

凯氏定氮法测定固体饮料中蛋白质含量的不确定度评定

戴飞, 吴贝贝, 关敬媛, 张浩杰 (宁波御坊堂生物科技有限公司, 浙江宁波 315012)

摘要 [目的] 对凯氏定氮法测定固体饮料中蛋白质含量的不确定度进行评定。[方法] 根据 JJF 1059.1—2012 标准中要求, 建立了凯氏定氮法测定固体饮料中蛋白质含量的测量不确定度的数学模型, 分析了凯氏定氮法中不确定度的主要来源, 对已识别来源的不确定度分量进行分析评价。[结果] 固体饮料中蛋白质含量为 11.60%, 扩展不确定度为 0.46% (95%, $k=2$)。测量结果的不确定度主要来源于测定样品实际消耗硫酸标准溶液的体积与测量重复性, 标准溶液的影响次之, 样品质量、取样体积与定容的体积带来的影响可忽略不计。[结论] 系统介绍了蛋白质测量不确定度的评定过程, 提高了检测数据的可靠性和一致性。

关键词 凯氏定氮法; 蛋白质; 固体饮料; 不确定度

中图分类号 TS 278 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)07-0076-03

Evaluation of Uncertainty in Determination of Protein Content by Kjeldahl Method in Solid Beverage

DAI Fei, WU Bei-bei, GUAN Jing-yuan et al (Ningbo Yufangtang Biological Technology Co., Ltd., Ningbo, Zhejiang 315012)

Abstract [Objective] The uncertainty in determination of protein content by Kjeldahl method in solid beverage was evaluated. [Method] According to the requirements of JJF 1059.1—2012 standard, a mathematical model for uncertainty in determination of protein content by Kjeldahl method in solid beverage was established, various sources of uncertainty were analyzed, the uncertainty components of identified sources are analyzed and evaluated. [Result] The concentration of protein was 11.60% and the expanded uncertainty was 0.46% (95%, $k=2$). The uncertainties of measurement result were mainly from volume determination of the actual consumption of sulfuric acid solution and measurement repeatability, the influence of standard solution on the second, the sample quality, the influence brought by sample volume and volume of constant volume was negligible. [Conclusion] The evaluation process of protein measurement uncertainty is introduced systematically, and the reliability and consistency of the data are improved.

Key words Kjeldahl determination; Protein; Solid beverage; Uncertainty

测量结果都不可避免地会有不确定度, 不确定度可以给出测量结果的可信程度, 是对测量结果质量的定量评定^[1]。不确定度评估可以作为产品质量评价的一个重要指标, 也可以反映数据可信的程度。检测结果一般是用数值来表示, 而检测数值的可信程度则一般用它的不确定度来表示, 数值只有包含了可置信的范围, 检测的最终结果才有意义。不确定度的大小, 表述了测量结果与被测量真值的接近程度, 不确定度越小, 离真值更近, 则测量结果质量越高; 不确定度越大, 离真值越远, 则测量结果的使用价值就越低。因此, 在给出测量结果时, 应相应给出它的测量不确定度, 使人们可以更直观地评定其可靠性, 使检测结果更有意义。

宁波御坊堂生物科技有限公司生产的固体饮料是指以乳或乳制品、蛋或蛋制品、白砂糖、果汁或植物提取物等为主要原料, 添加适量的辅料或食品添加剂制成的固体制剂, 以动物蛋白(胶原蛋白)、植物蛋白(大豆分离蛋白、花生蛋白)为主适量加入各种功能肽和调味剂制成的蛋白型固体饮料。常规固体饮料分为蛋白型固体饮料、普通型固体饮料和焙烤型固体饮料三大类。蛋白质作为固体饮料中的品质指标, 备受人们的重视, 并且宁波御坊堂生物科技有限公司生产的蛋白型固体饮料其蛋白质含量远高于市面上流通的普通蛋白型固体饮料, 国家标准中蛋白质型固体饮料中对蛋白质的要求仅大于 4.0%, 而该公司生产的固体饮料对蛋白质的要求大于 10.0%, 大大高于国家标准要求, 因此蛋白质是一个重要的检测指标, 更应该引起人们的重视。目前, 测定蛋白质采用 GB 5009.5—2010《食品安全国家标准 食品中蛋白质的

测定》^[2] 第一法(仲裁法)凯氏定氮法, 此法作为蛋白质检测的经典方法, 操作方便简单, 重复性和重现性较好, 被广泛应用于各类食品等样品的蛋白质含量测定中。关于各类食品中蛋白质的不确定度评定已有不少报道^[3-14], 而有关固体饮料中蛋白质的不确定度评估尚少见报道, 因此笔者以固体饮料为研究对象, 结合 GB 5009.5—2010 检测方法和实际操作, 建立凯氏定氮法的数学模型, 分析测量结果的不确定度来源并进行定量分析, 以此提高数据的可靠性, 提升实验室的专业技术水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料及主要试剂。 固体饮料, 宁波御坊堂生物科技有限公司生产。硫酸标准溶液: 购于国家标准物质中心, 证书编号为 BWB2010—2016, 浓度值 0.100 0 mol/L; 硫酸钾 (AR)、硫酸铜 (AR)、氢氧化钠 (AR)、硼酸 (AR)。

1.1.2 主要仪器。 凯氏定氮装置; 电子分析天平, 梅特勒-托利多国际股份有限公司; A 级 25 mL 滴定管; A 级 10 mL 移液管; A 级 100 mL 容量瓶。

1.2 样品处理 称取固体饮料 2 g, 精确至 0.000 1 g, 移入干燥的 500 mL 定氮瓶中, 加入 0.2 g 硫酸铜、6.0 g 硫酸钾及 20 mL 浓硫酸, 将瓶斜支于石棉网上。用电炉小心加热, 待内容物全部炭化与泡沫完全停止后, 增大火力, 并保持瓶内液体沸腾, 至液体颜色为蓝绿色并透明澄清后, 再加热 0.5 ~ 1.0 h。取下放冷, 小心加入 20 mL 试验用水。冷却后, 移入容量瓶, 并用少量试验用水洗 500 mL 定氮瓶, 洗液并入容量瓶, 加试验用水至刻度, 混匀后备用。吸取 10 mL 试样处理液加入到凯氏定氮装置进行蒸馏。蒸馏后用硼酸吸收液吸收, 用 0.100 0 mol/L 浓度的硫酸标准溶液进行滴定。空白

管加相同的试剂做试剂空白试验。

1.3 数学模型 蛋白质含量计算公式如下:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.014 \times C \times 100 \times F}{m \times V_3 / 100}$$

式中, X 为固体饮料中蛋白质含量(%); V_1 为消耗硫酸标准溶液的体积(mL); V_2 为空白消耗硫酸标准溶液的体积(mL); C 为硫酸标准滴定溶液的体积(mL); F 为氮(N)换算为蛋白质的系数,把固体饮料列为一般食物,换算系数为 6.25; m 为样品质量(g); V_3 为吸取消化液的体积(mL),该试验为 10 mL。

2 结果与分析

2.1 不确定度分量主要来源的定量分析

由于采用 GB 5009.5—2010 国家强制性标准规定的方法,因此忽略实验室温度、湿度等环境条件的影响。产生不确定度的主要因素有以下几点:由硫酸标准溶液引入的不确定度 u_1 ;由测定样品消耗硫酸标准溶液的体积($V_1 - V_2$)引入的不确定度 u_2 ;由定容的体积引入的不确定度 u_3 ;由样品质量引入的不确定度 u_4 ;由测量重复性引入的不确定度 u_5 ;由取样体积 V_3 引入的不确定度 u_6 。

2.1.1 由硫酸标准溶液引入的不确定度 u_1 。

硫酸标准溶液的不确定度,浓度为 0.100 0 mol/L,证书上给出的扩展不确定度为 0.1%,因此考虑正态分布, $k = \sqrt{3}$,则 0.100 0 mol/L 浓度的硫酸标准溶液的相对不确定度为 $u_1 = \frac{0.001}{0.1 \times \sqrt{3}} = 0.005 77$ 。

2.1.2 由测定样品实际消耗硫酸标准溶液的体积($V_1 - V_2$)引入的不确定度 u_2 。

测定样品实际消耗硫酸标准溶液的滴定体积来自滴定管本身带人的不确定度、滴定管使用和校准温度差带人的不确定度、滴定管读数引入的不确定度。由于实验室温度为 20 ℃,与校正的温度相差无几,因此滴定管使用和校准温度差带人的不确定度可忽略不计。

2.1.2.1 由滴定管本身引入的不确定度 u_{V_1} 。

滴定采用 25 mL 的 A 级酸式滴定管,消耗 0.100 0 mol/L 浓度硫酸标准溶液 2.65 mL 左右,按检定证书给出的最大容量的允许误差为 ± 0.04 mL,矩形分布考虑, $k = \sqrt{3}$,则滴定管校准引入的标准不确定度为 $\frac{0.04}{\sqrt{3}} = 0.023 0$ (mL),则相对不确定度为

$$u_{V_1} = \frac{0.023 0}{2.65} = 0.008 68。$$

2.1.2.2 滴定管读数引入的不确定度 u_{V_2} 。

25 mL 的 A 级滴定管最小刻度为 0.1 mL,估读最大误差为 ± 0.05 mL,矩形分布考虑,计算不确定度为 $\frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.028 9$ (mL),则相对不确定度为 $u_{V_2} = \frac{0.028 9}{2.65} = 0.010 9$ 。

则由测定样品实际消耗硫酸标准溶液的滴定体积引入的相对标准不确定度为 $u_2 = \sqrt{u_{V_1}^2 + u_{V_2}^2} = 0.013 9$ 。

2.1.3 由定容的体积引入的不确定度 u_3 。

样品消化提取

后,洗入并定容到 100 mL 容量瓶,此 100 mL 容量瓶的标准不确定度来源包括:①100 mL 容量瓶的校准。经计量检定,100 mL A 级容量瓶最大允差为 ± 0.1 mL,按照 B 类不确定度评定,则用均匀分布换算成 100 mL 容量瓶的标准不确定度为 $u_{3-1}(V_{100}) = \frac{0.1}{\sqrt{3}} = 0.058$ (mL)。②100 mL 容量瓶的重复性。用 100 mL A 级容量瓶重复进行 20 次定容和称量,测定结果的标准偏差为 0.080 mL,按照 A 类不确定度评定,则充满液体至 100 mL 容量瓶刻度的准确性引入的标准不确定度为 $u_{3-2}(V_{100}) = 0.080$ (mL)。③温度。由于实验室温度为 20 ℃,与校正温度相差不大,因此 100 mL 容量瓶使用和校准温差引入的不确定度可忽略不计。

合成以上 2 项得出: $u(V_{100}) = \sqrt{u_{3-1}(V_{100})^2 + u_{3-2}(V_{100})^2} = 0.098 8$ mL,则样品定容的相对不确定度为 $u_3 = \frac{u(V_{100})}{V_{100}} = \frac{0.098 8}{100.0} = 0.000 988$ 。

2.1.4 由样品质量引入的不确定度 u_4 。

所用电子天平的最大允差 $\pm 0.000 1$ g,按 B 类不确定度评定,可认为其服从均匀分布,标准不确定度为 $u(m) = \frac{0.000 1}{\sqrt{3}} = 0.000 058$ (g)。

样品的称取质量为 2.000 0 g,则样品质量(2.000 0 g)引入的相对标准不确定度为 $u_4 = \frac{u(m)}{m} = \frac{0.000 058}{2.000 0} = 0.000 029$ 。

2.1.5 由测量重复性引入的不确定度 u_5 。

8 次重复测定的试验结果,覆盖试验的全过程,即始于取样、消化、蒸馏、滴定,直至计算结果。结果见表 1。

表 1 固体饮料中蛋白质含量 8 次重复测定试验结果

Table 1 Determination of protein content in solid beverage by repeated 8 times

编号 No.	滴定体积 Titration volume mL	测定结果 Determination results %
1	2.80	12.25
2	2.65	11.59
3	2.72	11.90
4	2.55	11.15
5	2.70	11.81
6	2.50	10.94
7	2.60	11.38
8	2.70	11.81
平均值 Mean	2.65	11.60

按 A 类不确定度考虑,蛋白质含量的标准差为 $S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.429$,则测量重复性 A 类不确定度为 $u_s = \frac{0.429}{\sqrt{8}} = 0.152$ (mL),测量重复性 A 类相对不确定度为 $u_5 = \frac{0.152}{11.60} = 0.013 1$ 。

2.1.6 由取样体积 V_3 引入的不确定度 u_6 。

该试验使用 10 mL A 级移液管移取样品稀释液 10 mL,10 mL A 级移液管

的标准不确定度来源如下:①移液管体积引入的不确定度, 10 mL A 级移液管 20 °C 时容量允许偏差为 ± 0.05 mL, 按照矩形分布估算, 其标准偏差为 $0.05/10 \times \sqrt{3} = 0.003$ mL。②充满液体至 10 mL 刻度的变动性, 重复 4 次的测定结果为 0.02 mL。③移液管和溶液温度与校正时温度差引起的体积不确定度, 假设温度偏差为 2.0 °C, 水的体积膨胀系数则为 $2.1 \times 10^{-4}/^{\circ}\text{C}$; 则 95% 置信概率 ($k=2$) 时体积变化的区间为 0.004 2 mL ($10 \times 2 \times 2.1 \times 10^{-4}$), 转换成标准偏差为 0.002 1 mL。将以上 3 项合成得出: $u_{V_0} = \sqrt{(0.003)^2 + (0.02)^2 + (0.0021)^2} = 0.0230$ mL, 相对标准

$$\text{不确定度 } u_6 = \frac{0.0203}{10} = 0.00203。$$

2.2 相对合成标准不确定度 由以上可知, 该公司生产的固体饮料中蛋白质含量的合成相对标准不确定度如下: 样品中蛋白质的标准不确定度分析即为测得固体饮料中蛋白质含量为 8.66%, 则样品中蛋白质含量的标准不确定度为

$$U_{rel}(C) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_4^2 + u_5^2 + u_6^2} = 0.0201 \text{ mL}。$$

则固体饮料中蛋白质含量的相对合成标准不确定度为: $u_c(X) = 0.0169X = 0.0169 \times 11.60 = 0.23\%$ 。

各不确定度分量及其合成不确定度的贡献率列于表 2。

表 2 不确定度分量及各贡献率

Table 2 Uncertainty components and contribution rate

不确定分量名称 Uncertain component name	含量值 Content value	相对标准不确定度 Relative standard uncertainty	贡献率 Contribution rate // %
标准溶液 Standard solution	0.100 0 mol/L	0.005 77	16.10
测定样品实际消耗硫酸标准溶液的体积 Determination of the actual consumption of sulfuric acid solution	2.65 mL	0.013 9	38.80
定容的体积 Volume of constant volume	100 mL	0.000 988	2.76
样品质量 Sample quality	2.000 0 g	0.000 029	0.081
测量重复性 Measurement repeatability	11.60%	0.013 1	36.60
取样体积 Sampling volume	10 mL	0.002 03	5.67

2.3 扩展不确定度的评定 取包含因子 $k=2$ (95% 的置信概率), 则 $U(X) = 2u_c(X) = 0.23 \times 2 \times 10 = 0.46\%$ 。测量结果可表示为 $X = (11.60 \pm 0.46)\%$, $k=2$ 。

3 结论

由不确定度评定定量分析结果可知, 固体饮料中蛋白质含量为 11.60%, 扩展不确定度为 0.46%, 因此蛋白质含量为 $(11.60 \pm 0.40)\%$, 符合宁波御坊堂生物科技有限公司制定的企业标准要求 ($\geq 10.00\%$)。测量结果的不确定度主要来源于测定样品实际消耗硫酸标准溶液的体积与测量重复性, 标准溶液的影响次之, 样品质量、取样体积与定容的体积带来的影响较小, 可忽略不计。因此在以后的实际检测工作中应控制影响测量不确定度的主要因素, 滴定要准确, 同时增加重复次数, 以提高检测数据的准确性。

参考文献

- [1] 国家质量技术监督局. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1—2012 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2013.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2010 [S/OL]. (2010-06-01) [2016-10-12]. <http://www.doc88.com/p-612721064825.html>.

- [3] 陈永元, 乐琼. 乳制品中非蛋白氮含量测定的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 829-833.
- [4] 解联合, 汪琦, 刘敏红, 等. 食品中亚硝酸盐含量的测量不确定度评定[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(6): 511-513.
- [5] 林荆, 林永辉, 陈竞秀. 凯氏定氮法测定大豆粉中蛋白质的不确定度评定[J]. 福建分析测试, 2015, 24(6): 27-29.
- [6] 郝晓莉, 赵瑛博, 陈芳芳. 分光光度法测定白菜中亚硝酸盐的不确定度评定[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 208-210.
- [7] 王红梅, 雷萍, 王少鸥, 等. 凯氏定氮法测定灵芝破壁孢子粉中粗蛋白质含量的不确定度评定[J]. 食用菌学报, 2012(2): 73-76.
- [8] 姬勇, 陈霞, 罗力力. 全自动定氮仪测定大米中蛋白质含量的测量不确定度分析[J]. 农产品加工(学刊), 2011(1): 78-79, 103.
- [9] 霍艳敏, 王艳丽, 王骏, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿乳粉中烟酰胺的不确定度评定[J]. 食品科学, 2011(16): 330-333.
- [10] 王燕. 大豆水溶性蛋白含量测定的不确定度评定[J]. 粮食与食品工业, 2011, 18(5): 50-53.
- [11] 高云宏. 乳粉中蛋白质含量测定的不确定度分析[J]. 中国乳业, 2011(11): 44-45.
- [12] 陈雄, 戴璇. 奶粉中蛋白质的不确定度评定[J]. 食品安全导刊, 2016(9): 78-79.
- [13] 邓晓鸿, 强敏, 朱新生, 等. 食品中致病微生物检测结果的不确定度评定[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(11): 160-165.
- [14] 杨桂菊. 气相色谱法测定食品中苯甲酸的不确定度评定[J]. 中国酿造, 2004(2): 34-36.

科技论文写作规范——题名

以最恰当、最简明的词句反映论文、报告中的最重要的特定内容, 题名应避免使用不常见的缩略语、首字母缩写词、字符、代号和公式等。一般字数不超过 20 字。英文与中文应相吻合。英文题名首字母大写, 连词及冠词除外。