

· 药物研究 ·

黄芩及其提取物中黄芩素成分分析标准物质的研制*

邢逞¹, 张丽¹, 马林¹, 龚宁波¹, 杜冠华², 吕扬¹

(北京协和医学院, 中国医学科学院药物研究所 1. 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; 2. 药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要 目的 通过建立准确可靠的定值方法及不确定度分析研究, 研制具有可溯源和量值传递功能的黄芩及其水、95%乙醇提取物中黄芩素成分分析标准物质。方法 根据《中华人民共和国计量法》和标准物质研制技术规范与相关文件要求, 利用黄芩素国家一级纯度标准物质的量值传递功能, 采用高效液相色谱法对黄芩及其水、95%乙醇提取物中黄芩素成分分析标准物质进行均匀性和稳定性检验; 采用高效液相色谱法-多家实验室协作标定的方法, 确定黄芩中药材、黄芩 95%乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分的含量标准值及不确定度评估。结果 所研制的黄芩及其水、95%乙醇提取物中黄芩素成分分析标准物质均具有良好的均匀性和稳定性, 黄芩素成分含量分别为 $(7.95 \pm 0.23)\%$, $(4.29 \pm 0.12)\%$, $(8.80 \pm 0.40)\%$ ($k=2$)。结论 所研制的标准物质属国家级计量有证标准物质, 具有量值准确、可溯源的特性, 可为我国传统中药材及其提取物中有效物质和成分的标准化与国际化提供必要的标准物质、物质标准和标准方法。

关键词 黄芩; 黄芩 95%乙醇提取物; 黄芩水提取物; 黄芩素; 标准物质; 不确定度

中图分类号 R286; R917

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2019)03-0298-06

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2019.03.003

开放科学(资源服务)标识码(OSID)

Development of Certified Reference Material of Baicalein in *Scutellaria Baicalensis* and Its ExtractsXING Cheng¹, ZHANG Li¹, MA Lin¹, GONG Ningbo¹, DU Guanhua², LYU Yang¹ (1. Research Centre of Polymorphic Drugs, Beijing Key Laboratory of Polymorphic Drug; 2. Beijing Key Laboratory of Drug Targets and Screening Research, Peking Union Medical College, Institute of Materia Medica & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

ABSTRACT Objective Through establishing accurate, reliable analytical method of evaluation and uncertainty analysis, to develop the certified reference materials (CRMs) of baicalein in *Scutellaria Baicalensis* and its alcohol extract, water extract which have measurement traceability and value transfer function. **Methods** On the basis of Technical Norm of Primary Reference Material and related documents requirements, using the quantity transmission of the national level CRM of baicalein, the homogeneity and the stability were checked by high performance liquid chromatography (HPLC), the content standard value and uncertainty of CRMs of baicalein in *scutellaria baicalensis* and its 95% alcohol extract, water extract were determined by HPLC in collaboration with a number of laboratories. **Results** The series of CRMs showed satisfactory homogeneity and stability. The content values of baicalein were $(7.95 \pm 0.23)\%$, $(4.29 \pm 0.12)\%$, $(8.80 \pm 0.40)\%$ ($k=2$), respectively. **Conclusion** The series of CRMs are assigned as national measurement of CRMs, which possess a high-accuracy value and traceability characteristics. The series of CRMs could provide the accurate and reliable CRM, materials standard and standard methods for standardization and internationalization of active ingredient of traditional Chinese medicines and extracts.

KEY WORDS *Scutellaria Baicalensis*; 95% alcohol extract of *Scutellaria Baicalensis*; Water extract of *Scutellaria Baicalensis*; Baicalein; Certified reference material; Uncertainty

黄芩为唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根, 是 2015 年版《中华人民共和国药典》^[1] 收载的中药材品种, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效, 临床用于湿温、暑湿、胎动不安等的治疗^[2]。黄芩药材作为主要成分被用于安宫牛黄丸、安坤赞育丸、八宝坤顺丸、参茸白凤丸等中成药^[3], 黄芩中药材质量直接关系到中成药产品质量。因此, 需要对黄芩中药材的有效成分进行质量控制^[4-5]。

用 95%乙醇提取中化学成分是研究中草药中活性物质的主要提取方法, 而水煎法是数千年来中药材

在临床疾病治疗时的主要用药方式, 95%乙醇提取物和水提取物中均含有治疗疾病的活性化学物质。因此, 研制中药材 95%乙醇提取物及水提取物标准物质, 并以黄芩素作为指标成分定值, 具有科学意义和实际应用价值^[6]。

笔者在本实验完成了黄芩、黄芩 95%乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分分析国家级标准物质的研制, 确定了药材、醇提物、水提物 3 种不同基质中黄芩素成分含量的标准值与不确定度值^[7]。黄芩及其提取物中黄芩素成分分析标准物质的研制, 可为我国黄芩中药

材及中成药研制和产品质量控制提供物质基准。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1200 型高效液相色谱仪;美国安捷伦科技公司,DAD 检测器,Agilent chemstation 工作站;XS105 型电子分析天平(Mettler 公司,感量: $0\text{ g} \leq m \leq 5\text{ g}$, 0.01 mg ; $5\text{ g} < m \leq 20\text{ g}$, 0.02 mg);SHH.W21.420 三用电热恒温水箱(北京精科华瑞仪器有限公司)。

1.2 国家一级标准物质黄芩素 化学纯标准物质,证书编号:GBW09516,纯度标准值及不确定度值(99.72 ± 0.25)% ($k=2$)(中国医学科学院药物研究所研制)。

1.3 中药材及其提取物

1.3.1 黄芩中药材 产地河北省,经中国医学科学院药物研究所马林教授鉴定为正品,质量检查符合《中华人民共和国药典》2015 年版规定要求^[1]。黄芩中药材经除尘、粉碎、并过筛孔内径(250 ± 9.9) μm (65 目)筛,备用。精密称取样品 1 g 置棕色安瓿瓶密封包装,共完成 500 支最小包装 1 g 量的黄芩中药材成分分析标准物质候选物样品的制备工作。

1.3.2 黄芩 95%乙醇提取物 取黄芩中药材,粉碎后以 5 倍量 95%乙醇作为提取溶剂,经加热回流提取 3 次,合并提取液,减压浓缩得浸膏,真空干燥,粉碎并过筛孔内径(250 ± 9.9) μm (65 目)筛,得棕红色干粉,即为黄芩 95%乙醇提取物,备用。精密称取样品 100 mg,置棕色安瓿瓶密封包装,共完成 500 支最小包装 100 mg 量的黄芩 95%乙醇提取物成分分析标准物质候选物样品的制备工作。

1.3.3 黄芩水提取物 取黄芩中药材粉碎,加入 6 倍量纯净水,煎煮 1 h,滤过,得提取液,将药渣加入与提取液等体积的纯净水,煎煮 1 h,滤过,再次向药渣中加

入与提取液等体积纯净水,继续煎煮 1 h,滤过。合并上述提取液,水浴挥干后,75 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥,得棕色粉末,即为黄芩水提取物,备用。精密称取 100 mg 样品置于棕色安瓿瓶密封包装,共计完成了 500 支最小包装 100 mg 量的黄芩水提取物成分分析标准物质候选物样品的制备工作。

1.4 试剂 甲醇(Fisher Chemical,色谱纯),磷酸(分析纯,北京化学试剂公司),娃哈哈饮用纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,5 mm);流动相:甲醇:0.4%磷酸=51:49;梯度洗脱程序:0~17 min(51%甲醇);17~25 min(51% \rightarrow 70%甲醇);后运行 5 min;流速 1.0 mL \cdot min⁻¹;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 mL;检测波长 275 nm。

2.1.2 溶液的制备 标准储备液制备方法:精密称取黄芩素化学纯标准物质 5.09 mg(按化学纯度 99.72%计),置于 50 mL 量瓶,用色谱级甲醇将样品完全溶解,并定容至刻度,摇匀,配制成黄芩素为 101.52 mg \cdot L⁻¹标准储备液。精密移取 0.1,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶,用色谱级甲醇稀释至刻度,获黄芩素为 1.0,5.1,10.2,20.3,50.8,101.5 mg \cdot L⁻¹标准溶液。

样品提取方法:精密称取黄芩中黄芩素成分分析标准物质样品 100 mg、黄芩 95%乙醇提取物中黄芩素成分分析标准物质样品 30 mg、黄芩水提取物中黄芩素成分分析标准物质样品 30 mg,分别置具塞锥形瓶,精密加 95%乙醇:盐酸=7:3 混合溶液 20 mL(95%乙醇提取物、水提取物为 10 mL),置 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中回流 3 h,放冷,滤过,滤液置 100 mL 量瓶,用少量 95%乙醇分次洗涤容器和残渣,洗液滤入同一量瓶中,加 95%乙醇至刻度,摇匀。准确量取 1 mL,分别置 10 mL 量瓶,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系考察 分别精密移取 6 种不同浓度标准溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,按照“2.1.1”项色谱条件,记录色谱图及峰面积。色谱峰面积分别为 38.68,198.35,389.67,802.44,1982.56,4003.11,以黄芩素标准溶液浓度为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,获得回归方程为 $Y=39.424X-4.8638$ ($r=1.0000$, $n=6$)。标准曲线实验结果表明,黄芩素标准溶液在 1.0~101.5 mg \cdot L⁻¹范围内线性关系良好。

2.2.2 精密度实验 精密吸取 101.5 mg \cdot L⁻¹黄芩素标准储备液 1 mL 至 10 mL 量瓶,用色谱纯甲醇稀释至

收稿日期 2018-01-24 修回日期 2018-03-10

基金项目 * 国家重点研发计划(2016YFC1000900);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-3-007);北京市科技专项(Z161100005016056)

作者简介 邢逞(1987-),女,山东滕州人,助理研究员,博士,研究方向:药物分析。ORCID:0000-0002-0895-7822,电话:010-63031258,E-mail:xingc@imm.ac.cn。

通信作者 吕扬(1959-),女,北京人,研究员,博士生导师,主要从事药物分析研究。电话:010-63165212,E-mail:luy@imm.ac.cn。

通信作者 杜冠华(1956-),男,山东滕州人,研究员,博士生导师,主要从事药物发现、高通量药物筛选、神经药理学和心脑血管药理学研究。电话:010-63165184,E-mail:dugh@imm.ac.cn。

刻度。采用高效液相色谱法,按照“2.1.1”项色谱条件,重复测定6次,记录色谱图,黄芩素峰面积分别为369.68,369.82,369.33,369.47,369.60,369.66,RSD为0.05%,表明仪器精密度良好。

准确称取自制黄芩素纯度标准物质5.09 mg(按化学纯度99.72%计)6份,置50 mL量瓶,用甲醇将样品溶解,并定容至刻度,获得101.52 mg·L⁻¹标准储备溶液。准确吸取1.0 mL置10 mL量瓶,用甲醇稀释至刻度。采用高效液相色谱法,按照“2.1.1”项色谱条件,各重复进样3次,分别记录色谱图,获得黄芩素色谱面积均值/称样量为72.953,72.423,72.770,72.246,72.017,72.182,RSD为0.50%,表明实验方法精密度良好。

2.2.3 重复性实验 分别称取黄芩中药材、黄芩95%乙醇提取物、黄芩水提取物样品各6份,按照“2.1.2”项样品提取方法,按照“2.1.1”项色谱条件进行测定。黄芩中黄芩素含量分别为8.084%,8.160%,8.162%,8.174%,8.005%,8.284%,平均8.145%,RSD 1.15%;黄芩95%乙醇提取物中黄芩素含量分别为4.333%,4.301%,4.342%,4.282%,4.284%,4.292%,平均4.306%,RSD为0.60%;黄芩水提取物中黄芩素含量分别为9.165%,9.122%,9.021%,9.070%,8.873%,9.026%,平均9.046%,RSD为1.12%。表明黄芩中药材、黄芩95%乙醇提取物、黄芩水提取物系列标准物质溶液制备方法重复性良好。

2.2.4 回收率实验 分别称取黄芩中药材100 mg、黄芩95%乙醇提取物30 mg、黄芩水提取物样品30 mg各6份,分别加入黄芩素纯度标准物质作为加标样品。按照“2.1.2”项样品提取方法制备样品,采用HPLC法

按照“2.1.1”项色谱条件测定黄芩素含量,计算回收率。黄芩中黄芩素回收率分别为100.50%,99.45%,98.64%,99.64%,99.77%,97.91%,平均回收率99.32%,RSD为0.92%;黄芩95%乙醇提取物中黄芩素回收率分别为100.89%,99.90%,98.79%,101.84%,98.34%,101.52%,平均回收率为100.21%,RSD为1.44%;黄芩水提取物中黄芩素的回收率分别为100.32%,99.47%,100.65%,101.63%,99.01%,99.02%,平均回收率100.02%,RSD为1.04%,结果表明方法回收率良好。

2.3 均匀性实验 从500支标准物质候选物中采用简单随机抽样方法抽取15瓶样品,每瓶样品平行取样3份,均按照“2.1.2”项样品提取方法,按照“2.1.1”项色谱条件测定黄芩素含量,分别获得45个均匀性检验数据。黄芩中药材、黄芩95%乙醇提取物、黄芩水提取物的均匀性数据见表1。

采用单因素方差分析(One Way Anova)^[8]对均匀性数据进行组内和组间统计分析,测定黄芩中药材、黄芩95%乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素含量,*F*分别为1.24,1.21,1.29;均小于临界值 $[F_{0.05}(14,30)=2.04]$,即 $F < F_{0.05}(14,30)$ 。检测结果表明黄芩中药材、黄芩95%乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分分析系列标准物质样品均具有良好的均匀性。

2.4 长期稳定性实验 将密封包装后的标准物质候选物样品放置在常温条件下长期保存,考察样品稳定性,并分别于0,1,2,4,6,12个月随机抽样,每个点随机抽样6瓶,按照“2.1.2”项样品提取方法,按照“2.1.1”项色谱条件测定黄芩素含量,实验测定结果见

表1 黄芩、黄芩95%乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分含量均匀性检验结果

Tab.1 Results of uniformity test on baicalein content in *Scutellaria Baicalensis* and its 95% alcohol extract and water extract

成分	1			2			3			4			5		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
黄芩	8.282	8.378	8.330	8.455	8.253	8.454	8.217	8.197	8.308	7.786	8.449	8.181	8.399	8.289	8.431
黄芩95%乙醇提取物	4.363	4.399	4.288	4.289	4.364	4.358	4.317	4.354	4.361	4.353	4.377	4.414	4.318	4.313	4.298
黄芩水提取物	9.335	9.021	9.077	9.028	9.236	9.127	9.281	9.377	8.784	9.262	8.748	8.890	9.461	8.721	8.854
成分	6			7			8			9			10		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
黄芩	8.444	8.485	8.358	8.478	8.405	8.229	8.456	8.248	8.622	8.361	8.388	8.413	8.462	8.423	8.210
黄芩95%乙醇提取物	4.315	4.355	4.454	4.395	4.397	4.418	4.420	4.421	4.367	4.384	4.338	4.437	4.476	4.410	4.308
黄芩水提取物	8.870	8.949	8.890	8.759	9.031	8.627	8.567	9.305	9.011	9.070	8.917	9.051	9.057	9.480	9.137
成分	11			12			13			14			15		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
黄芩	8.539	8.052	8.440	8.256	8.558	8.099	8.418	8.521	7.991	7.702	7.888	8.330	8.218	8.400	8.394
黄芩95%乙醇提取物	4.335	4.494	4.406	4.382	4.376	4.401	4.408	4.391	4.306	4.406	4.336	4.417	4.418	4.405	4.424
黄芩水提取物	9.079	9.054	9.371	9.680	8.888	9.855	8.909	9.441	10.228	9.320	8.684	8.569	8.970	9.036	8.742

表 2。以 X 代表时间(月),以 Y 代表黄芩素含量值,分别拟合直线,获得直线方程,计算斜率的不确定度^[9-10],结果分别为:

黄芩中黄芩素: $Y = 0.0002X + 0.0839, S_{(a)} = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{x})^2}} = 7.26 \times 10^{-5}$

黄芩 95% 乙醇提取物中黄芩素: $Y = 0.00001X + 0.0436, S_{(a)} = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{x})^2}} = 9.27 \times 10^{-5}$

黄芩水提取物中黄芩素: $Y = 0.00008X + 0.0935$
三者自由度均为: $n - 2 = 6 - 2 = 4, P = 0.95$ (95% 置信区间)的 t 因子等于 2.776。由于黄芩素含量测定值 $|a| < t_4^{0.05} \times S_{(a)}$, 故斜率不显著,表明黄芩、黄芩 95% 乙醇提取物、黄芩水提取物系列标准物质候选物在 12 个月内样品稳定性良好。

2.5 黄芩素含量标准值定值 依据国家标准物质技术规范^[10],采用 6 家实验室联合定值方法对黄芩、黄芩 95% 乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分进行定值,定值数据见表 3。采用格拉布斯检验,剔除可疑

值,并采用科克伦 (Cochran) 等精度检验,证明黄芩素成分含量的测量数据均属等精度数据。计算获得 6 家联合定值的黄芩中黄芩素成分含量标准值 $P = 7.952\%, S = 0.001631$;黄芩 95% 乙醇提取物中黄芩素成分含量标准值 $P = 4.285\%, S = 0.000408$;黄芩水提取物中黄芩素成分含量标准值 $P = 8.800\%, S = 0.002375$ 。

2.6 不确定度评定

2.6.1 成分含量标准值的不确定度评估 黄芩、黄芩 95% 乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分分析标准物质的总不确定度由 3 个部分组成:测量标准值引入的不确定度、样品不均匀性引入的不确定度、样品稳定性引入的不确定度。其中,测量标准值引入的不确定度包含国家一级标准物质引入的不确定度、中药材及其提取物中有效成分提取及含量测定过程引入的不确定度以及联合定值的标准曲线拟合引入的不确定度等。

2.6.2 标准值的不确定度计算 ①黄芩素一级标准物质引入的不确定度值 $u(P)$ 。黄芩素纯度标准物质的量值为 $(99.72 \pm 0.25)\%$, 其标准不确定度值为 $0.25\% / 2 = 0.125\%$, 相对标准不确定度值为 $u(P) = 0.125\% / 99.72\% = 0.00125$ 。②测量数据的不确定度

表 2 黄芩、黄芩 95% 乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分含量长期稳定性结果

Tab.2 Results of long-term stability test on baicalein content in *Scutellaria Baicalensis* and its 95% alcohol extract and water extract

成分与时间	1	2	3	4	5	6
黄芩						
0 个月	8.318	8.297	8.627	8.401	8.330	8.039
1 个月	7.980	8.490	8.444	8.534	8.526	8.105
2 个月	8.391	8.443	8.399	8.546	8.436	8.609
4 个月	8.635	8.183	8.530	8.335	8.649	8.658
6 个月	8.737	8.363	8.440	8.440	8.520	8.594
12 个月	8.558	8.586	8.421	8.764	8.435	8.390
黄芩 95% 乙醇提取物						
0 个月	4.265	4.328	4.375	4.331	4.355	4.541
1 个月	4.415	4.340	4.416	4.398	4.399	4.415
2 个月	4.233	4.367	4.287	4.265	4.331	4.292
4 个月	4.436	4.376	4.423	4.427	4.408	4.309
6 个月	4.372	4.247	4.345	4.257	4.342	4.407
12 个月	4.284	4.323	4.408	4.358	4.471	4.437
黄芩水提取物						
0 个月	9.326	9.484	9.225	9.155	9.103	9.154
1 个月	9.454	9.068	9.439	9.838	9.333	8.926
2 个月	9.512	9.570	9.274	9.486	9.513	9.569
4 个月	9.545	9.448	9.046	9.950	9.306	9.405
6 个月	9.507	9.531	9.262	9.753	8.964	9.156
12 个月	9.641	9.159	9.073	9.561	9.594	9.515

表 3 黄芩、黄芩 95% 乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素含量的联合定值

Tab.3 Results of baicalein content in *Scutellaria Baicalensis* and its 95% alcohol extract and water extract

样品与标准曲线	黄芩素含量/%
黄芩	
$Y=40.167X+1.0036$	0.07751,0.07752,0.07716,0.07745,0.07629,0.07616,0.07695,0.07868,0.07751,0.07783
$Y=40.013X-1.4033$	0.08003,0.07938,0.07917,0.07905,0.07855,0.07917,0.07966,0.08132,0.08113,0.07732
$Y=39.859X+0.349$	0.07926,0.07885,0.07921,0.07988,0.07837,0.07844,0.07883,0.07909,0.07813,0.07859
$Y=39.899X+0.6719$	0.08104,0.08136,0.08239,0.07901,0.08021,0.08016,0.07881,0.07917,0.08178,0.08092
$Y=61463X-736.37$	0.08303,0.08310,0.07943,0.08258,0.08219,0.08187,0.08257,0.08273,0.08345,0.08002
$Y=60042X+844.81$	0.08035,0.07782,0.07674,0.07810,0.07943,0.08018,0.07669,0.07776,0.08076,0.08083
黄芩 95% 乙醇提取物	
$Y=40.167X+1.0036$	0.04340,0.04257,0.04181,0.04263,0.04274,0.04246,0.04224,0.04250,0.04286,0.04264
$Y=40.013X-1.4033$	0.04342,0.04351,0.04359,0.04307,0.04280,0.04291,0.04271,0.04329,0.04262,0.04295
$Y=39.859X+0.3498$	0.04358,0.04270,0.04314,0.04322,0.04355,0.04302,0.04368,0.04367,0.04355,0.04290
$Y=39.899X+0.6719$	0.04245,0.04185,0.04228,0.04248,0.04235,0.04200,0.04208,0.04253,0.04212,0.04179
$Y=61463X-736.37$	0.04282,0.04240,0.04293,0.04310,0.04301,0.04328,0.04252,0.04270,0.04242,0.04276
$Y=60042X+844.81$	0.04380,0.04363,0.04309,0.04297,0.04301,0.04259,0.04308,0.04264,0.04301,0.04324
黄芩水提取物	
$Y=40.167X+1.0036$	0.08446,0.08899,0.08537,0.08200,0.08566,0.08459,0.08601,0.08588,0.08770,0.08474
$Y=40.013X-1.4033$	0.09490,0.09085,0.09056,0.09303,0.08868,0.09107,0.09200,0.08817,0.09196,0.09182
$Y=39.859X+0.3498$	0.09014,0.08636,0.09006,0.08915,0.08907,0.08701,0.08899,0.08901,0.08610,0.09156
$Y=39.899X+0.6719$	0.08710,0.08593,0.08426,0.08245,0.08452,0.08270,0.09023,0.08590,0.08677,0.07999
$Y=61463X-736.37$	0.08995,0.08848,0.08984,0.08880,0.08965,0.08984,0.08896,0.08806,0.08938,0.08942
$Y=60042X+844.81$	0.09177,0.08554,0.08997,0.08494,0.08893,0.08773,0.09000,0.09011,0.08699,0.08613

值 $u(f)$ 。利用测量数据计算：

黄芩中黄芩素： $u(f)=\frac{s}{\sqrt{n}}=\frac{0.001631}{\sqrt{6}}=0.000\ 666$

黄芩 95% 乙醇提取物中黄芩素： $u(f)=\frac{s}{\sqrt{n}}=\frac{0.000\ 408}{\sqrt{6}}=0.000\ 167$

黄芩水提取物中黄芩素： $u(f)=\frac{s}{\sqrt{n}}=\frac{0.002\ 375}{\sqrt{6}}=0.000\ 969$

③联合定值的标准曲线拟合引入的不确定度值 u_{rel} 。按照文献[11]规定,标准曲线拟合的标准偏差计算公式为：

$S(y)=\sqrt{\frac{i^n[A_i-(ac_i+b)]^2}{n-2}},u(s)=\frac{S(y)}{a}$
 $\sqrt{\frac{1}{q}+\frac{1}{n}+\frac{(C_1-\bar{c}_0)^2}{\sum_{i=1}^n(C_i-\bar{c}_0)^2}},u_{rel}=u(s)/C_1$

$S(y)$:标准溶液峰面积的标准偏差; q :黄芩、黄芩 95%乙醇提取物、黄芩水提取物溶液的测定次数; n :标准溶液的个数×每个标准溶液的测定次数; C_0 :标准溶液的浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); C_1 :中药材黄芩、95%乙醇提取物、水提取物溶液的浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); i :第 n 个校准溶

液的第 n 次测量。以 x 代表检测样品的溶液浓度,以 y 代表检测样品的吸光度,分别拟合获得直线联合标定单位的标准曲线相对不确定度 u_{rel} 值,结果见表 4。

比较 6 家单位获得的标准曲线相对标准不确定度值,取最大值分别为:黄芩中黄芩素成分含量标准曲线的不确定度 $u_{rel}=0.005\ 158$,黄芩 95%乙醇提取物中黄芩素成分含量标准曲线的不确定度 $u_{rel}=0.003\ 147$,黄芩水提取物中黄芩素成分含量标准曲线的不确定度 $u_{rel}=0.014\ 94$ 。

表 4 联合定值标准曲线引入的相对不确定度
Tab.4 Relative uncertainty introduced by standard curve

序号	黄芩	黄芩 95% 乙醇提取物	黄芩 水提取物
1	0.002 142	0.001 286	0.006 400
2	0.005 158	0.003 147	0.014 94
3	0.004 793	0.002 897	0.014 13
4	0.003 179	0.002 012	0.009 975
5	0.003 897	0.002 479	0.011 89
6	0.003 812	0.002 308	0.011 29

④合成标准不确定度计算,按照 $U_{c(x)}=x\sqrt{[\frac{u(p)}{p}]^2+[\frac{u(f)}{f}]^2+[u_{rel}]^2}$ 分别计算黄芩、黄芩 95%

乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分分析标准物质的合成标准不确定度值为 0.000 425, 0.000 145, 0.001 32。

2.6.3 样品均匀性引入的不确定度 S_H 按照国际标准化组织标准物质指南 35 规定,由均匀性产生的不确定度计算,数学模型为 $S_H = \sqrt{(MS_{\text{组间}}^2 - MS_{\text{组内}}^2)/n}$ 。式中 S_H 表示均匀性产生的不确定度, n 表示测定次数, $MS_{\text{组间}}$ 表示组间均方差, $MS_{\text{组内}}$ 表示组内均方差。黄芩、黄芩 95% 乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分分析标准物质由均匀性产生的不确定度分别为 5.33×10^{-4} , 1.25×10^{-4} , 9.89×10^{-4} 。

2.6.4 样品稳定性引入的不确定度 S_t 稳定性引入的不确定度计算, $S_t = t \times S_{(a)}$, $S_{(a)} = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{x})^2}}$ 。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。黄芩、黄芩 95% 乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分分析标准物质由稳定性产生的不确定度值分别为 8.71×10^{-4} , 5.54×10^{-4} , 1.11×10^{-3} 。

2.6.5 总合成标准不确定度 按照 $u_{c(\text{总})} = \sqrt{u_{c(x)}^2 + S_H^2 + S_t^2}$ 计算,黄芩、黄芩 95% 乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分分析标准物质的总合成不确定度分别为 0.001 11, 0.000 587, 0.001 99。

2.6.6 扩展不确定度 由总合成标准不确定度计算扩展不确定度 (U), 扩展因子 $k=2$, 黄芩、黄芩 95% 乙醇提取物、黄芩水提取物中黄芩素成分分析标准物质的扩展不确定度分别为 0.222%, 0.117%, 0.398%。

2.7 成分含量标准值及不确定度表示 在测量不确定度的最终计算中,一般采用只进不舍的规则。故黄芩中黄芩素成分分析标准物质定值结果为 $(7.95 \pm 0.23)\%$, $k=2$; 黄芩 95% 乙醇提取物中黄芩素成分分析标准物质定值结果为 $(4.29 \pm 0.12)\%$, $k=2$; 黄芩水提取物中黄芩素成分分析标准物质定值结果为 $(8.80 \pm 0.40)\%$, $k=2$ 。

3 讨论

笔者在本实验通过采用单一化学成分标识复杂成分体系的量值传递技术路线,采用高效液相色谱法-多家实验室协作标定的方法,成功研制了黄芩中黄芩素成分分析标准物质 GBW (E) 090438、黄芩 95% 乙醇提

取物中黄芩素成分分析标准物质 GBW (E) 090447、黄芩水提取物中黄芩素成分分析标准物质 GBW (E) 090453,解决了中药材及其提取物等复杂体系中的相关化学成分的量值溯源性科学技术难题,为中药相同类型标准物质的研制起到了指导和示范作用。

笔者在本实验研制的黄芩及其提取物中黄芩素成分分析系列标准物质均含有准确的量值与不确定度,属国家二级计量有证标准物质,具量值溯源和量值传递功能,在国内外均属首次研制,填补了标准物质领域的品种空白。同时为提高我国中药材及中成药的质量标准、推动中药的标准化和现代化提供了标准物质、物质标准、标准技术方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 923-925.
- [2] 王雅芳, 李婷, 唐正海, 等. 中药黄芩的化学成分及药理研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 206-211.
- [3] 贾蕾, 申丹, 唐仕欢, 等. 含黄芩中成药用药规律分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 634-639.
- [4] 邱明华. 中药标准品化合物的纯度和标准化[J]. 世界科学技术, 2005, S1: 91-97.
- [5] 王丹, 张秋燕, 杨兴鑫, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的黄芩道地药材与非道地药材的鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1951-1960.
- [6] 于昕, 何国荣, 杜冠华. 黄芩素对帕金森病的神经保护作用[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(4): 421-425.
- [7] 杨世颖, 刘淑聪, 杜冠华, 等. 大黄中药材及其醇、水提取物中大黄素成分分析标准物质研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 456-462.
- [8] 杨德智, 郭永辉, 张丽, 等. 大黄素国家级纯度有证标准物质研制[J]. 中国现代应用药理学, 2013, 30(9): 933-940.
- [9] 刘淑聪, 张宝喜, 杨世颖, 等. 虎杖中虎杖苷和白藜芦醇含量标准值与不确定度评估分析方法研究[J]. 中国药业, 2013, 22(18): 33-37.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国计量科学研究院. JJF 1059-1999. 中华人民共和国国家计量技术规范测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [11] ISO/REMCO Committee on reference materials. ISO Guide 35, Reference materials-General and statistical principles for certification[S]. USA. International Organization for Standardization. 2006.