

盐酸溶液中 17 种氨基酸混合溶液标准物质的研制

贾 铮, 周 剑, 王 敏, 李 兰, 杨梦瑞, 徐思远, 田 静, 樊 霞*

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业农村部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081)

摘 要: 目的 研制盐酸溶液条件下的 17 种氨基酸混合溶液标准物质。**方法** 选用 17 种氨基酸纯度标准物质, 采用氨基酸分析仪对各种标准物质的主成分及杂质进行了准确分析, 评估了组分相互干扰情况, 在此基础上采用重量-容量法配制了盐酸溶液中 17 种氨基酸混合溶液标准物质, 以配制值作为标准物质的量值, 并对标准物质进行了均匀性、稳定性检验和不确定度评估。**结果** 结果表明, 制备的混合溶液标准物质均匀性、稳定性良好, 不确定度评估合理, 满足国家标准物质技术要求, 研制的 2 个不同浓度的混合溶液标准物质均已通过标准物质评审并获批。**结论** 该类标准物质的研制对于保证农产品及其投入品中氨基酸成分检测以及实验室质量控制等具有重要意义。

关键词: 氨基酸; 盐酸溶液; 混合溶液; 标准物质

Preparation of 17 kinds of amino acids mixed solution standard materials in hydrochloric acid solution

JIA Zheng, ZHOU Jian, WANG Min, LI Lan, YANG Meng-Rui, XU Si-Yuan, TIAN Jing, FAN Xia*

(Key Laboratory of Agricultural Product Quality and Safety Research of Ministry of Agriculture, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To develop the standard substance of 17 amino acids mixed solution under the condition of hydrochloric acid solution. **Methods** The main components and residues in 17 amino acid standard material was evaluated with amino acid analyzer. The interactive interruption among components was evaluated, based on which a mixture of 17 amino acid standard material in hydrochloride was made according to weight-volume method. Based on the measured value of standard material, the evenness, stability, and uncertainty of standard material was evaluated. **Results** The results showed that the mixture solution of standard material had good uniformity, stability, and reasonable uncertainty, which complied the requirement by the national standard material. Both mixture of standard material were approved by the evaluation committee. **Conclusion** The development of standard material is of significant importance to ensure the accuracy of amino acid measurement in agro-products and agricultural inputs, and the quality control in laboratory.

KEY WORDS: amino acid; hydrochloride solution; mixture solution; standard material

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2016YFF0201105)、中国农业科学院创新工程

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFF0201105), and the Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP)

*通讯作者: 樊霞, 博士, 研究员, 主要研究方向为饲料质量安全及检测技术。E-mail: fanxia@caas.cn

*Corresponding author: FAN Xia, Ph.D, Professor, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products of CAAS, 12 Zhongguancun South Street, Haidian District, Beijing 100081, China. E-mail: fanxia@caas.cn

1 引 言

氨基酸是构成蛋白质的基本物质,是生物体内不可缺少的营养成分之一,已知参与蛋白质合成的基本氨基酸有 20 种,非蛋白氨基酸在自然界被发现的已超过 1000 种^[1]。氨基酸在环境、食品、生物、医学、农业以及营养方面均扮演着重要角色。其中,作为动物饲料中的营养成分,添加适宜含量的氨基酸可以最大限度地调控动物的生长和饲料转化率,满足动物的蛋白需求,大大降低蛋白质用量,节约饲养成本,提高饲料利用率^[2]。随着畜牧养殖业的发展,饲料监管部门以及行业企业越来越重视提升饲料质量安全水平,一系列氨基酸检测国家标准和行业标准^[3-5]相继修订并颁布实施,但目前适用于氨基酸检测的混合溶液标准物质还不能满足实际生产及检测工作的需要。为了支持相关国家标准文件的实施,本研究按照国家质量技术监督局对标准物质制备的相关要求^[6,7],研制了盐酸溶液中氨基酸混合溶液标准物质。

氨基酸种类繁多,且大多不具有紫外或荧光信号,往往无法定量,常需借助衍生化技术将其衍生后再进行测定^[8]。目前应用于氨基酸同步测定的方法主要有:气相色谱法^[9]、高效液相色谱法^[10,11]、毛细管电泳法^[12]以及串联质谱法^[13,14]等,其中以离子交换色谱结合柱后茚三酮衍生原

理开发的氨基酸分析仪技术成熟,已有多款商品化产品。绝大部分氨基酸在酸溶液中能够保持长期稳定性,因此配制氨基酸标准溶液普遍使用浓度约 0.1 mol/L HCl 溶液作为溶剂。国内有证标准物质官方平台“国家标准物质资源共享平台”^[15]上仅查到 1 种氨基酸混合溶液标准物质,相关标准物质研制文献仅见少量报道。

本研究在研制过程中选择蛋白质水解氨基酸中常见的 17 种氨基酸纯度标准物质作为原料,以 0.1 mol/L 盐酸溶液为溶剂,重量-容量法配制标准溶液,对纯度标准物质中的互相干扰组分进行了考察和定量,以配制值作为标准物质的量值,对配制的混合标准溶液进行了均匀性检验、半年稳定性监测及不确定度评定。以期适用于蛋白质水解氨基酸的定量检测,为相关部门提供参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 试剂与耗材

17 种氨基酸纯度标准物质(日本计量科学院,具体名称和编号信息见表 1);氨基酸混合溶液标准物质(GBW(E)100062,中国计量科学研究院);氨基酸分析仪流动相(和光纯药工业株式会社);盐酸(优级纯,北京化学试剂研究所)。

表 1 氨基酸纯度标准物质信息
Table 1 Information table of amino acid standard material

序号	名称	英文名	缩写	分子式	CAS 号	分子量	纯度	扩展不确定度
1	L-天门冬氨酸	L-Aspartic acid	Asp	C ₄ H ₇ NO ₄	56-84-8	133.10	0.999	0.002
2	L-苏氨酸	L-Threonine	Thr	C ₄ H ₉ NO ₃	72-19-5	119.12	0.999	0.002
3	L-丝氨酸	L-Serine	Ser	C ₃ H ₇ NO ₃	56-45-1	105.09	0.998	0.002
4	L-谷氨酸	L-glutamic acid	Glu	C ₅ H ₉ NO ₄	56-86-0	147.13	0.998	0.002
5	L-脯氨酸	L-proline	Pro	C ₅ H ₉ NO ₂	147-85-3	115.00	0.999	0.002
6	甘氨酸	glycine	Gly	C ₂ H ₅ NO ₂	56-40-6	75.07	0.999	0.002
7	L-丙氨酸	L-aLanine	Ala	C ₃ H ₇ NO ₂	56-41-7	89.09	0.999	0.002
8	L-胱氨酸	L-cystine	Cys	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	56-89-3	240.30	0.998	0.003
9	L-缬氨酸	L-valine	Val	C ₅ H ₁₁ NO ₂	72-18-4	117.15	0.998	0.002
10	L-蛋氨酸	L-methionine	Met	C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	63-68-3	149.21	0.999	0.002
11	L-异亮氨酸	L-isoleucine	Ile	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)C H(NH ₂)COOH	73-32-5	131.17	0.997	0.002
12	L-亮氨酸	L-leucine	Leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	61-90-5	131.17	0.999	0.002
13	L-酪氨酸	L-tyrosine	Tyr	C ₉ H ₁₁ NO ₃	60-18-4	181.19	0.999	0.002
14	L-苯丙氨酸	L-phenylalanine	Phe	C ₉ H ₁₁ NO ₂	63-91-2	165.19	0.999	0.002
15	L-赖氨酸盐酸盐	L-lysine monohydrochloride	Lys	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	657-27-2	182.65	0.998	0.002
16	L-组氨酸	L-histidine	His	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	71-00-1	155.15	0.999	0.002
17	L-精氨酸	L-arginine	Arg	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	74-79-3	174.20	0.999	0.002

2.1.2 仪器与设备

L-8900 氨基酸分析仪(日本 HITACHI 公司); BP310g 型分析天平(德国 Sartorius 公司); XS105 型分析天平(瑞士 Mettler 公司); Milli-Q 纯水器(美国 Millipore 公司); 容量瓶、移液管: 均通过计量部门检定。

2.1.3 氨基酸分析仪参数信息

氨基酸分析仪符合 JJG 1064 氨基酸分析仪检定规程的要求, 按照仪器说明书调整参数: 阳离子交换色谱柱(4.6 mm id×60 mm); 流速: 泵 1: 0.4 mL/min, 泵 2: 0.35 mL/min; 检测器: 通道 1: 570 nm, 通道 2: 440 nm; 分析柱柱温: 57 °C, 反应柱柱温: 135 °C。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的配制

氨基酸溶液标准物质储备液的制备: 保持环境温度在 20 °C±2 °C 的条件下, 使用经计量检定并取得合格证书的分析天平, 分别准确称量一定质量的各氨基酸固体, 转移至检定合格的 100 mL 容量瓶中, 以 0.1 mol/L 盐酸溶液定容至刻线, 振荡、混匀, 配制成浓度均为 25 μmol/mL 的各氨基酸储备液。

1.0 μmol/mL 17 种氨基酸混合标准溶液的配制: 用移液管分别准确吸取 20.00 mL 各组分储备液(25 μmol/mL), 配制成 500 mL 混合溶液标准物质(17 种氨基酸各 1 μmol/mL)。配制好的溶液以 1 mL/支分装至安瓿中, 共灌装约 500 支, 立即封口, 封装好的溶液标准物质置于避光冷藏条件下保存。

2.2.2 均匀性检验

氨基酸分析仪是以离子色谱法分离、柱后茚三酮衍生、紫外检测器测定为原理, 同步测定多组分氨基酸的专用仪器, 其技术成熟, 具有结果稳定性好、准确度高特点^[16]。根据 JJG 1006-1994《一级标准物质技术规范》的要求, 本研究以氨基酸分析仪法作为各氨基酸含量定值方法, 从 2 个浓度水平的混合溶液标准物质各随机抽取 15 个单元作为样品, 以氨基酸分析仪法测定各氨基酸组分峰面积, 每个样品重复测定 3 次。对采集数据进行方差分析, 通过比较 95% 置信水平下计算得到的 F 值与理论 F 的大小来判断均匀性结果。

2.2.3 长期稳定性考察

在 4 °C 避光保存条件下存放混合溶液标准物质, 以氨基酸分析仪法分别测定样品单元在第 1、2、3、4、6 个月的各氨基酸组分含量。每个浓度水平每次抽取 2 个包装, 平行测定 3 次, 以新配制混合溶液为标准, 采用单点比对法核查溶液标准物质质量值, 从而考察混合溶液标准物质的长期稳定性。

2.2.4 短期稳定性考察

针对运输和使用过程开展必要的稳定性评估, 确保标准物质发售运输及使用过程中的稳定性。具体实验过程为将样品分别置于 4、20、40 °C 恒温箱中保存, 在第 1、3、5、7 和 9 d 进行稳定性监测, 检测方法与均匀性检验所采用的方法相同。

2.2.5 互为干扰实验

对配制成的浓度均为 25 μmol/mL 的各氨基酸储备液进行氨基酸分析仪测定, 以考察互为干扰的氨基酸组分对标准物质定值及不确定度评定的影响。检测方法与均匀性检验所采用的方法相同。

3 结果与分析

3.1 均匀性检验

采用方差分析法考察混合溶液标准物质的瓶内均匀性和瓶间均匀性。2 个浓度水平的混合溶液标准物质各随机抽取 15 个单元, 采用氨基酸分析仪法对各氨基酸组分含量进行测定。17 种氨基酸的均匀性检验结果如表 2、表 3 所示, 方差分析的 F 值均小于 95% 置信水平下的 $F_{0.05}(14,30)$ 值。结果表明(见表 2、表 3), 17 种氨基酸混合溶液标准物质的均匀性良好, 满足标准物质技术要求。

3.2 稳定性检验

3.2.1 长期稳定性考察

根据标准物质稳定性考察按照先密后疏的原则, 以重量-容量法配制的各氨基酸标准溶液, 采用氨基酸分析仪法分别在配制完成后当月(第 0 月)以及第 1、2、3、4、6 个月进行 4 °C 条件下的稳定性监测。稳定性检验采用直线拟合法, 以时间为 X 轴, 特性量值为 Y 轴拟合一条直线, 斜率为 β_1 , 斜率的不确定度为 $s(\beta_1)$ 。通过 t 检验, 当 $|\beta_1| < t_{0.95,4} \cdot s(\beta_1)$ 时, 斜率变化不显著, 特性量值稳定(见表 4 和表 5)。

3.2.2 短期稳定性考察

将 2 个浓度水平的溶液标准物质分别置于 4、20、40 °C 条件下保存, 在第 1、3、5、7、9 d 进行稳定性监测, 检测方法均匀性检验相同。结果显示, 样品在 20 °C 条件下, 在规定时间内特性量值稳定, 见表 6、表 7。

3.3 互为干扰实验

为考察互为干扰的氨基酸组分对标准物质定值及不确定度评定的影响, 确保定值、不确定度评定的准确性, 首先对配制成的浓度均为 25 μmol/mL 的各氨基酸储备液进行氨基酸分析仪测定。出现互为干扰的氨基酸如图 1 所示。

表 2 均匀性检验结果(1.00 $\mu\text{mol/mL}$)
Table 2 Uniformity test and result analysis(1.00 $\mu\text{mol/mL}$)

氨基酸	总标准偏差 s	组间方差 s_1	组内方差 s_2	F	$F_{0.05}(14, 30)$	结论
Asp	0.00695	5.44×10^{-5}	4.71×10^{-5}	1.15	2.04	$F < F_{0.01}(14, 30)$, 原料样品均匀
Thr	0.00376	1.89×10^{-5}	1.24×10^{-5}	1.52		
Ser	0.00325	1.65×10^{-5}	8.20×10^{-6}	2.02		
Glu	0.01574	2.92×10^{-4}	2.36×10^{-4}	1.24		
Gly	0.00267	9.40×10^{-6}	6.30×10^{-6}	1.49		
Ala	0.00351	1.64×10^{-5}	1.08×10^{-5}	1.52		
Cys	0.00286	1.21×10^{-5}	6.60×10^{-6}	1.82		
Val	0.00287	9.20×10^{-6}	8.10×10^{-6}	1.14		
Met	0.00276	1.05×10^{-5}	6.50×10^{-6}	1.61		
Ile	0.00262	9.80×10^{-6}	5.70×10^{-6}	1.72		
Leu	0.00289	1.09×10^{-5}	7.40×10^{-6}	1.48		
Tyr	0.00255	9.00×10^{-6}	5.50×10^{-6}	1.63		
Phe	0.00249	8.90×10^{-6}	5.10×10^{-6}	1.74		
Lys	0.00264	8.70×10^{-6}	6.40×10^{-6}	1.36		
His	0.00318	1.08×10^{-5}	1.01×10^{-5}	1.08		
Arg	0.00314	1.48×10^{-5}	7.80×10^{-6}	2.01		
Pro	0.00386	1.82×10^{-5}	1.39×10^{-5}	1.31		

表 3 均匀性检验结果(0.10 $\mu\text{mol/mL}$)
Table 3 Uniformity test and result analysis (0.10 $\mu\text{mol/mL}$)

氨基酸	总标准偏差 S	组间方差 S_1	组内方差 S_2	F	$F_{0.05}(14, 30)$	结论
Asp	0.00140	2.70×10^{-6}	1.70×10^{-6}	1.61	2.04	$F < F_{0.05}(14, 30)$, 原料样品均匀
Thr	0.00118	1.70×10^{-6}	1.30×10^{-6}	1.35		
Ser	0.00114	1.80×10^{-6}	1.10×10^{-6}	1.59		
Glu	0.00133	2.70×10^{-6}	1.40×10^{-6}	1.96		
Gly	0.00204	6.20×10^{-6}	3.40×10^{-6}	1.84		
Ala	0.00131	2.30×10^{-6}	1.50×10^{-6}	1.55		
Cys	0.00146	3.30×10^{-6}	1.70×10^{-6}	1.98		
Val	0.0016	3.40×10^{-6}	2.30×10^{-6}	1.49		
Met	0.00454	2.72×10^{-5}	1.83×10^{-5}	1.49		
Ile	0.00324	1.14×10^{-5}	1.04×10^{-5}	1.10		
Leu	0.00362	1.95×10^{-5}	1.05×10^{-5}	1.85		
Tyr	0.00248	9.30×10^{-6}	4.90×10^{-6}	1.89		
Phe	0.00424	2.71×10^{-5}	1.43×10^{-5}	1.89		
Lys	0.00368	2.02×10^{-5}	1.09×10^{-5}	1.85		
His	0.00319	1.36×10^{-5}	9.00×10^{-6}	1.51		
Arg	0.00194	5.80×10^{-6}	2.90×10^{-6}	1.98		
Pro	0.00130	2.30×10^{-6}	1.50×10^{-6}	1.55		

表 4 长期稳定性检验结果(1.00 μmol/mL)
Table 4 Long-term stability test result(1.00 μmol/mL)

氨基酸	β_1	β_0	s^2	$s(\beta_1)$	$t_{0.95,4}$	结论
Asp	-0.0005	1.0032	1.24×10^{-6}	2.30×10^{-4}	2.78	$ \beta_1 < t_{0.95,4} \cdot s(\beta_1)$, 通过
Thr	-0.0006	1.0035	1.12×10^{-6}	2.19×10^{-4}		
Ser	-0.0003	1.0024	4.98×10^{-7}	1.46×10^{-4}		
Glu	-0.0004	1.0031	6.41×10^{-7}	1.66×10^{-4}		
Gly	-0.0005	1.0037	9.11×10^{-7}	1.98×10^{-4}		
Ala	-0.0006	1.0025	3.18×10^{-6}	3.68×10^{-4}		
Cys	-0.0003	1.0033	1.49×10^{-6}	2.53×10^{-4}		
Val	-0.0005	1.0033	7.57×10^{-7}	1.80×10^{-4}		
Met	-0.0004	1.0026	6.60×10^{-7}	1.68×10^{-4}		
Ile	-0.0005	1.0027	7.59×10^{-7}	1.80×10^{-4}		
Leu	-0.0004	1.0032	1.25×10^{-6}	2.31×10^{-4}		
Tyr	-0.0004	1.0026	3.23×10^{-6}	3.72×10^{-4}		
Phe	-0.0005	1.0029	7.99×10^{-7}	1.85×10^{-4}		
Lys	-0.0005	1.0031	1.07×10^{-6}	2.14×10^{-4}		
His	-0.0004	1.0027	8.11×10^{-7}	1.86×10^{-4}		
Arg	-0.0001	1.0026	6.55×10^{-7}	1.68×10^{-4}		
Pro	-0.0004	1.0025	6.44×10^{-7}	1.64×10^{-4}		

表 5 长期稳定性检验结果(0.10 μmol/mL)
Table 5 Long-term stability test result(0.10 μmol/mL)

氨基酸	β_1	β_0	s^2	$s(\beta_1)$	$t_{0.95,4}$	结论
Asp	-0.00005	0.1003	2.28×10^{-9}	2.94×10^{-5}	2.78	$ \beta_1 < t_{0.95,4} \cdot s(\beta_1)$, 通过
Thr	-0.00008	0.1006	2.61×10^{-9}	3.13×10^{-5}		
Ser	-0.00005	0.1004	5.42×10^{-9}	3.35×10^{-5}		
Glu	-0.00003	0.1004	2.46×10^{-9}	4.82×10^{-5}		
Gly	-0.00005	0.1004	2.63×10^{-9}	3.25×10^{-5}		
Ala	-0.00004	0.1004	2.48×10^{-9}	3.36×10^{-5}		
Cys	-0.00007	0.1005	2.64×10^{-9}	3.26×10^{-5}		
Val	-0.00005	0.1004	2.70×10^{-9}	3.37×10^{-5}		
Met	-0.00004	0.1004	3.68×10^{-9}	3.40×10^{-5}		
Ile	-0.00005	0.1005	3.17×10^{-9}	3.97×10^{-5}		
Leu	-0.00005	0.1004	8.79×10^{-9}	3.69×10^{-5}		
Tyr	-0.00005	0.1004	3.00×10^{-9}	1.94×10^{-5}		
Phe	-0.00009	0.1005	2.79×10^{-9}	3.59×10^{-5}		
Lys	-0.00008	0.1005	2.07×10^{-9}	3.46×10^{-5}		
His	-0.00008	0.1005	9.50×10^{-9}	2.98×10^{-5}		
Arg	-0.00005	0.1005	1.50×10^{-9}	2.02×10^{-5}		
Pro	-0.00007	0.1004	2.28×10^{-9}	2.54×10^{-5}		

表 6 短期稳定性检验结果(1.00 μmol/mL)
Table 6 Short-term stability test result(1.00 μmol/mL)

氨基酸	β_1	β_0	s^2	$s(\beta_1)$	$t_{0.95,4}$	结论
Asp	-0.0003	1.004	1.13×10^{-5}	1.2×10^{-4}	3.18	$ \beta_1 < t_{0.95,4} \cdot s(\beta_1)$, 稳定
Thr	0.0002	1.005	1.65×10^{-5}	4.5×10^{-4}		
Ser	0.0004	0.996	1.61×10^{-5}	4.5×10^{-4}		
Glu	-0.0002	1.003	7.80×10^{-5}	1.0×10^{-4}		
Gly	-0.0005	1.005	2.19×10^{-6}	1.7×10^{-4}		
Ala	-0.0003	1.009	5.43×10^{-6}	2.6×10^{-4}		
Cys	-0.0004	1.005	4.56×10^{-6}	2.4×10^{-4}		
Val	-0.0005	1.005	4.65×10^{-5}	2.4×10^{-4}		
Met	-0.0005	1.001	1.45×10^{-7}	4.3×10^{-4}		
Ile	-0.0003	1.003	9.83×10^{-7}	1.1×10^{-4}		
Leu	-0.0001	1.005	4.52×10^{-6}	2.4×10^{-4}		
Tyr	0.0001	1.005	1.12×10^{-6}	1.2×10^{-4}		
Phe	-0.0008	1.009	1.24×10^{-5}	3.9×10^{-4}		
Lys	-0.0003	1.006	1.14×10^{-5}	3.8×10^{-4}		
His	0.0001	1.002	9.74×10^{-5}	3.5×10^{-4}		
Arg	0.0002	1.005	1.34×10^{-5}	4.1×10^{-4}		
Pro	-0.0005	1.010	3.09×10^{-6}	2.0×10^{-4}		

表 7 短期稳定性检验结果(0.10 μmol/mL)
Table 7 Short-term stability test result(0.10 μmol/mL)

氨基酸	β_1	β_0	s^2	$s(\beta_1)$	$t_{0.95,4}$	结论
Asp	-0.0003	0.1004	4.20×10^{-7}	1.9×10^{-5}	3.18	$ \beta_1 < t_{0.95,4} \cdot s(\beta_1)$, 稳定
Thr	0.00002	0.1005	1.66×10^{-7}	4.0×10^{-5}		
Ser	0.0001	0.0996	2.67×10^{-7}	5.0×10^{-5}		
Glu	-0.00002	0.1000	1.13×10^{-9}	1.0×10^{-5}		
Gly	-0.00003	0.1005	2.13×10^{-9}	1.0×10^{-5}		
Ala	-0.00001	0.1009	1.32×10^{-7}	3.0×10^{-5}		
Cys	-0.00004	0.1010	4.56×10^{-9}	2.0×10^{-5}		
Val	-0.00005	0.1005	4.81×10^{-9}	2.0×10^{-5}		
Met	-0.00005	0.1001	1.46×10^{-7}	3.0×10^{-5}		
Ile	-0.00002	0.1003	1.44×10^{-9}	1.0×10^{-5}		
Leu	-0.00001	0.1005	4.92×10^{-9}	2.0×10^{-5}		
Tyr	0.00001	0.1010	1.07×10^{-9}	1.0×10^{-5}		
Phe	-0.00008	0.1009	1.26×10^{-7}	3.0×10^{-5}		
Lys	-0.00003	0.1006	1.14×10^{-7}	3.0×10^{-5}		
His	0.00001	0.1002	9.70×10^{-9}	3.0×10^{-5}		
Arg	0.00002	0.1005	1.38×10^{-7}	3.0×10^{-5}		
Pro	-0.00005	0.2010	3.36×10^{-9}	2.0×10^{-5}		

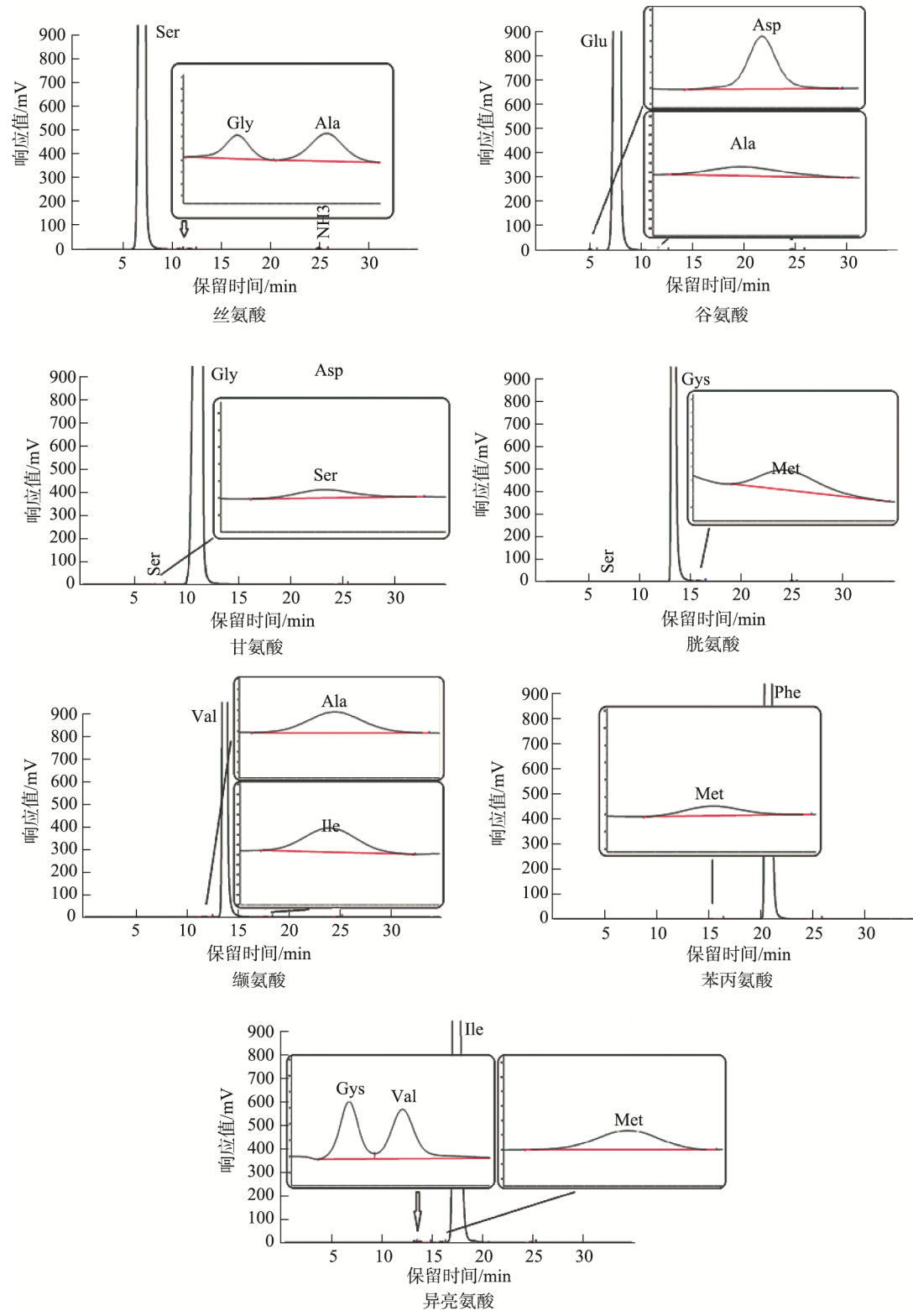


图 1 各氨基酸储备液中相互干扰组分的色谱图(25 $\mu\text{mol/mL}$)

Fig.1 Amino acid analyser chromatogram of the interactive interruption among components in amino acid stock solution(25 $\mu\text{mol/mL}$)

以重量-容量法配制的各氨基酸标准溶液, 采用外标法对互为干扰组分进行准确定量, 各干扰组分含量、对定值结果影响的具体数据如表 8 所示。由表 8 中的测定结果

可以看到, 7 种氨基酸储备液中出现互为干扰组分, 包括: 丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、胱氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸。定量测定结果显示, 25 $\mu\text{mol/mL}$ 的氨基酸储备

液中, 各干扰组分的含量在 0.002~0.027 $\mu\text{mol/mL}$ 之间, 通过定量计算可知, 干扰组分对通过稀释配制的 2 个浓度水平各氨基酸混合溶液标准物质定值结果无显著影响。

对混合溶液标准物质中的 17 种氨基酸含量进行定值检测, 结果如表 9 所示。

3.4 不确定度评估与结果表述

氨基酸混合溶液标准物质的不确定度来源分析如图 2 所示。标准物质的扩展不确定度由合成不确定度乘以包含因子得到。

对混合溶液标准物质的研制过程进行分析, 不确定度来源主要包括由标准物质的不均匀引入的不确定度、标准物质的不稳定引入的不确定度和标准物质定值过程引入的不确定度。其中, 标准物质的不稳定引入的不确定度包括短期稳定性引入的不确定度和长期稳定性引入的不确定度, 影响混合溶液标准物质定值的不确定度来源主要包括样品纯度、氨基酸分子量、天平称量以及体积变化。2 个浓度水平的氨基酸混合溶液标准物质的量值和不确定度计算和评估结果如表 10 和表 11 所示。

表 8 各氨基酸储备液中各干扰组分含量测定数据(25 $\mu\text{mol/mL}$)
Table 8 Interactive interruption among components value in amino acid stock solution(25 $\mu\text{mol/mL}$)

序号	组分名称	干扰组分含量/($\mu\text{mol/mL}$)		
		干扰组分 1	干扰组分 2	干扰组分 3
1	丝氨酸(Ser)	Gly/8.69 $\times 10^{-3}$	Ala/1.35 $\times 10^{-2}$	/
2	谷氨酸(Glu)	Asp/2.09 $\times 10^{-3}$	Ala/2.68 $\times 10^{-2}$	/
3	甘氨酸(Gly)	Ser/2.61 $\times 10^{-3}$	/	/
4	胱氨酸(Cys)	Met/7.66 $\times 10^{-3}$	/	/
5	缬氨酸(Val)	Ala/1.29 $\times 10^{-2}$	Ile/6.95 $\times 10^{-3}$	/
6	异亮氨酸(Ile)	Cys/1.35 $\times 10^{-2}$	Val/1.93 $\times 10^{-2}$	Met/1.03 $\times 10^{-2}$
7	苯丙氨酸(Phe)	Met/4.51 $\times 10^{-3}$	/	/

表 9 17 种氨基酸混合溶液标准物质定值结果
Table 9 Certified value of 17 amino acid in hydrochloric acid solution reference material

序号	氨基酸	干扰组分	配制浓度 /($\mu\text{mol/mL}$)	实际浓度 /($\mu\text{mol/mL}$)	配制浓度 /($\mu\text{mol/mL}$)	实际浓度 /($\mu\text{mol/mL}$)
1	Asp	无	1.00	1.00	0.100	0.100
2	Thr	无	1.00	1.00	0.100	0.100
3	Ser	Gly	1.00	1.00	0.100	0.100
		Ala	1.00	1.00	0.100	0.100
4	Glu	Asp	1.00	1.00	0.100	0.100
		Ala	1.00	1.00	0.100	0.100
5	Gly	Ser	1.00	1.00	0.100	0.100
6	Ala	无	1.00	1.00	0.100	0.100
7	Cys	Met	1.00	1.00	0.100	0.100
8	Val	Ala	1.00	1.00	0.100	0.100
		Ile	1.00	1.00	0.100	0.100
9	Met	无	1.00	1.00	0.100	0.100
		Cys	1.00	1.00	0.100	0.100
10	Ile	Val	1.00	1.00	0.100	0.100
		Met	1.00	1.00	0.100	0.100
11	Leu	无	1.00	1.00	0.100	0.100
12	Tyr	无	1.00	1.00	0.100	0.100
13	Phe	Met	1.00	1.00	0.100	0.100
14	Lys	无	1.00	1.00	0.100	0.100
15	His	无	1.00	1.00	0.100	0.100
16	Arg	无	1.00	1.00	0.100	0.100
17	Pro	无	1.00	1.00	0.100	0.100

表 10 盐酸溶液中各氨基酸溶液标准物质的量值和不确定度(1.0 μmol/mL)
Table 10 Characterization and uncertainty evaluation of 17 amino acid in hydrochloric acid solution reference material(1.0 μmol/mL)

氨基酸	均匀性引入的相对标准不确定度/%	短期稳定性引入的相对标准不确定度/%	长期稳定性引入的相对标准不确定度/%	溶液定值引入的相对标准不确定度							合成不确定度/%	扩展不确定度/(μmol/mL)	定值/(μmol/mL)	不确定度/(μmol/mL)
				纯度/%	质量/%	分子量/%	第一次定容/%	分取体积/%	第二次定容/%	配制过程/%				
Asp	0.62	0.12	0.05	0.2	0.13	0.0015	0.074	0.021	0.34	0.42	0.76	0.0152	1.00	0.02
Thr	0.39	0.22	0.05	0.2	0.14	0.0016	0.074	0.021	0.34	0.43	0.62	0.0124	1.00	0.02
Ser	0.37	0.10	0.03	0.2	0.16	0.0014	0.074	0.021	0.34	0.43	0.58	0.0116	1.00	0.02
Glu	1.47	0.06	0.04	0.2	0.11	0.0017	0.074	0.021	0.34	0.42	1.53	0.0306	1.00	0.04
Pro	0.37	0.08	0.04	0.2	0.15	0.0021	0.074	0.021	0.34	0.43	0.57	0.0115	1.00	0.02
Gly	0.27	0.10	0.04	0.2	0.22	0.0013	0.074	0.021	0.34	0.46	0.55	0.0109	1.00	0.02
Ala	0.36	0.05	0.08	0.2	0.19	0.0016	0.074	0.021	0.34	0.44	0.58	0.0116	1.00	0.02
Cys	0.31	0.05	0.06	0.3	0.07	0.0012	0.074	0.021	0.34	0.47	0.57	0.0113	1.00	0.02
Val	0.26	0.13	0.04	0.2	0.14	0.0020	0.074	0.021	0.34	0.43	0.52	0.0103	1.00	0.02
Met	0.29	0.11	0.04	0.2	0.11	0.0016	0.074	0.021	0.34	0.42	0.52	0.0104	1.00	0.02
Ile	0.28	0.08	0.04	0.2	0.13	0.0022	0.074	0.021	0.34	0.42	0.52	0.0103	1.00	0.02
Leu	0.29	0.08	0.05	0.2	0.13	0.0022	0.074	0.021	0.34	0.42	0.52	0.0104	1.00	0.02
Tyr	0.27	0.08	0.08	0.2	0.09	0.0023	0.074	0.021	0.34	0.41	0.51	0.0101	1.00	0.02
Phe	0.27	0.08	0.04	0.2	0.10	0.0025	0.074	0.021	0.34	0.41	0.50	0.0101	1.00	0.02
Lys	0.26	0.09	0.05	0.2	0.09	0.0016	0.074	0.021	0.34	0.41	0.50	0.0099	1.00	0.01
His	0.27	0.10	0.04	0.2	0.11	0.0018	0.074	0.021	0.34	0.42	0.51	0.0102	1.00	0.02
Arg	0.35	0.13	0.04	0.2	0.10	0.0016	0.074	0.021	0.34	0.41	0.56	0.0112	1.00	0.02

表 11 盐酸溶液中各氨基酸溶液标准物质的量值和不确定度(0.1 μmol/mL)
Table 11 Characterization and uncertainty evaluation of 17 amino acid in hydrochloric acid solution reference materia(0.1 μmol/mL)

氨基酸	均匀性引入的相对标准不确定度/%	短期稳定性引入的相对标准不确定度/%	长期稳定性引入的相对标准不确定度/%	溶液定值引入不确定度							合成不确定度/%	扩展不确定度/(μmol/mL)	定值/(μmol/mL)	不确定度/(μmol/mL)
				纯度/%	质量/%	分子量/%	第一次定容/%	第一次分取/%	第二次定容/%	第二次分取/%	第三次定容/%	配制过程		
Asp	0.58	0.03	0.01	0.2	0.13	0.0015	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.44	0.100	0.002
Thr	0.38	0.01	0.01	0.2	0.14	0.0016	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.44	0.100	0.002
Ser	0.47	0.01	0.01	0.2	0.16	0.0014	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.45	0.100	0.002
Glu	0.67	0.01	0.01	0.2	0.11	0.0017	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.43	0.100	0.002
Pro	0.52	0.01	0.01	0.2	0.15	0.0021	0.074	0.021	0.068	0.10	0.34	0.44	0.200	0.002
Gly	0.97	0.01	0.01	0.2	0.22	0.0013	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.48	0.100	0.003
Ala	0.52	0.01	0.01	0.2	0.19	0.0016	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.46	0.100	0.002
Cys	0.74	0.04	0.01	0.3	0.07	0.0012	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.48	0.100	0.002
Val	0.61	0.02	0.01	0.2	0.14	0.0020	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.44	0.100	0.002
Met	1.72	0.01	0.01	0.2	0.11	0.0016	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.43	0.100	0.004
Ile	0.58	0.01	0.01	0.2	0.13	0.0022	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.44	0.100	0.002
Leu	1.73	0.01	0.01	0.2	0.13	0.0022	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.44	0.100	0.004
Tyr	1.20	0.01	0.00	0.2	0.09	0.0023	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.43	0.100	0.003
Phe	2.10	0.01	0.01	0.2	0.10	0.0025	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.43	0.100	0.005
Lys	1.76	0.01	0.01	0.2	0.09	0.0016	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.43	0.100	0.004
His	1.20	0.01	0.01	0.2	0.11	0.0018	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.43	0.100	0.003
Arg	0.98	0.01	0.00	0.2	0.10	0.0016	0.074	0.015	0.068	0.10	0.34	0.43	0.100	0.003

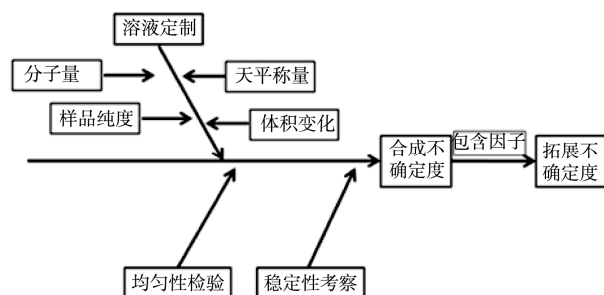


图 2 盐酸溶液中氨基酸混合溶液标准物质定值不确定度来源分析

Fig.2 Uncertainty source analysis of 17 amino acid in hydrochloric acid solution reference material

4 结 论

本研究成功研制了 1.00 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.100 $\mu\text{mol/mL}$ 2 个浓度水平的盐酸溶液中 17 种氨基酸混合溶液标准物质, 该系列标准物质具有良好的均匀性, 规定条件下的短期、长期稳定性均满足标准物质技术要求, 已成功申报国家二级标准物质, 证书编号为: GBW(E)100471、GBW(E)100472。该系列标准物质的研制与应用, 将为农产品及农业投入品的质量监测工作提供质量控制与技术支撑。

参考文献

- [1] Rodgers, Kenneth J. Non-protein amino acids and neurodegeneration: The enemy within [J]. *Exp Neurol*, 2014, 253: 192–196.
- [2] 赵静. 几种主要饲用氨基酸的营养研究进展[J]. *中国饲料添加剂*, 2016, (1): 10–13.
Sheng LH, Liu J, Cao WQ. Preparation of 17 amino acid mixed solution reference materials [J]. *China Metrol*, 2007, (5): 75–76.
- [3] GB/T 18246–2019 饲料中氨基酸的测定[S].
GB/T 18246–2019 Determination of amino acids in feeds [S].
- [4] GB/T 15399–2018 饲料中含硫氨基酸的测定 离子交换色谱法[S].
GB/T 15399–2018 Determination of sulfur amino acids in feeds—Ion exchange chromatography [S].
- [5] GB/T 15400–2018 饲料中色氨酸的测定[S].
GB/T 15400–2018 Determination of tryptophan in feeds [S].
- [6] JJF 1343–2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理[S].
JJF 1343–2012 General and statistical principles for characterization of reference materials [S].
- [7] JJF 1006–1994 一级标准物质技术规范[S].
JJF 1006–1994 Technical norm of primary reference material [S].
- [8] 何继杰, 张晓凤, 钱莉莉, 等. 痕量氨基酸分析方法研究进展[J]. *分析科学学报*, 2019, 35(4): 507–513.
He JJ, Zhang XF, Qian LL, *et al.* Recent progress on analysis of trace

amino acids [J]. *J Anal Sci*, 2019, 35(4): 507–513.

- [9] Menestrina F, Osorio GJ, Castells CB. Chiral analysis of derivatized amino acids from kefir by gas chromatography [J]. *Microchem J*, 2016, 128: 267–273.
- [10] Koros A, Varga Z, Molnar-Perl I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1203(2): 146–152.
- [11] Tuberoso CI, Congiu F, Serrelli G, *et al.* Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in cannonau and vermentino wines by HPLC–FLD [J]. *Food Chem*, 2015, 175: 29–35.
- [12] Lorenzo MP, Navarrete A, Balderas C, *et al.* Optimization and validation of a CE–LIF method for amino acid determination in biological samples [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, (73): 116–124.
- [13] Vancompernelle B, Croes K, Angenon G. Optimization of a gas chromatography–mass spectrometry method with methyl chloroformate derivatization for quantification of amino acids in plant tissue [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1017–1018: 241–249.
- [14] Creamer JS, Mora MF, Willis PA. Enhanced resolution of chiral amino acids with capillary electrophoresis for biosignature detection in extraterrestrial samples [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(2): 1329–1337.
- [15] 原国家质量监督检验检疫总局, 中国计量科学研究院. 国家标准物质资源共享平台[DB/OL]. <http://www.ncrm.org.cn>
Former general administration of quality supervision, inspection and quarantine, Chinese institute of metrology. National standard material resources sharing platform [DB/OL]. <http://www.ncrm.org.cn>
- [16] 盛灵慧, 刘军, 曹文祺. 17 种氨基酸混合溶液标准物质的研制[J]. *中国计量*, 2007, (5): 75–76.
Sheng LH, Liu J, Cao WQ. Preparation of 17 amino acid mixed solution reference materials [J]. *China Metrol*, 2007, (5): 75–76.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

贾 铮, 助理研究员, 主要研究方向为饲料质量安全及其检测技术。
E-mail: jiazheng@caas.cn



樊 霞, 研究员, 主要研究方向为饲料质量安全及其检测技术。
E-mail: fanxia@caas.cn