

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.015

高效液相色谱法测定盐酸吗啉胍片含量及其不确定度评定

朱清丽¹, 李 鹏¹, 郭梦倩², 涂蓉荣¹

(1. 陕西省安康市食品药品检验检测中心, 陕西 安康 725000; 2. 陕西省安康市中心医院, 陕西 安康 725000)

摘要:目的 建立测定盐酸吗啉胍片含量的高效液相色谱法,并评定其不确定度。方法 色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液-甲醇(95:5, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 237 nm,柱温为 30℃,进样量为 20 μL。并通过建立此方法测定数学模型,分析测量过程,确定不确定度来源和合成不确定度(U_c)。结果 盐酸吗啉胍质量浓度在 2~20 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$, $n=6$),平均回收率为 100.72%, RSD 为 0.63% ($n=9$);样品含量测定结果低于现行紫外-可见分光光度法的测定结果,其 U_c 为 0.43%,扩展不确定度(U)为 0.86% ($k=2$)。结论 通过不确定度评定,相较样品现行标准检测方法,所建立的高效液相色谱法专属性更强、重复性更好、准确度更高,可用于盐酸吗啉胍片的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 盐酸吗啉胍片; 含量测定; 不确定度

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)18-0060-05

Content Determination of Moroxydine Hydrochloride in Moroxydine Hydrochloride Tablets by HPLC and Evaluation of Its Uncertainty

ZHU Qingli¹, LI Peng¹, GUO Mengqian², TU Rongrong¹

(1. Ankang Institute for Food and Drug Control, Ankang, Shaanxi, China 725000; 2. Ankang Central Hospital, Ankang, Shaanxi, China 725000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of moroxydine hydrochloride in Moroxydine Hydrochloride Tablets and evaluate its uncertainty. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.2 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution-methanol (95:5, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 237 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 20 μL. Through the establishment of this method, the mathematical model was determined, the measurement process was analyzed, and the source of uncertainty and combined uncertainty (U_c) were determined. **Results** The linear range of moroxydine hydrochloride was 2-20 μg/mL ($r=0.999\ 9$, $n=6$), the average recovery of moroxydine hydrochloride was 100.72% with RSD of 0.63% ($n=9$). The content of moroxydine hydrochloride in the sample determined by this method was lower than that determined by the current UV-VIS spectrophotometry, the U_c was 0.43% and the expanded uncertainty (U) was 0.86% ($k=2$). **Conclusion** Through the evaluation of uncertainty, the established HPLC method has stronger specificity, better repeatability and higher accuracy than the current standard determination method, it can be used for the quality control of Moroxydine Hydrochloride Tablets.

Key words: HPLC; Moroxydine Hydrochloride Tablets; content determination; uncertainty

盐酸吗啉胍片(又名病毒灵)现行标准^[1-2]采用紫外-可见分光光度(UV)法测定盐酸吗啉胍的含量。为

第一作者:朱清丽,女,大学本科,副主任药师,研究方向为化学药品检验与分析,(电子信箱)pialiuping521@163.com。

- Pharmacol, 2015, 10(3):639-644.
- [15] BYLUND D, NORSTRÖM SH, ESSÉN SA, et al. Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2007, 1176(1/2):89-93.
- [16] 何敏恒,李秀英,曾令浩,等. 同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法检测蜂蜜中泛酸含量[J]. 中国酿造,2015(4):157-160.
- [17] SHAKYA R, NAVARRE DA. Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography[J]. J Agr Food Chem, 2006, 54(15):5253-5260.
- [18] RICCIUTELLI M, MORETTI S, GALARINI R, et al. Identification and quantification of new isomers of isopropyl-malic acid in wine by LC-IT and LC-Q-Orbitrap[J]. Food Chem, 2019, 294:390-396.
- [19] 谢 玮,杨 涛,赵雯霖. 黑老虎籽功能成分分析及其应前景展望[J]. 食品研究与开发,2016,37(12):1-5.
- [20] 谢 玮,张贤贤,平永良. 黑老虎果实化学成分和生理活性研究进展[J]. 农产品加工,2017(2):71-72.
- [21] ESWARANANDAM S, HETTIARACHCHY NS, JOHNSON MG. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*[J]. J Sci Food, 2004, 69(3):FMS79-FMS84.
- [22] 王立霞,王 枫,陈 欣,等. 阿魏酸钠的心脑血管药理作用研究进展[J]. 中草药,2019,50(3):772-777.
- [23] 侯国军. 黄嘌呤类药物治疗支气管哮喘的疗效与安全性探讨[J]. 当代医学,2015,21(14):114-115.
- [24] 张 玉,董文婷,霍金海,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的广地龙化学成分分析[J]. 中草药,2017,48(2):252-262.

(收稿日期:2020-09-18;修回日期:2021-02-20)

了进一步提高检测标准,本研究中参考文献[3-8],建立了测定含量的高效液相色谱(HPLC)法。并根据李慎安《化学实验室测量不确定度》、倪育才《实用测量不确定度评定(第5版)》及参考文献[9-12]分析新建方法含量测定结果的不确定度,找出了不确定度的主要来源并判定所建方法测定结果的可信度。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2030型高效液相色谱仪(含紫外检测器、色谱工作站)、UV-2600型紫外分光光度计,均购自日本Shimadzu公司;Milli-Q Integral 5型超纯水一体机(德国默克密理博公司);AUW220D型电子分析天平(精度为十万分之一);KQ-250DE型超声波清洗仪(昆山市超声波仪器厂)。

1.2 试剂

盐酸吗啉胍片(山西太原药业有限公司,批号为191006,181102;山西津华晖星制药有限公司,批号为191113);盐酸吗啉胍对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100483-200402,含量100.00%);甲醇、磷酸二氢钾均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液-甲醇(95:5, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:237 nm;柱温:30℃;进样量:20 μL。

2.1.2 溶液制备

取盐酸吗啉胍对照品 50 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,作为对照品贮备液;精密量取 2 mL,置 200 mL 容量瓶中,加水定容,制成每 1 mL 中含 10 μg 的对照品溶液。取样品 20 片,研细,称

取适量,精密称定(约相当于盐酸吗啉胍 50 mg),置 100 mL 容量瓶中,加水适量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 20 min,加水定容,摇匀,滤过,精密量取续滤液 2 mL,置 100 mL 容量瓶中,加水定容,制成每 1 mL 中约含 10 μg 的供试品溶液。取按盐酸吗啉胍片处方工艺制备不含盐酸吗啉胍的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

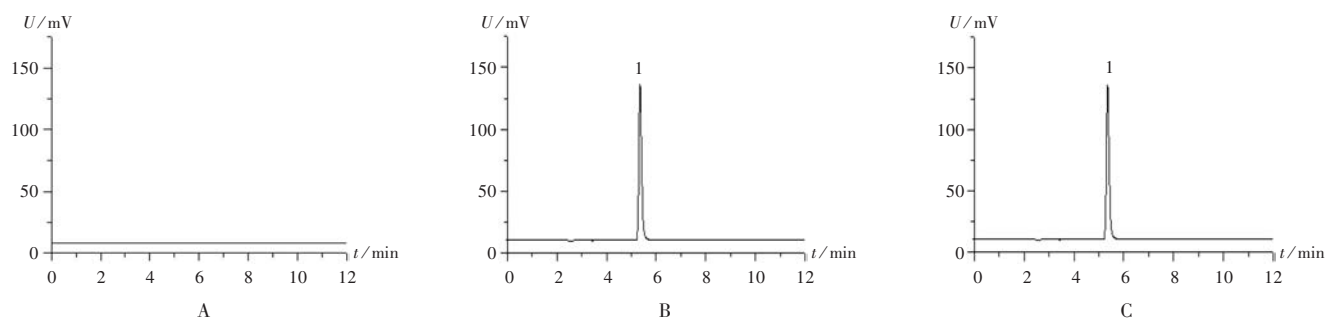
2.1.3 方法学考察

专属性与系统适用性试验:分别精密量取 2.2 项下 3 种溶液各 20 μL,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,阴性对照无干扰。分离度均大于 1.5,理论板数均大于 5 000。色谱图见图 1。

检测限与定量限考察:取 2.1.2 项下对照品溶液,逐级定量稀释后,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以信噪比(S/N)为 10:1 时的测得值为定量限,以 S/N 为 3:1 时的测得值为检测限,结果盐酸吗啉胍的定量限为 0.017 7 μg/mL,检测限为 0.005 78 μg/mL。

耐用性试验:取 2.1.2 项下对照品溶液及供试品溶液,分别在不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL/min)、不同柱温(30, 35, 40℃)、不同色谱柱(Phenomenex C₁₈柱, Agilent C₁₈柱, InertSustain C₁₈柱)下进样分析(均保持其余色谱参数不变),结果表明,流速、柱温或色谱柱发生一定程度改变时,本方法能满足试验要求,耐用性好。

线性关系考察:精密量取对照品贮备液 1, 3, 5, 7, 9, 10 mL,分别置 50 mL 容量瓶中,加水定容,摇匀;各精密量取 5 mL 置 50 mL 容量瓶中,定容,制成系列对照品溶液。各精密量取 20 μL,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以峰面积(Y)对质量浓度(X, μg/mL)进行线性回归,得回归方程 $Y = 89\,011.0X - 447.346$, $r = 0.999\,9$ ($n = 6$)。结果表明,盐酸吗啉胍质量浓度在 2~20 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。



1. 盐酸吗啉胍

A. 阴性对照品溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. moroxydine hydrochloride

A. Negative reference solution B. Reference solution C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

精密度试验:精密量取对照品溶液 20 μL ,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,重复进样 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.06% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为 191006)适量,依法制备供试品溶液,室温下放置 0,2,6,8,12,24 h,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.27% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

重复性试验:取样品(批号为 191006)粉末适量,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,分别精密量取 20 μL ,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果的 RSD 为 0.40% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为 191006)粉末适量,平行 9 份,精密称定,分别精密加入 2.1.2 项下对照品贮备液 8,10,12 mL,各 3 份,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,分别精密量取 20 μL ,并按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ($n=9$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
39.09	8.32	47.51	101.20		
39.09	8.32	47.56	101.80		
39.09	8.32	47.48	100.84		
39.09	10.40	49.58	100.87		
39.09	10.40	49.60	101.06	100.72	0.63
39.09	10.40	49.49	100.00		
39.09	12.48	51.66	100.72		
39.09	12.48	51.60	100.24		
39.09	12.48	51.54	99.76		

2.1.4 样品含量测定

取各批次样品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,各平行 4 份,分别精密量取 20 μL ,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算含量。结果平均含量为 97.29%,详见表 2。将表 2 数据与现行标准中的 UV 法的含量测定结果进行对比,结果批号为 191006,181102,191113 样品含量测定结果,UV 法均高于 HPLC 法(99.16% 比 96.98%,98.86% 比 96.99%,99.72% 比 97.89%)。

2.2 不确定度评定

2.2.1 模型计算方法

模型计算公式见式(1)和式(2),式中 $\bar{f}$ 为对照品的校正因子; $n=4$; m_R 为对照品的称样量(mg); P 为对照品的纯度; V_R 为对照品的稀释体积(mL); A_R 为对照品的峰面积; W 为盐酸吗啡标示百分含量(%); A 为样品的峰面积; $\bar{m}$ 为单片样品的平均质量(g); m 为样品取样量(g); V_1 为样品第 1 次稀释体积(mL); V_2 为移液

表 2 样品中盐酸吗啡含量测定结果 ($n=4$)

Tab. 2 Content determination of moroxydine hydrochloride in the samples ($n=4$)

批号	含量(%)	批号	含量(%)	批号	含量(%)
191006	96.69	181102	96.62	191113	97.63
191006	96.70	181102	96.59	191113	97.61
191006	97.21	181102	97.39	191113	98.15
191006	97.33	181102	97.37	191113	98.15

管的体积(mL); V_3 为样品第 2 次稀释体积(mL);100 为样品的规格(mg)。

$$\bar{f} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{m_R^i}{V_R A_R} \quad (1)$$

$$W = \frac{A \times \bar{m} \times \bar{f}}{m/V_1 \times V_2/V_3 \times 100} \times 100\% \quad (2)$$

2.2.2 主要来源

不确定度的主要来源包括随机效应与系统效应导致的分量。随机效应导致的分量有人员的操作分散性,仪器的稳定性、重复性,试样制备处理及环境等若干随机效应引入的不确定度。系统效应导致的分量有仪器、玻璃量器的允许误差,对照品的纯度及试验温度等由系统效应引入的不确定度。新建方法测量结果的不确定度主要来源有人员操作偏向性,试样制备处理,仪器测量的稳定性、重复性,天平、玻璃量器最大允许误差,环境温度等。

2.2.3 分量计算

1) 重复性

把整个检测过程中随机效应导致的分量,如人员操作偏向性,试样制备处理,仪器测量的稳定性、重复性等随机效应带来的不确定度分量的分析,以重复性表示。取本实验室内 4 名实验人员按新建方法及测量条件检测盐酸吗啡片含量的试验结果 20 份,根据测量结果计算其残差 V_k ,详见表 3。计算出合并样本标准偏差 S_p 。20 份样品的平行试验结果差值的平均值为:

$$\bar{\Delta} = \frac{1}{20} \sum_{k=1}^{20} \Delta_k = \frac{6.52\%}{20} = 0.33\%$$

按贝赛尔公式计算标准差 $s(\Delta_k)$:

$$s(\Delta_k) = \sqrt{\sum_{k=1}^{20} V_k^2 / (20-1)} = 0.048$$

合并样本标准差: $S_p = S(\Delta_k) / \sqrt{2} = 0.0339$ 。

平行试验 2 次的平均值 q 的重复性标准偏差:

$$s(q) = S_p / \sqrt{2} = 0.024\%。$$

自由度: $v = m - 1 = 19$, $W = 97.63\%$ 。则其相对标准不确定度为: $u(rep) = s(\bar{q}) / \bar{W} = 2.46 \times 10^{-4}$ 。

表3 样品的测量结果和残差计算

Tab. 3 Results of content determination of moroxydine hydrochloride in the samples and calculation of its residual error

序号	测量结果(%)		残差计算		
	q_1	q_2	$\Delta k(\%)$	$V_k(\%)$	V_k^2
1	96.69	97.27	0.58	0.25	0.062 5
2	96.60	97.38	0.78	0.45	0.202 5
3	97.62	98.15	0.53	0.20	0.040 0
4	96.70	97.09	0.39	0.06	0.003 6
5	96.23	96.73	0.50	0.17	0.028 9
6	97.14	97.03	0.11	0.22	0.048 4
7	96.01	96.15	0.14	0.19	0.036 1
8	97.20	96.96	0.24	0.03	0.000 9
9	98.00	97.98	0.02	0.31	0.096 1
10	96.13	95.79	0.34	0.01	0.000 1
11	95.47	96.00	0.53	0.20	0.040 0
12	98.33	98.12	0.21	0.12	0.014 4
13	101.26	100.98	0.28	0.05	0.002 5
14	96.85	96.42	0.43	0.10	0.010 0
15	100.07	100.36	0.29	0.04	0.001 6
16	97.77	98.05	0.28	0.05	0.002 5
17	96.03	95.78	0.25	0.08	0.006 4
18	100.41	100.06	0.35	0.02	0.000 4
19	97.33	97.27	0.06	0.27	0.072 9
20	99.84	100.05	0.21	0.12	0.014 4

注: $\Delta k = |q_1 - q_2|$; $\bar{\Delta} = \frac{1}{20} \sum_{k=1}^{20} \Delta k$; $V_k = |\Delta k - \bar{\Delta}|$ 。

Note: $\Delta k = |q_1 - q_2|$; $\bar{\Delta} = \frac{1}{20} \sum_{k=1}^{20} \Delta k$; $V_k = |\Delta k - \bar{\Delta}|$ 。

2) 对照品溶液校正因子(f)的不确定度分析

(1) 对照品取样量的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(m_R)$: 称量所使用的天平为万分之一及十万分之一双量程电子天平, 在 $d = 0.01 \text{ mg}$ 档, 检定证书给出天平示值误差为 0.03 mg , 按矩形分布, $u(m_R) = 0.03 \text{ mg} / \sqrt{3} = 0.017 \text{ mg}$, 采用减重法称定质量, 则天平校准的标准不确定度为 $\sqrt{2 \times 0.017^2} = 0.024$ 。对照品称定质量为 10.41 mg , 则 $u_{\text{rel}}(m_R) = 0.024 / 10.41 = 0.002 3$ 。

(2) 对照品稀释体积的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_R)$: ①第1次, 试验中应选用检定为A级的容量瓶进行定量分析。A级的 100 mL 容量瓶最大允许误差为 $\pm 0.10 \text{ mL}$, 按矩形分布, $u_1(V_{R1}) = 0.10 \text{ mL} / \sqrt{6} = 0.041 \text{ mL}$; 本试验中温度为 23°C , 校准温度为 20°C , 按矩形分布, 则 $u_2(V_{R1}) = 100 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3} = 0.036 \text{ mL}$ 。则 $u_{\text{rel}}(V_{R1}) = \sqrt{0.041^2 + 0.036^2} = 5.46 \times 10^{-4}$ 。②第2次, A级的 5 mL 单标线移液管最大允许误差为 $\pm 0.015 \text{ mL}$, 按矩形分布, $u_1(V_{R2}) = 0.015 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0.009 \text{ mL}$;

环境温度变化对玻璃仪器带来影响, 移液管的校准温度为 20°C , 本试验中温度为 23°C , 则由此产生的体积变化分散区间半宽 $a = 5 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} \text{ mL}$, 按矩形分布, 则 $u_2(V_{R2}) = 0.003 \text{ mL}$ 。则 $u_{\text{rel}}(V_{R2}) = \sqrt{0.009^2 + 0.003^2} / 5 = 1.90 \times 10^{-3}$ 。③第3次, A级的 50 mL 容量瓶最大允许误差为 $\pm 0.05 \text{ mL}$ 。参照第1次稀释评定, 则 $u_{\text{rel}}(V_{R3}) = \sqrt{0.03^2 + 0.018^2} / 50 = 7.00 \times 10^{-4}$ 。

(3) 对照品峰面积的不确定度 $u_{\text{rel}}(A_R)$: 使用的高效液相色谱仪为自动进样系统, 其进样体积带来的不确定度可忽略不计。2份对照品平行进样2次, 峰面积分别为 $926\ 563, 926\ 714, 942\ 352, 942\ 766$, 平均值分别为 $926\ 638.5$ 和 $942\ 559$, 采用极差法评定, R 分别为 $151, 414$, 查表, $n = 2$ 时, 得极差系数 $C = 1.13$, 则 $s(A)$ 分别为 133.628 和 366.372 , 则

$$u(A) = \sqrt{(133.628^2 + 366.372^2) / 2} = 275.76$$

$$u_{\text{rel}}(A_R) = 275.76 / 934\ 598.75 = 0.000\ 30$$

(4) 对照品校正因子(f)的合成不确定度: $U_{\text{rel}}(\bar{f}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(m_R) + u_{\text{rel}}^2(V_{R1}) + u_{\text{rel}}^2(V_{R2}) + u_{\text{rel}}^2(V_{R3}) + u_{\text{rel}}^2(A_R)} = 3.13 \times 10^{-3}$ 。对照品由中国食品药品检定研究院提供, 含量为 100% , 其带来的不确定度可忽略不计。天平称量与稀释体积测量的重复性, 已纳入1)重复性评定中, 不再进行计算。

3) 样品含量测定的不确定度分析

(1) 供试品称样量的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$: 天平重复性已纳入重复性评定中, 不再进行计算。采用减重法称量供试品, 根据天平检定证书的数据, 电子天平在 $d = 0.1 \text{ mg}$ 档时天平示值误差为 0.01 mg 。按矩形分布, $u(m) = 0.01 \text{ mg} / \sqrt{3} = 0.005\ 7 \text{ mg}$, 则天平校准的标准不确定度为 $\sqrt{2 \times 0.005\ 7^2} = 0.008\ 1$ 。供试品称样量为 $0.0763 \text{ g} = 76.3 \text{ mg}$, 则 $u_{\text{rel}}(m) = 0.008\ 1 / 76.3 = 1.06 \times 10^{-4}$ 。

(2) 样品稀释体积(V)带入的不确定度: ①第1次, 同对照品首次稀释方法评定, $u_{\text{rel}}(V_1) = 5.46 \times 10^{-4}$ 。②第2次, 2 mL 单标线移液管(A级)的最大允许误差为 $\pm 0.010 \text{ mL}$, 按矩形分布, $u_1(V_2) = 0.010 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0.005\ 8 \text{ mL}$ 。本试验中温度为 23°C , 移液管的校准温度为 20°C , 则由此产生的体积变化分散区间半宽 $a = 2 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} \text{ mL}$, 按矩形分布, 则 $u_2(V_2) = 0.001\ 3 \text{ mL}$ 。则 V_2 的合成标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(V_2) = \sqrt{0.005\ 8^2 + 0.001\ 3^2} / 2 = 2.97 \times 10^{-3}$ 。③第3次, 同第1次的稀释方法评定, $u_{\text{rel}}(V_3) = 5.46 \times 10^{-4}$ 。

(3) 供试品峰面积的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(A)$: 按2.2.3的2)项的(3)项下方法评定, 2份样品平行进样2次,

峰面积为 922 233,921 883,918 553,918 390,则 $u_1(A) = \sqrt{(309.735^2 + 144.248^2)/2} = 241.602$ 2, $u_{1rel}(A) = 241.602\ 2/920\ 264.75 = 2.63 \times 10^{-4}$ 。

2.2.4 不确定度分量

结果见表 4。

表 4 各种不确定度分量汇总

Tab. 4 Summary of the weight of various uncertainty

项目	名称	数据(x)	相对标准不确定度 [$u(x)/x$]
rep	重复性	97.63%	2.46×10^{-4}
f	对照品校正因子	$1.116\ 7 \times 10^{-11}$	3.13×10^{-3}
m	样品的取样量	0.076 3 g	1.06×10^{-4}
V ₁	样品第 1 次稀释体积	100 mL	5.46×10^{-4}
V ₂	移液管体积	2 mL	2.97×10^{-3}
V ₃	样品第 3 次稀释体积	100 mL	5.46×10^{-4}
A	样品的峰面积	920 264.75	2.63×10^{-4}

2.2.5 合成不确定度及扩展不确定度计算

合成不确定应根据相对不确定分量合成后求得,

$$U_{rel}(W) = [u_{rel}^2(\text{rep}) + u_{rel}^2(f) + u_{rel}^2(m) + u_{rel}^2(V_1) + u_{rel}^2(V_2) + u_{rel}^2(V_3) + u_{rel}^2(A)]^{1/2} = 0.004\ 4$$

$$u_c(W) = 97.0\% \times 0.004\ 4 = 0.43\%$$

扩展不确定度:取包含因子为 $k=2$,置信水平为 95%, $U = 2 \times 0.43\% = 0.86\%$,盐酸吗啉胍片含量测定结果为 $W = (97.0 \pm 0.86)\%$ ($k=2$)。

3 讨论

3.1 检测方法建立

现行标准采用 UV 法,为直接测定方式,虽方法简便,但准确性较低、专属性不强。HPLC 法通过色谱柱进行分离,分离效率高、选择性好、检测灵敏度高,可大幅提高检测的准确度、专属性。

3.2 检测波长选择

预试验中分别将各溶液在 200~400 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描,结果在 237 nm 波长处均有最大吸收,辅料在 237 nm 波长处无吸收,故选择 237 nm 为测定波长。

3.3 流动相选择

常用庚烷磺酸钠溶液-甲醇-乙腈作为类似研究的流动相,考虑到离子对试剂会对色谱柱造成永久性的改性,离子试剂体系重复性不佳,离子对试剂在流动相和色谱柱之间的平衡时间较长等因素,故尝试用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸二氢钾流动相系统,结果均不理想。采用本流动相后,检测到的盐酸吗啉胍理论板数均大于 5 000,保留时间、分离度、重复性、拖尾因子结果均满意。流动相比比例考察:预试验中流动相考察

了 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液-甲醇(85:15,90:10,93:7,94:6, V/V),结果两者比例为 85:15 和 90:10 时分离结果均不理想,比例为 93:7 和 94:6 时理论板数及拖尾因子不如比例为 95:5 时,故采用 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液-甲醇(95:5, V/V)作为流动相。

3.4 不确定度评定

HPLC 法测定样品含量不确定度,各影响因素按相对标准不确定度由大到小分别为对照品校正因子、移液管体积、样品稀释体积、样品峰面积、重复性、样品取样量。对照品校正因子不确定度中各分量按相对标准不确定度由大到小分别为对照品取样量、移液管体积、对照品稀释体积、对照品峰面积,其中主要来源是对照品取样量较小,在操作过程中应尽量选择稳定性好、精密度高、天平示值误差小的天平,同时适当加大对对照品取样量。从移液管体积、稀释体积分析得出,玻璃量器体积越小,带来的不确定度越大,故应尽可能选择体积较大的玻璃量器。在日常工作中要注意对仪器的维护保养、检定校准及期间核查,使仪器保持良好的工作状态。加强对检测人员的培训,规范试验操作流程,提高工作能力,减小操作误差。

参考文献

- [1] WS-10001-(HD-0649)-2002,国家食品药品监督管理局国家药品标准[S].
- [2] WS-10001-(HD-0650)-2002,国家食品药品监督管理局国家药品标准[S].
- [3] 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,2015:374-377.
- [4] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范 2019 年版[M]. 北京:中国医药科技出版社,2019:175-196.
- [5] 朱链键,王丽琼. IP-RP-HPLC 法同时测定感冒清片中 3 种成分[J]. 中成药,2020,42(2):313-316.
- [6] 王丽琼,吴丽. 高效液相色谱法同时测定感冒清胶囊中对乙酰氨基酚和盐酸吗啉胍含量[J]. 中国药业,2019,28(21):38-40.
- [7] 吕高明. 高效液相色谱法测定盐酸吗啉胍滴眼液的含量[J]. 海峡药学,2011,23(11):74-75.
- [8] 盛夏. HPLC 法测定盐酸吗啉胍滴眼液的含量[J]. 安徽医药,2011,15(12):1500-1501.
- [9] 张树强. 高效液相色谱法测定盐酸吗啉胍注射液的含量[J]. 中国药业,2011,20(22):46-47.
- [10] JJF1059.1-2012,测量不确定度评定与表示[S].
- [11] CNAS-GL006,化学分析中不确定度的评估指南[S].
- [12] 朱清丽,柯红梅,谭艳萍,等. HPLC 测定维生素 B₆ 片含量的不确定度分析[J]. 西北药学杂志,2014,29(5):466-469.

(收稿日期:2021-01-06;修回日期:2021-03-13)