

天然乳胶水抽提蛋白质含量检测结果不确定度评定

李兆枫, 谢丹华

广州检验检测认证集团有限公司 广东广州

【摘要】 本评定对标准 GB/T 21870-2008 用于测定块状乳胶产品的水抽提蛋白质含量进行不确定度分析, 从多方面去分析其方法的不确定度构成和贡献。最终计算得一份蛋白质含量为 805.29 $\mu\text{g/g}$ 的扩展不确定度为 197.94 $\mu\text{g/g}$ ($k=2$)。

【关键词】 蛋白质; 不确定度; 乳胶产品

Uncertainty evaluation of the detection result from determination of water-extractable protein in natural rubber latex

Zhaofeng Li, Danhua Xie

Guangzhou Inspection Testing and Certification Group Co., Ltd. Guangzhou, Guangdong

【Abstract】 This assessment conducts uncertainty analysis on the standard GB/T 21870-2008 for the determination of water-extracted protein content in bulk latex products, and analyzes the uncertainty composition and contribution of its method from various aspects. Finally, the expanded uncertainty of a protein content of 805.29 $\mu\text{g/g}$ was calculated to be 197.94 $\mu\text{g/g}$ ($k=2$).

【Keywords】 Protein; Uncertainty; Latex products

前言

本评定只针对块状乳胶产品(如乳胶枕、乳胶垫等)在 GB/T 21870-2008 上适用部分对其不确定度进行评定。由于标准有部分实验参数并无明确要求, 所以本评定采用本实验室检测使用的参数。

按标准要求, 每克样品加入 10~15mL 抽提液进行抽提, 本实验室选取样品取样量为 3g, 抽提液加入量为 45mL, 抽提液按照 GB/T 6920-1986 中的 pH=7.413 磷酸盐缓冲液进行配制, 比色皿选择 10mm 规格, 750nm 处测定显色液, 试剂用量会根据实际需要按比例调整。

1 测定原理及过程控制

1.1 测定原理

用缓冲溶液抽提水溶性蛋白质, 然后通过沉淀、浓缩, 将其从有可能干扰测定的其他水溶性物质中分离出来; 再溶解沉淀的蛋白质, 以标准蛋白质做参照, 用 Lowry 方法进行比色, 定量测定蛋白质含量。

1.2 过程控制

精确称量试样 3g (精确至 0.001g) 三份, 分别置于 250mL 聚乙烯三角瓶中, 加 45mL pH 为 7.4 \pm 0.4 缓冲溶液在 (25 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$ 条件下抽提 (120 \pm 5) min, 乳胶中的蛋白质被缓冲溶液抽提出来, 转移抽提液至离心管, 在不低于 2000g 条件下离心 15min, 取分离出的抽提液于离心管中, 加入 DOC, 混匀并静置 10min, 然后加入 TCA 和 PTA, 混匀并再静置 30min, 将离心管在不低于 6000g 条件下离心 30min, 倾去清液, 加入氢氧化钠溶液溶解沉淀, 溶解后的蛋白质溶液经碱性柠檬酸铜和福林试剂显色, 显色液用分光光度计比色测定其蛋白质浓度。按公式(1)计算出乳胶中可抽提蛋白质含量, 检测过程如下图 1。

2 建立测量模型

$$E_i = \frac{5Vc_i}{Fm} \dots \dots \dots (1)$$

E_i —第 i ($i=1, 2, 3$) 个试样蛋白质测定结果, $\mu\text{g/g}$ 。

V —试样抽提液的体积, mL。

c_i —第 i ($i=1, 2, 3$) 个试样从工作曲线上的萃取液中的蛋白质浓度的中位值, $\mu\text{g/mL}$ 。

m —试样的质量, g。

F —浓缩因子

3 测定结果不确定度主要来源及其分析

3.1 测定过程随机效应导致的不确定度 $u(E_i)$

该分量包括样品均匀性, 称量重复性, 量液重复性, 实验过程重复性, 分光光度计示值重复性等, 由于每个步骤相互影响, 所以不会将重复性在系统误差上考虑, 而是从最后测定结果上进行分析。

3.2 系统误差导致的不确定度: 分别从以下四个

方面进行分析

(1) 试样抽提液的体积 V , 此数据由 100mL 量筒量取, 故其不确定度分析由其量器参数决定。

(2) 试样的质量 m , 此数据由电子天平的线性不确定度决定。

(3) 配制标准系列溶液的浓度 c_{S2} , 此数据由其配制所用的各种器具的参数决定。

(4) 工作曲线的拟合产生的不确定度。

不确定度主要来源见图 2。

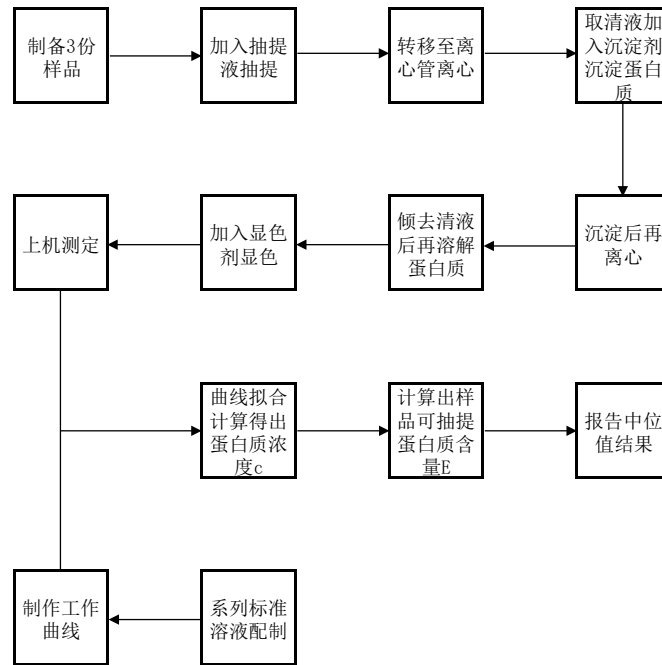


图 1 水抽提蛋白质含量测定过程示意图

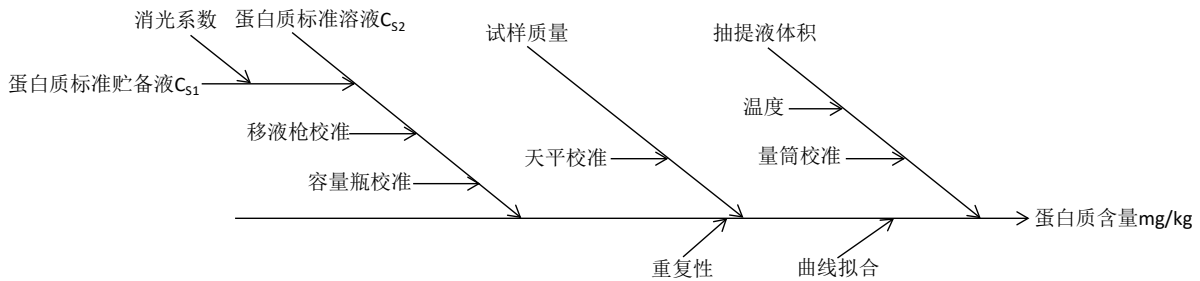


图 2 测定蛋白质含量不确定度来源示意图

4 标准不确定度分量评定

4.1 试样抽提液的体积相对标准不确定度

$u_{rel}(V)$ 分量的评定

本实验室试样抽提液的体积是用 100mL 量筒量取。故其不确定度由量筒的示值不确定度决定。由

于重复性会在最后测试结果合并计算, 所以仅考虑容量允差和校准温度差异引入的不确定度。

根据 JJG 196-2006 规定, 100mL 量出式量筒的容量允差为 $\pm 1.0\text{mL}$, 量具的计量是采用称量差值换算纯水体积所得, 按矩形分布 $k = \sqrt{3}$, 则量筒的校

准标准不确定度

$$u_{spel}(V_{100mL}) = \frac{1.0mL}{\sqrt{3}} = 0.577mL$$

$$u_{rel}(V_{45mL}, spel) = \frac{u_{spel}(V_{100mL})}{45mL} = \frac{0.577mL}{45mL} = 0.01283$$

校准时温度为 20℃, 以本实验室所处地区常年温度在 23℃计, 温差为 3℃, 根据水的膨胀系数 $2.1 \times 10^{-4}/^{\circ}C$, 按矩形分布 $k = \sqrt{3}$, 得出 100mL 量筒的温差引起的标准不确定度

$$u_T(V_{100mL}) = \frac{100mL \times 2.1 \times 10^{-4}/^{\circ}C \times 3^{\circ}C}{\sqrt{3}} = 0.036mL$$

$$u_{rel}(V_{45mL}, T) = \frac{u_T(V_{100mL})}{45mL} = \frac{0.036mL}{45mL} = 0.00081$$

由于 $u_{rel}(V_{45mL}, T)$ 该分量不足校准体积不确定度的十分之一, 可忽略不计。所以

$$u_{rel}(V) = u_{rel}(V_{45mL}, spel) = 0.01283$$

4.2 称量试样质量的相对标准不确定度 $u_{rel}(m)$ 分量的评定

本实验室使用的电子天平精度为 0.0001g, 其 $MPE \leq \pm 0.001g$, 称量两次, 一次去皮, 一次称重, 按矩形分布 $k = \sqrt{3}$, 得出该标准不确定度

$$u(m) = \sqrt{2} \times \frac{0.001g}{\sqrt{3}} = 0.00082g$$

$$u_{rel}(m) = \frac{u(m)}{3g} = 0.00027$$

4.3 配制蛋白质标准系列溶液相对标准不确定度 $u_{rel}(c_{S2})$ 分量的评定

蛋白质标准储备溶液 S1 是由电子天平称取 100mg 卵清蛋白溶解于 100mL 抽提液中, 再以其在 280nm 处的吸光度除以消光系数 0.64 得出精确浓度, 所以仅考虑吸光度产生的不确定度。按矩形分布 $k = \sqrt{3}$, 测量两次, 一次参比调零, 一次测量, 使用的紫外可见分光光度计 $MPE \leq \pm 0.001Abs$, 得出其标准不确定度。

由于该精确浓度是由吸光度直接换算得出, 所以相当于

$$c_{S1} = \frac{A}{A_0} \times c$$

其中

A_0 —消光系数

c —与消光系数所对应的蛋白质浓度, mg/mL

根据上述公式可得 $u_{rel}(c_{S1}) = u_{rel}(A)$, 所以其标准不确定度为:

$$u(A) = \sqrt{2} \times \frac{0.001Abs}{\sqrt{3}} = 0.00082Abs$$

$$u_{rel}(c_{S1}) = u_{rel}(A) = \frac{u(A)}{0.64Abs} = 0.00128$$

蛋白质标准系列溶液 S2 是通过 S1 进行稀释配制, 分别从蛋白质标准液 S1 中用 1mL 和 5mL 移液枪移取 0.25mL、0.50mL、1.00mL、2.0mL 和 4.0mL 于 100mL 容量瓶中并定容。其中使用了 1mL 移液枪 ($MPE \leq \pm 0.01mL$)、5mL ($MPE \leq \pm 0.03mL$) 移液枪和 100mL 容量瓶(允差 $\pm 0.1mL$), 按矩形分布分别计算出各点的标准不确定度见下表 1。

表 1 移液枪移取液体引入不确定度表

分量	来源	不确定度	量值	相对标准不确定度
$u_{rel}(V_{0.25mL}, spel)$			0.25mL	0.02309
$u_{rel}(V_{0.50mL}, spel)$	1mL 移液枪校准体积	$\frac{0.01mL}{\sqrt{3}} = 0.00577mL$	0.50mL	0.01155
$u_{rel}(V_{1.00mL}, spel)$			1.00mL	0.00577
$u_{rel}(V_{2.0mL}, spel)$	5mL 移液枪校准体积	$\frac{0.03mL}{\sqrt{3}} = 0.01732mL$	2.0mL	0.00866
$u_{rel}(V_{4.0mL}, spel)$			4.0mL	0.00433
$u_{rel}(V_{0.25mL}, T)$			0.25mL	0.00145
$u_{rel}(V_{0.50mL}, T)$	1mL 移液枪温差	$\frac{1mL \times 2.1 \times 10^{-4}/^{\circ}C \times 3^{\circ}C}{\sqrt{3}} = 0.00036mL$	0.50mL	0.00073
$u_{rel}(V_{1.00mL}, T)$			1.00mL	0.00036
$u_{rel}(V_{2.0mL}, T)$	5mL 移液枪温差	$\frac{5mL \times 2.1 \times 10^{-4}/^{\circ}C \times 3^{\circ}C}{\sqrt{3}} = 0.00182mL$	2.0mL	0.00091
$u_{rel}(V_{4.0mL}, T)$			4.0mL	0.00045

由于 $u_{rel}(V, T)$ 远低于 $u_{rel}(V, spel)$, 可以忽略, 所以 $u_{rel}(V) = u_{rel}(V, spel)$ 。

$$u_{spel}(V_{100mL}) = \frac{0.1mL}{\sqrt{3}} = 0.058mL$$

$$u_{rel}(V_{100mL}, spel) = \frac{u_{spel}(V_{100mL})}{100mL} = \frac{0.058mL}{100mL} = 0.00058$$

$$u_{rel}(V_{100mL}, T) = \frac{u_T(V_{100mL})}{100mL} = \frac{0.036mL}{100mL} = 0.00036$$

$$u_{rel}(V_{100mL}) = \sqrt{u_{rel}^2(V_{100mL}, spel) + u_{rel}^2(V_{100mL}, T)} = \sqrt{0.00058^2 + 0.00036^2} = 0.00068$$

由于 $u_{rel}(c_{s1})$ 和 $u_{rel}(V_{100mL})$ 远低于移液枪校准体积的不确定度, 所以可以忽略, 则蛋白质标准系列溶液相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(c_{s2}) = \sqrt{u_{rel}^2(V_{0.25mL}) + u_{rel}^2(V_{0.50mL}) + u_{rel}^2(V_{1.00mL}) + u_{rel}^2(V_{2.0mL}) + u_{rel}^2(V_{4.0mL})}$$

$$= \sqrt{0.02309^2 + 0.01155^2 + 0.00577^2 + 0.00866^2 + 0.00433^2} = 0.02817$$

4.4 拟合工作曲线的相对标准不确定度 $u_{rel}(c_0)$ 分量的评定

重复测量两次, 从校准曲线上拟合浓度 c_0 , c_0 与拟合工作曲线 $A = kc + b$ 有关的不确定度 $u(c_0)$ 的计算按 CNAS-GL06 进行

$$u(c_0) = \frac{S_R}{k} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{\sum_j^n (c_j - \bar{c})^2}}$$

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (kc_j + b)]^2}{n - 2}}$$

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (kc_j + b)]^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{0.01769}{2 \times 5 - 2}} = 0.04703 \mu\text{g/mL}$$

$$u(c_0) = \frac{S_R}{k} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{\sum_j^n (c_j - \bar{c})^2}} = \frac{0.04703}{0.0388} \times \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{2 \times 5} + \frac{(c_0 - 15.622)^2}{30.73}}$$

$$= 1.2121 \times \sqrt{0.6 + \frac{(c_0 - 15.622)^2}{30.73}}$$

$$u_{rel}(c_0) = \frac{1.2121 \times \sqrt{0.6 + \frac{(c_0 - 15.622)^2}{30.73}}}{c_0}$$

4.5 测试过程中随机效应导致的不确定度 $u_{rep}(E_i, rand)$ 分量的评定

按 GB/T 21870-2008 规定以三个平行试样的测试结果中间值作为报告的测试结果。以下将以 E_1 代表三个结果中的最小值、 E_2 代表中间值、 E_3 代表最大值, 对于测试样品 i 的报告结果 $E_i = E_{i2}$ 。以 E_i 代替 \bar{E}_i 进行合并样本的标准偏差计算。

对 m 组数据进行测定, 其实验标准偏差为:

S_R —残差标准偏差;

m —重复次数;

n —校准数据的总点数

b —截距。

由于本方法可采用多项式回归法进行拟合, 所以线性拟合效果并不是最优。以实验室当前采用的线性拟合法相关系数 $r \geq 0.995$ 以上的工作曲线, 在此以相关系数为 $r=0.996909$ 的某一拟合直线数据为例:

$$S_p(E_{ij}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^3 (E_{ij} - E_i)^2}{m(3-1)}}$$

以第 i 组独立观测样品的中位值作为测量结果, 侧测量结果随机效应导致的不确定度分量为:

$$u(E_i, rand) = S_p(E_i) = \frac{S_p(E_{ij})}{\sqrt{2}}$$

$$u_{rel}(E_i, rand) = \frac{u(E_i, rand)}{E_i}$$

5 不确定度分量表及 $u_{rel}(E_i)$ 的合成

表 2 水抽提蛋白质含量测定结果不确定度分量表

分量	来源	不确定度	量值	相对不确定度	
$u_{rel}(V)$	$u_{rel}(V_{100mL}, spel)$	100mL 量筒体积校准	0.577mL	45mL	0.01283
	$u_{rel}(V_{100mL}, T)$	100mL 量筒温差	0.036mL	45mL	0.00081 (可忽略)
$u_{rel}(m)$	-----	电子天平称量	0.00082g	3g	0.00027 (可忽略)
	$u_{rel}(c_{S1})$	分光光度计测量	0.00082Abs	0.640Abs	0.00128 (可忽略)
	$u_{rel}(V_{0.25mL}, spel)$			0.25mL	0.02309
	$u_{rel}(V_{0.50mL}, spel)$	1mL 移液枪体积校准	0.00577mL	0.50mL	0.01155
	$u_{rel}(V_{1.00mL}, spel)$			1.00mL	0.00577
	$u_{rel}(V_{2.0mL}, spel)$	5mL 移液枪体积校准		2.0mL	0.00866
	$u_{rel}(V_{4.0mL}, spel)$			4.0mL	0.00433
$u_{rel}(c_{S2})$	$u_{rel}(V_{0.25mL}, T)$			0.25mL	0.00145 (可忽略)
	$u_{rel}(V_{0.50mL}, T)$	1mL 移液枪温差	0.00036mL	0.50mL	0.00073 (可忽略)
	$u_{rel}(V_{1.00mL}, T)$			1.00mL	0.00036 (可忽略)
	$u_{rel}(V_{2.0mL}, T)$	5mL 移液枪温差		2.0mL	0.00091 (可忽略)
	$u_{rel}(V_{4.0mL}, T)$			4.0mL	0.00045 (可忽略)
	$u_{rel}(V_{100mL}, spel)$	100mL 容量瓶体积校准	0.058mL	100mL	0.00058 (可忽略)
	$u_{rel}(V_{100mL}, T)$	100mL 容量瓶温差	0.036mL	100mL	0.00036 (可忽略)
$u_{rel}(c_0)$	-----	拟合曲线($r \geq 0.995$)	-----	c_0	$\frac{1.2121 \times \sqrt{0.6 + \frac{(c_0 - 15.622)^2}{30.73}}}{c_0}$
$u_{rel}(E_i, rand)$	-----	随机效应	-----	E_i	$\frac{u(E_i, rand)}{E_i}$

将表 2 中所列出的水抽提蛋白质含量测试结果不确定度分量合成得:

$$\begin{aligned}
 u_{rel}(E_i) &= \sqrt{u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(c_{S2}) + u_{rel}^2(c_0) + u_{rel}^2(E_i, rand)} \\
 &= \sqrt{0.01283^2 + 0.02309^2 + 0.01155^2 + 0.00577^2 + 0.00866^2 + 0.00433^2 + \left[\frac{1.2121 \times \sqrt{0.6 + \frac{(c_0 - 15.622)^2}{30.73}}}{c_0} \right]^2 + \left[\frac{u(E_i, rand)}{E_i} \right]^2} \\
 &= \sqrt{0.03095^2 + \left[\frac{1.2121 \times \sqrt{0.6 + \frac{(c_0 - 15.622)^2}{30.73}}}{c_0} \right]^2 + \left[\frac{u(E_i, rand)}{E_i} \right]^2}
 \end{aligned}$$

6 扩展不确定度

一般扩展因子以 $k = 2$ 计, 扩展不确定度为:

$$U(E_i) = k \times E_i \times u_{rel}(E_i) = 2 \times E_i \times \sqrt{0.03095^2 + \left[\frac{1.2121 \times \sqrt{0.6 + \frac{(c_0 - 15.622)^2}{30.73}}}{c_0} \right]^2 + \left[\frac{u(E_i, rand)}{E_i} \right]^2}$$

7 应用实例

从本实验取部分以往数据 (10 组, 见表 3) 计算出

表 3 实验数据表

实验组	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
质量/g	3.0039	3.0048	3.0009	3.0095	3.0051	3.0079	3.0083	3.0058	3.0087	3.0069
再溶解体积 mL	3.0078	3.0038	3.0041	3.0039	3.0004	3.0001	3.0045	3.0021	3.0004	3.0058
校正吸光度	3.0071	3.0042	3.0033	3.0097	3.0028	3.0087	3.0012	3.0053	3.0020	3.0026
					3.20					
	1.411	1.247	1.292	1.264	1.083	0.902	1.134	1.266	1.094	1.261
	1.160	1.232	1.272	1.327	1.246	1.046	1.102	1.175	1.307	1.217
	1.245	1.208	1.413	1.345	1.310	1.152	1.020	1.182	1.194	1.251

$\bar{c}_0=34.394\mu\text{g/mL}$ $\bar{E}_i=805.29\mu\text{g/g}$ (该值由 10 组数据各自的中位值再进行平均计算得出)

$u(E_i, rand)=24.57\mu\text{g/g}$ 则

$$\begin{aligned}
 u_{rel}(E_i) &= \sqrt{u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(c_{S2}) + u_{rel}^2(c_0) + u_{rel}^2(E_i, rand)} \\
 &= \sqrt{0.03095^2 + \left[\frac{1.2121 \times \sqrt{0.6 + \frac{(c_0 - 15.622)^2}{30.73}}}{c_0} \right]^2 + \left[\frac{u(E_i, rand)}{E_i} \right]^2} \\
 &= \sqrt{0.03095^2 + \left[\frac{1.2121 \times \sqrt{0.6 + \frac{(34.394 - 15.622)^2}{30.73}}}{34.394} \right]^2 + \left[\frac{24.57}{805.29} \right]^2} \\
 &= \sqrt{0.03095^2 + 0.12242^2 + 0.03051^2} = 0.1229
 \end{aligned}$$

$$U(E_i) = k \times E_i \times u_{rel}(E_i) = 2 \times 805.29 \times 0.1229 = 197.94\mu\text{g/g} (k = 2)$$

该乳胶块蛋白质含量为 $(805.29 \pm 197.94) \mu\text{g/g} (k=2)$

8 结果说明

从得出的不确定度的组成分量及贡献上可见, 曲线拟合所引入的不确定度分量贡献相当大, 而标准上也有建议可选择多项式回归方程拟合方式降低不确定度。另外从本实验室日常检验的数据上观察, 样品的均匀性和处理过程的重复性对不确定度分量影响贡献也比较大。

参考文献

- [1] GB/T 21870-2008 《天然胶乳医用手套水抽提蛋白质的测定 改进 Lowry 法》
- [2] CNAS-GL006:2019 《化学分析中不确定度的评估指南》
- [3] CNAS-TRL-002:2020 《纺织品检测测量不确定度的评估及实例》

[4] JJG196-2006 《常用玻璃量器检定规程》

[5] JJF 1059.1-2012 《测量不确定度评定与表示》

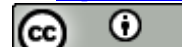
收稿日期: 2022 年 3 月 9 日

出刊日期: 2022 年 5 月 12 日

引用本文: 李兆枫, 谢丹华, 天然乳胶水抽提蛋白质含量检测结果不确定度评定[J]. 工程学研究, 2022, 1(1): 43-48
DOI: 10.12208/j.jer.20220011

检索信息: 中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

 OPEN ACCESS