

HPLC 测定茄尼醇的不确定度

白琦¹, 勝間田五郎², 陈修身², 白璜², 梅树常² (1. 四川农业大学分析测试中心, 四川 雅安 625014; 2. 雅安胜间田生物科技有限公司, 四川 雅安 625000)

摘要:目的 使高纯度茄尼醇(90%以上)含量的测定准确及可靠。方法 建立了 HPLC 测定高纯度茄尼醇的不确定度的评定方法。结果 通过统计学方法, 量化不确定度分量, 计算合成不确定度和扩展不确定度。结论 仪器环境不变时测量结果受控。

关键词:高效液相色谱法; 茄尼醇; 不确定度

中图分类号: R917.101; R917.72 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2009)03-0240-03

Uncertainty Measurement in the HPLC Determination of Solanesol

BAI Qi¹, KATSUMATA GOROH², CHEN Xiushen², BAI ying², MEI Shuchang² (1. Centre of Analysis, Sichuan Agricultural University Ya'an 625014, China; 2. KATSUMATA BIOTECH CO., Ltd, Ya'an 625000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To make the measures of the content of solanesol under control. **METHODS** To establish a method for uncertainty analysis in HPLC determination. **RESULTS** All the standard uncertainties were then divided according to the appropriate rules to give a combined standard uncertainty and an expanded standard uncertainty. **CONCLUSION** Measures result is controllable under constant instrument environment.

KEY WORDS: HPLC; solanesol; uncertainty

茄尼醇(solanesol), 是一种存在于植物体内的天然物质, 广泛存在于烟叶、马铃薯、桑叶中^[1]。茄尼醇含量在 0.3 ~ 3% 之间, 化学名为九聚异戊二烯伯醇, 90% 以上纯品为白色, 淡黄色结晶粉末。茄尼醇是 Co-Q10、VK2 的合成侧链。近年 Co-Q10 在保健品、化妆品、食品领域广泛应用, 主要消费国是日本、美国、欧洲各国。生产 Co-Q10 需要高纯度(90% 以上含量)茄尼醇作为原料。我国是烟叶生产大国, 从废次烟草中提取茄尼醇, 不仅能获得一种重要的医药原料, 而且能变废为宝, 提高烟草工业附加值, 具有较大的现实意义。本试验主要研究了利用 HPLC 进行茄尼醇的不确定度评定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 液相色谱仪, CP225D 电子天平, 感量 0.00001 (北京塞多利斯), HS6150D 超声波脱气仪(天津恒奥公司), 甲醇、乙腈、异丙醇均为色谱纯(上海陆都化学试剂厂), 甲醇为分析纯(成都科龙化工试剂厂), 茄尼醇对照品(日本大阪府立产业技术综合研究所提供, 纯度 95%, 批号: No. 02-00221-4)。茄尼醇(90% 以上含量, 批号: 2006-11-7)来自雅安胜间田生物技术有限公司。

1.2 色谱条件

色谱柱: Kromasil 5-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-异丙醇(75: 15: 10); 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 紫外检测波长: 210 nm; 柱温: 室温。在上述色谱条件下, 茄尼醇的对照品以及烟叶提取物茄尼醇的色谱图见图 1。

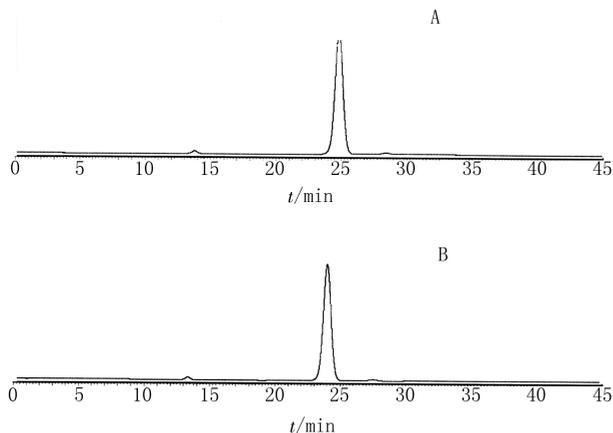


图1 茄尼醇对照品(A)供试品(B)液相色谱图
Fig 1 Chromatograms of reference substance(A) and solanesol in tobacco extract (B)

1.3 测定方法

分别精密称取茄尼醇对照品和供试品 25 mg 置于 50 mL 量瓶中,甲醇溶解(超声混匀),并稀释至刻度,分别取 5 μ L 注入液相色谱仪进行分析,并各自重复 5 次,取峰面积的平均值,按外标法计算含量。

2 结果与讨论

2.1 数学模型^[2-3]

用高效液相色谱方法测定茄尼醇,取 5 μ L 样品注入色谱仪,利用紫外检测器,通过对样品峰的保留时间来定性,根据供试品峰面积与对照品比较,用外标法定量,建立了利用液相色谱法测定高纯度茄尼醇含量的数学模型:

$$C\% = A_s/A_0 \times M_0/V_0 \times V_s/M_s \times P/100 \times 100$$

A_s : 供试品溶液的主峰平均响应区; A_0 : 对照品溶液的主峰平均响应区; V_0 : 对照品的定容体积 (mL); V_s : 供试品的定容体积 (mL); M_0 : 对照品物质标准重量 (g); M_s : 供试品的重量 (g); P : 对照品物质百分比的主要成分。

则 C% 相对标准不确定度为:

$$U(C)/C = \{ [U(A_0)/A_0]^2 + [U(A_s)/A_s]^2 + [U(M_0)/M_0]^2 + [U(M_s)/M_s]^2 + [U(V_0)/V_0]^2 + [U(V_s)/V_s]^2 + [U(P)/P]^2 \}^{1/2}$$

2.2 不确定度的来源^[4]

进行不确定度研究的关键步骤就是确定产生不确定度的所有来源,分析这些来源的方法就是根据测定步骤及建立的数学模型来构建不确定度来源因果图,见图 2。

2.3 各分量的相对不确定度^[5-6]

2.3.1 标准溶液的相对标准不确定度由电子天平

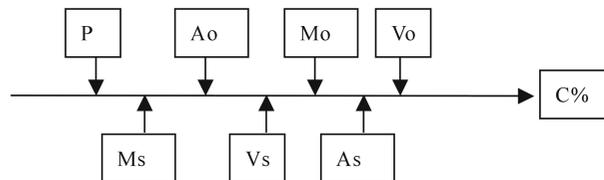


图2 液相色谱测定茄尼醇的不确定度来源因果图

Fig 2 Cause and effect diagram for the determination of solanesol by HPLC

的称量、试剂的纯度、量瓶、温度、重复性等引起的不确定度。

2.3.1.1 对照品质量的标准不确定度由称样量和对照品纯度的不确定度组成 $U(M_0)/M_0$, 根据 CP225D 电子天平鉴定证书,天平的精度为 $d = 0.000\ 01\ g$,按矩形分布,取包含因子 $K = 3^{1/2}$,对照品称样 $0.025\ g$,则称样的相对不确定度 $U(M_0)/M_0 = 0.000\ 01/(25 \times 10^{-3} K) = 2.31 \times 10^{-4}$ 。茄尼醇对照品纯度为 95% (日本提供),纯度的标准偏差为 5.0%,按矩形分布,取包含因子 $K = 3^{1/2}$,则对照品纯度的相对不确定度 $P(M_0) = 0.05/K = 0.028\ 9$ 。

2.3.1.2 对照品溶液是由对照品稀释而成,是由量瓶的不确定度以及操作的熟练程度和温度而引起 $U(V_0)/V_0$,根据国家计量鉴定规定^[7],A 级 50 mL 量瓶的允许偏差为 $\pm 0.05\ mL$,按矩形分布,取包含因子 $K = 3^{1/2}$,则由量瓶引起的相对不确定度为 $U_1(V_0) = 0.05/50 \times 3^{1/2} = 5.774 \times 10^{-4}$;重复性,重复用同一 50 mL 量瓶进行 10 次定容至刻度称量,实验得出定容至刻度的准确性引起的不确定度按贝赛尔公式计算为 $U_2(V_0) = 0.012\ 2$;温度引起的标准不确定度,根据制造商提供的信息,该量瓶在 20 $^{\circ}C$ 校准,而实验室温度在 $\pm 2\ ^{\circ}C$ 之间变动(假设)。水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/^{\circ}C$,体积的变化为 $2 \times 50 \times 2.1 \times 10^{-4} = 0.021\ (mL)$,按均匀分布,取包含因子 $K = 3^{1/2}$,则温度引起的标准不确定度为 $U_3(V_0) = 0.021/3^{1/2} = 0.012\ 1\ (mL)$ 。则:

$$U(V_0)/V_0 = \{ [U_1(V_0)]^2 + [U_2(V_0)]^2 + [U_3(V_0)]^2 \}^{1/2} = 0.017\ 2。$$

供试品取样量的相对不确定度 $U(M_s)/M_s$;由电子天平的称量 $0.002\ 5\ g$ 和最终定容体积为 50 mL 引起的不确定度。

供试品称量引起的不确定度主要是分析天平校准不确定度,根据鉴定证书,分析天平的精度为 $d = 0.000\ 01\ g$,按矩形分布,取包含因子 $K = 3^{1/2}$,则称样

的相对不确定度 $U_1(M)/M = 0.000\ 01/(25 \times 10^{-3} \text{ K}) = 2.31 \times 10^{-4}$ 。供试品溶液由供试品稀释而成,主要由量瓶引入的不确定度,根据国家计量鉴定规定 A 级 50 mL 量瓶的允许偏差为 $\pm 0.05 \text{ mL}$,按矩形分布,取包含因子 $K = 3^{1/2}$,则由量瓶引起的相对不确定度为:

$$U_2(M) = 0.05/50 \times 3^{1/2} = 5.774 \times 10^{-4}。则:$$

$$U(M_s)/M_s = [(2.31 \times 10^{-4})^2 + (5.774 \times 10^{-4})^2]^{1/2} = 6.21 \times 10^{-4}。$$

2.3.2 使用液相色谱仪的相对标准不确定度 $U(A_0)/A_0$ 与 $U(A_s)/A_s$;标准色谱峰面积 (A_0) 与供试品色谱峰面积 (A_s) 的标准不确定度分量是由液相色谱仪的定量从复性引起的不确定度。由于本方法采用外标法与标准比较来进行定量,因此为 A 类不确定度。

2.3.2.1 对照品溶液 5 次进样重复测量的峰面积为 7 527 764, 7 612 583, 7 561 751, 7 537 562, 7 577 433 平均为 (A_0) = 7 563 418;则对照品峰面积的标准不确定度按贝赛尔公式计算,其标准偏差 $S_i = [\sum (A_i - A_0)^2 / n - 1]^{1/2} = 33\ 749$ 。

2.3.2.2 供试品溶液 5 次进样重复测量的峰面积为 7 480 714, 7 431 160, 7 510 721, 7 520 113, 7 465 886 平均为 (A_s) = 7 481 718;则供试品峰面积的标准不确定度按贝赛尔公式计算,其标准偏差 $S_i = [\sum (A_i - A_s)^2 / n - 1]^{1/2} = 35\ 787$ 。

使用液相色谱仪的相对标准不确定度 $U(A_0)/A_0$ 与 $U(A_s)/A_s$ 为:

$$U(A_0)/A_0 = [\sum (A_i - A_0)^2 / n - 1]^{1/2} / A_0 = 0.004\ 5$$

$$U(A_s)/A_s = [\sum (A_i - A_s)^2 / n - 1]^{1/2} / A_s = 0.004\ 8$$

2.4 合成不确定度

相对标准不确定度总和为: $U_c(C)/C = \{ [U(P)]^2 + [U(M_0)/M_0]^2 + [U(M_s)/M_s]^2 + [U(V_0)/V_0]^2 + [U(A_0)/A_0]^2 + [U(A_s)/A_s]^2 \}^{1/2} = 4.76\%$,高纯度茄尼醇测得的含量为, $C = 93.9\%$,则其含量的相对不确定度为:

$$U(C) = C \times U_c(C)/C = 4.469\%$$

2.5 扩展不确定度^[8]

取包含因子 $K = 2$ (95% 置信概率),则 $U_c(c) = 2 U(C) = 8.938\%$,则茄尼醇测定结果表示为:

$$C(\%) = C \pm U_c(c) = 93.9\% \pm 8.938\%$$

2.6 讨论

高效液相色谱法测定工业提纯的茄尼醇时,测量时间一般在 45 min,做工作曲线大约需要 5 h。再测样品时,仪器灵敏度就发生了改变。所以,企业内部一般采用单点校正法测定。因此,配制对照品溶液的浓度一定与待测样品的溶液的浓度非常接近,这样就可以消除仪器非线性的影响。而单点校正法并没有考虑线性的影响,认为是绝对线性,不存在不确定度的。该方法没有考虑工作曲线引起的不确定度。

评价不确定度时,首先应尽量分析产生不确定度的所有来源,因为合成不确定度的数值取决于产生不确定度的所有来源的不确定度分量。本方法测定结果的不确定度主要来自对照品及供试品的称量、定容、及注入液相色谱仪的重复测定。

REFERENCES

- [1] NARASIMHA RAO C V, CHAKRABORTY M K. Solanesol from tobacco waste[J]. Research and Industry, 1979, 24: 83-86.
- [2] JIANG H J, ZHOU M L. Evaluation of uncertainty for determination the content of Benzoic acid by HPLC[J]. Chin J Health Lab Technol (中国卫生检验杂志), 2006, 16(4): 478-479.
- [3] LIN H J, LI J. Evaluation of uncertainty for determination the content of Coenzyme Q10 Capsules by HPLC[J]. China Pharm (中国药师), 2006, 9(6): 498-500.
- [4] HU P, LUO G A, ZHAO Z Z, et al. Evaluation of measurement uncertainty for the determination of ginsenosides in Radix ginseng by HPLC[J]. Acta Pharm Sin (药理学学报), 2005, 40(1): 49-53.
- [5] ZHU S T, XU Y X, WU M T. Uncertainty Measurement in the HPLC Determination of Caffeine[J]. J Instrum Anal (分析测试学报), 2003, 22(5): 88-90.
- [6] LI N, TIAN W, WU Z Y, et al. The Calculation of The Uncertainty in Benzene Gas Standard Determination by Gas Chromatography [J]. Low Temperature and Specialty Gases (低温与特气), 24(3): 29-42.
- [7] National Measure Examine Regulations of China (中华人民共和国国家计量规定). Working class container (常用玻璃量器) [S]. State Technique Administration JJG196-1990.
- [8] Guide to the expression of Uncertainty in Measurement (测量不确定度指南) [M]. Beijing: China metrology publishing house, 1999, 53-56.

收稿日期: 2007-11-27