

气相色谱法测定大蒜精油软胶囊中大蒜素含量的 不确定度评定

潘拾朝, 黎小兰*

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 评定气相色谱法测定大蒜精油软胶囊中大蒜素含量的不确定度。**方法** 采用气相色谱法测定大蒜精油软胶囊中大蒜素的含量。根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度的评定与表示》的有关规定, 建立数学模型, 分析影响大蒜素含量的不确定度因素, 量化各个不确定度分量, 合成不确定度。**结果** 气相色谱法测定大蒜精油软胶囊中大蒜素含量的不确定度主要来源于标准溶液配制、样品重复测定和溶液的稀释; 测定结果合成不确定度为 0.009%, 扩展不确定度为 0.018%, 大蒜素含量测定结果为 $(1.356 \pm 0.018)\%$, $k=2$ 。**结论** 建立的不确定度评定方法适合气相色谱方法测定大蒜精油软胶囊中大蒜素含量不确定度分析, 为评价测定方法以及检测结果的准确性提供可靠性依据。

关键词: 气相色谱法; 大蒜素; 数学模型; 不确定度

Uncertainty evaluation for the determination of allicin in garlic essential oil soft capsules by gas chromatography

PAN Shi-Chao, LI Xiao-Lan*

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of determination of allicin in garlic essential oil soft capsules by gas chromatography. **Methods** The content of allicin in garlic essential oil soft capsules was determined by gas chromatography. According to JJF1059.1-2012 *Measurement uncertainty evaluation and expression*, a mathematical model was established, the uncertainty factors affecting allicin content were analyzed, the uncertainty components were quantified and the uncertainty was synthesized. **Results** The uncertainty of the determination of allicin in garlic essential oil soft capsules by gas chromatography mainly came from the preparation of standard solutions, repeated determination of samples and dilution of solutions. The synthetic uncertainty of the measurement results was 0.009%, the expanded uncertainty was 0.018%, and the determination result of the allicin content was $(1.356 \pm 0.018)\%$, $k=2$. **Conclusion** The established uncertainty evaluation method is suitable for the uncertainty analysis of the determination of allicin in garlic essential oil soft capsules by gas chromatography, so as to provide reliable basis for evaluating the accuracy of determination methods and test results.

KEY WORDS: gas chromatography; allicin; mathematical model; uncertainty

*通讯作者: 黎小兰, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 475079345@qq.com

*Corresponding author: LI Xiao-Lan, Engineer, By-Health Co., Ltd., No.19, Xinghan Road, ZhuHai, Guangdong 519040, China. E-mail: 475079345@qq.com

1 引言

大蒜为百合科植物大蒜的鳞茎,其中含有大蒜素。大蒜素被誉为天然广谱抗生素,其化学名为二烯丙基三硫化物,具有较强的抗菌消炎作用^[1,2],容易透过磷脂膜进入细胞内,与一些截留化合物相互作用,具有抗肿瘤、降低胆固醇、抗血小板聚集、护肝、预防心血管疾病、降血压、抗氧化等药理学作用。大蒜素有特殊的臭味,对黏膜有刺激性,室温下易挥发,空气中易变质^[3]。目前在保健食品的功效成分分析中主要采用气相色谱氢火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)对大蒜素含量进行测定^[4,5],该方法能快速准确测定大蒜素的含量。然而检测过程会受到环境变化、人员操作、仪器设备等因素影响,引起一定的不确定度;不确定度评估是表示检验结果准确性的重要方式^[6],且能够表明结果的可靠程度,是衡量测量结果的重要指标^[7]。所以,测量不确定度的分析评定作为日常检测工作中的重要技术组成部分,对测定大蒜精油软胶囊中大蒜素含量的准确性具有重要意义,同时也是一个实验室体现其检验技术能力的手段。目前关于测定大蒜精油软胶囊中大蒜素含量的不确定度评定研究相对较少。

本研究根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[8]、JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[9]等测量不确定度的评定方法^[10-15],并参考其他相关不确定度的评定和分析^[16-21],结合检测方法,通过建立数学模型,分析整个检测过程的不确定度来源及其对分析结果的影响,对气相色谱法测定大蒜精油软胶囊中大蒜素的含量进行不确定度评估,为气相色谱法测量不确定度评定方法提供参考。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

2.1.1 仪 器

EQ-500 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 7890A 气相色谱仪(美国安捷伦公司); XP-205 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

2.1.2 试剂与材料

大蒜素标准品(纯度: 88.4%, 中国药品生物制品检定所); 正己烷(色谱纯, 美国 CNW 公司)。

大蒜精油软胶囊(汤臣倍健股份有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

精密称取样品(大蒜精油软胶囊内容物)适量于 10 mL 容量瓶,用正己烷超声溶解,稀释至刻度,配制成大蒜素含量约为 2 mg/mL 的样品溶液,待测。

2.2.2 色谱条件

载气: 氮气; 进样口: 温度 160 °C, 分流比 10:1, 进样

量 1 μL; 色谱柱: Perkin Elmer, Elite-WAX(30 m×0.32 mm, 0.25 μm), 流速 2.7 mL/min; 柱箱: 柱温 150 °C, 保持 20 min; 检测器: 氢焰离子化检测器(FID), 温度 260 °C, 氢气 40 mL/min, 空气 400 mL/min, 尾吹 27 mL/min。

2.2.3 标准品溶液的制备

精密称取 20.0 mg 大蒜素标准品,用正己烷溶解并稀释至 10 mL 容量瓶,配制成大蒜素含量约为 2 mg/mL 的标准品溶液,待测。

2.3 数学模型:

大蒜精油软胶囊中大蒜素的含量为:

$$X = \frac{F \times A_2 \times V_2}{M_2} \times 100$$

$$F = \frac{M_1 \times R}{A_1 \times V_1}$$

式中: X —样品中大蒜素的含量, %; 100—单位转换系数; R —大蒜素标准品纯度; V_2 —样品稀释体积, mL; F —校正因子; V_1 —标准品稀释体积, mL; M_1 —标准品的质量, mg; M_2 —样品的质量, mg; A_2 —样品溶液中大蒜素峰面积; A_1 —标准品溶液中大蒜素峰面积。

3 结果与分析

3.1 不确定度的来源

根据样品前处理、检测过程以及数学模型可以看出,影响大蒜素测定结果的不确定度因素主要有样品的制备过程,标准品、定容、样品的重复性测定以及检测仪器自身稳定状态等。故大蒜精油软胶囊中大蒜素含量的测量不确定度的来源主要有: 样品重复测定引入的不确定度 $u_{rel}(1)$, 主要为样品前处理一致性引入的不确定度; 仪器(气相色谱仪)引入的标准不确定度 $u_{rel}(2)$; 标准物质引入的不确定度 $u_{rel}(3)$, 包括: 标准品的称量、纯度、定容体积、环境温度变化; 样品引入的标准不确定度 $u_{rel}(4)$, 包括: 样品的称量、定容体积、环境温度变化。根据以上分析,不确定度来源如表 1 的所示。

根据相对标准测量不确定度传播公式,其合成不确定度公式为:

$$U_{rel}(x) = \sqrt{u_{rel}^2(1) + u_{rel}^2(2) + u_{rel}^2(3) + u_{rel}^2(4)}$$

3.2 不确定度各分量的评定

3.2.1 样品重复测定引入的不确定度 $u_{rel}(1)$

样品重复测定引入的不确定度 $u_{rel}(1)$, 主要为样品前处理一致性引入的不确定度, 包括: 电子天平重复性、定容体积重复性、样品前处理重复性等。本次实验按 NY/T 1800-2009《大蒜及制品中大蒜素的测定 气相色谱法》^[22]的要求,通过对同一大蒜精油软胶囊中大蒜素含量重复测定,得出以下数据(见表 2)。

表 1 大蒜素含量测定的不确定度来源
Table 1 Sources of uncertainty in determination of allicin content

不确定度来源	各影响因素分量
测定重复性	仪器
	称量
	人员操作
样品	样品称量
	样品定容
	样品处理过程环境温度变化
标准物质	标准物质称量
	标准物质定容
	标准物质纯度
仪器	标准物质处理过程环境温度变化
	液相色谱仪自身稳定性

大蒜素含量重复测定的标准偏差为:

$$S_1 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.00831,$$

相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)为:

$$RSD = \frac{S_1}{x} = 0.613\%,$$

则测定重复性引起的标准不确定度分量为:

$$u_{rel}(1) = \frac{RSD}{\sqrt{n}} = \frac{0.613\%}{\sqrt{10}} = 0.194\%。$$

3.2.2 气相色谱仪引入的不确定度 $u_{rel}(2)$

气相色谱仪引入的不确定度主要为仪器自身的性能的稳定性的, 该不确定度属 A 类评定; 实验条件下, 通过气相色谱仪对同一标准溶液进行重复进样测定, 其测量结果如表 3。

$$\text{测量结果的标准偏差: } S_2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 1.447,$$

$$RSD = \frac{S_2}{x} = 0.315\%,$$

则仪器引起的不确定度为:

$$u_{rel}(2) = \frac{RSD}{\sqrt{n}} = \frac{0.315\%}{\sqrt{6}} = 0.129\%。$$

表 2 样品重复测定结果

Table 2 The repetitive determination results of sample

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
含量/%	1.351	1.348	1.353	1.359	1.355	1.371	1.353	1.366	1.362	1.344	1.356

表 3 重复进样峰面积的测量值

Table 3 The repetitive determination peak area of sample

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
峰面积	460.3	457.5	461.2	460.6	459.8	458.7	460.5	458.1	457.8	461.4	459.6

3.2.3 标准物质引入的标准不确定度分量 $u_{rel}(3)$

标准物质称量引入的不确定度 $u_{rel}(3.1)$: 标准物质使用梅特勒 XP-205 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 $U=0.02 \text{ mg}$ ($k=2$), 属正态分布, 大蒜素标准物质质量 $m=20.69 \text{ mg}$; 则:

$$u_{rel}(3.1) = \frac{U}{k} \times \frac{1}{m} = 0.0483\%。$$

标准物质纯度引入的不确定度 $u_{rel}(3.2)$: 查大蒜素标准物质证书中提供的信息, 大蒜素标准物质的纯度 $R=88.4\%$, 扩展不确定度 $U=0.5\%$ ($k=2$), 按正态分布, 则:

$$u_{rel}(3.2) = \frac{U}{k} \times \frac{1}{R} = 0.283\%。$$

标准物质溶液定容过程引起的不确定度 $u_{rel}(3.3)$: 溶液定容过程引起的不确定度主要由 10 mL 容量瓶引入的不确定度。由 10 mL 单标线容量瓶的校准证书可知, 实验中所用的 10 mL 单标线容量瓶, 属于 A 级, 测量结果的扩展

不确定度 $U=0.007 \text{ mL}$ ($k=2$), 则有:

$$u_{rel}(3.3.1) = \frac{U}{k} \times \frac{1}{10} = 0.035\%。$$

环境温度变化引入的标准不确定度 $u_{rel}(3.3.2)$: 实验室环境温度控制在 $(20 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$, 假设温度变化为 $5 \text{ }^\circ\text{C}$, 该温度变化引起的不确定度可通过体积膨胀系数和温度范围计算, 正己烷的体积膨胀明显大于玻璃的体积膨胀, 所以只考虑正己烷的体积膨胀即可, 按矩形分布, 取 $k = \sqrt{3}$, 正己烷体积膨胀系数为 $1.36 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$, 则有:

$$u_{rel}(3.3.2) = 5 \times \frac{1.36 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.393\%。$$

标准物质溶液定容过程引起的不确定度 $u_{rel}(3.3)$:

$$u_{rel}(3.3) =$$

$$\sqrt{u_{rel}^2(3.3.1) + u_{rel}^2(3.3.2)} = \sqrt{(0.035\%)^2 + (0.393\%)^2} = 0.395\%。$$

综上, 大蒜素标准物质引起的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(3) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(3.1) + u_{\text{rel}}^2(3.2) + u_{\text{rel}}^2(3.3)}$$

$$= \sqrt{(0.0483\%)^2 + (0.283\%)^2 + (0.395\%)^2} = 0.486\%$$

3.2.4 样品引入的标准不确定度 $u_{\text{rel}}(4)$

样品称量引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(4.1)$: 样品使用梅特勒 XP-205 分析天平进行称量, 大蒜精油软胶囊试样重量 $m=0.5077$ g, 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($k=2$), 则:

$$u_{\text{rel}}(4.1) = \frac{U}{k} \times \frac{1}{m} = 0.0059\%$$

样品定容引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(4.2)$: 样品定容引与标准物质定容都是使用 10 mL 单标线容量瓶, 环境温度变化一致, 则有:

$$u_{\text{rel}}(4.2) = u_{\text{rel}}(3.3) = 0.395\%$$

综上, 大蒜精油软胶囊样品引起的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(4) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(4.1) + u_{\text{rel}}^2(4.2)}$$

$$= \sqrt{(0.0059\%)^2 + (0.395\%)^2} = 0.395\%$$

3.3 合成不确定度和扩展不确定度

3.3.1 合成相对标准不确定度

通过对各分量不确定度的分析计算, 如表 4, 合成相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(x) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(1) + u_{\text{rel}}^2(2) + u_{\text{rel}}^2(3) + u_{\text{rel}}^2(4)}$$

$$= \sqrt{(0.194\%)^2 + (0.129\%)^2 + (0.490\%)^2 + (0.395\%)^2} = 0.668\%$$

$$\text{合成不确定度为: } u(x) = u_{\text{rel}}(x) \times \bar{x} = 0.009\%$$

3.3.2 扩展不确定度评定

按国际不确定度计算惯例, 取置信概率 $P=95\%$, 包含因子 $k=2$, 此时大蒜精油软胶囊中的大蒜素含量测定的扩展不确定度为:

$$U_{95} = k \times u(x) = 2 \times 0.009\% = 0.018\%$$

因此, 气相色谱法测定大蒜精油软胶囊中的大蒜素含量的测量结果为: $(1.356 \pm 0.018)\%$, $k=2$ 。

表 4 各分量不确定度
Table 4 Uncertainty of each component

不确定度来源	不确定度分量	相对标准不确定度/%	合成标准不确定度/%
测定重复性 $u_{\text{rel}}(1)$	/	/	0.194
气相色谱仪 $u_{\text{rel}}(2)$	/	/	0.129
标准物质 $u_{\text{rel}}(3)$	标准物质称量	0.0637	0.486
	标准物质纯度	0.283	
	定容	0.035	
	温度	0.393	
样品 $u_{\text{rel}}(4)$	样品称量	0.0059	0.395
	定容	0.035	
	温度	0.393	

4 结论

本文建立了气相色谱法测定大蒜精油软胶囊中大蒜素含量的不确定度评定方法, 以查找检测过程中对结果产生影响的因素, 进行质量控制。

本次不确定度评定试验主要分析了称量、体积、溶液稀释、重复测定以及仪器自身稳定性等因数的不确定度; 从评定过程可以看出, 样品处理及标准溶液配制过程中环境温度变化对不确定度的贡献最大, 其次是标准品纯度、样品测量重复性、仪器设备引起的不确定度。因此, 在实际检测过程中, 可通过对环境温度的严格控制, 选用高纯度的标准品、高校准级别的容量瓶, 对仪器设备进行定期的检定与维护保养, 增加平行样品的测定, 提高分析人员

的操作技能, 来减小测量不确定度, 以提高检测结果的准确性。

参考文献

- [1] Liao H, Du LF, Zhang NH. A method for fast activestaining gelatin-PAGE which detects the protease inhibitors [J]. Plant Physiol Commun, 2003, 38(3): 257-259.
- [2] 姚军, 张明月, 张培. 保健食品中大蒜素含量的测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(5): 924-925.
Yao J, Zhang MY, Zhang P. Determination of health food allicin content [J]. Chin J Health Lab, 2008, 18(5): 924-925.
- [3] 马凤英, 王文英. 大蒜的药理研究进展[J]. 中草药, 1997, 28(11): 697-698.
Ma FY, Wang WY. Pharmacological research progress of garlic [J]. Chin Herbal Med, 1997, 28(11): 697-698.

- [4] 王颖, 吴文利, 王兵, 等. 不同产地大蒜挥发油成分分析及大蒜素含量测定[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9): 5321-5323.
Wang Y, Wu WL, Wang B, *et al.* Different regions of garlic essential oil composition analysis and determination of allicin content [J]. Anhui Agric Sci, 2012, 40(9): 5321-5323.
- [5] 徐丽红, 王建清, 张巧艳, 等. 保健食品中大蒜素色谱检测方法的研究[J]. 分析测试学报, 2010, 29(8): 802-806.
Xu LH, Wang JQ, Zhang QY, *et al.* Study on the determination of allicin in health food [J]. J Instrum Anal, 2010, 29(8): 802-806.
- [6] 余修中, 熊大千, 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]. 现代预防预防医学, 2014, 41(13): 2428-2430, 2434.
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 Prev Med, 2014, 41(13): 2428-2430, 2434.
- [7] 杨娟, 杨晓云, 钟昕, 等. 测量不确定度在食品检验检测中的应用及研究进展[J]. 食品安全导刊, 2019, 6: 93-95.
Yang J, Yang XY, Zhong X, *et al.* Application and research progress of measurement uncertainty in food inspection and testing [J]. Chin Food Saf Magaz, 2019, 6: 93-95.
- [8] 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].
- [9] JJG196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [10] ISO/IEC 17025-2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S].
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 曹宏燕. 分析测试中测量不确定度及评定 第三部分 分析测试中主要不确定度分量的评定[J]. 冶金分析, 2005, 25(3): 82-87.
Cao HY. The analysis of uncertainty of measurement in testing and evaluation the third part analysis the main evaluation of uncertainty components [J]. J Metall Anal, 2005, 25(3): 82-87.
- [14] 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 Laboratory Accreditation Committee. Evaluation of uncertainty in chemical analysis guide [M]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2002.
- [15] 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.
- [16] 荆淑芹, 孙媛媛, 李景辉. 高效液相色谱法测定冠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]. Chin Contempor Med, 2014, 21(22): 10-12.
- [17] 徐可, 朱娜, 郝伟, 等. HPLC 法测定盐酸二甲双胍片的含量及测量不确定度评定[J]. 分析仪器, 2019, 5: 75-81.
xu K, Zhu N, Hao W, *et al.* Content determination of metformin hydrochloride tablets by HPLC and its evaluation of measurement [J]. Anal Instrum, 2019, 5: 75-81.
- [18] 田甜, 文金华, 曾祥林. 气相色谱-质谱法测定芹菜中甲拌磷残留量的测量不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(17): 5653-5660.
Tian T, Wen JH, Zeng XL. Evaluation of measurement uncertainty for residues determination of phorate in celery by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(17): 5653-5660.
- [19] 余修中, 熊大千, 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 Prev Med, 2014, 41(13): 2428-2430.
- [20] 高家敏, 李红霞, 曹进, 等. 气相色谱法测定糕点中1,2-丙二醇含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7): 2407-2413.
Gao JM, Li HX, Cao J, *et al.* Uncertainty evaluation for the determination of 1, 2-propanediol by gas chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(7): 2407-2413.
- [21] 王宁. 测量不确定度评定中的常见错误解析[J]. 计量与测试技术, 2019, 46(6): 84-86.
Wang N. Analysis of common errors in evaluation of measurement uncertainty [J]. Metrol Measure Tech, 2019, 46(6): 84-86.
- [22] NY/T 1800-2009 大蒜及制品中大蒜素的测定 气相色谱法[S].
NY/T 1800-2009 Determination of allicin in garlic and its products-Gas chromatography [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



潘拾朝, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 313025326@qq.com



黎小兰, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 475079345@qq.com