

# 紫外分光光度法测定罗银胶囊中总黄酮含量的不确定度评定

魏惠珍<sup>1</sup>, 李新南<sup>2</sup>, 龚建平<sup>1</sup>, 王跃生<sup>1</sup>, 张红红<sup>1</sup>, 饶毅<sup>1\*</sup>, 谢菲<sup>2</sup>

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 建立紫外分光光度法测定罗银胶囊中总黄酮含量的测量不确定度评定方法。方法: 通过紫外分光光度法测定罗银胶囊中总黄酮含量的测定及方法学验证数据, 对来自对照品溶液配制、样品前处理、显色反应、标准曲线拟合及回收率因素所引入的不确定度进行评估, 由此计算合成不确定度, 最终给出测量结果在95%置信区间下的扩展不确定度。结果: 本次实验的罗银胶囊中总黄酮含量测定结果为 $(31.13 \pm 1.61) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 建立的不确定度评定法适用于紫外分光光度法测定中药含量的不确定度分析中。

[关键词] 测量不确定度; 方法学验证; 紫外分光光度法; 罗银胶囊; 总黄酮

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0039-05

## Evaluation of measurement uncertainty for the determination of total flavonoids in Luoyin soft capsules by UV spectrometry method

WEI Hui-zhen<sup>1</sup>, LI Xin-nan<sup>2</sup>, GONG Jian-ping<sup>1</sup>, WANG Yue-sheng<sup>1</sup>, ZHANG Hong-hong<sup>1</sup>, RAO Yi<sup>1\*</sup>, XIE Fei<sup>2</sup>

(1. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi Traditional Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract] Objective:** To evaluate the uncertainty of measurement for determination of total flavonoids in Luoyin soft capsules by UV spectrometry. **Method:** Through establishing UV spectrometry method determination mode, the factors affecting the uncertainty were deduced, including standard solution preparation, sample pretreatment, color reaction, calibration curve and recovery tests. Each component of uncertainty was evaluated, from which the combined uncertainty and finally the extended uncertainty were obtained in 95% confidence intervals. **Result:** The determined content of total flavonoids in Luoyin soft capsules of this test is  $(31.13 \pm 1.61) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . **Conclusion:** The established mathematic model is applicable to the uncertainty analysis of UV spectrometry method in the determination of traditional Chinese medicine.

**[Key words]** measurement uncertainty; method validation; UV spectrometry; Luoyin soft capsules; flavonoids

测量不确定度<sup>[1]</sup>是表征合理地赋予被测量值的分散性, 与测量结果相关联的参数。《检测和校准实验室能力的通用要求》<sup>[2]</sup>规定, 检测和校准实验室都必须有对测量结果进行不确定度评定的程序, 以对实验测量结果的可信度进行评定。目前, 测量不确定度理论已在国家计量基准、标准物质的研究及

仪器校准、化工生产、产品检验等领域得到大力的推广应用。在已有的不确定度评定研究中, 主要通过量化单独组分不确定度评定方法进行评定, 此方法能有效地对实验过程中(如定容、称量等)各个过程不确定度分量进行评定, 但对复杂的分析过程(如萃取、离心等)其不确定度来源尚不明确或难以评定。通过方法学验证<sup>[3]</sup>中稳定性、精密度及回收率等研究数据进行不确定度评定, 能够有效简化评定过程同时提高对复杂分析过程不确定度评定的真实性, 可以成为复杂处理过程的不确定度评定有效方法。

本实验建立了紫外分光光度法测定罗银胶囊中总黄酮含量方法, 根据欧洲化学委员会颁布的

[收稿日期] 2009-08-04

[基金项目] 江西省科学技术厅科技支撑计划(赣发计字[2007]189号)

[通讯作者] \* 饶毅, Tel: (0791) 7119609; E-mail: raoyi99@126.com

*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*<sup>[4]</sup>, 采用实验过程及方法学验证数据, 对所建立的总黄酮测定方法进行了测量不确定度评定, 为处理过程复杂的分析方法建立有效的不确定度评定程序提供指导。

### 1 仪器与试剂

岛津 UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); 岛津 AUW220D 电子天平; 梅特勒-托利多 AB104-N 电子天平; 实验室所用玻璃器皿均为天玻牌 A 级。

罗银胶囊(批号: 20090501, 自制); 甲醇、石油醚(60~90)为分析纯; 亚硝酸钠、硝酸铝为化学纯; 芦丁对照品(批号: 100080-200306, 含量测定用)购于中国药品生物制品检定所。

### 2 实验方法

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取在 120 干燥至恒重的芦丁对照品 13.26 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 既得每 1 mL 含无水芦丁 0.13 mg 的对照品溶液。

**2.2 标准曲线的制备** 使用 5 mL 刻度吸管, 精密吸取芦丁对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 均加入甲醇使成 5.0 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min, 再加 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min; 加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应的试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法在 500 nm 的波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 芦丁浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为横坐标, 绘制标准曲线。

**2.3 测定方法** 精密称取罗银胶囊内容物约 1.0 g 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 45 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 2 mL, 蒸干, 残渣加水约 10 mL 溶解并转移至分液漏斗中, 用石油醚(60~90)提取 3 次, 每次 10 mL, 提取液弃去, 水层蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中, 作供试品溶液。使用 5 mL 刻度吸管精密量取供试品溶液 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入甲醇使成 5 mL, 照标准曲线制备项下的方法, 自“分别加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min”起, 依法测定吸光度, 从标准曲线上读出供试品溶液中总黄酮(芦丁)的浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 计算, 即得。

### 3 方法学考察

**3.1 精密度与重复性考察** 为对罗银胶囊总黄酮测定过程中样品提取与显色反应两个过程不确定度进行评定, 将精密度与重复性结合考察。精确称取 1.0 g 罗银胶囊内容物 6 份, 按 2.3 方法提取, 得 6 份 25 mL 样品溶液, 每份各取 3 mL 3 份, 按 2.2 方法测定吸光度, 代入回归方程计算罗银胶囊总黄酮含量。见表 1。

表 1 罗银胶囊总黄酮精密度与重复性测定数据

| 称样量 /g  | W <sub>1</sub> / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | W <sub>2</sub> / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | W <sub>3</sub> / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | 平均值 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ |
|---------|--|--|--|-------------------------------------|
| 1.008 1 | 31.09  | 30.89  | 31.39  | 31.12                               |
| 1.006 5 | 31.64  | 30.94  | 29.83  | 30.80                               |
| 1.002 4 | 31.87  | 30.76  | 31.37  | 31.33                               |
| 1.007 0 | 32.13  | 31.33  | 32.94  | 32.13                               |
| 1.003 5 | 31.33  | 31.94  | 30.53  | 31.27                               |
| 1.003 5 | 31.54  | 31.03  | 31.13  | 31.23                               |

**3.2 显色稳定性考察** 精确吸取标准品和样品溶液各 3 mL 于 10 mL 量瓶中, 按 2.2 的方法测定吸光度。当显色体系反应完全后, 每隔 5 min 记录一次吸光度值, 连续 20 min 考察两者稳定性。在 20 min 内, 标准品溶液吸光度保持不变, 样品溶液吸光度变化不大, 所以选择显色体系反应完全后 20 min 内测定其吸光度。见图 1。

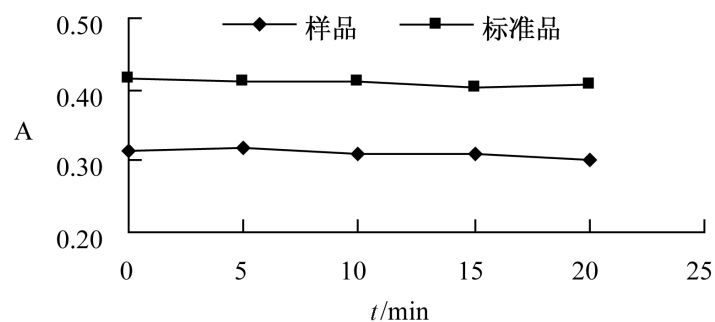


图 1 显色稳定性试验

**3.3 加样回收率考察** 取罗银胶囊内容物, 精密称定, 平行称取 5 份, 每份 0.5 g, 根据样品测定结果, 按芦丁含量与加入芦丁对照品(1:1)的比例加入芦丁对照品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液并测定吸光度, 计算其加样回收率。见表 2。

表 2 总黄酮回收率试验

| 称样量 /g  | 样品含量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD /% |
|---------|----------|---------|---------|--------|----------|--------|
| 0.508 4 | 16.01    | 15.09   | 30.81   | 98.01  |          |        |
| 0.506 6 | 15.96    | 15.23   | 30.91   | 98.16  |          |        |
| 0.502 9 | 15.84    | 15.31   | 31.11   | 99.74  | 99.13    | 0.97   |
| 0.500 1 | 15.75    | 15.40   | 31.16   | 100.06 |          |        |
| 0.505 6 | 15.93    | 15.28   | 31.26   | 99.67  |          |        |

#### 4 不确定度评定

4.1 测量过程分析 见图 2。

4.2 分析不确定度来源 本实验中, 不确定度来源于对照品溶液制备过程引入的不确定度、供试品制备过程引入不确定度、显色反应引入不确定度、样品



图 2 罗银胶囊总黄酮测定操作流程

#### 4.3 量化不确定度分量

4.3.1 对照品溶液不确定度  $U(Ref)$  对照品溶液的不确定度来源于对照品质量称定的不确定度  $U(mr)$  和溶液制备引入的不确定度  $U(Vr)$ 。

对照品质量称定的不确定度  $U(mr)$  包括天平的示值不确定度及其重复性不确定度。

十万分之一天平的示值不确定度 根据天平附带资料, 天平称量允许误差为  $\pm 0.1$  mg, 按矩形分布计算, 则示值不确定度  $= 0.1 / 3 = 0.058$  mg

称量由天平重复性带来的不确定度 根据天平附带资料, 天平称量重复性(标准偏差)  $0.05$  mg, 则重复性带来的不确定度  $= 0.05$  mg

由于对照品芦丁取样量为  $13.26$  mg, 则对照品质量引起的相对标准不确定度  $u(mr) / mr =$

$$\frac{0.058}{13.26} + \frac{0.05}{13.26} = 0.0042$$

对照品溶液制备过程的不确定度  $U(Vr)$  来源于玻璃量器的校准不确定度及其使用操作过程引入的重复性不确定度, 实验室温差引起的溶剂定容体积不确定度。

根据国家计量检定规程 JJG 196-2006 要求, 实验中所用的  $10, 100$  mL 量瓶(A级)与  $5$  mL 刻度移液管(A级)的容量允差分别为  $\pm 0.02$  mL、 $\pm 0.1$  mL 和  $\pm 0.025$  mL, 其使用过程中由校准偏差引入的不确定度按三角分布计算; 对照品溶解与稀释所用溶剂甲醇膨胀系数为  $1.19 \times 10^{-3} \text{ } ^{-1}$ , 实验室温度控制在  $20 \pm 5$  范围内, 温差引起的溶剂定容体积不确定度按矩形分布计算; 玻璃量器操作重复性偏差引入的不确定度, 采用实验中各规格量器重复吸取各标称容量蒸馏水  $6$  次, 并称重计算标准偏差进行计算, 其中  $5$  mL 刻度移液管进行标准曲线拟合过程中分别吸取  $0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0$  mL 标准

回收率影响引入的不确定度及标准曲线拟合所引入的不确定度。其中通过实验室内方法学验证, 根据精密度、重复性、回收率实验数据, 对分析过程中供试品制备过程引入不确定度、显色反应引入不确定度、样品回收率影响引入的不确定度进行评定。

品, 因而对各移取体积进行重复性偏差实验进而对其不确定度进行评定。对照品溶液制备不确定度  $U(Vr)$  各分值评定结果见表 3。

对照品液中对照品的稀释引起的相对标准不确定度  $u(Vr) / Vr =$

$$\frac{0.35}{100} + \frac{0.039}{10} + \frac{0.023}{5}$$

$$= 0.0070$$

对照品溶液不确定度  $U(Ref) =$

$$[u(mr) / mr]^2 + [u(Vr) / Vr]^2 = 0.0082$$

4.3.2 供试品制备  $U(p)$  及显色反应  $U(c)$  不确定度的评定 根据 2.8 项下精密度与重复性实验结果, 本研究采用方差分析法(ANOVA)<sup>[5]</sup> 对供试品制备  $U(p)$  及显色反应  $U(c)$  不确定度进行的评定。见图 3。

采用下表公式求出样品前处理方差  $MS_p$  和显色反应方差  $MS_c$ :

由表 3 可知, 显色反应过程的标准不确定度  $u(c) = s_c = 0.698 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$

实验所测罗银胶囊的总黄酮含量  $W = 31.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 显色反应过程的相对标准不确定度  $U(c) = u(c) / W = 0.021$

样品前处理过程的标准不确定度  $u(p) = s_p =$

$$\frac{MS_p - MS_c}{n} = 0.180 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$$

样品前处理过程的相对标准不确定度  $U(p) = u(p) / W = 0.0054$

4.3.3 回收率影响不确定度  $U(Rec)$  实验过程对样品回收率的影响所产生的不确定度具体表现为  $5$  次测量回收率平均值标准差  $s(C_{Rec})$ , 标准不确定度  $U(Rec) =$

$$\frac{s(C_{Rec})}{5} = 0.0043$$

表 3 对照品对照品溶液不确定度  $U(Ref)$  的各分量不确定度

| 项目         | 不确定度来源                               | 分布 误差或标准偏差  | 不确定度   |
|------------|--------------------------------------|---|--|
| 10 mL 量瓶   | 校准                                   | 三角 0.02 mL  | $\frac{0.02^2}{6} + 0.17^2 + \frac{0.0595^2}{3} = 0.039 \text{ mL}$  |
|            | 定容重复性                                | 正态 0.017 mL   |  |
|            | 温差                                   | 矩形 $10 \times 5 \times 1.19 \times 10^{-3} = 0.0595 \text{ mL}$ |  |
| 100 mL 量瓶  | 定容重复性                                | 正态 0.070 mL   | $\frac{0.1^2}{6} + 0.07^2 + \frac{0.595^2}{3} = 0.3 \text{ mL}$  |
|            | 温差                                   | 矩形 $100 \times 5 \times 1.19 \times 10^{-3} = 0.595 \text{ mL}$ |  |
|            | 校准                                   | 三角 0.025 mL   |  |
| 5 mL 刻度移液管 | 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 取重复性 | 正态 0.0063, 0.0057, 0.0040, 0.0043, 0.0030, 0.0035 mL            | $\frac{0.025^2}{6} + 0.0063^2 + 0.0057^2 + 0.0040^2 + 0.0043^2 + 0.0030^2 + 0.0035^2 + \frac{0.030^2}{3} = 0.023 \text{ mL}$ |
|            | 温差                                   | 矩形 $5 \times 5 \times 1.19 \times 10^{-3} = 0.030 \text{ mL}$   |  |

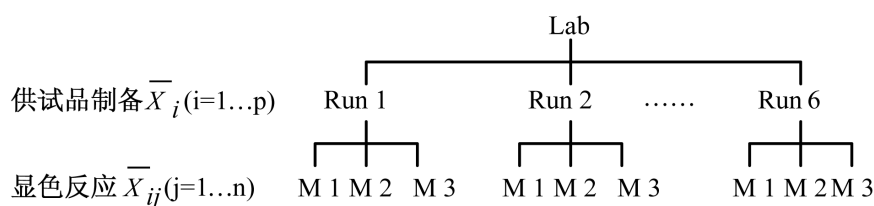


图 3 总黄酮测定精密度与重复性实验

表 4 重复性实验偏差计算公式

| 变量    | 均方   | 偏差                              |
|-------|--|---------------------------------|
| 样品前处理 | $MS_p = \frac{\sum_{i=1}^p n (\bar{X}_i - \bar{X})^2}{p-1}$              | $MS_p = s_c^2 + ns_p^2 = 0.584$ |
| 显色反应  | $MS_c = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{p(n-1)}$ | $MS_c = s_c^2 = 0.487$          |

表 5 线性最小二乘拟合

| 编号 | 浓度 /ng·mL <sup>-1</sup> | 平均浓度 /ng·mL <sup>-1</sup> | A <sub>1</sub> | A <sub>2</sub> | 平均吸收值 | B <sub>0</sub> | B <sub>1</sub> | r       |
|----|-------------------------|---------------------------|----------------|----------------|-------|----------------|----------------|---------|
| 1  | 0.006 63                | 0.034 26                  | 0.063          | 0.069          | 0.066 | 0.001 9        | 10.273         | 0.999 7 |
| 2  | 0.013 26                |                           | 0.145          | 0.133          | 0.139 |                |                |         |
| 3  | 0.026 52                |                           | 0.276          | 0.280          | 0.278 |                |                |         |
| 4  | 0.0397 8                |                           | 0.416          | 0.404          | 0.410 |                |                |         |
| 5  | 0.053 04                |                           | 0.541          | 0.563          | 0.552 |                |                |         |
| 6  | 0.066 30                |                           | 0.684          | 0.672          | 0.678 |                |                |         |

公式中:

$$s(A) = \frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \times c_j)]^2}{n-2} = 0.008 1, \text{ 为}$$

吸收度的残差的标准差

$$\bar{c} = \frac{\sum_{j=1}^n c_j}{n} = 0.034 3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}, \text{ 为标准溶液的平均浓度}$$

均浓度

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2 = 0.002 7, \text{ 为标准溶液的浓度残差}$$

度残差

$p$ —每份样品测定次数,  $p=3$

$n$ —标准曲线制备过程中测定了 6 个浓度, 每个浓度测定 2 次,  $n=12$

标准曲线拟合过程引入的相对标准不确定度  $U$

同时, 必须对平均回收率进行显著性检验:  $t =$

$$\frac{|1 - Rec|}{U(Rec)} = 2.02, t_{(95, 4)} = 2.776, \text{ 可以认为所测回}$$

收率与 100% 无显著性差异。

#### 4.3.4 标准曲线拟合过程引入的不确定度 $U(C_0)$

为了校准紫外分光光度计, 采用准确称取芦丁对照品配制成 6 种浓度的标准溶液, 每种溶液均用紫外分光光度计测定二次, 在 500 nm 处得到相应的吸收值  $A$ , 用最小二乘法进行拟合, 得到直线方程  $A = c \times B_1 + B_0$  ( $B_0$  为截距,  $B_1$  为斜率) 和相关系数  $r$ ; 见表 5。

取一份供试品溶液, 平行测定 2 次, 由直线方程求得平均浓度  $C_0 = 0.030 2 \text{ mg/mL}$ , 则  $C_0$  的标准不确定度  $u(c_0)$  为:

$$u(c_0) = \frac{s(A)}{B_1} \left( \frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}} \right) = 0.000 3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$u(C_0) = u(C_0) / C_0 = 0.011$$

**4.4 计算合成不确定度** 由上述各不确定度分量合成罗银胶囊中总黄酮含量相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(W) =$$

$$\sqrt{U^2(Ref) + U^2(p) + U^2(c) + U^2(Rec) + U^2(C_0)} = 0.026$$

各不确定度分量值及其贡献率见表 6。

表 6 紫外分光光度法测定罗银胶囊中总黄酮不确定度分量评定表

| 不确定度分量             | 相对标准<br>不确定度 | 不确定度<br>贡献率* /% |
|--------------------|--------------|-----------------|
| 对照品溶液不确定度 $U(Ref)$ | 0.008 2      | 12.82           |
| 供试品制备 $U(p)$       | 0.0054       | 5.54            |
| 显色反应 $U(c)$        | 0.021        | 55.08           |
| 回收率 $U(Rec)$       | 0.0043       | 3.52            |
| 标准曲线拟合 $U(C_0)$    | 0.011        | 23.04           |
| 合成不确定度 $U(W)$      | 0.023        | 100.00          |

\* 不确定度贡献率计算方法:  $U^2(y_i) / U^2(W)$

**4.5 扩展不确定度及报告不确定度** 95% 置信概率下取包含因子  $k = 2$ , 则相对扩展不确定度  $U_{95}(W) = k \times U_{rel}(W) = 0.052 = 5.2\%$

由实验所测罗银胶囊的总黄酮含量  $W = 31.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 故其扩展不确定度为:

$$U_{95} = 31.13 \times 0.052 = 1.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$$

本次实验所测罗银胶囊中总黄酮含量为:

$$W = (31.13 \pm 1.61) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$$

## 5 讨论

分析评估不确定度时, 应尽量注意产生不确定度的所有来源, 因为合成不确定度的数值几乎完全取决于重要的不确定度分量。从表 5 的各标准不确定度分量对合成不确定度的贡献率可以看出, 应用紫外分光光度法测定罗银胶囊中总黄酮含量的实验过程中, 其不确定度主要来源于显色反应, 原因是在显色反应过程中操作繁多, 反应试剂的添加、反应时

间温度的控制等对黄酮类化合物与  $\text{Al}^{3+}$  在碱性条件下进行络合反应生成红色络合物的转化率造成影响, 进而造成实验结果的偏差, 因而在操作过程中还需增强操作者的实验熟练程度, 同时应尽量避免小容量体积液体的量取、定容, 减少操作引入的不确定度。

采用方差分析能够对一个独立变量是否受一个或多个因素或变量影响而进行分析, 可以分析每一个因素的作用, 也可以分析因素之间的交互作用。本实验中根据 3.1 项下精密度与重复性实验结果, 采用方差分析法对样品前处理和显色反应两因素引入的不确定度进行评定, 较真实的反应了实验过程中其操作对结果的影响, 同时也避免了对复杂过程中各个操作引入的不确定度进行评定, 减少了评定的工作量, 能够快速准确的对各分量进行不确定度评定。

## [参考文献]

- [1] BIPM, IEC, IFCC, *et al.* Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement [M]. Geneve, 1995:2.
- [2] ISO/IEC 17025:2005, General requirements for the competence of calibration and testing laboratories[S]. Geneve, 2005:9.
- [3] Barwick VJ, Ellison SLR, Rafferty MJQ, *et al.* The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies Part 1: Description of a laboratory protocol [J]. Accred. Qual. Assur. 2000, 5(2):47.
- [4] Ellison SLR, Rosslein M, Williams A. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement [M]. 2nd Ed. UK: EURACHEM/CITAC, 2000:11.
- [5] Hoogmartens J, Crommen J, Massart DL. Norms and guidelines for the practical estimation of uncertainty in analytical measurements[R]. Brussels: Federal Science Policy, 2005:22.