

## 全自动氨基酸分析仪测定酱油中游离氨基酸的不确定度评定

杨 芳, 李 歆

(淮安市产品质量监督综合检验中心, 江苏 淮安 223001)

**摘 要:** 该实验评定了全自动氨基酸分析仪测定酱油中游离氨基酸的不确定度。参考 CNAS-GL 006—2019《化学分析中不确定度的评估指南》和 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》中的规定与要求, 分析游离氨基酸在测定过程中的各种不确定度来源。在包含因子 $k=2$ 时, 酱油中游离氨基酸的扩展不确定度范围为 $0.02\sim 0.60\text{ g}/100\text{ g}$ 。结果表明, 影响不确定度的主要因素是仪器本身的不确定度和酱油重复性测量的不确定度。

**关键词:** 全自动氨基酸分析仪; 酱油; 游离氨基酸; 不确定度

中图分类号: TS264.2

文章编号: 0254-5071(2022)02-0234-05

doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2022.02.039

引文格式: 杨芳, 李歆. 全自动氨基酸分析仪测定酱油中游离氨基酸的不确定度评定[J]. 中国酿造, 2022, 41(2): 234-238.

## Uncertainty evaluation for determination of free amino acids in soy sauce by automatic amino acid analyzer

YANG Fang, LI Xin

(Huai'an Product Quality Supervision and Inspection Center, Huai'an 223001, China)

**Abstract:** The uncertainty of determination of free amino acids in soy sauce by automatic amino acid analyzer was evaluated. The sources of uncertainty of free amino acids in the determination were analyzed by referring to the provisions and requirements of CNAS-GL 006—2019 "Uncertainty Assessment Guide for Chemical Analysis" and JJF 1059.1—2012 "Uncertainty Assessment and Expression for Measurement". When coverage factor was  $k=2$ , the extended uncertainty of free amino acids in soy sauce ranged from  $0.02\sim 0.60\text{ g}/100\text{ g}$ . The results showed that the main factors affecting the uncertainty were the uncertainty of the instrument itself and the uncertainty of soy sauce repeatability measurement.

**Key words:** automatic amino acid analyzer; soy sauce; free amino acids; uncertainty

酱油是中国老百姓家庭中必备的调味品之一, 含食盐、氨基酸、糖类、有机酸、色素及香料成分, 其风味形成是有微生物参与且非常复杂的过程。微生物的协同作用使之发生一系列的生化反应, 把原料中的不溶性高分子物质分解成低分子化合物, 这些物质的相互结合形成了种类繁多的呈味物质。这些呈味物质主要是氨基酸<sup>[1-4]</sup>。酱油中这些游离氨基酸本身呈现一定的甜味或苦味, 如脯氨酸和丙氨酸呈现甜味, 异亮氨酸和亮氨酸呈现苦味等。酱油的风味并不单纯由谷氨酸提供, 它是各种游离氨基酸共同作用的结果<sup>[5]</sup>。因此对酱油中游离氨基酸进行测定是十分必要的。

目前酱油中游离氨基酸的主要检测方法有红外光谱法<sup>[6]</sup>、分光光度计法<sup>[7]</sup>、毛细管电泳法<sup>[8]</sup>、电位法<sup>[9]</sup>、离子色谱法<sup>[10-11]</sup>、氨基酸分析仪法<sup>[12-15]</sup>、高效液相色谱法<sup>[5, 16-20]</sup>、气相色谱-质谱联用法<sup>[21]</sup>、高效液相色谱-质谱联用法<sup>[22-23]</sup>。其中高效液相色谱-质谱联用法检测游离氨基酸无需衍生, 前处理简单, 具有高选择性和高精度, 但仪器成本昂贵; 高效液相色谱法得到最广泛运用, 但前处理复杂, 部分衍生产物稳定性较差; 气相色谱-质谱联用法衍生条件苛刻, 不同氨基酸衍生反应速度不同或衍生试剂不同; 离子色谱法细菌

干扰性强, 基质影响大; 红外光谱法、分光光度法及电位法重现性较差, 氨基酸分析仪法所需样品衍生时间短、衍生条件对检测结果精确度影响较小, 而且具有样品的耐受性较高、所需的样品量较少的特点。由于衍生化试剂并没有直接注入到色谱柱内部, 还能使色谱柱的使用寿命能够得到有效的延长<sup>[24]</sup>。

现阶段针对采用全自动氨基酸分析仪测定酱油中游离氨基酸不确定度的相关分析研究较少。为了真实反映检测酱油中游离氨基酸结果的准确性, 减少分析过程中的误差, 本研究参照 CNAS—GL 006—2019《化学分析中不确定度的评估指南》<sup>[25]</sup>和 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》<sup>[26]</sup>等对全自动氨基酸分析仪测定酱油中游离氨基酸含量进行不确定度分析, 以期发现可能影响测定结果的因素, 为日常实验检测质量控制提供科学可靠的依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料与试剂

无水乙醇(分析纯): 莱阳市康德化工有限公司; 盐酸(优级纯): 西陇化工试剂有限公司; 17种氨基酸标准溶液

(GBW(E) 10062, 100 nmol/mL): 德国曼默博尔公司; 缓冲液A、B、C、D、E、F, 反应液R, 清洗液W(锂盐体系): 德国曼默博尔公司; 酱油(淮安本地某品牌酿造酱油): 市售。

### 1.2 仪器与设备

A300全自动氨基酸分析仪: 德国曼默博尔公司; 112900台式超速冷冻离心机: 美国赛默飞世尔公司; Milli-Q超纯水仪: 美国Millipore公司; MS105DM电子天平: 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品前处理

用电子天平称取酱油2.00 g于50 mL离心管中, 加入30 mL无水乙醇, 涡旋振荡2 min后定容至50 mL, 置于-20 ℃冰箱中冷冻30 min, 4 ℃、12 000 r/min离心20 min。取1 mL上清液用0.02 mol/mL盐酸定容至10 mL, 摇匀后过膜待测<sup>[27]</sup>。

#### 1.3.2 仪器参数条件

阳离子交换树脂锂盐色谱柱; 色谱柱工作温度40 ℃; 流动相: 缓冲液A、B、C、D、E、F, 反应液R, 清洗液W(锂盐体系); 衍生系统流速为0.1 mL/min, 缓冲系统流速为0.2 mL/min; 进样体积: 20 μL; 检测波长: 440 nm(脯氨酸)、570 nm(其余氨基酸)。仪器为双流路, 梯度洗脱条件见表1, 梯度柱温程序见表2。

表1 梯度洗脱条件

Table 1 Conditions of gradient elution

| 时间/min | 缓冲液A% | 缓冲液B% | 缓冲液C% | 缓冲液D% | 缓冲液E% | 缓冲液F% | 反应液R% | 清洗液W% |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 初始     | 100   | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 100   | 0     |
| 21.0   | 100   |       | 0     | 0     | 0     | 0     | 100   | 0     |
| 29.0   | 0     | 100   | 0     | 0     | 0     | 0     | 100   | 0     |
| 41.0   | 0     | 0     | 100   | 0     | 0     | 0     | 100   | 0     |
| 44.0   | 0     | 0     | 0     | 100   | 0     | 0     | 100   | 0     |
| 71.0   | 0     | 0     | 0     | 0     | 100   | 0     | 100   | 0     |
| 80.0   | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 100   | 0     | 100   |
| 100.0  | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 100   | 0     | 100   |

表2 梯度柱温程序

Table 2 Program of gradient column temperature

| 温度/℃   | 40 | 40 | 37 | 37 | 60 | 60 | 70 | 40  |
|--------|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| 时间/min | 0  | 21 | 29 | 41 | 44 | 71 | 80 | 100 |

Eluent Press数值为50~80 MPa, Reagent Press数值为5~12 MPa。以保留时间定性, 单点外标法定量。试样中氨基酸的峰面积应在标准溶液相应峰面积的30%~200%。

#### 1.3.3 建立数学模型

酱油中游离氨基酸测量不确定度数学模型见公式(1):

$$X = \frac{c \times M \times 10^{-6}}{m \times 100} \times D \quad (1)$$

式中:  $X$ 为酱油中某种游离氨基酸的含量, g/100 g;  $c$ 为测定液里某种游离氨基酸的浓度, nmol;  $M$ 为该游离氨基酸的摩尔质量, g/mol;  $m$ 为酱油的质量, mg;  $D$ 为酱油的稀释倍数。

#### 1.3.4 测定酱油中游离氨基酸的不确定度来源分析

通过对检测过程和数学模型的分析, 影响测定酱油中游离氨基酸不确定度的来源有: 酱油称量的不确定度、氨基酸标准溶液的不确定度、定容酱油的不确定度、酱油稀释的不确定度、全自动氨基酸分析仪的不确定度、氨基酸摩尔质量的不确定度、酱油重复性测量的不确定度。

## 2 结果与分析

### 2.1 不确定度分量的分析

#### 2.1.1 酱油称量的不确定度

酱油的称量天平为MS105DM电子天平(精密度为0.000 01 g), 根据淮安市计量测试中心出具的检定证书(编号: 918066090), 当称样量为0~5 g时, 该天平的最大允许误差为 $\pm 0.5e$  ( $e=0.1$  mg/1 mg), 取平均分布, 酱油称量2 g时, 其不确定度计算如表3所示。

表3 酱油称量的不确定度

Table 3 Uncertainty of soy sauce weighing

| 项目 | 最大允差          | 标准不确定度/mg<br>$u(m)$                 | 相对标准不确定度<br>$u_{rel}(m)$                    |
|----|---------------|-------------------------------------|---|
| 天平 | $\pm 0.05$ mg | $\frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.028\ 87$ | $\frac{0.028\ 87}{2\ 000} = 0.000\ 014\ 43$ |

#### 2.1.2 氨基酸标准溶液的不确定度

购买的氨基酸标准溶液的 $U=\pm 0.02$ , 标准不确定度 $u(std)=\frac{0.02}{\sqrt{3}}=0.011\ 55$ , 标准溶液的浓度是100 nmol/mL, 相对标准不确定度 $u_{rel}(std)=\frac{0.011\ 55}{100}=0.000\ 115\ 5$ 。

#### 2.1.3 定容酱油的不确定度

由JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》<sup>[28]</sup>可知, 50 mL A级容量瓶的容量允差为 $\pm 0.05$  mL, 根据三角分布,  $k=\sqrt{6}$ , 其引入的标准不确定度为:  $\frac{0.05}{\sqrt{6}}=0.020\ 42$  mL; 实验室温度范围为 $(20\pm 5)$  ℃, 无水甲醇的体积膨胀系数为 $7.5\times 10^{-4}/\text{℃}$ , 取温度变化均匀分布,  $k=\sqrt{3}$ , 则标准不确定度为:  $\frac{5\times 7.5\times 10^{-4}}{\sqrt{3}}=0.002\ 165$  mL。因此, 定容酱油引入的合成标准不确定度为:  $u(V_{50})=\sqrt{0.020\ 42^2+0.002\ 165^2}=0.020\ 53$  mL, 酱油定容的相对标准不确定度为 $u_{rel}(V_{50})=\frac{u(V_{50})}{50}=\frac{0.020\ 53}{50}=0.000\ 410\ 6$ 。

#### 2.1.4 酱油稀释的不确定度

在测定过程中, 为了减小称量引入的误差, 因此对酱油进行了二次稀释。二次稀释倍数为10倍。稀释时使用了

1 mL A级单标线吸量管和10 mL A级容量瓶,由JJG 196—2006<sup>[28]</sup>可知,1 mL A级单标线吸量管容量允差为±0.007 mL,

取均匀分布, $k=\sqrt{3}$ ,则其引入的标准不确定度为 $\frac{0.007}{\sqrt{3}}=$

0.004 042 mL;实验室温度范围为(20±5)℃,0.02 mol/mL盐酸溶液的体积膨胀系数为0.455×10<sup>-3</sup>/℃,取温度变化均匀

分布, $k=\sqrt{3}$ ,则标准不确定为: $\frac{5\times0.455\times10^{-4}}{\sqrt{3}}=0.001\ 314\ \text{mL}$ 。

1 mL A级单标线吸量管合成标准不确定度为 $u(V_{\text{吸}1})=\sqrt{0.004\ 042^2+0.001\ 314^2}=0.004\ 250$ ,相对标准不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_{\text{吸}1})=\frac{u(V_{\text{吸}1})}{1}=\frac{0.004\ 250}{1}=0.004\ 250$ 。

10 mL A级容量瓶最大容量允差为±0.020 mL,取三角分布, $k=\sqrt{6}$ ,则其定容体积引入的标准不确定度为 $\frac{0.020}{\sqrt{6}}=$

0.008 165 mL;实验室温度波动范围为(20±5)℃,温度变化引入的标准不确定同①中的0.001 314 mL。合成标准不确

定度 $u(V_{10})=\sqrt{0.008\ 165^2+0.001\ 314^2}=0.008\ 270\ \text{mL}$ ,相对标准不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_{10})=\frac{u(V_{10})}{10}=\frac{0.008\ 270}{10}=0.000\ 827\ 0$ 。

因此,酱油稀释引入的相对标准不确定度为: $u_{\text{rel}}(V_{\text{dil}})=\sqrt{0.004\ 250^2+0.000\ 827\ 0^2}=0.004\ 330$ 。

#### 2.1.5 全自动氨基酸分析仪的不确定度

江苏省计量科学研究院出具的校准证书(编号:C2020-3028896)中全自动氨基酸分析仪的相对标准不确定度为

$u_{\text{rel}}(A)=\frac{0.12}{2}=0.06$ 。

#### 2.1.6 氨基酸摩尔质量的不确定度

氨基酸分子的摩尔质量的不确定度可以通过合成各组成元素原子量的不确定度得到。对于每一个元素,标准不确定度可按矩形分布处理,即不确定度除以 $\sqrt{3}$ 。从原子量表(2009 IUPAC)<sup>[29]</sup>中查得元素的原子量和不确定度,计算元素的不确定度,结果见表4。

| 元素   | 原子量      | 不确定度      | 标准不确定度    |
|------|----------|-----------|-----------|
| 碳(C) | 12.010 7 | ±0.001    | 0.000 58  |
| 氢(H) | 1.007 94 | ±0.000 14 | 0.000 081 |
| 氧(O) | 15.999 4 | ±0.000 37 | 0.000 21  |
| 氮(N) | 14.006 7 | ±0.000 42 | 0.000 24  |
| 硫(S) | 32.065   | ±0.008 5  | 0.004 9   |

由表4可知,碳、氢、氧、氮、硫5种元素的标准不确定度分别为0.000 58、0.000 081、0.000 21、0.000 24、0.004 9,根据此结果可得到氨基酸分子的摩尔质量的不确定度,结果见表5。

| 名称        | 摩尔质量  | 分子式   | 标准不确定度<br>$u(M)$ | 相对不确定度<br>$u_{\text{rel}}(M)$ |
|-----------|-------|---|------------------|-------------------------------|
| 天冬氨酸(Asp) | 133.1 | C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>                               | 0.002 543        | 0.000 019 11                  |
| 苏氨酸(Thr)  | 119.1 | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>                               | 0.002 524        | 0.000 021 19                  |
| 丝氨酸(Ser)  | 105.1 | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                               | 0.001 950        | 0.000 018 55                  |
| 谷氨酸(Glu)  | 147.1 | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>                               | 0.003 115        | 0.000 021 18                  |
| 甘氨酸(Gly)  | 75.07 | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>                               | 0.001 320        | 0.000 017 58                  |
| 丙氨酸(Ala)  | 89.06 | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>                               | 0.001 893        | 0.000 021 26                  |
| 胱氨酸(Cys)  | 240.3 | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> | 0.010 490        | 0.000 043 65                  |
| 缬氨酸(Val)  | 117.2 | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                              | 0.003 072        | 0.000 026 21                  |
| 蛋氨酸(Met)  | 149.2 | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S                            | 0.005 783        | 0.000 038 76                  |
| 异亮氨酸(Ile) | 131.2 | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                              | 0.003 668        | 0.000 027 96                  |
| 亮氨酸(Leu)  | 131.2 | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                              | 0.003 668        | 0.000 027 96                  |
| 酪氨酸(Tyr)  | 181.2 | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                              | 0.005 338        | 0.000 029 46                  |
| 苯丙氨酸(Phe) | 165.2 | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                              | 0.005 318        | 0.000 032 19                  |
| 组氨酸(His)  | 155.2 | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>                 | 0.003 652        | 0.000 023 53                  |
| 赖氨酸(Lys)  | 146.2 | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | 0.003 715        | 0.000 025 41                  |
| 精氨酸(Arg)  | 174.2 | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                | 0.003 807        | 0.000 021 85                  |
| 脯氨酸(Pro)  | 115.1 | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                               | 0.003 029        | 0.000 026 32                  |

#### 2.1.7 酱油重复性测量的不确定度

重复条件下对酱油进行6次平行试验,测量结果见表6。

| 氨基酸名称     | 测量次数  |       |       |       |       |       | $\bar{X}/(\text{g}\cdot100\ \text{g}^{-1})$ |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
|           | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |   |
| 天冬氨酸(Asp) | 0.499 | 0.452 | 0.481 | 0.466 | 0.427 | 0.419 | 0.457                                       |
| 苏氨酸(Thr)  | 0.245 | 0.221 | 0.209 | 0.238 | 0.221 | 0.256 | 0.232                                       |
| 丝氨酸(Ser)  | 0.358 | 0.369 | 0.302 | 0.317 | 0.346 | 0.352 | 0.341                                       |
| 谷氨酸(Glu)  | 4.552 | 4.081 | 4.239 | 4.247 | 4.305 | 4.519 | 4.324                                       |
| 甘氨酸(Gly)  | 0.193 | 0.206 | 0.184 | 0.157 | 0.218 | 0.169 | 0.188                                       |
| 丙氨酸(Ala)  | 0.311 | 0.327 | 0.296 | 0.255 | 0.352 | 0.323 | 0.311                                       |
| 胱氨酸(Cys)  | ND*   | ND*   | ND*   | ND*   | ND*   | ND*   | ND*   |
| 缬氨酸(Val)  | 0.312 | 0.345 | 0.298 | 0.337 | 0.325 | 0.385 | 0.334                                       |
| 蛋氨酸(Met)  | 0.097 | 0.105 | 0.112 | 0.125 | 0.123 | 0.103 | 0.111                                       |
| 异亮氨酸(Ile) | 0.264 | 0.302 | 0.287 | 0.315 | 0.291 | 0.320 | 0.297                                       |
| 亮氨酸(Leu)  | 0.406 | 0.382 | 0.396 | 0.413 | 0.434 | 0.402 | 0.406                                       |
| 酪氨酸(Tyr)  | 0.239 | 0.214 | 0.248 | 0.207 | 0.207 | 0.218 | 0.222                                       |
| 苯丙氨酸(Phe) | 0.371 | 0.389 | 0.357 | 0.366 | 0.328 | 0.355 | 0.361                                       |
| 组氨酸(His)  | 0.105 | 0.113 | 0.134 | 0.102 | 0.114 | 0.122 | 0.115                                       |
| 赖氨酸(Lys)  | 0.206 | 0.196 | 0.222 | 0.201 | 0.217 | 0.232 | 0.212                                       |
| 精氨酸(Arg)  | 0.067 | 0.078 | 0.054 | 0.062 | 0.089 | 0.057 | 0.068                                       |
| 脯氨酸(Pro)  | 0.296 | 0.285 | 0.267 | 0.255 | 0.271 | 0.266 | 0.273                                       |

注:“ND\*”表示未检出。

本实验中的酱油未检测出胱氨酸,故在后续不对胱氨酸进行不确定度分析。

将重复性测定的平均值 $\bar{X}$ ,标准偏差 $S_{\text{Rep}}$ 结果分别代入公式, $u(\text{Rep})=\frac{S_{\text{Rep}}}{\sqrt{2}}$ , $u_{\text{rel}}(\text{Rep})=\frac{u(\text{Rep})}{\bar{X}}$ ,重复性测量的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{Rep})$ 如表7所示。

表7 重复性测量的不确定度  
Table 7 Uncertainty of repeatability measurements

| 氨基酸名称     | 标准偏差<br>$S_{Rep} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$ | 重复性测量的<br>标准不确定度<br>$u(Rep) = \frac{S_{Rep}}{\sqrt{2}}$ | 重复性测量的<br>相对标准不确定度<br>$u_{rel}(Rep) = \frac{u(Rep)}{\bar{X}}$ | 氨基酸名称     | 标准偏差<br>$S_{Rep} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$ | 重复性测量的<br>标准不确定度<br>$u(Rep) = \frac{S_{Rep}}{\sqrt{2}}$ | 重复性测量的<br>相对标准不确定度<br>$u_{rel}(Rep) = \frac{u(Rep)}{\bar{X}}$ |
|-----------|---|---|---|-----------|---|---|---|
| 天冬氨酸(Asp) | 0.030 95  | 0.021 89  | 0.047 86  | 异亮氨酸(Ile) | 0.020 50  | 0.014 50  | 0.048 90  |
| 苏氨酸(Thr)  | 0.017 61  | 0.012 45  | 0.053 76  | 亮氨酸(Leu)  | 0.017 46  | 0.012 35  | 0.030 45  |
| 丝氨酸(Ser)  | 0.025 75  | 0.018 21  | 0.053 46  | 酪氨酸(Tyr)  | 0.017 29  | 0.012 23  | 0.055 04  |
| 谷氨酸(Glu)  | 0.180 30  | 0.127 50  | 0.029 49  | 苯丙氨酸(Phe) | 0.020 25  | 0.014 32  | 0.039 67  |
| 甘氨酸(Gly)  | 0.022 75  | 0.016 09  | 0.085 66  | 组氨酸(His)  | 0.011 70  | 0.008 274   | 0.071 95  |
| 丙氨酸(Ala)  | 0.032 99  | 0.023 33  | 0.075 10  | 赖氨酸(Lys)  | 0.013 69  | 0.009 682   | 0.045 60  |
| 缬氨酸(Val)  | 0.030 30  | 0.021 43  | 0.064 22  | 精氨酸(Arg)  | 0.013 38  | 0.009 463   | 0.139 20  |
| 蛋氨酸(Met)  | 0.011 29  | 0.007 984   | 0.072 04  | 脯氨酸(Pro)  | 0.014 73  | 0.010 42  | 0.038 11  |

2.2 合成不确定度与扩展不确定度

由 $u_{rel}(C) = \sqrt{u_{rel}(m)^2 + u_{rel}(std)^2 + u_{rel}(V_{50})^2 + u_{rel}(V_{dil})^2 + u_{rel}(A)^2 + u_{rel}(M)^2 + u_{rel}(Rep)^2}$  计算得出合成不确定度, 如表8所示。

表8 全自动氨基酸分析仪测定酱油中游离氨基酸不确定度的合成不确定度  
Table 8 Synthetic uncertainties of free amino acid uncertainty in soy sauce determined by automatic amino acid analyzer

| 氨基酸名称     | $u_{rel}(m)$ | $u_{rel}(std)$ | $u_{rel}(V_{50})$ | $u_{rel}(V_{dil})$ | $u_{rel}(A)$ | $u_{rel}(M)$ | $u_{rel}(Rep)$ | $u_{rel}(C)$ |
|-----------|--------------|----------------|-------------------|--------------------|--------------|--------------|----------------|--------------|
| 天冬氨酸(Asp) | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 019 11 | 0.047 86       | 0.076 88     |
| 苏氨酸(Thr)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 021 19 | 0.053 76       | 0.080 68     |
| 丝氨酸(Ser)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 018 55 | 0.053 46       | 0.080 50     |
| 谷氨酸(Glu)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 021 18 | 0.029 49       | 0.067 01     |
| 甘氨酸(Gly)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 017 58 | 0.085 66       | 0.104 90     |
| 丙氨酸(Ala)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 021 26 | 0.075 10       | 0.096 23     |
| 缬氨酸(Val)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 026 21 | 0.064 22       | 0.087 98     |
| 蛋氨酸(Met)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 038 76 | 0.072 04       | 0.093 86     |
| 异亮氨酸(Ile) | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 027 96 | 0.048 90       | 0.077 52     |
| 亮氨酸(Leu)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 027 96 | 0.030 45       | 0.067 45     |
| 酪氨酸(Tyr)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 029 46 | 0.055 04       | 0.081 55     |
| 苯丙氨酸(Phe) | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 032 19 | 0.039 67       | 0.072 04     |
| 组氨酸(His)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 023 53 | 0.071 95       | 0.093 81     |
| 赖氨酸(Lys)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 025 41 | 0.045 60       | 0.075 50     |
| 精氨酸(Arg)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 021 85 | 0.139 20       | 0.151 70     |
| 脯氨酸(Pro)  | 0.000 014 43 | 0.000 115 5    | 0.000 410 6       | 0.004 330          | 0.06         | 0.000 026 32 | 0.038 11       | 0.071 20     |

由表8可知, 仪器本身的相对标准不确定度(0.06)和酱油重复性测量的相对不确定度(0.029 49~0.139 5)对于合成不确定度的贡献较大, 酱油稀释过程带入的相对不确定度0.004 330, 贡献一般, 称量、氨基酸标准溶液、定容、摩

尔质量引入的相对不确定度在 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ , 贡献相对较小。  
酱油中游离氨基酸的标准不确定度为 $u_{rel}(C) \times \bar{X}$ , 在95%置信概率下, 取包含因子 $k=2$ , 扩展不确定度为 $u \times k$ , 如表9所示。

表9 酱油中游离氨基酸的标准不确定度和扩展不确定度  
Table 9 Standard and extended uncertainties of free amino acids in soy sauce

| 氨基酸名称     | 含量/<br>$\bar{X}(\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1})$ | 标准不确定度<br>$u_{rel}(C) \times \bar{X}$<br>( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) | 扩展不确定度<br>$u \times k$ /<br>( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) | 测量不确定度<br>$X/(\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1})$ | 氨基酸名称     | 含量/<br>$\bar{X}(\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1})$ | 标准不确定度<br>$u_{rel}(C) \times \bar{X}$<br>( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) | 扩展不确定度<br>$u \times k$ /<br>( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) | 测量不确定度<br>$X/(\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1})$ |
|-----------|---|--|---|---|-----------|---|--|---|---|
| 天冬氨酸(Asp) | 0.457   | 0.035 1  | 0.07  | 0.457±0.07 (k=2)                                  | 异亮氨酸(Ile) | 0.297   | 0.023 0  | 0.05  | 0.297±0.05 (k=2)                                  |
| 苏氨酸(Thr)  | 0.232   | 0.018 7  | 0.04  | 0.232±0.04 (k=2)                                  | 亮氨酸(Leu)  | 0.406   | 0.027 4  | 0.05  | 0.406±0.05 (k=2)                                  |
| 丝氨酸(Ser)  | 0.341   | 0.027 5  | 0.05  | 0.341±0.05 (k=2)                                  | 酪氨酸(Tyr)  | 0.222   | 0.018 1  | 0.04  | 0.222±0.04 (k=2)                                  |
| 谷氨酸(Glu)  | 4.324   | 0.289 8  | 0.60  | 4.324±0.60 (k=2)                                  | 苯丙氨酸(Phe) | 0.361   | 0.026 0  | 0.05  | 0.361±0.05 (k=2)                                  |
| 甘氨酸(Gly)  | 0.188   | 0.019 7  | 0.04  | 0.188±0.04 (k=2)                                  | 组氨酸(His)  | 0.115   | 0.010 8  | 0.02  | 0.115±0.02 (k=2)                                  |
| 丙氨酸(Ala)  | 0.311   | 0.029 9  | 0.06  | 0.311±0.06 (k=2)                                  | 赖氨酸(Lys)  | 0.212   | 0.016 0  | 0.03  | 0.212±0.03 (k=2)                                  |
| 缬氨酸(Val)  | 0.334   | 0.029 4  | 0.06  | 0.334±0.06 (k=2)                                  | 精氨酸(Arg)  | 0.068   | 0.010 3  | 0.02  | 0.068±0.02 (k=2)                                  |
| 蛋氨酸(Met)  | 0.111   | 0.010 4  | 0.02  | 0.111±0.02 (k=2)                                  | 脯氨酸(Pro)  | 0.273   | 0.019 5  | 0.04  | 0.273±0.04 (k=2)                                  |

由表9可知,在包含因子 $k=2$ 时,酱油中游离氨基酸的扩展不确定度范围为 $0.02\text{ g}/100\text{ g}\sim 0.6\text{ g}/100\text{ g}$ 。

### 3 结论

本研究对采用全自动氨基酸分析仪测定酱油中游离氨基酸的检测结果进行了评价,评估了实验过程中产生的不确定度组成,发现不确定度的主要来源为仪器本身的不确定度和酱油重复性测量的不确定度,其次是酱油稀释过程带入的不确定度,称量、氨基酸标准溶液、定容、摩尔质量引入的不确定度均较小。结果表明,在实验过程中,应保证仪器良好的工作状态,保证其较高的灵敏度,定期对仪器进行维护和保养,从而达到良好的重复性,这样结果的测量不确定度就可以减少,结果的准确性更高。

### 参考文献:

- [1] 乔明艳,李全斌.对生物化学中氨基酸分类有关问题的讨论[J].卫生职业教育,2006,24(23):153-154.
- [2] WANG S, TAMURA T, KYOUNO N, et al. Effect of volatile compounds on the quality of Japanese fermented soy sauce[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2019, 111: 594-601.
- [3] WANG X J, GUO M Y, SONG H L, et al. Characterization of key aroma compounds in traditional Chinese soy sauce through the molecular sensory science technique[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 128: 109413.
- [4] ZHAO G Z, DING L L, HADIATULLAH H, et al. Characterization of the typical fragrant compounds in traditional Chinese-type soy sauce [J]. *Food Chem*, 2020, 312: 126054.
- [5] 葛冬梅,宗雯雯,朱笑梅,等.酱油中游离氨基酸成分分析[J].中国酿造,2008,27(13):75-77.
- [6] 魏明,徐传杰,韩松,等.红外光谱测试酱油中氨基酸的研究[J].电子技术与软件工程,2018(15):67.
- [7] 张华芳,曹树茵.酱油中丝氨酸含量分析方法研究[J].化学工程与装备,2018(9):290-293.
- [8] 吕爽,姜廷福,王远红,等.毛细管电泳间接紫外法分离分析海藻和酱油中游离氨基酸方法研究[J].中国海洋药物,2019,38(1):11-16.
- [9] 王明.基于衍生化与电位传感的氨基酸检测方法[D].大连:大连理工大学,2018.
- [10] 墨淑敏,梁立娜,蔡亚岐,等.高效阴离子交换色谱—电化学法测定酱油中的氨基酸[J].分析试验室,2006(5):34-39.
- [11] SONG W D, SU Z, HUI X D, et al. Simultaneous determination of twenty amino acids and six carbohydrates in soy sauce by ion chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(9): 89-97.
- [12] 冯志强,周芳梅,黄永连,等.全自动氨基酸分析仪鉴别不同种类酱油中氨基酸的分析研究[J].中国食品添加剂,2013(5):198-205.
- [13] 苏媛媛,郭慧.甜油和酱油中氨基酸和还原糖含量的比较研究[J].中国酿造,2019,38(11):125-128.
- [14] 梁寒峭,陈建国,刘伟,等.酿造酱油中特征氨基酸含量检测及对氨基酸态氮贡献的分析[J].食品与发酵工业,2018,44(4):198-203.
- [15] 钟小廷,李可,吕杰,等.13种市售原酿本味酱油品质分析[J].食品工业科技,2021,42(12):287-293.
- [16] 陈丽梅,尚艳芬,赵孟彬,等.柱前衍生化-超高效液相色谱法快速测定酱油中的18种氨基酸[J].色谱,2010,28(12):1154-1157.
- [17] DUAN W, HUANG Y, XIAO J F, et al. Determination of free amino acids, organic acids and nucleotides in 29 elegant spices[J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(7): 3777-3792.
- [18] REIS G C L, GUIDI L R, FERNANDES C, et al. UPLC-UV method for the quantification of free amino acids, bioactive amines and ammonia in fresh, cooked and canned mushrooms[J]. *Food Anal Method*, 2020, 13: 1613-1626.
- [19] 赵国忠,姚云平,曹小红,等.2种米曲霉发酵酱油风味物质比较[J].食品科学,2014,35(24):249-253.
- [20] 赫欣睿,武中庸,叶永丽,等.高效液相色谱法测定氨基酸的研究进展[J].分析测试学报,2016,35(7):922-928.
- [21] MUDIAM M K R, RATNASEKHAR C, JAIN R, et al. Rapid and simultaneous determination of twenty amino acids in complex biological and food samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry with the aid of experimental design after ethyl chloroformate derivatization[J]. *J Chromatogr B*, 2012, 907(20): 56-64.
- [22] 陈媛,吴惠勤,杭义萍,等.高效液相色谱串联质谱法测定酱油中水解氨基酸[J].中国酿造,2012,31(11):155-158.
- [23] 冯云子,黄梓堃,赵谋明.基于UPLC-Q-TOF-MS技术对高盐稀态酱油发酵过程中代谢产物变化的研究[J].食品科学,2020,42(20):107-113.
- [24] 王海美,李锋成,肖本游.探讨基于衍生化与电位传感的氨基酸检测方法[J].化工管理,2019(34):120-121.
- [25] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS—GL 006—2019化学分析中不确定度的评估指南[S].北京:中国计量出版社,2019.
- [26] 国家质量监督检验检疫总局. JJF 1059.1—2012测量不确定度评定与表示[S].北京:中国计量出版社,2012.
- [27] 李巧琪,许志彬,黄伟乾,等.柱后衍生阳离子交换色谱法测定酱油中38种游离氨基酸含量[J].中国调味品,2021,46(4):165-168.
- [28] 国家质量监督检验检疫总局. JJG 196—2006 常用玻璃量器检定规程[S].北京:中国计量出版社,2006.
- [29] WIESER M E, COPLIN T B. Atomic weights of the elements 2009 (IUPAC Technical Report)[J]. *Pure Appl Chem*, 2011, 83(2): 359-396.