

凯氏定氮仪测定灭活大肠杆菌粉疫苗中的蛋白质含量

1 前言

致病性大肠杆菌是人和多种动物（猪、鸡等）的致病菌之一。疫苗免疫是控制大肠杆菌病的主要方法。从动物体分离或实验室保存鉴定的大肠杆菌菌株，经扩增培养，配制成适当浓度，用甲醛灭活，使大肠杆菌失去毒力但又保持免疫原性，制成灭活疫苗。在疫苗中添加白油佐剂，有利于增强疫苗的免疫效果。本实验参照《中国药典 2020 年版 第四部 0731 蛋白质含量测定 第一法 凯氏定氮法》对大肠杆菌粉疫苗中的蛋白质含量进行测定。

2 仪器与试剂

2.1 仪器

K1160 全自动凯氏定氮仪，分析天平。

2.2 试剂

20g/L 硼酸溶液，溴甲酚绿-甲基红混合指示剂，400g/L 氢氧化钠，0.02mol/L 硫酸或盐酸标准滴定液。

3 实验方法

3.1 样品制备

非蛋白氮供试品溶液的制备：精密量取供试品适量（2020 版药典中规定如供试品为冻干制剂或固体粉末时，应复溶后量取，且蛋白质含量不高于 0.2g。由于本样品复溶困难，即称取 0.3~0.4g 样品。），置 20mL 容量瓶中，加水 10mL，10%钨酸钠溶液 2mL，0.33mol/L 硫酸溶液 2mL，加水至刻度，摇匀，静置 30 分钟，过滤，弃去初滤液（约 3~5mL），取续滤液作为非蛋白氮供试溶液。

3.2 取样

总氮供试品称取 0.05g(2020 版药典中规定如供试品为冻干制剂或固体粉末时 ,应用 0.9% 氯化钠溶液定量稀释成每 1mL 中含氮量约 1mg 的溶液 , 然后量取 1mL 进行测定。由于本样品复溶困难 , 即称取 0.05g 样品。) , 非蛋白氮供试品量取 2mL 非蛋白氮溶液加入消化管中 , 各加入 3g 硫酸钾与 0.2 硫酸铜水 , 再沿瓶壁滴加硫酸 10ml。

3.3 消解

设定消解参数

表 1 消解参数设置

阶段	温度/°C	保持/min
1	250	30
2	420	60

备注：第一阶段不盖排废罩，排出水分。

3.4 测试

定氮仪参数设置如下表。

表 2 定氮仪参数设置

硼酸	稀释水	碱液	蒸馏量	蒸汽流量	蛋白系数	滴定酸浓度
20mL	50mL	40mL	5min	100%	6.25	0.0200mol/L

4 结果与讨论

4.1 实验结果

表 3 大肠杆菌粉疫苗中的蛋白质含量测试结果

样品名称		取样质量 g	氮含量%	平均值%	蛋白质含量%
灭活大肠 杆菌粉 AND20060 1	总氮	0.05071	10.930	10.937	66.194
		0.04968	10.943		
	非蛋白氮	0.3887	0.3466	0.346	
			0.3453		

4.2 结论

测试结果显示本次测试的大肠杆菌粉疫苗中的蛋白质含量为 66.194%。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 附录 0731 蛋白质含量测定 第一法凯氏定氮法

注意事项

1) 该样品为粉末样品, 因此依据药典在样品制备时应制备成合适浓度的溶液进行测试, 如样品复溶困难可直接称取相应重量样品进行测试。

2) 本实验中蛋白质含量= (总氮含量-非蛋白氮含量) *6.25。