

STANISŁAW MUSZYŃSKI

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego — Akademia Rolnicza w Warszawie

JERZY HUCZKOWSKI

Instytut Fizyki Jądrowej w Krakowie

ZASTOSOWANIE ANALIZY AKTYWACYJNEJ DO OCENY ZAWARTOŚCI BIAŁKA W NASIONACH MATERIALÓW HODOWLANYCH

Skuteczność hodowli roślin, mającej na celu zwiększenie zawartości białka, zależna jest w dużym stopniu od możliwości określenia tej cechy w materiałach hodowlanych. Hodowca roślin musi mieć do dyspozycji taką metodę oznaczania zawartości białka, która umożliwi przebadanie bardzo licznych prób materiału roślinnego w stosunkowo krótkim okresie czasu. Właśnie możliwie krótki okres czasu trwania analizy jest szczególnie ważny u zbóż ozimych, u których okres czasu między zbiorem i siewem jest zazwyczaj krótki, a w warunkach niesprzyjających, jak np. lato 1978 roku, bardzo krótki.

Hodowca musi przebadać bardzo liczne materiały hodowlane, rzędu wieluset, a nawet wielu tysięcy prób. Tylko bowiem wczesna eliminacja mało wartościowych materiałów hodowlanych może spowodować poważniejsze skrócenie cyklu hodowlanego i tym samym przyspieszenie uzyskiwania nowych, wartościowych odmian.

Aby można było znacznie skrócić proces hodowli roślin, metoda oznaczania zawartości białka musi również umożliwić analizę stosunkowo niewielkich ilości materiału roślinnego, jakim są najczęściej nasiona. Wiadomo przecież, że we wczesnych etapach hodowli hodowca dysponuje wielką liczbą ale małych liczebnie form hodowlanych (pojemniki i rody). Tak np. w przypadku zbóż powinna istnieć możliwość oznaczenia zawartości białka w kilku, albo nawet w pojedynczych nasionach, ewentualnie metoda analizy powinna nie niszczyć materiału. Hodowca mógłby wtedy odzyskać z powrotem i wysiać nasiona, w których dokonano oznaczenia zawartości białka bez obniżenia siły kiełkowania tych nasion.

Jedyną metodą, spełniającą te warunki, jest metoda analizy aktywacyjnej.

Analiza aktywacyjna polega na działaniu na badaną próbkę odpowiednimi promieniami lub cząstkami jonizującymi, w wyniku czego powstają w tej próbce izotopy promieniotwórcze. Izotopy te ulegają samorzutnemu rozpadowi promieniotwórczemu, emitując z kolei promienio-

wanie jonizujące. Pomiar tego właśnie promieniowania pozwala na ustalenie ilości powstałego izotopu promieniotwórczego, a tym samym pozwala na określenie ilości tego pierwiastka, z którego dany izotop promieniotwórczy powstał. W ostatnich latach metody aktywacyjne znajdują coraz szersze zastosowanie w badaniach biologicznych [12].

W przypadku oznaczania zawartości białka, analiza aktywacyjna podobnie jak metoda Kjeldahla lub Dumasa, polega na określeniu zawartości azotu, a następnie na przeliczeniu zawartości azotu na zawartość białka. Analiza aktywacyjna zawartości azotu wykorzystuje jedną z kilku reakcji, prowadzących do powstania izotopu promieniotwórczego [1, 6]:

- 1) $^{14}\text{N} (n, \gamma) ^{15}\text{N}$
- 2) $^{14}\text{N} (p, d) ^{13}\text{N}$
- 3)* $^{14}\text{N} (d, p) ^{15}\text{N}$
- 4) $^{14}\text{N} (d, \alpha) ^{12}\text{C}$
- 5) $^{14}\text{N} (p, n) ^{14}\text{O}$
- 6) $^{14}\text{N} (n, 2n) ^{13}\text{N}$
- 7) $^{14}\text{N} (\gamma, n) ^{13}\text{N}$

Najczęściej w analizie aktywacyjnej zawartości azotu wykorzystywana jest reakcja 6): $^{14}\text{N} (n, 2n) ^{13}\text{N}$, a znacznie rzadziej reakcja 1): $^{14}\text{N} (n, \gamma) ^{15}\text{N}$; pozostałe reakcje nie znalazły praktycznego zastosowania [2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11].

Izotop promieniotwórczy azotu ^{13}N emituje pozytron, który ulega anihilacji w spotkaniu z elektronem, dając dwa kwanty gamma o energii 0,51 MeV. Półokres rozpadu ^{13}N wynosi $T_{1/2} = 10$ minut. Promieniowanie gamma, emitowane przez ^{13}N , jest stosunkowo łatwe do zmierzenia.

Przy wykorzystaniu reakcji $^{14}\text{N} (2, 2n) ^{13}\text{N}$, czas napromieniowania próby analizowanej wynosi 2 min., po czym następuje 12-minutowe schłodzenie, podczas którego ulega rozpadowi większość izotopów promieniotwórczych, jakie powstały również podczas napromieniowania próby, a zwłaszcza ^{30}P i ^{28}Al , które utrudniają dokładne oznaczenie ^{13}N (tab. 1). Po upływie 12 minut od zakończenia napromieniowania dokonywany jest pomiar promieniowania gamma i określenie ilości powstałego izotopu ^{13}N .

O ile izotopy promieniotwórcze, powstające z zawartego w analizowanej próbce fosforu i krzemu, a więc ^{30}P i ^{28}Al , praktycznie zanikają po upływie 12-minutowego okresu schładzania próby, to zaburzenia spowodowane wytworzeniem ^{38}K wymagają wprowadzenia odpowiedniej poprawki na zawartość potasu w analizowanej próbce. Natomiast tę ilość ^{13}N , jaka powstaje z ^{13}C , eliminuje się podczas pomiarów przez porów-

* Obok izotopów promieniotwórczych, w próbce, poddanej działaniu promieni jonizujących o odpowiednio wysokiej energii, powstają również izotopy stabilne.

nanie z odpowiednim wzorcem [11]. Wymienione utrudnienia powodują, że metodą analizy aktywacyjnej można oznaczać zawartość azotu powyżej 0,5% próby.

Tabela 1

Reakcje jądrowe, mające miejsce podczas stosowania analizy aktywacyjnej do oznaczania azotu w produktach spożywczych [10, 11]

Pierwiastek	Reakcja	Półokres (min,)	Energia kwantów γ (MeV)
N	$^{14}\text{N} (n, 2n) ^{13}\text{N}$	10,0	0,51 (anihilacja)
P	$^{31}\text{P} (n, 2n) ^{30}\text{P}$	2,6	0,51
	$^{31}\text{P} (n, a) ^{28}\text{Al}$	2,3	(anihilacja)
Si	$^{28}\text{Si} (n, p) ^{28}\text{Al}$	2,3	1,78
K	$^{39}\text{K} (n, 2n) ^{38}\text{K}$	7,7	0,51
C	$^{13}\text{C} (p, n) ^{13}\text{N}$	10,0	0,51

Wyniki oznaczania zawartości białka metodą analizy aktywacyjnej są zgodne z wynikami, uzyskanymi metodą Kjeldahla [10, 11]. Statystyczne porównanie danych, uzyskanych obydwiema metodami, dowodzi, że metody te są porównywalne pod względem dokładności (tab. 2). Zastosowanie minikomputera, sprzężonego z detektorem promieni gamma, znacznie ułatwia obliczenia, dzięki czemu otrzymuje się wynik w postaci procentowej zawartości białka w próbce.

Wielką zaletą metody aktywacyjnej jest możliwość jednoczesnego oznaczenia kilku ważniejszych pierwiastków [7]. Tak np. jednoczesne oznaczenie zawartości N, P, K oraz Si dokonywane jest z bardzo dużą dokładnością (tab. 3). Podobnie wysoką dokładność wyników uzyskano przy porównywaniu metody aktywacyjnej z klasycznymi metodami chemicznymi przy oznaczeniu zawartości kilku pierwiastków w nasionach

Równoczesne oznaczenie zawartości siedmiu pierwiastków: N, P, K, Ca, Mg, Cl oraz Si wykazuje również dużą dokładność i powtarzalność wyników przy wielokrotnym powtarzaniu analizy (tab. 5). Tym samym jedno urządzenie do analizy aktywacyjnej może być z powodzeniem wykorzystywane do oznaczania zawartości składników pokarmowych w glebie lub w mieszankach nawozowych (tab. 6).

Opisane wyżej możliwości dowodzą uniwersalności metody analizy aktywacyjnej i wielokierunkowych możliwości jej zastosowanie w badaniach rolniczych, nie ograniczonych do hodowli roślin. Nie ulega jednak wątpliwości, że właśnie zastosowanie tej metody spowoduje prawdziwą rewolucję technologiczną w hodowli roślin.

Kompletne urządzenia do anlizy aktywacyjnej dla celów rolniczych produkowane są przez zakłady „Sames” we Francji przy współpracy z ZSRR, oraz przez zakłady „Kama” w USA.

Tabela 2

Porównawcza analiza zmienności dla metody analizy aktywacyjnej i metody Kjeldahla w oznaczaniu zawartości białka [3]

Źródło zmienności	Analiza aktywacyjna		Metoda Kjeldahla	
	wariancja	udział %	wariancja	udział %
Wykonawca	0	0	0,0052	5,7
Kolejny dzień	0,2104	50,7	0,0301	32,9
Kolejna analiza (błąd)	0,2044	49,3	0,0562	61,4
Ogólna wariancja w obrębie laboratorium	0,4148	100,0	0,0915	100,0
Odchylenie standartowe w obrębie laboratorium	0,64		0,30	
Najmniejsza istotna różnica w obrębie laboratorium	1,785		0,838	
Liczba prób	56		56	
Średni wynik (% białka)	42,3		41,1	
Współczynnik zmienności ^b	1,07		0,58	
Współczynnik zmienności ^c	1,51		0,73	

Uwaga:

^b = na podstawie średniego kwadratu błędu,

^c = jako % średniej.

Tabela 3

Wyniki analizy aktywacyjnej mieszaniny o zawartości 20% N + 6,5% P + 0,8% K + różna zawartość Si [7]

Liczba pomiarów	Średni wynik (%)				Zawartość Si (%)
	N	P	K	Si	
10	1,98	0,51	0,82	0,12	0,1
10	1,99	0,49	0,85	0,25	0,25
10	1,97	0,48	0,85	0,51	0,50
15	1,98	0,49	0,84	1,01	1,00
10	1,96	0,46	0,87	2,08	2,00
20	2,01	0,45	0,95	3,10	3,00
10	1,84	—	1,40	4,99	5,00

Tabela 4

Porównanie analizy aktywacyjnej z metodami klasycznymi przy analizie nasion [7]

Próba	N ⁰ %		P ⁰ %		K ⁰ %	
	AA	Ch	AA	Ch	AA	Ch
Owies	2,02	2,02	0,46	0,43	0,56	0,51
Jęczmień	1,95	1,94	0,40	0,39	0,45	0,43
Pszenica	1,85	1,78	0,33	0,34	0,40	0,41
Kukurydza	1,64	1,62	0,38	0,37	0,35	0,39
Groch	3,21	3,11	0,36	0,38	0,96	0,00

Uwaga: AA = analiza aktywacyjna, Ch = metody chemiczne.

Tabela 5

Wyniki analizy aktywacyjnej jarmużu Bowen (rośliny wzorcowej dla porównywania metod analizy zawartości składników [wg. 7])

Pierwiastek (‰)	N	P	K	Ca	Mg	Cl	Si
Średnia z 20 pomiarów	4,29	0,44	2,70	3,8	0,15	0,32	0,04
Odchylenie standart. ‰	2,0	7,7	3,6	10,8	12,6	11,8	15,0
Najlepszy wynik dla standardu	4,32	0,45	2,50	4,0	0,16	0,34	0,02

Tabela 6

Wyniki analizy aktywacyjnej mieszanek nawozowych (wg. Srapenyantsa 1977)

Zawartość procentowa w mieszance							
Azotan amonu		Superfosfat		Chlorek potasu		Suma	
AA	Ch	AA	Ch	AA	Ch	AA	Ch
33,2	33,3	32,8	33,3	32,5	33,3	98,5	100
25,5	25,0	50,3	50,0	24,7	25,0	100,5	100
81,0	80,0	9,9	10,0	9,8	10,0	100,7	100
50,6	50,0	24,8	25,0	25,1	25,0	100,5	100
14,7	14,3	59,1	57,2	28,5	28,5	102,3	100
66,5	66,6	16,8	16,6	16,6	16,3	99,6	100

Uwaga: AA = metoda aktywacyjna, Ch = zawartość znana.

Trzeba podkreślić fakt podjęcia w Polsce próby skonstruowania podobnego urządzenia, wykorzystującego cyklotron Instytutu Fizyki Jądrowej w Krakowie [4]. Wydaje się jednak, że potrzeby rolnictwa, a zwłaszcza nowoczesnej hodowli roślin są tak duże, że już w chwili obecnej istnieje pilna potrzeba zakupu takich urządzeń, które zostałyby zainstalowane w najważniejszych ośrodkach naukowych rolniczych, co umożliwi łatwy dostęp dla hodowców z pobliskich stacji hodowlanych. Jest to nieodzownym warunkiem zapewnienia hodowli roślin takich samych możliwości technologicznych, jakimi dysponują kraje przodujące, jeśli chcemy poważnie myśleć o rezygnacji z importu odmian obcych. Wiadomo bowiem, że tylko odmiany własne, dysponujące maksymalną zdolnością przystosowawczą do naszych warunków glebowych i klimatycznych, mogą zapewnić nie tylko wysokie, ale i wierne plony.

LITERATURA

1. Dohan D. A., Standing K. G., Bushuk W.: A new method of analysis of protein content in grain by proton activation. *Cereal Chemistry* 53:91—100, 1976.
2. Doty W. H., Wood D. E., Schneider E. L.: Neutron activation analysis of nitrogen in feedstuffs. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 52:953—956, 1969.
3. Doty W. H., Munson A. W., Wood D. E., Schneider E. L.: Comparative analysis of variance of the Kjeldahl nitrogen and a neutron activation nitrogen technique. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 53:801—803, 1970.
4. Huczkowski J., Krasnowolski S., Łazarska B., Próchnicka A., Wojciechowski H.: Application of the cyclotron for determination of protein content in the seeds of cereals. *IAEA Proceedings, Vienna 1976*.
5. Kosta L., Ravnik V., Dumanovic J.: Determination of nitrogen in plant seeds by fast neutron activation analysis. *IAEA Proceedings, Vienna 1969*.
6. Niemann E. G., Neumüller D.: Determination of seed nitrogen content by ^{14}N (γ, n) ^{13}N activation analysis. *IAEA Proceedings Vienna 1975*.
7. Srapenyants R. A., Saveliev I. B.: Multielement neutron-activation analysis of plants and fertilizers. *Journal of Radioanalytical Chemistry* 38: 247—255, 1977.
8. Tiwari P. N.: Rapid and non-destructive determination of protein in grain samples by prompt (n, γ) technique. *Radiochemical and Radioanalytical Letters* 6:363—370, 1971.
9. Tiwari P. N., Larsson B., Bergman R.: Determination of nitrogen in organic materials by prompt (n, γ) technique. *International Journal for Application of Radiations and Isotopes*. 22:587—592, 1971.
10. Wood D. E.: Protein determination by neutron activation analysis. *Third Natl. Feed Prod. School, Kansas City 1969*.
11. Wood D. E.: Protein determination by neutron activation analysis. *Isotopes and Radiation Technology* 9:351—353, 1972.
12. Zbiorowe: Primienienije aktiwacjonnoho analiza w biologii i medicinie. *Me-cnijereba, Tbilisi, 1977*.