

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПАРОДИСТИЛЛЯЦИОННЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ НИТРАТОВ ИЗ РАСТЕНИЙ В ИССЛЕДОВАНИЯХ С¹⁵N

Н. А. САВИДОВ, Б. А. ЯГОДИН

(Лаборатория микроэлементов

и кафедры агрономической и биологической химии)

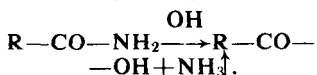
Изучали возможность использования предварительной обработки растительного экстракта сильнокислотными ионообменными смолами и микроионофореза экстракта на полиакриламидном геле для повышения эффективности разделения нитратного азота и азота других фракций растений пародистилляционным методом с восстановлением нитратов в слабощелочной среде по Деварду. Параллельное определение изотопного состава нитратов, выделенных по Деварду и ортокисленовым методом из предварительно обработанных экстрактов, содержащих меченный ¹⁵N органический азот, показало их равноценность при исследовании фракционного состава азота в растениях.

Для изучения некоторых процессов азотного обмена иногда требуется особо тщательное разделение фракций органического и неорганического азота растений. Например, при исследовании вялотекущих процессов окисления аммония до нитратов в тканях растений возникает потребность в использовании соединений аммония высокого обогащения ¹⁵N. В этом случае примесь даже небольшого количества высокообогащенного азота из органических соединений или аммонийного азота в выделяемой фракции нитратного азота растений приводит к артефакту [18, 19].

Общепринятые методы препаративного выделения фракций неорганического азота растений не отвечают этим требованиям, за исклю-

чением быстроразвивающейся за рубежом жидкостной хроматографии высокого разрешения [19], к сожалению, пока малодоступной в нашей стране. Существующие пародистилляционные и микродиффузионные методы основаны на восстановлении нитратов славом Деварда или солями титана в щелочной растительной вытяжке, из которой предварительно удален аммонийный азот [13—16]. Образующийся при восстановлении аммиак затем улавливается в приемнике с кислой средой. Однако растительная вытяжка весьма сложна по химическому составу и содержит, помимо аммония, другие источники восстановленного азота, способные постепенно гидролизироваться в слабощелочной среде (рН 8) с выделением аммиака, ко-

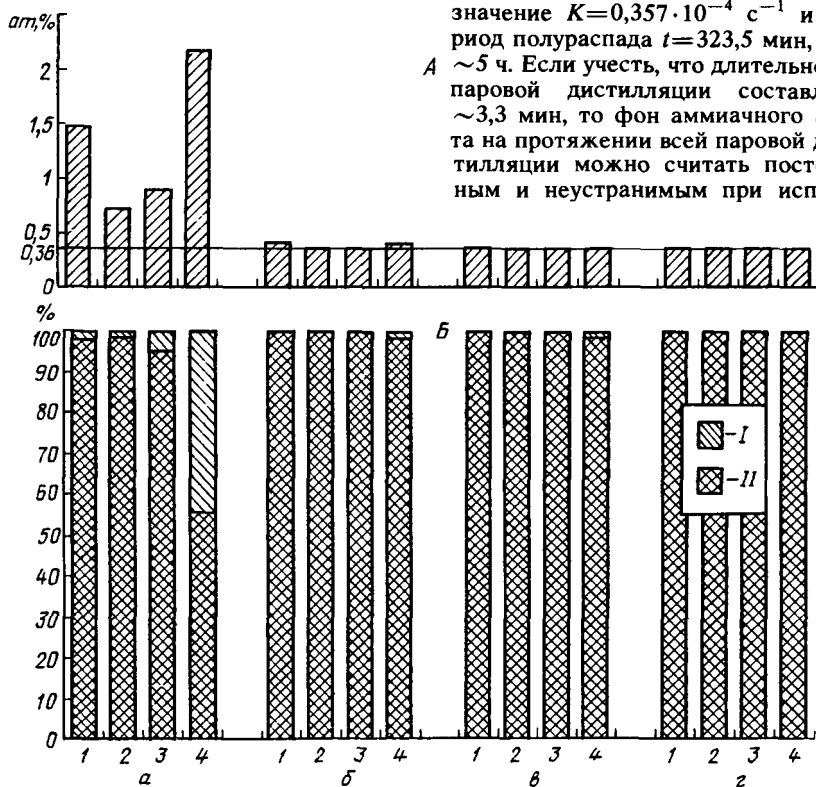
торый загрязняет выделяемый нитратный азот [15, 21]:



При наличии даже небольших количеств высокообогащенного ^{15}N восстановленного азота в пробе нитратов обогащения ^{15}N , близкого к природному (0,366 ат.%), точность определения изотопного состава нит-

ратного азота резко снижается (рисунок).

Кинетика гидролиза некоторых из этих соединений в слабощелочной среде позволяет создать фон аммиачного азота на всем протяжении процесса паровой дистилляции. Если считать в первом приближении ($C \times 1$) реакцией 1-го порядка, то для нее будет справедливо $K[A] = -d[A]/dt$. Эмпирически найденные в проведенных нами экспериментах значение $K = 0,357 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и период полураспада $t = 323,5$ мин, или $A \sim 5$ ч. Если учесть, что длительность паровой дистилляции составляет $\sim 3,3$ мин, то фон аммиачного азота на протяжении всей паровой дистилляции можно считать постоянным и неустраняемым при исполь-



Отклонение фактического обогащения ^{15}N нитратов от исходного изотопного состава (А) и содержание нитратного и примесного азота в пробах после фракционного разделения (Б).

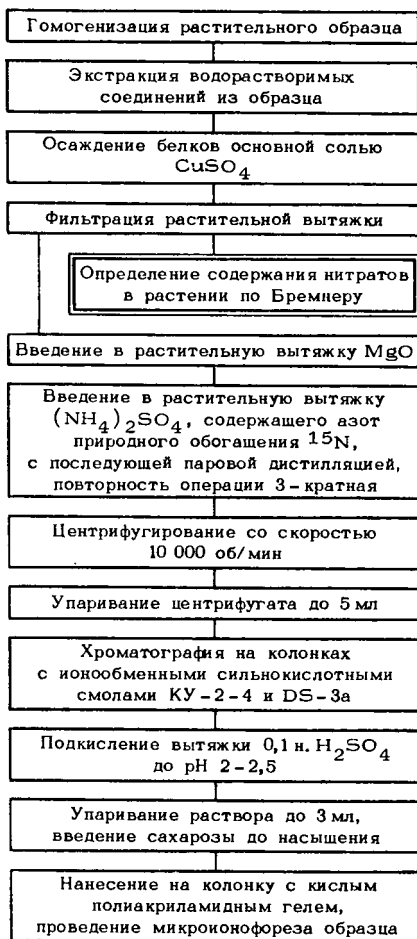
I — контрольный раствор; аспарагин+глутамин (обогащение ^{15}N 52,7 ат.%) и KNO_3 ; 2, 3, 4 — не содержавшие нитраты вытяжки, приготовленные соответственно из листьев картофеля, его микроклубней и листьев кормовых бобов+ KNO_3 ; а — контрольный метод; б — с обработкой КУ-2-4; в — КУ-2-4+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; г — с микронофорезом; I — содержание примеси азота в пробе; II — содержание нитратного азота в пробе.

зовании обычных методов выделения нитратов [13]. Поэтому нами была разработана схема выделения нитратов из растений, которая предусматривала применение дополнительных операций для выделения из растительного экстракта гидролизующихся органических соединений (амиды, уреиды, глюкозамины и т. д.) перед восстановлением и выделением нитратного азота. Применяли методы разделения, основанные на различиях физических и физико-химических свойств нитратов и соединений восстановленного азота, среди них разделение на ионообменных смолах [9, 11, 21], микроионофорез [7], электродиализ [8], изотопный обмен [10]. Подготовительные операции для выделения нитратов из растений двумя методами представлены на схеме 1.

Разделение на ионообменных смолах [9, 11]

Как известно, компоненты, содержащие азот в восстановленном состоянии, хорошо адсорбируются на сильнокислотных катионитах [6], поскольку в определенных условиях (кислая среда) такие соединения заряжаются положительно в результате протонирования азотной группы (при наличии у азота свободной электронной пары). Поэтому сделано предположение, что амиды и другие соединения, гидролизующиеся в слабощелочной среде, могут быть полностью выделены сорбцией последних на сильнокислотных сульфостирольных смолах типа КУ-2-4. Для проверки этого предположения использовали тесты с применением стандартных образцов, содержавших глутамин и аспарагин (1:1 по азоту), и ионообменных колонок с КУ-2-4 (внутренний диаметр 10 мм, длина 200 мм) и DS-3а (внутренний диаметр 10 мм, длина 150 мм). Количество амидного азота в аликвоте стандартного

Схема 1.



образца, которую наносили на колонку (2800 мкг), примерно в 100 раз больше количества этого компонента в наносимой на колонку растительной пробе. После нанесения стандартного образца ($V=5$ мл) с помощью делительной воронки на поверхность сорбента и разделения со скоростью потока элюента (деионизованный бидистиллят), обеспечивавшего расход 1 мл/мин, отбирали фракции по 10 мл.

В процессе разделения отбирали пробы для качественной реакции с BaCl_2 с целью определения фронта (в начале анализа в пробу вводили раствор CuSO_4); 1-ю фракцию отбирали сразу после появления мути в пробирке с BaCl_2 . После отбора 3 фракций колонку промывали дистиллированной водой (20 мл), затем в нее вводили следующий образец и продолжали отбор фракций. Для обнаружения амидного азота использовали тесты с нингидрином и паровую дистилляцию амидного азота из сильнощелочного раствора, в процессе которой отбирали пробы конденсата, для обнаружения аммонийного азота в пробах конденсата — качественную реакцию с реактивом Несслера. Полученные растворы фотометрировали при длине волны 400 нм на спектрофотометре СФ-26 [2].

Тесты продемонстрировали хорошую сорбируемость аспарагина и глутамина на смоле в условиях эксперимента. Применение стандартных образцов, содержавших нитратный азот, показало, что большая часть нитратов (около 90 %) после нанесения на сорбент обнаруживается в 1-й фракции при содержании последних в аликвоте, вводимой в колонку, 100—300 мкг $\text{N}—\text{NO}_3$, поэтому в дальнейших экспериментах для последующего выделения использовали только 1-ю фракцию элюата.

Таким образом, предварительные исследования показали, что обработка на ионообменных смолах — это один из возможных способов разделения нитратного и амидного азота.

Для дальнейшего изучения пригодности катионитов типа КУ-2-4 для очистки нитратов были использованы стандартные образцы 2 типов: 1) контрольный раствор, содержащий 1400 мкг азота нитратов, обогащение ^{15}N 0,36 ат. % и 2800 мкг

азота амидов (N аспарагина: N глутамина=1:1), обогащение ^{15}N 57,2 ат.%; 2) контрольные растительные вытяжки. Растительные вытяжки получены по следующей технологии: 3 навески по 400 мг для 1-го и 2-го образцов и 4000 мг для 3-го образца сухой массы растений, выращенных в стерильных условиях на субстрате, меченном ^{15}N (в аммонийной группе), использовали для получения экстрактов [5], из которых при кипячении со сплавом Деварда и MgO удаляли эндогенные нитраты. Затем в профильтрованные экстракты вводили по 2800 мкг азота нитратов природного обогащения ^{15}N для 1-го и 2-го образцов и 280 мкг для 3-го образца. Изотопный состав определяли по Риттенбергу [4] на масс-спектрометре МИ-1201в.

При анализе как контрольных растворов, так и контрольных растительных вытяжек выявлены значительные преимущества схемы выделения нитратов, предусматривающей предварительную обработку растворов с помощью ионообменных смол, по сравнению с обычным пародистилляционным методом Бремнера [14—16], являющимся контрольным (рисунок). Незначительное изменение доли нитратного азота (со 100 до 97,82 %) в полученном после пародистилляционного отгона контрольном образце (рисунок, б) вследствие загрязнения амидным азотом обуславливает существенное искажение результатов определения изотопного состава нитратов в контрольном методе — вместо обогащения ^{15}N 0,36 ат. % получено 1,28—1,61 ат. % (рисунок, а). Сравнение двух методов очистки при анализе контрольной растительной вытяжки позволило выявить еще более значительное преимущество модифицированного метода. Наибольшее отклонение обогащения ^{15}N нитратного азо-

та пробы от исходного значения зафиксировано при анализе листьев кормовых бобов, содержащих небелковый азот главным образом в амидной форме (рисунок, а). В этом случае наибольший эффект получен при использовании ионообменных смол.

На основании приведенных выше данных можно сделать вывод о непригодности метода Бремнера для целей настоящего исследования без предварительной очистки экстракта.

Применение ионообменных смол, несмотря на большой прогресс в повышении точности определения изотопного состава нитратов, не позволило полностью исключить примесный азот из пробы нитратов, поэтому возникла потребность введения дополнительных операций для дальнейшего повышения точности метода.

Использование эффекта изотопного обмена для снижения обогащения меченного ^{15}N фона аммиачного азота [10]

После выделения белка из растительной пробы [5] в раствор вводили сернокислый аммоний природного обогащения ^{15}N в количестве, не менее чем в 20—50 раз превышающем содержание гидролизующихся компонентов по азоту ($7000 \text{ мкг N—NH}_4^+$). Для активизации обмена в реакционную смесь также вводили MgO и проводили паровую дистилляцию для интенсивного удаления меченных ^{15}N азотсодержащих групп, гидролизующихся в слабощелочной среде с образованием аммония. При этом снижалось обогащение ^{15}N восстановленного азота растительной пробы. Всю операцию проводили троекратно без дополнительного введения MgO , в дальнейшем суспензию центрифугировали и из центрифугата выделяли амидный азот с по-

мощью ионообменных смол, как описано выше.

В слабощелочной среде аммоний переходит в газообразную форму (NH_3), которая затем легко удаляется, поэтому данная операция не только способствует изотопному обмену групп, содержащих восстановленный азот, но и обеспечивает удаление аммонийного азота из реакционной смеси перед последующими операциями. Аммонийный азот растительной пробы, как и амидный азот, также загрязняет пробу нитратов в процессе паровой дистилляции, что наблюдается при неполном удалении аммония из растительной вытяжки во время паровой дистилляции перед восстановлением нитратов славом Деварда, десорбции сорбированного ранее аммония на стенках прибора и химической посуды. Удаление аммония из растительной вытяжки также желательно в связи с применением в дальнейшем ионообменных смол для выделения амидов, так как аммоний способен элюировать сорбированные ранее на катионите амиды [6].

Частичное удаление меченных ^{15}N групп гидролизующихся азотных соединений в результате использования эффекта изотопного обмена перед обработкой пробы ионообменными смолами позволило добиться более полной очистки нитратов (рисунок, а, б). Аналогичные результаты получены при анализе контрольных растительных вытяжек.

Выделение нитратного азота с помощью микроионофореза на кислом полиакриламидном геле [7]

Применение электрофореза основано на различиях физических свойств разделяемых компонентов — заряда и массы иона. Нитраты являются анионами при любой

реакции раствора (pH 3—3,5), в то время как вещества, способные при гидролизе в слабощелочной среде выделять аммиак, являются либо катионами (NH_4^+), либо амфолитами (аминокислоты и т. д.). Поскольку азотсодержащие амфолиты в подавляющем большинстве имеют pH_i выше 3,5 (pH_i амидов аминокислот — аспарагина и глутамина — соответственно 5,41 и 5,65) при pH экстракта около 3,5, цвиттер-ионная форма органических амидов полностью переходит в катионную. В случае приложения электромагнитного поля нитраты накапливаются в анодном буферном растворе, а все остальные азотсодержащие компоненты в процессе разделения двигаются к катоду (методика разделения дана при описании общего хода анализа), поэтому в результате микроионофореза опытного раствора достигается высокая степень очистки нитратов (рисунок, а, б).

Для проведения микроионофореза контрольный образец подкисляли до pH 2—2,5 с помощью 0,1 н. раствора H_2SO_4 (объем 3 мл), упаривали до 1—2 мл, смешивали с сахарозой до получения насыщенного раствора и наносили на поверхность полиакриламидного геля или (при барьерном микроионофорезе) на мембрану из ацетата целлюлозы, которую прикрепляли к колонке с гелем при помощи полихлорвиниловой трубки, сверху наслаивали катодный буферный раствор.

Для осуществления микроионофореза в качестве неподвижной фазы использовали мелкопористый кислый полиакриламидный гель [6]. Нижнюю часть трубки с гелем опускали в стакан с анодным электролитом. Микроионофорез вели при плотности тока 20—30 мА на 1 см^2 в течение 30 мин, затем анодный электролит, содержащий нитраты, перенесли в колбу кварцевого

аппарата для паровой дистилляции и анализировали.

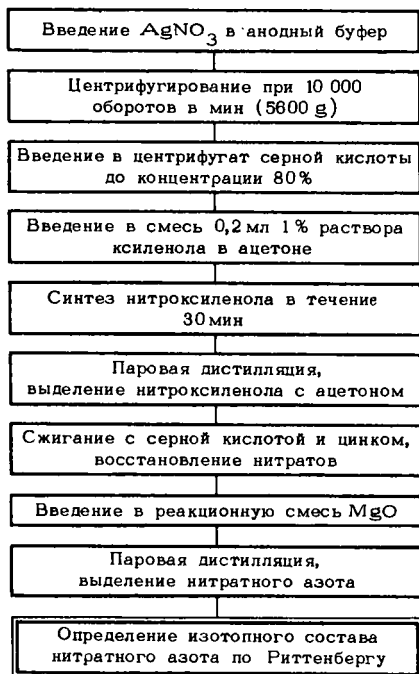
При выделении нитратов с помощью микроионофореза достигается та же точность определения изотопного состава, что и при использовании предыдущего метода (рисунок, а), однако в первом случае на одну сокращается число дополнительных операций. Еще более эффективным в этом отношении является барьерный электрофорез.

Использование барьерного электрофореза [8]

Характерной особенностью барьерного микроионофореза является применение мембраны из ацетата целлюлозы, которая, пропуская небольшие ионы (нитраты и т. д.) и нейтральные молекулы, препятствует продвижению к аноду макроионов (белки и т. д.) и загрязнению геля частицами гомогената. В связи с этим отпадает необходимость в операциях, связанных с подготовкой экстракта и выделением белка (экстракция растворимых азотсодержащих компонентов, осаждение белка сернокислой медью, фильтрация), что позволяет значительно экономить время при проведении анализа и материалы, причем точность анализа не снижается. Таким образом, барьерный микроионофорез представляет собой комбинацию электродиализа и микроионофореза.

В заключение описания методов предварительной очистки нитратов от соединений восстановленного азота следует отметить, что в данном случае главным критерием пригодности метода служила не полнота выделения нитратов из растений, а степень чистоты выделения. Так, при использовании соответствующих режимов, описанных выше для микроионофореза, выделяется лишь 30—50 % всего количества нитратов растения. Для 1-го и 2-го методов указанная величина боль-

Ортоксиленовый метод



ше, но она также не достигает 100%. Исходя из этого, содержание нитратов в растениях в проведенных экспериментах определялось традиционным методом по Бремнеру [16].

При анализе опытных растительных образцов с целью достижения наилучших результатов в выделении нитратов описанные выше методы использовали в сочетании (схемы 1 и 2).

Выделение нитратного азота из растительной пробы нитроксиленоловым методом (метод Серенсена)

Метод пародистилляционного выделения опытных проб нитратного азота из слабощелочной растительной вытяжки, использованный в данных исследованиях, тестиро-

Выделение по методу Деварда

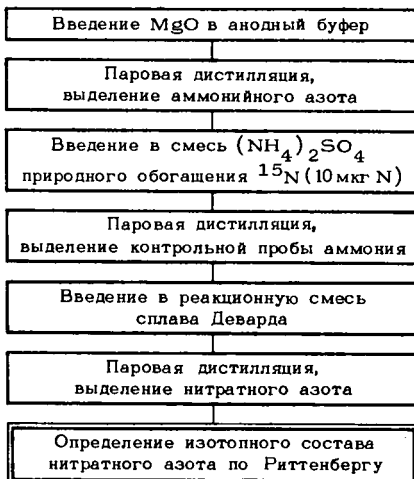


Схема 2.

вался с помощью наиболее селективного в этом отношении ортоксиленолового метода [1, 13, 17, 20], основанного на способности нитратных ионов конденсироваться в сильнокислой среде с ароматическим соединением — 3,4-ксиленолом. Продуктом конденсации является нитроксиленол, который затем легко отгоняется из реакционной смеси с ацетоном (схема 3).

В использованной модификации ортоксиленолового метода полученный таким образом нитроксиленол сжигали серной кислотой по Йодльбауэру [3], затем отгоняли восстановленный до аммиачной формы нитратный азот паровой дистилляцией по Кьельдалю [5]. Выделение нитратов из сильнокислой среды исключает возможность его загрязнения аммонийным и амидным

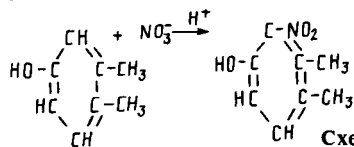


Схема 3.

азотом. Тестирование включало параллельное выделение нитратов 2 методами из одних и тех же предварительно обработанных растительных вытяжек с последующим определением изотопного состава нитратного азота (схема 2).

Результаты определения изотопного состава нитратного азота, полученные разными способами, практически совпадают (таблица), что свидетельствует об объективности тех и других данных.

Необходимо отметить, что, несмотря на высокую селективность нитрокислородного метода, его существенными недостатками являются длительность и трудоемкость, поэтому основная часть результатов получена с привлечением в заключение метода Бремнера.

Выводы

1. Использование паровой дистилляции для препаративного выделения эндогенных нитратов из слабо-

Избыток ^{15}N в составе азота нитратов, выделенных из различных растительных проб 2 способами ($r=0,997$, коэффициент линейной регрессии — 1,08)

| Растительная проба (листья) | Способ выделения нитратов | |
|---|---|---|
| | пародистилляционный с восстановлением нитратов по Деварду | ортокислородный с восстановлением нитратов по Йодльбауэру |
| <i>Triticum aestivum</i> L. | | |
| проба 1 | 0,024 | 0,021 |
| проба 2 | 0,093 | 0,100 |
| <i>Solanum tuberosum</i> L., микрочлонуальная культура | 0,018 | 0,020 |
| <i>Cucumis sativa</i> L. | 0,065 | 0,065 |

щелочных растительных вытяжек в исследованиях с ^{15}N предполагает обязательное применение методов предварительной очистки растительного экстракта от органического и аммонийного азота из-за неполного разделения фракций азота в процессе паровой дистилляции.

2. Применение сильнокислотных катионитов типа КУ-2-4 и DS-3а, обработки экстракта аммиаком природного обогащения и микроинфореза на кислом полиакриламидном геле позволяет удалять источники восстановленного азота из растительного экстракта и снижать загрязнение пробы нитратного азота в процессе паровой дистилляции.

3. Сравнительная оценка изотопного состава нитратного азота растений, выделенного из предварительно обработанного экстракта 2 методами (из слабощелочного экстракта с восстановлением нитратов сплавом Деварда и ортокислородным методом с восстановлением нитратного азота цинком в кислой среде), показала равноценность этих методов для исследования фракционного состава азота в растениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Губачек Й., Рихтер Р., Каплан Т., Бернацик К. Методы определения нитратов в растительном материале.— *Агрехимия*, 1981, № 7, с. 131—138.— 2. Ермаков А. И. Методы биохимического исследования растений.— Л.: Агропромиздат, 1987.— 3. Замятина В. Б. Методика анализа почв и растений в агрохимических исследованиях с ^{15}N .— Методы применения изотопа азота ^{15}N в агрохимии. М.: Колос, 1977, с. 10—54.— 4. Зерцалов В. В. Методы определения изотопного состава азота, применяемая аппаратура и ее особенности.— Методы применения изотопа азота ^{15}N в агрохимии. М.: Колос, 1977, с. 55—58.— 5. Петербургский А. В. Практикум по агрономической химии.— М.: Колос, 1968.— 6. Плешков Б. П. Практикум по

- биохимии растений.— М.: Колос, 1985.— 7. Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В. Способ определения количества азота, окисленного в растениях. (Решение о выдаче АС на изобретение от 6/VI—89 г. по заявке № 4 670 918).— 8. Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В. То же. (Решение о выдаче АС на изобретение от 6/VI—89 г. по заявке № 4 672 019).— 9. Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В. То же. (Решение о выдаче АС на изобретение от 14/VI—89 г. по заявке № 4 670 916).— 10. Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В. То же. (Решение о выдаче АС на изобретение от 15/VI—89 г. по заявке № 4 670 917).— 11. Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В. То же. (Решение о выдаче АС на изобретение от 15/VI—89 г. по заявке № 4 671 199).— 12. Хроматографический анализ окружающей среды.— М.: Химия, 1979.— 13. Barker A. V. Nitrate Determinations in Soil, Water a. Plants.— Res. Bull. the Massachusetts Agric. Exp. Station, 1974, N 611.— 14. Bremner J. M., Edwards A. P.— Soil. Sci. Soc. Proc., 1965, vol. 29, p. 504—507.— 15. Bremner J. M., Keeney D. R.— Analytica Chimica Acta, 1965, vol. 39, p. 485—497.— 16. Bremner J. M., Keeney D. R.— Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 1966, vol. 30, p. 577—594.— 17. Delwiche C. C.— Biol. Chem., 1951, vol. 189, p. 167—175.— 18. Ohyama T.— Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., 1986, vol. 57, p. 503—505.— 19. Ohyama T., Saito K., Kato N.— Soil Sci. Plant Nutr., 1989, vol. 35, p. 9—20.— 20. Sörensen C.— Physiol. Plant., 1956, vol. 9, p. 304—320.— 21. Varner J. E., Bulen W. A., Vanesko S., Burell R. C.— Anal. Chem., 1953, vol. 25, p. 1528—1529.

Статья поступила 29 февраля 1991 г.

SUMMARY

The possibility to use preliminary treatment of plant extract with heavy-acid ion-exchange resins of KU-2-4, DS-3a type and microiontophoresis of the extract on polyacrylamide gel to increase the efficiency of separating nitrate nitrogen and nitrogen of other plant fractions using vapour-distillary method with reduction of nitrates in weekly alkaline medium by Devard was studied. Parallel determining the isotopic composition of nitrates isolated by Devard method also using the orthoxylenol method from preliminary treated extracts containing labeled ^{15}N organic nitrogen has shown their equivalence for investigating the fractional composition of nitrogen in plants.