

一点法与工作曲线法两种外标法选择依据的探讨

金樟照 祝明 王志宇¹ (杭州 310004 浙江省药品检验所; ¹ 杭州 310006 浙江医科大学附属第二医院)

摘要 目的: 根据试验测定的标准直线 $y = kx + b$, 如何根据直线方程中系数 k 、 b 及进样量选择使用外标一点法还是用工作曲线法进行测定。方法: 使用数学推导出偏差计算公式并通过测定芍药苷的量进行验证。结果: 根据数学推导得因使用不同外标法而引起的偏差公式为 $\epsilon = \left| \frac{b}{kx_0 + b} \times \left(1 - \frac{x_0}{x_1}\right) \right|$ (x_0, x_1 分别为对照品及样品进样量)。结论: 高效液相色谱法(气相色谱法), 允许使用不同外标法引起偏差为 1%, 当标准直线方程中系数符合 $\left| \frac{b}{kx_0 + b} \right| \leq 3.5\%$ 时, 或薄层色谱扫描法, 允许使用不同外标法引起偏差为 3%, 当标准直线方程中系数符合 $\left| \frac{b}{kx_0 + b} \right| \leq 10.5\%$ 时, 样品进样量至少为对照品进样量的 80% ~ 140% 范围内, 可用外标一点法代替工作曲线法进行定量测定。

关键词 含量测定; 外标一点法; 工作曲线法

Discussion on superseding working curve method using one-point external standard method in quantitative analysis

Jin Zhangzhao, Zhu Ming, Wang Zhiyu (Zhejiang Provincial Institute for Drug Control Hangzhou 310004)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** to discuss on superseding working curve method using one-point external standard method in quantitative analysis. **METHOD:** The equation to calculate error caused by different external standard methods was derived and validated by experiment. **RESULT:** the error equation is: $\epsilon = \left| \frac{b}{kx_0 + b} \times \left(1 - \frac{x_0}{x_1}\right) \right|$. **CONCLUSION:** if $\epsilon = 1\%$ and $\left| \frac{b}{kx_0 + b} \right| \leq 3.5\%$ for the HPLC or GC, $\epsilon = 3\%$ and $\left| \frac{b}{kx_0 + b} \right| \leq 10.5\%$ for the TLCs, and the amount of test sample (x_1) is at least 80% ~ 140% of the amount of external standard (x_0), one-point external standard method can supersede by working curve method in quantitative analysis.

KEY WORDS: quantitative analysis, one-point external standard method, working curve method

在制订药品质量标准含量测定过程中, 对如何根据试验测定的标准直线方程 $y = kx + b$ 来确定样品和对照品进样量以及选用外标一点法还是工作曲线法的定量方法实际上存在随意性。理论上只有当 $b = 0$ 时用外标一点法定量, 当 $b \neq 0$ 时用标准曲线法定量, 但实际上 $b \neq 0$, 那么在何种情况下可以用外标一点法代替标准曲线法进行定量? 本文通过数学理论推导以及通过测定芍药苷含量进行验证, 为解决上述问题提供借鉴。

1 数学推导

在进行数学推导之前, 根据实际情况作以下假设:

- 1.1 按工作曲线法标化得直线方程 $y = kx + b$, 且 x 在适当范围内与响应值有良好的线性关系。
- 1.2 选用线性范围内一点(x_0, y_0)作为外标一点法进行标化

得一通过原点直线方程 $y = \frac{y_0}{x_0}x$, 且 $y_0 = kx_0 + b$ 。

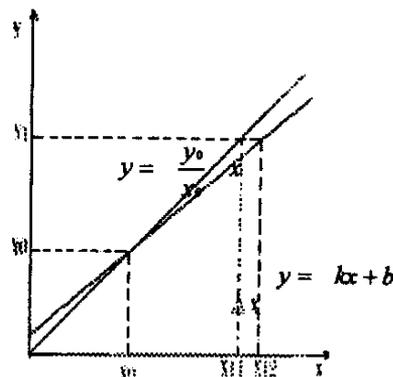


图 1 不同外标法引起偏差原理示意图

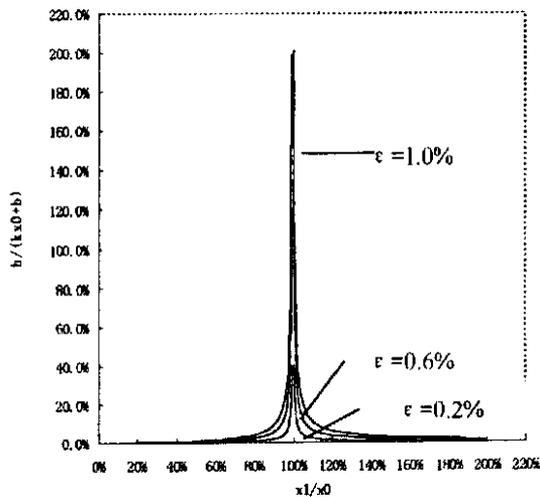


图2 偏差 ϵ , $\frac{x_1}{x_0}$, $\frac{b}{kx_0+b}$ 关系图

1.3 已知在线性范围内样品 (x_1, y_1) , 符合 $y_1 = kx_1 + b$, 根据工作曲线法的数据点 (x_{12}, y_1) , 符合 $y_1 = kx_{12} + b$, 根据外标一点法得数据点 (x_{11}, y_1) , 符合 $y_1 = \frac{y_0}{x_0} x_{11}$.

表1 $\frac{x_1}{x_0}$ 和 $\left| \frac{b}{kx_0+b} \right|$ 的关系表 ($\epsilon = 1.0\%$)

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$\frac{x_1}{x_0}$	20%	40%	60%	77%	80%	100%	120%	140%	160%	180%	200%
$\frac{b}{kx_0+b}$	0.3%	0.7%	1.5%	3.5%	4.0%	∞	6.0%	3.5%	2.7%	2.3%	1.0%

由图2和表1可得: 标准直线方程系数符合 $\left| \frac{b}{kx_0+b} \right| \leq 3.5\%$ 时, 样品进样量为对照品进样量的 77% ~ 140% 范围内, 用外标一点法可代替工作曲线法进行定量测定。

薄层色谱扫描法进行定量时板上同一样品不同点测

表2 $\frac{x_1}{x_0}$ 和 $\left| \frac{b}{kx_0+b} \right|$ 的关系表 ($\epsilon = 3.0\%$)

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$\frac{x_1}{x_0}$	20%	40%	60%	77%	80%	100%	120%	140%	160%	180%	200%
$\left \frac{b}{kx_0+b} \right $	0.75%	2.0%	4.5%	10.5%	12%	∞	18%	10.5%	8%	6.75%	6.0%

由图2和表2可知: 标准直线方程系数符合 $\left| \frac{b}{kx_0+b} \right| \leq 10.5\%$ 时, 样品进样量为对照品进样量的 77% ~ 140% 范围内, 用外标一点法可代替工作曲线法进行定量测定。

国际人用药品注册技术要求协调会在 ICH-Q2B 方法学验证工业指导原则中规定一般分析含量测定线性范围应为测试样品浓度的 80% ~ 120%, 含量均匀度测定要求线性范围应为测试样品浓度的 70% ~ 130%, 至于溶出度测定和杂质检查要根据具体情况而定线性范围。因此, 认为 $\left| \frac{b}{kx_0+b} \right| \leq$

1.4 因使用不同外标法引起的绝对偏差 Δx 。

1.5 因使用不同外标法引起的相对偏差 ϵ 。

$$\Delta x = |x_{12} - x_{11}| = \left| \frac{y_1 - b}{k} - \frac{x_0}{y_0} \times y_1 \right| = \left| \frac{b \times (y_1 - y_0)}{k \times y_0} \right|$$

$$\epsilon = \frac{\Delta x}{x_1} = \frac{\left| \frac{b \times (y_1 - y_0)}{k \times y_0} \right|}{x_1} = \frac{\left| \frac{b \times (kx_1 + b - kx_0 - b)}{k \times (kx_0 + b)} \right|}{x_1}$$

$$= \left| \frac{b \times (x_1 - x_0)}{(kx_0 + b) \times x_1} \right| = \left| \frac{b}{kx_0 + b} \times \left(1 - \frac{x_0}{x_1} \right) \right|$$

(公式 1-1)

由上式可知因选用不同外标法引起的偏差由标准品和样品的进样量的比值以及标准品的线性关系确定。由于高效液相色谱(气相色谱法)因进样偏差约为 0.5% (5 ~ 10 μ l), 1% (1 ~ 5 μ l, 自动进样仪进样), 若注射器进样偏差也可能略大于 1%, 因此认为因选用不同外标法所引起的偏差也应在 1% 左右。当选用不同外标法所引起的偏差为 1% 时, $\frac{x_1}{x_0}$

和 $\left| \frac{b}{kx_0+b} \right|$ 的关系参见表 1。

定结果偏差可达 3%, 认为用不同外标法引起的偏差也可达 3%。当选用不同外标法所引起的偏差为 3% 时, $\frac{x_1}{x_0}$ 和

$\left| \frac{b}{kx_0+b} \right|$ 的关系参见表 2。

3.5% (高效液相色谱法或气相色谱法) 或 $\left| \frac{b}{kx_0+b} \right| \leq 10.5\%$ (薄层色谱扫描法), 允许不同外标法引起偏差为不得过 1% (高效液相色谱法或气相色谱法) 和 3% (薄层色谱扫描法), 在一般分析和含量均匀度测定中可用外标一点法代替工作曲线法进行含量测定。

2 实验验证

2.1 仪器与试剂

HP1100 系列高效液相色谱仪(自动进样仪, 柱温箱, VWD 检测器, Chem station 化学工作站)。

乙腈(色谱纯),重蒸馏水,甲醇(分析纯)。

芍药苷(供含量测定用),为中国药品生物制品检定所提供。

2.2 芍药苷测定

2.2.1 色谱条件

流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(11:89),检测波长230nm,色谱柱:Discovery C18(150mm×4.6mm×5μm)。

2.2.2 标准直线方程测定

精密吸取芍药对照品溶液(0.04456mg/ml)2,4,6,8,10,12μl,注入液相色谱仪中测定峰面积,根据最小二乘法计算回归方程,用前5点计算的回归方程一为 $y = 1.2901x +$ 表3 实际测定偏差与按公式1-1计算偏差

序号	进样量 (ng)	峰面积	工作曲线法 计算进样量	外标一点法 计算进样量	实测偏差 ε	公式1-1计算 偏差ε	$\frac{x_1}{x_0}$
1	89.12	124.5	89.76	93.92	4.66%	4.40%	40%
2	178.24	236.8	176.81	178.64	1.02%	0.73%	80%
3	267.36	361.3	273.32	272.56	0.28%	0.49%	120%
4	356.48	473.2	360.05	356.97	0.86%	1.10%	160%
5	445.60	579.1	442.14	436.86	1.19%	1.47%	200%
6	534.72	658.0	503.30	496.38	1.29%	1.71%	240%

由上表可知样品进样量为对照品进样量的80%~160%范围内,可用外标一点法代替工作曲线法进行定量测定。由上表可知使用不同外标法引起的实测偏差与用公式1-1计算的偏差存在偏差,但不影响最终的结果。

表4 实际测定偏差与按公式1-1计算偏差

序号	进样量 (ng)	峰面积	工作曲线法 计算进样量	外标一点法 计算进样量	实测偏差 ε	公式1-1计算 偏差ε	$\frac{x_1}{x_0}$
1	89.12	124.5	84.08	93.92	11.04%	10.67%	40%
2	178.24	236.8	175.31	178.64	1.87%	1.92%	80%
3	267.36	361.3	276.46	272.56	1.46%	1.78%	120%
4	356.48	473.2	367.37	356.97	2.92%	2.67%	160%
5	445.60	579.1	453.40	436.86	3.71%	3.56%	200%
6	543.72	658.0	517.50	496.38	3.95%	4.15%	240%

由上表可知按方程二用于外标法定量时,只有在样品进样量为对照品进样量的90%~110%范围内,可用外标一点

8.695, $r = 0.9997$,其中 x 为进样量(ng);用6点计算的回归方程二为 $y = 1.2309x + 21.01$, $r = 0.9983$ 。由此可知芍药苷在进样量为89.12~445.6ng范围内呈良好的线性关系。

2.2.3 根据2.2.2项测定的回归方程计算不同外标法引起的偏差ε

选芍药苷对照品溶液5μl作为外标一点法得一通过原点的直线方程为 $y = 1.3256x$,即 $x_0 = 222.8ng$ 。根据回归方程一和直线方程 $y = 1.3256x$ 验证使用不同外标法引起的偏差ε, $\frac{b}{kx_0 + b} = 2.94\%$,结果参见表3。

根据回归方程二和直线方程 $y = 1.3256x$ 验证使用不同外标法引起的偏差ε, $\frac{b}{kx_0 + b} = 7.12\%$,结果参见表4。

法代替工作曲线法进行定量测定。