

凯氏定氮法测定重组胶原蛋白产品中的真蛋白含量

一、前言

重组胶原蛋白作为生物医药与护肤领域的高效活性原料，其真蛋白含量直接决定产品的功效与质量。然而，产品中游离氨基酸、短肽等非蛋白氮的存在，导致传统凯氏定氮法测定的总氮值虚高，无法真实反映有效成分含量。《中国药典》2020 版通则 0731 “蛋白质含量测定法”中明确规定了钨酸沉淀法的应用，旨在通过选择性沉淀真蛋白进而通过差减法测得样品中的真蛋白含量。

本方案基于 2020 版《中国药典第四部》0704 氮测定法和 0731 蛋白质含量测定法 第一法凯氏定氮法，对重组胶原蛋白产品中的真蛋白含量进行测定。旨在为重组胶原蛋白产品的生产企业、第三方检测机构及监管部门提供可靠的技术支持，助力产品质量提升、生产工艺优化及市场合规性审查，同时为胶原蛋白类产品的功效宣称与标准化评价体系构建提供科学依据，促进胶原蛋白产品的规范化与高质量发展。

二、仪器与试剂

2.1、仪器

K1160 全自动凯氏定氮仪、SH420F 石墨消解仪、分析天平等。

2.2、试剂

甲基红、溴甲酚绿、硼酸、氢氧化钠、无水硫酸钾、五水合硫酸铜、浓硫酸、钨酸钠。

2.3、样品

重组胶原蛋白喷剂产品。

三、实验方案

3.1、试剂配制

(1) 甲基红溶液 (1g/L)：称取 100mg 甲基红溶于 95%乙醇，用 95%乙醇稀释至 100mL。

(2) 溴甲酚绿溶液 (1g/L): 称取 100mg 溴甲酚绿溶于 95%乙醇, 用 95%乙醇稀释至 100mL。

(3) 甲基红-溴甲酚绿溶液: 将甲基红试液与溴甲酚绿试液按照体积比为 1:5 进行混合。

(4) 硼酸溶液 (20g/L): 称取 100g 硼酸, 加水溶解后并稀释至 5L。按照 100:1 的比例向 5L 硼酸溶液中加入 50mL 甲基红-溴甲酚绿试液并搅拌均匀。

(5) 氢氧化钠溶液 (40g/L): 称取 200g 氢氧化钠加水溶解后, 冷却, 并稀释至 5L。

(6) 钨酸钠溶液 (10%): 称取 10g 钨酸钠, 加入纯水溶解并定容至 100mL。

(7) 硫酸溶液 (0.33mol/L), 在 100mL 容量瓶中加入部分水, 移取 1.79mL 浓硫酸, 缓慢加入后轻摇, 冷却至室温后, 加水定容并摇匀。

3.2、样品称量

(1) 总氮含量测试: 通过减量法准确称取样品 5g 左右 (精确至 0.1mg), 并转移至洁净的消化管中。

(2) 非蛋白氮含量测试: 通过减量法准确称取样品 5g 左右 (精确至 0.1mg), 置于 20mL 容量瓶中, 加入 10mL 的纯水、2mL 的 10%钨酸钠溶液和 2mL 的 0.33mol/L 硫酸溶液, 加水定容至刻度。摇匀, 静置 30 分钟后, 于 3000rpm 下离心 5min 以促进样品过滤。随后取上清液进行过滤, 弃去初滤液 (约 5 滴), 取续滤液, 使用 10mL 移液管准确量取 10mL 滤液于消化管中待测。空白消化管中则需加入 8mL 的纯水、1mL 的 10%钨酸钠溶液和 1mL 的 0.33mol/L 硫酸溶液。

3.3、消解

向空白及样品消化管中加入 0.2g 硫酸铜、3g 硫酸钾和 10mL 浓硫酸后上机消解, 消解程序如表一:

表一 SH420F 石墨消解仪消解程序设置

阶段	温度梯度/°C	保温时间/min
1	220	20
2	420	90

3.4 蒸馏与滴定

待消解程序完成，消化管冷却并无酸雾后，使用凯氏定氮仪进行检测，定氮仪参数设置如表二：

表二 K1160 全自动凯氏定氮仪试验参数设置

滴定液/ (H ⁺) mol/L	硼酸/mL	氢氧化钠/mL	稀释水/mL	蒸馏时间/min
0.0205	30	40	40	5

四、测试结果

样品经消解和上机测试，重组胶原蛋白产品中总氮、非蛋白氮及真蛋白含量如表三至表五所示：

表三 样品中总氮含量表

样品名称	称样量/g	空白体积/mL	滴定体积/mL	氮含量/ (g/100g)	氮含量均值/ (g/100g)
喷剂	5.1538	0.3515	2.9733	0.0146	0.0146
	5.0582		2.8940	0.0145	

表四 样品中非蛋白氮含量表

样品名称	称样量/g	空白体积/mL	滴定体积/mL	非蛋白氮含量/ (g/100g)	非蛋白氮含量均值/ (g/100g)
喷剂	5.1594	0.2428	1.2986	0.0118%	0.0117
	5.0236		1.2529	0.0116%	

注：由于测试过程中取了实际滤液总量的 1/2 (10mL)，故表中非蛋白氮含量（实际含量）为上机测试值 ×2。

表五 样品中真蛋白含量表

样品名称	总氮含量/ (g/100g)	非蛋白氮含量/ (g/100g)	真蛋白含量/ (g/100g)
喷剂	0.0146	0.0117	0.0181

注：表中真蛋白含量=（样品总氮含量-非蛋白氮含量）×蛋白转换系数（6.25）。

五、结论

经测试，重组胶原蛋白产品中的总氮、非蛋白氮和真蛋白含量分别为 0.0146g/100g、0.0117g/100g 和 0.0181g/100g。实验结果表明，凯氏定氮仪可用于检测重组胶原蛋白产品中的真蛋白含量。

六、参考标准

[1] 《中国药典第四部》0704 氮测定法和 0731 蛋白质含量测定法 第一法凯氏定氮法。