

水杨酸片溶出度测定的不确定度及 Z 比分数研究

夏佳, 付珣, 陈志禹, 席时东(宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315000)

摘要: 目的 比较、分析水杨酸片溶出度测定的不确定度及 Z 比分数法。方法 按照中国药典 2010 年版溶出度测定法先对溶出仪进行性能确认, 再分别对水杨酸片 A、B 样进行溶出度篮法和桨法的测定。考察各影响因素, 计算不确定度, 取包含因子 $k=2$ (对应的置信水平为 95%), 得扩展不确定度。用 Z 比分数法统计参加此次能力验证的 205 家实验室的结果。结果 A 样篮法和桨法溶出度分别为 23.75%, 23.65%; B 样篮法和桨法溶出度分别为 23.49%, 24.46%。Z 比分数法统计结果满意。结论 通过 2 种方法的比较, 可以对溶出度有更全面的认识。

关键词: 水杨酸片溶出度; 不确定度; Z 比分数

中图分类号: R917.105

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)12-1460-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.012

Study on the Uncertainty and the Z Score for the Determination of Dissolution Rate of Salicylic Acid Tablets

XIA Jia, FU Xun, CHEN Zhiyu, XI Shidong(Ningbo Institute of Drug Control, Ningbo 315000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare and analyze the uncertainty and the Z score for the determination of dissolution rate of salicylic acid tablets. **METHODS** To confirm the performance of dissolution tester according to the dissolution method of Ch.P 2010 Vol II. To test the dissolution of salicylic acid tablets A and B using dissolution method 1 and 2. The factors influenced upon the measurement were inspected and the uncertainty of each factor was calculated, then the expanded uncertainty was obtained by using a coverage factor $k=2$ (confidence of approximately 95%). Analyzed the results of 205 labs participating in this ability verification by the use of the Z score. **RESULTS** The dissolution of salicylin acid tablets A using dissolution method basket and paddle was 23.75, 23.65%. The dissolution of salicylin acid tablets B using dissolution method basket and paddle was 23.49%, 24.46%. The statistical results of the Z score were satisfying. **CONCLUSION** By comparing these two methods, more comprehensive knowledge about the dissolution can be get.

KEY WORDS: dissolution rate of salicylic acid tablets; uncertainty; the Z score

溶出度系指活性药物从片剂、胶囊剂或颗粒剂等制剂在规定条件下溶出的速率和程度^[1]。它是药品的重要评价指标之一, 在很大程度上影响了药品在人体内的吸收及利用, 因而需要严格加以控制。然而, 溶出度的测定受很多因素影响, 使结果偏差很大, 为了提高结果的可靠性, 引入不确定度以及 Z 比分数法, 对相关数据进行分析、评价。将这 2 种方法同时应用于溶出度测定的文献尚未见报道。

不确定度的定义是根据所获信息, 表征赋予被测量值分散性的非负参数^[2]。标准不确定度是以

标准差表示测量不确定度。测量不确定度的 A 类评定, 简称 A 类评定, 是对在规定测量条件下测得的量值, 用统计分析的方法进行的测量不确定度分量的评定。而对于一些测量工作中, 不能进行或不需要重复测量的情况则采用测量不确定度的 B 类评定, 简称 B 类评定, 是对现有信息进行非统计方法的评定。合成标准不确定度是由在一个测量模型中各输入量的标准测量不确定度获得的输出量的标准不确定度, 它是测量结果标准差的估计值。扩展不确定度是合成标准不确定度与一个 >1 的数字因子(包含因子)的乘积。包含因子

为获得扩展不确定度,对合成标准不确定度所乘之数字因子,一般在 2~3 内,它等于扩展不确定度与合成标准不确定度之比。

Z 比分数法^[3]是国际公认、中国实验室认可评价实验室检测能力的一种方法。在实验室能力比对前,由组织者准备好均匀的样品,统一试验方法后,分发给各参加单位,参加单位按时返回比对结果。通过 Z 比分数法得出每一个比对结果对应的 Z 比分数。进而评价出该比对结果是“满意结果”、“可疑值”或者“离群值”,作为一个定性的评价。

1 仪器与试剂

Sotax AT7 型溶出仪(瑞士 Sotax); UV-2550 紫外分光光度计及工作站(日本岛津); CP225D 电子天平(德国 Sartorius); 水杨酸溶出度校正片(中国药品生物制品检定所,批号: 101030-200610,标示量: 每片 300 mg); 水杨酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 100106-201104,纯度: 100%); 磷酸二氢钾(批号: 10017618); 氢氧化钠(批号: 10019718); 乙醇(批号: 10009164)均购自国药集团化学试剂有限公司; 纯水(实验室自制)。

2 溶出仪的性能确认

2.1 校正所用溶出度测定仪

按中国药典 2010 年版二部附录 X C 第一法(篮法)、第二法(浆法)操作。

2.2 溶出介质的配制

取磷酸二氢钾 6.80 g, 加氢氧化钠 1.58 g, 先用尽量少的水溶解(约 50 mL), 加煮沸并冷却至约 41 °C 的水稀释至 1 000 mL, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取水杨酸对照品 2 份约 20 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加乙醇 1 mL, 摇匀, 加溶剂适量, 经超声处理 30 min, 使水杨酸溶解, 加溶剂至刻度, 摇匀, 精密量取 5.0 mL 置 50 mL 量瓶中, 溶剂稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.4 校正溶液的制备

取介质溶剂各 900 mL, 分别注入每个操作容器中, 温度保持在(37±0.5)°C, 按规定(篮法, 浆法均为 100 r·min⁻¹)调整转速。取水杨酸溶出度校正片 6 片, 分别精密称定, 分置 6 个容器中, 自药片接触溶出介质时开始计时, 30 min 时取样。

2.5 测定法

精密吸取校正溶液 5.0 mL, 分别置 25 mL 量

瓶中, 加溶出介质至刻度, 摇匀, 采用 1 cm 吸收池, 照分光光度法(中国药典 2005 年版二部附录 IV A), 在 296 nm 的波长处测定吸收度, 按以下公式计算每片溶出度:

$$\text{溶出度}(\%) = \frac{A_{\text{校}} \times 900 \times 5}{\bar{F} \times 300} \times 100\%$$

$A_{\text{校}}$: 30 min 供试品溶液的吸光度; \bar{F} : 2 份

对照品的平均响应因子 $\bar{F} = \frac{F_1 + F_2}{2}$; F_1 : 第 1 份对

照品响应因子 $F_1 = \frac{A_1}{C_1}$; F_2 : 第 2 份对照品响应因

子 $F_2 = \frac{A_2}{C_2}$; A_1 : 第 1 份对照品溶液的吸光度; A_2 :

第 2 份对照品溶液的吸光度; C_1 : 第 1 份对照品溶液的浓度(mg·mL⁻¹); C_2 : 第 2 份对照品溶液的浓度(mg·mL⁻¹)。

2.6 溶出度测定仪校正结果

根据篮法和浆法, 水杨酸标准片校正结果平均溶出度分别为 24.61%(RSD=1.75%)和 24.78%(RSD=1.04%)。

3 水杨酸片溶出度的测定

水杨酸片作为能力验证的测试样品, 测定方法同校正方法一致, 水杨酸片分为 A 样和 B 样, 分别都做了篮法和浆法, 篮法样品 A、B 平均溶出度分别为 23.75%(RSD 为 1.24%)和 23.49%(RSD 为 1.54%); 浆法样品 A、B 平均溶出度分别为 23.65%(RSD 为 1.57%)和 24.46%(RSD 为 1.15%)。

4 不确定度计算

4.1 不确定度来源分析

$$\text{溶出度}(\%) = \frac{A_{\text{供}} \times 900 \times 5}{\bar{F} \times 300} \times 100\%$$

$A_{\text{供}}$: 30 min 时供试品溶液的吸光度; \bar{F} : 2

份对照品的平均响应因子, $\bar{F} = \frac{F_1 + F_2}{2}$ 。

分析整个实验过程, 可以确定不确定度的来源包括称量、定容、样品稀释、紫外测定等^[4]。考虑到实验室温度变动引起的溶液体积变化对实验带来的影响, 引入一个温度系数 f_{temp} , 该系数为 1^[5]。

称量对照品使用的天平的单次测量标准差为 0.05 mg, 重复性的标准差为 0.03 mg, 假定矩形分布, 对照品称量的不确定度:

$$u(m) = \sqrt{2 \times \left[\left(\frac{0.05}{\sqrt{3}} \right)^2 + \left(\frac{0.03}{\sqrt{3}} \right)^2 \right]} = 0.0476 \text{ mg}$$

对照品稀释使用标定过的 5 mL 移液管和标定过的 100 mL 和 50 mL 量瓶；样品稀释使用标定过的 5 mL 移液管和标定过的 25 mL 量瓶。5 mL 移液管和 100, 50, 25 mL 量瓶允差分别为 ± 0.015 , ± 0.10 , ± 0.05 , ± 0.03 mL。体积的 3 个主要影响：校准、重复性和温度影响^[6]。假设温度变化是矩形分布，实验室温度在 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 变化，则 $u(f_{\text{temp}}) = 2.1 \times 10^{-4} \times \frac{5}{\sqrt{3}} = 0.00061$ 。容量器具的相对标准不确定度的计算结果见表 1。

表 1 容量器具的相对标准不确定度

Tab. 1 The relative standard uncertainty of volumetric apparatus

序号	标示值/ mL	允许 误差	允许误差 $/\sqrt{6}$	读数 误差 r	$R/\sqrt{3}$	相对合成 标准不 确定度
1	5(2)	0.015	0.0061	0.001	0.0005774	0.0012
2	25	0.03	0.012	0.01	0.005774	0.00053
3	50	0.05	0.020	0.01	0.0005774	0.00082
4	100	0.10	0.04	0.1	0.05774	0.00084
5	900	10	4.1	5	2.8867	0.0056

4.2 合成不确定度

根据重复测量($n=10$)结果可知，所使用的紫外分光光度计在 296 nm 处的相对标准不确定度 0.01^[7]，相对合成标准不确定度： $u_{\text{rel总}}=0.024$ 。溶出度结果为 23.75% 的合成标准不确定度： $u_{\text{总}}=0.024 \times 23.75\%=0.57\%$ ，取包含因子 $k=2$ (对应的置信水平为 95%)，得扩展不确定度： $U=2 \times 0.57\%=1.14\%$ 。

5 Z 比分数计算

Z 比分数一般是用来评价能力验证结果的。分发给实验室的通常是样品对(A 和 B)。把各实验室测量样品对的和、差进行标化：

$T=(A+B)/\sqrt{2}$ ； $D=|A-B|/\sqrt{2}$ 。分别将 T 和 D 从大到小排列，计算各自的低四分位(Q_L)、高四分位(Q_H)、中位数(M)。计算四分位间距($IQR=Q_H-Q_L$)；标准化四分位间距($SIQR=IQR \times 0.7413$)；计算 Z 比分值： $Z_{\text{间}}=(T-M_T)/SIQR_T$ ； $Z_{\text{内}}=(D-M_D)/SIQR_D$ 。

Z 比分数的判断：满意 $|Z| \leq 2$ ；有问题 $2 < |Z| < 3$ ；不满意 $|Z| \geq 3$ 。

采用 Excel 软件对数据完整无误的 205 家实验室的篮法和浆法数据(采用 Grubbs 检验法，

$\alpha=0.05$)分别对 A 样和 B 样水杨酸片溶出度测定结果进行统计分析，先剔除有明显有问题的数据)。溶出量结果见表 2。205 家实验室的数据来源于 NIFDC-PT-016 水杨酸片溶出度测定能力验证计划。篮法 A 样 Z 比分数统计结果见图 1。

表 2 能力验证测定结果统计

Tab. 2 The statistics of the ability verification determination results

方法	样品	平均值	平均值 $\pm 3SD$	最大值	最小值
篮法	A	24.60	24.60 ± 2.78	27.42	21.75
	B	23.87	23.87 ± 3.14	26.99	21.05
浆法	A	25.02	25.02 ± 3.48	28.35	21.33
	B	24.03	24.03 ± 3.91	28.82	20.39

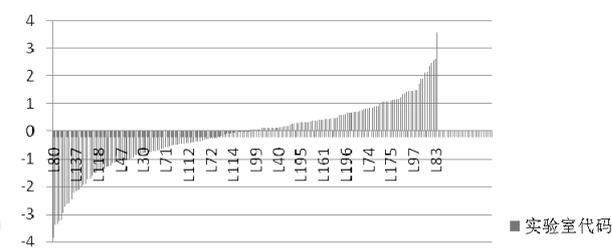


图 1 篮法 A 样 Z 比分数统计结果

Fig. 1 The statistical results of the Z score of sample A (basket)

6 讨论

通过对比以上 2 种方法可知，理论上，溶出度计算得到的不确定度只有 1.14%，然而此次能力验证收到的 205 家实验室的数据差值最大有 7%，远远超过不确定度。分析原因，可能是不同实验室所采用的仪器、试剂、所处的环境以及人员操作不一样造成的。另外，由于药典规定转速、溶出介质温度允许有偏差，而且取样方式不同等因素也会对溶出度结果造成很大的影响，而这些因素又很难在不确定度中得以体现。从统计学角度来看，Z 比分法的平均值相对更接近真实值，可以给参加的实验室提供一个相对准确的参考。通过对实验结果的分析，找出实验存在的问题，以提高实验能力和水平。

REFERENCES

- [1] 中国药典·二部[S]. 2010: Appendix 85-87.
- [2] LU M, FAN G R, WANG Y, et al. Research progress of measurement uncertainty in drug detection [J]. Chin Pharm. Aff(中国药事), 2013, 27(5): 485-492.
- [3] 任万杰. 稳健 Z 比分数法在实验室能力比对实验中的运用

[J]. 中国计量, 2012, 30(6): 1080-1083.

[4] XU M Z, HU C Q, JIN S H, et al. Application of uncertainty evaluation in arbitration test of determination of dissolution rate of immediate release solid oral dosage forms [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(6): 1080-1083.

[5] The people's Republic of China National Metrology Technical specifications(中华人民共和国国家计量技术规范)JJF 1059.1-2012 [S]. 2012.

[6] LUO S Q, ZHOU Z. Evaluation of measurement uncertainty for the determination of alcohol residue in glycididazole sodium by GC internal standard method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(2): 173-177.

[7] LI H Q, PANG J. Assessment of the uncertainty in the determination of vitamin B1 tablets by UV [J]. Qilu Pharm. Aff(齐鲁药事), 2009, 28(5): 276-278.

收稿日期: 2015-06-12

裸花紫珠抑制 NO 生成活性及其活性部位的 HPLC-DAD-ESI-MS 研究

潘争红^{1,2}, 黄思思¹, 宁德生¹, 谷陟欣², 黄胜^{2,3}, 颜冬兰², 谢运昌¹, 李典鹏¹(1.广西壮族自治区·中国科学院, 广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西 桂林 541006; 2.九芝堂股份有限公司, 长沙 410008; 3.海南九芝堂药业有限公司, 海口 570311)

摘要: 目的 确定裸花紫珠抑制一氧化氮(NO)生成的活性部位, 并建立一套基于液质联用(HPLC-DAD-ESI-MS)技术快速鉴定裸花紫珠有效部位中主要成分的方法。方法 以脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞 RAW264.7 生成一氧化氮(NO)作为筛选模型, 采用液质联用(HPLC-DAD-ESI-MS)进行成分测定。结果 裸花紫珠中低极性的乙酸乙酯部位和石油醚部位显示出较强的抑制 NO 活性, 可能是其抗炎活性部位, 黄酮及黄酮苷类是乙酸乙酯部位的主要成分, 黄酮和二萜成分是石油醚部位的主要成分。结论 研究结果为裸花紫珠的产品升级及其质量控制提供了参考依据。

关键词: 裸花紫珠; 一氧化氮; 抗炎; HPLC-DAD-ESI-MS

中图分类号: R965.2; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)12-1463-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.013

Inhibition Activity on Nitric Oxide Production of *Callicarpa nudiflora* and HPLC-DAD-ESI-MS Analysis on Its Effective Part

PAN Zhenghong^{1,2}, HUANG Sisi¹, NING Desheng¹, GU Zhixin², HUANG Sheng^{2,3}, YAN Donglan², XIE Yunchang¹, LI Dianpeng¹(1.Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2.Jiuzhitang Co., Ltd., Changsha 410008, China; 3. Hainan Jiuzhitang Pharmaceutical Co., Ltd., Haikou 570311, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the active fractions of *Callicarpa nudiflora* on inhibitory of nitric oxide production, and to establish a method for identification of the main compositions of *Callicarpa nudiflora* by HPLC-DAD-ESI-MS technology. **METHODS** The inhibitory activity of nitric oxide production was carried out using lipopolysaccharide (LPS) to induce macrophage RAW264.7. The main compositions were determined by HPLC-DAD-ESI-MS technology. **RESULTS** The petroleum ether fraction and ethyl acetate fraction of *Callicarpa nudiflora* could inhibit the production of nitric oxide in lipopolysaccharide induced RAW264.7 cells ($IC_{50} < 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Flavonoids and flavonoid glycosides were the main constituents of ethyl acetate fraction, and the main constituents of petroleum ether fraction were flavonoids and diterpenoids. **CONCLUSION** The research provides a reference for the upgrading of products and the quality control of *Callicarpa nudiflora*.

KEY WORDS: *Callicarpa nudiflora*; nitric oxide; anti-inflammatory; HPLC-DAD-ESI-MS

裸花紫珠(*Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.) 为马鞭草科紫珠属植物, 产自我国海南、广西、广东, 印度、越南、马来西亚等地也有分布, 其

根、叶可入药, 具有收敛止血、消炎解毒等功效^[1]。由该味药材浸膏制成的裸花紫珠片已于 2000 年被列入国家基本药物目录, 在临床上用于治疗急性

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 11107010-3-10)

作者简介: 潘争红, 男, 博士, 副研究员 Tel: 15807737260 E-mail: pan7260@126.com