

大连水产学院自编讲义

水产养殖、食品科学与工程专业用

生物化学实验

许庆陵 编
崔铁军 审

大连水产学院养殖系

一九九四年七月

前 言

本实验讲义是根据生物化学实验的有关资料,结合本教研室长期以来的实验教学经验和实验条件,针对不同专业、程度的教学对象,编写了总括二十二个实验的基础生物化学实验教材。该教材内容较全面,注重实验原理及实验技术,同时设有实验结果的记录和讨论,思考题等内容,可作为水产养殖专业,水产品加工专业等的本科、专科学生选用的生物化学实验教学用书。

本书在编写过程中得到了崔铁军副教授、李丹彤讲师等的大力协助和指导,经崔铁军副教授审阅后定稿,在此深表感谢。

由于编写时间仓促,编写水平有限,缺点错误在所难免,欢迎广大读者批评指正。

本书所提供的实验材料、器材、试剂的数据仅是以一个实验小组为计量单位。

大连水产学院养殖系生化实验室
一九九四年七月

生化实验室实验守则

1. 实验前认真预习实验目的、原理、操作方法;
2. 实验时自觉遵守课堂纪律,严格按操作规程操作,既要独立操作,又要与其他同学配合;
3. 实验数据、现象应随时记录在实验本上;
4. 精密贵重仪器每次使用后应登记姓名并记录仪器使用情况,应随时保持仪器的清洁,若发生故障,应立即停止使用并报告辅导教师;
5. 实验前后应认真清点、洗净各仪器,若有损坏或遗失需说明情况,经辅导教师签名后可补领,并按规定赔偿;
6. 按需量取用药品及蒸馏水,注意节约,用完仪器、药品后应归还原处,不得用个人量器取用公共药品;试剂瓶盖随开随盖,不得搞错;
7. 需在烘箱内烘烤、干燥器内干燥冷却、冰箱内保存等物品都应加盖并注明内容及标号;
8. 不得将易燃溶剂接近火焰;漏电设备不得使用;通风厨门应紧闭,非必要时勿打开;含强酸强碱的废液应倒入废液缸中;严禁口吸取有毒试剂;
9. 离开实验室前需认真完成如下工作:①所用试剂瓶整齐归还于实验架三、四格;②洗净各玻璃仪器并排放于实验架一、二格;③擦净实验台桌面,关闭实验台左右各水龙头,倒掉废液;④实验记录送辅导教师审阅;

目 录

前言	
生化实验室实验守则	
实验一、水份的测定	1
实验二、灰份的测定	3
实验三、血糖浓度的测定	5
实验四、总糖和还原糖的测定——斐林试剂法	7
实验五、脂肪的定量测定——索氏抽提法	10
实验六、总氮的测定——凯氏定氮法	12
实验七、蛋白质浓度的快速测定——双缩脲法	16
实验八、蛋白质浓度的快速测定——Folin 酚法	18
实验九、氨基氮的测定——甲醛滴定法	21
实验十、氨基酸的分离鉴定——纸层析法	23
实验十一、离子交换柱层析分离氨基酸——阶段洗脱法	26
实验十二、蛋白质的分离鉴定——醋酸纤维薄膜电泳	29
实验十三、蛋白质等电点测定	32
实验十四、聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离血清蛋白	34
实验十五、酵母核糖核酸(RNA)提取制备	39
实验十六、核糖核酸的定量测定——定磷法	41
实验十七、脱氧核糖核酸的定量测定——改良二苯胺法	44
实验十八、温度、PH、激活剂、抑制剂对酶活性的影响	46
实验十九、脲酶 K_m 值的简易测定	49
实验二十、蛋白酶的活性测定	53
实验二十一、肌糖元的酵解作用	56
实验二十二、脂肪酸的 β -氧化	59

附 录

一、常用标准溶液的制备及标定	61
二、常用缓冲溶液的配制	62
三、常见蛋白质等电点参考值	66
四、常用混合指示剂的组成及颜色变化	70
五、常用指示剂的 pK 值、PH 范围、颜色变化、配制方法	71
六、市售浓酸、浓氨水的比重和各种浓度	72
七、分光光度法简介	72
八、基础生物化学学生使用仪器清单	78

实验一 水份的测定

一、目的:

1. 掌握直接干燥法测定水份的原理及方法;
2. 熟练掌握物品的精确称量方法。

二、原理:

食品、饲料、饵料等由水份和固形物组成。水份又以自由水, 结合水两种状态存于食品等物质中。自由水以毛细管凝聚状态存于细胞间, 可作溶剂, 易经加热, 吸湿而增减, 加热至 98~105℃ 即可挥去, 它们在食品中含量高低直接影响到食品、饲料、饵料的品质及保存能力; 结合水则以较强的氢键结合于有机体中的蛋白质、糖类, 不可作溶剂, 需 130° 以上方可挥去, 为不可利用水。直接干燥法测定水份就是测定食品、饲料等样品中的自由水份含量, 即称量样品在常压下经 98~105℃ 高温烘烤前后的重量差。

三、实验材料、器材、试剂:

1. 材料: 食品 (或饲料、饵料) 1~5 克;
2. 器材: ①称量瓶 (D65mm、H15mm±) (×2) ②药勺、天平 (灵敏度 0.01g)、50 毫升烧杯、硫酸纸 (2×30Cm)、电烘箱 (105℃)、坩锅钳、玻璃干燥器 【各×1】
3. 试剂: ①氯化钙或硅胶 (500g)
②凡士林 (少量)

四、操作步骤及数据记录:

1. 取一称量瓶洗净置于 100~105℃ 电烘箱中 (盖斜支瓶边) 烘 0.5~1 小时, 用坩锅钳取出称量瓶并移入干燥器内冷却 0.5 小时。冷却后严盖称重 _____、_____ 克: 再干燥、冷却, 称重 _____、_____ 至恒重 (即前后两次重量差不得超过 2 毫克) $W_1 =$ _____ 克。

2. 取样品 1~5 克于称量瓶中, 称重 $W_2 =$ _____ 克。

3. 将盛有样品的称量瓶置于 105℃ 电烘箱 (盖斜支), 干燥 2~3 小时, 取出移于干燥器内冷却 0.5 小时, 称重 (严盖) _____ 克, 再干燥 1 小时, 冷却 0.5 小时, 复重 _____ 克、_____ 克、至恒重 W_3 _____ 克。

五、计算:

样品水份 (%) = $(W_2 - W_3 / W_2 - W_1) \times 100\% =$ _____

六、结果讨论:

七、思考题:

1. 怎样取用称量瓶? (称量、烘烤、冷却)

2. 什么叫恒重?

实验二 灰分的测定

一、目的：

学习用高温灼烧重量法测定食品中总灰分的含量。

二、原理：

食品中除含有大量有机物质外，还含有较丰富的无机物质。食品经高温灼烧后残留下来的无机物质即为食品中的灰分。将食品等样品置高温炉中灼烧（550~600℃）一定时间后，称量残留物的重量即为该样品中总灰分含量。

三、实验材料、仪器、试剂：

1. 实验材料：食品（饲料、饵料）【5克】

2. 仪器：①坩锅（×2）

②干燥器、精密天平、药匙、坩锅钳、高温炉（又名灰化炉）调温电炉 [各×1]

3. 试剂：①盐酸（1：4/V：V）（200ml）

②硅胶（于干燥器内使用）

四、实验步骤及数据记录：

1. 瓷坩锅于盐酸（1：4/V：V）中煮沸、洗净，于灰化炉中 600℃ 高温灼烧 30 分钟，待炉温降至 200℃ 下后，取出坩锅于干燥器冷却至室温，称重_____克，反复操作，称重_____、_____至恒重 $W_1 =$ _____克。

2. 加入 2~3 克固体（或 5~10 克液体）样品于坩锅中，精密称重 $W_2 =$ _____克。

3. 将盛有样品的坩锅（液体样品先在沸水浴中至干）置于调温电炉上炭化至无烟发生。<1>

4. 将炭化好的坩锅移至灰化炉中，在 550~600℃ 下灼烧灰化 2~3 小时至无碳微粒<2>。冷至 200℃ 后取出坩锅于干燥器冷却至室温，称重_____克，再灼烧 1 小时，冷却称重_____克，_____克至恒重 $W_3 =$ _____克。

五、计算：

样品中灰分（%）= $(W_2 - W_3 / W_2 - W_1) \times 100\%$

六、结果讨论：

七、思考题：

1. 测定食品中总灰含量有何意义？
2. 灰化温度为何应控制在 500~600℃？

八、说明：

<1>若样品中含易发泡物（糖分、淀粉、蛋白质较多，炭化时易发生膨胀，可在炭

化前先在样品上酌加数滴纯植物油。炭化时先用小火，避免样品溅出。

<2>灼烧温度不得超过 600°C，否则钾、钠、氯等易挥发损失造成误差。第一次灼烧后，若中间仍有微小的碳粒，可加少许水，使已灰化物质溶解，未挥发物露于表面，蒸干后再灼烧。

实验三 血糖浓度的测定

一、目的：

1. 测定动物血液中糖分含量；
2. 学习熟练 72 型分光光度计的使用方法。

二、原理：

动物血液的糖主要是葡萄糖，其含量较恒定。用硫酸及钨酸钠除去被检血中的蛋白质，制备成无蛋白血滤液。当血滤液与碱性铜试剂混合加热时，血滤液中葡萄糖的醛基被氧化成羧基，而铜试剂中 Cu^{2+} 被还原成砖红色的 Cu_2O 沉淀，至使糖的还原反应进行较完全。 Cu_2O 可使磷钼酸还原成钼盐，使溶液呈蓝色，其生成颜色的深浅与葡萄糖浓度成正比。

三、实验材料、器材、试剂：

1. 材料：鱼或其它动物血液（1 毫升）；
2. 器材：①血糖管 25ml（带橡皮塞） $\times 4$ ；
②粗滤纸 $\times 2$ ；
③吸量管 1ml $\times 4$ ，2ml $\times 4$ ，10ml $\times 2$ ；
④试管架、锥形瓶 25ml、普通离心机、漏斗、定性滤纸（11cm）、分光光度计 $\times 1$ 。

3. 试剂：①0.05mol/L H_2SO_4 （10ml）

②10%钨酸钠溶液（5ml）：为完成沉淀蛋白质，该液需用 H_2SO_4 或 NaOH 调至中性或弱碱性。

③碱性硫酸铜试剂：称取无水碳酸钠（ Na_2CO_3 ）40g 溶于约 400ml 蒸馏水中；酒石酸 7.5 克溶于约 300ml 蒸馏水中；结晶硫酸铜（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）溶于 200ml 蒸馏水中。均加热助溶。冷却后，将酒石酸溶液倾入碳酸钠溶液中，混匀。移于 1000ml 容量瓶中，再将硫酸铜溶液倾入并加蒸馏水稀释至刻度，混匀，贮存于棕色瓶中。

④磷钼酸试剂 $\times 20\text{ml}$ ：称取磷钼酸 70 克及钨酸钠 10 克，加入 40ml 10% NaOH 及 400ml 蒸馏水，20~40 分钟，至无氨味时停止加热。冷却后，加入 250 毫升 80% 浓磷酸，再用蒸馏水定容至 1000 毫升。

⑤磷钼酸试剂稀释剂 $\times 100\text{ml}$ ：将试剂④用 4 倍体积蒸馏水稀释。

⑥标准葡萄糖液（0.1 毫克/毫升） $\times 5\text{ml}$ ：

取 1.5~2 克葡萄糖于硫酸干燥器内过夜，隔日精确称取葡萄糖 1 克，用少量 0.25% 苯甲酸溶解，转入 100 毫升容量瓶中以 0.25% 苯甲酸溶液定容。置冰箱长期保存（此为 10 毫克/毫升标准葡萄糖液）。临用前，再准确吸取葡萄糖贮液 1 毫升，置于 100 毫升容量瓶中，用 0.25% 苯甲酸溶液稀释至刻度。（此为 0.1 毫克/毫升标准葡萄糖液）

四、操作步骤及数据记录：

1. 无蛋白血滤液制备：取 25ml 锥形瓶一个，准确吸取抗凝血 1 毫升（血液中加入少量草酸盐抗凝剂，1~2 毫克/毫升血液）。用滤纸擦干净吸量管外壁的血液，然后缓缓加入锥形瓶底部，再加入 7 毫升蒸馏水，混匀，使完全溶血。继续加入 1 毫升 0.05mol/L

SO₄溶液(边加边摇)、1毫升10%钨酸钠液(边加边摇)。静置5分钟,若振摇后不再发生泡沫,说明蛋白质已完全沉淀。用定量滤纸过滤(或2500转/分,离心10分钟),即得完全澄清无色的无蛋白血滤液。

2. 血糖测定:取四支血糖管,按下表顺序操作。

管 号 试剂 (毫升)	空白管	低 浓 度 标准管	高 浓 度 标准管	测 定 管
无蛋白血滤液	—	—	—	1.0
蒸馏水	2.0	1.0	—	1.0
标准葡萄糖液	—	1.0	2.0	—
碱性铜试剂	2.0	2.0	2.0	2.0
混匀,置沸水液中煮沸8分钟,取出用流动水自动冷却3分钟(冷却时切勿摇动)				
磷钼酸试剂	2.0	2.0	2.0	2.0
磷钼酸稀释液至	25.0	25.0	25.0	25.0
吸光度(OD) ₄₂₀				

用橡皮塞塞紧管口,颠倒混匀。在分光光度计420nm波长处用空白管调零,读取各管吸光光度值(O. D.)₄₂₀填于表格中。

五、计算:

选以与测定管吸光度值较接近的标准管,计算血糖浓度。如以高浓度标准管为参照,按下式计算。

$$\text{血糖浓度(毫克/100毫升)} = \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准吸光度}} \times 0.2 \times \frac{100}{0.1} = \underline{\hspace{2cm}}$$

六、结果讨论:

七、思考题:

1. 怎样取用比色皿?
2. 测定血糖浓度所用动物血,为什么必须无蛋白?

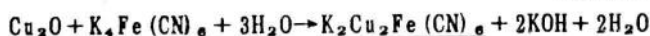
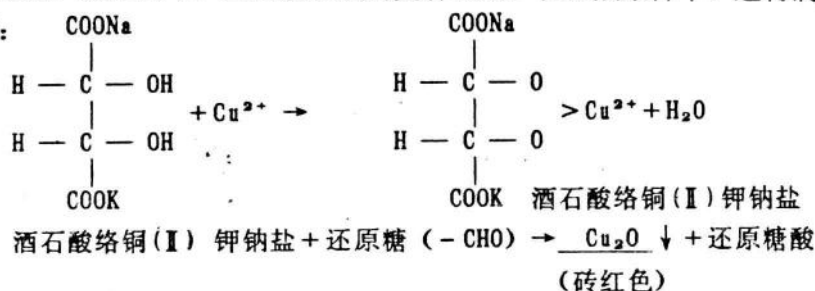
实验四：总糖和还原糖测定——斐林氏法

一、目的：

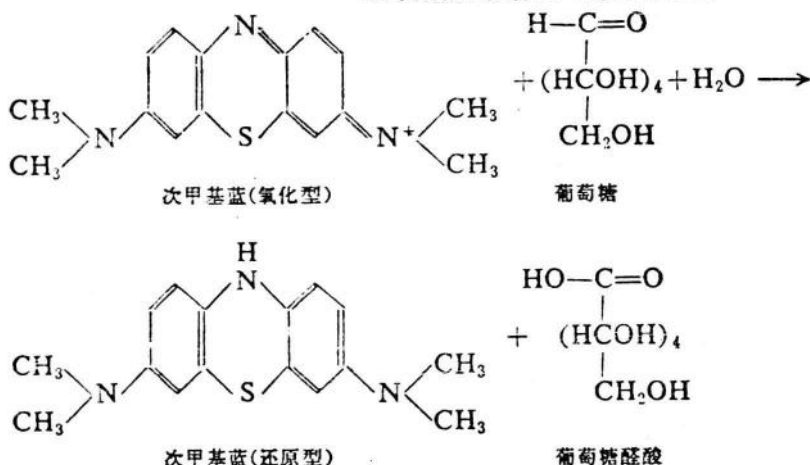
1. 学习常用快速定糖法——斐林试剂热滴定糖的原理及方法；
2. 正确掌握滴定管的使用方法 & 热滴定终点。

二、原理：

单糖及部分双糖是还原糖，含有具有还原性的自由醛基或酮基。在碱性溶液中能将金属离子 (Cu^{2+} 、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 等) 还原，而糖本身则被氧化成各种羟酸类化合物。本实验所用的斐林试剂热滴定法，就是由甲、乙两液组成的斐林试剂，在加热条件下，进行滴定，其反应原理如下：



亚铁氰酸铬铜(Ⅰ) 钾盐 (无色)



斐林试剂中 Cu^{2+} 氧化性比次甲基蓝强，滴入的还原糖液首先使 Cu^{2+} 被还原完后，少量过量的还原糖可将次甲基蓝还原为无色。溶液蓝色消失为滴定终点。在测定时，先做一对照管 (不加样品)，用标准葡萄糖滴定求知一定体积斐林试剂中 Cu^{2+} 和次甲基蓝的量，即测定对照管消耗的标准葡萄糖量 (A)。再做样品管，样品中还原糖消耗斐林试剂中一部分 Cu^{2+} ，剩余的量再用标准葡萄糖来滴定，即样品消耗的标准葡萄糖量 (B)。将 (A) 减 (B) 即为样品中还原糖量。

三、实验材料、器材、试剂：

1. 材料：山芋粉 <3 克>；
2. 器材：①三角烧瓶 250 毫升 1<×6>；

②容量瓶 100 毫升 $\times 3$ ；
 ③烧杯 150 毫升 $\times 2$ ；
 ④吸量管 5 毫升 $\times 4$ ，10 毫升 $\times 2$ ；
 ⑤玻璃漏斗（6CM），定性滤纸（9CM）（各 $\times 2$ ）；
 ⑥广泛 PH 试纸、天平、恒温水浴箱（50℃）、电炉（300W）、滴定管 25 毫升、双孔橡皮塞（各 $\times 1$ ）。

3. 试剂：

①斐林氏甲液（40Ml）：

15 克 $C_5SO_4 \cdot 5H_2O$ + 0.05 克次甲基兰 + 水定容 1000 毫升；

②斐林氏乙液（40Ml）：

50 克酒石酸钾钠

54 克氢氧化钠 + 蒸馏水定容 1000 毫升；

4 克亚铁氰化钾

③0.1%标准葡萄糖溶液（50Ml）：准确称取干燥恒重的葡萄糖 1.00 克，加入少量蒸馏水溶解后，再加 8 毫升浓盐酸（防微生物生长），蒸馏水定容至 1000 毫升。

④6mol/L HCl（20ml）

⑤6mol/L NaOH（20ml）

四、操作步骤及数据记录：

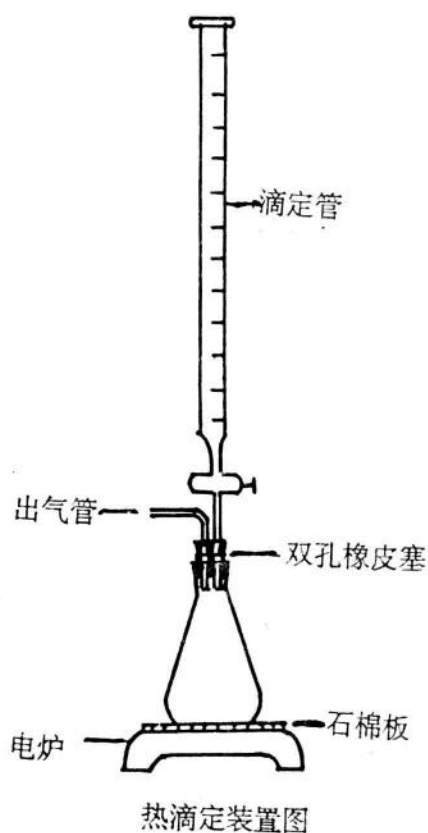
1. 还原糖提取：称取山芋粉 2.00 克，在小烧杯中先用少量水调成糊状，再加入 70 毫升蒸馏水，50℃ 保温 15 分钟，取出在 100 毫升容量瓶中定容，过滤，取滤液测定其还原糖。

2. 总糖水解：称取山芋粉 1.00 克于小烧杯中，加 6mol/L 盐酸 10 毫升，蒸馏水 15 毫升，在沸水浴上加热 0.5 小时，取出后用 6mol/L 氢氧化钠中和至中性，再定容至 100 毫升。过滤，取滤液 10 毫升稀释至 100 毫升，即为稀释 1000 倍总糖水解液。

3. 糖的定量测定：

按右图装置热滴定仪器。

取六个锥形瓶，按下表分别加入各试剂。（整个实验要连续、快速，仅三分钟可滴定完全。



热滴定装置图

管 号 试剂 (毫升)		1	2	3	4	5	6
斐林 试剂	甲 液	5	5	5	5	5	5
	乙 液	5	5	5	5	5	5
还原糖提取液		—	—	5	5	—	—
总糖水解液		—	—	—	—	5	5
0.1%葡萄糖初滴入量		7	7	—	—	—	—
加热至沸腾状态，然后以4—5滴/秒的速度加入葡萄糖液。当滴定至蓝色刚消失，出现黄色时立即停止滴定（再现蓝色，切勿再滴定）							
0.1%葡萄糖总滴入量							

五、计算：

$$\text{还原糖}\% = \frac{(A-B) \times \text{葡萄糖浓度}(\text{mg/ml}) \times \text{样品稀释倍数} \times 100}{\text{吸取测定毫升数} \times \text{样品量}} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\text{总糖}\% = \frac{(A-B) \times \text{葡萄糖浓度}(\text{mg/ml}) \times \text{样品稀释倍数} \times 100}{\text{吸取测定毫升数} \times \text{样品量}} = \underline{\hspace{2cm}}$$

六、结果讨论：

七、思考题：

1. 本实验定量测定糖时，为何在沸腾状态下滴定？
2. 为什么要做空白？说明本实验误差来源及消除方法。

实验五 粗脂肪的定量测定——索氏抽提法

一、目的：

1. 学习和掌握粗脂肪提取的原理及测定方法。
2. 熟悉和掌握重量分析的基本操作。

二、原理：

脂肪为三元醇（甘油）和脂肪酸结合成的酯类。可溶解在脂溶性有机溶剂中。

利用这一特性，常将样品浸于脂肪溶剂（无水乙醚或 30~60℃ 的石油醚），借助于索氏提取器进行循环抽提。再将抽提物蒸馏挥去有机脂溶剂，称取瓶中残留物重量（或样品损失重量），即可获得该样品的粗脂肪含量。

三、实验材料、器材、试剂：

1. 材料：油菜籽（或含脂食品、饲料）<10 克>
2. 器材：①流动自来水；
②脱脂棉花、滤纸（15×12cm）、脱脂白线各少许；
③索氏抽提器（抽提瓶、提取筒、冷凝管）、分析天平、电烘箱（100~105℃）、恒温水浴箱（30~80℃）、干燥器、称量瓶、蒸发皿、小漏斗<各×1>。
3. 试剂：①无水 C_2Cl_2 （少许）；
②10%KI（用于检查无水乙醚中是否有过氧化物）；
③无水乙醚（或沸程 30~60℃ 石油醚 C·R）<50ml>。

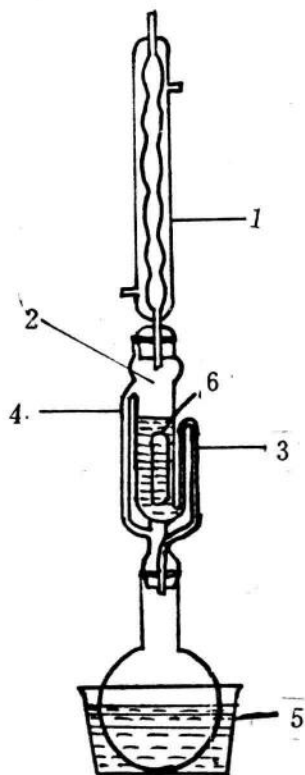
四、操作步骤及数据记录：

1. 样品制备：取 10 克在 100℃ 烘箱中干燥 3~4 小时，取出冷却于干燥器中 0.5 小时，在研钵中研细碎，精确称取 5 克样品 $W = \underline{\hspace{2cm}}$ 克。

2. 滤纸筒的制备：取 15×12cm 脱脂滤纸一张，绕成圆筒形，底部褶起封闭，使其成为长 7cm 直径 1cm 的圆筒形纸包。将称好的样品全部转入筒中，上层覆盖一层 0.5cm 厚的脱脂棉花，用脱脂线捆好以防样品溢出。

3. 抽提：称量已洗净、干燥、冷却后的索氏抽提瓶的重量 $M_1 = \underline{\hspace{2cm}}$ 克。

将样包放入索氏提取管中（脱脂棉花层在上方）。用小漏斗从冷凝管上端加入石油醚（或无水乙醚）达提取瓶容积的 2/3 处。球瓶部分全部浸入水浴（冬季 70~80℃、夏季 40℃，保证每分钟 1~1.5 滴的速度回流）加热，使无水乙



醚（或石油醚）不断回流＜1＞提取 6~16 小时，直至滤筒内乙醚无色，不再有脂肪溶出为止。（检查方法：用滴管在抽提筒中取出 1 滴抽提液于滤纸或毛细玻璃皿上，待乙醚挥发无油迹即为抽提完全）。

4. 称量：取下滤纸包，回收提取瓶中乙醚，待接受瓶中乙醚剩下 1—2 毫升时在水浴上蒸干，再于 95~105℃ 下干燥 2 小时，干燥器中冷却 0.5 小时，称重_____克、克、_____克至恒重 $M_2 =$ _____克。

五、计算：

样品中脂肪含量 = $(M_2 - M_1 / W) \times 100\%$

六、结果讨论：

七、思考题：

1. 指出几种含脂量较高的食品（包括果蔬、谷类、肉类）。
2. 除卵磷脂外，从动物组织中还可以提取哪些磷脂？
3. 写出四种良好的脂肪溶剂。

八、说明：＜1＞乙醚蒸气由联接管上升至冷凝器，凝结成液体，滴入提取筒中，到过一定高度后，溶有脂肪的乙醚经虹吸管流入提取瓶，如此循环抽提脂肪。

实验六 粗蛋白质测定——常量凯氏定氮法

一、目的：

1. 学习凯氏定氮法原理；
2. 掌握常量凯氏定氮法测定物质中蛋白质含量的操作技术。

二、原理：

蛋白质是含氮有机化合物。含氮有机物同浓硫酸、催化剂 (CuSO_4) 共热消化分解，其中 C·H 被转为 CO_2 和 H_2O ，N 转为 NH_3 ， NH_3 进一步与浓 H_2SO_4 作用生成硫酸铵。然后进行碱化蒸馏，使分解出的氨气借水蒸汽蒸馏到一定浓度一定量的硼酸溶液中，从而使硼酸中 $[\text{H}^+]$ 降低。再用标准的无机酸滴定，直至恢复到原来的 $[\text{H}^+]$ 浓度。根据所用标准酸的物质的量的浓度及耗去标准酸体积，可计算出待测物中含氮量，含氮量再乘以 6.25 (6.25 克蛋白质中含有 1g 氮) 换算系数，则为该样品中含蛋白质总量。

三、实验材料、器材、试剂：

1. 材料：食品 (或饵料、饲料) <干样品 0.2 克>
2. 器材：①蝴蝶小夹子 (1×4)；
②100 毫升凯氏烧瓶，100 毫升容量瓶，150 毫升锥形瓶；
③小玻璃皿、硫酸纸 (6×6CM，2×30CM) <各×2>；
④移液管 10 毫升 (×4)，5 毫升 (×1)；
⑤小玻璃珠 (3~5 粒)；
⑥粗、细玻璃棒，小漏斗，10 毫升量筒，电炉 (600W)，50 毫升烧杯，分析天平及台称，25 毫升酸式滴定管，凯氏定氮蒸馏装置 <各×1>。
3. 试剂：①浓 H_2SO_4 <15 毫升>；
②粉末 K_2SO_4 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 以 3:1 配比研磨；
③30% NaOH 液 (15~20 毫升)；
④2% 硼酸液 (20~30 毫升)；
⑤标准盐酸液 (0.01mol/L，20~40 毫升)；

⑥混合指示剂：(1~2 毫升)。 0. 1%甲基红乙醇溶液 2 份

>临用时 2: 1 混合

0. 1%次甲基蓝乙醇溶液 1 份

四：操作步骤及数据记录：

(一) 消化：称取样品 $W =$ _____ 克 (干样品约 0. 1~0. 15 克，半干样品 1~1. 5 克)，用硫酸纸条慢慢送入已洗净、干燥、冷却至恒重的凯氏烧瓶内底部，再向凯氏烧瓶内依次送入 1~3 粒玻璃珠、1 克混合催化剂 (K_2SO_4 为了提高消化液沸点，使消化时间更长、更彻底)、8 毫升浓 H_2SO_4 。将凯氏烧瓶固定在消化架上，打开通风厨及电炉电源，开始消化应用小火使样品完全碳化成深褐色后 (约 20~30 分钟)，改用大火使溶液沸腾。经 5~6 小时后，溶液呈浅蓝色透明液 (注意不是呈黄色透明液) 时，断开电炉电源，冷却至室温，此刻溶液为无色透明液。打开通风厨电源，取出凯氏烧瓶，并加入 10 毫升蒸馏水，摇匀后溶液又呈蓝色，冷却后转入 100 毫升容量瓶定容，即消化稀释液总体积 $V_{总} = 100$ 毫升。同时作一平行空白实验。

(二)、蒸馏：

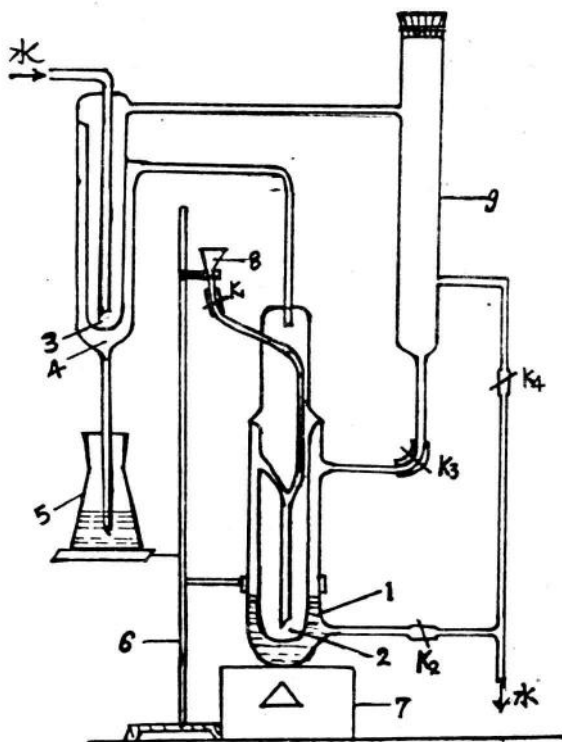
1. 安装、清洗蒸馏装置：

<1>用一铁架台固定好凯氏定氮仪 (如图，由蒸汽发生器①、反应管②、冷凝器③④组成)、接受瓶，进出冷凝水胶管。

<2>关闭夹子 K_2 、 K_4 ，打开夹子 K_3 ，从⑨管上口送上 5~10 毫升用硫酸酸化的蒸馏水，接通电炉电源，让蒸汽发生器中水沸腾，使蒸汽通过整个仪器约 15 分钟后，将冷凝管下端浸入 5 毫升 2% 硼酸液 (内滴入 1~2 滴混合指示液) 的锥形瓶中，若锥形瓶内液不变色，则证明蒸馏装置已洗滴干净；若溶液颜色退去则继续蒸馏反复至干净。之后下移锥形瓶，使冷凝管下口端离开液面约 1cm，继续通蒸汽洗滴 1 分钟。

<3>断开电源关闭夹子 K_1 ，用蒸馏水洗瓶冲洗冷凝管下口，(可再用一湿布包蒸汽发生器外面) 由于反应室外层蒸汽冷缩，压力降低，反应室内凝结的水可自动吸出进入反应室的底部 (若反应室内液尚未完全排除，可再用洗耳球于冷凝管出冷凝液下管口向上吹气，把反应室内液排除)，打开夹子 K_2 ，倾斜倒出球底部废水。

2. 蒸馏样品：



凯氏定氮仪蒸馏装置图