

УДК 631.4

М. Ш. ШАЙМУХАМЕТОВ

**УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗОТА  
АМИНОКИСЛОТ И ГЕКСОЗАМИНОВ В ПОЧВАХ**

Описан усовершенствованный вариант дистилляционного метода определения аминокислотного и гексозаминного азота в гидролизатах почв.

На долю аминокислот приходится 20—25%, а на долю гексозаминов (аминосахаров) 4—10% общего азота почв [9]. Определение их содержания является одной из важнейших стадий исследования форм почвенного азота.

Методов определения аминокислот в биологических объектах описано много [5], из них в почвоведении широкое распространение получили бумажная хроматография [2, 3, 12], хроматография на ионообменных смолах [26], аналогичная процедура с использованием автоматических анализаторов [18, 24, 25]. Для определения суммарного количества аминокислот (без идентификации отдельных представителей) предложены объемно-газометрические [20, 33], колориметрические [17, 30], комплексометрические [15], дистилляционные [19, 22] и другие методы. В почвоведении широко распространен дистилляционный метод Бремнера [8, 10]. У некоторых авторов можно найти результаты сравнительных испытаний различных методов [13, 30]. В ряде случаев для ориентировочного определения азота аминокислот пользуются более упрощенными методами. Так, в методе Стивенсона представление о содержании азота аминокислот можно получить по разности между общим гидролизуемым и отгоняемым азотом, т. е. по количеству неотгоняемого азота [27]. Этот метод был слегка модифицирован Стюартом с соавт., которые почву перед гидролизом обрабатывают раствором KCl для определения минеральных форм азота [31]. С некоторыми изменениями этот подход используется при анализе форм почвенного азота с помощью ступенчатого гидролиза [1].

При определении азота гексозаминов преимущественно используются колориметрические методы [14], которые приспособлены и для анализа почв [23, 28, 29]. В основе дистилляционных методов, менее трудоемких, лежит положение Моргана о том, что при обработке нормальной щелочью глюкозамин и галактозамин практически полностью разрушаются [21]. Азот этих гексозаминов может быть легко определен путем отгона, что и было использовано в методе Трейси [32], видоизмененном Бремнером [6, 7, 10] применительно к почвам.

Определение органических форм азота по Бремнеру [10] отличается простотой, однако имеет некоторые недостатки и отдельные стадии анализа все еще остаются трудоемкими. Как известно, для отгона аммиака, образующегося в результате реакции аминокислот с нингидрином, используется концентрированный раствор щелочи. Однако в присутствии щелочи образуются продукты конденсации аммиака с нингидрином, что приводит к значительному уменьшению количества отгоняемого аммиака. Обработка пергидролом в кислой среде [22] не

дает желаемых результатов, осаждение нингидрина с помощью сероводорода [19] неприемлемо для массовых анализов из-за трудоемкости операции. Чтобы не допустить образования продуктов конденсации, Бремнер предложил [8] использовать вместо щелочи фосфатно-боратный буфер (ФББ) с рН 11,2, но, к сожалению, этот прием также неэффективен. Опыт показывает, что ФББ сам по себе не предотвращает образования продуктов конденсации, к тому же этот процесс усиливается благодаря присутствию щелочи, добавленной в гидролизат в ходе нейтрализации последнего.

В предлагаемом нами методе указанная трудность устранена. Это достигается тем, что вместо ФББ используется концентрированный раствор щелочи, как это было принято раньше, а продукты конденсации разрушаются пергидролем в щелочной среде. Скорость отгона увеличена с 7—8 мл дистиллята в минуту до 14—15 мл/мин. Этот прием также способствует уменьшению опасности образования продуктов конденсации, так как сокращает время взаимодействия нингидрина с продуктами распада аминокислот. С целью удаления летучих продуктов распада в предлагаемом методе предусмотрена процедура принудительного аэрирования реакционной смеси. Эти меры способствуют увеличению количества отгоняемого азота. Кроме сказанного, в метод Бремнера внесен ряд изменений, значительно облегчающих проведение анализа. Во-первых, в предлагаемом методе нет стадии нейтрализации гидролизата: Это означает, что реакция дезаминирования аминокислот нингидрином проводится в более кислой среде (рН около 1), чем это предусмотрено по Бремнеру (рН 2,5). Такое изменение не противоречит теоретическим предпосылкам метода, так как по литературным данным [19] наиболее полное разрушение аминокислот при обработке нингидрином достигается при рН 1—2. Во-вторых, операция 10-минутного прогревания проб гидролизата с нингидрином проводится на приборе Хоскинса. Это означает, что отпадает необходимость в использовании для этой цели кипящей водяной бани. Это обстоятельство способствует лучшей организации рабочего места аналитика и облегчает его труд. Из литературы известно [33], что реакция аминокислот с нингидрином лучше всего проходит при 99—100°. При работе на приборе Хоскинса это условие не нарушается. В-третьих, реактивы, используемые в методе Бремнера (нингидрин, цитратный буфер), заменены их водными растворами.

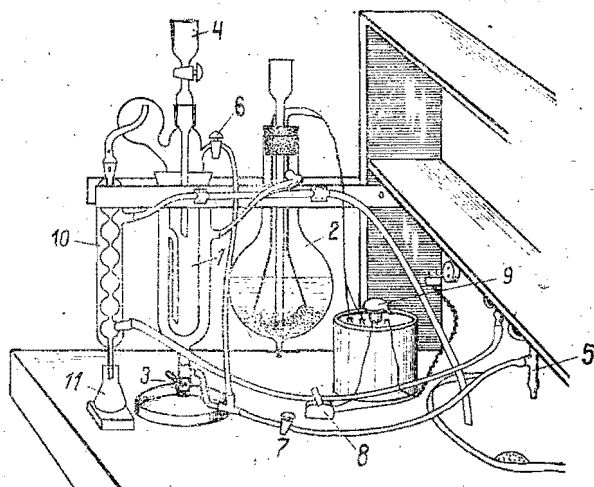
В методику определения азота гексозаминов внесены следующие изменения. Как и в случае с аминокислотами, опущена стадия предварительной нейтрализации гидролизата, а для отгона аммиака (аммонийный + гексозаминный азот) вместо ФББ применяется избыточное количество щелочи. При учете аммонийного азота к кислому гидролизату добавляется избыточное количество суспензии MgO, а продолжительность отгона увеличена с 2 до 4—5 минут с целью лучшей очистки холодильника от остатков аммиака предыдущего определения. Весь анализ проводится на приборе Хоскинса, позволяющем пользоваться MgO в виде суспензии.

#### Описание предлагаемого метода

Универсальный прибор для определения форм почвенного азота показан на рисунке. При изготовлении этого прибора полезно соблюдать следующие условия. Длина внутреннего отгоночного цилиндра 1 должна быть 22—23 см (от шлифа), диаметр 3,3—3,5 см. Важно, чтобы трубки и отверстия, через которые проходит горячий пар, имели внутренний диаметр не менее 5 мм, иначе в парообразователе 2 создается высокое давление и затрудняется проведение отгона с требуемой скоростью.

Длина холодильника составляет 21—22 см, что обеспечивает эффективное охлаждение дистиллята. Вода в парообразователе разогревается при помощи опущенной в нее открытой спирали (10—12 см) от электроплитки, поэтому не следует подкислять воду с целью связывания следов аммиака. Это создает некоторые трудности по сравнению с парообразователями с закрытой спиралью, зато вариант, изображенный на рисунке, очень прост в изготовлении. Кран 3 под внешним цилиндром целесообразно использовать металлический (например, газовый) с диаметром отверстия 4—5 мм.

Реактивы. А. 6*n* HCl. Б. 20%-ный водный раствор цитратного буфера (рН 2,5). Исходный состав готовят путем смешивания 4,12 г



Усовершенствованный прибор Хоскинса (объяснения в тексте)

лимоннокислого натрия и 38,30 г лимонной кислоты. В. 2%-ный водный раствор нингидрина. Некоторая часть нингидрина может остаться нерастворенной, однако это не имеет большого значения. Раствор должен быть использован в день приготовления. Г. Насыщенный раствор КОН. Д. Пергидроль (30%  $H_2O_2$ ). Е. 2%-ный раствор борной кислоты с индикатором. Последний готовят путем растворения 99 мл бромкрезола зеленого и 66 мг метилового красного в 100 мл этилового спирта. Приготовленный индикатор добавляют к раствору борной кислоты до приобретения ею вишневого окраски. Если пользуются индикатором Гроака, борную кислоту и индикатор не следует смешивать указанным способом, целесообразнее добавлять 2—3 капли индикатора в борную кислоту непосредственно перед отгоном. Для приготовления раствора борной кислоты воду следует слегка подогреть. Ж. Стандартный раствор 0,005*n* серной кислоты. З. 10%-ная водная суспензия прокаленного ( $600^\circ$ , 2 часа) порошка MgO.

Кроме указанных реактивов для периодического контроля за качеством работы прибора необходимо иметь серию стандартных растворов азотсодержащих соединений. 1. Раствор аминокислоты. 25,4 мг  $\alpha$ -аланина растворить в 100 мл воды. В 1 мл этого раствора содержится 0,040 мг (40 мкг) N. 2. Раствор глюкозамина. 30,8 мг глюкозамин-гидрохлорида растворить в 100 мл воды. В 1 мл содержится 0,020 мг гексозаминного N. 3. Раствор сульфата аммония. 18,9 мг  $(NH_4)_2SO_4$  растворить в 100 мл воды. В 1 мл содержится 0,040 мг аммонийного N.

Для гидролиза навеску почвы (сито 1 мм), содержащую 10 мг общего азота, следует перенести в эрленмейеровскую колбу (100 мл) со шлифом, прилить 30 мл раствора А, на колбу установить холодильник, имеющий соответствующий шлиф. Затем колбу с содержимым следует слегка погрузить в глицерин, разогретый на электроплитке (через автотрансформатор) до 105—110° и оставить в таком состоянии на 12 часов (2 рабочих дня). За это время азотсодержащие соединения почвы гидролизуются до такой степени, что дальнейшее увеличение продолжительности гидролиза почти не сопровождается переходом дополнительных количеств азота в раствор. По окончании гидролиза содержимое колбы переносят в центрифужный стакан, центрифугируют в течение 3—5 мин. при 3000 об/мин, центрифугат сливают в мерную колбу на 100 мл, осадок 2 раза промывают по 20—25 мл воды, центрифугаты объединяют, общий объем гидролизата доводят до метки.

I. Определение аммонийного+гексозаминного+аминокислотного азота (А+Г+АК). 1 мл гидролизата переносят во внутренний цилиндр 1 прибора, туда же приливают 2 мл реактива Б, 10 мл реактива В по метке на воронке 4 и 1 мл воды. Включив прибор в сеть, доводят до кипения воду в парообразователе 2. После появления пара из отверстия крана 3, находящегося в положении «свободный слив», кипение воды уменьшают настолько, чтобы пузырьки воздуха не проскакивали через слой испытуемой жидкости в цилиндре 1 и пар без особого напора проходил через отверстие крана 3. В таком состоянии прибор оставляют на 10 мин. По истечении этого срока, достаточного для полного разрушения аминокислот, проводят аэрирование реакционной смеси, для чего включают водоструйный насос 5, открывают кран 6, а кран 3 переводят в положение «закрыто». После аэрирования в течение 20—30 сек. выключают ток 8, водоструйный насос и кран 6 закрывают, а кран 3 снова переводят в положение «свободный слив». По метке на воронке 4 приливают 5 мл реактива Г и 1 каплю реактива Д, ополаскивают воронку небольшим количеством воды. Включают ток, кран 3 закрывают и приступают к отгону аммиака, усилив кипение воды так (9), чтобы из холодильника 10 в приемник 11 поступало примерно 14—15 мл дистиллята в минуту. Предварительно в приемник приливают 5 мл реактива Е. Во время отгона конец трубки холодильника находится на 3—4 см выше поверхности жидкости в приемнике. Отгон считается законченным, когда уровень жидкости в приемнике достигнет метки, соответствующей объему 35 мл, т. е. продолжительность отгона составляет 2—2,5 мин. Содержимое приемника титруют реактивом Ж (1 мл 0,005 л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> соответствует 0,07 мг азота).

II. Определение аммонийного+гексозаминного азота (А+Г).

В парообразователь доливают воды до первоначального уровня, отгонный цилиндр 1—2 раза ополаскивают водой, в него переносят 1 мл гидролизата, приливают 10 мл реактива Г и отгоняют аммиак со скоростью 7—8 мл/мин. Содержимое приемника титруют реактивом Ж.

III. Определение аммонийного азота (А). Подготовив прибор указанным способом, в отгонный цилиндр переносят 2 мл гидролизата, прибавляют 20 мл реактива З, отгоняют аммиак и титруют, как указано выше.

Содержание азота аминокислот и гексозаминов находят соответственно по разности:

$$AK = (A + Г + AK) - (A + Г) \quad Г = (A + Г) - A.$$

Если известно количество общего гидролизующего азота (ОГ), можно узнать содержание неидентифицируемых форм (НИФ):

$$НИФ = ОГ - (A + Г + AK).$$

Для определения ОГ пробу гидролизата в 1—2 мл сжигают полумикрометодом Кьельдаля и отгоняют аммиак на приборе Хоскинса [4].

Пример расчета. Почва — мощный чернозем Курской обл., слой 0—10 см. Исходя из общего содержания азота в почве (2610 мг/кг), для гидролиза брали 3,83 г почвы, что соответствует 10 мг азота. Общий объем гидролизата составляет 100 мл. При определении (А+Г+АК), (А+Г) и А на титрование уходило соответственно 1,02 мл, 0,63 мл и 0,58 мл 0,005 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Тогда, с учетом показателей холостых определений:

$$(A+Г+AK) = (1,02 - 0,18) \cdot 0,07 \cdot 100 = 5,88 \text{ мг/100 мл, или } 58,8\% \text{ от } N_{\text{общ. почвы.}}$$

$$(A+Г) = (0,63 - 0,30) \cdot 0,007 \cdot 100 = 2,31 \text{ мг/100 мл, или } 23,1\% N_{\text{общ.}}$$

$$A = (0,58 - 0,15) \cdot 0,007 \cdot 50 = 1,50 \text{ мг/100 мл, или } 15,0\% N_{\text{общ.}}$$

$$AK = 58,8 - 23,1 = 35,7\%$$

$$Г = 23,1 - 15,0 = 8,1\%$$

### Результаты и обсуждение

Аминокислоты. Как видно из данных табл. 1, при проведении анализов по Бремнеру удовлетворительные результаты получаются лишь для некоторых аминокислот. Прежде всего это так называемые кислые аминокислоты — аспарагиновая кислота и глутаминовая кис-

Таблица 1

Полнота обнаружения α-аминного азота в зависимости от методов определения, % от исходного содержания (средние из 6 определений)

| Аминокислота          | По Бремнеру | По предлагаемому методу |
|-----------------------|-------------|-------------------------|
| Аспарагиновая кислота | 93,6        | 98,7                    |
| Глутаминовая кислота  | 95,1        | 97,2                    |
| Аргинин               | 80,2        | 162,0                   |
| Гистидин              | 100,0       | 118,5                   |
| Лизин                 | 93,5        | 105,1                   |
| Глицин                | 79,9        | 95,0                    |
| Аланин                | 80,0        | 94,0                    |
| Валин                 | 73,8        | 96,1                    |
| Лейцин                | 80,0        | 96,3                    |
| Фенилаланин           | 76,0        | 92,8                    |
| Серин                 | 72,6        | 94,8                    |
| Треонин               | 72,5        | 95,6                    |
| Метионин              | 77,0        | 95,3                    |
| Пролин                | 15,0        | 30,4                    |

Примечание. Для анализа брали по 1 мл раствора соответствующей аминокислоты, содержащего 40 мкг/мл α-аминного азота.

лота. Среди основных хорошие данные получаются по гистидину и лизину, а из аргинина высвобождается лишь 80,2% аминного азота. Ни у одной из нейтральных аминокислот полнота обнаружения азота не превышала 80%. При проведении анализа по предлагаемому методу значительно повышается количество учитываемого азота в группе основных и нейтральных аминокислот. У аргинина и гистидина отщепляется часть атомных групп, которые не занимают α-положение в структуре молекул. У лизина отщепляется α-аминный азот, а у пролина полнота обнаружения азота превышает 30% при 15% по Бремнеру.

В дополнительных экспериментах, результаты которых здесь не приводятся, установлено, что при отгоне с одной щелочью (без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и

при скорости 6—8 мл/мин получают данные, близкие к данным по Бремнеру. Это доказывает, что ФББ не имеет преимуществ перед обычной щелочью в смысле предотвращения образования продуктов конденсации. Признаком образования продуктов конденсации является то, что после прибавления щелочи реакционная смесь приобретает темно-синюю окраску («голубой продукт» Рузмана). В случае использования ФББ смесь имеет оранжево-красный цвет, который в ходе отгона переходит в темно-вишневый. Темно-синюю окраску реакционной смеси легко устранить путем прибавления 1—2 капель пергидроля, этот прием, как правило, приводит к появлению дополнительного количества аммиака в приемнике. Темно-вишневая окраска смеси в аналогичных условиях обесцвечивается гораздо труднее и, главное, этот прием способствует не увеличению, а зачастую даже уменьшению отгоняемого аммиака.

Таким образом, пергидроль можно использовать только при отгоне с щелочью — вот почему в предлагаемой методике мы отказались от ФББ в пользу щелочи. В наших опытах выявлено, что наибольший эффект от пергидроля получается в случае внесения его вместе с щелочью, а не до нее, как рекомендовалось ранее [22]. Установлено также, что нет необходимости прибавлять  $H_2O_2$  больше, чем 1—2 капли. Напротив, при использовании большего количества  $H_2O_2$  устойчивость результатов повторных определений заметно ухудшается. Между количеством прибавляемой щелочи и полнотой отгона аммиака зависимости не установлено.

Вслед за обработкой пергидролем важным приемом увеличения отгоняемого азота является ускоренный отгон. Если проводить отгон с обычной скоростью (7—8 мл/мин), то по истечении 2—3 минут после обесцвечивания пергидролем реакционная смесь в ходе отгона начинает приобретать более интенсивный желтоватый оттенок. Возможно, даже в условиях использования пергидроля происходит образование незначительных количеств продуктов конденсации. Увеличение скорости отгона до 14—15 мл/мин позволяет свести к минимуму такую опасность. Некоторый положительный эффект на результаты анализа оказывает и тот факт, что прогревание реакционной смеси проводится в струе горячего пара, а не в кипящей воде, как это предусмотрено у Бремнера. По-видимому, при разрушении аминокислот на приборе Хоскинса происходит более интенсивное перемешивание реакционной смеси, поскольку в ходе прогревания уровень смеси в цилиндре 1 постоянно пульсирует под слабым напором пара. Замечено, что аминокислоты разрушаются полностью как при интенсивном, так и при более слабом поступлении пара из парообразователя.

Несмотря на преимущества перед методом Бремнера, у большинства исследованных нами аминокислот полнота обнаружения по предлагаемому методу едва превышает 96%. Добиваясь полного выделения  $\alpha$ -аминного азота из стандартных растворов аминокислот, мы испытали различные приемы. Например, пробовали увеличить время прогревания смеси при разрушении аминокислот с 10 до 20 мин., применяли изатин вместо нингидрина, увеличивали время отгона аммиака с 5 до 10—15 мин. и т. д., но желаемых результатов получить не удалось. Повсей видимости, полному разрушению аминокислот и отгону аммиака мешает присутствие альдегидов, которые, как известно, являются весьма реакционноспособными. Часть альдегидов, не успевших взаимодействовать с аммиаком, удаляется при аэрировании. Благодаря этому приему результаты несколько улучшаются, но продолжение аэрирования сверх 30 сек. видимых сдвигов не дает. Опыт показывает, что основная польза аэрирования заключается в устранении неприятных запахов, которые в его отсутствии постоянно сопровождают процесс отгона. Важно подчеркнуть, что цифры, приведенные в табл. 1, хорошо воспро-

изводятся и при анализе тех же стандартных растворов аминокислот в присутствии почвенного гидролизата. Очевидно, присутствие минеральных и органических веществ в гидролизате не мешает полному окислению аминокислот нингидрином и последующему отгону аммиака.

Может возникнуть вопрос, не будут ли получаться завышенные данные о содержании азота аминокислот за счет более интенсивного разрушения аргинина и гистидина в результате обработки пергидролем. Такое опасение вряд ли можно считать оправданным. Обычно  $\alpha$ -аминный азот указанных аминокислот занимает весьма скромное место в общей сумме азота аминокислот почвенного гидролизата. Об этом сви-

Таблица 2

Молярные отношения\* аминокислот в черноземе (Курская обл.) и дерново-подзолистой почве (Московской обл.)

| Аминокислоты          | Чернозем | Дерново-подзолистая почва |
|-----------------------|----------|---------------------------|
| Аспарагиновая кислота | 16,20    | 12,70                     |
| Глутаминовая кислота  | 5,60     | 6,0                       |
| Аргинин               | 2,15     | 2,42                      |
| Гистидин              | 2,43     | 1,85                      |
| Лизин                 | 3,02     | 3,70                      |
| Глицин                | 18,10    | 16,55                     |
| Аланин                | 12,43    | 13,35                     |
| Валин                 | 1,81     | 2,05                      |
| Лейцин                | 5,39     | 5,75                      |
| Изолейцин             | 1,81     | 2,29                      |
| Фенилаланин           | 1,69     | 2,05                      |
| Тирозин               | 2,0      | 2,20                      |
| Серин                 | 6,02     | 5,62                      |
| Треонин               | 5,05     | 5,32                      |
| Пролин                | 1,98     | 1,95                      |
| Метионин              | 2,02     | 1,60                      |
| Итого:                | 87,70    | 85,40                     |

\*  $\alpha$ -аминный N/100/N аминокислот.

детельствуют, в частности, данные табл. 2, которые получены нами при анализе гидролизатов двух почв на автоматическом анализаторе НД-1200Е (очистку гидролизатов от соединений Fe и Al проводили по известной методике [25]). Аналогичные данные можно найти в работах других исследователей [16]. Можно предположить, кроме того, что отщепление некоторого количества не  $\alpha$ -аминного азота аргинина и гистидина способствует восполнению потерь по другим аминокислотам, например пролину и др. (табл. 1).

В табл. 3 приведены данные о полноте выделения аммонийного и гексозаминного азота из стандартных растворов при отгоне с MgO, KOH или ФББ. Видно, что полное обнаружение аммонийного азота (на примере раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) достигается при продолжительности отгона 5 мин. (скорость отгона 7—8 мл/мин). Ограничение времени до 2 мин., по-видимому, нежелательно, так как отгон может быть неполным и следы азота в холодильнике могут повлиять на результаты последующего отгона. Указания о возможности увеличения продолжительности отгона с MgO можно найти также в литературе [29]. По данным табл. 3, известное количество ионов аммония, внесенное в почвенный гидролизат, при добавлении к последнему избытка MgO или щелочи полностью обнаруживается в приемнике. Это доказывает, что самостоятельную процедуру предварительной нейтрализации гидролизата можно не проводить, что и было учтено в предлагаемом методе. На примере глюкозамина и  $\alpha$ -аланина показано, что при отгоне с MgO

Таблица 3

Влияние условий отгона на полноту выделения азота из различных веществ,  
% от внесенного (а — отгон с MgO; б — отгон с NaOH или ФББ)

| Анализируемое вещество  | Внесено N,<br>мкг | Продолжительность отгона, мин. |      |      |      |         |      |
|-------------------------|-------------------|--------------------------------|------|------|------|---------|------|
|                         |                   | 2                              |      | 5    |      | 10      |      |
|                         |                   | а                              | б    | а    | б    | а       | б    |
| NH <sub>4</sub> Cl      | 200               | 92,6                           | 96,9 | 98,9 | 99,6 | Не опр. |      |
| То же +5 мл гидролизата | 200*              | Не опр.                        |      | 98,0 | 99,5 | »       |      |
| Глюкозамин-гидрохлорид  | 50                | »                              | »    | 0    | 85,0 | 1,0     | 85,5 |
| То же +5 мл гидролизата | 50*               | »                              | »    | 0    | 85,0 | 1,2     | 85,9 |
| α-аланин                | 100               | »                              | »    | 0    | 0    | 0       | 0    |

\* Без учета содержания азота в гидролизате.

Таблица 4

Результаты определения аминокислотного, гексозаминного и аммонийного азота  
в различных почвах

| Почва, угодье, пункт                                                   | Глубина,<br>см | N <sub>общ</sub> ,<br>мг/кг | Гидро-<br>лизуе-<br>мый N,<br>% от<br>N <sub>общ</sub> | Аминокислот-<br>ный N |      | Гексозаминный<br>N |      | Аммонийный N |      |
|------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------|------|--------------------|------|--------------|------|
|                                                                        |                |                             |                                                        | а                     | б    | а                  | б    | а            | б    |
|                                                                        |                |                             |                                                        |                       |      |                    |      |              |      |
| Чернозем мощный ти-<br>пичный, степень не-<br>косимая. Курская<br>обл. | 0—10           | 5000                        | 79,2                                                   | 24,0                  | 36,3 | 9,0                | 8,4  | 16,0         | 15,2 |
|                                                                        | 40—50          | 2350                        | 73,2                                                   | 18,9                  | 29,5 | 9,0                | 8,3  | 18,2         | 17,6 |
|                                                                        | 110—120        | 910                         | 88,5                                                   | 18,7                  | 31,0 | 7,0                | 6,0  | 26,5         | 27,0 |
| Чернозем мощный ти-<br>пичный, пашня. Кур-<br>ская обл.                | 0—20           | 2610                        | 75,5                                                   | 19,1                  | 23,1 | 9,6                | 10,4 | 18,6         | 19,1 |
| Чернозем обыкновен-<br>ный, пашня. Воро-<br>нежская обл.               | 0—20           | 4440                        | 76,3                                                   | 19,2                  | 28,2 | 9,0                | 8,7  | 16,0         | 15,8 |
| Выщелоченный черно-<br>зем, пашня. Башкир-<br>ская АССР                | 0—20           | 4980                        | 60,3                                                   | 14,6                  | 22,9 | 7,5                | 7,0  | 14,0         | 13,6 |
| Оподзоленный черно-<br>зем, пашня, Башкир-<br>ская АССР                | 0—20           | 6280                        | 63,0                                                   | 15,5                  | 19,3 | 7,2                | 6,7  | 16,0         | 15,5 |
| Серая лесная, лес.<br>Тульская обл.                                    | 0—10           | 2200                        | 80,9                                                   | 22,7                  | 36,1 | 9,5                | 8,9  | 16,2         | 15,3 |
| Дерново-подзолистая<br>легкосуглинистая,<br>пашня. Московская<br>обл.  | 0—20           | 850                         | 82,5                                                   | 22,7                  | 25,4 | 11,7               | 11,2 | 17,2         | 17,5 |
|                                                                        | 70—80          | 185                         | 79,4                                                   | 3,0                   | 18,0 | 5,0                | 4,5  | 41,0         | 43,1 |

Примечание. а — по Бремнеру, б — по предполагаемому методу.

не происходит дезаминирования аminosахаров и аминокислот даже при увеличении продолжительности отгона до 10 мин., а аминокислоты не разрушаются также при отгоне с щелочью. Под действием щелочи 85% азота глюкозамина (как чистого, так и добавленного к гидролизату) выделяется в виде аммиака, причем этот показатель не удается улучшить путем увеличения продолжительности отгона до 10 мин. Замена щелочи ФББ также не дает желаемых результатов. Эти данные в совокупности с указаниями в литературе [7, 31] дают основание считать, что в условиях полумикроотгона с паром мы должны считаться с возможностью недостаточно полного обнаружения гексозаминного азота. В этой связи следует подчеркнуть, что вопрос о поправочных коэффициентах [10] по отношению к гексозаминам нельзя считать еще окончательно решенным.



Наряду с анализом стандартных растворов проверку эффективности предлагаемого метода мы проводили и на образцах почв. С этой целью каждый образец гидролизovali в 3-кратной повторности, половину гидролизатов нейтрализовали до pH 6,5, затем как в кислых, так и в нейтральных гидролизатах в 3-кратной повторности определяли содержание аминокислотного и гексозаминного азота по Бремнеру и по предлагаемому методу. Результаты приведены в табл. 4, в ней имеются данные о содержании аммонийного азота. Как и в случае со стандартными растворами, при анализе почв на содержание аминокислот обнаруживается явное преимущество предлагаемого метода перед методом Бремнера. Для верхних слоев почв разница в пользу первого достигает от 24% (оподзоленный чернозем) до 50% и более (чернозем мощный, серая лесная почва под лесом). Эта разница еще более возрастает при анализе образцов нижних слоев почв. Замечено, что при гидролизе образцов нижних малогумусных слоев почв в раствор  $6n$  HCl переходит очень много минеральных веществ, гидролизат получается густым. По-видимому, присутствие повышенных количеств минеральных веществ в гидролизате сильно мешает отгону аммиака в присутствии ФББ.

При определении гексозаминов по предлагаемому методу получены, как правило, более низкие данные, чем по Бремнеру. В большинстве случаев разница между показателями оказалась достоверной ( $P=0,05$ ), однако в целом можно признать, что оба метода показывают практически одинаковые результаты, в особенности, когда речь идет о пахотном слое почв. В показателях содержания аммонийного азота не обнаружено существенных различий между методами. Это дает некоторое основание думать, что причину более высокого содержания гексозаминного азота по Бремнеру следует искать в особом, еще невыясненном воздействии ФББ на азотсодержащие соединения в почвенном гидролизате.

Данные табл. 4 дают возможность рассчитать содержание неидентифицируемых форм азота в гидролизатах исследуемых почв. Так, в слое 0—10 см мощного чернозема содержание НИФ составляет 19,3% от  $N_{\text{общ}}$  почвы. Вполне возможно, что некоторую, хотя и очень незначительную часть НИФ составляют  $\alpha$ -аминокислоты, не обнаруженные вследствие неполного их разрушения. В группу НИФ переходит азот гетероциклических соединений, пигментов, часть азота гексозаминов, а также не  $\alpha$ -аминный азот ряда аминокислот. Некоторая часть азота в группе НИФ сосредоточена, вероятно, в кислоторастворимых гумусовых веществах [11]. При работе по методу Бремнера содержание НИФ получается значительно выше (для мощного чернозема 30,2%).

## Выводы

1. Описан усовершенствованный вариант дистилляционного метода определения аминокислотного и гексозаминного азота в гидролизатах почв.

2. По сравнению с известным методом Бремнера предлагаемый метод позволяет точнее, более полно и значительно проще определить содержание аминокислотного азота. По гексозаминам данные практически совпадают.

## Литература

1. Андреева Е. А., Щеглова Г. М., Куренева Л. Н. Распределение азота удобрений по фракциям азота почвы. В кн.: Применение стабильного изотопа  $^{15}N$  в исследованиях по земледелию. «Колос», 1973.
2. Кононова М. М., Александрова И. В. Применение метода распределительной хроматографии на бумаге при изучении форм азота гумусовых веществ. Почвоведение, 1956, № 5.

3. Турчин Ф. В. Роль минерального и биологического азота в земледелии СССР. Почвоведение, 1956, № 6.
4. Шаймухаметов М. Ш. Высокопроизводительный аппарат для отгона аммиака. Агрохимия, 1971, № 4.
5. Blackburn S. Amino acid determination. Methods and techniques. 1968.
6. Bremner J. M., Shaw K. Studies on the estimation and decomposition of amino sugars in soil. J. Agric Sci., v. 44, № 1, 1954.
7. Bremner J. M. Amino sugars in soil. J. Sci. Food Agric., v. 9, № 8, 1958.
8. Bremner J. M. Forms of nitrogen in soils and plants. Rothmsted Exp. Sta. Rept. for 1959.
9. Bremner J. M. Organic nitrogen in soil. In: Soil Nitrogen, 1965.
10. Bremner J. M. Organic forms of nitrogen In: Methods of soil analysis. 1965.
11. Cheng H. H., Kurtz L. T. Chemical distribution of added nitrogen in soils. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., v. 27, № 3, 1963.
12. Davidson D. J., Sowden F. J., Atkinson H. J. Application of paper chromatography to identification and quantitative estimation of amino acids in soil organic matter fractions Soil Sci., v. 7, № 5, 1951.
13. Ferguson W. S., Sowden F. J. A comparison of methods of determining nitrogen fractions in soils Canad. J. Soil. Sci., v. 46, № 1, 1966.
14. Gardell S. Determination of hexosamines. In: Methods of biochemical analysis, v. 6, 1958.
15. Gawargious Y. A., Amir Besada, Hassouna M. E. M. Microdetermination of amino acids by direct titration with copper(II) sulphate solution. Microchim. acta, № 6, 1974.
16. Khan S. U., Sowden F. J. Distribution of nitrogen in the black solonetzic and black chernozemic soils of Alberta. Canad. J. Soil, v. 51, № 2, 1971.
17. Lorenz K. Über eine neue photometrische Aminösäurebestimmung mit p-Benzochinon in biologischen Flüssigkeiten. Z. Anal. Chem., v. 269, № 3, 1974.
18. Love L. E. Amino acid distribution in forest humus layers in British Columbia. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., v. 37, № 4, 1973.
19. McFadyen D. Determination of  $\text{NH}_3$  evolved from amino acids by ninhydrin. J. Biol. Chem., v. 153, № 2, 1944.
20. Matoba T., Komori N., Doi E. A simple gasometric method for determination of free amino acid contents in biological fluids. Agric. Biol. Chem., v. 39, № 12, 1975.
21. Morgan T. J. The preparation and properties of specific polysaccharide. Biochem. J., v. 30, № 5, 1936.
22. Sobel A. E., Hirschman A., Besman L. A convenient microtitrat ion method for the estimation of amino acids. J. Biol. Chem., v. 161, № 1, 1945.
23. Sowden F. J. Investigation of the amount of hexosamines found in various soils. and methods for their determination. Soil Sci., v. 88, № 3, 1959.
24. Sowden F. J. Determination of amino acids and amino sugars in soil hydrolysates with the Autoanalyser using long and short columns. In: Automation in analytical chemistry. Technicon symposia, 1966.
25. Sowden F. J. Effect of hydrolysis time and iron and aluminium removal on the determination of amino compounds in soil. Soil Sci., v. 107, № 5, 1969.
26. Stevenson F. J. Ion-exchange chromatography of the amino acids in soil hydrolysates. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., v. 18, № 4, 1954.
27. Stevenson F. J. Distribution of the forms of nitrogen in some soil profiles. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., v. 21, № 3, 1957.
28. Stevenson F. J. Investigations of aminopolysaccharides in soil: I. Colorimetric determination of hexosamines in soil hydrolysates. Soil Sci., v. 83, № 2, 1957.
29. Stevenson F. J. Amino-sugars. In: Methods of Soil Analysis. 1965.
30. Stevenson F. J., Cheng C.-N. Amino acids in sediments: recovery by acid hydrolysis and quantitative estimation by colorimetric procedure. Geochim. Cosmochim. acta, v. 34, № 1, 1970.
31. Stewart B. A., Porter L. K., Johnson D. D. Immobilisation and mineralisation of nitrogen in several organic fractions of soil. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., v. 27, № 3, 1963.
32. Tracey M. V. The determination of glucosamine by alkaline decomposition. Biochem. J., v. 52, № 2, 1952.
33. Van Slyke D., Dillon R. T., McFadyen D. A., Hamilton P. Gasometric determination of carboxyl groups in free amino acids. J. Biol. Chem., v. 141, № 2, 1941.

Почвенный институт  
им. В. В. Докучаева

Дата поступления  
9.XI.1976 г.

M. SH. SHAIMUKHAMETOV

#### A METHOD FOR DETERMINATION OF AMINO ACID AND HEXOSE AMINE NITROGEN IN SOILS

The description of an improved method for determination of amino acid and hexose amine nitrogen is presented.