

分光光度法测定桑黄中总黄酮的不确定度评定

华晶忠¹, 王莹², 王嵩², 刘笑笑^{2*}

(1. 吉林省经济管理干部学院, 长春 130012; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘要: **目的** 评定分光光度法测定桑黄中总黄酮的不确定度。**方法** 依据 JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》的方法, 建立相应的数学模型。对测量过程中可能引入不确定度的来源进行分析与计算, 进而合成相对不确定度和扩展不确定度。**结果** 标准曲线是不确定度主要来源, 其中曲线拟合所占比例最大。**结论** 在总黄酮测定过程中, 要注意选择线性好的标准曲线。
关键词: 分光光度法; 桑黄; 总黄酮; 不确定度评定

Evaluation of uncertainty in determination of total flavone in *Phellinus* spp. by spectrophotometer

HUA Jing-Zhong¹, WANG Ying², WANG Song², LIU Xiao-Xiao^{2*}

(1. Jilin Academy of Economic Management Cadre, Changchun 130012, China;
2. Jilin Academy of Agricultural Science, Changchun 130033, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of determination of caffeine in total brass using phellinus linteus spectrophotometer. **Methods** According to JJF1059.1-2012 *evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement*, a mathematical model was established to determine the uncertainty of total brass in phellinus linteus spectrophotometer. The sources of uncertainty which may be introduced into the measurement process were analyzed and calculated, and then the relative uncertainty and extended uncertainty were synthesized. **Results** The standard curve was a major source of uncertainty, curve fitting account for the largest proportion. **Conclusion** In the determination process of total flavonoids, care should be taken to select a good linear standard curve.

KEY WORDS: spectrophotometry; *phellinus* spp.; total flavone; uncertainty evaluation

1 引言

桑黄是一种珍贵的食、药两用型真菌, 具有降血脂、提高免疫力、保护肝脏等多种功能^[1-8], 总黄酮是桑黄中的有效活性成分, 用来评价桑黄质量的重要指标之一^[9], 对桑黄中总黄酮含量测定及不确定度评定十分必要。

测量不确定度直接影响检测结果的判定^[10,11], 且

GB/T 27025-2008《检测和校准实验室能力的通用要求》^[12]中规定, 必要时需提供测定结果不确定度。本文根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》和 CNAS-GL 06:2019《化学分析中不确定度的评估指南》规定^[13,14], 对分光光度法测定桑黄中总黄酮含量进行不确定度评定, 分析影响测定结果的关键因素, 提高检测结果的准确度。

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2018ZY004)

Fund: Supported by the Science and Technology Innovation Engineering Project of Jilin Agricultural(CXGC2018ZY004)

*通讯作者: 刘笑笑, 助理研究员, 主要研究方向为农产品质量安全研究。E-mail: 843202215@qq.com

*Corresponding author: LIU Xiao-Xiao, Assistant Professor, Jilin Academy of Agricultural Science, No.1363 Ecological Street, Jingyue Economic Development Zone, Changchun 130033, China. E-mail: 843202215@qq.com

2 材料与方法

2.1 实验材料

桑黄,栽培种植,一年生,吉林省通化市神芝健生物科技有限公司。

2.2 试剂

芦丁(优级纯,中国药品生物制品检定所);乙醇(分析纯)、醋酸钾(分析纯)、冰乙酸(优级纯)(国药集团化学试剂有限公司);水为超纯水。

2.3 仪器设备

VF 611 超纯水系统(德国 SARTORIUS 公司);T6 新世纪分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);BT 124S 电子天平[中国赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

2.4 实验方法

2.4.1 方法原理

溶于乙醇的黄酮类化合物在弱碱性条件下,与显色剂三价铝离子络合形成黄色物质,在波长 415 nm 处有最大吸收峰,总黄酮含量与吸光度成正比,以芦丁为对照品,用分光光度计测定总黄酮的含量。

2.4.2 试样制备

准确称取样品 2.0 g,置于 150 mL 具塞磨口三角瓶中,加 30 mL 95%乙醇,50 °C 超声 30 min,趁热过滤,收集滤液于 100 mL 容量瓶中,重复 3 次,用 95%乙醇定容至刻度,备用。

吸取上述试液 1.0 mL 于 50 mL 具塞比色管中,加入 2.0 mL 三氯化铝溶液(2.5 g/100 mL),再加入 2.0 mL 醋酸钾溶液(9.82 g/100 mL),混匀,用 30%乙醇定容至刻度,30 min 内于波长 415 nm 处测吸光度。同时做试剂空白。

2.4.3 标准曲线配制

称取 0.0100 g 芦丁标准品,用 95%乙醇溶解,移入 100 mL 容量瓶中,用 95%乙醇定容至刻度,混匀。得到每毫升相当于 0.1 mg 的芦丁储备液。

吸取 20.00 mL 芦丁标准储备液,置于 100 mL 容量瓶中,用 95%乙醇定容至刻度,混匀。每毫升相当于 0.02 mg 的芦丁使用液。

分别吸取 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 芦丁使用液于 50 mL 具塞比色管中,加入 2.0 mL 三氯化铝溶液,再加入 2.0 mL 醋酸钾溶液,混匀,用 30%乙醇定容至刻度,用零管调零,30 min 内于波长 415 nm 处测吸光度,绘制标准曲线。

2.4.4 仪器工作条件

选择 1 cm 比色杯,波长 415 nm,以零管做参比,测定吸光度。

3 结果与分析

3.1 不确定度分析

3.1.1 建立数学模型

桑黄中总黄酮含量计算公式:

$$X = \frac{A}{m \times \frac{V_1}{V_2}} \times 1000$$

式中:

X ——试样中总黄酮的含量(以芦丁计), mg/g;

A ——测定用样液中芦丁的质量, mg;

m ——试样的质量, g;

V_1 ——测定用样液体积, mL;

V_2 ——试样处理液总体积, mL。

3.1.2 不确定度的来源

按照测定步骤和数学模型,根据 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[13],分析可能引入不确定度的来源如下:

(1)样品溶液制备引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{制}})$,包括称量样品、提取、显色、定容过程;

(2)绘制标准曲线引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{标}})$,包括标准品纯度、标准储备液、工作液、系列曲线配制以及曲线拟合过程;

(3)重复测定引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{重}})$;

(4)仪器引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{仪}})$ 。

3.2 不确定度分量的评定

3.2.1 样品溶液制备引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{制}})$

3.2.1.1 样品称量引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(m)$

电子天平是此步可能引入不确定度的主要因素。由说明书可知,天平最大允许误差为 ± 0.15 mg,按矩形分布计算。

电子天平引入的不确定度 $u(m)$ 为:

$$u(m) = \frac{a}{k} = \frac{0.15 \text{ mg}}{\sqrt{3}} = 0.0866 \text{ mg}$$

电子天平引入的相对不确定度 $U_{\text{rel}}(m)$ 为:

$$U_{\text{rel}}(m) = \frac{u(m)}{m} = \frac{0.0866 \text{ mg}}{2000 \text{ mg}} = 0.0000433$$

3.2.1.2 样品提取、显色过程引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{提}})$

此步引入的不确定度主要是容量器具(1 mL 吸管、50 mL 具塞比色管和 100 mL 容量瓶)以及温度变化。其中,1 mL 吸管共用了 5 次,避免重复评定,只计算 1 次。依据 JJG 196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[15],20 °C 时,A 级各种容量器具的不确定度分量,按矩形分布计算,取 $\sqrt{3}$ 。温度缺乏精确控制产生的不确定度,假设温度波动范围为 ± 5 °C,水的膨胀系数为 2.1×10^{-4} °C,计算不确定度和相对不确定度,结果见表 1。

$$U_{\text{rel}}(C_{\text{提}}) = \sqrt{[U_{\text{rel}}(V_{1\text{吸}})]^2 + [U_{\text{rel}}(V_{50\text{具}})]^2 + [U_{\text{rel}}(V_{100\text{容}})]^2}$$
$$= 0.00715$$

$$U_{\text{rel}}(C_{\text{制}}) = \sqrt{[U_{\text{rel}}(m)]^2 + [U_{\text{rel}}(C_{\text{提}})]^2} = 0.00715$$

3.2.2 绘制标准曲线引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{标}})$

3.2.2.1 标准品纯度引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(\rho_1)$

由芦丁标准物质证书可知, 芦丁标准品纯度 $\geq 99.2\%$, 按矩形分布计算。

芦丁标准品纯度不确定度 $U_{\text{rel}}(\rho_1)$ 为:

$$U_{\text{rel}}(\rho_1) = \frac{100\% - 99.2\%}{\sqrt{3}} = 0.00462$$

3.2.2.2 配制标准溶液引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(\rho_2)$

配制标准溶液引入的不确定度主要包括 2 个过程, 一是储备液; 二是工作液。

配制标准储备液是称量 0.01 g 芦丁引入的相对不确定度 $U_{\text{rel}}(m_1)$, 计算方法同 3.2.2.1。

$$U_{\text{rel}}(m_1) = \frac{0.0866 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} = 0.00866$$

配制标准溶液过程中使用了 100 mL 容量瓶和 10 mL 吸管。引入的相对不确定度 $U_{\text{rel}}(V)$, (见表 2):

$$U_{\text{rel}}(V) = \sqrt{[U_{\text{rel}}(V_{10\text{吸}})]^2 + [U_{\text{rel}}(V_{100\text{容}})]^2} = 0.00155$$

配制标准溶液引入的相对不确定度 $U_{\text{rel}}(\rho_2)$ 为:

$$U_{\text{rel}}(\rho_2) = \sqrt{[U_{\text{rel}}(m)]^2 + [U_{\text{rel}}(V)]^2} = \sqrt{0.00866^2 + 0.00155^2} = 0.00880$$

3.2.2.3 标准曲线配制引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(\rho_3)$

标准曲线配制过程中使用了 1 mL 吸管、5 mL 吸管和 50 mL 具塞比色管, 各自引入的相对不确定度(见表 1 和 2)。

配制标准曲线引入的相对不确定度 $U_{\text{rel}}(\rho_3)$ 为:

$$U_{\text{rel}}(\rho_3) = \sqrt{[U_{\text{rel}}(V_{1\text{吸}})]^2 + [U_{\text{rel}}(V_{5\text{吸}})]^2 + [U_{\text{rel}}(V_{50\text{具}})]^2} = 0.00734$$

3.2.2.4 标准曲线拟合引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{拟}})$

标准曲线拟合引入的不确定度采用最小二乘法进行评定, 标准溶液中芦丁质量在 0.00~0.10 mg 时, $Y=0.6392X-0.002$, 标准溶液中芦丁质量和吸光度值计算见表 3。

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{Y}_{0i} - Y_{0i})^2}{n-2}} = 0.00448$$

标准曲线拟合引入的不确定度为:

$$u(C_{\text{拟}}) = \frac{S_R}{b} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{m} - \bar{m}_{0i})^2}{\sum_{i=1}^n (\bar{m}_{0i} - \bar{m}_{0i})^2}} = 1.155$$

标准曲线拟合引入的相对不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(C_{\text{拟}}) = \frac{u(C_{\text{拟}})}{\bar{m}} = 0.0398$$

绘制标准曲线合成不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(C_{\text{标}}) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(\rho_1) + U_{\text{rel}}^2(\rho_2) + U_{\text{rel}}^2(\rho_3) + U_{\text{rel}}^2(C_{\text{拟}})} = 0.0417$$

表 1 器具引入的相对不确定度

Table 1 Relative uncertainty introduced by capacity apparatus

项目	容量允差/mL	容量校正不确定度/mL, $V_{(\text{容量})}$, 按矩形分布, 取 $\sqrt{3}$	温度变化引入体积变化的	相对不确定度 $U_{\text{rel}}(\text{标定}) = \frac{\sqrt{V_{(\text{容量})}^2 + V_{(\text{温度})}^2}}{V}$
			不确定度/mL, $V_{(\text{温度})}$, $V_{(\text{温度})} = \frac{V \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}}$	
1 mL 吸管	0.007	0.00404	0.00063	0.00409
50 mL 具塞比色管	0.50	0.28868	0.03150	0.00581
100 mL 容量瓶	0.10	0.05774	0.06062	0.000837

表 2 器具引入的相对不确定度

Table 2 Relative uncertainty introduced by capacity apparatus

项目	容量允差/mL	容量校正不确定度/mL, $V_{(\text{容量})}$, 按矩形分布, 取 $\sqrt{3}$	温度变化引入体积变化的不确定度	相对不确定度 $U_{\text{rel}}(\text{标定}) = \frac{\sqrt{V_{(\text{容量})}^2 + V_{(\text{温度})}^2}}{V}$
			/mL, $V_{(\text{温度})}$, $V_{(\text{温度})} = \frac{V \times 2.1 \times 10^{-4} \times 5}{\sqrt{3}}$	
5 mL 吸管	0.015	0.00866	0.00315	0.00184
10 mL 吸管	0.020	0.01150	0.006062	0.001300
100 mL 容量瓶	0.10	0.05774	0.06062	0.000837

表 3 标准溶液中芦丁质量和吸光度值计算结果
Table 3 Calculation results of rutin mass and absorbance in standard solution

序号	m_{0i}/mg	$\bar{Y}_{0i}$	Y_{0i}	$(m_{0i}-\bar{m}_{0i})^2$	$(\bar{Y}_{0i}-Y_{0i})^2$
1	0	0	-0.002	0.001936	0.000004
2	0.01	0.006	0.004392	0.001156	0.00000259
3	0.02	0.009	0.010784	0.000576	0.00000318
4	0.04	0.016	0.023568	0.000016	0.0000573
5	0.06	0.042	0.036352	0.000256	0.0000319
6	0.08	0.05	0.049136	0.001296	0.000000746
7	0.1	0.061	0.06192	0.003136	0.000000846

注: $\bar{m}$: 待测样品溶液中总黄酮(以芦丁计)含量平均值, mg; $\bar{m}_{0i}$: 标准曲线系列芦丁含量平均值, mg; m_{0i} : 各标准溶液芦丁含量, mg。
 S_R : 工作曲线剩余标准差; P : 待测样品重复测定次数($P=10$); n : 工作曲线的点数($n=7$);
 $\bar{Y}_{0i}$: 各标准溶液的实际响应值平均值; Y_{0i} : 各标准溶液的吸光度计算值。
 $\bar{m}_{0i}=0.044 \text{ mg}$

3.2.3 样品测定重复性引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{重}})$
重复测定 10 次, 用标准偏差评定, 测定结果见表 4。
由表 4 计算 $u(C_{\text{重}})$ 和 $U_{\text{rel}}(C_{\text{重}})$ 为:

$$u(C_{\text{重}}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} (X_i - \bar{X})^2}{10 \times (10 - 1)}} = 0.0113 \text{ mg/g}$$
$$U_{\text{rel}}(C_{\text{重}}) = \frac{0.0113}{29.03} = 0.000389$$

3.2.4 仪器引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(C_{\text{仪}})$
由计量检定证书可知, 透射比 0.06%($K=2$), 仪器引入的相对不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(C_{\text{仪}}) = \frac{0.006}{2} = 0.003$$

3.3 桑黄中总黄酮含量测定的合成不确定度和扩展不确定度

3.3.1 合成不确定度 $U_{\text{rel}}(\text{总})$ 为:

$$U_{\text{rel}}(\text{总}) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(C_{\text{制}}) + U_{\text{rel}}^2(C_{\text{标}}) + U_{\text{rel}}^2(C_{\text{重}}) + U_{\text{rel}}^2(C_{\text{仪}})} = 0.0425$$

试样总黄酮含量为 29.03 mg/g, 总黄酮含量的合成不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(\text{合成}) = X \times U_{\text{rel}}(\text{总}) = 29.03 \times 0.0425 = 1.233 \text{ mg/g}$$

3.3.2 扩展不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(\text{合成}) = kU_{\text{rel}}(\text{合成}) = 2 \times 1.233 = 2.47 \text{ mg/g}$$

3.4 结果分析

采用分光光度法测定桑黄中总黄酮含量, 通过分析、计算与合成, 各不确定度的分量的评定与比较见图 1。由图 1 可知, 测定桑黄中总黄酮引入不确定度影响因素排序为: 标准曲线 > 样品制备 > 重复性 > 仪器分析; 标准曲线绘制是引入不确定度的首要因素, 而其中曲线拟合所占比例最大, 因此, 测试时要选择线性好的曲线。

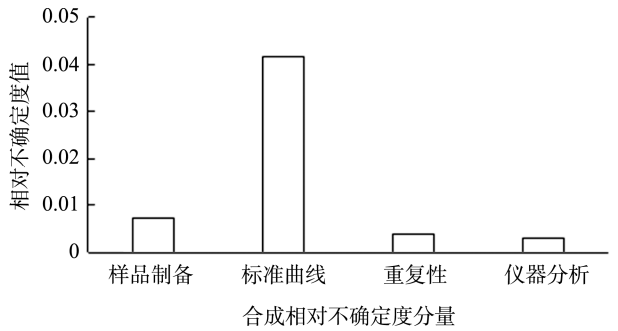


图 1 合成相对不确定度分量比较
Fig.1 Comparison of relative uncertainty component

4 结 论

分光光度法测定桑黄中总黄酮结果平均值为 29.03 mg/g, 扩展不确定度为 2.466 mg/g, 取值结果为 $X=(29.03 \pm 2.47) \text{ mg/g}$;
测定桑黄中总黄酮过程中引入不确定度的各分量影响因素排序为: 标准曲线 > 样品制备 > 重复性 > 仪器分析;
绘制标准曲线是引入的不确定度的首要原因, 其中曲线拟合所占比例最大。因此, 在测定总黄酮的过程中, 要注意选择线性好的标准曲线。

表 4 桑黄中总黄酮含量测定结果
Table 4 Determination of total flavone in phellinus igniarius

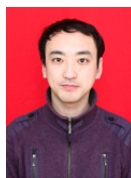
检测参数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
总黄酮/(mg/g)	29.03	29.04	29.04	29.01	29.03	29.04	29.04	29.04	29.01	29.03
平均值: 29.03 mg/g					标准偏差: 0.0115 mg/g					

参考文献

- [1] 吕英华, 王健芳, 杜明, 等. 药用真菌桑黄的研究进展[J]. 蚕业科学, 2019, 35(1): 204–210.
Lv YH, Wang JF, Du M, *et al.* Progress of studies on the medicinal fungus *Phellinus* spp. [J]. *Sci Sericul*, 2019, 35(1): 204–210.
- [2] 殷梵钧, 项睿洁, 景灵洋, 等. 桑黄降血脂及抗氧化功能研究进展[J]. 中药材, 2018, 41(11): 2721–2724.
Yin FY, Xiang RJ, Jing LY, *et al.* Research progress on hypolipidemic and antioxidant functions of *Phellinus* spp. [J]. *J Chin Medi Mater*, 2018, 41(11): 2721–2724.
- [3] 圣明明, 王宏媛, 冯岳琴, 等. 药用真菌桑黄研究进展[J]. 轻工科技, 2016, (12): 13–15.
Sheng MM, Wang HY, Feng YQ, *et al.* Progress of studies on the medicinal fungus *Phellinus* spp. [J]. *Light Ind Sci Technol*, 2016, (12): 13–15.
- [4] 许谦, 周文欣, 王冲, 等. 桑黄活性物质研究进展[J]. 中国食用菌, 2019, 38(2): 1–6.
Xu Q, Zhou WX, Wang C, *et al.* Research status on active substances of *phellinus igniarius* [J]. *Edible Fungi Chin*, 2019, 38(2): 1–6.
- [5] 孟庆龙, 潘景芝, 陈丽, 等. 桑黄发酵产物当抑菌作用[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 56–59.
Meng QL, Pan JZ, Chen L, *et al.* Antibacterial activity evaluation of fermentation supernatant and mycelia of *phellinus igniarius* [J]. *Food Sci*, 2011, 32(3): 56–59.
- [6] 孙培龙, 徐双阳, 杨开, 等. 珍稀药用真菌桑黄当国内外研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 119–123.
Sun PL, Xu SY, Yang K, *et al.* Advance of researches on *Phellinus* spp. a rare and precious medicinal fungus [J]. *Microbiol Chin*, 2006, 33(2): 119–123.
- [7] 梁晓薇, 刘远超, 黄龙花, 等. 桑黄孔菌属的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(6): 98–103.
Liang XW, Li YC, Huang LH, *et al.* Advances in the genus of *sanghuangporus* study [J]. *J Microbiol Dec*, 2017, 37(6): 98–103.
- [8] 回晶, 李其久, 边媛媛, 等. 桑黄总黄酮超声提取工艺及其生物活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 98–103.
Hui J, Li QJ, Bian YY, *et al.* Ultrasound-assisted extraction and biological activity of total flavonoids from *phellinus igniarius* [J]. *Food Sci*, 2010, 31(24): 98–103.
- [9] 张勇, 宋吉玲, 李福森, 等. 10 种不同来源桑黄中 4 种有效成分含量的对比研究[J]. 食品工业, 2019, 40(9): 261–265.
Zhang Y, Song JL, Li FS, *et al.* Compared study of 4 kinds of active components in different *phellinus igniarius* [J]. *Food Ind*, 2019, 40(9): 261–265.
- [10] 伍一军. 有机磷农药对人类健康的危害[C]. 农业与环境安全国际学术研讨会论文集. 北京: 北京农药学会, 2003: 79–82.
Wu YJ. Hazard of organophosphorus pesticides to human health [C]. *Anthology of the International Symposium on agriculture and Environmental Security*. Beijing: Beijing Pesticide Society, 2003: 79–82.
- [11] 刁银军, 刘莉, 肖珊美, 等. UPLC-MS/MS 法测定元胡中 4 种有机磷农药残留的不确定度评定[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(6): 157–161.
Diao YJ, Liu L, Xiao SM, *et al.* Uncertainty evaluation of determination of organic organophosphorus residues in *corydalis yanhusuo* by UPLC-MS/MS [J]. *J Anhui Agricul Sci*, 2018, 46(6): 157–161.
- [12] GB/T 27025-2008 检测和校准实验室能力的通用要求[S].
GB/T 27025-2008 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S].
- [13] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Evaluation and representation of measurement uncertainty [S].
- [14] CNAS-GL 06:2019 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL 06:2019 Guide for the evaluation of uncertainty in chemical analysis [S].
- [15] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification regulation of common glass measuring instruments [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



华晶忠, 主要研究方向为食品营养与检测。
E-mail: 843202215@qq.com

刘笑笑, 助理研究员, 主要研究方向为农产品质量安全研究。
E-mail: 843202215@qq.com