

生鲜乳中动物水解蛋白 L-羟脯氨酸含量测定 (分光光度法) 不确定度分析

苗建民, 于和水, 郝晨雪, 王 欣

(唐山市畜牧水产品质量监测中心 唐山 063000)

摘 要: 本文对用紫外分光光度法检测生鲜乳中 L-羟脯氨酸含量的不确定度分析, 讨论了影响样品检测结果各分量的不确定度分析并量化, 求出其对检测结果不确定度的相对影响。

关键词: 不确定度; 生鲜乳; 水解蛋白; 分光光度法

中图分类号: TS252.7 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 550.1030

Hydrolyzed animal protein L-in raw milk Determination of hydroxyproline content (photometric method) uncertainty analysis

Miao Jianmin, Yu Heshui, Hao Chenxue, Wang Xin

(Tangshan City animal husbandry and aquatic product quality monitoring center Tangshan 063000)

Abstract: In this paper, using UV spectrophotometric determination of fresh milk L-hydroxyproline content of the uncertainty analysis, discusses the influence of sample test results of each component of uncertainty analysis and quantification, and the result of detection overall uncertainty of relative impact.

Key words: Overall uncertainty; Fresh milk; Proteinum hydrolysatum; Photometric method

1 引 言

皮革水解物是皮革“鞣革”工艺中产生的下脚料,是一种廉价的工艺原料,最常见的皮革水解物就是皮革粉。将其掺入牛奶或奶粉中可提高蛋白质的含量,会导致不易消化,吸收利用率降低,影响人体健康。2009年2月6日,卫生部公布了《食品中可能违法添加的非食用物质和滥用的食品添加剂品种名单(第二批)》,共4个指标,其中就包含“皮革水解物”。检测牛奶中皮革水解物,实际就是检测牛奶中的 L-羟脯氨酸。L-羟脯氨酸,英文名 L-Hydroxy proline, trans-4-Hydroxy-L-pronine, 别名: L-4-羟脯氨酸、反-4-羟基-脯氨酸,分子式为 C₅H₉N₃O₃ 分子量为 131.13。因此建立有效的动物组织中 L-羟脯氨

酸的检测方法迫在眉睫。可采用多种技术对其检测,其中分光光度法敏感性高、快捷并适合大范围监测等优点。不断地优化该方法,提高检测准确性具有深刻的社会意义。但是,每一次紫外分光光度法检测时,建立的标准曲线都是不尽相同的。为了保证检测结果的可比性和可靠性,过去的观点是通过误差分析给出被测量值不能确定的范围即误差,现在的观点认为,误差一词不宜用来定量表征测定结果的可靠程度。这是由于测量误差是表明测量结果偏离真值的差值,它客观存在,但人们无法准确得到(真值不可得)。如何较准确的界定一个区间来表征被测量值围绕真值的分散性,或者说确定测量结果可信度程度在什么水平上? 现代统计学认为,测量结果可信的程度是需要通过分析和评定来确定的,测量不确定度就是用来表征被测量值所处范围的一

种评定。在生鲜乳中 L-羟脯氨酸紫外分光光度法检测中引入不确定度概念,将提高检测结果的准确性和可靠性。

2 检测部分

2.1 主要仪器及试剂

UV-2550 紫外分光光度计[岛津仪器(北京)有限公司]、DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司)、BS110 电子天平(北京赛多利斯公司)、HHS 型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司)、PB-10 酸度计(德国赛多利斯),实验室常规设备。

2.2 试剂

所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2.2.1 缓冲溶液

将 50 g 柠檬酸 26.3 g 氢氧化钠和 146.1 g 结晶乙酸钠溶于水,稀释至 1 L,此溶液与 200 ml 水和 300 ml 正丙醇混合。

2.2.2 氯胺 T 溶液

将 1.41 g 氯胺 T 溶于 10 ml 水中,依次加入 10 ml 正丙醇和 80 ml 缓冲溶液。现用现配。

2.2.3 显色剂

称取 10 g 对二甲氨基苯甲醛,用 35 ml 高氯酸溶解,缓慢加入 65 ml 异丙醇。

2.2.4 L-羟脯氨酸标准液

储备液和工作液

储备液:精密称取 50.0 mg 的 L-羟脯氨酸溶解,加一滴 6 mol/L 盐酸定容至 100 ml 容量瓶,浓度为 500 mg/L;

工作液:精密量取 L-羟脯氨酸储备液 2.00 ml 用超纯水定容至 200 mL 的容量瓶中,浓度为 5 mg/L。

2.3 检测原理

生鲜乳经过盐酸水解,释放出 L-羟脯氨酸,经氯胺 T 氧化,生成含有吡咯环的氧化物与对氨基苯甲醛生成红色化合物,在波长 558 nm 处进行比色测定。

2.4 检测结果

通过检测,将获得各浓度标准样品的吸光值(见表 1),并对应的 L-羟脯氨酸的浓度建坐标曲

线图,待测样品的浓度可以从曲线上读出(如图 1 所示)。

表 1 检测结果一览表

序号	1	2	3	4	5	6	待测样品
浓度 ppb	0	0.25	0.5	1	1.5	2.5	1.4
吸光值	0.135	0.172	0.202	0.264	0.325	0.414	0.631

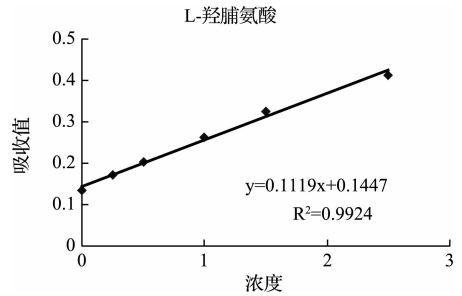


图 1 待测样品浓度曲线

3 不确定度分析

3.1 建立数学模型

影响检测结果的标准不确定度的分量有两部分组成:其一是由标准溶液的浓度-吸光度拟合的曲线球的检测结果时所产生的不确定度,记为 $u_1(x)$;其二是由标准溶液和待测样品量取过程所产生的不确定度,记为 $u_2(x)$ 。这样,待测结果的不确定度 $u(x)$ 数学表达模式为:

$$u(x) = \sqrt{u_1^2(x) + u_2^2(x)} \quad (1)$$

3.2 $u_1(x)$ 的计算

分光光度计法检测 L-羟脯氨酸的表示为:

$$y = a + bx$$

式中: x 为 L-羟脯氨酸的浓度, y 为标准曲线中 L-羟脯氨酸浓度为 x 时对应的吸光度百分比, b 为标准曲线的斜率, $b = 0.1119$, a 为标准曲线的截距, $a = 0.1447$

根据测定原理得: $2u_1(x) = \ln u_1(x)$ 。本次样品进行 2 次平行检测,有标准曲线求得 $x = 1.4 \mu\text{g/L}$, $u_1(x)$ 计算公式表示为

$$u'(x) = \frac{S_R}{b} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(X - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^n (X - \bar{X})^2}} \quad (2)$$

$$\text{式中: } S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y - (a + bx)]^2}{n - 2}} = 74.81,$$

$P = 2$, 对样品进行2次平行检测, $N = 6$, 标准曲线浓度点数, \bar{x} 为标准曲线个浓度点均值, $\bar{x} =$

$$\frac{\sum_{i=1}^n \times 1}{n} = 1.6$$

将上述各值代入公式(2) 得出:

$$u_1/(x) = 0.81$$

$$u_1/(x)/x = 0.81 \div 1.4 = 0.579$$

3.3 $u_2(x)$ 的计算

标准样品及待测样品取样量的不确定度实际上是 100 μL 和 20 μL 微量移液器的不确定度, 包括移液器的允许误差、充液重复误差以及温度变化产生的误差。

1) 20 μL 微量移液器的相对不确定度 $V(v_1)/v_1$: 20 μL 微量移液器的相对不确定度包括 20 微量移液器允许误差 $V(v_{11})$ 、充液重复误差 $V(v_{12})$ 、温度变化产生的误差 $V(v_{13})$, 即: $V(v_1)^2 = V(v_{11})^2 + V(v_{12})^2 + V(v_{13})^2$ 其中, $V(v_{11}) = A/3 = 0.5/3 = 0.29 \mu\text{L}$ (B 类不确定度, 20 μL 微量移液器的允许误差检定证书为 $A = \pm 0.5 \mu\text{L}$, 即区间半宽度为 0.5 μL); $(v_{12}) = R/C = 0.5/1.13 = 0.44 \mu\text{L}$ (A 类不确定度, 用极差法计算, 充液两次, 极其差为 $R = 0.5 \mu\text{L}$); $V(v_{13}) = \alpha V_{\Delta} t = 0.25 \times 10^{-3} \times 3 \times 20 = 1.5 \times 10^{-2} \mu\text{L}$ (A 类不确定度, 设温度变化 $\pm 3^\circ\text{C}$, 去离子水的膨胀系数在 20°C 时 $\alpha = 0.25 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$)。代入式(3) 计算的: $V(v_1)^2 = 0.29^2 + 0.44^2 + (1.5 \times 10^{-2})^2 = 0.28$, 20 μL 移液器不确定度 $V(v_1) = 0.53 \mu\text{L}$, 20 μL 移液器相对不确定度 $V(v_1)/v_1 = 0.03$ 。

2) 100 μL 微量移液器的相对不确定度 $V(v_2)/v_2$: 100 μL 微量移液器的相对不确定度计

算类似前节(1), 其中 100 μL 微量移液器的允许误差 $A = \pm 3.0 \mu\text{L}$, 计算不确定 $V(v_2) = 3.20 \mu\text{L}$, 相对不确定度 $V(v_2)/v_2 = 3.2 \times 10^{-2}$;

3) 合并 1)、2) 所得, 微量移液器的相对不确定度: $[u_2(x)/x]^2 = [V(v_1)/v_1]^2 + [V(v_2)/v_2]^2 = 0.03^2 + (3.2 \times 10^{-2})^2 = 0.0017$, 则 $u_2(x)/x = 0.042$

3.4 合成标准不确定度

合成相对标准不确定度:

$$\frac{u(x)}{x} = \sqrt{\left[\frac{u_2(x)}{x}\right]^2 + \left[\frac{u_1(x)}{x}\right]^2} \quad (3)$$

则

$$\frac{u(x)}{x} = 0.581$$

$$u(x) = 0.581 \times 1.4 = 0.81 (\mu\text{g/L})$$

3.5 扩展不确定度为:

取置信概率 $P = 95\%$, 包含因子 $K = 2$, 因此本次测定结果的扩展不确定度为:

$$U_{(P=95\%)} = K \times u(x) = 2 \times 0.81 = 1.62 \mu\text{g/L}$$

4 结 论

从以上分析中可知, 置信水平为 95% 条件下, 该样品测得结果表述为: $1.4 \pm 1.62 \mu\text{g/L}$

参考文献

- [1] JJF1059—1999 中国人民共和国国家计量技术规范—测量不确定度评定与标准。
- [2] 卫生部指定方法《乳与乳制品中水解蛋白鉴定-L(-)-羟脯氨酸含量测定》

作者简介

苗建民(1973 年 1 月 -), 女, 高级畜牧师, 从事动物性食品检测工作。

E-mail: miaojianmin2004@163.com