

黄酮的提取率最高,总黄酮的平均质量分数达1.853%。因此实验选择用70%乙醇做提取用的溶剂。

流动相的选择:黄酮碳苷的测定多采用水-甲醇系统,但在此流动相的不同比例条件下荭草苷与异荭草苷极性很接近,使样品中的两个成分很难达到基线分离,因而实验尝试加入适量酸以增大流动相的极性,结果发现选择甲醇-水-冰醋酸(40:70:1)可以达到理想的分离效果。

本实验采用微波萃取法提取淡竹叶中的黄酮苷,具有溶剂用量少,提取快速,有效成分的提取率

较高的特点。所建立的RP-HPLC测定方法具有方法简便、准确,结果稳定、重复性好的特点,可作为淡竹叶及其制剂质量控制的定量方法。

参考文献:

- [1] 李水福,王如伟,陈琴鸣,等.浅谈竹类的药用现状及开发利用前景[J].中国药业,2002,11(11):53.
- [2] 张胜帮,赵玲玲.淡竹叶中黄酮类化合物的提取研究[J].食品科学,2006,27(10):255-257.
- [3] 宋秋烨,吴启南.中药淡竹叶的研究进展[J].中华中医药学刊,2007,25(3):526-527.
- [4] 宋秋烨,陈梅,吴启南.淡竹叶中总黄酮提取工艺研究[J].中国中医药信息杂志,2007,14(3):46-47.
- [5] 李核,李攻科,张展霞.微波辅助萃取技术的进展[J].分析化学,2003,31(10):1261-1265.

HPLC法测定大豆异黄酮的不确定度评定

饶毅¹,张浩²,李新南²,魏惠珍¹,吴有根²,王跃生¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,江西 南昌 330006; 2. 江西中医学院,江西 南昌 330004)

摘要:目的 对HPLC法测定大豆异黄酮中的大豆苷和染料木苷的测定不确定度进行分析,找出影响不确定度的因素。方法 采用HPLC法测定大豆苷和染料木苷,并根据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059-1999)中有关规定评估其不确定度。结果 不确定度评估大豆苷为±0.51%、染料木苷为±0.79%。结论 大豆苷不确定度各分量均较小,而染料木苷不确定度主要由对照品的稀释、样品及对照品的峰面积所引入。

关键词:大豆异黄酮;大豆苷;染料木苷;高效液相色谱;测量不确定度

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1667-04

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性的参数^[1]。《检测和校准实验室能力的通用要求》规定,检测和校准实验室都必须有对测量结果进行不确定度评定的程序,并应用这些程序对实验结果进行测量不确定度的评定。本实验通过HPLC法测定大豆异黄酮中大豆苷、染料木苷的不确定度评定,建立HPLC测定法的不确定度评定方式。

1 材料

岛津LC-10A高效液相色谱仪,岛津AUW220D电子天平,所用玻璃器皿均为天玻牌A级。

甲醇、乙腈均为色谱纯,所用试剂水均为超纯水;大豆苷对照品由中国药品生物制品检定所提供,染料木苷对照品由深圳TAUTO生物技术公司提供,质量分数≥99%;大豆异黄酮由华北制药股份有限公司提供,批号:Y0607003。

2 方法与结果

2.1 大豆异黄酮中大豆苷和染料木苷的HPLC法

测定

2.1.1 色谱条件:大连依利特公司C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(15:85);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:40℃;进样量:10 μL。

2.1.2 对照品溶液的配制:精密称取大豆苷对照品10.20 mg置50 mL量瓶,用50%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得大豆苷对照品储备液。精密称取染料木苷对照品12.31 mg置25 mL量瓶,用50%乙醇稀释至刻度,摇匀,再从中取1 mL置10 mL量瓶中,用50%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得染料木苷对照品储备液。分别取大豆苷、染料木苷对照品储备液各1 mL,置10 mL量瓶中,用50%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的配制:精密称取大豆异黄酮样品10 mg置100 mL量瓶中,加入适量50%乙醇,超声溶解,用50%乙醇加至刻度,摇匀,即得。

收稿日期:2008-03-22

作者简介:饶毅(1964—),男,江西南昌人,教授,博士,主要从事中药质量控制研究工作。

Tel:(0791)7119609 E-mail:raoyi_99@126.com

2.1.4 测定结果:依据 Q/HYG J 03.04.08-2004《华北制药股份有限公司企业标准—大豆异黄酮》进行测定,结果大豆异黄酮中大豆苷的质量分数为 21.31% ($n=3$),染料木苷的质量分数为 10.38% ($n=3$)。

2.2 不确定度的评定:依据《测量不确定度评定与表示》(JF1059-1999)进行不确定度评定。采用数学模型不确定度 $X = \frac{m_i \cdot A_i \cdot V_i}{A_i \cdot V_i \cdot m_i} \times 100\%$, 其中 m_i 为对照品的质量, A_i 为样品的峰面积, V_i 为样品的稀释体积, A_i 为对照品的峰面积, V_i 为对照品的稀释体积, m_i 为样品的称样量。

2.3 不确定度分量的分析:被测样品的不确定度包括对照品峰面积的不确定度、对照品溶液的不确定度、样品峰面积的不确定度、样品溶液的不确定度 4 个方面,其中对照品溶液的不确定度包括标准物质纯度的不确定 $u(p_i)$ 、称量天平带入的不确定度 $u(m_i)$ 和配制对照品的不确定度 $u(V_i)$ 3 个方面,样品溶液的不确定度包括称量天平带入的不确定度 $u(m_i)$ 、配制对照品的不确定度 $u(V_i)$ 两个方面。

2.3.1 对照品质量的相对不确定度 $u(m_i)$:主要有 3 个来源,包括①对照品质量分数的不确定度 $u(p_i)$:大豆苷对照品未给出质量分数和限度标识,染料木苷对照品证书提供的质量分数为 99%,未给出限度标识,故此项目不考虑。②称量由天平示值带入的不确定度 $u(m_i)$:电子天平经检定 1 级,天平称量允差为 ± 0.1 mg,则标准扩展不确定度 $U = 0.1$ mg ($k=2$),按正态分布换算成标准偏差为 $0.1/2 = 0.05$ mg。③称量由天平重复性带入的不确定度 $u(m_i)$:根据天平的检定证书重复性标准偏差为 0.05 mg。因此,合成标准不确定度 $u(m_i) = \sqrt{u^2(m_{i1}) + u^2(m_{i2})} = \sqrt{0.05^2 + 0.05^2} = 0.071$ mg,相对标准不确定度中大豆苷 $\frac{u(m_i)}{m_i} = 0.071/10.20 =$

0.70%,染料木苷 $\frac{u(m_i)}{m_i} = 0.071/12.31 = 0.58\%$ 。

2.3.2 配制大豆苷对照品时由玻璃器皿带入的相对不确定度 $u(V_i): V_i = \frac{V_{i1} \times V_{i2}}{V_{i3}}$ 。

(1) 50 mL 量瓶 $u(V_{i1})$ 来源主要有 3 种:①校准: A 级 50 mL 单标线移液管示值允差 ± 0.05 mL,取 $k = \sqrt{3}$,则 $u(V_{i1}) = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.029$ mL;②重复性:重复测定 10 次,测得 $u(V_{i2}) = 0.0095$ mL;③温度:由于本试验温度与校准温度相同,此项可忽略。

$$u(V_{i1}) = \sqrt{u^2(V_{i21}) + u^2(V_{i22})} =$$

$$\sqrt{0.029^2 + 0.0095^2} = 0.030 \text{ mL}$$

(2) 1 mL 移液管 $u(V_{i2})$ 主要来源有 3 种:①校准: A 级 1 mL 单标线移液管示值允差 ± 0.007 mL,取 $k = \sqrt{3}$, $u(V_{i21}) = \frac{0.007}{\sqrt{3}} = 0.0040$ mL;②重复性:通过 10 次测定,计算得 $u(V_{i22}) = 0.0067$ mL;③温度:由于本试验温度与校准温度相同,所以此项可忽略。

$$u(V_{i2}) = \sqrt{u^2(V_{i21}) + u^2(V_{i22})} = \sqrt{0.0040^2 + 0.0067^2} = 0.0078 \text{ mL}$$

$$(3) 10 \text{ mL 量瓶 } u(V_{i7}) \text{ 所测结果同 } u(V_{i1}): u(V_{i7}) = \sqrt{u^2(V_{i71}) + u^2(V_{i72})} = \sqrt{0.029^2 + 0.0095^2}$$

因此大豆苷对照品合成标准相对不确定度为:

$$\frac{u(V_i)}{V_i} = \sqrt{\left[\frac{u(V_{i1})}{V_{i1}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{i2})}{V_{i2}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{i7})}{V_{i7}}\right]^2} = \sqrt{0.0006^2 + 0.0078^2 + 0.0014^2} = 0.79\%$$

2.3.3 配制染料木苷对照品时由玻璃器皿带入的相对不确定度 $u(V_i): V_i = \frac{V_{i4} \times V_{i5} \times V_{i2}}{V_{i3} \times V_{i6}}$ 。

(1) 25 mL 量瓶不确定度 $u(V_{i3})$:①校准 $u(V_{i31})$: A 级 25 mL 单标线移液管示值允差 ± 0.030 mL, $k = \sqrt{3}$, $u(V_{i31}) = \frac{0.030}{\sqrt{3}} = 0.017$ mL;②重复性 $u(V_{i32})$:重复测定 10 次,测得 $u(V_{i32}) = 0.021$ mL;③温度:由于本试验温度与校准温度相同,所以此项可忽略。

$$u(V_{i3}) = \sqrt{u^2(V_{i31}) + u^2(V_{i32})} = \sqrt{0.017^2 + 0.021^2} = 0.027 \text{ mL}$$

(2) 1 mL 移液管不确定度 $u(V_{i4})$:同 $u(V_{i2})$, $u(V_{i4}) = \sqrt{0.0040^2 + 0.0067^2} = 0.0078$ mL。

(3) 10 mL 量瓶 $u(V_{i5})$:同 $u(V_{i1})$, $u(V_{i5}) = \sqrt{0.012^2 + 0.0083^2} = 0.014$ mL。

(4) 1 mL 移液管不确定度 $u(V_{i6})$:同 $u(V_{i2})$, $u(V_{i6}) = \sqrt{0.0040^2 + 0.0067^2} = 0.0078$ mL。

(5) 10 mL 量瓶 $u(V_{i7})$ 的不确定度同 $u(V_{i1})$, $u(V_{i7}) = \sqrt{0.029^2 + 0.0095^2}$ 。

因此,染料木苷对照品的合成标准不确定度

$$\text{度计算公式为: } \frac{u(V_i)}{V_i} = \sqrt{\left[\frac{u(V_{i3})}{V_{i3}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{i4})}{V_{i4}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{i5})}{V_{i5}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{i6})}{V_{i6}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{i7})}{V_{i7}}\right]^2} = \sqrt{0.0011^2 + 0.0078^2 + 0.0014^2 + 0.0078^2 + 0.0014^2} =$$

1.13%;

2.3.4 对照品测得的峰面积的相对不确定度 $u(A_i)$:

①大豆苷:对照品液4次进样重复测得量的标准不

确定度按贝赛尔公式计算 $s = \sqrt{\frac{\sum (A_i - \bar{A})^2}{n-1}} =$

2 396.56。则相对不确定度 $u(A_i) = \frac{s}{\bar{A}} = 0.32\%$ 。

②染料木苷:对照品液4次进样重复测得量的标准

不确定度按贝赛尔公式计算 $s = \sqrt{\frac{\sum (A_i - \bar{A})^2}{n-1}} =$

3 252.5。则相对不确定度 $u(A_i) = \frac{s}{\bar{A}} = 2.76\%$ 。

2.3.5 样品质量的不确定度 $u(m_i)$:主要来源有2

种(1)电子天平称量示值的不确定度 $u(m_{i1})$:天平称量允差为 ± 0.1 mg,则标准扩展不确定度 $U=0.1$ mg($k=3$),按正态分布换算成标准偏差为 $u(m_{i1})=0.1/3=0.033$ mg;(2)电子天平称量重复性的不

确定度 $u(m_{i2})$:根据天平的检定证书重现性标准偏差为0.05 mg,即 $u(m_{i2})=0.05$ mg。因此,合成不

确定度为: $u(m_{i1}) = \sqrt{u^2(m_{i1}) + u^2(m_{i2})} =$

$\sqrt{0.033^2 + 0.05^2} = 0.060$ mg,相对标准不确定度 $\frac{u(m_{i1})}{m_i} = 0.060/10.24 = 0.58\%$

2.3.6 稀释样品时,由玻璃器皿(100 mL 量瓶)带人的不确定度 $u(V_i)$:(1)校准 $u(V_{i1})$:A级10 mL 单标线移液管示值允差 ± 0.100 mL,取 $k=\sqrt{3}$,则

$u(V_{i1}) = \frac{0.100}{\sqrt{3}} = 0.058$ mL;(2)重复性 $u(V_{i2})$:重复

量取10次,测得 $u(V_{i2})=0.032$ mL;(3)由于本试验温度与校准温度相同,所以此项可忽略。 $u(V_i) =$

$\sqrt{u^2(V_{i1}) + u^2(s_{i2})} = \sqrt{0.058^2 + 0.032^2} = 0.066$

mL, $\frac{u(V_i)}{V_i} = 0.066\%$

2.3.7 样品测得的峰面积的相对不确定度 $u(A_i)$:样品6次重复测定结果的标准不确定度按贝赛尔公

式计算 $s_{\text{大豆苷}} = \sqrt{\frac{\sum (A_i - \bar{A})^2}{n-1}} = 1 200$; $s_{\text{染料木苷}} =$

$\sqrt{\frac{\sum (A_i - \bar{A})^2}{n-1}} = 5 442$ 。相对不确定度 $u_{\text{大豆苷}}(A_i) =$

$\frac{s_{\text{大豆苷}}}{\bar{A}} = 0.15\%$, $u_{\text{染料木苷}}(A_i) = \frac{s_{\text{染料木苷}}}{\bar{A}} = 2.28\%$ 。

2.3.8 合成不确定度:各相对不确定度分量见表1、2。

大豆苷合成不确定度 =

$\sqrt{u^2(m_i) + u^2(V_i) + u^2(A_i) + u^2(m_i) + u^2(A_i) + u^2(V_i)} =$

$\sqrt{0.70\%^2 + 0.79\%^2 + 0.32\%^2 + 0.58\%^2 + 0.15\%^2 + 0.066\%^2} =$

0.012

染料木苷合成不确定度 =

$\sqrt{u^2(m_i) + u^2(V_i) + u^2(A_i) + u^2(m_i) + u^2(A_i) + u^2(V_i)} =$

$\sqrt{0.58\%^2 + 1.13\%^2 + 2.76\%^2 + 0.58\%^2 + 0.066\%^2 + 2.28\%^2} =$

0.038

2.3.9 扩展不确定度:取包含因子 $k=2$,则大豆苷

扩展不确定度 $U_r(S) = 21.31\% \times 0.012 \times 2 =$

0.51%,染料木苷扩展不确定度 $U_r(S) = 10.38\% \times$

0.038 $\times 2 = 0.79\%$ 。

2.3.10 测量不确定度报告:质量分数测定的结果

可表示为大豆苷(21.31 ± 0.51)%,染料木苷

(10.38 ± 0.79)%。

3 讨论

由于被测样品为原料粉末,主成分测定过程中

不受辅料和杂质的影响,且其样品非均匀性引入的

不确定度可忽略。本测定方法采用单点对照品比较

表1 大豆苷不确定度分量

Table 1 Uncertainty item of daidzin

名称	分量	不确定度来源	分布	类型	相对不确定度
对照品称样	$u(m_i)$	天平示值的不确定度 $u(m_{i1})$	矩形	B类	0.70%
		天平称量重复性的不确定度 $u(m_{i2})$	正态	A类	
对照品稀释	$u(V_{i1})$	校准容量瓶的不确定度 $u(V_{i11})$	三角	B类	0.79%
	$u(V_{i2})$	定容重复性的不确定度 $u(V_{i12})$	正态	A类	
	$u(V_{i7})$				
对照品峰面积	$u(A_i)$	对照品溶液进样重复性的不确定度	正态	A类	0.32%
样品称样	$u(m_i)$	天平示值的不确定度 $u(m_{i1})$	矩形	B类	0.58%
		天平称量重复性的不确定度 $u(m_{i2})$	正态	A类	
样品稀释	$u(V_i)$	校准量瓶的不确定度 $u(V_{i11})$	三角	B类	0.066%
		定容重复性的不确定度 $u(V_{i12})$	正态	A类	
样品峰面积	$u(A_i)$	样品溶液进样重复性的不确定度	正态	A类	0.15%

表2 染料木苷不确定度分量
Table 2 Uncertainty item of genistin

名称	分量	不确定度来源	分布	类型	相对不确定度
对照品称样	$u(m_1)$	天平示值的不确定度 $u(m_{11})$	矩形	B类	0.58%
		天平称量重复性的不确定度 $u(m_{12})$	正态	A类	
对照品稀释	$u(V_{13})$ 、 $u(V_{14})$	校准容量瓶的不确定度 $u(V_{131})$	三角	B类	1.13%
	$u(V_{16})$ 、 $u(V_{15})$	定容重复性的不确定度 $u(V_{132})$	正态	A类	
	$u(V_{15})$				
对照品峰面积	$u(A_i)$	对照品溶液进样重复性的不确定度	正态	A类	2.76%
样品称样	$u(m_2)$	天平示值的不确定度 $u(m_{21})$	矩形	B类	0.58%
		天平称量重复性的不确定度 $u(m_{22})$	正态	A类	
样品稀释	$u(V_2)$	校准量瓶的不确定度 $u(V_1)$	三角	B类	0.066%
		定容重复性的不确定度 $u(V_{12})$	正态	A类	
样品峰面积	$u(A_i)$	样品溶液进样重复性的不确定度	正态	A类	2.28%

法,由于配制的样品与对照品的质量浓度相近,其峰面积响应中可能的非线性引入的不确定度可忽略。环境温度、环境湿度的随机变化对质量、峰面积会带来影响,其不确定度纳入称量重复性、进样重复性中,因样品和对照品几乎为同时操作,故环境温度湿度的系统影响而可忽略。

由于本实验中使用的天平和量瓶的精密度较高,不确定度均参考检定和实验的数据,未采用最大允差,且称量接近、操作简单,不包括人为过失误差,故不确定度较小。由于HPLC仪本身对测定结果的影响因素很多,难以一一评估。又因为在实际测定中,HPLC仪误差引起的不确定度已体现在色谱峰面积的测量结果中,所以对HPLC仪的体积流量、流量精度和进样精密度等各因素的不确定度分量不作另行细化讨论。实验未进行回收率的不确定度评定,并以回收率对检测结果进行修正,因为回收率测得值的离散度是包含在测量结果离散度内的,且用回收率修正结果,不仅会重复评定,而且会脱离实际^[2]。

分析评估不确定度时,应尽量考虑到产生不确定度的所有来源,因为合成不确定度的数值几乎完全取决于重要的不确定度分量。根据上述评定可得,本方法测量大豆苷结果的各分量不确定度均较小,测量染料木苷结果的不确定度主要来自于对照品和样品的峰面积的不确定度、稀释对照品带来的不确定度。比较大豆苷和染料木苷的不确定度,染料木苷的扩展不确定度($\pm 0.79\%$)为大豆苷的扩展不确定度($\pm 0.51\%$)的1.5倍。这是由于染料木苷对照品的质量浓度较低,约为大豆苷对照品的1/5倍,故染料木苷在高效液相色谱上的响应不稳定而造成其峰面积不确定度较大。且染料木苷对照品稀释次数较多,稀释过程中带来了较大的不确定度。在分析了以上影响测量不确定度的原因后,如果采取了相应的措施,完全可以将测量结果的不确定度进一步减小。

参考文献:

- [1] 测量不确定度评定与表示[S]. JF 1059-1999,1999.
- [2] 冯家力,潘振球,曾 栋,等.气相色谱-质谱法测定马兜铃的测量不确定度评定及防止重复评定的探讨[J].中国卫生检验杂志,2006,16(8):1011.

毛知母的减压加温润制工艺研究

宋 坤,陆兔林,季 德*

(南京中医药大学药学院,江苏 南京 210029)

摘 要:目的 探讨毛知母的最佳减压加温润制工艺。方法 以菝葜皂苷元、芒果苷为指标选择润制时间、润制温度、润制压力3个因素,用 $L_9(3^3)$ 正交设计表,采用方差分析法,对毛知母进行减压加温润制工艺的优选。结果 润

收稿日期:2008-05-07

作者简介:宋 坤(1973—),江苏省南京人,讲师,从事中药饮片质量标准方面的研究工作。

Tel:(025)85811513 E-mail:songseeng@yeah.net

*南京中医药大学02届硕士研究生