

HPLC 测定桉叶止咳糖浆中盐酸麻黄碱的不确定度评价

寇光, 刘玲^{1*}, 陶松², 汤韶明¹, 甘晓云¹, 饶毅³

(1. 江西省人民医院药剂科, 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院药剂科, 南昌 330006;
3. 江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 评价桉叶止咳糖浆中盐酸麻 + 黄碱的 HPLC 测定结果不确定度。方法: 采用 HPLC 测定桉叶止咳糖浆中盐酸麻黄碱含量, 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定, 计算合成不确定度, 确定测量结果在 95% 置信区间下的扩展不确定度。结果: 采用该方法测定桉叶止咳糖浆中盐酸麻黄碱含量的扩展不确定度 2.41%。结论: 该方法适用于 HPLC 测定中药有效成分含量的不确定度分析, 使测定结果更加可靠。

[关键词] 桉叶止咳糖浆; 盐酸麻黄碱; HPLC; 测量不确定度; 方法学验证

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0041-04

[doi] 10.11653/syfyj2013170041

Evaluation of Uncertainty for Determination of Ephedrine Hydrochloride in Anye Zhike Syrup by HPLC

KOU Guang¹, LIU Ling^{1*}, TAO Song², TANG Shao-ming¹, GAN xiao-yun¹, RAO Yi³

(1. Department of Pharmacy, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, China;
2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China;
3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for uncertainty analysis of ephedrine hydrochloride in Anye Zhike syrup. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of ephedrine hydrochloride. According to data from verification method, each component of uncertainty was evaluated, from which the combined uncertainty and finally the extended uncertainty were obtained in 95% confidence intervals. **Result:** Expanded standard uncertainty of this HPLC for determining the content of ephedrine hydrochloride in Anye Zhike syrup was 2.41%. **Conclusion:** This established mathematic model was reasonable and reliable, which was applicable to uncertainty analysis of HPLC for determining active ingredients of traditional Chinese medicine.

[Key words] Anye Zhike syrup; ephedrine hydrochloride; HPLC; measurement of uncertainty; method validation

桉叶止咳糖浆为我院自制制剂, 由桉叶、黄芩、枇杷叶、百部、桔梗、麻黄等 6 味药材煎制而成^[1], 具有疏风清热、宣肺化痰、止咳平喘之功效, 临床疗效确切。桉叶疏风清热解表, 黄芩清泻肺热、表里同

治, 枇杷叶、桔梗宣通肺气、化痰, 百部温润肺气、止咳, 佐以麻黄, 助解表平喘之功。

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^[2]。由于结果测量定量表征是通过测量不确定度进行的, 中国合格评定认可委员会(CNAL)对实验室认可时均需开展对测量不确定度的评定^[3]。本实验在对建立的测定方法进行方法学验证的同时, 对桉叶止咳糖浆中盐酸麻黄碱的测定结果进行不确定度评定^[4-7], 拟建立一套合理、完善的桉叶止咳糖浆的质量评价方法,

[收稿日期] 20130408(113)

[基金项目] 江西省卫生厅中医药科研基金项目(2007A056)

[第一作者] 寇光, 本科, 副主任药师, 从事医院药学研究, Tel: 0791-86895686, E-mail: k13907085886@126.com

[通讯作者] * 刘玲, 硕士, 药师, 从事药物质量控制方法研究, Tel: 0791-86895691, E-mail: liuling909@126.com

为该制剂的质量检验和评估提供依据。

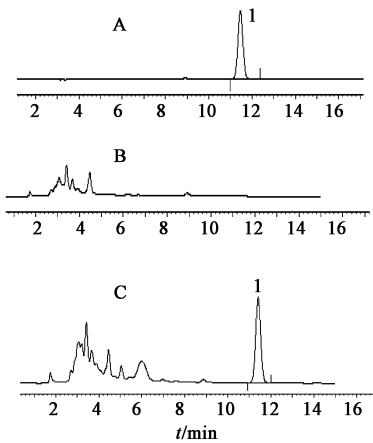
1 材料

LC-2010AHT 型高效液相色谱仪(日本岛津), Satorius BP 211D 型 1/10 万电子天平(上海精密仪器有限公司), SPD-20A 型紫外-可见检测器(天津市科器高新技术公司)。

桉叶止咳糖浆(自制,批号 120422, 120513, 120522), 盐酸麻黄碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0714-9903), 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 磷酸溶液(含 0.1% 三乙胺)-乙腈(97:3), 检测波长 205 nm, 进样量 10 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温室温, 进样量 10 μL, 见图 1。



A. 对照品; B. 缺麻黄阴性样品; C. 供试品; 1. 盐酸麻黄碱

图 1 桉叶止咳糖浆 HPLC

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 精密量取桉叶止咳糖浆样品 10 mL, 分别加水、浓氨试液 10, 3 mL, 用乙醚振摇提取 4 次(每次 30, 30, 20, 20 mL) 和 5 次提取(每次 30, 30, 20, 20, 20 mL), 合并乙醚液后加入盐酸乙醇溶液(1→20) 2 mL, 混匀, 低温回收溶剂至干, 残渣加乙醇 5 mL 使溶解, 转移至 100 mL 量瓶中, 加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 对照品溶液 取盐酸麻黄碱对照品约 12.61 mg, 精密称定, 置于 250 mL 量瓶中, 加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度 50 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 采用相同处方比例制得不含麻黄的阴性样品, 按 2.2.1 项下方法制成阴性空白对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别吸取麻黄碱对照品溶液 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 μL 进样, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程 $Y = 2\,337.977X + 9.494$ ($R^2 = 1.000\,0$), 表明盐酸麻黄碱在 0.151 3 ~ 2.071 6 μg 与峰面积呈良好线性相关性。

2.3.2 精密度试验 精密吸取同一盐酸麻黄碱对照品溶液, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定, 结果峰面积的 RSD 0.52%, 表明仪器精密度较好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于制备后于 0, 3, 6, 9, 12 h 各进样 10 μL, 按上述色谱条件测定, 结果峰面积的 RSD 0.83%, 表明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取 3 个批次样品, 每批次样品按 2.2.1 项下方法制备 6 份供试品溶液, 测定, 结果盐酸麻黄碱含量的 RSD ≤ 1.28%, 表明该方法重复性较好。

2.3.5 加样回收率试验 精密量取供试品 6 份(盐酸麻黄碱 0.493 6 g·L⁻¹), 每份 5.0 mL, 置于分液漏斗中, 加入 0.490 g·L⁻¹ 的盐酸麻黄碱对照品溶液 5.0 mL, 按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液, 测定盐酸麻黄碱含量, 计算回收率, 结果平均回收率 99.43%, RSD 1.10%。

2.4 不确定度的评定

2.4.1 不确定度的来源分析 主要来源为测量过程中对照品和样品的体积引入不确定度、质量不确定度、进行萃取浓缩过程时对样品回收率影响所导致的不确定度及 HPLC 测试过程中随机效应所带来的不确定度。采用重复性研究数据及实验准确度的回收率试验数据, 将涵盖所有样品制备与检测过程中随机效应及仪器操作、样品基质等因素系统误差所引起的不确定度进行评定。

2.4.2 不确定度分量量化

2.4.2.1 试验方法精密度的相对标准不确定度测定 根据试验方法学对重复性试验数据进行验证, 采用公式(1)对测定方法中精密度不确定度评定。

$$u(P)/P = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (n_i - 1) RSD_i^2}{\sum_{i=1}^k (n_i - 1)}} = 0.010\,3 \quad (1)$$

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

2.4.2.2 试验方法准确度相对标准的不确定度测定 [$u(R_m)/R_m$] 试验方法准确度是通过加样回收率试验测定的, 回收率不确定度按照公式(2)评定。

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

式中 \bar{m}_{obs} 为对照品平均测得量, \bar{R}_m 为平均回收率, $s_{obs}/(\sqrt{n}/\bar{m}_{obs})$ 为回收率试验测定过程不确定度, n 为回收率测定次数, s_{obs} 为对照品含量实际测得量的方差, $u(m_{spike})/m_{spike}$ 为对照品加入量的相对标准不确定度。

回收率试验中对照品溶液的配制是采用 1/10 万电子天平精密称量对照品 24.50 mg 定容于 50 mL 量瓶中, 采用 5 mL 刻度的移液管对 5.0 mL 溶液进行移取, 加至样品溶液中, 所有引入的不确定度 $u(m_{spike})/m_{spike}$ 包括对照品溶液配制 $u(V_1)$ 、对照品

称量 $u(m)$ 及对照品溶液移取 $u(V_2)$ 共三部分所引入的不确定度。

电子天平称量允许的误差为 ± 0.1 mg, 对允许误差用矩形分布计算示值的不确定度, 对标准偏差采用正态分布的计算称量重复性不确定度。国家计量检定规程规定的 5 mL 单标移液管、50 mL 量瓶的容量允许误差分别为 0.015, 0.05 mL, 样品稀释过程中校准不确定度及量器允差按三角分布计算, 采用试验中各规格量器重复吸取各标称容量蒸馏水共 6 次, 以质量所得出的标准偏差, 按正态分布计算其不确定度, 对照品溶液配制的相对不确定度评定结果见表 1。

表 1 桉叶止咳糖浆中麻黄碱的 HPLC 测定时对照品溶液配制的相对不确定度

项目	分量	不确定度来源	分布	误差或标准偏差	不确定度 $u(x)/x$
1/10 万电子天平称量	$u(m_1)$	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	
50 mL 量瓶	$u(V_{11})$	校准	三角	0.050 mL	0.056 mL
	$u(V_{12})$	定容重复性	正态	0.052 mL	
5 mL 刻度移液管	$u(V_{21})$	校准	三角	0.015 mL	0.017 1 mL
	$u(V_{22})$	定容重复性	正态	0.016 mL	

计算对照品加入量的相对标准不确定度

$$\frac{u(m_{spike})}{m_{spike}} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left[\frac{u(m_i)}{m_i} \right]^2 + \sum_{i=1}^n \left[\frac{u(V_i)}{V_i} \right]^2} =$$

0.004 8。试验方法准确度不确定度 $u(Rm)$ 根据公式 2 评定, 结果 $\bar{R}_m = 99.43\%$, $m_{obs} = 2.436 0$ mg, $s_{obs} = 0.024 5$ mg, $u(m_{spike})/m_{spike} = 0.004 8$, $u(Rm) = 0.006 3$ 。

2.4.3 合成不确定度的计算 由上述各不确定度分量合成桉叶止咳糖浆中盐酸麻黄碱含量相对标准不确定度为 $U_{rel}(W) = \sqrt{U^2(Rm) + U^2(p)} = \sqrt{0.006 3^2 + 0.004 8^2} = 0.012 1$ 。95% 置信概率下取包含因子 $k = 2$, 则相对扩展不确定度 $U_{95}(W) = k \times U_{rel}(W) = 2 \times 0.012 1 = 2.41\%$ 。测得批号 120422 的桉叶止咳糖浆中盐酸麻黄碱质量浓度 $0.494 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 故其扩展不确定度 (U_{95}) = $0.494 3 \times 0.024 1 = 0.011 9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 批号 120513, 120522 的扩展不确定度分别为 0.011 8, 0.009 6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

选取桉叶止咳糖浆为研究对象, 建立其有效成分盐酸麻黄碱的含量测定方法, 根据不确定度理论对回收率试验及方法重复性不确定度评定, 并于

95% 可信空间下得出该法测定含量结果扩展的不确定度为 $(W \times 2.41\%) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对试验方法可信度行定量描述, 可作为桉叶止咳糖浆中测定盐酸麻黄碱含量方法学验证的补充。

在药物分析检测评定不确定度时, 应尽可能地分析产生不确定度的所有可能来源^[8-10]。目前, 分析测试领域中多采用对每个测定步骤进行分析, 从而得出对测定结果的不确定度。但由于化学分析操作相对较复杂, 需附加试验后再进行 B 类不确定度的评定, 而且其测定过程中对 A 类不确定度也较难评定, 本实验通过实验室内方法学验证法 (Validation-based 法) 的数据进行评定, 通过采用方法学考察的准确度与精密度试验, 整体考察检测方法的不确定度, 为实际生产中药物分析提供参考。

[参考文献]

- [1] 刘向荣, 汤韶明. 桉叶止咳糖浆的质量标准研究[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11): 1915.
- [2] 饶毅, 夏川, 周海滨, 等. 高效液相色谱法测定白芍总苷的不确定度分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 89.
- [3] General requirements for the competence of calibration and testing laboratories[S]. Geneva, ISO/IEC 17025, 2005:9.

槟榔炒制过程中不同炮制品的指纹图谱分析

何晓燕,刘玉杰,黄永亮,吴纯洁*

(成都中医药大学药学院,成都 611137)

[摘要] 目的:建立槟榔不同炮制品的 HPLC 指纹图谱。方法:采用 HPLC,Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水梯度洗脱,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 283 nm。建立槟榔不同炮制品的 HPLC 指纹图谱。结果:HPLC 指纹图谱方法学考察中 RSD 均 < 1.5%,符合相关规定。各炮制品的共有峰有 10 个,在生槟榔至槟榔炭的过程中发现新增了 3 个成分峰,从生品到焦品 3 个成分含量逐渐增加,焦品达峰值,之后逐渐减少,炒制过程中槟榔其他成分均随炒制时间延长而逐渐降低。结论:槟榔炒制过程中指纹图谱的变化可在一定程度上揭示其物质基础的变化,为解释槟榔炮制原理提供参考。

[关键词] 槟榔;炒制;炮制品;高效液相色谱;指纹图谱

[中图分类号] R283.3,R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0044-03

[doi] 10.11653/syfy2013170044

Fingerprint Analysis of Different Processed Products of Arecae Semen in Frying Process

HE Xiao-yan, LIU Yu-jie, HUANG Yong-liang, WU Chun-jie*

(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint for different processed products of Arecae Semen. **Method:** HPLC was adopted, Chromatographic conditions were performed on Agilent TC-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), acetonitrile-water as mobile phases in gradient elution, detection wavelength of 283 nm and column temperature at 30 ℃, flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. HPLC fingerprint for different processed products of Arecae Semen was established. **Result:** RSD of methodological study in HPLC fingerprint were less than 1.5%.

[收稿日期] 20130114(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973942)

[第一作者] 何晓燕,博士,从事中药炮制与制剂研究,Tel:028-61801001,E-mail:yan124208@126.com

[通讯作者] *吴纯洁,博士,教授,从事中药炮制与制剂研究,Tel:028-61801001,E-mail:wcyj-one@263.net

- [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,2002:11.
- [5] 王惠娟,王力,刘艳新. 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[J]. 中草药,2011, 42(7):1326.
- [6] 周燕,金佩芬,薛磊冰. HPLC 法测定双黄连胶囊中黄芩苷含量不确定度评定[J]. 中国药师,2011, 14(2):221.
- [7] 陈华,马仕洪,张河战. 高效液相色谱法测定伪麻黄碱含量的不确定度分析[J]. 药物分析杂志,2005, 25(2):201.
- [8] 刘福艳,李军,谢元超,等. 中成药中非法添加化学药品的现状与分析检测对策[J]. 中国药事,2008, 22(12):1067.
- [9] 陶松,刘旭海,刘玲,等. HPLC 测定补肾口服液中淫羊藿苷的不确定度分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(13):111.
- [10] 严蓓,杨晨,李扬,等. HPLC 法测定人血浆中奥硝唑浓度的不确定度评定[J]. 药物分析杂志,2011, 31(9):1797.

[责任编辑 全燕]