

微量凯氏定氮法测定

蛋白质含量

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐

实验目的

The slide features a decorative header with five circles of varying shades of purple and blue, arranged horizontally across the top.

- 学习微量凯氏定氮法的原理
- 掌握微量凯氏定氮法的操作技术（未知样品的消化、蒸馏、滴定及其含氮量的计算等）

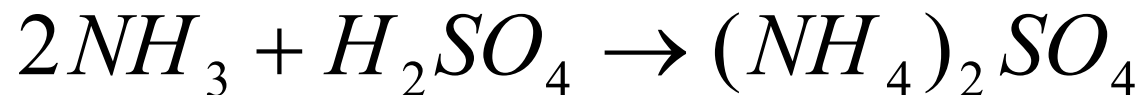
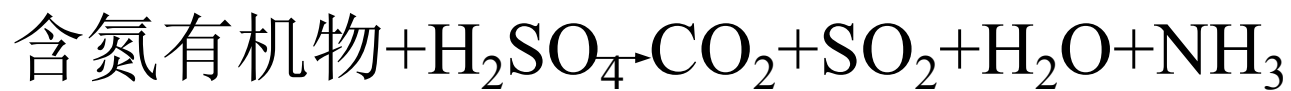
实验原理




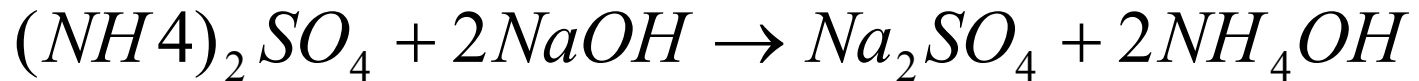
- 凯氏定氮法常用于测定天然有机物（如蛋白质，核酸及氨基酸等）的含氮量。
- 当天然含氮有机物与浓硫酸共热时，其中的碳、氢被氧化成二氧化碳和水，而氮则变成氨并进一步与硫酸作用生成硫酸铵。此过程称为“消化”。
- 此过程进行的相对较为缓慢，通常需要加入硫酸钾或硫酸钠以提高反应的沸点，并加入硫酸铜作为催化剂，以促进反应的进行。氧化剂过氧化氢也能加速反应。



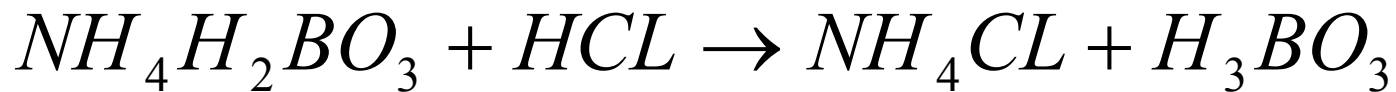
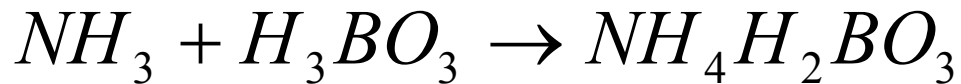
消化过程：



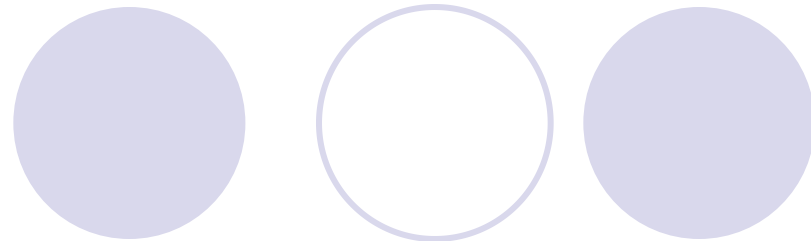
- 
- **蒸馏：** 在消化完全的样品溶液中加入浓氢氧化钠使呈碱性，加热蒸馏，即可释放出氨气，反应方程式如下：



● 吸收与滴定：蒸馏所放出的氨，可用硼酸溶液进行吸收，待吸收完全后，再用盐酸标准溶液滴定，直至恢复溶液中原来氢离子浓度为止（即滴定至紫色），最后根据所用标准酸的当量数（相当于待测物中氨的当量数）计算出待测物中的氮量。



实验材料与试剂



- 实验材料：食用面粉
- 实验试剂：

浓硫酸

30%氢氧化钠溶液

克氏催化剂

2%硼酸

指示剂

0.01M HCL

实验器材

凯氏烧瓶

电炉

凯氏定氮蒸馏装置

锥形瓶

100ml容量瓶

酸式滴定管

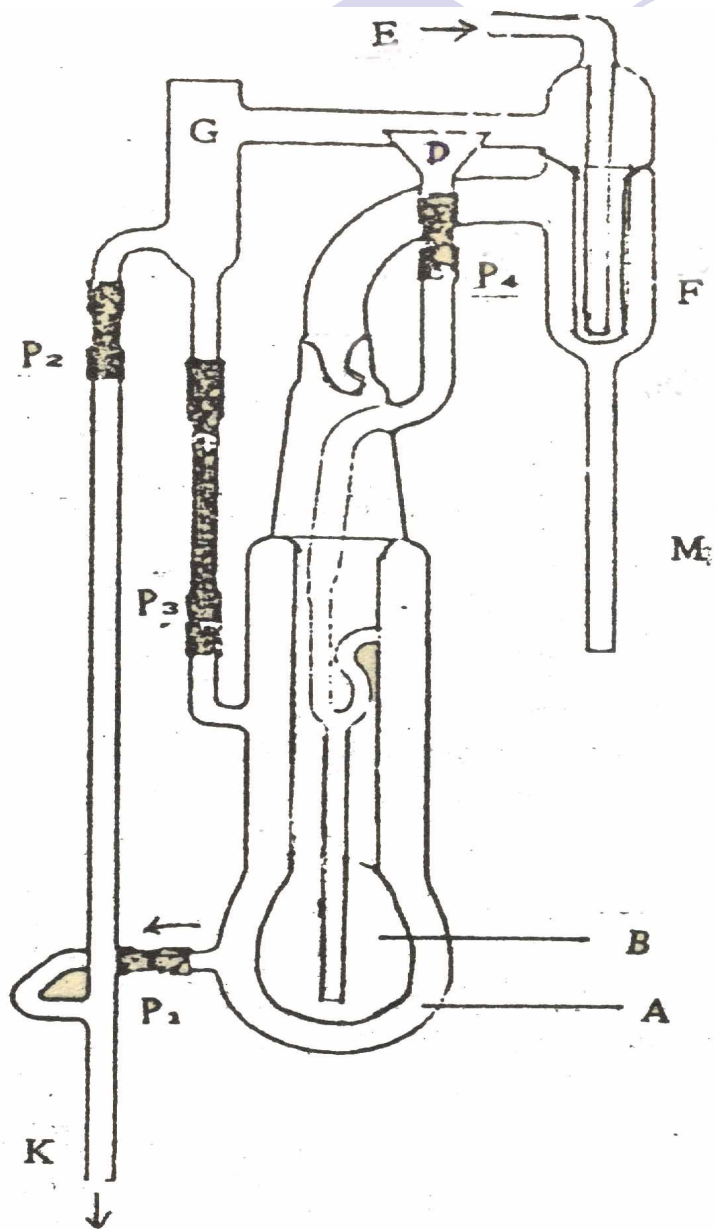


操作步骤

消化：

- 准确称取1克食用面粉，用称量纸卷好小心送入至50毫升的凯氏烧瓶底部，切勿沾于瓶口或瓶颈上。向另一烧瓶加入1ml水作空白对照。
- 在每个烧瓶内加入硫酸钾—硫酸铜混合物（克氏催化剂）少许，浓硫酸10ml，小瓷片两粒，摇匀。将烧瓶约60度角固定在铁架上，每个瓶口放一小漏斗，在通风厨内的电炉上消化。
- 在消化开始时，应控制火力，不要使液体冲到瓶颈。待瓶内水汽蒸完，硫酸开始分解并放出SO₂白烟后，适当加强火力，继续消化，直至消化液呈透明绿色为止。消化完毕，待烧瓶内容物冷却后，加蒸馏水10ml（注意慢加，边加边摇）。冷却后将瓶中内容物转入100ml的容量瓶中，并用蒸馏水洗烧瓶数次，溶液一并倒入容量瓶，最后定容至刻度摇匀，做上记号备用。

蒸馏：
仪器的洗涤：



- 蒸馏器洗净后，开放水龙头P3，使水进入A室，水放至A室球部2/3处即可。
- 取3个50ml的锥形瓶，分别加入10ml硼酸（内加有混合指示剂）。用表面皿复盖备用。
- A、加样：用移液管吸取2ml消化液，小心地由漏斗D倾入B室，用少量蒸馏水冲洗漏斗D。取一个盛有硼酸的锥形瓶，置于M管下，使管口置于硼酸溶液液面以下，将P4夹紧，向漏斗D加入30%氢氧化钠5ml，慢慢松开P4，使氢氧化钠进入B室，但漏斗中始终保持一部分液体封闭，往漏斗加入少量蒸馏水，重复以上过程，全程都要保持漏斗中的液体封闭。

- B、蒸馏：用酒精灯加热，维持火力恒定，沸腾不可高于Y管口以免A室溶液从Y管倒吸，待第一滴蒸馏液从冷凝柱F顶端滴下时起，继续蒸馏5分钟，然后将锥形瓶放低，使导管离开液面再蒸2分钟，最后用蒸馏水洗导管外壁，蒸馏完毕，取下锥形瓶准备滴定。
- C、空白蒸馏：用移液管分别吸取2ml蒸馏水按上述操作步骤进行蒸馏。



滴定：

蒸馏完毕，用微量酸式滴定管，以 **0.01mol/L** 盐酸标准溶液滴定锥形瓶内溶液，溶液由蓝绿色变为淡紫色或灰色，即为终点。记录所用盐酸的量。

计算：

$$\text{样品的总氮含量 (克氮\%)} = \frac{(A - B) \times 0.0100 \times 14}{C \times 1000} \times 100$$

若测定的样品含氮量部分只是蛋白质则：

$$\text{样品的总蛋白含量 (克蛋白\%)} = \frac{(A - B) \times 0.0100 \times 14 \times 6.25}{C \times 1000} \times 100$$

式中：**A**为滴定样品用去的盐酸平均毫升数；

B为滴定空白用去的盐酸平均毫升数；

C为称量样品的克数：**0.0100**为盐酸的当量浓度（实际上，此项应按实验中使用盐酸的实际浓度填写）；

14为氮的原子量；

6.25为常数（1毫升**0.1N**盐酸相当于**0.14**毫克氮）。

注意事项

- 本法适用于**0.05-3.0mg**氮，样品中含氮量过高时，则应减少取样量或将样液稀释。
- 勿使样品粘于烧瓶颈部。放置液体样品时，需将吸管插至烧瓶底部再放样；如固体样品，可将样品卷在纸内，平插入烧瓶底部，然后再将烧瓶直起，纸卷内的样品即完全放在烧瓶底部。

- 蒸馏完毕，先将蒸馏出口离开液面，继续蒸馏1min，将附着在尖端的吸收液完全洗入吸收瓶内，再将吸收瓶移开，最后移开酒精灯，绝不能先灭灯，否则吸收液将发生倒吸。
- 硼酸吸收液的温度不应超过40° C，否则氨吸收减弱，造成损失，可置于冷水浴中。
- 混合指示剂在碱性溶液中呈兰绿色，在中性溶液中呈灰色，在酸性溶液中呈红色。

思考题：

- 写出一下各步的化学反应方程式：

蛋白质的消化

氨的蒸馏

氨的滴定

- 指出本测定方法产生误差的原因
- 消化过程中产生何种有毒气体？如何判断消化终点？