

乳制品中非蛋白氮含量测定的不确定度评定

陈永元^{1,2*}, 乐琼^{1,2}

(1. 云南省产品质量监督检验研究院, 昆明 650223; 2. 国家热带农副产品质量监督检验中心, 昆明 650223)

摘要: **目的** 建立滴定法测定乳制品中非蛋白氮含量的不确定度评定的方法。**方法** 根据中华人民共和国国家标准 GB/T21704-2008《乳与乳制品中非蛋白氮含量的测定》和中华人民共和国国家计量技术规范 JJF1059.1-2006《测量不确定度的评定与表示》建立不确定度模型, 运用《测量不确定度评定与表示指南》, 分析该方法测定中各不确定因素。**结果** 当乳制品中非蛋白氮的含量为 0.0274%, 不确定度为 0.000258%, 非蛋白氮含量表示为 $[(0.0274 \pm 0.000258)\%, K=2]$ 。**结论** 在确定的实验条件下, 本方法的不确定度主要来自于标定硫酸标准溶液和滴定非蛋白氮时对终点的判断, 同时测定非蛋白氮时的重复试验也是一个主要影响因素。

关键词: 乳制品; 非蛋白氮; 不确定度

Evaluation of uncertainty in determination of non-protein nitrogen in dairy products

CHEN Yong-Yuan^{1,2*}, YUE Qiong^{1,2}

(1. Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Kunming 650223, China; 2. National Tropical Agricultural and Sideline Products Quality Supervision and Inspection Center, Kunming 650223, China)

ABSTRACT: Objective To establish a titration assessment method for detecting the uncertainty of the non-protein nitrogen dairy. **Methods** The uncertainty model was established according to national standard of china GB/T21704-2008 "The determination of non-protein nitrogen content in milk and dairy products" and the National metrology technical specifications JJF1059.1-2006 "Evaluation and expression of uncertainty of measurement", and the uncertainty factors in this method were analyzed by "Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement Guide". **Results** When the non-protein nitrogen content in dairy products was 0.0274%, the uncertainty was 0.000258%, and the non-protein nitrogen content was expressed as $[(0.0274 \pm 0.000258)\%, K=2]$. **Conclusion** Under determined experimental conditions, the major uncertainty sources are sulfuric acid standard solution, the judgment of the end point of titration and the repeat experiments of non-protein nitrogen.

KEY WORDS: dairy products; non-protein nitrogen; uncertainty

1 引言

测量不确定度是指表征合理地赋予被测量之值的分散性与测量结果相联系的参数, 是经典的误差

理论发展和完善的产物, 克服了传统误差评定因不同领域不同个人对误差处理方法的不同见解造成方法的不统一和概念上的麻烦, 能够统一地评价测量结果, 是对测量结果质量的定量表征。测量结果必须

*通讯作者: 陈永元, 工程师, 主要研究方向食品检测与食品安全。E-mail: 1369568825@qq.com

*Corresponding author: CHEN Yong-Yuan, Engineer, Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Kunming 650223, China. E-mail: 1369568825@qq.com

附有不确定度说明才有完整的意义。实验室有必要通过对测量结果的不确定度评定来了解被测量值在什么范围。在测定乳制品中的非蛋白氮时采用 GB/T 21704-2008《乳与乳制品中非蛋白氮含量的测定》^[4]规定的方法,为使结果准确完整和满足客户需要,对其测定结果进行测量不确定度的评定。

2 材料与方法

用 15% 三氯乙酸溶液沉淀蛋白质,滤液按 GB 5009.5-2010《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》^[5]消化、蒸馏后,用 0.01 mol/L 的硫酸标准溶液滴定,计算氮含量,即为样品中非蛋白氮含量。

2.1 材料与试剂

硫酸、三氯乙酸、蔗糖、硫酸铜、硫酸钾、硼酸、氢氧化钠均为分析纯,购于国药集团,所用水为 GB/T 6682^[6]规定的一级水,标准溶液按 GB/T 601^[7]配制。

2.2 仪器与设备

电子分析天平 AL204(瑞士梅特勒-托利多公司)。

2.3 实验方法

称取液态乳 10 g(精确至 0.0001 g)置于预先称量的烧杯中。加入 40 mL 三氯乙酸(150 g/L)溶液,摇匀,准确称量。静置 5 min,用中速滤纸过滤,准确称取滤液 20 g(精确至 0.0001 g)于 100 mL 定氮瓶中,加入 0.2 g 硫酸铜、6 g 硫酸钾及 20 mL 硫酸,轻摇后于瓶口放一小漏斗,将瓶以 45°角斜支于有小孔的石棉网上。小心加热,待内容物全部炭化,泡沫完全停止后,加强火力,并保持瓶内液体微沸,至液体呈蓝绿色并澄清透明后,再继续加热 0.5~1 h。取下放冷后转移于 500 mL 长颈烧瓶中,加水至约 300 mL,加几粒玻璃珠,塞上带分液漏斗的双孔橡胶塞,加热进行蒸馏,从分液漏斗中滴加氢氧化钠溶(400 g/L)至溶液沸腾时刚好变为黑色,用预先加有 20.0 mL 硼酸溶液(20 g/L)及 3 滴混合指示剂的 250 mL 锥形瓶接收馏出液,并使冷凝管的下端插入液面下。蒸馏至馏出液约 150 mL 后移动蒸馏液接收瓶,使液面离开冷凝管下端,

再蒸馏 1 min,然后用少量水冲洗冷凝管下端外部,取下蒸馏液接收瓶,用 0.01 mol/L 硫酸标准溶液滴定溶液由绿色变为红色即为终点。

空白试验:称取 0.1 g 蔗糖,加入 16 mL 三氯乙酸(150 g/L),按上述步骤操作。

2.4 计算公式

$$X = \frac{1.4007c(V_1 - V_0)(m_2 - 0.065m_1)}{m_3m_1}$$

式中: X —试样中非蛋白氮的含量, %;

c —硫酸标准溶液的浓度, mol/L;

V_1 —试样消耗硫酸标准溶液的体积, mL;

V_2 —空白消耗硫酸标准溶液的体积, mL;

m_2 —加入 40 mL 三氯乙酸溶液后的试样质量, g;

0.065—响应因子;

m_1 —用于沉淀蛋白的试样质量, g;

m_3 —用于消化滤液的质量, g

3 结果与分析

不确定度的类型有 2 种: A 类不确定度: 重复性实验产生的不确定度, 为重复实验测得结果的标准偏差 S 除以 $\sqrt{8}$; B 类不确定度: 天平称量、基准试剂、容量瓶允许差、移液管允许差、滴定管允许差、校准和实验温度差异、肉眼判断滴定终点误差、滴定终点误差引入的不确定度。

3.1 A 类相对不确定度

3.1.1 标定硫酸标准溶液的 A 类相对不确定度

按 GB/T 601-2002《化学试剂 标准滴定溶液的制备》^[7]配制和标定硫酸标准溶液, 标定结果符合标准要求, 结果见表 1。

U_{A1} 为 0.00001302 mol/L, 相对 A 类不确定度 U'_{A1} 为 0.0127%。

3.1.2 测定非蛋白氮的 A 类相对不确定度

按 GB/T 21704-2008《乳与乳制品中非蛋白氮含量的测定》^[4]并结合 GB 5009.5-2010《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》^[5], 测定乳中的非蛋白氮含量, 测定结果符合标准精密度的要求, 结果见表 2。

表 1 硫酸标准溶液标定结果
Table 1 Calibration results of standard sulfuric acid solution

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
结果 mol/L	0.10227	0.10232	0.10236	0.10225	0.10232	0.10226	0.10230	0.10231

表 2 非蛋白氮检测结果
Table 2 Results of non-protein nitrogen test

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
结果%	0.02748	0.02712	0.02715	0.02790	0.02785	0.02724	0.02751	0.02727

U_{A2} 为 0.000107%, 相对 A 类不确定度 U'_{A2} 为 0.3905%。

$$A \text{ 类相对不确定度 } U'_A = \sqrt{U_{A1}^2 + U_{A2}^2} = 0.3907\%$$

3.2 B 类相对不确定度

3.2.1 天平引入的相对不确定度

天平称量的不确定度来源为: 重复性、数字分辨率和线性度。重复性引入的不确定度归入整个操作程序统一考虑。天平的分度值为 0.1 mg, 数字分辨率引入的不确定度按矩形分布, 则其不确定度分量 U_{B11} 为:

$$U_{B11} = \frac{0.1}{\sqrt{3}} = 0.029 \text{ mg}$$

天平的线性度为 ± 0.2 mg, 该数值是称量的实际重量与天平读数的最大差值, 按矩形分布计算, 将天平的线性分量转化为标准不确定度分量 U_{B12} 为:

$$U_{B12} = \frac{0.2}{\sqrt{3}} = 0.115 \text{ mg}$$

上述分量需计算 2 次, 一次为毛重, 一次为净重, 2 次称量均为独立观测, 互不相关。由此天平称量的标准不确定度为:

$$U_{B1} = \sqrt{2 \times (U_{B11}^2 + U_{B12}^2)} = 0.168 \text{ mg}$$

标定硫酸标准溶液, 称取 0.2 g 基准无水碳酸钠, 测定非蛋白氮过程进行 3 次称量, 分别为 10、50、20 g, 天平引入的相对不确定度 U'_{B1} :

$$U'_{B1} = \sqrt{\left(\frac{0.000168}{0.2} \times 100\right)^2 + \left(\frac{0.000168}{10} \times 100\right)^2 + \left(\frac{0.000168}{50} \times 100\right)^2 + \left(\frac{0.000168}{20} \times 100\right)^2} = 0.0857\%$$

3.2.2 基准试剂引入的相对不确定度

根据中华人民共和国国家标准 GB 1255-2007《工作基准试剂 无水碳酸钠》^[8]规定, 基准无水碳酸钠的含量范围是 $(100 \pm 0.05)\%$, 按矩形分布, 其相对不确定度 U'_{B2} 为:

$$U'_{B2} = \frac{0.05\%}{\sqrt{3}} = 0.0289\%$$

3.2.3 滴定管引入的相对不确定度

根据 JJG196-2006《常用玻璃仪器检定规程》^[9], 标定硫酸标准溶液用 50 mL 滴定管(A 级), 容量允差为 ± 0.050 mL, 消耗体积 37 mL; 测定非蛋白氮用 10 mL 滴定管(A 级), 容量允差为 ± 0.025 mL, 消耗体积 7 mL。按三角形分布, 滴定管引入的相对不确定度 U'_{B3} 为:

$$U'_{B3} = \sqrt{\left(\frac{0.050}{\sqrt{6} \times 37} \times 100\right)^2 + \left(\frac{0.025}{\sqrt{6} \times 7} \times 100\right)^2} = 0.1559\%$$

3.2.4 容量瓶引入的相对不确定度

根据 JJG196-2006《常用玻璃仪器检定规程》^[9], 稀释 0.01 mol/L 硫酸标准溶液时用 500 mL 容量瓶(A 级), 容量允差为 ± 0.25 mL, 按三角形分布, 容量瓶定容引入的相对不确定度 U'_{B4} 为:

$$U'_{B4} = \frac{0.25}{\sqrt{6} \times 500} \times 100 = 0.0204\%$$

3.2.5 移液管引入的相对不确定度

根据 JJG196-2006《常用玻璃仪器检定规程》^[9], 稀释 0.01 mol/L 硫酸标准溶液时用 50 mL 移液管(A 级), 容量允差为 ± 0.05 mL, 按三角形分布, 移液管移取溶液引入的相对不确定度 U'_{B5} 为:

$$U'_{B5} = \frac{0.05}{\sqrt{6} \times 50} \times 100 = 0.0408\%$$

3.2.6 温度引入的不确定度

根据 JJG196-2006《常用玻璃仪器检定规程》^[9]中规定, 滴定管在 20 °C 校准, 水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, 实验室的温度在 ± 5 °C 之间波动, 产生的体积变化为 ± 0.001 mL。温度变化按矩形分布, 标定硫酸标准溶液消耗体积 37 mL, 测定非蛋白氮消耗体积 7 mL, 测温度变化引入的相对不确定度 U'_{B6} 为:

$$U'_{B6} = \sqrt{\left(\frac{0.001}{\sqrt{3} \times 37} \times 100\right)^2 + \left(\frac{0.001}{\sqrt{3} \times 7} \times 100\right)^2} = 0.0084\%$$

3.2.7 滴定终点误差引入的不确定度

理论上, 滴定终点与等当点之间将会存在 0.1%~0.2% 的偏差, 考虑滴定在空气中进行, 滴定终点误差取 0.2%, 按矩形分布, 标定硫酸标准溶液和

测定非蛋白氮需进行2次终点判定, 滴定终点误引入的相对不确定度 U'_{B7} 为:

$$U'_{B7} = \sqrt{\left(\frac{0.2\%}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0.2\%}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0.1633\%$$

3.2.8 用肉眼判断滴定终点引入的不确定度

用肉眼判断滴定终点有可能引入 0.01 mL 的偏差, 按矩形分布计算, 标定硫酸标准溶液消耗体积 37 mL, 测定非蛋白氮消耗体积 7 mL。用肉眼判断滴定终点引入的相对不确定度 U'_{B8} 为:

$$U'_{B8} = \sqrt{\left(\frac{0.01}{\sqrt{3} \times 30} \times 100\right)^2 + \left(\frac{0.01}{\sqrt{3} \times 7} \times 100\right)^2} = 0.0840\%$$

综合以上各 B 不确定度来源, B 类相对不确定度 U'_B 为:

$$U'_B = \sqrt{(U'_{B1})^2 + (U'_{B2})^2 + (U'_{B3})^2 + (U'_{B4})^2 + (U'_{B5})^2 + (U'_{B6})^2 + (U'_{B7})^2 + (U'_{B8})^2} \\ = \sqrt{(0.0857\%)^2 + (0.0289\%)^2 + (0.1559\%)^2 + (0.0204\%)^2 + (0.0408\%)^2 + (0.0084\%)^2 + (0.1633\%)^2 + (0.0840\%)^2} \\ = 0.2615\%$$

3.3 相对不确定度 U'

$$U' = \sqrt{(U'_A)^2 + (U'_B)^2} = \sqrt{(0.3907\%)^2 + (0.2615\%)^2} \\ = 0.4701\%$$

3.4 测定非蛋白氮的不确定度

$$U = U' \times 0.0274\% = 0.000129\%$$

3.5 扩展不确定度

计算测试结果不确定度时, 按国际惯例, 在 95% 的置信概率下, 扩展包含因子 K 取 2, 则扩展不确定度为

$$U_{rel} = U_{crel} \times K = 0.000129\% \times 2 = 0.000258\%$$

3.6 结果表示

非蛋白氮测量结果的不确定度表示为 $[0.0274 \pm 0.000258]\%$, $K = 2$ 。

4 讨论与结论

根据 GB/T 27025-2008 体系要求实验室对同一类型的测量至少进行 1 项测量不确定度评定。本文结合检测方法和实际操作情况, 按照 GB/T 21704-2008 《乳与乳制品中非蛋白氮含量的测定》测定非蛋白氮的含量, 根据测量不确定度的评定理论, 同时参考多

篇不确定度评定和分析的文献^[10-17], 分析不确定度来源, 建立模型, 进行不确定度评定。测量不确定度的主要影响因素有测试人员、环境、测试方法、仪器设备等。通过对乳制品中非蛋白氮含量测定的各分量不确定度的分析和比较, 天平、容量瓶、滴定管、移液管、温度等通过检定受控的因素对测定结果的不确定度的影响比较小, 影响非蛋白氮含量结果不确定度的最大因素是重复性试验和滴定终点误差引入的不确定度, 因此在实际操作要保证每次滴定终点的颜色一致, 减少样品转移过程的损失, 保证每次测定时天平、消化温度、蒸馏时间、实验室温度等条件一致, 提高检测人员操作技能, 减少人为的误差, 并对样品进行多次测定取平均值, 以进一步降低检测过程中的不确定度, 提高检验数据的准确性。

参考文献

- [1] GB/T 27025-2008 检测和校准实验室能力的通用要求[S]. GB/T 27025-2008 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S].
- [2] 测量不确定度评定与表示指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2000. Evaluation and guidance of measurement uncertainty [M]. Beijing: Chinese Metrology Press, 2000.
- [3] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定和表示[S]. JJF 1059.1-2012 The measurement uncertainty evaluation and said [S].
- [4] GB/T 21704-2008 乳与乳制品中非蛋白氮含量的测定[S]. GB / T 21704-2008 Determination of non-protein nitrogen content in milk and dairy products [S].
- [5] GB 5009.5-2010 食品中蛋白质的测定[S]. GB 5009.5-2010 Determination of protein in foods [S].
- [6] GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和实验方法[S]. GB/T 6682-2008 Water for analytical laboratory use specification and test methods [S].
- [7] GB/T 601-2002 标准滴定溶液的制备[S]. GB/T 601-2002 Preparations of standard volumetric solution [S].
- [8] GB 1255-2007 工作基准试剂 无水碳酸钠[S]. GB 1255-2007 Working chemical-sodium carbonate anhydrous [S].
- [9] JJG 196-2006 常用玻璃仪器检定规程[S]. JJG 196-2006 Commonly used measuring glass verification regulations [S].
- [10] 王竹天. 食品卫生检验方法(理化部分)注解(上)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2013. Wang ZT. Food hygiene inspection method (physical and

- chemical) notes (on) [M]. Beijing: Standards Press of China, 2013.
- [11] 张燕, 徐幸, 郭启新, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 3 种磺胺类药物残留不确定度的评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 303-309.
- Zhang Y, Xu X, Guo QX, *et al.* Uncertainty evaluation of three sulfonamides residues in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(1): 303-309.
- [12] 张信仁, 唐庆强, 张云. 液相色谱-串联质谱法测定鳗鱼中甲苯咪唑含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1713-1718.
- Zhang XR, Tang QG, Zhang Y. Uncertainty analysis on determination of the content of mebendazole in eel by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(5): 1713-1718.
- [13] 吕飞, 钟伟龙, 周卫东, 等. LC-MS/MS 测定蔬菜中丁草胺残留量的不确定度分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(6): 299-304.
- Lv F, Zhong WL, Zhou WD, *et al.* Uncertainty analysis of butachlor residues in vegetables by LC-MS/MS [J]. *J Food Saf Qual*, 2011, 2(6): 299-304.
- [14] 黄艳梅, 孙汗巨, 王德胜, 等. 液相色谱-串联质谱法测定猪肉及组织中沙丁胺醇的含量不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(9): 2903-2909.
- Huang YM, Sun HJ, Wang DS, *et al.* Uncertainty analysis of salbutamol in swine tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(9): 2903-2909.
- [15] 赵健亚, 陈丹, 谢怀根, 等. 高效液相色谱法测定鸡肉中磺胺类药物残留的不确定度评定[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 144-147.
- Zhao JY, Chen D, Xie HG, *et al.* Uncertainty evaluation for determination of sulfonamide residues in chicken by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Sci*, 2013, 34(10): 144-147.
- [16] 杨微微, 王俐毳, 许乾丽, 等. 高效液相色谱法测定面条中柠檬黄、日落黄含量的不确定度分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7): 2208-2214.
- Yang WW, Wang LO, Xu QL, *et al.* Uncertainty analysis determination of citrine and sunset yellow in noodle by HPLC [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(7): 2208-2214.
- [17] 张盼, 苏福海, 戴新华, 等. 棉类纺织品中痕量五氯酚的液相色谱-同位素稀释质谱法测定及不确定度评定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(9): 953-957.
- Zhang P, Su FH, Dai XH, *et al.* Analysis of trace pentachlorophenol in cotton textiles by liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry and its uncertainty evaluation [J]. *J Instrum Anal*, 2010, 29(9): 953-957.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



陈永元, 工程师, 主要研究方向食品检测与食品安全。

E-mail: 1369568825@qq.com