

## 全自动凯氏定氮仪测定蛋白饮料中蛋白质的不确定度分析

唐静, 罗玥, 黄萍, 蒋丽娜 (四川省食品药品检验检测院, 四川成都 610100)

**摘要** [目的]减少试验过程中带来的误差,确保蛋白质含量的数据准确性。[方法]采用 GB 5009.5—2016 第一法,凯氏定氮法测定蛋白饮料中蛋白质含量,其测量不确定度来源于样品称量、消化、蒸馏及滴定等过程。通过对各个不确定度分量的计算合成,找出影响测量不确定度的因素,并对各个不确定度分量进行评估,最终分析出样品核桃花生奶中蛋白质的标准不确定度及扩展不确定度,并描述影响核桃花生奶蛋白质测定结果各分量对其不确定度的相对贡献。[结果]最终通过合成和扩展得出了核桃花生奶中蛋白质含量测定的扩展不确定度为 $(1.30 \pm 0.03)\%$ 。[结论]不确定度主要由全自动凯氏定氮仪的仪器滴定体积的不确定度引入,说明仪器的先进性能能够有效减少试验过程中的误差。

**关键词** 全自动凯氏定氮仪;不确定度分量;蛋白饮料;蛋白质

**中图分类号** TS201.2<sup>+4</sup> **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)07-0152-03

## Uncertainty Analysis on Determination of Protein in Protein Drinks with Kjeltac 8400 Protein Analyzer

TANG Jing, LUO Yue, HUANG Ping et al (The Food and Drug Testing Institute of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610100)

**Abstract** [Objective] To reduce the errors caused by the experiment and ensure the accuracy of the protein content. [Method] Protein content in protein drinks was determined by Kjeldahl method, the first method of GB 5009.5-2016, the measurement uncertainty was tracked from such experimental processes as sample weighing, digestion, distillation and titration etc. . By calculation and synthesis of each component uncertainty, it figured out the factors affected the measurement uncertainty, and evaluated the uncertainty of each component, analyzed the standard uncertainty and expanded uncertainty of protein in protein drinks samples, and described the relative contributions which affected various components results of protein in walnut and peanut milk on its uncertainty. [Result] The results were combined and expanded, thus the expanded uncertainty of measurement result of the protein in walnut and peanut milk was  $(1.30 \pm 0.03)\%$ . [Conclusion] The uncertainty is mainly introduced by the uncertainty of the instrument titration volume of the automatic apparatus, indicating that the advanced nature of the instrument can greatly reduce the error in the experiment.

**Abstract** Protein analyzer; Uncertainty components; Protein drinks; Protein

蛋白质含量是食品营养成分的重要指标之一,其检测质量直接影响对产品品质的评价。对测定结果不确定度的评定已成为通过中国实验室国家认可委员会的必要条件之一。蛋白饮料是目前消费者喜爱的饮料,有些消费者甚至想通过饮用蛋白饮料来补充蛋白质,因此,对于蛋白饮料中蛋白质含量的不确定度分析是很有必要的,它有助于消费者对蛋白饮料的正确认识以及选购。有关蛋白质测定不确定度评定的研究报道较多<sup>[1-2]</sup>,目前也有一些用自动定氮仪测定蛋白质的不确定度评定的报道<sup>[3-5]</sup>,但是用全自动凯氏定氮仪测定蛋白饮料中蛋白质的不确定度分析鲜有报道。该研究依据 JJF1059—1999《测量不确定度评价与表示》<sup>[6]</sup>建立了以核桃花生奶为试验对象的不确定度评定方法,识别出测定过程中的关键环节,重点关注关键环节的质量控制,以期有效地提高检测工作的质量,为消费者提供可靠的营养指标参数。

## 1 材料与方

## 1.1 材料与仪器

**1.1.1 样品。**试验对象为核桃花生奶,为国家抽检样品。

**1.1.2 试剂。**浓硫酸、硫酸钾、硫酸铜、硼酸、氢氧化钠、甲基红、溴甲酚绿、95%乙醇,均为分析纯。盐酸标准溶液(0.1 mol/L),根据 GB/T 601—2016《化学试剂标准滴定溶液的制备》<sup>[7]</sup>配制、标定而成。

**1.1.3 仪器。**8400型全自动凯氏定氮仪、消化炉均为丹麦 FOSS 公司所生产;电子分析天平;滴定管 50 mL, A 级。

**作者简介** 唐静(1987—),女,四川岳池人,工程师,硕士,从事食品理化分析研究。

**收稿日期** 2017-12-18

## 1.2 方法

**1.2.1 方法原理。**检测方法参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》<sup>[8]</sup>。核桃花生奶与硫酸和催化剂一同加热消化,使蛋白质分解的氮与硫酸结合成硫酸铵。然后加碱蒸馏使氮游离,用硼酸吸收后,再以盐酸标准溶液滴定,根据盐酸消耗量计算蛋白质含量。

**1.2.2 试样处理。**称取 10~20 g 试样,至于消化管中,加催化剂和 16 mL 浓硫酸,于 8400 型全自动凯氏定氮仪的消化炉中集中加热,采取梯度缓慢升温的方式。消化完全后,取下消化管,冷却至室温,按照仪器说明书进行蒸馏测定。根据所消耗的盐酸标准溶液的体积,求出蛋白质含量。

**1.2.3 建立数学模型。**蛋白质含量计算公式如下:

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times C \times 0.0140}{m} \times F \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $X$  为试样中蛋白质含量(%);  $V_1$  为试样消耗盐酸标准溶液的体积(mL);  $V_0$  为空白消耗盐酸标准溶液的体积(mL);  $C$  为盐酸标准溶液浓度(mol/L);  $m$  为试样质量(g); 0.0140 为每毫摩尔质量氮的克数;  $F$  为氮换算成蛋白质的系数,此处蛋白饮料为 6.25。

由于各分量相互独立,得出  $X$  的相对合成标准不确定传播率为

$$u_r(X) = \sqrt{u_r^2(V_1 - V_0) + u_r^2(C) + u_r^2(m) + u_r^2(\text{rep})} \quad (2)$$

式中,  $u_r(\text{rep})$  为平行重复试验的相对扩展标准不确定度。

## 2 结果与分析

## 2.1 测定不确定度的来源及计算

**2.1.1 检测过程重复性的不确定度。**表 1 为测定花生核桃

乳中蛋白质的 8 次平行试验结果,测定覆盖该方法的全过程,即称量、消化、自动蒸馏和滴定。

表 1 蛋白质测定结果

Table 1 The determination result of the protein

序号 Code	$m//g$	$V_1 - V_0//mL$	$C//mol/L$	$X//%$
1	10.645 0	14.825 7	0.104 9	1.279
2	10.907 0	15.213 8	0.104 9	1.281
3	10.684 0	15.253 1	0.104 9	1.311
4	13.102 0	18.776 7	0.104 9	1.316
5	10.901 0	15.678 7	0.104 9	1.321
6	10.208 0	14.521 2	0.104 9	1.307
7	10.412 0	14.955 9	0.104 9	1.319
8	10.356 8	14.642 5	0.104 9	1.299
平均值 Mean	10.902 0	15.483 4	0.104 9	1.300

$$u_{rep} = S(X_i)/\sqrt{n} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^8 (X_i - \bar{X})^2}{8 \times (8-1)}} = 0.005 83\%$$

$$u_r(\text{rep}) = 0.004 49$$

**2.1.2** 全自动凯氏定氮仪自动滴定引入的不确定度。根据全自动凯氏定氮仪检定证书提供,仪器扩展不确定度  $U_{\text{仪器}} = 1.4\%$ ,  $k=2$ ,  $u_r(\text{仪器}) = u_{\text{仪器}}/kc = 0.005 38$ 。

**2.1.3** 样品称量所用的电子天平示值引入的不确定度。经查天平校准证书,称量样品的电子天平最大允许误差为  $\pm 0.5$  mg,重复性误差为 1.5 mg,四角误差为  $\pm 1.0$  mg,按正态分布考虑,  $k=3$ ,称样量的平均值为 10.902 0 g,则合成标准不确定度为  $u(m) = 0.726 5$  mg,  $u_r(m) = u(m)/m = 0.000 066 6$ 。

**2.1.4** 数值修约引入的不确定度。标准方法规定蛋白质计算结果保留 3 位有效数字,该花生核桃乳中蛋白质含量为 1.300%,因此,该方法数值修约间隔为 0.01%,按均匀分布考虑,则由此引入的不确定度为  $u_{\text{修约}} = \delta_x/2\sqrt{3} = 0.002 88\%$ ,  $u_r(\text{修约}) = u_{\text{修约}}/x = 0.002 22$ 。

**2.1.5** 盐酸标准溶液浓度的不确定度。根据 GB/T 601—2016 进行盐酸标准溶液的配制及标定,其数学模型为

$$C_{\text{HCl}} = \frac{m_{\text{Na}_2\text{CO}_3} \times P_{\text{Na}_2\text{CO}_3} \times 1 000}{V_{\text{HCl}} \times M_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}$$

式中,  $C_{\text{HCl}}$  为盐酸标准溶液浓度 (mol/L);  $P_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$  为无水碳酸钠的纯度 (%);  $V_{\text{HCl}}$  为滴定消耗的盐酸体积 (mL);  $M_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$  为无水碳酸钠的摩尔质量 (g/mol)。

不确定度传播率为

$$u_r(X) = \sqrt{u_r^2(m_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) + u_r^2(P_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) + u_r^2(V_{\text{HCl}}) + u_r^2(M_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) + u_r^2(\text{rep})}$$

式中, rep 为平行重复标定的总重复性因子。

**2.1.5.1** 标定重复性引入的不确定度。表 2 为 8 次重复标定的结果,按 A 类评定。

$$u_{rep} = \frac{S(X_i)}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^8 (X_i - \bar{X})^2}{8 \times (8-1)}} = 0.000 042 0\%$$

$$u_r(\text{rep}) = 0.000 400$$

表 2 盐酸标定结果

Table 2 The result of the calibration of hydrochloric acid

序号 Code	$m$ g	$V_1 - V_0$ mL	$M(1/2\text{Na}_2\text{CO}_3)$ g/mol	$C$ mol/L
1	0.200 67	36.13	52.994	0.104 81
2	0.200 27	36.03		0.104 89
3	0.200 78	36.10		0.104 95
4	0.200 99	36.16		0.104 89
5	0.201 88	36.33		0.104 86
6	0.200 98	36.16		0.104 88
7	0.203 55	36.63		0.104 86
8	0.201 45	36.23		0.104 92
平均值 Mean	0.201 32	36.22		0.104 90

**2.1.5.2** 无水碳酸钠基准物质纯度引入的不确定度。供应商给出无水碳酸钠基准物质纯度  $P = 99.98\%$ , 不确定度优于 0.05%, 按 B 类评定正态分布, 不确定度为  $u(P_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) = 0.011 5\%$ ,  $u_r(P_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) = u(P_{\text{Na}_2\text{CO}_3})/P = 0.000 115$ 。

**2.1.5.3** 称量无水碳酸钠引入的不确定度  $u_r(m_{\text{Na}_2\text{CO}_3})$ 。经查电子天平的校准证书,该天平最大允许误差为  $\pm 0.5$  mg,重复性误差为 1.5 mg,四角误差为  $\pm 1.0$  mg,按正态分布考虑,  $k=3$ ,称样量的平均值为 0.201 32 g,则合成标准不确定度为  $u(m_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) = 0.623 6$  mg,  $u_r(m_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) = u(m_{\text{Na}_2\text{CO}_3})/m_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 0.003 10$ 。

**2.1.5.4** 无水碳酸钠摩尔质量  $M$  数值引入的不确定度。从最新的 IUPAC 原子量表,查得无水碳酸钠各组成元素的原子量及其不确定度见表 3。

表 3 无水碳酸钠各组成元素的原子量及其不确定度

Table 3 The atomic weight and uncertainty of each component of anhydrous sodium carbonate

组成元素 Element	原子量 Atomic weight g/mol	不确定度 Uncertainty	标准不确定度 Standard uncertainty g/mol
Na	22.989 8	$\pm 0.000 1$	0.000 060
C	12.010 7	$\pm 0.000 8$	0.000 460
O	15.999 4	$\pm 0.000 3$	0.000 170

$$u(M_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) = 0.000 670 \text{ mg}$$

$$M_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 105.988 5 \text{ g/mol}$$

$$u_r(M_{\text{Na}_2\text{CO}_3}) = u(M_{\text{Na}_2\text{CO}_3})/M_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 0.000 006 30$$

**2.1.5.5** 滴定基准物质消耗盐酸标准溶液体积引入的不确定度。

(1) 50 mL A 级滴定管。校准证书给出的校准误差为 0.05 mL,按三角形分布考虑,  $k = \sqrt{6}$ , 则  $u_r(V_{\text{HCl}}) = 0.020 4$  mL。

(2) 滴定管使用温度与校正温度不同引起的不确定度。设温度变化  $\pm 5$  °C,膨胀系数  $a = 2.1 \times 10^{-4}/\text{°C}$ , 滴定体积的平均值为 36.22 mL,按矩形分布考虑,  $k = \sqrt{3}$ , 则  $u_2(V_{\text{HCl}}) = 0.022 0$  mL。

(3) 2 种分量合成。  $u(V_{\text{HCl}}) = 0.030 0$  mL,  $u_r(V_{\text{HCl}}) = 0.000 828$  mL。

2.1.5.6 盐酸标准溶液浓度合成标准不确定度。 $u_r(C_{\text{HCl}}) = 0.003\ 24$ 。

2.2 合成不确定度分量的计算及分析 由上述可得到计算蛋白质含量不确定度的有关量值。

根据公式(2)得到  $X$  的相对合成标准不确定度为  $u_r(X) = 0.008\ 03$ ,  $u(X) = 0.010\ 4\%$ 。

对各影响蛋白质含量的测定因素的分量进行分析,从表4可以看出,仪器自动滴定的体积对测定结果影响最大,占分量总和的34.94%,是影响测定结果不确定度来源的主要分量。其次是重复性试验、盐酸标准溶液的浓度以及数字修约的影响,样品称量所引入的不确定度是最弱小的,可以忽略不计。

表4 合成标准不确定度分量的分析

Table 4 Analysis of combined standard uncertainty components

参数 Parameter	$u_r$	各分量占总和的百分比 The percentage of each component as a sum//%
$X$	0.004 49	29.16
仪器滴定体积 Instrument titration volume	0.005 38	34.94
$m$	0.000 066 6	0.43
数字修约 Data rounding	0.002 22	14.42
$C$	0.003 24	21.04
分量总和 Total of component	0.015 4	—

2.3 扩展不确定度 取包含因子  $k = 2$  (置信概率95%),则  $U = 2 \times u(X) = 0.020\ 8\%$ , 蛋白质含量为  $(1.30 \pm 0.03)\%$ 。

### 3 结论与讨论

(1)影响样品测定结果的不确定度分量很多,此次采用

全自动凯氏定氮仪测定核桃花生奶中蛋白质含量,其测量不确定度主要来源于仪器自动滴定体积的不确定度,其次是检测过程重复性试验的不确定度,即随机效应导致的不确定度、盐酸标准溶液浓度的不确定度以及数字修约引入的不确定度。因此,仪器的先进性成为减小合成不确定度的主要因素。

(2)从检测过程重复性的不确定度即随机效应导致的不确定度部分可以看出:重复性产生的不确定度主要来源于样品的称量、消化及自动蒸馏、滴定全过程的重复性试验,综合上述的各分量所占比重,得出为减少重复性检测所产生的不确定度,需要特别注意样品消化、自动蒸馏、滴定的过程。

(3)从盐酸标准溶液浓度的不确定度可以看出:主要来源于盐酸标定过程中滴定体积引入的不确定度,因此要特别注意在滴定过程中,准确判定终点,以减少因此产生的不确定度。

### 参考文献

- [1] 黄奕娜,侯晓东,张树潮,等.乳粉中蛋白质含量测定结果的不确定度评定[J].食品研究与开发,2008,29(10):98-100.
- [2] 姜诚,沙祎炜.婴幼儿奶粉中蛋白质测定的不确定度的评定[J].乳业科学与技术,2008(3):123-125.
- [3] 程树维,顾金玲,逢晶.自动凯氏定氮仪测定大豆中蛋白质含量的不确定度评定[J].食品科技,2007(5):231-233.
- [4] 潘葳,宋永康,黄星.自动凯氏定氮仪测定灵芝中蛋白质的不确定度评定[J].现代科学仪器,2009(2):92-95.
- [5] 徐志飞,李芳.凯氏定氮法测定蛋白粉中蛋白质含量的不确定度分析[J].中国卫生工程学,2015,14(4):361-362,365.
- [6] 国家质量技术监督局.测量不确定度评定与表示:JJF 1059—1999[S].北京:中国计量出版社,1999:7-10.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.化学试剂 标准滴定溶液的制备:GB/T 601—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理局.食品中蛋白质的测定:GB 5009.5—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.

(上接第87页)

- [7] 薛颖,白世卓,王晓龙.2株东北林蛙源蛙病毒 MCP 基因序列分析[J].经济动物学报,2011,15(4):187-189.
- [8] 盛慧英,吴小平,张奇亚.单克隆抗体技术在水生动物病毒研究中的应用[J].中国病毒学,2003,18(2):187-190.
- [9] 奕志娟.草鱼出血病细胞灭活疫苗的免疫效果评价[D].温州:温州医科大学,2015.
- [10] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. Am J Hyg, 1938, 27(3):493-497.
- [11] 王琳琳,杨娜,袁悦,等.人叶酸受体自身抗体 IgG 酶联免疫吸附试验

检测方法的建立及评价[J].北京大学学报(医学版),2014,46(3):483-487.

- [12] 黄立平,刘长明,危艳武,等.猪圆环病毒2型血清中和抗体阻断 ELISA 检测方法的建立及应用[J].中国兽医科学,2009,39(9):779-785.
- [13] 曾宪辉,曾令兵,周勇,等.大鲵虹彩病毒主衣壳蛋白 MCP 基因 DNA 疫苗的构建及其免疫效果[J].中国水产科学,2015,22(5):1055-1067.
- [14] 邵磊,何琴.鸡喷雾免疫技术要点[J].家禽科学,2015(7):20-21.

## 科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率),单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时),则可取各主要词首字母写成缩写,但需在第一次出现处写出全称,表及图中则用注解形式在下方注明,以便读者理解。