

微量凯氏定氮法 (Micro-Kjeldahl determine)

一、目的

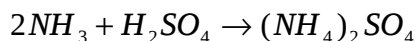
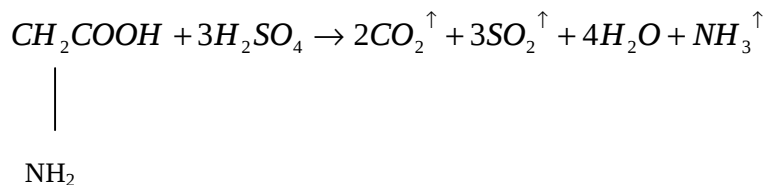
- 1、学习微量凯氏定氮法的原理
- 2、掌握微量凯氏定氮法的操作技术，包括标准硫酸铵含量的测定，未知样品的消化、蒸馏、滴定及其含氮量的计算等。

二、原理

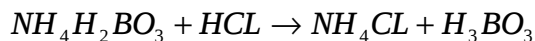
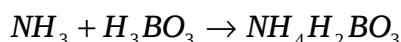
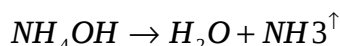
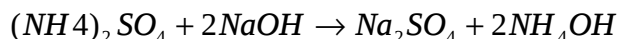
凯氏定氮法常用于测定天然有机物（如蛋白质，核酸及氨基酸等）的含氮量。

天然的含氮有机物与浓硫酸共热时，其中的碳、氢二元素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。此时程称之为“消化”。

但是，这个反应进行得比较缓慢，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。甘氨酸的消化过程可表示如下：



浓碱可使消化液中的硫酸铵分解，游离出氨，借水蒸汽将产生的氨蒸馏到一定量，一定浓度的硼酸溶液中，硼酸吸收氨后，氨与溶液中的氢离子结合，生成铵离子，使溶液中氢离子浓度降低。然后用标准无机酸滴定，直至恢复溶液中原来氢离子浓度为止，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。



滴定时用甲烯蓝和甲基红混合指示剂，其指示范围为 pH5.2~5.6，将 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ 的蓝色滴至原来 H_3BO_3 的蓝紫色即为终点。

本法适用范围 0.2~1.0 毫克氮。相对误差应小于 2%。

三、材料、试剂与器具

（一）材料

人的血清或猪的血清

（二）试剂

- 1、浓硫酸（化学吨）
- 2、30%氢氧化钠（分析纯）溶液
- 3、0.9%NaCl 溶液

4、硫酸钾—硫酸铜混合物：硫酸钾与硫酸铜（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）以 3: 1（W/W）的配比混合研磨成粉末。

5、2%硼酸

6、混合指示剂的配制：

方法一：取 50 毫升 0.1%甲烯蓝无水醇溶液与 200 毫升 0.1%甲基红无水乙醇溶液混合配成，贮于棕色瓶备用，这种指示剂酸性时为紫色，碱性时为绿色，变色范围窄且灵敏。

方法二：0.1%溴甲酚绿乙醇溶液 10 毫升与 0.1%甲基红乙醇溶液 2 毫升混和即成。

本指示剂的变色范围为 $\text{pH}5.2 \rightarrow 5.4 \rightarrow 5.6$

紫红色 灰色 绿色

7. 0.0100M HCl

8. 硼酸—指示剂混合液：取 100 毫升 2%硼酸溶液，滴加混合指示剂贮备液，摇匀后溶液呈现紫红色即可。（约加 1 毫升左右混合指示剂）

9.标准硫酸铵溶液（0.3 毫克氮/毫升）

（三）、器具

1、凯氏烧瓶

2、消化架

3、吸量管（1 毫升、2 毫升）

4、量筒（10 毫升）

5、凯氏定氮蒸馏装置

6、微量滴定管（3 毫升、5 毫升，可读至 0.02 毫升）

7、锥形瓶（50~100 毫升）

8、容量瓶（50 毫升）

四、操作步骤

（一）样品的处理

血清样品：取人血（或猪血），放于离心管中，于冰箱中放置过夜，次日离心除去凝血块，上层黄色透明清液即为血清。准确吸取血清 1.0 毫升加入 0.9%NaCl 4.0 毫升，仔细混匀备用。

固体样品：某一固体样品中的含氮量是 100 克该物质（干重中所含氮的克数）来表示（%）。因此在定氮前，应将固体样品中的水份除掉。一般样品干燥的温度都采用 105℃，因为非游离的水都不能在 100℃以下烘干。

在称量瓶中称入一定量的磨碎的样品，然后置 105℃的烘箱内干燥 4 小时。用坩埚将称量瓶放入干燥器内，待降至室温后称重，按上述操作继续烘干样品。每干燥 1 小时后，称量一次，直到两次称量的数量不变，即达恒重。

（二）消化

取 2 个 50 毫升的凯氏烧瓶，向第一号烧瓶内加 2 毫升稀释血清溶液（或 4 毫升核酸制品溶液，或 200 毫克固体粉末）。注意，用吸量管直接将溶液（或用试管加入固体样品）加至烧瓶底部，切勿沾于瓶口或瓶颈上，向 2 号烧瓶加入 2 毫升水作空白对照。

在每个烧瓶内加入硫酸钾—硫酸铜混合物约 0.2 克，浓硫酸 3 毫升，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 SO_2 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 10 毫升（注意慢加，边加边摇）。冷却后将瓶内容物转入 50 毫升的容量瓶中，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。

（三）蒸馏

1、仪器的洗涤：仪器应先经一般洗涤，再经水蒸气洗涤。

蒸馏器（图 1-1）有几种，应用前需熟悉其使用方法。使用方法如下：

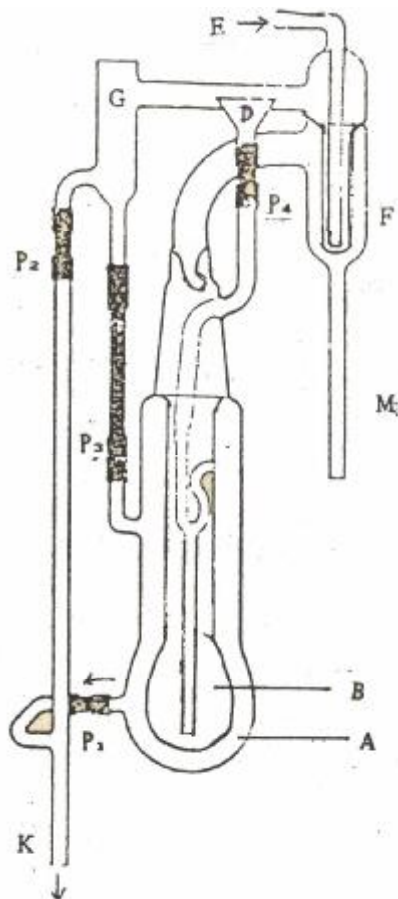


图 1-1 凯氏微量定氮蒸馏装置

开放自来水龙头，使水 E 进入 G，从 K 管流出（水不宜开得过大以免水从 G 管溢出）。开放 P₃，使水进入 A 室，漏斗 D 中加蒸馏水约 10 毫升入 B 室。用拇指将管口按紧，同时开放 P₁，则 B 室中的水先从 Y 型管口冲出，随后 A 室中水经 K 管流出，一般情况下如此重复洗涤两次即可。若蒸馏器内有氨存在，则应加入蒸馏水后，不加样品蒸馏一次方可使用。（可用 PH 试纸检查。）

A 为蒸气发生室，P₃ 为其开关，P₁ 为出水开关，B 为蒸馏室，与出气室 M 相遇，M 管插入盛有定量酸液的锥形瓶，B 室内有 Y 型管，一端与 A 室相通，另一端经 P₄ 与漏斗 D 相连，可经此将样品及试剂加入 B 室，F 为指形冷凝管，E 为进水管，水经 F、G、K 而流出，蒸馏时 B 室进消化好的样品及 NaOH，二者反应产生氨，B 室经 M 管进入锥形瓶中的酸吸收。

2、滴定标准样品

先用标准硫酸铵溶液试验 2~3 次。蒸馏器洗净后，开放水龙头 P₃，使水进入 A 室，水放至 A 室球部即可。

取 3 个 50 毫升的锥形瓶，各准确加入 10 毫升硼酸（内加有混合指示剂）。用表面皿复盖备用。

加样：用吸量管吸取 1 毫升标准硫酸铵溶液，细心地由漏斗 D 倾入蒸馏室，再用蒸馏水 1 毫升清洗漏斗。取一个盛有硼酸—混合指示剂的锥形瓶，置于 M 管下，使管口恰好接触硼酸溶液，用量筒从漏斗 D 加入 30%氢氧化钠 8 毫升，随即将 P₄ 夹紧，并往漏斗加入少量蒸馏水封闭。

蒸馏：用酒精灯加热（应用挡风板将灯围拢，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，随即将蒸馏器洗净。）

3、样品及空白蒸馏：用吸量管分别吸取 1 毫升样品和 1 毫升蒸馏水按上述操作步骤进行蒸馏。

4、滴定：蒸馏完毕，用 0.0100N 标准盐酸溶液滴定锥形瓶内溶液至淡紫色或灰色，记录所用盐酸的量。

（四）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性，（如血清）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）。

若样品中除有蛋白外，尚有其他含氮物质，则样品蛋白质含量的测定要更复杂一些。首先需向样品中加入三氯乙酸，使其最终浓度为 5%，然后测定未加三氯乙酸的样品及加入三氯乙酸后的样品的上清液中的含氮量，从而计算出蛋白氮，再进一步算出蛋白质的含量。

$$\text{蛋白氮} = \text{总氮} - \text{非蛋白氮}$$

$$\text{蛋白质含量（克/\%）} = \text{蛋白氮} \times 6.25$$

五、注意事项

1、凯氏法的优点是适用范围广，可用于动植物的各种组织，器官及食品等成组复杂样品的测定，只要细心操作都能得到精确的结果。其缺点是操作比较复杂，含有大量碱性氨基酸的蛋白质测定结果偏高。

2、普通实验室中的空气中常含有少量的氨，会影响结果，所以操作应在单独洁净的房中进行，并尽可能快地对硼酸吸收液进行滴定。

六、实验报告

绘画蒸馏装置图，计算待测样品的总氮量和蛋白质含量

七、思考题

- 1、正式测定未知样品前为什么必须测定标准硫酸铵的含氮量及空白？
- 2、写出以下各步的化学反应式：
 - ① 蛋白质消化
 - ② 氨的蒸馏
 - ③ 氨的滴定
3. 指出本测定方法产生的误差的原因。