高效液相色谱法测定维生素片中维生素 A 醋酸酯含量的不确定度评定

黄成安*, 张喜金, 潘拾朝, 黄康惠
(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘 要: 目的 分析高效液相色谱法测定维生素片中维生素 A 醋酸酯含量的不确定度来源和影响不确定度的因素, 为简化评定方法和提高检测质量提供依据。**方法** 根据检测过程, 建立数学模型, 分析影响不确定度因素的来源, 通过对不确定度进行量化分析, 得出扩展不确定度。**结果** 由各不确定度分量评定结果可以看出, 高效液相色谱法测定维生素片中维生素 A 醋酸酯含量的扩展不确定度为 0.46 mg/100 g, 平均含量为 35.72 mg/100 g, 包含因子 k=2。**结论** 高效液相色谱法测定维生素片中维生素 A 醋酸酯含量的不确定度主要由标准溶液配制、重复测定和稀释标准溶液引入。因此在含量检测过程中, 要控制各不确定因素, 以提高检测准确性。
关键词: 高效液相色谱法; 维生素 A 醋酸酯; 数学模型; 不确定度

Assessment of content uncertainty of vitamin A acetate in vitamin tablets by high performance liquid chromatography

HUANG Cheng-An*, ZHANG Xi-Jin, PAN Shi-Chao, HUANG Kang-Hui
(*By-Health Co.*, *Ltd.*, *Zhuhai* 519040, *China*)

ABSTRACT: Objective To analyze the sources and influencing factors of content uncertainty of vitamin A in vitamin tablets by high performance liquid chromatography (HPLC), so as to simplify the evaluation method and increase the testing quality. **Methods** A mathematical model was established to analyze the sources and influencing factors in uncertainty according to the testing process, and through the quantitative analysis of uncertainty, the expanded uncertainty was obtained. **Results** The expanded uncertainty of vitamin A in vitamin tablets by HPLC was 0.46 mg/100 g, the average content was 35.72 mg/100 g, and the including factor k=2 through evaluation of the results in uncertainty components. **Conclusion** The main sources of uncertainty of vitamin A in vitamin tablets by HPLC were preparing the standard solution, repetitive measurement, and thinning the standard solution. Therefore, it was necessary to control various uncertain factors in order to improve detection accuracy in the testing process.
KEY WORDS: high performance liquid chromatography; vitamin A acetate; mathematical model; uncertainty

1 引 言

维生素 A 醋酸酯在分类中属于脂溶性维生素, 能够调节人体的多种生理机能, 增强机体免疫能力, 在调节体内各方面的代谢及促进骨骼的生长发育上有着极其重要的作用, 同时它也参与视网膜视紫质

*通讯作者: 黄成安, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 46456523@qq.com
***Corresponding author:** HUANG Cheng-An, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 46456523@qq.com

的合成与再生, 维持正常的视觉反应, 以降低夜盲症和视力减退的发生[1,2]。而维生素 A 醋酸酯摄入过量也会引起副作用, 可损害脑组织等[3], 因此维生素 A 制剂含量的控制十分重要。本文根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》[4], 并参考 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》[5], 结合检测方法和数学模型, 对高效液相色谱法测定维生素片中维生素 A 醋酸酯的含量进行不确定度评估, 找出不确定度主要来源, 为方法的优化和评定测量结果提供依据。

测量不确定度是测量不确定性的一种度量, 是表征合理的赋予被测量值的分散性、与测量结果相联系的参数、评定测量水平的指标和判定测量结果可靠程度的依据, 对检测实验室测量结果的质量评价越来越重要。ISO 等 7 个国际组织于 1993 年联合发布《测量不确定度表示指南》, (简称 GUM), ISO/IEC 17025-2005 明确规定, 检测实验室应具有并应用评定测量不确定度的程序[6]。

2　材料与方法

2.1　仪器与试剂

高效液相色谱仪(岛津-15C, 附紫外检测器); 超声波清洗器(EQ-500, 昆山市超声仪器有限公司); 电子分析天平(XP-205 型, 梅特勒); Unitary C_{18} 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm, ACCHROM)。

维生素 A 醋酸酯标准品(来源: DR; 批号: 31010; 纯度: 99.5%); 甲醇(色谱纯, 上海安谱; 多种维生素矿物质片(老年人型)(汤臣倍健股份有限公司)。

2.2　仪器条件

色谱柱: Unitary C_{18} 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm, ACCHROM); 流动相: 甲醇, 等度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 30 μL; 检测器: 紫外检测器 325 nm; 色谱柱温度: 40 ℃; 运行时间: 10 min。

2.3　测定方法

2.3.1　标准品溶液的配制

精密称取维生素 A 醋酸酯标准品 10.51 mg, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 加入 30 mL 甲醇, 超声使其溶解, 加甲醇定容, 摇匀, 作为维生素 A 醋酸酯标准储备溶液。精密吸取维生素 A 醋酸酯标准贮备液 5 mL, 置于 50 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 作为维生素 A 醋酸酯标准溶液。

2.3.2　供试品溶液的配制

取本品 20 片, 研细, 精密称取 0.46 g 研磨均匀的样品, 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 加入 20 mL 甲醇, 于 40 ℃超声, 并不时振摇样品, 20 分钟后取出, 放冷至室温, 加甲醇定容, 摇匀。经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液。

2.3.3　数学模型

结果计算公式为: $X=\dfrac{c\times V}{m\times 10}$

式中:

X—样品中维生素 A 醋酸酯的含量, mg/100 g;

m—样品的质量, g;

V—样品的定容体积, mL;

c—样品溶液中维生素 A 醋酸酯的浓度, μg/mL。

由实验步骤和数学模型可以看出, 影响维生素 A 醋酸酯测定结果的不确定度因素中, 除了样品的质量, 样品的定容体积, 样品溶液中维生素 A 醋酸酯的浓度之外, 还有样品处理过程的一致性。故不确定度的来源可以归纳为以下几个方面:

重复测定引入的不确定度 $u_{rel}(1)$:主要为样品处理过程的一致性;

样品称量所引入的不确定度 $u_{rel}(2)$: 主要为天平准确性和称量过程变动性;

样品定容体积所引入的不确定度 $u_{rel}(3)$: 包括样品定容所用容量瓶体积; 环境温度变化;

标准溶液配制所引入的不确定度 $u_{rel}(4)$: 包括标准溶液配制过程中对照品的称量; 标准溶液定容所用容量瓶体积; 环境温度变化; 对照品纯度;

标准溶液稀释所引入的不确定度 $u_{rel}(5)$: 主要为稀释标准溶液过程中所用移液管、容量瓶; 环境温度变化。

3　结果与讨论

3.1　不确定度各分量计算

3.1.1　重复测定引入的相对不确定度 $u_{rel}(1)$

样品处理过程的一致性, 采用平行测定 8 次的结果进行评定, 属于 A 类评定, 按照实验方法对样品平行操作。测试结果分别为 35.779、35.343、35.739、35.464、35.756、36.234、35.860、35.605 mg/100 g, 其平均值 $\bar{X}$ =35.72 mg/100 g, 维生素 A 醋酸酯含量

测定的标准偏差 $S(\bar{X})$为: 0.2699 mg/100 g,

RSD=$\frac{S(\bar{X})}{\bar{X}}\times100$=0.7556%，则:

$$u_{rel}(1)=\frac{RSD}{\sqrt{n}}=\frac{0.7556\%}{\sqrt{8}}=0.2671\%$$

3.1.2 样品称量所引入的相对不确定度 $u_{rel}(2)$

本次实验样品使用梅特勒 XP205 分析天平进行称量，天平的校准证书给出的测量结果示值误差的扩展不确定度 U=0.06 mg(k=2),样品的称样量 m=460.00 mg，则样品称量所引入的相对不确定度为:

$$u_{erl}(2)=\frac{0.06}{2\times460.00}\times100\%=0.006522\%$$

3.1.3 样品定容体积引入的相对不确定度 $u_{rel}(3)$

样品定容过程使用 25 mL 的容量瓶，由 25 mL 单标线容量瓶的校准证书可知，实验中使用的 25 mL 单标线容量瓶，属于 A 级，测量结果的扩展不确定度 U=0.01 mL(k=2)。则:

$$u_{erl}(3.1)=\frac{0.01}{2\times25}\times100\%=0.02000\%$$

由于本实验室温度在 20±5 ℃的范围内波动，假设温度变化为 5 ℃，该温度引起的不确定度可通过估算温度范围和体积膨胀系数计算，液体的体积膨胀明显大于容量瓶的体积膨胀，故只考虑前者即可。设温度为矩形分布，换算系数为 $\sqrt{3}$，水的膨胀系数为 2.1×10^{-4} /℃。则:

$$u_{rel}(3.2)=5\times\frac{2.1\times10^{-4}}{\sqrt{3}}\times100\%=0.06063\%$$

综合以上，样品定容体积引入的相对不确定度 $u_{rel}(3)$为:

$$u_{rel}(3)=\sqrt{u^2_{rel}(3.1)+u^2_{rel}(3.2)}=0.06384\%$$

3.1.4 标准溶液配制所引入的相对不确定度 $u_{rel}(4)$

标准品使用梅特勒 XP205 分析天平进行称量，天平的校准证书给出的测量结果示值误差的扩展不确定度 U=0.06 mg(k=2)；标准品的质量 m=10.51 mg，则:

$$u_{rel}(4.1)=\frac{0.06}{2\times10.51}\times100\%=0.2854\%$$

标准品溶液定容过程使用 50 mL 的容量瓶，由 50 mL 单标线容量瓶的校准证书可知，实验中所用的 50 mL 单标线容量瓶，属于 A 级，测量结果的扩展不确定度 U=0.02 mL(k=2)则:

$$u_{rel}(4.2)=\frac{0.02}{2\times50}\times100\%=0.02000\%$$

温度变化带来的体积相对不确定度，同 $u_{rel}(3.2)$，则:

$$u_{rel}(4.3)=0.06063\%$$

标准品纯度所引入的相对不确定度:在维生素 A 醋酸酯标准品证书上查得其纯度为(99.5±1.0)%。则:

$$u_{rel}(4.4)=\frac{1.0\%}{2\times99.5\%}\times100\%=0.5025\%$$

综合以上，标准溶液配制所引入的相对不确定度 $u_{rel}(4)$为:

$$u_{rel}(4)=\sqrt{u^2_{rel}(4.1)+u^2_{rel}(4.2)+u^2_{rel}(4.3)+u^2_{rel}(4.4)}=0.5814\%$$

3.1.5 标准品溶液稀释所引入的相对不确定度 $u_{rel}(5)$

标准品溶液稀释过程中使用的 5 mL 移液管，由校准证书可知，该 5 mL 单标移液管，属于 A 级，测量结果的扩展不确定度 U=0.005 mL(k=2),则:

$$u_{rel}(5.1)=\frac{0.005}{2\times5}\times100\%=0.05000\%$$

50 mL 容量瓶所引入的相对不确定度，同 $u_{rel}(4.2)$，则:

$$u_{rel}(5.2)=\frac{0.02}{2\times50}\times100\%=0.02000\%$$

温度变化带来的体积相对不确定度，同 $u_{rel}(3.2)$，则:

$$u_{rel}(5.3)=0.06063\%$$

综合以上，标准品溶液稀释所引入的相对不确定度 $u_{rel}(5)$为:

$$u_{rel}(5)=\sqrt{u^2_{rel}(5.1)+u^2_{rel}(5.2)+u^2_{rel}(5.3)}=0.08109\%$$

3.2 合成不确定度和扩展不确定度

3.2.1 合成不确定度

通过对不确定度各分量的分析和计算，维生素 A 醋酸酯检测结果的合成相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(x)=\sqrt{u^2_{rel}(1)+u^2_{rel}(2)+u^2_{rel}(3)+u^2_{rel}(4)+u^2_{rel}(5)}=0.6481\%$$

合成不确定度为: $u(x)=u_{rel}(x)\times\bar{X}=0.2315$

3.2.2 扩展不确定度

取包含因子 k=2，其扩展不确定度为:

U=2×0.2315=0.46 mg/100 g

4 结 论

本文结合检验方法和实际操作过程，采用高效液相色谱法测定维生素片中维生素 A 醋酸酯的含量，根据测量不确定度的评定方法[4-11]，并参考其他有关

不确定度的评定和分析[12-14], 通过建立数学模型, 分析整个测定过程的不确定度来源及其对分析结果的影响, 为高效液相色谱法测量不确定度评定方法提供参考。

从不确定度评定过程可以看出, 影响样品中维生素 A 醋酸酯含量测定不确定度的主要来源为:标准溶液配制、重复测定和稀释标准溶液。这一结果符合本实验操作过程, 因此在今后的含量检测过程中, 要准确配制标准溶液, 选用高校准级别的容量瓶、移液管和高纯度的对照品, 还要对分析天平进行定期的检定与维护保养, 以保持仪器的最佳工作状态。而且要求分析人员熟练掌握样品的各项处理步骤, 注意样品的平行性问题, 以提高检测准确性。

参考文献

[1] 黄敏, 黄增琼. 高效液相色谱法测定复合鱼肝油制剂中维生素 A 的含量[J].广西医科大学学报, 2007, 24(3): 600–601.
Huang M, Huang ZQ. Determination of vitamin a in compound cod-liver oil preparation by HPLC [J]. J Guangxi Med Univ, 2007, 24(3): 600–601.

[2] 钱玲慧, 廖佳宇, 李亚妮, 等. 测定维生素 A 的三种方法比较[J]. 实验技术与管理, 2012, 29(5): 43–48.
Qian LH, Liao JY, Li YN, *et al*. Comparison of three methods on assay for vitamin A [J]. Exp Technol Manage, 2012, 29(5): 43–48.

[3] 李东文. HPLC 检测复合鱼肝油制剂中维生素 A 含量的可行性[J]. 河北医药, 2013, 35(12): 1986–1987.
Li DW. Feasibility of testing vitamin a in compound cod–liver oil preparation by HPLC [J]. Hebei Med J, 2013, 35(12): 1986–1987.

[4] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].

[5] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 commonly used measuring glass verification regulations [S].

[6] ISO/IEC 17025-2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S].

[7] 中国实验室国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2002.
China National Approval Committee Lab. Evaluation of uncertainty in chemical analysis guide [M]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2002.

[8] 倪育才. 实用测量不确定度评定[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004.
Ni YC. Practical measurement uncertainty evaluation [M]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2004.

[9] 曹宏燕. 分析测试中测量不确定度及评定 第一部分 测量不确定度概述[J]. 冶金分析, 2005, 24(1): 77–81.
Cao HY. The analysis of uncertainty of measurement in testing and evaluation the first part of measurement uncertainty overview[J]. J Metall Anal, 2005, 24(1): 77–81.

[10] 曹宏燕. 分析测试中测量不确定度及评定 第二部分 测量不确定度评定的基本方法[J]. 冶金分析, 2005, 25(2): 84–87.
Cao HY. The analysis of uncertainty of measurement in testing and evaluation the second part of the basic method of measurement uncertainty evaluation [J]. J Metall Anal, 2005, 25(2): 84–87.

[11] 李娜, 马修水, 李桂华. 测量不确定度及测量不确定度评定综述[J]. 安徽电子信息职业技术学院学报, 2008(3): 52–53.
Li N, Ma XS, Li GH. Measurement uncertainty and measurement uncertainty evaluation [J]. J Anhui Tech Coll Electron Inform, 2008, (3): 52–53.

[12] 郑素荣. HPLC 测定饮料中山梨酸不确定度评定[J]. 计测技术, 2008, 28(6): 46–48.
Zheng SR. Evaluation of uncertainity of results in measurement of sorbic acid in beverage by HPLC [J]. Metrol Meas Technol, 2008, 28(6): 46–48.

[13] 余修中, 熊大迁, 张灵玲. 不确定度评价指数及质量目标指数在评价常规化学检验结果质量中的价值[J]. 现代预防医学, 2014, 41(13): 2428–2430.
Yu XZ, Xiong DQ, Zhang LL. Value of uncertainty evaluation index and quality goal index in evaluating the quality of conventional chemical test results [J]. Mod Prevent Med, 2014, 41(13): 2428–2430.

[14] 荆淑芹, 孙媛媛, 李景辉. 高效液相色谱法测定尪痹胶囊中芍药苷含量的不确定度评定[J]. 中国当代医药, 2014, 21(22): 10–12.
Jing SQ, Sun YY, Li JH. Determination of content uncertainty of paeoniflorin in Wangbi capsule by HPLC [J]. China Mod Med, 2014, 21(22): 10–12.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介

黄成安, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 46456523@qq.com