

统计模拟分光光度法及其在复方制剂组分含量测定中的应用*

王 玺 周 炬** 毕开顺 杜立颖 罗 旭

(沈阳药科大学药物分析研究室, 沈阳 110015)

摘要 将复方制剂诸组分的纯品按标示量的 100%, 100±5%, 100±10% 和 100±15% 进行交叉组合, 制备合成样品(习称模拟样品), 绘制其溶液的 UV-VIS 吸收光谱, 选择组分含量对吸收度影响大的若干灵敏波长, 读出对应的吸收度, 并用逐步回归法构造反映该复方制剂在灵敏波长吸收度—组分含量关系的数学模型; 根据所构造的数学模型, 在计算机上算出诸组分含量在标示量 100±15% 范围内详尽组合(以标示量的 0.1% 或其它含量单位系统增减)的模拟样品溶液的吸收度; 对未知样品采用全组合法寻优, 即可求出组分的含量。本研究是通过建立测定脑清片(二组分)组分含量的统计模拟分光光度法完成的, 并对含量测定结果进行方差分析, 均得到令人满意的结果。

关键词 统计模拟分光光度法; 复方制剂; 逐步回归分析法; 脑清片

复方制剂脑清片含二组分氨基比林和咖啡因(3.75:1), 其法定组分含量测定方法操作复杂繁琐而测定结果不够准确。近年来, 随着计算机技术的进步, 提出了许多该复方制剂不经分离的计算分光光度法。这些方法虽各具特色^[1~5], 但受到吸收度与组分浓度的关系偏离比尔定律、在计算中测定误差叠加、吸收度测定点少、合成样品组分含量范围和样本容量小而代表性差等条件的限制, 结果难以重复。

统计模拟即蒙特卡洛(Monte Carlo)方法^[6,7], 是一个以随机因素的概率分布为理论基础、用有限但足够的实验数据建立数学模型以对无限实体进行数值模拟的科学方法。本文提出的统计模拟分光光度法是用统计模拟即蒙特卡洛方法制定的, 分为三步: 首先是建立数学模型。在制剂的组分数为 n 、组分含量合格限是标示量±15% 的情况, 如果按组分含量为标示量的 100, 100±5, 100±10 和 100±15% 用纯品进行交叉组合制备复方制剂的合成样品(习称模拟样品), 则交叉组合数为 7^n ; 如果再选择 m 个吸收度随组分含量变化大的波长即灵敏波长并进行平行双测定, 则得 $2m \cdot 7^n$ 个实验数据。根据这些数据, 即可用逐步回归法构造反映不同波长下吸收度与组分含量经验关系的 m 个“最优”数学模型。其次是产生模拟数据。根据所构造的模型, 即可在计算机上算出诸组分含量详尽组合(以 0.1% 或其它含量单位系统增减)的模拟样品溶液的吸收度, 存盘供测定未知样品组分含量用。最后, 测量未知样品的组分含量时, 只须测量未知样品溶液在 m 个波长的吸收度(扫描仪器只须绘制一条 UV-VIS 吸收曲线), 即可用全组合法检索法准确、快速、简便地找出未知样品诸组分的含量。

本文提出了测定脑清片组分含量的统计模拟分光光度法, 并对测定结果进行了方差分析以估计由确定因素产生的变差, 均得到令人满意的结果。

本文于 1994 年 11 月 2 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目

** 1994 届硕士生

方 法

数学模型的构造

在复方制剂组分的分光光度含量测定中,吸收度与浓度的关系不能简单地表示为 $A=KC$,其中 A 为吸收度矩阵, C 为浓度矩阵, K 为吸收系数矩阵,须将 $A=KC$ 式中右方拟合为多变量二次多项式进行校正。以二组分复方制剂的样品溶液为例,可将 $A=KC$ 表示为 $A=B_0+B_1C_1+B_2C_2+B_3C_1^2+B_4C_2^2+B_5C_1C_2$ 。令 $X_1=C_1, X_2=C_2, X_3=C_1^2, X_4=C_2^2, X_5=C_1C_2$,进行回归运算,从 X_1-X_5 中选择最佳回归变量,即可得出反映吸收度与诸浓度关系的最优回归方程的数学模型。在 m 个波长点逐一构造数学模型,共得 m 个。

逐步回归分析法的主要思路,是对变量逐个根据其贡献进行引入或删除,以达到回归方程中的每个变量都是有效的这一目的。每次引入一个新变量时,对已入选的变量逐个进行 F 检验,将对偏回归平方和变得无效的变量剔除,直至变量既不能引入,也不能剔除为止。其具体计算方法见文献^[8]。

在构造了数学模型后,即可在计算机上产生该复方制剂组分在含量合格限范围内(标示量的 $100\pm 15\%$)详尽组合(以 0.1% 或其它含量单位系统增减)的模拟样品溶液在诸灵敏波长的吸收度。

未知样品溶液吸收度的测定和组分含量的检索

在对复方制剂的常规质量控制中,首先配制未知样品溶液,在分光光度计上测量在诸灵敏波长的吸收度(用扫描仪器时,只须绘制一条吸收光谱曲线),然后用全组合法检索诸组分含量。

全组合检索是以 $\sum (A_i - A_{ir})^2$ 为目标函数,其中灵敏波长点 $i=1, 2, \dots, m, A_i$ 是对吸收度的计算机模拟数据, A_{ir} 是对应的实测吸收度,从存盘的吸收度模拟数据中检索并计算出目标函数最小的一组,就是未知样品诸组分的含量。

实 验 部 分

仪器与试剂

仪器 岛津 UV-265 分光光度计; LQ-50 超声波振荡仪; LEO-386 计算机; DT-100 光电分析天平。

试剂 盐酸、氯化钾、硼酸、氢氧化钠(以上试剂均为分析纯),氨基比林、咖啡因(以上药品均为合格原料药),淀粉、硬脂酸镁(均符合中国药典有关规定)。

容量器具和仪器的校正 将实验所需的容量器具、量瓶、移液管校正为一等品方可使用;天平、UV-265 分光光度计均按有关规定校正。

原料药的精制 参照《全国原料药工艺汇编》对原料药反复进行重结晶,得其精制品。

脑清片组分含量的测定

组分溶液的吸收曲线绘制和稳定性考查

分别精密称取氨基比林、咖啡因精制品适量,分别置于 250 ml 量瓶中,加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl,振摇,溶解后稀释至刻度,摇匀成(单)组分溶液;再分别精密量取各组分溶液适量,置于同一 25 ml 量瓶中,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 稀释至刻度,摇匀成混合组分溶液,在 UV-265 分光光

度上绘制诸组分的吸收曲线。

经吸收度考查,各单组分溶液至少在一周内、混合组分溶液至少在 4 h 内稳定。

波长选择

从各单组分溶液和混合组分溶液的吸收曲线选出 255, 257, 270, 272, 274, 276 nm 6 个灵敏波长。

空白辅料与储备组分溶液的配制

空白辅料溶液的配制 按处方称取淀粉、硬脂酸镁混匀成空白辅料备用。取空白辅料约 160 mg, 称定, 置于 1000 ml 量瓶中, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液备用。

储备组分溶液的配制 精密称量相当于标示量 85.0, 90.0, 95.0, 100.0, 110.0 和 115.0% 的氨基比林、咖啡因精制品, 分别置于 1000 ml 量瓶中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 溶解后, 再加入称定的空白辅料约 160 mg, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 弃去初滤液, 续滤液成为储备组分溶液备用。

数学模型的建立

精密量取各储备组分溶液 2 ml, 置于 50 ml 量瓶中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 至刻度, 摇匀合成样品溶液。取辅料储备液 2 ml, 置于 50 ml 量瓶中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 至刻度, 摇匀作空白液。在 200~400 nm 范围内进行扫描, 吸收曲线存盘。按交叉组合原理, 当组分数为 2、各组分为 7 个浓度时, 应配制 $7^2 = 49$ 个浓度配比不同的合成样品溶液。在 200~400 nm 范围内扫描绘制 UV 曲线, 读出灵敏波长下的吸收度原始数据, 输入计算机建立 Dbase 数据库, 再运行逐步回归分析程序, 求得各波长下的多元回归方程, 其经验参数见表 1。

Tab 1 Empirical regression equations and parameters at 6 wavelengths for the assay of Naoqingpian tablets

$$Y = B_0 + B_1C_1 + B_2C_2 + B_3C_1^2 + B_4C_2^2 + B_5C_1C_2$$

$\lambda_c(\text{nm})$	B_0	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	Correlation coefficient
255	-0.1049	0.1859	6.437E-03	-3.476E-03	0	0	0.9997
257	-0.1244	0.1924	7.446E-03	-3.969E-03	0	0	0.9998
270	-0.0585	0.1066	1.595E-02	0	0	-6.455E-04	0.9991
272	2.194E-02	7.945E-02	1.238E-02	0	0	0	0.9988
274	2.297E-02	6.661E-02	1.227E-02	0	0	0	0.9982
276	-4.022E-02	6.547E-02	1.485E-02	0	0	-5.353E-02	0.9980

回收率的测定

按照数学模型的建立方法, 配制 25 个合成样品溶液, 绘制 UV 曲线, 读出灵敏波长下的吸收度, 用全组合检索法所得结果计算各组分的回收率。氨基比林、咖啡因回收率的均值分别为 100.1%, 99.9%; 标准差分别为 0.57%, 0.39% ($n=25$)。

样品测定

取本品 20 片, 精密称定, 研成细粉, 精密称取适量(约相当于 2 片重), 置于 1000 ml 量瓶中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 至刻度, 摇匀, 过滤, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 2 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 至刻度, 摇匀, 在 200~400 nm 扫描, 读出灵敏波长下的吸收度, 计算含量。咖啡因与氨基比林含量的均值分别为 100.0%, 91.9%, 标准差分别为 0.65%,

1.16% (n=4)。

方差分析

按照数学模型的建立方法配制样品溶液,由不同人员分别在不同仪器上进行测定,用统计模拟分光光度法算出含量,对结果进行方差分析⁽⁹⁾。数据和结果见表 2、表 3,算出的各因素的标准差见表 4。

Tab 2 Results of the assay of Naoqingpian tablets

Ingredient	Operator	UV-VIS spectrophotometer					
		UV-265			UV-260		
Aminopyrine	1	19.923	19.858	19.771	20.227	20.162	19.966
	2	19.879	19.749	19.749	20.118	19.987	20.205
	3	19.858	19.749	20.053	20.010	20.227	19.792
Caffeine	1	5.828	5.805	5.828	5.776	5.758	5.787
	2	5.822	5.822	5.834	5.787	5.782	5.770
	3	5.828	5.828	5.805	5.787	5.781	5.805

Tab 3 Analysis of variance for the assay of Naoqingpian tablets

Ingredient	Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Observed variance	Ratio of variance	
					Observed value	Critical value
Aminopyrine	I(instrument)	0.2233	1	0.2233	19.8	F(95,1,2)=18.5*
	O(operator)	0.0089	2	0.0045	0.396	F(95,2,2)=19.0
	I×O(interaction)	0.0224	2	0.0112	0.527	F(95,2,12)=3.89
	E(error)	0.256	12	0.0213		F(99,1,2)=98.5
Caffeine	I(instrument)	0.0075	1	0.0075	50.7	F(95,1,2)=18.5*
	O(operator)	0.0023	2	0.0012	0.792	F(95,2,2)=19.0
	I×O(interaction)	0.0003	2	0.00015	1.045	F(95,2,12)=3.89
	E(error)	0.0017	12	0.00014		F(99,1,2)=98.5

*Significance

Tab 4 Sources of variation

	σ_E	$\sigma_{I \times O}$	σ_O	σ_I
Aminopyrine	0.146	0	0	0.266
Caffeine	0.012	0.0013	0.013	0.025

讨 论

本研究建立了统计模拟分光光度法。在数学模型的构造中应用了逐步回归分析法,成功地校正了主要由诸组分交互作用产生的各组分吸收度与其浓度关系对比尔定律的偏离;在混合物组分含量的测定工作中不要求逆一些增加误差的计算过程;在波长的选择上也没有非常严格的要求;这是本法的优势所在。本法在构造反映各灵敏波长下吸收度与各组分浓度关系的数学模型中,需要由有经验的操作人员取得翔实的数据并编写分析软件,但在用于混合物组分分析的常规工作中,操作人员只要为样品溶液绘制一条 UV-VIS 吸收光谱曲线,读出各灵敏

波长下的吸收度,即可准确、快速地测定各组分的含量。

为了寻找本法的误差来源,保证它在常规计量检定工作中的可靠性,本研究对不同操作人员、使用不同 UV-VIS 分光光度计测定脑清片组分含量的结果进行了两因素、等重复、交叉分组、随机效应模型方差分析。可以看出:仪器因素对小组分咖啡因和小组分氨基比林含量的测定结果在 99% 的置信概率下都不存在显著差异,但在 95% 的置信概率下,对小组分存在显著差异。推其原因,是所使用的外单位 UV-260 分光光度计未经操作人员亲自校正,而本室的 UV-265 分光光度计是由操作人员校正过的。操作人员因素对该二组分在该二置信概率下都不存在显著差异。仪器因素和操作人员因素不存在交互作用。

在复方制剂组分的分光光度分析中,小组分的含量测定受吸收度测定误差的影响大,对这个问题本法尚未能完全解决。

参 考 文 献

- 1 徐嘉凉,俞善辉,易大年. 联立方程组的新解法及其在复方制剂分析中的应用. 药学期刊, 1990, 25: 626
- 2 高文兰,程刚,李松平. 倍增差示法测定脑清片中氨基比林和咖啡因的含量. 沈阳药学院学报, 1992, 9: 266
- 3 白韬,贾金华. 导数多波长数据线性回归法测定脑清片中氨基比林和咖啡因的含量. 药学期刊, 1988, 2: 616
- 4 徐本明,毕同香. 双波长系数倍率法测定脑清片含量. 中国医药工业杂志, 1989, 20: 174
- 5 朱奎,林一鸣,邓桂芹等. 紫外分光光度法直接测定脑清片的含量. 中国医院药学杂志, 1989, 9: 546
- 6 Davies DL, Goldsmith PL. *Statistical Methods in Research and Production*. 4th edition. New York: Longman Group Limited, 1980: 409~422
- 7 李惕培. 实验的数学处理. 北京: 科学出版社, 1980: 305~334
- 8 相秉仁编. 计算药理学. 北京: 中国医药科技出版社, 1990: 78~90
- 9 罗旭著. 化学统计学基础. 沈阳: 辽宁人民出版社, 1986: 254~282

STATISTICAL SIMULATION SPECTROPHOTOMETRY AND ITS APPLICATION TO THE ASSAY FOR INDIVIDUAL MEDICAMENTS IN A COMPOUND FORMULATION

X Wang, J Zhuo, KS Bi, LY Du and X Luo

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015)

ABSTRACT It is well known that the absorbance—concentration relationship of a chemical component may deviate from Beer's law with certain chemical cause, and errors of absorbance measurement propagate and multiply in mathematical operation. But there are difficulties in carrying out experiments on large systems of chemical components to ascertain the real relationship, and

statistical simulation spectrophotometry —— SSS for short, or Monte Carlo simulation spectrophotometry —— has been developed for the assay of medicaments in compound formulations. The key step of SSS is to build a model based on a collection of limited but sufficient actual data, then the model will provide the numerical imitation —— giving simulation data —— of the real sum-up absorbance—concentration relationship of individual medicaments at several sensitive wavelengths. The method of stepwise regression has been used in the present study on Naoqingpian tablets, a compound formulation of two medicaments. For the reliability of this SSS, an analysis of variance has been performed on the assay data of cross-classification to separate and estimate the variations associated with instrument and operator. SSS is accurate, rapid and practicable, and promises well to be adopted as an official assay method of some compound formulations.

Key words Statistical simulation spectrophotometry; Compound formulation; Stepwise regression; Naoqingpian