

高效液相色谱法测定保健食品中 西地那非的不确定度评定

曹玲, 吴嫣艳, 张妤琳, 鲁寅生

(江苏省食品药品检验所, 江苏南京 210008)

摘要: 评价了高效液相色谱法测定壮阳类保健食品中掺入的枸橼酸西地那非含量的测量不确定度。通过不确定度来源分析, 建立不确定度评定的数学模型, 并考察影响不确定度的因素, 计算出测定的不确定度结果。

关键词: 枸橼酸西地那非; 不确定度; 高效液相色谱; 保健品

文章编号: 1673-9078(2012)7-890-893

Evaluation of Uncertainty for Determination of Sildenafil

Citrate Added in Health Products by HPLC

CAO Lin, WU Yan-yan, ZHANG Yu-lin, LU Yin-sheng

(Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China)

Abstract: The uncertainty of HPLC method for determination of sildenafil citrate illegally added in aphrodisiac products was evaluated. A mathematical model was established by analysis of the uncertainty sources and the combined uncertainty was finally obtained by investigating the uncertainties of various component variables

Key words: sildenafil citrate; uncertainty; HPLC; health products

不确定度是表征被测量物质真值所处的量值范围的评定结果, 可为药品检验合格评定准确性、可靠性提供真实、有效的依据^[1]。随着检测和校准实验室认可准则(ISO/IEC17025:2005)要求检测和校准实验室必须建立并实施测量不确定度评估程序规定的出台^[2], 不确定度的重要性越来越得到广泛关注。目前, 国内外有关分析方法测量不确定度的报道多见于食品检验、环境分析等领域^[3], 中药及保健品分析方面应用较少, 尤其是保健品中非法掺入化学药品的分析更是鲜见。

枸橼酸西地那非(sildenafil citrate)俗称“伟哥”, 可用于治疗阴茎勃起功能障碍(ED), 长期服用可能导致性功能减退或器官萎缩。目前, 某些中药保健品厂为了增强壮阳效果, 在其生产的补肾保健食品中非法添加化学药品枸橼酸西地那非, 严重危害老百姓的生命健康。为了有效打击这种制假掺伪的不法行为, 通常采用 HPLC-DAD-MS 等一系列的方法对非法掺入的西药成分进行定性分析, 然后采用 HPLC 法对检出成分进行定量。本文以补肾壮阳类保健品蚁粒神为

例, 对其中非法掺入的枸橼酸西地那非含量不确定度进行分析, 找出影响不确定度的因素并对各个不确定度分量进行评估, 最终给出测量结果的置信区间和置信水平, 以期对 HPLC 法测定保健品中掺入的西药含量的不确定度评定提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司, 含二元梯度泵、自动进样器、柱温箱以及二极管阵列检测器); Mettler Toledo MX5 型电子天平($d=1 \mu\text{g}$); Sartorius BP210S 型电子天平($d=0.1 \text{mg}$)。

枸橼酸西地那非对照品(中国药品生物制品检定所提供); 蚁粒神样品(江苏省食品药品检验所提供); 甲醇、乙腈、乙酸铵均为色谱纯; 水为纯净水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件与系统适用性试验

Phenomenex Gemmi C₁₈ (250 mm×4.6 mm×5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.01 mol/L 乙酸铵溶液-乙腈-甲醇(35:10:55), 检测波长为 254 nm, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL 。理论板数按枸橼酸西地那非

收稿日期: 2012-02-07

作者简介: 曹玲(1971-), 女, 博士, 主任药师, 主要研究方向: 食品药品质量控制

峰计算不低于 2000。

2.2 标准曲线对照品溶液的制备

取枸橼酸西地那非对照品 5.236 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液。分别精密量取贮备液适量，用流动相稀释制成浓度分别为 52.36、26.18、10.472、5.236、2.094、1.047 μg/mL 的系列溶液，即得标准曲线对照品系列溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取样品 10 粒内容物，研细，精密称取约 300 mg，置 50 mL 量瓶中，加流动相适量，超声提取 10 min，放冷至室温，加流动相稀释至刻度，摇匀。高速离心（12000 r/min）10 min，取上清液 1 mL，置 50 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4 测定

分别精密量取标准曲线对照品系列溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，以枸橼酸西地那非浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，进行线性回归，计算相关系数。精密量取供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪，将峰面积代入上述拟合方程，计算供试品中枸橼酸西地那非的含量。

3 不确定度分量的分析与计算

3.1 数学模型

实际操作中，采用标准曲线法，将 6 份标准曲线对照品系列溶液分别进样 2 次，将 12 份数据拟合成一个直线回归方程

$$A=aC+b$$

注：其中 A 为枸橼酸西地那非的峰面积，C 为对照品系列溶液中枸橼酸西地那非的浓度(μg·mL⁻¹)，a 为回归方程的斜率，b 为回归方程的截距。

供试品溶液配制 2 份，每份进样 2 次，通过直线回归方程计算供试品溶液中枸橼酸西地那非的浓度，进而计算供试品中枸橼酸西地那非的含量。

含量计算公式：

$$C_x = \frac{A_x - b}{a}$$

$$X(\text{mg/g}) = \frac{C_x \times V_x \times D_x}{W_x \times 1000}$$

注：其中 C_x 为供试品溶液中枸橼酸西地那非的浓度(μg·mL⁻¹)，A_x 为供试品溶液中枸橼酸西地那非的峰面积，X 为供试品溶液中枸橼酸西地那非的含量(mg/g)，V_x 为供试品溶液定容体积(mL)，D_x 为供试品溶液的稀释倍数，W_x 为供试品的取样量(g)。

3.2 不确定度的量化分析

根据检测过程和数据模型分析，枸橼酸西地那非含量测定测量不确定度 $u_{rel}(x)$ 的来源主要包括：供试品溶液浓度引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(c)$ 、供试品称量引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(w)$ 、供试品稀释、定容等引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(v)$ ，其中 $u_{rel}(c)$ 来源于对照品纯度、对照品称量、配制标准溶液的玻璃量具校准、标准曲线非线性引入的输入量、测量重复性等，具体构成图如图 1 所示：

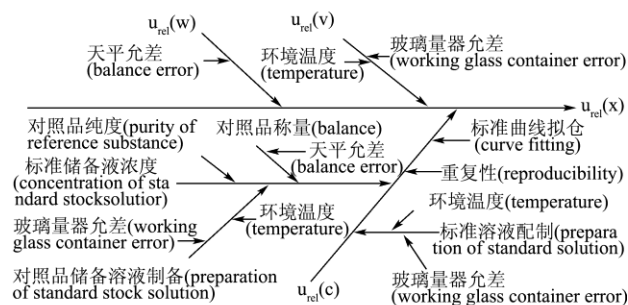


图 1 不确定度影响因素构成图

Fig.1 Constitution of uncertainty influential factor

3.2.1 供试品溶液浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C)$

3.2.1.1 标准储备液浓度的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_0)$

对照品含量的标准不确定度由称量和对照品纯度的不确定度等组成。枸橼酸西地那非对照品由中国药品生物制品检定所提供，说明书中未注明不确定度值，暂假定其纯度为 100%±0.05%，视为矩形分布 ($K=\sqrt{3}$)，则对照品纯度引起的不确定度： $u_{rel}(p) = 0.05\% / \sqrt{3} = 0.00029$ 。

对照品称量引入的不确定度由电子天平检定证书给出的最大允差计算。电子天平 ($d=1 \mu\text{g}$) 检定证书给出的最大允差为±15 μg，按矩形分布，同时采用减量法称重，每个结果均需称量两次，故天平称重的相对标准不确定度：

$$u_{rel}(w_0) = \sqrt{2} \times 0.015 / \sqrt{3} / 5.236 = 0.00234$$

对照品储备溶液制备过程中使用的 100 mL 量瓶为 A 级，由国家计量检定规程 JJG 196-2006^[4] 查得其容量允差为±0.1 mL，按矩形分布，取 $K=\sqrt{3}$ ，则玻璃量器引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(100) = 0.1 / \sqrt{3} / 100 = 0.00058$ ；该容量瓶在 20 °C 校准，而实验室的温度为 (20±5) °C，水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ，按照矩形分布，则环境温度引入的相对不确定度 $u_{rel}(t) = 5 \times 2.1 \times 10^{-4} / \sqrt{3} = 0.00061$ ，合成得对照品储备溶液制备过程的相对不确定度：

$$u_{rel}(u_0) = \sqrt{0.00058^2 + 0.00061^2} = 0.00084$$

将上述不确定度分量合成，得标准储备液浓度的相对标准不确定度：

$$u_{rel}(c_0) = \sqrt{0.00029^2 + 0.00234^2 + 0.00084^2} = 0.00250$$

3.2.1.2 标准溶液配制过程中引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(v_0)$

校准溶液配制过程中使用了一系列的玻璃量具，

均为 A 级，按照国家计量检定规程 JJG-196-1990 的要求，均有相应的允许偏差。按照矩形分布考虑， $k=\sqrt{3}$ ，由此估算本实验中涉及到的玻璃器皿的相对不确定度分量（表 1）。

表 1 移液管和容量瓶引入的不确定度

Table 1 Uncertainty introduced by pipet and flask

玻璃量具	最大允差 /mL	标准不确定度	量具校准引起的相对标准不确定度	温度变化引起的相对标准不确定度	合成相对标准不确定度
10mL 量瓶	±0.020	0.01155	0.001155	0.000606	0.00130
20mL 量瓶	±0.020	0.01155	0.000578	0.000606	0.00084
50mL 量瓶	±0.050	0.02887	0.000577	0.000606	0.00084
1mL 移液管	±0.007	0.00404	0.004041	0.000606	0.00409
2mL 移液管	±0.010	0.00577	0.002887	0.000606	0.00295
5mL 移液管	±0.015	0.00866	0.001732	0.000606	0.00183

计算得 26.18、10.472、5.236、2.094、1.047 $\mu\text{g/mL}$ 系列对照品溶液配置过程中引入的相对不确定度分别为 0.00224、0.00322、0.00307、0.00307、0.00418，取其中最大的不确定度值，则 $u_{rel}(v_0) = 0.00418$ 。

3.2.1.3 Agilent 1100 高效液相色谱仪检定证书给出的扩展不确定度 $u_{rel}(A)$

Agilent 1100 高效液相色谱仪检定证书给出的定量测量重复性 RSD 为 0.21% ($n=5$)，则 $u_{rel}(A) = 0.21\% / \sqrt{5} = 0.00094$ 。该标准偏差是随机测量，属 A 类不确定度。

3.2.1.4 标准曲线拟合过程中引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(C_1)$

本实验将浓度为 52.36、26.18、10.472、5.236、2.094、1.047 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液分别测定 2 次，结果见表 2。根据表 2 中的数据拟合的标准工作曲线方程为： $A=bC+b_0=12.5238C-0.4376$ ， $r=1.0000$ 。

表 2 对照品溶液测定结果

Table 2 Determination results of the reference solutions

浓度 $C_0/(\mu\text{g/mL})$	峰面积 A	
52.36	655.59375	655.41046
26.18	326.45798	326.70166
10.47	132.24631	132.07365
5.236	64.58327	64.75131
2.094	25.50208	25.47522
1.047	12.58006	12.68518

对供试品溶液重复测量了 8 次， $p=8$ ，求得的供试品溶液中枸橼酸西地那非的含量 $a=256.7\text{mg/g}$ （供试品溶液浓度 $C_1=31.767 \mu\text{g/mL}$ ）， $\bar{c}_0=16.231 \mu\text{g/mL}$ 。

$$s(A) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n [A_{ij} - (b_0 + bc_i)]^2}{mn - 2}} = 0.8115$$

$$u_{rel}(c_1) = \frac{s(A)}{b \cdot c_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{mn} + \frac{(c_1 - \bar{c}_0)^2}{\sum_{i=1}^m (c_i - \bar{c}_0)^2}} = 0.00106$$

$s(A)$: 对照品溶液峰面积的标准偏差， p : 供试品的测定次数 (8)， m : 对照品溶液的个数 (6)， n : 每个对照品溶液的测定次数 (2)， c_0 : 对照品溶液的浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)， c_1 : 供试品溶液的浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)， i : 指第几个对照品溶液； j : 指对照品溶液的第几次测量。

将以上各不确定度分量合成得：

$$u_{rel}(c) = \sqrt{u_{rel}^2(c_0) + u_{rel}^2(v_0) + u_{rel}^2(A) + u_{rel}^2(c_1)} = 0.00507$$

3.2.2 供试品称量引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(w)$

供试品称量引起的不确定度主要来源于分析天平校准不确定度，称量过程中使用的干燥器与天平称量仓内均放置同质硅胶，视为相同湿度，称量时无吸潮。Sartorius BP210S 型电子天平 ($d=0.1\text{mg}$) 检定证书给出的最大允差为 0.5mg，按矩形分布 ($K=\sqrt{3}$)，则称量结果的不确定度为： $u(w) = \frac{0.5}{\sqrt{3}} = 0.2887\text{mg}$

供试品称量 4 次，分别为 0.3058 g、0.3072 g、0.3167 g、0.3081 g，引起的相对不确定度分别为：

$$u_{rel}(w_1) = \frac{0.2887}{0.3058 \times 1000} = 0.000944$$

$$u_{rel}(w_2) = \frac{0.2887}{0.3072 \times 1000} = 0.000940$$

$$u_{rel}(w_3) = \frac{0.2887}{0.3167 \times 1000} = 0.000912$$

$$u_{rel}(w_4) = \frac{0.2887}{0.3081 \times 1000} = 0.000937$$

则供试品称量引入的相对标准不确定度

$$u_{rel}(w) = \sqrt{\frac{u_{rel}^2(w_1) + u_{rel}^2(w_2) + u_{rel}^2(w_3) + u_{rel}^2(w_4)}{4}} = 0.00093$$

3.2.3 供试品稀释、定容等引入的不确定度 $u_{rel}(v)$

供试品溶液制备过程中使用了 50 mL 量瓶和 1 mL 移液管, 均为 A 级, 按照矩形分布处理, $k=\sqrt{3}$, 由此估算玻璃容器引入的相对标准不确定度

$$u_{rel}(v) = \sqrt{0.00084^2 + 0.00084^2 + 0.00409^2} = 0.00426$$

3.3 合成标准不确定度

综上分析, HPLC 法测定保健品蚁粒神中掺入的枸橼酸西地那非含量的各相对标准不确定度分量见表 3。

供试品溶液的浓度、稀释体积以及供试品的重量等不确定度相互独立, 将上述不确定度合成得合成标准不确定度 $u(X)$ 为:

$$u_{rel}(x) = \sqrt{u_{rel}^2(c) + u_{rel}^2(w) + u_{rel}^2(v)}$$

$$= \sqrt{0.00507^2 + 0.00093^2 + 0.00426^2} = 0.00669$$

$$\text{合成标准不确定度 } U_c(X_1) = 0.00669 \times 256.7$$

$$= 1.72 \text{ mg/g}$$

3.4 扩展不确定度

取包含因子 $k=2$ (置信概率约 95%), 则测量结果的扩展不确定度 $U(p) = k \times 1.72 = 3.43 \text{ mg/g}$

表 3 相对标准不确定度一览表

Table 3 Reverse standard uncertainty

分量	不确定度来源	分布	类型	相对标准不确定度
$u(c)$	对照品纯度	矩形	B	0.00029
	天平允差	矩形	B	0.00234
	配制对照品储备溶液的玻璃量器允差	矩形	B	0.00084
	配制对照品溶液的玻璃量器允差	矩形	B	0.00418
	HPLC 进样重复性	正态	A	0.00094
	标准曲线拟合	正态	A	0.00106
$u(w)$	供试品称样	矩形	B	0.00093
$u(v)$	供试品稀释、定容的玻璃量器允差	矩形	B	0.00426

3.5 报告测量结果及不确定度

供试品中枸橼酸西地那非的含量可表示为:

$(256.7 \pm 3.43) \text{ mg/g}$, $k=2$ (95%的置信区间)

即: 枸橼酸西地那非的含量测定结果出现在 $(256.7 \pm 3.43) \text{ mg/g}$ 区间的概率为 95%。

4 讨论

4.1 完整的测量数据应包括不确定信息, 以评价分析测量结果的可信度, 最终给出的扩展不确定度即是测量结果在一定置信水平的置信区间。蚁粒神中掺入的枸橼酸西地那非含量测定的扩展不确定度为 $0.669\% \times 2 = 1.34\%$, 表明供试品测定结果的分散程度与高效液相色谱的准确度规定 (1.50%) 较接近, 测定测定结果较为准确可靠。

4.2 不确定度测量可提供分析测定过程中误差来源的有关信息。从本实验看出, 在影响此法检测结果的各个分量中, 配制对照品溶液和供试品溶液的玻璃量器允差带入的不确定度相对较显著, 为不确定度的主要来源。在分析了不确定度后, 可以采取相应的措施, 合理改进分析方法, 为将误差降至最小, 获得高质量的检验结果提供可靠依据。

4.3 随着人民生活水平的日益提高, 保健品逐渐进入千家万户, 其质量直接关系到人民群众的生命健康。对保健品的质量控制, 尤其是其中非法掺入的化学药品的检测越来越受到关注。本实验以补肾壮阳类保健品蚁粒神中掺入的枸橼酸西地那非含量测定为例, 对含量测定结果进行了不确定度评定, 为更加准确可靠地测定保健品中掺入的化学物质提供了方法和思路。

参考文献

- [1] 魏昊. 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004
- [2] 国家质量技术监督局 GB/T 27025-2008, 检测与校准实验室能力的通用要求[S]. 2008
- [3] 董道明, 孙军. 离子色谱法测定水样中氯离子的测量不确定度评定. 化学分析计量[J]. 2007, 1(16): 8
- [4] 国家质量技术监督局 JJG 196-2006, 常用玻璃量器检定规程[S]. 北京: 中国计量出版社, 2007

中文核心期刊

《现代食品科技》