

人参中人参皂苷 HPLC 定量方法的测量不确定度的评定

胡 坪^{1,2}, 罗国安^{1,3*}, 赵中振², 陈金泉², 姜志宏^{2*}

(1. 华东理工大学 化学与制药学院, 上海 200237; 2. 香港浸会大学 中医药学院, 香港;
3. 清华大学 分析中心, 北京 100084)

摘要: 目的 探讨人参中人参皂苷 R_{gl} , R_c 和 R_{bl} 的 HPLC 定量分析方法的测量不确定度的评定方法。方法 通过分析测量过程, 确定并简化不确定度来源; 利用 HPLC 法测定人参中人参皂苷 R_{gl} , R_c 和 R_{bl} 的方法验证数据及经验数据, 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。结果 用 HPLC 法测定人参中人参皂苷 R_{gl} , R_c 和 R_{bl} 的扩展不确定度分别为 0.12c, 0.14c 和 0.13c。结论 测量不确定度可用于人参中人参皂苷的标准限量的制定; 测量不确定度的评定方法的确立对于中药质量标准的研究具有重要意义。

关键词: 测量不确定度; 人参皂苷; 高效液相色谱法; 人参

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)01 - 0049 - 05

Evaluation of measurement uncertainty for the determination of ginsenosides in Radix ginseng by HPLC

HU Ping^{1,2}, LUO Guo-an^{1,3*}, ZHAO Zhong-zhen², CHAN Kelvin KC², JIANG Zhi-hong^{2*}

(1. School of Chemistry and Pharmaceutics, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;
2. School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, China;
3. Analysis Center, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: **Aim** To set out the procedure for estimation of measurement uncertainty for the determination of ginsenosides R_{gl} , R_c and R_{bl} in Radix ginseng by HPLC. **Methods** To facilitate the identification and analysis of the uncertainty sources arising from the procedure of analysis, a cause and effect diagram was constructed and simplified. Each uncertainty component, whether associated with individual sources or with the combined effects of several sources, was evaluated with respect to the significance of its contribution to the overall measurement uncertainty and was expressed as standard uncertainty. All the standard uncertainties were then combined according to the appropriate rules to give a combined standard uncertainty and an expanded standard uncertainty. **Results** The expanded standard uncertainties for the HPLC determination of ginsenoside R_{gl} , R_c and R_{bl} are 0.12c, 0.14c and 0.13c, respectively. **Conclusion** Measurement uncertainty is applicable to set the limit of the ginsenosides in Radix ginseng. The establishment of the methodology for the evaluation of measurement uncertainty is important to the studies of Chinese materia medica standards.

Key words: measurement uncertainty; ginsenoside; HPLC; ginseng

测量不确定度 (measurement uncertainty) 是“与测量结果相关联的参数, 表征合理地赋予被测量量值的分散性”^[1], 它是被测量客观值在某一量值范围内的一个评定, 其大小决定了测量结果的实用价值。不确定度越小, 测量结果的质量越高, 使用价值越大。测量不确定度与误差是两个不同的概念, 误

收稿日期: 2004-05-12.

基金项目: 中国香港特别行政区卫生署香港常用中药材研究计划资助; 国家科技部十五攻关 (2002BA906A29-3); 基础性科技专项资助项目 (2002DEA20021-3).

* 通讯作者 Tel: 852 - 34112906, Fax: 852 - 34112461,
E-mail: zhjiang@hkbu.edu.hk
Tel: 86 - 10 - 62781688, Fax: 86 - 10 - 62770327,
E-mail: Luoga@mail.tsinghua.edu.cn

差在实际应用中难以确切求得,因此测量不确定度的提出引发了经典误差理论及测量结果评定与表示的重大变革,是现代误差理论形成的基础。1993年出版的《测量不确定度表示指南》(GUM)^[1]中首次明确规定了测量不确定度的定义、评定方法及表达方式,从而使不同学科、不同地域在表示测量结果及不确定度时具有一致的含义。

《测量不确定度表示指南》颁布以来,已被许多全球性、区域性国际组织和国家采用。在分析化学领域,1995年由欧洲化学委员会(EURACHEM)起草了《分析测量中不确定度的评定》^[2],指引如何将《测量不确定度表示指南》中的定义应用于分析测定。目前,测量不确定度的概念在国家计量基准、标准物质的研究和对比中应用广泛,同时逐渐向其他领域渗透^[3]。因此,正确表达和评定测量方法的测量不确定度将逐步成为国际通行的要求。

本文首次将测量不确定度的概念引入中药质量评价及标准制定中,以人参药材中人参皂苷 R_{g1}, R_e和 R_{b1}的 HPLC定量方法的测量不确定度的评定为例,探讨以方法学验证数据评定测量不确定度的过程,评定结果可用于人参的质量标准的制定。

原理

人参药材中人参皂苷 R_{g1}, R_e和 R_{b1}的 HPLC定量方法的测量不确定度的评定可以通过测量过程分析、分析不确定度来源、量化不确定度分量、计算合成不确定度及扩展不确定度这四个步骤来完成^[2]。

步骤一:测量过程分析 HPLC法测定人参药材中人参皂苷 R_{g1}, R_e和 R_{b1}的含量的测定流程见图 1。

根据样品的提取和分析过程,人参样品中人参皂苷 R_{g1}, R_e和 R_{b1}的含量可用公式(1)计算:

$$C = \frac{A \times D \times V}{W} \quad (1)$$

(1)式中,C为药材中人参皂苷的含量(mg·kg⁻¹),A为样品溶液中被分析组分的浓度(mg·L⁻¹),V为样品溶液的最终体积(mL),W为药材的称样量(g),D为稀释因子(如果溶液中组分浓度超出标准曲线范围,溶液需要稀释的倍数)。

另外,考虑到中药材样品的不均匀性,在计算公式中加入样品均匀性因子 F(hom)项,将计算公式(1)修正如下:

$$C = \frac{A \times D \times V \times F(\text{hom})}{W} \quad (2)$$

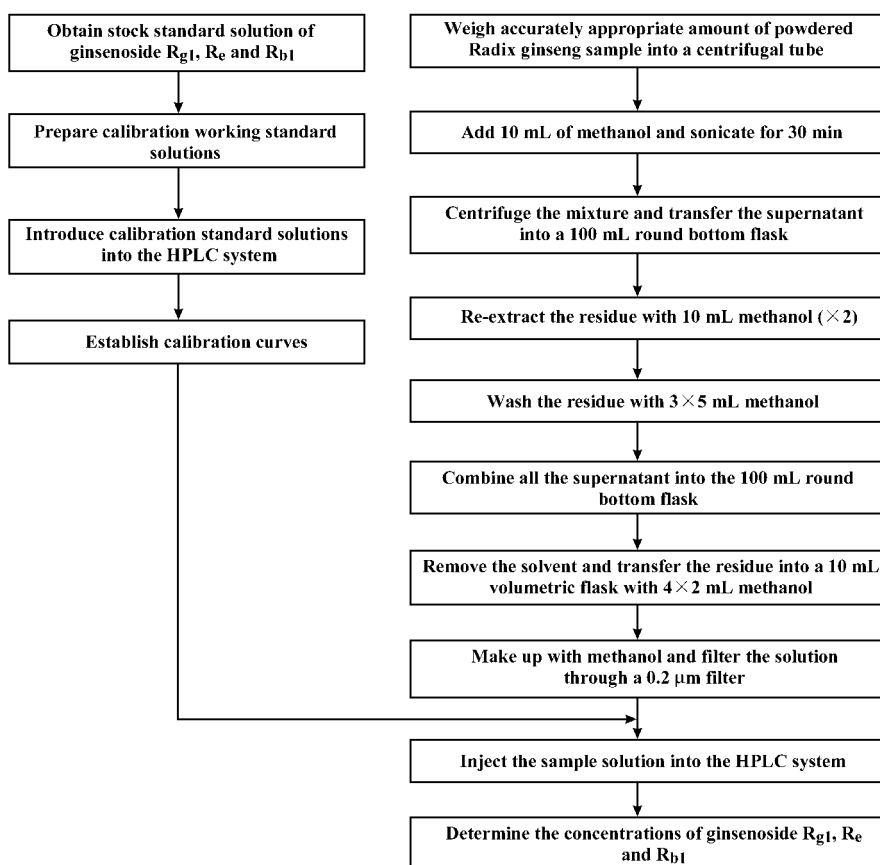


Figure 1 Flow diagram illustrating the stages in the method for the determination of ginsenosides in Radix ginseng

步骤二:不确定度来源 进行不确定度研究的关键步骤之一是确定可能产生不确定度的所有来源,例如在制样过程中取样随机误差造成的影响,称量对照品和样品用的分析天平的误差带来的不确定度,分析样品时由于基质干扰或共存组分带来的影响等等。分析这些来源最简便的方法就是根据步骤一中的测定步骤及计算公式来构建因果关系图。图2表示了用 HPLC法测定人参中 R_{gl} 、 R_c 和 R_{bl} 的测量不确定度的因果关系图。

如果采用方法学验证数据来评估测量不确定度,可将上述因果关系图合并简化成图3^[2]。通过简化,方法验证过程中的精密度研究数据涵括了所有参数的精密度引起的不确定度;而通过回收率的测定及误差分析,可评定由基质、干扰以及其他诸多因素带来的不确定度;其他不能由精密度及回收率误差分析来评定的不确定度来源,如样品均匀性、对

照品纯度等,应分别予以考察。

步骤三:量化不确定度分量

精密度研究 不同类型的样品,用于评定不确定度的精密度研究方式和要求不同^[4]。人参药材的基质相似,但被分析的人参皂苷含量有差异,对于此类样本,通常要求对不同浓度的样本进行多次分析,并按公式(3)计算相对标准不确定度。

$$u(P)/P = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) RSD_1^2 + (n_2 - 1) RSD_2^2 + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}} \quad (3)$$

其中, $u(P)/P$ 为相对标准不确定度, RSD_i 为样本 i 的相对标准偏差, n_i 为样本 i 的重复测定次数,以此类推。

误差研究 误差研究可以通过方法回收率数据计算,回收率越接近于1,方法误差越小。由于中药的空白样品较难得到,通常采用加样回收来进行方

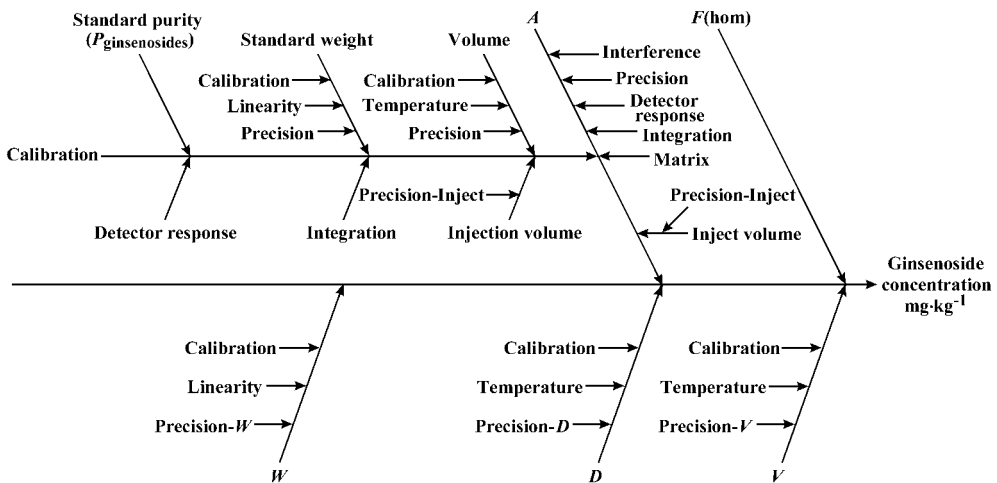


Figure 2 Cause and effect diagram for the determination of ginsenosides R_{gl} , R_c and R_{bl} in Radix ginseng by HPLC

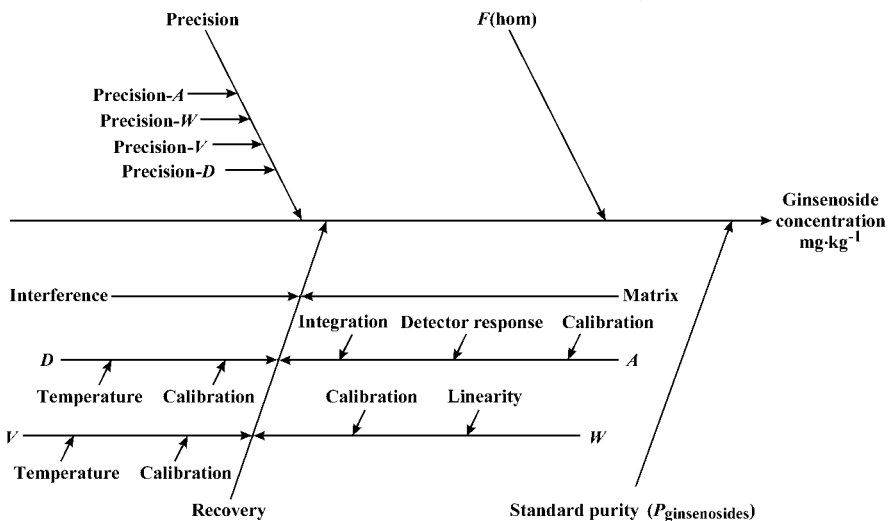


Figure 3 Refined cause and effect diagram for the determination of ginsenosides R_{gl} , R_c and R_{bl} in Radix ginseng by HPLC

法学验证,即在已知含量的人参药材中加入一定水平的人参皂苷 R_{gl} , R_c 和 R_{bi} 对照品进行回收率的测定,其标准不确定度按公式(4)进行计算。

$$u(\overline{Rec}) = SD/\sqrt{n} \quad (4)$$

其中, $u(\overline{Rec})$ 为回收率标准不确定度, SD 为标准偏差, n 为测量次数。

《测量不确定度表示指南》中要求校正明显的系统误差,因此在误差分析中需要进行 t 检验,考察平均回收率与 1.0 是否有显著性差异。如果有显著性差异,需要对标准不确定度进行校正。 t 值按公式(5)计算

$$t = \frac{|1 - \overline{Rec}|}{u(\overline{Rec})} \quad (5)$$

\overline{Rec} 为平均回收率。该 t 值与 $n - 1$ 自由度 95%置信水平下的双尾临界值 $t_{crit, n-1}$ 比较,如果 t 值低于临界值 $t_{crit, n-1}$,按公式 4 计算得到的即为标准不确定度;如果 t 值高于临界值 $t_{crit, n-1}$,则按公式(6)对标准不确定度进行校正。

$$u(\overline{Rec})'' = \sqrt{\left(\frac{1 - \overline{Rec}}{k}\right)^2 + u(\overline{Rec})^2} \quad (6)$$

其中, $k = 2$ 。

其他来源的不确定度 其他来源的不确定度如对照品纯度和样品不均匀性带来的不确定度。

对照品的含量范围通常由供应商提供,这类不确定度可用矩形分布假设来计算:

$$u(C_{std}) = \frac{(1 - C_{std})}{2\sqrt{3}} \quad (7)$$

其中 $u(C_{std})$ 为对照品纯度引起的标准不确定度, C_{std} 为对照品的最低百分含量。

不同类型的样本,由取样引起的不确定度不同。关于人参样本均匀性没有文献报道,可以采用二项式统计分布来估计由样本的不均匀性引起的相对标准不确定度 $u(F(hom))/F(hom)^{[2]}$ 。

步骤四:计算合成不确定度及扩展不确定度 当所有可能产生测量不确定度的因素被确定后,即可计算合成不确定度。如果各不确定度参数之间相互独立,首先将所有标准不确定度转化为相对标准不确定度,然后按以下公式计算合成标准不确定度:

$$u_c(C) = C$$

$$\sqrt{\left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(\overline{Rec})}{\overline{Rec}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{std})}{C_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(F(hom))}{F(hom)}\right)^2} \quad (8)$$

扩展不确定度是一个区间,包含被测量值分散性的主要区域,由以下公式计算:

$$U(C) = k \times u_c(C) \quad (9)$$

在置信水平为 95%时包含因子 $k = 2$ 。

材料与amp;方法

仪器与试剂 美国 Agilent HPL100型液相色谱仪,二极管阵列检测器。人参皂苷 R_{gl} , R_c 和 R_{bi} 均购自中国药品与生物制品检定所,含量不低于 98%。HPLC级乙腈为美国 Merck 公司产品,甲醇为分析纯(LAB SCAN,爱尔兰),水为 Milli Q 超纯水。人参药材由香港政府卫生署提供。

分析条件 Beckman Ultrasphere ODS 柱(250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm);流速 1.6 mL · min⁻¹;柱温 25 °C;检测波长 203 nm。流动相由乙腈和水组成,梯度洗脱程序为:0 - 20 min,乙腈的体积百分比为 20%;20 - 60 min,乙腈的体积百分比由 20%增至 42%^[5]。

结果与amp;讨论

1 精密度研究

分析 10批人参药材,每批药材测定两次,人参皂苷 R_{gl} , R_c 和 R_{bi} 的测量结果及相对标准不确定度见表 1。

Table 1 Results of duplicate analyses of ten batches of Radix ginseng samples and the relative standard uncertainties of precision study

Batch No.	R_{gl}		R_c		R_{bi}	
	Mean/ mg · g ⁻¹	RSD*	Mean/ mg · g ⁻¹	RSD*	Mean/ mg · g ⁻¹	RSD*
1	2.07	0.012 0	2.25	0.001 5	3.73	0.007 8
2	1.27	0.038 4	0.42	0.070 1	2.25	0.037 1
3	2.45	0.056 1	2.28	0.063 1	3.15	0.062 1
4	2.39	0.011 2	2.87	0.041 7	4.86	0.007 0
5	1.55	0.003 0	3.49	0.007 0	4.64	0.011 5
6	1.07	0.027 2	0.82	0.074 2	4.17	0.021 5
7	2.01	0.015 9	2.01	0.015 3	2.16	0.007 3
8	1.54	0.027 1	2.36	0.004 4	2.24	0.015 3
9	3.13	0.009 3	3.23	0.026 3	2.14	0.015 5
10	0.80	0.062 6	0.57	0.050 5	3.14	0.007 6
$u(P)/P$		0.032 6		0.044 4		0.0255

* 由两次测定的绝对平均偏差 (ADM) × √2计算

2 误差研究

在用 HPLC法测定人参中人参皂苷 R_{gl} , R_c 和 R_{bi} 的方法学验证中测定了 5次加样回收率,测量结果及不确定度分析见表 2。

Table 2 In-house validation data of recoveries of ginsenosides and the standard uncertainties of bias study (n = 5)

Ginsenosides	Rec /%	SD /%	$\overline{u(\text{Rec})}$	T-test		$u(\overline{\text{Rec}})^a$
				t	$t_{\text{crit } 4}$	
R _{gl}	98.0	2.68	0.012 0	1.667	<	-
R _c	99.8	3.22	0.014 4	0.139	<	-
R _{bl}	95.1	3.46	0.015 5	3.161	>	0.029 0

3 对照品纯度

对照品人参皂苷 R_{gl}, R_c和 R_{bl}的标示含量不低于 98%,因此

$$u(C_{\text{std}}) = \frac{(1 - 0.98)}{2\sqrt{3}} = 0.005 8$$

4 样品均匀性

人参皂苷在人参药材的各部位均有分布,不挥发,且化学性质较稳定,根据文献[2],样品均匀性引起的相对标准不确定度取估计值 0.05。即 $u(F(\text{hom})) / F(\text{hom}) = 0.05$ 。

5 合成标准不确定度和扩展标准不确定度

根据以上分析结果,人参药材中人参皂苷 R_{gl}, R_c和 R_{bl}的 HPLC定量方法的合成标准不确定度 $u_c(C)$ 及扩展标准不确定度 $U(C)$ 见表 3。

Table 3 Combined standard uncertainties and expanded uncertainties for the determination of ginsenosides R_{gl}, R_c, R_{bl} in Radix ginseng by HPLC

	R _{gl}	R _c	R _{bl}
$u(P) / P$	0.032 6	0.044 4	0.025 5
$u(\text{Rec}) / \text{Rec}$	0.012 2	0.014 4	0.030 5
$u(C_{\text{std}}) / C_{\text{std}}$	0.005 8	0.005 8	0.005 8
$u(F(\text{hom})) / F(\text{hom})$	0.05	0.05	0.05
$u_c(C)$	0.061 c	0.069 c	0.064 c
$U(C)$	0.12 c	0.14 c	0.13 c

6 影响人参中人参皂苷 R_{gl}, R_c和 R_{bl}的含量测量方法的测量不确定度的因素分析

图 4给出了各不确定度分量对合成相对标准不确定度的贡献。由图可见,样品的不均匀性对人参药材中人参皂苷 R_{gl}, R_c和 R_{bl}的 HPLC定量方法的测量不确定度影响最大,而对照品纯度的影响最小。因此样品不均匀性这一参数在分析测定时应加以严格控制,例如采用合理的取样方式,增加取样量,控制粉碎粒度等。

7 测量不确定度的应用

目前测量不确定度的重要性已经得到广泛的认识,一个完整的定量分析结果应该包含不确定度信息,它是定量分析结果的重要组成部分,可用于评估

定量方法的可靠性和测量结果的可信程度。此外,测量方法的不确定度在方法学研究等方面也能提供有益的指导,如提供分析过程的主要误差来源信息以及解决方案等。

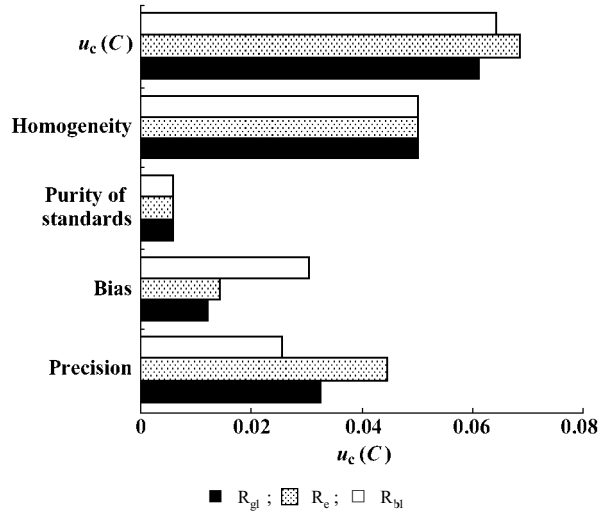


Figure 4 Relative standard uncertainties of the quantitative analysis of ginsenoside R_{gl}, R_c and R_{bl} in Radix ginseng by HPLC

测量不确定度的另一个用途是用于标准的制定。HPLC法测定人参中人参皂苷 R_{gl}, R_c和 R_{bl}的含量是香港中药标准中人参药材下的检测项,该标准的检测限量是根据 10批代表性药材中人参皂苷的测量平均值及相对标准偏差,以及测量方法的不确定度计算得到。标准制定时考虑测量结果的不确定度,制定的标准限量将更加合理。因此,进行测量不确定度的评定方法研究对于中药标准的制定具有重要意义。

References:

[1] International Bureau of Weights and Measures, ISO. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, International Organization for the Standardization* [Z]. Geneva: ISO, 1995. 2 - 3.

[2] Ellison SLR, Rosslein M, Williams A. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* [M]. 2nd Ed. UK: EURACHEM / CITAC, 2000. 11 - 33.

[3] Yang XL, Dai KZ. Uncertainty of measurement and guide to the expression of uncertainty in measurement [J]. *J Wuhan Inst Chem Tech (武汉化工学院学报)*, 2002, 24 (1): 74 - 79.

[4] Barwick VJ, Ellison SLR. *Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles (Part d)* [M]. UK: LGC Limited, 2000. 8 - 24.

[5] Chen W, Hu GL, Wang XR, et al. Determination of six ginsenosides in panax species by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr (色谱)*, 2000, 18(5): 439 - 441.