

土壤中五碳糖的比色测定法

文啓孝 程勵勵

(中国科学院土壤研究所)

土壤有机质是一个极其复杂的体系。在此复杂体系中碳水化合物的状况无疑地将对土壤的肥力状况产生多方面的作用。例如, Martin 等^[1-3]证明, 多醣类物质对水稳性团聚体的形成具有良好的效应。Broadbent 等^[4,5]认为, 能源物质的含量直接影响微生物的活动性, 从而与氮素的有效性密切相关。

在土壤碳水化合物状况的研究中, 过去, 由于缺乏适宜的方法, 一般仅常用 Fehling 溶液测定土壤水解液中的还原糖总量^[6]。这类方法只能给人以碳水化合物状况的一般概念, 而鲜有助于糖类组成的了解。此外, 该类方法还有把非糖类物质计算为糖类的缺陷^[7]。最近几年来, 这方面的情况获得了一些进展, 土壤糖醛酸^[8]、氨基糖^[9]、六碳糖等^[7]的简易测定法均先后被拟定。在五碳糖方面 Lynch 等^[10]虽用纸谱法研究了土壤中五碳糖的含量和组成, 但该方法费时, 不能适合大量分析所需。

在生物化学研究里广泛应用的几种五碳糖测定法中^[11,12], 常须特别注意以免其他碳水化合物的干扰。1950年 Tracey^[13]拟定了醋酸—草酸—苯胺法(下简称苯胺法), 该方法具有仅微受六碳糖等干扰的优点, 且操作简便。看来, 较适合应用于土壤五碳糖总量的测定。我们研究了应用苯胺法测定土壤五碳糖总量的一些问题, 现将结果报告如下。

一、試驗样品及方法

取砖红壤、草甸黑土及水稻土等的表土作为供试样品。

1. 土壤样品的水解 称取挑去细根, 并过 0.25 毫米筛孔的风干土样 4 克, 放置于 100 毫升三角瓶中, 加 40 毫升 1N H₂SO₄¹⁾, 置三角瓶于柯赫水浴上, 在 100°C 水解 8 小时。水解时, 三角瓶上盖一烧杯, 以免水滴滴入。水解完毕, 趁热过滤。用热水洗数次, 收集滤液及洗液于 50 或 100 毫升量瓶中(视土壤的五碳糖量而定), 加蒸馏水稀释至刻度。

2. 水解液的预处理 取部分水解液, 徐徐加入过量碳酸钙(化学纯)使溶液完全中和, 过滤, 并用少量热水洗沉淀数次, 定容至适当体积, 此时应得到完全透明无色的溶液²⁾。取部分上述透明无色溶液通过阳离子交换树脂柱³⁾, 用蒸馏水洗滌数次。收集流出液于一适当体积的容量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度。该溶液即可供测定五碳糖之用。

3. 五碳糖的测定^[13] 吸取水解液 2 毫升, 置于一 10 毫升的刻度试管中, 准确加入 6

- 1) 对于含有大量游离碳酸钙的土壤, 须根据中和碳酸钙所需的酸量, 增大硫酸的浓度, 使水解时硫酸的浓度仍保持为 1N。
- 2) 该溶液静置一段时间后, 有时变为淡黄色, 这示明尚有少量 Fe⁺⁺⁺ 的存在。该 Fe⁺⁺⁺ 可用阳离子交换树脂除去, 对测定无碍。
- 3) 国产强酸型 1 号阳离子交换树脂。如常法处理转变为 H⁺ 型备用。一般 25 毫升水解液, 树脂柱内径 0.5 厘米, 高 15 毫米即足。

毫升苯胺试剂[100 毫升冰醋酸,加 10 毫升 5% (W/V)草酸水溶液,24 毫升蒸馏水、16 毫升新蒸馏的无色苯胺混合即得。该试剂贮存于暗色瓶中,置避光处,可保存一周],混匀,放置于暗室中 20—24 小时(18—22°C)后¹⁾,用分光光度计(国产 73 型)测定其透光度(400 毫微米)。

用木糖作为标准,绘制标准曲线。配制每毫升含有 100 微克木糖的饱和苯甲酸溶液作为贮藏溶液。每次测定时配制每毫升含木糖 10—80 微克的标准溶液,同上显色并测定其透光度。用试剂—蒸馏水为空白。

根据标准曲线查出水解液中的五碳糖量,并换算为每 100 克土壤中五碳糖(以木糖表示)的毫克数。

整个操作步骤的图示见图 1。

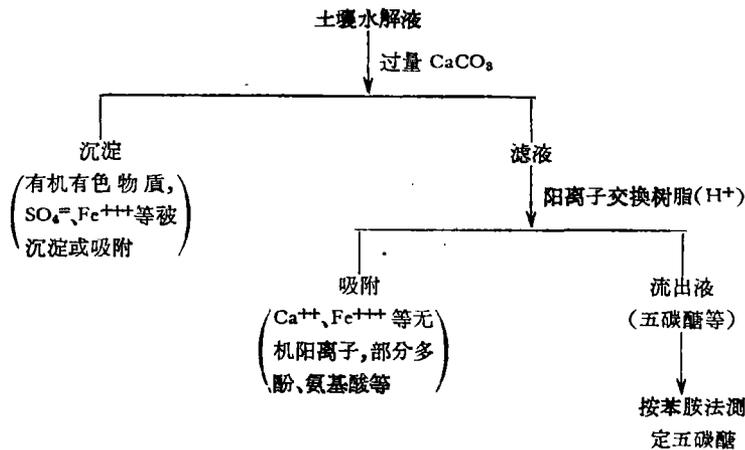


图 1 操作步骤图式

二、结果和讨论

1. 干扰物质 土壤水解液常呈淡棕至棕红色,测定五碳糖时必须首先除去这些颜色物质。此外,由表 1 可见,SO₄²⁻ 及 Fe³⁺ 也将显著增大测定条件下溶液的光密度。Ca²⁺ 将与试剂中的草酸形成沉淀,使溶液混浊并抑制五碳糖的显色。经过一些试验,我们发现,用碳酸钙和 H⁺ 型的阳离子交换树脂处理水解液的办法,可以很方便地将这些物质去除掉。用过量的碳酸钙中和水解液时,一方面,全部有机有色物质将被沉淀或吸附;另一方面, Ca²⁺ 将与 SO₄²⁻ 生成 CaSO₄ 沉淀,大部分 Fe³⁺ 也将呈 Fe(OH)₃ 析出。滤液中存留的 Ca²⁺、Fe³⁺ 及其他可能存在的某些无机阳离子干扰物质,则可在进一步处理时,用阳离子交换树脂除去。这一点可以为表 2 中的材料所证明。从表 2 资料表明,经碳酸钙和阳离子交换树脂处理后的土壤水解液中,已没有足致干扰五碳糖显色的无机物质。

就目前所知的土壤水解液里可能含有的各类有机化合物中,醛虽与苯胺反应,使溶液呈紫色,但在测定条件下,一般在加入苯胺试剂后 10—15 分钟时呈色最深,以后逐渐褪

1) 详见文献[13]。显色在保温箱中进行最为方便,显色时的温度以 20°C 或 25°C 为宜。

表 1 各类物质对五碳糖显色的影响

木 糖 + 硫 酸						
硫酸浓度(N)	0.3		0.01		0.001	
加入木糖量(微克)	40	80	40	80	40	80
测定值(微克)	80	148	42.5	82	42.5	82
木糖(50 微克)+Fe ⁺⁺						
加入 Fe ⁺⁺ 量*(毫升)	1.0		0.5		0.1	
木糖测定值(微克)	65		62		53	
木糖(50 微克)+麸氨酸						
加入麸氨酸量(微克)	250		500		750	
木糖测定值(微克)	50		48		48	
木糖(50 微克)+儿茶酚						
加入儿茶酚量(微克)	25		50		75	
木糖测定值(微克)	52		51		51	

* 0.1N FeSO₄ 溶液, 经 CaCO₃ 处理充分去除 SO₄⁼ 后, 再用少量离子交换树脂处理后所得的溶液。Fe⁺⁺ 未去尽。但仅作定性鉴定, 未定量。

表 2 灼烧土壤的水解液对木糖显色的影响*

加入的木糖量(微克)	10	20	40	60	80
水 解 液 A					
测定值(微克)	10	20	39.2	59.4	80
水 解 液 B					
测定值(微克)	10	19.4	40.8	59.4	80

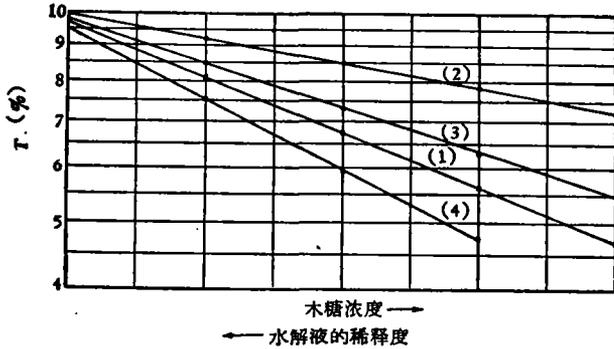
* 红壤, 于 800°C 下灼烧, 去除有机质后水解。水解液按本法处理后, 分别加入不同量的木糖。
水解液 A——1N H₂SO₄, 80°C, 2 小时; 水解液 B——3N H₂SO₄, 80°C, 2 小时。

表 3 土壤水解液中木糖的回收

土 壤	水解液中的五碳糖量 (微克)	加入的木糖量 (微克)	理 论 值 (微克)	测 定 值 (微克)
水 稻 土	16.8	10	26.8	26.8
	16.8	20	36.8	37.0
	16.8	40	56.8	57.0
砖 红 壤	28.0	10	38.0	38.0
	28.0	20	48.0	48.0
	28.0	40	68.0	68.0
草 甸 黑 土	17.0	10	27.0	27.0
	17.0	20	37.0	39.0
	17.0	40	57.0	57.0

去, 1—3 小时后即完全消失, 因此不产生干扰。葡萄糖与半乳糖的干扰在 5% 以下。这和 Tracey^[13] 所得到的结果相近。氨基酸与简单的多酚化合物也不影响五碳糖的显色(表

1)。后二者且绝大部分将被阳离子交换树脂除去。不同稀释度的水解液其透光度完全符合比尔定律(图 2)。同时和有 SO_4^{2-} 、 Fe^{+++} 等干扰物质存在时的情况不同,加不同量的木糖于经预处理后的水解液中,回收结果十分良好(表 3,并与表 1 比较)。由此似乎可以认为,经过碳酸钙和阳离子交换树脂处理后的土壤水解液中,已无足致干扰的物质存在。



(1) 木糖标准溶液 (2) 水稻土水解液
(3) 砖红壤水解液 (4) 草甸黑土水解液

图 2 不同稀释度的土壤水解液的透光度

可以认为,经过碳酸钙和阳离子交换树脂处理后的土壤水解液中,已无足致干扰的物质存在。

五碳糖极易以阳离子交换树脂柱上定量地收回。用碳酸钙处理水解液时,水解液中的硫酸浓度如在 0.8N 以上时,将导致五碳糖的损失。但如硫酸浓度在 0.8N 以下时,五碳糖的回收也是十分良好的(表 4)。

2. 水解条件

在水解过程中包含着游离五碳糖的释出与破坏两个方面。

各种土壤中有机的本性不同,同时有机质与矿质部分的结合状态亦各异,从而,很难期望,在同一水解条件下,各种土壤中五碳糖的释出量均为最大值。因此,有必要寻求一合适的水解条件。图 3 表明,在常用的几种土壤多糖水解条件下,五碳糖的释出量随水解时间的加长而增多,但除 1N H_2SO_4 -80°C 这一水解条件外,8 小时后即趋于稳定。

表 4 碳酸钙处理时溶液中硫酸浓度对木糖回收率的影响

硫酸浓度(N)	木糖(微克)				
	10	20	40	60	80
0.8	100	95	99	100	100
1.6	95	100	92.5	90	85
2.4	100	90	70	78	62

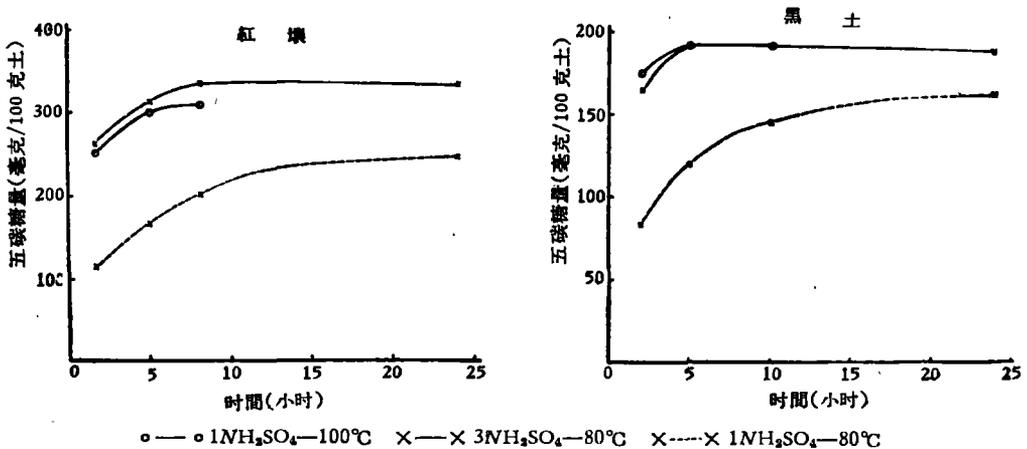


图 3 不同水解条件的五碳糖量

1.0N H₂SO₄—80℃ 下五碳糖释出量恆最低, 3N H₂SO₄—80℃ 下最高, 1.0NH₂SO₄—100℃ 下者与 3N H₂SO₄—80℃ 下者接近或相等。考虑到硫酸浓度增大时水解液稀释度加大后将带来的测定上的困难, 我們认为一般以采用 1.0N H₂SO₄—100℃—8 小时此一水解条件较为适宜。

3. 方法的重現性和准确度 曾作平行重复和前后重复以检查方法的重現性。当水解时土样与硫酸溶液的比率一定时, 各种水解条件的平行重复結果都很一致。前后重复的誤差一般在5%以內(表5)。

表5 方法的重現性(前后重复)
(五碳糖量, 毫克/100克土)

土 壤	水解时间, 小时 3NH ₂ SO ₄ —80℃				水解时间, 小时 1N H ₂ SO ₄ —100℃		
	2	5	8	24	2	5	8
砖 紅 壤	260	310	335	335	240	290	310
	265	315	320	320	250	300	310
草 甸 黑 土	165	190	190	190	180	—	—
	160	180	175	185	175	190	190

如同 Tracey 所指出^[13], 不同五碳糖与苯胺試剂所生成的顏色产物的光密度各不相同。如以木糖的光密度为 100, 則核糖为 88, 阿拉伯糖为 77。因此本法所得的測定值将低于水解液中实际存在的五碳糖量。二者間的差异亦将因各种五碳糖相对含量之不同而异。但是已有的材料指明, 不同土壤中五碳糖的組成可能是相似的^[10,14,15,16], 所以本法仍可得出不同土壤五碳糖总量的近似值。

曾取用几种主要土壤的表土用本法測定其五碳糖量。供試样品中五碳糖碳量占土壤有机碳量的 1.5—8.0% (表6)。值得注意的是, 五碳糖量似乎与腐殖质的組成有关, 随着土壤腐殖质腐殖化程度的增高五碳糖有降低的趋势。但是, 由于分析的土壤样品过少, 目前还远不能就这一点得出結論, 尙有待进一步的研究。

表6 不同土壤表土中的五碳糖含量
(以木糖表示)

土壤及采集地点	有机碳 (%)	五 碳 糖 量 (毫克/100克土)	五碳糖—碳(%) 有机碳
栗鈣土(內蒙古賀兰山北寺)	2.26	137.5	2.44
黑垆土(甘肃通渭)	2.06	77.5	1.50
草甸黑土(黑龙江佳木斯)	3.04	190.0	2.50
水稻土(江苏兴化)	1.00	132.5	5.31
紅壤性水稻土(江西贛县)	0.71	142.5	7.98
紅壤(海南島)	0.90	117.5	5.23
砖紅壤(广东徐聞)	3.52	310.0	3.53

摘 要

叙述了測定土壤中五碳糖的方法。

土壤水解液中的有机有色物质、SO₄⁻、Fe⁺⁺(Fe⁺⁺⁺)、Ca⁺⁺ 等将对五碳糖的測定产生

干扰。但用碳酸钙和阳离子交换树脂处理水解液能够很方便地将所有干扰物质除去。

比较研究各种土壤的五碳糖含量时,以采用 $1N H_2SO_4-100^\circ C-8$ 小时的水解条件较为适宜。

虽然不同五碳糖与苯胺试剂所生成的颜色产物的光密度有所不同,但考虑到各种土壤中五碳糖的组成可能差异不大,所以本法可以得出土壤中五碳糖总量的近似值。

参 考 文 献

- [1] J. P. Martin: Origin and nature of some of the aggregating substances. *Soil Sci.*, 59, 163—174, 1945.
- [2] W. N. Haworth, F. W. Pinkard, M. Stacey: Function of bacterial polysaccharides in the soil. *Nature*, 158, 837, 1946.
- [3] M. J. Geoghegan: Aggregate formation in soil. Influence of some microbial metabolic products and other substances on aggregation of soil particle. 4th Internat. Congr. *Soil Sci.*, 1, 1950.
- [4] F. E. Broadbent, A. G. Norman: Some factors affecting the availability of the organic nitrogen in soil—A preliminary report. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 11, 264—267, 1946.
- [5] F. E. Broadbent: Nitrogen release and carbon loss from soil organic matter during decomposition of added plant residues. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 12, 246—249, 1948.
- [6] S. A. Waksman, K. R. Stevens: A system of proximate analysis of plant materials. *Analy. Chem.*, 2, 167—172, 1930.
- [7] R. H. Brink, Jr., P. Dubach, D. L. Lynch: Measurement of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. *Soil Sci.*, 89, 157—166, 1960.
- [8] D. L. Lynch, E. E. Hearn, L. J. Cotnoir, Jr.: The determination of polyuronides in soils with carbazole. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 21, 160—162, 1957.
- [9] F. J. Stevenson: Investigations of amino polysaccharides in soils: I. *Soil Sci.*, 83, 113—122, 1957.
- [10] D. L. Lynch, H. O. Olney, L. M. Wright: Some sugars and related carbohydrates found in Delaware soils. *J. Sci. Food Agr.*, 1, 56—60, 1958.
- [11] A. H. Brown: Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 11, 269—278, 1946.
- [12] Z. Dische: Spectrophotometric method for the determination of free pentose and pentose in nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 181, 379—403, 1949.
- [13] M. V. Tracey: A colorimetric method for the determination of pentoses in the presence of hexoses and uronic acids. *Biochem. J.*, 47, 433—436, 1950.
- [14] W. G. C. Forsyth: Studies on the more soluble complex of soil organic matter. *Biochem. J.*, 46, 141—146, 1950.
- [15] R. L. Whitler, K. W. Kirby: Composition and behavior of soil polysaccharide. *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 1755—1759, 1956.
- [16] B. Bernier: Characterization of polysaccharide isolated from forest soils. *Biochem. J.*, 70, 590, 1958.

THE DETERMINATION OF PENTOSE IN SOILS WITH ANILINE

C. H. WEN AND L. L. CHEN

(Institute of Soil Science, Academia Sinica)

(ABSTRACT)

The colorimetric aniline method for the determination of pentoses of Tracey^[13] was applied to the hydrolyzates of soil. Experimental tests showed no interfering substances in the color development after the treatment of hydrolyzates with CaCO_3 and cation exchange resin. Equimolar quantities of various pentoses do not give exact equal effects on color development. Since the pattern of pentoses probably is similar in different soils, the aniline method may give an approximate value of the total pentoses content of soils.