

应用误差叠加原理评价色谱内标法

浙江医科大学药物分析教研室(杭州310006) 曹 苏 陶巧凤* 刘志强

提要 本文应用误差叠加原理,对药物分析中的内标定量法进行了评价。五个实际例子说明,内标法改善分析方法精密度的条件是 $C_{V,i_2} < 2rC_{V,i_1}$ 。作者提出了在药物分析中所用内标法的条件。本文表明内标法除了其优点外,还存在一些局限性。

关键词 内标法 误差叠加原理 色谱法 药物分析

在药物分析中,内标法已广泛用于各种分析方法,特别是色谱法。内标法不仅可用作药物鉴别(相对保留值)和含量测定的参比依据,还可用作从各种药物制剂和生物样品中分离提取药物的分离效率的验证^[1,2]。该法是将准确量的标准参比物(内标物),加到待分析样品中,混匀,当样品中的药物在分离提取和定量测定过程中有所损失或在药物定性分析中保留值有所改变时,相当量的内标物有补偿和校正作用。但是,由于色谱法种类较多,待测样品类型复杂,各种分析方法的操作与条件不同,因此采用内标法后,

能否改善药物分析的精密度和准确性、能否减免分析误差,就成为人们所关心的问题。本文应用误差叠加原理,从理论和实践两方面,探讨色谱法采用内标测定药物含量的条件。

理论部分

精密度的评价是评价分析方法的重要指标,通常用标准偏差(S)和变异系数(C_V)表示。它用于衡量测定值的离散程度(重现性),分别用下列方程式表示^[3]:

$$S = \left[\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right]^{1/2} \quad (1)$$

$$C_v = \frac{S}{\bar{x}} \quad (2)$$

式中 x_i 为单次测定值, $\bar{x}$ 为算术平均值, n 为测定次数。

色谱内标法定量时, 经常采用被测组分(i)的峰高或峰面积(h_i)与内标物(S)的峰高或峰面积(h_s)的比值(R)。根据误差叠加原理^[4,6], 对于 $R = h_i/h_s$, 可得到:

$$S_R^2 = \left(\frac{1}{h_s}\right)^2 S_i^2 + \left(\frac{h_i}{h_s^2}\right)^2 S_s^2 - 2 \frac{h_i}{h_s h_s^2} S_{is} \quad (3)$$

$$\frac{S_R^2}{(\bar{R})^2} = \frac{S_i^2}{(\bar{h}_i)^2} + \frac{S_s^2}{(\bar{h}_s)^2} - 2 \frac{S_{is}}{\bar{h}_i \bar{h}_s} \quad (4)$$

$$(C_{v,R})^2 = (C_{v,i})^2 + (C_{v,s})^2 - 2 \frac{S_{is}}{\bar{h}_i \bar{h}_s} \quad (5)$$

已知相关系数 $\gamma = S_{is}/S_i S_s$, 代入(5)式得

$$(C_{v,R})^2 = (C_{v,i})^2 + (C_{v,s})^2 - 2\gamma C_{v,i} C_{v,s} \quad (6)$$

内标法若能改善分析方法的精密度, 则要求

$$C_{v,R} < C_{v,i} \text{ 或 } (C_{v,R})^2 < (C_{v,i})^2 \quad (7)$$

将(6)式代入(7)式, 重排后得

$$C_{v,s} < 2\gamma C_{v,i} \quad (8)$$

若 $C_{v,i} = C_{v,s}$ 或 $C_{v,i} = 2C_{v,s}$, 则 h_i 与 h_s 的相关系数必须分别大于0.50或0.25, 内标法才能改善分析精密度。若 $\gamma = +1$, 则 $C_{v,s}$ 须小于两倍的 $C_{v,i}$ 。若 γ 出现负值, 因为 $C_{v,s}$ 和 $C_{v,i}$ 均为正值, 故(8)式无法成立, h_i 与 h_s 之间只能是正相关。一般情况要求 $C_{v,s}$ 小以满足(8)式。

实 验

上分100型气相色谱仪, 2 m不锈钢柱, 固定液 PEG 20 M, 测定颠茄酊中乙醇含量以异丙醇为内标, 进样量 1 μ l。Varian 5000 型高效液相色谱仪, 15 cm $\times$ 4 mm i.d. C_{18} 反相柱, 装配 10 μ l 定量进样管, 测定苯以萘为内标, 进样量 5 μ l 和 10 μ l。测定结果列于表 1。

Tab 1 Data of GC and HPLC with the Internal Standard

No	GC			HPLC (5 μ l)			HPLC(10 μ l)		
	h_i (mm)	h_s (mm)	R	h_i (mm)	h_s (mm)	R	h_i (mm)	h_s (mm)	R
1	96.0	99.0	0.9697	59.8	48.9	1.223	119.9	98.0	1.223
2	96.3	98.0	0.9827	60.0	48.8	1.230	119.5	97.8	1.222
3	95.6	98.0	0.9755	59.0	48.6	1.214	120.7	99.8	1.209
4	93.0	93.0	1.000	60.0	49.3	1.217	120.0	98.5	1.218
5	91.0	93.3	0.9753	60.2	49.8	1.209	120.3	99.5	1.209
6	90.0	93.0	0.9677	60.4	49.9	1.210	118.2	97.4	1.214
7	94.0	95.2	0.9874	62.2	51.0	1.220	120.0	97.5	1.231
8	96.5	100	0.9650	62.4	51.0	1.224	119.5	97.7	1.223
Mean	94.05	96.2	0.9779	60.5	49.7	1.218	119.8	98.3	1.219
Cv%	2.7	3.0	1.2; 1.2*	2.0	1.9	0.60 0.59*	0.62	0.93	0.63; 0.62*
r			+0.921			+0.956			+0.746

* Value of calculation using equation (6)

按照(8)式评价三种方法。GC(进样量小)和HPLC采用部分充满进样管进样(5 μ l)

时, 均受进样量体积准确性的影响, 采用内标法 $2\gamma C_{v,i}$ 等于5.0和3.8, 分别大于各自

相应的 $C_{V,i}$ 3.0 和 1.9, 测定方法的精密度大为提高。而 HPLC 采用全充满定量管进样时, 进样体积误差已可忽略, 故当色谱系统稳定时, 采用内标法 $2\gamma C_{V,i} = 0.93 = C_{V,s}$, 分析方法精密度并未见提高。

Haefelfinger^[6] 将待测药物和其内标加到空白血浆中, 用有机溶剂提取, 血浆提取物, 采用自动进样系统进行 GC 或 HPLC 分析。HPLC 采用全充满定量管进样, 测定结果列于表 2。

Tab 2 GC and HPLC of Plasma Extracts with Automatic Injection

No	GC(arbitrary units)			HPLC		
	hi	hs	R	hi (mm)	hs (mm)	R
1	2109	1338	1.576	114	119	0.9580
2	2056	1356	1.516	112	120	0.9333
3	1970	1272	1.549	112	120	0.9333
4	1937	1285	1.507	112	120	0.9333
5	1757	1285	1.367	112	121	0.9256
6	1984	1315	1.509	112	123	0.9106
7	1943	1294	1.502	110	122	0.9016
8	1884	1332	1.414	111	124	0.8952
9	1942	1308	1.485	111	124	0.8952
10				111	125	0.8880
11				111	126	0.8801
Mean	1954	1309	1.492	111.6	122.2	0.9140
Cv%	5.1	2.2	4.3; 4.3*	0.92	1.9	2.6; 2.6*
r			+0.558			-0.672

GC 分析的 $2\gamma C_{V,i} = 5.7$ 大于 $C_{V,s} = 2.2$, 因此内标法明显改善方法的精密度。然而 HPLC 分析采用内标法, 却出现 $C_{V,s} > 2C_{V,i}$, 此时即使 $\gamma = +1$, 采用内标法也无济于事; 再则此例 r 为负值, 组分 i 与内标 s 的信号响应之间不存在相关关系, 损害了分析方法的精密度。

讨 论

运用误差叠加原理, 对上述结果的分析表明, 内标法不能在任何情况下都改善分析的精密度, 并非万能。对各种具体情况需要根据 $C_{V,i}$ 、 $C_{V,s}$ 及 r 按(8)式判断内标法是否对分析方法精密度有贡献。一般, 色谱法的系统误差, 如仪器稳定性、进样体积等, 可用内标法克服。但色谱分析误差的种类并

不仅限于此。待测组分与内标的理化性质、样品的制备和贮存及取样方式等均可影响测量结果的重现性。有时, 色谱峰峰形不对称也直接损害方法的精密度。因此中国药典规定^[7]采用峰高定量时, 须检查药物色谱峰的对称因子 $\frac{t_{w0.05}}{2A}$, 式中 $t_{w0.05}$ 是距底边 5% 峰

高处的峰宽度, A 是峰高上距底边 5% 处至峰上升边的半边峰宽。分析药物制剂和生物样品中的药物时, 其前处理过程, 如分离、提取、净化、浓缩和衍生化等操作, 即使所用内标与待测药物理化性质相类似, 也可能引入较大的变异性。因此, 选用内标法定量时, 应按(8)式评定。

药物分析中常用的一些内标物列于表 3^[8-10]。

Tab 3 The Internal Standards in
Pharmaceutical Analysis

Drugs to be measured	Internal Standards
Acetaminophen	α -Acetamidophenol
Alcohols	2-Propanol, t-Butanol
Amphetamines	N-Prohyl Amphetamine
Barbiturates	Ibomal, Mephobarbital
Basic Drugs	Carbinoxamine, SKF-525-A
Cocaine	Metycaine
Morphine	Nalorphine
Neutral Drugs	Methylphenidte
Vitamin B Group	p-Hydroxybenzoic Acid

参 考 文 献

[1] 江燕主编: 法医毒物分析, 第一版, 北京, 人民卫

生出版社, 1988, 12~13, 139

[2] 南京药学院药分组: 药物分析, 南京, 江苏科技出版社, 1981, 95-97

[3] IUPAC, data interpretation, Pure and Applied Chemistry, 1976, 45:99

[4] 罗旭: 化学统计学基础, 第一版, 沈阳, 辽宁人民出版社, 1985, 33-58

[5] SL Meyer, Data Analysis for Scientists and Engineers, John Wiley & Sons Inc, 1975, 39-62

[6] P Haefelfinger, J Chromatogr, 1981, 218, 73

[7] 中国药典, 一九八五年版, 二部, 附录27

[8] 南京药学院主编: 药物分析, 第一版, 北京, 人民卫生出版社, 1980, 36-37

[9] 刘耀, 徐婉: 毒物分析工作的质量管理, 中国法医学杂志, 1987, 2, 132

[10] 安登魁主编: 药物分析, 第二版, 北京, 人民卫生出版社, 1986, 239~271

Estimation of the Internal Standard Technique in Chromatography Using Law of Propagation of Error

Zeng Su Tao Qiaofeng Liu Zhiqiang

(Dept of Pharmaceutical Analysis, Zhejiang Medical University, Hangzhou, 310006)

Abstract

It is possible to estimate how the internal standard technique affects the precision of a chromatographic method in pharmaceutical analysis by use of the law of propagation of error. The use of this method is demonstrated with 5 practical examples. Conditions are provided for the proper internal standard in the analysis of drugs including material, preparation, and biological specimen. This paper may show that the internal standard technique not only has advantages but also limits.

Key words Internal Standard Technique Pharmaceutical Analysis Chromatographic Analysis Law of Propagation of Error