

高效液相色谱法测定灭菌乳中糠氨酸的不确定度评定

卢慧芳, 王文霞, 张耀广, 柴艳兵, 刘丽, 张影, 屈雅莉, 李飞, 肖淑贞, 刘志楠*
(石家庄君乐宝乳业有限公司, 石家庄 050021)

摘要: **目的** 评定高效液相色谱法测定灭菌乳中糠氨酸含量结果的不确定度。**方法** 依据 NY/T939-2016《巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定》测定灭菌乳中糠氨酸的含量, 建立高效液相色谱法测定灭菌乳中糠氨酸含量的不确定度评定的数学模型, 全面分析实验过程中各不确定度的来源, 并对各不确定度进行分量量化及合成, 计算灭菌乳中糠氨酸的合成标准不确定度及扩展不确定度。**结果** 灭菌乳中糠氨酸含量为 151.0 mg/100 g 蛋白质时, 测量结果的扩展不确定度为 5.8 mg/100 g 蛋白质($k=2$)。**结论** 溶液配制、蛋白质检测终点判断、色谱峰峰面积积分、样品重复性实验、加标回收率实验引入的不确定度对糠氨酸总不确定度贡献较大。

关键词: 灭菌乳; 糠氨酸; 不确定度; 高效液相色谱法

Uncertainty evaluation for the determination of furosine in sterilized milk by high performance liquid chromatography

LU Hui-Fang, WANG Wen-Xia, ZHANG Yao-Guang, CHAI Yan-Bing, LIU Li, ZHANG Ying, QU Ya-Li, LI Fei, XIAO Shu-Zhen, LIU Zhi-Nan*

(Shijiazhuang Junlebao Dairy Co., Ltd, Shijiazhuang 050021, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of determination of furosine in sterilized milk by high performance liquid chromatography. **Methods** According to NY/T939-2016 *Identification of restored milk in pasteurized milk and UHT sterilized milk*, the content of furfural in the sterilized milk was determined. A mathematical model for uncertainty evaluation of determination of furosine in sterilized milk by high performance liquid chromatography was established, the source of each uncertainty in the experiment was analyzed comprehensively, the components of each uncertainty were quantified and synthesized, and the standard uncertainty and extended uncertainty of the synthesis of furosine in sterilized milk were calculated. **Results** When the content of furosine in sterilized milk was 151.0 mg/100 g protein, the expanded uncertainty of measurement results was 5.8 mg/100 g protein ($k=2$). **Conclusion** The uncertainties introduced by solution preparation, protein detection endpoint judgment, chromatographic peak area integration, sample repeatability experiment, and standard addition recovery experiment contribute a lot to the total uncertainty of furosine.

KEY WORDS: sterilized milk; furosine; uncertainty; high performance liquid chromatography

*通信作者: 刘志楠, 高级工程师, 主要研究方向为乳制品行业质量管理、研发管理、检验管理。E-mail: liuzhinan@jlbry.com

*Corresponding author: LIU Zhi-Nan, Senior Engineer, Shijiazhuang Junlebao Dairy Co., Ltd. No.36 Shitong Road, Shijiazhuang 050021, China. E-mail: liuzhinan@jlbry.com

0 引言

糠氨酸是牛乳在加热过程中,氨基酸、蛋白质和乳糖通过美拉德反应所产生的系列产物之一,其学名是"ε-N-2-呋喃甲基-L-赖氨酸",在巴氏杀菌奶、直接法超高温瞬间灭菌奶和间接法超高温瞬间灭菌奶(ultra-high temperature)以及保持法二次灭菌奶中,糠氨酸的含量依次分别约为:0.2、2.2、26、270 mg/L^[1];全脂奶粉兑水复原奶的糠氨酸含量一般在 20~250 mg/kg 之间。含量幅度变化较大,其最主要的原因是生奶在不同的加工工艺过程中所经受热处理的强度不同,因此糠氨酸作为判断液态奶成品质量优劣的一个重要指标越来越受到关注。而更进一步的研究表明,摄入过量的糠氨酸对人体健康有害^[2]。

乳品实验室经常采用 NY/T 939-2016《巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定》^[3]中规定的超高效液相法测定灭菌乳中糠氨酸的含量,本方法检出限为 1.0 mg/100 g 蛋白质,准确性高,较普通液相色谱法上机时间短,较液相色谱质谱法前处理简单^[4],满足了实验室快速大批量检测的需求。为保证实验的准确性,有效地对检测过程进行质量控制,本研究对实验过程中各个不确定度来源进行了分析,计算了各个相对不确定度分量对总不确定度的影响,为提高实验结果的准确性和实验人员的检测水平提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂材料

UHT 灭菌乳(石家庄君乐宝乳业有限公司);甲醇(色谱纯,德国 Meker 公司);浓盐酸(分析纯,天津福晨化学试剂有限公司);三氟乙酸(优级纯,天津科密欧化学试剂有限公司);乙酸铵(色谱纯,美国 Sigma 公司);糠氨酸 C₁₂H₁₇O₄·XHCl(CAS:19746-33-9,肽纯度系数 69.6%,德国 Iris Biotech GmbH 公司);浓硫酸(分析纯,北京化工有限公司);氢氧化钠、硼酸、甲基红、溴甲酚绿(分析纯,国药集团有限公司);凯氏定氮催化剂(丹麦福斯公司);硫酸标准滴定溶液(0.1 mol/L,上海市计量测试技术研究院)。

1.2 仪器和设备

UPLC-Class 超高效液相色谱仪(配有紫外检测器,美国 Waters 公司);DHG-9243BS-III 干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);ME204E 天平(感量为 0.01 mg, 1 mg, 瑞士梅特勒-托利多公司);Kjeltec 8100 凯氏定氮仪(丹麦福斯公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

取 2 mL 奶样,置于高温消解瓶中,加 6 mL 10.6 mol/L

的盐酸溶液(盐酸:水=88:12, V:V),盖盖混匀,置于 110 °C 干燥箱中水解 12~23 h,加热结束后,从干燥箱中取出,冷却,涡旋混匀,用滤纸过滤,备用。

1.3.2 标准溶液制备

糠氨酸标准储备溶液(500 mg/L):将糠氨酸标准品按标准品证书提供的肽纯度系数(NetPeptide Content)换算后,用 3 mol/L 盐酸溶液配制成标准储备溶液。

示例:糠氨酸标准品证书上标注肽纯度系数为 69.1%,则称取 7.24 mg 糠氨酸标准品,用 3 mol/L 盐酸溶液溶解并定容至 10 mL,标准储备液的浓度为 500.0 mg/L。

糠氨酸标准工作液(2.0 mg/L):取 0.1 mL 标准储备溶液,用 3 mol/L 盐酸溶液定容至 25 mL,配制 2.0 mg/L 的糠氨酸标准工作液。

1.3.3 色谱条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流速:0.3 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:35 °C;进样量:5.0 μL;流动相:6 g/L 乙酸铵含 0.1% 三氟乙酸水溶液为流动相 A,甲醇为流动相 B,纯水为流动相 C。检测开始前用纯水过渡 15 min,用流动相 A 以 0.3 mL/min 的流速平衡色谱柱 15 min 后开始进样。洗脱条件:流动相 A,等度洗脱。检测完成后用纯水冲洗色谱柱,最后用甲醇保存色谱柱^[5]。

1.3.4 糠氨酸含量测定

1.3.4.1 蛋白检测

取 2 mL 水解液,按 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》^[6]的方法测定蛋白质的含量。

1.3.4.2 糠氨酸检测

在 10 mL 比色管中加入 5 mL 乙酸铵溶液(6 g/L),取 1 mL 水解液加入混匀,过 0.22 μm 水相滤膜后,上机检测。

2 结果与分析

2.1 不确定度数学模型的建立

糠氨酸含量以质量分数 F 计,数值以 mg/100 g 蛋白质表示:

$$F=C \times D / M \times 100$$

式中: F -样品中每 100 g 蛋白质中糠氨酸的含量,mg/100 g; C -样品水解液中糠氨酸的浓度,mg/L; D -测定时稀释倍数($D=6$); M -样品水解液中蛋白质浓度,g/L;

$$\text{糠氨酸含量: } FT = F - 0.7t$$

式中:0.7:常温下样品每储存 1 d 产生的糠氨酸含量, t :样品在常温下的储存天数, d 。

$$M = (V_1 - V_0) \times c \times 0.014 \times k \times 100 / m$$

式中: V_1 -样品消耗酸体积,mL; V_0 -空白消耗酸体积,mL; c -标准酸溶液的浓度,mol/L; m -样液称量质量,g;0.0140-氮原子的摩尔质量 kg/mol; k -氮换算成粗蛋白的系数。

2.2 检测不确定度来源分析

根据检测过程和数学模型分析, 不确定度主要来自样品前处理(包括样品水解、水解后稀释、水解后蛋白检测)、标准溶液的配制、超高效液相色谱仪测量及结果计算等方面, 重复性评估作为整体可以从测量结果重复性研究中得到, 因此无需分别考虑所有重复性的分量^[7]。

为明确表示实验过程中可能影响检测结果的诸多因素的关联性, 将检测过程用鱼骨图表示(图 1), 通过计算不确定度, 了解超高效液相色谱仪在检测灭菌乳中糠氨酸时影响结果准确性的主要因素, 以便在检测过程中予以重视。

2.3 各不确定度分量的计算

2.3.1 样品移取

灭菌乳的移取过程为使用 1 mL 的移液枪移取 2 次 1 mL 奶样加入耐高温消解瓶。此过程的不确定度 $u_{rel}(V_1)$ 由 1 mL 移液枪允差、温度组成。移取体积变动性已包括在测量重复性误差中, 不再评定。

1 mL 移液器容量允差为 ± 0.006 mL(厂商提供的说明书), 按照均匀分布考虑($K=\sqrt{3}$),

$$\text{标准不确定度为: } u_1(V_1) = \frac{0.006}{\sqrt{3}} = 0.003464 \text{ mL};$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_{1rel}(V_1) = \frac{u_1(V_1)}{V_1} = \frac{0.003464 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.3464\%。$$

温度对 1 mL 移液枪体积的影响引入的不确定度, 按下式计算, 由于水的膨胀体系系数^[8]为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$, 实验环境为 $(25 \pm 2) \text{ } ^\circ\text{C}$, 产生的体积变化为 $1 \text{ mL} \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} \times$

$2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C} = 4.2 \times 10^{-4} \text{ mL}$, 因此按均匀分布考虑($K=\sqrt{3}$),

$$\text{标准不确定度为: } u_2(V_1) = \frac{4.2 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0.0002425 \text{ mL};$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_{2rel}(V_1) = u_{rel}(V_1) = \frac{u_2(V_1)}{V_1} = \frac{0.0002425 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 0.02425\%。$$

按照 A 类不确定度评定, 样品 2 次移取引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(V_1) = \sqrt{\left[\left(\frac{u_1(V_1)}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{u_2(V_1)}{V_1}\right)^2\right]} \times 2 = \sqrt{[(0.3464\%)^2 + (0.02425\%)^2]} \times 2 = 0.4911\%。$$

2.3.2 样品水解

灭菌乳的水解过程用 10 mL 移液管移取 6 mL 10.6 mol/L 的盐酸溶液进行水解, 此过程的不确定度 $u_{rel}(V_2)$ 由 10 mL 移液管的允差、温度组成。移取体积变动性已包括在测量重复性误差中, 不再评定。

根据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》^[9] 10 mL 移液管容量允差为 ± 0.1 mL, 按照均匀分布考虑($K=\sqrt{3}$),

$$\text{标准不确定度为: } u_1(V_2) = \frac{0.1 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.05774 \text{ mL};$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_{1rel}(V_2) = \frac{u_1(V_2)}{V_2} = \frac{0.05774 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.5774\%。$$

温度对 10 mL 移液管体积的影响引入的不确定度按下式计算, 由于水的膨胀体系系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$, 实验环境为 $(25 \pm 2) \text{ } ^\circ\text{C}$, 产生的体积变化为 $10 \text{ mL} \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} \times 2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C} = 4.2 \times 10^{-3} \text{ mL}$, 因此按均匀分布考虑($K=\sqrt{3}$),

$$\text{标准不确定度为: } u_2(V_2) = \frac{4.2 \times 10^{-3} \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.002425 \text{ mL};$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_{2rel}(V_2) = \frac{u_2(V_2)}{V_2} = \frac{0.002425 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.02425\%。$$

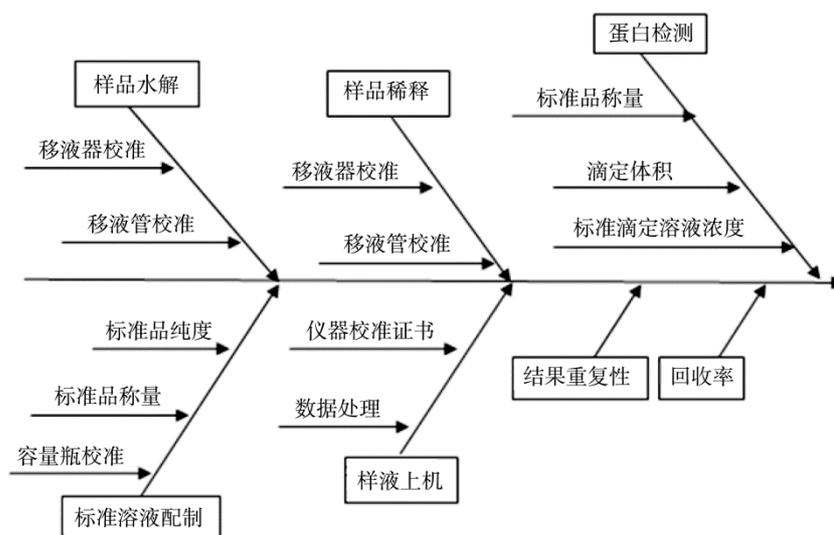


图 1 不确定度的来源

Fig.1 Sources of uncertainty

按照 A 类不确定度评定, 样品水解引入的相对不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_2) = \sqrt{\left(\frac{u_1(V_2)}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{u_2(V_2)}{V_2}\right)^2} = \sqrt{0.5774\%^2 + 0.02425\%^2} = 0.5779\%$$

2.3.3 样品溶液的稀释

水解液冷却后, 取 1 mL 加水稀释至 6 mL, 此过程的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_3)$ 由 5 mL 移液管和 1 mL 的移液枪的允差、温度组成。移取体积变动性已包括在测量重复性误差中, 不再评定。

5 mL 移液管容量允差为 ± 0.05 mL, 按照均匀分布考虑 ($K=\sqrt{3}$),

$$\text{标准不确定度为: } u_1(V_3) = \frac{0.05 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.02887 \text{ mL};$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_{1\text{rel}}(V_3) = \frac{u_1(V_3)}{V_3} = \frac{0.02887 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 0.5774\%$$

温度对 5 mL 移液管体积的影响引入的不确定度, 按下式计算, 由于水的膨胀体系系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}$, 实验环境为 $(20 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, 产生的体积变化为 $5 \text{ mL} \times 2 \text{ }^\circ\text{C} \times 2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C} = 2.1 \times 10^{-3} \text{ mL}$, 因此按均匀分布考虑 ($K=\sqrt{3}$),

$$\text{标准不确定度为: } u_2(V_3) = \frac{2.1 \times 10^{-3} \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.001212 \text{ mL};$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_{2\text{rel}}(V_3) = \frac{u_2(V_3)}{V_3} = \frac{0.001212 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 0.02424\%$$

1 mL 的移液枪不确定度同 3.3.1, $u_{\text{rel}}(V_4) = 0.3472\%$, 可以直接引用。

按照 A 类不确定度评定, 样品溶液稀释引入的相对不确定度为:

$$\begin{aligned} u_{\text{rel}}(V_3 + V_4) &= \sqrt{\left(\frac{u_1(V_3)}{V_3}\right)^2 + \left(\frac{u_2(V_3)}{V_3}\right)^2 + (u_{\text{rel}}(V_4))^2} \\ &= \sqrt{0.5774\%^2 + 0.02424\%^2 + 0.3472\%^2} \\ &= 0.6742\% \end{aligned}$$

2.3.4 样品溶液蛋白检测

取 2 mL 水解液, 按 GB 5009.5 的方法测定蛋白质的含量。此过程的不确定度由 (1) 样品称量的不确定度 $u_{\text{rel}}(m)$ 、(2) 滴定液消耗体积引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(V_5)$ 、(3) 标准滴定溶液浓度所引起的不确定度 $u_{\text{rel}}(p)$ 。

2.3.4.1 样品称量的不准确度

从样液中取出 2 mL 至消化管, 用万分之一天平称量移取前后的质量, 需称量 2 次, 按均匀分布处理。称量的变动性已包括在测量重复性误差中, 不再评定。所使用天平检定证书上给出的最大允许误差为 $\pm 0.0015 \text{ g}$, 在称量区间内按照均匀分布, 取 $K=\sqrt{3}$ 。

$$\text{则其标准不确定度为: } u(m) = \frac{0.0015}{\sqrt{3}} = 0.0008661 \text{ g};$$

$$\text{因二次称量所得故相对不确定度为: } u_{\text{rel}}(m) = \sqrt{\left(\frac{u_1(m)}{m}\right)^2} \times 2 = \sqrt{\left(\frac{0.0008661 \text{ g}}{2 \text{ g}}\right)^2} \times 2 = 0.06124\%$$

2.3.4.2 滴定液消耗体积引起的不确定度

由于 V_0 接近于 0, 评定的 $u(V_0)$ 比 $u(V_5)$ 小很多, 可忽略 $u(V_0)$ 的计算^[10], $u(V_5)$ 主要由以下几个量组成: (1) 滴定管体积引入的不确定度分量。 (2) 温度对滴定管体积的影响。 (3) 终点判断所引起的标准不确定度。滴定管估读误差已包括在测量重复性误差中, 不再评定。

10 mL 滴定管容量允差为 ± 0.025 mL, 按照均匀分布考虑 ($K=\sqrt{3}$),

$$\text{标准不确定度为: } u_1(V_5) = \frac{0.025 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.01443 \text{ mL};$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_{1\text{rel}}(V_5) = \frac{u_1(V_5)}{V_5} = \frac{0.01443 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.1443\%$$

温度对 10 mL 滴定管体积的影响引入的不确定度, $u_2(V_5)$ 按下式计算, 由于水的膨胀体系系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}$, 实验环境为 $(20 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, 产生的体积变化为 $10 \text{ mL} \times 2 \text{ }^\circ\text{C} \times 2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C} = 4.2 \times 10^{-3} \text{ mL}$, 因此按均匀分布考虑 ($K=\sqrt{3}$),

$$\text{标准不确定度为 } u_2(V_5) = \frac{4.2 \times 10^{-3} \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.002425 \text{ mL};$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_{2\text{rel}}(V_5) = \frac{u_2(V_5)}{V_5} = \frac{0.002425 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.02425\%$$

终点判断所引起的标准不确定度^[11], 终点判断的误差为 ± 0.05 mL (1 滴的体积), 假设其按照两点分布 ($K=1$), 标准不确定度为: $u_3(V_5) = 0.05 \text{ mL} / 1 = 0.05 \text{ mL}$;

$$\text{相对标准不确定度为 } u_{3\text{rel}}(V_5) = \frac{u_3(V_5)}{V_5} = \frac{0.05 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.5\%$$

2.3.4.3 标准滴定溶液浓度所引起的不确定度

标准滴定溶液证书标示的扩展不确定度 0.3%, 取容量因子 $K=2$ ^[7], 则标准滴定溶液引入的相对不确定度为: $u_{\text{rel}}(p) = \frac{0.3\%}{2} = 0.15\%$;

按照 A 类不确定度评定, 样品蛋白检测引入的相对不确定度为:

$$\begin{aligned} u_{\text{rel}}(M) &= \sqrt{\left(u_{\text{rel}}(m)\right)^2 + \left(\frac{u_1(V_5)}{V_5}\right)^2 + \left(\frac{u_2(V_5)}{V_5}\right)^2} \\ &\quad + \left(\frac{u_3(V_5)}{V_5}\right)^2 + (u_{\text{rel}}(p))^2 \\ &= \sqrt{0.06124\%^2 + 0.1443\%^2 + 0.02425\%^2 + 0.5\%^2 + 0.15\%^2} = 0.5456\% \end{aligned}$$

2.3.5 糠氨酸标准溶液配制

糠氨酸标准溶液配制过程: 称取有证标准物质糠氨酸 13.74 mg 于 10 mL 容量瓶, 用 3 mol/L 盐酸溶液溶解并定容, 配制过程引入的不确定度包括以下几个方面:

(1) 标准品证书标示的纯度 $P=(98.4 \pm 0.6)\%$, 取容量因子 $K=2$, 则糠氨酸标准物质纯度引入的相对标准不确定度为: $u_{\text{srel}}(p) = \frac{0.006}{2} = 0.3\%$ 。

(2) 标准物质称量引入的不确定度

① 所使用天平检定证书上给出的最大允许误差为 $\pm 0.01 \text{ mg}$, 在称量区间内按照均匀分布, 取 $K=\sqrt{3}$, 则其标

准不确定度为 $u_{s1}(m) = \frac{0.00001}{\sqrt{3}} = 5.7737 \times 10^{-6} \text{ g}$ 。

②天平的变动引起的不确定度, 按照^[12]《化学分析中不确定度的评估指南》附录 G(不确定度的常见来源和数值)中给出的数据进行计算, 即 0.5 乘以最后一位有效数字。对于十万分之一天平, $d=0.01 \text{ mg}$, 所以称量重复性的不确定度即为半宽度 $u_{s2}(m) = d/2 = 0.005 \text{ mg} = 5 \times 10^{-6} \text{ g}$ 。

因此标准品称量引入的不确定度为: $u_s(m) = \sqrt{(5.7737 \times 10^{-6})^2 + (5 \times 10^{-6})^2} = 7.6378 \times 10^{-6} \text{ g}$;

相对不确定度为: $u_{srel}(m) = \frac{u_s(m)}{m} = \frac{7.6378 \times 10^{-6}}{0.01374} = 0.05559\%$ 。

(3)标准储备液定容引入的相对不确定度

①容量瓶允差引入的标准不确定度, 根据 JJG 196—2006 常用玻璃量器检定规程给出的 10 mL 容量瓶容量允差为 $\pm 0.02 \text{ mL}$, 容量允差包括体积校准、重复性、人员读数, 按均匀分布考虑取 $K=\sqrt{3}$ 。

则标准不确定度为: $u_{s1}(V_1) = \frac{0.02 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.01155 \text{ mL}$;

相对标准不确定度为: $u_{s1rel}(V_1) = \frac{u_{s1}(V_1)}{V_1} = \frac{0.01155 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.1155\%$ 。

②温度对 10 mL 容量瓶体积的影响引入的不确定度按下式计算, 由于水的膨胀体系系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$, 实验环境为 $(20 \pm 2) \text{ } ^\circ\text{C}$, 产生的体积变化为 $10 \text{ mL} \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} \times 2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C} = 4.2 \times 10^{-3} \text{ mL}$, 因此按均匀分布考虑 ($K=\sqrt{3}$)。

则标准不确定度为: $u_{s2}(V_1) = \frac{4.2 \times 10^{-3} \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.002425 \text{ mL}$;

相对标准不确定度为: $u_{s2rel}(V_1) = \frac{u_{s2}(V_1)}{V_1} = \frac{0.002425 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 0.02425\%$ 。

按照 A 类不确定度评定, 标准品定容至 10 mL 容量瓶引入的相对不确定度为:

$$u_{srel}(V_1) = \sqrt{0.1155\%^2 + 0.02425\%^2} = 0.1180\%$$

(4)标准工作液配制引入的不确定度

糠氨酸标准工作液稀释过程为: 移取糠氨酸标准储备液 50 μL 于 10 mL 容量瓶中, 用 3 mol/L 盐酸溶液定容至刻度。其不确定度来自于 50 μL 移液器和 10 mL 容量瓶。10 mL 容量瓶定容引入的不确定度可以直接引用 3.6.5(3) $u_{srel}(V_3) = 0.1180\%$ 。50 μL 移液器不确定度来自于容量允差、温度、移取体积变动性组成。

50 μL 移液器允差引入的标准不确定度, 其容量允差为 $\pm 0.5 \text{ } \mu\text{L}$ (厂商提供的说明书), 按均匀分布考虑取 $K=\sqrt{3}$,

标准不确定度为: $u_{s1}(V_2) = \frac{0.0005 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.0002887 \text{ mL}$;

相对标准不确定度为: $u_{s1}(V_2) = \frac{u_{s1}(V_2)}{V_2} = \frac{0.0002887 \text{ mL}}{0.05 \text{ mL}} = 0.5774\%$ 。

温度对 50 μL 移液器体积的影响引入的不确定度按下式计算, 由于水的膨胀体系系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$, 实验环境

为 $(20 \pm 2) \text{ } ^\circ\text{C}$, 产生的体积变化为 $0.05 \text{ mL} \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} \times 2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C} = 2.1 \times 10^{-5} \text{ mL}$, 因此按均匀分布考虑 ($K=\sqrt{3}$),

标准不确定度为: $u_{s2}(V_2) = \frac{2.1 \times 10^{-5} \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 1.212 \times 10^{-5} \text{ mL}$;

相对标准不确定度为 $u_{s2rel}(V_2) = \frac{u_{s2}(V_2)}{V_2} = \frac{1.212 \times 10^{-5} \text{ mL}}{0.05 \text{ mL}} = 0.02425\%$ 。

50 μL 移液器重复性误差为 $\pm 0.15 \text{ } \mu\text{L}$ (厂商提供的说明书), 因此按均匀分布考虑 ($K=\sqrt{3}$),

标准不确定度为 $u_{s3}(V_2) = \frac{0.00015 \text{ mL}}{\sqrt{3}} = 0.00008661 \text{ mL}$;

相对标准不确定度为 $u_{s3rel}(V_2) = \frac{u_{s3}(V_2)}{V_2} = \frac{0.00008661 \text{ mL}}{0.05 \text{ mL}} = 0.1732\%$ 。

按照 A 类不确定度评定, 标准工作液稀释引入的相对不确定度为:

$$u_{srel}(V_2, V_3) = \sqrt{0.5774\%^2 + 0.02425\%^2 + 0.1732\%^2 + 0.1180\%^2} = 0.6147\%$$

糠氨酸标准溶液制备过程总相对不确定度为:

$$u_{rel}(S) = \sqrt{(u_{rel}(p))^2 + (u_{rel}(m))^2 + (u_{rel}(V_1))^2 + (u_{rel}(V_2 + V_3))^2} = \sqrt{0.3\%^2 + 0.05559\%^2 + 0.1180\%^2 + 0.6147\%^2} = 0.6963\%$$

2.3.6 超高效液相色谱测定

由超高效液相色谱仪测定引入的不确定度由仪器色谱峰面积积分引入的不确定度、测定样品重复性和加标回收率引入的不确定度 3 部分组成。

(1)根据仪器说明书和积分仪一般性能分析, 色谱峰面积积分处理最大误差为 $0.2\% \sim 1\%$ ^[13], 按均匀分布考虑则色谱峰面积的标准不确定度为: $u(A) = \frac{1\%}{\sqrt{3}} = 0.005774$;

其相对标准不确定度为: $u_{rel}(A) = \sqrt{2} \times 0.005774 = 0.8164\%$ 。

(2)样品重复性试验引入的不确定度

样品重复性试验引入的不确定度见表 1。

表 1 样品重复性试验结果(mg/100 g 蛋白质)
Table 1 Results of sample repeatability test

测量次数	1	2	3	4	5	6	7	8
含量	153.2	149.8	150.7	147.3	155.6	154.5	145.9	150.8
平均含量 w_1	151.0							
标准偏差 $\%S_1$	3.37							

因此重复性引入相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(R_1) = \frac{S_1}{w_1 \sqrt{n}} = \frac{3.37}{151.0 \sqrt{8}} = 0.7892\%$$

(3)加标回收率试验引入的不确定度

样品的前处理过程有高温水解、过滤、消化等步骤,

不确定因素难以评定,可通过加标回收实验评定。本方法对同一样品进行8次独立重复性加标回收实验,结果见表2。

表2 加标回收实验结果
Table 2 Results of spike recovery experiment

测量次数	1	2	3	4	5	6	7	8
回收率/%	90.8	92.4	94.2	93.3	91.5	90.6	94.8	89.6
平均回收率 w_2 /%	92.5							
标准偏差 S_2 /%	1.99							

因此回收率引入标准不确定度为:

$$u(R_2) = \frac{S_2}{\sqrt{n}} = \frac{0.0199}{\sqrt{8}} = 0.007036。$$

用 t 检验来确定平均回收率是否与1.0有显著性差异。

检验统计量 t 用下式来计算^[10]:

$$t = \frac{|1-0.925|}{u(R_2)} = \frac{1-0.925}{0.007036} = 10.66。$$

该值与95%置信度, $n-1$ 自由度下的双侧临界值 t_{crit} 比较, 自由度 $=n-1=7$, 查 t 分布表得 $t_{crit}=1.895$, $t > t_{crit}$, 说明 w_2 与1有显著差异, 平均回收率需要包含在结果的计算中。

因此回收率引入的相对不确定度为:

$$u_{rel}(R_2) = \frac{0.007036}{0.925} = 0.7606%;$$

高效液相测定的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(HPLP) = \sqrt{(u_{rel}(A))^2 + (u_{rel}(R_1))^2 + (u_{rel}(R_2))^2} = \sqrt{0.8164\%^2 + 0.7892\%^2 + 0.7606\%^2} = 1.3668%。$$

2.4 合成不确定度的计算

相对不确定度分量如表3所示。

相对标准不确定度的计算:

$$u_{rel}(F) = \sqrt{(u_{rel}(V_1))^2 + (u_{rel}(V_2))^2 + (u_{rel}(V_3+V_4))^2 + (u_{rel}(M))^2 + (u_{rel}(S))^2 + (u_{rel}(hplp))^2} = \sqrt{0.4911\%^2 + 0.5779\%^2 + 0.6742\%^2 + 0.5456\%^2 + 0.6963\%^2 + 1.3668\%^2} = 1.9205%。$$

表3 相对不确定度分量一览表

Table 3 List of relative uncertainty components

评定因子	不确定度来源	标准不确定度	相对标准不确定度	总不确定度
$u_{rel}(V_1)$ 两次移取样品体积	1 mL 移液器容量允差	$u_1(V_1)$	0.003464	0.3464%
	温度对1 mL 移液枪体积的影响	$u_2(V_1)$	0.0002425	0.02425%
$u_{rel}(V_2)$ 样品水解体积	10 mL 移液管容量允差	$u_1(V_2)$	0.05774	0.5774%
	温度对10 mL 移液管体积的影响	$u_2(V_2)$	0.002425	0.02425%
$u_{rel}(V_3+V_4)$ 水解液的稀释	5 mL 移液管容量允差	$u_1(V_3)$	0.02887	0.05774%
	温度对5 mL 移液管体积的影响	$u_2(V_3)$	0.001212	0.02424%
	1 mL 移液器容量允差	$u_1(V_4)$	0.003464	0.3464%
	温度对1 mL 移液枪体积的影响	$u_2(V_4)$	0.0002425	0.02425%
$u_{rel}(M)$ 样品溶液蛋白检测	样品称量的标准不确定度	$u(m)$	0.0008661	0.06124%
	滴定管体积引入的不确定度分量	$u_1(V_5)$	0.01443	0.1443%
	温度对滴定管体积的影响	$u_2(V_5)$	0.002425	0.02425%
	终点判断所引起的标准不确定度	$u_3(V_5)$	0.05	0.5%
	标准滴定溶液浓度引起的不确定度	$u(p)$	0.3%	0.15%
	标准品证书标示的纯度	$u_S(p)$	0.6%	0.3%
	标准物质称量引入的不确定度	$u_{S1}(m)$	5.7737×10^{-6}	0.05559%
$u_{rel}(S)$ 糠氨酸标准溶液配制		$u_{S2}(m)$	5×10^{-6}	
	标准储备液定容引入的不确定度	$u_{S1}(V_1)$	0.01155	0.1155%
		$u_{S2}(V_1)$	0.002425	0.02425%
		$u_{S1}(V_2)$	0.00002887	0.5774%
		$u_{S2}(V_2)$	1.212×10^{-5}	0.02425%
	标准工作液配制引入的不确定度	$u_{S3}(V_2)$	0.00008661	0.1732%
$u_{rel}(HPLP)$ 高效液相色谱测定		$u_{S1}(V_3)$	0.01155	0.1155%
		$u_{S2}(V_3)$	0.002425	0.02425%
	色谱峰峰面积积分引入的不确定度	$u(A)$	0.005774	0.8164%
	样品重复性试验引入的不确定度	$u(R_1)$	0.0337	0.7892%
	加标回收率试验引入的不确定度	$u(R_2)$	0.007036	0.7606%

2.5 计算扩展不确定度

取置信水平 $P=95\%$, 包含因子 $k=2$, 计算相对扩展不确定度 $U=k \times u_{\text{rel}}(F)=2 \times 1.9205\%=3.84\%$, 则扩展不确定度为 $151.0 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 蛋白质 $\times 3.84\%=5.8 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 蛋白质。

2.6 结果表示

液相色谱法测定灭菌乳中糠氨酸的测定结果为 $Y=(151.0 \pm 5.8) \text{ mg}/100 \text{ g}$ 蛋白质, ($k=2$)。

2.7 灭菌乳中的糠氨酸不确定度分析

通过对液相色谱法测定灭菌乳中的糠氨酸不确定分析(表3)可知, 由样品水解时 $u_{\text{rel}}(V_2)$ 10 mL 移液管容量允差、 $u_{\text{rel}}(V_3)$ 蛋白质检测终点判断、标准溶液配制 $u_{\text{rel}}(V_2)$ 50 μL 移液器容量允差、 $u_{\text{rel}}(A)$ 色谱峰峰面积积分、 $u_{\text{rel}}(R_1)$ 样品重复性试验、 $u_{\text{rel}}(R_2)$ 加标回收率试验引入的不确定度对糠氨酸总不确定度贡献较大。

3 结论

本研究采用超高效液相色谱法对灭菌乳中糠氨酸进行了测定, 根据不确定度的主要来源对测定结果进行评定, 结合实验过程和评定结果可知, 本方法中测量不确定度影响因素主要来源于检测过程中量具的使用、蛋白质检测终点判定、标准溶液配制、色谱峰峰面积积分、样品重复性试验、加标回收率试验, 为了保证测量结果的准确性, 在检测过程中要注意操作细节, 特别是量具的使用, 在蛋白质滴定时可以选择 pH 计进行终点颜色判定^[14], 避免肉眼判定的误差, 配制标准溶液时采用精密度高的称量设备和定容器具, 优化上机条件, 使用分离度高的色谱柱, 减少干扰峰对目标峰的影响, 保证积分的准确性, 对仪器进行定期维护保养, 保证检测的稳定性, 在检测过程中采用加标等质控手段监控过程的准确性, 尽可能降低不确定度。

参考文献

- [1] 白永胜, 杨小剑, 李梅, 等. 灭菌乳产品不同生产工艺及储存条件下糠氨酸的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3501-3504.
BAI YS, YANG XJ, LI M, *et al.* Study on the production process and storage of furosine of sterilized milk products [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(13): 3501-3504.
- [2] 李蓓. 调整巴氏杀菌工艺 防止糠氨酸超标[J]. 食品安全导刊, 2008, 2: 38-39.
LI B. Adjust the pasteurization process to prevent furosine from exceeding the standard [J]. Chin Food Saf Magaz, 2008, 2: 38-39.
- [3] NY/T 939—2016 巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定[S].
NY/T 939—2016 Identification of reconstituted milk in pasteurized and UHT milk [S].
- [4] 陈冲冲. 基于 UPLC 的糠氨酸快速检测方法的建立及应用[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
CHEN CC. Establishment and application of rapid detection method for

furosine based on UPLC [D]. Changchun: Jilin University, 2017.

- [5] ANATOL S, LISA IB, HELMUT KM. A new UPLC method for the quantitation of furosine as heat load indicator in commercial liquid milk [J]. J Food Comp Anal, 2017, (56): 104-109.
- [6] GB 5009.5—2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定 [S].
GB 5009.5—2016 National food safety standard-Determination of protein in food [S].
- [7] 李东刚, 李春娟, 吴凡, 等. 高效液相色谱法测定巴氏杀菌乳中糠氨酸不确定度的评定[J]. 化学计量分析, 2008, 17(3): 7-9.
LI DG, LI CJ, WU F, *et al.* Evaluation of uncertainty for the determination of furosine in pasteurized milk by high performance liquid chromatography [J]. Chem Anal Meter, 2008, 17(3): 7-9.
- [8] JJG 646—2006 移液器[S].
JJG 646—2006 Pipette [S].
- [9] JJG 196—2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196—2006 Verification regulation of working glass container [S].
- [10] 唐静, 罗玥, 黄萍, 等. 全自动凯氏定氮仪测定蛋白饮料中蛋白质的不确定度分析[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(7): 152-154.
TANG J, LUO Y, HUANG P, *et al.* Uncertainty analysis on determination of protein in protein drinks with Kjeltec 8400 protein analyzer [J]. Anhui Agric Sci, 2018, 46(7): 152-154.
- [11] 李建新. 滴定液扩展不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(8): 3155-3159.
LI JX. Evaluation of expanded uncertainty of titrant [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(8): 3155-3159.
- [12] CNAS—GL 006: 2019 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS—GL 006: 2019 Guide for evaluation of uncertainty in chemical analysis [S].
- [13] 李兰, 贾铮, 周剑, 等. 高效液相色谱法测定鱼粉中色氨酸及不确定度评定[J]. 食品质量安全检测学报, 2020, 11(9): 2714-2721.
LI L, JIA Z, ZHOU J, *et al.* Determination of tryptophan in fish meal by high performance liquid chromatography and evaluation of uncertainty [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(9): 2714-2721.
- [14] 徐志飞, 李芳. 凯氏定氮法测定蛋白粉中蛋白质含量的不确定度分析[J]. 中国卫生工程学, 2015, 4: 361-362, 365.
XU ZF, LI F. Uncertainty analysis of protein content in protein powder determined by Kjeldahl method [J]. Chin J Public Health Eng, 2015, 4: 361-362, 365.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

卢慧芳, 主要研究方向为乳制品质量安全检测。

E-mail: luhuifang@jlby.com

刘志楠, 高级工程师, 主要研究方向为乳制品行业质量管理、研发管理、检验管理。

E-mail: liuzhinan@jlby.com