

高效液相色谱法在肠炎宁颗粒中活性成分含量测定的优化策略及不确定度评估

王雪芹*

(海南省检验检测研究院, 海口 570000)

摘要: 目的 本研究旨在通过优化高效液相色谱 (HPLC) 技术, 提高肠炎宁颗粒中活性成分含量测定的准确性和可靠性, 并全面评估测定结果的不确定度。**方法** 本研究采用 Agilent 1260 HPLC 系统, 通过优化色谱条件如流动相比例、检测波长、色谱柱温度和溶剂等, 对肠炎宁颗粒中的没食子酸活性成分进行含量测定。同时, 建立数学模型, 量化仪器误差、操作误差、样品制备误差等多个不确定度来源。**结果** 优化后的色谱技术显著提高了肠炎宁颗粒中活性成分的检测灵敏度和准确性。没食子酸的含量为 27.5 mg, 色谱峰峰形对称, 分离度和理论板数均达到理想水平。不确定度分析表明, 总不确定度较小 ($U_{\text{total}}=5.40\%$), 表明优化后的色谱技术具有较高的可靠性。**结论** 本研究成功优化了肠炎宁颗粒含量测定的 HPLC 方法, 通过对不确定度的全面评估, 证明了该方法的准确性和可靠性。这为肠炎宁颗粒的质量控制提供了一种更为精确和可靠的分析手段, 同时也为中药制剂现代化分析提供了新的方法论。

关键词: 肠炎宁颗粒; 高效液相色谱; 含量测定; 不确定度分析; 中药制剂质量控制

Optimization strategies and uncertainty assessment of high performance liquid chromatography method for determination of active components in Enteritis Ning Granules

WANG Xue-Qin*

(Hainan Inspection and Testing Research Institute, Haikou 570000, China)

ABSTRACT: Objective This study aims to improve the accuracy and reliability of the determination of active ingredient content in Enteritis Ning Granules by optimizing high-performance liquid chromatography (HPLC) technology, and comprehensively evaluate the uncertainty of the determination results. **Methods** In this study, the Agilent 1260 HPLC system was used to determine the content of gallic acid active ingredient in Enteritis Ning Granules by optimizing chromatographic conditions such as mobile phase ratio, detection wavelength, column temperature, and solvent. At the same time, establish mathematical models to quantify multiple sources of uncertainty such as instrument errors, operational errors, and sample preparation errors. **Results** The optimized chromatographic technique significantly improved the sensitivity and accuracy of detecting active ingredients in Enteritis Ning Granules. The content of gallic acid is 27.5 mg, the chromatographic peak shape is symmetrical, and the separation degree and theoretical plate number have reached the ideal level. The uncertainty analysis shows that the total uncertainty is small ($U_{\text{total}}=5.40\%$), indicating that the optimized chromatographic technique has high reliability. **Conclusion** This study successfully optimized the HPLC method for determining the content of Enteritis Ning Granules, and demonstrated the accuracy and reliability of the method through a comprehensive evaluation of uncertainty. This provides a more accurate and reliable analytical method for the quality control of Enteritis Ning Granules, and also offers a new methodology for the modernization analysis of traditional Chinese medicine preparations.

KEY WORDS: Enteritis Ning Granules; high performance liquid chromatography (HPLC); content determination; uncertainty analysis; quality control of traditional Chinese medicine preparations

* 通信作者: 王雪芹, 制药工程师, 研究方向为药品。E-mail: xueqin101@126.com

* Corresponding author: WANG Xue-Qin, Pharmaceutical Engineer, Hainan Inspection and Testing Research Institute, Haikou 570000, China. E-mail: xueqin101@126.com

0 引言

肠炎宁功能主治清热利湿,主要用于急慢性胃肠炎,腹泻,细菌性痢疾,小儿消化不良等。作为一种治疗消化系统疾病的中药制剂,肠炎宁颗粒成分含量的准确测定,对于药品疗效和质量的保证至关重要。传统的分析方法存在灵敏度不足和操作的复杂性等诸多限制,就此促进了对更为高效和精确的色谱技术的探索。高效液相色谱(HPLC)因其卓越的分辨率和灵敏度,成为本研究的优化对象。研究表明,通过对色谱条件进行精心优化,能够使肠炎宁颗粒中活性成分的检测效率和准确性得到显著提升。然而,色谱分析的高精密度同样带来了不确定度的考量,包括仪器误差、样品制备、操作技巧等多个方面,是这些不确定度的来源。在以往,关于肠炎宁颗粒的质量控制采用的是《中华人民共和国药典》推荐的高效液相色谱法(HPLC),此法应用梯度洗脱技术进行活性成分的定量分析^[1]。但值得注意的是,该传统方法操作复杂,耐用性不足,限制了其在肠炎宁颗粒质量控制中的应用^[2]。本文将对该品种含量测定进行质量分析与研究。本研究的目的是通过对肠炎宁颗粒没食子酸活性成分含量测定方法的优化,全面评估肠炎宁颗粒含量测定结果的不确定度,以建立一种更为精确和可靠的分析方法。这不仅对肠炎宁颗粒的质量控制具有重要意义,也能够提供出中药制剂现代化分析的新视角和方法论。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(HPLC)(Agilent 1260型号,安捷伦科技);紫外检测器(Agilent 1260 UV Detector型号,安捷伦科技);电子天平(CPA225D型号,赛多利斯生产);恒温水浴(DK-S28型号,上海精宏实验设备有限公司);超声波清洗器(KQ-250E型号,昆山舒美);Agilent Zorbax SB-C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,粒径5 μm,安捷伦公司);依利特 BDS C18色谱柱(依利特公司);YMC C18色谱柱(YMC公司)。

甲醇(色谱纯,Fisher Scientific);乙腈(色谱纯,Sigma-Aldrich);超纯水(Millipore);磷酸(分析纯,Merck)。

选用中国食品药品检定研究院提供没食子酸对照品,用于制备对照品溶液,进行定量分析。对照品溶液通过精确称量标准品,使用上述溶剂配制成一定浓度的溶液,用于色谱分析的校准和定量。样品溶液则是由正规药厂生产的肠炎宁颗粒样品,通过提取和稀释,制备成适合色谱分析的溶液。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液制备

用电子天平精密称取没食子酸对照品10 mg,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度线,摇匀,再精密量取1 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度线,摇匀即可。

1.2.2 样品溶液制备

精密称定本品细粉0.1 g,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解定容至刻度,超声20 min,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.2.3 色谱条件优化

选用Agilent Zorbax SB-C18色谱柱,选择270 nm作为紫外检测器的检测波长,柱温为30°C,进样量为10 μL。以乙腈作为流动相A,0.2%磷酸溶液作为流动相B,以表1中的程序进行洗脱。

表1 洗脱程序

Table 1 Elution procedure

时间(分钟)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~30	0	100
30~31	0~25	100~75
31~41	25	75
41~42	25~0	75~100
42~60	0	100

1.2.4 数学模型创建

C_{std} ——对照品浓度(μg/mL); V_{std} ——对照品稀释体积(mL); A_{std} ——对照品的色谱峰面积; C_{sample} ——样品浓度(μg/mL); V_{sample} ——样品溶液稀释体积(mL); A_{sample} ——样品色谱峰面积; σ_{std} ——标准品峰面积实验标准偏差; σ_{sample} ——样品峰面积的实验标准偏差; ΔV ——容量瓶定容时体积变化量(mL); 输出结果 U ——含量测定不确定度(%)。

模型(1)——活性成分的含量计算:

$$\text{含量} = \frac{(A_{sample} / W_{样}) \times V_{sample} \times \text{平均装量}}{(A_{std} / W_{标}) \times V_{std}} \times \text{对照品含量}(\%) \times 1000$$

模型(2)——不确定度计算:诸多分量构成不确定度,详细为标准品和样品体积变化不确定度、浓度称量不确定度、峰面积测量不确定度。结合不确定度构成原理,将总不确定度 U 表示:

$$U = \left\{ [U(A_{std})]^2 + [U(C_{std})]^2 + [U(V_{std})]^2 + [U(A_{sample})]^2 + [U(C_{sample})]^2 + [U(V_{sample})]^2 + [U(\Delta V)]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$U(A_{std})$ 和 $U(A_{sample})$ 代表标准品和样品峰面积不确定度,公式:

$$U(A_{std}) = \frac{\sigma_{std}}{\sqrt{n_{std}}}$$

$$U(A_{sample}) = \frac{\sigma_{sample}}{\sqrt{n_{sample}}}$$

n_{std} 和 n_{sample} 代表标准品、样品重复次数。

1.2.5 各不确定分量的量化方法

(1) 不确定度来源

U_{inst} ——色谱系统和天平误差引入的不确定度; U_{op} ——样品处理和色谱进样误差引入的不确定度; U_{prep} ——提取和稀释过程中误差引入的不确定度; U_A ——色谱峰面积重复性误差引入的不确定度; U_{conc} ——标准品和样品浓度称量误差引入的不确定度; U_{vol} ——容量瓶定容时体积变化误差引入的不确定度。

(2) 量化方法

设备误差: $U_{inst} = k_{inst} \times \frac{\sigma_{inst}}{\sqrt{n_{inst}}}$

n_{inst} ——仪器校准/测试次数; σ_{inst} ——仪器误差标准偏差; k_{inst} ——仪器误差系数。

操作误差: $U_{op} = k_{op} \times \frac{\sigma_{op}}{\sqrt{n_{op}}}$

n_{op} ——操作重复次数; σ_{op} ——操作误差的标准偏差; k_{op} ——操作误差系数。

$$\text{样品制备误差: } U_{\text{prep}} = k_{\text{prep}} \times \frac{\sigma_{\text{prep}}}{\sqrt{n_{\text{prep}}}}$$

n_{prep} ——样品制备重复次数; σ_{prep} ——样品制备误差的标准偏差; k_{prep} ——样品制备误差系数。

$$\text{色谱峰面积测量误差: } U_A = \frac{\sigma_A}{\sqrt{n_A}}$$

σ_A ——色谱峰面积标准差; n_A ——色谱峰面积测量频次。

$$\text{浓度测量误差: } U_{\text{conc}} = k_{\text{conc}} \times \frac{\sigma_{\text{conc}}}{\sqrt{n_{\text{conc}}}}$$

n_{conc} ——称量次数; σ_{conc} ——浓度称量的标准偏差; k_{conc} ——浓度称量误差系数。

$$\text{体积变化误差: } U_{\text{vol}} = k_{\text{vol}} \times \Delta V$$

ΔV ——容量瓶定容时的体积变化量; k_{vol} ——体积变化误差系数。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化结果

样品分析图谱峰形分叉, 分析时间长, 检测效果不理想, 如下图 1。改变溶液配制溶剂为 50% 甲醇, 引用 50% 甲醇作为该实验溶剂, 按照 1.2.1 和 1.2.2 对照品和配制样品溶液, 以上文的色谱方法进样, 实验结果良好, 峰形尖锐对称, 理论塔板数、分离度均符合质量标准要求。

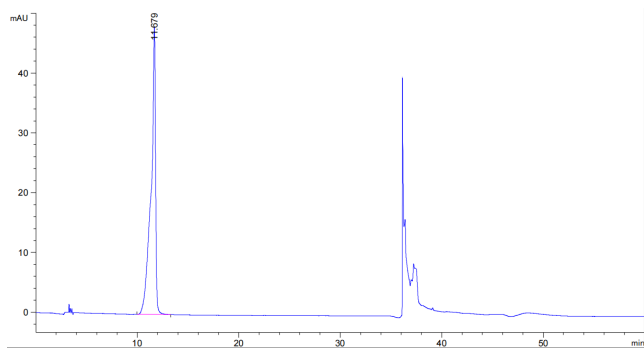


图 1 以甲醇为溶剂的对照品色谱图

Fig.1 Chromatogram of the reference substance with methanol as the solvent

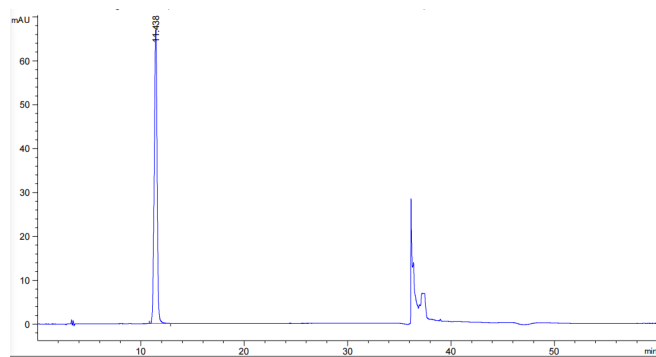


图 2 以 50% 甲醇为溶剂的对照品色谱图

Fig.2 The chromatogram of the reference substance using 50% methanol as the solvent

该肠炎宁颗粒质量标准的含量测定色谱分析条件梯度洗脱程序分析复杂, 时间长, 分离效果不佳, 现对该方法进行提高

并进行方法学研究。通过分析, 选用 Agilent Zorbax SB-C18 色谱柱, 选择 270 nm 作为紫外检测器的检测波长, 柱温为 30°C, 进样量为 10 μL 。以乙腈作为流动相 A, 0.2% 磷酸溶液作为流动相 B。

2.2 方法学验证

(1) 专属性: 按 1.2.1 和 1.2.2 项下配制样品溶液和对照品溶液, 精密量取样品溶液和对照品溶液按上述色谱条件进样测定, 样品和对照品溶液在相同时间有相对应的色谱峰, 无杂质干扰, 理论塔板数和分离度符合标准要求。

(2) 含量测定: 按 1.2.3 项色谱条件, 处理 1.2.2 项和 1.2.1 项的样品溶液和对照品溶液上机, 含量测定没食子酸平均含量为 27.5 mg 证实肠炎宁颗粒中活性成分没食子酸的浓度, 针对品的疗效和质量控制具有重要意义。为保证相关结果可靠度、精准性, 需要针对测试结果的准确度加以评价。结果证实, 重复性测试结果标准偏差 RSD 为 1.8%, 重复性良好; 稳定性测试显示主成分峰面积 RSD 为 2.4%, 溶液稳定性强; 颗粒样本加入对照品之后, 平均回收率达到 98.00%, RSD 为 1.9%, 方法准确性强。

(3) 重复性: 取本品细粉约 0.1 g, 精密称定, 共 6 份, 按 1.2.2 项和 1.2.1 项样品溶液和对照品溶液规定处理, 以 1.2.3 项色谱条件进行分析, 主成分峰含量 RSD 为 1.8%, 表明该方法重复性较好。

(4) 加标回收率: 取本品细粉约 0.1 g, 精密称定, 共 6 份, 精密加入对照品溶液, 按 1.2.2 项制备样品溶液, 以 1.2.3 项色谱条件进样测定, 计算回收率。结果回收率为 98%, RSD 为 1.9%, 表明没食子酸回收率良好。

(5) 稳定性: 精密吸取 1.2.2 项的样品溶液适量, 按 1.2.3 项色谱条件, 于 0、2、4、6、8、12、24 h 上机, 主成分峰峰面积 RSD% 分别为 2.4%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

(6) 色谱柱耐用性: 选用 Agilent Zorbax SB-C18 色谱柱、依利特 BDS C18 色谱柱和 YMC C18 色谱柱, 按 1.2.1 项和 1.2.2 项制备的对照品和样品溶液, 参照 1.2.3 项色谱条件上机, 该主成分峰峰形均一致, 无杂质干扰, 主成分峰含量 RSD 为 2.1%, 表明该方法耐用性良好。

2.3 数学模型结果

$C_{\text{std}} = 40 \mu\text{g/mL}$; $V_{\text{std}} = 25 \text{ mL}$; $A_{\text{std}} = 1300$; $C_{\text{sample}} = 20 \mu\text{g/mL}$; $V_{\text{sample}} = 5 \text{ mL}$; $A_{\text{sample}} = 1950$; $\sigma_{\text{std}} = 1.2$; $\sigma_{\text{sample}} = 22$; $n_{\text{std}} = n_{\text{sample}} = 6$; $\Delta V = 0.1 \text{ mL}$ 。

结合数据, 计算不确定度分量, 可求出总不确定度为 5.40%

2.4 总不确定度结果

总不确定度 (U_{total}) 为体积变化误差系数, 公式为:

$$U_{\text{total}} = \sqrt{U_{\text{inst}}^2 + U_{\text{op}}^2 + U_{\text{prep}}^2 + U_A^2 + U_{\text{conc}}^2 + U_{\text{vol}}^2}$$

数据带入: $k_{\text{inst}} = 1.5$, $\sigma_{\text{inst}} = 0.002 \text{ mg}$, $n_{\text{inst}} = 5$, $k_{\text{op}} = 1.2$, $\sigma_{\text{op}} = 0.0005 \text{ mL}$, $n_{\text{op}} = 6$, $k_{\text{prep}} = 1.1$, $\sigma_{\text{prep}} = 0.001 \text{ mg}$, $n_{\text{prep}} = 6$, $\sigma_A = 5$, $n_A = 10$, $k_{\text{conc}} = 1.3$, $\sigma_{\text{conc}} = 0.0003 \text{ mg}$, $n_{\text{conc}} = 6$, $k_{\text{vol}} = 1.0$, $\Delta V = 0.05 \text{ mL}$ 。

结合数据, 能求出各不确定分量贡献, 得出总不确定度为 50.00%。

3 讨论与结论

3.1 色谱技术优化的效果

色谱技术在得到优化后使得肠炎宁颗粒中活性成分的检测灵敏度得到了显著提高。通过选择 270 nm 作为检测波长,能够对没食子酸等成分的色谱信号进行更准确地捕捉。在色谱图谱分析中,能够观察到色谱峰尖锐且对称,分离度和理论塔板数较好,表明对于这些成分,检测系统具有较高的响应。特别是,色谱峰面积的标准偏差较小,使得检测的高灵敏度得到了进一步证实。

色谱技术的优化不仅使灵敏度有所提高,还增强了测定的准确性。对色谱条件的精确控制,如流动相的组成、色谱柱的温度,溶剂的选用,能够使肠炎宁颗粒中活性成分的准确定量得以实现^[3-4]。数据表明,没食子酸的含量测定结果具有较高的一致性,这对色谱技术在优化后的定量分析可靠性做出了反映。优化后的色谱技术还能够使测定的重复性得到显著提高。在色谱图谱分析中,能够观察到不同批次样品的色谱峰面积具有高度的一致性,这表明在重复测定中色谱系统表现出了良好的稳定性。通过详细分析不确定度,能够对色谱技术的优化效果做出进一步验证。数据表明,总不确定度 U_{total} 较小,代表在肠炎宁颗粒含量测定中,优化后的色谱技术具有可靠性。例如,通过量化仪器误差、操作误差、样品制备误差等,能够对测定结果的不确定性进行更全面的评估,使结果的可信度有效提高。

3.2 不确定度分析的意义

通过对实验过程中的各种误差来源进行评估和量化,可以针对检测结果的准确性做出更客观的评价。例如,通过对总不确定度 U_{total} 的计算,能够使研究者和用户对测量结果的可信区间进行直观的了解,以对实验结果的精确度有一个明确的认识^[5]。

在本研究中,对仪器误差、操作误差、样品制备误差等多个因素进行了考虑。这种分析能够了解哪些因素对实验结果的影响最大提供帮助,以便有针对性地改进,使实验的准确性和重复性得到提高。通过分析不确定度,能够对实验设计进行优化,使不必要的变异减少,提高实验的效率。在样品制备的过程中,如果发现误差较大,可以通过对提取或稀释步骤进行改进来降低这一误差,使整体的实验性能得到提高^[6]。对于实验数据,不确定度分析能够使其解释的深度增加。不仅能够得到测量值,还能够确定测量值的可信度。这对于科学论文的撰写、药品质量标准的制定以及临床决策都具有重要价值。不确定度分析是国际实验室认证和药品注册过程中,针对测量方法有效性的重要评估标准之一。通过进行不确定度分析,研究结果更易于被国际同行接受,有助于使研究的国际影响力得到提升^[7-9]。不确定度分析能够提高科学研究的透明度。通过对不确定度的计算过程和结果进行公开,研究者可以使其工作的

严谨性和完整性得到展示,增强其他研究者和用户对研究结果的信任。

3.3 进一步研究的建议

在本研究中,通过色谱技术的优化,使得肠炎宁颗粒含量测定的灵敏度、准确性和重复性得到了显著提高。通过采用 LC-MS 等先进技术,实现检测灵敏度的继续提升,分析制剂的多重成分将成为可能。同时,减少不确定度将是研究的重点,这将通过改进样品处理和采用自动化技术来实现^[10]。针对优化后的方法,还将进行广泛验证,使其普适性和稳健性得以确保。

此外,针对新的色谱条件的探索以及先进数据处理技术的应用将使得分析能力得到进一步提高。快速检测方法的开发,将使效率得到提高,针对样品基质效应和评估方法的环境与成本效益进行考虑,将促进绿色化学实践。跨学科合作将使得对肠炎宁颗粒作用机制的理解得到加深,为其现代化和国际化提供推动。持续的技术创新将为肠炎宁颗粒的质量控制和临床应用提供坚实的科学基础。

参考文献

- [1] 谭林威,金辉辉,刘永祥,等.基于HPLC-Q-TOF-MS/MS技术快速分析肠炎宁片中主要化学成分[J].中草药,2020,51(16):4124-4132.
- [2] 何凤,严建良,吴孔松,等.HPLC法测定肠炎宁颗粒中芦丁、迷迭香酸的含量[J].海峡药学,2022,34(03):86-89.
- [3] 虞金宝,余良忠,李才堂,等.肠炎宁片的薄层色谱研究[J].时珍国医国药,2008,19(12):2894-2895.
- [4] 金辉辉,钱正,姚建标,等.基于多成分测定及特征图谱评价不同批次肠炎宁片质量[J].药物分析杂志,2020,40(12):2174-2185.
- [5] 邢占芬,成洪达,张平平.肠炎宁片高效液相色谱指纹图谱研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(11):1529-1532.
- [6] 李晶,李才堂,周国平,等.肠炎宁片定性定量方法研究[J].中国新药杂志,2010,19(01):68-71.
- [7] 吴育强,吴玉菡,林果,等.肠炎宁颗粒质量标准控制研究[J].中国医药导刊,2018,20(10):619-622.
- [8] 杨宪.中药复方五味肠炎宁治疗溃疡性结肠炎的药效评价与质量控制[D].重庆:重庆大学,2012.
- [9] 李江,吴溢威.HPLC测定肠炎宁口服液中没食子酸的含量[J].安徽中医学院学报,2008,27(03):48-50.
- [10] 谭怀美,周方勇,张文新.肠炎宁口服液质量标准研究[J].中国药业,2012,21(10):37-39.

作者简介

王雪芹,制药工程师,研究方向为药品。