

УДК :663.252.4

**МЕТОДОЛОГИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ФОСФОРА  
И АЗОТА В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ**

Якуба Юрий Федорович  
канд. техн. наук, доцент

Сула Роман Алексеевич  
канд. техн. наук

Филимонов Михаил Васильевич

*Государственное научное учреждение  
Северо-Кавказский зональный научно-  
исследовательский институт  
садоводства и виноградарства  
Россельхозакадемии, Краснодар, Россия*

Рассмотрены возможности и новые методические решения определения общего фосфора и азота в растительном сырье с помощью капиллярного электрофореза и атомной эмиссии. Обсуждены действующие методические подходы к проведению процесса подготовки растительных образцов к анализу.

*Ключевые слова:* РАСТИТЕЛЬНЫЕ  
ОБРАЗЦЫ, АНАЛИЗ, ЭЛЕКТРОФОРЕЗ,  
ФОСФОР, АЗОТ, ЭМИССИЯ

UDC :663.252.4

**METODOLOGY OF QUANTITATIVE  
DETERMINATION OF TOTAL  
PHOSPHORUS AND NITROGEN  
IN THE PLANT RAW MATERIAL**

Yakuba Yuriy  
Cand. Tech. Sci., Docent

Sula Roman  
Cand. Tech. Sci.

Filimonov Michael

*State Scientific Organization North  
Caucasian Regional Research Institute  
of Horticulture and Viticulture  
of the Russian Academy of Agricultural  
Sciences, Krasnodar, Russia*

Possibilities and new methodical decisions of determination of the analysis of total phosphorus and nitrogen in the plant raw material by means of capillary electrophoresis and atomic emission are considered. The existing methodical approaches to the preparation of plant samples to analysis are discussed.

*Key words:* PLANT SAMPLES,  
ANALYSIS, ELECTROPHORESIS,  
PHOSPHORUS, NITROGEN, EMISSION

**Введение.** Продуктивность плодовых культур и винограда формируется в прямой зависимости от наличия фосфорных и азотных удобрений. Сложность взаимодействия растительного организма с окружающей средой, в частности обеспеченность фосфором и азотом и их роль в обменных процессах организмов, свидетельствует о нерешенности многих задач, связанных с данной проблемой.

Фосфор и азот играют исключительно важную роль в процессах обмена энергии растительных организмов. Обмен энергии и веществ в растениях нарушается при недостатке фосфора в тканях. Особенно резко дефи-

цит фосфора у всех растений сказывается на образовании репродуктивных органов. Его недостаток тормозит развитие и задерживает созревание, вызывает снижение урожая и ухудшение качества продукции.

Основное накопление азота в растениях заключается в запасе аминокислот и белков, особенно это заметно для зерновых и бобовых культур. Содержание белкового азота в плодовых культурах значительно меньше, и переизбыток азотных удобрений почти не сказывается на его накоплении в плодах, в отличие от ягодных культур, в первую очередь бахчевых, где избыточное содержание нитратного и гораздо более опасного – нитритного азота часто приводит к пищевым отравлениям.

Признаки недостатка фосфора проявляются уже на начальных стадиях развития растений, когда они имеют слаборазвитую корневую систему и не способны усваивать труднорастворимые фосфаты почвы (А.К. Приймак, С.Ф. Неговелов, Ю.В. Трунов, В.П. Попова) [1]. На долю фосфора приходится около 1 % сухого вещества растений и плодов, источником фосфора служат неорганические соединения. Усиленное снабжение растений фосфором и азотом ускоряет их развитие и позволяет получать более ранний урожай, одновременно улучшается качество продукции.

Благодаря буферным свойствам соли фосфорной кислоты регулируют также кислотность содержимого клетки, поддерживая ее на благоприятном уровне. Фосфор особенно необходим в ранние периоды жизни растений. При отсутствии его в начале жизни и при последующей подкормке фосфорными солями листья растений некоторое время страдают из-за усиленного поступления фосфора и нарушенного в связи с этим азотного обмена.

Существующие в мире методы определения общего фосфора условно можно разделить на две группы – классические химические и инструментальные, причем в массовом анализе преобладают классические химические испытания. Сущность всех методов определения общего фосфора заключается в разрушении органического (минерального) вещества с по-

следующим переводом в раствор в виде фосфат-иона и выполнением количественного анализа.

Применяют различные физико-химические методы определения общего фосфора: спектральные, атомно-адсорбционный (в том числе эмиссионный), люминесцентный, ЯМР, радио-активационный (с использованием изотопов вольфрама 188; фосфора 32; таллия 204) и др. Для отделения фосфора от мешающих элементов чаще всего используют экстракционные методы или бумажную хроматографию. Традиционно широко распространены фотоколориметрические методы (фосфорномолибденовая гетерополикислота, оксихинолин), весовой метод (молибдат аммония и др.), титриметрический фосфоромолибдатный метод [2].

Определение общего азота основано на окислении органических форм, содержащих азот, и последующего их анализа. Для анализа применяют многочисленные модификации химических методов определения азота по Кьелдалю и Дюма, азотные (CHN) анализаторы, хроматографические, спектрофотометрические и другие методы [2].

Несмотря на всю значимость количественного определения общего фосфора и азота в био- и агроценозах, как и в плодах, винограде и продуктах их переработки, существующие методы анализа не обеспечивают требуемую точность (часто зависящую от чистоты реактивов), не отвечают требованиям экологии и защиты окружающей среды, либо требуют значительных затрат для массового диагностического анализа.

Кроме того, сложный состав матрицы биообъектов оказывает существенное влияние на точность измерений общего фосфора и азота в случае анализа без пробоподготовки, что неприемлемо. Например, при определении общего фосфора пробу растительного сырья кипятят в смеси серной и хлорной кислот в течение нескольких часов, охлаждают, регулируют кислотность и анализируют [2]. Для определения общего азота органическое вещество окисляют кипящей серной кислотой с добавкой сернокислого ка-

лия и катализаторов металлического селена и сернокислой меди, смесью хромовой кислоты с серной и т.д.

Для определения в пробах воды фосфат, нитрат-ионов и некоторых других известна следующая методика капиллярного электрофореза: водный раствор ведущего электролита – 0,05 М оксид хрома, 0,1 М диэтанолламин, 0,01 М гексадецилтриметиламмоний гидроксид (ЦТА-ОН), 0,025 М глюконат кальция; отрицательное напряжение 17 кВ, длина волны детектирования 254 нм, эффективная длина капилляра 0,5 м, внутренний диаметр 75 мкм.

Установлено, что нейтральные органические соединения не мешают определению, допускается присутствие до 10 мг/дм<sup>3</sup> двухосновных органических кислот и до 3 мг/дм<sup>3</sup> перхлорат и формиат-ионов. Диапазон измеряемых концентраций анионов составляет 5-50 мг/дм<sup>3</sup>, кислотность анализируемой среды регулируется аммиаком, либо уксусной кислотой [3].

**Обсуждение результатов.** Литературные данные [4, 5] позволили предложить для реализации капиллярно-электрофоретической методики ведущий электролит, содержащий бихромат, хромат-ион, дипиколиновую кислоту – ДПК (обеспечение регистрации компонентов), уротропин, диэтанолламин, тетраметиленамин - ТЕМЕД, этилендиуксусная кислота - ЭДДК – модификаторы электролита, обеспечивающие разделение компонентов. Для эмиссионного определения общего фосфора был использован атомный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой OPTIMA-2100DV.

В результате исследований модельных и калибровочных растворов, с учетом наличия мешающих анионов, подобраны два состава электролита для определения фосфат-ионов методом капиллярного электрофореза. Оптимизированы условия эмиссионного определения.

Анализ выполняли на системе капиллярного электрофореза в кварцевом капилляре эффективной длиной 0,5 м, внутренним диаметром

75 мкм. Использовали водный раствор ведущего электролита, содержащий 0,2 % хромата калия и 0,6 % уротропина при отрицательной полярности напряжения и длине волны детектирования 254 нм. Линейный диапазон измерений – 5-500 мг/дм<sup>3</sup>. Влияние соотношения компонентов электролита на подвижность фосфат-иона показано на рис. 1.

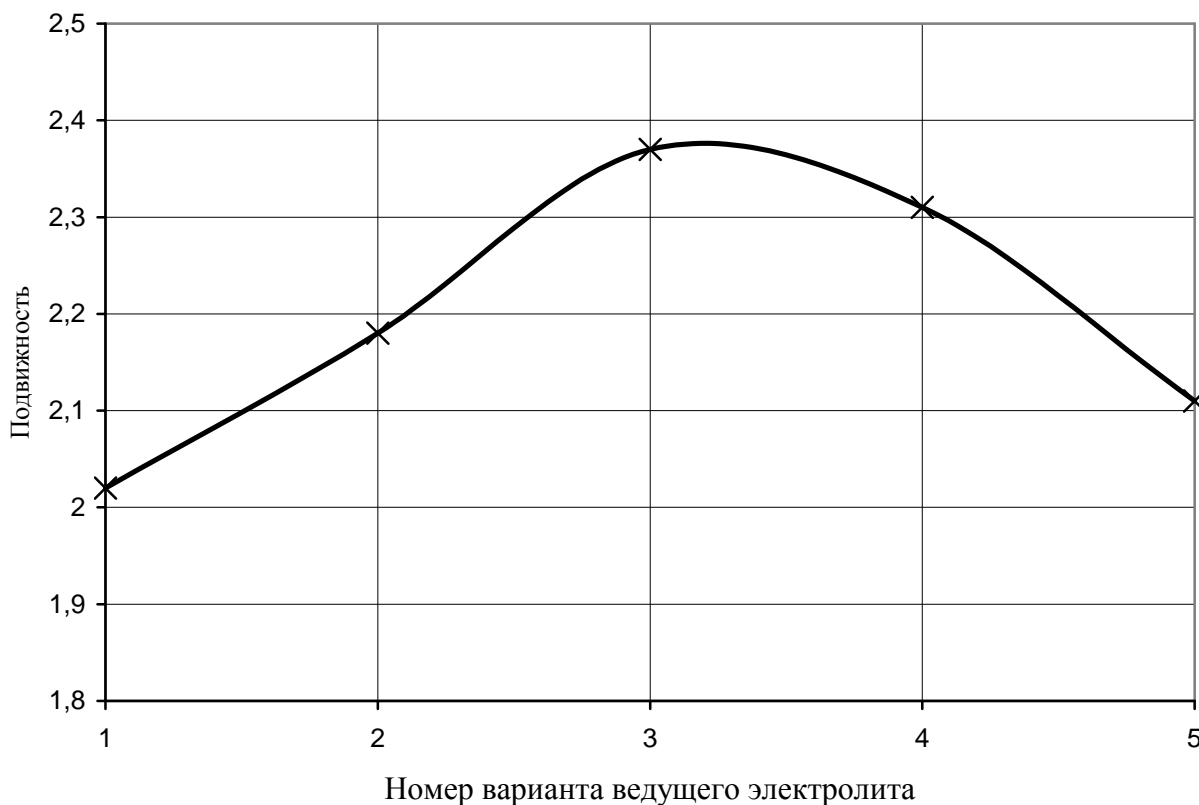


Рис. 1. Подвижность фосфат-иона ( $\times 10^{-4}$ ),  $\text{см}^2 / (\text{В} \cdot \text{с})$  в зависимости от соотношения составляющих электролита, отрицательное напряжение 16кВ  
 1 – 0,2 % хромата калия и 0,3 % уротропина; 2 – 0,2 % хромата калия и 0,4 % уротропина; 3 – 0,2 % хромата калия и 0,6 % уротропина;  
 4 – 0,2 % хромата калия и 0,8 % уротропина; 5 – 0,4 % хромата калия и 0,6 % уротропина

Данные рис. 1 показали, что увеличение содержания уротропина до 0,6 % обеспечивает возрастание электрофоретической подвижности фосфат-иона и его определение при наличии избытка сульфат и нитрат-ионов. Увеличение концентрации хромата калия до 0,4 % ухудшает условия раз-

деления, в первую очередь, за счет резкого возрастания тока и увеличения тепловых шумов в капилляре. Рекомендуется термостатирование капилляра при +24 °С; ввод пробы – пневматический – 30 мБар в течение 5 секунд.

Определение концентраций фосфат-иона в диапазоне 1-100 мг/дм<sup>3</sup> выполняли на системе капиллярного электрофореза в кварцевом капилляре эффективной длиной 0,5 м, внутренним диаметром 75 мкм, использовали водный раствор ведущего электролита, содержащий 0,11 % дипиколиновой кислоты, 1,01 % тетраметиленамина, 0,09 % этилендиуксусной кислоты, смешанных в объемных соотношениях 8:1:1, при отрицательной полярности напряжения и длине волны детектирования 254 нм. Влияние концентраций компонентов электролита на подвижность фосфат-иона показано на рис. 2.

Данные рис. 2 показали, что увеличение содержания дипиколиновой кислоты до 0,11 % обеспечивает возрастание электрофоретической подвижности фосфат-иона и его определение при наличии избытка сульфат и нитрат-ионов. Рекомендуется термостатирование капилляра при +26 °С; ввод пробы – пневматический – 30 мБар в течение 5 секунд.

Пробоподготовку для определения общего фосфора осуществляли термическим окислением и СВЧ-разложением [6, 7]. При реализации термического разложения пробу растительного сырья массой 1 г помещали в стакан объемом 50 см<sup>3</sup>, добавляли 10 см<sup>3</sup> 30 %-ной азотной кислоты, переносили в вытяжной шкаф и медленно нагревали на плитке до кипения, не допуская вспенивания и разбрызгивания.

Процесс кипячения вели до полного растворения пробы и прекращения активного выделения окислов азота. После этого нагрев прекращали и пробу охлаждали в естественных условиях. В данных условиях термического кислотного разложения все формы соединений фосфора в биологических объектах разрушаются и переходят под действием азотной кислоты в фосфорную кислоту (фосфат-ион).

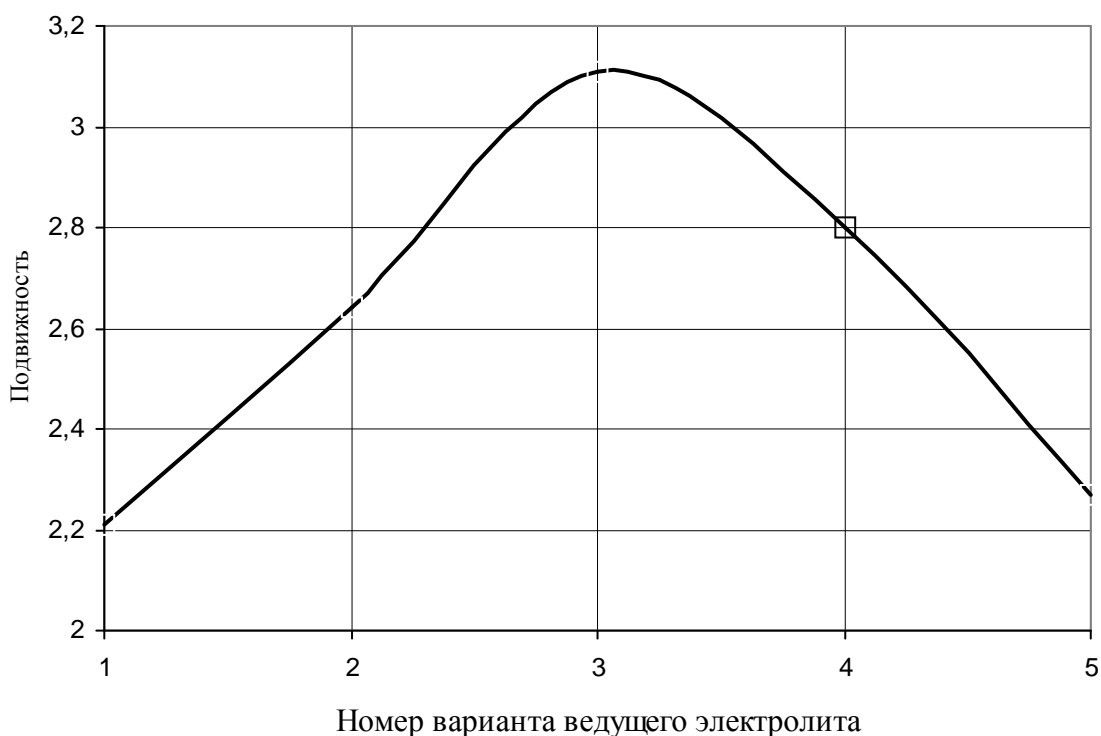


Рис. 2. Подвижность фосфат-иона ( $\times 10^{-4}$ ),  $\text{см}^2 / (\text{В} \cdot \text{с})$  в зависимости от концентраций составляющих электролита, отрицательное напряжение 23 кВ; 1 – 0,03 % дипиколиновой кислоты, 0,3 % тетраметиленамина, 0,03 % этилендиуксусной кислоты; 2 – 0,06 % дипиколиновой кислоты, 0,5 % тетраметиленамина, 0,05 % этилендиуксусной кислоты; 3 – 0,11 % дипиколиновой кислоты, 1,01 % тетраметиленамина, 0,09 % этилендиуксусной кислоты; 4 – 0,15 % дипиколиновой кислоты, 1,5% тетраметиленамина, 0,2 % этилендиуксусной кислоты; 5 – 0,18 % дипиколиновой кислоты, 1,8 % тетраметиленамина, 0,12 % этилендиуксусной кислоты

Содержимое стакана после термического кислотного разложения количественно переносили в мерную колбу объемом  $25 \text{ см}^3$  и доводили до метки дистиллированной водой, перемешивали, отбирали  $5 \text{ см}^3$  и переносили в чашку для выпаривания. Содержимое чашки в вытяжном шкафу выпаривали до состояния влажных солей, добавляли  $5 \text{ см}^3$  дистиллированной воды, растворяли пробу, фильтровали, центрифугировали и переносили для анализа в систему капиллярного электрофореза или в атомный спектрометр. Суммарное разбавление исходной пробы – 25 раз, что учитывали в количественных расчетах.

СВЧ-разложение пробы растительного сырья осуществляли с использованием минерализатора Минотавр. Навеску массой  $0,500 \pm 0,001$  г помещали в контейнер минерализатора, добавляли  $25 \text{ см}^3$  30 %-ной азотной кислоты, проводили разложение без давления 10 мин, затем под давлением в течение 10 мин, далее осуществляли выпаривание пробы до состояния влажных солей. Содержимое контейнера количественно переносили в мерную колбу  $25 \text{ см}^3$  и использовали для анализа. В расчетах учитывали 50-ти кратное разбавление пробы. Пример электрофореграммы определения общего фосфора в пробе комбикорма с использованием электролита хромат-уротропин показан на рис. 3.

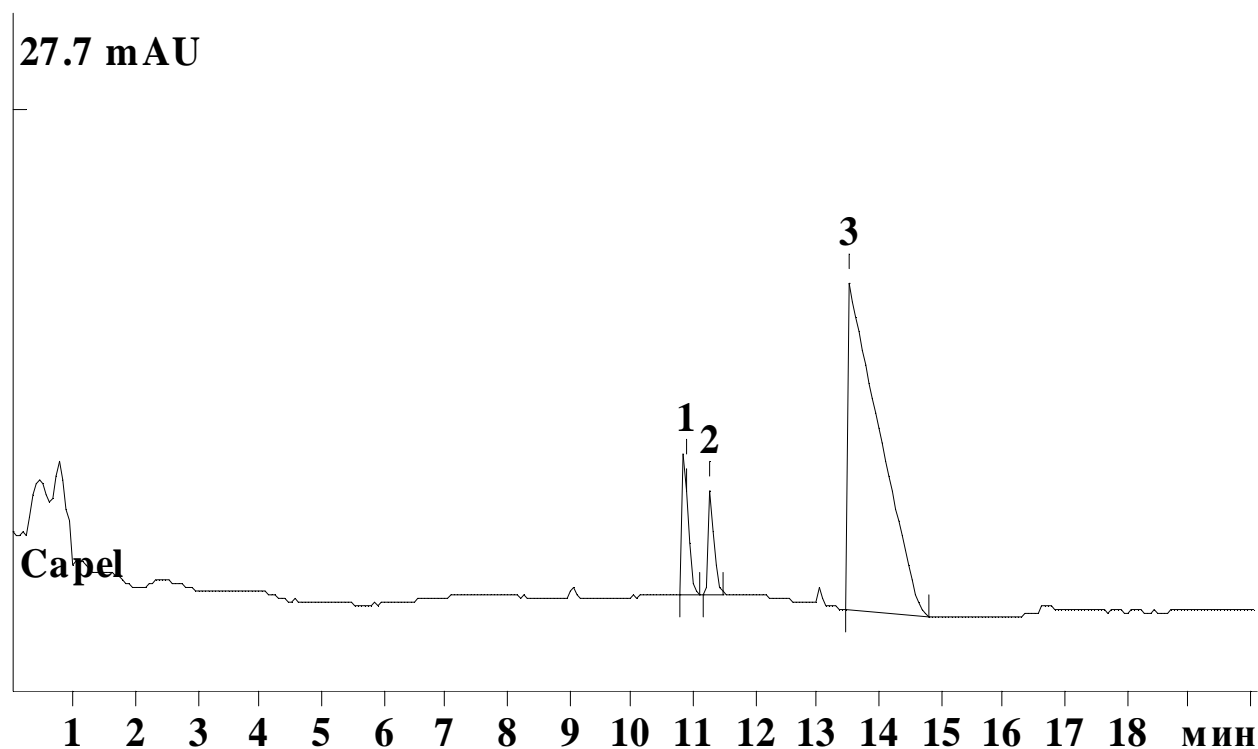


Рис. 3. Электрофореграмма определения общего фосфора в подготовленной пробе комбикорма на системе капиллярного электрофореза «Капель-104РТ» пики № 1, 2 – нитрат и сульфат ионы, пик № 3 – фосфат-ион

Полученные результаты количественного определения общего фосфора с использованием электролитов разного состава отражены в таблице.



Результаты определения общего фосфора в исследуемых объектах с использованием различных модификаций электролита, мг/кг

Образец	Электролит хромат калия-уротропин	Электролит ДПК-ТЕМЕД-ЭДДК
Комбикорм	360	340
Листья груши	240	210
Вино сухое	88	89
Бренди	6,4	6,7
Яблочной пюре	190	180
Орех грецкий	170	190

Анализ полученных данных показал, что искажение результатов определения общего фосфора в изучаемых пробах практически не происходит. В связи с этим предложена следующая схема проведения анализа определения общего фосфора в пробах растительного сырья (рис.4).

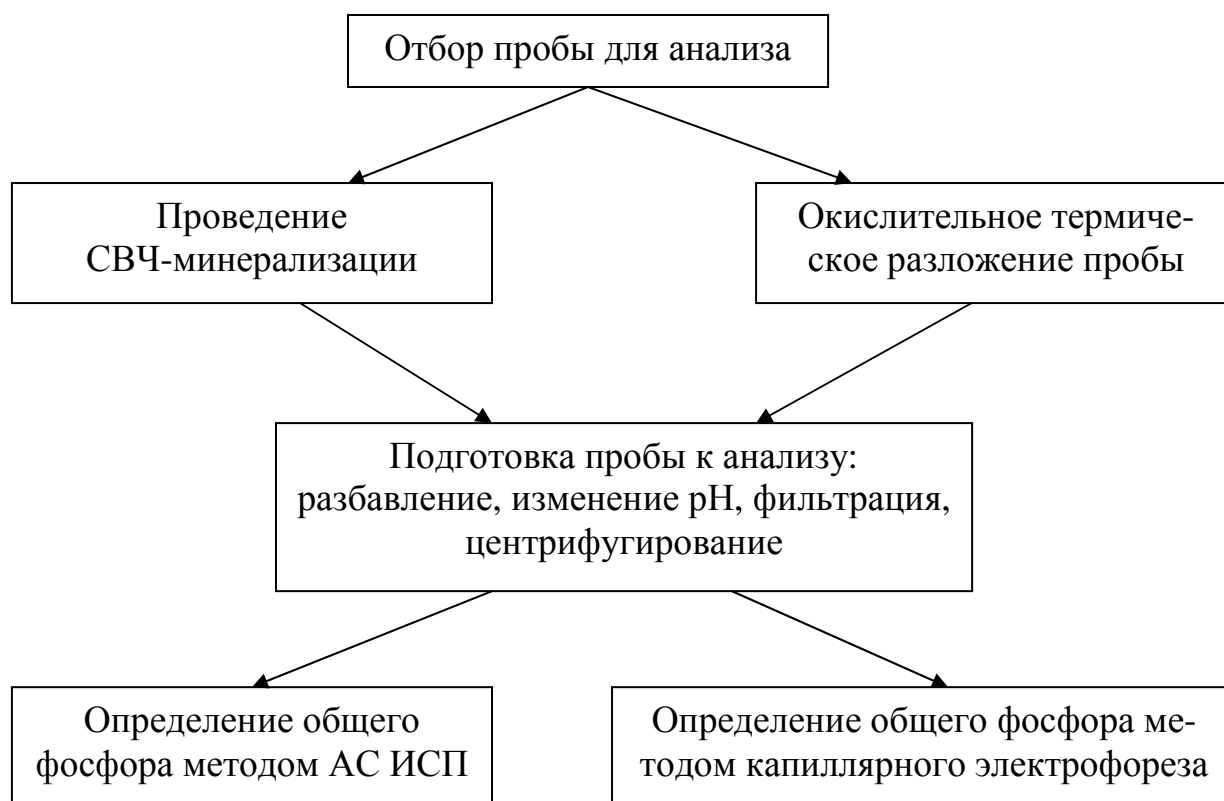


Рис. 4. Порядок определения общего фосфора в растительном сырье

**Выводы.** Разработанные варианты анализа содержания общего фосфора в растительных образцах методом капиллярного электрофореза требуют разбавления проб в несколько раз. При этом исключается влияние мешающих анионов (хлоридов, нитратов, сульфатов, перхлоратов и т.д.), водный раствор ведущего электролита стабилен во времени и не загрязняет внутреннюю поверхность капилляра. Количественные результаты определения массовой концентрации общего фосфора сравнимы по своему качеству с эмиссионным методом анализа.

Проведение окислительной пробоподготовки и СВЧ-разложения позволяет достичь экспрессности, высокого качества и соответствующей точности определения общего фосфора и азота в изучаемых образцах и устранить влияние других анионов на сам ход анализа. По результатам исследований подана заявка на патент РФ «Способ определения общего фосфора методом капиллярного электрофореза».

### Литература

1. Попова, В.П. Система оптимизации пищевого и водного режимов плодовых ценозов / В.П. Попова, Н.Н. Сергеева, Т.Г. Фоменко [и др.] // Разработки, формирующие современный облик садоводства. Монография. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2011. – С. 166-200.
2. Агрохимические методы исследования почв / Под ред. А.В. Соколова. – М.: Наука, 1975. – 656 с.
3. Методика М 01-30-2003. Методика выполнения измерения массовых концентраций хлорид-ионов, нитрит-ионов, сульфат-ионов, нитрат-ионов, фторид-ионов и фосфат-ионов в пробах природных, питьевых и очищенных сточных вод с применением системы капиллярного электрофореза «Капель». – СПб., 2003. – 34 с.
4. Беленький, Б.Г. Высокоэффективный капиллярный электрофорез / Б.Г. Беленький. – СПб.: Наука, 2009. – 320 с.
5. Руководство по капиллярному электрофорезу. – М.: ЦНИИТЭИ Тракторсельмаш, 1996. – 231 с.
6. Захарова, М.В. Методика проведения экстракционной пробоподготовки растительных объектов на СВЧ-минерализаторе «Минотавр-1» / М.В. Захарова, Г.К. Киселева, Г.В. Лифарь [и др.] // Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2010. – С.275-279.
7. Причко, Т.Г. Подготовка плодово-ягодного сырья для определения минерального состава на приборе «Капель-103» / Т.Г. Причко, Л.Д. Чалая, Ю.Ф. Якуба // Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2010. – С. 268-270.