

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНФОРМАЦИОННО-АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПРИРОДО-  
ОХРАННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Учебно-методическое пособие для вузов

Составители:

Л.И. Брехова

Л.Д. Стахурлова

Д.И. Щеглов

А.И. Громовик

ВОРОНЕЖ – 2009

Утверждено Научно-методическим советом биолого-почвенного факультета - протокол № 10 от 4 июня 2009 г.

Рецензент д.б.н., профессор Л.А. Яблонских

Учебно-методическое пособие подготовлено на кафедре почвоведения и управления земельными ресурсами биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета.

Рекомендовано для студентов почвенного отделения биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета.

Для специальности: 020701 - Почвоведение

Недостаток или избыток любого химического элемента вызывает нарушение нормального хода биохимических и физиологических процессов в растениях, что в конечном итоге изменяет урожайность и качество растениеводческой продукции. Поэтому определение химического состава растений и показателей качества продукции позволяет идентифицировать неблагоприятные экологические условия произрастания как культурной, так и естественной растительности. В связи с этим химический анализ растительного материала является неотъемлемой частью природоохранной деятельности.

Практическое пособие по информационно-аналитическому обеспечению природоохранной деятельности в сельском хозяйстве составлено в соответствии с программой лабораторных занятий по «Биогеоценологии», «Аналізу растений» и «Природоохранной деятельности в сельском хозяйстве» для студентов 4-го и 5-го курсов почвенного отделения биолого-почвенного факультета ВГУ.

## **МЕТОДИКА ВЗЯТИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОБ И ПОДГОТОВКА ИХ К АНАЛИЗУ**

Взятие проб растений является весьма ответственным моментом в результативности диагностики питания растений и оценки доступности им почвенных ресурсов.

Всю площадь исследуемого посева визуальнo делят на несколько участков в зависимости от ее размера и состояния растений. Если в посеве выделяются участки с явно худшими растениями, то на карте поля отмечают эти участки, выясняют, не является ли плохое состояние растений следствием энто- или фитозаболевания, местного ухудшения свойств почвы или других условий роста. Если все эти факторы не объясняют причины плохого состояния растений, то можно предположить, что нарушено их питание. Это проверяется методами растительной диагностики. Берут про-

бы с участков с самыми худшими и самыми лучшими растениями и почвы под ними и по их анализам выясняют причины ухудшения растений и уровень их питания.

Если по состоянию растений посев не однороден, то при отборе проб следует добиваться, чтобы образцы соответствовали среднему состоянию растений на данном участке поля. С каждого выделенного массива по двум диагоналям берут растения с корнями. Они используются: а) для учета прироста массы и хода образования органов – будущей структуры урожая и б) для химической диагностики.

В ранние фазы (при двух – трех листьях) в пробе должно быть не менее 100 растений с 1 га. Позже для зерновых, льна, гречихи, гороха и других – не менее 25 – 30 растений с 1 га. У крупных растений (взрослых кукурузы, капусты и др.) берут нижние здоровые листья не менее, чем с 50 растений. Чтобы учесть накопление по фазам и вынос урожаем, берут в анализ всю надземную часть растения.

У древесных пород – плодовых, ягодников, винограда, декоративных и лесных – в связи с особенностями их возрастных изменений, периодичности плодоношения и т. д. взятие проб несколько сложнее, чем у полевых культур. Выделяют следующие возрастные группы: сеянцы, дички, привитые двухлетки, саженцы, молодые и плодоносящие (начавшие плодоносить, в полном и в затухающем плодоношении) деревья. У сеянцев в первый месяц их роста в пробу входит целиком все растение с последующим разделением его на органы: листья, стволы и корни. Во второй и следующие месяцы отбирают вполне сформировавшиеся листья, обычно – первые два после самых молодых, считая от верхушки. У двухлетних дичков также берут первые два сформировавшихся листа, считая от верхушки ростового побега. У привитых двухлеток и саженцев берут, так же как и у взрослых, средние листья ростовых побегов.

У ягодников – крыжовника, смородины и других – отбирают с побегов текущего прироста по 3 – 4 листа с 20 кустов с тем, чтобы в пробе

было не менее 60 – 80 листьев. У земляники в том же количестве отбирают взрослые листья.

У хвойных деревьев рекомендуется брать хвою из мутовок текущего года из средней трети бокового побега.

Общим требованием является унификация техники отбора, обработки и хранения проб: взятие со всех растений строго одних и тех же частей по их ярусности, возрасту, расположению на растении, отсутствию заболеваний и т.д. Имеет значение также, находились ли листья на прямом солнечном свете или в тени, причем во всех случаях должны быть отобраны листья одинакового размещения по отношению к солнечному освещению, лучше на свету.

При анализе корневой системы среднюю лабораторную пробу перед взвешиванием осторожно промывают в водопроводной воде, споласкивают в дистиллированной воде и подсушивают фильтровальной бумагой.

Лабораторная проба зерна или семян берется из множества мест (мешка, ящика, машины) щупом, затем ее распределяют ровным слоем на бумаге в виде прямоугольника, делят на четыре части и берут материал из двух противоположных частей до нужного количества для анализа.

Одним из важных моментов в подготовке растительного материала к анализу является правильная фиксация его, если анализы не предполагается проводить в свежем материале.

Для химической оценки растительного материала по общему содержанию элементов питания (N, P, K, Ca, Mg, Fe и др.) образцы растений высушивают до воздушно-сухого состояния в сушильном шкафу при температуре 50 – 60 ° или на воздухе.

В анализах, по результатам которых будут сделаны выводы о состоянии живых растений, следует использовать свежий материал, так как завядание вызывает существенное изменение состава вещества или уменьшение его количества и даже исчезновение веществ, содержащихся в

живых растениях. Например, целлюлоза не затрагивается разрушением, а крахмал, белки, органические кислоты и особенно витамины подвергаются разложению после нескольких часов завядания. Это заставляет экспериментатора проводить анализы в свежем материале в очень короткие сроки, что не всегда можно сделать. Поэтому часто используют фиксацию растительного материала, цель которой заключается в стабилизации нестойких веществ растений. Решающее значение при этом имеет инактивация ферментов. Используются различные приемы фиксации растений в зависимости от задач опыта.

**Фиксация паром.** Этот вид фиксации растительного материала применяется тогда, когда нет необходимости определения воднорастворимых соединений (клеточного сока, углеводов, калия и др.). Во время обработки сырого растительного материала может происходить такой сильный автолиз, что состав конечного продукта иногда значительно отличается от состава исходного материала.

Практически фиксацию паром проводят следующим образом: внутри водяной бани подвешивается металлическая сетка, сверху баня покрывается плотным негорючим материалом и вода нагревается до бурного выделения пара. После этого на сетку внутри бани помещается свежий растительный материал. Время фиксации 15 – 20 мин. Затем растения высушиваются в термостате при температуре 60°.

**Температурная фиксация.** Растительный материал помещают в пакеты из плотной бумаги типа «крафт», а сочные плоды и овощи в измельченном виде рыхло укладывают в эмалированные или алюминиевые кюветы. Материал выдерживают 10 – 20 мин при температуре 90 - 95°. При этом инактивируется большая часть ферментов. После этого потерявшую тургор листостебельную массу и плоды высушивают в сушильном шкафу при температуре 60° с вентиляцией или без нее.

При использовании этого метода фиксации растений необходимо помнить, что длительное высушивание растительного материала при тем-

температуре 80° и выше приводит к потерям и изменениям веществ вследствие химических превращений (термического разложения некоторых веществ, карамелизации углеводов и т. д.), а также вследствие летучести аммонийных солей и некоторых органических соединений. Помимо этого, температура сырого растительного материала не может достигнуть температуры окружающей среды (сушильного шкафа), пока не испарится вода и пока все подводимое тепло не перестанет превращаться в скрытую теплоту парообразования.

Быстрое и осторожное высушивание растительной пробы в ряде случаев также считают приемлемым и допустимым методом фиксации. При умелом проведении этого процесса отклонения в составе сухого вещества могут быть небольшими. При этом происходит денатурация белков и инактивация ферментов. Как правило, сушку проводят в сушильных шкафах (термостатах) или специальных сушильных камерах. Значительно быстрее и надежнее высушивается материал, если через шкаф (камеру) циркулирует нагретый воздух. Наиболее подходящая температура для высушивания от 50 до 60°.

Высушенный материал лучше сохраняется в темноте и на холоде. Поскольку многие содержащиеся в растениях вещества способны самоокисляться даже в сухом состоянии, рекомендуется хранить высушенный материал в плотно закрывающихся сосудах (склянках с притертой пробкой, эксикаторах и др.), доверху заполненных материалом, чтобы в сосудах не оставалось много воздуха.

**Замораживание материала.** Растительный материал очень хорошо сохраняется при температуре от -20 до -30°, при условии, что замораживание происходит достаточно быстро (не более 1 часа). Преимущество хранения растительного материала в замороженном состоянии обусловлено как действием охлаждения, так и обезвоживанием материала вследствие перехода воды в твердое состояние. Надо учитывать, что при заморажива-

нии ферменты инактивируются лишь временно и после оттаивания в растительном материале могут происходить ферментативные превращения.

**Обработка растений органическими растворителями.** В качестве фиксирующих веществ можно использовать кипящий спирт, ацетон, эфир и др. Фиксация растительного материала этим способом проводится опусканием его в соответствующий растворитель. Однако при этом методе происходит не только фиксация растительного материала, но и экстракция ряда веществ. Поэтому применять такую фиксацию можно только тогда, когда заранее известно, что вещества, которые нужно определять, не извлекаются данным растворителем.

Высушенные после фиксации растительные пробы измельчаются ножницами, а затем на мельнице. Измельченный материал просеивается через сито с диаметром отверстий 1 мм. При этом из пробы ничего не выбрасывается, так как удаляя часть материала, не прошедшего через сито с первого просеивания, мы тем самым меняем качество средней пробы. Крупные частицы пропускаются через мельницу и сито повторно. Остатки на сите следует растереть в ступке.

Из подготовленной таким образом лабораторной средней пробы берут аналитическую пробу. Для этого растительный материал, распределенный тонким ровным слоем на листе глянцевой бумаги, делят по диагоналям на четыре части. Затем два противоположных треугольника убирают, а оставшуюся массу вновь распределяют тонким слоем на всем листе бумаги. Снова проводят диагонали и опять убирают два противоположных треугольника. Так поступают до тех пор, пока на листе не останется количество вещества, которое необходимо для аналитической пробы. Отобранная аналитическая проба переносится в стеклянную банку с притертой пробкой. В таком состоянии она может храниться неопределенно долгое время. Вес аналитической пробы зависит от количества и методики исследований и колеблется от 50 до нескольких сот граммов растительного материала.

Все анализы растительного материала должны проводиться с двумя параллельно взятыми навесками. Только близкие результаты могут подтвердить правильность проведенной работы.

Работать с растениями нужно в сухой и чистой лаборатории, не содержащей паров аммиака, летучих кислот и других соединений, могущих оказать влияние на качество пробы.

Результаты анализов могут быть рассчитаны как на воздушно-сухую, так и на абсолютно сухую навеску вещества. При воздушно-сухом состоянии количество воды в материале находится в равновесии с парами воды в воздухе. Эта вода называется гигроскопической, и количество ее зависит как от растения, так и от состояния воздуха: чем влажнее воздух, тем больше гигроскопической воды в растительном материале. Для пересчета данных на сухое вещество необходимо определять количество гигроскопической влаги в пробе.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУХОГО ВЕЩЕСТВА И ГИГРОСКОПИЧЕСКОЙ ВЛАГИ В ВОЗДУШНО-СУХОМ МАТЕРИАЛЕ**

При химическом анализе количественное содержание той или иной составной части рассчитывается на сухое вещество. Поэтому перед анализом определяют количество влаги в материале и тем самым находят количество в нем абсолютно сухого вещества.

**Ход анализа.** Аналитическую пробу вещества распределяют тонким слоем на листе глянцевой бумаги. Затем шпателем из разных мест распределенного на листе вещества берут небольшие щепотки его в предварительно высушенный до постоянного веса стеклянный бюкс. Навеска должна составлять примерно 5 г. Бюкс вместе с навеской взвешивают на аналитических весах и помещают в термостат, температуру внутри которого поддерживают на уровне 100-105<sup>0</sup>. Первый раз в термостате открытый бюкс с навеской держат в течение 4-6 часов. По истечении этого времени бюкс из термостата переносят в эксикатор для охлаждения, через 20-30

минут бюкс взвешивают. После этого бюкс открывают и снова помещают в термостат (при той же температуре) на 2 часа. Высушивание, охлаждение и взвешивание повторяют до тех пор, пока бюкс с навеской не достигнет постоянного веса (разница между двумя последними взвешиваниями должна быть меньше 0,0003 г).

Вычисление процента воды производят по формуле:

$$X = \frac{(v - v_1)}{v} \times 100$$

где: x – процент воды; v – навеска растительного материала до высушивания, г; v<sub>1</sub> – навеска растительного материала после высушивания.

#### Оборудование и посуда:

- 1) термостат;
- 2) стеклянные бюксы.

#### Форма записи результатов

Вес пустого бюкса, г	Вес бюкса с навеской до высушива- ния, г	Навеска до высушива- ния, г	Вес бюкса с навеской по- сле высуши- вания, г			Навеска по- сле высу- шивания, г	Процент воды
			1	2	3		

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ «СЫРОЙ» ЗОЛЫ МЕТОДОМ СУХОГО ОЗОЛЕНИЯ

Золой называют остаток, получаемый после сжигания и прокаливания органических веществ. При сжигании углерод, водород, азот и частично кислород улетучиваются и остаются лишь нелетучие оксиды.

Содержание и состав зольных элементов растений зависит от видовой принадлежности, роста и развития растений и особенно от почвенно-климатических и агротехнических условий их выращивания. Концентрация зольных элементов существенно отличается в разных тканях и органах растений. Так, содержание золы в листьях и травянистых органах растений значительно выше, чем в семенах. В листьях золы больше, чем в стеблях,

поэтому навески измельченных листьев берут в пределах 1.5 – 2 г. Для определения золы в травянистых материалах, которые при помоле дают неоднородные по величине частицы, навески следует брать в пределах 3 – 5 г.

**Принцип метода.** Определение золы основано на сжигании растительного материала и последующем количественном определении остатка. Сжигание может быть осуществлено сухим и мокрым (чаще всего азотной кислотой или смесью азотной и серной кислот) способами. Более надежные результаты дает мокрое озоление, так как с ним не связана возможность потери части фосфора, серы и калия. Для других элементов вполне достаточно и сухое озоление, но при осторожном сжигании вещества и нагревании муфеля лишь до определенной температуры. При этом потери фосфора и калия маловероятны.

**Ход анализа.** На аналитических весах в тарированном тигле берут навеску 1-2 г исследуемого вещества. Для разрыхления материала и ускорения озоления перед сжиганием навеску в тигле смачивают 2 мл этилового спирта и поджигают на электрической плитке в вытяжном шкафу. Когда пламя погаснет, тигель ставят в муфель и проводят сжигание при приоткрытой дверце. В таких условиях происходит медленное сжигание, которое обычно заканчивается через 30 минут после достижения температуры темно-красного каления (500-525°C).

После того как тигли перестанут дымить, их вынимают и охлаждают на воздухе. Затем в каждый тигель прибавляют 6-8 капель концентрированной азотной кислоты или 30%-ного пергидроля. Тигли снова ставят в муфель, нагретый до 80-100<sup>0</sup>. Минут через 10, когда внесенный окислитель испарится, нагрев муфеля усиливают до темно-красного каления, дверцу его закрывают и выдерживают тигли при этой температуре 30 минут. Если полного сжигания не произошло, в охлажденные тигли вновь добавляют окислитель, выпаривают и прокаливают. После полного сжигания цвет золы должен быть светло-серый, почти белый. Если материал содержит мно-

го железа, зола получается красно-бурая, присутствие марганца дает зеленоватый цвет. После сжигания тигли ставят в эксикатор и через 40-60 минут взвешивают на аналитических весах. При сухом озолении получается «сырая зола», так как она содержит небольшие примеси глины, угля.

Сухое озоление вещества для определения серы (продукты озоления, содержащие серу, частично улетучиваются) производят в присутствии щелочей. Выделяющийся в процессе озоления сернистый и серный ангидрид поглощается щелочью, чем предотвращается их улетучивание. Для этого 2-3 г сухого измельченного вещества помещают в платиновую чашку и добавляют 10 мл 5% раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Затем на водяной бане содержимое чашки выпаривают досуха, помещают чашку в муфель и проводят озоление обычным путем.

Сжигание проводят примерно 7-8 часов.

Содержание «сырой» золы в исследуемом веществе в процентах вычисляется по формуле:

$$X = \frac{a \times 100}{n}$$

где: x - процент «сырой» золы в растительном материале; a – вес золы, г.; n – навеска абсолютно сухого материала, г. (Пересчет на абсолютно сухой материал ведется с учетом определенной влажности).

#### Форма записи результатов

Вид растительно-го материала	Вес пустого тигля, г			Вес тигля с навеской до озоления, г	Навеска абсолютно сухого материала, г	Вес тигля с навеской после озоления, г			Вес золы, г	Процент «сырой» золы
	1	2	3			1	2	3		

#### Реактивы и посуда:

- 1) этиловый спирт;
- 2)  $\text{HNO}_3$  (d=1,4); 3)  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%-ная;
- 3) электрический муфель;

4) фарфоровые тигли.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРА В ЗОЛЕ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ДЕНИЖЕ

**Принцип метода.** При осторожном сухом озолении вещества находящаяся в нем фосфорная кислота остается в золе в виде солей различных металлов. Эти соли растворяют соляной кислотой. Дальнейшее определение основано на способности фосфорной кислоты давать голубое окрашивание с молибденово-кислым аммонием в присутствии хлористого олова.

При взаимодействии фосфорной кислоты и молибденового реактива образуется фосфорно-молибденовая гетерополикислота  $H_7[P(Mo_2O_7)_6] \cdot H_2O$ . Добавление восстановителя (хлористого олова) приводит к частичному восстановлению шестивалентного молибдена в пятивалентный и появлению соединения, окрашенного в синий цвет.

Интенсивность и устойчивость окраски зависит не только от наличия в растворе фосфорной кислоты, но и от соотношения в растворе между кислотами ( $HCl$ ,  $H_2SO_4$ ), молибденово-кислым аммонием и восстановителем, поэтому важно пунктуальное соблюдение техники анализа при пользовании модификацией метода Дениже.

Следует иметь в виду, что определению фосфорной кислоты этим методом мешают ионы щавелевой и лимонной кислот, железа, фосфора, а в больших количествах - и хлора. Особенно важно полное отсутствие мышьяка, анионы которого также образуют окрашенные в синий цвет соединения с молибденовым реактивом в присутствии восстановителя. Определению не мешают ионы алюминия, марганца, кальция, магния, если они присутствуют даже в количестве 1 мг на 1 мл исследуемого раствора. Кремневая кислота мешает анализу (она образует соли гетерополикислоты), если находится в количествах, больших, чем 0,08 мг на 1 мл колориметрируемого раствора.

**Ход анализа.** Зола после охлаждения в эксикаторе и доведения до постоянного веса смачивают несколькими каплями дистиллированной воды и растворяют в 5мл 25%-ной соляной кислоты, помешивая содержимое тигля стеклянной палочкой. Солянокислый раствор золы через воронку переносят в мерную колбочку емкостью 100 мл (колба №1). Тигель и стеклянную палочку многократно смывают дистиллированной водой в ту же колбочку. Затем доводят содержимое ее до метки водой и хорошо перемешивают взбалтыванием.

После отстаивания в колбе №1 не растворившихся частиц из нее осторожно берут пипеткой 10мл раствора и переносят в новую мерную колбочку емкостью 100 мл (колба №2) . Туда же добавляют одну каплю фенолфталеина и раствор нейтрализуют 1%-ным аммиаком до слабого порождения. По окончании нейтрализации колбу доливают дистиллированной водой до метки, закрывают пробкой и содержимое ее перемешивают перевертыванием колбы.

Определение  $P_2O_5$  колориметрическим методом Дениже в модификации Малюгина и Хреновой проводят следующим образом. Берут пипеткой 10 мл испытуемого раствора из колбы №2, переносят в мерную колбочку емкостью 100 мл (колба №3), приливают по 10 мл 27%-ной серной кислоты и 2%-ного молибденово-кислого аммония, доводят раствор водой до метки, перемешивают, добавляют 7 капель хлористого олова и снова перемешивают. Через 5 минут раствор колориметрируют (светофильтр красный).

**Приготовление шкалы образцового раствора.** Образцовый рабочий раствор, содержащий 0,002 мг  $P_2O_5$  в 1 мл в количестве 10, 20, 30, 50, 70, мл помещают в мерные колбы на 100 мл, туда же приливают 10-20 мл дистиллированной воды, по 10 мл. 27%-ной серной кислоты и 2%-ного молибденового аммония, перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой. Раствор хлористого олова добавляют за 5 минут до фотоколориметрирования.

### Форма записи для шкалы образцового раствора

Рабочий раствор, мл	10	20	30	50	70
Концентрация P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/100 мл	0,02	0,04	0,06	0,1	0,14
Отсчет по ФЭКу, D					

Содержание P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> в золе вычисляется по формуле:

$$P_2O_5 \text{ (мг на 100 г вещества)} = \frac{a \times D_x \times V \times 100}{D_{\text{эт}} \times V_1 \times n}$$

где: а – концентрация образцового раствора (мг/100 мл), оптическая плотность которого близка к плотности испытуемого раствора; D<sub>x</sub> - оптическая плотность испытуемого раствора; D<sub>эт</sub> – оптическая плотность эталонного раствора; V – общий объем вытяжки (100 мл); V<sub>1</sub> – объем вытяжки, взятый на определение с учетом разбавления (10\*10/100=1 мл); n – навеска (2 г); 100 – для пересчета на 100 г вещества.

$$P_2O_5 (\%) = P_2O_5 \text{ мг на 100 г} / 1000.$$

#### Реактивы:

- 1) HCl – 25%-ная (63,4 мл конц. HCl довести дистиллированной водой до 100 мл).
- 2) фенолфталеин (1% спиртовой раствор)
- 3) NH<sub>4</sub>OH 1%-ный р-р (21,8 мл конц NH<sub>4</sub>OH довести до метки 500 мл дистиллированной водой).
- 4) 27%-ная H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150 мл конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> разбавляют до 1 литра дистиллированной водой).
- 5) 2%-ный водный раствор молибденовокислого аммония.
- 6) Раствор хлористого олова (250 мг натертого металлического олова переносят в пробирку, приливают 5 мл конц. HCl. Пробирку опускают в стакан с дистиллированной водой и кипятят до полного растворения олова. После растворения олова объем доводят дистиллированной водой до 25 мл).

7) Образцовый раствор фосфата: 0,1917 г  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  растворяют в дистиллированной воде и переносят количественно в мерную колбу на 1 литр (объем доводят до метки); 20 мл полученного раствора переносят в другую мерную колбу на 1 литр и доводят до метки. Концентрация последнего раствора составляет 0,002 мг  $\text{P}_2\text{O}_5$  в 1 мл.

### Форма записи результатов

Вид растительного материала	Навеска, г	Общий объем вытяжки V, мл	Объем вытяжки, взятый для определения $V_1$ , мл	Отсчет по ФЭКу, Dx	$\text{P}_2\text{O}_5$ , мг/100 г	$\text{P}_2\text{O}_5$ , %

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА, КАЛИЯ И КАЛЬЦИЯ В ОДНОЙ НАВЕСКЕ

**Принцип метода.** Вещество озоляют концентрированной серной кислотой и перекисью водорода. После озоления в полученном растворе определяют азот колориметрически и калий пламеннофотометрически.

**Ход анализа.** Навеску анализируемого вещества около 0,2 г (взятую на аналитических весах) переносят в коническую колбу из термостойкого стекла емкостью 100 мл и приливают 10 мл концентрированной серной кислоты. Колбу устанавливают в вытяжном шкафу на электрическую плитку и приливают по каплям 3-5 мл 30% перекиси водорода. Вещество при этом полностью растворяется и содержимое колбы полностью обесцвечивается или иногда остается слабоокрашенным.

После этого плитку включают в электрическую сеть и нагревают жидкость в колбе до побурения и выделения белых паров. Затем колбу снимают с плитки, охлаждают и вновь добавляют 5–8 капель перекиси водорода (до обесцвечивания жидкости) и снова нагревают колбу на плитке до потемнения. Приливание перекиси водорода и нагревание повторяют до

прекращения потемнения жидкости и начала выделения белых паров, что указывает на окончание озоления.

Раствор после озоления и охлаждения переносят в мерную колбу емкостью 250 мл при многократном ополаскивании колбы, в которой проводилось озоление. Объем жидкости в мерной колбе доводят до черты дистиллированной водой и раствор хорошо перемешивают. Из этой колбы берут пробы для определения азота и калия.

**Определение азота.** 1-2 мл раствора переносят в мерную колбу емкостью 100 мл. Для нейтрализации избытка серной кислоты в эту колбу приливают столько мл 2,5% NaOH, сколько было взято раствора для определения азота. Приливают в колбу дистиллированной воды примерно 80 мл, взбалтывают, добавляют 4 мл реактива Несслера, доводят объем жидкости до метки и снова перемешивают. Определение азота проводят на фотоэлектроколориметре при синем светофильтре.

Одновременно готовят и образцовую шкалу. Из рабочего раствора берут 2, 5, 10, 15, 20 мл в колбы емкостью 100 мл, приливают 60 мл дистиллированной воды, затем 4 мл реактива Несслера и содержимое колб доводят до метки дистиллированной водой и снова перемешивают. Оставляют стоять в течение 2-3 мин. И затем сравнивают окраску. Разведение окрашенных растворов водой не допускается, поэтому в случае большой разницы в окраске окрашивание следует повторить с другим (большим или меньшим) объемом раствора.

#### Форма записи для шкалы образцового раствора

Рабочий раствор, мл	2	5	10	15	20
Концентрация N, мг/100 мл	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2
Отсчет по ФЭКу, D					

Содержание общего азота рассчитывают по формуле:

$$N \text{ (мг на 100 г вещества)} = \frac{a \times D_x \times V \times 100}{D_{\text{эт}} \times V_1 \times n}$$

где: а – концентрация образцового раствора (мг/100 мл), оптическая плотность которого близка к плотности испытуемого раствора;  $D_x$  - оптическая плотность испытуемого раствора;  $D_{\text{эт}}$  – оптическая плотность образцового раствора; V – общий объем вытяжки, мл;  $V_1$  – объем вытяжки, взятый на определение с учетом разбавления мл; n – навеска растительного вещества в г; 100 – для пересчета на 100 г вещества.

$$\%N = N, \text{ (мг на 100 г в-ва)}/1000$$

### Форма записи результатов

Вид растительного материала	Навеска, г	Общий объем вытяжки V, мл	Объем вытяжки, взятый для определения $V_1$ , мл	Отсчет по ФЭКу, D	N, мг/100 г	N, %

**Реактивы.** Образцовый раствор – 0,3820 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$  растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу емкостью 1 л, , доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и получают запасной раствор с содержанием 0,1 мг азота в 1 мл. Рабочий раствор с содержанием 0,01 мг N в 1 мл получают разбавлением запасного раствора в 10 раз.

**Определение калия.** Содержание общего калия в растениях определяется на пламенном фотометре с использованием того же раствора (полученного после сжигания), который используется и для определения общего азота. Для этого прозрачный раствор наливают в стеклянный стаканчик и подставляют под всасывающий капилляр прибора. Одновременно строят калибровочный график образцовых растворов, откладывая на оси абсцисс значения концентрации калия, а на оси ординат – показания гальванометра. Для графика берут 1, 2, 4, 6, 8 мл рабочего раствора в мерные колбы на 250 мл..

### Форма записи для шкалы образцового раствора

Рабочий раствор, мл	1	2	4	6	8
Концентрация K <sub>2</sub> O, мг/250 мл	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0
Показание прибора					

Содержание калия в растительном материале рассчитывают на К или K<sub>2</sub>O, используя стандартный график, построенный по шкале образцовых растворов. Расчет ведут по формуле:

$$\%K_2O = \frac{a \times 100}{n}$$

где: а – концентрация K<sub>2</sub>O по стандартному графику, мг/250 мл; n – навеска растительного материала в мг.

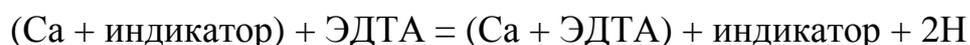
**Реактивы.** Образцовый раствор: 1,583 г х. ч. KCl довести до метки в колбе на 1 л. В 1 мл такого раствора содержится 1 мг K<sub>2</sub>O.

### Форма записи результатов

Вид растительного материала	Навеска, г	Показание микроамперметра прибора	K <sub>2</sub> O, %

**Определение кальция.** Метод основан на способности кальция образовывать с индикатором мурексид (аммонийная соль пурпуровой кислоты C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>N<sub>15</sub>NH<sub>4</sub>) комплексное соединение розовой окраски. Полученный комплекс оттитровывается раствором ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) до изменения окраски от розовой до фиолетовой.

Схема реакции при титровании может быть представлена таким образом:



Изменение окраски при титровании трилоном происходит в интервале рН от 9,6 до 11,6. Для создания сильнощелочной среды к испытуемому раствору добавляется щелочь – КОН или NaOH. Присутствие в растворе небольшого количества аммиака, меди, марганца, железа мешает проведению данного анализа. Отрицательную роль может при этом сыграть и избыток магния, который выпадает в осадок в виде  $Mg(OH)_2$  и мешает нормальному титрованию. Поэтому при анализе делается большое разведение раствора.

Для устранения вредного влияния меди к испытуемому раствору прибавляют сульфид натрия, чтобы перевести медь в нерастворимый сульфид меди. Для предотвращения вредного действия марганца, который в щелочной среде может выпадать в осадок и обесцвечивать раствор, к испытуемому раствору следует прибавить раствор гидроксиламина. Вредное действие железа устраняется как прибавлением гидроксиламина, так и большим разведением испытуемого раствора.

Сульфид натрия может быть заменен сероводородом (прибавляют одну каплю раствора  $H_2S$ ).

**Ход анализа.** После озоления растительного материала из колбы с раствором взять пипеткой 5 мл в колбу Эрленмейера объемом 200 мл. Прилить цилиндром 100 мл дистиллированной воды, взболтать. Прибавить 3 капли 2,5%-ного раствора сульфида натрия  $Na_2S \cdot 9H_2O$  (раствор должен быть свежеприготовленным). Прибавить 8 капель солянокислого раствора гидроксиламина. Прилить 3 мл 10%-ного раствора КОН (рН испытуемого раствора должен быть около 12). На кончике скальпеля внести смесь мурексида с хлористым натрием (0,02 – 0,03 г). Медленно, при непрерывном взбалтывании, титровать анализируемый раствор раствором ЭДТА из микробюретки до ясного перехода к фиолетовой окраске. Титрование нужно проводить со «свидетелем», т.е. с перетитрованным раствором. Необходимо также провести контрольное определение чистоты воды и реактивов на содержание Са.

Содержание кальция (в %) определяют по формуле:

$$\%Ca = \frac{V \times c \times p \times 100 \times 0.02}{n}$$

где: V – количество ЭДТА (трилона Б), пошедшее на титрование, см<sup>3</sup>; c – концентрация раствора ЭДТА, ммоль/ см<sup>3</sup>; p – разведение (250/5); 0,02 – молярная масса 1/2 Ca<sup>++</sup>, г·ммоль<sup>-1</sup>; n – навеска растительного материала, г.

### Реактивы:

- 1) Гидроксиламин солянокислый NH<sub>2</sub>OH·HCl (5%-ный водный раствор).
- 2) 1%-ный водный раствор сульфида натрия Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, свежеприготовленный.
- 3) 10%-ный раствор КОН.
- 4) Смесь мурексида (0,25 г) и хлористого натрия (25 г): C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O + NaCl. Сухие реактивы хорошо растереть и хранить в темной плотно закрытой склянке.
- 5) ЭДТА – 0,01 н. раствор двуназриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (комплексон): навеску х. ч. реактива (93 г) растворить в 1 л дистиллированной воды, не содержащей кальция. Из колбы взять 200 мл раствора в мерную колбу на 1 л, довести до метки дистиллированной водой без кальция. Установить нормальность трилона по 0,01 н. раствору MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

### **Форма записи результатов**

Вид растительного материала	Навеска, г	Концентрация ЭДТА, ммоль/ см <sup>3</sup>	Объем ЭДТА, пошедший на титрование, мл	Разведение	Ca, %

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ И МАГНИЯ ПОСЛЕ СУХОГО ОЗОЛЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА**

Кальций и магний содержатся в тканях всех растений. Эти элементы являются составной частью протоплазменных структур. Магний входит в состав хлорофилла. Значительное количество кальция, особенно в старых органах растений, находится в виде оксалатов, фосфатов, сульфатов. Содержание кальция в различных растениях и их органах колеблется от сотых долей процента до 2% и выше, магния – меньше 0,5%.

Известно, что бобовые, многие крестоцветные, листья дуба и липы содержат больше 1 % кальция, в то время как в большинстве злаков, хвое ели, древесине и корнях многих пород содержание кальция менее 1%. Растения, богатые Са, как правило, содержат и повышенное количество Mg. Эти закономерности следует учитывать при расчете объема растворов для определения Са и Mg.

**Объемный метод определения  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  титрованием раствором ЭДТА.**

**Принцип метода.** В настоящее время в объемном анализе широко используются органические реагенты, образующие с ионами металлов внутрикомплексные соединения. Наиболее часто применяются - этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

Двузамещенная натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты в щелочной среде дает устойчивые комплексы с ионами кальция и магния.

ЭДТА с  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  образует бесцветные комплексные соединения, поэтому эквивалентную точку устанавливают по изменению окраски органических реактивов - металлиндикаторов хромогена черного и мурексида. Когда все ионы кальция и магния будут связаны с ЭДТА, свободный индикатор изменяет окраску раствора.

Определение суммы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  проводят в присутствии хромогена черного. Комплексы ионов кальция и магния с ЭДТА устойчивы при

pH выше 10,3. Изменение окраски хромогена черного от винно-красной (комплекс с Ca и Mg) до синей (в свободном состоянии) происходит также при щелочной реакции (pH около 10). Следовательно, поддержание щелочной реакции - неперемнное условие успешного определения суммы Ca и Mg. При определении кальция в качестве индикатора используют мурексид. Однако извлечение кальция из комплекса с мурексидом происходит при pH не меньше 12. В этих условиях магний выделяется в виде гидроокиси магния. В том случае, когда содержание магния в растворе высокое, гидроокись магния адсорбирует значительное количество Ca, поэтому кальций определяют ЭДТА только в том случае, когда его содержание в растворе значительно превышает содержание магния, что характерно для золы растительных объектов.

Определению кальция и магния мешает присутствие в растворе ряда ионов других металлов: Ni, Co, Cu, Zn, Fe, Ba, Sr. Они образуют комплексы с индикаторами или ЭДТА. Влияние этих ионов устраняют или предварительным осаждением и удалением (Fe, Al, Ti), или связыванием их в более прочные комплексы. Ионы Ni, Co, Cu и Zn связывают добавлением цианида или сульфида натрия. Влияние иона  $Mn^{+4}$  устраняется добавлением солянокислого гидроксилamina. Для снижения концентрации мешающих ионов титрование проводят в разбавленных растворах.

Сначала определяют сумму ионов кальция и магния, затем в отдельной порции раствора определяют кальций. Содержание магния находят по разности.

**Ход анализа.** 2-5 г воздушно-сухого растительного материала озоляют в муфельной печи (см. определение «сырой» золы методом сухого озоления). Полученную в ходе озоления золу в тигле увлажняют несколькими каплями дистиллированной воды, приливают туда же 5 мл 25% соляной кислоты и, помешивая стеклянной палочкой, растворяют. Раствор переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, многократно ополаскивая дистиллированной водой тигель и палочку. Про-

мывную жидкость сливают в эту же колбу. Затем объем жидкости доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают переворачиванием вверх и вниз, предварительно закрыв отверстие колбы каучуковой пробкой, и дают отстояться осадку.

50 мл отстоявшегося солянокислого раствора из мерной колбы пипеткой переносят в термостойкий химический стакан емкостью 500 мл, добавляют несколько капель серной кислоты и выпаривают смесь на газовой горелке или электрической плитке до появления белых паров серной кислоты.

Охладив содержимое стакана, всыпают в него около 5 г уксуснокислого натрия и разбавляют дистиллированной водой до 250 мл. Если выпадает осадок гидроокисей или фосфатов алюминия и железа, его отфильтровывают, а фильтрат переносят в мерную колбу емкостью 500 мл и доливают дистиллированной водой до метки.

**Определение кальция.** Для определения кальция берут пипеткой 200 мл фильтрата, приливают к нему 5 мл 30% раствора NaOH, свободного от углекислоты (если в растворе присутствуют соли аммония, щелочи прибавляют больше, чтобы достигнуть pH 12), и 1-2 мл 2% сульфида натрия для связывания металлов, мешающих определению. Затем в исследуемый раствор добавляют 0,1 г мурексида. Окрасившийся в красный цвет раствор титруют децимолярным раствором ЭДТА до перехода красной окраски в фиолетовую (1 мл трилона ЭДТА соответствует 4,008 мг Ca).

**Определение суммы кальция и магния.** В другой порции фильтрата (100 мл) определяют сумму кальция и магния. В фильтрат последовательно добавляют 5 капель 1% солянокислого гидроксиламина, 5 мл аммиачного буферного раствора с pH 10, 1-2 мл раствора сульфида натрия и 0,1 г индикатора хромогена черного.

Окрасившийся в красный цвет раствор нагревают на плитке до 40°C и титруют децимолярным раствором ЭДТА до перехода красной окраски в синюю (на холоде она имеет фиолетовый оттенок).

Расчеты проводят по формулам:

$$Ca \% = \frac{a \times 4,008 \times 100}{n}$$

$$Mg \% = \frac{(b - a) \times 2,432 \times 100}{n}$$

где:  $a$  - количество раствора ЭДТА, пошедшего на титрование первой порции фильтрата с мурексидом (определение кальция), мл;  $b$  - количество раствора ЭДТА, пошедшего на титрование второй порции фильтрата с хромогеном черным (определение суммы кальция и магния), мл;  $n$  - навеска исследуемого вещества, соответствующая анализируемому объему фильтрата, взятого для титрования, мг; 4,008 - количество кальция, отвечающее 1 мл раствора ЭДТА, мг; 2,432 - количество магния, отвечающее 1 мл раствора ЭДТА, мг; 100 - для выражения результатов в процентах.

### **Реактивы:**

- 1) Соляная кислота, 25 % раствор: 634,8 мл концентрированной кислоты постепенно растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 л).
- 2) Уксуснокислый натрий, сухая соль.
- 3) 30 %-ный раствор NaOH.
- 4) 2 %-ный раствор сульфида натрия ( $Na_2S$ ).
- 5) Мурексид (аммонийная соль пурпуровой кислоты  $C_8H_8O_6N_6$ ).
- 6) Раствор ЭДТА 37,21 г ЭДТА растворяют в 1 л дистиллированной воды; раствор не должен содержать кальция и магния, что проверяется с названными выше индикаторами (красный цвет при наличии Ca и Mg).
- 7) 1 %-ный раствор солянокислого гидросиламина.

- 8) Раствор аммиачного буфера: 35 мл 25% аммиака растворяют в 100 мл дистиллированной воды, добавляют 5,4 г хлористого аммония и перемешивают.
- 9) Хромоген черный.

### Форма записи результатов

Вид растительного материала	Навеска, г	Концентрация ЭДТА, ммоль/см <sup>3</sup>	Объем ЭДТА (мл), пошедший на титрование		Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
			Ca <sup>2+</sup> +Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	%	

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТНОГО АЗОТА В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Нитраты являются естественными компонентами растений, начальным звеном в цепи биосинтеза белка, однако накопление их в значительных количествах представляет гигиеническую опасность, так как нитраты и продукты их восстановления изменяют иммунологическую реактивность организма, обладают эмбриотоксическим и тератогенным свойствами. N – нитрозоамины, способные синтезироваться в различных объектах окружающей среды из нитритов и вторичных аминов, рассматриваются как супермутагены и канцерогены.

В настоящее время для некоторых токсикантов разработаны гигиенические нормативы – предельно допустимые концентрации (ПДК).

Для нитрит- и нитрат - ионов установлены разные ПДК для различных культур.

**Допустимые уровни содержания нитратов в продуктах растительного происхождения[5].**

Продукт	Допустимые уровни, мг NO <sub>3</sub> /кг		Продукт	Допустимые уровни, мг NO <sub>3</sub> /кг	
	открытый грунт	защищенный грунт		открытый грунт	защищенный грунт
Картофель	250		Лук перо	600	800
Капуста: белокочанная ранняя	900		Дыни	90	
поздняя	500		Арбузы	60	400
Морковь: ранняя	400		Перец		
поздняя	250		сладкий	200	400
Томаты	150	300	Кабачки	400	
Огурцы	150	400	Виноград		
Свекла	1400		столовых		
Лук репчатый	80		сортов	60	
			Яблоки	60	
			Груши	60	

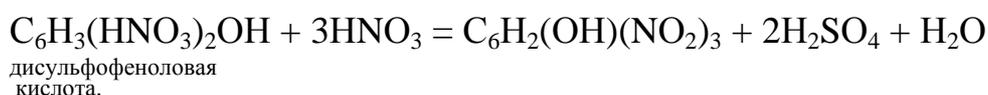
**ПДК содержания нитрат –и нитрит – ионов в кормах  
для сельскохозяйственных животных [5].**

Вид корма	Нитрат-ион, мг/кг	Нитрит-ион, мг/кг
Картофель	300	10
Свекла	800	10
Силос, сенаж	200	10
Комбикорма для свиней и птицы	200	5
Комбикорма для мелкого и крупного рогатого скота	500	10
Зеленые корма	200	10
Сено, солома	500	10
Зернофураж	300	10

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ С ДИСУЛЬФОФЕНОЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Из колориметрических методов наиболее пригоден метод определения нитратов с дисульфофеноловой кислотой, предложенный Грандваль – Ляжу.

Метод основан на взаимодействии нитратов с дисульфофеноловой кислотой и образовании нитрофенолов. При подщелачивании смеси раствор приобретает желтую окраску, по интенсивности которой судят о содержании нитратов в анализируемом материале.



нитрофенол, желтый  
раствор.

**Ход анализа** Навеску растительного материала (2-10г) измельчают в фарфоровой ступке с кварцевым песком до гомогенной массы. Переносят дистиллированной водой в мерную колбу на 200 мл, взбалтывают содержимое 3 мин. (объем гомогената примерно 2/3 колбы). Доводят до метки водой и фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Первые порции фильтра отбрасывают. Раствор отфильтровывают полностью. Если получаются мутные вытяжки, в колбу можно добавить чайную ложку активированного угля.

Берут пипеткой 50 мл фильтрата, помещают в фарфоровую чашечку диаметром 8 см, выпаривают досуха на водяной бане, не допуская пересушивания, и немедленно охлаждают. Выпаривать чашки на песчаной бане, а также оставлять чашки на водяной бане после испарения последней капли не следует, – высокая температура приводит к перегреву чашек и потере нитратов.

В охлажденную чашку из бюретки вносят 1 мл дисульфифеноловой кислоты, равномерно смачивая остаток по краям и на дне чашечки. Остаток растворяют в кислоте, растирая его короткой стеклянной палочкой с оплавленным концом. Через 10 мин в чашку добавляют 25 мл дистиллированной воды, смесь перемешивают и нейтрализуют, добавляя по каплям 10%-ный раствор щелочи. Щелочь прекращают добавлять, когда лакмусовая бумажка, опущенная в раствор, посинеет, а раствор приобретает желтую окраску. Некоторый избыток щелочи не вредит развитию окраски.

Раствор из фарфоровой чашки количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, несколько раз ополаскивая водой чашечку и палочку, содержимое колбы перемешивают, доводят водой до метки.

Определяют оптическую плотность растворов на фотоколориметре с синим светофильтром сразу же после установления окраски. При отстаивании интенсивность окраски снижается. В качестве раствора сравнения на колориметре используют дистиллированную воду: 50 мл воды упаривают в фарфоровой чашечке и обрабатывают кислотой, водой, щелочью, т. е. так, как поступают с вытяжками.

Если испытуемый раствор имеет более интенсивную окраску, чем образцовые растворы, его разбавляют водой, это разбавление учитывается при подсчете результатов.

Определению нитратов в растворе могут мешать окрашенные органические вещества, присутствие заметных количеств хлора (более  $3 \cdot 10^{-3}$  г/л), а также значительные количества аммония.

Окрашенные органические примеси разрушаются 30%-ным раствором  $H_2O_2$ . Для этого водную вытяжку в фарфоровой чашке упаривают до 5-7 мл и приливают 1 мл перекиси водорода. Если органика разрушается не полностью, периодически добавляют по 2-3 капли перекиси.

Для построения калибровочной кривой в фарфоровых чашках выпаривают 5, 10, 15, 20, 25 мл рабочего образцового раствора нитрата и далее выполняются те же операции, что и с вытяжкой из растений.

Содержание нитратного азота (мг) определяют по формуле

$$NO_3, \text{мг} / 100 \text{ г} = \frac{a \times V \times 100}{n \times V_1},$$

где: а - содержание NO<sub>3</sub> в 1 мл образцового раствора по графику, мг; V – общий объем вытяжки, мл; V<sub>1</sub> - объем вытяжки для выпаривания, мл; n – навеска растительного материала, г.

### Форма записи

Навеска, г	Общий объем фильтра, мл	Объем-фильтрата на упаривание, мл	Показания ФЭКа	NO <sub>3</sub> , (по граф.), мг/мл	NO <sub>3</sub> , мг на 100 г сырого веса

### Реактивы:

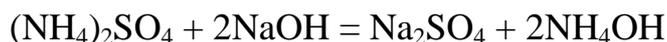
- 1) Раствор дисульфифеноловой кислоты: 30 г свежеперегнанного фенола поместить в колбу на 500 мл, добавить 200 мл серной кислоты (d 1,84), перемешать, закрыть корковой пробкой с обратным холодильником (длинная стеклянная трубка), нагреть в течение 6 часов на кипящей водной бане, охладить и использовать для анализа. В случае выпадения кристаллов из раствора их растворить, поместив колбу в горячую воду. Можно приготовить кислоту и таким образом: 50 г фенол – 2,4 – дисульфокислоты растворить в 100 мл концентрированной серной кислоты (d 1,83 – 1,84).
- 2) 10%-ный раствор NaOH или КОН.
- 3) Образцовый раствор нитрата калия: 0,1631 г х. ч. соли растворить в воде и довести объем до 1 л. Взять 100 мл раствора и вновь довести его водой до 1 л этот последний раствор является образцовым и содержит 0,01 мг NO<sub>3</sub> в 1 мл;
- 4) Перекись водорода 30%-ный раствор.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА ПО КЬЕЛЬДАЛЮ

Определение общего азота в растительном материале целесообразно проводить для оценки выноса и поглощения этого элемента из почвы и удобрений, а также для ориентировочной оценки качества растительной продукции. Азотистые соединения растений представлены двумя группами веществ: белковыми и небелковыми соединениями. Количественное содержание их в растениях определяется для первой группы по содержанию белкового азота, а для второй группы по содержанию небелкового азота. На долю небелковых веществ обычно приходится менее 10% от общего содержания азота в растениях, а в зерне и того меньше, поэтому часто этими различиями пренебрегают. Определяют общий азот и его содержание, пересчитывают на содержание белка в растении. Этот показатель называется «сырой белок».

**Принцип метода.** Навеску растительного материала озоляют в колбе Кьельдаля концентрированной серной кислотой в присутствии катализатора. Азот сохраняется в колбе в виде сульфата аммония.

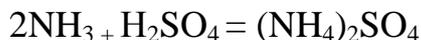
Для освобождения аммиака используется 40%-ный раствор щелочи:



В кислой среде нет гидролитической диссоциации сульфата аммония, парциальное давление аммиака равно нулю. В щелочной среде происходит смещение равновесия, и в растворе образуется аммиак, который при нагревании легко улетучивается:



Аммиак не теряется, а переходит по холодильнику вначале в виде газа, а затем, конденсируясь, каплями попадает в приемник с титрованной серной кислотой и связывается ею, вновь образуя сернокислый аммоний:



Избыток кислоты, не связанный с аммиаком, оттитровывают щелочью точно установленной нормальности по комбинированному индикатору или по метилроту.

**Ход анализа.** На аналитических весах берут навеску растительного материала (0,2 – 0,3 г) с помощью пробирки (по разности между весом пробирки с навеской и весом пробирки с остатком материала) и, надев на конец пробирки резиновую трубку длиной 12 –15 см, осторожно высыпают навеску на дно колбы Кьельдаля. Приливают в колбу небольшим цилиндром 5 мл концентрированной серной кислоты (d 1,84). Равномерное озоление растительного материала начинается уже при комнатной температуре, поэтому залитую кислотой навеску лучше оставить на ночь.

Колбу помещают на электроплитку или специальную установку и проводят постепенное сжигание вначале на слабом огне (положить асбест), затем на сильном, периодически осторожно взбалтывая. Когда раствор посветлеет, прибавляют катализатор (несколько кристаллов селена или несколько капель перекиси водорода) и продолжают сжигание до полного обесцвечивания раствора.

**Катализаторы.** Повышению температуры кипения серной кислоты (338°) и ускорению озоления способствует применение катализаторов. В различных модификациях метода Кьельдаля используют металлические ртуть и селен, серноокислый калий, сернокислую медь, перекись водорода. Некоторые из этих катализаторов используют в смеси друг с другом. Например, хорошие результаты дает смесь – селен, сернокислая медь и калий серноокислый – в весовом отношении 2 : 10 : 100. Сначала селен растирают в ступке, затем постепенно добавляют и растирают другие компоненты. Расход – 1 г смеси на одно определение. Равномерное озоление обеспечивает применение металлического селена – 0,05 г (на кончике скальпеля) на одно определение. При кипячении с концентрированной серой кислотой происходит реакция:





Селенистый ангидрид отдает кислород на окисление органического вещества, а металлический селен освобождается. При избытке селена раствор в колбе приобретает зеленую окраску.

Отгонка аммиака. После окончания сжигания колбу Кьельдаля охлаждают и в нее осторожно приливают по стенкам дистиллированную воду, перемешивая содержимое и ополаскивая горлышко колбы. Первую порцию воды наливают до горлышка и количественно переносят в круглодонную колбу емкостью 0,6 – 0,8 л. Колбу Кьельдаля еще 5 – 6 раз промывают небольшими порциями горячей дистиллированной воды, сливая каждый раз промывные воды в отгонную колбу. Осадок на дне колбы Кьельдаля надо полностью перенести в отгонную колбу. Наполняют отгонную колбу промывными водами до 2/3 ее объема и добавляют 2-3 капли фенолфталеина. Малое количество воды затрудняет парообразование при отгоне, а большое количество может привести к перебросу кипящей воды в холодильник.

В коническую колбу или химический стакан емкостью 300 – 400 мл (приемник) наливают из бюретки 25 – 30 мл 0,1 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , добавляют 2-3 капли индикатора метилроta или реактива Гроака (лиловая окраска). Кончик трубки холодильника погружают в кислоту. Отгонную колбу ставят на нагреватель и подсоединяют к холодильнику, проверяя герметичность соединения. Для разрушения сернокислого аммония и отгона аммиака используют 40%-ный раствор щелочи, взятый в таком объеме, который в четыре раза превосходит объем концентрированной серной кислоты, взятой при сжигании пробы (на 10 мл кислоты берут 40 мл щелочи).

Отгонную колбу перед нагреванием открывают, наклоняют, (в левой руке удерживают колбу и пробку холодильника). В колбу **по стенке** из цилиндра приливают необходимое количество щелочи так, чтобы она опустилась на дно колбы, затем пробку холодильника **быстро** закрывают. Строгое выполнение данных условий вызвано тем, что реакция взаимодей-

ствия щелочи и сульфата аммония начинается уже без нагревания, что приводит к потерям аммиака. Горлышко колбы нельзя по всей поверхности заливать щелочью, так как пробка холодильника может выскочить при кипячении.

Закрытую колбу осторожно и тщательно взбалтывают круговыми движениями, при этом в стакан-приемник проскакивают первоначально пузырьки воздуха. Раствор в отгонной колбе сначала становится красного цвета, затем темнеет, и при нагревании появляется объемный осадок. Включают нагреватель и холодильник и приступают к отгону аммиака. Через 20-25 мин после начала отгона, когда раствор в отгонной колбе нагревается до кипения, опускают стакан-приемник так, чтобы раствор аммиака из холодильника стекал по стенке стакана.

Отгон считают законченным, когда содержимое отгонной колбы испарится до  $1/3$  первоначального объема. Полноту отгона аммиака проверяют универсальным индикатором, лакмусом или реактивом Несслера, для чего берут несколько капель из холодильника на индикаторную бумагу или в пробирку, куда добавляют реактив Несслера. Он дает с аммиаком желтое окрашивание.

Если в процессе отгона жидкость в приемнике изменит окраску, необходимо немедленно добавить точно фиксированное количество 0,1 н  $H_2SO_4$  (20 мл), так как первоначального объема кислоты не хватило для связывания аммиака.

По окончанию отгона носик холодильника ополаскивают дистиллированной водой из промывалки в приемник.

Содержимое приемника титруют 0,1 н раствором едкого натрия до перехода окраски метилового красного в соломенно-желтую, а по реактиву Гроака от лиловой в светло-зеленую, (интенсивность окраски зависит от количества индикатора).

Количество аммиака находят по разности между количеством кислоты в приемнике, первоначально прилитой, и количеством кислоты, которая не связалась аммиаком и оттитрована впоследствии щелочью.

Расчет результатов анализа (в %) производят по формуле:

$$N = \frac{(V_1 \times n_1 - V_2 \times n_2) \times 14 \times 100}{n \times 1000},$$

где:  $V_1$  – объем  $H_2SO_4$  в приемнике, мл;  $n_1$  – молярная концентрация эквивалентов серной кислоты ( $1/2 H_2SO_4$ ), ммоль/мл;  $V_2$  – объем щелочи, израсходованный на титрование, мл;  $n_2$  – молярная концентрация NaOH, ммоль/мл; 14 – атомная масса азота, мг;  $n$  – навеска, г; 1000 – коэффициент пересчета мг атомной массы азота в г.

#### Форма записи результатов

Масса пробирки + навеска, г	Масса пробирки, г	Навеска, г	Объем $H_2SO_4$ , мл	Объем NaOH, мл	$H_2SO_4$ , $n_1$	NaOH, $n_2$	N, %

#### Реактивы:

- 1) Серная кислота концентрированная ( $d = 1,84$ ).
- 2) 40%-ный раствор щелочи.
- 3) Селен металлический.
- 4) 0,1 н раствор  $H_2SO_4$ .
- 5) 0,1 н раствор NaOH или KOH,
- 6) смешанный индикатор Гроака или метилрот.

### ПРЯМОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕБЕЛКОВОГО АЗОТА

Прямое определение небелкового азота проводится путем извлечения азотсодержащих соединений водной вытяжкой. Посредством данного

метода можно определить и содержание форм небелкового азота – аммиачную, нитратную и т.д.

**Ход анализа.** Навеску воздушно-сухого растительного материала ( $1 \text{ г} \pm 0,0001$ ) помещают в химический стакан объемом 150 – 200 мл, приливают 125 мл дистиллированной воды. Экстрагирование азотистых веществ проводят на водяной бане при температуре в стаканах  $80^\circ$  в течение 30 мин, периодически перемешивая содержимое стеклянной палочкой с резиновым наконечником. Растворы охлаждают до комнатной температуры (можно в той же водяной бане, налив холодной воды) и проводят осаждение белков.

Для этого к раствору приливают градуированной пипеткой 0,5 мл 4%-ного раствора уксуснокислого свинца  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ , перемешивают, дают отстояться осадку и при четком разделении осадка белка и надосадочной жидкости проводят пробу на полноту осаждения белков, для чего 2-3 капли раствора уксуснокислого свинца осторожно по стенке стакана вливают в раствор. Если надосадочная жидкость остается прозрачной, операцию прекращают, если в надосадочной жидкости появляется белая муть неосажденного белка, добавляют новые порции раствора уксуснокислого свинца, точно фиксируя общее количество прилитого осадителя.

Избытка свинца следует избегать, поэтому после осаждения белков и формирования осадка (через 1 час) в стакан приливают 10%-ный раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  в объеме, превышающем в 3 раза объем раствора свинца, прилитого для осаждения белков. Содержимое стакана перемешивают и оставляют на несколько часов (3 – 4 часа) или на ночь для образования осадка  $\text{PbSO}_4$ .

При избытке свинца на стенках стакана образуется прочный мелкокристаллический белый налет, который не смывается водой и не препятствует дальнейшей работе.

Содержимое стакана фильтруют через рыхлый, складчатый бумажный фильтр диаметром 10 – 12 см в мерную колбу на 200 мл. Осадок в колбе и на фильтре многократно промывают небольшими порциями дис-

тиллированной воды, доводят раствор до метки, перемешивают и используют для определения суммы небелкового азота и его компонентов.

Для определения небелкового азота из колбы на 200 мл берут пипеткой 50 мл фильтрата и переносят в колбу Кьельдаля (лучше с широким горлом). Приливают 5 – 7 мл концентрированной серной кислоты. Раствор упаривают на электроплитке до объема 7 – 10 мл, добавляют один из катализаторов и продолжают сжигание. При упаривании раствора содержимое колбы сначала чернеет, а затем в конце озоления становится бесцветным и прозрачным. Если в исследуемом материале возможно наличие заметных количеств нитратного азота, то озоление раствора следует вести с фенол-серной кислотой, так как прежде следует восстановить нитраты до аммиака. Иначе нитратный азот не будет учтен в анализе при озолении с одной серной кислотой.

Можно также предварительно в отдельной пробе фильтрата определить нитратный азот и для расчета небелкового азота суммировать.

**Отгон.** Учитывая малую концентрацию аммония при определении небелковых форм, следует проводить все операции с особой точностью, а для отгона использовать микроустановки Кьельдаля. При наличии таких установок сжигание проводят непосредственно в колбе Кьельдаля со шлифом, ее же используют как отгонную колбу. Отгонка аммония осуществляется паром. В приемную колбу берут 20 мл 0,02 н  $H_2SO_4$ , в отгонную колбу – 20 мл 40%-ного едкого натрия. Избыток кислоты в приемнике оттитровывают 0,02 н КОН. Используются индикаторы метилрот или реактив Гроака. Отгон ведут не более 20 мин.

Рассчитывают содержание небелкового азота (в %) по формуле:

$$N = \frac{(V_1 \times n_1 - V_2 \times n_2) \times r \times 14 \times 100}{n \times 1000}$$

где:  $V_1$  – объем  $H_2SO_4$  в приемнике, мл;  $n_1$  – молярная концентрация эквивалентов серной кислоты ( $1/2 H_2SO_4$ ), ммоль/мл;  $V_2$  – объем щелочи, израсходованный на титрование, мл;  $n_2$  – молярная концентрация NaOH,

моль/мл;  $p$  – разведение, 200/50; 14 – атомная масса азота, мг;  $n$  – навеска воздушно-сухого материала, г; 1000 – коэффициент пересчета мг в г.

**Форма записи результатов**

№ образ-ца	Навеска, г	Объем $H_2SO_4$ , мл	Объем NaOH, мл	$H_2SO_4$ , $n_1$	NaOH, $n_2$	N, %

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Воробьева Л.А. Химический анализ почв / Л.А. Воробьева. - М., 1998. – 280 с.
2. Гришина Л.А., Самойлова Е.М. Учет биомассы и химический анализ растений / Гришина Л.А., Самойлова Е.М. – М., 1971. – 99 с.
3. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. - Л.,1972. – 365 с.
4. Практикум по агрохимии / Под ред. В.Г. Минеева. М., 1989. – 303 с.
5. Соколов О.А.. Атлас распределения нитратов в растениях / О.А. Соколов, Т.В. Бубнова. - Пушкино, 1989. – 68 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

МЕТОДИКА ВЗЯТИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОБ И ПОДГОТОВКА ИХ К АНАЛИЗУ	3
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУХОГО ВЕЩЕСТВА И ГИГРОСКОПИЧЕСКОЙ ВЛАГИ В ВОЗДУШНО-СУХОМ МАТЕРИАЛЕ	9
ОПРЕДЕЛЕНИЕ «СЫРОЙ» ЗОЛЫ МЕТОДОМ СУХОГО ОЗОЛЕ- НИЯ	10
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРА В ЗОЛЕ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ДЕ- НИЖЕ	13
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА, КАЛИЯ И КАЛЬЦИЯ В ОД- НОЙ НАВЕСКЕ	16
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ И МАГНИЯ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ	22
ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТНОГО АЗОТА В РАСТИТЕЛЬНОМ МА- ТЕРИАЛЕ	26
ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ С ДИСУЛЬФОФЕНОЛОВОЙ КИ- СЛОТОЙ	28
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА ПО КЪЕЛЬДАЛЮ	31
ПРЯМОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕБЕЛКОВОГО АЗОТА	35
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	39

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

ИНФОРМАЦИОННО-АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ  
ПРИРОДООХРАННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ  
В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ВУЗОВ

Составители: Брехова Любовь Ивановна,  
Стахурлова Лариса Дмитриевна,  
Щеглов Дмитрий Иванович,  
Громовик Аркадий Игоревич.

Редактор