

HPLC 法测定丹参片中丹酚酸 B 含量的不确定度评定

王怡静

上海上药杏灵科技药业股份有限公司, 上海 201700

摘要: 目的 通过高效液相色谱法 (HPLC) 系统评估丹参片中丹酚酸 B 含量测定的不确定度来源。方法 建立数学模型从对照品和供试品称量、定容、仪器及数值修约等方面识别并量化关键不确定度分量。结果 以 HPLC 法测定每片丹参片中丹酚酸 B 含量, 在置信概率 95%, 包含因子 $k=2$ 时, 合成不确定度是 0.154 mg/片 , 扩展不确定度是 0.31 mg/片 , 测量结果表示为 $(13.46 \pm 0.31) \text{ mg/片}$ 。结论 该法完整表征了方法的测量可靠性范围。

关键词: 丹参片; 含量测定; 不确定度; 高效液相色谱

近年来, 不确定度在药品检测领域应用日益广泛, 测量不确定度的主要作用是表征测量结果的可信性、有效性。通过系统评估与优化测量不确定度, 可显著提升丹参片含量测定结果的科学可信度与数据溯源性, 进而贯穿药品研发、生产及质量控制全流程, 为保障药品的安全性、有效性及临床可及性提供核心技术支持。^[1] 丹参片作为《中国药典》2020 年版 (一部) 成方制剂法定收载品种, 其含量测定严格遵循药典方法学要求, 采用高效液相色谱外标法, 主要功能是活血化瘀, 用于治疗瘀血闭阻所致的胸痹, 症见胸部疼痛、痛处固定、舌质紫暗; 冠心病心绞痛。^[2] 本文对采用 HPLC 法对丹参片中丹酚酸 B 含量的测定不确定度进行计算、分析、评估, 明确影响不确定度的主要影响因素及其来源, 结合扩展不确定度, 对丹酚酸 B 含量测定结果进行客观评价。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器

高效液相色谱仪: Agilent 1260 II 型;

电子天平: Sartorius QUINTIX224-1CN 型 (常规称量)、Mettler XS105DU 型 (精密称量);

超纯水系统: Milli-Q Direct16 型实验室专用超纯水机。

1.1.2 试剂与样品

色谱纯试剂:

甲醇 (德国默克公司, 批号 I1338707412);

乙腈 (德国默克公司, 批号 I1324530406);

甲酸 (国药集团化学试剂有限公司, 批号

20240321);

超纯水 (实验室自制)。

对照品: 丹酚酸 B (中国食品药品检定研究院, 批号 111562-202318, 纯度 97.5%);

供试样品: 丹参片 (上海上药杏灵科技药业股份有限公司, 批号 240601, 规格 0.27 g/片)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 反相柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$);

流动相: 甲醇-乙腈-甲酸-水 (体积比 30:10:1:59);

流速: 1.0 mL/min ;

检测波长: 286 nm ;

柱温: 30°C ;

进样体积: $20 \mu\text{L}$ 。

1.2.2 对照品溶液的制备

储备液配制步骤: 精密称取丹酚酸 B 对照品 10.0 mg , 置 100 mL 容量瓶中, 加水溶解并稀释至液面凹面与刻度线平齐, 摇匀, 制得丹酚酸 B 储备液 (浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$)。

工作液稀释步骤: 精密量取上述丹酚酸 B 储备液 5.0 mL , 置 50 mL 容量瓶中, 加水定容至液面凹面与刻度线平齐, 摇匀, 即得丹酚酸 B 对照品溶液 (浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$)。

1.2.3 供试品溶液的制备

样品前处理: 取 10 片供试品 (丹参片), 精密称定总重, 研细后精密称取细粉约 200 mg , 置 50 mL 容量

瓶中。

超声提取：加水适量，于 250W、33kHz 条件下超声处理 20 分钟，冷却后加水定容至液面凹面与刻度线平齐，摇匀，滤过。

溶液稀释步骤：精密量取续滤液 1.0mL，置 25ml 容量瓶中，加水定容至液面凹面与刻度线平齐，摇匀，二次滤过后取续滤液作为供试品溶液。

1.2.4 含量测定方法

采用外标法定量分析，精密量取对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L，进样至高效液相色谱系统，采集并记录色谱峰面积。基于外标法，以峰面积积分值为依据进行定量计算，确定供试品中丹酚酸 B 的含量。

2 数学模型的建立与不确定度来源分析

2.1 数学模型的建立

含量计算公式为：

$$X(\text{mg/片}) = \frac{A_x \times M_r \times P \times V_x \times \bar{W}}{A_r \times M_x \times V_r}$$

X 代表供试品中丹酚酸 B 含量，mg/片；

A_x 代表供试品峰面积；

M_r 代表对照品称样量，mg；

P 代表对照品特性量值，%；

式中： V_x 代表供试品稀释倍数；

$\bar{W}$ 代表供试品平均片重，mg；

A_r 代表对照品峰面积平均值；

M_x 代表供试品称样量，mg；

V_r 代表对照品稀释倍数；

2.2 不确定度来源分析

根据含量计算公式可以得出不确定度来源如图 1。

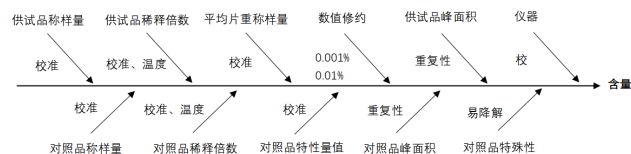


图 1

2.3 不确定度的量化分析

2.3.1 称量引入的不确定度

2.3.1.1 对照品称样量的相对不确定度：U-Mr

该不确定度的主要来源为天平的校准。^[3] 该天平的检定证书 (J202401084289C-0001) 显示，按矩形分布计算如下：当实际分度值为 0.01mg 时，在 0 ~ 5g

称重范围内的示值误差为 $\pm 0.05\text{mg}$ ，U 示值 = $0.05/\sqrt{3} = 2.887 \times 10^{-2}\text{mg}$ ；偏载误差为 $\pm 0.05\text{mg}$ ，U 偏载 = $0.05/\sqrt{3} = 2.887 \times 10^{-2}\text{mg}$ ；重复性误差为 $\pm 0.05\text{mg}$ ，U 重复 = $0.05/\sqrt{3} = 2.887 \times 10^{-2}\text{mg}$

$$\begin{aligned} \text{合成 U-天平 } X &= \sqrt{(2.887 \times 10^{-2})^2 + (2.887 \times 10^{-2})^2 + (2.887 \times 10^{-2})^2} \\ &= 0.05\text{mg} \end{aligned}$$

对照品称样量为 10.32mg 故相对不确定度为：

$$\text{合成 U-Mr} = \text{天平 } X / 10.32 = 0.05 / 10.32 = 4.485 \times 10^{-3}$$

2.3.1.2 供试品称样量的相对不确定度：U-Mx

该不确定度的主要来源为天平的校准。该天平检定证书 (J202401084289B-0036) 显示，按矩形分布计算如下：当实际分度值为 0.1mg 时，在 0g ~ 50g 称重范围内的示值误差为 $\pm 0.5\text{mg}$ ，U 示值 = $0.5/\sqrt{3} = 0.2887\text{mg}$ ；偏载误差为 $\pm 0.5\text{mg}$ ，U 偏载 = $0.5/\sqrt{3} = 0.2887\text{mg}$ ；重复性误差为 $\pm 0.5\text{mg}$ ，U 重复 = $0.5/\sqrt{3} = 0.2887\text{mg}$

$$\begin{aligned} \text{合成 U-天平 } Q &= \sqrt{0.2887^2 + 0.2887^2 + 0.2887^2} \\ &= 0.5\text{mg} \end{aligned}$$

供试品两次称样量分别为 202.9mg、206.2mg，故相对不确定度为：

$$\text{U-Mx1} = \text{天平 } Q / 202.9 = 0.5 / 202.9 = 2.464 \times 10^{-3}$$

$$\text{U-Mx2} = \text{天平 } Q / 206.2 = 0.5 / 206.2 = 2.425 \times 10^{-3}$$

$$\begin{aligned} \text{合成 U-Mx} &= \sqrt{(2.464 \times 10^{-3})^2 + (2.425 \times 10^{-3})^2} \\ &= 3.457 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

2.3.1.3 供试品平均片重的相对不确定度：U- $\bar{W}$

该不确定度主要来源为天平的校准。计算同 2.3.1.2 法，供试品平均片重为 271.1mg，故相对不确定度为：

$$\text{合成 U-}\bar{W} = \text{天平 } Q / 271.1 = 0.5 / 271.1 = 1.844 \times 10^{-3}$$

2.3.2 定容引入的不确定度

按照常用玻璃量器检定规程^[4]以及玻璃器具校准证书，可知在配制过程中玻璃器具在 20℃ 都有相应的容量允许误差 (S)，单标线容量瓶按三角分布计算， $U=|S|/\sqrt{6}$ ；胖度移液管按矩形分布计算， $U=|S|/\sqrt{3}$ 。

实验室的实际温度为 23℃，所以要考虑温度变化引入的不确定度。稀释的液体为水，所以还要考虑水的膨胀系数的不确定度。水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ mL/}^\circ\text{C}$ ，按矩形分布计算，

$$U = 2.1 \times 10^{-4} \times (23 - 20) \times V / \sqrt{3} \text{ (V 为玻璃器具规格)}^{[5]}$$

玻璃器具引入的标准不确定度

序号	玻璃器具（A 级）	容量允许误差 S/mL	U 器具 /mL	U 温度 /mL
1	100ml 容量瓶	± 0.10	4.082×10^{-2}	3.637×10^{-2}
2	50ml 容量瓶	± 0.05	2.041×10^{-2}	1.819×10^{-2}
3	25ml 容量瓶	± 0.03	1.225×10^{-2}	9.093×10^{-3}
4	5ml 胖度移液管	± 0.015	8.660×10^{-3}	1.819×10^{-3}
5	1ml 胖度移液管	± 0.007	4.041×10^{-3}	3.637×10^{-4}

表 1

2.3.2.1 对照品稀释倍数的相对不确定度：U-Vr

100mL 容量瓶引入的相对不确定度：

$$\sqrt{(4.082 \times 10^{-2})^2 + (3.637 \times 10^{-2})^2} / 100 = 5.468 \times 10^{-4}$$

50mL 容量瓶引入的相对不确定度：

$$\sqrt{(2.041 \times 10^{-2})^2 + (1.819 \times 10^{-2})^2} / 50 = 5.468 \times 10^{-4}$$

5mL 胖度移液管引入的相对不确定度：

$$\sqrt{(8.660 \times 10^{-3})^2 + (1.819 \times 10^{-3})^2} / 5 = 1.770 \times 10^{-3}$$

合成 U-Vr=
$$\sqrt{(5.468 \times 10^{-4})^2 + (5.468 \times 10^{-4})^2 + (1.770 \times 10^{-3})^2}$$

= 1.932×10^{-3}

2.3.2.2 供试品稀释倍数的相对不确定度：U-Vx

50mL 容量瓶引入的相对不确定度：

$$\sqrt{(2.041 \times 10^{-2})^2 + (1.819 \times 10^{-2})^2} / 50 = 5.468 \times 10^{-4}$$

25mL 容量瓶引入的相对不确定度：

$$\sqrt{(1.225 \times 10^{-2})^2 + (9.093 \times 10^{-3})^2} / 25 = 6.102 \times 10^{-4}$$

1mL 胖度移液管引入的相对不确定度：

$$\sqrt{(4.041 \times 10^{-3})^2 + (3.637 \times 10^{-4})^2} / 1 = 4.058 \times 10^{-3}$$

由于是双份供试品，故合成

U-Vx=
$$\sqrt{2 \times [(5.468 \times 10^{-4})^2 + (6.102 \times 10^{-4})^2 + (4.058 \times 10^{-3})^2]}$$

= 5.854×10^{-3}

2.3.3 重复性引入的相对不确定度

2.3.3.1 对照品色谱峰面积的相对不确定度：U- Ar

将同一批次丹酚酸 B 对照品溶液连续进样 6 次，

所得峰面积数据结果详见表 2。因为 n=6，故采用贝塞尔公式法，对照品相对不确定度

$$U - \overline{Ar} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (Ari - \overline{Ar})^2}{n(n-1)}} / \overline{Ar}$$

$$= \sqrt{\frac{(247.460 - 254.459)^2 + (253.040 - 254.459)^2 + (255.287 - 254.459)^2 + (257.096 - 254.459)^2 + (257.147 - 254.459)^2 + (256.722 - 254.459)^2}{6 \times 5}} / 254.459$$

= 6.045×10^{-3}

对照品峰面积测定结果

序号	对照品峰面积	对照品平均峰面积
1	247.460	254.459
2	253.040	
3	255.287	
4	257.096	
5	257.147	
6	256.722	
对照品回进		回进率 100.6%

表 2

从表 2 可以看出，对照品平均峰面积与其对照品回进的比值计算得 100.6%，落在 98% ~ 102% 的范围里，说明仪器整个进样环境波动较小，从侧面反映了分析方法的准确性和结果可靠性。

2.3.3.2 供试品色谱峰面积的相对不确定度：U-Ax

取供试品溶液进行 2 次平行测定，每个样品连续进样 2 次（共 4 针），测定结果详见表 3。因样本量较小（n=2），采用极差分析法来评估其相对不确定度，计算公式 = 极差 / （C × 峰面积平均值）（极差系数 C=1.13）。^[6]

供试品峰面积测定结果

供试品	峰面积 1	峰面积 2	峰面积平均值	极差 R
-----	-------	-------	--------	------

1	203.475	202.584	203.030	0.891
2	208.058	207.762	207.910	0.296

表 3

供试品 1 相对不确定度 $U-A_{x1}=R1/(C \times \text{峰面积平均值 } 1)=0.891/(1.13 \times 203.030)=3.884 \times 10^{-3}$;
供试品 2 相对不确定度 $U-A_{x2}=R2/(C \times \text{峰面积平均值 } 2)=0.296/(1.13 \times 207.910)=1.260 \times 10^{-3}$;

$$\text{合成 } U-A_x = \sqrt{(3.884 \times 10^{-3})^2 + (1.260 \times 10^{-3})^2} = 4.083 \times 10^{-3}$$

2.3.4 高效液相色谱仪引入的相对不确定度: U- 仪器

根据该高效液相色谱仪的检定证书(J202401084289B-0026),定量测量重复性为 0.01%,按矩形分布计算,由高效液相色谱仪引入的相对不确定度为 $U- \text{仪器} = 0.01\% / \sqrt{3} = 5.774 \times 10^{-5}$

2.3.5 数值修约引入的相对不确定度: U- 修约

根据报告要求,每片丹参片中丹酚酸 B 含量的平行样结果修约至 0.001mg/片,最终结果数值修约至 0.01mg/片,属于 B 类不确定度,故由数值修约引入的相对不确定度为

$$U- \text{修约 } 0.001-1 = \frac{0.001}{\sqrt{3}} / 13.409 = 4.306 \times 10^{-5};$$

$$U- \text{修约 } 0.001-2 = \frac{0.001}{\sqrt{3}} / 13.512 = 4.273 \times 10^{-5};$$

对照品峰面积衰减情况

		储存方式——冷藏									
		0 天	1 天	3 天	6 天	9 天	12 天	16 天	20 天	26 天	30 天
对照品	1	/	255.262	239.652	227.099	182.629	186.896	161.356	133.143	136.299	132.819
峰面积	2	/	254.315	237.360	226.475	180.427	185.823	162.851	132.388	136.119	132.553
两次测定平均值		254.459	254.788	238.506	226.787	181.528	186.360	162.104	132.766	136.209	132.686
衰减率		/	-0.13%	6.27%	10.87%	28.66%	26.76%	36.29%	47.82%	46.47%	47.86%

表 4

3 结果

计算得到丹参片中丹酚酸 B (C₃₆H₃₀O₁₆) 含量为 13.46mg/片。

合成标准不确定度和扩展不确定度

合成标准不确定度

$$U = \sqrt{\frac{Mr^2 + Mx^2 + \bar{W}^2 + Vr^2 + Vx^2 + \bar{Ar}^2 + Ax^2 + \text{仪器}^2 + \text{数值修约}^2 + P^2}{}} \times X$$

$$U- \text{修约 } 0.001 = \sqrt{(4.306 \times 10^{-5})^2 + (4.273 \times 10^{-5})^2} = 6.066 \times 10^{-5}$$

$$U- \text{修约 } 0.01 = \frac{0.01}{\sqrt{3}} / 13.46 = 4.289 \times 10^{-4};$$

$$\text{故合成 } U- \text{修约} = \sqrt{(6.066 \times 10^{-5})^2 + (4.289 \times 10^{-4})^2} = 4.332 \times 10^{-4}$$

2.3.6 对照品特性量值的相对不确定度: U-P

丹酚酸 B 对照品的特性量值 P=97.5%,属于 B 类不确定度。^[7]假设其分散区间的半宽度为 0.05%,按均匀分布 $k = \sqrt{3}$ 计算,实验中所用的对照品纯度所引起的不确定度 $U-P = \frac{0.05\%}{\sqrt{3}} / 97.5\% = 2.961 \times 10^{-4}$

2.3.7 对照品溶液易降解

0 天将对照品溶液罐装进 10 个新的 1ml 进样小瓶中,其中初始进样瓶为 1 瓶,其余 9 瓶盖紧密闭,储存于冷藏环境下,当次使用。测定在天数 1 天、3 天、6 天、9 天、12 天、16 天、20 天、26 天、30 天对冷藏环境下储存的对照品峰面积,并与 0 天进行对比,分析冷藏储存条件下对照品峰面积随时间的变化情况。实验数据与变化趋势的完整记录详见表 4,展示了关键参数的变化规律。由此可见,采用冷藏的储存方式,历经 30 天对照品峰面积从初始 254.459 降低至 132.686,衰减率达到 47.82%,第 0 天至第 20 天为加速衰减期,第 20 天至第 30 天趋于稳定。

$$\begin{aligned} & \sqrt{(4.845 \times 10^{-3})^2 + (3.457 \times 10^{-3})^2 + (1.844 \times 10^{-3})^2 + (1.932 \times 10^{-3})^2 + (5.854 \times 10^{-3})^2 + (6.045 \times 10^{-3})^2 + (4.083 \times 10^{-3})^2 + (5.774 \times 10^{-5})^2 + (4.332 \times 10^{-4})^2 + (2.961 \times 10^{-4})^2} \\ & = 0.01142 \times 13.46 = 0.154 \text{mg/片} \end{aligned}$$

取包含因子 $k=2$ ，在 95% 置信水平下，扩展不确定度为 $2 \times 0.154 = 0.31 \text{mg} / \text{片}$

测量不确定度报告：每片丹参片中丹酚酸 B 的含量为 $X = (13.46 \pm 0.31) \text{mg} / \text{片}$ ， $k=2$

4 讨论

对不确定度来源的相对不确定度的测定结果进行排序，得出下表 5。可见，相对不确定度的最大来源是对照品色谱峰面积，占比为 20.96%。其主要原因为在进行过程中，第一针对照品色谱峰面积显著偏低，而后逐步趋于稳定，对照品色谱峰面积的不确定度为 6.045×10^{-3} ，若剔除第一针的影响，其不确定度降低至 3.054×10^{-3} ，其在不确定度的测定结果排名降至第五。可见在进行过程中，增加进样次数，选取对照品

色谱峰面积稳定的连续 6 针计算平均峰面积，将有助于降低对照品色谱峰面积对不确定度的影响。其次，供试品的稀释倍数是不确定度的第二大来源，占比为 20.29%，其主要原因为供试品的配制浓度较低，在常规实验条件下，需经过两次稀释，方能配制完成。因此两次稀释的过程大幅放大了供试品的配制误差，导致实际浓度与理论浓度存在一定偏差。同时，对照品称量时的天平的校准是不确定度的第三大来源，经分析，其原因主要有以下两个方面，一是对照品称样量仅 10.32mg，在低重量的称量中，天平本身的校准情况极大的影响测定的准确率；二是精度天平的示值、偏载、重复性误差较高，影响称量的准确性。

各分量相对标准不确定度一览

序号	不确定度来源	相对不确定度	排序	占比
1	天平的校准 - 对照品 (U-Mr)	4.845×10^{-3}	3	16.80%
2	天平的校准 - 供试品 (U-Mx)	3.457×10^{-3}	5	11.98%
3	天平的校准 - 平均片重 (U- $\bar{W}$)	1.844×10^{-3}	7	6.39%
4	对照品稀释倍数 (U-Vr)	1.932×10^{-3}	6	6.70%
5	供试品稀释倍数 (U-Vx)	5.854×10^{-3}	2	20.29%
6	对照品色谱峰面积 (U- $\bar{A}_r$)	6.045×10^{-3}	1	20.96%
7	供试品色谱峰面积 (U-Ax)	4.083×10^{-3}	4	14.15%
8	仪器	5.774×10^{-5}	10	0.20%
9	数值修约	4.332×10^{-4}	8	1.50%
10	对照品特性量值 (U-P)	2.961×10^{-4}	9	1.03%

表 5

综上不确定度来源分析，结合储存环境对对照品峰面积的影响，可见确保合适的储存环境、校准准确的称量仪器、规范的配制过程是准确测定结果的有效保障，也能从这些方面持续优化测定过程，使测定结果更加准确、稳定、可靠。

参考文献

[1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL006-2019 化学分析中不确定度的评估指南 [S]. 2019.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部 [S]. 2020 年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：713.

[3] 邓洪，何金晓，殷莉丽，赵薇. HPLC 法测定格列美脲片含量的不确定度评价 [J]. 广州化工，2024，

Vol.52 No.6.

[4] 国家质量技术监督局. 常用玻璃量器检定规程 [S]. 北京：中国计量出版社，JJG196-2006，2007：7

[5] 闻俊. HPLC 法测定头孢唑啉钠含量的不确定度分析 [J]. 数理医药学杂志，2010，23(6)：695-696

[6] 秦力，肖英，陈诗慧，范亚刚. HPLC 法测定枸橼酸喷托维林片含量的测量不确定度评定 [J]. 中国药师，2014，17(03)：505-507.

[7] 张志超，袁晓转，韩慧丽. HPLC 法测定盐酸利多卡因注射液含量的不确定度评定 [J]. 中国药物评价，2021，38(3)：202-205.