

HPLC-MS/MS 测定生乳中 *L*-羟脯氨酸的不确定度评定

Uncertainty evaluation of determination of *L*-hydroxyproline in raw milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

康 宁^{1,2} 郭丽丽³ 刘晓琳² 花 锦² 高利珍¹

KANG Ning^{1,2} GUO Li-li³ LIU Xiao-lin² HUA Jin² GAO Li-zhen¹

(1. 太原理工大学, 山西 太原 030024; 2. 中华人民共和国太原海关, 山西 太原 030024;

3. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

(1. College of Environmental Science and Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan, Shanxi 030024, China; 2. Taiyuan Customs District, Taiyuan, Shanxi 030024, China;

3. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China)

摘要:参照 SN/T 3929—2014《出口食品中 *L*-羟脯氨酸的测定》,对乳制品中 *L*-羟脯氨酸的含量不确定度进行评定。根据 JJF 1059.1—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》两个现行有效的标准中不确定度评定的基本程序,建立数学模型,分析高效液相色谱串联质谱法测定乳制品中 *L*-羟脯氨酸含量过程中引入的各测量不确定度分量,计算得到测量结果的合成标准不确定度和扩展不确定度。评定结果表明,对结果的影响最大的不确定度分量为拟合标准工作曲线,其次是测量重复性引起的不确定度,试样称量的不确定度对结果的影响最小。评定结果可以对分析检测结果的准确程度和方法的可靠性研究提供参考。

关键词:*L*-羟脯氨酸;生乳;高效液相色谱串联质谱法;不确定度

Abstract: The content uncertainty of *L*-hydroxyproline in dairy products was evaluated by referring to SN/T 3929—2014 “Determination of *L*-hydroxyproline in export foods”. According to JJF 1059.1—2012 “Measurement uncertainty evaluation and expression”, and CNAS—GL006:2019 “The evaluation guidance for uncertainty in chemical analysis”, and these two existing standards for evaluation of uncertainty of the basic procedures, a mathematical model was established for the analysis of determination of *L*-hydroxyproline content in dairy products by high per-

formance liquid chromatography tandem mass spectrometry, which introduced in the process of the measurement uncertainty components. The measured results of synthetic standard uncertainty and expanded uncertainty were obtained by calculation. The evaluation results showed that the uncertainty generated by fitting the standard work curve generated the greatest influence on the results, followed by the uncertainty caused by the measurement repeatability, and the uncertainty of sample weighing had the least influence on the results. The evaluation results can provide a reference for analyzing the accuracy of test results and the reliability of methods.

Keywords: *L*-hydroxyproline; raw milk; HPLC-MS/MS; uncertainty

在 2008 年爆发的三聚氰胺事件后,不少不法商贩又将目光转向动物水解蛋白,代替三聚氰胺加入到乳及乳制品中以增加乳中蛋白含量。*L*-羟脯氨酸是动物水解蛋白的特征成分^[1],乳蛋白质中不含有,它是胶原蛋白中特有的一种氨基酸,约占胶原蛋白氨基酸总量的 10%,而胶原蛋白的主要来源是动物皮料。曾有无良商家向乳制品中掺杂以皮革下脚料等原料制备低廉的高蛋白产品,由于此类低廉的高蛋白产品存在铬残留,长期食用此类低廉高蛋白产品的乳制品会危害人体健康^[2-3]。2011 年中国食品安全整顿工作办公室发布关于印发《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第五批)》的通知(整顿办函[2011]1 号)中明确皮革水解物不能加入乳制品中^[4]。

目前,乳及乳制品中 *L*-羟脯氨酸主要是采用分光光度法和液相色谱及质谱法来检测^[4-6],经检索对于各类

基金项目:教育部博士点基金联合资助课题(编号:20121402110014)

作者简介:康宁,女,太原理工大学在读博士研究生。

通信作者:高利珍(1965—),男,太原理工大学教授,博士生导师,博士。E-mail:gaolizhen@tyut.edu.cn

收稿日期:2019-03-06

食品检测方法的不确定度研究报告较多^[7-9],而 *L*-羟脯氨酸的不确定度评估却较少^[10-11],尤其是 *L*-羟脯氨酸在乳及乳制品中检测方法的不确定度评估,只有 1 篇关于分光光度法的不确定度研究^[12],对于检测实验室,检测质量的保证是很关键的,其次作为第三方检测机构在日常检测过程中,发现乳及乳制品中 *L*-羟脯氨酸检测送检率较高,因此对于 *L*-羟脯氨酸的质谱检测方法的不确定度亟待评估。

基于 SN/T 3929—2014《出口食品中 *L*-羟脯氨酸的测定》,本研究对本实验室测定生乳中 *L*-羟脯氨酸测量的不确定进行评定,以期结果的准确性提供保证,为客户提供公平公正的检测结果。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

生乳:散装,委托送检样品;

L-羟脯氨酸标准品:纯度(99±1)%,上海古朵生物科技有限公司;

乙腈、甲醇:色谱纯,美国 Fisher 公司;

优级纯、正己烷、盐酸:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

甲酸铵:天津市科密欧化学试剂有限公司;

高效液相色谱串联质谱仪:Waters ACQUITY TQ Detector 型,美国沃特世公司;

电子分析天平:Mettler ME204E 型,瑞士梅特勒集团;

冷冻干燥机:Scientz-18N 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

漩涡混匀器:TALBOYS DIGITAL VRTX MXR 230V EURO 型,美国 Henry Troemner 公司;

旋转蒸发器:Heating Bath B-491 型,瑞士步琪(Buchi)实验室仪器公司;

超声波清洗器:KQ-500DB 型,江苏省昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液配制 准确移取 *L*-羟脯氨酸标准品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中,用水定容,配制成 1 mg/mL 的标准溶液。吸取上述 1 mL *L*-羟脯氨酸标准溶液,用水定容到 10 mL 容量瓶中,制成 100 μg/mL 标准中间溶液于 4 °C 下保存。再移取 0.003, 0.005, 0.010, 0.020, 0.050 mL *L*-羟脯氨酸标准中间溶液分别置于 10 mL 容量瓶中,再用水定容成标准工作溶液。

1.2.2 样品制备 准确称取生乳 1 g 于 30 mL 水解管中,移取 6 mol/L 盐酸溶液 10 mL,混合后充入氮气封口,在 105 °C 下水解过夜。将水解液冷却过滤,并用 25 mL 水稀释后—80 °C 冷冻干燥 2 h,冻干物依次加 1 mL 水,10 mL 乙腈,溶解。将提取液 40 °C 进行减压浓缩干,并

用 1 mL 乙腈—水(9+1 体积比)溶解。溶解液用 5 mL 乙腈饱和正己烷液液分配、萃取脱脂,下层溶液经 0.22 μm 滤膜过滤,待上机。

1.2.3 色谱条件 色谱柱:Agilent HILIC(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm);柱温:35 °C;流动相:0.01 mol/L 的甲酸铵溶液和乙腈;流速:0.4 mL/min;进样体积:10 μL。

1.2.4 *L*-羟脯氨酸测量的数学模型

$$X = \frac{c \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \times f(\text{rec}) \times f(\text{rep}), \quad (1)$$

式中:

X ——样品中 *L*-羟脯氨酸的含量,μg/kg;

c ——溶液中 *L*-羟脯氨酸在标准曲线中的浓度,ng/mL;

V_1 ——提取液的体积,mL;

V_2 ——用于净化样品的体积,mL;

V_3 ——样品的最终定容体积,mL;

1 000——换算系数;

m ——样品的质量,g;

$f(\text{rec})$ ——回收率的校正因子;

$f(\text{rep})$ ——重复性的校正因子。

2 分析过程中不确定度的分量

通过提取、净化、浓缩、定容生乳中的 *L*-羟脯氨酸等步骤,液相色谱串联质谱法进行检测,各个环节都会引入不确定度。每个步骤对应的不确定度较为困难,本文选择评价了检测方法中数据的分量。

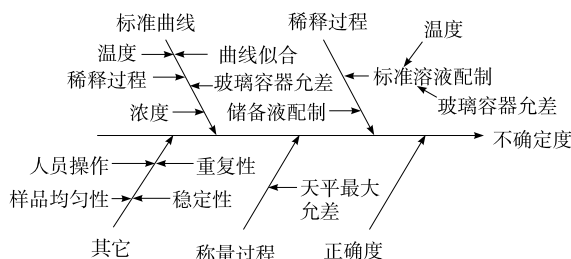


图 1 生乳中 *L*-羟脯氨酸测定不确定度来源图

Figure 1 Uncertainty sources of determination for *L*-hydroxyproline in raw milk

2.1 质量引入的不确定度

称取样品 0.518 5 g,由电子天平的计量证书获得,称量范围为 0~100 g,示值误差为±0.000 1 g,取矩形分布,称量引入的标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(m) = \frac{0.000\,1}{0.518\,5 \times \sqrt{3}} = 0.000\,111\,3.$$

2.2 样品前处理中体积引入的不确定度

2.2.1 水解溶液定容体积引入的标准不确定度 JJG 196—2006《常用玻璃量器》检定规程中规定 A 级 10 mL 具塞比色管的容量允差为±0.002 0 mL,取矩形分布,则

得出 10 mL 具塞比色管引入的标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_1) = \frac{0.002\ 0}{10 \times \sqrt{3}} = 0.000\ 115\ 5。$$

2.2.2 水解溶液分取体积引入的标准不确定度 2.5 mL 分取体积需使用 5 000 μL 的移液器, JJG 646—2006《移液器》检定规程中规定: 5 000 μL 移液器取 2 500 μL 时的容量允差为 $\pm 0.5\%$, 取矩形分布, 则得出水解液分取体积引入的不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_2) = \frac{2\ 500 \times 0.5\%}{5\ 000 \times \sqrt{3}} = 0.001\ 443。$$

2.2.3 最终定容体积引入的标准不确定度 本方法定容体积为 1 mL, JJG 646—2006《移液器》检定规程中规定: 1 000 μL 移液器的容量允差为 $\pm 1.0\%$, 取矩形分布, 则得出最终定容体积引入的不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_3) = \frac{1\ 000 \times 1.0\%}{1\ 000 \times \sqrt{3}} = 0.005\ 773。$$

由前处理中体积引入的不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{前}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(V_1)^2 + u_{\text{rel}}(V_2)^2 + u_{\text{rel}}(V_3)^2} = 0.005\ 952。$$

2.3 标准工作溶液配制过程的不确定度

2.3.1 标准物质的不确定度 L -羟脯氨酸标准物质证书上标出标准物质的不确定度 $u_{\text{rel}}(P) = 0.000\ 25$ 。

2.3.2 标准工作液配制过程的不确定度 使用 0.1 mg 的分量天平、A 级 10 mL 的容量瓶称取标准品、配制和稀释, JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》中规定 A 级 10 mL 容量瓶最大允许差为 $\pm 0.025\ \text{mL}$, 因此由容量瓶引入的不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(V_{10}) = \frac{0.025}{\sqrt{3}} = 0.014\ 43。$$

2.3.3 L -羟脯氨酸标准曲线引入的不确定度 配制质量浓度为 30, 50, 100, 200, 500 ng/mL 的校准标准溶液, 计算得到的标准曲线的不确定度只与仪器的灵敏度相关。 L -羟脯氨酸标准曲线图见图 2。

根据式(2)、(3)计算 L -羟脯氨酸标准曲线引入的不确定度。

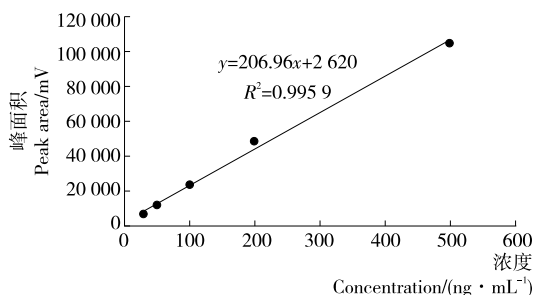


图 2 L -羟脯氨酸标准曲线图

Figure 2 L -hydroxyproline standard curve

$$u_{\text{rel}}(C) = \frac{s_A}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{N} + \frac{c_0 + c_{\text{均}}}{\sum_{i=1}^N (c_j - c_{\text{均}})^2}}, \quad (2)$$

$$s_A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [A_i - (R)]^2}{N - 2}}, \quad (3)$$

式中:

$u_{\text{rel}}(C)$ —— L -羟脯氨酸标准曲线引入的不确定度;

s_A ——回归直线标准偏差;

A_i —— i 个质量浓度点测定的峰面积;

R ——按回归方程计算得出的 i 点的峰面积;

N ——标准溶液浓度点。

经计算得 $u_{\text{rel}}(C) = 0.053\ 6$ 。

2.3.4 标准工作液浓度不确定度的合成

$$u_{\text{rel}}(C_s) = \sqrt{u_{\text{rel}}(P)^2 + 2 \times u_{\text{rel}}(V_{10})^2 + u_{\text{rel}}(C)^2} = \sqrt{0.000\ 25^2 + 2 \times 0.014\ 43^2 + 0.053\ 6^2} = 0.057\ 4。$$

2.4 回收率带入的不确定度

对空白样品进行加标回收试验, 需要添加 6 次相同浓度的标样, 测得回收率分别为 94.3%, 98.1%, 97.8%, 92.7%, 99.9%, 99.2%, 平均回收率 97.0%, 根据式(4)、(5)计算回收率引入的相对标准不确定度。

$$S_{\overline{f_{\text{rec}}}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (f_{\text{rec}i} - \overline{f_{\text{rec}}})^2}{n - 1}}, \quad (4)$$

$$u_{\text{rel}}(f_{\text{rec}}) = \frac{S_{\overline{f_{\text{rec}}}} \div \sqrt{n}}{\overline{f_{\text{rec}}}}, \quad (5)$$

式中:

$u_{\text{rel}}(f_{\text{rec}})$ ——回收率引入的不确定度;

$S_{\overline{f_{\text{rec}}}}$ ——6 次回收率的标准偏差;

$\overline{f_{\text{rec}}}$ ——6 次测定结果的平均值;

n ——回收率测定的频次点。

经计算得出 $S_{\overline{f_{\text{rec}}}} = 0.037\ 6$, $u_{\text{rel}}(f_{\text{rec}}) = 0.015\ 82$ 。

2.5 重复性带入的不确定度

选取一个阳性样品进行重复性试验 ($n = 6$), L -羟脯氨酸测得结果为 374.351 2, 375.463 5, 375.631 3, 375.785 6, 374.379 9, 375.129 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均值为 375.123 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 根据式(4)、(5)计算重复性引入的相对标准不确定度: $u_{\text{rel}}(f_{\text{rep}}) = 0.033\ 83$ 。

2.6 合成最终的不确定度

通过对方法重复性及数学模型的每个分量引入的不确定度等分量进行合成, 最终通过计算合成不确定度:

$$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}(m)^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{前}})^2 + u_{\text{rel}}(C_s)^2 + u_{\text{rel}}(f_{\text{rec}})^2 + u_{\text{rel}}(f_{\text{rep}})^2} = \sqrt{0.000\ 111\ 3^2 + 0.005\ 952^2 + 0.057\ 4^2 + 0.015\ 82^2 + 0.033\ 83^2} = 0.068\ 7\ \mu\text{g}/\text{kg}。$$

2.7 扩展不确定度

置信概率约为 95%, 取包含因子 $k=2$, 高效液相色谱串联质谱法检测生乳中 *L*-羟脯氨酸的相对扩展不确定度为: $u_{\text{rel}} = k \times u_{\text{rel}}(X) = 2 \times 0.0687 = 0.1374 \mu\text{g/kg}$ 。

3 测量结果及其不确定度的报告

用高效液相色谱串联质谱法测定生乳中 *L*-羟脯氨酸含量, 测定结果可表示为: $X = (375.1235 \pm 0.1374) \mu\text{g/kg}$, $k=2$ 。

4 结论

高效液相色谱串联质谱法检测生乳中 *L*-羟脯氨酸过程中的不确定度, 主要来源于前处理的过程、天平的称量过程、标准溶液的配制过程及浓度、回收率、重复性 5 个分量。对这 5 个分量进行不确定度评定, 最终得出扩展不确定度为 $0.1374 \mu\text{g/kg}$, 当包含因子 $k=2$ 、生乳中 *L*-羟脯氨酸检测值为 $375.1235 \mu\text{g/kg}$ 时, 测定结果可表示为: $(375.1235 \pm 0.1374) \mu\text{g/kg}$, $k=2$ (置信概率约为 95%)。

检测结果的不确定度主要来源于最小二乘法拟合的标准曲线、重复性及回收率, 因此, 可以采取增加标准曲线的进样次数、增加平行样品的测试, 选择精度更高的器皿来代替普通的器皿, 优化前处理过程等措施来减少各不确定度分量对检测结果的影响, 增加检测结果的可信度。

参考文献

- [1] 金萍, 丁洪流, 陈英, 等. 乳制品中异种蛋白掺假检测的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(12): 135-138.
- [2] 李景红, 孟祥晨. 高效液相色谱法检测牛乳中掺加的胶原蛋白[J]. 中国乳品工业, 2008(11): 56-59.
- [3] 蔡梅, 吉文亮, 刘华良, 等. 氨基酸自动分析仪对牛乳中羟脯氨酸快速测定方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(6): 542-545.
- [4] 全国食品安全整顿工作办公室. 关于公布食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第五批)的公告[EB/OL]. (2011-01-03) [2017-07-01]. http://www.gov.cn/zwgk/2011-01/25/content_1792065.htm.
- [5] 由丹青. 纯牛奶中动物水解蛋白 *L*-羟脯氨酸含量测定[J]. 中国奶牛, 2014(Z2): 48-50.
- [6] 王娣, 毛琰, 张会军. 分光光度法测定酸奶中 *L*(-)-羟脯氨酸含量的不确定度评定[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 76-80.
- [7] 胡文辉, 童孟新, 陈跃跃, 等. 婴幼儿配方乳粉中黄曲霉 B₁ 质量分数测定的不确定度[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(10): 43-45.
- [8] FERRARI A, GUTIÉRREZ S, SIN G. Modeling a production scale milk drying process: parameter estimation, uncertainty and sensitivity analysis[J]. Chemical Engineering Science, 2016, 152: 301-310.
- [9] 肖利龙, 花锦. 高效液相色谱法测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 结果不确定度的评定[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 79-81.
- [10] 汤丽华. 液相色谱—串联质谱法测定牛奶中地塞米松残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3258-3262.
- [11] GONZALES-GUSTAVSON E, CÁRDENAS-YOUNGS Y, CALVO M, et al. Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 134: 46-53.
- [12] 黄宝莹, 余之蕴, 沈宏林, 等. 发酵乳中乳酸菌数测定的不确定度评估[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(11): 41-44.
- [13] 田倚凡, 陈芳, 谭小路, 等. 萝卜硫素—玉米醇溶蛋白纳米水分散体制备及性质[J]. 食品与发酵工业, 2019(1): 121-127.
- [14] ZHAO Chang-dong, CHENG Hui, JIANG Peng-fei, et al. Preparation of Lutein-loaded particles for improving solubility and stability by Polyvinylpyrrolidone (PVP) as an emulsion-stabilizer[J]. Food Chemistry, 2014, 156: 123-128.
- [15] CHANG Chao, WANG Tao-ran, HU Qiao-bin, et al. Pectin coating improves physicochemical properties of caseinate/Zein nanoparticles as oral delivery vehicles for curcumin[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70: 143-151.
- [16] PATEL A R, VELIKOV K P. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2014, 19(5): 450-458.
- [17] 黄旭琳, 黄晓霞, 钟南京, 等. 负载姜黄素的玉米醇溶蛋白—多糖纳米颗粒的制备及生物活性研究[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(5): 545-549.
- [18] 郭夏丽, 蓝雅惠, 邹艺红, 等. 蜂胶醇提物脂质体制备及表征[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 47-52.
- [19] CHUACHAROEN T, SABLIOV C M. Stability and controlled release of Lutein loaded in Zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2016, 503: 11-18.
- [20] ZOU Li-qiang, LIU Wei, LIU Wei-lin, et al. Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62: 934-941.
- [21] WANG Yong-hui, WANG Jin-mei, YANG Xiao-quan, et al. Amphiphilic Zein hydrolysate as a novel nano-delivery vehicle for curcumin[J]. Food & Function, 2015, 6(8): 2636-2645.

(上接第 12 页)