

## 双波长 HPLC 测定双黄连口服液中 3 种成分的不确定度分析

方海红<sup>1\*</sup>, 陈振华<sup>1</sup>, 吴杰连<sup>1</sup>, 魏惠珍<sup>2</sup>, 饶毅<sup>2</sup>

(1. 江西科技师范大学药学院, 南昌 330013;  
2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

**[摘要]** **目的:**建立双波长高效液相色谱法同时测定双黄连口服液中绿原酸、连翘苷和黄芩苷的不确定度评定方法。**方法:**根据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059-1999)中有关规定,分析影响含量测定结果不确定度的因素来源,对各个不确定度因素进行评定,并计算合成不确定度,最终给出测量结果的扩展不确定度和报告不确定度。**结果:**不确定度评估为绿原酸 $\pm 2.23\%$ ,连翘苷 $\pm 9.18\%$ ,黄芩苷 $\pm 0.84\%$ 。**结论:**对照品质量的不确定度是双黄连口服液中3种成分测量不确定度的主要来源。

**[关键词]** 双波长高效液相色谱法; 双黄连口服液; 绿原酸; 连翘苷; 黄芩苷; 测量不确定度

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0104-05

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1745.035.html>

**[网络出版时间]** 2012-07-04 17:45

## Uncertainty Analysis for Three Components in Shuanghuanglian Oral Liquid by Dual-wavelength HPLC

FANG Hai-hong<sup>1\*</sup>, CHEN Zhen-hua<sup>1</sup>, WU Jie-lian<sup>1</sup>, WEI Hui-zhen<sup>2</sup>, RAO Yi<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacology, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China;

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

**[Abstract]** **Objective:** To establish a dual-wavelength high performance liquid chromatography method for uncertainty analysis of chlorogenic acid, forsythin and aicalin in Shuanghuanglian Oral Liquid. **Method:** According to the technical requirements of JJF 1059—1999 (Evaluation and expression of uncertainty in measurement), each active component of uncertainty was calculated the variable parameters among the procedures. The combined uncertainty and extended uncertainty and reported uncertainty were finally obtained by synthesized the uncertainties of various component variables. **Result:** Uncertainty evaluation for chlorogenic acid was  $\pm 2.23\%$ , forsythin was  $\pm 9.18\%$  and aicalin  $\pm 0.84\%$ . **Conclusion:** The uncertainty of the reference standard quality was the main source of three components measurement uncertainty in Shuanghuanglian Oral Liquid.

**[Key words]** dual-wavelength HPLC; shuanghuanglian oral liquid; chlorogenic acid; forsythin; aicalin; measurement uncertainty

双黄连口服液由金银花、黄芩及连翘三味中药提取精制而成,具有清热解毒、疏风解表的功效,用

于外感风热所致的感冒、上呼吸道感染、轻型肺炎、扁桃体炎等<sup>[1]</sup>。测量不确定度是评价定量方法的

**[收稿日期]** 20120215(013)

**[基金项目]** 江西科技师范大学科研项目(KY2009ZZ04)

**[通讯作者]** \*方海红,讲师,硕士,从事中药质量控制研究,Tel:0791-83802393,E-mail:fanghh2006@126.com

可靠性与测量结果的可信程度的内容之一,其重要性已得到广泛认可,测量不确定度的评定在环境分析、食品检验、药物分析等领域得到深入的研究和广泛的应用<sup>[2-6]</sup>。

本文根据国家质量技术监督局批准发布的 JJF1059-1999 计量技术规范《测量不确定度评定与表示》<sup>[7]</sup>,对双波长高效液相色谱法测定双黄连口服液中绿原酸、连翘苷和黄芩苷等 3 种指标成分含量的测量不确定度进行了评定,分析含量测定不确定度大小及主要影响因素。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, XS205 型电子天平(梅特勒-托利多公司)。

绿原酸(批号 110753-200413)、连翘苷(批号 110821-200711)、黄芩苷(批号 110715-201016)均购于中国药品生物制品检定所,双黄连口服液(哈药集团三精制药股份有限公司,批号 10092952, 11072017,规格每支 10 mL,黑龙江瑞格制药有限公司,批号 091203,101004,110107,规格每支 10 mL),甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX XDB C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~35 min, 10%~65% A),检测波长 0~16 min, 324 nm, 16~35 min, 280 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。在上述色谱条件下,3 种待测组分与邻近组分达到了基线分离,各对照品的理论塔板数均 > 3 000。

**2.2 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取绿原酸、连翘苷和黄芩苷对照品 4.65, 1.1, 16.4 mg 至 10 mL 量瓶,加 50% 甲醇溶解并定容至刻度,制成各对

照品储备液;精密吸取各储备液 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释并定容至刻度,制成质量浓度为 0.093, 0.022, 0.328 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密吸取本品 2 mL 置于 50 mL 量瓶中,加 50% 甲醇适量,超声处理 5 min,放置至室温,加 50% 甲醇稀释至刻度,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.4 测定** 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,利用外标法计算含量。

## 3 数学模型

双黄连口服液中绿原酸、连翘苷和黄芩苷 3 种指标性成分含量计算公式:

$$X = \frac{A}{A_s} \times C_s \times D \quad (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$$

式中  $X$  为样品中各成分的含量( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $A, A_s$  为供试品液、混合对照品溶液中各成分的色谱峰峰面积响应值;  $C_s$  为混合对照品溶液中各成分质量浓度( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $D$  为样品溶液的稀释倍数。

## 4 不确定度来源的识别及分析

**4.1 不确定度的来源** 从检测过程和数学模型分析,样品中 3 种成分含量的相对标准不确定度  $U_{\text{rel}}$  来源,主要包括①对照品溶液浓度的相对标准不确定度  $U_{\text{rel}}(C_s)$ ,②供试品溶液配制过程引入相对标准不确定度  $U_{\text{rel}}(V)$ ,③HPLC 测定峰面积相应值的相对标准不确定度  $U_{\text{rel}}(A)$ 、 $U_{\text{rel}}(A_s)$ 。

$$\text{即: } U_{\text{rel}} = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(A) + U_{\text{rel}}^2(A_s) + U_{\text{rel}}^2(C_s) + U_{\text{rel}}^2(V)}$$

各相对不确定度分量及其影响因素构成见图 1。

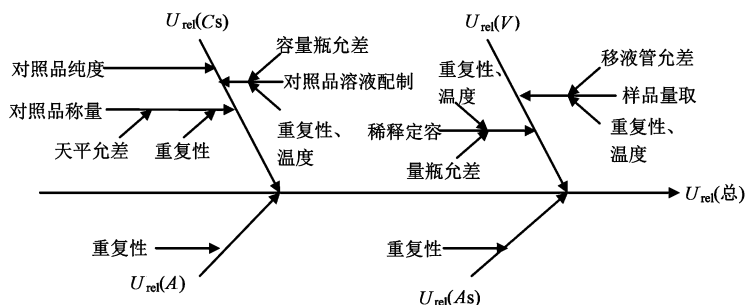


图 1 不确定度影响因素构成图

**4.2 对照品溶液浓度的相对标准不确定度  $U_{\text{rel}}(C_s)$**   $U_{\text{rel}}(C_s)$  的来源:①对照品的纯度的不确定度;②对照品的称量所产生的相对不确定度  $U_{\text{rel}}$

( $m_s$ );③配制对照品溶液产生的相对不确定度  $U_{\text{rel}}(V_s)$ 。

**4.2.1 对照品的纯度的不确定度** 对照品绿原酸、

连翘苷、黄芩苷均购自中国药品生物制品检定所,由于尚无法得到不确定度参考值,故此项忽略。

**4.2.2** 对照品的称量所产生的相对不确定度  $U_{rel}(m_s)$  检定证书中 1/10 万天平称量允差为 0.01 mg,按矩形分布计算不确定度为  $u(m_{s1}) = 0.01/\sqrt{3} = 0.0058$  mg;该天平称量时重复性标准偏差为 0.01 mg,即  $u(m_{s2}) = 0.01$  mg;绿原酸、连翘苷和黄芩苷 3 种对照品的取样量分别为 4.65, 1.1, 16.4 mg,则对照品称量所引起的相对标准不确定度为:

$$\begin{aligned} \text{绿原酸: } U_{rel}(m_{s绿}) &= \frac{\sqrt{u(m_{s1})^2 + u(m_{s2})^2}}{m} \\ &= \frac{\sqrt{0.0058^2 + 0.01^2}}{4.65} = 2.16\% \end{aligned}$$

同理连翘苷:  $U_{rel}(m_{s连}) = 9.15\%$ ; 黄芩苷:  $U_{rel}(m_{s黄}) = 0.61\%$ 。

**4.2.3** 对照品溶液配制的相对不确定度 对照品溶液配制过程中分别使用了 10 mL 量瓶与 2 mL 移液管,其不确定度分别如下:

①校准, A 级 10 mL 量瓶、2 mL 移液管的允许偏差分别为  $\pm 0.02$  mL,  $\pm 0.005$  mL,按矩形分布计算不确定度为  $0.02/\sqrt{3} = 0.0115$  mL,  $0.005/\sqrt{3} = 0.0029$  mL;②重复性,用 A 级 10 mL 量瓶与 2 mL 移液管重复吸量蒸馏水 10 次,测得重复性不确定度  $u(V_{s10}) = 0.0056$  mL,  $u(V_{s2}) = 0.0009$  mL;③温度,环境温度为室温 ( $20 \pm 5$ ) °C,溶剂水的体积膨胀系数为  $2.1 \times 10^{-4}$ ,按照矩形分布,环境温度引入的不确定度为  $u(T_{s10}) = (5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 10)/\sqrt{3} = 0.0060$  °C,  $u(T_{s2}) = 5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 2/\sqrt{3} = 0.0012$  °C。

对照品溶液配制过程中分别使用了 10 mL 量瓶 2 次, 2 mL 移液管 1 次,因此,对照品配制过程的引入的相对不确定度为:

$$U_{rel}(V_{s10}) = \frac{\sqrt{0.0115^2 + 0.0056^2 + 0.0060^2}}{10} = 0.14\%$$

$$U_{rel}(V_{s2}) = \frac{\sqrt{0.0029^2 + 0.0009^2 + 0.0012^2}}{2} = 0.16\%$$

$$U_{rel}(V_s) = \sqrt{2 \times 0.0014^2 + 0.0016^2} = 0.26\%$$

因此,对照品溶液浓度引入的相对不确定度分别为:

$$\text{绿原酸 } U_{rel}(C_{s绿}) = \sqrt{0.0216^2 + 0.0026^2} = 2.18\%$$

$$\text{连翘苷 } U_{rel}(C_{s连}) = \sqrt{0.0915^2 + 0.0026^2} = 9.15\%$$

$$\text{黄芩苷 } U_{rel}(C_{s黄}) = \sqrt{0.0061^2 + 0.0026^2} = 0.66\%$$

**4.3** 供试品溶液配制过程引入的相对标准不确定

$U_{rel}(V)$  供试品溶液在配制过程中分别使用了 2 mL 移液管、50 mL 的量瓶,其不确定度分别如下:

①校准, A 级 2 mL 移液管、50 mL 量瓶的允许偏差分别为  $\pm 0.005$ ,  $\pm 0.05$  mL,按矩形分布计算不确定度为  $0.005/\sqrt{3} = 0.0029$  mL,  $0.05/\sqrt{3} = 0.029$  mL;②重复性,用 A 级 2 mL 移液管与 50 mL 量瓶重复吸量蒸馏水 10 次,测得重复性不确定度  $u(V_2) = 0.0009$  mL,  $u(V_{50}) = 0.0049$  mL;③温度,环境温度为室温 ( $20 \pm 5$ ) °C,溶剂水的体积膨胀系数为  $2.1 \times 10^{-4}$ ,按照矩形分布,环境温度引入的不确定度为:  $u(T_2) = (5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 2)/\sqrt{3} = 0.0012$  °C,  $u(T_{50}) = (5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 50)/\sqrt{3} = 0.0303$  °C。则样品溶液配制过程中引入的相对不确定度为:

$$U_{rel}(V_2) = \frac{\sqrt{0.0029^2 + 0.0009^2 + 0.0012^2}}{2} = 0.16\%$$

$$U_{rel}(V_{50}) = \frac{\sqrt{0.0029^2 + 0.0049^2 + 0.0303^2}}{50} = 0.08\%$$

$$U_{rel}(V) = \sqrt{0.0016^2 + 0.0008^2} = 0.18\%$$

**4.4** HPLC 测定峰面积相应值的相对标准不确定度  $U_{rel}(A)$ ,  $U_{rel}(A_s)$ ,  $U_{rel}(A)$ ,  $U_{rel}(A_s)$  主要由重复进样引起,由仪器给出的进样峰面积标准偏差为随机测量,属 A 类不确定度。混合对照品溶液重复进样 6 次,其峰面积的标准不确定度按贝赛尔公式计

$$\text{算 } S = \sqrt{\frac{\sum (A_i - \bar{A})^2}{n - 1}}, \text{混合对照品中绿原酸、连翘}$$

$$\begin{aligned} \text{苷和黄芩苷的相对标准不确定度分别为 } U_{rel}(A_{s绿}) &= \frac{S_{绿}}{A_{绿}} = 0.44\%, U_{rel}(A_{s连}) = \frac{S_{连}}{A_{连}} = 0.54\%, U_{rel}(A_{s黄}) \\ &= \frac{S_{黄}}{A_{黄}} = 0.46\%。 \end{aligned}$$

同理,供试品中 3 种成份的相对不确定度分别为  $U_{rel}(A_{绿}) = 0.12\%$ ,  $U_{rel}(A_{连}) = 0.56\%$ ,  $U_{rel}(A_{黄}) = 0.15\%$ 。

**4.5** 计算合成不确定度 将所有的不确定度分量进行汇总(表 1),有利于更直观分析各分量的大小。对 3 种成分进行合成不确定度计算,结果分别为:

$$\begin{aligned} U_{rel绿} &= \sqrt{U_{rel(A)}^2 + U_{rel(A_s)}^2 + U_{rel(C_s)}^2 + U_{rel(V)}^2} \\ &= \sqrt{0.0012^2 + 0.0044^2 + 0.0218^2 + 0.0018} \\ &= 2.23\% \end{aligned}$$

$$\text{同理 } U_{rel连} = 9.18\%; U_{rel黄} = 0.84\%。$$

根据 2.4 样品测定方法得双黄连口服液(批号为 11072017)中 3 种成分的含量为  $X_{绿} = \frac{A}{A_s} \times C_s \times$

$D = 1.76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $X_{\text{连}} = 0.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $X_{\text{黄}} = 11.67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。则 3 种成分含量的相对合成不确定度分别为

$U_{x_{\text{绿}}} = X_{\text{绿}} \times U_{\text{rel绿}} = 1.76 \times 2.23\% = 0.0039 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

$U_{x_{\text{连}}} = 0.42 \times 9.18\% = 0.038 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $U_{x_{\text{黄}}} = 11.67 \times 0.84\% = 0.098 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**4.6 计算扩展不确定度及测量结果** 取 95% 的置信概率,包含因子  $k=2$ ,则  $U=2 \times U_x$ ,本次实验所测量样品的含量及不确定度见表 2。

表 1 不确定度评定

不确定度分量	%		
	绿原酸	连翘苷	黄芩苷
$U_{\text{rel}}(m)$	2.16	9.15	0.61
$U_{\text{rel}}(Vs)$	0.26	0.26	0.26
$U_{\text{rel}}(V)$	0.18	0.18	0.18
$U_{\text{rel}}(As)$	0.44	0.54	0.46
$U_{\text{rel}}(A)$	0.12	0.56	0.15
$U_{\text{rel}}(\text{总})$	2.23	9.18	0.84

表 2 样品含量测定结果及不确定度

 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 

批号	成分	含量	含量合成不确定度	扩展不确定度	报告不确定度
11072017(三精)	绿原酸	1.76	0.039	0.078	$1.76 \pm 0.078$
	连翘苷	0.42	0.038	0.077	$0.42 \pm 0.077$
	黄芩苷	11.67	0.098	0.196	$11.67 \pm 0.196$
10092952(三精)	绿原酸	1.76	0.039	0.077	$1.76 \pm 0.077$
	连翘苷	0.42	0.038	0.077	$0.42 \pm 0.077$
	黄芩苷	11.33	0.095	0.190	$11.33 \pm 0.190$
091203(瑞格)	绿原酸	1.80	0.040	0.080	$1.8 \pm 0.080$
	连翘苷	0.52	0.048	0.095	$0.52 \pm 0.095$
	黄芩苷	11.32	0.095	0.190	$11.32 \pm 0.190$
101004(瑞格)	绿原酸	1.83	0.041	0.082	$1.83 \pm 0.082$
	连翘苷	0.53	0.049	0.097	$0.53 \pm 0.097$
	黄芩苷	11.46	0.096	0.193	$11.46 \pm 0.193$
110107(瑞格)	绿原酸	1.81	0.040	0.081	$1.81 \pm 0.081$
	连翘苷	0.50	0.046	0.092	$0.5 \pm 0.092$
	黄芩苷	11.38	0.096	0.191	$11.38 \pm 0.191$

## 5 讨论

经二极管阵列检测器全波长扫描,得各待测物质最大吸收波长分别为绿原酸 324 nm,连翘苷 280 nm,黄芩苷 274 nm,由于连翘苷的含量较低,并且在 324 nm 基本无吸收,因此确定连翘苷与黄芩苷的检测波长为 280 nm;但绿原酸在 280 nm 左右吸收弱,而且在注射液中绿原酸量很低,故绿原酸的检测波长设定为 324 nm。综合考虑各峰高及峰面积的比例,选择 324,280 nm 为检测波长,在不同的时间段进行双波长切换检测。

未对待测成分的分布均匀性的不确定度予以评定,因为本实验的供试品为液体制剂,且取样时将 10 支口服液混匀后直接量取,因而我们认为 3 种待测成分在口服液中的分布基本均匀。

通过比较分析 3 种待测成分的合成不确定度,发现 3 种待测成分的对照品称量引入的相对不确定

度最大,其中以连翘苷的对照品称量的相对不确定度最大,从实验过程可以看出,由于连翘苷的含量相对较低,其对照品的称取量较少,导致其相对不确定度较大。另外本文参考文献[8]在实验过程中考虑样品量取次数与体积对不确定度的影响,尽可能减少量取的次数并尽量选用容量相对大的量具,因此,对照品溶液与供试品溶液稀释定容过程引入的相对不确定度均较小。

峰面积是不确定度来源的另一个重要方面,本实验所测黄芩苷与连翘苷含量差异显著,分析 3 种成分不同进样量峰面积所产生的相对不确定度,发现绿原酸与黄芩苷不同进样量峰面积所产生的相对不确定度基本相近,即基本无影响,而连翘苷不同进样量峰面积所产生相对不确定度变化较大,其关系图见图 2。由于低进样量时连翘苷的含量过低,基本接近检测限,导致其引入不确定度

# 姜黄炮制前后姜黄素、挥发油含量比较研究

杨海玲<sup>1</sup>, 宋永龙<sup>2</sup>, 覃葆<sup>1\*</sup>, 黄华艳<sup>1</sup>, 吴尤娇<sup>1</sup>, 徐信<sup>1</sup>

(1. 广西中医学院药学院, 南宁 530001; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222002)

**[摘要]** 目的: 比较姜黄炮制前后各样品中姜黄素及挥发油含量。方法: 采用 SHIMADZU, VP-ODS C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-0.1% 冰醋酸溶液 (48:52), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 430 nm, 柱温 35 °C。挥发油采用水蒸气蒸馏法。结果: 姜黄不同炮制品姜黄素的含量为原药材 (10.77 mg·g<sup>-1</sup>) > 微炒品 (10.04 mg·g<sup>-1</sup>) > 生品 (10.02 mg·g<sup>-1</sup>) > 酒制品 (9.44 mg·g<sup>-1</sup>) > 醋制品 (9.28 mg·g<sup>-1</sup>)。挥发油含量为: 原药材 (8.05%) > 生品 (8.00%) > 酒制品 (7.99%) > 微炒品 (7.81%) > 醋制品 (7.60%)。结论: 不同炮制方法对姜黄中姜黄素及挥发油含量均有一定的影响。

**[关键词]** 姜黄; 炮制; 挥发油; 姜黄素; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0108-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1735.009.html>

**[网络出版时间]** 2012-07-04 17:35

## Comparison of Curcumin and Volatile Oil Content in *Curcuma longa* before and after Processed

YANG Hai-ling<sup>1</sup>, SONG Yong-long<sup>2</sup>, QIN Bao<sup>1\*</sup>, HUANG Hua-yan<sup>1</sup>, WU You-jiao<sup>1</sup>, XU Xin<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. Kanion Pharmaceutical Co., Ltd, Lianyungang 222002, China)

**[收稿日期]** 20111213(004)

**[基金项目]** 广西中医学院普通课题 (P2009055)

**[第一作者]** 杨海玲, 讲师, 硕士, 从事中药炮制教学与质量控制研究, Tel: 15977184822, E-mail: gxyangh2005@126.com

**[通讯作者]** \*覃葆, 副教授, 学士, 从事中药炮制与新药研究, Tel: 13481151916, E-mail: bbythemoon@yahoo.com.cn

的可能性增大, 在测定样品时样品的浓度不宜过低。

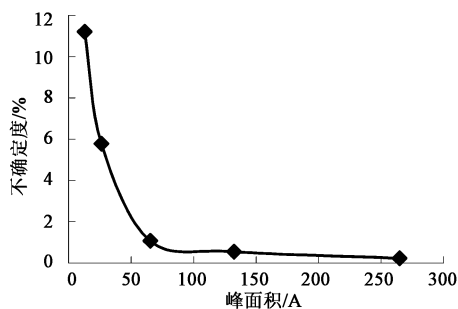


图2 连翘苷的峰面积与所引不确定度关系

### [参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:611.  
[2] 梅爱华, 蓝学威. 气相色谱法检测空气中有机物挥发总量的不确定度评定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(1):88.

[3] 王宜生. 果蔬食品中有机磷类农药不确定度的测定[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(8):125.  
[4] 饶毅, 夏川川, 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.  
[5] 吕尚, 魏惠珍, 饶毅. 原子吸收火焰法测定药用辅料山梨醇中的镍元素及其不确定度评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20):52.  
[6] 付朝晖, 王全凯, 王健, 等. 大鼠吸入毒性实验空气样品浓度不确定度评定[J]. 毒理学杂志, 2012, 26(1):37.  
[7] 国家质量技术监督局. JJF1059-1999. 测定不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 1999.  
[8] 魏惠珍, 饶毅, 李新南, 等. 气相色谱内标法测定牡荆油胶丸中β-丁香烯含量的不确定度评定[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11):1881.

[责任编辑 顾雪竹]