

凯氏定氮仪法测定胶原蛋白（冻干纤维状）中的蛋白质

方案编号: HM-KDN-004

适用仪器: 全 HM-DN2、HM-DN3 全自动凯氏定氮仪、HM-SM 系列石墨消化炉

发布日期: 2026 年 10 月 09 日

1 前言

蛋白质是胶原蛋白类生物材料的关键质量指标，重组 III 型人源化胶原蛋白作为重要的生物医用材料，其蛋白质含量是衡量产品纯度与批次一致性的核心参数之一。我国相关标准对重组胶原蛋白类产品（如医疗器械、生物敷料、化妆品原料等）均有明确的蛋白质含量要求，准确测定冻干纤维状胶原蛋白中的蛋白质含量对产品研发、质量控制及注册申报具有重要意义。

本方案依据《GB 5009.5-2025 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中第一法凯氏定氮法的全自动凯氏定氮仪法（5.2 节），采用全自动凯氏定氮仪配合石墨消化炉进行测定。该方法将消解与检测流程无缝衔接：样品在石墨消化炉中消化完全后，消化管直接转移至凯氏定氮仪，由仪器自动完成蒸馏、滴定及结果计算，具有自动化程度高、结果准确、重复性好的特点，适用于重组III型人源化胶原蛋白（冻干纤维状）及其他高蛋白生物材料中蛋白质的批量检测。

2 仪器与试剂

2.1 仪器

HM-DN2/HM-DN3 全自动凯氏定氮仪（配有滴定系统、蒸馏系统，可直接对消化管进行蒸馏滴定），HM-SM 系列石墨消化炉（控温精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，最高温度 $\geq 420^{\circ}\text{C}$ ），分析天平（感量 0.001 g ），消化管（与消化炉和定氮仪配套），移液管、量筒等玻璃器皿，剪刀或研磨工具（用于冻干纤维状样品的预处理）。

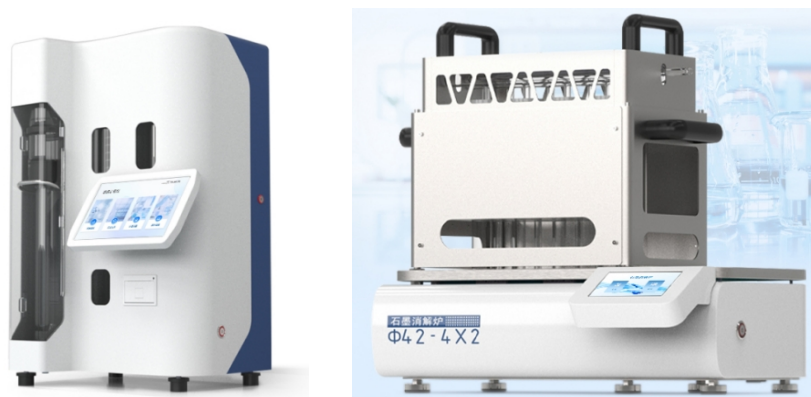


图 1 HM-DN3 全自动凯氏定氮仪及石墨消化炉外观图

2.2 试剂

硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)，硫酸钾 (K_2SO_4)，硫酸 (H_2SO_4 , 98%)，氢氧化钠 (NaOH)，硼酸 (H_3BO_3)，硫酸标准滴定溶液 [$c(1/2\text{H}_2\text{SO}_4)=0.1\text{ mol/L}$]，甲基红指示剂 (1 g/L 乙醇溶液)，

溴甲酚绿指示剂（1 g/L 乙醇溶液），混合指示剂 B：1 份甲基红乙醇溶液与 5 份溴甲酚绿乙醇溶液混匀，水：符合 GB/T 6682 规定的三级水。

试剂选择说明：人源化胶原蛋白冻干纤维蛋白质含量极高（通常 $\geq 90\%$ ），建议使用 0.1 mol/L 硫酸标准滴定溶液进行滴定。当蛋白质含量 ≤ 1 g/100 g 时可选用 0.05 mol/L 溶液。

3 实验方法

3.1 试样制备

取具有代表性的重组 III 型人源化胶原蛋白冻干纤维样品，用剪刀剪碎或研磨成均匀粉末状，充分混匀后装入密闭容器中备用。冻干纤维状样品易吸潮，制备过程应尽量快速，避免长时间暴露于空气中。

3.2 试样称量与消解

准确称取粉碎后的胶原蛋白试样约 0.1 g（精确至 0.001 g），置于干燥的消化管中。依次加入：硫酸铜 0.4 g，硫酸钾 6 g，硫酸 15 mL。

轻轻摇匀，将消化管置于石墨消化炉上。启动消解程序，420°C 恒温消解至少 1~1.5h，直至消解液呈蓝绿色透明状，确保消解完全。

消解结束后，取下消化管冷却至室温。无需转移消解液，消化管可直接用于后续蒸馏滴定。同时进行空白试验（不加样品，其余步骤相同）。



图 2 石墨消化炉消解过程图

3.3 蒸馏与滴定

开机预热全自动凯氏定氮仪，检查碱液（氢氧化钠溶液）、吸收液（硼酸溶液+混合指示剂 B）、滴定液（硫酸标准滴定溶液）是否充足。

将含有消解液的消化管（包括试样和空白）依次放入定氮仪的样品盘上。

根据仪器操作说明，设置蒸馏滴定参数（如加碱量、蒸馏时间、接收液体积等）。仪器将自动加入氢氧化钠溶液碱化蒸馏（加碱量根据消解用酸量设定，通常为酸体积的 4 倍）进行碱化蒸馏，释放的氨被硼酸吸收，然后用硫酸标准滴定溶液自动滴定至终点（混合指示剂 B 由蓝绿色变为浅灰红色）。

仪器自动记录滴定体积并计算蛋白质含量。分别记录试样消耗体积 V_1 和空白消耗体积 V_0 。



图 3 滴定参数设置界面及全自动凯氏定氮仪工作图片

4 结果与讨论

4.1 计算公式

试样中蛋白质含量按下式计算（适用于全量蒸馏，即全部消解液用于蒸馏）：

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 0.0140 \times F \times 100}{m}$$

式中：

X —— 试样中蛋白质含量，单位为克每百克（g/100 g）

V_1 —— 滴定试样消解液消耗硫酸标准滴定溶液的体积，单位为毫升（mL）

V_0 —— 滴定空白消解液消耗硫酸标准滴定溶液的体积，单位为毫升（mL）

C —— 硫酸标准滴定溶液的浓度，单位为摩尔每升（mol/L），此处为 $c(1/2H_2SO_4)$

0.0140 —— 与 1.00 mL 硫酸标准滴定溶液 [$c(1/2H_2SO_4)=1.000$ mol/L]相当的氮的质量，单位为克每毫摩尔（g/mmol）

M —— 试样质量，单位为克（g）

F —— 蛋白质折算系数（重组Ⅲ型胶原蛋白取 5.325）

100 —— 换算为每百克试样的系数

注：全自动凯氏定氮仪内置上述计算公式，可直接读取蛋白质含量结果。

4.2 测试结果

样品名称	取样量（g）	滴定体积 V_1 （mL）	蛋白质含量（g/100 g）	平均值（g/100 g）
胶原蛋白样品 1-1	0.1766	18.08	16.1	16.2
胶原蛋白样品 1-2	0.1204	12.24	16.2	

注 1：硫酸标准滴定溶液浓度 $c = 0.1129$ mol/L； V_0 0.08 mL。

注 2：蛋白质折算系数 $F = 5.325$ ，结果保留三位有效数字。

The screenshot displays the '蛋白质检测' (Protein Detection) software interface. It includes sections for '人员管理' (Personnel Management), '检测结果' (Detection Results), and '项目管理' (Project Management). The '检测结果' section shows '测定体积' (Measurement Volume) as 18.08 and '含氮量' (Nitrogen Content) as 3.0242%. The '项目管理' section lists parameters for '胶原蛋白' (Collagen): '标准酸浓度' (Standard Acid Concentration) 0.1129 mol/L, '样品质量' (Sample Mass) 0.1766 g, '空白体积' (Blank Volume) 0.08 mL, '加酸体积' (Add Acid Volume) 50 mL, '加稀释液体积' (Add Diluent Volume) 20 mL, '加碱体积' (Add Alkali Volume) 60 mL, '蒸馏时间' (Distillation Time) 6 min, '蛋白质系数' (Protein Coefficient) 5.325, and '指示剂' (Indicator) 甲基红:溴甲酚绿=1:5. At the bottom, there are buttons for '自动检测' (Automatic Detection), '手动检测' (Manual Detection), '空白检测' (Blank Detection), '样品检测' (Sample Detection), and a row of utility buttons: '项目类型' (Project Type), '保存项目' (Save Project), '设置系数' (Set Coefficient), '保存人员' (Save Personnel), '打印' (Print), '上传' (Upload), and '仪器调试' (Instrument Debugging).

图 4 检测结果截图

4.3 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%（因蛋白质含量 $>10\text{ g}/100\text{ g}$ ），符合 GB 5009.5-2025 标准要求。

5 方案特点与优势

5.1 针对胶原蛋白冻干纤维样品的的方法优势

样品代表性：冻干纤维状样品经剪碎或研磨确保均匀，避免纤维粗细差异导致消化不完全。

消解高效：石墨消化炉温控精准， 420°C 恒温消解保证胶原蛋白中蛋白质彻底分解。

流程简化：消解后直接上机，无需转移定容，减少操作步骤和人为误差。

5.2 仪器设备优势

石墨消化炉：加热均匀、升温快、耐腐蚀，可同时处理多批样品，提高效率。

全自动凯氏定氮仪：自动化完成加碱、蒸馏、滴定、计算，结果直接读取，数据可存储导出，符合现代实验室对智能化、可追溯的要求。

5.3 关键操作要点

样品粉碎：冻干纤维状样品必须剪碎或研磨，防止纤维缠绕或颗粒不均匀导致消化时间延长或消化不完全。消解终点判断：消解液应呈蓝绿色透明状，且加热至少 1 h，确保氮完全释放。

碱液添加量：加碱量应根据消解时加入的硫酸量确定。通常碱液（40% NaOH）的添加量应为消解用浓硫酸体积的 4 倍左右，以确保完全中和硫酸并使溶液呈强碱性。

碱量是否充足的判断：可通过观察反应液颜色变化来判断。硫酸铜在碱性条件下会生成褐色沉淀（氧化铜），若蒸馏时溶液颜色未发生变化，说明碱液添加量不足，需要补加。

空白控制：空白值应稳定且低（通常 $V_0 < 0.2\text{ mL}$ ），若偏高需检查试剂纯度、消化管清洁度或蒸馏系统密封性。

滴定液浓度：定期标定硫酸标准滴定溶液，确保浓度准确；注意使用与浓度匹配的滴定管精度。

折算系数: 大豆蛋白质折算系数为 6.25, 若检测大豆制品(如大豆分离蛋白)应参照产品标准执行。

6 结论

本方案采用全自动凯氏定氮仪配合石墨消化炉, 建立了大豆中蛋白质含量的测定方法。方法严格遵循 GB 5009.5-2025 国家标准, 消解与检测无缝衔接, 操作简便、结果准确可靠, 适用于大豆原料、豆制品及饲料等样品的批量检测, 可为育种、收购、加工及质量控制提供有力支持。

7 参考文献

- [1] GB 5009.5-2025 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S].
- [2] GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备[S].

山东恒美电子科技有限公司 应用研究部