

应用报告 | 杜马斯定氮法测定乳制品中蛋白质含量

一、前言

杜马斯定氮仪的原理是在高温有氧环境下，样品被催化燃烧生成 CO_2 、 H_2O 和 NO_x 等混合气体，所生成的干扰成分被一系列吸收剂去除，而 NO_x 则被还原为 N_2 ，并被热导检测器检测，整个分析过程仅需 3~5min。因此，与传统的凯氏定氮法相比，杜马斯定氮法不仅免去了样品前处理过程，并且避免了用户与化学试剂接触，具有快速便捷、绿色安全等显著优势。

由于国家标准《GB 5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》中规定了燃烧法仅作为食品中蛋白质测定的第三法，为了将其与第一法（仲裁法）凯氏定氮法结果相统一，本应用报告主要就蒙牛乳业相关产品（奶粉、牛奶以及酸奶等乳制品）中蛋白质含量的测定进行方法开发，使用“杜马斯定氮仪”（燃烧法）和凯氏定氮法测得乳制品中的蛋白质含量，并将两种方法的结果进行比对，得到了高钙奶粉、纯牛奶以及原味酸奶凯氏氮与杜马斯氮的比例系数（ $K=\text{KN}/\text{DN}$ ），分别为 0.9881、0.9674 和 0.9660。该比例系数便于用户直接使用杜马斯定氮仪在加工生产过程中对乳制品中的蛋白质含量进行监控。

二、杜马斯定氮仪测试方案

1、仪器与试剂

仪器：D200 杜马斯定氮仪、十万分之一分析天平；

试剂：氧气（纯度 > 99.999 %）、二氧化碳气（纯度 > 99.999 %）、L-天冬氨酸标准品（纯度 > 99 %）；

样品：蒙牛高钙奶粉、蒙牛纯牛奶、蒙牛原味酸奶。

2、样品前处理

对于奶粉及液体样品，在测试前需要充分混匀均质，保证样品均一。

3、样品称量与承装

样品称量使用的是十万分之一的天平，以 mg 为单位进行称量。

奶粉等固体粉末乳制品使用锡箔纸（5 cm×5 cm）承装，首先利用工装将锡箔纸压制成药碗状，置于天平并等待数值稳定后去皮，取 200mg 奶粉样品于锡箔纸称量碗中，等待数值稳定后记数，并将锡箔纸包裹成紧密的小球。

牛奶、酸奶等液体乳制品使用锡杯（Φ6 mm×16 mm）承装，首先将锡杯置于天平上并等待数值稳定后去皮，使用移液枪准确移取 200μL 即 200mg 左右的样品置于锡杯中，等待数值稳定后记数，并用镊子将锡杯口捏紧，从距离上端 2mm 处向下弯折，将弯折得到的两角内缩，最终得到奶盒状的样品球。

总而言之，乳制品的承装方式主要参考乳制品的状态，固态使用锡箔纸，液态使用锡杯；取样量参考乳制品的 N 含量，N 含量在 0.5%及以上取样量在 200mg 左右，在 0.5%以下取样量在 400mg 左右，因此低含量的液态乳制品需要更换大的锡杯。具体细节参考表格如下：

产品类型	含 N 量（约）	承装方式	取样量	备注
固体奶粉	3.10%	碗状锡箔纸	200mg	
液体牛奶	0.56%	6×16mm 锡杯	200mg	使用 200 μ L 移液枪
液体酸奶	0.49%		200mg	使用胶头滴管（7 滴左右）

3、样品测试流程

- ◆ 开机前准备：清理掉一级燃烧管中的灰分管后放回，在二级燃烧管上端加入再生剂，并检查干燥管是否需要更换；
- ◆ 开机：打开仪器开关、氧气及二氧化碳气瓶，并调节气瓶压力；
- ◆ 维护耗材周期：将灰分管、再生剂以及更换耗材的相应维护周期改为 0；
- ◆ 气密性检查：“打开 CO₂ 输入”，将 CO₂ 和 O₂ 流量改为 0，点击测试，要求气体流量 < 50 mL/min；
- ◆ 仪器升温：气密性和通畅性检查合格后，点击“开始升温”。等待仪器升至设定温度。
- ◆ 空白测试：仪器升至设定温度后，编辑空白样品信息，点击自动分析，至少测试三个空白，直至空白测试有效时间内（100s—265s）TCD 基线无波动，且 TCD 的数值在 200 unit 左右，说明仪器状态正常且稳定，可以进行样品测试；
- ◆ 标准品测试：称取 7 个 50mg 的天冬氨酸标准品，编辑样品信息，点击自动分析，第一个天冬氨酸不计入范围，再连续测试 3 个天冬氨酸进行日常系数校准，要求三次 RSD < 0.5%。点击计算日常系数，要求日常系数在 0.90—1.10 范围内（如日常系数不在范围内，需重新建立标准曲线），校正日常系数后，复测 3 个标准品，验证仪器校正后天冬氨酸的 N 含量是否在给定范围内，并计算连续 6 个标准品的 RSD 值。
- ◆ 样品测试：将包裹好的样品放入样品盘，编辑样品信息，具体实验方法参考下表，点击自动分析。

样品名称	取样量	实验方法					
		通氧时间	氧气流量	断氧阈值	自动归零	峰值预期	蛋白质系数
高钙奶粉	200mg	90s	180mL/min	0	130	130	6.38
牛奶	200mg	80s	150mL/min	0	130	130	
原味酸奶	200mg						6.25

- ◆ 仪器降温：测试完成后，点击开始降温，关闭二氧化碳、氧气气瓶总阀。燃烧管温度降至 300℃ 以下时，方可切断电源。

三、凯氏定氮仪测试方案

1、仪器与试剂

仪器：K1160 凯氏定氮仪、SH520 消解仪、S403 废气吸收系统、分析天平等；

试剂：混合指示剂（1g/L 甲基红乙醇溶液：1g/L 溴甲酚绿甲醇溶液=1:5）、硼酸接收液（20g/L+混合指示剂 ϕ =0.01）、硫酸标准滴定溶液（0.1mol/L）、氢氧化钠溶液（400g/L）、定氮片（4g/片，K₂SO₄:CuSO₄·5H₂O=9:1）；

样品：蒙牛高钙奶粉、蒙牛纯牛奶、蒙牛原味酸奶。

2、样品前处理

对于奶粉及液体样品，在测试前需要充分混匀均质，保证样品均一。

3、样品称量

样品称量使用的是万分之一的天平，以 g 为单位进行称量。

奶粉等固体粉末乳制品采用直接称量法，将称量纸置于天平并等待数值稳定后去皮，取 0.5g 奶粉样品于称量纸中，等待数值稳定后记数，并将称量纸同样品一起放入消化管中。

牛奶、酸奶等液体乳制品采用差减称量法，首先使用带有刻度的注射器吸取 3mL 液体样品，并置于天平并等待数值稳定后去皮，向消化管中缓慢注入 2mL 液体样品，再次置于天平中读数并记录。

4、样品消解

向样品及样品空白消化管中加入一片定氮片和 10mL 浓硫酸，使用 SH520 消解仪搭配 S403 废气吸收系统对样品进行消解，消解完成后，溶液呈现澄清透明的蓝绿色。消解程序参见下表：

阶段	消解温度/°C	保温时间/min
1	220	10
2	420	90
3	冷却	

5、样品测试

消解完成后，待样品冷却，上机测试。凯氏定氮仪参数设置参见下表。

蒸馏时间	蒸汽流量	碱液	滴定酸浓度	硼酸	稀释水
5min	100%	40mL	0.1081mol/L	20mL	50mL

四、凯氏定氮仪及杜马斯定氮仪测试结果比对

为了保证测试结果具备可比性，本次测试的同种的乳制品均为同一批次，且同一袋或同一瓶样品开封后同时进行两种方法的测定，并且不再重复使用。以下为连续三天重复测试三次的结果。注：表格中样品名称后提到的 P% 为样品营养标签中蛋白质的含量，高钙奶粉及纯牛奶的蛋白质换算系数为 6.38、原味酸奶的蛋白质换算系数为 6.25。

1. K1160 全自动凯氏定氮仪的测试结果

样品	次数	称样量/g	空白体积/mL	滴定体积/mL	氮含量/%	RSD/%	蛋白质含量/%
高钙奶粉 (P%=19.4%)	第一次	0.5002	0.0535	10.2840	3.0953	0.31	19.789
		0.5003		10.3402	3.1117		
		0.5007		10.3369	3.1082		
		0.5002		10.2716	3.0916		
	第二次	0.4998	0.0711	10.3361	3.1082	0.10	19.813
		0.5004		10.3469	3.1078		
		0.5006		10.3386	3.1040		

	第三次	0.5005	0.0513	10.3295	3.1019	0.50	19.742
		0.5006		10.2113	3.0715		
		0.5007		10.3063	3.0996		
		0.5000		10.2948	3.1005		
		0.5007		10.3270	3.1059		
纯牛奶 (P%=3.6%)	第一次	2.0517	0.0535	7.6556	0.5608	0.40	3.582
		2.0681		7.7382	0.5624		
		2.0309		7.6217	0.5640		
		2.0836		7.7465	0.5588		
	第二次	2.0347	0.0711	7.6721	0.5654	0.29	3.602
		2.1077		7.9383	0.5649		
		2.1391		8.0706	0.5660		
		2.1428		8.0318	0.5622		
	第三次	2.1105	0.0513	7.8366	0.5583	0.25	3.571
		2.0738		7.7407	0.5612		
		2.0580		7.6762	0.5607		
		2.0854		7.7539	0.5590		

样品	次数	称样量/g	空白体积/mL	滴定体积/mL	氮含量/%	RSD/%	蛋白质含量/%
原味酸奶 (P%=3.1%)	第一次	2.0693	0.0535	6.8411	0.4964	0.19	3.103
		2.0091		6.6427	0.4963		
		2.0119		6.6716	0.4978		
		2.0019		6.6080	0.4955		
	第二次	2.0911	0.0711	6.9494	0.4978	0.35	3.112
		2.1130		6.9982	0.4961		
		2.0210		6.7518	0.5003		
		2.0182		6.7047	0.4974		
	第三次	2.0287	0.0513	6.6898	0.4952	0.16	3.102
		2.1090		6.9759	0.4969		
		2.0568		6.8048	0.4969		
		2.0960		6.9230	0.4962		

样品独立三次的重复性计算:

样品	N 含量/%	N 含量平均值/%	RSD/%	绝对差值与算数平均值的比值/%
高钙奶粉 (P%=19.4%)	3.102	3.100	0.18	0.35
	3.105			
	3.094			
纯牛奶 (P%=3.6%)	0.561	0.562	0.47	0.89
	0.565			
	0.560			
原味酸奶 (P%=3.1%)	0.497	0.497	0.20	0.40
	0.498			
	0.496			

2. D200 杜马斯定氮仪的测试结果

样品	次数	仪器状态	称样量/mg	氮含量/%	氮含量平均值/%	RSD/%	蛋白质含量/%
高钙奶粉 (P%=19.4%)	第一次	50mg 标准品 天冬氨酸 N 平均值 10.553% RSD=0.266% (n=6)	200.12	3.133	3.140	0.54	20.031
			200.06	3.110			
			200.05	3.140			
			200.14	3.159			
			200.12	3.150			
			200.01	3.146			

	第二次	50mg 标准品 天冬氨酸 N 平均值 10.567% RSD=0.338% (n=5)	200.04	3.142	3.139	0.54	20.028	
			200.21	3.110				
			199.98	3.161				
			200.18	3.133				
			200.13	3.141				
	199.07	3.148						
	第三次	50mg 标准品 天冬氨酸 N 平均值 10.543% RSD=0.185% (n=6)	199.98	3.146	3.133	0.71	19.991	
			200.02	3.137				
			200.18	3.132				
			200.13	3.103				
200.03			3.116					
200.11	3.166							
纯牛奶 (P%=3.6%)	第一次	50mg 标准品 天冬氨酸 N 平均值 10.553% RSD=0.266% (n=6)	205.11	0.583	0.582	0.55	3.71	
			206.75	0.584				
			208.76	0.578				
			208.06	0.580				
			205.72	0.586				
	第二次	50mg 标准品 天冬氨酸 N 平均值 10.567% RSD=0.338% (n=5)	209.69	0.575	0.583	0.89	3.72	
			204.23	0.587				
			207.45	0.580				
			206.54	0.585				
			203.33	0.587				
	第三次	50mg 标准品 天冬氨酸 N 平均值 10.543% RSD=0.185% (n=6)	210.28	0.583	0.579	0.97	3.691	
			209.81	0.574				
			217.91	0.570				
			211.07	0.580				
			211.51	0.579				
	204.86	0.585						
	原味酸奶 (P%=3.1%)	第一次	50mg 标准品 天冬氨酸 N 平均值 10.553% RSD=0.266% (n=6)	234.15	0.521	0.518	0.46	3.236
				219.29	0.518			
233.45				0.519				
226.30				0.519				
227.29				0.515				
217.77		0.515						
第二次		50mg 标准品 天冬氨酸 N 平均值 10.567% RSD=0.338% (n=5)	238.01	0.500	0.506	0.69	3.161	
			230.48	0.506				
			220.78	0.508				
			230.60	0.510				
			222.17	0.507				
223.00		0.504						
第三次		50mg 标准品 天冬氨酸 N 平均值 10.543% RSD=0.185% (n=6)	243.73	0.520	0.520	0.60	3.251	
			239.74	0.518				
			234.79	0.518				
			230.61	0.526				
			231.86	0.518				
232.97		0.521						

样品独立三次的重复性计算:

样品	N 含量/%	N 含量平均值/%	RSD/%	绝对差值与算数平均值的比值/%
高钙奶粉 (P%=19.4%)	3.140	3.137	0.12	0.22
	3.139			
	3.133			
纯牛奶 (P%=3.6%)	0.582	0.581	0.36	0.52

	0.583	0.515	1.47	2.72
	0.579			
	0.518			
原味酸奶 (P%=3.1%)	0.506	0.515	1.47	2.72
	0.520			

由上述实验结果可以看出，固态奶粉、液态纯牛奶以及粘稠态酸奶样品的重复测定结果的绝对差值均不超过算数平均值的 3%，甚至有的重复测定结果的绝对差值不超过算数平均值的 1%。除此之外，杜马斯定氮法的重复性结果与凯氏定氮法的重复性结果非常接近。说明杜马斯定氮法测试固态奶粉、液态纯牛奶以及粘稠态酸奶样品具有良好的重复性，尤其是 N 含量高于 1% 的固态样品，重复性会更好。

3. 杜马斯定氮法结果与凯氏定氮法结果的准确性偏差

样品	KN/%	DN/%	绝对差值与算数平均值的比值/%
高钙奶粉 (P%=19.4%)	3.100	3.137	1.19
纯牛奶 (P%=3.6%)	0.562	0.581	3.32
原味酸奶 (P%=3.1%)	0.497	0.515	3.56

由上述计算结果可以看出，就固态奶粉、液态纯牛奶以及粘稠态酸奶样品而言，使用杜马斯定氮法测得结果与凯氏定氮法的结果准确性偏差均小于 4%。重复性及准确性计算结果表明，使用适当的比例系数时，用 DN 取代 KN 来测定乳制品中的 N 含量和粗蛋白含量是可行的。

4. KN 与 DN 的比例系数计算

在此将高钙奶粉、纯牛奶及原味酸奶的相应比例系数分别强制规定为 K_G 、 K_C 、 K_Y ， $K=KN/DN$ 。根据已列出的数据计算出的 K_G 的平均值为 0.9881 (RSD=0.58%)， K_G 范围在 0.9792 和 0.9990 之间 (n=18)； K_C 的平均值为 0.9674 (RSD=0.86%)， K_C 范围在 0.9574 和 0.9860 之间 (n=16)； K_Y 的平均值为 0.9660 (RSD=0.73%)， K_C 范围在 0.9449 和 0.9861 之间 (n=18)。

5. 高钙奶粉、纯牛奶及原味酸奶的比例系数验证

高钙奶粉、纯牛奶及原味酸奶的 KN 与 DN 的比例系数一旦确定，则粗蛋白 (Crude protein, Cp) 含量的有两个计算公式，即 $C_{p1}=6.38 \times KN$ ， $C_{p2}=6.38 \times K \times DN$ 。因此通过判断两种计算方式得到的 C_{p1} 与 C_{p2} 是否有显著差异，即可判断 K_G 、 K_C 、 K_Y 三个比例系数是否可靠。

三种乳制品通过两种公式计算得到的粗蛋白含量及两组数据经过 t 检验后的 P 值如下表所示，其中三组的 P 值均小于 0.05，说明由 KN 得到的粗蛋白含量与由 DN 经过系数校正后得到的粗蛋白含量之间无明显差异，说明 $K_G=0.9881$ 、 $K_C=0.9674$ 、 $K_Y=0.9660$ 分别对高钙奶粉、纯牛奶及原味酸奶得到的 DN 进行校正正是可靠的。

样品名称	KN%	DN%	蛋白换算系数	$C_{p1}/\%$	$C_{p2}/\%$	P
高钙奶粉 (P%=19.4%)	3.0953	3.139	6.38	19.7	19.8	0.14
	3.1117	3.140		19.9	19.8	
	3.1082	3.114		19.8	19.6	
	3.0916	3.145		19.7	19.8	

	3.1082	3.157		19.8	19.9	
	3.1078	3.113		19.8	19.6	
	3.1040	3.070		19.8	19.4	
	3.1019	3.124		19.8	19.7	
	3.0715	3.160		19.6	19.9	
	3.0996	3.112		19.8	19.6	
	3.1005	3.130		19.8	19.7	
	3.1059	3.106		19.8	19.6	
纯牛奶 (P%=3.6%)	0.5608	0.572		3.6	3.5	0.60
	0.5624	0.578		3.6	3.6	
	0.5640	0.569		3.6	3.5	
	0.5588	0.583		3.6	3.6	
	0.5654	0.574		3.6	3.5	
	0.5649	0.570		3.6	3.5	
	0.5660	0.582		3.6	3.6	
	0.5622	0.587		3.6	3.6	
	0.5583	0.592		3.6	3.7	
	0.5612	0.609		3.6	3.8	
	0.5607	0.588		3.6	3.6	
	0.5590	0.588		3.6	3.6	
样品名称	KN%	DN%	蛋白换算系数	Cp1/%	Cp2/%	P
原味酸奶 (P%=3.1%)	0.4964	0.506	6.25	3.1	3.1	0.21
	0.4963	0.518		3.1	3.1	
	0.4978	0.521		3.1	3.1	
	0.4955	0.503		3.1	3.0	
	0.4978	0.520		3.1	3.1	
	0.4961	0.514		3.1	3.1	
	0.5003	0.526		3.1	3.2	
	0.4974	0.528		3.1	3.2	
	0.4952	0.511		3.1	3.1	
	0.4969	0.523		3.1	3.2	
	0.4969	0.522		3.1	3.2	
	0.4962	0.516		3.1	3.1	

五、结论

本应用报告分别使用 D200 杜马斯定氮仪及 K1160 凯氏定氮仪对高钙奶粉、纯牛奶以及原味酸奶中蛋白质含量进行重复测定。两种仪器针对三种乳制品的重复测定结果的绝对差值均不超过算数平均值的 3%，且两种仪器之间的结果准确性偏差均小于 4%。高钙奶粉、纯牛奶以及原味酸奶的 KN 与 DN 的比值分别为 $K_c=0.9881$ 、 $K_c=0.9674$ 、 $K_v=0.9660$ 。除此之外，由 KN 得到的蛋白质含量与由 DN 经过比例系数校正后得到的蛋白质含量均通过 t 检验证明两者无明显差异。表明使用相应的比例系数时，杜马斯定氮仪可以取代凯氏定氮仪来测定乳制品中的 N 和蛋白质含量。便于用户使用杜马斯定氮仪在加工生产过程中对乳制品中的蛋白质含量进行监控。

参考文献

- [1] GB5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定 [S].
- [2] A H Simonne, E H Simonne, R R Eitenmiller, et al. Could the Dumas Method Replace the Kjeldahl

Digestion for Nitrogen and Crude Protein Determinations in Foods[J]. J Sci Food Agric 1997, 73, 39-45.