

HPLC测定茶叶中茶氨酸含量的不确定度评定

谢颖颖^{1,2}, 李含春^{1,2}, 姚自强^{1,2}

(1. 国家茶叶产品质量检验检测中心, 四川 雅安 625000; 2. 四川省雅安市产品质量检验检测中心, 四川 雅安 625000;)

摘要:按照 GB/T 23193-2017 的规定, 用高效液相色谱法对蒙顶甘露茶叶中茶氨酸含量进行检测, 对茶氨酸含量的不确定度进行分析和评定, 建立数学模型, 分析样品的不确定度来源, 推导出计算方法和步骤, 建立了该试验方法的评定方式, 找出不确定度的主要分量, 以便在检测工作中予以改进。通过评定得出分析仪器带来的不确定度最大, 标准曲线拟合和加标回收率带来的不确定度次之, 故在测定时应加以控制。

关键词: 不确定度; HPLC; 茶叶; 茶氨酸含量

中图分类号: TS272 文献标志码: A

Uncertainty Evaluation of the Measurement of Theanine Content in Tea by HPLC

XIE Yingying^{1,2}, LI Hanchun^{1,2}, YAO Ziqiang^{1,2}

(1. National Tea Product Quality Inspection and Testing Center, Sichuan Ya'an 625000, China;

2. Ya'an Product Quality Inspection and Testing Center in Sichuan Province, Sichuan Ya'an 625000, China)

Abstract: According to the provisions of GB/T 23193-2017, theanine content of Mengding Ganlu tea were measured by high performance liquid chromatography in the current study, and a mathematical model had been established to analyze and evaluate the uncertainty evaluation of theanine content. To improve the future measurement work, by analyzing the source of the uncertainty of the sample and deducing the calculation method and steps, the evaluation method of the measurement was established, and the main component of the uncertainty was found. The evaluation results found that the uncertainty caused by the analytical instrument was the largest, followed by the standard curve fitting and the recovery rate of standard addition, which indicates that these main factors should be controlled during the measurement.

Key Words: uncertainty; HPLC; tea; theanine content

茶氨酸(L-Theanine)1950年首次从绿茶中分离得到,是茶叶中特有的游离氨基酸,也是茶叶呈味物质之一,有甜味,是茶叶中生津润甜的主要成份。它与绿茶品质呈强正相关,相关系数达0.787~0.876。茶氨酸是茶叶中含量最高的氨基酸,约占游离氨基酸总量的50%以上,占茶叶干质量的1%~2%。茶氨酸含量因茶的品种、部位不同而不同,其含量随发酵过程而减少。

测量不确定度意味着对测量结果可信性、有效性的怀疑程度,是定量说明测量结果的质量的一个参数。有关测量茶叶中茶氨酸含量的不确定度评

定,尚未见文献报道。因此,本文以四川省雅安市蒙顶甘露茶叶为检测对象,依据JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》和《化学分析中不确定度的评估指南》对HPLC测定茶叶中茶氨酸含量的不确定度进行了评定。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甘露茶叶产自四川省雅安市蒙顶山。电子天平,赛多利斯BT125D,出厂编号22591458;恒温水浴锅,常州澳华仪器有限公司,WR-1,出厂编号0912871;液相色谱仪,美国Thermo公司Ulti Mate 3000,出厂编号8096349;二极管阵列检测器,美国Thermo公司Ulti Mate DAD-3000,出厂编号8096400;L-茶氨酸,纯度99.6%,坛墨质检-标准物质中心检测;CAS为3081-61-6;乙腈为色谱纯。

收稿日期:2022-04-25

基金项目:《蒙顶甘露茶》,中华人民共和国供销合作行业标准(2014GH-1-015)。

作者简介:谢颖颖(1982-),女,硕士,副高级工程师,主要从事茶叶与食品检测方面的研究,E-mail:xzzjxyy@163.com。

1.2 试验方法

样品试液制备按 GB/T 23193—2017 中 6.1.4 的规定:称取 1 g(准确至 0.01 g)磨碎试样于 200 mL 烧杯中,加沸蒸馏水 100 mL,在 100 °C 恒温水浴锅中浸提 30 min,过滤,转移至 100 mL 容量瓶中,冷却后,用水定容至刻度,混匀待用。用 0.45 μm 的水相微孔滤膜过滤到自动进样瓶中,然后进行液相色谱分析。色谱分析以峰面积-浓度作图,绘制标准曲线和回归方程,利用得到的回归方程,通过测定样品的峰面积求出样品的浓度。样品溶液中被测物的响应值均应在仪器测定的线性范围之内。

1.3 色谱条件

色谱柱:DIKMA 公司 C₁₈ 色谱柱,5 μm,4.6 mm×250 mm;流动相:100% 纯水(A),100% 乙腈(B),梯度洗脱。流速:1.0 mL/min;柱温:40 °C;进样量:10 μL;检测波长:210 nm。环境温湿度:温度 25 °C,湿度 65%。

1.4 建立数学模型

$$X=(C \times V \times 1\ 000)/(m \times w \times 1\ 000)。$$

式中:

X——样品茶氨酸含量(g/kg);

C——样品浓度,根据测得的峰面积从标准曲线上查得的茶氨酸浓度(mg/mL);

V——试液总量(mL),本试验中为 100 mL;

m——试样质量(g);

w——样品的干物质含量(%)。

2 不确定度来源分析

由于采用的方法是国标法,且是在指定的范围内使用,参考笔者已发表的文章^[1](与本文同一基金项目),从试验过程和数学模型分析,不确定度主要来源于:①标准溶液配制及测定引起的相对不确定度,其中包括定容标准储备液、标准工作溶液配制、标准曲线拟合等引入的不确定度;②样品制备后定容体积、称样质量、重复测量、干物质含量所引入的相对不确定度;③加标回收率引入的相对不确定度;④分析仪器的相对不确定度。每一来源又受不同因素的影响。

3 不确定度的计算

3.1 标准溶液配制及测定引入的相对不确定度

3.1.1 配制标准储备液引入的相对不确定度 $urel(S1)$

称取 L-茶氨酸 0.05 g(精确到 0.000 1 g),用水溶解后转移定容至 50 mL 容量瓶中,摇匀。该标准

储备液 1 mL 含有 1 mg 的茶氨酸。

1) 标准品由坛墨质检-标准物质中心提供,不确定度值为 0.5%,由公式 $K=\sqrt{3}$,得标准品纯度引入的相对标准不确定度 $urel(b_1)=0.5\%/\sqrt{3}=2.9 \times 10^{-3}$ 。

2) 电子天平(0.1 mg)检定证书中,当称量在 0~50 g 时,偏载误差 0.0 mg,重复性 0.1 mg,示值误差 0.0 mg,可得 $u=\sqrt{0.1^2}=0.1$ mg,由公式 $K=\sqrt{3}$,得天平校准引入的相对标准不确定度 $urel(b_2)=0.1/\sqrt{3}/0.05/100=1.15 \times 10^{-3}$ 。

3) 定容使用 50 mL 容量瓶,主要包含体积校准和水溶液温度变化两个不确定度因素。

50 mL A 级容量瓶最大允差为 ±0.05 mL,由公式 $K=\sqrt{3}$,得体积校准引入的标准不确定度 $u_1=0.05$ mL/ $\sqrt{3}=0.0289$ mL。

配制标准储备液时,实验室室温 25 °C,偏离度 5 °C,水的体积膨胀系数为 2.08×10^{-4} °C⁻¹,由公式 $K=\sqrt{3}$,得水溶液温度变化引入的标准不确定度 $u_2=5 \times 2.08 \times 10^{-4} \times 50/\sqrt{3}=0.030$ mL。

所以定容引起的相对标准不确定度 $urel(b_3)=\sqrt{u_1^2 + u_2^2}/50=\sqrt{0.0289^2 + 0.030^2}/50=8.33 \times 10^{-4}$ 。

综合 3.1.1 所述,配制标准储备液产生的相对标准不确定度 $urel(S1)=\sqrt{urel(b_1)^2 + urel(b_2)^2 + urel(b_3)^2}=\sqrt{(2.9 \times 10^{-3})^2 + (1.15 \times 10^{-3})^2 + (8.33 \times 10^{-4})^2}=3.23 \times 10^{-3}$ 。

3.1.2 配制标准工作溶液引入的相对不确定度 $urel(S2)$

移取 0.0 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.5 mL, 1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL 标准储备液,分别加水定容至 10 mL,摇匀,制成标准工作溶液。

配制标准工作溶液过程中,使用到 1 mL 移液管 A 级和 10 mL 容量瓶 A 级,其各自的相对标准不确定度计算原理与 3.1.1(3) 相同。

1) 1 mL 移液管 A 级允差值为 ±0.008 mL,体积校准、水溶液温度变化所引入的标准不确定度分别为 0.004 62, 0.000 6(计算过程略),合成相对标准不确定度 $urel(n_1)=\sqrt{0.004\ 62^2 + 0.000\ 6^2}/1=4.66 \times 10^{-3}$ 。

2) 10 mL 容量瓶 A 级最大允差为 ±0.02 mL,体积校准、水溶液温度变化所引入的标准不确定度分别为 0.011 5, 0.006 0(计算过程略),合成相对标准不确定度 $urel(n_2)=\sqrt{0.011\ 5^2 + 0.006\ 0^2}/10=1.30 \times 10^{-3}$ 。

所以配制标准工作溶液产生的相对标

准不确定度 $urel(S2) = \sqrt{urel(n1)^2 + urel(n2)^2} = \sqrt{(4.66 \times 10^{-3})^2 + (1.30 \times 10^{-3})^2} = 4.84 \times 10^{-3}$ 。

3.1.3 标准曲线拟合引入的相对不确定度 $urel(D)$

用HPLC测定所配制的标准工作溶液的峰面积,每个浓度测定3次,3条标准曲线,6个浓度,共测定18次。根据最小二乘法和平均峰面积计算得出回归方程为: $y=53.483x+0.071$, 相关系数 $R^2=0.9998$ (表1)。

表1 标准曲线数据

浓度/(mg·mL ⁻¹)	峰面积回归计算值 (bx+a)	实测峰面积	平均峰面积	误差平方
0.01	0.606	0.528	0.559	60.84×10 ⁻⁴
0.01	0.606	0.580		6.76×10 ⁻⁴
0.01	0.606	0.569		13.69×10 ⁻⁴
0.02	1.141	1.095	1.123	21.16×10 ⁻⁴
0.02	1.141	1.156		2.25×10 ⁻⁴
0.02	1.141	1.117		5.76×10 ⁻⁴
0.05	2.745	2.740	2.785	0.25×10 ⁻⁴
0.05	2.745	2.823		60.84×10 ⁻⁴
0.05	2.745	2.791		21.16×10 ⁻⁴
0.10	5.419	5.408	5.451	1.21×10 ⁻⁴
0.10	5.419	5.507		77.44×10 ⁻⁴
0.10	5.419	5.437		3.24×10 ⁻⁴
0.15	8.093	8.117	8.152	5.76×10 ⁻⁴
0.15	8.093	8.224		171.61×10 ⁻⁴
0.15	8.093	8.115		4.84×10 ⁻⁴
0.20	10.768	10.728	10.702	16×10 ⁻⁴
0.20	10.768	10.905		187.69×10 ⁻⁴
0.20	10.768	10.473		870.25×10 ⁻⁴

注:误差平方为 $[y - (bx + a)]^2$ 。

得出标准溶液浓度的平均值 $\bar{x}=0.088$ mg/mL, $\sum_{j=1}^n [y_j - (bx_j + a)]^2 = 1.531 \times 10^{-1}$, 计算标准曲线拟合

引起的相对不确定度 $urel(D)$ 。

$$urel(D) = \frac{s}{xb} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x}' - \bar{x})^2}{s_{xx}}} = 8.30 \times 10^{-3}$$

$$其中 S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [y_j - (bx_j + a)]^2}{n - 2}} = 9.78 \times 10^{-2}$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2 = 8.61 \times 10^{-2}$$

n: 标准溶液的测试次数, $n=6 \times 3=18$;

p: 样品的测试次数, $p=10$;

\bar{x} : 标准溶液浓度的平均值, $\bar{x}=0.088$ mg/mL;

\bar{x}' : 样品浓度的平均值, $\bar{x}'=0.06912$ mg/mL(表2);

b: 工作曲线的斜率, $b=53.483$;

j: 下标, 标准溶液的测试次数。

3.2 样品处理及测定所引入的相对不确定度

3.2.1 样品定容体积引入的相对不确定度 $urel(P)$

样品经前处理后的上清液用100 mL的A级容量瓶进行定容,用0.45 μm的水相微孔滤膜过滤到自动进样瓶中,然后进样测量。

定容100 mL容量瓶包含体积校准、水溶液温度变化2个不确定度分量来源。计算原理同3.1.1。100 mL容量瓶A级最大允差为±0.10 mL, 则其体积校准、水溶液温度变化引入的标准不确定度分别为0.0577, 0.060(计算过程略), 所以, 样品处理过程中定容体积的相对不确定度 $urel(P) = \sqrt{0.0577^2 + 0.060^2}/100 = 8.32 \times 10^{-4}$ 。

3.2.2 样品称量引入的相对不确定度 $urel(F)$

计算原理同3.1.1。样品称样量为1.0933 g(表2), 则天平称质量的相对标准不确定度 $urel(F) = 0.1/\sqrt{3}/1.0933/100 = 5.28 \times 10^{-5}$ 。

3.2.3 样品重复性测量引入的相对不确定度 $urel(G)$

以第1条标准曲线为工作曲线,实际测定样品溶液10次,茶叶中茶氨酸含量平行测试的结果(g/kg)见表2。

表2 样品数据

测量次数	峰面积	浓度 (mg·mL ⁻¹)	平均浓度 (\bar{x})(mg·mL ⁻¹)	干物质含量/%	称样量 /g	平均称样量 /g	茶氨酸含量 /(g·kg ⁻¹)	茶氨酸平均含量/(g·kg ⁻¹)	茶氨酸含量误差平方
1	3.679	0.0680	0.06912	94.564	1.0943	1.0933	6.5712	6.6795	1.17×10 ⁻²
2	3.756	0.0695					6.7162		1.35×10 ⁻³
3	3.756	0.0695					6.7162		1.35×10 ⁻³
4	3.799	0.0703					6.7935		1.3×10 ⁻²
5	3.787	0.0700					6.7645		7.23×10 ⁻³
6	3.738	0.0691			1.0923		6.6775		3.88×10 ⁻⁶
7	3.688	0.0682					6.5906		7.91×10 ⁻³
8	3.711	0.0686					6.6292		2.53×10 ⁻³
9	3.729	0.0690					6.6679		1.35×10 ⁻⁴
10	3.732	0.0690					6.6679		1.35×10 ⁻⁴

样品茶氨酸含量标准偏差根据A类贝塞尔公式为:

$$S_{x_i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2} = \sqrt{\frac{0.045348}{9}} = 7.1 \times 10^{-2}$$

10⁻²,重复性测量的标准不确定度为:

$$u_{(\bar{x})} = S_{(\bar{x})} = \frac{S_{(x_i)}}{\sqrt{n}} = 7.1 \times 10^{-2} / \sqrt{10} = 2.24 \times 10^{-2}$$

得 $urel(G) = \frac{S_{(\bar{x})}}{\bar{x}} = 2.24 \times 10^{-2} / 6.6795 = 3.36 \times 10^{-3}$.

3.3 样品干物质含量测定引入的相对不确定度 urel(N)

包含样品干物质重复性测量的相对不确定度 urel(e)和干物质称量引入的相对不确定度 urel(t),同时包含恒质量问题。

表3 干物质含量数据

空称量皿恒质量/g	样品质量/g	干燥后称量皿和样品恒质量/g	干物质含量/%
35.239 0	2.102 2	37.226 7	94.553
36.391 2	2.246 9	38.516 2	94.575

3.3.1 样品干物质重复性测量引入的相对不确定度 urel(e)

根据GB 5009.3-2016的要求,样品干物质独立测量2次,则测量重复性的试验标准偏差为:

$$Se = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2} =$$

$$\sqrt{(94.553 - 94.564)^2 + (94.575 - 94.564)^2} / 1 =$$

0.015 556 %,重复性的不确定度 $u(r) = Sr / \sqrt{2} = 0.015 556 \% / \sqrt{2} = 0.011 \%$,

样品干物质平均含量为94.564 %,则重复性的相对不确定度 $urel(r) = 0.011 \% / 94.564 \% = 1.16 \times 10^{-4}$ 。

3.3.2 干物质称量引入的相对不确定度 urel(t)

天平称量产生的标准不确定度计算原理同3.1.1,则标准不确定度 $u(a) = 0.1 \text{ mg} / \sqrt{3} / 1000 = 5.77 \times 10^{-5} \text{ g}$ 。

根据GB 5009.3-2016的要求,将称量皿置于101~105℃干燥箱中加热1 h后,置干燥器内冷却0.5 h,称量,并重复干燥至前后2次质量差不超过2 mg,即为恒质量。这就是说,质量的最大允许差值为2 mg,按B类矩形(均匀)分布计算,有恒质量的标准不确定度 $u(z) = 2 \text{ mg} / 1000 / \sqrt{3} = 1.15 \times 10^{-3} \text{ g}$ 。

干物质测定中包含3次称质量,分别是干燥前称量皿恒重称质量,样品称质量,干燥后称量皿与样品恒质量称量。

1)干燥前称量皿恒质量涉及了天平称量和恒质量,故 $u(a_1) = \sqrt{u(a)^2 + u(z)^2} = \sqrt{(5.77 \times 10^{-5})^2 + (1.15 \times 10^{-3})^2} = 1.151 \times 10^{-3} \text{ g}$ 。

称量皿平均质量为35.815 1 g, $urel(a_1) = 1.151 \times 10^{-3} \text{ g} / 35.815 1 \text{ g} = 3.21 \times 10^{-5}$ 。

2)样品称量只与天平称量有关,故 $u(a_2) = u(a) = 5.77 \times 10^{-5} \text{ g}$ 。

样品干物质平均称样量为2.174 55 g,得天平称量的相对标准不确定度 $urel(a_2) = 5.77 \times 10^{-5} \text{ g} / 2.174 55 \text{ g} = 2.65 \times 10^{-5}$ 。

3)干燥后称量皿与样品恒质量,包含了天平称量和恒质量,得 $u(a_3) = u(a_1) = 1.151 \times 10^{-3} \text{ g}$ 。

干燥后称量皿与样品平均质量为37.871 47g, $urel(a_3) = 1.151 \times 10^{-3} \text{ g} / 37.871 47 \text{ g} = 3.04 \times 10^{-5}$ 。

干物质称量产生的相对标准不确定度 $urel(t) = \sqrt{urel(a_1)^2 + urel(a_2)^2 + urel(a_3)^2} = \sqrt{(3.21 \times 10^{-5})^2 + (2.65 \times 10^{-5})^2 + (3.04 \times 10^{-5})^2} = 5.15 \times 10^{-5}$ 。

综合3.3.1和3.3.2所述,样品干物质含量测定引起的相对不确定度 $urel(N) = \sqrt{urel(e)^2 + urel(t)^2} = \sqrt{(1.16 \times 10^{-4})^2 + (5.15 \times 10^{-5})^2} = 1.27 \times 10^{-4}$ 。

3.4 加标回收率测量引入的相对不确定度 urel(R)

对样品进行6份加标样平行测定,计算测定结果回收率,结果见表4。

表4 加标回收率平行测定

测定次数	峰面积	浓度 (mg·mL ⁻¹)	回收率/%	平均回收率/%
1	6.395	0.1186	99.0	100.5
2	6.448	0.1196	101.0	
3	6.379	0.1183	98.4	
4	6.448	0.1196	101.0	
5	6.502	0.1206	103.0	
6	6.432	0.1193	100.4	

回收率标准偏差根据A类贝塞尔公式有:

$$S_{x_i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2} = \sqrt{\frac{2.684}{5}} = 1.638 \%$$

加标回收率测量的标准不确定度为:

$$u_{(\bar{x})} = S_{(\bar{x})} = \frac{S_{(x_i)}}{\sqrt{n}} = 1.638 \% / \sqrt{6} = 0.6687 \%$$

回收率经t判断: $t = \frac{|1 - \bar{x}|}{u_{(\bar{x})}} = \frac{|1 - 100.5\%|}{0.6687\%}$

$0.7477 < t(0.05, 5) = 2.571$,

差异无统计学意义,回收率是有效的,则有:

$$\text{urel}(R) = \frac{S(\bar{x})}{\bar{x}} = (0.6687\%) / (100.5\%) = 6.65 \times 10^{-3}$$

3.5 分析仪器的相对不确定度 $\text{urel}(K)$

仪器检定证书上提供的定量重复性误差为

$\text{Urel} = 3\%, k = 2$, 得 $\text{urel}(K) = 3\% / \sqrt{3} = 1.73 \times 10^{-2}$ 。

4 合成相对不确定度

根据表5,合成相对不确定度。

表5 不确定度总览

来源	符号	影响因素	评定类别	计算公式	数值
标准储备液	$\text{urel}(S1)$	标准品纯度	B类矩形(均匀)分布	$a/\sqrt{3}$	3.23×10^{-3}
		天平校准			
		定容体积			
标准工作溶液	$\text{urel}(S2)$	移液管体积	B类矩形(均匀)分布	$a/\sqrt{3}$	4.84×10^{-3}
		容量瓶体积			
		比色管体积			
标准曲线拟合	$\text{urel}(D)$	拟合曲线计算吸光度	A类贝塞尔公式法	$\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$	8.30×10^{-3}
样品定容体积	$\text{urel}(P)$	容量瓶体积	B类矩形(均匀)分布	$a/\sqrt{3}$	8.32×10^{-4}
		移液管体积			
		比色管体积			
样品称量	$\text{urel}(F)$	天平校准	B类矩形(均匀)分布	$a/\sqrt{3}$	5.28×10^{-5}
样品重复性测量	$\text{urel}(G)$	含量	A类贝塞尔公式法	$\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$	3.36×10^{-3}
样品干物质含量	$\text{urel}(N)$	重复性测量	A类贝塞尔公式法	$\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$	1.27×10^{-4}
		天平校准	B类矩形(均匀)分布	$a/\sqrt{3}$	
加标回收率	$\text{urel}(R)$	回收测量	A类贝塞尔公式法	$\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$	6.65×10^{-3}
分析仪器	$\text{urel}(K)$	透射比	B类正态分布	$a/2$	1.73×10^{-2}

合成相对不确定度的计算如下:

$$\text{urel} = \sqrt{\text{urel}(S1)^2 + \text{urel}(S2)^2 + \text{urel}(D)^2 + \text{urel}(P)^2 + \text{urel}(F)^2 + \text{urel}(G)^2 + \text{urel}(N)^2 + \text{urel}(R)^2 + \text{urel}(K)^2} = 2.14 \times 10^{-2}$$

5 相对扩展不确定度

取置信概率 $p = 95\%$, 且取扩展因子 $k = 2$, 则相对扩展不确定度为 $\text{Urel} = 2.14 \times 10^{-2} \times 2 = 4.28 \times 10^{-2}$ 。

6 结论

本文对 GB/T 23193—2017 茶叶中茶氨酸的测定过程做了详细的测量,并对不确定度进行了评估,发现液相色谱分析仪器带来的不确定度最大,标准曲线拟合和加标回收率(即方法准确度)带来

的不确定度次之,这些都会对茶叶中茶氨酸含量的测定产生影响,故在测定时应对其重点控制。为尽量减少对结果的影响,可以使用优质的 C18 柱和规范的标准物质,确保有效的回收率;标液配制环节注意提高操作规范性,选择精度高的容量器皿。这对提高检测结果的准确性有重要的参考意义。

本次试验所测的茶氨酸含量修约后为 6.68 g/kg , 相对扩展不确定度 $\text{Urel} = 4.28 \times 10^{-2}, k = 2, p = 95\%$ 。

参考文献:

[1] 谢颖颖. 茶叶中游离氨基酸总量的测量不确定度评定[J]. 四川林业科技, 2019, 40(3): 109-114.