

高效液相色谱法测定鱼粉中色氨酸及 不确定度评定

李 兰, 贾 铮, 周 剑, 王 敏, 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** 探讨利用高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC)测定饲料中色氨酸含量的方法, 并对动物性饲料原料鱼粉中色氨酸含量检测过程的不确定度进行计算和评定。**方法** 采用高效液相色谱仪, 通过优化前处理过程和色谱条件, 建立饲料中色氨酸含量的高效液相色谱测定方法, 并针对鱼粉进行实际样品测定。依据测量不确定度评定和表示的要求, 通过获取的数据对高效液相色谱法测定鱼粉中色氨酸过程的不确定度进行评定。**结果** 选择的智利鱼粉中色氨酸含量为 0.64%, 测量结果的不确定度为 0.01%; 色氨酸检测过程中, 样品的水解、试液的转移稀释、标准物质的纯度以及制备过程、液相色谱测定的重复性是测量误差的主要来源。**结论** 本研究建立的液相色谱法可用于饲料中色氨酸含量的测定, 同时构建的鱼粉中色氨酸含量的不确定度评定方法为检测过程的质量控制提供了参考。

关键词: 高效液相色谱; 饲料; 鱼粉; 色氨酸; 不确定度

Uncertainty evaluation of tryptophan in fishmeal by high performance liquid chromatography method

LI Lan, JIA Zheng, ZHOU Jian, WANG Min, 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 investigate the method for the determination of tryptophan content in feed by high performance liquid chromatography (HPLC), and calculate and evaluate the uncertainty of the determination process of tryptophan in the fishmeal of animal feedstuff. **Methods** The HPLC method was used in this study. The conditions for pre-possessing and chromatography were optimized in order to establish a method for measuring the concentration of tryptophan in fish meal. The uncertainty during the measurement of tryptophan was evaluated based on the requirements of evaluation and expression of uncertainty in measurement. **Results** The results showed that the tryptophan concentration in the Chilean fish meal and the uncertainty of tryptophan was 0.64% and 0.01%, respectively. Hydrolysis of samples, transfer dilution of test solution, purity of reference materials, preparation process and repeatability of liquid chromatography were the main sources of measurement error of the uncertainty. **Conclusion** The method established in this study can be used to evaluate the concentration of tryptophan in feed.

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(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

The uncertainty evaluation method of the determination of tryptophan in fish meal provides a reference for the quality control of the detection process.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; feed; fish meal; tryptophan; uncertainty

1 引言

色氨酸又名 α -氨基- β -吲哚丙酸, 是一种芳香族氨基酸, 分 DL 型、D 型和 L 型 3 种异构体, 天然存在的只有 L-色氨酸^[1]。色氨酸是动物体内必需氨基酸, 在机体代谢中起着重要作用。日粮中缺乏会影响动物生长, 同时也会减低其它氨基酸的利用率^[2,3]。鱼粉作为我国饲料行业主要的动物源性饲料原料, 在补充饲料蛋白方面有着不可或缺的重要作用, 含有较为均衡的氨基酸组成, 是最为重要的优质动物蛋白来源之一^[4]。准确测定鱼粉中的色氨酸, 对于评价鱼粉质量, 识别掺假有着重要意义。原国家标准 GB/T 15400-1994《饲料中色氨酸的测定》^[5]中仅规定了分光光度法, 在多年的检测实践过程中, 研究人员发现高效液相色谱法也是一种可靠和高效的测定饲料中色氨酸的方法^[6-22], 为此, 在对标准进行修订时, 通过大量的研究工作, 新国家标准 GB/T 15400-2018《饲料中色氨酸的测定》^[20]中将高效液相色谱法作为饲料中色氨酸的检测方法之一列入其中。在此基础上, 本研究采用该方法对智利鱼粉中的色氨酸含量进行了测定; 为保证方法的可靠性和检测结果之间可比性, 在确定了样品均匀性基础上, 针对该方法的不确定度来源^[23,24]进行了分析, 建立了基于该方法的测量不确定度评估模型^[14,16], 对方法不确定度进行了定量评定和合成, 并对影响量值结果准确性的主要不确定度来源进行了讨论^[25], 以期对检测数据的正确评价和检测结果的质量控制提供依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Aglient 1100 高效液相色谱仪(备荧光检测器, 美国安捷伦公司); 电子分析天平(精度 0.0001 g, 德国 Sartorius 公司); 带温控 pH 计(精度 0.01, 德国 Lab 公司); TRANSSONIC460 超声波提取器(美国公司 Elma 公司); 3K15 高速离心机(美国 Sigma 公司); 针头过滤器备 0.45 μm (或 0.2 μm)水系滤膜(美国安捷伦公司)。

L-色氨酸纯度标准物质(GBW09233, 国家一级标准物质), 纯度为 99.7% \pm 0.6%; 乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 氢氧化钾、氢氧化锂、磷酸二氢钾(分析纯, 国药集团化学试剂公司); 水为 Milli-Q Gradient 超纯水(电阻率达到 18.2 M Ω .cm)。

饲料和智利鱼粉样品由国家饲料质量监督检验中心(北京)提供。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

L-色氨酸标准储备溶液 100 $\mu\text{g/mL}$: 精确称取 25 mg L-色氨酸纯度标准物质溶于 250 mL 0.1 mol/L 氢氧化钾中。

4 mol/L 氢氧化锂: 称取 9.58 g 氢氧化锂固体溶解于 100 mL 水中。

0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液(pH 4.5): 称取 6.80 g 磷酸二氢钾固体溶解于 1000 mL 水中, 用磷酸调节 pH 至 4.5。

2.2.2 样品前处理

称取试样约 75 mg, 置于聚四氟乙烯水解衬管中, 充氮 1 min, 加入 1.5 mL 4 mol/L 氢氧化锂溶液, 将水解管于 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中水解 20 h。取出冷却至室温, 用水洗入 25 mL 容量瓶中, 同时加入 1 mL 6 mol/L 盐酸溶液中和, 用水定容至刻度。试液继续稀释 10 倍后, 取少量过 0.45 μm 滤膜, 上高效液相色谱仪测定。

2.2.3 不确定度评价试验

称取选定的智利鱼粉样品, 按照样品前处理方法进行 8 次重复测定。

2.2.4 色谱条件

色谱柱: Aglient Proshell 120 SB-Aq C₁₈ 柱(100 mm \times 4.6 mm, 2.1 μm); 柱温: 28 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 检测波长: 激发波长 283 nm; 发射波长 343 nm; 流动相: 磷酸二氢钾溶液(0.05 mol/L, pH 4.5)/乙腈=95/5(V_1/V_2); 流速: 0.8 mL/min。

3 结果与分析

3.1 高效液相色谱检测方法的建立

鱼粉中的色氨酸以蛋白结合态的形式存在, 通过碱解的方式使之成为游离态色氨酸。由于色氨酸在 C₁₈ 色谱柱上具有良好的保留特征, 以及本身所具有的荧光特性, 可以通过液相色谱的分离、荧光检测器的检测而对其进行定量测定。

为准确测定鱼粉中的色氨酸, 有必要对样品前处理条件和色谱条件进行优化。本实验通过设计正交实验, 确定了碱解剂种类、用量、水解时间等条件, 获得了最佳的色谱条件。

3.2 前处理条件的优化

3.2.1 碱解剂选择和用量的确定

在色氨酸的测定中, 比较关键的是碱解剂的选择。

NaOH、LiOH、Ba(OH)₂ 是最为常用的碱解剂, 由于 4 mol/L Ba(OH)₂ 在制备时易结块难于溶解; 5 mol/L NaOH 不适用于使用玻璃水解管进行水解。5 mol/L NaOH 和 4 mol/L LiOH 在使用聚四氟乙烯水解管, 并在相同用量下水解鱼粉结果并无差异; 国家标准 GB/T 18246-2000《饲料中氨基酸的测定》^[26]中选择了氢氧化锂作为碱解剂, 因此本研究用碱解剂为 4 mol/L LiOH。

碱解剂用量决定了水解效率, 因此在研究中比较了 0.5、1.0、1.5、2.0 mL 等 4 个体积用量对检测结果的影响, 结果如图 1 所示, 结果表明在 1.5 mL 时水解效率最佳。

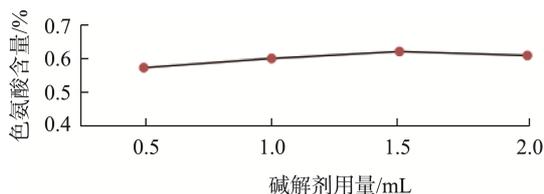


图 1 4 mol/L 氢氧化锂用量试验(n=3)

Fig.1 Consumption curve of 4mol/L lithium hydroxide (n=3)

3.2.2 水解时间的确定

在 1.5 mL 4 mol/L LiOH 作用下, 比较了不同水解时间对色氨酸含量测定的影响, 设计水解时间 2~25 h 作为实验区间, 观察含量变化, 如图 2 所示, 当水解时间达到 15 h 后, 色氨酸含量趋于平稳, 为保证水解充分, 确定水解时间为 20 h。

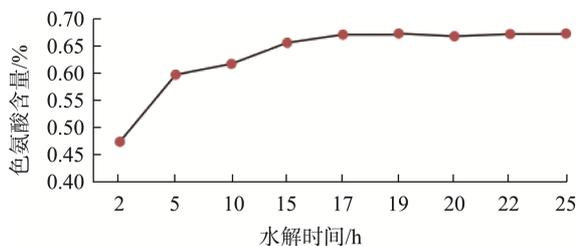


图 2 鱼粉水解时间试验(n=3)

Fig.2 Hydrolysis time curve of fish meal (n=3)

3.2.3 色谱条件的优化

本研究对缓冲溶液体系、色谱柱、检测器进行了优化,

确定了作为评价不确定度过程的色谱条件。

优化后的条件如表 1 所示。

表 1 测定饲料中色氨酸优化条件
Table 1 Optimal conditions

色谱柱	流动相	检测器
C ₁₈ 柱	0.05 mol 磷酸二氢钾/乙腈	荧光检测器
Proshell 120	95/5	283 nm; 343 nm

3.3 方法评价

3.3.1 方法的线性范围

在优化的色谱条件下对 L-色氨酸标准系列溶液进行相关性考察, 取 L-色氨酸标准储备溶液, 制备成 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 μg/mL, 以 L-色氨酸色谱峰面积与浓度拟合曲线, 如图 3 所示。实验表明, L-色氨酸在 0.01~5.0 μg/mL 浓度范围具有良好线性关系, 线性回归方程为: $Y=209.9X+0.291$ $r^2=0.9991$ 。

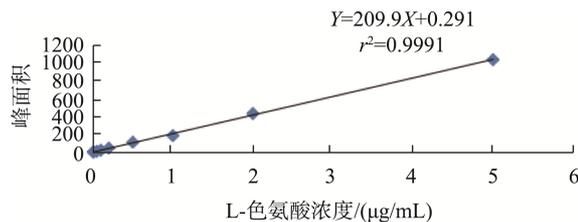


图 3 L-色氨酸校准曲线

Fig 3 L-tryptophan calibration curve

3.3.2 方法准确度的考察-回收率试验

由于鱼粉本身含有色氨酸, 因此需对鱼粉样品进行强化添加 L-色氨酸, 扣除本底后计算回收率, 如表 2 所示: 平均回收率为 97.7%, 证明了方法具有良好的准确性。

3.3.3 精密度

连续 3 天进行鱼粉中色氨酸的测定, 计算组内、组间差异如表 3 所示:

表 2 添加回收率数据(%)
Table 2 Add recovery data (%)

次数	本底值	添加量	测定值	回收率	平均回收率
1	0.652	0.385	0.371	96.6	97.7
2		0.357	0.345	96.8	
3		0.385	0.350	91.0	
4		0.357	0.345	96.6	
5		0.336	0.304	90.4	
6		0.352	0.351	99.8	

表 3 精密度测定(%)
Table 3 Precision measurement data (%)

编号	批次	含量	平均值	标准偏差	相对标准偏差	总平均值	总标准偏差	总相对标准偏差
	1	0.641						
1	2	0.651	0.643	0.0068	0.0106			
	3	0.638						
	1	0.645						
2	2	0.650	0.649	0.0036	0.0056	0.647	0.0049	0.0076
	3	0.652						
	1	0.649						
3	2	0.644	0.648	0.0032	0.0050			
	3	0.650						

组间及组内相对标准偏差均在 2%以内, 测量重复性和精密度良好。

3.4 检测不确定度的来源分析

根据 2.2.2 不确定度评价试验流程, 采用高效液相色谱法测定已经通过均匀性检验的智利鱼粉样品中的色氨酸含量, 其不确定度主要来自样品的前处理(包括样品称重、水解后定容、试液的二级稀释)、L-色氨酸标准溶液的配制以及稀释、高效液相色谱仪器测量以及结果计算等方面。

为明确表示试验流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^[17], 如图 4 所示。通过计算不确定度, 了解高效液相色谱法在检测鱼粉中色氨酸含量时影响结果准确度的主要因素, 以便在检测工作中予以重视并加以修正。

3.5 不确定度数学模型的建立

根据检测流程, 鱼粉中的色氨酸含量 C_{try} 可以表达为:

$$C_{try} = \frac{A_x \times C_0 \times V_{try}}{A_0 \times m} \times 10^{-4}$$

其中, C_{try} 为样品溶液中 L-色氨酸的百分含量, %; A_x 为样品溶液中 L-色氨酸的色谱峰面积; A_0 为标准工作溶液中 L-色氨酸的色谱峰面积; C_0 为标准工作溶液中 L-色氨酸的质量分数, $\mu\text{g/mL}$; V_{try} 为鱼粉样品总定容体积, mL; m 为鱼粉的称样量, g。

3.6 不确定度计算

3.6.1 检测结果

在重复性条件下, 对鱼粉样品进行了 8 次平行测定, 结果如表 4 所示。

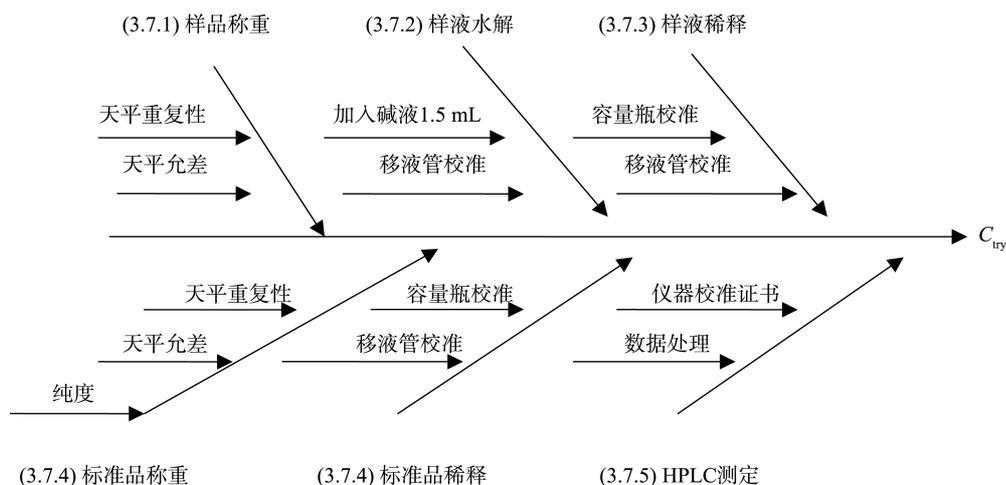


图 4 鱼粉中色氨酸检测的不确定度来源分析图
Fig.4 Fishbone diagram of uncertainty

表 4 智利鱼粉中色氨酸含量测定数据
Table 4 Data of trptophan in Chilean fish meal

测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8
含量/%	0.643	0.648	0.643	0.643	0.637	0.638	0.639	0.629
平均含量/%	0.640							
标准偏差(S)	0.005682							

3.7 不确定度各分量的计算

3.7.1 样品称重:

在称量过程中引入不确定度 $U_{\text{rel}}(m)$ 有以下几方面:

(1)天平校准引入的不确定度:按照检定证书上给出的最大允许误差,在称量区间 $0 \text{ g} \leq m \leq 50 \text{ g}$ 时,为 $\pm 0.05 \text{ mg}$,按均匀分布取 $k = \sqrt{3}$,则其标准不确定度为:

$$u_1(m) = \frac{0.00005}{\sqrt{3}} = 2.8868 \times 10^{-5} \text{ g}.$$

(2)天平变动性(称量重复性)引入的不确定度:天平变动性可根据《化学分析中不确定度的评估指南》^[19]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。对于万分之一天平, $d=0.1 \text{ mg}$,所以天平变动带来的不确定度即为半宽度。

$$u_2(m) = a = \frac{d}{2} = 0.05 \text{ mg} = 5 \times 10^{-5} \text{ g}.$$

则样品称量引起的不确定度:

$$U(m) = \sqrt{u_1^2(m) + u_2^2(m)} = \sqrt{(2.8868 \times 10^{-5})^2 + (5 \times 10^{-5})^2} =$$

5.7735×10^{-5} , 相对不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(m) = \frac{U(m)}{m} = \frac{5.7735 \times 10^{-5}}{0.075} = 0.077\%.$$

3.7.2 样液水解:

鱼粉样品的水解过程为使用 2 mL 刻度移液管加入 1.5 mL 4 mol/L 氢氧化锂溶液进行水解。此过程不确定度 $U_{\text{rel}}(V)$ 由 2 mL 移液管的允差、温度以及估读误差组成。

(1)2 mL 移液管容量允差为 $\pm 0.012 \text{ mL}$,按照均匀分布考虑 ($k = \sqrt{3}$),则标准不确定度为

$$u_1(v_1) = \frac{0.012}{\sqrt{3}} = 0.006928 \text{ (mL)}, \text{ 相对不确定度}$$

$$\frac{u_1(v_1)}{2} = 0.3464\%.$$

(2)温度对 2 mL 移液管体积的影响引入的不确定度, $u_2(v_2)$ 按以下计算,由于水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$,实验环境为 $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$,产生的体积变化 $2 \text{ mL} \times 2 ^\circ\text{C} \times 2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C} = (8.4 \times 10^{-4}) \text{ mL}$,因此,按均匀分布考虑 ($k = \sqrt{3}$),则标准不确定度为:

$$u_2(v_2) = \frac{8.4 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0.000485 \text{ (mL)}, \text{ 相对不确定度为:}$$

$$\frac{u_2(v_2)}{2} = 0.0242\%.$$

(3)移液管估读误差引入的不确定度, $u_3(v_3)$, 2 mL 移液管重复吸取 2 mL 液体进行 10 次称量试验,得标准偏差为 0.0028 mL,相对不确定度为: $\frac{u_3(v_3)}{2} = 0.14\%$ 。

2 mL 移液管合成相对不确定度:

$$U_{\text{rel}}(V) = \sqrt{\left(\frac{u_1(v_1)}{2}\right)^2 + \left(\frac{u_2(v_2)}{2}\right)^2 + \left(\frac{u_3(v_3)}{2}\right)^2} = \sqrt{0.3464\%^2 + 0.0242\%^2 + 0.14\%^2} = 0.374\%.$$

3.7.3 样品溶液的稀释 $U_{\text{rel}}(S_a)$

主要是水解液冷却后,加水稀释定容至 25 mL 时引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(v_1)$ 以及继续稀释 10 倍时引入的相对不确定度 $U_{\text{rel}}(v_2)$:

(1)容量瓶允差引入的标准不确定度, $u_1(v_1)$: 水解液用 25 mL 容量瓶(A 级)定容,容量瓶(A 级)的容量允差为 $\pm 0.03 \text{ mL}$,按均匀分布考虑 ($k = \sqrt{3}$),则相对不确定度为

$$\frac{u_1(v)}{v} = \frac{0.03}{\sqrt{3} \times 25} = 0.06928\%.$$

(2)温度对容量瓶体积影响引入的标准不确定度, $u_2(v_1)$ 。标准不确定度为

$$u_2(v_1) = \frac{25 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 3}{\sqrt{3}} = 0.009094 \text{ (mL)}, \text{ 相对不确定度为}$$

$$\frac{u_2(v)}{v_1} = \frac{0.009094}{25} = 0.03637\%.$$

(3)容量瓶估读误差引入的不确定度, $u_3(v_1)$ 。用水对 25 mL 容量瓶进行 10 次的定容和称量试验,得标准偏差为 0.030 mL,按 A 类不确定度评定,则标准不确定度为

$$u_3(v_1) = \frac{0.03}{\sqrt{10}} = 0.009487 \text{ (mL)}, \text{ 相对不确定度为}$$

$$\frac{u_3(v)}{v_1} = \frac{0.009487}{25} = 0.03795\%.$$

按照 A 类不确定度评定,样品水解液稀释定容 25 mL 容量瓶引入的相对不确定度为

$$U_{\text{rel}}(v_1) = \sqrt{\left[\frac{u_1(v_1)}{v_1}\right]^2 + \left[\frac{u_2(v_2)}{v_1}\right]^2 + \left[\frac{u_3(v_3)}{v_1}\right]^2} = \sqrt{0.06928\%^2 + 0.03637\%^2 + 0.03795\%^2} = 0.08697\%.$$

(4)样液再次稀释 10 倍过程不确定度:移取 2.5 mL 已定容的样品溶液,置于 25 mL 容量瓶中,加水稀释并定容至刻度。其间不确定度来自于 5 mL 刻度移液管和 25 mL

容量瓶。

①5 mL 刻度移液管引入的不确定度, $U_{rel}(V_m)$

5 mL 移液管容量允差为 ± 0.025 mL, 按均匀分布 $k=\sqrt{3}$, 则标准不确定度为 $u_1(v_1)=\frac{0.025}{\sqrt{3}}=0.01443(\text{mL})$, 相对不确定度为: $\frac{u_1(v_2)}{v_1}=\frac{0.01443}{5}=0.2886\%$ 。

②温度对 5 mL 移液管体积的影响引入的不确定度

$u_2(v_2)=\frac{5 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 3}{\sqrt{3}}=0.001819$ (mL), 相对不确定度为:

$\frac{u_2(v_2)}{v_2}=\frac{0.001819}{5}=0.03638\%$ 。

③5mL 移液管估读引入的不确定度, $u_3(c_3)$

重复吸取 5 mL 水进行 10 次称量试验, 得标准偏差为 0.004 mL, 相对不确定度为 $\frac{u_2(c_2)}{v_3}=\frac{0.004}{5}=0.08\%$ 。

$$\text{则: } U_{rel}(V_m)=\sqrt{\left[\frac{u_1(v_1)}{v_1}\right]^2+\left[\frac{u_2(v_2)}{v_2}\right]^2+\left[\frac{u_3(v_3)}{v_3}\right]^2}$$

$$=\sqrt{0.2886\%^2+0.03638\%^2+0.08\%^2}=0.3017\%$$

④25 mL 容量瓶引入的不确定度: 按照样品 3.7.3(3) 水解过程 25 mL 容量瓶的不确定度计算得

$\frac{u_4(v_2)}{v_2}=0.08697\%$ 。

样液第 2 次稀释过程合成标准相对不确定度为:

$$U_{rel}(V_2)=\sqrt{0.3017\%^2+0.08697\%^2}=0.314\%$$

样液稀释过程总不确定度

$$U_{rel}(S_a)=\sqrt{U_{rel}^2(V_1)+U_{rel}^2(V_2)}$$

$$=\sqrt{0.08697\%^2+0.314\%^2}=0.3258\%$$

3.7.4 L-色氨酸标准溶液的配制 $U_{rel}(S_{st})$

L-色氨酸储备溶液配置过程: 称取有证标准物质 L-色氨酸 25 mg 于 250 mL 容量瓶中, 加入少量 0.1 mol/L 氢氧化钾溶解, 用水定容至刻度。配制过程引入的不确定度包括以下几方面:

(1)标准品证书标示的纯度 p 为(99.7 \pm 0.6)%, 取容量因子 $k=2$, 则 L-色氨酸标准物质纯度引入的相对不确定度

$$U_{rel}(p)=\frac{0.006}{2}=0.3\%$$

(2)标准物质称量引入的不确定度 $U_{rel}(m_{st})$

所使用天平检定证书上给出的最大允许误差为 ± 0.01 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 $u_{s1}(m)=0.00001/\sqrt{3}=5.7735 \times 10^{-6}$ g。天平变动引起的不确定度, 按照《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)中国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, $d=0.01$ mg, 所以称量重复性的不确定度即为半宽度

$u_2(m)=\frac{d}{2}=0.005$ mg=(5×10^{-6})g。因此, 标准品称量引入的不确定度为

$$u_s(m)=\sqrt{u_{s1}^2(m_s)+u_{s2}^2(m_s)}=\sqrt{(5.7737 \times 10^{-6})^2+(5 \times 10^{-6})^2}$$

$$=7.6376 \times 10^{-6}$$
 g。

相 对 不 确 定 度

$$U_{rel}(m_{st})=\frac{u_s(m)}{m}=\frac{7.6376 \times 10^{-6}}{0.025}=0.03055\%$$

(3)250 mL 容量瓶定容引入的相对不确定度, $U_{rel}(V_{st1})$ 包含以下几方面:

①容量瓶允差引入的标准不确定度, $u_1(V)$: 250 mL 容量瓶(A 级)定容, 容量瓶(A 级)的容量允差为 ± 0.15 mL, 按均匀分布考虑 ($k=\sqrt{3}$), 则相对不确定度为

$$\frac{u_1(v)}{v}=\frac{0.15}{\sqrt{3} \times 250}=0.03464\%$$

②温度对容量瓶体积影响引入的标准不确定度, $u_2(v)$ 。标准不确定度为

$u_2(v)=\frac{250 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 3}{\sqrt{3}}=0.09094(\text{mL})$, 相对不确定度为

$$\frac{u_2(v_2)}{v_2}=\frac{0.09094}{250}=0.03637\%$$

③容量瓶估读误差引入的不确定度, $u_3(V_3)$ 。用水对 250 mL 容量瓶进行 10 次的定容和称量试验, 得标准偏差为 0.05 mL, 按 A 类不确定度评定, 则标准不确定度为

$$u_3(V_3)=\frac{0.05}{\sqrt{10}}=0.0158(\text{mL}), \text{ 相对不确定度为}$$

$$\frac{u_3(v_3)}{v_3}=\frac{0.0158}{250}=0.006325\%$$

按照 A 类不确定度评定, 标准品水定容 250 mL 容量瓶引入的相对不确定度为:

$$U_{rel}(V_{st1})=\sqrt{\left[\frac{u_1(v_1)}{v_2}\right]^2+\left[\frac{u_2(v_2)}{v_2}\right]^2+\left[\frac{u_3(v_3)}{v_2}\right]^2}$$

$$=\sqrt{0.03464\%^2+0.03637\%^2+0.006325\%^2}=0.0506\%$$

(4)标准溶液稀释引入的不确定度 $U_{rel}(V_{st2})$

L-色氨酸标准工作溶液稀释过程为: 移取 L-色氨酸标准储备溶液 2.5 mL 于 25 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。其间不确定度来自于 5 mL 刻度移液管和 25 mL 容量瓶。

直接引用 3.7.3(4)的结果, 期间相对不确定度为 0.314%。

因此, L-色氨酸标准溶液制备过程总不确定度为:

$$U_{rel}(S_{st})=\sqrt{U_{rel}^2(p)+U_{rel}^2(m_{st})+U_{rel}^2(V_{st1})+U_{rel}^2(V_{st2})^2}$$

$$= \sqrt{0.3\%^2 + 0.03055\%^2 + 0.0506\%^2 + 0.314\%^2} = 0.3209\%$$

3.7.5 高效液相色谱仪测定

由高效液相色谱仪测定引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(\text{HPLC})$ 由仪器色谱峰面积积分引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(A_x/A_0)$ 和测定样品重复性引入的不确定度 $U_{\text{rel}}(R)$ 两部分组成。

(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%~1%, 按均匀分布考虑, 则色谱峰面积的标准不确定度为: $u(A_x/A_0) = \frac{1\%}{\sqrt{3}} = 5.774 \times 10^{-3}$,

其相对不确定度为: $U_{\text{rel}}(A_x/A_0) = \sqrt{2} u(A_x/A_0) = 0.8165\%$ 。

(2) 采用选定的方法对鱼粉进行 8 次重复测定, 结果如表 4 所示, 含量平均值为 0.640%, 标准偏差 $S=0.005682\%$ 。因此, 重复性引入的相对不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(R) = \frac{s}{w\sqrt{n}} = \frac{0.005682}{0.640\sqrt{8}} = 0.314\%$$

高效液相色谱测定的不确定度为:

$$U_{\text{rel}}(\text{HPLC}) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2\left(\frac{A_x}{A_0}\right) + U_{\text{rel}}^2(R)} = \sqrt{0.8165\%^2 + 0.314\%^2} = 0.8748\%$$

3.8 合成不确定度的计算

相对标准不确定度由下式计算而得:

$$U_{\text{rel}}(w) = \sqrt{U_{\text{rel}}^2(m) + U_{\text{rel}}^2(V) + U_{\text{rel}}^2(S_{\text{sa}}) + U_{\text{rel}}^2(S_{\text{st}}) + U_{\text{rel}}^2(\text{HPLC})} \\ = \sqrt{0.077\%^2 + 0.374\%^2 + 0.3258\%^2 + 0.3209\%^2 + 0.8748\%^2} \\ = 0.5958\%$$

3.9 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 $U=k \times U_{\text{rel}}(w) = 1.19\%$ 。则扩展不确定度为 $0.64\% \times 1.19\% = 0.0076\% \approx 0.01\%$

3.10 结果表示

本研究中智利鱼粉中色氨酸含量的测定结果可以表达为 $w=(0.64 \pm 0.01)\%$ 。

4 结论

本研究建立了高效液相色谱-荧光检测器测定鱼粉中色氨酸的方法。通过对标准溶液线性相关、样品强化添加回收率试验、重复性试验考察了方法的准确度和精密度。

通过优化的样品前处理条件, 对智利鱼粉进行了 8 次重复测定, 计算了测量过程的不确定度分量并合成了总不确定度。测量结果表达为: 色氨酸含量为 0.64%, 扩展不确定度为 0.01%。检测过程各不确定度分量的分析结果如表 5 所示。

表 5 检测过程相对不确定度分量表达

Table 5 Express of uncertainty components in detection process

过程	样品称重 $U_{\text{rel}}(m)$	水解体积 $U_{\text{rel}}(V)$	样品总稀释 $U_{\text{rel}}(S_a)$	标准物质纯度 $U_{\text{rel}}(p)$	标准物质称量 $U_{\text{rel}}(m_{\text{st}})$	标准溶液制备稀释 $U_{\text{rel}}(S_{\text{st}})$	HPLC 测定 $U_{\text{rel}}(hplc)$
不确定度 $U_{\text{rel}}(\%)$	0.077	0.374	0.326	0.3	0.0306	0.321	0.314

通过对表 5 不确定度各分量的分析可见: 在测定鱼粉色氨酸含量的过程中, 样品的水解、试液的转移稀释、标准物质的纯度以及制备过程、液相色谱测定的重复性是测量误差的主要来源。由于测定蛋白水解色氨酸时称量样品的量和加入的碱解剂都较少, 因此在加入碱解剂时要使干燥的样品充分分散于 1.5 mL 的碱液中; 转移稀释样品时要确保水解残渣被完全洗出。L-色氨酸标准物质纯度不确定度在标准物质的制备过程起着主导作用, 正确选择有证标准物质也是减低由标准溶液引入的误差的必要条件。液相色谱测定的重复性也是影响鱼粉中色氨酸测定不确定度主要来源之一, 因此, 选择稳定的流动相体系、关注检测器的灵敏度有助于减低重复性偏差。

本研究为鱼粉中色氨酸含量的测定分析了测量误差来源, 有助于在分析测试中最大程度的规避引起误差的风险, 对实际工作具有指导意义, 也适用于其它饲料产品中色氨酸含量的分析与测试。

参考文献

- [1] 闫丽红. 色氨酸在畜禽生产中的应用[J]. 饲料博览, 2016, (11): 15-18. Yan LH. The application of tryptophan in livestock and poultry production [J]. Feed Expo, 2016, (11): 15-18.
- [2] 郭宝珠, 张小叶, 王健. 色氨酸的研究进展[C]. 2011 年国际氨基酸产业创新与联盟发展高峰论坛论文集, 45-51. Guo BZ, Zhang XY, Wang J. Research progress of tryptophan [C]. 2011 International amino acid industry innovation and Alliance Development Summit Forum, 45-51.
- [3] 林香信, 姚清华, 宋永康. 饲用羽毛肽粉中色氨酸的测定[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(7): 39-41. Lin XX, Yao QH, Song YK. Determination of tryptophan in feed feather peptide powder [J]. Anim Husb Feed Sci, 2011, 32(7): 39-41.
- [4] 刘坤, 谭凯艳. 鱼粉质量的氨基酸评价[J]. 中国化工贸易, 2012, 4: 304-186. Liu K, Tan KY. Amino acid evaluation of fish meal quality [J]. Chin Chem Trade, 2012, 4: 304-186.

- [5] GB/T 15400-1994 饲料中色氨酸的测定[S].
GB/T 15400-1994 Determination of tryptophan in feed [S].
- [6] Katarzyna S, Illona S, Jolanta R, *et al.* Method validation for determination of amino acid in feed by HPLC [J]. Accreditation Qual Assurance, 2017, 22: 247-252.
- [7] 李成成, 尤晓蒙, 付琨, 等. 高效液相色谱测定饲料中色氨酸含量方法的研究[J]. 食品工业科技, 2016, (9): 308-310, 316.
Li CC, You XM, Fu J, *et al.* Determination of tryptophan in feed by HPLC [J]. Food Ind Technol, 2016, (9): 308-310, 316.
- [8] 樊霞, 彭强, 徐思远, 等. 火焰原子吸收光谱法测定饲料中铜含量的不确定度评定[J]. 农产品质量与安全, 2016, 5: 47-51.
Fan X, Peng Q, Xu SY, *et al.* Flame atomic absorption of copper in feed measurement uncertainty evaluation [J]. Qual Saf Agric Prod, 2016, 5: 47-51.
- [9] 宋卫得, 高尧华, 厉雪芹, 等. 高效液相色谱法测定饲料中赭曲霉毒素A的不确定度评估[J]. 粮食与饲料工业, 2016, 3: 64-67.
Song WD, Gao YH, Li XQ, *et al.* Evaluation of determination of ochrotoxin A in Feed by HPLC [J]. Food Feed Ind, 2016, 3: 64-67.
- [10] 樊霞, 肖志明. 过滤法测定饲料中粗纤维的不确定度评定[J]. 中国饲料, 2014, 20: 32-35.
Fan X, Xiao ZM. Evaluation of uncertainty in the determination of crude fiber in feed by filtration method [J]. Chin Feed, 2014, 20: 32-35.
- [11] Barbara M, Anna SR, Ewa C. Estimation of uncertainty and validation of analytical procedures as a quality control tool the evaluation of uncertainty for amino acid analysis with ion-exchange chromatography-case study [J]. J Microbiol, Biotechnol Food Sci, 2013, 2(Special issue 1): 1875-1882.
- [12] 张兰珍, 杨继红, 熊琛. 氨基酸分析最低检测限的测量不确定度评定[J]. 计量与检测技术, 2012, 39(6): 50-53.
Zhang LZ, Yang JH, Xiong Y. Evaluation of the measurement uncertainty of the minimum detection limit of amino acid analysis [J]. Meas Test Technol, 2012, 39(6): 50-53.
- [13] 保志娟, 周瑾艳, 杨亦. 高效液相色谱法测定氨基酸口服液中 L-色氨酸的不确定度评定[J]. 化学分析计量, 2012, 21(2): 14-16.
Bao ZJ, Zhou JY, Yang Y. Uncertainty evaluation of determination of L-tryptophan in amino-acid oral liquid by HPLC [J]. Chem Anal Metrol, 2012, 21(2): 14-16.
- [14] 邱钟华. 测量不确定度评估的应用管理和模型化[J]. 质量与标准化, 2011, (s1): 48-51.
Qiu ZH. Application management and modeling of measurement uncertainty evaluation [J]. Qual Stand, 2011, (s1): 48-51.
- [15] 程立坤, 徐庆阳, 谢希贤, 等. HPLC 快速测定发酵液中 L-色氨酸[J]. 天津科技大学学报, 2010, 25(1): 9-12.
Cheng LK, Xu QY, Xie XX, *et al.* Rapid determination of L-tryptophan in fermentation broth by HPLC [J]. J Tianjin Univ Sci Technol, 2010, 25(1): 9-12.
- [16] 李庆忠. 不确定度评估方法的六个关键点[J]. 工程与试验, 2008, 48(B12): 16-18.
Li QZ. Six key points of uncertainty evaluation method [J]. Eng Test, 2008, 48(B12): 16-18.
- [17] 王建清, 张玉. 氨基酸分析仪测定鱼粉中水解色氨酸的试验[J]. 畜牧与饲料科学, 2007, (6): 37-38.
Wang JQ, Zhang Y. Determination of hydrolyzed tryptophan in fish meal by amino acid analyzer [J]. AnimHusb Feed Sci, 2007, (6): 37-38.
- [18] 于泓, 牟世芬. 氨基酸研究方法的进展[J]. 分析化学评述与进展, 2005, (3): 398-404.
Yu H, Mu SF. Progress in research methods of amino acids [J]. Rev Dev Anal Chem, 2005, (3): 398-404.
- [19] CNAS-GL006: 2019 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2019.
CNAS-GL006: Guide for the evaluation of uncertainty in 2019 chemical analysis [M]. Beijing: China Measurement press, 2019.
- [20] GB/T 15400-2018 饲料中色氨酸的测定[S].
GB/T 15400-2018 Determination of tryptophan in feed [S].
- [21] GB/T 27418-2017 测量不确定度评定和表示[S].
GB/T 27418-2017 Evaluation and representation of measurement uncertainty [S].
- [22] JJF 1059. 1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059. 1-2012 Evaluation and representation of measurement uncertainty [S].
- [23] 刘长娇, 杨越超, 王妮, 等. 茚三酮比色法测定黄秋葵氨基酸含量不确定度评定[J]. 粮食与油脂, 2019, (9): 92-95.
Liu CJ, Yang YC, Wang N, *et al.* Uncertainty evaluation for determining amino acids content in okra by ninhydrin colorimetric method [J]. Gain Oil, 2019, (9): 92-95.
- [24] 刘宇明. 黄酒氨基酸态氮测定结果的不确定度评定[J]. 酿酒科技, 2018, (1): 80-86.
Zhao YM. Evaluation of uncertainty of amino acid nitrogen content in yellow rice wine [J]. Liquor Making Technol, 2018, (1): 80-86.
- [25] CNAS-CL07: 2011 测量不确定度评估的要求[M]. 北京: 中国计量出版社, 2011.
CNAS-CL 07: Requirements for evaluation of measurement uncertainty in 2011 [M]. Beijing: China Measurement Press, 2011.
- [26] GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定[S].
GB/T 18246-2000 Determination of amino acids in feed [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



李 兰, 副研究员, 主要研究方向为饲料中维生素和氨基酸类质量检测技术研究。

E-mail: lilan@caas.cn



樊 霞, 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