

2016.7.12

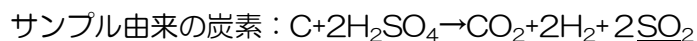
植物組織窒素定量マニュアル —ケルダール法—

窒素は、植物の健全な生長のために必要不可欠な物質である。窒素量の定量により、「物質 A」の葉面散布が、ジャガイモ植物体内への吸収窒素量にどのように影響しているのかを調査する。

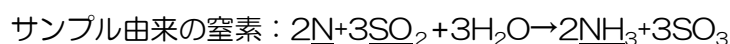
【原理】

- ① 分解：[試料+硫酸+分解促進剤]←加熱

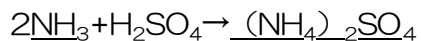
試料に高濃度 H_2SO_4 を加えて、有機物を脱水、炭化



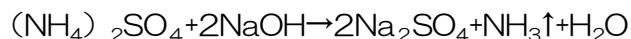
SO_2 は、N（サンプル由来）を還元して NH_3 を生成、 SO_3 発生



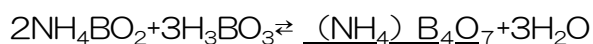
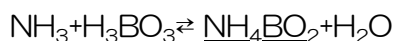
NH_3 は、直ちに H_2SO_4 と化合して塩 $(NH_4)_2SO_4$ となり沈む



- ② 蒸留：上記の分解液（ $(NH_4)_2SO_4$ を含む H_2SO_4 ）に、過剰量の $NaOH$ を加えて、アルカリ性にしてから蒸気で加熱して、再び NH_3 を放出させ、

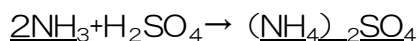


この NH_3 を冷却して、 NH_4OH とし、規定のホウ酸にトラップさせる。



（トラップされてはいるが、上記の 2 状態の解離の方向性は可逆的）

- ③ 滴定：上記の「自由に解離可能な (NH_3) 」を硫酸の規定液で滴定する。



【装置と器具】

電熱炉，ケルダール蒸留器，ケルダール分解フラスコ，ディスペンサー，ビュレット，電子天秤，200 (or300) mL 三角フラスコ，薬包紙，ビニールテープ，ガラス棒。

【試薬】

- ・分解に供する触媒（分解促進剤）：微粉末に磨砕した硫酸銅（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）と硫酸カリウム（ K_2SO_4 ）を 1：9 の割合で混合したもの（調整済）
- ・4%ホウ酸溶液：pH 指示薬として， $1 \times 10^{-3}\%$ の BCG（ブロム・クレゾール・グリーン）と $5 \times 10^{-4}\%$ の MR（メチルレッド）を含む（調整済）
- ・12.5N 水酸化ナトリウム溶液
- ・0.1N (0.05mol/L) 硫酸標準液
- ・97%濃硫酸

【実験操作】

サンプリング（6/22 および 7/5）

- ① 生長解析サンプリングの 1 回目および 2 回目時に，対照区，A 処理区より新鮮重で 5 g 程度の葉を，それぞれ 2 サンプル（各区合計 10 g 程度）取った後，封筒に入れて乾燥機で乾燥させる（各時期で合計 4 サンプル）。（←サンプリング済）

1 日目 (7/12)

- ① SB122 の乾燥機にある葉の乾物サンプルを回収して，S213 で粉碎，ビニールパック内に保存（ラベリングを忘れずに）。
- ② ブランクを含めて合計 5 本のフラスコには，それぞれビニールテープを張り，ID をラベルする。
粉末試料 0.5 g を正確に量り，ケルダール分解フラスコに入れる
触媒を 5 g 正確に量り，薬包紙ごとケルダール分解フラスコに入れる（ブランクのフラスコ（1 本）には，試料は入れないが薬包紙のみを入れること）。ガラス棒で薬包紙を，フラスコの底に押し込む。その後濃硫酸を 10mL それぞれのフラスコに入れる。
- ③ フラスコを電熱炉にかける。加熱に伴い分解が進み，分解内容物の色が，黒→緑→すんだ青に変化する。熱している時間は，1.5 時間程度。その後，1 時間程度冷却したフラスコに 30mL の蒸留水を入れ，空気中の CO_2 の溶解込みを防ぐために，ラップでフラスコの口をマスクする

2日目 (7/13)

- ④ 分解物が入っているケルダール分解フラスコと、10mLのホウ酸溶液をピペットで分注した三角フラスコを、それぞれケルダール蒸留機にセットする。蒸留器を作動させて（操作法は当日説明します）、アンモニアを三角フラスコ内にトラップさせる。
- ⑤ 試料由来の窒素を源とするアンモニアを含む三角フラスコ内容物を、0.1N硫酸標準液の入ったビュレットによって滴定する（ビュレットの操作方法は当日説明します）。フラスコ毎に滴定値を記録し、その値を以下の式を用いて、窒素含有率（%）を算出する。

計算方法

乾物中の窒素含有率（%）

$$= 1.4007 \text{ (mg)} *1 \times F *2 \times (\text{試料滴定値} - \text{ブランク滴定値}) \div 500 \text{ mg} *3 \times 100$$

*1 1mLの1/10N硫酸は、NH₃-Nの1.4007mgと当量

*2 1/10N硫酸の補正係数、Fの値は、1.000、1.002あるいは1.005（各ビュレットで使用する規定硫酸液による）

*3 用いた粉砕乾物試料の重さ。もし500mgでなければ、用いた重さで除すること。

【留意点】

○分解について

試料の分解時、ケルダール分解フラスコに濃硫酸を入れる。この作業にはディスペンサーを用いるが、**濃硫酸の取り扱いには十分に気を付けること**。万が一、着衣、肌などに濃硫酸が付着した場合には、直ちに流水で洗い、硫酸濃度を薄めること。衣服の場合には、この作業を怠ると、付着部に穴があく。

○滴定について

今回滴定に用いるビュレットは3基ある。それぞれで硫酸規定液の補正係数「F」の値が異なる。

生物資源科学実験 測定用紙 (窒素分析用)

_____ 班 氏名 _____

処理区	反復	滴定値 1/10N 硫酸の量 (mL)	乾物葉サンプル 中の窒素含有率 (%)
ブランク	—		
対照区	1		
	2		
	平均	-----	
物質A区	1		
	2		
	平均	-----	

・ 1mLの1/10N硫酸は、NH₃-Nの1.4007mgと当量

・ 1/10N硫酸の補正係数Fは、ディスペンサーに取り付けてある試薬瓶のラベル記載で確認すること。

・ 乾物中の窒素含有率 (%)

$$= 1.4007 \text{ (mg)} \times F \times (\text{試料滴定値} - \text{ブランク滴定値}) \div 500 \text{ mg} \times 100$$

○上の結果をもとに、ジャガイモ葉内の窒素質含量に及ぼす物質A葉面散布の影響を考察