

HPLC 法测定保健食品中芦荟苷含量不确定度的评定

翁雪萍, 黄丹莹

(广东省惠州市药品检验所, 惠州 516003)

摘要 目的: 对高效液相色谱法测定保健食品中芦荟苷含量不确定度进行评定。方法: 以必舒牌芦荟胶囊为例, 用 HPLC 法测定芦荟苷的含量, 分析了整个测定过程产生的不确定度。结果: 实验给出扩展不确定度以及最终结果表示: $(60.49 \pm 2.24) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 分析产生不确定度的主要来源, 为有效地控制用该方法来测定芦荟苷的含量提供可靠的理论依据。

关键词: 不确定度; HPLC; 芦荟苷; 保健品

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)06-1193-04

HPLC evaluation of uncertainty in measurement of aloin in health food

WENG Xue - ping, HUANG Dan - ying

(Guangdong Provincial Huizhou Institute for drug Control, Huizhou 516003, China)

Abstract Objective: Through the assessment of uncertainty in measurement of Aloin in health food by HPLC. **Method:** Determination of Aloin in Pianbishupian Luhui capsule by HPLC, it analyzes the uncertainty of the entire process measurement. **Result:** The extended uncertainty and the eventual result: $(60.49 \pm 2.24) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** It analyzes the main source of uncertainty, which provide reliable theoretical basis for the effective control determination of Aloin by the method.

Key words: uncertainty; HPLC; aloin; health care products

高效液相色谱法具有高选择性、高适用性及优良的分离效果, 与其他色谱方法比较显示出更大的优越性。在药品检验、保健食品等领域中被广泛使用。芦荟胶囊作为保健食品, 其功效成分芦荟苷的测定采用高效液相色谱法, 收载于《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)^[1]。本文参考有关文献^[2-4], 以必舒牌芦荟胶囊为例, 用 HPLC 法测定芦荟苷的含量^[1], 分析了整个测定过程产生的不确定度, 通过分析和评价该成分测定过程的测量不确定度, 以探讨各不确定度分量对测定结果的影响, 为评价检测报告提供科学依据。

1 仪器与实验材料

1.1 仪器 1100 Series 高效液相色谱仪(美国 Agilent); AE-240 电子分析天平(瑞士 Mettler); KQ-250 超声波清洗器(功率 250 W, 频率 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); DT5-7 低速自动平衡台式离心机(北京时代北利离心机有限公司)。

1.2 实验材料 50 mL、100 mL 容量瓶及 5 mL 移液管依据 JJG196-2006 常用玻璃量器检定规程检定^[5]为 A 类; 必舒牌芦荟胶囊(吉林天强制药有限公司, 批号: 080301); 芦荟苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110787-200504); 甲醇为色谱纯试剂; 水为超纯水。

2 试验方法

2.1 色谱条件及系统适应性 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以甲醇-水(55:45)为流动相; 检测波长为 293 nm; 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在此条件下芦荟苷与其他组分达到基线分离, 分离度大于 1.5, 理论板数按芦荟苷峰计算为 14472。

2.2 对照品溶液制备 精密称取芦荟苷对照品 0.00910 g, 加甲醇稀释至 100 mL, 即得。

2.3 供试品溶液制备 取本品内容物, 研细, 混匀, 精密称取 1.01230 g, 置 50 mL 量瓶中, 加入流动相 30 mL 溶解, 超声(250 W, 40 kHz)处理 5 min, 放冷至室温, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 离心($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。

min^{-1} , 5 min) 沉淀, 取上清液 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 经滤膜(0.45 μm) 过滤, 即得^[1]。

2.4 方法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪并进行测定, 利用外标法计算含量。

3 数学模型

$$H(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{A_X \times W_R \times V_X}{W_X \times A_R \times V_R}$$

式中: A_X 供试品峰面积; A_R 芦荟苷对照品峰面积; W_R 芦荟苷对照品的称取量(g); W_X 供试品称取量(g); V_X 供试品稀释体积(mL); V_R 对照品稀释体积(mL)。

从数学模型中得知 H 与 W 、 A 、 V 是相互独立、非

线性关系, 因而可以应用 JJF1059-1999^[6] 标准中公式(20) 计算相对合成不确定度, 而无需计算各标准不确定度的分量的灵敏系数^[7]。

因芦荟苷含量的测试结果仅用于合格判定, 其不确定度一般不用于转播, 故不必计算其自由度。

4 不确定度分量的分析与计算

4.1 不确定度的来源 从检测过程和数学模型分析, 芦荟苷含量的不确定度来源, 主要有以下几个方面: (1) 对照品的纯度(P_R)、称量(W_R) 及对照品溶液制备(V_R); (2) 供试品称重(W_X) 及溶液制备(V_X); (3) 供试品的重复测量(F_X); (4) 对照品、供试品积分峰面积。但由于本实验采用自动进样, 峰面积重复性通过供试品重复测量予以体现, 故此项可忽略。不确定度来源因果分析见图 1。

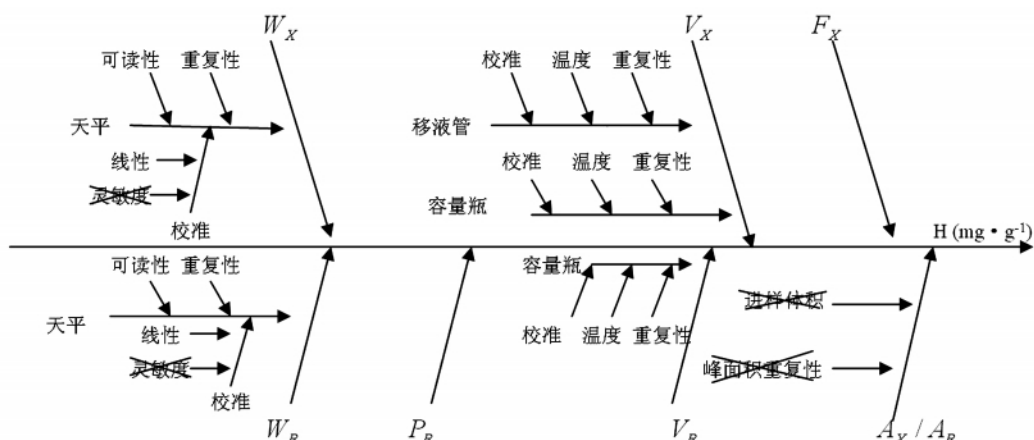


图1 不确定度来源因果分析图

Fig 1 Source of uncertainty

4.2 不确定度的量化分析

4.2.1 对照品纯度的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(P_R)$

对照品购自中国药品生物制品检定所, 未标明含量, 视为 100% $u_{\text{rel}}(P_R) = 0$ 。

4.2.2 对照品称量的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(W_R)$

对照品的相应质量由已扣除皮重的的称量给出, 则称量的 3 个不确定来源^[8]: 重复性、可读性(数字分辨率) 以及由于天平校准产生的不确定度分量。其中天平校准本身有两个不确定度来源: 灵敏度和校准函数的线性。灵敏度可忽略, 因为称量是用同一架天平在很窄范围内进行。

天平称量重复性引入的不确定度 $u(W_{R1})$, 所用电子天平($d = 0.01 \text{ mg}$) 的检定证书给出的重复性误差为 $\pm 0.2 \text{ mg}$, 按矩形分布, 则:

$$u(W_{R1}) = \frac{0.2}{\sqrt{3}} = 0.115 \text{ mg}$$

天平可读性(数字分辨率) 引入的不确定度 u

(W_{R2}), 所用电子天平最小有效数字为 0.01 mg, 分辨率引起的标准不确定度为:

$$u(W_{R2}) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0.00288 \text{ mg}$$

天平的线性引入的不确定度 $u(W_{R3})$, 所用电子天平($d = 0.01 \text{ mg}$) 的检定证书给出的最大允差为 $\pm 0.1 \text{ mg}$, 按矩形分布, 则:

$$u(W_{R3}) = \frac{0.1}{\sqrt{3}} = 0.0577 \text{ mg}$$

单次称量的标准不确定度:

$$\sqrt{0.115^2 + 0.00288^2 + 0.0577^2} = 0.128 \text{ mg}$$

因称量使用减重法, 故:

$$u(W_R) = \sqrt{2 \times 0.128^2} = 0.181 \text{ mg}$$

因而相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(W_R) = \frac{u(W_R)}{W_R} = \frac{0.181}{0.00910 \times 10^3} = 1.99 \times 10^{-2}$$

4.2.3 对照品溶液配制的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_R)$

容量瓶中的溶液体积主要有 3 个不确定度来源^[8]: 确定容量瓶内部体积时的不确定度(校准); 充满容量瓶至刻度的变化(重复性); 容量瓶和溶液温度与容量瓶体积校准时的温度不同(温度)。

(1) 校准: 容量瓶(100 mL)的容量允差为 ± 0.08 mL, 按三角分布换算成标准偏差为 $\frac{0.08}{\sqrt{6}} = 0.0327$ mL; (2) 重复性: 充满溶液至刻度, 称量, 重复 10 次, 得出标准偏差 0.0128 mL, 作为标准不确定度。(3) 温度: 实验温度为 27.5 °C, 校准时温度为 22.5 °C, 温差为 5 °C, 水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$, 假设温度变化是矩形分布, 因此产生的不确定度:

$$\frac{100 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.0606 \text{ mL}$$

以上三项合成得出:

$$u_{\text{rel}}(V_R) = \frac{\sqrt{0.0327^2 + 0.0128^2 + 0.0606^2}}{100} = 7.00 \times 10^{-4}$$

4.2.4 供试品称量的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(W_X)$

供试品称量与对照品称量为同一天平的同一量程, 因此:

$$u(W_X) = u(W_R) = 0.181 \text{ mg}$$

相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(W_X) = \frac{u(W_R)}{W_X} = \frac{0.181}{1.01230 \times 10^3} = 1.79 \times 10^{-4}$$

4.2.5 供试品溶液制备的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_X)$

从“2.3”可知, 供试品溶液制备过程中稀释的体积 $V_X = V_1 \times \frac{V_3}{V_2}$, 其中 V_1 为供试品第 1 次定容体积, V_2 为精密吸取上清液 5 mL, V_3 为第 2 次定容体积。

4.2.5.1 供试品在容量瓶中第一次定容的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_1)$

定容所用的 50 mL 容量瓶, 同理(见“4.2.3”)亦包括 3 个部分: (1) 容量允差为 ± 0.05 mL, 按三角分布^[8]换算成标准偏差为 $\frac{0.05}{\sqrt{6}} = 0.0204$ mL; (2) 重复性的标准不确定度为 0.00644 mL。(3) 温度产生的不确定度为 $\frac{50 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.0303$ mL。

以上三项合成得出:

$$u_{\text{rel}}(V_1) = \frac{\sqrt{0.0204^2 + 0.00644^2 + 0.0303^2}}{50} = 7.42 \times 10^{-4}$$

4.2.5.2 精密吸取上清液 5 mL 引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_2)$

所用的 5 mL 移液管, 与容量瓶同理, 亦包括三个部分: (1) 吸管体积的不确定度 移液管(5 mL)的容量允差为 ± 0.015 mL, 按三角分布换算成标准偏差为 $\frac{0.015}{\sqrt{6}} = 0.00612$ mL; (2) 重复性。吸取溶液至刻度, 称量, 重复 10 次, 得出标准偏差 0.00292 mL, 作为标准不确定度。(3) 温度产生的不确定度: $\frac{5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.11303$ mL。

以上三项合成得出:

$$u_{\text{rel}}(V_2) = \frac{\sqrt{0.00612^2 + 0.00292^2 + 0.00303^2}}{5} = 1.49 \times 10^{-3}$$

4.2.5.3 供试品在容量瓶中第二次定容的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_3)$

所用的 100 mL 容量瓶, 同“4.2.3”, 即

$$u_{\text{rel}}(V_3) = 7.00 \times 10^{-4}$$

4.2.6 A 类不确定度, 即重复测定样品产生的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(F_X)$

取本品细粉适量, 称取 1 g, 精密称定, 共 6 份, 按“2.3”项下操作, 进样测定, 计算芦荟苷的含量分别为 60.70 60.35 60.69 60.45 60.43 60.32 mg · g⁻¹, 为随机测定, 属 A 类不确定度。

$$\bar{x} = \frac{\sum x_k}{n} = 60.49$$

单次测量的实验标准差为:

$$S(x_k) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_k - \bar{x})^2} = 0.166$$

观测列算术平均值的实验标准差为:

$$S(\bar{x}) = \frac{S(x_k)}{\sqrt{n}} = \frac{0.166}{\sqrt{6}} = 0.0677$$

测定结果的标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(F_X) = \frac{S(\bar{x})}{\bar{x}} = 1.12 \times 10^{-3}$$

4.3 相对合成标准不确定度

把以上各不确定度分量的计算结果列成表 1。

表 1 相对标准不确定度一览表
Tab 1 Table of reverse standard uncertainty

分量 (quantity)	不确定度来源 (sources of uncertainty in measurement)	标准不确定度 (standard uncertainty)	类型 (type)	相对标准不确定度 (reverse standard uncertainty)	排序 (order)	
$u_{\text{rel}}(W_R)$	称量重复性(weigh repeatability)	0.115	B	1.99×10^{-2}	1	
	天平可读性(balance readability)	0.00288	B			
	天平线性(balance linear)	0.0577	B			
$u_{\text{rel}}(P_R)$	/	0	B	0	7	
$u_{\text{rel}}(V_R)$	校准(measuring flask error)	0.0327	B	7.00×10^{-4}	5	
	重复性(repeatability)	0.0128	A			
	温度(temp)	0.0606	B			
$u_{\text{rel}}(W_X)$	称量重复性(weigh repeatability)	0.115	B	1.79×10^{-4}	6	
	天平可读性(balance readability)	0.00288	B			
	天平线性(balance linear)	0.0577	B			
$u_{\text{rel}}(V_X)$	V_1	校准(measuring flask error)	0.0204	B	7.42×10^{-4}	4
		重复性(repeatability)	0.00644	A		
		温度(temp)	0.0303	B		
	V_2	校准(sucker error)	0.00612	B	1.49×10^{-3}	2
		重复性(repeatability)	0.00292	A		
		温度(temp)	0.00303	B		
	V_3	校准(measuring flask error)	0.0327	B	7.00×10^{-4}	5
		重复性(repeatability)	0.0128	A		
		温度(temp)	0.0606	B		
$u_{\text{rel}}(F_X)$	/	0.0677	A	1.12×10^{-3}	3	

$$u_{\text{c rel}} = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(W_R) + u_{\text{rel}}^2(P_R) + u_{\text{rel}}^2(V_R) + u_{\text{rel}}^2(W_X) + u_{\text{rel}}^2(V_1) + u_{\text{rel}}^2(V_2) + u_{\text{rel}}^2(V_3) + u_{\text{rel}}^2(F_X)} = 0.020$$

实验中测得 $H = 60.49 \text{ mg}$ 则:

$$u_{\text{c}}(H) = 0.020 \times 60.49 = 1.21 \text{ mg}$$

4.4 扩展不确定度分析 对于一般检测实验室,包含因子 k 取 2 便可满足需要^[8] 则扩展不确定度:

$$U = k u_{\text{c}}(H) = 2 \times 1.21 = 2.24 \text{ mg}$$

4.5 结果报告 测定结果: $(60.49 \pm 2.24) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ $k = 2$ 。

5 讨论

由表 1 可知,对照品的称量所产生的不确定度分量最大,因此在实验中适当增大对照品的称取量,控制好对测量有较大影响的不确定度分量,即可得到较可靠的测定结果。此次评定结果与文献报道^[9]基本吻合,可用于保健食品中芦荟苷含量检测结果质量的评价。

参考文献

1 Ministry of Health of P. R. C(中华人民共和国卫生部) . Technacal Standards for Testing & Assessment of Health Food(保健食品检验与评价技术规范) . 2003. 253
2 CHEN Jian - qin(陈建琴) . Evaluation of measurement uncertainty of HPLC mthod for determination of phenobaribital and scopolamine hydrobromide tablets(HPLC 法测定苯巴比妥东莨菪碱片含量的测定不确定度价) . *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志) ,2007 ,38 (5) : 368

3 JIANG Lian - ge(姜连阁) ,LIU Yong - cheng(刘永成) ,BAI Zheng - zhong(白政忠) . Evaluation of uncertainty measurement for the de-termination of ribavirin by HPLC(HPLC 法含量测定不确定度分析及实例) . *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2007 27(11) : 1803
4 XIE Yuan - chao(谢远超) ,WANG Wei - jian(王维剑) ,NIU Chong(牛冲) *et al.* Evaluation of the uncertainty for the determination of prednisone acetate tablets by HPLC with 3 kinds of calulate meth-ods(HPLC 法测定醋酸泼尼松片含量 3 种不同计算方法的不确定度分析) . *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2009 29(4) : 6148
5 General Administration of Quality Supervision ,Inspection and Quarant-ine of P. R. C(国家质量监督检验检疫总局) . Verification Regula-tion of Working Glass Container(常用玻璃量器检定规程) . JJG196 - 2006. 2006
6 State Quality and Technique Administration(国家质量技术监督局) . Evaluation and expression of uncertainty in measurement(测量不-确定度评定与表示) . JJF1059 - 1999
7 GUO Lan - dian(郭兰典) . Commodity Inspection of The Uncertainty in the Examples(商品检测不确定度评定实例) . Beijing(北京) : China Metrology Publishing House(中国计量出版社) 2004. 156
8 China National Accreditation Board for Laboratories(中国实验室国家认可委员会) . Guidance on Evaluation the Uncertainty in Chemi-cal Analysis(化学分析中不确定度的评估指南) . Beijing(北京) : China Metrology Publishing House(中国计量出版社) 2002
9 SU Xiao - li(粟晓黎) ,LI Guan - min(李冠民) ,JIN Shao - hong (金少鸿) . Studies on evaluation of uncertainty for general analysis methods for quality control of drugs(药品检验一般检测项目不确定-度评定研究 - 1. B 类评定) . *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) , 2005 25(6) : 699

(本文于 2010 年 6 月 24 日收到)