

氨基酸分析仪测定羊奶粉中含硫氨基酸及不确定度评定

李璐^{1,2} 刘丹^{1,2} 强鑫^{1,2} 王琳^{1,2} 张华峰^{3,4}

(1. 富平县检验检测中心, 陕西 富平 711799; 2. 陕西省羊乳产品质量监督检验中心, 陕西 富平 711799;

3. 陕西师范大学中俄食品与健康科学国际联合研究中心, 陕西 西安 710119;

4. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119)

摘要: [目的] 评定氨基酸分析仪测定羊奶粉中含硫氨基酸的不确定度。[方法] 通过建立数学模型和不确定度来源鱼骨图, 分析和量化引入的不确定度分量, 计算合成不确定度和扩展不确定度。[结果] 当胱氨酸和半胱氨酸质量分数为 0.305 g/100 g、蛋氨酸质量分数为 0.338 g/100 g 时, 其扩展不确定度分别为 0.022, 0.023 g/100 g ($k=2$)。[结论] 该方法不确定度主要来源于标准物质称量、样品称量和标准系列工作液配制, 在样品检测过程中应严格控制。

关键词: 羊奶粉; 含硫氨基酸; 氨基酸分析仪; 不确定度

Determination of sulfur-containing amino acids in goat milk powder by amino acid analyzer and uncertainty evaluation

LI Lu^{1,2} LIU Dan^{1,2} QIANG Xin^{1,2} WANG Lin^{1,2} ZHANG Huafeng^{3,4}

(1. Fuping County Inspection and Testing Center, Fuping, Shaanxi 711799, China; 2. Shaanxi Goat Milk Product Quality Supervision and Testing Center, Fuping, Shaanxi 711799, China; 3. International Joint Research Center of Shaanxi Province for Food and Health Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710119, China; 4. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710119, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the uncertainty during the determination of sulfur-containing amino acids in goat milk powder by an amino acid analyzer. [Methods] The mathematical model and fishbone diagram of the uncertainty source are established to analyze and quantify the introduced uncertainty components. Then, the combined uncertainty and extended uncertainty are calculated. [Results] When the mass fractions of cystine, cysteine, and methionine are 0.305, and 0.338 g/100 g, the extended uncertainty is 0.022, and 0.023 g/100 g, respectively ($k=2$). [Conclusion] The uncertainty of this method mainly comes from the weighing of standard material and samples, as well as the preparation of the standard series working solution, which should be strictly controlled during sample testing.

Keywords: goat milk powder; sulfur-containing amino acid; amino acid analyzer; uncertainty

胱氨酸[(Cys)₂]、半胱氨酸(Cys)和蛋氨酸(Met)为食品中主要的含硫氨基酸, 其中蛋氨酸是必需氨基酸之一^[1], 胱氨酸和半胱氨酸对早产儿来说也是必需氨基酸^[2], 在人体中通过影响细胞氧化还原状态和细胞代谢有毒化合物的能力, 维持细胞系统的运行^[1,3]。含硫氨基酸

含量是蛋白质质量评价的重要指标^[4], 含硫氨基酸也可以作为食品增香剂和发色剂、面包添加剂和用于延长食品货架期的抗氧化剂^[1,5]。目前, 有关氨基酸的检测方法有滴定法、碘量法、电化学分析法、分光光度法、近红外光谱法、离子交换色谱法(又称氨基酸分析仪法)、高效液相色谱

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(编号: 2024GH-YBXM-16, 2025GH-YBXM-079); 渭南市科技计划项目(编号: 2022ZDYFJH-47)

通信作者: 张华峰(1975—), 男, 陕西师范大学教授, 博士。E-mail: isaacsau@sohu.com

收稿日期: 2025-01-14 改回日期: 2025-07-14

引用格式: 李璐, 刘丹, 强鑫, 等. 氨基酸分析仪测定羊奶粉中含硫氨基酸及不确定度评定[J]. 食品与机械, 2025, 41(10): 34-42.

Citation: LI Lu, LIU Dan, QIANG Xin, et al. Determination of sulfur-containing amino acids in goat milk powder by amino acid analyzer and uncertainty evaluation[J]. Food & Machinery, 2025, 41(10): 34-42.

谱法、气相色谱法、毛细管电泳法、液相色谱—串联质谱法、液相色谱—电感耦合等离子体质谱法^[6]、气相色谱—质谱联用法^[7]等,常采用离子交换色谱法测定含硫氨基酸^[8-9]。

羊奶中蛋白质含量为2.6~4.1 g/100 g,其中胱氨酸含量为0.71~0.78 mg/g^[10]、半胱氨酸含量为0.31 mg/g^[11]、蛋氨酸含量为0.54~0.56 mg/g^[10]。市售羊奶粉包括全脂乳粉、调制乳粉和配方乳粉等,其氨基酸含量各不相同。全脂羊奶粉中蛋白质含量为23.0~27.1 g/100 g^[12],其氨基酸主要来自羊奶;调制和配方羊奶粉中蛋白质含量为11.5~20.0 g/100 g^[12],其氨基酸来自羊奶、乳清粉、益生菌或用于营养强化的乳铁蛋白和氨基酸等。张雪等^[13]研究表明,婴幼儿配方羊奶粉中蛋氨酸和胱氨酸是第一限制性氨基酸,蛋白质含量过高会加重婴幼儿肾脏的代谢负担,均衡蛋白和必需氨基酸含量是生产加工的关键控制点。根据精准的检测数据规范羊奶粉加工生产,有利于科学地监测、强化羊奶粉营养,高效地监管羊奶粉销售。

测量不确定度能够定量表征测量结果的质量和分散程度^[14],因此表示为测量结果与其不确定度的方式更加准确可靠。通过不确定度评定能够充分反映试验过程中的各种影响因素,便于技术人员分析试验过程中的主要误差来源^[15],采取纠正措施规范操作行为和步骤。试验拟依据JJF1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》和CNAS-GL006:2019《化学分析中不确定度的评估指南》,应用氨基酸分析仪对羊奶粉中含硫氨基酸进行测定,并分析和评定不确定度,以明确各不确定度来源对结果的影响程度,为控制检测过程中的关键环节提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

羊奶粉:市售;

过氧化氢(纯度30%)、甲酸(纯度88%)、氢溴酸(纯度40%)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、苯酚、硼酸、正辛酸、氯化钠、抗坏血酸:国产分析纯;

盐酸(纯度36%)、乙酸(纯度99.8%)、柠檬酸钠、柠檬酸、乙酸钠、乙酸钾、氢氧化钠:国产优级纯;

甲醇、乙醇:色谱纯,德国默克公司;

茚三酮:纯度98%,上海麦克林生化科技股份有限公司;

L-磺基丙氨酸(纯度99.3%,摩尔质量169.15 g/mol)、L-蛋氨酸(纯度99.9%,摩尔质量181.21 g/mol):坛墨质检科技股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

氨基酸分析仪(茚三酮柱后衍生离子交换色谱仪):

S-433Dup型,配570 nm光度检测器,塞卡姆(北京)科学仪器有限公司;

电子分析天平:BT125D型,德国赛多利斯科学仪器有限公司;

酸度计:PHSJ-6L型,上海仪电物理光学仪器有限公司;

电热鼓风干燥箱:101-2型,北京科伟永兴仪器有限公司;

氮吹仪:MTN-5800A-24型,天津奥特赛恩斯仪器有限公司;

超纯水机:UPHW-IV-90T型,四川优普超纯科技有限公司;

数控超声波清洗器:SB-4200DTS型,宁波新艺超声设备有限公司;

螺口玻璃消解管:含聚四氟乙烯盖,容量20~30 mL,山玻玻璃仪器有限公司;

移液器:20~200,25~250,100~1 000 μ L,大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;

分度吸量管(5 mL)、容量瓶(10,50,100 mL):A级,天玻玻璃仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 原理 羊奶粉样品中的蛋白质经过甲酸氧化和盐酸水解^[16],其产物中的胱氨酸与半胱氨酸经氧化酸水解为磺基丙氨酸(CysA),最后的测定结果实际为胱氨酸与半胱氨酸之和,而蛋氨酸经氧化酸水解为蛋氨酸砒[Met(O)₂],水解后的磺基丙氨酸和蛋氨酸砒相对稳定,有利于准确检测。氨基酸分析仪是采用阳离子交换色谱法对氨基酸进行分离并定性、定量分析,根据JJG 1064—2011《氨基酸分析仪》检定校准可使仪器保持适宜状态。磺基丙氨酸和蛋氨酸砒经离子交换色谱柱分离,与茚三酮溶液产生颜色反应,生成紫色化合物,再通过可见光分光光度检测器测量其在570 nm处的吸光度,与相应标准溶液的吸光度进行比较,即可计算出样品中相应的氨基酸含量。

1.2.2 试剂溶液配制

(1) 过甲酸溶液:将过氧化氢和甲酸按体积比1:9混匀,每毫升加入5 mg苯酚,室温下静置1 h,冰水浴30 min,临用现配。

(2) 样品稀释液:称取11.8 g柠檬酸钠和6.0 g柠檬酸,加入800 mL水和10.4 mL盐酸,用氢氧化钠调节pH值为2.20,定容至1 000 mL。过0.45 μ m水系滤膜,加入0.1 mL正辛酸防腐。

(3) 钾钠缓冲液:称取196.0 g乙酸钾和272.0 g乙酸钠,加入400 mL水,缓慢加入200 mL乙酸,冷却,定容至1 000 mL,过0.45 μ m水系滤膜。

(4) 茚三酮溶液:将600 mL甲醇倒入棕色试剂瓶,加

入 20 g 茚三酮和 2 g 苯酚,搅拌溶解。加入 400 mL 钾钠缓冲液,用氮气从底部吹 3~5 min,加入 0.2 g 抗坏血酸,用氮气从底部吹 3~5 min,密封溶液,静置 10 h 后使用。

1.2.3 标准溶液配制

(1) 标准储备液(2.5 $\mu\text{mol/mL}$):称取 0.042 59 g 磺基丙氨酸和 0.045 35 g 蛋氨酸砷,用样品稀释液溶解并定容至 100 mL。

(2) 标准中间液(200 nmol/mL):吸取磺基丙氨酸和蛋氨酸砷标准储备液各 4 mL,用样品稀释液定容至 50 mL。

(3) 标准系列工作液:吸取混合标准中间液 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.50, 5.00 mL 于 10 mL 容量瓶,用样品稀释液定容。标准系列工作液摩尔浓度分别为 2, 5, 10, 20, 30, 50, 100 nmol/mL, 其中磺基丙氨酸标准系列工作液质量浓度分别为 0.000 338 3, 0.000 845 8, 0.001 691 0, 0.003 383 0, 0.005 074 0, 0.008 458 0, 0.016 90 0 mg/mL。蛋氨酸砷标准系列工作液质量浓度分别为 0.000 362 4, 0.000 906 1, 0.001 812 0, 0.003 624 0, 0.005 436 0, 0.009 061 0, 0.018 100 0 mg/mL。

1.2.4 样品前处理 羊奶粉混匀后准确称取 0.050 g(精确至 0.000 01 g)于消解管中。于 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰水中加入 2 mL 预冷的过甲酸溶液, 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min(或 2 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 h),加入 0.3 mL 48% 氢溴酸,冰浴中静置 30 min 去除多余的过甲酸。加入 1~3 滴正辛酸后置于氮吹仪中, 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 吹干。加入 10 mL 6 mol/L 的盐酸溶液于消解管中,拧紧螺盖, (110 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 干燥 24 h。冷却,混匀后将水解液过滤至 50 mL 容量瓶中,水定容。取 1 mL 滤液氮吹干,加入 1 mL 样品稀释液混匀,用 0.22 μm 水系滤膜过滤,得到样品待测液。

1.2.5 仪器工作条件 阳离子分离柱:LCA K06/Na 型, 150 mm $\times$ 4.6 mm,进样量 50 μL ,检测波长 570 nm,柱温 58 $^{\circ}\text{C}$,衍生化温度 130 $^{\circ}\text{C}$,洗脱泵流速 0.45 mL/min,衍生泵流速 0.25 mL/min。流动相 A:称取 11.8 g 柠檬酸钠和 6.0 g 柠檬酸,加入 800 mL 水溶解,加入 70 mL 乙醇和 5.6 mL 盐酸,用氢氧化钠调节 pH 值为 3.45,水定容至 1 000 mL。流动相 B:称取 20.0 g 氢氧化钠和 0.2 g EDTA,溶解后用水定容至 1 000 mL。流路清洗液:20%~50% 甲醇水溶液。洗脱梯度:1~9 min, 100% A; 9.0~9.1 min, 100%~0 A; 9.1~13.0 min, 0 A; 13.0~13.1 min, 0~100% A; 13.1~26.0 min, 100% A。

1.2.6 样品测定 标准系列工作液和样品待测液分别以相同体积注入氨基酸分析仪,用外标法定量。以质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。根据标准曲线得到样品待测液中氨基酸质量浓度,在仪器数据处理软件中输入试样质量和稀释倍数,得到样品中

氨基酸质量分数。将样品待测液逐级稀释,分别根据信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 时由标准曲线得到的氨基酸质量浓度计算出样品中氨基酸质量分数,以此估算检出限和定量限^[17],并通过实际检测来验证检出限和定量限。胱氨酸与半胱氨酸的检出限和定量限分别为 0.001 5, 0.004 8 g/100 g,蛋氨酸的检出限和定量限分别为 0.002 1, 0.006 2 g/100 g。

1.3 数学模型和不确定度来源分析

1.3.1 数学模型 按式(1)计算试样中氨基酸含量。

$$w = \frac{X \times V \times f}{m} \quad (1)$$

式中:

w ——试样中目标化合物的质量分数, g/100 g;

X ——样品待测液中目标化合物的质量浓度, mg/mL;

m ——试样质量, g;

V ——定容体积, mL;

f ——稀释倍数, 50。

1.3.2 不确定度来源分析 根据测量过程,含硫氨基酸测量结果的不确定度来源用鱼骨图表示,如图 1 所示。不确定度主要来源有:

A 类评定:① 样品测量重复性引入的不确定度;② 仪器分析引入的不确定度。

B 类评定:① 样品前处理引入的不确定度;② 标准系列溶液配制引入的不确定度;③ 标准曲线拟合引入的不确定度;④ 加标回收率引入的不确定度。

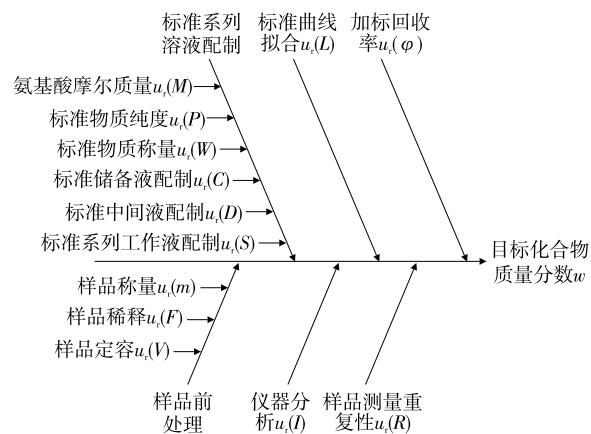


图 1 不确定度来源图

Figure 1 Uncertainty source

2 结果与分析

2.1 A 类不确定度评定

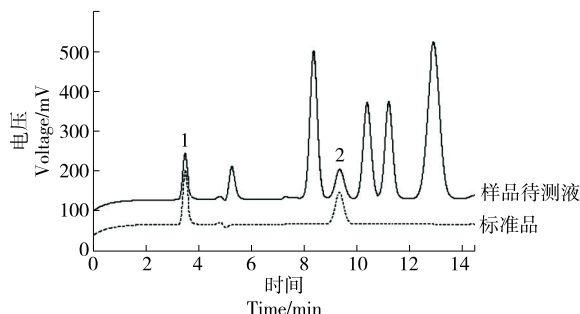
2.1.1 样品测量重复性引入的相对标准不确定度 $u_r(R)$

按样品前处理方法对 7 份($n=7$)羊奶粉进行检测,结果见表 1。样品待测液和标准品色谱图如图 2 所示。根据

表1 样品重复性测量结果

Table 1 Repeatability measurement results of samples

化合物	项目	单位	1	2	3	4	5	6	7	平均值	标准偏差 s
样品	称样量	g	0.050 42	0.050 17	0.050 21	0.050 23	0.050 16	0.050 19	0.050 22	0.050 23	/
胱氨酸与半胱氨酸(以磺基丙氨酸计)	质量浓度	mg/mL	0.003 06	0.003 10	0.003 02	0.003 10	0.003 02	0.003 10	0.003 02	0.003 06	/
	质量分数	g/100 g	0.302 7	0.308 8	0.301 8	0.308 3	0.301 6	0.308 5	0.300 7	0.304 6	0.003 70
蛋氨酸(以蛋氨酸磺计)	质量浓度	mg/mL	0.003 40	0.003 42	0.003 36	0.003 44	0.003 36	0.003 42	0.003 36	0.003 39	/
	质量分数	g/100 g	0.336 3	0.340 5	0.335 4	0.342 7	0.334 7	0.341 4	0.333 9	0.337 8	0.003 58



1为磺基丙氨酸3.48 min,2为蛋氨酸磺9.39 min;样品待测液中磺基丙氨酸和蛋氨酸磺质量浓度分别为0.003 06、0.003 39 mg/mL;标准品中磺基丙氨酸和蛋氨酸磺质量浓度分别为0.003 383、0.003 624 mg/mL

图2 样品待测液和标准品的含硫氨基酸色谱图

Figure 2 Chromatogram of sulfur-containing amino acids in the sample solution to be tested and the standard material

JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》计算标准偏差 s , 则样品测量重复性引入的标准不确定度 $u(R) = \frac{s}{\sqrt{n}}$, 相对标准不确定度 $u_r(R) = \frac{u(R)}{\bar{w}}$ 。因此, 样品测量

$$\text{重复性引入的相对标准不确定度 } u_r(R_{\text{蛋}}) = \frac{0.003 70}{0.304 6 \times \sqrt{7}} =$$

0.004 96。同理, $u_r(R_{\text{蛋}}) = 0.004 33$ 。

2.1.2 仪器分析引入的相对标准不确定度 $u_r(I)$ 经检定, 氨基酸分析仪测得的峰面积重复性相对标准偏差(RSD)为0.8%, 假设为均匀分布($k=\sqrt{3}$), 则仪器分析引入的相对标准不确定度 $u_r(I) = \frac{0.008}{\sqrt{3}} = 0.004 62$ 。

2.2 B类不确定度的评定

2.2.1 样品前处理引入的相对标准不确定度

(1) 样品称量引入的相对标准不确定度 $u_r(m)$: 样品称量使用十万分之一电子天平, 天平引入的不确定度包括称量误差和重复性误差两个分量, 天平检定证书显示其最大允许误差 $M_1 = \pm 0.5 \text{ mg}$, 重复性误差 $M_2 = 1 \text{ mg}$, 假

设为均匀分布($k=\sqrt{3}$), 则天平的称量误差引入的标准不确定度 $u_{M_1} = \frac{M_1}{k} = \frac{0.000 5}{\sqrt{3}} = 0.000 289 \text{ g}$, 天平的重复性误

差引入的标准不确定度 $u_{M_2} = \frac{M_2}{k} = \frac{0.001}{\sqrt{3}} = 0.000 577 \text{ g}$,

所以天平引入的标准不确定度 $u_{\text{天平}} = (u_{M_1}^2 + u_{M_2}^2)^{1/2} = (0.000 289^2 + 0.000 577^2)^{1/2} = 0.000 645 \text{ g}$ 。

羊奶粉称量的平均值为 $\bar{m} = 0.050 23 \text{ g}$ (见表1), 在称量时考虑去皮和最后读数两个分量而计算两次^[18], 则样

$$\text{品称量引入的相对标准不确定度 } u_r(m) = \frac{u_{\text{天平}} \times \sqrt{2}}{\bar{m}} =$$

$$\frac{0.000 645 \times \sqrt{2}}{0.050 23} = 0.018 2。$$

(2) 样品稀释引入的相对标准不确定度 $u_r(F)$: 样品水解液用水稀释至50 mL容量瓶, 主要由量器的容量允差 $u_r(F_{\text{容}})$ 和环境温度波动 $u_r(F_{\text{温}})$ 引入。按照JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》, 玻璃量器服从三角分布($k=\sqrt{6}$), 由GB/T 12807—2021《实验室玻璃仪器分度吸量管》和JJG 196—2006《常用玻璃量器》, 查得量器校准时标准温度20℃时所使用的玻璃量器的容量允许误差, 可得玻璃量器的相对标准不确定度见表2。由表2可知, 50 mL容量瓶的相对标准不确定度 $u_r(F_{\text{容}}) = 0.000 408$ 。

实验室温度为25℃, 与标准温度20℃的温度差 $\Delta T = 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。已知水和玻璃的体积膨胀系数分别为 $\alpha_{\text{水}} = 0.000 210 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ 、 $\alpha_{\text{玻璃}} = 0.000 025 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$, 假设为均匀分布($k=\sqrt{3}$), 则环境温度波动使水的体积膨胀引入的相对标准不确定度 $u_r(F_{\text{水}}) = \frac{\alpha_{\text{水}} \times \Delta T}{k} = \frac{0.000 21 \times 5}{\sqrt{3}} = 0.000 606$,

环境温度波动使玻璃的体积膨胀引入的相对标准不确定度 $u_r(F_{\text{玻璃}}) = \frac{\alpha_{\text{玻璃}} \times \Delta T}{k} = \frac{0.000 025 \times 5}{\sqrt{3}} = 0.000 072 2$,

得出环境温度波动引入的相对标准不确定度 $u_r(F_{\text{温}}) = [u_r^2(F_{\text{水}}) + u_r^2(F_{\text{玻璃}})]^{1/2} = (0.000 606^2 + 0.000 072 2^2)^{1/2} = 0.000 610$ 。

表 2 移液器和玻璃量器引入的不确定度

Table 2 Uncertainty introduced by pipettes and glass gauges

类别	标称容量/mL	使用体积/mL	容量允许误差	计算式	$u_r(V)$
移液器	0.2	0.1	±2.0%	$u_r(V)=\frac{M}{k}$ ($k=\sqrt{3}$)	0.011 5
	0.25	0.25	±1.5%		0.008 66
	1	0.5	±1.0%		0.005 77
	1	1	±1.0%		0.005 77
分度吸量管	2	1.5	±0.012 mL	$u_r(V)=\frac{m}{V \times k}$ ($k=\sqrt{6}$)	0.003 27
	5	2.5	±0.025 mL		0.004 08
	5	4	±0.025 mL		0.002 55
	5	5	±0.025 mL		0.002 04
容量瓶	10	10	±0.020 mL		0.000 816
	50	50	±0.05 mL		0.000 408
	100	100	±0.1 mL		0.000 408

合并得样品稀释引入的相对标准不确定度 $u_r(F)=[u_r^2(F_{容})+u_r^2(F_{温})]^{1/2}=(0.000\ 408^2+0.000\ 610^2)^{1/2}=0.000\ 734$ 。

(3) 样品定容引入的相对标准不确定度 $u_r(V)$: 使用移液器吸取 1 mL 样品稀释液定容, 忽略溶液中试剂的影响。样品定容引入的不确定度主要由量器的容量允差 $u_r(V_{容})$ 和环境温度波动 $u_r(V_{温})$ 引入。由 JJG 646—2006《移液器检定规程》查得所使用移液器的容量允许误差, 假设为均匀分布($k=\sqrt{3}$), 可得移液器的相对标准不确定度见表 2。由表 2 可知, 移液器吸取 1 mL 样品时的相对标准不确定度 $u_r(V_{容})=0.005\ 77$ 。忽略环境温度波动使塑料产生的体积膨胀, 量器的容量允差引入的相对标准不确定度 $u_r(V_{温})=u_r(F_{水})=0.000\ 606$ 。合并得样品定容引入的相对标准不确定度 $u_r(V)=[u_r^2(V_{容})+u_r^2(V_{温})]^{1/2}=(0.005\ 77^2+0.000\ 606^2)^{1/2}=0.005\ 80$ 。

2.2.2 标准溶液配制引入的相对标准不确定度

(1) 氨基酸摩尔质量引入的相对标准不确定度 $u_r(M)$: 由文献[19]可知, 氨基酸摩尔质量引入的相对标准不确定度分别为 $u_r(M_{磺})=(0.000\ 043\ 65^2+0.000\ 031\ 57^2)^{1/2}=0.000\ 053\ 9$ 、 $u_r(M_{蛋})=(0.000\ 038\ 76^2+0.000\ 032\ 17^2)^{1/2}=0.000\ 050\ 4$ 。

(2) 标准物质纯度引入的相对标准不确定度 $u_r(P)$: 经查询标准物质证书可知, *L*-磺基丙氨酸的纯度 $\lambda_{磺}=99.3\%$, 相对扩展不确定度 $U_{磺}=0.5\%(k=2)$, 则 *L*-磺基丙氨酸纯度引入的相对标准不确定度 $u_r(P_{磺})=\frac{U_{磺}}{\lambda_{磺} \times k}=\frac{0.5\%}{99.3\% \times 2}=0.002\ 52^{[20]}$ 。同理, *L*-蛋氨酸的纯度 $\lambda_{蛋}=99.9\%$, 相对扩展不确定度 $U_{蛋}=0.8\%(k=2)$, *L*-蛋氨酸纯度引入的相对标准不确定度 $u_r(P_{蛋})=0.004\ 00$ 。

(3) 标准物质称量引入的相对标准不确定度 $u_r(W)$: 标准物质称量和 2.2.1(1) 样品称量使用同一天平, *L*-磺基丙氨酸和 *L*-蛋氨酸的称量质量分别为 $m_{磺}=0.042\ 59\ \text{mg}$, $m_{蛋}=0.045\ 35\ \text{mg}$, 则 *L*-磺基丙氨酸称量引入的相对标准

不确定度 $u_r(W_{磺})=\frac{u_{天平} \times \sqrt{2}}{m_{磺}}=\frac{0.000\ 645 \times \sqrt{2}}{0.042\ 59}=0.021\ 4$ 。

同理, *L*-蛋氨酸称量引入的相对标准不确定度 $u_r(W_{蛋})=0.020\ 1$ 。

(4) 标准储备液配制引入的相对标准不确定度 $u_r(C)$: 标准物质用样品稀释液定容至 100 mL 容量瓶配制标准储备液, 忽略样品稀释液中的试剂。不确定度主要由量器的容量允差 $u_r(C_{容})$ 和环境温度波动 $u_r(C_{温})$ 引入。由表 2 可知, 100 mL 容量瓶的相对标准不确定度 $u_r(C_{容})=0.000\ 408$ 。已知环境温度波动引入的相对标准不确定度 $u_r(C_{温})=u_r(F_{温})=0.000\ 610$, 则标准储备液配制引入的相对标准不确定度 $u_r(C)=[u_r^2(C_{容})+u_r^2(C_{温})]^{1/2}=(0.000\ 408^2+0.000\ 610^2)^{1/2}=0.000\ 734$ 。

(5) 标准中间液配制引入的相对标准不确定度 $u_r(D)$: 标准中间液配制用 2 个 5 mL 分度吸量管和 1 个 50 mL 容量瓶, 忽略样品稀释液中的试剂。不确定度主要由量器的容量允差 $u_r(D_{容})$ 和环境温度波动 $u_r(D_{温})$ 引入。由表 2 可知, 分度吸量管吸取 4 mL 和 50 mL 容量瓶的相对标准不确定度。已知环境温度波动引入的相对标准不确定度 $u_r(D_{温})=u_r(F_{温})=0.000\ 610$, 则标准中间液配制引入的相对标准不确定度 $u_r(D)=[u_r^2(D_{容-4\ \text{mL}}) \times 2 + u_r^2(D_{容-50\ \text{mL}}) + u_r^2(D_{温}) \times 3]^{1/2}=(0.002\ 55^2 \times 2 + 0.000\ 408^2 + 0.000\ 610^2 \times 3)^{1/2}=0.003\ 78$ 。

(6) 标准系列工作液配制引入的相对标准不确定度 $u_r(S)$: 标准系列工作液配制使用 20~200 μL 移液器 1 次、

25~250 μL 移液器 1 次、100~1 000 μL 移液器 2 次、2 mL 分度吸量管 1 个、5 mL 分度吸量管 2 个和 10 mL 容量瓶 7 个,忽略样品稀释液中的试剂,主要由量器的容量允差 $u_r(S_{\text{容}})$ 和环境温度波动 $u_r(S_{\text{温}})$ 引入。由表 2 可知,移液器吸取 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 mL, 分度吸量管吸取 1.5, 2.5, 5.0, 10.0 mL 容量瓶的相对标准不确定度。已知环境温度波动使水的体积膨胀引入的相对标准不确定度 $u_r(S_{\text{温-水}}) = u_r(F_{\text{水}}) = 0.000\ 606$, 环境温度波动使水和玻璃的体积膨胀引入的合成不确定度 $u_r(S_{\text{温-水和玻璃}}) = u_r(F_{\text{温}}) = 0.000\ 610$, 则标准系列工作液配制引入的相对标准不确定度 $u_r(S) = [u_r^2(S_{\text{容-0.1 mL}}) + u_r^2(S_{\text{容-0.25 mL}}) + u_r^2(S_{\text{容-0.5 mL}}) + u_r^2(S_{\text{容-1 mL}}) + u_r^2(S_{\text{容-1.5 mL}}) + u_r^2(S_{\text{容-2.5 mL}}) + u_r^2(S_{\text{容-5 mL}}) + u_r^2(S_{\text{容-10 mL}}) \times 7 + u_r^2(S_{\text{温-水}}) \times 4 + u_r^2(S_{\text{温-水和玻璃}}) \times 10]^{1/2} = (0.011\ 5^2 + 0.008\ 66^2 + 0.005\ 77^2 + 0.005\ 77^2 + 0.003\ 27^2 + 0.004\ 08^2 + 0.002\ 04^2 + 0.000\ 816^2 \times 7 + 0.000\ 606^2 \times 4 + 0.000\ 610^2 \times 10)^{1/2} = 0.017\ 8$ 。

2.2.3 标准曲线拟合引入的相对标准不确定度 $u_r(L)$ 利用仪器工作软件制作标准曲线,标准曲线线性方程见表 3。

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n-2}}, \quad (2)$$

$$u(L) = \frac{s}{b} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(X_0 - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}, \quad (3)$$

$$u_r(L) = \frac{u(L)}{X_0}, \quad (4)$$

式中:

s ——标准系列工作液峰面积的标准偏差;

b ——标准曲线的斜率;

p ——样品平行测定的次数, $p=7$;

n ——标准系列工作液测定的个数, $n=7 \times 2=14$ (7 个浓度每个浓度测定 2 次);

X_0 ——样品待测液中目标化合物的平均质量浓度(见表 1), mg/mL ;

$\bar{X}$ ——标准系列工作液的平均质量浓度, mg/mL 。

由表 4 可知,标准曲线拟合引入的相对标准不确定度 $u_r(L_{\text{磺}}) = 0.006\ 06$, $u_r(L_{\text{蛋}}) = 0.004\ 30$ 。

表 3 线性回归方程及相关系数

Table 3 Linear regression equations and correlation coefficients

化合物	标准曲线各点质量浓度 $X_i/$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	峰面积平均值 $Y_i/$ ($\text{mV} \cdot \text{s}$)	拟合峰面积 $Y_2/$ ($\text{mV} \cdot \text{s}$)	线性方程 $Y=bX+a$
胱氨酸与半胱氨酸(以磺基丙氨酸计)	0.000 338 3	185.29	215.52	$Y=518\ 500X+40.115$
	0.000 845 8	462.86	478.66	$r=0.999\ 9$
	0.001 691	927.86	916.90	
	0.003 383	1 800.39	1 794.20	
	0.005 074	2 677.77	2 670.98	
	0.008 458	4 475.76	4 425.59	
	0.016 91	8 779.89	8 807.95	
蛋氨酸(以蛋氨酸磺计)	0.000 362 4	174.32	196.37	$Y=483\ 897X+21.002$
	0.000 906 1	450.53	459.46	$r=0.999\ 9$
	0.001 812	909.41	897.82	
	0.003 624	1 776.93	1 774.64	
	0.005 436	2 649.66	2 651.47	
	0.009 061	4 443.80	4 405.59	
	0.018 12	8 769.93	8 789.22	

表 4 标准曲线拟合引入的不确定度

Table 4 Uncertainty introduced by standard curve fitting

化合物	s	b	$X_0/$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\bar{X}/$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$	$u(L)/$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$u_r(L)$
胱氨酸与半胱氨酸(以磺基丙氨酸计)	19.735 3	518 500	0.003 06	0.005 243 0	0.000 206 0	0.000 018 5	0.006 06
蛋氨酸(以蛋氨酸磺计)	14.549 2	483 897	0.003 39	0.005 617 0	0.000 236 5	0.000 014 6	0.004 30

2.2.4 加标回收率引入的相对标准不确定度 $u_r(\varphi)$ 对羊奶粉样品做3个水平的加标,分别添加2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 氨基酸标准储备液0.06,0.10,0.20 mL,每个添加水平重复2次($n=6$),经样品前处理,测得胱氨酸与半胱氨酸、蛋氨酸的加标回收率。加标回收率引入的标准不确定度 $u(\varphi)=\frac{s}{\sqrt{n}}$,相对标准不确定度 $u_r(\varphi)=\frac{u(\varphi)}{\varphi}$ ^[21],计算结果见表5。

用 t 检验对回收率进行显著性检验^[18], $t_{\text{磺}}=\frac{|1-\bar{\varphi}|}{s}= \frac{|1-100.43\%|}{4.299\,4\%}=0.099\,2$,同理 $t_{\text{蛋}}=0.627$ 。取 $P=0.95$,查 t 检验表知 $t_{(0.05)}=2.57$,所以 $t_{\text{磺}}、t_{\text{蛋}}$ 均 $<t_{(0.05)}$,即 $\bar{\varphi}$ 与1无显著性差异,无需考虑加标回收率引入的不确定度。

2.3 合成不确定度 $u_c(Y)$

胱氨酸与半胱氨酸、蛋氨酸的相对标准不确定度分量如表6所示。如果不考虑各分量之间的相关性,则胱氨酸与半胱氨酸合成不确定度 $u_c(Y_{\text{磺}})=[u_r^2(R)+u_r^2(I)+u_r^2(m)+u_r^2(F)+u_r^2(V)+u_r^2(M)+u_r^2(P)+u_r^2(W)+u_r^2(C)+u_r^2(D)+u_r^2(S)+u_r^2(L)]^{1/2}=(0.004\,96^2+$

$0.004\,62^2+0.018\,2^2+0.000\,734^2+0.005\,80^2+0.002\,52^2+0.021\,4^2+0.000\,734^2+0.003\,78^2+0.017\,8^2+0.006\,06^2)^{1/2}=0.035\,3$ 。同理,蛋氨酸合成不确定度 $u_c(Y_{\text{蛋}})=0.034\,3$ 。

由表6可知,对测定结果的不确定度贡献前三的分量依次为标准物质称量、样品称量和标准系列工作液配制,其不确定度贡献占比之和 $>66\%$,为检测过程中的关键控制点;对测定结果的不确定度贡献最后4个分量分别为样品稀释、标准储备液配制和氨基酸摩尔质量,其不确定度贡献占比均 $<1\%$,尤其是氨基酸摩尔质量仅为0.06%,基本可以忽略不计;其他6个分量的不确定度贡献占比为2.91%~6.99%。总体来看,样品前处理和标准系列溶液配制的贡献占比之和 $>80\%$,为检测过程中最应关注的两个环节。

2.4 扩展不确定度(U)及结果表示

依据JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》,取包含因子 $k=2$ (95%置信概率),则扩展不确定度 $U_{\text{磺}}=u_c(Y_{\text{磺}})\times k\times\bar{x}_{\text{磺}};U_{\text{蛋}}=u_c(Y_{\text{蛋}})\times k\times\bar{x}_{\text{蛋}}$ 。因此,该羊奶粉中胱氨酸与半胱氨酸的质量分数合计为 $(0.305\pm0.022)\text{ g/100 g}$,蛋氨酸的质量分数为 $(0.338\pm0.023)\text{ g/100 g}$ (见表7)。

表5 样品回收率测定结果

Table 5 Recovery measurement results of samples

化合物	回收率 $\varphi/\%$						平均值 $\bar{\varphi}/\%$	标准偏差 $s/\%$	$u_r(\varphi)$
	1	2	3	4	5	6			
胱氨酸与半胱氨酸(以磺基丙氨酸计)	105.24	96.96	105.00	102.16	98.02	95.18	100.43	4.299 4	0.016 2
蛋氨酸(以蛋氨酸磺计)	97.49	93.08	103.08	100.22	94.70	97.79	97.727	3.624 6	0.014 0

表6 相对标准不确定度分量汇总表

Table 6 Summarization of relative standard uncertainty components

不确定度来源		分量	胱氨酸与半胱氨酸(以磺基丙氨酸计)				蛋氨酸(以蛋氨酸磺计)			
			相对标准不确定度		贡献占比/%		相对标准不确定度		贡献占比/%	
样品测量重复性	样品测量重复性	$u_r(R)$	0.004 96	0.004 96	5.72	5.72	0.004 33	0.004 33	5.13	5.13
仪器分析	仪器分析	$u_r(I)$	0.004 62	0.004 62	5.33	5.33	0.004 62	0.004 62	5.47	5.47
样品前处理	样品称量	$u_r(m)$	0.018 2	0.019 1	21.00	28.54	0.018 20	0.019 1	21.55	29.29
	样品稀释	$u_r(F)$	0.000 734		0.85		0.000 734		0.87	
	样品定容	$u_r(V)$	0.005 80		6.69		0.005 80		6.87	
标准系列溶液配制	氨基酸摩尔质量	$u_r(M)$	0.000 053 9	0.028 2	0.06	53.41	0.000 050 4	0.027 4	0.06	55.02
	标准物质纯度	$u_r(P)$	0.002 52		2.91		0.004 00		4.74	
	标准物质称量	$u_r(W)$	0.021 4		24.69		0.020 10		23.80	
	标准储备液配制	$u_r(C)$	0.000 734		0.85		0.000 734		0.87	
	标准中间液配制	$u_r(D)$	0.003 78		4.36		0.003 78		4.48	
	标准系列工作液配制	$u_r(S)$	0.017 8		20.54		0.017 80		21.08	
标准曲线拟合	标准曲线拟合	$u_r(L)$	0.006 06	0.006 06	6.99	6.99	0.004 30	0.004 30	5.09	5.09
合成不确定度		$u_c(Y)$	0.035 3		100		0.034 3		100	

表 7 胱氨酸与半胱氨酸、蛋氨酸不确定度评定结果

Table 7 Uncertainty evaluation results of cystine, cysteine, and methionine

化合物	实测值 $\bar{x}$ / ($10^{-2} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$)	合成不确定度 $u_c(Y)$	扩展不确定度 $U/(10^{-2} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1})$	质量分数/ ($10^{-2} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$)
胱氨酸与半胱氨酸(以磺基丙氨酸计)	0.305	0.035 3	0.022	0.305 ± 0.022
蛋氨酸(以蛋氨酸砷计)	0.338	0.034 3	0.023	0.338 ± 0.023

3 结论

采用氨基酸分析仪测定了羊奶粉中含硫氨基酸含量, 并通过构建数学模型对其不确定度进行了分析和评定。结果表明, 当胱氨酸和半胱氨酸质量分数为 0.305 g/100 g、蛋氨酸质量分数为 0.338 g/100 g 时, 其扩展不确定度分别为 0.022, 0.023 g/100 g ($k=2$)。该方法不确定度主要来源标准物质称量、样品称量和标准系列工作液配制。后续应周期性检定校准天平, 使用时注意保持天平的最佳状态; 使用检定合格甚至精度更高的移液器、分度吸量管和容量瓶等量器, 采取每次更换移液器枪头和分度吸量管、增加平行测定次数、提高人员精确操作水平等方式来尽可能地降低引入的不确定度, 提高检测结果的准确性和可靠性。

参考文献

[1] 李玉玲. 奶粉中含硫氨基酸的分析与检测[D]. 太原: 山西大学, 2012: 1-14.
LI Y L. The analysis and detection of sulfur amino acids in milk powder[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2012: 1-14.

[2] 周颖, 黄瑛. 半胱氨酸在早产儿中的代谢[J]. 中华围产医学杂志, 2008, 11(3): 211-213.
ZHOU Y, HUANG Y. Metabolism of cysteine in premature infants[J]. China J Perinat Med, 2008, 11(3): 211-213.

[3] TOWNSEND D M, TEW K D, TAPIERO H. Sulfur containing amino acids and human disease[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2004, 58(1): 47-55.

[4] A Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Energy and protein requirements[R]. World Health Organization Technical Report Series 724. Geneva: World Health Organization, 1985: 64-66.

[5] EMILIE HENG H F, ONG X L, EDWIN CHOW P Y. Antioxidant action and effectiveness of sulfur-containing amino acid during deep frying[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(3): 1 150-1 157.

[6] 贾铮, 李兰, 赵根龙, 等. 饲料中氨基酸分析技术研究进展[J]. 农产品质量与安全, 2017(6): 53-60.
JIA Z, LI L, ZHAO G L, et al. Analytical techniques on amino acid in feed: a review[J]. Quality and Safety of Agro-Products, 2017(6): 53-60.

[7] 李莹杰, 张贞伟, 脱佳琪, 等. 2 种厚皮甜瓜果实不同部位氨基酸组成分析[J]. 中国瓜菜, 2024, 37(11): 48-56.
LI Y J, ZHANG Z W, TUO J Q, et al. Analysis of amino acids composition in different fruit parts of two muskmelon varieties [J]. China Cucurbits and Vegetables, 2024, 37(11): 48-56.

[8] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中含硫氨基酸的测定 离子交换色谱法: GB/T 15399—2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 1-7.
State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration of China. Determination of sulfur amino acids in feeds—Ion exchange chromatography: GB/T 15399—2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018: 1-7.

[9] 广东省质量协会. 食品中含硫氨基酸的测定: T/GDAQ 00006—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022: 1-8.
Guangdong Quality Association. Determination of sulfur amino acids in foods: T/GDAQ 00006—2022[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022: 1-8.

[10] 穆闯录. 不同泌乳阶段牛羊乳及母乳中蛋白质和总氨基酸分析及评价[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017: 22.
MU C L. Comparative analysis and evaluation of protein and total amino acid in different stages in cows', goats' and breast milk[D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2017: 22.

[11] 逢金柱, 米丽娟, 刘正冬. 羊奶营养研究进展及羊乳基婴儿配方奶粉开发[J]. 中国食物与营养, 2018, 24(7): 43-46.
PANG J Z, MI L J, LIU Z D. Research progress in nutrition of goats' milk and development of goat milk-based infant formula [J]. Food and Nutrition in China, 2018, 24(7): 43-46.

[12] 乔春艳. 多重检测技术对市售羊奶粉品质结果的差异性分析研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2021: 11-25.
QIAO C Y. Research on quality difference of goat milk powder with multiple testing technologies[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2021: 11-25.

[13] 张雪, 葛武鹏, 郗梦露, 等. 不同基料的婴幼儿配方奶粉蛋白质营养评价[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 257-263.
ZHANG X, GE W P, XI M L, et al. Protein nutrition evaluation of infant formula with different base materials[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(13): 257-263.

[14] 翟洪稳, 范素芳, 王娟, 等. 测量不确定度在食品检验中的应用及进展[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 314-320.

- ZHAI H W, FAN S F, WANG J, et al. Recent progress in measurement uncertainty and its application in food inspection and detection[J]. Food Science, 2021, 42(5): 314-320.
- [15] 张雪梅, 孔祥吉, 田丰. 高效液相色谱—串联质谱法测定饮用水中季铵盐类消毒剂的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2024, 40(6): 77-82, 89.
- ZHANG X M, KONG X J, TIAN F. Evaluation of uncertainty in determination of two quaternary ammonium salt disinfectants in drinking water by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food & Machinery, 2024, 40(6): 77-82, 89.
- [16] 叶颖慧, 别致, 唐凌轩, 等. 食品中含硫氨基酸含量测定前处理条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 236-242.
- YE Y H, BIE Z, TANG L X, et al. Pretreatment conditions on the determination of sulfur-containing amino acid in food[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(8): 236-242.
- [17] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 化学分析方法验证通则: GB 5009.295—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023: 4.
- National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. General rules for validation of chemical analytical methods in food safety national standards: GB 5009.295—2023[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023: 4.
- [18] 陆振华, 于丽芳, 蔡丹萍, 等. QuEChERS-气相色谱—串联质谱法测定茶叶中水胺硫磷农药残留的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2022, 38(10): 55-60, 68.
- LU Z H, YU L F, CAI D P, et al. Uncertainty evaluation for determination of isocarbophos residues in tea by QuEChERS-gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food & Machinery, 2022, 38(10): 55-60, 68.
- [19] 汪园, 马家麟, 王环, 等. 离子交换色谱法测定饲料中含硫氨基酸含量的不确定度评定[J]. 饲料研究, 2023, 46(23): 126-130.
- WANG Y, MA J L, WANG H, et al. Uncertainty evaluation of determination of sulfur amino acids in feed by ion exchange chromatography[J]. Feed Research, 2023, 46(23): 126-130.
- [20] 杨韵, 曹阳, 李菁, 等. 液相色谱—串联质谱法测定蜂蜜中 4 种喹诺酮类药物残留量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2024, 40(3): 75-81.
- YANG Y, CAO Y, LI J, et al. Uncertainty evaluation for the determination of four quinolone residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food & Machinery, 2024, 40(3): 75-81.
- [21] 张丽, 刘腾飞, 姚菱一, 等. 茶鲜叶中 3 种拟除虫菊酯农药残留量测定的不确定度分析[J]. 食品与机械, 2023, 39(6): 59-64, 87.
- ZHANG L, LIU T F, YAO L Y, et al. Uncertainty evaluation for the determination of three pyrethroid pesticide residues in fresh tea leaves[J]. Food & Machinery, 2023, 39(6): 59-64, 87.