

DOI:10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20180612.001

许思思,张森,郑鹏,等. 甲醇中胆固醇溶液标准物质的研制[J]. 广西科学院学报,2018,34(2):161-165.

XU S S,ZHANG S,ZHENG P,et al. Preparation of reference material of cholesterol in methanol[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences,2018,34(2):161-165.

## 甲醇中胆固醇溶液标准物质的研制

# Preparation of Reference Material of Cholesterol in Methanol

许思思,张森,郑鹏,郭波,李锋丽,何云馨

XU Sisi,ZHANG Sen,ZHENG Peng,GUO Bo,LI Fengli,HE Yunxin

(山东省计量科学研究院,山东济南 250014)

(Shandong Institute of Metrology, Jinan, Shandong, 250014, China)

**摘要:**【目的】研究甲醇中胆固醇溶液标准物质的制备方法。【方法】运用重量-容量法采用胆固醇纯度标准物质和甲醇制备甲醇中胆固醇溶液标准物质,采用配制值作为标准值,运用液相色谱法对研制的标准物质进行均匀性、稳定性检验和量值核验。【结果】研制的甲醇中胆固醇溶液标准物质具备很好的均匀性,分别贮存于4℃和60℃条件下7 d内短期稳定性合格,在16个月内长期稳定性良好。【结论】研制的甲醇中胆固醇溶液标准物质符合国家二级标准物质的要求,标准值为200 μg/mL( $U_{rel}=2\%$ ,  $k=2$ ),可用于测量仪器的校准、测量过程质量控制及分析方法确认和评价。

**关键词:**胆固醇 液相色谱法 制备 标准物质

**中图分类号:**O656.3,O69 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2018)02-0161-05

**Abstract:**【Objective】The preparation method of reference material of cholesterol in methanol was studied. 【Methods】Using method of gravimetric-volumetric and materials of purity standard material of cholesterol and methanol, the reference material of cholesterol in methanol was prepared. The preparation concentration was used as the reference value. The content of cholesterol in methanol and the homogeneity and stability of the content of the reference material was determined by Liquid chromatography. 【Results】Results showed that the concentration of cholesterol of the reference material exhibited good uniformity, and showed good stability after storage at 4℃ and 60℃ for 7 d, respectively, also had good long term stability in 16 months. 【Conclusion】The cholesterol solution in methanol prepared in the study met the requirements of the national secondary certified reference material with the reference value of 200 μg/mL ( $U_{rel}=2\%$ ,  $k=2$ ). It could be used for calibration of instrument, quality control of measurement, and confirmation and evaluation of analysis method. **Key words:**cholesterol, liquid chromatography, preparation, reference material

## 0 引言

【研究意义】胆固醇作为影响健康的重要物质<sup>[1-3]</sup>,不仅是疾病控制领域的重要检测对象,也是计量领域液相色谱仪器检定的重要物质。标准物质作为一种计量器具,由于其量值准确可靠,溯源链清晰,对于准确检测胆固醇含量和保证仪器的计量准确具有重要意义。【前人研究进展】目前,常见的胆

收稿日期:2017-11-03

修回日期:2018-04-11

作者简介:许思思(1985—),女,高级工程师,博士,主要从事化学计量和标准物质研究,E-mail:sisixu2008@163.com。

固醇测定方法有液相色谱法(紫外检测器、蒸发光检测器)和液相色谱-质谱联用法<sup>[4-7]</sup>,运用液相色谱紫外检测法对胆固醇标准物质进行均匀性、稳定性检验和量值核验的文献较少。【本研究切入点】本研究根据相关技术规范<sup>[8-12]</sup>,基于液相色谱紫外检测法对甲醇中胆固醇溶液标准物质进行研制。【拟解决的关键问题】通过重量-容量法制备甲醇中胆固醇溶液标准物质,并运用液相色谱法进行均匀性、短期稳定性、长期稳定性检验和量值核验,研制了甲醇中胆固醇溶液标准物质,标准值为  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $U_{\text{rel}} = 2\%$ ,  $k = 2$ ),用于测量仪器校准、测量过程质量控制及分析方法确认和评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

胆固醇:采用中昊光明化工研究设计院有限公司研制的二氧化硫纯度标准物质,其编号为 GBW (E)060063,纯度标准值为 99.99%,相对扩展不确定度为 0.01% ( $k = 2$ )。

甲醇:采用德国进口的 Merck 无水甲醇试剂。

#### 1.1.2 仪器

气相色谱-质谱联用仪: GCMS-QP 2010 Ultra; 色谱柱(Rtx-5MS,  $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm ID} \times 0.25 \mu\text{m}$ ); 液相色谱仪: LC-20AT 泵, SPD-20A 紫外检测器; 色谱柱(C18 色谱柱); 天平: 电子天平(AE200, METTLER TOLEDO); 电子天平(CPA225D, Sartorius); 精密恒温水浴: YCC-1, 宁波天恒; 空盒气压表: DYM3, 长春气象局; 容量瓶: 1 000 mL, A 级合格; 一等标准密度计:  $0.65 \sim 1.95 \text{ g}/\text{cm}^3$ , 浙江余姚比重计厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 甲醇测试方法

测试条件: 进样口温度  $280^\circ\text{C}$ , 分流比 100 : 1, 柱流量  $1.0 \text{ mL}/\text{min}$ , 载气为 He; 程序升温方式: 在  $35^\circ\text{C}$  保持 4 min, 然后以  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  速率升至  $100^\circ\text{C}$ , 再以  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  升至  $280^\circ\text{C}$ 。测试结果如图 1 所示。

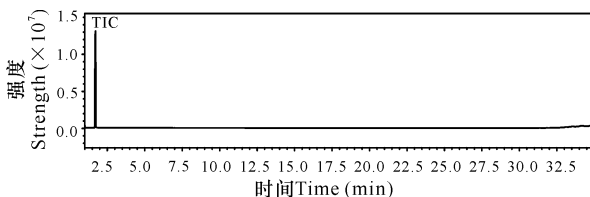


图1 甲醇的气相色谱-质谱联用法测试色谱图

Fig. 1 Chromatogram of methanol measured using gas chromatography-mass spectrometry

#### 1.2.2 胆固醇测试方法

均匀性、短期稳定性和长期稳定性检验测量条件: 流动相为 100% 甲醇, 流速  $1.0 \text{ mL}/\text{min}$ , 检测波长  $207 \text{ nm}$ , 柱温  $40^\circ\text{C}$ 。

#### 1.2.3 制备

用十万分之一天平准确称取  $0.20060 \text{ g}$  的胆固醇纯度标准物质, 用色谱纯甲醇溶解并定容至  $1000 \text{ mL}$  容量瓶中, 混匀。配制时, 容量瓶和甲醇试剂放在  $20^\circ\text{C}$  的恒温水浴中, 保证容量瓶和甲醇试剂体积的准确。

将甲醇中胆固醇溶液标准物质转移至分装玻璃试剂瓶中, 先放在冰箱里于  $4^\circ\text{C}$  避光静置, 然后运用瓶口分液器移取  $3 \text{ mL}$  标准溶液至各  $5 \text{ mL}$  棕色安瓿瓶中, 迅速对安瓿瓶进行封口, 分装时环境温度为  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ , 环境湿度为  $(40 \pm 10)\%$ 。配制  $1000 \text{ mL}$  标准溶液共分装甲醇中胆固醇溶液标准物质 200 瓶。该标准物质需冷藏保存。

#### 1.2.4 短期稳定性检验

为评估在短期运输条件下标准物质的稳定性, 对研制的标准物质进行了短期稳定性试验。将甲醇中胆固醇溶液标准物质分别随机抽取样品, 放在  $4^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$  贮存 7 d, 其中  $4^\circ\text{C}$  通过放在冰箱中实现,  $60^\circ\text{C}$  通过放在烘箱中实现。在这 7 d 内, 分别在第 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 天放置随机抽取的样品, 于第 8 天统一测试。

用液相色谱仪紫外检测器对所抽取的各个样品进行测定, 重复测定 3 次。测量前, 先将标准物质样品避光放置在室温条件下平衡一段时间。各样品胆固醇的浓度值基于峰面积由新配制的甲醇中胆固醇溶液标准物质作为标准, 将各测试值换算为浓度值。

#### 1.2.5 长期稳定性

为了评价标准物质的稳定性, 在贮存期间必须定期对标准物质进行抽样测定(贮存条件为存放于阴凉避光的室温条件下)。在每一次抽样测量过程中, 运用液相色谱法测试各样品中胆固醇的含量, 并控制环境条件尽量一致, 使测量结果之间的差异着重反映出物质变化所引起的差异。根据“一级标准物质技术规范”的要求, 对研制的甲醇中胆固醇溶液标准物质, 基于先密后疏的原则, 进行 16 个月的稳定性检验。

基于色谱峰面积, 采用新配制的  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  的甲醇中胆固醇溶液标准物质作为标准给测试的样品浓度进行赋值。

### 1.2.6 定值及不确定度计算

本标准物质采用配制值作为标准值。该标准物质以中国计量科学研究院研制的胆固醇纯度标准物质和高纯度甲醇为原料,在室温为 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的洁净室中,采用重量-容量法配制。胆固醇纯度标准物质的纯度值采用标准物质证书中给定的纯度值(标准值 99.7%,  $U_{\text{rel}} = 0.1\%$  ( $k = 2$ ))。另外,使用的经检定合格的单标线移液管、容量瓶、精密恒温水浴和十万分之一天平称配制该标准物质。

$$C = \frac{m \times P \times 10^{-6}}{V}, \quad (1)$$

配制的甲醇中胆固醇溶液标准物质的标准值满足式(1)。其中,  $C$  为甲醇中胆固醇溶液标准物质的标准值,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $m$  为胆固醇纯度标准物质的称量质量,  $\text{g}$ ;  $V$  为容量瓶的定容体积,  $\text{mL}$ ;  $P$  为胆固醇纯度标准物质的纯度值, %。由式(1)计算可得,配制的甲醇中胆固醇溶液标准物质的标准值  $C$  为  $200.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

标准物质的合成标准不确定度  $u_c$  包括其定值过程引入的不确定度  $u_c(C)$ 、标准物质的不均匀性引入的不确定度  $u_{bb}$  和标准物质的稳定性引入的不确定度  $u_s$ , 见式(2)。其中,由式(1)可得配制过程引入的不确定度  $u_c(C)$  的计算公式见式(3);均匀性引起的不确定度见式(4);稳定性引入的不确定度  $u_s$  由  $u_{s,长}$  (式 5) 和  $u_{s,短}$  (式 6) 合成而得。

$$u_c = \sqrt{u_c^2(C) + u_{bb}^2 + u_s^2}, \quad (2)$$

$$\left\{ \frac{u_c(C)}{C} \right\}^2 = \left\{ \frac{u_c(m)}{m} \right\}^2 + \left\{ \frac{u_c(P)}{P} \right\}^2 + \left\{ \frac{u_c(V)}{V} \right\}^2, \quad (3)$$

$$u_{bb} = s_{bb} = \sqrt{\frac{s_1^2 - s_2^2}{n}}, \quad (4)$$

$$u_{s,长} = s(\beta_{1,长}) \cdot x_{长}, \quad (5)$$

$$u_{s,短} = s(\beta_{1,短}) \cdot x_{短}。 \quad (6)$$

### 1.2.7 验证

该标准物质研制完成后,运用中国计量科学研究院研制的甲醇中胆固醇溶液标准物质(编号 GBW(E) 130405, 标准值为  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $U_{\text{rel}} = 2.0\%$ ,  $k = 2$ )对该标准物质样品进行验证。根据峰面积运用 GBW(E) 130405 标准物质对研制的标准物质的量值进行核校。

## 2 结果与分析

### 2.1 均匀性和稳定性检验

如表 1 所示,取显著水平  $\alpha = 0.05$ ,由  $F_\alpha$  数值表可知  $F_\alpha(0.05, 14, 30) = 2.04$ 。各样品胆固醇的浓度值基于峰面积由新配制的  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  甲醇中胆固醇溶液标准物质作为标准换算为浓度值。由表 1 中统计结果可知,统计量  $F$  小于  $F_\alpha$ ,因此可以判断所制备的标准物质是均匀的。

由表 2 和图 2 可知,胆固醇浓度没有显著变化。因此,研制的甲醇中胆固醇溶液标准物质在  $4^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$  贮存 7 d 内其特征量值是稳定的。由表 2 可知,甲醇中胆固醇的浓度没有显著变化,因此其在 16 个月的时间内其特征量值是稳定的。

表 1 甲醇中胆固醇溶液标准物质均匀性检验结果 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Table 1 Homogeneity test result of cholesterol in methanol ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

$n$ $m$	1	2	3	平均值 Average
1	201.2	199.7	200.6	200.5
2	200.5	200.2	199.1	199.9
3	200.8	200.4	200.0	200.4
4	199.1	200.1	200.3	199.9
5	199.6	200.0	200.5	200.0
6	200.4	200.0	200.4	200.3
7	199.7	199.4	198.5	199.2
8	200.1	199.9	201.8	200.4
9	199.6	199.7	200.0	199.7
10	200.6	200.5	200.9	200.7
11	201.1	200.6	199.4	200.4
12	200.9	200.5	201.4	200.9
13	200.2	21.9	200.7	201.0
14	200.0	199.9	199.6	199.8
15	200.3	200.3	200.2	200.3

Statistical result:  $m = 15, n = 3, \nu_1 = 14, \nu_2 = 30, Q_1 = 9.4698, Q_2 = 10.5733, F = 1.92, F_\alpha(0.05, 14, 30) = 2.04, F < F_\alpha(0.05, 14, 30)$ , uniformity test passed.

表2 甲醇中胆固醇溶液标准物质稳定性检验统计结果

Table 2 Statistical results of stability test of cholesterol in methanol

项目 Category	统计结果 Statistical results	结论 Conclusion
短期稳定性检验 Short term stability test	4℃ $\beta_1=0.0488, \beta_0=199.94, s=0.2116,$ $s(\beta_1)=0.0327, t_{0.95,6}=2.45, t_{0.95,6} \cdot s(\beta_1)=0.08$	$ \beta_1  < t_{0.95, n-2} \cdot s(\beta_1)$ Qualified
	60℃ $\beta_1=-0.05119, \beta_0=200.07, s=0.2578,$ $s(\beta_1)=0.0398, t_{0.95,6}=2.45, t_{0.95,6} \cdot s(\beta_1)=0.09745$	$ \beta_1  < t_{0.95, n-2} \cdot s(\beta_1)$ Qualified
长期稳定性检验 Long term stability test	$\beta_1=0.014, \beta_0=199.99, s=1.072,$ $s(\beta_1)=0.065, t_{0.95,10}=2.23, t_{0.95,10} \cdot s(\beta_1)=0.145$	$ \beta_1  < t_{0.95, n-2} \cdot s(\beta_1)$ Qualified

注： $\beta_1$ 表示斜率， $\beta_0$ 表示截距， $s$ 表示直线标准偏差； $s(\beta_1)$ 表示斜率不确定度

Note:  $\beta_1$  indicates slope,  $\beta_0$  indicates intercept,  $s$  indicates straight line standard deviation,  $s(\beta_1)$  indicates uncertain slope

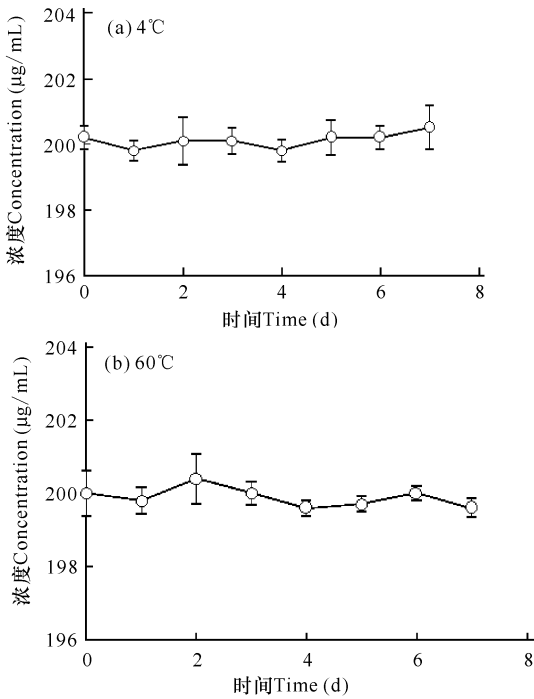


图2 短期稳定性变化示意图

Fig. 2 Short-term stability changes

2.2 定值及验证

根据 1.2.6 节的方法计算可得  $u_c$  等于 0.75 mg/L。甲醇中胆固醇溶液标准物质的浓度为 200.0 µg/mL。取包含因子  $k=2$ ，其扩展不确定度  $U_{rel}=2 \times u_c/C=2 \times 0.75/100 \approx 2\%$ ，见表 3。对研制的标准物质进行验证，测量色谱图见图 3 和图 4。研制样品的测量浓度与偏差等于 0.08%，小于其不确定度，故验证合格。

表3 合成标准不确定度及扩展不确定度

Table 3 Combined standard uncertainty and extended uncertainty

不确定度 Uncertainty	数值 Value
$u_c(C)$	0.13 µg/mL
$u_{bb}$	0.33 µg/mL
$u_s$	0.67 µg/mL
$u_c$	1.14 µg/mL
$U_{rel}$	2%

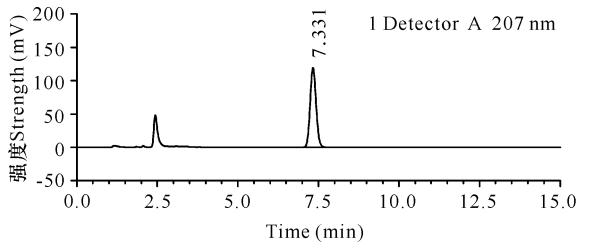


图3 研制样品测量色谱图

Fig. 3 Measurement chromatograms of samples prepared in the study

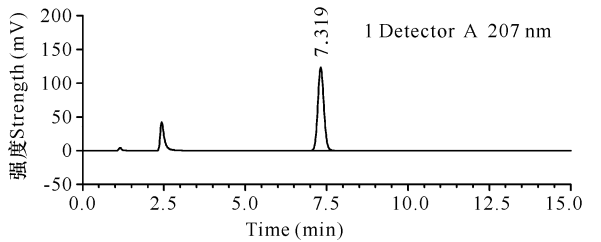


图4 国家标准物质 GBW(E)130405 测量色谱图

Fig. 4 Measurement chromatograms of state certified reference material reference material (GBW(E)130405)

### 3 结论

本研究运用称量-容量法制备了甲醇中胆固醇溶液标准物质。研制的标准物质具有很好的瓶间和瓶内均匀性,在 4℃ 和 60℃ 条件贮存一周,其量值稳定,表明短期运输条件下的稳定性可靠;在 16 个月内,其浓度稳定,具有很好的长期稳定性。测出的甲醇中胆固醇溶液标准物质结果:标准值为 200 mg/L,  $U_{rel} = 2\%$ ,  $k = 2$ 。

#### 参考文献:

- [1] 陈全斌,沈钟苏,韦正波,等. 罗汉果黄酮的活血化瘀药理作用研究[J]. 广西科学, 2005, 12(4): 316-319.  
CHEN Q B, SHEN Z S, WEI Z B, et al. Study on the pharmacological function of stimulate circulation to end stasis of flavone from *Momordica grosvenori*[J]. Guangxi Sciences, 2005, 12(4): 316-319.
- [2] 吴尤娇,黄敏桃,黄云峰,等. 毛茛金乙醇提取物降血脂作用研究[J]. 广西科学, 2015, 22(2): 130-134.  
WU Y J, HUANG M T, HUANG Y F, et al. Antihyperlipidosis effects of ethanol extract from *Curcuma aromatica*[J]. Guangxi Sciences, 2015, 22(2): 130-134.
- [3] 罗蔓,吴杰,杨海珉,等. 人体胆囊结石超微结构的观察研究[J]. 广西科学, 2001, 8(2): 124-126.  
LUO M, WU J, YANG H M, et al. Micro-structure of gall stone of human body[J]. Guangxi Sciences, 2001, 8(2): 124-126.
- [4] 辜英杰,吴锐,闫世平,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定食品中胆固醇含量[J]. 分析测试学报, 2006, 25(6): 98-100.  
GU Y J, WU R, YAN S P, et al. Determination of cholesterol in foods by HPLC with evaporative light-scatter detector [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2006, 25(6): 98-100.
- [5] 徐锐锋,徐蓓,方向,等. 血清中胆固醇的国际比对--CCQM-K6 的 IDMS 法测量[J]. 化学分析计量, 2001, 10(2): 5-7.  
XU R F, XU B, FANG X, et al. Measurement of CCQM-K6 key international comparison on the determination of cholesterol in human serum by GC/IDMS method[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2001, 10(2): 5-7.
- [6] 何海红. 高效液相色谱用蒸发光散射检测器检定方法研究[J]. 化学分析计量, 2010, 19(2): 78-80.

HE H H. Test method of evaporative light scattering detector for high performance liquid chromatography [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2010, 19(2): 78-80.

- [7] 荀其宁,张文申,侯倩倩,等. 液相色谱仪检定用甲醇中胆固醇标准物质的研制[J]. 化学分析计量, 2015, 24(2): 13-15.  
XUN Q N, ZHANG W S, HOU Q Q, et al. Preparation of cholesterol in methanol reference materials for liquid chromatography verification[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2015, 24(2): 13-15.
- [8] 国家标准物质管理委员会. 中华人民共和国标准物质目录[M]. 北京: 中国质检出版社/中国标准出版社 2013.  
National Management Committee of Reference Materials. List of reference materials, the People's Republic of China [M]. Beijing: China Quality Inspection Press/China Standards Press, 2013.
- [9] 国家标准物质管理委员会. 标准物质的研制管理与应用[M]. 北京: 中国计量出版社, 2010.  
National Management Committee of Reference Materials. Development, management and application of reference materials [M]. Beijing: China Quality Inspection Press, 2010.
- [10] 阚莹,李红梅,孟凡敏,等. 标准物质定值的通用原则及统计学原: JJF 1343-2012[S]. 北京: 中国质检出版社, 2012.  
KAN Y, LI H M, MENG F M, et al. General and statistical principles for characterization of reference materials: JJF 1343-2012[S]. Beijing: China Quality Inspection Press, 2012.
- [11] 国家标准物质管理委员会. 标准物质定值原则和统计学原理[M]. 北京: 中国质检出版社, 2011.  
National Management Committee of Reference Materials. Principles of certification and statistics of reference materials [M]. Beijing: China Quality Inspection Press, 2011.
- [12] 李红梅. 标准物质质量控制及不确定度评定[M]. 北京: 中国质检出版社/中国标准出版社, 2014.  
LI H M. Quality control and uncertainty evaluation of reference materials [M]. Beijing: China Quality Inspection Press/China Standards Press, 2014.

(责任编辑: 陆 雁)