

盐酸千金藤素国家一级有证标准物质的研制

杨德智^{a,b}, 胡堃^{a,b}, 张燕^a, 吕扬^{a,b*} (北京协和医学院中国医学科学院药物研究所, a.药物晶型研究中心, 晶型药物研究北京市重点实验室; b.天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 目的 开展盐酸千金藤素国家一级标准物质的研制, 建立盐酸千金藤素纯度测量方法, 并进行不确定度的评定。方法 根据我国一级标准物质研制技术规范及国际标准化组织相关导则的要求, 采用差示扫描量热法与质量平衡法测定盐酸千金藤素的纯度, 并对其不确定度进行评定。结果 研制的盐酸千金藤素标准物质的纯度值为 99.6%, 不确定度为 0.4%, 其中包含因子为 2, 置信区间为 0.95。结论 研制的盐酸千金藤素被国家质量监督检验检疫总局评为国家一级标准物质, 编号 GBW09578。该标准物质的研制为相关药物产品的质量控制研究提供物质标准与标准方法, 亦为其他天然产物标准物质的研究提供科学依据。

关键词: 盐酸千金藤素; 有证标准物质; 差示扫描量热法; 质量平衡法; 不确定度

中图分类号: R914.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)03-0266-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.03.002

Development of National Primary Certified Reference Material of Cepharanthine Hydrochloride

YANG Dezhi^{a,b}, HU Kun^{a,b}, ZHANG Yan^a, LYU Yang^{a,b*} (Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, a. Research Center for Pharmaceutical Polymorphism, Institute of Materia Medica; b. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Through establishing accurate, reliable analytical method and evaluation of uncertainty, to develop the national primary certified reference material(CRM) of cepharanthine hydrochloride. **METHODS** The purity of cepharanthine hydrochloride CRM was certified by the joint certification including mass balance method and differential scanning calorimetry (DSC) and the uncertainty was carefully evaluated on the basis of Technical Norm of Primary Reference Material and related documents requirements of International Standards of the International Organization for Standardization. **RESULTS** The purity of cepharanthine hydrochloride CRM was 99.6% and the uncertainty was 0.4% with $k=2$, $P=0.95$. **CONCLUSION** The national primary CRM of cepharanthine hydrochloride developed in this study has been approved and assigned as a grade primary reference material by the General Administration of Quality Supervision, Inspection, and Quarantine of the People's Republic of China, which was numbered GBW09578. The CRM provides quality control of related pharmaceutical products with standard material and method and also provides reference for purity determination and uncertainty evaluation of other medicines and natural products.

KEY WORDS: cepharanthine hydrochloride; certified reference material; differential scanning calorimetry; mass balance method; uncertainty

盐酸千金藤素(cepharanthine hydrochloride, CH)是从防己科千金藤属植物的块根中提取分离出的一种双苄基异喹啉类生物碱单体化合物与盐酸形成的盐。具有镇痛消炎、抗病毒、调节免疫、升高白细胞、诱导肿瘤细胞分化等多种药理学活性^[1], 其化学结构式见图 1。在日本, 千金藤素作为升白细胞药物已在临床上应用 40 余年, 未发现明显的不良反应。在我国, 千金藤素片作为新药于 1993 年经卫生部批准上市, 临床应用于矽肺的治疗^[2]。盐酸千金藤素具有巨大的开发价值及应用

前景, 而针对盐酸千金藤素相关药物质量控制的标准物质的研制就显得尤为重要与迫切。

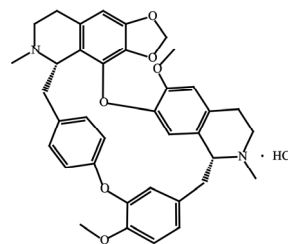


图 1 盐酸千金藤素化学结构式

Fig. 1 Chemical structural formula of cepharanthine hydrochloride

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09301-002-001); 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(GTZC201229)

作者简介: 杨德智, 男, 博士, 助理研究员 Tel: (010) 63030566
(010) 63161258 E-mail: luy@imm.ac.cn

E-mail: ydz@imm.ac.cn

*通信作者: 吕扬, 女, 研究员, 博导

Tel:

标准物质是准确进行定性定量测试分析的重要保障。根据国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)指南 30 的定义^[3], 标准物质(reference material, RM)是具有一种或多种足够均匀和很好地确定了特性值, 用以校准设备, 评价测量方法或给材料赋值材料或物质; 而有证标准物质(certified reference material, CRM)是附有证书的标准物质, 其一种或多种特性值用建立了溯源性的程序确定, 使之可溯源到准确复现的用于表示该特性值的计量单位, 每个标准值都附有给定置信水平的不确定度。标准物质的特性量值具有均匀性、稳定性、准确性和复现性的特点。它的应用已遍及工业生产、商业贸易、环境保护和医疗卫生等诸多领域, 在产品质量保证、仲裁检验、分析测试技术发展、计量学发展等方面发挥重要的作用^[4]。

本研究依据一级标准物质研制技术规范(JJF 1006-1994)^[5]以及 ISO 导则 34、35 的技术要求^[6-7], 开展盐酸千金藤素国家一级有证标准物质的研制, 以化学纯度作为特性量值, 研究内容主要包括样品的纯化、均匀性检验、稳定性考察、特性量值的确定与不确定度的评定。论文首次采用 2 种不同原理的检测分析方法, 即差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)与质量平衡法, 联合对盐酸千金藤素的纯度标准值进行确定研究, 并对分析方法的不确定度进行评定。

盐酸千金藤素标准物质已经通过国家标准物质委员会专家评审, 并获得国家质检总局颁发的国家一级标准物质证书(GBW09578)和计量器具生产许可证, 填补了我国有证标准物质的品种空白。

1 仪器与试剂

DSC 1/700 型差示扫描量热仪、V20 卡尔·费休滴定仪、XS105 型分析天平均购于瑞士 METTLER TOLEDO 公司; SX2.5-10 型箱式电阻炉(上海树立仪器仪表有限公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪(DAD 检测器, 美国 Agilent 公司); Agilent 7890A GC system(美国 Agilent 公司)。

盐酸千金藤素(成都曼斯特科技发展有限公司, 批号: MUST 11060902); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司); 磷酸(分析纯, 北京化学试剂公司); 水(Millipore 超纯水, 现制); 三乙胺(分析纯, 西陇化工集团股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 高纯度标准物质样品制备

取盐酸千金藤素粗品, 按照 1:50 的比例加入 50%乙醇溶液(外浴温度 70 °C), 加热至溶解, 趁热过滤, 滤液室温放置过夜, 至固体析出完全后抽滤, 经 60 °C 减压干燥至恒重, 即得盐酸千金藤素纯品。获得盐酸千金藤素白色固体, HPLC 检测化学纯度, 色谱条件: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%三乙胺水溶液(82:18); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; 检测浓度: 500 μg·mL⁻¹ (甲醇溶解); 检测波长: 284 nm。结果纯度为 99.76%。

2.2 化合物结构确证

采用四大光谱技术进行盐酸千金藤素标准物质样品的结构确证研究。

2.2.1 紫外分光光度法 吸收光谱在 200~400 nm 内扫描, 结果样品在乙醇溶液(40 μg·mL⁻¹)中于 216.5, 282.0 nm 处有最大吸收峰。

2.2.2 红外光谱法 采用溴化钾压片法进行红外光谱分析, 结果样品于 3 427, 3 075, 3 019, 2 933, 2 894, 2 838, 2 789, 2 771, 2 644, 2 574, 2 429, 2 266, 2 039, 1 891, 1 841, 1 777, 1 622, 1 585, 1 512, 1 474, 1 445, 1 424, 1 401, 1 384, 1 371, 1 359, 1 319, 1 269, 1 225, 1 207, 1 167, 1 130, 1 100, 1 062, 1 047, 1 035, 1 017, 998, 975, 956, 933, 910, 869, 853, 839, 798, 758, 740, 709, 663, 652, 625, 588, 575, 544, 531, 480 cm⁻¹ 处存在吸收峰。

2.2.3 质谱法 采用电喷雾电离质谱分析法, 检测获得 m/z : 304.3, 564.2[M-(CH₃-N-CH₂)]⁺, 607.2[M+H]⁺分子碎片峰。

2.2.4 核磁共振法 ①¹H-NMR(DMSO-*d*₆)δppm: 7.35(1H, d, J =8 Hz, 11'-H), 6.98(1H, d, J =7.5 Hz, 13'-H), 6.90(1H, d, J =7.5 Hz, 10'-H), 6.81(1H, d, J =7.5 Hz, 14'-H), 6.70(2H, s, O-CH₂-O), 6.52(1H, s, 10-H), 6.37(1H, s, 8-H), 6.24(1H, d, J =7 Hz, 10-H), 5.65(1H, s, 14-H), 5.58(1H, s, 13-H), 5.37(1H, s, 5'-H), 4.02(1H, m, 1'-H), 3.75(3H, s, 12-OMe), 3.55(3H, s, 6-OMe), 3.49(1H, m, 1-H), 2.52(3H, s, 2'-Me), 2.49(3H, s, 2N-Me), 2.0-3.2(11H, m)。②¹³C-NMR(DMSO-*d*₆)δppm: 151.66(C-12'), 148.20(C-11), 148.09(C-6),

146.44(C-12, 6'), 146.03(C-7), 141.29(C-9'), 138.90(C-8'), 137.41(C-7'), 132.35(C-9), 131.76(C-4a'), 131.56(C-4a), 130.28(C-10'), 127.75(C-14'), 126.33(C-8a), 124.00(C-8a'), 123.44(C-8a), 121.80(C-12'), 120.34(C-11'), 117.94(C-8), 116.23(C-10), 111.13(C-13), 120.02(C-5), 100.19(C-5'), 79.14(O-CH₂-O), 63.55(C-1), 61.43(C-1'), 55.32(12-OMe), 55.00(6-OMe), 51.00(C-3,3'), 44.64(2-Me), 43.57(2'-Me), 41.88(C-α'), 36.82(C-α), 28.63(C-4), 25.29(C-4')。以上实验数据与文献[8]对照数据一致,可确定化合物为盐酸千金藤素。

2.3 质量平衡法

质量平衡法要求首先确定样品中的各种杂质,包括非挥发性杂质(有机杂质)、水分、挥发性溶剂和灼烧残渣的含量,再从总物质中减去上述杂质得到该物质的纯度。计算公式如下:

$$\text{纯度} = (100\% - I_{\text{有机杂质}}) \times (100\% - I_{\text{溶剂残留}} - I_{\text{水分}} - I_{\text{灼烧残渣}}) \times 100\% \quad (1)$$

其中 I 代表杂质含量。

2.3.1 有机杂质测定 采用 HPLC 对供试品的有机杂质进行测定。精密称取供试品约 12.50 mg 共 10 份,分别用甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,制成 500 μg·mL⁻¹ 溶液。按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱峰面积,采用面积归一化法计算得相对纯度分别为 99.77%, 99.76%, 99.76%, 99.75%, 99.76%, 99.76%, 99.77%, 99.76%, 99.77%, 99.77%。将得到的供试品纯度值进行格拉布斯(Grubbs)检验^[9],均值为 99.76%,计算 $s=0.000\ 06$, $a_1=0.01\%$, $a_2=0.01\%$, $G=1.476$,查格拉布斯临界值表得 $G_{0.95}(10)=2.176$,因 $G < G_{0.95}(10)$,故 10 组数据中无可疑值。

2.3.2 其他杂质检测 ①溶剂残留:供试品中的溶剂残留检测使用气相色谱法,按照中国药典 2010 年版二部附录 VIII P 残留溶剂测定法测定,色谱条件:DM-624 色谱柱;前进样口温度:230 ℃;FID 检测器温度:250 ℃;进样量:1 μL;分流比:30:1;流速:1.5 mL·min⁻¹;升温程序:70 ℃保持 12 min,以 25 ℃·min⁻¹ 速度升至 180 ℃,保持 5 min,以 35 ℃·min⁻¹ 速度升至 230 ℃,保持 10 min。结果见表 1。②水分:采用卡尔·费休水分测定仪,按照中国药典 2010 年版二部附录 VIII M 水分测定法测定供试品中水分含量,结果见表 1。

③灼烧残渣:供试品中的无机杂质按照中国药典 2010 年版二部附录 VIII N 灼烧残渣检查法要求测定,结果见表 1。

表 1 供试品的杂质含量测定结果

Tab. 1 Results of impurities content in test sample %

编号	溶剂残留	水分	灼烧残渣
1	0.063 1	0.040 0	0.038 0
2	0.062 8	0.043 0	0.037 6
3	0.063 7	0.044 0	0.036 8
4	0.063 0	0.036 0	0.039 8
5	0.063 6	0.044 0	0.038 9
6	0.064 2	0.037 0	0.037 5
7	0.063 8	0.036 0	0.038 2
8	0.063 7	0.044 0	0.037 3
9	0.063 7	0.038 0	0.037 3
10	0.063 6	0.038 0	0.038 4
均值	0.064 0	0.040 0	0.038 0
s	0.000 4	0.003 4	0.000 9

2.3.3 不确定度评定 按照质量平衡法数学模型^[10]测定不确定度,结果见表 2。其中, $A_{\text{主峰}}$ 为主色谱峰面积, $A_{\text{总色谱峰}}$ 为总色谱峰面积, s 为测量标准偏差, n 为测量次数, k 为包含因子。

2.3.4 定值结果及不确定度

按照公式 1 计算盐酸千金藤素纯度标准物质标准值(即纯度值)得 99.62%,质量平衡法最终结果表示为 $(99.62 \pm 0.24)\%(n=10)$, $k=2$, $P=0.95$ 。

2.4 DSC 法

2.4.1 条件 升温速率:10 K·min⁻¹;升温区间:30~180 ℃;炉内气体:静态空气。

2.4.2 纯度测定 精密称取供试品 2.0~4.0 mg 共 10 份,分别置于 40 μL 的标准铝坩埚中,压盖,备用。记录 DSC 曲线,按以下公式计算相对纯度:

$$\text{纯度} = 1 - \frac{\Delta H_f F(T_0 - T_f)}{RT_0^2} \times 100\% \quad (2)$$

其中, ΔH_f 为纯物质的熔融热焓, R 为气体常数, T_0 为纯物质的熔点, T_f 为样品实测熔点, F 为熔融分数。

相对纯度分别为:99.62%, 99.67%, 99.63%, 99.60%, 99.56%, 99.57%, 99.62%, 99.68%, 99.62%, 99.56%。将得到的供试品纯度值进行格拉布斯检验,其均值为 99.61%,计算 $s=0.000\ 419\ 1$, $a_1=0.07\%$, $a_2=0.05\%$, $G=1.670$,查格拉布斯临界

值得得 $G_{0.95}(10)=2.176$, $G<G_{0.95}(10)$, 故 10 组数据中无可疑值。

2.4.3 不确定度评定 针对 DSC 纯度测量过程,

表 2 质量平衡法不确定度评定结果

Tab. 2 Results of uncertainty evaluation by mass balance method

参数	描述	公式	数值
$u_{\text{主峰}}$	色谱主峰面积不确定度	$\sqrt{\frac{\sum S_{\text{各组主峰偏差}}^2}{10}}$	2.866 4
$u_{\text{总色谱峰}}$	总色谱峰面积不确定度	$\sqrt{\frac{\sum S_{\text{各组总色谱峰偏差}}^2}{10}}$	2.950 5
u_{HPLC}	HPLC 测定不确定度	$W_{\text{HPLC}} \times \sqrt{\left[\frac{u_{A_{\text{主峰}}}}{A_{\text{主峰}}} \right]^2 + \left[\frac{u_{A_{\text{总色谱峰}}}}{A_{\text{主峰}}} \right]^2}$	0.001 18
$u_{\text{H}_2\text{O}}$	水分测定不确定度	$\frac{s}{\sqrt{n}}$	0.000 010 8
u_{solvent}	溶剂残留不确定度	$\frac{s}{\sqrt{n}}$	0.000 001 3
u_{ash}	灰分测定不确定度	$\frac{s}{\sqrt{n}}$	0.000 002 8
u_w	合成不确定度	$\sqrt{u_{\text{HPLC}}^2 + u_{\text{H}_2\text{O}}^2 + u_{\text{ash}}^2 + u_{\text{solvent}}^2}$	0.001 18
U_c	扩展不确定度	ku_w (其中 $k=2$, $P=0.95$)	0.002 36

表 3 DSC 法不确定度评定结果

Tab. 3 Results of uncertainty evaluation by DSC method

参数	描述	公式	数值
$u_{\text{B1(DSC)}}$	钢标定焓变不确定度	$\frac{s}{\sqrt{n}}$	2.77×10^{-3}
$u_{\text{A1(DSC)}}$	测量不确定度	$\frac{s}{\sqrt{n}}$	0.000 133
$u_{\text{B2(DSC)}}$	称量误差不确定度	$\left(\frac{\partial X}{\partial m} \frac{dm}{m} \right) / k$	0.001 92
$u_{\text{B3(DSC)}}$	温度误差不确定度	$\left(\frac{\partial X}{\partial T_0} + \frac{\partial X}{\partial T_m} \right) dT / k$	9.10×10^{-6}
$u_{\text{(DSC)}}$	合成标准不确定度	$99.61\% \times \sqrt{u_{\text{B1(DSC)}}^2 + u_{\text{A1(DSC)}}^2 + u_{\text{B2(DSC)}}^2 + u_{\text{B3(DSC)}}^2}$	0.001 35
U_c	扩展不确定度	ku_w (其中 $k=2$, $P=0.95$)	0.002 70

2.4.4 定值结果及不确定度 DSC 法测定盐酸千金藤素纯度标准物质的结果为 $(99.61 \pm 0.27)\%$ ($n=10$), $k=2$, $P=0.95$ 。

2.5 均匀性检验与稳定性研究

2.5.1 均匀性检验 随机数表抽取 15 支“盐酸千金藤素纯度标准物质”, 每支取样 3 次, 采用高效液相色谱面积归一化法进行均匀性检验。经方差分析, 得到 F 值为 1.08, 查 F 检验临界值得 $F_{0.05}(14, 30)=2.04$, 即 $F < F_{0.05}(14, 30)$ 。结果表明, 供试品具有良好的均匀性。

2.5.2 稳定性检验 ①短期稳定性: 考虑到盐酸千金藤素纯度标准物质在运输及转移过程对环境

对不确定度进行评定, 结果见表 3。其中, m 为称样量, X 为杂质含量, T_m 为样品熔点均值, T 为温度。

的要求, 对包装后标准物质样品进行高温实验 ($60\text{ }^\circ\text{C}$, 14 d)、高湿实验 [$(90 \pm 5)\%$, $25\text{ }^\circ\text{C}$, 14 d]、光照实验 [照度 $(4\ 500 \pm 500)\text{lx}$, 14 d], 并分别于 0, 7, 14 d 对标准物质样品进行检测^[11], 考察标准物质样品纯度变化情况。每个时间点随机抽取 3 瓶样品, 每瓶测量 3 次, 采用 HPLC 检测样品纯度, 结果见表 4。

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, 公式为:

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

表 4 短期稳定性实验结果

Tab. 4 Results of short-term stability

条件	时间/d	纯度值/%									均值/%	s/%
		瓶 1			瓶 2			瓶 3				
		1	2	3	1	2	3	1	2	3		
高温	0	99.76	99.77	99.76	99.76	99.75	99.79	99.78	99.76	99.77	99.77	0.012
	7	99.75	99.77	99.77	99.76	99.75	99.76	99.75	99.76	99.76	99.76	0.008
	14	99.76	99.77	99.76	99.74	99.74	99.76	99.77	99.74	99.76	99.76	0.013
高湿	0	99.76	99.77	99.76	99.76	99.75	99.79	99.78	99.76	99.77	99.77	0.013
	7	99.76	99.75	99.77	99.77	99.77	99.75	99.76	99.76	99.76	99.76	0.008
	14	99.76	99.75	99.77	99.75	99.77	99.73	99.75	99.77	99.76	99.76	0.013
光照	0	99.76	99.77	99.76	99.76	99.75	99.79	99.78	99.76	99.77	99.77	0.012
	7	99.74	99.76	99.76	99.75	99.77	99.77	99.77	99.76	99.77	99.76	0.011
	14	99.73	99.75	99.77	99.76	99.76	99.76	99.76	99.75	99.77	99.76	0.012

其中, $\bar{x}$ 表示测量平均值, n 表示测量数, s 表示测量标准偏差, 角标 1 为第 1 次测量, 角标 2 为第 2 次测量。

查 t 分布双侧分位数表得 $t_4^{0.05} = 2.776$, 计算获得: 高温 $t_4^{0.05}(0,7) = 1.192$, 高温 $t_4^{0.05}(0,14) = 0.994$, 高湿 $t_4^{0.05}(0,7) = 1.192$, 高湿 $t_4^{0.05}(0,14) = 0.960$, 光照 $t_4^{0.05}(0,7) = 1.071$, 光照 $t_4^{0.05}(0,14) = 1.000$ 。

短期稳定性实验结果表明, 实验前后供试品的化学纯度未发生变化, 样品在短期不同环境条件下的稳定性良好。证明供试品的包装能够满足运输及转移过程中对环境的一般需求。

②长期稳定性: 考虑到供试品在常温状态下的稳定性, 将包装后标准物质放置在常温下长期保存, 并分别于 0, 1, 2, 4, 6, 12 个月对取样进行纯度检测。每个时间点随机抽样 6 瓶样品, 按短期稳定性考察方法检测样品纯度, 结果见表 5。

以 x 代表时间, 以 y 代表标准物质的特性量值 (盐酸千金藤素的纯度值), 拟合成一条直线, 获得直线方程为: $y = -0.000\ 006x + 0.997\ 6$ 。则有斜率 $a = -0.000\ 006$, 截距为 $b = 0.997\ 6$, 计算直线的标准偏差:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b - aX_i)^2}{n-2} = 1.49 \times 10^{-9}$$

因此, 斜率的不确定度用下式计算:

$$S_{(a)} = \frac{S}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = 3.92 \times 10^{-6}$$

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/%						均值/ %	s/%
		瓶 1	瓶 2	瓶 3	瓶 4	瓶 5	瓶 6		
0	1	99.76	99.76	99.78	99.76	99.75	99.77		
	2	99.77	99.75	99.76	99.77	99.75	99.76	99.76	0.010 8
	3	99.76	99.79	99.77	99.76	99.75	99.77		
1	1	99.76	99.74	99.75	99.74	99.76	99.76		
	2	99.77	99.74	99.77	99.77	99.73	99.73	99.75	0.014 6
	3	99.76	99.75	99.78	99.76	99.76	99.74		
2	1	99.74	99.74	99.71	99.77	99.77	99.77		
	2	99.73	99.76	99.77	99.76	99.77	99.77	99.76	0.017 8
	3	99.77	99.76	99.76	99.76	99.78	99.77		
4	1	99.78	99.76	99.75	99.76	99.76	99.78		
	2	99.75	99.75	99.76	99.76	99.75	99.75	99.76	0.009 4
	3	99.77	99.76	99.77	99.76	99.76	99.76		
6	1	99.76	99.78	99.76	99.76	99.77	99.76		
	2	99.74	99.76	99.76	99.71	99.76	99.77	99.76	0.015 9
	3	99.76	99.77	99.77	99.77	99.77	99.74		
12	1	99.76	99.75	99.73	99.77	99.72	99.75		
	2	99.76	99.76	99.74	99.76	99.74	99.76	99.75	0.015 4
	3	99.75	99.77	99.74	99.77	99.73	99.77		

其中 X 为时间, Y 为标准物质纯度值, i 为各时间点。自由度为 $n-2=6-2=4$ 和 $P=0.95$ (95%置信区间) 的 t 因子等于 2.776。由于 $|a| = 6.0 \times 10^{-6} < t_4^{0.05} \times S_{(a)} = 1.09 \times 10^{-5}$, 故斜率是不显著的, 因而未观察到不稳定性。结果表明, 供试品在 12 个月内稳定性良好。

2.6 综合评价

盐酸千金藤素纯度标准物质的定值和不确定

度评价分别使用了2种方法,即质量平衡法与DSC法。使用 t 检验方法对不同原理获得的定值结果进行比较,计算 t 值为0.780,经查 t 分布双侧分位数表知: $t_{10}^{0.05}=2.228$, t 值小于临界值,表明2种方法测定结果一致。

因此,2种定值方法的测量结果最佳值为其算术平均值,即: $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2}{2} = \frac{99.62\% + 99.61\%}{2} = 99.62\%$$

对2种方法的不确定度进行综合评价,结果见表6。其中 x_1 为质量平衡法测定结果, x_2 为DSC法测定结果, $MS_{\text{组间}}$ 为组间方差, $MS_{\text{组内}}$ 为组内方差, n 为测量次数, t 为时间。

表6 不确定度综合评定结果

Tab. 6 Results of uncertainty evaluation

参数	描述	公式	数值
$u_c(x)$	测量不确定度	$\sqrt{\left(\frac{u_c(x_1)}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u_c(x_2)}{x_2}\right)^2}$	0.001 796
S_H	均匀性不确定度	$\sqrt{(MS_{\text{组间}}^2 - MS_{\text{组内}}^2)/n}$	2.49×10^{-9}
S_t	稳定性不确定度	$t \times S_{(a)}$	4.70×10^{-5}
$u_{c(\oplus)}$	总合成不确定度	$\sqrt{u_{c(x)}^2 + S_H^2 + S_t^2}$	0.001 79
U_c	总扩展不确定度	$k \times u_{c(\oplus)}$ (其中 $k=2$, $P=0.95$)	0.003 58

盐酸千金藤素纯度标准物质的纯度值最终为 $(99.6 \pm 0.4)\%$, $k=2$, $P=0.95$ 。

3 讨论

根据ISO导则及我国一级标准物质研制规范的要求,本研究采用2种不同原理的方法对盐酸千金藤素标准物质进行联合定值的方式,弥补了单一一定值方法的不足与缺陷,保证了定值结果的合理性与科学性。质量平衡法通常被认为具有很高准确度,并且被世界卫生组织和欧洲药典推荐为药品标准物质定值方法^[12],是一种潜在的基准方法^[13],在盐酸千金藤素标准物质定值研究中,有效检测出不同杂质,即无机杂质、有机杂质和溶剂残留。而基于凝固点下降原理的DSC法则具有样品量少、快速高效、检测方法准确度高以及检测结果重现性好等特点,常用于标准物质的定值研究和药物研究^[14-15]。在本研究中,有效地验证了质量平衡法的测定结果。

本研究研制的盐酸千金藤素标准物质属国家一级有证标准物质,具备量值溯源和传递功能,可用于仪器校准、新方法确认、实验室检测能力验证以及相关产品成分与含量的质量控制与法律仲裁等方面。

REFERENCES

- [1] FURUSAWA S, WU J. The effects of biscochlorine alkaloid cepharanthine on mammalian cells: Implications for cancer, shock, and inflammatory diseases [J]. Life Sci, 2007, 80(12): 1073-1079.
- [2] ZANG C H. Cepharanthine hydrochloride reverse multidrug resistance via upregulating P-gp ATPase activity in mice model of hepatocellular carcinoma [D]. Henan: Zhengzhou University, 2011.
- [3] ISO Guide 30. Terms and definitions used in connection with reference materials [S]. 1992: 3.
- [4] WANG Q Y, HE X, WANG R. Development of reference materials in China and abroad [J]. Chem Reagents(化学试剂), 2014, 36(4): 289-296.
- [5] 国家标准物质研究中心. 一级标准物质研制技术规范(JJF 1006-1994)[S]. 北京: 中国计量出版社, 1994: 2-5.
- [6] ISO GUIDE 34. General Requirements for the Competence of Reference Material Producers [S]. 2009: 15-21.
- [7] ISO Guide 35. Reference Materials-General and Statistical Principles for Certification [S]. 2006: 6-47.
- [8] JIN H Z, WANG H B, WANG Y B, et al. Alkaloids from Stephania epigaea[J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2007, 5(2): 112-114.
- [9] 全国化工标准物质委员会. 分析测试质量保证[M]. 沈阳: 辽宁大学出版社, 2004.
- [10] YANG D Z, WANG F F, ZHANG L, et al. Development of a new tetrandrine certified reference material for clinical chemistry and pharmaceutical analysis [J]. Anal Methods, 2015, 7(11): 4763-4768.
- [11] ZHANG B X, GONG N B, YANG D Z, et al. Preparation and certification of sulfamethoxazole reference material by mass balance method and differential scanning calorimetry [J]. Curr Anal Chem, 2015, 11(3): 153-158.
- [12] World Health Organization. Supplementary Part A(3.3), Evaluation of chemical reference substance. international pharmacopoeia(V01.5) [S]. 2003.
- [13] LIU S Y, HU C Q. A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance methods [J]. Anal Chim Acta, 2007, 602(1): 114-121.
- [14] HU X R, SHEN J, WU S X, et al. Preparation and characterization of form b of pramipexole dihydrochloride [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(9): 1086-1090.
- [15] HAN M, LI H J, HU F Q, et al. Studies on delayed-release enteric film using blends of aqueous dispersion [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(12): 1487-1492.

收稿日期: 2015-10-12