

发布日期: 2002-07-11

版本号: 5.0

AN 303

使用蒸馏单元按照直接蒸馏法测定氮含量

1 介绍

本文是使用FOSS公司KJELTEC®蒸馏系统按照直接蒸馏法进行氮含量分析的一般性指导。所叙述的分析过程适用于可采用直接蒸馏法分析的各类样品。没有针对各种特定样品的优化的分析步骤, 样品具体的分析方法可以在福斯的**专项应用简报**中找到(福斯公司免费提供各种应用简报)。

福斯公司提供了从手动到全自动分析的全套KJELTEC®系统, 因此本文没有对各具体的仪器设置作说明, 这类资料可以在各套装置的使用说明书和**专项应用简报**中找到。

2 安全性

为保证安全必须要小心的操作试剂。对于试剂的操作可以参考有关的MSDS。任何操作都需要配戴护目镜, 处理热的消化管时也要加以注意。

3 直接蒸馏法的原理

当样品在碱溶液中用蒸汽进行蒸馏时, 蛋白中的某些氮会转化成氨。氨会被释放并由接收液收集, 然后通过滴定测定。氮的释放不是定量的, 很大程度上取决于样品类型和样品处理所采用的技术。

为了得到精确的分析结果, 对于每一种类型的产品, 直接蒸馏法都必须按照传统的凯氏定氮方法进行校正。

由于直接蒸馏法不包括酸消化的步骤, 相比完整的消化步骤来说更快更环保。当要求速度或分析同一类型的样品时, 采用这种方法很有效。

4 样品制备

用于直接蒸馏分析的样品必须认真制备以免造成最终实验结果的错误。能否获得有代表性的试样在于是否有很好保证的制样方法, 并因样品种类或行业的不同而有很大差异, 本文不可能概括所有的制样方法。

从大样品采得的实验室样品中获得分析试样可能要进行一种或多种样品处理以使样品均质。方法可以有简单的物理处理如振荡、搅拌、研磨、等格缩分、四分法采样等, 或是机械处理如研混、均质或粉碎。根据样品不同(混合物、复合物或单一组分)使用不同的处理方法。样品一般可分为: 固体、半固体或糊状、液体。

固体样品

固体样品一般用粉碎的方法处理。用直接蒸馏法进行测定的样品必须用合适的实验室粉碎磨以得到很细的粒度, 例如可以用FOSS的旋风磨。处理方法的一致性获得理想实验结果的重要条件, 特别是实验中的一系列条件已经确定时更是如此。例如: 用旋风磨磨出的很细的样品颗粒将增加直接蒸馏法的功效, 如果与用咖啡粉碎机处理的同一样品在同一条件下分析, 结果是没有可比性的, 因为咖啡粉碎机处理的样品氮的释放效果很差。

半固体样品

Dedicated Analytical Solutions

FOSS Analytical AB
Box 70
SE-263 21 Höganäs
Sweden
Tel +4642361500
Fax +4642340349
E-mail info@foss.tecator.se
Web www.foss.dk

福斯中国
北京: Tel 010-68467239
上海: Tel 021-5169 5953
广州: Tel 020-38288492
热线电话: 800 810 3363
Fax 010-68467241
Fax 021-64044713
Fax 020-38288191
Web: www.foss.com.cn

+ **FOSS**
© FOSS Analytical AB2001. all rights reserved
福斯版权所有, 未经许可, 请勿翻印传播!

此类样品是最难处理的，尤其是样品粒度范围较宽和/或某些组分比较坚硬时更难处理。根据具体的样品类型可用匀浆、液化或球磨的方法处理以获得适当的分析样品。很多情况下，简单的乳钵和研钵就可以很好处理样品了。和所有的样品制备一样，为了达到合乎要求的样品均匀度，或许需要两种或多种处理方法并用。

液体样品

液体样品可有两种基本形式，即只含有可溶性物质的液体和含有颗粒的液体或悬浊液如牛奶。前者只需要震荡或搅拌就可直接取样，而后者则要根据是想分析全部悬浊液还是液体的某一部分进行不同的样品处理。例如：牛奶可分为含有悬浊固体颗粒的水相和脂肪相（即浮在液面上的奶油）。通常是对全奶进行分析，这就需要均质。

只有在分析前做好样品制备工作，才能减少各种样品的实验误差。

样品称重

直接蒸馏分析样品要使用精确度为0.1毫克的分析天平准确称取并全部移入蒸馏管。所需样品量依样品含氮量和均匀度而定。一般说来，直接蒸馏法需要的样品量比传统方法大，因为氮的回收率较低。推荐的样品量在每个具体的应用子报中有描述。

5 蒸馏

因为消化后样品中所有的氮将形成硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，所以硫酸铵可以作为检验蒸馏器回收率的一种标准试剂。具体检验方法将在下面阐述。蒸馏的原理是用氢氧化钠将 NH_4^+ 转化为氨，然后将氨蒸馏到一个含有硼酸的接收瓶中，再用标准酸溶液滴定，用比色法判断滴定终点。

蒸馏器回收率的化学检验

使用纯度 > 99.5% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ （注意硫酸铵标准品需确知含水量或充分烘干）

摩尔重量 = 132.14 克/摩尔

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的含氮量 = 21.09%

称取 0.15 克 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 放入消化管，加入 75 毫升的蒸馏水和 50 毫升 40% 的 NaOH，然后蒸馏。

$$\text{氮}\% = \frac{(\text{ml} - \text{空白ml值}) \times N \times 14.007 \times 100}{\text{样品重量, mg}}$$

式中：N = 滴定标准液当量浓度，精确至小数点后第四位

$$\text{回收率}\% = \frac{\text{实际含氮}\%}{21.09} \times 100$$

用硫酸亚铁铵 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ （含稳定结晶水，一般不处理，严格需用适当方法平衡水分）

摩尔重量 = 392.14 克/摩尔

硫酸亚铁铵含氮量 = 7.145%

称取 0.5 克硫酸亚铁铵放入消化管，再加 75 毫升蒸馏水和 50 毫升 40% NaOH

$$\text{氮}\% = \frac{(\text{ml} - \text{空白ml值}) \times N \times 14.007 \times 100}{\text{样品重量, mg}}$$

式中：N = 滴定标准液当量浓度，精确至小数点后第四位

Dedicated Analytical Solutions

FOSS Analytical AB
Box 70
SE-263 21 Höganas
Sweden
Tel +4642361500
Fax +4642340349
E-mail info@foss.tecator.se
Web www.foss.dk

福斯中国
北京: Tel 010-68467239
上海: Tel 021-5169 5953
广州: Tel 020-38288492
热线电话: 800 810 3363
Fax 010-68467241
Fax 021-64044713
Fax 020-38288191
Web: www.foss.com.cn

+ **FOSS**
© FOSS Analytical AB 2001, all rights reserved
福斯版权所有，未经许可，请勿翻印传播！

$$\text{回收率}\% = \frac{\text{实际含氮}\%}{7.145} \times 100$$

标准滴定液的浓度

为了获得准确的氮/蛋白质分析结果，必须要保证盐酸的浓度符合要求，因此有必要按照下述方法用碳酸钠滴定盐酸，否则不准确的盐酸标准液浓度会引起实验误差。

a) 基准物质

称取约10克无水碳酸钠 (Na_2CO_3)，研成细粉，在265℃干燥1小时或200℃干燥2小时，在干燥器中冷却后移入烧杯，盖紧，在干燥器中存放。

b) 指示剂

将0.1克甲基红溶于100毫升乙醇中。

c) 过程

用分析天平称取约0.4克基准 Na_2CO_3 ，记取重量 (W_1)，移入锥形瓶，加40毫升蒸馏水，再加10滴指示剂，用盐酸标准液滴至粉红色，记下所用盐酸毫升数 (A_1)。将锥形瓶中的溶液煮沸几分钟，再用自来水冲凉至室温，此时粉红色褪去，继续使用盐酸滴定至粉红色复现，记下滴定毫升数 (A_2)。再将锥形瓶中的溶液煮沸几分钟，然后用自来水冲凉至室温，此时粉红色褪去，继续使用盐酸滴定至粉红色复现，记下滴定毫升数 (A_3)。

备注：温度会影响标准溶液的体积和浓度。使用标准溶液时的温度应该和标定时温度接近。如果需要对温度进行校正，可使用校正表。

d) 计算

$$\text{摩尔浓度} = \frac{18.870 \times W_1}{A_1 + A_2 + A_3}$$

注意：浓度必须精确到小数点后4位，例如0.2000M。

备注：此检验法的变色可能不容易观察到，因此可使用PH计或混合指示剂（如0.1克甲基红和0.1克溴甲酚绿溶于100毫升乙醇）代替上述指示剂，可使变色易为观察。

氢氧化钠使用量

蒸馏时要用过量的NaOH将铵转化为氨。为了得到可重复性的结果，在校正和样品测定中应使用等量的同浓度的碱。在我们的简报中通常使用75ml40%的NaOH。

氢氧化钠溶液

应为400克NaOH/升，溶液浓度不要超过40%，否则会形成结晶影响泵的功能，市售溶液一般为50%，如果你只能买到浓度高于40%的溶液，须稀释后再用。

硼酸接受液

1030/2300和1035/2400型自动滴定的分析仪使用含溴甲酚绿和甲基红指示剂的1%的硼酸溶液，手动滴定的分析仪（1002/2100/1026/2200型）使用含溴甲酚绿和甲基红的4%硼酸溶液。

为了获得准确的结果，硼酸溶液需要调整到空白在0.05-0.15ml之间。

制备：

1. 将100克硼酸溶于10升蒸馏水配成1%硼酸溶液。

将400克硼酸溶于10升蒸馏水配成4%硼酸溶液。

2. 添加100毫升溴甲酚绿溶液（100毫克溴甲酚绿溶于100毫升无水乙醇）。

Dedicated Analytical Solutions

FOSS Analytical AB
Box70
SE-263 21 Höganäs
Sweden
Tel +4642361500
Fax +4642340349
E-mail info@foss.tecator.se
Web www.foss.dk

福斯中国
北京: Tel 010-68467239
上海: Tel 021-5169 5953
广州: Tel 020-38288492
热线电话: 800 810 3363

Fax 010-68467241
Fax 021-64044713
Fax 020-38288191
Web: www.foss.com.cn

+ **FOSS**

© FOSS Analytical AB2001, all rights reserved
福斯版权所有，未经许可，请勿翻印传播！

3. 添加70毫升甲基红溶液（100毫克甲基红溶于100毫升无水乙醇）。

注：配好的吸收液颜色应该是暗紫色（蓝紫色）

调节：

1. 取25ml上述步骤配好的硼酸溶液于一个锥形瓶中，加入100ml蒸馏水，此时溶液应该变灰蓝色。如果溶液仍然是红的，则应加碱调节，可用0.1M的NaOH滴定至灰色。然后可根据下面的公式再调节剩余的硼酸：

需用的1.0M的NaOH体积数= 0.1M的NaOH体积数×40

2. 将计算好的1.0M的NaOH加入到硼酸溶液中。

3. 或者：用25ml硼酸滴定一个空白值，如果空白值过高（0.5毫升0.2摩尔的盐酸），说明硼酸配的不正确，这会造成空白值不稳定。空白值过高可用下列方法纠正：向硼酸桶中直接加入盐酸，仔细混匀，重新测定空白值，直至其数值<0.2毫升盐酸为止。如果得不到正的空白值（或为零），需添加少量1摩尔的氢氧化钠进行调节，重新滴定直至获得满意的结果为止。

注意：加入NaOH的目的是得到正的空白值。但是还是要保证空白值在0.05-0.15ml之间，这样才能获得好的重复性。

6 一般应用概论

下文阐述了直接蒸馏法的过程，可广泛应用于各种样品，当然，可以优化实验步骤以适应具体实验室和样品类型的需要。

1. 制备有代表性的样品，按照子报中的推荐称量样品（精确至2毫克/克）放入蒸馏管中。

注意：使用1035/2300/2400 分析仪时称量值可直接输入仪器电脑，自动进行结果计算。

2. 按子报说明在每个蒸馏管中加入蒸馏水。

注意：如果使用KJELTEC®1026/1035/2200/2300/2400，蒸馏循环开始时蒸馏水自动加入。

3. 将25毫升吸收液加入锥形吸收瓶，放入蒸馏器，使馏出液出口浸入吸收液中。

注意：2200 可选自动加入吸收液，使用KJELTEC® 2300/2400/1030/1035时此过程为自动操作。

4. 将蒸馏管放入蒸馏器，关上安全门。

注意：使用KJELTEC®1026/1035/2200/2300/2400，如果选用了自动程序，将自动添加稀释用蒸馏水。

5. 将75毫升40%NaOH加入蒸馏管，程序可以设置自动添加。

6. 使用凯尔特1002时，打开蒸汽阀，按照规定的时间/体积进行蒸馏。使用KJELTEC®2100/2200/2300/2400/1026/1030/1035时，蒸汽阀和蒸馏循环自动控制。

7. 在完成90%的蒸馏时，将1002的吸收液平台降低。1026会自动完成。2100或2200不需要将馏出液的出口从吸收液中取出。1030/1035/2300和2400完整的蒸馏、滴定和计算可以自动完成。

8. 使用Kjeltec1002时，蒸馏循环结束时要将阀门关闭。

注意：Kjeltec2100/2200/2300/2400/1026/1030/1035的阀门自动控制。

9. 此条只对Kjeltec1002/1026/2100/2200有用：接收瓶中的溶液这时呈绿色，表示有碱—氨存在。

10. 用标准盐酸溶液（通常为0.1N或0.2N）滴定馏出液至兰/灰色为滴定终点，记下耗用盐酸的毫升数。

空白实验

每次分析之前，应该做分析所用化学试剂的空白实验以校正化学试剂对实验的影响，空白值的测定应与样品测定一样才有意义。

7 校正

对于每种类型的样品，都应建立一个直接蒸馏法和凯氏测定法的校正图谱。一旦建立了这个图谱，日常检测就可以使用，过一段时间再用经典凯氏法检测准确度就可以了。

要建立一个图谱，至少需要收集15个蛋白含量和产品种类范围较宽的样品。例如，对粮食来说，应包括所有类型的粮食。基于凯氮的方法按照不同的蛋白含量选择样品。

Dedicated Analytical Solutions

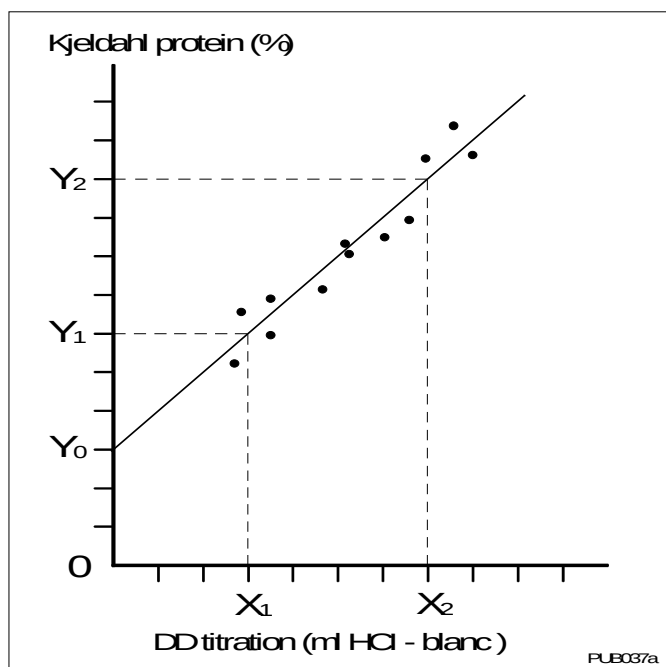
FOSS Analytical AB
Box70
SE-263 21 Höganas
Sweden
Tel +4642361500
Fax +4642340349
E-mail info@foss.tecator.se
Web www.foss.dk

福斯中国
北京: Tel 010-68467239
上海: Tel 021-5169 5953
广州: Tel 020-38288492
热线电话: 800 810 3363
Fax 010-68467241
Fax 021-64044713
Fax 020-38288191
Web: www.foss.com.cn

+ **FOSS**
© FOSS Analytical AB2001, all rights reserved
福斯版权所有，未经许可，请勿翻印传播！

进行平行直接蒸馏分析—测定同一份样品，避免水分变化或样品的降解。对直接蒸馏法来说，样品制备和后面所有的步骤都要使用同样的操作。如果平行样使用的滴定液体积差别超过0.2ml，则需要重复直接蒸馏测定。

计算直接蒸馏法的平均值，然后和凯氏法进行对比作图（如下）。



从图中可以计算两个常数a和b。这两个常数可以用直接蒸馏法的测定值来计算凯氏蛋白含量。

$$a = \text{截距} = Y_0$$

$$b = \text{斜率} = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

一般来说凯氮法和直接蒸馏法的相关系数应大于0.95。

8 计算

$$\% \text{蛋白} = a + b \times (V_{\text{样品}} - V_{\text{空白}})$$

a = 截距

b = 斜率

$V_{\text{样品}}$ = 直接蒸馏法测定样品消耗标准溶液的体积

$V_{\text{样品}}$ = 直接蒸馏法测定空白消耗标准溶液的体积

版本纪事

版本号	修改描述
Rev. 5.0	纠正回收率实验，修改计算公式

日期
2002-07-11

签名
LLg

Dedicated Analytical Solutions

FOSS Analytical AB
Box 70
SE-263 21 Höganas
Sweden
Tel +4642361500
Fax +4642340349
E-mail info@foss.tecator.se
Web www.foss.dk

福斯中国
北京: Tel 010-68467239
上海: Tel 021-5169 5953
广州: Tel 020-38288492
热线电话: 800 810 3363

Fax 010-68467241
Fax 021-64044713
Fax 020-38288191
Web: www.foss.com.cn

+ **FOSS**

© FOSS Analytical AB2001, all rights reserved
福斯版权所有，未经许可，请勿翻印传播！