506323.X[P]. 2011-04-06.

[6] 徐春生,徐文霞. 救必应中药牙膏的功效试验[J]. 口腔护理用品工业, 2016(1):13-16.

[7] 朱任宏,洪海山,王友海. 中药救必应中的配糖体[J]. 化学学报, 1956, 14(2):128-133.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:293.

[9] 李超生,潘书洋. 具柄冬青苷在制备用于治疗脑缺血的药物中的应用:中国,201010518605.1[P]. 2006-09-19.

[10] 李超生,潘书洋. 具柄冬青苷在制备用于治疗冠心病的药物中的应用:中国,201010518602.8[P]. 2006-09-19.

[11] Farhoodniay J M A, Gupta M, Manickama M, et al. Hypolipidemic activity of pedunculoside, a constituent of *Ilex doniana*[J]. Pharm Biol, 1999, 37(1):37-41.

[12] 李超生,张婷,李林国,等. 高效液相色谱法测定救必应药材中具柄冬青苷的含量[J]. 特产研究, 2007, 29(4):45-47.

[13] 欧阳燕琴,严萍,陈卓俊,等. 救必应商品药材的质量评价[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(6):1075-1081,1152.

[14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3)标准样品定值的一般原则和统计方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[15] 王淳,巢志茂,吴晓毅,等. 救必应中总苷类物质提取技术研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(12):61-63.

[16] WANG C, CHAO Z M, WU X Y, et al. Enrichment and purification of pedunculoside and syringin from the barks of *Ilex rotunda* with macroporous resins [J]. J Liq Chromatogr R T, 2014, 37(4):572-587.

[17] WANG C, CHAO Z M, SUN W, et al. Isolation of five glycosides from the barks of *Ilex rotunda* by high-speed counter-current chromatography [J]. J Liq Chromatogr R T, 2014, 37(16):2363-2376.

[18] WANG C, CHAO Z M, WU X Y, et al. Extraction and crystal structure of pedunculoside [J]. Chin J Stru Chem, 2012, 31(12):1729-1735.

[责任编辑 顾雪竹]