

复方板蓝根颗粒乙醇残留量测定及不确定度评定

郑露盼, 张继红*, 方文超, 何亚芬

上饶市检验检测认证院, 上饶 334000

摘要: **目的** 旨在建立复方板蓝根颗粒中乙醇残留量的顶空-气相色谱测定方法, 评定其测量结果的不确定度。**方法** 采用顶空-气相色谱法, 对乙醇残留量进行测定, 分析不确定度来源。根据 RB/T 030—2020《化学分析中测量不确定度评估指南》和 GB/T 27418—2017《不确定度评定方法与表示》进行不确定度评定, 计算合成不确定度、扩展不确定度及报告结果。**结果** 50 批次样品中均检出乙醇, 随机抽取 1 批次样品进行评定, 结果显示乙醇残留量合成标准不确定度为 0.000164%, 扩展不确定度为 0.000328%。气相色谱法测定复方板蓝根颗粒中乙醇残留量测定结果表示为 $0.0152\% \pm 0.000328\%$, $k=2$ 。**结论** 本文建立的顶空气相色谱法测定乙醇残留量, 并对各不确定度分量评定, 结果显示对检测结果有较大影响的因素主要有测量重复性、对照品溶液的配制和样品的称量等。其次为实验方法, 实验人员及气相色谱仪引入的不确定度。为提高乙醇残留量检测结果的准确度及可信度提供参考。**关键词:** 顶空-气相色谱法; 乙醇残留量; 不确定度评定

0 引言

复方板蓝根颗粒由板蓝根和大青叶两味药组成经水提醇沉法制得。在整个制备工艺流程中, 使用了大量的乙醇溶剂, 容易导致乙醇残留。乙醇为药品生产质量管理规范(GMP)或其他基本的要求限制使用的溶剂, 是药品安全性控制指标^[1-2]。因此对复方板蓝根颗粒中乙醇残留量的限制对其质量控制具有重要意义。测量不确定度是表征测量结果可信程度的参数之一, 反应出测量结果的分散性。评定测量结果的不确定度有利于发现测量过程中误差的主要来源, 从而采取一定措施减少误差, 以便提高检测结果的准确性。本文根据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》、RB/T 030—2020《化学分析中测量不确定度评估指南》和 GB/T 27418—2017《不确定度评定方法与表示》等相关要求, 统分析复方板蓝根颗粒中乙醇残留量的不确定度来源, 进行科学评估, 为提高复方板蓝根颗粒乙醇残留量检测结果的准确性提供可靠的数据支持^[3-5]。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 8860 气相色谱仪(美国安捷伦公司, 氢火焰离子化检测器(FID), 配标准 20 mL 顶空瓶的 Agilent 7697A); Agilent 7890A 气相色谱仪(美国安捷伦公司, 氢火焰离子化检测器(FID)及数据处理系统, 配标准 20 mL 顶空瓶的 Agilent 7694E 进样器); MSE125P-ICE-DU 型电子天平(德国 Sartorius 公司); FA2204B 电子天平(上海天美天平仪器有

限公司); DURABOND-624 气相色谱柱(美国安捷伦公司, $30\text{ m} \times 0.530\text{ mm} \times 3.00\text{ }\mu\text{m}$)。

1.2 试剂

乙醇对照品(购自中国食品药品检定研究院, 批号 130106-202105, 按乙醇 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ 计, 含量为 100.0%); N,N-二甲基乙酰胺(DMAC)(西陇科学股份有限公司, 含量均 $\geq 99.9\%$, 色谱纯); 复方板蓝根颗粒 50 批次样品(涉及 22 家企业); 溶剂 I 为 [DMAC: 水(1:1)]。

1.3 方法

1.3.1 气相色谱条件

色谱柱: 以 6%(V/V) 氰丙基苯基-94%(V/V) 二甲基聚硅氧烷为固定相, 毛细管柱为 DURABOND-624 ($30\text{ m} \times 0.530\text{ mm} \times 3.00\text{ }\mu\text{m}$); 柱温: 初温 40°C , 保持 2 min, 按照 $3^\circ\text{C}/\text{min}$ 将温度提升至 65°C , 然后按 $25^\circ\text{C}/\text{min}$ 进一步将温度提升至 200°C , 10 min 内保持不变; 流速: 2.0 mL/min; 顶空进样参数: 顶空瓶平衡温度 90°C ; 顶空循环时间 30 min; 进样持续时间 1 min; 平衡时间 30 min; 定量环温度 105°C ; 传输线温度 110°C ; 进样量 1 mL。

1.3.2 溶液的配制

对照品溶液的配制: 精密称取乙醇对照品 100 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加溶剂 I 至刻度, 摇匀。精密量取 5 mL, 转移置 20 mL 顶空瓶内至底部, 缓慢摇晃, 密封, 即得。

供试品溶液的配制: 取复方板蓝根颗粒研细, 精密称取 1 g, 转移置 20 mL 顶空瓶内至底部, 添加溶剂 I 5 mL, 密封, 缓慢摇晃直至无固体残留, 备用。

基金项目: 江西省药品监督管理局科研项目(2022JS22)

第一作者: 郑露盼, 助理工程师, 检验员, 研究方向为食品药品质量标准研究。

* 通信作者: 张继红, 硕士, 副主任药师, 研究方向为食品药品质量标准研究。E-mail: 149747048@qq.com

空白溶液的配制: 精密量取 5 mL 溶剂 I, 转移置 20 mL 顶空瓶内至底部, 密封, 即得。

1.3.3 数学模型

复方板蓝根颗粒中乙醇残留量按式(1)及式(2)计算:

$$f = \frac{m_R \times M\%}{A_R \times V_R} \quad (1)$$

$$C_X = \frac{f \times A_X}{W_X \times 1000} \times 100\% \quad (2)$$

式中 f 为校正因子; m_R 为乙醇对照品取样量 (mg); $M\%$ 为乙醇对照品百分含量 (%); A_R 为对照品溶液中乙醇的峰面积; V_R 为对照品定容体积 (mL); C_X 为复方板蓝根颗粒中乙醇的含量 (%); A_X 为样品中乙醇峰面积; W_X 为样品的取样量 (g); 1000 为单位换算。

1.3.4 不确定度来源分析

根据数学模型, 结合 RB/T 030—2020《化学分析中测量不确定度评估指南》和 GB/T 27418—2017《不确定度评定方法与表示》的相关规定, 可以将测定复方板蓝根颗粒乙醇残留量不确定度来源归纳为样品溶液制备, 对照品溶液制备, 样品测定重复性等, 具体分量表述及模型有以下几方面:

样品称量引入的相对标准不确定度 $\mu_{\text{rel}}(m)$; 对照品溶液配制引入的相对不确定度 $\mu_{\text{rel}}(R)$, 其中包括对照品称量的相对标准不确定度 $\mu_{\text{rel}}(m_R)$, 容量瓶引入的相对标准不确定度 $\mu_{\text{rel}}(V_R)$, 移液管引入标准不确定度 $\mu_{\text{rel}}(U_R)$, 温度引入相对标准不确定度 $\mu_{\text{rel}}(V_t)$; 实验方法、人员及仪器引入的相对标准不确定度, 数学模型依次为 $\mu_{\text{rel}}(S_f)$ 、 $\mu_{\text{rel}}(S_r)$ 及 $\mu_{\text{rel}}(S_y)$; 样品重复性测定引入的相对标准不确定度 $\mu_{\text{rel}}(\text{rel})$ ^[6-8]。

2 结果与分析

2.1 样品中乙醇残留量的测定

按 1.3 项下的方法, 对 22 家企业生产的 50 批样品进行乙醇残留量的测定。结果发现, 50 批次样品中均检出乙醇残留, 含量为 0.0027%~0.15%。根据《中华人民共和国药典》四部通则 0861 残留溶剂乙醇限度为 0.5%, 50 批次样品乙醇残留量均在限度范围内。其中只有 1 家企业生产 2 批次样品乙醇残留量大于 0.1%。

2.2 不确定度的评定

2.2.1 样品称量引入的不确定度分量

使用万分之一电子分析天平称量样品 1 g (精确值 0.0001 g), 称量过程中产生的不确定度主要来自自身存在的系统误差。由电子天平检定证书得天平的最大允许差为 $\mu=0.002$ g, 定于矩形分布, $k=\sqrt{3}$, 则样品称量的标准不确定度为 $\mu(m)=\frac{\mu}{\sqrt{3}}=\frac{0.002}{\sqrt{3}}=0.00115$, 样品称量的相对标准不确定度

$$\text{分量为 } \mu_{\text{rel}}(m)=\frac{\mu(m)}{m}=\frac{0.00115}{1.0}=0.00115。$$

2.2.2 对照品引入的不确定度分量

根据 1.3.2 中分析, 对照品引入的不确定度主要由对照品称量、容量瓶定容和移液管稀释三方面引入的不确定度分量组成。

(1) 对照品称量引入的不确定度分量

精密称取乙醇对照品 100 mg (精确值 0.00001 g) 由电子天平

检定证书得天平的最大允许差为 $\mu=0.0002$ g, 定于矩形分布, $k=\sqrt{3}$, 乙醇对照品前后称取了两次, 则对照品称量的标准不确定度为:

$$\mu(m_R)=\sqrt{2 \times \left(\frac{\mu}{\sqrt{3}}\right)^2}=\sqrt{2 \times \left(\frac{0.0002}{\sqrt{3}}\right)^2}=0.000163$$

对照品称量的相对标准不确定度分量:

$$\mu_{\text{rel}}(m_R)=\frac{\mu(m_R)}{m_R}=\frac{0.000163}{0.1}=0.00163$$

(2) 容量瓶定容引入的不确定度分量

乙醇对照品溶液由 100 mL, A 级单标线容量瓶定容, 据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》规定, 其允许差 μ 为 ± 0.1 mL。欧洲分析化学中心 (EURACHEM) 认为 A 级 100 mL 单标容量瓶服从三角分布, 则 $k=\sqrt{6}$, 由此引入的标准不确定度 $\mu(V_R)=0.00333$, 容量瓶的相对标准不确定度分量 $\mu_{\text{rel}}(V_R)$ 为 0.0000333。

(3) 移液管稀释引入的不确定度分量

据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》规定, 5 mL 移液管允许差为 ± 0.05 mL。假定服从三角分布, 则 $k=\sqrt{6}$, 由此可知移液管引入的不确定度分量 $\mu(U_R)=0.0204$, 移液管的相对标准不确定度分量 $\mu_{\text{rel}}(U_R)$ 为 0.00408。

(4) 温度引入的不确定度分量

根据玻璃量器检定规程可知, 容量瓶及移液管校准在 20°C 进行, 实验室环境温度波动为 $\pm 5^\circ\text{C}$ 。在 20°C 温度下玻璃的体积膨胀系数为 $2.5 \times 10^{-5} \text{C}^{-1}$, 假定温度变化是矩形分布的设定计算, 其相对标准不确定度为:

$$\mu_{\text{rel}}(V_t)=\frac{5 \times 2.5 \times 10^{-5}}{\sqrt{3}}=0.0000722$$

合成对照品引入的相对标准不确定度为:

$$\mu_{\text{rel}}(R)=\sqrt{[\mu_{\text{rel}}(m_R)]^2 + [\mu_{\text{rel}}(V_R)]^2 + [\mu_{\text{rel}}(U_R)]^2 + 2 \times [\mu_{\text{rel}}(V_t)]^2} = 0.004395$$

2.2.3 实验方法、人员及仪器引入的不确定度分量

本文采用的是外标法(方法 1)计算乙醇的残留量, 参考《中华人民共和国药典》四部通则 0711 乙醇量测定方法内标法^[9](方法 2), 同时对同一样品测定 5 次。分别计算合并标准偏差 S_f 及相对标准不确定度。同法分别计算实验人员及仪器引入的不确定度如表 1 所示。

$$S_f = \sqrt{\frac{S_1^2 \times (n-1) + S_2^2 \times (n-1)}{(n-1) + (n-1)}} = \sqrt{\frac{0.000335^2 \times 4 + 0.000497^2 \times 4}{8}} = 0.000424$$

则实验方法引入的相对标准不确定度为:

$$\mu_{\text{rel}}(S_f) = S_f \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n}} = 0.000424 \times \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{5}} = 0.000268$$

2.2.4 重复性确定引入的不确定度分量

重现性的不确定度通常是在相同条件下对同一样品进行多次测量时所得的测量结果之间的离散程度。其来源主要是实验方法、人员操作、样品自身的均匀性及仪器的性能等导致的峰面积的变动。由此可见, 很难精确的评估不确定度, 因此以 A

类评估为主^[10-11]。样品平行测定10次,测得平均值为 $\bar{x}=0.0152\%$ 。以 \bar{x} 为最终测量结果。根据计算结果计算引入的不确定度 $\mu(\text{rel})$:

表1 实验方法、实验人员及仪器引入的不确定度结果

| | 标准偏差 S | n | 合并标准偏差 | 相对标准不确定度 |
|---------------|----------|-----|---------|----------|
| 人员 A | 0.000335 | 5 | 0.0003 | 0.000192 |
| 人员 B | 0.00027 | 5 | | |
| Agilent 8860 | 0.000335 | 5 | 0.00026 | 0.000165 |
| Agilent 7890A | 0.000152 | 5 | | |
| 方法 1 | 0.000335 | 5 | 0.00042 | 0.000268 |
| 方法 2 | 0.000497 | 5 | | |

$$\mu(\text{rel}) = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} = 0.000148$$

则重复性引入的相对标准不确定度为:

$$\mu_{\text{rel}}(\text{rel}) = \frac{\mu(\text{rel})}{\bar{x}} = \frac{0.000148}{0.0152} = 0.00974$$

2.2.5 合成相对标准不确定度

标准不确定度分量的 A 类评定是对被测样品进行独立重复测定得到的系列测定值,根据的是频数分布,用统计方法获得试验标准偏差,而 B 类评定根据的是先验分布,是根据有关信息,判定测定值的可能值区间和概率分布。因此将各分量引入的相对标准不确定度分类汇总列于表 2。

表2 不确定度分量汇总表

| 相对标准不确定度分量 | 不确定度来源 | 相对标准不确定度 | 分类 |
|--------------------------------|-----------------|----------|----|
| $\mu_{\text{rel}}(m)$ | 样品质量 | 0.00115 | B |
| $\mu_{\text{rel}}(R)$ | 对照品质量、定容体积及实验温度 | 0.004395 | B |
| $\mu_{\text{rel}}(S_p)$ | 实验方法 | 0.000268 | A |
| $\mu_{\text{rel}}(S_r)$ | 实验人员 | 0.000192 | A |
| $\mu_{\text{rel}}(S_y)$ | 气相色谱仪 | 0.000165 | A |
| $\mu_{\text{rel}}(\text{rel})$ | 样品重复测定 | 0.00974 | A |

根据上表数据,合成复方板蓝根颗粒乙醇残留量的相对标准不确定度 $\mu_{\text{rel}}(W)=0.0108$,则乙醇残留量标准不确定度 $\mu(W)$ 为0.000164%。

2.2.6 扩展不确定度及结果报告

测量误差在服从正态分布情况下,包含因子 $k=2$,置信区间为95%,将合成标准不确定度乘以包含因子,得到扩展不确定度,所以乙醇残留量的扩展不确定度为:

$$U = k \times \mu(w) = 0.000328\%$$

结果表达为:气相色谱法测定复方板蓝根颗粒中乙醇残留量测定结果表示为 $(0.0152 \pm 0.000328)\%$, $k=2$ 。

3 讨论与结论

通过顶空-气相色谱法对复方板蓝根颗粒中乙醇残留量的测定,结果50批次样品均检出乙醇,含量在0.0027%~0.15%之间。其中只有1家企业生产的2批次样品乙醇残留量大于0.1%。虽然符合《中华人民共和国药典》残留溶剂乙醇的限

度标准,但是该样品可通过感官闻出略有乙醇气味。对于部分乙醇过敏体质人员服用该药品后,存在引发相关过敏反应的风险。故结合复方板蓝根颗粒的制备工艺,分析该企业的回收乙醇工艺需进一步优化,以减少制剂中乙醇的残留。

为确保乙醇残留量检测结果的准确信,必须实验过程中潜在的误差源进行细致分析,并评估他们对检测结果的综合影响。本文根据RB/T 030—2020《化学分析中测量不确定度评估指南》和GB/T 27418—2017《不确定度评定方法与表示》规定的方法和流程,对实验过程中不确定度来源细致分析,发现对检测结果影响占比最大的是样品的称量和测量重复性引入的不确定度分量,对照品溶液的配制与样品的称量引入的不确定度分量也应引起高度重视。因此,在实验过程中,应当充分混合样品,增加样品平行实验次数。选择精密度高,稳定性好且经过校准的分析仪器设备。在对照品溶液配制中,使用检定合格有效、经过不确定度评定和精度较高的计量器具。同时,应控制好实验环境温度,以减少环境温度对实验结果带来的不确定度。以此来降低随机误差的影响,以提高检测结果的可靠性,确保检测结果的有效性,从而提高检测数据的准确性。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制剂: 第十二册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: Z12-122.
- [2] 胡青, 程益清, 曹帅, 等. 复方板蓝根颗粒物质基础研究及其整体质量评价 [J]. 中成药, 2023, 45(10): 3194-3199.
- [3] 国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家计量检定规程. 常用玻璃量器: JJG 196—2006 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
- [4] 国家认证认可监督管理委员会. 中华人民共和国认证认可行业标准. 化学分析中测量不确定度评估指南: RB/T 030—2020 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2020.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家标准. 测量不确定度评定与表示: GB/T 27418—2017 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2017.
- [6] 余红, 何亚芬, 张继红, 等. 顶空-气相色谱法同时测定维生素 B1 片中 9 种溶剂残留量 [J]. 药品评价, 2024, 21(02): 143-146.
- [7] 陈肇娜, 李丝红, 吴丽荣, 等. 气相色谱法测定藿香正气水中乙醇量的不确定度评定 [J]. 山西化工, 2024, 44(10): 82-84, 93.
- [8] 李昱霖, 杨乃蒙, 李海霞, 等. 顶空-气相色谱法测定植物油中溶剂残留的不确定度评估 [J]. 中国标准化, 2024, (22): 199-204.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 116-120.
- [10] 黎俊威, 卢迪勋, 苏君梅, 等. 高效液相色谱-柱后光化学衍生法测定食品中黄曲霉毒素的不确定度评定 [J]. 食品安全导刊, 2024, (33): 58-63.
- [11] 郭巧云, 龚子珊, 谢鑫宝, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定保健食品中西地那非的不确定度评估 [J]. 廊坊师范学院学报 (自然科学版), 2024, 24(04): 82-88.