

# 两种方法测定比沙可啶纯度及不确定度评定

郭永辉\*, 姜建国, 闫凯, 韩学静(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

中图分类号 R917;R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)41-3916-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.26

**摘要** 目的:采用两种不同原理的测定方法对比沙可啶纯度进行联合定值,并建立其不确定度评定方法。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)与非水溶液电位滴定法测定比沙可啶纯度,并依据相关规范要求,对两种方法测定过程的不确定度进行了系统分析。结果:比沙可啶HPLC法、非水溶液电位滴定法纯度测定值分别为 $(99.81 \pm 0.29)\%$ 、 $(99.82 \pm 0.51)\%$ ,两种方法联合测定比沙可啶纯度的标准值及其不确定度分别为 $99.82\%$ 、 $(\pm)0.59\%$  ( $k=2, P=0.95$ )。结论:采用HPLC与非水溶液电位滴定法联合测定比沙可啶纯度及不确定度评定结果准确可靠,避免了采用一种技术带来的分析方法缺陷,有利于提高比沙可啶的质量评价与控制水平,同时为比沙可啶纯度标准物质的研制提供了科学依据。

**关键词** 比沙可啶;纯度;不确定度;高效液相色谱法;非水溶液电位滴定法

## Purity Determination and Uncertainty Evaluation of Bisacodyl by Using 2 Different Methods

GUO Yong-hui, JIANG Jian-guo, YAN Kai, HAN Xue-jing (Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To determine the purity of bisacodyl by two different principles methods, and to establish the method for uncertainty evaluation of it. METHODS: HPLC and non-aqueous potentiometric titration were selected for the purity determination of bisacodyl. According to the requirements of related measuring technique criterion, the uncertainty of the determination of 2 different principles methods were analyzed systematically. RESULTS: The purities were  $(99.81 \pm 0.29)\%$  by HPLC and  $(99.82 \pm 0.51)\%$  by non-aqueous potentiometric method. By using two different methods, standard value of purity and uncertainty of bisacodyl were  $99.82\%$  and  $(\pm)0.59\%$  ( $k=2, P=0.95$ ). CONCLUSIONS: HPLC combined with non-aqueous potentiometric titration is accurate and reliable for the purity determination and uncertainty evaluation of bisacodyl, and avoids the defect of single analysis method. It is helpful to improve quality evaluation and control of bisacodyl, and provides a scientific basis for the development of bisacodyl purity reference materials.

**KEYWORDS** Bisacodyl; Purity; Uncertainty; HPLC; Non-aqueous potentiometric titration

比沙可啶为2010年版《中国药典》收录的品种,是目前临床上广泛使用的通便剂。本文参考2010年版《中国药典》及有关文献<sup>[1-7]</sup>,采用高效液相色谱(HPLC)法与非水溶液电位滴定法对比沙可啶的纯度进行了测定。依据标准物质技术规范及相关计量技术规范要求,分别对HPLC法与非水溶液电位滴定

法测定比沙可啶纯度的过程进行不确定度评定,并将两种不同原理方法的测定结果进行联合定值及不确定度评定。最终确定的比沙可啶纯度值及其不确定度值准确可靠,更加准确地反映了比沙可啶的真实纯度,有利于提高药品的质控水平,同时对比沙可啶纯度标准物质的研制与标定赋值提供了科学

鲎试剂由于生产工艺、质量参数等方面有一定差异,其抗干扰能力存在差异<sup>[7-8]</sup>。由于替尼泊昔结构较复杂,较高质量浓度时对内毒素试验的凝集有一定的干扰,但通过BET水的稀释则完全可以排除干扰。本试验采用2个不同厂家的鲎试剂( $\lambda_1=0.25$  EU/ml,  $\lambda_2=0.125$  EU/ml)对3个批号的样品进行试验,对应将样品稀释至质量浓度 $\leq 0.02$  mg/ml、 $\leq 0.01$  mg/ml时,不干扰细菌内毒素检查。因此,替尼泊昔注射液用凝胶法进行细菌内毒素检查是可行的。

### 参考文献

- [1] 高明,赵丹.沙利度胺联合替尼泊昔对人胃腺癌移植瘤生长的影响[J].中国医药指南,2013,11(23):58.
- [2] Wang M, Ming G, Wei H, et al. Oxaliplatin and teniposide can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of

gastric cancer cell line BGC-823 synergistically[J]. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2010, 3(9): 149.

- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XIE、XIX.
- [4] 百时美施贵宝公司.替尼泊昔注射液说明书[S].2011-02-10.
- [5] 曾云胜.复方甘草酸苷注射液的细菌内毒素检查[J].中国医院药学杂志,2013,33(17):1456.
- [6] 黄荣富,厉青,李龙健,等.注射用尖吻蝮蛇血凝酶细菌内毒素检查方法的建立[J].中国药房,2013,24(17):1602.
- [7] 周梅,武谷.注射用盐酸吉西他滨细菌内毒素检查方法的研究[J].中国药房,2013,24(1):76.
- [8] 杨娟,李昇刚,朱爱民.环磷腺苷注射液的细菌内毒素检查方法探讨[J].中国药师,2013,16(1):145.

(收稿日期:2014-01-09 修回日期:2014-03-08)

\* 主管药师,博士。研究方向:药物分析。电话:0311-85212004-8085。E-mail: guo19830723@163.com

依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

e2695 HPLC 仪(美国 Waters 公司);DL-50 自动电位滴定仪、XS105 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

### 1.2 药品与试剂

比沙可啶原料药样品(河北康泰药业有限公司,批号:130501,规格:每瓶 10 g,HPLC 纯度:99.9%);邻苯二甲酸氢钾基准试剂(KHP)为优级纯,高氯酸、无水冰醋酸、醋酸酐均为分析纯,结晶紫为试剂纯,乙腈为色谱纯,水为自制超纯水。

## 2 HPLC 法测定

### 2.1 色谱条件

根据文献报道的 HPLC 条件<sup>[8]</sup>,采用与文献不同的色谱柱,优化了流动相比例,对比沙可啶纯度进行测定。色谱柱为 Phenomenex Luna C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(60:40,V/V),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 265 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl,进样质量浓度为 1 000 μg/ml。记录色谱图及峰面积,利用面积归一化法进行纯度测定。比沙可啶的 HPLC 图谱见图 1。

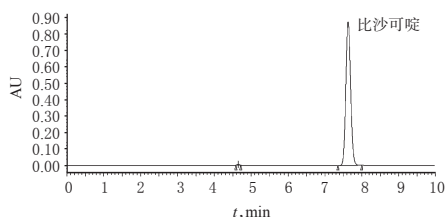


图 1 比沙可啶的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of bisacodyl

### 2.2 方法学研究

2.2.1 供试品溶液的制备。精密称取样品 25 mg,置于 25 ml 量瓶中,加流动相溶解并定容,配制成质量浓度为 1 000.0 μg/ml 的溶液,即得。

2.2.2 线性关系考察。精密称取样品 50.0 mg 置于 25 ml 量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,配制成质量浓度为 2 000.0 μg/ml 的贮备液;分别精密移取 0.05、0.25、0.5、1.25、2.5、5.0 ml 至 10 ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,获得 7 种质量浓度样品溶液(10.0、50.0、100.0、250.0、500.0、1 000.0、2 000.0 μg/ml)。进样测定,记录色谱峰面积。以样品质量浓度(x)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $y=7\,743.2x+62\,935$  ( $r=1.000\,0, n=7$ )。结果表明,比沙可啶检测质量浓度线性范围为 10.0~2 000.0 μg/ml。

2.2.3 仪器精密度试验。取供试品溶液连续重复进样 6 次,记录主峰面积,计算其 RSD 为 0.19% ( $n=6$ ),结果表明仪器精密度良好。

2.2.4 方法重复性试验。平行配制 6 份供试品溶液,每份重复进样 3 次,结果 6 份样品的峰面积平均值的 RSD=0.44% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

2.2.5 峰纯度考察。根据比沙可啶二极管阵列检测器(DAD)光谱图,其最大吸收波长为 220、265 nm。2 个波长下检出的色谱图纯度值均为 99.88%,但在 265 nm 波长下比沙可啶主峰响应值高,基线平稳,无溶剂影响,且主成分色谱峰与杂质峰可达基线分离。故选取 265 nm 波长作为 HPLC 法的检测波长。比沙可啶的 DAD 光谱图见图 2。

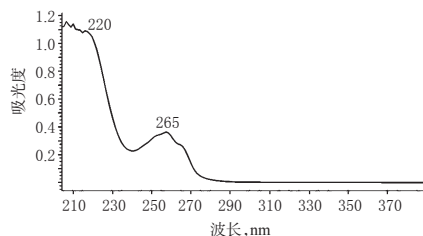


图 2 比沙可啶的 DAD 光谱图

Fig 2 DAD chromatogram of bisacodyl

### 2.3 纯度标准值的确定

2.3.1 数学模型。应用 HPLC 面积归一化法进行标准物质候选物的纯度测定,根据面积归一化法计算公式,确定比沙可啶纯度计算数学模型:  $W_{\text{HPLC}} = A_{\text{化合物色谱峰面积}} / A_{\text{总色谱峰面积}} \times 100\%$ 。式中:  $W_{\text{HPLC}}$  表示化合物的相对纯度,  $A_{\text{化合物色谱峰面积}}$  表示被测化合物色谱峰面积值,  $A_{\text{总色谱峰面积}}$  表示被测化合物加各杂质成分的色谱峰面积之和。

2.3.2 纯度测定。①测定方法。按“2.2.1”项下方法平行配制 10 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,每份重复进样 3 次。比沙可啶色谱峰面积平均值为 7 949 449,相对纯度平均值为 99.88%,总色谱峰面积平均值为 7 959 193(详细数据略)。②格拉布斯检验。将 10 组检测数据进行格拉布斯检验,进行可疑值的剔除。将 10 组测量纯度数据按从小到大的顺序排列,可疑值不是最小值就是最大值。计算平均值( $\bar{x}$ )和标准偏差( $s$ )。计算偏离值:平均值与最小值之差为  $a_1$ ;最大值与平均值之差为  $a_2$ 。确定可疑值,即比较  $a_1$  和  $a_2$ ,其中最大值确定为可疑值。纯度平均值为 99.88%,  $s=5.683\,3 \times 10^{-5}$ 。经计算,格拉布斯  $G$  值为 1.760。查格拉布斯临界值表<sup>[9]</sup>知:  $G_{0.95}(10)=2.176$ 。  $G < G_{0.95}(10)$ ,故在两组数据中无可疑值存在。③标准值。由比沙可啶的纯度测量数据确定比沙可啶 HPLC 面积归一化纯度值为 99.88%,10 组测量数据标准偏差为:  $s=5.683 \times 10^{-5}$ 。

### 2.4 其他杂质测定

由于 HPLC 面积归一化法测定纯度值的局限性,样品中的水分、无机杂质和溶剂残留均无法检测,因此参照 2010 年版《中国药典》附录,分别采用卡尔费休水分测定法<sup>[1]</sup>、炽灼残渣检查法<sup>[1]</sup>、气相色谱法<sup>[1]</sup>进行相关物质的检测。结果表明,样品中水分含量为 0.020%、炽灼残渣为 0.036%、溶剂残留为 0.015%,合计 0.071%。最终可得比沙可啶 HPLC 法纯度标准值  $x_1$  为:  $99.88\% \times (100\% - 0.071\%) = 99.81\%$ 。

### 2.5 HPLC 法不确定度评估

HPLC 法引入的不确定度由“2.3.1”项下的数学模型可知,主要是由色谱峰面积引入,其中包含了由天平、量瓶以及色谱仪等因素带来的各种影响因素。峰面积的不确定度计算公式为  $u(A_{\text{色谱峰}}) = \sqrt{\sum s_{\text{色谱峰}}^2 / 10}$ ,式中  $u(A_{\text{色谱峰}})$  表示色谱峰引入的不确定度,  $s_{\text{色谱峰}}$  表示色谱峰标准偏差,10 表示测定次数。

标准物质的 HPLC 法合成不确定度计算公式为:  $u_c(x_1) = W_{\text{HPLC}} \times \sqrt{[u(A_{\text{主峰}}) / A_{\text{主峰}}]^2 + [u(A_{\text{总色谱峰}}) / A_{\text{总色谱峰}}]^2}$ 。式中,  $u_c(x_1)$  表示合成不确定度,  $W_{\text{HPLC}}$  表示化合物的相对纯度,  $u(A_{\text{主峰}})$  表示色谱主峰面积引入的不确定度值,  $u(A_{\text{总色谱峰}})$  表示色谱总峰面积引入的不确定度值,  $A_{\text{主峰}}$  表示 10 组主色谱峰面积均值,  $A_{\text{总色谱峰}}$  表示 10 组总色谱峰面积均值。

根据“2.3.2①”项中的相关数据计算,可得到 HPLC 法合成不确定度值为:  $u_c(x_1) = 0.141\%$ 。

根据标准 JJF 1059-1999<sup>[2]</sup>,当不确定度分布为均匀分布且置信概率  $P$  为 0.95 时,扩展不确定度的包含因子  $k=2$ ,其扩展不确定度为:  $U(x_1) = k \times u_c(x_1) = 2 \times 0.141\% = 0.282\%$ 。

综上,比沙可啶 HPLC 法纯度标准值及不确定度分别为 99.81%、 $(\pm)0.29\%$  ( $k=2, P=0.95$ )。

### 3 非水溶液电位滴定法测定

#### 3.1 测定方法

取样品约 0.30 g,精密称定,加无水冰醋酸 25 ml 溶解,加萘酚苯甲醇指示液 2 滴,照 2010 年版《中国药典》附录 VII B 非水溶液滴定法<sup>[1]</sup>,在磁力搅拌下用 0.1 mol/L 高氯酸滴定液滴定,记录消耗滴定液的体积,并将滴定结果用空白试验校正,计算结果。本研究选择电位法指示终点,并采用萘酚苯甲醇为指示剂进行滴定终点的辅助判断,溶液显黄绿色即为滴定终点。此方法不确定度具体评定过程将另文报道。

#### 3.2 数学模型

以比沙可啶含量计算公式作为不确定度评定的数学模型。比沙可啶含量计算公式:  $A = c \times (V - V_0) \times M / m \times 100\%$ 。式中:  $A$  为以无水物计算所得比沙可啶的质量分数(%);  $c$  为高氯酸滴定液的浓度(mol/L);  $V$  为供试品消耗滴定液的体积(ml);  $V_0$  为空白试验消耗滴定液的体积(ml);  $M$  为无水比沙可啶的摩尔质量(g/mol);  $m$  为供试品称样量(g)。

#### 3.3 纯度标准值的确定

按照“3.1”项下测定方法,双人(甲、乙)独立操作,每人测定 10 组,共 20 组测定数据。20 组检测数据进行格拉布斯检验,无可疑值。由比沙可啶的纯度测量数据,确定非水溶液电位滴定法纯度值  $x_2$  为 99.82%,  $s = 5.016 \times 10^{-4}$ 。

#### 3.4 非水溶液电位滴定法不确定度评估

不确定度各合成分量贡献分析结果见表 1。

表 1 比沙可啶含量测定的不确定度评定结果

Tab 1 Uncertainty evaluation of content determination of bisacodyl

标准不确定度分量	标准不确定度	数值	相对标准不确定度
高氯酸滴定液浓度( $u_{HClO_4}$ )	0.167 0	101.3 mmol/L	$1.649 \times 10^{-3}$
方法重复性( $u_{rep}$ )	$1.122 \times 10^{-4}$	99.82%	$1.124 \times 10^{-4}$
自动电位滴定仪( $u_T$ )	$1.155 \times 10^{-3}$	8.328 7 ml	$1.387 \times 10^{-2}$
比沙可啶摩尔质量( $u_M$ )	$1.005 \times 10^{-3}$	361.290 6	$2.782 \times 10^{-5}$
比沙可啶称量( $u_m$ )	$1.155 \times 10^{-3}$	299.65 mg	$3.854 \times 10^{-5}$
测定比沙可啶消耗滴定液体积( $u_{V_2}$ )	$1.276 \times 10^{-3}$	8.328 7 ml	$1.532 \times 10^{-3}$

计算合成标准不确定度:  $u_c(x_2) = 0.254\%$ 。  $P$  为 0.95 时,  $k=2$ , 其扩展不确定度:  $U(x_2) = k \times u_c(x_2) = 2 \times 0.254\% = 0.508\%$ 。

综上,比沙可啶非水溶液电位滴定法纯度标准值及不确定度分别为 99.82%、 $(\pm)0.51\%$  ( $k=2, P=0.95$ )。

### 4 两种方法的纯度标准值和不确定度

#### 4.1 纯度标准值

使用  $t$  检验方法对不同原理获得的纯度值进行比较,检查结果的一致性。经计算  $t=0.88$ , 自由度  $n=21$ 。查  $t$  分布双侧分位数表知:  $t_{21}^{0.05} = 2.08$ , 两种方法间  $t$  检验计算结果,  $t$  值小于临界值,表明两种方法数据结果一致。故取两种方法的平均值作为比沙可啶的纯度标准值,即  $(99.82\% + 99.81\%) / 2 = 99.82\%$ 。

#### 4.2 两种不同原理方法总不确定度

根据 CNAS-GL06 化学分析中不确定度的评估指南<sup>[3]</sup>与相关文献<sup>[7]</sup>,两种不同原理方法总合成不确定度计算公式为:

$$\frac{u_c(x)}{\bar{x}} = \sqrt{\left(\frac{u_c(x_1)}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u_c(x_2)}{x_2}\right)^2}$$

式中,  $u_c(x)$  表示合成不确定度,  $\bar{x}$  表示纯度标准值,  $u_c(x_1)$  表示 HPLC 法合成不确定度,  $x_1$  表示 HPLC 法纯度标准值,  $u_c(x_2)$  表示非水溶液电位滴定法合成不确定度,  $x_2$  表示非水溶液电位滴定法纯度标准值。计算结果为  $u_c(x) = 0.291\%$ 。  $P$  为 0.95 时,  $k=2$ , 其扩展不确定度为:

$$U(x) = k \times u_c(x) = 2 \times 0.291\% = 0.582\%$$

#### 4.3 比沙可啶含量标准值及不确定度

比沙可啶含量标准值及不确定度分别为 99.82%、 $(\pm)0.59\%$  ( $k=2, P=0.95$ )。

### 5 讨论

(1) 在比沙可啶 HPLC 法不确定度评定过程中,水分、无机杂质和溶剂残留的含量测定值均较小(小于 0.1%),对纯度标准值的定值结果几乎无影响,所以由其引入的不确定度可以忽略不计。

(2) 本文采用 HPLC 和非水溶液电位滴定法两种不同原理的分析方法联合测定比沙可啶纯度值,有效地避免了采用一种技术带来的分析方法缺陷,使定值结果更加准确可靠。

(3) 非水溶液电位滴定法为 2010 年版《中国药典》(二部)中测定比沙可啶纯度的法定方法, HPLC 面积归一化法为测定比沙可啶纯度的经典方法,建立其不确定度评定方法十分重要,同时也为比沙可啶纯度标准物质的研制和标定赋值工作提供了科学依据。本文建立的不确定度评估数学模型和定值方法与国际标准物质研制水平接轨,同时也为其他药物进行纯度测量、不确定度模型建立及标准物质评定提供了一定的参考。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 55, 附录 V E、VII B、VIII M、VIII N.
- [2] 国家质量技术监督局. JJF 1059-1999 测量不确定度评定与表示[S]. 1999-01-11.
- [3] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL06 化学分析中不确定度的评估指南[S]. 2006-06-01.
- [4] 国家质量监督检验检疫总局. JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S]. 2006-12-08.
- [5] 倪育才. 实用测量不确定度评定[M]. 2 版. 北京: 中国计量出版社, 2004: 27-34.
- [6] 国家质量技术监督局. 中华人民共和国国家计量检定规程: 标准玻璃量器[S]. 2001-11-30.
- [7] 周浩辉, 周政政, 郭永辉, 等. 岩白菜素化学纯度标准物质的定值及不确定度评价研究[J]. 中国药房, 2012, 23(11): 1 005.
- [8] 王卉, 杜春波, 沈立, 等. RP-HPLC 法测定比沙可啶片剂含量及有关物质[J]. 药学进展, 2005, 29(12): 565.

(收稿日期: 2014-04-08 修回日期: 2014-07-04)