

HPLC 测定补肾口服液中淫羊藿苷的不确定度分析

陶松¹, 刘旭海^{2*}, 刘玲¹, 许锦珍², 季巧遇², 张璐¹

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 江中药业股份有限公司, 南昌 330096)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定补肾口服液中淫羊藿苷的不确定度评价方法。方法: 采用 HPLC 法测定补肾口服液中淫羊藿苷含量, 分析影响其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置信水平。结果: 本次试验补肾口服液中淫羊藿苷含量测定结果为 $(0.2212 \pm 0.0140) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论: 建立的不确定度评定法适用于 HPLC 法测定补肾口服液中淫羊藿苷含量的不确定度分析。

[关键词] 高效液相色谱法; 淫羊藿苷; 测量不确定度; 补肾口服液

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0111-04

Analysis of Uncertainty for Determination of the Icariin in Bushen Oral Liquid by HPLC

TAO Song¹, LIU Xu-hai^{2*}, LIU Ling¹, XU Jin-zhen², JI Qiao-yu², ZHANG Lu¹

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Jiangxi Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd., Nanchang 330096, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for uncertainty analysis of icariin in bushen oral liquid. **Method:** HPLC method was established to determinate the content of icariin. Each active component of uncertainty was calculated the variable parameters among the procedures. The combined uncertainty and extended uncertainty and confidence were finally obtained by synthesized the uncertainties of various component variables. **Result:** The determined content of icariin in bushen oral liquid of this test is $(0.2212 \pm 0.0140) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** The established mathematic model is applicable to the uncertainty analysis of icariin in bushen oral liquid by HPLC method.

[Key words] HPLC; icariin; measurement uncertainty; bushen oral liquid

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性, 与测量结果相关联系的参数^[1]。它是被测量客观值在某一量值范围内的一个评定, 其大小决定了测量结果的实用价值。一个完整的定量分析结果应该包含测量值(表示被测量集中性的参数又称最优估计值, 是提供给客户的结果)和测量不确定度(表示被测量分散性的参数)两个指标。测量不确定度是评价测量值可信度的重要参数^[2]。目前,

测量不确定度的理论已在国家计量基准、标准物质的研究及仪器校准、化工生产、产品检验等领域得到大力的推广应用^[3]。因此, 正确表达和评定测量方法的测量不确定度正逐步成为国际通行的要求。通过对药品检测方法中的测量不确定度的分析评定, 为结果的准确性和可靠性提供了保证^[4]。

本文根据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059-1999)中有关规定^[1]及化学分析中不确定度的评估指南^[5], 对补肾口服液中淫羊藿苷含量的测量不确定度进行了分析, 以找出影响不确定度的因素, 对不确定度进行评估, 为评价检测报告提供理论依据, 以控制测量结果的有效性和适宜性。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪

[收稿日期] 20111120(003)

[第一作者] 陶松, 硕士研究生, 从事新制剂与新工艺研究, E-mail: taosong909@sina.com

[通讯作者] *刘旭海, 总工程师、主任药师, 硕士研究生导师, E-mail: lxh007jz@sina.com

(Agilent, USA)、Agilent Chemstation 色谱工作站, SK5200H 型数控超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司), 岛津 AUW220 1/10 万电子天平, AB104-N 型 1/万天平(梅特勒-托利多), 超纯水机(美国 Millipore 公司), 所用玻璃仪器均为天玻牌 A 级。

1.2 试药 补肾口服液(江中药业股份有限公司提供, 批号 20110725), 淫羊藿苷对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号 110737-200312), 甲醇(色谱纯, 山东禹王实验有限公司化工分公司), 所用试剂水均为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(63:37), 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 取淫羊藿苷对照品 2.24 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 精密吸取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密吸取补肾口服液 2 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇超声处理 30 min, 冷却至室温, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.4 样品测定 分别精密吸取对照品溶液、与供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定, 按外标法(峰面积)计算, 结果补肾口服液中淫羊藿苷为 0.221 2 g·L⁻¹ (n=6), 淫羊藿苷含量测定结果的标准差为 0.001 7%, RSD 0.007 6%。

3 测量不确定度的评估

测量不确定度的评估程序主要有以下几个步骤^[6]: 确定数学模型; 分析直接测量分量的不确定度来源并计算各分量的合成标准不确定度; 计算最终测量值的合成标准不确定度; 计算扩展不确定度; 正确表示最终测量值结果。以下按照这几个步骤对本次试验的测量不确定度进行评估。

3.1 数学模型 根据实验过程, 建立含量测定数学模型^[7] $C_s = \frac{m_i A_s V_s}{A_i V_i}$, 其中 C_s 为供试品中淫羊藿苷含量(g·L⁻¹), m_i 为对照品的质量, A_s 为样品的峰面积, V_s 为样品的稀释体积, A_i 为对照品的峰面积, V_i 为对照品的稀释体积。

3.2 确定和分析不确定度来源 根据数学模型分析, 单份供试品含量测定的不确定度主要来源于

m_i, V_s, V_i, A_i 和 A_s 5 个分量^[8-9]。每一个不确定度分量中又应考虑每一个影响因素, 直至影响因素变得足够小, 对结果的影响可以忽略时为止。图 1 列出了本试验的所有不确定度分量的因果关系图, 有利于更直观地分析所有不确定度来源^[10]。

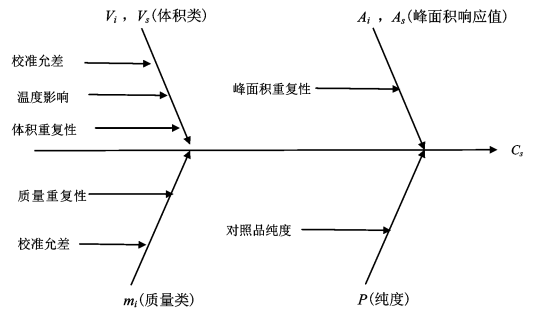


图 1 不确定度分量来源

3.3 不确定度分量的量化

3.3.1 对照品纯度的不确定度 $u(p_i)$ 淫羊藿苷对照品提供的纯度 >98%, 按矩形分布计算, 其对照品纯度引入的不确定度 $u(p_i) = \frac{1-0.98}{2\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-3}$, 相对标准不确定度 $\frac{u[p]}{p} = \frac{5.77 \times 10^{-3}}{1} = 5.77 \times 10^{-3}$ 。

3.3.2 对照品称量质量的相对不确定度 $u(m_i)$ 主要有 2 个来源, 包括①电子天平称量示值的不确定度 $u(m_{i1})$: 电子天平经检定为 1 级, 允许误差为 ±0.1 mg, 按正态分布计算 $u(m_{i1}) = 0.1/3 = 0.033$ mg。②称量由天平重复性代入的不确定度 $u(m_{i2})$: 天平的重复性标准偏差为 0.05 mg。由于对照品淫羊藿苷取样量为 2.24 mg, 则淫羊藿苷相对标准不确定度为

$$\frac{u(m_i)}{m_i} = \sqrt{\left[\frac{u(m_{i1})}{m_i}\right]^2 + \left[\frac{u(m_{i2})}{m_i}\right]^2} = \sqrt{\left[\frac{0.033}{2.24}\right]^2 + \left[\frac{0.05}{2.24}\right]^2} = 0.026 7$$

3.3.3 配制对照品时由玻璃器皿引入的相对不确定度 $u(V_i)$ 即对照品制备过程中主要使用了 10 mL 量瓶、1 mL 移液管, 这些玻璃仪器引入的不确定度 $u(V_i)$: (1) 10 mL 量瓶 $u(V_{i1})$ 来源主要有 3 种①校准, A 级 10 mL 单标线量瓶示值允差 ±0.020 mL, 取 $k = \sqrt{3}$, 则 $u(V_{i11}) = \frac{0.020}{\sqrt{3}} = 0.011 5$ mL; ②重复性, 重复测定 10 次, 测得 $u(V_{i12}) = 0.017$ mL; ③温度, 由于实验温度变化范围为 20 ± 5 °C, 按矩形分布计算, 甲醇的膨胀系数为 1.10 × 10⁻³ / °C, 则温度影

$$\text{响的不确定度 } u(V_{i13}) = \frac{10 \times 5 \times 1.10 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} =$$

0.031 8 mL。

$$u(V_{i1}) = \sqrt{u^2(V_{i11}) + u^2(V_{i12}) + u^2(V_{i13})} = \sqrt{0.0115^2 + 0.017^2 + 0.0318^2} = 0.038 \text{ mL}$$

(2) 1 mL 单标线移液管 $u(V_{i2})$ 来源主要有 3 种①校准, A 级 1 mL 单标线移液管示值允差 ± 0.007 mL, 取 $k = \sqrt{3}$, 则 $u(V_{i21}) = \frac{0.007}{\sqrt{3}} = 0.004 041$ mL; ②重复性, 重复测定 10 次, 测得 $u(V_{i22}) = 0.007$ mL; ③温度, 由于实验温度变化范围为 20 ± 5 °C, 按矩形分布计算, 甲醇的膨胀系数为 $1.10 \times 10^{-3}/\text{°C}$, 则温度影响的不确定度。

$$u(V_{i23}) = \frac{1 \times 5 \times 1.10 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.003 18 \text{ mL}$$

$$u(V_{i2}) = \sqrt{u^2(V_{i21}) + u^2(V_{i22}) + u^2(V_{i23})} = \sqrt{0.004041^2 + 0.007^2 + 0.00318^2} = 0.008 69$$

由于配制对照品溶液时 10 mL 量瓶使用了 2 次, 1 mL 单标线移液管使用了 1 次, 故配制对照品时由玻璃器皿产生的相对合成标准不确定度为

$$\frac{u(V_i)}{V_i} = \sqrt{2 \times \left[\frac{u(V_{i1})}{V_{i1}} \right]^2 + \left[\frac{u(V_{i2})}{V_{i2}} \right]^2} = \sqrt{2 \times \left[\frac{0.038}{10} \right]^2 + \left[\frac{0.00869}{1} \right]^2} = 0.010 2$$

3.3.4 样品稀释引入的不确定度 $u(V_s)$ 由于样品稀释时使用了 25 mL 量瓶、2 mL 移液管, 这些玻璃仪器使用引入的不确定度如下: (1) 25 mL 量瓶 $u(V_{i3})$ 来源主要有 3 种①校准, A 级 25 mL 单标量瓶示值允差 ± 0.03 mL, 取 $k = \sqrt{3}$, 则 $u(V_{i31}) = \frac{0.03}{\sqrt{3}} = 0.0173$ mL; ②重复性, 重复测定 10 次, 测得 $u(V_{i32}) = 0.024$ mL; ③温度, 由于实验温度变化范围为 20 ± 5 °C, 甲醇的膨胀系数为 $1.10 \times 10^{-3}/\text{°C}$, 按矩形分布计算, 则温度影响的不确定度

$$u(V_{i33}) = \frac{25 \times 5 \times 1.10 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.079 4 \text{ mL}$$

$$U_{rel}(C_s) = \frac{u(C_s)}{C_s} = \sqrt{\left[\frac{u(P)}{P} \right]^2 + \left[\frac{u(m_i)}{m_i} \right]^2 + \left[\frac{u(V_i)}{V_i} \right]^2 + \left[\frac{u(V_s)}{V_s} \right]^2 + \left[\frac{u(A_i)}{A_i} \right]^2 + \left[\frac{u(A_s)}{A_s} \right]^2} = \sqrt{0.577\%^2 + 2.67\%^2 + 1.02\%^2 + 0.689\%^2 + 0.717\%^2 + 0.764\%^2} = 0.031 7$$

3.5 计算扩展不确定度及报告不确定度 取 95% 的置信概率, 包含因子 $k = 2^{[11]}$, 则 $U_{95} = 0.031 7 \times$

$$u(V_{i3}) = \sqrt{u^2(V_{i31}) + u^2(V_{i32}) + u^2(V_{i33})} = \sqrt{0.0173^2 + 0.024^2 + 0.0794^2} = 0.085 \text{ mL}$$

(2) 2 mL 移液管 $u(V_{i4})$ 主要来源有 3 种①校准, A 级 2 mL 单标线移液管示值允差 ± 0.010 mL, 取 $k = \sqrt{3}$, $u(V_{i41}) = \frac{0.010}{\sqrt{3}} = 0.005 77$ mL; ②重复性, 重复测定 10 次, 计算得 $u(V_{i42}) = 0.008$ mL; ③温度, 由于实验温度变化范围为 20 ± 5 °C, 甲醇的膨胀系数为 $1.10 \times 10^{-3}/\text{°C}$, 按矩形分布计算, 则温度影响的不确定度

$$u(V_{i43}) = \frac{2 \times 5 \times 1.10 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.006 35 \text{ mL}$$

$$u(V_{i4}) = \sqrt{u^2(V_{i41}) + u^2(V_{i42}) + u^2(V_{i43})} = \sqrt{0.00577^2 + 0.008^2 + 0.00635^2} = 0.012 \text{ mL}$$

因此由样品稀释引入的相对合成标准不确定度为:

$$\frac{u(V_i)}{V_i} = \sqrt{\left[\frac{u(V_{i1})}{V_{i1}} \right]^2 + \left[\frac{u(V_{i2})}{V_{i2}} \right]^2} = \sqrt{\left[\frac{0.085}{25} \right]^2 + \left[\frac{0.012}{2} \right]^2} = 0.006 89$$

3.3.5 对照品测得的峰面积的不确定度 $u(A_i)$

对照品溶液 6 次重复进样测得量的峰面积为 249.1, 246.1, 247.3, 245.5, 250.2, 247.6。 $\bar{A} = 247.6$ 标准不确定度按贝赛尔公式计算 $s =$

$$\sqrt{\frac{\sum (A_i - \bar{A})^2}{n-1}} = 1.775。 \text{ 则对照品测得的峰面积相}$$

对不确定度 $u(A_i) = \frac{s}{A} = 0.007 17。$

3.3.6 样品测得的峰面积的相对不确定度 $u(A_s)$

样品重复测定 6 次峰面积为 195.2, 196.8, 193.6, 197.8, 195.3, 194.8。 $\bar{A} = 195.6$ 标准不确定度按贝

赛尔公式计算 $s = \sqrt{\frac{\sum (A_i - \bar{A})^2}{n-1}} = 1.495。 \text{ 则样品测}$

得峰面积相对不确定度 $u(A_s) = \frac{s}{A} = 0.007 64。$

3.4 计算合成标准不确定度 不确定度分量汇总 见表 1。

$0.221 2 \times 2 = 0.014 0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 本次试验含量测定结果可表示为 $(0.221 2 \pm 0.014 0) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 不确定度各分量分布

分量	不确定度来源	分布 类型	相对标准不确定度
$u(p)$	对照品纯度	矩形 B 类	5.77×10^{-3}
$u(m_i)$	天平示值	正态 B 类	2.67×10^{-2}
	天平称量重复性	正态 A 类	
$u(V_i)$	标准容量瓶	矩形 B 类	1.02×10^{-2}
	温度系数引起	矩形 B 类	
	定容重复性	正态 A 类	
$u(V_s)$	标准容量瓶	矩形 B 类	6.89×10^{-3}
	温度系数引起	矩形 B 类	
	定容重复性	正态 A 类	
$u(A_i)$	对照品溶液进样重复性	正态 A 类	7.17×10^{-3}
$u(A_s)$	样品溶液进样重复性	正态 A 类	7.64×10^{-3}

4 讨论

分析评估不确定度时,应尽量注意产生不确定度的所有来源,因为合成不确定度的数值几乎完全取决于重要的不确定度分量。从表 1 各标准分量的不确定可以看出,对照品称量质量以及对照品稀释体积对合成不确定度的影响较大,对照品纯度、样品稀释体积及色谱峰峰面积响应值的不确定度较小。在分析了上述影响测量不确定度的原因后,在以后的试验中加以注意和改进。选择精密度高的单标移液管或与移液体积相同或稍大的刻度吸管,样品测量应在基线平稳以后进样,同时尽量保持标准溶液和待测样品测定条件相同,使测量结果更加可靠,可使测量结果的不确定度进一步减小。

测量结果标准差(s)是指对同一被测量作 n 次测量,表征测量结果分散性的量,用贝塞尔公式

$$\text{计算标准差 } s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}。 \text{ 不确定度可以是标}$$

准差或其倍数,或说明了置信水平的区间的半宽。不确定度通常由多个分量组成,对每一分量均要评定其标准不确定度,评定方法分为 A, B 两类^[12]。A 类不确定度由测量数据的实验标准差表征,需要进行多次重复性或重复性试验来评定, B 类不确定度通常采用非统计方法评定,按照现有信息加以评定。将 A, B 两类不确定度用合成方差的方法合成即得

合成标准不确定度。因此,不确定度包括测定结果标准差,全面考虑到各个分量引入的标准不确定度,能够更好的描述测量结果。

本文所建立的方法考虑了 HPLC 测定过程中产生不确定度的大部分因素,逐一进行分析和量化,评定出测量结果的合成标准不确定度和扩展不确定度,为评价检验报告提供科学依据,为同类方法测量结果的不确定度评定提供有益的参考。

[参考文献]

- [1] 国家质量技术监督局. JJF1059-1999 测量不确定度评定与表示[S]. 北京:中国计量出版社,1999.
- [2] 罗曼. HPLC 法测定复方杜仲口服液中含羊藿苷的不确定度评估[J]. 中国药事,2010,24(1):88.
- [3] 魏慧珍,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.
- [4] 姜连阁,刘永成,白政忠. HPLC 法含量测定不确定度分析及实例[J]. 药物分析杂志,2007,27(11):1803.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 孙莉. HPLC 法测定双黄连口服液中黄芩苷含量的不确定度分析[J]. 现代中药研究与实践,2009,23(3):71.
- [8] 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.
- [9] 饶毅,刘玲,刘琼,等. 离子色谱法测定大黄药材中二氧化硫残留量的不确定度评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):32.
- [10] 梁春卿. 胆舒胶囊含量测定不确定度评定[J]. 中成药,2006,28(12):1736.
- [11] 王文昭,王璐,陈凯. HPLC 法测定诺氟沙星胶囊含量的不确定度分析[J]. 中国药事,2010,24(6):590.
- [12] 岳香梅,王纪龙. 测量标准不确定度的 A 类与 B 类评定[J]. 山西大同大学学报:自然科学版,2007,23(1):28.

[责任编辑 顾雪竹]