

分光光度法测定大豆中植酸含量的不确定度评估

温舒元¹, 范杰英², 魏春雁², 蔡玉红², 马 虹²

(1. 延边大学, 吉林 延吉 133002; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘 要:本文评估了分光光度法测定大豆中植酸含量结果的不确定度,建立了相应的数学模型,探讨了大豆中植酸测定过程中产生测量结果不确定度的来源,按照JJF1059-2012《测量不确定度评定与表示》和《化学分析中不确定度的评估指南》的规定和要求,对测量结果的不确定度合成并扩展。结果表明,标准溶液配制、方法的回收率及标准工作曲线的拟合是合成不确定度的主要来源,当取置信概率95%, $k=2$ 时,计算出测量结果的扩展不确定度为0.957 2 mg/g,测定结果表示为 $(15.58 \pm 0.957 2)$ mg/g。

关键词:分光光度法;大豆;植酸;不确定度评估

中图分类号:R151.3 **文献标识码:**A

文章编号:2096-5877(2019)03-0092-05

Evaluation of Uncertainty of the Determination of Phytic Acid Content in Soybean by Spectrophotometry

WEN Shuyuan¹, FAN Jieying², WEI Chunyan², CAI Yuhong², MA Hong²

(1. Yanbian University, Yanji 133002; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: The uncertainty of the determination of phytic acid content in soybean by spectrophotometry was evaluated in the paper. A mathematical model was established and source of measurement uncertainty discussed. According to the requirement and method of Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement (JJF1059-2012), Guidance on Evaluating the Uncertainty in Chemical Analysis, the component uncertainties were synthesized and extended. The results showed that method recovery standard, solution preparation, fitted curve were the major factors of uncertainty. An expanded uncertainty of 0.957 2 mg/g was obtained at the confidence probability of 95% and coverage factor of 2, the results of determination of phytic acid of soybean was $(15.58 \pm 0.957 2)$ mg/g.

Key words: Spectrophotometry; Soybean; Phytic acid; Evaluation of uncertainty

植酸(Phytic acid)在谷物及油料作物的籽实中含量较高,是种子中磷营养元素的主要贮存形式^[1]。植酸与组织中的钙、镁、铜、锰、锌等二价金属阳离子生成不可溶性植酸盐^[2],与蛋白质形成难溶性和不易消化吸收的植酸-蛋白质复合物,并抑制淀粉酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶的活性^[3-4]。由于人和单胃动物缺少植酸酶,消化植酸磷的能力低,因此植酸分子中的大部分磷、部分微量元素以及蛋白质不能被吸收利用,严重降低了植酸中的磷、金属元素及蛋白质的利用率,所以说,植酸是一种抗营养因子^[5]。

大豆是我国主要的植物性优质蛋白资源,在我国大面积种植,食用方法多种多样,但也存在

植酸含量一般在10~45 mg/g之间,在豆腐加工过程中,植酸优先与凝固剂结合,改变豆腐凝胶形成过程中凝固剂与大豆蛋白结合的有效浓度和反应速度,从而影响凝固剂使用量及豆腐软硬度^[6-9],所以,在大豆及其制品生产加工过程中,必须通过检测了解植酸的含量,保证豆制品品质。因此,植酸含量高低是评价谷物、油料作物品质的一项定量指标,成为育种工作者考虑的重要因子之一。

不确定度是检测方法准确度的新的量化表达方法,是一定概率的误差极限,是与测量结果相关联的参数^[10-12]。不确定度完善了检测结果信息,它显示测量结果的可信程度,反映了检测结果的质量高低。《检验检测机构资质认定评审准则》中《建立和保持应用评定测量不确定度的程序》要求实验室有能力评估检测结果的不确定度,出具包含有测量结果不确定度的报告。

收稿日期:2018-12-24

基金项目:吉林省省级现代农业发展专项资金项目(3810222)

作者简介:温舒元(1997-),女,在读本科,主要从事园艺学研究。多种抗营养因子,植酸是其中之一,大豆籽粒中

本文依据国家标准^[13]和三氯化铁比色法^[14-16],对大豆中植酸含量测量结果的不确定度分析并合成^[17-18],为同行实验室大豆中植酸含量测定结果不确定度评估提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料:大豆(市售)。干燥后,四分法处理、粉碎、全部通过16目尼龙筛,在干燥器内储存备用。

试剂:植酸钠(98%);硫酸钠、盐酸、磺基水杨酸、三氯化铁、氢氧化钠、三氯乙酸(TCA)均为分析纯;水为GB/T 6682规定的二级水。

仪器:T 6新世纪紫外-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(精确至0.000 1 g):中国赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;单标吸管、容量瓶:天津市天波玻璃仪器有限公司(A级);SC-3610离心机:中国安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.2 试样制备与测定

1.2.1 提取

称取大豆试样1.000 g,加入40 mL 1.2 %HCl-10% Na₂SO₄混合溶液于离心管中搅拌均匀,静置浸提2 h,选择离心机4 000 r/min,离心30 min,取全部上清液于50 mL容量瓶中,用HCl-Na₂SO₄浸提液定容,4℃冰箱保存。

1.2.2 净化

取上清液2.0 mL,加入15% TCA 2.0 mL于10 mL硬质玻璃试管中,混匀,4℃冰箱中静置2 h,离心(同1.2.1),取全部上清液于25 mL容量瓶中,用0.75 mol/L NaOH调节pH值为6.0~6.5,加水定容至刻度,混匀。

1.2.3 测定液与空白液制备

取3.0 mL净化液于15 mL离心管中,加入1 mL 0.3%磺基水杨酸,涡旋混匀,2 500 r/min离心10 min,上清液即为测定液;按1.2.2和1.2.3项步骤平行操作,但不加样品溶液,得比色空白溶液。

1.2.4 测定

将测定液和比色空白溶液分别倒入1 cm比色杯中,用空白液调“零点”,在500 nm波长下测定消光值。试样8次重复,2次平行比色。

1.3 标准曲线制备

1.3.1 标准溶液、标准储备液、标准工作液的配制

称取1.734 7 g植酸钠标准品,超纯水溶解、定容至100 mL,即为10 mg/mL植酸标准溶液;吸取5.0 mL标准溶液于500 mL容量瓶中,加水定容至

刻度,即得0.1 mg/mL标准储备液。分别吸取标准储备液0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.4 mL于7只10 mL玻璃试管中,分别加超纯水3.0 mL、2.8 mL、2.6 mL、2.4 mL、2.2 mL、2.0 mL、1.6 mL,再分别加1.0 mL 0.3%磺基水杨酸试剂,摇匀,即得每试管中含植酸0 μg、20 μg、40 μg、60 μg、80 μg、100 μg、140 μg的系列标准工作液。

1.3.2 标准曲线绘制

1.3.1项各标准工作液离心,取上清液倒入1 cm比色杯中,同空白溶液于500 nm处比色,建立直线回归方程。

2 不确定度分析

2.1 建立数学模型

$$X = \frac{m_2 \times 25 \times 1\,000}{m_1 \times 3 \times V \times 1\,000} \times 50$$

X—试样中植酸含量(mg/g); m_2 —3 mL供测定用的试液植酸的质量(mg);25—洗脱液定容体积(mL); m_1 —试样质量(g);3—供测定用的试液体积(mL);V—供净化的提取液的体积(mL);50—提取液定容体积(mL)。

2.2 不确定度的来源

通过数学模型和实验过程可知,不确定度由以下6部分组成:①制备待测液;②绘制标准曲线;③拟合标准曲线;④重复测定试样;⑤回收率;⑥仪器检定(见图1)。

2.3 评定不确定度分量

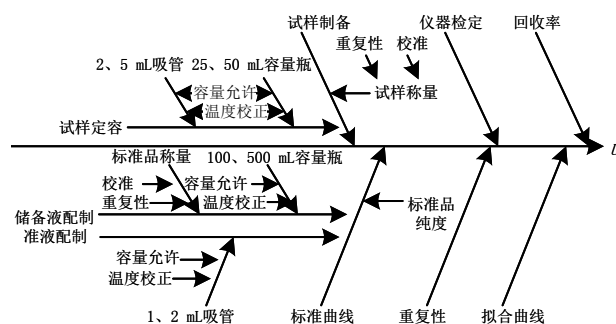


图1 不确定度来源与分析

2.3.1 待测液制备 $u_{rel}(X_{测})$

称量、提取、净化和定容用(0.000 1 g)天平及吸管和容量瓶。

2.3.1.1 试样称量 $u_{rel}(X_m)$

查天平检定证书,实际分度值 $d=0.1$ mg, $k=2$

(1)称量变动性

$$u_1(X_m) = \frac{a}{k} = \frac{0.1}{2} = 0.05(\text{mg})$$

(2)天平校准:按矩形分布。

$$u_2(X_m) = \frac{a}{k} = \frac{0.1}{\sqrt{3}} = 0.0577(\text{mg})$$

称量引入的不确定度为:

$$u(X_m) = \sqrt{u_1(m)^2 + u_2(m)^2} \\ = \sqrt{0.05^2 + 0.0577^2} = 0.0763(\text{mg})$$

称量引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(X_m) = \frac{u(m)}{m} = \frac{0.0763}{1\ 000} = 0.000\ 076\ 3$$

2.3.1.2 待测液提取、净化和定容引入的不确定度 $u_{rel}(X_v)$

根据《常用玻璃量器检定规程》(JJG196-2006)^[19]规定,玻璃量器要评定容量允差、温度允差引入的不确定度,其中,温度变动带来的不确定度分量:假设有3℃差异,查得水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{℃}$ 。取 $p=0.95$,体积变化 $\Delta V=V \times \text{液体膨胀系数} \times \Delta T$ 。所用玻璃量器不确定度见表1。

$$u_{rel}(X_v) = \sqrt{u_{rel}^2(V_{2\text{吸}}) + u_{rel}^2(V_{5\text{吸}}) + u_{rel}^2(V_{25\text{容}}) + u_{rel}^2(V_{50\text{容}})} \\ = \sqrt{0.002\ 89^2 + 0.001\ 77^2 + 0.000\ 782^2 + 0.000\ 683^2} \\ = 0.035\ 4$$

表1 容量器具引入的相对标准不确定度

项目	20℃允差	K值	容量允差(mL)	温度变化(mL)(矩形分布 $\sqrt{3}$)	相对标准不确定度 $u_{rel}(v)$
1 mL吸管	0.007	$\sqrt{3}$	0.004 04	0.000 364	0.004 05
2 mL吸管	0.010	$\sqrt{3}$	0.005 77	0.000 727	0.002 89
5 mL吸管	0.015	$\sqrt{3}$	0.008 66	0.001 82	0.001 77
25 mL容量瓶	0.03	$\sqrt{3}$	0.017 3	0.009 1	0.000 782
50 mL容量瓶	0.05	$\sqrt{3}$	0.028 9	0.018 2	0.000 683
100 mL容量瓶	0.10	$\sqrt{3}$	0.057 7	0.036 4	0.000 682
500 mL容量瓶	0.25	$\sqrt{3}$	0.144 3	0.182	0.000 465

$$u_{rel}(X_{\text{制}}) = \sqrt{u_{rel}^2(X_m) + u_{rel}^2(X_v)} \\ = \sqrt{0.000\ 076\ 3^2 + 0.000\ 354^2} = 0.000\ 362$$

2.3.2 标准溶液引入的不确定度 $u_{rel}(X_{\text{标}})$

包括购买的有证标准品植酸钠及配制系列标准溶液引入的不确定度。

2.3.2.1 植酸钠标准品(98%) $u_{rel}(\rho_1)$

标准品纯度为98%,按均匀分布 $k = \sqrt{3}$ 。

$$u_{rel}(\rho_1) = \frac{100\% - 98\%}{\sqrt{3}} = 0.011\ 6$$

2.3.2.2 配制0.1 mg/mL植酸标准储备液引入的不确定度 $u_{rel}(\rho_2)$

(1)称量1.734 7 g植酸钠标准品(计算同

2.3.1.1)

$$u_{rel}(X_m) = \frac{u(m)}{m} = \frac{0.0763}{1\ 734.7} = 0.000\ 043\ 9$$

(2)吸管和容量瓶不确定度(见表1)

$$u_{rel}(X_v) = \sqrt{u_{rel}^2(v_{5\text{吸}}) + u_{rel}^2(v_{100\text{容}}) + u_{rel}^2(v_{500\text{容}})} \\ = \sqrt{0.001\ 77^2 + 0.000\ 682^2 + 0.000\ 465^2} \\ = 0.001\ 95$$

$$u_{rel}(\rho_2) = \sqrt{u_{rel}^2(X_m) + u_{rel}^2(X_v)} \\ = \sqrt{0.000\ 043\ 9^2 + 0.001\ 95^2} = 0.001\ 95$$

2.3.2.3 配制系列标准溶液 $u_{rel}(\rho_3)$

使用1 mL或2 mL吸管共7次,由于平行比色测定2次,并设计了8次试样重复,在此,不再重复评定。

$$u_{rel}(\rho_3) = \sqrt{u_{rel}^2(v_{1\text{吸}}) + u_{rel}^2(v_{2\text{吸}})} \\ = \sqrt{0.004\ 05^2 + 0.002\ 89^2} = 0.004\ 98$$

$$u_{rel}(X_{\text{标}}) = \sqrt{u_{rel}^2(\rho_1) + u_{rel}^2(\rho_2) + u_{rel}^2(\rho_3)} \\ = \sqrt{0.011\ 6^2 + 0.001\ 95^2 + 0.004\ 98^2} = 0.012\ 77$$

2.3.3 标准曲线拟合引入的不确定度 $u_{rel}(X_{\text{测}})$

取标准溶液各点测定平均值,以标准溶液系

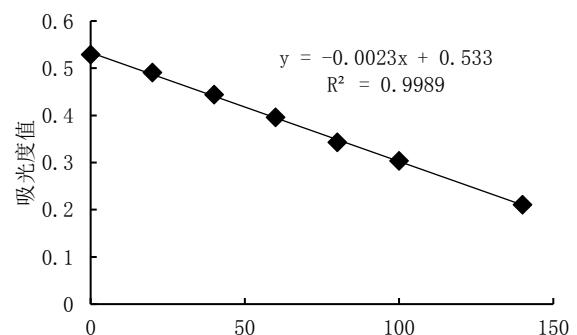


图2 植酸标准曲线

表2 标准溶液质量—吸光度结果及计算

序号	$X_{0i}(\mu\text{g})$	A_{0i}	$a+bC_{0i}$	$(C_{0i}-\bar{C}_0)^2$	$[A_{0i}-(a+bC_{0i})]^2$
0	0	0.5289	0.533	3 951.0	0.000 016 81
1	20	0.4908	0.487	1 836.7	0.000 014 44
2	40	0.4441	0.441	522.4	0.000 009 61
3	60	0.3956	0.395	8.162	0.000 000 36
4	80	0.3425	0.349	293.8	0.000 042 25
5	100	0.3036	0.303	1 379.6	0.000 000 36
6	140	0.2108	0.211	5 951.0	0.000 084 64

列质量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线(图2),用最小二乘法进行拟合,建立直线方程 $A=a+bc$, a : 直线截距; b : 直线斜率。 $A=-0.002\ 3c+0.533$; $R^2=0.998\ 9$ 。待测液吸光度平均值为:0.360 9, 计算待测液植酸含量为 74.784 μg , 代入数学模型, 试样中植酸含量为 15.58 mg/g 。系列标准溶液质量-吸光度结果及计算见表2。

$\bar{C}$ —待测试样溶液浓度的平均值(μg); $\bar{C}_0$ —标准曲线系列质量平均值(μg); S_R —标准曲线的剩余标准差; C_{0i} —各标准溶液质量(μg); P —待测试样重复测定次数($P=8$); n —标准曲线的点数($n=14$); A_{0i} —各标准溶液的实际响应值; $a+bC_{0i}$ —各

标准溶液的吸光度理论值。

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_{0i} - (a) + bC_{0i})^2}{n - 2}}$$
$$= \sqrt{\frac{0.000\ 168\ 47}{14 - 2}} = 0.003\ 74$$

标准曲线拟合引入的不确定度为:

$$u(C_n) = \frac{S_R}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{C} - \bar{C}_0)^2}{\sum_{i=1}^n (C_{0i} - \bar{C}_0)^2}}$$
$$= \frac{0.003\ 74}{0.002\ 3} \sqrt{\frac{1}{8} + \frac{1}{14} + \frac{(74.784 - 62.857)^2}{13\ 942.7}} = 0.739$$

表3 样品重复测定结果

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	74.33	74.21	75.09	75.14	75.21	74.42	74.98	74.65
平均值	74.784		标准偏差 0.399 25			相对标准偏差 0.533 9%		

则标准曲线拟合引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(C_{\text{拟}}) = \frac{u(C_n)}{\bar{C}} = \frac{0.739}{74.784} = 0.009\ 88$$

2.3.4 重复性测定引入的不确定度 $u_{rel}(X_{\text{重}})$

每个试样进行8次重复测定,吸光度值代入直线方程,由直线方程计算待测液质量,计算大豆样品待测液平均含量为:78.784 μg ,测定结果及重复性引入的不确定度见表3。

$$u(X_{\text{重}}) = \frac{0.399\ 25}{\sqrt{8}} = 0.141\ 2(\mu\text{g})$$

$$u_{rel}(X_{\text{重}}) = \frac{0.141\ 2}{74.784} = 0.001\ 889$$

2.3.5 方法的回收率引入不确定度 $u_{rel}(X_{\text{回}})$

实验回收率为 96%~105%,依据 JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》,计算回收率产生的不确定度:

$$u_{rel}(X_{\text{回}}) = \sqrt{\frac{(b_+ + b_-)^2}{12}}$$

$$b_+ = (105 - 100)\% = 5\%$$

$$b_- = (100 - 96)\% = 4\% \quad u_{rel}(X_{\text{回}}) = 0.025\ 9$$

2.3.6 检定仪器引入的不确定度 $u_{rel}(X_{\text{仪}})$

查分光光度计计量鉴定证书,透射比 $U=0.6\%$

$$(k=2), \text{则 } u_{rel}(X_{\text{仪}}) = \frac{0.006}{2} = 0.003$$

2.4 试样合成标准不确定度

试样相对合成标准不确定度为:

$$u_{rel}(X) = \sqrt{u_{rel}^2(X_{\text{制}}) + u_{rel}^2(X_{\text{标}}) + u_{rel}^2(C_{\text{拟}}) + u_{rel}^2(X_{\text{重}}) + u_{rel}^2(X_{\text{回}}) + u_{rel}^2(X_{\text{仪}})}$$
$$= \sqrt{0.000\ 362^2 + 0.012\ 77^2 + 0.009\ 88^2 + 0.001\ 889^2 + 0.025\ 9^2 + 0.003^2}$$
$$= 0.030\ 72$$

合成标准不确定度为: $u(X)=X \times u_{rel}(X)=15.58$

$$\text{mg/g} \times 0.030\ 72 = 0.478\ 6\ \text{mg/g}$$

2.5 扩展不确定度

$$k=2, \quad U=ku=2 \times 0.478\ 6\ \text{mg/g} = 0.957\ 2\ \text{mg/g}$$

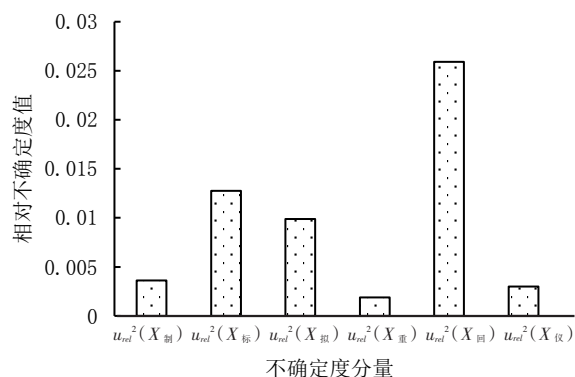


图3 不确定度分量贡献比较

2.6 检测报告

样品中植酸含量(X)=(15.58±0.957 2)mg/g

3 讨论

各种不确定度分量的贡献比较结果见图3。

由图3可见,①方法的回收率、标准曲线绘制及标准曲线拟合引入合成不确定度的85%,实验测定过程中,通过选择合适浓度范围的标准曲线、增加标准溶液系列质量的点数和测定次数、用较为精密的移液器代替吸管等措施,降低测量结果的合成不确定度。②加强对仪器的日常维护保养,定期计量检定和期间核查,保证仪器的技术性能处于良好状态,以减少仪器测量引入的不确定度,提高检测质量。③样品的制备、样品重复性及仪器的性能对测量结果的不确定度影响较小。

参考文献:

- [1] 袁凤杰,舒庆尧,朱丹华.大豆低植酸育种研究进展[J].中国农学通报,2006,22(6):173-176.
- [2] 范杰英,刘香英,田志刚,等.我国东北地区大豆品种植酸含量的比较分析[J].吉林农业科学,2014,39(3):9-10,41.
- [3] Singh M, Krikorian A D. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate[J]. Agric Food Chem, 1982, 30(4):799.
- [4] 傅启高.植酸对单胃动物的抗营养作用[J].动物营养学报,1998,10(4):1-10.
- [5] Zhou J R, Erdman J W. Phytic acid in health and disease[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1995, 35(6): 495-508.
- [6] Saio K, Koyama E, Yagasaki S, et al. Protein-calcium-phytic acid relationship in soybean. Part III. Effect of phytic acid on coagulative reaction in tofu-making[J]. Agric Biol Chem, 1969, 33(1): 36-42.
- [7] Ishiguro T, Ono T, Wada T, et al. Changes in soybean phytate content as a result of field growing conditions and influence on tofu texture[J]. Biosci Biotech Biochem, 2006, 70(4): 874-880.
- [8] Hou H J, Chang K C. Yield and textural properties of tofu as affected by the changes of phytate content during soybean storage [J]. J Food Sci, 2003, 68(4): 1185-1191.
- [9] Toda K, Takahashi K, Ono T, et al. Variation in the phytic acid content of soybeans and its effect on consistency of tofu made from soybean varieties with high protein content[J]. Food Agric, 2006, 86(2): 212-219.
- [10] 李若姝,刘香英,田志刚,等.大豆品种籽粒品质对豆浆加工特性的影响[J].东北农业科学,2017,42(1):50-55.
- [11] 田志刚,刘香英,范杰英,等.小粒大豆籽粒品质与豆芽品质的关系研究[J].东北农业科学,2016,41(3):95-98.
- [12] 田志刚,刘香英,康立宁.大豆品种品质与腐竹品质的关系研究[J].吉林农业科学,2013,38(3):72-75.
- [13] 刘香英,田志刚,范杰英,等.大豆品种籽粒品质与酸豆奶品质相关性研究[J].东北农业科学,2016,41(4):100-105.
- [14] 国家质量监督检验检疫总局.中华人民共和国国家计量技术规范 JJF1001-2011 通用计量术语及定义[S].北京:中国质检出版社,2011:16-18.
- [15] 臧慕文.分析测试不确定度的评定与表示(1)[J].分析实验室,2005,24(11):74-79.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局.JJF1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].北京:中国计量出版社,2013:1-51.
- [17] 中华人民共和国 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.153-2016《食品安全国家标准 食品中植酸的测定》[S].2016:1-6.
- [18] 傅启高,李慧荃.三氯化铁比色法测定植酸含量的研究[J].营养学报,1997,19(2):216-220.
- [19] 王国蓉,万文贵,王 丽,等.三氯化铁滴定法测定植酸含量方法的优化及改进研究[J].食品科学,2009,30(10):188-190.
- [20] 张理珉,程立忠,陆和生.三氯化铁比色法测定曲酸含量方法的改进[J].生物技术,2000,10(3):16-17.
- [21] 国家质量监督检验检疫总局.JJF1135-2005 化学分析测量不确定度评定[S].北京:中国计量出版社,2005:1-12.
- [22] 中国实验室国家认可委员会.化学分析中不确定度的评估指南[S].北京:中国计量出版社,2006:26-29.
- [23] 国家质量监督检验检疫总局.JJG196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].北京:中国计量出版社,2006:6-8.