

槟榔中槟榔碱含量的不确定度评定

袁 河¹, 肖晓义¹, 康志娇¹, *夏延斌², 赵志友¹, 江日初³

(1. 湖南省槟榔加工与食用安全工程技术研究中心, 湖南宾之郎食品科技有限公司, 湖南 湘潭 411100;
2. 湖南农业大学 食品科技学院, 湖南 长沙 410128; 3. 湘潭市食品药品监督管理局, 湖南 湘潭 411100)

摘要: 采用高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 测定槟榔中槟榔碱的含量, 并对测定结果进行不确定度分析。依据 JJF 1059.1—2012 测量不确定度评定与表示中的方法, 根据试验过程建立了数学模型, 从标准储备液、标准曲线的拟合、样品的定容、样品称量、样品测量重复性及提取过程对样品回收率的影响等方面分析了引入不确定度的来源。比较得出标准曲线的拟合和样品测量重复性对合成不确定度贡献最大, 达到 57.7%。当槟榔中槟榔碱含量为 3.31 g/kg 时, 其扩展不确定度为 3.31 ± 0.052 g/kg, $k=2$ 。结果表明, 该评定方式适用于槟榔中槟榔碱含量的不确定度评估。

关键词: 槟榔; 槟榔碱; 不确定度; 液相色谱仪

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

doi: 10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2019.02.051

The Evaluation of Uncertainty of Arecoline Content in *Areca catechu* L.

YUAN He¹, XIAO Xiaoyi¹, KANG Zhijiao¹, *XIA Yanbin², ZHAO Zhiyou¹, JIANG Richu³

(1. Hu'nan Areca Processing and Edible Safety Engineering Technology Research Center, Hu'nan Bingzhilang Food Science and Technology Co., Ltd., Xiangtan, Hu'nan 411100, China; 2. College of Food Science and Technology, Hu'nan Agricultural University, Changsha, Hu'nan 410128, China; 3. Xiangtan Food and Drug Administration, Xiangtan, Hu'nan 411100, China)

Abstract: To establish a method for the determination of the arecoline in *Areca catechu* L. by high performance liquid chromatography and to analyze the uncertainty of the results. According to the method of Guidance on evaluating the uncertainty in Chemical Analysis, the mathematical models were established based on the experimental process, the sources of measurement uncertainty was analyzed, such as standard stock solution, fitting of standard curve, constant volume of sample, sample weighting, influence of repeatability of sample measurement and extraction process on sample recovery rate and so on. The comparison showed that the fitting of standard curve and the repeatability of sample measurement have the greatest contribution to the uncertainty of synthesis, reached 57.7%. When the content of arecoline in the sample was 3.31 g/kg $k=2$, its extended uncertainty introduced by the method was 0.052 g/kg. The experimental results showed that the evaluation method was applicable to the uncertainty evaluation of arecoline content in *Areca catechu* L.

Key words: *Areca catechu* L.; arecoline; uncertainty; high performance liquid chromatography

槟榔为棕榈科植物槟榔 (*Areca catechu* L.) 的干燥成熟种子, 广泛栽培于中国、印度、印度尼西亚、斯里兰卡、菲律宾等南亚及东南亚国家^[1]。槟榔是四大南药之首, 药理研究表明槟榔具有驱虫灭螺、抑菌、促胃肠道消化运动、诱发口腔黏膜纤维化病变和心血管病变等生理效应^[2-3]。引起这种生理效应的关键物质就是槟榔碱^[4-5], 它是槟榔的有效成分, 也是槟榔化学物质成分中含量最多的生物碱, 其含量达到 0.30%~0.63%^[6]。各种研究表明, 只有当槟榔

碱含量达到一定浓度以后才会产生各种生理效应, 因此准确无误地测量槟榔中槟榔碱的含量对后续病理学研究具有十分重要的意义。

采用了高效液相色谱法测定槟榔中槟榔碱的含量, 再依据 JJF 1059.1—2012 测量不确定度评定与表示, 对测量海南原果中槟榔碱的过程中产生的不确定度进行了分析评定。充分验证了分析方法的可行性和合理性, 同时确保了试验结果的准确性和有效性, 为使用高效液相色谱法测定中药有效成分含量

收稿日期: 2018-10-22

基金项目: 长株潭国家自主创新示范区专项项目 (2017SK2430); 湖南省科技创新计划项目 (2017TP2028、2017ZK3138)。

作者简介: 袁 河 (1989—), 男, 硕士, 工程师, 研究方向为食品质量与安全控制。

*通讯作者: 夏延斌 (1952—), 男, 博士, 国家二级教授, 博士生导师, 研究方向为食品质量与安全、食品化学与营养等。

的不确定度研究提供了参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

槟榔, 海南新鲜原果。

氢溴酸槟榔碱标准品 (纯度为 99.8%), 中国食品药品检定研究院提供; 甲醇 (色谱纯), 美国 TEDIA 公司提供; 磷酸、三乙胺 (色谱纯), 国药集团化学试剂有限公司提供; 十二烷基磺酸钠 (分析纯), 上海麦克林生化科技有限公司提供。

1260 Infinity 型配 UV 检测器, 美国安捷伦产品; KQ-700E 型超声波清洗机, 昆山美美超声仪器有限公司产品; 十万分之一分析天平、百分之一天平, 奥豪斯仪器有限公司产品。

1.2 试样制备与测定

(1) 将海南槟榔鲜果切开后放入干燥箱中于 60 ℃ 下恒温干燥至恒质量, 用粉碎机粉碎后, 密封干燥备用。

(2) 准确称取槟榔试样 1.0 g (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 30 mL 水, 超声提取 30 min, 冷却至室温后, 取上层清液用 0.45 μm 滤膜过滤, 滤液用于液相色谱仪分析。

1.3 标准溶液的配制

准确称取氢溴酸槟榔碱标准品 13.89 mg 于 100 mL 容量瓶中, 加超纯水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到质量浓度为 0.138 9 mg/mL 的氢溴酸槟榔碱标准储备液。

1.4 标准溶液工作曲线的绘制

准确移取 0.138 9 mg/mL 的氢溴酸槟榔碱标准储备液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 于 10 mL 容量瓶中并加蒸馏水定容至刻度。得到标准溶液系列质量浓度分别为 13.9, 27.8, 55.6, 83.3, 111.1, 138.9 μg/mL。与样品溶液同时用高效液相色谱仪分析测定其峰面积, 以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标, 用最小二乘法拟合得标准曲线方程 $Y=aX+b$ (a 为斜率, b 为截距) 与相关系数。

1.5 色谱条件

高效液相色谱条件为: 色谱柱 Hypersil BDS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL; 检测波长 215 nm; 流动相: 以水溶液 (1 L 水加入磷酸 1.0 mL, 十二烷基磺酸钠 10 g, 用三乙胺调节 pH 值至 3) 为流动相 A, 以甲醇为流动相 B。按流动相 A: 流动相 B=52:48 进行等度洗脱。

2 数学模型的建立

$$X=C \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000}$$

式中: X ——试样中槟榔碱含量, g/kg;

C ——由标准曲线得出的样液中待测组分的质量浓度, μg/mL;

V ——试样提取液总体积, mL;

m ——试样质量, g;

1 000——单位转换系数。

计算结果保留 3 位有效数字。

3 不确定度分量的主要来源

槟榔中槟榔碱含量测定的不确定度主要来自于标准储备液、标准曲线的拟合、样品的定容、样品称量、样品测量重复性及提取过程对样品回收率的影响。

4 不确定度的评估

4.1 标准储备液引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(c)$

标准储备液引入的不确定度主要包括标准物质纯度、标准物质的称量及标准物质的定容。

4.1.1 标准物质纯度引入的不确定度 $u(p)$

氢溴酸槟榔碱标准物质证书给出其纯度为 $p=99.8\%$, 假设其为矩形分布, 包含因子 $k_m=\sqrt{3}$, 则其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(p)=\frac{1-99.8\%}{\sqrt{3}}=0.12\%$$

4.1.2 标准物质称量引入的不确定度 $u(m)$

分析天平证书实际分度值 $d=0.01\text{mg}$, 区间半宽度 $\alpha_m=0.005\text{mg}$, 假设其为矩形分布, 包含因子 $k_m=\sqrt{3}$, 则其标准不确定度为:

$$u(m)=\alpha_m\sqrt{3}=2.89 \times 10^{-3}\text{mg}$$

称取氢溴酸槟榔碱标准物质的质量为 13.89mg, 则称量产生的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m)=\frac{u(m)}{m}=0.021\%$$

4.1.3 标准物质的定容引入的不确定度 $u(V)$

(1) 容量瓶引入的不确定度。氢溴酸槟榔碱标准品溶解定容至 100 mL 容量瓶中, 根据中华人民共和国国家计量检定规程 JJG 196—2006, $25 \pm 1\text{℃}$ 时 100 mL 单标线容量瓶 (A 级) 容量允差为 $\pm 0.10\text{mL}$, 假设其为矩形分布, 则 100 mL 容量瓶的不确定度为:

$$u(V_1)=\frac{0.10\text{mL}}{\sqrt{3}}=0.058\text{mL},$$

$$u_{\text{rel}}(V_1)=\frac{0.058\text{mL}}{100\text{mL}}=0.058\%$$

(2) 温度引入的不确定度。容量瓶的校准温度为 20 ℃, 实验室温度在 $20 \pm 5\text{℃}$ 变化。液体的体积膨胀明显大于容量瓶的体积膨胀, 因此只需考虑液

体的体积膨胀。因此容量瓶溶液温度与校准时温度不同所引起的体积变化为 $100 \text{ mL} \times 5 \text{ }^{\circ}\text{C} \times 2.08 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1} = 0.104 \text{ mL}$ ($2.08 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ 为水的膨胀系数), 假设其为矩形分布, 则温度对定容体积影响所引入的不确定度为:

$$u(V_2) = \frac{0.104 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.060 \text{ mL},$$

$$u(V_2) = \frac{0.060 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 0.060 \text{ } \%$$

因此定容体积引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(V_1) + U_{\text{rel}}^2(V_2)} = 0.083 \%,$$

由此得出标准储备液引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(c) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(p) + U_{\text{rel}}^2(m) + U_{\text{rel}}^2(V)} = 0.15 \%,$$

4.2 标准曲线的拟合引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(g)$

标准曲线引入的不确定度包括定容容器和标准曲线的拟合。

4.2.1 配制标准溶液所用的容器引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(b)$

分别用 2.0, 5.0, 10.0 mL 分度移液管从标准溶液中分别准确移取 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 溶液置于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度。

根据中华人民共和国国家计量检定规程 JJG 196—2006, 假设其为矩形分布。

量器校准引入的不确定度见表 1。

表 1 量器校准引入的不确定度

容器	最大允许误差 / mL	相对标准不确定度 / %
A 级 2.0 mL 分度移液管	$\pm 0.012 \text{ mL}$	$u_1(b) = 0.346$
A 级 5.0 mL 分度移液管	$\pm 0.015 \text{ mL}$	$u_2(b) = 0.173$
A 级 10.0 mL 分度移液管	$\pm 0.020 \text{ mL}$	$u_3(b) = 0.115$
10 mL 单标线容量瓶	$\pm 0.025 \text{ mL}$	$u_4(b) = 0.144$

因此容器引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(b) = \sqrt{U_1^2(b) + U_2^2(b) + U_3^2(b) + U_4^2(b)} = 0.43 \%,$$

4.2.2 标准曲线拟合引入的不确定度 $u(q)$

试验对 6 个不同质量浓度标准工作液进行测定, 记录所得峰面积与对应浓度。

标准曲线原始记录见表 2。

表 2 标准曲线原始记录

编号	氢溴酸槟榔碱 浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	峰面积 AU			
		1	2	3	平均值
1	13.9	290.7	293.0	293.3	292.3
2	27.8	612.8	600.2	603.9	605.6
3	55.6	1 226.1	1 210.5	1 219.3	1 218.8
4	83.3	1 827.0	1 815.6	1 810.1	1 817.6
5	111.1	2 433.4	2 418.2	2 410.9	2 420.8
6	138.9	3 020.0	3 029.6	3 035.3	3 028.3

采用最小二乘法对氢溴酸槟榔碱的浓度与其对应的平均峰面积进行线性回归, 得到氢溴酸槟榔碱

标准曲线: $Y = 21.84X - 3.34$, $R^2 = 0.999\ 97$ 。

对待测试样进行了 6 次测量, 由标准曲线方程求得待测液中氢溴酸槟榔碱的质量浓度 $C_{\text{氢溴酸槟榔碱}}$, 则 $C_{\text{氢溴酸槟榔碱}}$ 的标准不确定度为:

$$u(q) = \frac{S(A)}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_{\text{槟榔碱}} - C_{\text{氢溴酸槟榔碱}})^2}{S_{cc}}}$$

式中: $S(A) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (b + ac_j)]^2}{n-2}}$ 为标准工作液峰面积的残差的标准差;

$C = \frac{\sum_{j=1}^n C_j}{n}$ 为标准工作液的平均质量浓度;

$S_{cc} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2$ 为标准溶液含量的残差的平方和;

n 为标准溶液的测量次数, 试验为 18; p 为 $C_{\text{氢溴酸槟榔碱}}$ 的测量次数, 试验为 6。

$C_{\text{氢溴酸槟榔碱}}$ 的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(q) = \frac{u(q)}{C_{\text{槟榔碱}}}.$$

由最小二乘法拟合曲线求得 $C_{\text{氢溴酸槟榔碱}}$ 时所产生的标准不确定度 $u(q)$ 和相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(q)$ 。

标准曲线不确定度结果见表 3。

表 3 标准曲线不确定度结果

组分	氢溴酸槟榔碱	组分	氢溴酸槟榔碱
$C_{\text{氢溴酸槟榔碱}} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	110.3	$u(q)$	0.233
$S(A)$	8.61	$u_{\text{rel}}(q)$	0.21
S_{cc}	11 730		

由此得出标准曲线拟合引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(g) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(b) + U_{\text{rel}}^2(q)} = 0.48 \%,$$

4.3 样品定容引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(d)$

(1) 量筒引入的不确定度。由校准证书给出的 100 mL 量筒 (A 级) 的不确定度为 0.2 mL, 假设其为矩形分布, 则 100 mL 量筒引入的不确定度为:

$$u(d_1) = \frac{0.2 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.12 \text{ mL},$$

$$u_{\text{rel}}(d_1) = \frac{0.12 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 0.12 \%,$$

(2) 温度引入的不确定度。量筒溶液温度与校准时温度不同所引起的体积变化为 $100 \text{ mL} \times 5 \text{ }^{\circ}\text{C} \times 2.08 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1} = 0.104 \text{ mL}$ ($2.08 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ 为水的膨胀系数), 假设其为矩形分布, 则温度对体积影响所引入的不确定度为:

$$u(d_2) = \frac{0.104 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.060 \text{ mL},$$

$$u_{\text{rel}}(d_2) = \frac{0.060 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 0.060 \%,$$

因此样品定容引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(d) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(d_1) + U_{\text{rel}}^2(d_2)} = 0.13\%$$

4.4 样品称量引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(z)$

称取槟榔样品 1.00 g, 校准证书给出分析天平允差为 0.005 g, 假设其为矩形分布, 故由天平在样品称量时引入的不确定度为:

$$u(z) = \frac{0.005 \text{ g}}{\sqrt{3}} = 0.0029 \text{ g},$$

$$u_{\text{rel}}(z) = \frac{0.0029 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 0.29\%$$

4.5 样品测量重复性引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(e)$

分别称取 6 份同一槟榔样品 1.00 g, 测得样品中氢溴酸槟榔碱的含量, 假设其为矩形分布。

样品 6 次平行测定结果见表 4。

表 4 样品 6 次平行测定结果

	平行测定结果					
	3.30	3.31	3.32	3.29	3.30	3.34
平均含量 $\bar{x}$	3.31					
标准偏差 $S(e)$	0.016					

由表 4 得出, 测量重复性引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(e) = \frac{S(e)}{\bar{x}} = 0.49\%$$

4.6 提取过程对样品回收率的影响所引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(C_{\text{Rec}})$

样品提取过程的回收率经对该样品所测的物质进行 9 次回收试验, 得平均回收率为 102.3%, 其标准偏差 4.21%。其标准不确定度采用平均标准偏差, 其回收率的相对不确定度为:

$$u(C_{\text{Rec}}) = \frac{s(C_{\text{Rec}})}{\sqrt{n}} = \frac{0.00421}{3} = 0.14\%,$$

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{Rec}}) = \frac{s(C_{\text{Rec}})}{\bar{C}_{\text{Rec}}} = \frac{0.14\%}{102.3\%} = 0.14\%.$$

提取过程回收率结果分析见表 5。

表 5 提取过程回收率结果分析

	回收率 / %							
	105.7	108.6	97.1	101.5	108.2	102.2	98.8	102.1
平均回收率 $\bar{R}_{\text{ec}}$ / %	102.3							

4.7 合成标准不确定度

上述各分量相对不确定度合成槟榔碱含量的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(x) =$$

$$\sqrt{u_{\text{rel}}^2(C) + u_{\text{rel}}^2(g) + u_{\text{rel}}^2(d) + u_{\text{rel}}^2(z) + u_{\text{rel}}^2(e) + u_{\text{rel}}^2(C_{\text{Rec}})} = 0.78\%.$$

4.8 扩展不确定度

相对扩展不确定度在 95%, 置信水平下取包含因子 $k=2$, 得相对扩展不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(X) = k \times u_{\text{rel}}(x) = 2 \times 0.78\% = 1.56\%.$$

槟榔样品中槟榔碱含量为 3.31g/kg, 得扩展不确定度为:

$$U = 3.31 \text{ g/kg} \times 1.56\% = 0.052 \text{ g/kg}.$$

综上可得, 槟榔样品中槟榔碱含量不确定度为: $3.31 \pm 0.052 \text{ g/kg}$ ($k=2$)。

5 结论

槟榔中槟榔碱的测定的不确定度来源主要为标准储备液、标准曲线的拟合、样品的定容、样品称量、样品测量重复性及提取过程对样品回收率的影响。从不确定度的评定结果来看, 标准曲线的拟合和样品测量重复性引入的不确定度最大, 可以通过以下途径降低测定结果的不确定度:

- ①增强试验人员的技术能力, 提高其操作稳定性;
- ②多维护保养仪器, 尽量提高仪器的精密密度;
- ③尽量保持试验温度的稳定性, 减少随机误差。

参考文献:

- [1] 李习雄, 胡冠英, 张三印. 槟榔毒性机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (19): 212-216.
- [2] 熊雄, 李珂, 易书瀚, 等. 食用槟榔中槟榔碱毒性及生理活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2017, 38 (20): 328-335.
- [3] 张爱华, 李立, 何昌浩, 等. 低浓度槟榔碱杀螺作用的实验观察 [J]. 中国病原生物学杂志, 2007 (6): 475-476.
- [4] 高义军, 凌天牖, 尹晓敏, 等. 槟榔碱诱导口腔角质形成细胞凋亡研究 [J]. 口腔医学研究, 2007 (6): 624-627.
- [5] 王斌, 杨大伟, 匡理. 槟榔生理活性及危害控制研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39 (10): 219-224.
- [6] Huang J L, Mcleish M J. High-performance liquid chromatographic determination of the alkaloids in betel nut [J]. Journal of Chromatography A, 1989 (2): 447-450. ◇

(上接第 61 页)

cane sugar [J]. Agricultural and Food chemistry, 1959(5): 353-354.

- [3] Chavan S M, Kumar A, Jadhav S J. Rapid quantitative analysis of starch in sugar cane juice [J]. International Sugar Journal, 1991 (2): 56-58.

- [4] 黄立新, 杨松青. 白砂糖中微量淀粉的测定 [J]. 甘蔗糖业, 1998 (3): 28-33.
- [5] 陈骏佳, 班甲, 胡雪梅. 蔗汁与糖浆中淀粉含量测定的新方法研究 [J]. 甘蔗糖业, 2011 (3): 27-29.
- [6] 陈其斌. 甘蔗糖手册 (上册) [M]. 北京: 轻工业出版社, 1987: 75-80. ◇