

Kjeletc 8400 凯氏定氮仪测定乳粉中蛋白质的 不确定度评定

杨波¹, 杨雪^{1,2*}, 王莹¹, 陈雪^{1,2}

(1. 吉林省食品检验所, 长春 130103; 2. 吉林省安信食品技术服务有限责任公司, 长春 130033)

摘要: **目的** 评定 Kjeletc 8400 凯氏定氮仪测定乳粉中蛋白质的不确定度。**方法** 采用 GB 5009.5-2016 第一法凯氏定氮法测定乳粉中蛋白质含量。对每个不确定度分量进行计算合成, 分析影响测量不确定度的因素, 同时对各不确定度分量进行评估, 计算乳粉中蛋白质的标准不确定度及扩展不确定度。**结果** 乳粉称量、消化、蒸馏及滴定等过程均为不确定度的来源, 乳粉中蛋白质含量测定的扩展不确定度为 $(19.3\pm 2.7)\%$, $k=2$ 。**结论** 不确定度主要由硫酸标准溶液浓度和全自动凯氏定氮仪的仪器滴定体积的不确定度引入。

关键词: Kjeltec 8400 凯氏定氮仪; 不确定度; 乳粉; 蛋白质

Uncertainty analysis on determination of protein in milk powder with Kjeltec 8400 protein analyzer

YANG Bo¹, YANG Xue^{1,2*}, WANG Ying¹, CHEN Xue^{1,2}

(1. Jilin Institute for Food Control, Changchun 130103, China; 2. Jilin Anxin Food Technology Services Limited Company, Changchun 130033, China)

ABSTRACT: Objective To determine the uncertainty of protein in milk powder with Kjeletc 8400 protein analyzer. **Methods** The protein content in milk powder was determined by the first method of GB 5009.5-2016. Each uncertainty component was calculated and synthesized, and the factors affecting the measurement uncertainty were analyzed. At the same time, each uncertainty component was evaluated to calculate the standard uncertainty and extended uncertainty of the protein in the milk powder. **Results** Milk powder weighing, digestion, distillation and titration were sources of uncertainty. The extended uncertainty of protein content determination in milk powder was $(19.3\pm 2.7)\%$, $k=2$. **Conclusion** The uncertainty is mainly introduced by the uncertainty of the concentration of the sulfuric acid standard solution and the instrumental titration volume of Kjeltec 8400 protein analyzer.

KEY WORDS: Kjeltec 8400 protein analyzer; uncertainty; milk powder; protein

1 引言

蛋白质是人体生命活动的物质基础^[1], 是人体所需的第一大营养素^[2], 其含量的在食品中的重要性不言而喻^[3]。随着人年龄的增长, 人体对蛋白质需求也会增加^[4]。蛋白质含量测定是评价食品质量的重要标志之一^[5]。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^[6]。测量不确定度, 简称不确定度 (uncertainty)^[7], 其定义为“变化、不可靠、不确定、未知”^[8], 是由测量误差的存在, 对被测量值的不确定程度的一个参数, 测量结果的可靠性在很大程度上取决于其不确定度的大小^[9,10]。本实验基于《测量不确定度评估与表示》^[9]和《化

*通讯作者: 杨雪, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 1063290273@qq.com

*Corresponding author: YANG Xue, Assistant Engineer, Jilin Institute for Food Control, Changchun 130103, China. E-mail: 1063290273@qq.com

学分析中不确定度的评估指南》^[10], 依据 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》^[11]中第一法凯氏定氮法的方法, 通过建立数学模型^[12-14], 对乳粉中的蛋白质含量检测的不确定度进行测定和分析。

本研究采用 Kjeletc 8400 凯氏定氮仪作为测定蛋白质的仪器, 评定其测定乳粉中蛋白质的不确定度, 以期更加有效地提高乳粉检测的质量, 为广大消费者提供更安全更可靠更真实的检测数据^[15]。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

乳粉为市售样品。

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(分析纯, 北京化学试剂公司)。

8400 型全自动凯氏定氮仪、DT 220 消化炉(丹麦 FOSS 公司); AUW120D EXP 电子分析天平(日本岛津公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

称取 0.5~1g 试样置于消化管中, 加入 6 g 硫酸钾、0.2 g 硫酸铜和 12 mL 浓硫酸, 在 8400 型全自动凯氏定氮仪中进行消化, 消化完全后, 冷却至室温。

2.2.2 测定方法

实验依据 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》^[11]第一法凯氏定氮法和 8400 型全自动凯氏定氮仪测定乳粉中的蛋白质含量。

2.2.3 标准溶液配制

硫酸标准溶液(0.1 mol/L): 根据 GB/T 601—2016《化学试剂标准滴定溶液的制备》^[14]配制、标定而成。

称取于 270~300 °C 高温炉中灼烧至恒量的工作基准试剂无水碳酸钠, 溶于 50mL 水中, 加 10 滴溴甲酚绿-甲基红指示液, 用配制的硫酸溶液滴定至溶液由绿色变为暗红色, 煮沸 2min, 加盖具钠石灰管的橡胶塞, 冷却, 继续滴定至溶液再呈暗红色, 同时做空白实验。溶液的标定计算方法为:

$$C = \frac{m \times 1000}{(V_1 - V_2) \times M}$$

式中: m ——无水碳酸钠质量, g;

V_1 ——盐酸溶液体积, mL;

V_2 ——空白实验消耗盐酸溶液体积, mL;

M ——无水碳酸钠的摩尔质量, g/mol, $M(1/2\text{Na}_2\text{CO}_3)=52.994$;

1000——换算系数。

2.2.4 数学模型

乳粉中蛋白质的计算公式为:

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

式中: X ——试样中蛋白质的含量, g/100g;

V_1 ——试液消耗盐酸标准滴定液的体积, mL;

V_0 ——试剂空白消耗盐酸标准溶液体积, mL;

C ——盐酸标准滴定溶液浓度, mol/L;

0.0140——1.0 mL 硫酸 $[c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4)=1.000 \text{ mol/L}]$ 或盐酸 $[c(\text{HCl})=1.000 \text{ mol/L}]$ 标准滴定溶液相当的氮的质量, g;

m ——试样的质量, g;

F ——氮换算为蛋白质的系数, 乳制品为 6.38;

100——换算系数。

3 结果与分析

3.1 不确定度分量的量化

3.1.1 测量结果的重复性

为获得重复性测量的不确定度, 取一个样品进行独立重复测量 6 次, 测量结果见表 1。

表 1 蛋白质测定结果
Table 1 The determination result of the protein

编号	单次测量结果 /%	测量结果 平均值/%	标准差 /%	相对标准 差
1	19.3			
2	19.3			
3	19.2	19.3	0.063	0.003
4	19.3			
5	19.4			
6	19.3			

实验中, 由测量结果重复性带来的相对不确定度 $u(\text{rep})$, 以对乳粉中蛋白质进行测量的测量结果平均值的相对标准差来表示。

$$u(\text{rep}) = \frac{u_{r1}}{\sqrt{n}} = \frac{0.003}{\sqrt{6}} = 0.001。$$

3.1.2 乳粉称样量

天平称量最大允许误差、乳品中水分、称样重复性各分量组成乳粉称量质量 m 产生标准不确定度 $u(m)$ 。

本研究称取的乳粉量为 0.5g, 天平校准证书上最大允许误差为 0.5mg, 采用矩形分布计算标准不确定度为:

$$\frac{0.5}{\sqrt{3}} = 0.29 \text{ mg}。通过计算得到由天平称量最大允许误差引$$

入的相对标准不确定度为 $\frac{0.29}{500} = 0.058\%$ 。

乳粉烘干 4 h 后达到恒重, 继续烘干其失重小于 0.08%, 乳粉中水分含量引入的相对标准不确定度为 0.08%。

本研究对乳粉重复称量 6 次,计算相对标准差为 0.02%,称量重复性引入的标准不确定度为 0.02%。

样品称量质量产生的标准不确定度 $u(m)$ 由上述 3 个不确定度分量合成得到:

$$u_{rel}(m) = \sqrt{0.058\%^2 + 0.08\%^2 + 0.02\%^2} = 0.001 \text{ mg}。$$

3.1.3 标准滴定溶液浓度

从检测过程和数学模型分析,标定硫酸标准溶液的不确定度来源主要有 4 个方面:测量的重复性(A类不确定度)、基准无水碳酸钠的纯度(B)、标定体积的不确定度(C)、自动凯氏定氮仪引入的不确定度(D)。

(1) 标准溶液重复测量的不确定度

为获得标准溶液重复测量的不确定度分量,对同一标准溶液进行标定 10 次,测量数据见表 2。

表 2 硫酸标定结果(mol/L)
Table 2 The result of the calibration of sulfuric acid(mol/L)

n	x_i	$ x_i - \bar{x} $	$(x_i - \bar{x})^2$
1	0.0527	1×10^{-3}	1×10^{-6}
2	0.0527	1×10^{-3}	1×10^{-6}
3	0.0525	1×10^{-3}	1×10^{-6}
4	0.0523	3×10^{-3}	9×10^{-6}
5	0.0528	2×10^{-3}	4×10^{-6}
6	0.0521	5×10^{-3}	25×10^{-6}
7	0.0524	2×10^{-3}	2×10^{-6}
8	0.0526	0	0
9	0.0531	5×10^{-3}	25×10^{-6}
10	0.0529	3×10^{-3}	9×10^{-6}
\bar{x}		0.0526	

计算可得,测量的重复性引入的相对不确定度为 $s_2 = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \frac{77 \times 10^{-6}}{10-1} = 2.92 \times 10^{-3}$,其标准不确定度为 $u_r(A) = s_2 \sqrt{x} = 5.55 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。

(2) 基准无水碳酸钠的纯度的不确定度

基准无水碳酸钠的纯度为 1.0000 ± 0.0005 ,采用矩形分布计算标准不确定度为: $u_r(\text{NaCO}_3) = \frac{\sigma}{\sqrt{3}} = \frac{0.0005}{\sqrt{3}} = 2.89 \times 10^{-4}$ 。

(3) 测量使用的电子分析天平的不确定度

天平称量最大允许误差:称样量为 0.2g,天平校准证书上最大允许误差为 0.5mg。采用矩形分布计算标准不确定度为 $\frac{0.5}{\sqrt{3}} = 0.29 \text{ mg}$ 。通过计算得到由天平称量最大允许

误差引入的相对标准不确定度为 $\frac{0.29}{200} = 0.145\%$ 。

对乳粉烘干 4 h 后,达到恒重,继续烘干,失重小于 0.06%,乳粉中中水分影响产生的相对标准不确定度为 0.06%。

本实验乳粉重复称量 10 次,得到相对标准差为 0.02%,称量重复性引入的相对标准不确定度为 0.02%;

测量使用的电子分析天平的不确定度为 $u_{rel}(M) = \sqrt{0.145\%^2 + 0.06\%^2 + 0.02\%^2} = 0.0015\%$ 。

(4) 标定体积的不确定度

滴定管的校准:滴定使用 50mL 酸式滴定管(A级),允差值为 $\pm 0.05 \text{ mL}$,采用矩形分布计算得到滴定管引入的标准不确定度为 $u_1 = \frac{\sigma}{\sqrt{3}} = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.0290 \text{ mL}$,其相对标准不确定度为 $u_{r1} = \frac{0.0290}{50} = 5.80 \times 10^{-4}$ 。

环境温度:实验环境在空调条件下,室温接近 20°C ,温度在 20°C 左右时,标准溶液的温度修正值非常小,对实验结果影响可以忽略不计^[2]。

滴定终点的判断:终点时的误差 $\pm 0.05 \text{ mL}$ (1 滴体积),亮点分布,现由终点判断引入的标准不确定度为 0.05 mL ,其不确定度为 $u_r(ZD) = \frac{0.05}{27.4} = 1.82 \times 10^{-3}$ 。

所以由滴定管和滴定终点判断引入的准不确定度为 $u_r(V) = \sqrt{u_{r1}^2 + u_r(ZD)^2} = \sqrt{(5.80 \times 10^{-4})^2 + (1.82 \times 10^{-3})^2} = 1.91 \times 10^{-3}$;

由标定体积引入的不确定度为

$$u_r(B) = \sqrt{u_r(\text{NaCO}_3)^2 + u_{rel}(M)^2 + u_r(V)^2} = \sqrt{(2.89 \times 10^{-4})^2 + (1.5 \times 10^{-3})^2 + (1.91 \times 10^{-3})^2} = 1.85 \times 10^{-3}。$$

(5) 标定硫酸合成的不确定度

标定硫酸合成的不确定度为 $u_{rel}(C) = \sqrt{u_r(A)^2 + u_r(B)^2} = \sqrt{(5.55 \times 10^{-2})^2 + (1.85 \times 10^{-3})^2} = 5.55 \times 10^{-2}$ 。

3.2 自动凯氏定氮仪引入的不确定度

自动凯氏定氮仪的校准证书已给出, $u_{rel}(D) = 4.2\%$ 。

3.3 合成标准不确定度的计算

将本实验的测量结果各不确定度分量及大小列于表 3。

将各不确定度分量进行合成:

$$u_{rel}(X) = \sqrt{u(rep)^2 + u_{rel}(m)^2 + u_{rel}(C)^2 + u_{rel}(D)^2} = \sqrt{0.001^2 + 0.001^2 + 0.0555^2 + 0.042^2} = 6.96 \times 10^{-2};$$

样品中蛋白质含量的最终测定结果为

$$u_c = u_{rel}(X) \times X = 6.96 \times 10^{-2} \times 19.3\% = 1.34\%。$$

表3 不确定度分量表
Table 3 Relative uncertainty of each component

符号	说明	x	相对标准 不确定度 $u(x_i)/x_i$
rep	重复性	0.500	0.001
m	样品质量	0.4926	0.001
C	盐酸标定	0.1064	0.0555
D	自动凯氏定氮仪	19.3	0.042

3.4 包含因子及扩展不确定度的计算与结果

95%置信概率下取包含因子 $k=2$, 将合成标准不确定度乘以包含因子计算得到测量结果的扩展不确定度为:

$$U = K \times u_c = 2.7\% ;$$

由此的得出, 乳粉样品中的蛋白质含量为: $(19.3 \pm 2.7)\%$, $k=2$ 。

4 结论

根据 GB 5009.5-2016 《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》, 采用 Kjeltac 8400 凯氏定氮仪测定乳粉中蛋白质含量, 其测量不确定度主要来源于硫酸标准溶液浓度的不确定度和仪器自动滴定体积的不确定度。Kjeltac 8400 凯氏定氮仪测定乳粉中蛋白质的扩展不确定度为 $(19.3 \pm 2.7)\%$, $k=2$ 。

在全自动凯氏定氮仪测定乳粉中蛋白质含量过程中, 为了提高检测水平, 获得具有较小不确定度的测量结果, 在检测过程中要规范硫酸标准溶液的配制以及标定, 标准溶液浓度的会直接影响到仪器的滴定体积, 需要检验人员操作熟练掌握, 以减少因此产生的不确定度, 同时尽量选用 A 级玻璃量器。

参考文献

- [1] 王淑芝, 孟淑芳, 石学明. 试谈蛋白质与人体健康[J]. 中国食物与营养, 2002, (6): 57-58.
Wang SZ, Meng SF, Shi XM. Try talking about protein and human health [J]. Food Nutr China, 2002, (6): 57-58.
- [2] 佚名. 蛋白质: 人类的第一营养素[J]. 中国新技术新产品, 2008, (5): 77-81.
Anonymous. Protein: The first nutrient of mankind [J]. New Technol New Prod China, 2008, (5): 77-81.
- [3] 孙敬, 董赛男. 食品中蛋白质的重要性[J]. 肉类研究, 2009, (4): 66-73.
Sun J, Dong SN. The importance of protein in food [J]. Meat Res, 2009, (4): 66-73.
- [4] Wolfe RR. Update on protein intake: importance of milk proteins for health status of the elderly [J]. Nutr Rev, 2015, 73(S1): 245-248.
- [5] 唐静, 罗玥, 黄萍, 等. 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[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(7): 152-154.
Tang J, Luo Y, Huang P, et al. Uncertainty analysis on determination of protein in protein drinks with Kjeltac8400 protein analyzer [J]. J Anhui

Agric Sci, 2018, 46(7): 152-154.

- [6] 常虹, 唐帅, 罗小菊. 浅谈食品中蛋白质含量测定方法优缺点[J]. 食品安全导刊, 2018, (27): 86-87.
Chang H, Tang S, Luo XJ. Discuss the advantages and disadvantages of the determination method of protein [J]. China Food Saf Magaz, 2018, (27): 86-87.
- [7] 赵立群, 毛燕. 湿法消解-火焰原子吸收法测定小麦粉中锌含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1689-1694.
Zhao LQ, Mao Y. Uncertainty evaluation of determination of zinc content in whea tflour by wet digestion-flame atomic absorption spectrometry [J]. J Food Saf Oual, 2018, 9(7): 1689-1694.
- [8] 邹大雁, 陈永元. 乳粉中蛋白质含量的测定不确定度评定[J]. 食品安全导刊, 2017, (9): 101-102.
Zou DY, Chen YY. Evaluation of uncertainty for determination of protein content in milk powder [J]. China Food Saf Magaz, 2017, (9): 101-102.
- [9] JJF1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059.1-2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement [S].
- [10] CNAS-GL06:2006 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL06:2006 Guidance on evaluating the uncertainty in measurement [S].
- [11] GB 5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S].
GB 5009.5-2016 National food safety standard-Determination of Protein in food [S].
- [12] 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.
Lin J, Lin YH, Chen JX. Evaluation of uncertainty of protein in soybean powder by Kjeldahl method [J]. Fujian Anal Test, 2015, 24(6): 27-29.
- [13] 赵艳萍, 陈平, 张蕾. 全自动凯氏定氮仪测定食品中蛋白质分析[J]. 科技创新导报, 2014, 11(8): 45.
Zhao YP, Chen P, Zhang L. Protein analysis in food was determined by automatic protein analyzer [J]. Sci Technol Innov Herald, 2014, 11(8): 45.
- [14] GB/T 601-2016 化学试剂标准滴定溶液的制备[S].
GB/T 601-2016 Chemical reagent Preparations of reference titration solutions [S].
- [15] 缪艳红, 姜芳, 刘江梅, 等. 乳粉中蛋白含量检测的不确定度评定[J]. 轻工科技, 2013, 29(5): 25-26.
Liao YH, Jiang F, Liu JM, et al. Evaluation of uncertainty of protein content in milk powder [J]. Light Ind Sci Technol, 2013, 29(5): 25-26.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



杨波, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 1169684734@qq.com



杨雪, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 1063290273@qq.com