

大豆中氮及蛋白质含量的测定

——杜马斯燃烧法与凯氏定氮法的比对研究

一、前言

大豆作为重要的油料与蛋白来源，其籽粒中蛋白质含量的准确测定是衡量品质、指导贸易与加工的关键环节。这一检测需求贯穿于粮食收储、油脂加工、饲料生产、食品制造、质量监管及科研机构等全产业链。目前，蛋白质测定主要遵循《GB 5009.5-2025 食品安全国家标准 食品中蛋白质含量的测定》采用经典的凯氏定氮法，但该方法流程繁琐、耗时较长，且涉及浓硫酸、氢氧化钠等危险化学品，存在安全与环保隐患。与之相比，基于《NY/T 2007-2011 谷类、豆类粗蛋白质含量的测定 杜马斯燃烧法》标准的杜马斯燃烧法，通过高温燃烧原理，具备快速（3-5 分钟/样）、自动化、无需有毒试剂、安全环保等显著优势。

为系统评估并推广杜马斯燃烧法在大豆检测中的适用性，本研究选用美国与乌拉圭大豆样品，严格依据标准方法，使用多台 D200 杜马斯定氮仪与 K1160 全自动凯氏定氮仪开展了详尽的比对分析。从测定准确性上看，杜马斯燃烧法测试美国大豆和乌拉圭大豆中氮与蛋白质含量均略高于凯氏定氮法，氮含量平均结果的绝对差值介于 0.112%至 0.127%之间。为了评估两种方法之间的差异来源，进一步采用紫外分光光度法对大豆中的硝态氮进行测定，测试结果表明样品中微量硝态氮是导致差异的潜在因素之一。从结果精密度上看，杜马斯法表现出良好的重复性与重现性，其精密度与凯氏定氮法处于同一水平。本方案不仅验证了杜马斯燃烧法的准确性与可靠性，更通过优化的前处理与仪器参数，提供了一套即用型解决方案。实践证明，杜马斯燃烧法在保证数据准确的前提下，实现了对检测效率、操作安全与环保效益的全面提升，是大豆蛋白质含量测定中极具推广价值的现代化选择。

二、仪器与试剂

2.1 仪器

仪器：D200 杜马斯定氮仪、K1160 全自动凯氏定氮仪、SH520 自动消解仪、紫外分光光度计、万分之一分析天平、十万分之一分析天平。

2.2 试剂

杜马斯燃烧法所需试剂：氧气（纯度 > 99.999 %）、二氧化碳气（纯度 > 99.999 %）、线状氧化铜、线状铜、铂催化剂、刚玉球、再生剂、银丝。

杜马斯燃烧法所需标准品：L-天冬氨酸标准品（纯度 > 99 %）。

凯氏定氮法所需试剂：混合催化剂（4g/片，五水硫酸铜：硫酸钾=1:9）、浓硫酸、氢氧化钠溶液（400g/L）、硼酸溶液（20g/L）、硫酸标准滴定溶液 $[c(1/2H_2SO_4)]=0.1mol/L$ 。

硝态氮含量测定所需试剂：过氧化氢溶液、硝酸钾（优级纯）。

2.3 样品

美国大豆、乌拉圭大豆。

三、杜马斯定氮法及凯氏定氮法测试方案

3.1 样品前处理

3.1.1 取样

取样应具有代表性，取样量应不少于 20g，带壳种子需挑拣干净脱壳。

3.1.2 样品充分混匀

为保证取样均匀，粉碎过筛前需将样品充分混匀。

3.1.3 粉碎与过筛

①称取 $\geq 20g$ 样品，保水磨粉碎后过 20 目筛（孔径 0.9mm），未通过筛网的颗粒需重新研磨至全部过筛。②取部分 20 目筛后样品过 40 目筛（孔径 0.45mm），未通过颗粒重新研磨至全部过筛。

3.2 杜马斯燃烧法

3.2.1 样品称量

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。

称取大豆样品 400mg（精确至 0.01mg）左右样品，包裹在锡箔纸中，并将锡箔纸团成紧密的样品球，放入样品盒备用。

3.2.2 上机测试

仪器校正：称取 300mg 天冬氨酸标准品进行仪器日常系数校正。

将标准品和样品置于样品盘中，根据样品重量选择相应方法，开始测试。测试方法参数如表一：

表一 D200 杜马斯定氮仪方法参数设置

方法名称	300mg 天冬氨酸	400mg 大豆
通氧时间	90s	100s
氧气流量	210mL/min	300mL/min
断氧阈值	0%	0%
自动归零	130 s	130 s
峰值预期	130 s	130 s
积分重启延迟	0 s	0 s
蛋白质换算系数	—	6.25

3.3 凯氏定氮法

3.3.1 取样

称取固体样品 0.5g，精确至 0.1mg，使用称量纸包裹样品，一同放入消化管中。最后向样品空白消化管及样品消化管中均加入一片定氮片和 10mL 浓硫酸。

注：为保证样品及样品空白消解内容的一致性，需要向样品空白消化管中加入一张称量纸，随样品一起消解。

3.3.2 样品消解

使用 SH520 自动消解仪对样品进行消解，消解完成后，溶液呈现澄清透明的蓝绿色。消解程序参见表二：

表二 消解程序

阶段	温度梯度/°C	保温时间/min
1	420	90
2	冷却	-

3.3.3 蒸馏

待消解程序完成、消化管冷却并无酸雾后，上凯氏定氮仪检测。定氮仪参数设置如表三：

表三 K1160 全自动凯氏定氮仪试验参数设置

滴定酸 (H ⁺) mol/L	硼酸/mL	氢氧化钠/mL	稀释水/mL	蒸馏时间/min	蒸汽流量%
0.1	25	30	40	5	100

四、大豆样品中硝态氮含量的测定

4.1 样品前处理

准确称取烘干后的植物样品 0.5g 置于消化管中，加入 6mL 浓硫酸，混匀浸润放置过夜。在消解仪上慢慢加热至开始冒白烟，控温稍冷（约 1min），逐滴加入 20 滴 H₂O₂ 溶液，继续加热微沸几分钟，再放冷，滴加 H₂O₂ 数滴，以此反复多次，直至消煮液完全清亮为止，最后一次应微沸 15min，以除尽剩余 H₂O₂，冷却后加入无氨水 10mL，移入 50mL 容量瓶中，定容。

4.2 标准曲线的绘制

硝酸钾标准储备液 (ρ (N) =10mg/L)：称取 0.0722g 硝酸钾溶于适量水中，并定容至 1000mL。

分别吸取硝酸钾标准溶液 0,1,2,3,4,5,6,10mL 于 50mL 比色管中，各加入 1mL 空白消煮液，加水定容至 50mL 并摇匀，使用 1cm 石英比色皿在紫外分光光度计上测试 210nm 处的吸光度。并绘制吸光

度和浓度的标准曲线。

4.3 样品中硝态氮含量的测定

吸取 5mL 消煮液于 50mL 比色管中，用无氨水稀释至刻度，摇匀，在波长 210nm 处，用 1cm 石英比色皿，以无氨水作参比，在紫外分光光度计进行硝态氮测定。

五、实验结果

5.1 D200 杜马斯定氮仪测试大豆中氮及蛋白质含量

三台 D200 杜马斯定氮仪测试大豆中氮及蛋白质含量如表四所示：

表四 三台 D200 杜马斯定氮仪测试大豆中氮及蛋白质含量

设备 编号	样品 名称	取样量 (mg)	氮含量 (%)	重复性精密度 (%)	重复性 限 r	氮含量平均值 (%)	重现性精密度 (%)	重现性 限 R	蛋白质含量 (%)	蛋白质含量平均值 (%)	RSD (%)
1	美国 大豆	399.97	5.740	0.063	0.063	5.744	0.017	0.024	35.875	35.898	0.39
		399.89	5.701						35.631		
		399.95	5.754						35.963		
		399.98	5.764						36.025		
		399.97	5.756						35.975		
		400.03	5.747						35.919		
2		399.93	5.756	0.009	0.011	5.751			35.975	35.946	0.07
		400.08	5.750						35.938		
		400.11	5.748						35.925		
		400.01	5.756						35.975		
		399.94	5.747						35.919		
		399.89	5.751						35.944		
3		400.05	5.753	0.022	0.025	5.761			35.956	36.003	0.15
		400.02	5.774						36.088		
		400.05	5.768						36.050		
		399.99	5.756						35.975		
		399.98	5.760						36.000		
		399.86	5.752						35.950		
1	乌拉 圭大 豆	400.10	5.963	0.062	0.060	5.965	0.050	0.073	37.269	37.278	0.36
		399.99	5.928						37.050		
		400.00	5.958						37.238		
		399.95	5.981						37.381		
		400.12	5.990						37.438		
		399.94	5.967						37.294		
		399.76	5.925	0.023	0.022	5.929			37.031	37.054	0.14

3		399.81	5.939						37.119		
		399.78	5.916						36.975		
		399.88	5.929						37.056		
		399.64	5.928						37.050		
		399.92	5.935						37.094		
		399.61	5.918	0.020	0.020	5.914			36.988	36.963	0.12
		399.65	5.914						36.963		
		399.84	5.913						36.956		
		400.23	5.901						36.881		
		399.62	5.921						37.006		
		399.93	5.917						36.981		

备注：《NY/T 2007-2011 谷类、豆类粗蛋白质含量的测定 杜马斯燃烧法》中提到，对于重复性而言，两次测定结果的绝对差值大于重复性限 r 值的情况不超过 5%；对于重现性而言，两次测定结果的绝对差值大于再现性限 R 值的情况不超过 5%。其中重复性限 r 值和再现性限 R 值的计算公式如下：

$$r = 2.8S_r$$

$$R = 2.8S_R$$

式中： S_r ——重复性标准偏差；

S_R ——再现性标准偏差。

如表四所示，编号 1、2、3 D200 杜马斯定氮仪连续六次测试美国大豆样品和编号 3 D200 杜马斯定氮仪连续六次测定乌拉圭大豆的氮含量绝对差值均 $\leq$ 相应的重复性限 r ，编号 1 和编号 2 D200 杜马斯定氮仪连续六次测定乌拉圭大豆的氮含量绝对差值略高于相应的重复性限 r ；三台 D200 杜马斯定氮仪测试同一大豆样品的氮含量平均值的绝对差值均小于相应的重现性 R 值。证明 D200 杜马斯定氮仪在测试大豆样品上表现出良好的测试效果。

5.2 K1160 全自动凯氏定氮仪测试大豆中氮及蛋白质含量

三台 K1160 全自动凯氏定氮仪测试大豆中氮及蛋白质含量如表五所示:

表五 三台 K1160 全自动凯氏定氮仪测试大豆中氮及蛋白质含量

设备 编号	样品 名称	取样量 (g)	空白体积 (mL)	滴定体积 (mL)	氮含量 (%)	重复性 精密密度 (%)	重复性限 r	氮含量平 均值 (%)	重现性精密密度 (%)	重现性限 R	蛋白质含量 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	美国 大豆	0.5018	0.0398	19.4953	5.6668	0.054	0.057	5.636	0.057	0.081	35.4177	35.2272	0.36
		0.5042		19.4812	5.6358						35.2236		
		0.5065		19.4912	5.6131						35.0816		
		0.5056		19.5700	5.6458						35.2865		
		0.5010		19.3784	5.6418						35.2611		
		0.5085		19.5741	5.6148						35.0926		
2		0.5061	0.0844	19.7326	5.6743	0.037	0.040	5.670			35.4647	35.4379	0.25
		0.5084		19.8241	5.6750						35.4686		
		0.503		19.6564	5.6872						35.5449		
		0.5045		19.6838	5.6782						35.4888		
		0.5011		19.4552	5.6501						35.3129		
		0.5051		19.629	5.6556						35.3475		
3		0.4993	0.0541	19.2252	5.6120	0.067	0.071	5.613			35.0747	35.0792	0.45
		0.4998		19.3028	5.6290						35.1814		
		0.502		19.1582	5.5623						34.7641		
		0.5023		19.3862	5.6253						35.1580		
		0.5029		19.4027	5.6234						35.1460		
		0.4994		19.2706	5.6241						35.1507		
1	乌拉 圭大 豆	0.507	0.0398	20.2334	5.8215	0.057	0.056	5.799	0.070	0.100	36.3843	36.2466	0.34
		0.5024		19.9672	5.7974						36.2334		
		0.5063		20.1472	5.8047						36.2791		
		0.5031		19.9846	5.7943						36.2146		
		0.5024		19.8544	5.7645						36.0283		
		0.5052		20.1372	5.8144						36.3400		
2		0.5076	0.0844	20.4896	5.8756	0.071	0.083	5.849			36.7222	36.5585	0.51
		0.5008		20.0192	5.8180						36.3628		
		0.5037		20.1787	5.8308						36.4427		
		0.5009		20.0395	5.8228						36.3926		
		0.5057		20.3586	5.8598						36.6235		
		0.5055		20.4521	5.8891						36.8070		
3		0.5008	0.0491	19.8529	5.7798	0.116	0.105	5.780			36.1237	36.1237	0.65
		0.4997		19.7621	5.7660						36.0373		
		0.4994		19.5977	5.7213						35.7582		

		0.4997		19.8504	5.7918						36.1987		
		0.5001		20.0214	5.8371						36.4821		
		0.4999		19.8273	5.7827						36.1420		

备注：《NY/T 2007-2011 谷类、豆类粗蛋白质含量的测定 杜马斯燃烧法》中提到，对于重复性而言，两次测定结果的绝对差值大于重复性限 r 值的情况不超过 5%；对于重现性而言，两次测定结果的绝对差值大于再现性限 R 值的情况不超过 5%。其中重复性限 r 值和再现性限 R 值的计算公式如下：

$$r = 2.8S_r$$

$$R = 2.8S_R$$

式中： S_r ——重复性标准偏差；

S_R ——再现性标准偏差。

如表五所示，编号 1、2、3 K1160 全自动凯氏定氮仪连续六次测试美国大豆和编号 2 K1160 全自动凯氏定氮仪连续六次测试乌拉圭大豆氮含量绝对差值均 $\leq$ 相应的重复性限 r ，编号 1 和编号 3 K1160 全自动凯氏定氮仪连续六次测试乌拉圭大豆氮含量绝对差值略高于相应的重复性限 r ；三台 K1160 全自动凯氏定氮仪测试同一大豆样品的氮含量平均值的绝对差值均小于相应的重现性 R 值。证明 K1160 全自动凯氏定氮仪在测试大豆样品上也表现出良好的测试效果。

表四和表五中的蛋白质含量均为湿基含量，如果要获得样品的干基蛋白质含量，可对样品进行水分含量测定，并将水分值带入公式即可获得样品的干基蛋白质含量。

5.3 D200 杜马斯定氮仪与 K1160 全自动凯氏定氮仪测定结果比对

两款仪器测试大豆样品中氮含量的比对如表六所示：

表六 两款仪器测试大豆样品中氮含量的比对表

设备 编号	杜马斯燃烧法				凯氏定氮法			绝对差值 (%)	KN/DN
	样品 名称	氮含量(DN, g/100g)	重复性 精密度 (%)	重现性 精密度 (%)	氮含量(KN, g/100g)	重复性 精密度 (%)	重现性 精密度 (%)		
1	美国	5.744	0.063	0.017	5.636	0.054	0.057	0.112	0.980
2	大豆	5.751	0.009		5.670	0.037			

3		5.761	0.022		5.613	0.067			
1	乌拉	5.965	0.062	0.050	5.799	0.057	0.070	0.127	0.979
2	圭大	5.929	0.023		5.849	0.071			
3	豆	5.914	0.020		5.780	0.116			

5.4 美国大豆中的硝态氮含量

经紫外分光光度法测定美国大豆中的硝态氮含量如表七所示：

表七 紫外分光光度法测定美国大豆中的硝态氮含量

样品	取样量(g)	吸光度	硝态氮含量(mg/mL)	硝态氮含量(%)	平均值(%)
美国大豆	0.4921	0.946	0.0016	0.1591	0.1576
	0.5074	0.957	0.0016	0.1560	

由表七可知，美国大豆中含有少量的硝态氮，且硝态氮含量与杜马斯燃烧法和凯氏定氮法测试结果的绝对差值比较接近，说明样品中的硝态氮是造成两种方法数据差异的原因之一，但可能并非是唯一影响因素。

六、注意事项

- 1、样品的均匀程度和粉碎程度直接影响测试结果的平行性，因此建议对样品进行充分研磨。
- 2、全天连续测试时，建议上午和下午进行两次“仪器日常系数校正”。
- 3、按照本方案进行测试时，灰分管的维护周期为 60 次，即每测 60 个样品需要清理一次灰分管里的灰分。

七、实验结论

- 1、杜马斯燃烧法测试美国大豆和乌拉圭大豆中氮与蛋白质含量均略高于凯氏定氮法，将凯氮的结果与杜马斯的结果相除，得到两者的比例系数 KN/DN 均在 0.979~0.980 范围内。这与相应的文件测试结论保持一致。
- 2、通过测试美国大豆中的硝态氮含量可以说明大豆中存在的硝态氮是造成杜马斯燃烧法和凯氏定氮法结果差异的原因之一，但可能并非唯一印象因素。
- 3、使用杜马斯燃烧法和凯氏定氮法测得美国大豆样品中氮含量结果的重复性精密度和重现性精密度

均小于相应的重复性限 r 值和现性限 R 值。使用杜马斯燃烧法和凯氏定氮法测得乌拉圭大豆样品中氮含量时，均有个别重复性精密度略高于相应的重复性限 r 值，这可能与乌拉圭大豆样品基质有一定关系。就结果看，杜马斯燃烧法与凯氏定氮法的结果精密度在同一水平。

4、与凯氏定氮法相比，杜马斯燃烧法无需任何危险化学品试剂（如浓硫酸、氢氧化钠），从根本上杜绝了化学废液的处理难题，操作更加安全环保；无需复杂的消解、蒸馏等前处理步骤，极大地简化了工作流程；支持大批量样品连续自动检测、无人值守，将单样检测时间从数小时缩短至 3-5 分钟，大批量测试效率极高。这些特点使得杜马斯定氮法尤其适用于生产型企业对检测效率、操作安全及成本控制有高要求的应用场景。

5、本方案提供大豆样品的即用型测试参数，包括精确的取样量建议和优化的仪器方法，相关企业在测试大豆时可直接使用杜马斯燃烧法进行样品测试。确保用户能够快速、顺利地获得准确可靠的测定结果。

参考文献

- [1] NY/T 2007-2011 谷类、豆类粗蛋白质含量的测定 杜马斯燃烧法 [S].
- [2] 郭望山, 孟庆翔. 杜马斯燃烧法与凯氏法测定饲料含氮量的比较研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(5): 464-468.
- [3] 吕伟仙, 葛滢, 吴建之, 等. 植物中硝态氮、氨态氮、总氮测定方法的比较研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(2): 204-206.
- [4] HJ 636-2012 水质总氮的测定碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法 [S].