

# 凯氏定氮法测定奶粉中蛋白质含量的测量 不确定度评定

曾慧\*, 王念彬, 张明珠

(清远加多宝草本植物科技有限公司, 清远 511675)

**摘要:目的** 对凯氏定氮法测定奶粉中蛋白质含量的不确定度进行评定。**方法** 建立凯氏定氮法测定奶粉中蛋白质含量的不确定度模型, 分析影响测量不确定度的主要因素, 包括测量重复性、样品的称量、样品消化过程定容、消化液的移取及滴定过程, 计算合成标准不确定度和扩展不确定度。**结果** 当样品中蛋白质含量为 7.98 g/100 g 时, 扩展不确定度为 0.15 g/100 g ( $k=2$ , 包含因子  $P=95%$ )。**结论** 该方法测量不确定度主要来源于滴定过程, 其次为测量重复性。

**关键词:** 测量不确定度评定; 凯氏定氮法; 改进

## 0 引言

凯氏定氮法是一种经典的蛋白质定量方法, 食品中蛋白质在催化加热条件下被分解, 产生的氨与硫酸结合生成硫酸铵, 碱性蒸馏使氨游离, 用硼酸吸收后以硫酸或盐酸标准滴定溶液滴定, 根据酸的消耗量计算氮含量, 再乘以换算系数, 即为蛋白质的含量<sup>[1]</sup>。该方法适用于各种食品的蛋白质分析, 但也存在一些局限性, 如操作较繁琐、过程质量不易于控制。许多学者如李花觉等对凯氏定氮法测定蛋白质注意事项进行研究探讨<sup>[2-5]</sup>, 杜蒙等对凯氏定氮法测定蛋白质方法进行了改良优化<sup>[6-9]</sup>。

测量不确定度评定合理表征了被测量量值的分散性, 是评价测量活动质量的重要指标。本研究参考凯氏定氮法测定蛋白质的研究进展<sup>[10-11]</sup>、改良方法研究进展<sup>[12]</sup>、不确定度评定<sup>[13-14]</sup>及不确定度评定的标准<sup>[15-17]</sup>, 对 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》第一法 凯氏定氮法 5.1 凯氏定氮法<sup>[1]</sup>(以下简称凯氏定氮法)测定奶粉中蛋白质含量的进行测量不确定度评定, 为凯氏定氮法测定奶粉中蛋白质含量提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器: 分析天平(BSA224S-CW, 感量为 0.1 mg, 赛多利斯科学仪器北京有限公司); 定氮蒸馏装置(德国 BRAND); 25 mL 滴定管(分度 0.05 mL, 德国 BRAND)。

试剂: 奶粉中蛋白质分析质控样品(证书给定值为 7.89 g/100 g±1.51 g/100 g, 北京美证检测技术有限公司); 硫酸钾(分析纯, 广东光华科技股份有限公司); 硫酸铜(分析纯, 西陇化工股份有限公司); 浓硫酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 硼酸(优级纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 氢氧化钠(分析纯, 西陇化工股份有限公司); 溴甲酚绿(指示剂, 天津市化学试剂研究所有限公司); 甲基红(指示剂, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 0.05 mol/L 盐酸(标准滴定溶液, 深圳市博林达科技有限公司)。

### 1.2 不确定度评定

#### 1.2.1 检测方法简述

依据 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》第一法 凯氏定氮法进行测定<sup>[1]</sup>。

#### 1.2.2 建立数学模型

奶粉中蛋白质含量计算公式如下<sup>[1]</sup>:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.0140}{m \times \frac{V_3}{100}} \times F \times 100 \quad (1)$$

式中:  $X$ ——试样中蛋白质的含量, g/100 g;  $V_1$ ——试液消耗盐酸标准滴定溶液的体积, mL;  $V_2$ ——试剂空白消耗盐酸标准滴定溶液的体积, mL;  $V_3$ ——吸取消化液的体积, mL;  $c$ ——盐酸标准滴定溶液的浓度, mol/L; 0.0140——1.0 mL 盐酸标准滴定溶液相当的氮的质量, g;  $m$ ——试样的质量, g;  $F$ ——氮换算成蛋白质的系数, 乳制品为 6.38; 100——换算系数<sup>[1]</sup>。

\* 通信作者: 曾慧, 助理工程师, 研究方向为食品分析检测。E-mail: zenghui@jdbchina.com

## 2 结果与分析

### 2.1 测量不确定度的来源

根据数学模型对检测方法过程分析, 凯氏定氮法测定奶粉中蛋白质含量的不确定度主要来源于: (1)测量重复性引入的不确定度; (2)样品称量引入的不确定度; (3)样品消化过程定容引入的不确定度; (4)蒸馏过程移取消化液引入的不确定度;

(5)滴定过程引入的不确定度。

### 2.2 测量不确定度评定

#### 2.2.1 测量重复性引入的不确定度

对奶粉中蛋白质分析质控样品在重复性条件下平行测定 6 次, 测定覆盖本方法全过程, 包含样品称量、消化定容、蒸馏、滴定等操作的重复性。6 次平行测定结果见表 1。

表 1 6 次平行测定结果

编号	1	2	3	4	5	6	平均值	SD
测定值(g/100 g)	8.10	7.88	8.06	7.87	8.00	7.96	7.98	0.0935

由重复性引入的标准不确定度为  $u(\text{重}) = \frac{SD}{\sqrt{n}} = 0.0382 \text{ g/100 g}$ ,

相对标准不确定度为  $u_{\text{rel}}(\text{重}) = \frac{0.0382}{7.98} \times 100 = 0.479\%$ 。

#### 2.2.2 样品称量引入的不确定度

去皮后, 用天平称取 1.0 g 样品, 前后需称量两次。查分析天平(BSA224S-CW)校准证书, 扩展不确定度为 0.0005 g,  $k=2$ 。由样品称量引入的标准不确定度为

$u_m = \sqrt{\frac{0.0005^2}{2} + \frac{0.0005^2}{2}} = 0.3536 \text{ mg}$ , 相对标准不确定度为  $u_{\text{rel}(m)} = \frac{u_m}{1.0} \times 100 = 0.0354\%$ 。

#### 2.2.3 消化过程定容引入的不确定度

样品中加入硫酸钾、硫酸铜、硫酸消化后, 用蒸馏水定容至 100 mL。查 100 mL 容量瓶校准证书, 扩展不确定度为 0.04 mL,  $k=2$ 。实验室温度在  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$  之间变化, 即温度变化半幅为  $5^\circ\text{C}$ 。样品消解过程中加入了硫酸、硫酸钾、硫酸铜, 溶剂热膨胀系数为  $0.001/^\circ\text{C}$ , 假设温度变化为矩形分布<sup>[6]</sup>, 则由样品定容引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\text{定容}) = \sqrt{\left(\frac{100.00 \times 5 \times 0.001}{\sqrt{3} \times 100.00}\right)^2 + \left(\frac{0.04}{2 \times 100.00}\right)^2} = 0.289\%$$

#### 2.2.4 蒸馏过程移取消化液引入的不确定度

移取 5.00 mL 消化液进行蒸馏, 查 5 mL 单标线移液管校准证书, 扩展不确定度为 0.005 mL,  $k=2$ 。实验室温度在  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$  之间变化, 则由蒸馏过程消化液移取引入的相对标准不确定度为

$$u_{\text{rel}}(\text{移取}) = \sqrt{\left(\frac{5.00 \times 5 \times 0.001}{\sqrt{3} \times 5.00}\right)^2 + \left(\frac{0.005}{2 \times 5.00}\right)^2} = 0.293\%$$

#### 2.2.5 滴定过程引入的不确定度

滴定过程引入的不确定度主要为标准滴定溶液、滴定消耗的体积、滴定管的分辨力引入的不确定度。

#### (1)标准滴定溶液引入的不确定度

由标准滴定溶液引入的不确定度主要来源于标准滴定溶液本身以及稀释的过程。

a. 标准滴定溶液引入的不确定度: 查盐酸标准滴定溶液证书, 浓度为 0.05014 mol/L, 相对扩展不确定度为 0.5%,  $k=2$ , 则由标准滴定溶液引入的相对标准不确定度  $u_{\text{rel}}(c)$  为 0.25%。

#### b. 稀释过程引入的不确定度

用 100 mL 单标线移液管移取 100.00 mL 盐酸标准滴定溶液于 500 mL 容量瓶, 用蒸馏水稀释至刻度, 稀释后溶液浓度为 0.01003 mol/L, 实验室温度在  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$  之间变化, 此过程中:

① 标准滴定溶液移取引入: 查 100 mL 单标线移液管校准证书, 扩展不确定度为 0.03 mL,  $k=2$ 。水的热膨胀系数为  $0.00021/^\circ\text{C}$ , 则温度引入的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(T_1) = \frac{100.00 \times 5 \times 0.00021}{\sqrt{3} \times 100.00} = 0.0606\%$$

由标准溶液移取引入的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(v_1) = \sqrt{[u_{\text{rel}}(T_1)]^2 + \left(\frac{0.03}{2 \times 100.00}\right)^2} = 0.0624\%$$

② 由标准滴定溶液定容引入: 查 500 mL 容量瓶校准证书, 扩展不确定度为 0.09 mL,  $k=2$ 。则由稀释定容引入的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(v_2) = \sqrt{\left(\frac{500.00 \times 5 \times 0.00021}{\sqrt{3} \times 500.00}\right)^2 + \left(\frac{0.09}{2 \times 500.00}\right)^2} = 0.0616\%$$

综上所述, 将标准滴定溶液稀释至 0.01003 mol/L 时引入的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(\text{标液}) = \sqrt{[u_{\text{rel}}(c)]^2 + [u_{\text{rel}}(v_1)]^2 + [u_{\text{rel}}(v_2)]^2} = 0.265\%$$

#### (2)滴定消化体积引入的不确定度

a. 样品滴定: 查酸碱两用滴定管校准证书, 未给出 5 mL

左右点的扩展不确定度。考虑 25 mL 滴定管的示值允差为 ±0.03 mL, 假设其服从三角分布, 实验室温度在 (20±5) °C 之间变化, 样品平均消耗盐酸标准滴定溶液体积为 4.775 mL, 前后进行两次读数, 则其标准不确定度:

$$u(\text{样品}) = \sqrt{\left(\frac{4.775 \times 5 \times 0.00021}{\sqrt{3}}\right)^2 + 2 \times \left(\frac{0.03}{\sqrt{6}}\right)^2} = 0.01756 \text{ mL}$$

b. 试剂空白滴定: 试剂空白消耗盐酸标准滴定溶液体积为 0.300 mL, 实验室温度在 (20±5) °C 之间变化, 则由试剂空白滴定引入的标准不确定度:

$$u(\text{空白}) = \sqrt{\left(\frac{0.300 \times 5 \times 0.00021}{\sqrt{3}}\right)^2 + 2 \times \left(\frac{0.03}{\sqrt{6}}\right)^2} = 0.01732 \text{ mL}$$

由滴定消耗体积引入的相对标准不确定度<sup>[7]</sup>:

$$u_{\text{rel}}(\text{滴定}) = \frac{\sqrt{[u(\text{样品})]^2 + [u(\text{空白})]^2}}{4.775 - 0.300} \times 100\% = 0.551\%$$

综上所述, 滴定过程引入的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(\text{滴}) = \sqrt{[u_{\text{rel}}(\text{标液})]^2 + [u_{\text{rel}}(\text{滴定})]^2} = 0.612\%$$

### 2.2.6 合成相对标准不确定度

各不确定度分量见表 2。

合成相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}} = \left\{ [u_{\text{rel}}(\text{重})]^2 + [u_{\text{rel}}(m)]^2 + [u_{\text{rel}}(\text{定容})]^2 + [u_{\text{rel}}(\text{移取})]^2 + [u_{\text{rel}}(\text{滴})]^2 \right\}^{\frac{1}{2}} = 0.8794\%$$

奶粉中蛋白质平均含量为 7.98 g/100g, 则蛋白质含量测定结果的合成标准不确定度为  $u_x = 0.8794 \times 7.98 = 0.0702 \text{ g/100 g}$ , 取包含因子  $k=2$ , 则扩展不确定度为  $u_x \times k = 0.0702 \times 2 \approx 0.15 \text{ g/100 g}$ 。即本实验奶粉蛋白质含量测定结果为 (7.98±0.15)g/100 g,  $k=2$ 。

表 2 各不确定度来源及影响占比

各不确定度分量	相对标准不确定度(%)	影响占比(%)
重复性	0.479	28.04
样品称量	0.0354	2.07
消化定容	0.289	16.91
蒸馏过程移取消化液	0.293	17.15
滴定过程	0.612	35.83

### 2.3 测量不确定度评定结果分析

从不确定度评定的结果可知, 滴定过程引入的相对标准不确定度影响最大, 影响占比约为 36%, 应引起高度重视, 其次是重复性引入的不确定度, 再次是样品消化定容及蒸馏过程中移取消化液引入的不确定度。

#### 2.3.1 滴定消耗的体积

由测定的不确定度评定各相对标准不确定度计算公式可知, 温度变化引起溶剂膨胀引入的相对标准不确定度不受滴定消耗体积的影响; 由滴定管引入的相对标准不确定度, 体积越小, 引入的相对标准不确定度越大; 同理可知, 滴定过程对相对标准不确定影响较大的是  $\Delta V$ , 即  $V_{\text{样品}} - V_{\text{空白}}$  的差值, 通常试剂空白滴定消耗的体积在一个很小的范围波动,  $\Delta V$  变化主要受样品蛋白质含量的影响, 即样品滴定消耗体积的影响。样品滴定消耗体积越小, 引入的相对标准不确定度越大, 反之则越

小。滴定体积在 4 mL 以内, 随着滴定体积的增加由滴定过程引入的相对标准不确定度减小的较快; 4 mL 以上随着滴定体积增加, 由滴定过程引入的相对标准不确定度趋向于一个稳定值。所以, 为了尽量减少滴定过程滴定管允差引入的相对标准不确定度, 滴定消耗的体积应控制在 4 mL 以上 (10 mL 滴定管), 即滴定管最大量程的 40% 以上。

#### 2.3.2 标准滴定溶液

本实验采用 0.05 mol/L 的盐酸标准滴定溶液稀释 5 倍后进行滴定, 取 5.00 mL 消化液进行检测, 消耗 0.01 mol/L 盐酸标准滴定溶液的平均体积为 4.475 mL, 按照这个结果折算, 如果使用 0.05 mol/L 的盐酸标准滴定溶液直接进行滴定, 则理论消耗体积为 0.895 mL, 分别计算比较不同浓度的标准滴定溶液本身及滴定消耗体积引入的相对标准不确定度及合成相对标准不确定度, 结果见表 3。

表 3 不同浓度标准滴定溶液的相对标准不确定度

盐酸标准滴定溶液浓度(mol/L)	$\Delta V(\text{mL})$	$u_{\text{rel}}(c)(\%)$	$u_{\text{rel}}(\text{滴定})(\%)$	合成相对标准不确定度(%)
0.050	0.895	0.250	2.476	2.489
0.010	4.475	0.265	0.392	0.473

由上表可知滴定过程的不确定度主要影响因素是标准滴定溶液的浓度及滴定消耗的体积, 这两者是一个负相关的关系, 标准滴定溶液的浓度高, 滴定消耗体积相对就低, 反之则高。如果将滴定过程引入的不确定度控制在一个较小值的水平, 则需要尽量增加标准滴定溶液的消耗体积。可以通过适当减小标准滴定溶液的浓度达到增加标准滴定溶液消耗体积的目的。

### 3 讨论与结论

通过对实验过程中样品称量、消化、蒸馏及滴定过程中各种误差来源进行分析评估和量化, 可以客观的反应各因素对结果影响及影响占比, 有助于针对性的优化流程。本研究通过凯氏定氮法测定奶粉中蛋白质含量的测量不确定度分析可知, 滴定过程是实验控制的关键, 应调整过程控制措施为控制滴定消耗体积在滴定管量程的 40% 以上。验过程中可通过以下一种或是几种方式结合达到减小滴定过程中引入不确定度分量的目的:(1)适当的增加取样量, 如可将称样量 1.0 g 提高至 1.5 g 或是 2.0 g, 但是注意需要控制氮含量在标准要求范围内(约当于 30~40 mg 氮)。(2) 2.0~10.0 mL 范围内, 适当的增加消化蒸馏过程中移取消化液的体积, 如本研究移取消化液体积为 5.00 mL, 若增加至 10.00 mL, 理论估计消耗盐酸标准滴定溶液的体积也将增大 2 倍, 约为 9.55 mL, 则引入的不确定度将由 0.392% 减小为 0.197%, 减小约 50%, 极大的减小了该步骤引入的不确定度。该过程中需注意加入的氢氧化钠是否过量。(3)将标准滴定溶液稀释之后再行滴定, 即使用浓度较低的标准滴定溶液。(4)选用小量程的滴定管。其次是样品测量的重复性, 过程中应加强人员的培训, 强化人员对操作过程关键控制点的理解、掌握, 及熟练程度; 再次是消化定容、蒸馏过程移取消化液, 这两者相差不大, 属于设备一类引入的不确定度, 如果追求更高的准确度, 可以选择等级或精度更高的设备。

本研究采用凯氏定氮法对奶粉中蛋白质含量的不确定度进行了评定, 找出了实验过程中引入不确定度较大的因素, 并提出了有效控制不确定度的措施, 以保证实验数据的可靠性, 为凯氏定氮法在奶粉蛋白质测定中的准确性和可靠性提供了科学的依据和参考。

### 参考文献

[1] 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

监督管理总局. 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[2] 李花觉. 凯氏定氮法检测奶粉中蛋白质质量控制及注意事项[J]. 中国卫生产业, 2019, 16(10): 162-163.

[3] 王曙光. 凯氏定氮法测定奶粉中蛋白质应注意的环节[J]. 河南预防医学杂志, 2014, 25(01): 28-29.

[4] 周俞宏. 基于凯氏定氮法测定食物蛋白质含量要素探究[J]. 工业微生物, 2024, 54(02): 200-202.

[5] 孔美玲, 张晓萍. 影响凯氏定氮法测定蛋白质准确度的因素探讨[J]. 现代面粉工业, 2020, 34(03): 19-22.

[6] 杜蒙, 孙允超, 李雯雯, 等. 凯氏定氮法测定花生中蛋白质方法的优化[J]. 食品安全导刊, 2023, (18): 125-127, 131.

[7] 张林祥, 杜广华, 葛秀元, 等. 检验食品中蛋白质含量标准测定方法的改进[J]. 宝鸡文理学院学报(自然科学版), 2016, 36(01): 36-39.

[8] 黄漫蓉, 宋艳梅, 范光彩, 等. 凯氏定氮法检测乳制品中蛋白质含量的优化方法[J]. 中国乳业, 2023, (02): 87-90.

[9] 刘曼曼, 吴宏萍, 吴丽华, 等. 凯氏定氮法检测高粱中蛋白质含量的条件优化[J]. 酿酒, 2022, 49(04): 106-108.

[10] 王雪焦, 廉玮歆, 张心壮. 乳制品中蛋白质含量测定方法的研究进展[J]. 乳品与人类, 2023, (05): 52-59.

[11] 刘利娟. 乳及乳制品中蛋白质含量测定方法研究进展[J]. 轻工标准与质量, 2022, (01): 85-87.

[12] 卢锦斌, 张利敏, 徐秀容. 改良凯氏定氮法的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2020, 41(12): 84-87.

[13] 刘顺. 植物蛋白饮料中蛋白质含量的测定结果不确定度评价[J]. 轻工标准与质量, 2023, (06): 77-80.

[14] 李菊生, 吴伟都, 杨杨, 等. 奶粉中蛋白质含量测定的不确定度评定[J]. 饮料工业, 2023, 26(05): 30-35.

[15] 国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1—2012[S]. 北京: 中国质检出版社, 2012.

[16] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南: CNAS-GL006: 2019[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2019.

[17] 中国金属学会分析测试分会. 滴定法测量结果不确定度评定规范: CSM 01010101—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.

[18] 张伟. 凯氏定氮法测定食品中蛋白质[J]. 食品安全导刊, 2016, (24): 114.