

模型大鼠脑内兴奋性氨基酸的含量, 增加脑内抑制性氨基酸的含量, 对急性脑缺血模型大鼠起到保护作用。党红梅等^[12]的实验结果也表明, 脑缺血时, 使用盐酸川芎嗪注射液可显著降低细胞外兴奋性氨基酸神经递质, 同时可显著升高抑制性氨基酸神经递质。这一结果将对阐明川芎嗪治疗缺血性脑血管疾病的有关机理提供帮助。

REFERENCES

- [1] GUO L J. GABA receptors and the cerebral ischemia [J]. J Xianning Coll (Med Sci)(咸宁学院学报: 医学版), 2004, 18(2): 77-80.
- [2] YUAN F, CHEN Z J, CHEN J. Determination of tetramethylpyrazine and its active metabolite in rat plasma by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(6): 529-534.
- [3] MENG Q N. Treatment of acute cerebral infarction with ligustrazine injection and reinforced Buyan Huanwu tang of 38 cases [J]. Chin J Integr Tradit West Med Intens Crit Care(中西医结合实用临床急救), 1999, 6(1): 12.
- [4] ZHANG Z H, YU S Z. Effects of ligustrazine on polymorphonuclear leukocyte in focal cerebral ischemia cases [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med(浙江中西医结合杂志), 2002, 12(3): 154-156.
- [5] LIU H W, YAN Y L, ZHOU L L. Comparison of the brain

- pharmacokinetics of nasal tetramethylpyrazine phosphate pH-sensitive in situ gel in normal rats and model rats [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2012, 47 (5): 677-679.
- [6] ZHUGE Q C. Rats Radiostereostatics Mapping(大鼠脑立体定位图谱) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 3, 82.
 - [7] ZEA LONGA, WEISTEIN P R, CALSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
 - [8] LIU H W, YAN Y L, ZHOU L L. Prescription optimization of ligustrazine phosphate pH-sensitive in situ gel in nasal [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(9): 2296-2298.
 - [9] DAWSON L A, DJALI S, GONZALES C, et al. Haracterization of transient focal ischemia-induced in creases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats [J]. Brain Res Bull, 2000, 53(6): 767-776.
 - [10] RAO V L, BOWEN K K, DEMPSEY R J. Transient focal cerebral ischemia down regulates glutamate transporters GLT-1 and EAACL expression in rat brain [J]. Neurochem Res, 2001, 26(5): 407-502.
 - [11] KANG T C, PARK S K, HWANG I K, et al. Spatial and temporal alterations in the GABA shunt in the gerbil hippocampus following transient ischemia [J]. Brain Res, 2002, 94(1/2): 10-18.
 - [12] DANG H M, MA W Y, HAN H W. Influence of ligustrazine on trace amino acid neurotransmitters in striatum of rats after transient focal cerebral ischemia by CZE-LIF [J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2005, 26(10): 1803-1807.

收稿日期: 2012-11-14

大黄素国家级纯度有证标准物质研制

杨德智, 郭永辉, 张丽, 杨世颖, 吕扬* (北京协和医学院 & 中国医学科学院药物研究所, 药物晶型研究中心, 晶型药物研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 目的 通过建立准确的定值分析方法及不确定度的研究, 研制具有可溯源性、高准确度量值的大黄素国家级化学纯度有证标准物质。方法 根据我国计量法和一级标准物质研制技术规范与相关技术文件要求, 采用高效液相色谱法(HPLC)和差示扫描量热法(DSC)对大黄素纯度标准物质联合定值, 并完成不确定度评估。结果 研制的大黄素纯度标准物质符合国家一级有证标准物质要求, 其化学纯度标准值与不确定度值为(99.54±0.18)%($k=2, P=0.95$)。结论 本实验研制的大黄素国家一级纯度有证标准物质具有量值准确、可溯源的特性, 属于国际公认的标准物质, 将为我国药品的有效物质和成分标准化与国际化, 提供必要的标准物质与物质标准。

关键词: 大黄素; 纯度标准物质; 高效液相色谱法; 差示扫描量热法; 标准值; 不确定度

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)09-0933-08

Development of National Primary Purity Certified Reference Material of Emodin

YANG Dezhi, GUO Yonghui, ZHANG Li, YANG Shiyong, LÜ Yang* (Research Center for Pharmaceutical Polymorphism, Peking Union Medical College, Institute of Materia Medica & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing

基金项目: 科技部科技基础性工作专项重点项目(2007FY130100); 天然药物活性物质与功能国家重点实验室自主课题 C 类-探索性课题 (GTZC201229)

作者简介: 杨德智, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (010)63030566 E-mail: ydz@imm.ac.cn *通信作者: 吕扬, 女, 博导, 研究员 Tel: (010)63161258 E-mail: luy@imm.ac.cn

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop the national primary purity certified reference material(CRM) of emodin which has traceability and high-accuracy quantity value by establishing accurate, reliable analytical method and evaluation of uncertainty. **METHODS** The CRM of emodin was developed by the joint certification including high performance liquid chromatography (HPLC) and differential scanning calorimetry(DSC) on the basis of Technical Norm of Primary Reference Material and related documents requirements. **RESULTS** The developed emodin purity CRM in accordance with Technical Norm of Primary Reference Material requirements had the standard value and uncertainty of $(99.54 \pm 0.18)\%$ ($k=2, P=0.95$). **CONCLUSION** The national primary purity CRM of emodin developed in this study possess a high-accuracy value and traceability characteristics which could provide necessary material base for medicines standardization and internationalization. **KEY WORDS:** emodin; purity certified reference material; HPLC; DSC; standard value; uncertainty

大黄素(emodin)又称朱砂莲甲素, 化学名为 1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌, 为中药材大黄、虎杖、决明子等药材中的主要有效成分。大黄素具有抗炎、抗癌、免疫调节、肾保护、利胆、利尿、降低内毒素、改善心血管系统和微循环等药理作用^[1]。在中国药典 2010 年版规定大黄素成分可用于中药材大黄、虎杖、决明子、黄氏响声丸、牛黄解毒片、三黄片等数十种药材及中成药的质量控制^[2]。

根据我国计量法和一级有证标准物质研制的技术规范及管理要求等相关技术文件^[2-7], 笔者利用高效液相色谱法(HPLC)对大黄素纯度标准物质候选物样品进行了均匀性检验和稳定性考察、采用 HPLC 与差示扫描量热法(DSC)2 种不同技术原理方法实现对大黄素纯度标准物质候选物样品化学纯度联合定值研究, 并对定值结果进行了不确定度的评估, 保证了研制标准物质定值结果的科学性和准确性^[8-9]。

笔者研制的大黄素国家一级纯度有证标准物质, 具有可溯源性与量值传递功能, 该品种的化学纯度标准物质在国内外均属首次研制。标准物质可用于国际交流、药物质量监测、仪器校准等领域, 计量有证标准物质的研制将促进我国与国际药品质量接轨, 对我国中药的标准化与现代化均起到重要的推动作用。

1 材料

大黄素原料来源于陕西森弗生物技术有限公司, 批号: 20110614。

1.1 高纯度标准物质候选物样品的制备

采用重结晶纯化步骤: 将提取获得的大黄素粗品 50 g 溶于 500 mL 的氯仿-甲醇溶液中, 加热到 120 °C 回流 2 h, 过滤后将续滤液自然冷却析晶 12 h, 再次过滤获滤饼, 经 60 °C 减压干燥 6 h 获得黄色粉末状样品; 重复 2 次获得经 HPLC 检测相对化学纯度为 99.6% 的高纯度大黄素化学纯度

标准候选物样品。

1.2 化合物结构确证

采用四大光谱技术进行大黄素化学纯度标准候选物样品的分子结构确证研究:

①紫外分光光度法: 吸收光谱在 200~400 nm 内扫描, 结果样品于 222, 254, 288 nm 处有最大吸收峰。

②红外光谱法: 结果样品于 3 398, 2 980, 2 930, 2 596, 1 663, 1 674, 1 624, 1 563, 1 477, 1 448, 1 416, 1 388, 1 353, 1 313, 1 297, 1 264, 1 224, 1 170, 1 101, 1 033, 994, 938, 908, 894, 874, 852, 822, 769, 742, 723, 674, 634, 612, 582, 560, 550, 472, 453, 429 cm^{-1} 位置存在吸收峰。

③质谱法: 经 ESI-MS 检测获得 117.2, 269.3 (M^+-1) 分子碎片峰。

④核磁共振法: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ : 2.30 (3H, s, CH_3), 6.46(1H, s, H-2), 6.95(1H, s, H-4), 6.97(1H, s, H-7), 7.27(1H, s, H-5), 11.27(1H, s, C3-OH), 11.83(1H, s, C8-OH), 11.92(1H, s, C1-OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO) δ : 161.3(C-1), 107.7(C-2), 165.5(C-3), 108.6(C-4), 120.3(C-5), 148.0(C-6), 123.9(C-7), 164.4(C-8), 189.4(C-9), 180.9(C-10), 134.8(C-11), 113.0(C-12), 108.7(C-13), 132.5(C-14), 21.4(CH_3)。

以上数据与已知大黄素结构文献对照数据一致^[10-11], 可确定化合物为大黄素, 图 1 为大黄素的化学结构式。

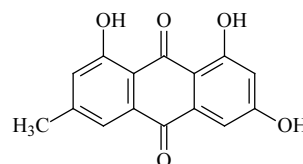


图 1 大黄素化学结构式

Fig 1 Chemical structural formula of emodin

1.3 仪器与试剂

1.3.1 仪器 Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (DAD 检测器, 美国 Agilent 公司); DSC-1 型差示扫描量热仪(瑞士梅特勒-托利多公司); XS-105 型分析天平(感量 0.01 mg, 瑞士梅特勒-托利多公司); TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用有限责任公司)。

1.3.2 试剂 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司); 磷酸(分析纯, 北京化学试剂公司); 纯净水(娃哈哈集团有限公司); 一级钢标准物质 [GBW13202, 熔点: (429.75±0.01)K, 中国计量科学院]。

2 HPLC

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸水溶液(80:20); 波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; 进样浓度: 500 μg·mL⁻¹。记录色谱图及峰面积, 利用 Agilent Chemstation 色谱工作站处理数据, 采用面积归一化法进行纯度测定。大黄素纯度标准物质候选物的 HPLC 图谱见图 2。

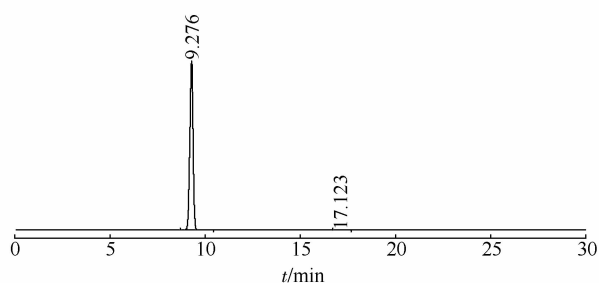


图 2 大黄素纯度标准物质候选物的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of emodin purity CRM candidate

2.2 方法学研究

2.2.1 系统适用性 精密称取大黄素纯度标准物质候选物质样品约 12.5 mg, 移至 25 mL 量瓶中, 平行称定 6 份, 使用甲醇溶剂定容, 配制成浓度为 500 μg·mL⁻¹ 溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 结果见表 1。

2.2.2 线性关系 精密称取大黄素纯度标准物质候选物质样品 12.48 mg, 移至 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 配制成浓度为 499.2 μg·mL⁻¹ 储备液。分别精密移取 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 获得 6 种浓度样品

表 1 系统适用性试验结果

Tab 1 Results of system suitability test

序号	主峰面积	含量/%	保留时间/ min	主峰拖尾 因子	分离度	理论 板数
1	119 52.3	99.67	9.131	1.12	19.46	14 987
2	119 30.7	99.67	9.110	1.12	19.40	14 548
3	118 99.1	99.66	9.128	1.13	19.27	14 605
4	1179 6.8	99.64	9.169	1.13	19.69	14 736
5	117 66.1	99.61	9.111	1.12	19.45	14 922
6	117 90.0	99.62	9.142	1.13	19.64	15 024
RSD/%	0.68	0.03	0.24	-	-	-

(4.992, 24.96, 49.92, 99.84, 249.6, 499.2 μg·mL⁻¹)。分别精密移取 6 种浓度溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图及峰面积, 按“2.1”项下色谱条件进样分析。以样品浓度($X/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标, 以峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归线性方程为 $Y=76\ 905X+42\ 099$, 相关系数 $r=1.000\ 0$ ($n=6$)。结果表明, 在 4.992~499.2 μg·mL⁻¹ 内, 大黄素峰面积与浓度呈现良好的线性关系。

2.2.3 仪器精密度 按“2.2.1”项下方法配制浓度为 500 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 连续重复进样 6 次。结果 RSD 为 0.17%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性 按“2.2.1”项下方法平行配制 6 份浓度为 500 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 每个样品重复进样 3 次, RSD=1.61%, 表明方法重复性良好。

2.3 样品均匀性检验

从 500 支大黄素纯度标准物质候选物中随机抽取 15 支, 每支平行取样 3 次, 配制成 500 μg·mL⁻¹ 的溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进行均匀性检验, 采用 HPLC 面积归一化法进行测定, 获得 45 个均匀性检验数据, 结果见表 2。

采用单因素方差分析对均匀性检验数据进行统计分析, $F=0.87$; 查 F 检验临界值表知: $F_{0.05}(14, 30)=2.04$, $F<F_{0.05}(14, 30)$ 。表明大黄素纯度标准物质候选物样品具有良好的均匀性。结果见表 3。

2.4 稳定性考察

2.4.1 短期稳定性 考虑到大黄素纯度标准物质在运输及转移过程对环境的要求, 对包装后标准物质样品进行高温实验(60 °C, 14 d)、高湿实验 [(90±5)%], 25 °C, 14 d]、光照实验[照度(4 500±

表 2 均匀性检验结果

Tab 2 Results of homogeneity

编号	观测次数	相对纯度/%			均值/ %
		1	2	3	
1	3	99.64	99.59	99.66	99.63
2	3	99.66	99.64	99.60	99.63
3	3	99.59	99.64	99.67	99.63
4	3	99.67	99.69	99.65	99.67
5	3	99.64	99.66	99.61	99.64
6	3	99.64	99.59	99.65	99.63
7	3	99.66	99.64	99.65	99.65
8	3	99.65	99.65	99.68	99.66
9	3	99.65	99.66	99.69	99.67
10	3	99.64	99.65	99.65	99.65
11	3	99.63	99.66	99.63	99.64
12	3	99.65	99.65	99.65	99.65
13	3	99.62	99.67	99.62	99.64
14	3	99.64	99.64	99.66	99.65
15	3	99.65	99.52	99.65	99.61

表 4 短期稳定性实验结果

Tab 4 Results of short-term stability

实验条件	时间/d	次数	纯度值/%			均值/%	标准差
			1次	2次	3次		
高温	0	3	99.68	99.67	99.67	99.67	0.000 057 74
	7	3	99.68	99.67	99.68	99.68	0.000 057 74
	14	3	99.65	99.66	99.67	99.66	0.000 100 00
高湿	0	3	99.68	99.67	99.67	99.67	0.000 057 74
	7	3	99.68	99.69	99.68	99.68	0.000 057 74
	14	3	99.69	99.66	99.67	99.67	0.000 152 75
光照	0	3	99.68	99.67	99.67	99.67	0.000 057 74
	7	3	99.66	99.64	99.66	99.65	0.000 115 47
	14	3	99.66	99.67	99.65	99.66	0.000 100 00

当标准物质特性量值的标准值未知时,用平均值一致性检验法评价标准物质的稳定性,公式

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \times \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}}$$

查 t 分布双侧分位数表知: $t_{0.05(4)}=2.776$, 高温 $t_{0.05(4)}(0, 7)=2.121$, 高温 $t_{0.05(4)}(0, 14)=1.500$, 高湿 $t_{0.05(4)}(0, 7)=2.121$, 高湿 $t_{0.05(4)}(0, 14)=0$, 光照 $t_{0.05(4)}(0, 7)=2.683$, 光照 $t_{0.05(4)}(0, 14)=1.500$ 。

短期实验结果表明,经上述 3 种影响因素实验前后标准物质样品的化学纯度未发生变化,包装标准物质样品在短期不同环境条件下的稳定性良好。证明大黄素纯度标准物质的包装能够保证满足运输及转移过程中对环境的一般需求。

2.4.2 长期稳定性 对包装后大黄素纯度标准物质候选物样品进行常温下的长期稳定性考察,分

表 3 均匀性检查方差分析结果

Tab 3 ANOVA results of homogeneity

差异源	离差平方和	自由度	均方差	均方差比	概率	F 临界值
组间	1.12×10^{-6}	14	7.98×10^{-8}		0.87	2.04
组内	2.74×10^{-6}	30	9.13×10^{-8}			
总计	3.86×10^{-6}	44				

500)lx, 14 d], 并分别于 0, 7, 14 d 对经过高温、高湿、光照后的标准物质样品进行检测,以考察标准物质样品纯度变化情况。每个时间点随机抽样 3 瓶样品,每瓶进 3 针,采用高效液相色谱技术的面积归一化方法检测样品纯度,纯度检测结果见表 4。

别于 0, 1, 2, 4, 6, 12 月取样进行纯度检测。每个时间点随机抽取 6 瓶样品,按“2.2.1”项下方法配制供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行检测,纯度检测结果见表 5。

以 X 代表时间,以 Y 代表标准物质的纯度值,获得线性方程为 $Y=0.000\ 000\ 6X+0.996\ 4$, 斜率 $a=6 \times 10^{-7}$, 直线的标准偏差

$$S^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - b - aX_i)^2 / n - 2 = 9.26 \times 10^{-9}$$

$$\text{的不确定度为 } S_{(a)} = S / \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = 9.78 \times 10^{-6}$$

自由度为 $n-2=6-2=4$, $P=0.95$ (95%置信区间)的因子 $t=2.776$; 由 $|a| < t_4^{0.05} \times S_{(a)}$, 故斜率是不显著的,因而未观察到不稳定性。实验结果表明,大黄素纯度标准物质候选物在 12 个月内稳定性良好。

表 5 长期稳定性实验结果

Tab 5 Results of long-term stability

时间/月	次数	纯度值/%						均值/%	标准差
		1	2	3	4	5	6		
0	6	99.60	99.61	99.68	99.59	99.61	99.68	99.63	0.000 407 0
1	6	99.68	99.69	99.68	99.59	99.63	99.61	99.65	0.000 422 7
2	6	99.65	99.64	99.65	99.59	99.66	99.65	99.64	0.000 253 0
4	6	99.68	99.67	99.64	99.66	99.63	99.64	99.65	0.000 196 6
6	6	99.67	99.64	99.66	99.65	99.61	99.59	99.64	0.000 307 7
12	6	99.68	99.68	99.66	99.61	99.60	99.60	99.64	0.000 392 0

2.5 纯度标准值研究

随机抽取 10 支大黄素纯度标准物质候选物样品，配制成 500 μg·mL⁻¹ 的溶液，采用面积归一化法测定样品的纯度值，结果见表 6 和表 7。标准物质化学纯度计算数学模型为：

$W_{HPLC} = 100\% \times A_{\text{化合物色谱峰面积}} / A_{\text{总色谱峰面积}}$ ，其中 W_{HPLC} 表示化合物的相对纯度， $A_{\text{化合物色谱峰面积}}$

示测定被测化合物色谱峰面积值， $A_{\text{总色谱峰面积}}$ 表示测量化合物加各杂质成分的色谱峰面积之和。首先，对 10 个纯度值进行格拉布斯 (Grubbs) 检验以剔除可疑值，计算得 $G = 1.938 4$ ，查格拉布斯临界值表知： $G_{0.95}(10) = 2.176$ 。因 $G < G_{0.95}(10)$ ，故 10 组数据中无可疑值存在。

表 6 大黄素色谱峰面积结果

Tab 6 Results of chromatographic peak areas of emodin

编号	Area-1	Area-2	Area-3	平均	s	相对纯度/%
DHSu-1	12 069.00	12 072.00	12 066.40	12 069.13	2.80	99.64
DHSu-2	12 342.40	12 351.00	12 343.80	12 345.73	4.61	99.65
DHSu-3	12 116.60	12 098.80	12 112.80	12 109.40	9.37	99.64
DHSu-4	12 206.50	12 202.50	12 220.90	12 209.97	9.68	99.64
DHSu-5	11 991.90	11 998.20	11 987.40	11 995.50	5.42	99.64
DHSu-6	12 196.60	12 191.90	12 200.70	12 196.40	4.40	99.65
DHSu-7	12 128.50	12 132.00	12 123.70	12 128.07	4.17	99.66
DHSu-8	119 73.10	11 979.60	11 988.90	11 980.53	7.94	99.65
DHSu-9	12 006.20	120 17.10	12 012.50	12 011.93	5.47	99.63
DHSu-10	11 945.00	11 941.00	11 930.50	11 938.83	7.49	99.62
平均值				12 098.25		99.64

表 7 总色谱峰面积结果

Tab 7 Results of total chromatographic peak areas

编号	Area-1	Area-2	Area-3	平均	s
DHSu-1	12 113.20	12 115.80	12 109.80	12 112.93	3.01
DHSu-2	12 384.80	12 394.30	12 386.90	12 388.67	4.99
DHSu-3	12 159.50	12 142.60	12 156.90	12 153.00	9.10
DHSu-4	12 249.30	12 246.30	12 265.30	12 253.63	10.21
DHSu-5	12 034.70	12 042.00	12 030.50	12 035.73	5.82
DHSu-6	12 240.60	12 234.10	12 244.60	12 239.77	5.30
DHSu-7	12 168.60	12 173.80	12 165.90	12 169.43	4.02
DHSu-8	12 014.30	12 024.70	12 030.00	12 023.00	7.99
DHSu-9	12 048.90	12 063.90	12 055.90	12 056.23	7.51
DHSu-10	11 989.10	11 986.90	11 975.70	11 983.90	7.19
平均值				12 141.63	

2.6 杂质成分研究

由于高效液相色谱面积归一化法测定纯度值的局限性,样品中的水分、无机杂质和溶剂残留均无法检测,因此分别采用卡尔费休水分测定法、炽灼残渣法、气相色谱法进行相关物质的检测。实验结果表明,样品中水分含量为 0.021%、炽灼残渣为 0.046%、溶剂残留为 0.035%,合计 0.102%。最终可得大黄素纯度标准物质的纯度标准值为 $99.64\% \times (100\% - 0.102\%) = 99.54\%$ 。

2.7 HPLC 纯度标准值的不确定度评估

HPLC 实验引入的不确定度由“2.5”项下的数学模型可知,主要是由色谱峰面积引入,包含了由于天平、量瓶以及色谱仪等因素带来的各种影响因素。峰面积的不确定度计算公式为 $u_{(A_{\text{色谱峰}})} = \sqrt{\sum S_{\text{色谱峰}}^2 / 10}$, 式中 $u_{(A_{\text{色谱峰}})}$ 表示色谱峰引入的不确定度, $S_{\text{色谱峰}}$ 表示色谱峰标准偏差, n 表示测定次数; 标准物质的 HPLC 合成不确定度计算公式为

$$u_{(\text{HPLC})} = W_{\text{HPLC}} \times \sqrt{[u_{(A_{\text{主峰}})} / A_{\text{主峰}}]^2 + [u_{(A_{\text{总色谱峰}})} / A_{\text{总色谱峰}}]^2}$$

式中 $u_{(\text{HPLC})}$ 表示合成不确定度, W_{HPLC} 表示化合物的相对纯度, $u_{(A_{\text{主峰}})}$ 表示色谱主峰面积引入的不确定度值, $u_{(A_{\text{总色谱峰}})}$ 表示色谱总峰面积引入的不确定度值, $A_{\text{主色谱峰}}$ 表示 10 组主色谱峰面积均值, $A_{\text{总色谱峰}}$ 表示 10 组总色谱峰面积均值。根据表 5~6 中的数值计算,可得到 HPLC 合成不确定度值为 0.000 778。

扩展不确定度计算, $U_{(\text{HPLC})} = k \cdot u_{(\text{HPLC})}$, k 取 2, $U_{(\text{HPLC})} = 0.000 778 \times 2 = 0.001 6$, $P=95\%$ 。最终可知大黄素纯度标准物质 HPLC 测定的纯度值为 $(99.54 \pm 0.16)\%$, $k=2$, $P=0.95$ 。

3 DSC 法

3.1 实验条件

升温速率: $2.0 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$; 升温区间: $245 \sim 290 \text{ }^\circ\text{C}$; 炉内气体: 静态空气; 称样量: $1.75 \sim 3.25 \text{ mg}$, 样品使用前 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下干燥至恒重。记录 DSC 热流值变化曲线,采用 STARe 分析软件计算其纯度。大黄素纯度标准物质候选物 DSC 检测图谱见图 3。

3.2 方法学研究

3.2.1 线性关系 分别精密称取 6 份 $1.75 \sim 3.25 \text{ mg}$ 内不同质量的自制大黄素纯度标准物质,置于

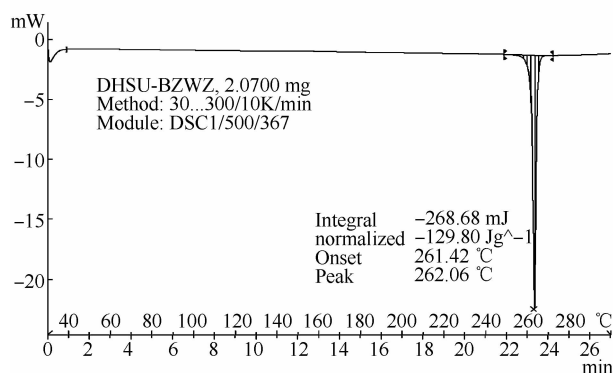


图 3 大黄素纯度标准物质候选物 DSC 检测图谱

Fig 3 DSC curve of emodin purity CRM candidate

$40 \mu\text{L}$ 的标准 Al_2O_3 坩埚中,压盖,按“3.1”项下实验条件进行 DSC 实验,记录热流值吸热峰面积。以大黄素纯度标准物质候选物样品的质量 (X/mg) 为横坐标,吸热峰面积 (Y) 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归线性方程为 $Y=102.25X-18.047$, $r=0.999 7(n=6)$ 。实验结果表明,所建立的 DSC 方法在 $1.75 \sim 3.25 \text{ mg}$ 内线性关系良好。

3.2.2 方法精密性 分别精密称取 6 份质量约为 2.55 mg 的大黄素纯度标准物质候选物样品,置于 $40 \mu\text{L}$ 的标准铝坩埚中,压盖,按“3.1”项下方法进行 DSC 实验,记录热流值吸热峰面积。6 次测量热流值吸热峰面积分别为 235.38, 236.19, 235.07, 236.10, 235.97, 236.78, $\text{RSD}=0.26\%$,表明所建立的方法精密性良好。

3.3 纯度标准值研究

随机抽取大黄素纯度标准物质候选物样品 10 支,称取适量,置于 $40 \mu\text{L}$ 的标准铝坩埚中,压盖,按“3.1”项下方法进行进样测试,检测结果见表 8。对获得的 10 组数据进行 Grubbs 检验,剔除可疑值,经计算可知 $\bar{x}=99.60\%$, $s=4.9 \times 10^{-5}$, $G=1.225$; 查 Grubbs 临界值表可知 $G_{0.95}(10)=2.176$, 因 $G < G_{0.95}(10)$, 故 10 组数据中无可疑值存在。综上,可获得大黄素纯度标准物质的 DSC 纯度值为 99.60% 。

表 8 DSC 测量数据

Tab 8 Results of DSC

序号	样品量/mg	纯度值/%	序号	样品量/mg	纯度值/%
1	2.45	99.60	6	2.56	99.60
2	2.56	99.61	7	2.61	99.60
3	2.69	99.61	8	2.64	99.60
4	2.58	99.60	9	2.80	99.61
5	2.61	99.60	10	2.72	99.61

3.4 杂质成分研究

由于 DSC 测定纯度值的局限性, 样品中的水分、溶剂残留等挥发性杂质均无法检测, 因此分别采用卡尔费休水分测定法、气相色谱法进行相关物质的检测。实验结果表明, 样品中水分含量为 0.021%、溶剂残留为 0.035%, 合计 0.056%。最终可得大黄素纯度标准物质的纯度标准值为 $99.60\% \times (100\% - 0.056\%) = 99.54\%$ 。

3.5 DSC 纯度值的不确定度评估

经分析, 本实验测量结果的不确定度来源主

表 9 DSC 检测分析方法的合成标准不确定度评定结果

Tab 9 Results of combined uncertainty of DSC method

标准不确定度分量	不确定度来源	数值	标准不确定度	相对标准不确定度	评定方法
$u_{B1}(\text{DSC})$	钢标定焓变	-27.83 J/g	2.37×10^{-15}	8.52×10^{-17}	B
$u_{A1}(\text{DSC})$	测量	99.649%	6.97×10^{-5}	6.99×10^{-5}	A
$u_{B2}(\text{DSC})$	称量	2.45 mg	4.18×10^{-4}	1.71×10^{-4}	B
$u_{B3}(\text{DSC})$	仪器温度	0.01 K	1.93×10^{-6}	1.93×10^{-4}	B
$u_{B4}(\text{DSC})$	纯度分析软件	99.649%	3.05×10^{-4}	3.06×10^{-4}	B

根据表 9 计算 $u_{(\text{DSC})} = 0.000\ 404$, 根据 JJF 1059-1999, 当不确定度为均匀分布且置信概率为 0.95 时, 扩展不确定度的包含因子 $k=2$, 其扩展不确定度 U 可计算: $U_{(\text{DSC})} = k_p u_{(\text{DSC})}$, $U_{(\text{DSC})} = 0.08\%$ 。最终可知大黄素纯度标准物质的 DSC 纯度值为 $(99.54 \pm 0.08)\%$, $k=2$, $P=0.95$ 。

4 两种方法的纯度标准值和不确定度值

4.1 纯度标准值确定

采用 HPLC 和 DSC 2 种不同原理的方法对大黄素纯度标准物质分别进行了定值, 2 种方法数据结果一致, 故取 2 种方法的平均值作为大黄素纯度标准物质的标准值, 即: $(99.54\% + 99.54\%) / 2 = 99.54\%$ 。

4.2 纯度标准值的总不确定度评价

标准值的总不确定度由 3 个部分组成。第一部分是通过对测量数据的标准偏差、测量次数及所要求的置信水平按统计方法计算出。第二部分是通过对测量影响因素的分析, 估计出其大小。第三部分是物质不均匀性和物质在有效期内的变动性所引起的误差。将这三部分误差综合就构成标准值的总不确定度。

4.3 HPLC 未检出杂质成分引入的不确定度

由“2.6”项下测定结果可知, 大黄素纯度标准物质中水分、无机杂质与溶剂残留的含量测定

要有 5 个方面, 包括由钢标定焓变时产生的不确定度、测量产生的 A 类不确定度、样品称量天平称量误差产生的不确定度、仪器的温度误差产生的不确定度、系统偏差产生的不确定度及标准不确定度等, 根据 JJF1059-1999《测量不确定度评定与表示》, 对上述 5 个不确定度的量值进行分析, 结果见表 9。其合成标准不确定度 $u_{(\text{DSC})}$ 由各分量相对不确定度合成计算, 公式为

$$u_{(\text{DSC})} = 99.54\% \times \sqrt{u_{B1(\text{DSC})}^2 + u_{A1(\text{DSC})}^2 + u_{B2(\text{DSC})}^2 + u_{B3(\text{DSC})}^2 + u_{B4(\text{DSC})}^2}$$

值均较小($<0.1\%$), 对纯度标准值的定值结果几乎没有影响, 所以由其引入的不确定度可以忽略不计。

4.4 样品均匀性引入的不确定度

由样品均匀性产生的不确定度按照国际标准化组织标准物质指南 35-标准物质定值的一般原则和统计学原理规定, 数学模型为 $S_H = \sqrt{MS_{\text{组内}}^2 / n \times 4 / \nu_2}$, 其中式中的 S_H 表示均匀性产生的不确定度, n 表示测定次数, $MS_{\text{组内}}$ 表示组内均方差, ν_2 表示组内检查的自由度。计算结果为 2.679×10^{-8} , 与测量产生的不确定度相比, 均匀性产生的不确定度较小, 可以忽略不计。

4.5 样品稳定性引入的不确定度

样品稳定性引入的不确定度数学模型为 $S_{(a)} = S / \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$, $S_t = t \cdot S_{(a)}$; 式中 $S_{(a)}$ 表示斜率产生的不确定度, S 表示直线的标准偏差, X_i 表示时间点, \bar{X} 表示时间均值, S_t 表示稳定性产生的不确定度, t 表示时间。计算结果为 2.350×10^{-4} 。

4.6 2 种定值方法测量引入的不确定度

2 种定值方法合成不确定计算数学模型为 $\frac{u_c(x)}{x} = \sqrt{\left(\frac{u_c(x_1)}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u_c(x_2)}{x_2}\right)^2}$, $u_c(x)$ 式中表示合成

不确定度, \bar{x} 表示纯度标准值最佳值, $u_c(x_1)$ 表示 HPLC 法合成不确定度, x_1 表示 HPLC 法纯度标准值, $u_c(x_2)$ 表示 DSC 法合成不确定度, x_2 表示 DSC 法纯度标准值。计算结果为 8.766×10^{-4} 。

4.7 总合成不确定度计算

总合成不确定度计算数学模型为 $u_{c(\text{总})} = \sqrt{u_{c(x)}^2 + S_H^2 + S_I^2}$ 。式中 $u_{c(\text{总})}$ 表示总合成不确定度, $u_{c(x)}$ 表示测量产生的合成不确定度, S_H 表示均匀性产生的不确定度, S_I 表示稳定性产生的不确定度。总合成不确定度计算结果为 9.074×10^{-4} 。

4.8 扩展不确定度计算

数学模型为 $U_{(x)} = k \times u_{c(\text{总})}$, 式中 $U_{(x)}$ 表示扩展不确定度, k 表示包含因子, $u_{c(\text{总})}$ 表示总合成不确定度。 k 取 2, $P=0.95$, 扩展不确定度为 0.18%。

4.9 大黄素纯度标准物质标准值及不确定度

大黄素纯度标准物质的标准值为 (99.54 ± 0.18)%, $k=2$, $P=0.95$ 。

5 讨论

本实验研制大黄素纯度标准物质采用 2 种不同原理的分析方法联合定值, 即 HPLC 面积归一化法和基于凝固点下降原理的 DSC 法, 有效克服了采用一种技术带来的分析方法缺陷, 使定值结果准确可靠。

研制的大黄素纯度标准物质提供了纯度标准值和不确定度评估数据, 研究按照计量标准物质研究方法, 标准物质具备量值溯源和传递功能, 可用于仪器校准、新方法确认、药品质量控制等。

本实验研制的计量纯度标准物质在国内外尚属首次, 已经获得国家质检总局批准为国家一级有证计量标准物质, 证书编号为 GBW09513。

大黄素为常见中药材及中成药中的有效成分, 大黄素纯度标准物质的研制将为中药的现代化和标准化发挥积极的推动作用。

REFERENCES

- [1] ZHANG S S. Survey research on the pharmacological effects of emodin [J]. China Med Her(中国医药导报), 2006, 2(23): 12-13.
- [2] Ch.P 2010(中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010.
- [3] Metrology Law of the People's Republic of China(中华人民共和国计量法) [S]. 1985.
- [4] Technical Specification of Development of Primary Certified Reference Materials of the People's Republic of China(中华人民共和国一级标准物质研制技术规范) [S]. 1994: JJF 1006-1994.
- [5] International Organization for Standardization, Reference Materials-General and Statistical Principles for Certification [S]. ISO Guide 35, 2006.
- [6] Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement(测量不确定度评定与表示) [S]. 1999: JJF 1059-1999.
- [7] QUAN H, HAN Y Z, LAI X P, et al. Reference Material and its Application Technology(标准物质及其应用技术) [M]. Beijing: Standards Press of China, 2003.
- [8] GONG N B, GUO Y H S, LU Y, et al. Preparation and characterization a new certified reference material of puerarin (GBW09511) [J]. Anal Methods, 2012, 4(10): 3443-3347.
- [9] GONG N B, LIU S, LU Y, et al. Purity assessment of luteolin reference material candidates by coulometric titration method [J]. Anal Methods, 2013(5): 784-788.
- [10] ZHANG Y. Extraction and separation of emodin from PCS and the analysis of structure [J]. J Qiqihar Med Coll(齐齐哈尔医学院学报), 2010, 31(7): 1091-1093.
- [11] CHEN D J, WANG L, ZU X D, et al. Studies on the extraction of emodin and the analysis of structure by NMR [J]. J Nanjing TCM Univ(南京中医药大学学报), 2010, 26(2): 126-129.

收稿日期: 2012-11-13

布洛芬联合芎麻汤对利血平化低 5-HT 伴局部脑血管痉挛的偏头痛模型的影响

徐成坤¹, 郭建生^{2*} (1. 南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

摘要: 目的 研究布洛芬联合芎麻汤对利血平化低 5-HT 伴局部脑血管痉挛的实验性偏头痛模型小鼠的作用。方法 采用皮下注射利血平 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 14 d 建立偏头痛模型, 第 14 天小鼠乙醚麻醉, 经颅穿刺大鼠皮层注射自身鼠血凝块 $2 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 观察布洛芬联合芎麻汤对利血平偏头痛小鼠体质量、凝血时间及血清中 5-HT 及其代谢产物 5-HIAA 含量的影响。结果

基金项目: 湖南省高校创新平台开发基金项目(11K048); 湖南省研究生科研创新项目(CX2010B351)

作者简介: 徐成坤, 男, 副主任药师 Tel: (0734)8578926 E-mail: ckx1881@163.com *通信作者: 郭建生, 男, 硕士, 教授, 博导, 硕导 Tel: (0731)88458239 E-mail: gjs7878@126.com