

УДК 663.252.4

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ
К ОПРЕДЕЛЕНИЮ РАЗЛИЧНЫХ
ФОРМ АЗОТА В РАСТИТЕЛЬНОМ
СЫРЬЕ**

Якуба Юрий Федорович
канд. техн. наук, доцент

Сула Роман Алексеевич
канд. техн. наук

Ушакова Яна Владимировна

Филимонов Михаил Васильевич

*Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства
Россельхозакадемии, Краснодар, Россия*

Рассмотрены возможности и новые методические решения определения общего азота в растительном сырье с помощью классического химического анализа и капиллярного электрофореза. Обсуждены действующие методические подходы к пробоподготовке образцов.

Ключевые слова: МЕТОД,
РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ, АНАЛИЗ,
ЭЛЕКТРОФОРЕЗ, АЗОТ

UDC 663.252.4

**THE METHODIC APPROACHES
TO DETERMINATION
OF VARIOUS NITROGEN FORMS
IN THE PLANT RAW MATERIAL**

Yakuba Yuriy
Cand. Tech. Sci., Docent

Sula Roman
Cand. Tech. Sci.

Ushakova Yana

Filimonov Michail

*State Scientific Organization North
Caucasian Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture
of the Russian Academy of Agricultural
Sciences, Krasnodar, Russia*

The possibilities and new methodic decisions of determination of general nitrogen in the plant material by means of capillary electrophoresis and classic chemical analysis are considered. The operating systematic approaches providing control samples preparing are discussed.

Key words: METHOD, PLANT ROW
MATERIAL, ANALYSIS,
ELECTROFORESIS, NITROGEN

Введение. Азот занимает четвертое место по распространенности в биосфере после водорода, углерода и кислорода и входит в состав белков, нуклеиновых кислот, хлорофилла, ферментов, большинства витаминов и других органических азотистых соединений, которые играют важную роль в процессах обмена веществ растений. В почве содержится азота до 0,5 %, в сухом веществе растения – в среднем 1,5 %. Растения синтезируют белок, усваивая содержащиеся в почве азотистые вещества, главным образом нитраты аммонийных солей, при недостатке азота у растений уменьшается содержание зеленых пигментов, бледнеют листья, замедляется рост, листья

становятся более тонкими. Например, у злаковых культур при недостатке азота ослабляется развитие колосков: они формируются короткими и с меньшим количеством зерен [1].

Полноценное обеспечение азотом повышает продуктивность растений, они хорошо кустятся, формируют крупные темно-зеленые листья и репродуктивные органы, в которых активизируется синтез белка, что позволяет им длительное время сохранять жизнедеятельность. При усиленном азотном питании улучшается качество урожая кормовых культур и увеличивается содержание белка в зерне. В корнеплодах сахарной свеклы, клубнях картофеля – наоборот: при чрезмерном количестве азота в конце вегетации накапливаются аминокислоты и другие азотистые вещества, которые уменьшают выход сахара и снижают содержание крахмала. У льна и зерновых избыток азота может спровоцировать полегание посевов [2].

Поглощаемый растениями азот распределяется по органам неравномерно. Поступившие в растения минеральные формы азота проходят сложный цикл превращений, в конечном итоге включаясь в состав органических азотистых соединений, синтез которых идет с образованием аммиака, являющегося также конечным продуктом распада этих соединений. Более высокое содержание азота наблюдается в генеративных органах, особенно в зерне, и меньше его концентрация в листьях, стеблях, корнях, корнеплодах, очень мало в соломе, где представлена в основном клетчатка. Общий азот в растении представлен двумя формами: азотом белковым и азотом небелковых соединений, к которым относятся амиды, амины, свободные аминокислоты, нитраты и аммиак [3].

Для определения азота в растениях разработано множество методов, которые классифицируются в зависимости от того, какие из его соединений необходимо исследовать. Определение общего азота основано на окислении органических форм, содержащих азот, и последующего их анализа. Для анализа применяют многочисленные модификации химических

методов определения азота по Кьельдалю и Дюма, азотные (СНН) анализаторы, хроматографические, спектрофотометрические и другие методы [5].

К наиболее ранним относятся методы Кьельдаля, Деварда и Ульч-метод, которые впоследствии были подвергнуты модификации.

A.C. Sessions and J.W. Shive обратили внимание на то, что азот, определяемый Ульч-методом, может оказаться не только в форме нитратов, но и амидов, соответственно возможны потери азота в результате неправильных манипуляций при работе с амидосодержащими растворами [4].

Апробированный в 1920 году метод Деварда заключается в приготовлении 1%-ного щелочного раствора растительного экстракта, который обрабатывают реактивом Деварда. Аммиак, образующийся в результате разложения нитратов, абсорбируется стандартной кислотой и титруется стандартной щелочью [5]. Позднее T.G. Phillips пришел к выводу, что данный метод может успешно применяться при условии, что аммонийный и амидный азот исключают до определения нитратов [6].

Затем G.T. Рупе разработал два похожих метода определения азота, дающих воспроизводимые результаты. Первый метод основан на применении гидроксида титана в холодном щелочном растворе; второй метод зависит от осаждения нитратов охлажденной пробой Деварда, причем аммоний превращается в хлорид аммония в вакууме при 45-50°C с гашеной известью [7].

A.C. Sessions и J.W. Shive свежую растительную ткань размалывали в ступке с кварцевым песком и последовательно с помощью дистиллированной воды вымывали нитраты. Полученный раствор нагревали до кипения, добавляли 3 см³ уксусной кислоты и кипятили в течение 2-3 минут. Образовавшийся осадок фильтровали через воронку Бачнера. Объем полученного раствора доводится до 500 см³ горячей кипяченой водой.

Для анализа использовалась сложная конструкция, состоящая из абсорбционных пробирок и аспирационных колб, соединенных тестовыми

трубками таким образом, чтоб через всю систему проходил регулируемый поток воздуха. В колбах были исследуемые образцы, а в соответствующих пробирках – нейтральные растворы карбоната натрия и хлорида натрия, герметично закрытые пробками, через которые проходили трубки, соединяющие пробирки со стандартным раствором кислоты. После окончания аспирации установка разбирается, и стандартный раствор кислоты из абсорбционных трубок титруют.

Концентрация общего азота вычисляется из количества образовавшегося аммиака. Оставшийся в колбах безаммиачный экстракт затем снова анализируется подобным образом вместе с Devarda-реактивом в течение 12 ч, а полученный раствор стандартной кислоты затем титруется и вычисляется концентрация нитратов. Данный метод и его модификации был достаточно точным для определения фракций неорганического азота в растительном материале [4].

В работе [8] предложено дифференцировать и определять различные соединения азота в растениях, особенно в период урожая, так как лабильность большинства компонентов и их взаимодействие с реактивами, применяемыми во многих методиках, не дают полноценного представления о балансе азота в растении. Помимо общего азота зачастую определяют амидный и аминокислотный азот. Растворимые соединения азота не менее важны для активного метаболизма растений, чем свободные аминокислоты, следовательно, пробоподготовка должна включать гидролиз 20%-ной соляной или серной кислотами в течение 12-24 ч, либо такими солями как гидросульфит, сульфат натрия, либо смесью ферментов, полученных из *Aspergillus parasiticus* или *Aspergillus wentii*. и другими [8].

Для злаков и других растений с плотными волокнистыми листьями был применен хлоратный метод, для обеспечения контакта с реагентом, чтобы исключить потери азота. Метод предусматривает использование 50%-ного раствора хлората натрия, добавляемый к исследуемой пробе в

колбу Эрленмейера, далее вносили 52%-ную серную кислоту и соединяли колбу Эрленмейера с конденсатором с водным охлаждением таким образом, чтобы содержимое колбы легко перемешивалось, и постепенно нагревали в течение нескольких минут. К содержимому колбы после охлаждения добавляли фенолдисульфоновую кислоту и титровали 40%-ным раствором гидроксида натрия [9].

Определение общего азота обычно проводится макро- и микрометодами Кьельдаля. Принцип метода Кьельдаля заключается в том, что весь азот органического вещества при сжигании с крепкой серной кислотой и катализатором переводится в сернокислый аммоний, при этом углерод переходит в CO_2 , водород – в воду, азот же восстанавливается в аммиак.

Из полученного раствора после подщелачивания отгоняется аммиак, который поглощается отмеренным, заведомо избыточным объемом титрованной кислоты. Оставшаяся не связанной с аммиаком кислота оттитровывается обратно щелочью, путем вычитания узнается количество связанной с аммиаком титрованной кислоты, следовательно, количество аммиака или азота. Однако подобная процедура требует много времени для выполнения и наличие специальных аппаратов, поэтому ее пытались заменить другими методами.

Так, после мокрого сжигания вместо отгонки образовавшегося аммиака и последующего титрования можно сразу оттитровать аммиак в колбе. Для этого используют гипохлорит или гипобромит натрия. Расход окислительного раствора, который соответствует количеству титруемого аммиака, измеряется йодометрическим методом. Но этот метод не получил широкого распространения, во-первых, потому, что окислительные растворы неустойчивы, во-вторых, необходимо установить оптимальные соотношения количества азота в объекте и количества окислительного раствора, в-третьих, присутствие некоторых тяжелых металлов в среде мешает определению [10].

В настоящее время довольно распространенным методом определения нитратов считается хроматография. Метод газожидкостной хроматографии, обладающий высокой чувствительностью и достаточной точностью, основан на нитровании органических соединений ароматического ряда – бензола и его производных в присутствии серной кислоты, разделения их с помощью колонки, заполненной специальными сорбентами, и количественном определении нитропроизводных пламенно-ионизационным детектором или детекторами электронного захвата [11].

Распространенным методом определения нитратов является стандартный ионометрический экспресс-метод, позволяющий проводить экспресс-анализ овощей, зеленых кормов, сена, силоса, сенажа, витаминной муки, корнеплодов. Нитраты извлекают раствором алюмокалиевых квасцов с последующим измерением их концентрации в полученном растворе с помощью ион-селективного электрода.

Несмотря на всю значимость количественного определения общего фосфора и азота в био- и агроценозах, как и в плодах, винограде и продуктах их переработки, существующие методы анализа не обеспечивают требуемую точность (часто зависящую от чистоты реактивов), не обеспечивают требований экологии и защиты окружающей среды, либо требуют значительных затрат для массового диагностического анализа.

Для определения в пробах воды фосфата, нитрата и некоторых других известна следующая методика капиллярного электрофореза: водный раствор ведущего электролита – 0,05 М оксид хрома, 0,1 М диэтаноламин, 0,01 М гексадецилтриметиламмоний гидроксид (ЦТА-ОН), 0,025 М глюконат кальция; отрицательное напряжение 17 кВ, длина волны детектирования – 254 нм, эффективная длина капилляра 0,5 м, внутренний диаметр 75 мкм. Установлено, что нейтральные органические соединения не мешают определению, допускается присутствие до 10 мг/дм³ двухосновных органических кислот и до 3 мг/дм³ перхлорат и формиат-ионов.

Диапазон измеряемых концентраций анионов составляет 5-50 мг/дм³. Необходимо кислотность анализируемой среды регулировать аммиаком, либо уксусной кислотой [12].

Цель настоящего исследования – совершенствование методик определения различных форм азота в растительном сырье.

Обсуждение результатов. Для определения массовой концентрации аммонийного азота может быть использована следующая методика.

Система капиллярного электрофореза или анализатор капиллярный ионный электрофоретический (далее – прибор капиллярного электрофореза или прибор), оснащенный ультрафиолетовым фотометрическим детектором, работающим на длине волны 254 нм, или спектрофотометрический детектор с перестраиваемой длиной волны излучения в области 200-400 нм, кварцевым капилляром, длиной не менее 0,5 м до детектора, внутренним диаметром от 75 мкм, источником высокого напряжения положительной полярности с регулируемым напряжением от 1 до 25кВ и устройством для сбора и обработки информации, например система капиллярного электрофореза «Капель» (номер Госреестра средств измерений 17727-01).

Электролит готовят следующим образом.

Раствор бензимидазола, молярная концентрация 20 ммоль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают навеску 0,2363 г бензимидазола и приблизительно 50 см³ воды. Раствор выдерживают на водяной бане до полного растворения, затем доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Срок хранения раствора при комнатной температуре – 3 месяца.

Раствор винной кислоты, молярная концентрация 25 ммоль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают навеску 0,375 г винной кислоты, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки

дистиллированной водой. Срок хранения раствора в холодильнике при 4-6°C – 3 месяца.

Раствор 18-крауна-6, молярная концентрация 10 ммоль/дм³

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают навеску 0,132 г 18-крауна-6, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки дистиллированной водой. Срок хранения раствора в сосуде из полиэтилена в холодильнике при 4-6°C – 3 месяца.

Рабочий электролит готовят следующим образом: в высушенный стеклянный сосуд с завинчивающейся крышкой помещают 3 см³ раствора бензимидазола, 1 см³ раствора винной кислоты и 2 см³ 18-крауна 6, тщательно перемешивают. Раствор используют в течение одной недели. При необходимости объем раствора может быть изменен.

Прибор подготавливают к работе в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают следующие параметры:

положительное напряжение на капилляре 16 кВ;

время анализа – 12 мин;

ввод пробы – пневматический;

температура капилляра – от 20 до 30°C;

длина волны детектирования – 254 нм.

Примечание: допускается изменение напряжения и времени анализа по решению оператора при обеспечении условий разделения интересующих компонентов.

Градуировочные смеси готовят путем последовательных разбавлений исходной градуировочной смеси иона аммония. Градуировку прибора проводят не реже одного раза в три месяца, а также при замене капилляра, исходных растворов реактивов, использующихся для приготовления рабочих растворов, после ремонта прибора, а также при неудовлетворительных результатах контроля стабильности градуировочной характеристики.

Дозируют в прибор анализируемую пробу не менее двух раз и регистрируют электрофореграммы для каждого ввода. Условия регистрации электрофореграмм проб должны соответствовать условиям регистрации электрофореграмм градуировочных растворов. Прецизионность метода показана в таблице.

Показатели прецизионности метода

Диапазон измерений, мг/кг	0,5-200
Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	4
Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	10
Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r , %, $P=0,95$, $n=2$	8
Предел воспроизводимости, R , %, $P=0,95$, $n=2$	21
Границы относительной погрешности при вероятности, $\pm\delta$, %, $P=0,95$, $n=2$	16

Определение концентрации свободных и связанных аминокислот в биологических объектах и продукции переработки методом капиллярного электрофореза основано на разделении анионных форм N-фенилтиокарбамил-производных аминокислот под действием электрического поля вследствие их различной электрофоретической подвижности. Для идентификации и количественного определения анализируемых компонентов регистрируют ультрафиолетовое поглощение при длине волны 254 нм.

Система капиллярного электрофореза, оснащенная кварцевым капилляром эффективной длиной 0,5 м, внутренним диаметром 0,075 мм, спектрофотометрическим детектором, работающим на длине волны 254 нм и электронно-вычислительной машиной (компьютером) с программным обеспечением для обработки электрофореграмм, например система капиллярного электрофореза «Капель» (номер Госреестра средств измерений 17727-01). Электролит готовят из следующих растворов.

Раствор гидрофосфата натрия, 0,2М

В мерной колбе вместимостью 100 см³ растворяют 7,164 г двенадцативодного гидрофосфата натрия в 50-60 см³ воды. Затем доводят до метки водой и перемешивают. Срок хранения – 2 месяца.

Раствор дигидрофосфата натрия, 0,2 М

Навеску 2,76 г моногидрата однозамещенного фосфата натрия помещают в колбу на 100 см³, растворяют в 70 см³ воды, затем доводят до метки водой. Срок хранения – 2 месяца.

Приготовление ведущего электролита. В колбу вместимостью 25 см³ вносят 0,1135 г β-циклодекстрина, добавляют 3см³ 0,2 м/дм³ раствора гидрофосфата натрия и 0,75 см³ 0,2 м/дм³ дигидрофосфата натрия, перемешивают, добавляют 10-12 см³ воды и растворяют бэтта-циклодекстрин. При необходимости нагревают на теплой водяной бане. После полного растворения β-циклодекстрина доводят до метки водой. Концентрация ведущего электролита 30 мМ, β-циклодекстрина – 4 мМ, значение рН – 7,7-7,8. Срок хранения в полиэтиленовой посуде и температуре +4°С – не более двух недель.

Приготовление реакционных растворов. Раствор карбоната натрия, 0,1 М: в колбу вместимостью 25 см³ вносят 0,715 г десятиводного карбоната натрия, добавляют 15 см³ дистиллированной воды и растворяют. Доводят до метки водой и перемешивают. Срок хранения раствора в полиэтиленовой посуде не ограничен.

Приготовление реактива для дериватизации аминокислот. Раствор N-фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте: в стеклянную емкость вносят 0,2 см³ фенилизотиоцианата и 12 см³ изопропилового спирта, тщательно перемешивают. Срок хранения в холодильнике не ограничен.

Прибор подготавливают к работе в соответствии с руководством по эксплуатации и устанавливают следующие параметры:

- длина волны спектрофотометрического или фотометрического детектора – 254 нм;
- положительное напряжение 9-11 кВ;
- дозирование пробы – пневматическое при 30 мБар в течение 5 с при напряжении 0 кВ;
- время анализа до 40 мин;
- рекомендуется термостатирование капилляра при температуре 20 °С.

Примечание: допускается изменение напряжения и времени анализа по решению оператора при обеспечении условий разделения интересующих компонентов

Градуировка прибора. Исходную градуировочную смесь аминокислот – аргинина, лизина, тирозина, гистидина, лейцина, метионина, валина, пролина, треонина, триптофана, серина, альфа-аланина, глицина (при необходимости могут быть добавлены глютаминовая, аспарагиновая кислоты и цистеин) массовой концентрацией по 1 г/дм³ готовят следующим образом: в мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают по 0,100 г аминокислот, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Срок хранения раствора в холодильнике при 4-6°С – 7 суток. Рабочие градуировочные смеси концентрацией 0,001; 0,005; 0,010; 0,025 и 0,050 г/дм³ готовят путем последовательных разбавлений исходной градуировочной смеси.

Подготовка градуировочных смесей для анализа: градуировочную смесь отбирают мерной пипеткой (дозатором) в количестве 0,05 см³ в пробирку Эппендорфа, добавляют 0,1 см³ 10%-го водного раствора карбоната натрия, и 0,3 см³ раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте. Содержимое тщательно перемешивают и оставляют на 35 мин при комнатной температуре для прохождения реакции между фенилизотиоцианатом и свободными аминокислотами образца. Затем содержимое сушат до суха в потоке теплого воздуха (допускается сушка в естественных условиях), добавляют 0,5 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают,

центрифугируют при 6000 об^{-1} в течение 5 мин, переносят в прибор и пневматическим методом под давлением 30 мБар в течение 5 сек дозируют пробу в капилляр. Градуировку прибора проводят не реже одного раза в три месяца, а также при замене капилляра, исходных растворов, реактивов, использующихся для приготовления электролита, после ремонта прибора, а также при неудовлетворительных результатах контроля стабильности градуировочной характеристики.

Пробоподготовка биоматериала: ввиду незначительного содержания аминокислот в коньячных дистиллятах и бренди для анализа берут $0,5 \text{ см}^3$ напитка в пробирку Эппендорфа, добавляют $0,1 \text{ см}^3$ 10%-го водного раствора карбоната натрия и $0,3 \text{ см}^3$ раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте. Содержимое тщательно перемешивают и оставляют на 35 мин при комнатной температуре для прохождения реакции между фенилизотиоцианатом и свободными аминокислотами образца. Затем содержимое сушат досуха в потоке теплого воздуха (допускается сушка в естественных условиях), добавляют $0,5 \text{ см}^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, центрифугируют при 6000 об^{-1} в течение 5 мин, переносят в прибор и пневматическим методом под давлением 30 миллибар в течение 5 сек дозируют пробу в капилляр. В итоге достигается 10-кратное концентрирование пробы, что учитывают в количественных расчетах. Жидкие пробы биологических объектов (соки, экстракты плодов, настои) для дериватизации берут в количестве $0,05 \text{ см}^3$. Пробы, гидролизованные в 20%-ной соляной кислоте, перед постановкой на реакцию подсушивают, далее следуют процедуре изложенной выше.

Анализируемую пробу дозируют в прибор не менее двух раз и регистрируют электрофореграммы для каждого ввода. Условия регистрации электрофореграмм проб должны соответствовать условиям регистрации электрофореграмм градуировочных растворов.

Используя электрофореграмму, зарегистрированную в приведенных выше условиях анализа, при помощи программного обеспечения к прибору рассчитывают массовую концентрацию соответствующих аминокислот по установленным градуировочным характеристикам с учетом концентрирования.

Заключение. Представленные научные разработки определения различных форм общего азота в растительных образцах обладают перспективой для широкого практического применения в области физиологии растений, а также в производстве продукции перерабатывающей промышленности.

Литература

1. Угай, Я.А. Общая и неорганическая химия: Учеб. Для студентов вузов, обучающихся по направлению и спец. Химия / Я.А. Угай.– М.: Высш. шк., 1997.– 440 с.
2. Кузнецов, А.Е. Научные основы экобиотехнологии / А.Е. Кузнецов.– М.: Высш. шк., 1999.– 428 с.
3. Galloway J.N., Dentener F.J., Capone D.G., Boyer E.W., Howarth R.W., Seitzinger S.P., Asner G.P., Cleveland C., Green P., Holland E., Karl D.M., Michaels A.F., Porter J.H., Townsend A. Nitrogen cycles: past, present and future // *Biogeochemistry*.- 2004.-V.70(2). - P.153–226.
4. Sessions, A.C. A method for the determination of inorganic nitrogen in plant extracts / A. C. Sessions and J. W. Shive // *Paper of the Journal Series, New Jersey Agricultural Experiment Station, Department of Plant Physiology*
5. Strowd, W.H. The determination of nitrites and nitrates in plant tissue / W. H. Strowd // *Soil Science*.– 1920.- 10.-P. 333-342.
6. Phillips, T.G. The determination of nitrogen in relatively simple compounds / // Section IV of the report of the Committee on Methods of Chemical Analysis of the American Society of Plant Physiologists. *Plant Physiol.* - 1927.- №2.- P.205-211.
7. Pyne, G.T. The determination of nitrates in plant materials / // *Jour. Agr. Sci.* 1927.- Part 2.-№17.-P. 153-161.
8. F.S. Orcutt и P.W. Wilson *Biochemical methods for the study of nitrogen metabolism in plants*.-
9. Emmert, E.M. Method for quickly determining nitrogen in plants, and soluble nitrogen as a measure of the nitrogen available for anabolic processes. *Plant Physiol.* 10: 355-364. 1935
10. Сборник методик по физиолого-биохимическим исследованиям в виноградарстве.– М.: Агропромиздат, 1967.– 387 с.
11. Соколов, О.А. Нитраты под строгий контроль / О.А. Соколов // *Наука и жизнь*.– 1988.– №3.– С. 16.
12. Методика М 01-30-2003 Методика выполнения измерения массовых концентраций хлорид-ионов, нитрит-ионов, сульфат-ионов, нитрат-ионов, фторид-ионов и фосфат-ионов в пробах природных, питьевых и очищенных сточных вод с применением системы капиллярного электрофореза «Капель».– С-Петербург.– 2003.– 34с.