

大豆分离蛋白中蛋白质含量的测定

——杜马斯燃烧法与凯氏定氮法的比对研究

一、前言

大豆分离蛋白是以低温脱脂豆粕为原料，经现代加工技术分离、纯化得到的高纯度植物蛋白产品。因其具有优异的凝胶性、乳化性及高营养特性，被广泛应用于肉制品、乳制品、烘焙食品、营养补充剂、素食代餐等领域。食品生产企业、质检机构、第三方实验室、科研院校及监管部门等相关单位，在原料验收、生产过程控制、成品检验、产品研发及合规性评估中，均需对其核心品质指标——蛋白质含量进行准确测定。

准确测定大豆分离蛋白中的氮含量并换算为蛋白质含量，对保障产品质量、控制成本、规范产品标识及维护市场公平具有关键意义。目前，蛋白质含量测定主要采用凯氏定氮法（经典方法）及杜马斯燃烧法（现代方法）。凯氏定氮法虽结果可靠，但操作繁琐、耗时较长，且涉及强酸强碱的使用，存在安全与环境负担。相比之下，杜马斯燃烧法基于样品在高温富氧环境下燃烧并检测释放的氮氧化物，具有分析速度快（通常仅需 3-5 分钟）、自动化程度高、无需使用有害化学试剂、绿色环保等显著优势，更适用于高通量、高效率的现代检测需求。

为推广杜马斯燃烧法在高蛋白基质中的应用，本方案依据《GB/T 31578-2015 粮油检验 粮食及制品中粗蛋白测定 杜马斯燃烧法》标准，针对大豆分离蛋白样品进行了系统的方法开发与条件优化，旨在建立一套即用性强、操作规范、结果可靠的测试流程，为相关实验室提供可直接采纳的解决方案。同时，为帮助未接触过该方法的用户直观理解其可靠性，本方案对杜马斯燃烧法与凯氏定氮法进行了详细的比对研究。结果表明：两种方法测得的氮含量差异较小，通常在 0.051%–0.145% 之间；杜马斯燃烧法表现出良好的重复性与重现性，能够在大幅提升检测效率的同时，保证结果的准确性与稳定性，具备在实际检测中替代或补充传统方法的明显优势。

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、万分之一分析天平、十万分之一分析天平；

2.2 试剂

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、L-天冬氨酸标准品（纯度 > 99 %）、混合催化剂（4g，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（ $[c(1/2H_2SO_4)]=0.1mol/L$ ）；

2.3 样品

大豆分离蛋白。

三、杜马斯定氮法及凯氏定氮法测试方案

3.1 杜马斯燃烧法

3.1.1 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。

称取大豆分离蛋白样品 300mg（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。

3.1.2 上机测试

仪器校正：称取 350mg 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	350mg 天冬氨酸	300mg 大豆分离蛋白
通氧时间	90s	80s
氧气流量	300mL/min	150mL/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

3.2 凯氏定氮法

3.2.1 取样

称取固体样品 0.2g，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。

3.2.2 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	-

3.2.3 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%
0.1007	30	40	50	5	100

四、实验结果

4.1 D200 杜马斯定氮仪测试大豆分离蛋白中氮及蛋白质含量

D200 杜马斯定氮仪连续三天测试大豆分离蛋白中氮及蛋白质含量如表四所示：

表四 D200 杜马斯定氮仪连续三天测试大豆分离蛋白中蛋白质含量

测试批次	样品 编号	取样量 (mg)	氮含量 (%)	重复性精密度 (%)	重复性 r	氮含量平均值 (%)	重现性精密度 (%)	重现性 R	蛋白质含量 (%)	蛋白质含量平均值 (%)
第一天	1	299.87	13.460	0.058	0.060	13.454	0.024	0.038	84.125	84.085
		299.81	13.460						84.125	
		300.11	13.422						83.888	
		300.38	13.480						84.250	
		300.35	13.466						84.163	
		300.10	13.434						83.963	
第二天		299.90	13.452	0.038	0.038	13.476			84.075	84.225
		299.94	13.490						84.313	
		299.91	13.479						84.244	
		300.12	13.469						84.181	
		300.00	13.484						84.275	
		300.01	13.482						84.263	
第三天		299.97	13.446	0.041	0.044	13.452			84.038	84.072
		300.01	13.443						84.019	
		300.02	13.430						83.938	
		299.83	13.471						84.194	
		300.11	13.469						84.181	
		300.28	13.450						84.063	
第一天	2	300.02	13.625	0.068	0.072	13.612	0.014	0.020	85.156	85.074
		299.82	13.586						84.913	
		300.12	13.584						84.900	
		300.12	13.605						85.031	
		300.13	13.652						85.325	
		299.91	13.619						85.119	
第二天		300.34	13.625	0.057	0.062	13.626			85.156	85.160
		300.03	13.651						85.319	
		300.12	13.612						85.075	
		300.14	13.622						85.138	
		299.93	13.650						85.313	
		300.13	13.594						84.963	
第三天		299.87	13.594	0.075	0.081	13.615			84.963	85.092

		299.88	13.607						85.044	
		300.07	13.618						85.113	
		300.02	13.650						85.313	
		300.20	13.575						84.844	
		300.20	13.644						85.275	
第一天		300.10	13.606						85.038	
		300.16	13.641						85.256	
		300.33	13.642						85.263	
		300.17	13.653	0.047	0.054	13.629			85.331	85.183
		300.26	13.609						85.056	
		300.23	13.625						85.156	
第二天	3	300.25	13.610						85.063	
		299.89	13.644						85.275	
		300.12	13.632	0.049	0.049	13.634	0.013	0.018	85.200	85.215
		300.13	13.659						85.369	
		299.82	13.640						85.250	
		300.01	13.621						85.131	
第三天		300.04	13.623						85.144	
		300.06	13.624						85.150	
		299.92	13.642	0.077	0.080	13.622			85.263	85.134
		299.98	13.631						85.194	
		300.04	13.566						84.788	
		300.03	13.643						85.269	

备注：《GB/T 31578-2015 粮油检验 粮食及制品中粗蛋白测定 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，D200 杜马斯定氮仪连续六次测试同一编号大豆分离蛋白结果的绝对差值均小于相应的重复性限 r ，重复三天测试同一编号大豆分离蛋白结果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分离蛋白上表现出良好的测试效果。

4.2 K1160 全自动凯氏定氮仪测试大豆分离蛋白中氮及蛋白质含量

K1160 全自动凯氏定氮仪连续两天测试大豆分离蛋白中氮及蛋白质含量如表五所示：

表五 K1160 全自动凯氏定氮仪连续两天测试大豆分离蛋白中蛋白质含量

测试批次	样品 编号	取样量 (g)	空白 (mL)	滴定体积 (mL)	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 R	蛋白质 含量 (%)	平均值 (%)
第一天	1	0.2006	0.073	19.0915	13.3660	0.0943	0.1511	13.3358	0.0407	0.0806	83.5378	83.3485
		0.1999		19.0276	13.3678						83.5486	
		0.2014		19.0351	13.2735						82.9592	
第二天	1	0.2026	0.0697	19.0691	13.2208	0.1788	0.2608	13.2951	0.0407	0.0806	82.6300	83.0942
		0.2025		19.1230	13.2649						82.9054	
		0.2007		19.1454	13.3996						83.7473	
第一天	2	0.2016	0.073	19.3427	13.4754	0.0573	0.0830	13.4996	0.0937	0.1854	84.2213	84.3728
		0.2006		19.3286	13.5327						84.5792	
		0.2002		19.2308	13.4908						84.3178	
第二天	2	0.2003	0.0697	19.3917	13.5997	0.0190	0.0307	13.5933	0.0937	0.1854	84.9980	84.9581
		0.2019		19.5459	13.5996						84.9974	
		0.2004		19.3743	13.5807						84.8791	
第一天	3	0.2013	0.073	19.4182	13.5507	0.1021	0.1439	13.6051	0.0556	0.1101	84.6917	85.0322
		0.2009		19.5252	13.6527						85.3297	
		0.1995		19.3320	13.6120						85.0752	
第二天	3	0.2015	0.0697	19.4124	13.5309	0.0327	0.0472	13.5496	0.0556	0.1101	84.5679	84.6847
		0.2018		19.4746	13.5542						84.7138	
		0.2011		19.4207	13.5636						84.7725	

备注：《GB/T 31578-2015 粮油检验 粮食及制品中粗蛋白测定 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，K1160 全自动凯氏定氮仪连续三次测试同一编号大豆分离蛋白结果的绝对差值均小于相应的重复性限 r ，重复两天测试同一编号大豆分离蛋白结果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分离蛋白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。

4.3 D200 杜马斯定氮仪与 K1160 全自动凯氏定氮仪测定结果比对

两款仪器测试大豆分离蛋白中氮含量的比对如表六所示：

表六 两款仪器测试大豆分离蛋白中氮含量的比对表

杜马斯定氮法				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 号大豆分 离蛋白	13.454	0.058	0.024	13.3358	0.094	0.041	0.145	0.989
	13.476	0.038		13.2951	0.179			
	13.452	0.041		—	—			
2 号大豆分 离蛋白	13.612	0.068	0.014	13.4996	0.057	0.094	0.071	0.995
	13.626	0.057		13.5933	0.019			
	13.615	0.075		—	—			
3 号大豆分 离蛋白	13.629	0.047	0.013	13.6051	0.102	0.056	0.051	0.996
	13.634	0.049		13.5496	0.033			
	13.622	0.077		—	—			

五、实验结论

1、杜马斯燃烧法测试大豆蛋白胨中氮含量与凯氏定氮法（仲裁法）测试大豆蛋白胨中氮含量结果十分接近，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 0.989~0.996 范围内。

2、使用杜马斯燃烧法和凯氏定氮法测得大豆蛋白胨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。且就结果看，杜马斯燃烧法测试大豆分离蛋白的精密度甚至优于凯氏定氮法的结果精密度。

3、与凯氏定氮法相比，杜马斯燃烧法无需任何危险化学试剂（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。

4、本方案提供大豆分离蛋白的即用型测试参数，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蛋白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] GB/T 31578-2015 粮油检验 粮食及制品中粗蛋白测定 杜马斯燃烧法 [S].