

分光光度法测定蜂胶中总黄酮含量的 不确定度评定

张文珠*

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘 要: **目的** 评定分光光度法测定蜂胶中总黄酮含量的不确定度。**方法** 建立测量过程不确定度评价的数学模型, 根据 GB/T 24283-2018 《蜂胶》中的分光光度法测定蜂胶中总黄酮含量, 对检测过程中引入的不确定度进行分类和量化。**结果** 当样品总黄酮含量是 2.37×10^4 mg/100 g 时, 其扩展不确定度为 644 mg/100 g ($k=2$), 其结果可表示为 $(2.37 \pm 0.06) \times 10^4$ mg/100 g。**结论** 不确定度主要来源于称量, 在实验时, 应注意称量操作的准确性, 以提高测量结果的准确性。

关键词: 蜂胶; 总黄酮; 分光光度法; 不确定度

Uncertainty evaluation of determination of total flavonoids in propolis by spectrophotometry

ZHANG Wen-Zhu*

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of spectrophotometric determination of total flavonoids in propolis. **Methods** The mathematical model was established to evaluate the uncertainty in measurement process, and the content of total flavonoids in propolis was determined according to spectrophotometry in GB/T 24283-2018 *Propolis*. The uncertainty introduced in the detection process was classified and quantified. **Results** When the total flavonoids content in the sample was 2.37×10^4 mg/100 g, the expanded uncertainty was 644 mg/100 g ($k=2$), and the result could be expressed as $(2.37 \pm 0.06) \times 10^4$ mg/100 g. **Conclusion** The uncertainty mainly comes from weighing, and the accuracy of weighing operation should be paid attention during the experiment in order to improve the accuracy of measurement results.

KEY WORDS: propolis; total flavonoids; spectrophotometry; uncertainty

1 引 言

测量不确定度, 是按照指定检测方法对某一基质(目标物)的测量结果的分散程度的量化描述, 也即对被测对象结果不能确定程度的表征。在分析化学领域, 尤其是定量分析领域, 仅有检测结果的表达是不完善的, 不确定度

是不可或缺的一部分。在定量检测工作中, 由于各种主观、客观原因, 测量过程中不可避免会引入误差, 而产生误差的程度, 我们通常用“不确定度”来表达, 这对检测结果是至关重要的, 尤其是当检测结果在某一“临界值”时^[1]。对测量过程的不确定来源进行分析, 对影响较大的环节进行控制有利于提高测量结果的准确性。

*通讯作者: 张文珠, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。E-mail: 13918716740@139.com

*Corresponding author: ZHANG Wen-Zhu, Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China. E-mail: 13918716740@139.com

蜂胶具有多重药理活性, 如抗菌、抗氧化、消炎、免疫调节、预防龋齿、心血管保护等, 广泛应用于医药、保健食品、化妆品等领域^[2-4]。蜂胶含有丰富的营养保健成分, 尤其是含有大量的黄酮类化合物和酚酸类化合物, 具有广谱抗菌的生物学活性, 蜂胶中黄酮和多酚的含量是评价蜂胶质量的一个重要指标^[5-8]。

目前蜂胶中总黄酮含量的测定方法有很多, 常用的有分光光度法^[9]及高效液相色谱法^[10]。国标 GB/T 24283-2018《蜂胶》^[11]中采用分光光度法。本文针对分光光度法测定蜂胶中总黄酮含量进行不确定度进行评价, 主要依据 CNAS-GL006:2018《化学分析中不确定度的评估指南》^[12]和 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[13]对测量过程中的不确定度进行评价, 以提高检测结果的准确性、为蜂胶中总黄酮的准确测量提供可靠性依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器设备

Evolution 300 紫外可见分光光度计(美国 Thermo 公司); XPE204 电子天平(瑞士梅特勒-托利多国际有限公司); P300H 型超声仪(德国 ELMA 公司); HWS-28 型水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

2.1.2 试剂与样品

芦丁标准品(纯度 95%, 美国 Sigma 公司); 聚酰胺粉(100~200 目)、无水甲醇、无水乙醇、无水甲苯(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

蜂胶样品购自市场。

2.2 实验方法

2.2.1 标准曲线的绘制

精密称取经干燥处理过的芦丁 5.0 mg, 用甲醇充分搅拌溶解, 定容至 100 mL, 得 50 μg/mL 芦丁标准使用溶液。吸取该溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 于 360 nm 测定吸光度, 以浓度为横坐标(X), 吸光度为纵坐标(Y), 绘制回归曲线。

2.2.2 试样处理及测定方法

称取适量的试样, 加乙醇溶解并定容至 50 mL, 摇匀, 放入超声仪, 超声 20 min, 静置过滤, 吸取提取液 1.0 mL 置于蒸发皿中, 加入 5 mL 乙醇及 1 g 聚酰胺粉, 用玻璃棒搅拌混匀。将蒸发皿置于 60 °C 水浴上将乙醇挥干后, 将聚酰胺粉转移至层析柱中。用 20 mL 甲苯清洗去除杂质, 然后用甲醇洗脱目标物, 洗脱液定容至 25 mL。以甲醇为空白, 测定洗脱液在 360 nm 处吸光度, 由标准曲线计算试样中总黄酮的含量。

2.2.3 数学模型

根据 GB/T 24283-2018《蜂胶》的测定方法, 总黄酮

含量的数学模型如下:

$$X = \frac{CV_3}{mV_2 \times 1000} \times V_1 \times 100$$

式中: X-试样中总黄酮的含量, mg/100 g;

C-由标准曲线算得被测液中总黄酮的浓度, μg/mL;

V₁-样品定容体积, mL;

V₂-吸取样液过柱体积, mL;

V₃-洗脱液定容体积, mL;

m-试样的质量, g。

从实验方法可见, 本检测过程中, 各不确定度分量之间是相互独立的, 可以采用相对标准不确定度进行合成, 得到检测方法的不确定度。

3 结果与分析

3.1 不确定度来源分析

根据上述数学模型分析, 分光光度法测定蜂胶中总黄酮含量, 不确定度主要来自样品提取液中总黄酮含量、样品称量、样品定容、样品提取液移取、反应液定容、分光光度计和重复性实验等各环节引入的不确定度。其中样品提取液中总黄酮含量的不确定度由标准品纯度、称量及定容, 和标准曲线的配制引入。

其关系如图 1 所示。

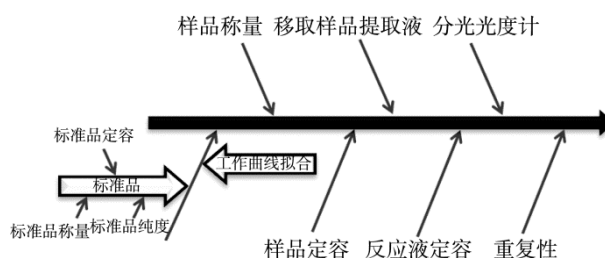


图 1 不确定度分量来源关系图

Fig.1 The relationship of uncertainty component source

3.2 不确定度分量的评定

3.2.1 样品提取液中总黄酮含量引入的不确定度 U_C

(1) 标准曲线拟合引入的不确定度 U_1

对配制的标准工作溶液, 测定其吸光度, 每个浓度的标准溶液测定 6 次, 计算其平均吸光度, 数据见表 1。

根据标准溶液吸光度绘制标准曲线, 进行拟合, 得到线性回归方程为 $A=0.0282C + 0.0021$, 相关系数 r^2 为 0.9998。按照本检测方法, 对同一样品, 进行 2 次测定, 即 $P=2$ 。对 2 次测定结果取平均值, 将其代入线性回归方程, 计算样品溶液中总黄酮浓度 $C=9.91 \mu\text{g/mL}$ 。

表 1 标准溶液吸光度测定值
Table 1 Absorbance value of standard solution

芦丁标准溶液浓度/(μg/mL)	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0
吸光度平均值	0.143	0.281	0.428	0.568	0.704

由拟合直线求 C 时产生的标准不确定度 U_1 按以下公式计算:

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (B_0 + B_1 C_i)]^2}{n-2}} = 0.00256$$
$$U_1 = \frac{S_R}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}} = 0.0675 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

式中: U_1 -由线性回归方程求 C 时产生的不确定度;

S_R -由拟合直线求得的 A 与相应 A_i 测定值之差按贝塞尔公式求出的标准偏差;

P -样品溶液的测定次数, $P=2$;

n -标准溶液的测定总次数, $n=30$;

A_i -标准溶液吸光度测定值;

B_1 -常数, 其值为 0.0282;

B_0 -常数, 其值为 0.0021;

C_i -标准溶液中芦丁的浓度, $\mu\text{g/mL}$;

c -标准溶液中芦丁浓度的测定平均值, 15.0 $\mu\text{g/mL}$;

$\bar{c}$ -样品溶液中芦丁的浓度 9.91 $\mu\text{g/mL}$;

标准曲线拟合引入的相对标准不确定度 $U_{\text{rel1}}=U_1/\bar{c}$
 $=0.0675/9.91=0.00681$

(2) 使用芦丁标准品绘制标准曲线产生的不确定度 U_2

使用芦丁标准品绘制标准曲线产生的不确定度由 3 部分组成, 包括标准品的纯度引入的不确定度、称取样品过程引入的不确定度和标准品定容及稀释过程引入的不确定度。

(i)由芦丁纯度引入的不确定度。本实验的芦丁标准品纯度为 95.0%, 即 0.950 ± 0.001 , 假设不确定度为矩形分布, 则标准不确定度为 $0.001 \text{ g}/\sqrt{3} = 5.77 \times 10^{-4} \text{ g}$, 则相对标准不确定度为 6.07×10^{-4} 。

(ii)称取样品过程引入的不确定度。使用万分位天平称量芦丁标准品, 仪器的标准偏差为 0.10 mg, 为矩形分布, 则其不确定度为 $u(m)=0.1 \text{ mg}/\sqrt{3} = 0.0577 \text{ mg}$, 标准品称取质量为 0.0050 g, 则称取样品过程的相对标准不确定度为 0.0115。

(iii)标准品定容及稀释过程引入的不确定度。芦丁标准品的定容至 100 mL 时使用 100 mL A 级容量瓶, 根据 JJG 196-2006《常用玻璃器具鉴定规程》^[14], 其不确定度由 2 部分构成, 容量瓶的最大允差及校准温度。假设容量瓶最大允差及校正温度均为矩形分布, 100 mL 容量瓶的最大允差为 $\pm 0.03 \text{ mL}$, 则体积不确定度为 0.0173 mL, 温度不确定度为 0.0525 mL, 将不确定度进行合成, 为 0.0553 mL, 相对标准不确定度为 5.53×10^{-4} 。

将以上 3 个分量进行合成, 则使用芦丁标准品绘制标准曲线产生的相对标准不确定度为:

$$U_{\text{rel2}} = \sqrt{(0.115)^2 + (5.53 \times 10^{-4})^2 + (6.07 \times 10^{-4})^2} = 0.1115$$

(3) 合成相对不确定度 U_c

将以上不确定度进行合成, 得到样品提取液中总黄酮含量引入的不确定度, 为:

$$U_c = \sqrt{U_{\text{rel1}}^2 + U_{\text{rel2}}^2} = \sqrt{0.00681^2 + 0.1115^2} = 0.1134$$

该样液中芦丁含量为 9.91 $\mu\text{g/mL}$, 则其标准不确定度分量为 $9.91 \times 0.1134 = 1.133 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 。

3.2.2 称取蜂胶样品引入的不确定度 U_m

称取蜂胶样品使用万分位天平, 其精度为 0.10 mg, 称量过程的不确定度主要来源于天平误差。假设为矩形分布, 则其标准不确定度为 $0.1/\sqrt{3} = 0.0577 \text{ mg}$, 本检测过程称取蜂胶质量为 0.1258 g, 则其相对标准不确定度为 4.59×10^{-4} 。

3.2.3 样品定容体积 V_1 引入的不确定度 U_{V1}

称取的蜂胶样品用乙醇定容至 50 mL, 使用 50 mL A 级容量瓶。定容过程引入的不确定度由容量瓶精度及温度 2 部分组成。50 mL A 级容量瓶, 其最大允许误差为 $\pm 0.025 \text{ mL}$, 按照均匀分布, 其标准不确定度为 $0.025/\sqrt{3} = 0.0144 \text{ mL}$ 。由温度引入的不确定度为 $2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 50/2 = 0.02625 \text{ mL}$, 将以上 2 部分的不确定度进行合成, 得到样品定容体积 V_1 产生的标准不确定度 $U_{V1} = \sqrt{0.0144^2 + 0.02625^2} = 0.0299 \text{ mL}$, 则其相对标准不确定度为 $0.0299/50 = 5.99 \times 10^{-4}$ 。

3.2.4 吸取蜂胶提取液引入的不确定度 U_{V2}

吸取蜂胶提取液使用 1.0 mL 单标线吸管吸取蜂胶提取液。此过程不确定度主要来源于 1 mL 单标线移液管的允差及温度。使用 1.0 mL A 级单标线移液管, 其最大允差为 $\pm 0.001 \text{ mL}$, 假设为均匀分布, 其标准不确定度为 $0.001/\sqrt{3} = 5.8 \times 10^{-4} \text{ mL}$; 温度引入的不确定度为 $5.25 \times 10^{-4} \text{ mL}$, 将 2 部分不确定度分量进行合成, 得到吸取蜂胶提取液引入的标准不确定度 $U_{V2} = \sqrt{0.00058^2 + 0.000525^2} = 7.82 \times 10^{-4} \text{ mL}$, 则其相对不确定度为 7.82×10^{-4} 。

3.2.5 反应液定容体积 V_3 引入的不确定度 U_{V3}

反应液定容引入的不确定度由容量瓶引入。使用 25 mL A 级容量瓶, 其最大允许误差为 0.030 mL, 假设为均匀分布, 其标准不确定度为 $0.030/\sqrt{3} = 0.0173 \text{ mL}$, 由温度引入的不确定度为 $2.1 \times 10^{-4} \times 5 \times 50/2 = 0.02625 \text{ mL}$, 将以上 2 项不确定度进行合成, 得到反应液定容体积 V_3 引入的不确定度 $U_{V3} = \sqrt{0.0173^2 + 0.02625^2} = 0.0314 \text{ mL}$, 则其相对

不确定度为 $0.0314/25=1.26\times10^{-3}$ 。

3.2.6 分光光度计引入的不确定度 U_A

分光光度计, 精度为 0.001, 为矩形分布, 则其不确定度为 $U_A=0.001\text{ g}/\sqrt{3}=0.000577$, 样品溶液吸光度为 0.676, 则样品吸光度测量引入的相对标准不确定度为 $0.000577/0.676=8.54\times10^{-4}$ 。

3.2.7 重复性实验引入的不确定度 U_R

对同一检测对象, 在同一条件下, 连续测定 6 次, 将检测结果列于表 2。

总黄酮含量的标准偏差为 $S=51.6\text{ mg}/100\text{ g}$ 。

按正态分布计算, 标准不确定度为 $U_R=S/\sqrt{6}=21.23\text{ mg}/100\text{ g}$ 。

重复性实验的相对标准不确定度为 $21.23/2.37\times10^4=9.0\times10^{-4}$ 。

3.3 合成标准不确定度

各项不确定度汇总来源如表 3 所示。

根据以上结果, 合成相对标准不确定度为

$$U_r = \sqrt{\frac{0.0134^2 + 0.000459^2 + 0.000599^2 + 0.000782^2}{0.00126^2 + 0.000854^2 + 0.00090^2}} = 0.0136$$

蜂胶中总黄酮测定的标准不确定度为 $2.37\times10^4\times0.0136=322\text{ mg}/100\text{ g}$

3.4 扩展不确定度

取包含因子 $k=2$, 则蜂胶中总黄酮的测定的扩展不确定度为 $U=322\text{ mg}/100\text{ g}\times2=644\text{ mg}/100\text{ g}$

3.5 测定结果表示

保健品蜂胶中总黄酮含量是 $2.37\times10^4\text{ mg}/100\text{ g}$, 其真实含量可表示为 $(2.37\pm0.06)\times10^4\text{ mg}/100\text{ g}$ 。

表 2 6 次测定吸光度测定值
Table 2 Results of 6 absorbance measurements

编号	1	2	3	4	5	6
样品质量/g	0.1258	0.1261	0.1254	0.1259	0.1255	0.1261
样品定容体积 V_1/mL	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
样液过柱体积 V_2/mL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
洗脱液定容体积 V_3/mL	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
空白管吸光度	0	0	0	0	0	0
样品吸光度	0.675	0.678	0.673	0.676	0.675	0.677
被测液中总黄酮浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	23.86	23.97	23.79	23.90	23.86	23.93
样品中总黄酮含量/ $(\text{mg}/100\text{ g})$	2.37×10^4	2.38×10^4	2.37×10^4	2.37×10^4	2.38×10^4	2.37×10^4
最佳估计值/ $(\text{mg}/100\text{ g})$	2.37×10^4					

表 3 各项不确定度
Table 3 Various uncertainties

来源	数值	标准不确定度 $U(x)$	相对标准不确定度 $U_{\text{rel}}(x)$
浓度 C	$9.91\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$	$0.133\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$	0.0134
样品质量 m	0.1258 g	0.0577 mg	0.000459
样品定容体积 V_1	50 mL	0.0299 mL	0.000599
样液过柱体积 V_2	1 mL	0.000782 mL	0.000782
洗脱液定容体积 V_3	25 mL	0.0314 mL	0.00126
分光光度计 A	0.676	0.000577	0.000854
重复性试验 R	$2.37\times10^4\text{ mg}/100\text{ g}$	$21.23\text{ mg}/100\text{ g}$	0.00090

4 结论与讨论

本研究对分光光度法测定蜂胶中总黄酮含量的不确定度进行评定。通过对蜂胶中总黄酮的测定的不确定度分析可知,测定结果的不确定度主要来源是标准品中总黄酮的浓度,由于标准品中总黄酮浓度的不确定度主要来源于标准品的称量,因此在实验时,应提高标准品称量操作的准确性,如有条件,可使用十万分之一天平称量标准品,以减少称量误差,降低由此引入的不确定度,提高实验结果的可信度。

参考文献

- [1] CNAS-GL 01: 2018 检测和校准实验室能力认可准则[S].
CNAS-GL 01: 2018 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S].
- [2] 郑宇斐, 蒋侠森, 陈曦, 等. 2018 年国内外蜂胶的研究概况[J]. 蜜蜂杂志, 2019, (4): 1-8.
Zheng YF, Jiang XS, Chen X, *et al.* Overview of propolis research at home and abroad in 2018 [J]. J Bee, 2019, (4): 1-8.
- [3] 胡福良. 蜂胶的化学成分、质量控制及生物学活性研究进展[J]. 经济动物学报, 2017, (4): 187-196, 184, 200.
Hu FL. Research progress on chemical composition, quality control and biological activity of propolis [J]. J Econ Anim, 2017, (4): 187-196, 184, 200.
- [4] 王凯, 张江临, 胡福良. 蜂胶抗炎活性及其分子机制研究进展[J]. 中草药, 2013, (16): 2321-2329.
Wang K, Zhang JL, Hu FL. Research progress on anti-inflammatory activity and molecular mechanism of propolis [J]. Chin Herb Med, 2013, (16): 2321-2329.
- [5] 郑宇斐, 蒋侠森, 王凯, 等. 2017 年国内外蜂胶研究概况(一)[J]. 蜜蜂杂志, 2018, (4): 6-9.
Zheng YF, Jiang XS, Wang K, *et al.* Overview of propolis research at home and abroad in 2017(Part 1) [J]. J Bee, 2018, (4): 6-9.
- [6] 郑宇斐, 蒋侠森, 王凯, 等. 2017 年国内外蜂胶研究概况(二)[J]. 蜜蜂杂志, 2018, (5): 3-8.
Zheng YF, Jiang XS, Wang K, *et al.* Overview of propolis research at home and abroad in 2017(Part 2) [J]. J Bee, 2018, (5): 3-8.
- [7] 董捷, 张红城, 尹策, 等. 蜂胶研究的最新进展[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 637-642.
Dong J, Zhang HC, Yin C, *et al.* Recent advances in propolis research [J]. Food Sci, 2007, 28(9): 637-642.
- [8] 胡福良, 玄红专. 蜂胶化学成分的最新研究进展[J]. 养蜂科技, 2003, (1): 27-31, 37.
Hu FL, Xuan HZ. Recent advances in chemical constituents of propolis [J]. Apic Sci Technol, 2003, (1): 27-31, 37.
- [9] 张爱武. 蜂胶胶囊中总黄酮提取方法的优化与研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2019, (6): 46-51.
Zhang AW. Optimization and research on extraction method of total flavonoids from propolis capsules [J]. J Heilongjiang Bayi Agric Univ, 2019, (6): 46-51.
- [10] 曾林晖, 邓泽元, 余修亮, 等. 蜂胶黄酮的超声波提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(12): 295-300.
Zeng LH, Deng ZY, Yu XL, *et al.* Optimization of ultrasonic extraction technology of propolis flavonoids and its antioxidant activity [J]. Food Ind Technol, 2016, 37(12): 295-300.
- [11] GB/T 24283-2018 蜂胶[S].
GB/T 24283-2018 Propolis [S].
- [12] CNAS-GL 006: 2018 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL 006: 2018 Guidance on evaluating the uncertainty in chemical analysis [S].
- [13] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [14] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



张文珠, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。

Email: zhangwzh@sqi.org.cn