

高效液相色谱法测定连花清瘟颗粒中连翘苷含量的不确定度评定

高敏^{1*}, 李珣², 李茗¹

(1. 枣庄市食品药品检验检测中心, 枣庄 277000; 2. 枣庄市市中区市场监管综合服务中心, 枣庄 277101)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱(HPLC)法测定连花清瘟颗粒中连翘苷含量的不确定度评定。**方法** 根据2020年版《中华人民共和国药典(一部)》和JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》,采用HPLC法测定连花清瘟颗粒中连翘苷含量的不确定度。**结果** 在95%的置信区间下,包含因子 $k=2$ 时评定扩展不确定度为 (2.279 ± 0.160) mg。**结论** 本方法的测量不确定度主要由样品称量、制备引入。通过不确定度的评估,可提高检验结果的可靠性,及时发现和降低检验风险,提升检验报告质量。

关键词: 连花清瘟颗粒; 不确定度; 连翘苷; 含量; 高效液相色谱法

0 引言

连花清瘟颗粒,具有清瘟解毒、宣肺泄热的功效。是在中医理论指导下研发的用于治疗流行性感属热毒袭肺证^[1-2]。目前连花清瘟颗粒中连翘苷含量的检测方法依据为2020年版《中华人民共和国药典(一部)》^[3],在检测过程中引入不确定度的因素很多。连翘苷含量的准确测定,可以更好地评价连花清瘟颗粒制剂的质量状况。而在实际的实验室检测过程中,含量测定结果受到实验室环境、操作人员、仪器设备等因素的影响。因此正确评价测量结果,分析影响结果的因素来源及可信程度,分析测量不确定度尤为必要。本研究依据《测量不确定度评定与表示》(JJF 1059.1—2012)^[4]、《化学分析中不确定度的评估指南》(CNAS-GL006:2019)^[5]和《常用玻璃量器检定规程》(JJG 196—2006)^[6],并参考文献^[7-10],对含量测定过程中不确定度来源进行详细分析,比较不确定度主要来源的影响大小,建立不确定度模型,计算扩展不确定度,更好地规范实验操作和提高结果准确性,并为正确评价测量结果、提高药品质量提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

岛津LC-20AT型高效液相色谱仪;梅特勒电子天平XS205DU;连翘苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:

110821-202117,纯度:94.9%)。

色谱纯级别乙腈、甲醇;优级纯级别磷酸;超纯水;连花清瘟颗粒(批号:A2204127H,衡水以岭药业股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78);流速:1.0 mL/min;检测波长为205 nm。

1.2.2 溶液制备

(1)对照品溶液的制备:取连翘苷对照品11.18 mg,配制成4.244 μg/L的对照品溶液。

(2)供试品溶液的制备:取装量差异项下的供试品,混匀,取适量,研细,取2.0040 g,精密称定,制备供试品溶液。

1.2.3 测定方法

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。

1.3 测量模型

$$X = \frac{\bar{A}_t \times f_t \times \bar{M}}{F \times M_t}$$

$$F = \frac{\bar{A}_s \times f_s}{M_s \times C}$$

式中, X ——每袋样品中连翘苷的含量,mg; f_t ——供试品稀释倍数; f_s ——对照品稀释倍数; M_t ——供试品质量,g;

*通信作者:高敏,硕士,主管中药师,研究方向为中药质量控制。E-mail:gaomin169@163.com

M_s ——对照品质量, g; \bar{A}_i ——供试品峰面积平均值; \bar{A}_s ——对照品峰面积平均值; C ——对照品纯度, %; \bar{M} 样品平均装量, g。

2 结果与分析

2.1 不确定度来源分析

根据检测方法及函数关系式, 连花清瘟颗粒中连翘苷含量的不确定度来源主要有:

A 类不确定度: 涉及的测量重复性。

B 类不确定度: (1)样品和对照品称量过程引入的不确定度; (2)样品和对照品稀释定容过程引入的不确定度; (3)样品的不均匀性; (4)仪器测量引入的不确定度。

2.2 不确定度评定

2.2.1 天平称量过程引入的不确定度

(1)对照品称量过程引入的不确定度 $u_{rel}(M_s)$

用十万分之一电子天平称量连翘苷对照品, $m=11.18$ mg。根据使用天平的校准证书, 在称量负荷范围的最大允许误差为 ± 0.05 mg, 按照均匀分布计算, $k=\sqrt{3}$, 故标准不确定度为:

$$u_1(M_s) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 2.887 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

根据使用天平的校准证书, 天平称量重复性的标准偏差为 0.15 mg, 按照均匀分布计算, $k=\sqrt{3}$, 故标准不确定度为:

$$u_2(M_s) = \frac{0.15}{\sqrt{3}} = 8.660 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

对照品称量使用减重法, 称量实验室的环境独立, 温湿度

在快速称量的短期内变化忽略不计, 故对照品称量过程的合成标准不确定度计算如下:

$$u(M_s) = \sqrt{2 \times \left\{ [u_1(M_s)]^2 + [u_2(M_s)]^2 \right\}} = 0.129 \text{ mg}$$

相对标准不确定度计算如下:

$$u_{rel}(M_s) = \frac{u(M_s)}{11.18 \text{ mg}} = 1.154 \times 10^{-2}$$

(2)供试品平均装量称量引入的不确定度 $u_{rel}(\bar{M})$

平均装量引入的不确定度分为天平称量过程的测量不确定度和装量量差异的不确定度。使用万分之一天平称量供试品的装量差异, 测量不确定度计算如下:

根据使用天平的校准证书, 在称量负荷范围的最大允许误差为 ± 0.50 mg, 按照均匀分布计算, $k=\sqrt{3}$, 故标准不确定度为:

$$u_1(M_t) = \frac{0.50}{\sqrt{3}} = 0.2887 \text{ mg}$$

根据使用天平的校准证书, 天平称量重复性的标准偏差为 1.0 mg, 按照均匀分布计算, $k=\sqrt{3}$, 故标准不确定度为:

$$u_2(M_t) = \frac{1.0}{\sqrt{3}} = 0.5774 \text{ mg}$$

供试品称量使用减重法, 称量实验室的环境独立, 温湿度在称量的短期内变化忽略不计, 故称量过程的合成标准不确定度计算如下:

$$u(M_t) = \sqrt{2 \times \left\{ [u_1(M_t)]^2 + [u_2(M_t)]^2 \right\}} = 0.9129 \text{ mg}$$

供试品装量差异引入的不确定度计算如下: 取供试品 10 袋, 分别取内容物精密称定, 并得出平均装量, 结果如表 1。

表 1 供试品装量差异表

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
装量(g)	6.0324	6.1567	5.8966	6.0107	6.1868	6.0414	6.0528	5.9706	5.9825	6.0379
平均装量 \bar{W}_{ij} (g)	6.0368									

计算标准偏差 $S_{ij}=1.4911$

$$\text{则 } u_{rel}(\bar{M}) = \frac{S_{ij}}{\sqrt{10}} = 0.472 \text{ g}$$

综上所述, 平均装量引入的相对不确定度为

$$u_{rel}(\bar{M}) = \frac{\sqrt{[u(M_t)]^2 + [u(\bar{M}) \times 10^3]^2}}{\bar{M} \times 10^3} = 7.819 \times 10^{-2} \text{ g}$$

(3)供试品称量过程引入的不确定度 $u_{rel}(M_t)$

用万分之一电子天平称量装量差异项下的连花清瘟颗粒供试品 $m=2.0040$ g。

供试品称量过程的合成标准不确定度同 2.2.1(2)中

$$u(M_t) = 0.9129 \text{ mg}$$

相对标准不确定度计算如下:

$$u_{rel}(M_t) = \frac{u(M_t)}{2.0040 \text{ g} \times 10^3} = 4.555 \times 10^{-4}$$

2.2.2 溶液配制过程引入的不确定度

(1)对照品溶液配制过程引入的不确定度 $u_{rel}(V_s)$

a. 玻璃仪器校准不确定度

根据使用到的 50 mL, A 级单标线容量瓶的允许误差为 ± 0.05 mL, 使用到 2 次, 按照三角分布计算, $k=\sqrt{6}$, 故标准不确定度为:

$$u_s(V_{50}) = \frac{0.05}{\sqrt{6}} \times 2 = 4.082 \times 10^{-2} \text{ mL}$$

根据检定证书 1 mL A 级移液管的允许误差为 ± 0.005 mL, 按照三角分布计算, $k=\sqrt{6}$, 故标准不确定度为:

$$u_s(V_1) = \frac{0.005}{\sqrt{6}} = 2.041 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

b. 温度引入的不确定度

实验温度为 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 配制过程中使用到 50% 甲醇,

此条件下根据甲醇及水的体积膨胀系数分别为 $1.2 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$ 、 $2.07 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$, 得出 50% 甲醇体积膨胀系数为 $1.635 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$ 。标准不确定度计算如下:

$$u_s(V_{502}) = \frac{1.635 \times 10^{-3} \times 50 \times 5}{\sqrt{3}} \times 2 = 0.471 \text{ mL}$$

$$u_s(V_{12}) = \frac{1.635 \times 10^{-3} \times 1 \times 5}{\sqrt{3}} = 4.720 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

$$\text{则 } u_s(V_{50}) = \sqrt{[u_s(V_{501})]^2 + [u_s(V_{502})]^2} = 0.473 \text{ mL}$$

$$u_s(V_1) = \sqrt{[u_s(V_{11})]^2 + [u_s(V_{12})]^2} = 5.300 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

综上, 对照品溶液配制过程中引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_s) = \sqrt{\left[\frac{u_s(V_{50})}{50}\right]^2 + \left[\frac{u_s(V_1)}{1}\right]^2} = 8.055 \times 10^{-3}$$

(2) 供试品溶液配制过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_t)$

a. 玻璃仪器校准不确定度

根据使用到的 25 mL, A 级单标线容量瓶的允许误差为 $\pm 0.03 \text{ mL}$, 使用到 2 次, 按照三角分布计算, $k = \sqrt{6}$, 故标准不确定度为:

$$u_t(V_{251}) = \frac{0.03}{\sqrt{6}} \times 2 = 2.449 \times 10^{-2} \text{ mL}$$

根据检定证书 5 mL A 级移液管的允许误差为 $\pm 0.015 \text{ mL}$,

按照三角分布计算, $k = \sqrt{6}$, 故标准不确定度为:

$$u_t(V_51) = \frac{0.015}{\sqrt{6}} = 6.124 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

b. 温度引入的不确定度

实验温度为 $(20 \pm 5) \text{ } ^\circ\text{C}$, 供试品配制过程中使用到甲醇和水, 此条件下甲醇及水的体积膨胀系数分别为 $1.2 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$ 、

$2.07 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$ 。

标准不确定度计算如下。25 mL 容量瓶分别使用到甲醇和水, 分别计算为:

$$u_{t\text{甲醇}}(V_{252}) = \frac{1.2 \times 10^{-3} \times 25 \times 5}{\sqrt{3}} = 8.660 \times 10^{-2} \text{ mL}$$

$$u_{t\text{水}}(V_{252}) = \frac{2.07 \times 10^{-3} \times 25 \times 5}{\sqrt{3}} = 0.149 \text{ mL}$$

$$u_t(V_52) = \frac{1.2 \times 10^{-3} \times 5 \times 5}{\sqrt{3}} = 1.732 \times 10^{-2} \text{ mL}$$

$$\text{则 } u_{t\text{甲醇}}(V_{25}) = \sqrt{\left[\frac{u_{t\text{甲醇}}(V_{251})}{2}\right]^2 + [u_{t\text{甲醇}}(V_{252})]^2} = 8.746 \times 10^{-2} \text{ mL}$$

$$u_{t\text{水}}(V_{25}) = \sqrt{\left[\frac{u_{t\text{水}}(V_{251})}{2}\right]^2 + [u_{t\text{水}}(V_{252})]^2} = 0.150 \text{ mL}$$

$$u_t(V_5) = \sqrt{[u_t(V_51)]^2 + [u_t(V_52)]^2} = 1.837 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

综上, 供试品溶液配制过程中引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_t) = \sqrt{\left[\frac{u_{t\text{甲醇}}(V_{25})}{25}\right]^2 + \left[\frac{u_{t\text{水}}(V_{25})}{25}\right]^2 + \left[\frac{u_t(V_5)}{5}\right]^2} = 7.857 \times 10^{-3}$$

2.2.3 HPLC 方法测量过程中引入的不确定度

(1) HPLC 设备的测定不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{HPLC})$

根据设备的检定证书, 测定相对标准偏差为 1.0%, 按照均匀分布计算, $k = \sqrt{3}$, 故标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\text{HPLC}) = \frac{1.0\%}{\sqrt{3}} = 5.774 \times 10^{-3}$$

(2) 供试品测量结果重复性引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{rep})$

使用同一设备重复进样 10 次, 结果如表 2 所示。

表 2 供试品连翘苷含量测定结果

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
含量(mg)	2.268	2.261	2.266	2.271	2.266	2.267	2.260	2.264	2.272	2.269
平均含量 \bar{C} (mg)	2.266									

计算标准偏差 $S_n = 3.944 \times 10^{-3}$

$$\text{则 } u(\text{rep}) = \frac{S_n}{\sqrt{10}} = 1.247 \times 10^{-3} \text{ mg}$$

综上所述, 测量结果重复性引入的相对不确定度为

$$u_{\text{rel}}(\text{rep}) = \frac{u(\text{rep})}{2.266} = 5.504 \times 10^{-4} \text{ mg}$$

2.2.4 回收率引入的不确定度

因莲花清瘟颗粒供试品前处理较为复杂, 提取步骤对结果存在一定的影响, 通过测定回收率对结果进行校正。取 6 份空白质控样品约 2.0 g, 精密称定, 加入定量的连翘苷对照品溶液, 按 1.2.2 供试品溶液制备方法制备, 测定其连翘苷含量。回收率为 97.25%~101.39%, 平均回收率 $\bar{R} = 99.45\%$, 校正后含量为 2.279 mg/袋。回收率结果见表 3。

计算标准偏差 $S_n = 1.288$

$$\text{则 } u(\text{rec}) = \frac{S_n}{\sqrt{6}} = 0.526 \text{ mg}$$

综上所述, 测量结果重复性引入的相对不确定度为

$$u_{\text{rel}}(\text{rec}) = \frac{u(\text{rec})}{99.45} = 5.289 \times 10^{-3}$$

表 3 加标回收率

序号	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)
1	111.8	110.27	98.63	99.45
2	111.8	110.74	99.05	
3	111.8	113.35	101.39	
4	111.8	109.47	97.92	
5	111.8	110.83	99.13	
6	111.8	112.44	100.57	

2.2.5 合成标准不确定度

连花清瘟颗粒中连翘苷含量测定过程中各分量不确定度见表4。各分量的不确定度来源相互独立, 因此合成标准不确定度 u_{crel} 为:

$$u_{\text{crel}} = \left\{ \left[u_{\text{rel}}(M_s) \right]^2 + \left[u_{\text{rel}}(\bar{M}) \right]^2 + \left[u_{\text{rel}}(M_t) \right]^2 + \left[u_{\text{rel}}(V_s) \right]^2 + \left[u_{\text{rel}}(V_t) \right]^2 + \left[u_{\text{rel}}(\text{HPLC}) \right]^2 + \left[u_{\text{rel}}(\text{rep}) \right]^2 + \left[u_p(\text{rec}) \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$= 8.022 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

表4 各分量不确定度一览表

各分量名称	不确定数值
对照品称量的不确定度 $u_{\text{rel}}(M_s)$	1.154×10^{-2}
供试品平均装量的不确定度 $u_{\text{rel}}(\bar{M})$	7.819×10^{-2}
供试品称量过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(M_t)$	4.555×10^{-4}
对照品溶液配制的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_s)$	8.055×10^{-3}
供试品溶液配制的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_t)$	7.857×10^{-3}
HPLC 设备的测定不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{HPLC})$	5.774×10^{-3}
供试品测量结果重复性的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{rep})$	5.504×10^{-4}
回收率引入的不确定度 $u_p(\text{rec})$	5.289×10^{-3}

2.2.6 扩展不确定度

连翘苷含量测定结果属正态分布, 取 95% 置信区间 ($k=2$), 扩展不确定度为:

$$U = u_{\text{crel}} \times k = 8.022 \times 10^{-2} \times 2 = 0.160 \text{ mg}$$

综上所述, 含量测定结果为 $X = (2.279 \pm 0.160) \text{ mg/袋}$

3 讨论与结论

通过对连花清瘟颗粒中连翘苷含量的不确定度评定可知, 不确定度来源较多, 但分量值较小。具体分析来看, 不确定度最大的为对照品称量的不确定度, 这主要是因为对照品的称量质量较小, 对实验人员操作水平和设备使用状况、精度等要求较高。在日常操作中, 可通过称取较大质量标准品置于较大容量的容量瓶中进行配制, 同时确保设备在检定周期内, 选择性能最佳的进行操作^[11-13]。其次是供试品平均装量的不确定度, 因此生产厂家在控制药品质量过程中应提高生产工艺^[14]从而降低装量差异^[15-16]。

综上所述, 评定检测数据的不确定度可以提升试验数据的准确性和可靠性, 降低检验报告的风险, 尤其在面对检验工作中遇到的检验结果处在标准要求数据临界值或者略低于标准限值^[17-18]时更具有指导意义^[19]。通过本次研究可以为中成药中颗粒剂含量指标的不确定度评定提供参考。

参考文献

[1] 成蕾, 刘洪, 王婷婷, 等. 连花清瘟制剂化学成分、药理作用、

临床应用的研究进展[J]. 中成药, 2021, 43(12): 3409-3416.

[2] 张红梅, 于姗姗, 王桂英. 连花清瘟制剂化学成分及检测方法的研究进展[J]. 中国药物经济学, 2023, 18(04): 118-121.

[3] 国家药典委员会. 2020 版中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1015-1016.

[4] 国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示JJF 1059.1—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[5] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南: CNAS-GL006[S]. 北京: 中国计量出版社, 2019.

[6] 国家质量监督检验检疫总局. 常用玻璃量器检定规程JJG 196—2006[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.

[7] 李莉, 王继双, 王海燕. 高效液相色谱法测定化妆品中补骨脂酚的不确定度评定[J]. 化学分析计量, 2024, 33(10): 114-118.

[8] 王洋, 江玲玲, 谢耀轩, 等. 金银花质量标准中木犀草苷含量测定方法探讨及不确定度分析[J]. 中国药物评价, 2024, 41(01): 56-60.

[9] 马力辉, 崔炎, 李迅, 等. HPLC法测定远志中黄曲霉毒素B1含量的不确定度评定[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2023, 43(05): 484-491.

[10] 赵贵琴, 冷崇姣, 赵悦, 等. 高效液相色谱法测定蒲公英中菊苣酸含量的不确定度评定[J]. 中国药业, 2023, 32(23): 92-95.

[11] 曹富宁, 岳进, 罗远, 等. 芪七连胶囊两种不同制备工艺对剂型成型的影响及药效评价研究[J]. 中医药导报, 2024, 30(07): 60-63.

[12] 王楚盈, 刘婧, 康爽, 等. 新加香需颗粒制备及质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(07): 1643-1648.

[13] 杨跃龙, 龚力民. 黄精中多糖的含量不确定度评定[J]. 中国处方药, 2023, 21(07): 35-38.

[14] 江涛, 周颐, 王璐璐. 养心颗粒的制备及成型工艺的优化[J]. 华西药学杂志, 2023, 38(04): 366-370.

[15] 占爱华, 方丽君, 涂远镇, 等. 归芪养血止痒颗粒剂制备工艺及质量标准研究[J]. 临床医药实践, 2024, 33(09): 686-691.

[16] 李瑞林. 微波真空干燥机干燥中药颗粒剂的工艺研究[J]. 新疆中医药, 2021, 39(04): 78-80.

[17] 潘志文, 黄婉锋, 钱鑫, 等. 基于超高效液相色谱串联质谱法特征肽检测技术的阿胶鉴别与 6 种动物源性成分检查[J]. 中国药业, 2024, 33(11): 79-83.

[18] 赵玉泉. 不确定度评定在六味地黄丸(浓缩丸)中丹皮酚含量测定中的应用[J]. 江西中医药大学学报, 2023, 35(02): 85-88.

[19] 黄柳娟, 王红梅, 邵毅. 灵芝破壁孢子粉中粗多糖含量测定的不确定度评估及控制[J]. 上海农业学报, 2023, 39(02): 88-94.