

湿生扁蓿乙醇提取物中总呋酮含量测定的不确定度评定

寇亮^{1,2}, 刘越敏¹, 柳娜¹, 曲馨¹, 景明¹ (1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 西北民族大学化工学院, 甘肃 兰州 730030)

摘要: **目的** 建立湿生扁蓿乙醇提取物中总呋酮的含量测定方法, 并对该法的测量不确定度进行评定。**方法** 采用紫外分光光度法测定湿生扁蓿乙醇提取物中总呋酮的含量, 并进行方法学验证。建立数学模型, 识别和分析不确定度来源, 量化各不确定度分量, 计算测量结果的合成不确定度和 95% 置信区间下的扩展不确定度。**结果** 在 95% 置信区间下, 紫外分光光度法测得湿生扁蓿乙醇提取物中总呋酮的含量为 $(12.87 \pm 0.52)\%$ 。供试品溶液中总呋酮质量浓度、实验重复性和加样回收率的不确定度是影响总的不确定度的 3 个主要不确定度分量。**结论** 建立了紫外分光光度法测定湿生扁蓿乙醇提取物中总呋酮含量的方法。通过不确定度评定, 得到了测量结果在 95% 置信区间下的扩展不确定度, 了解了该法测定结果的可靠性, 也为优化该分析方法, 提高分析结果质量提供了依据。

关键词: 湿生扁蓿; 总呋酮; 含量测定; 紫外分光光度法; 不确定度

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)03-0400-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.03.014

Uncertainty Evaluation for Determination of Total Xanthenes Content in Ethanol Extracts from *Gentianopsis paludosa*

KOU Liang^{1,2}, LIU Yue-min¹, LIU Na¹, QU Xin¹, JING Ming¹ (1. College of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000 Gansu, China; 2. Chemical Engineering College of Northwest Minzu University, Lanzhou 730030 Gansu, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the content determination of total xanthenes in ethanol extracts from *Gentianopsis paludosa* and to evaluate the uncertainty in measurement using the method. **Methods** Ultraviolet spectrophotometry was used to determine the content of total xanthenes in ethanol extracts from *Gentianopsis paludosa*, and the method was verified. The mathematical model was established, the sources of uncertainty were identified and analyzed, the uncertainty components were quantified, and the combined uncertainty of measurement results and the expanded uncertainty in 95 % confidence interval were calculated as well. **Results** Within 95 % confidence interval the total xanthenes content in the ethanol extracts from *Gentianopsis paludosa* measured by ultraviolet spectrophotometry was $(12.87 \pm 0.52)\%$. The uncertainty of concentration of total xanthenes in the test solution, the uncertainty of test repeatability, and the uncertainty of sample recovery rate were the three main uncertainty components that affect the total uncertainty. **Conclusion** A method for the content determination of total xanthenes in ethanol extracts of *Gentianopsis paludosa* by ultraviolet spectrophotometry was established. By evaluating the uncertainty, the expanded uncertainty of measurement results at 95% confidence interval was obtained, the reliability of the measurement results of the method was realized, and a basis was provided for optimizing the analytical method and improving the quality of the analytical results.

Keywords: *Gentianopsis paludosa*; total xanthenes; content determination; ultraviolet spectrophotometry; uncertainty

收稿日期: 2020-06-23

作者简介: 寇亮, 男, 博士研究生, 研究方向: 中药制药工艺研究。Email: kouliang83@163.com。通信作者: 景明, 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药新药研发。Email: jm@gszy.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81860788, 81560717)。

不确定度是与测量结果相关联的参数,表征了可以合理地赋予被测量的量值分散程度^[1]。它是测量结果质量的指标,可以反映测量结果的可信赖程度。近年来,随着对分析结果质量要求的不断提高,不确定度评定已在国家计量基准、标准物质的研究及仪器校准、化工生产、产品检验等领域被大力推广应用^[2]。在药物研发过程尤其是药物分析研究中,测量不确定度也越来越多地被应用^[3-5]。

湿生扁蕾 [*Gentianopsis paludosa* (Hook. f.) Ma.], 为 1 年生草本植物,龙胆科扁蕾属,生长在海拔 1 180~4 900 m 之间的河滩、林下、山坡草地及潮湿沼泽地区。在我国,主要分布在西北地区的西藏、青海省及甘肃省的南部^[6-8]。湿生扁蕾属于传统藏药,以全草入药,具有利肝、清热、解毒之功效,主治结膜炎、高血压、痔疮、肝炎、肾炎、消化不良、发烧、流感和腹泻等症。《中华人民共和国卫生部药品标准》藏药(第一册)收载了药材湿生扁蕾,但其质量标准中未制定含量测定指标。植物化学研究^[9]表明,湿生扁蕾中含有吡啶类、萜类和黄酮类等化合物。吡啶(xanthone)又被称为咕吨酮、氧杂蒽酮或苯并色原酮,是一类酚性化合物,主要分布在龙胆科、藤黄科、远志科、桑科和豆科植物中,具有广泛的生物活性,如抗肿瘤、抗菌、抗病毒、保肝、降血糖、抑制黄嘌呤氧化酶^[10]以及抗多种脏器细胞纤维化等活性^[11-18]。因此吡啶类化合物具有良好的开发前景,且湿生扁蕾中的吡啶类化合物有成为该药材指标性成分的潜质。本研究采用紫外分光光度法,以湿生扁蕾中所含有的 1,8-二羟基-3,7-二甲氧基吡啶为对照品^[7],对湿生扁蕾乙醇提取物中的总吡啶进行含量测定,以期对湿生扁蕾药材的质量控制及进一步开发利用提供参考依据。目前,尚未见紫外分光光度法测定湿生扁蕾中总吡啶含量及含量测定方法不确定度评定的相关报道。因此,本研究根据 JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》^[19]以及 CNAS-GL006:2019《化学分析中不确定度的评估指南》^[20]中的有关规定对含量测定过程中的不确定度进行评定,以期了解该方法测定结果的可靠性,为优化该测定方法、提高分析结果质量提供科学依据,同时也为紫外分光光度法同类型研究的不确定度分析提供有益的参考。

1 仪器及试剂

1.1 仪器 UV-1800PC 型紫外-可见分光光度仪,上海美普达仪器有限公司;METTLER TOLEDO MX5 百

万分之一分析天平,梅特勒-托利多(上海)有限公司。

1.2 试剂 湿生扁蕾药材来源于甘肃省渭源县,由甘肃农业大学陈垣教授鉴定为龙胆科植物湿生扁蕾 [*Gentianopsis paludosa* (Hook.f.) Ma.];湿生扁蕾乙醇提取物干浸膏,本实验室自制,批号:20190227;1,8-二羟基-3,7-二甲氧基吡啶对照品,湖州展舒生物科技有限公司,批号:201803413,纯度≥98%;95%乙醇为分析纯试剂,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 总吡啶含量测定的方法建立

2.1.1 供试品溶液的制备 称取湿生扁蕾乙醇提取物干浸膏约 2 mg,精密称定,置于 100 mL 容量瓶中,用 95%乙醇定容,摇匀,在避光通风处放置 30 min,即得供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定 120 ℃干燥至恒质量的 1,8-二羟基-3,7-二甲氧基吡啶对照品 4.051 mg,置于 100 mL 容量瓶中,以 95%乙醇溶解、定容、摇匀,配置成相当于对照品纯品质量浓度为 0.04 mg·mL⁻¹的对照品溶液。

2.1.3 最大吸收峰的确定 取对照品溶液,以 95%乙醇稀释成浓度为 0.002 mg·mL⁻¹的溶液,另取供试品溶液,分别按紫外分光光度法在 200~600 nm 波长范围内进行全波长扫描。通过比较全波长扫描色谱图,发现对照品和供试品溶液在 255 nm 波长处都有较大吸收,故选择 255 nm 为测定波长。

2.1.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,加 95%乙醇定容,摇匀,以 95%乙醇为空白,按照紫外分光光度法,于 255 nm 波长处测定吸光度。以对照品质量浓度(C_0 , mg·mL⁻¹)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标拟合标准曲线,得线性回归方程为: $A=105.07C_0+0.0188$, $r=0.9997$ 。结果表明,对照品在质量浓度为 0.002~0.010 mg·mL⁻¹范围内与吸光度线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密量取对照品溶液 0.5 mL,置 10 mL 容量瓶中,按照“2.1.4”项下“加 95%乙醇定容”起的操作方法测定其吸光度,重复 6 次。结果,吸光度平均值为 0.2258, $RSD=0.02\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取对照品 1.6 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加 95%乙醇定容,摇匀,精密量取 0.5 mL,置 10 mL 容量瓶中,按照“2.1.4”项下

“加 95%乙醇定容”起的操作方法, 分别于 0、10、20、30、40、50、60 min 时测定吸光度。结果, 对照品的平均吸光度为 0.234 9, RSD=0.37%($n=7$), 表明对照品溶液在 60 min 内吸光度稳定。取新制的供试品溶液按照 2.1.4 项下测定吸光度的方法, 分别于 0、10、20、30、40、50、60、90、120、180 min 时测定吸光度。结果, 供试品溶液在 30~180 min 之间的平均吸光度为 0.290 0, RSD=2.87%($n=7$), 表明供试品溶液在配置好 30 min 至 180 min 之间吸光度较为稳定。

2.1.7 重复性试验 按照 2.1.1 项下操作配置供试品溶液, 平行 6 份, 再按照 2.1.4 项下测定吸光度的方法测定 6 份供试品溶液的吸光度。结果, 供试品溶液中总呋喃酮含量的 RSD=2.76 %($n=6$), 表明该法重复性较好。

2.1.8 加样回收率试验 取湿生扁蕾乙醇提取物干浸膏约 2 mg, 精密称定, 平行 9 份, 分别置于 100 mL 容量瓶中, 加少量 95%乙醇溶解后在避光通风处放置半小时; 再往每份中加入对照品, 使对照品加入量与供试品溶液中总呋喃酮质量之比控制在 0.5:1, 1:1, 1:1.5 左右; 每 3 份为一个梯度, 分别加 95%乙醇定容, 摇匀, 并按照 2.1.4 项下测定吸光度的方法测定 9 份溶液的吸光度, 计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 湿生扁蕾乙醇提取物加样回收率试验结果($n=9$)

Table 1 Results of adding recovery rates of ethanol extract of *G. paludosa*($n=9$)

序号	浸膏质量/mg	已知含量/mg	加对照品量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
1	2.061	0.283	0.145	0.438	106.90	104.25	1.97
2	2.114	0.288	0.145	0.438	103.45		
3	2.167	0.297	0.145	0.450	105.52		
4	2.061	0.283	0.290	0.577	101.38		
5	2.114	0.288	0.290	0.592	104.83		
6	2.167	0.297	0.290	0.604	105.86		
7	2.061	0.283	0.435	0.739	104.83		
8	2.114	0.288	0.435	0.744	104.83		
9	2.167	0.297	0.435	0.735	100.69		

2.2 湿生扁蕾乙醇提取物中总呋喃酮含量计算数学模型的建立

湿生扁蕾乙醇提取物中总呋喃酮含量计算:

$$\omega = \frac{C_0 \times V}{m} \times 100\%.$$

其中 ω 为湿生扁蕾乙醇提取物干浸膏中总呋喃酮的含量(%); C_0 为由“2.1.4”项下所得回归方程计算出的供试品溶液中的总呋喃酮质量浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); V 为

供试品溶液的定容体积(mL); m 为制备供试品溶液时湿生扁蕾乙醇提取物干浸膏的称样质量(mg)。

2.3 不确定度来源识别和分析

不确定度来源见图 1。

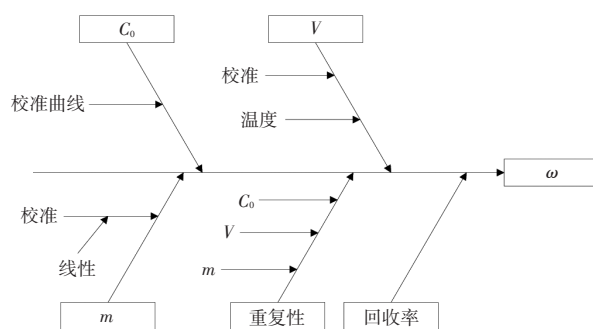


图 1 湿生扁蕾乙醇提取物不确定度来源因果图

Figure 1 Causality diagram of uncertainty sources of ethanol extract of *G. paludosa*

2.3.1 重复性不确定度来源 重复性(rep)评估作为整体可以在方法验证研究中得到, 将所有重复实验的变化进行合并作为总的实验重复性, 因此无需分别考虑所有重复性的分量。

2.3.2 供试品溶液中总呋喃酮质量浓度的不确定度来源 供试品溶液中总呋喃酮的质量浓度(C_0)利用标准曲线法计算。使用线性最小二乘法拟合曲线程序的前提是假定横坐标的不确定度远小于纵坐标的不确定度。因此通常的 C_0 不确定度计算程序仅仅反映由于吸光度随机变异产生的不确定度, 而不是对照品溶液的不确定度, 也不是从同一对照品溶液中逐级稀释产生的必然的相关性^[1]。故本研究中, 校准标准溶液的不确定度视为足够小以至可以忽略, C_0 不确定度来源主要是与线性最小二乘法拟合曲线程序有关的不确定度。

2.3.3 供试品溶液的定容体积的不确定度来源 供试品溶液在 100 mL 容量瓶中定容。容量瓶中的溶液体积(V)的不确定度来源: 确定容量瓶内部体积时的不确定度(校准)以及容量瓶和溶液温度与容量瓶体积校准时的温度不同带来的不确定度。

2.3.4 制备供试品溶液时干浸膏称样量的不确定度来源 称取约 2 mg 湿生扁蕾乙醇提取物干浸膏制备供试品溶液。每次称质量都会有随机变异和天平校准来源的不确定度。天平校准本身有两个可能的不确定度来源: 灵敏度和天平的线性。本研究称量用同一台天平且称量范围很小, 则灵敏度带来的不确定度忽略不计。

2.3.5 总体偏倚(回收率)的不确定度 通过加样回收

率($\overline{\text{Rec}}$)实验来获得分析程序的偏倚,其标准不确定度采用平均值的标准偏差计算得到。

2.4 不确定度分量的量化

2.4.1 重复性不确定度的量化 6 次独立测定总吡酮含量,结果显示实验的相对标准偏差(RSD)为 2.76%,则 6 次测定的标准不确定度 $[u(\text{rep})]$ 由 0.027 6 除以 $\sqrt{6}$ 得到: $u(\text{rep}) = \frac{0.0276}{\sqrt{6}} = 0.0113$ 。

2.4.2 供试品溶液中总吡酮质量浓度不确定度的量化 根据“2.3.2”项下分析,供试品溶液中总吡酮质量浓度(C_0)不确定度来源主要是与线性最小二乘法拟合曲线程序有关的不确定度。使用手工绘制的校准曲线计算供试品溶液中总吡酮质量浓度,需用 1,8-二羟基-3,7-二甲氧基吡酮对照品溶液配制 5 个校准标准溶液,其浓度分别是 0.002、0.004、0.006、0.008 和 0.010 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。测量 5 个校准溶液,每个点各 3 次,结果见表 2。

表 2 湿生扁蕾乙醇提取物校准溶液的浓度及其吸光度测定
Table 2 Calibration solution concentrations and their absorbance measurements for ethanol extract of *G. paludosa*

校准标准溶液浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	吸光度		
	1	2	3
0.002	0.231 6	0.229 7	0.227 5
0.004	0.431 7	0.429 1	0.430 4
0.006	0.660 3	0.661 6	0.662 6
0.008	0.858 7	0.858 3	0.857 9
0.010	1.066 3	1.065 9	1.066 1

重复性试验进行 6 次得到 C_0 的平均值为 0.002 6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,则与线性最小二乘法拟合曲线程序有关的标准不确定度 $[u(C_0)]$:

$$u(C_0) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

$$= \frac{0.007505}{105.07} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{15} + \frac{(0.0026 - 0.006)^2}{0.00012}}$$

$$= 0.000041 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

残差标准偏差(S)为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \cdot C_j)]^2}{n-2}} = 0.007505 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

离差平方和(S_{xx})为:

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2 = 0.00012 (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})^2$$

其中 B_1 为拟合标准曲线的斜率,由标准曲线的回归方程可知 B_1 为 105.07; p 为测试 C_0 的次数; n 为测试校准溶液的次数; C 为校准溶液的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); $\bar{C}$ 为校准溶液质量浓度的平均值 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);

A 为吸光度; B_0 为拟合标准曲线的截距,由标准曲线的回归方程可知 B_0 为 0.018 8; j 为获得校准曲线的测量次数。

2.4.3 供试品溶液定容体积不确定度的量化

(1)校准影响:参考 JJG196-2006《常用玻璃量器检定规程》^[20]的相关规定,本实验中使用的 100 mL 容量瓶为 B 级,其容量允差为 $\pm 0.2 \text{ mL}$,计算标准不确定度时假设是三角形分布,则其标准不确定度为: $\frac{0.2}{\sqrt{6}} = 0.0816 \text{ mL}$ 。

(2)温度影响:制造商已在 20 $^{\circ}\text{C}$ 时对该容量瓶进行了校准,而实验室的温度在 $(20 \pm 3) ^{\circ}\text{C}$ 之间变动。温度引起的不确定度可通过估算实验室温度范围和体积膨胀系数来计算。液体的体积膨胀系数明显大于容量瓶的体积膨胀,因此忽略后者。水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} ^{\circ}\text{C}^{-1}$,因此产生的体积变化为 $\pm (100 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4}) = \pm 0.063 \text{ mL}$,计算标准不确定度时假设温度变化是矩形分布,即 $\frac{0.063}{\sqrt{3}} = 0.0364 \text{ mL}$ 。

2 种分量合成得到体积的标准不确定度 $[u(V)]$:

$$u(V) = \sqrt{0.0816^2 + 0.0364^2} = 0.0894 \text{ mL}$$

2.4.4 制备供试品溶液时干浸膏称样量不确定度的量化 影响湿生扁蕾乙醇提取物干浸膏称样质量(m)的不确定度只考虑天平不确定度的线性分量。天平制造商给出了该天平的线性为 $\pm 0.004 \text{ mg}$,按矩形分布考虑,则称样质量的标准不确定度 $[u(m)]$ 为:

$$u(m) = \frac{0.004}{\sqrt{3}} = 0.00231 \text{ mL}$$

2.4.5 总体偏倚(回收率)不确定度的量化 加样回收率实验结果显示,9 次加样回收平均回收率($\overline{\text{Rec}}$)为 104.25%,标准偏差为 2%,标准不确定度 $[u(\overline{\text{Rec}})]$ 采用平均值的标准偏差计算得到: $u(\overline{\text{Rec}}) = \frac{0.02}{\sqrt{9}} = 0.0067$ 。

用 t 检验来确定 $\overline{\text{Rec}}$ 是否与 1 有显著性差异。检验统计量(t)的计算: $t = \frac{|1 - \overline{\text{Rec}}|}{u(\overline{\text{Rec}})} = \frac{|1 - 1.0425|}{0.0067} = 6.34$ 。

该值与 95%置信度、 $n-1$ 自由度下的双侧临界值(t_{crit})比较($n=9$): $t=6.34 \geq t_{\text{crit},8}=2.306$, $P < 0.05$,说明 $\overline{\text{Rec}}$ 与 1 有显著性差异,因此, $\overline{\text{Rec}}$ 被明确地包含在结果的计算中。

2.5 合成标准不确定度的计算 ω 由下式计算获得:

$$\omega = \frac{C_0 \times V}{m} \times 100\%$$

考虑到重复性和加样回收率对实验结果的影响,计算 ω 的完整公式应为 $\omega = \frac{C_0 \times V}{m \times \overline{\text{Rec}}} \times \text{rep} \times 100\%$ 。

数值及其标准不确定度、相对标准不确定度见表3。将这些数据代入得:

$$\omega = \frac{0.002\,666 \times 100}{1.987 \times 1.042\,5} \times 1 \times 100\% = 12.87\%。$$

相应的合成各不确定度分量为: $\frac{u_c(\omega)}{\omega} =$

$$\sqrt{\left(\frac{u(C_0)}{C_0}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(\overline{Rec})}{\overline{Rec}}\right)^2 + \left(\frac{u(rep)}{rep}\right)^2} =$$

$$\sqrt{0.015\,38^2 + 0.000\,894^2 + 0.001\,163^2 + 0.006\,426^2 + 0.011\,3^2}$$

$$= 0.020\,191。则 u_c(\omega) = \omega \times 0.020\,191 = 0.26\%。$$

表3 总呋喃酮含量测定中的数值与不确定度

Table 3 Numerical values and uncertainties in the process of the determination of total xanthenes content

项目	数值	标准不确定度	相对标准不确定度
C_0	0.002 666 mg·mL ⁻¹	0.000 041 mg·mL ⁻¹	0.015 380
V	100 mL	0.089 4 mL	0.000 894
m	1.987 mg	0.002 31 mg	0.001 163
$\overline{Rec}$	104.25%	0.006 7	0.006 426
rep	1	0.011 3	0.011 3
ω	12.87%	0.002 6	0.020 191

各不确定度分量的大小见图2。图中 $u(y, x_i)$ 的数值计算遵循 CNAS-GL006:2019《化学分析中不确定度的评估指南》^[1] 电子表格方法。由直方图可以看出不确定度分量贡献由大到小依次是 C_0 、rep、 $\overline{Rec}$ 、 m 和 V 相同且为最小。

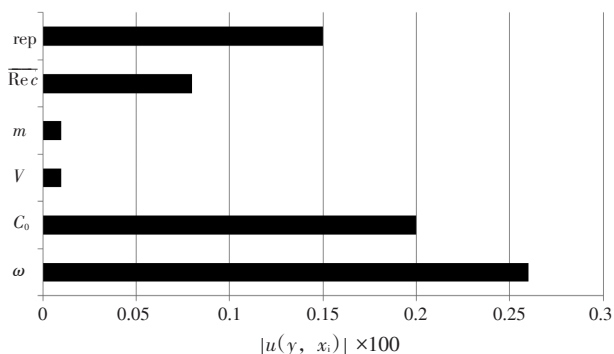


图2 总呋喃酮含量测定的不确定度分量

Figure 2 The uncertainty components for determining the total xanthenes content

在95%置信区间下, 包含因子(k)=2, 扩展不确定度 $[u(\omega)] = 0.26\% \times 2 = 0.52\%$, 则该批湿生扁蕾乙醇提取物中总呋喃酮的含量为 $(12.87 \pm 0.52)\%$ 。

3 讨论

3.1 含量测定方法的选择 目前, 对天然产物中呋喃酮类化合物的含量测定研究多集中在单个化合物的测

定上, 测定方法多采用高效液相色谱(HPLC)技术或者是液质联用(HPLC-MS)技术^[21-23], 对于呋喃酮这一类化合物的总含量测定还鲜有涉及。藏药湿生扁蕾中含有丰富的呋喃酮类化合物, 全草入药时, 这些化合物或单独或协同发挥着药效作用, 因此有必要建立一种准确、可靠的方法测定湿生扁蕾中总呋喃酮的含量。测定大类成分现今依旧多采用紫外分光光度法^[24], 因此本研究采用紫外分光光度法测定湿生扁蕾中总呋喃酮的含量。

3.2 检测波长的选择 本研究在200~600 nm波长范围内扫描并对比对照品溶液和供试品溶液的紫外吸收, 结果显示, 对照品溶液在205、255、279、335 nm处有吸收峰, 在同一质量浓度下吸光度大小顺序为205 nm>255 nm>279 nm>335 nm; 供试品溶液在205 nm和255 nm波长处有较大吸收, 而在279 nm和335 nm波长处吸收不明显。205 nm波长处对照品溶液和供试品溶液都有最大吸收, 但考虑到紫外末端吸收的影响, 最终选择255 nm波长作为测定波长。

3.3 因果关系图的绘制 确定主要不确定度来源是本研究的关键环节, 既不能忽略一些主要因素, 也不能重复计算一些因素。针对相对复杂的分析程序, 绘制因果关系图是一个简单高效的途径。制作因果图重点是将被测量计算数学模型的参数作为主要的分支, 以抓住分析不确定度来源的主要矛盾。

3.4 不确定度各分量的贡献 直方图直观地反映不同不确定度分量的大小, 但直方图中各不确定度分量的赋值却不是各分量来源不确定度的标准不确定度数值或是相对标准不确定度数值, 而是各分量由于其不确定度影响所得含量测定值与各参数原取值所得含量测定值的差值的绝对值, 赋值更能展示不同不确定度分量对测量不确定度贡献的大小。由直方图可以看出, 不确定度分量的贡献大小为 $C_0 > rep > \overline{Rec} > m = V$, C_0 、rep和 $\overline{Rec}$ 的不确定度是影响测量不确定度的3个主要不确定度分量。

不确定度越小, 所述结果与被测量的真值越接近, 测量结果的质量越高, 反之, 测量结果的质量越低, 这增强了测量结果之间的可比性。由不确定度评定结果可知, C_0 、rep和 $\overline{Rec}$ 的不确定度对方法的测量不确定度即合成标准不确定度的影响较大, 因此这3个因素也是影响本研究含量测定方法结果质量的主要原因。因此, 在改进含量测定方法时可有的放矢, 在实验操作过程中应加强对标准曲线的

拟合过程控制, 加强标准操作训练, 选择合适的显色剂等方法提高紫外吸收的稳定性和专属性以及加样回收率实验结果质量, 最终减小测量不确定度以优化含量测定实验方法。

本研究通过采用紫外分光光度法对湿生扁蕾乙醇提取物中总黄酮含量测定的不确定度评定, 计算得出了测量结果在 95% 置信区间下的扩展不确定度、了解了该法测定结果的可靠性; 同时, 了解了不确定度各分量的贡献大小, 为优化该分析方法、提高分析结果质量提供了依据。同时, 也为紫外分光光度法的不确定度评定提供了有益的参考。

参考文献:

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南: CNAS-GL006: 2019[S]. 北京: 中国计量出版社, 2019.
- [2] 魏惠珍, 李新南, 龚建平, 等. 紫外分光光度法测定罗根胶囊中总黄酮含量的不确定度评定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 39-43.
- [3] 朱静, 丰杰, 贾毓宁. 金银花中绿原酸含量不确定度的评定[J]. 中成药, 2017, 39(10): 2207-2209.
- [4] 李茂光, 李亚南, 张河战, 等. 紫外-分光光度法测定A群脑膜炎球菌多糖含量的不确定度评估[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(8): 861-865, 869.
- [5] 邓中华, 俞冰芸, 李新南, 等. UV法测定白头翁提取物中总皂苷含量的不确定度评定[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(4): 550-553.
- [6] 景明, 景威栋, 张尚智, 等. 藏药湿生扁蕾研究[M]. 甘肃: 甘肃科学技术出版社, 2017: 1-2.
- [7] LU N H, ZHAO H Q, JING M, et al. The pharmacodynamic active components study of Tibetan medicine, *Gentianopsis paludosa*, on ulcerative colitis fibrosis[J]. International Immunopharmacology, 2017, 46: 163-169.
- [8] 侯勤正, 叶广继, 马小兵, 等. 青藏高原不同生境下湿生扁蕾 (*Gentianopsis paludosa*) 个体大小依赖的繁殖分配[J]. 生态学报, 2016, 36(9): 2686-2694.
- [9] XUE C Y, LI D Z. Use of DNA barcode sensu lato to identify traditional Tibetan medicinal plant *Gentianopsis paludosa* (Gentianaceae)[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2011, 49(3): 267-270.
- [10] 樊冬梅, 刘越, 唐丽. 天然酮类化合物生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(3): 503-510.
- [11] RAHMANIAH R, YUYUNTIA Y, SOETIKNO V, et al. Alpha mangostin inhibits hepatic stellate cells activation through TGF- β /Smad and Akt signaling pathways: an in vitro study in LX2[J]. Drug Research, 2017, 68(3): 153-158.
- [12] RODNIEM S, TIYAO V, NILBU-NGA C, et al. Protective effect of alpha-mangostin on thioacetamide-induced liver fibrosis in rats as revealed by morpho-functional analysis[J]. Histology and Histopathology, 2019, 34(4): 419-430.
- [13] ZHENG X Y, YANG Y F, LI W, et al. Two xanthones from *Swertia punicea* with hepatoprotective activities in vitro and in vivo[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 153: 854-863.
- [14] ZHENG X Y, ZHAO X, YANG Y F, et al. Antioxidant, antiapoptotic and amino acid balance regulating activities of 1,7-dihydroxy-3,4,8-trimethoxyxanthone against dimethyl nitrosamine induced liver fibrosis[J]. Plos One, 2017, 12(12): e0189344.
- [15] ZHENG D, HOU J, XIAO Y, et al. Cardio protective effect of mangiferin on left ventricular remodeling in rats[J]. Pharmacology, 2012, 90(1/2): 78-87.
- [16] HOU J, ZHENG D Z, ZHONG G C, et al. Mangiferin mitigates diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-diabetic rats[J]. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology, 2013, 91(9): 759-763.
- [17] 柳娜, 张旭东, 赵慧巧, 等. 湿生扁蕾黄酮对UC肠纤维化大鼠肠上皮细胞间质转化的影响[J]. 药学研究, 2018, 37(1): 8-12.
- [18] 张旭东, 柳娜, 景明, 等. 湿生扁蕾黄酮对溃疡性结肠炎肠纤维化大鼠肠上皮细胞ATG16L1、LC3表达的影响[J]. 中药材, 2018, 41(3): 720-724.
- [19] 国家质量技术监督局. 测量不确定度评定与表示: JJF1059.1-2012[S]. 北京: 中国计量出版社, 2012.
- [20] 国家质量监督检验检疫总局. 常用玻璃量器检定规程: JJG196-2006[S]. 北京: 中国计量出版社, 2006.
- [21] 魏茜, 刘铜华, 时晓娟, 等. HPLC法测定尖叶假龙胆中3个黄酮苷的含量[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(5): 1060-1064.
- [22] 赵慧巧, 陈晖, 景明, 等. RP-HPLC法同时测定湿生扁蕾中木犀草素、当药黄酮和当药醇苷的含量[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(3): 603-605.
- [23] 王琰, 石建功, 车镇涛, 等. HPLC-DAD-MS法同时测定藏药花锚中6个黄酮类成分[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(3): 345-349.
- [24] 郑杭生, 李计萍, 韩炜, 等. 紫外-可见分光光度法测定总黄酮含量的方法学考察要点[J]. 中成药, 2008, 30(9): 1364-1365.

(编辑: 梁进权)