

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 543.422.7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТА В ПОЧВЕ МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ ЦВЕТОМЕТРИИ**Андрей Владимирович Гармай, Оксана Викторовна Моногарова,
Кирилл Владимирович Осколок, Павел Михайлович Радзиковицкий**

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии

Автор, ответственный за переписку: Андрей Владимирович Гармай,
andrew-garmay@yandex.ru

Аннотация. Предложен способ определения нитрата в почве методом цифровой цветометрии. Разработанный подход основан на фотометрических способах определения нитратов после извлечения хлористым калием из образцов почв. Для достижения более высокой чувствительности и точности цветометрического определения модифицирована оригинальная методика определения нитрата в виде азокрасителя – продукта реакции азосочетания 1-нафтиламина и сульфаниламида. Этот подход обеспечивает метрологические характеристики цифровой цветометрической методики, близкие к спектрофотометрическим. Адекватность предложенного способа подтверждена при анализе стандартных образцов и проб почвы, собранных в районах Московской области.

Ключевые слова: нитрат, почва, цифровая цветометрия, офисный планшетный фотосканер

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2025-66-1-52-59

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова АААА-А21-121011590089-1 «Развитие высокоинформативных и высокотехнологичных методов химического анализа для защиты экосистем, создания новых материалов и передовых производственных технологий, перехода к экологически чистой и ресурсосберегающей энергетике, развития природоподобных технологий, высокотехнологичного здравоохранения и рационального природопользования».

Для цитирования: Гармай А.В., Моногарова О.В., Осколок К.В., Радзиковицкий П.М. Определение нитрата в почве методом цифровой цветометрии // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2025. Т. 66. № 1. С. 52–59.

ORIGINAL ARTICLE

DETERMINATION OF NITRATE IN SOILS BY DIGITAL COLORIMETRY**Andrei V. Garmay, Oksana V. Monogarova, Kirill V. Oskolok,
Pavel M. Radzikovitskiy**Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry,
Division of Analytical Chemistry, Moscow, Russia**Corresponding author:** Andrey V. Garmay, andrew-garmay@yandex.ru

Abstract. A method for determining nitrate in soil by digital colorimetry is proposed. The developed approach is based on appropriate photometric techniques of nitrate determination after potassium chloride extraction from soil samples. The original method of determining nitrate in the form of an azo dye formed by the azo coupling reaction between 1-naphtylamine and sulfanilamide has been modified to achieve a higher sensitivity and accuracy of colorimetric determination. This approach ensures metrological characteristics of the digital colorimetric technique, close to spectrophotometric. The adequacy of the proposed method was confirmed by analyzing standard samples and soil samples collected in districts of the Moscow region.

Keywords: nitrate, soil, digital colorimetry, office flatbed photoscanner

Financial Support. The work was carried out within the framework of the state task of the Lomonosov Moscow State University AAAA-A21-121011590089-1 “Development of highly informative and high-tech methods of chemical analysis for the protection of ecosystems, the creation of new materials and advanced production technologies, the transition to environmentally friendly and resource-saving energy, the development of nature-like technologies, high-tech healthcare and rational nature management”.

For citation: Garmay A.V., Monogarova O.V., Oskolok K.V., Radzikovitskiy P.M. Determination of nitrate in soils by digital colorimetry // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2025. T. 66. № 1. S. 52–59.

Азот – жизненно важный элемент для роста растений и сельскохозяйственных культур [1–3]. Естественное содержание азота в почве, как правило, недостаточно для обеспечения высокой продуктивности [4], поэтому во всем мире используют азотные удобрения [2, 4]. Существенная часть азота теряется из-за выщелачивания [5, 6], потери могут варьироваться от 10 до 75% [7]. Это приводит к экологическим проблемам, таким как загрязнение вод или образование парниковых газов, а также вызывает снижение экономической эффективности сельского хозяйства [4, 6–7]. По этим причинам определение содержания нитратов в почвах имеет большое значение.

Для определения нитратов применяют различные методы: паровую дистилляцию по методу Кьельдаля, ионную хроматографию, ионометрию и спектрофотометрию [7]. Метод Кьельдаля довольно опасный, длительный и трудоемкий, так как анализ одного образца занимает несколько часов [8]. При использовании ионной хроматографии и ионометрии исследователи сталкиваются с проблемой сильного влияния мешающих ионов [7]. Фотометрические методы являются одними из наиболее распространенных для определения нитратов [9]. Нитраты часто определяют методом диазотирования после восстановления до нитритов [9–10]. Эти методы приняты в качестве нормативных государственных стандартов в некоторых странах (США [11],

Российская Федерация [12] и др.). Однако и у спектрофотометрии есть свои недостатки, одним из которых является более высокая стоимость оборудования по сравнению с ионоселективными электродами [7]. Другая проблема – определение нитратов в полевых условиях [13]. В этих целях разработаны портативные колориметры, которые, однако, довольно дороги и обычно используются только в исследовательских целях [7].

Одним из перспективных решений перечисленных проблем является применение метода цифровой цветометрии [14–15]. Поскольку для измерения аналитического сигнала используются бытовые оптические гаджеты, например камеры смартфонов и офисные планшетные сканеры, стоимость анализа определяется фактически ценой реактивов и посуды [16]. Экспрессность цветометрического метода можно повысить при использовании многолуночных микропланшетов, позволяющих одновременно проводить измерения аналитического сигнала нескольких десятков растворов с минимальным расходом реактивов [14], что позволяет дополнительно снизить общую стоимость анализа [16]. Наконец, цифровой цветометрический анализ на основе смартфона можно применять в полевых условиях, что позволяет проводить анализы с точностью, близкой к спектрофотометрическому методу, при значительно меньших затратах [14].

Цель настоящей работы – оптимизация оригинальной спектрофотометрической методики

определения нитратов в почве для метода цифровой цветометрии.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы. В работе использованы следующие реагенты: хлорид калия, гидроксид натрия, пиррофосфат натрия декагидрат, этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль дегидрат (ЭДТА), пентагидрат сульфата меди(II), гидразин сульфат, 1-нафтиламин, сульфаниламид, 85%-й водный раствор фосфорной кислоты. Все реактивы производства Sigma-Aldrich, США. Для определения уровня рассеянного излучения использовали черную тушь (АО «ГАММА», Российская Федерация).

Оборудование и вспомогательные материалы для цветометрического анализа: офисный планшетный фотосканер EPSON Perfection 1670 (Япония), 96-луночный микропланшет из прозрачного полистирола (Greiner AG, Австрия) с плоским дном (емкость лунки 350 мкл), целлюлозная фильтровальная бумага Whatman (Cytiva, США), белые полипропиленовые наконечники емкостью 10 мкл для механической пипетки BioHit (Китай), лабораторный шейкер «ЛОИП ЛС-120» (ОАО «Лабора-

торное оборудование и приборы», Российская Федерация).

Спектры поглощения растворов в видимом диапазоне длин волн измеряли на однолучевом спектрофотометре UV-mini 1240 (Shimadzu, Япония) в стандартных кюветах из полистирола толщиной 1 см.

Извлечение селитры из образцов почвы. Почвенные экстракты готовили в соответствии с известными методиками [12]. В коническую колбу помещали $16,00 \pm 0,01$ г грунта, затем добавляли 40,0 мл 2 М раствора хлорида калия. Суспензию встряхивали на лабораторном шейкере «ЛОИП ЛС-120» в течение 1 ч и отфильтровывали. На первом этапе методом цифровой цветометрии проанализированы стандартные образцы дерново-подзолистых среднесуглинистых и карбонатных глубокоземных почв. С февраля 2022 г. по май 2023 г. было проанализировано около 50 проб. Образцы почв были собраны в Московской области.

Приготовление растворов. Поскольку для анализа требуется всего несколько миллилитров окрашивающего раствора, объемы анализируемых растворов и реагентов уменьшены в 10 раз по сравнению с исходной методикой

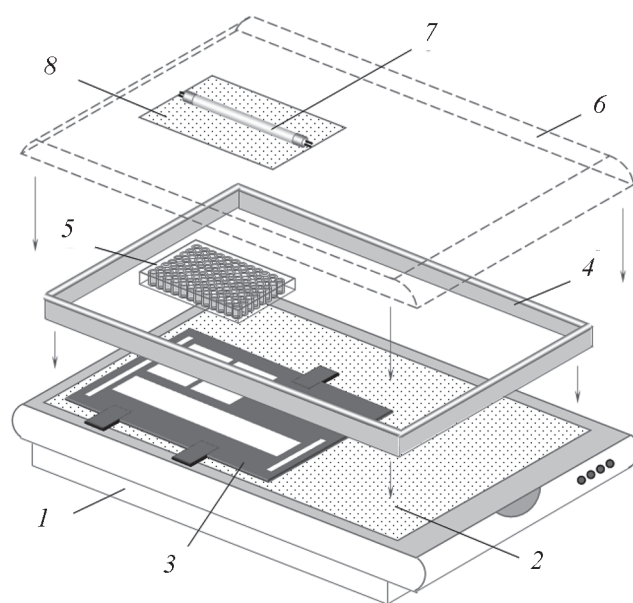


Рис. 1. Схема экспериментальной установки на основе офисного планшетного фотосканера для проведения анализа методом цифровой цветометрии: 1 – корпус фотосканера, 2 – стеклянная столешница, 3 – слайд-адаптер, 4 – защитная рамка, 5 – 96-луночный микропланшет, 6 – крышка фотосканера, 7 – электролюминесцентная лампа, 8 – диффузор

[12]. В колбу емкостью 5,0 мл добавляли 0,500 мл анализируемого раствора, смешивали с 1,00 мл раствора пирофосфата натрия и 1,00 мл раствора гидразина сульфата. Раствор пирофосфата натрия готовили растворением $5,00 \pm 0,01$ г пирофосфата натрия и $8,00 \pm 0,01$ г гидроксида натрия в 1,00 л деионизированной воды. Для приготовления раствора гидразина сульфата $5,50 \pm 0,01$ г гидразина сульфата растворяли в нескольких миллилитрах деионизированной воды в колбе объемом 1,00 л, затем добавляли 6,00 мл 0,01 М раствора сульфата меди, раствор разбавляли до метки деионизированной водой. Через 10 мин после добавления раствора пирофосфата натрия добавляли 2,50 мл окрашивающего раствора. Окрашивающий раствор готовили растворением $5,00 \pm 0,01$ г сульфаниламида, $1,00 \pm 0,01$ г 1-нафтиламина, $1,00 \pm 0,01$ г ЭДТА, 100 мл фосфорной кислоты в 1,00 л деионизированной воды с последующим разбавлением полученного раствора в 5 раз деионизированной водой. Окраска становится отчетливой через 15 мин после добавления окрашивающего раствора и устойчива в течение 1,5 ч.

Для адаптирования оригинальной фотометрической методики к методу цифровой цветометрии, использовали концентрированный окрашивающий раствор без разбавления и варьировали объем аликвоты анализируемого раствора (см. раздел «Результаты и их обсуждение»).

Проведение измерений. В измерительные лунки (с градуировочными и анализируемыми растворами) и лунки контрольного опыта (заполненные деионизированной водой) микропланшета вносили 320 мкл каждого раствора. Содержимое измерительных лунок гомогенизировали с помощью механической пипетки *Sartorius*TM. Растровые изображения 96-луночного микропланшета с растворами получали в режиме «на просвет» с помощью офисного планшетного фотосканера. Микропланшет помещали под диффузор электролюминесцентной лампы, вмонтированной в крышку фотосканера. Для уменьшения влияния на результат измерений внешних засветок стеклянную столешницу фотосканера ограничивали по периметру защитной рамкой, высота которой равна толщине микропланшета (рис. 1).

Сканирование осуществляли в автоматическом режиме при отключенной функции постобработки изображения (автоматическая коррекция цвета и т.п.). Отсканированные изображения сохраняли в 48-битном tif-формате без потери качества. Для извлечения информации о значениях свет-

лоты (яркости) цветовых каналов из растровых изображений на стационарном компьютера под управлением ОС Windows использовали бесплатно распространяемую программу IrfanView (разработчик Irfan Skiljan [17]).

Результаты и их обсуждение

Первый вопрос, возникающий при определении нитратов, заключался в том, подходит ли стандартная спектрофотометрическая методика для цифрового цветометрического анализа с использованием офисного планшетного фотосканера. Поэтому градуировочные зависимости строили в соответствии с вышеописанной методикой [12]. Приготовлено восемь растворов нитратов с концентрацией азота, равной 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 и 12,0 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$, что соответствует содержанию нитратов азота в почве от 2,5 до 30 млн^{-1} . Для каждой лунки 96-луночного микропланшета выбрано пять точек и проведено усреднение. Условную оптическую плотность A_i для i -го цветового канала рассчитывали по формуле

$$A_i = \lg \left(\frac{L_{\text{water},i} - L_{\text{scatter},i}}{L_{\text{sample},i} - L_{\text{scatter},i}} \right),$$

где $L_{\text{water},i}$ – светлота i -го цветового канала для лунки, заполненной деионизированной водой, $L_{\text{scatter},i}$ – уровень рассеянного излучения для i -го цветового канала (для оценки этого параметра измерены светлоты рабочих цветовых каналов изображения лунки микропланшета, заполненной черной тушью), $L_{\text{sample},i}$ – светлота i -го цветового канала для лунки, заполненной анализируемым раствором.

Наиболее существенные изменения светлоты наблюдались для G -канала RGB -цветовой модели (рис. 2, а). Несмотря на то, что градуировочная зависимость является линейной, условная оптическая плотность не превышает 0,14. При этом минимальная концентрация с ненулевым поглощением составляет 4,0 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$, что в 4 раза выше предела определения фотометрического метода [12]. Предполагая, что эту проблему можно решить за счет увеличения концентрации нитратов, построены градуировочные зависимости для аликвот объемом 1,00 и 1,50 мл вместо 500 мкл, использовавшихся ранее (рис. 2, б, в). В этом случае условная оптическая плотность статистически значимо отличается от нуля для 2,0 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (объем аликвоты 1,00 мл) и для 1,0 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (объем аликвоты 1,50 мл). Отклонения от линейной

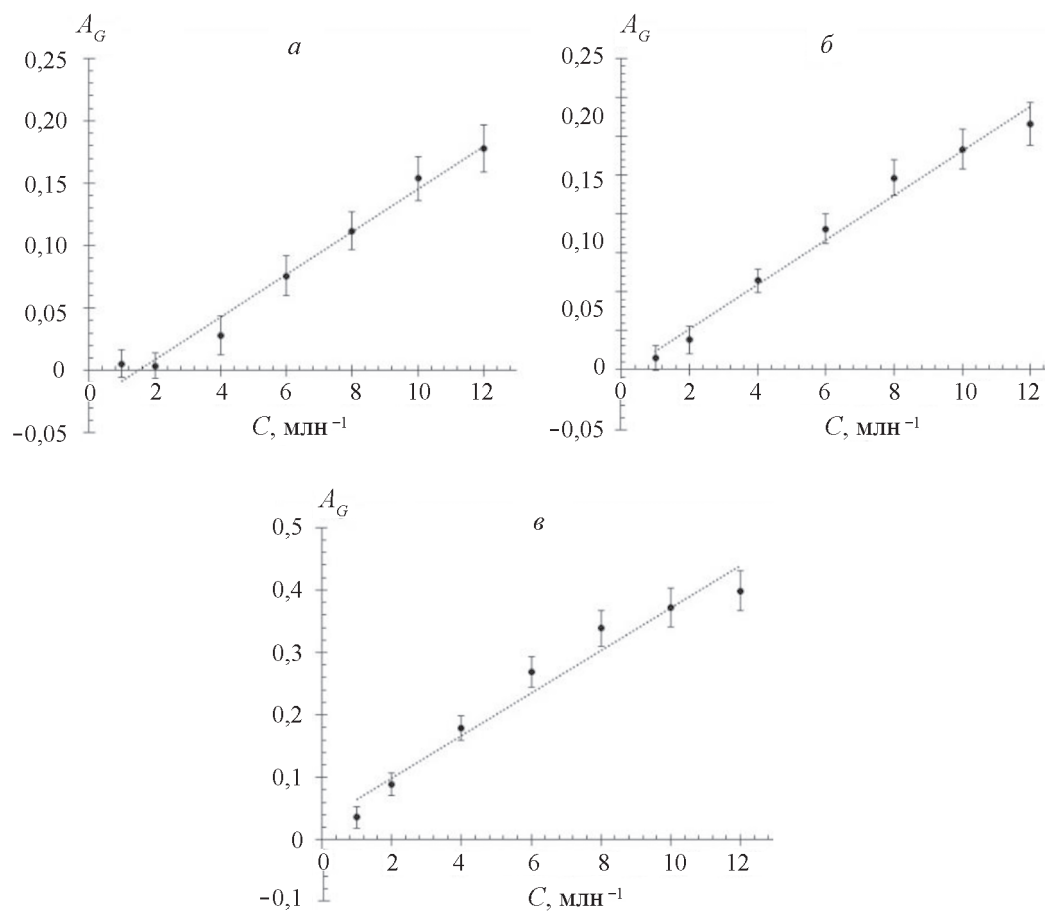


Рис. 2. Градуировочные зависимости условной оптической плотности G -канала от содержания нитрата, млн⁻¹ с объемами аликвот, мл: а – 0,50; б – 1,00; в – 1,50

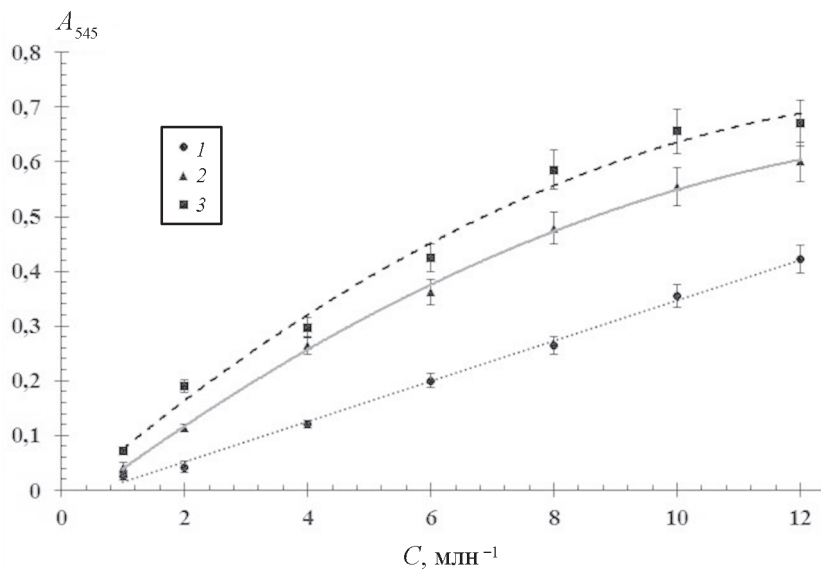


Рис. 3. Градуировочные зависимости оптической плотности при 545 нм от содержания нитрата N , млн⁻¹ с объемами аликвот, мл:
1 – 0,50; 2 – 1,00; 3 – 1,50

зависимости наблюдаются при концентрации раствора выше $10,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, несмотря на то, что величина оптической плотности не превышает 0,27. Аналогичное поведение наблюдается и для градуировочных зависимостей, полученных спектрофотометрическим методом (рис. 3). Этот эффект был более выражен для объема аликвоты 1,50 мл. Это свидетельствует о том, что, скорее всего, концентрация окрашивающего раствора недостаточно высока и диазо-промежуточные продукты рекомбинируют с водой. Поэтому было решено использовать концентрированный окрашивающий раствор без разбавления. Объем аликвоты составил 1,50 мл. Соответствующая градуировочная зависимость приведена на рис. 4. Верхняя граница диапазона линейности составляет $12,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, что согласуется с оригинальной методикой [12]. Для проверки адекватности разработанного цветометрического спосо-

ба определения нитратов проанализировано несколько стандартных образцов почвы (таблица). Полученные результаты согласуются с паспортными данными.

Разработанный цветометрический способ определения нитратов применен для анализа различных образцов почвы наряду со спектрофотометрическим методом [12]. Соответствующая корреляционная диаграмма приведена на рис. 5. Среднее относительное отклонение результатов цветометрического определения от результатов анализа методом спектрофотометрии составило 8%, что находится в пределах, заданных стандартным методом [12].

Таким образом, оригинальные фотометрические методики [12] определения азота нитратов были успешно адаптированы для метода цифровой цветометрии. Использование сканера вместо спектрофотометра позволяет снизить

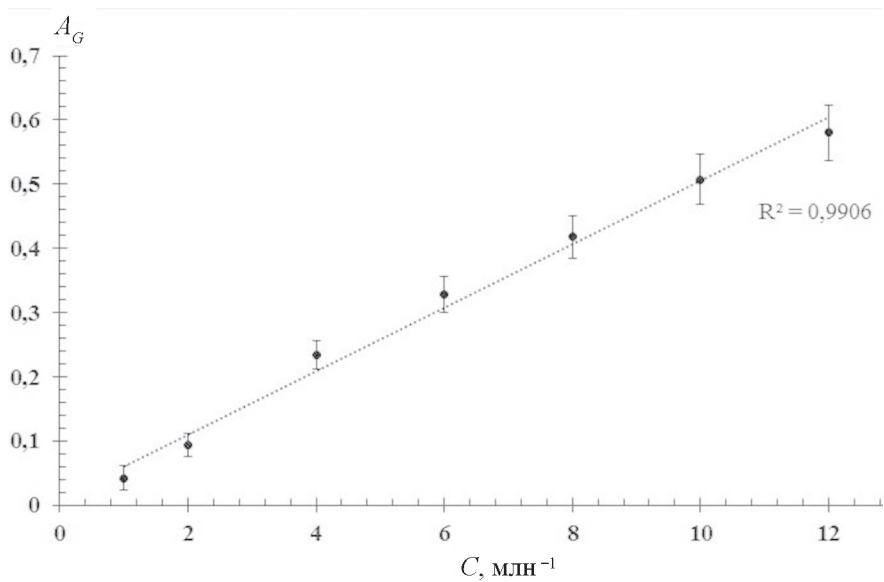


Рис. 4. Градуировочные зависимости «условная оптическая плотность G-канала – содержание нитратов, млн⁻¹» с объемом аликвоты 1,50 мл, построенные с использованием концентрированного окрашивающего раствора

Результаты определения нитратного азота в некоторых почвенных стандартах ($P = 0,95$; $n = 3$)

Образец	Содержание нитрата, млн ⁻¹		Относительная погрешность, %
	паспортное значение	цифровая цветометрия	
Дерново-подзолистая среднесуглинистая почва САДПП-10/5	3,01	3,13 ± 0,73	4,0
Чернозем карбонатный глубокий САЧкп-08/1	13,1	12,5 ± 1,2	4,6

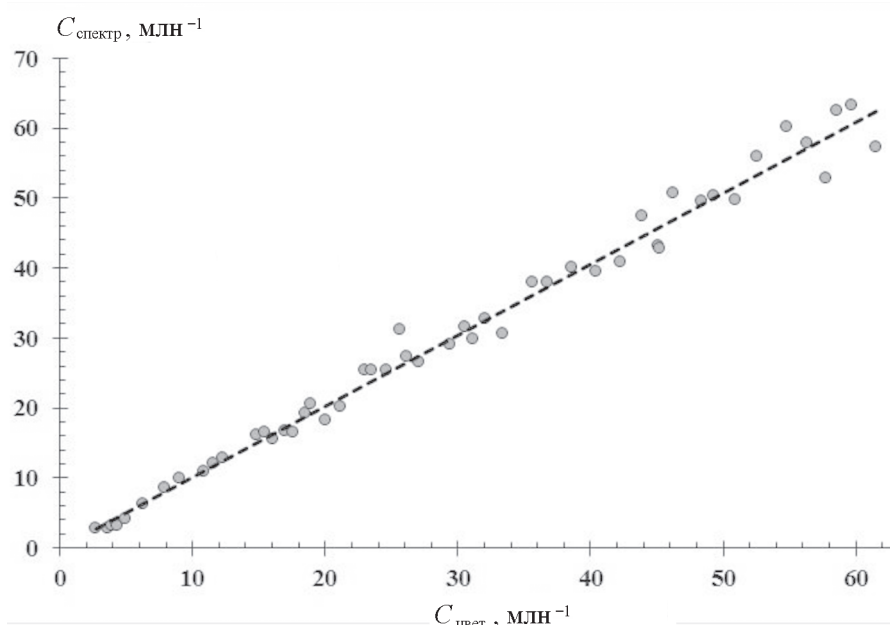


Рис. 5. Корреляционная диаграмма «концентрация нитрата, полученная методом спектрофотометрии – концентрация нитрата, полученная методом цифровой цветометрии»

стоимость анализа, измерять сразу несколько десятков образцов за счет использования 96-луночного микропланшета, а также проводить

анализ в полевых условиях, при этом для измерений требуется только ноутбук и сканер с питанием от USB.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jose J.V. Physiological and molecular aspects of macronutrient uptake by higher plants / T. Aftab, Kh.R. Hakeem (editors). Sustainable Plant Nutrition. Molecular Interventions and Advancements for Crop Improvement. Elsevier, 2022. Ch. 1. P. 1 (DOI: 10.1016/B978-0-443-18675-2.00010-9).
2. Saleem S., Ul Mushtaq N., Rasool A., Shah W.H., Tahir I., Ul Rehman R. Plant nutrition and soil fertility: physiological and molecular avenues for crop improvement // T. Aftab, Kh. R. Hakeem (editors). Sustainable Plant Nutrition. Molecular Interventions and Advancements for Crop Improvement. Elsevier, 2022. Ch. 2. P. 23 (DOI: 10.1016/B978-0-443-18675-2.00009-2).
3. Hachiya T., Sakakibara H. // J. Exp. Bot. 2017. Vol. 68. N 10. P. 2501-2512 (DOI: 10.1093/jxb/erw449).
4. An T., Wang F., Ren L., Ma Sh., Li Sh., Liu L., Wang J. // Applied Soil Ecology. 2022. Vol. 169. P. 104164 (DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.104164).
5. Gurmesa G.A., Hobbie E.A., Zhang Sh., Wang A., Zhu F., Zhu W., Koba K., Yoh M., Wang Ch., Zhang Q., Fang Y // Ecosphere. 2022. Vol. 13. P. e3998 (DOI: 10.1002/ecs2.3998).
6. Mustafa Gh., Hayat N., Alotaibi B.A. How and why to prevent over fertilization to get sustainable crop production. // T. Aftab, Kh. R. Hakeem (editors). Sustainable Plant Nutrition. Molecular Interventions and Advancements for Crop Improvement. Elsevier, 2022. Ch. 15. P. 339 (DOI: 10.1016/B978-0-443-18675-2.00019-5).
7. Choosang J., Numnuam A., Thavarungkul P., Kanatharana P., Radu T., Ullah S., Radu A. // Sensors. 2018. Vol. 18. P. 3555 (DOI: 10.3390/s18103555).
8. Śaez-Plaza P., Navas M.J., Wybraniec S., Michałowski T., Asuero A.G. // Crit. Rev. Anal. Chem. 2013. Vol. 43. P. 224 (DOI: 10.1080/10408347.2012.751787).
9. López Pasquali C.E., Fernández Hernando P., Durand Alegría J.S. // Anal. Chim. Acta. 2007. Vol. 600. P. 177 (DOI: 10.1016/j.aca.2007.03.015).
10. Schmiedt Sattolo Th.M., Otto R., Mariano E., Kamogawa M.Ya. // Comm. Soil Sci. Plant Anal. 2016. Vol. 47. N 22. P. 2547 (DOI: 10.1080/00103624.2016.1243710).
11. EPA method 353.2. Determination of Nitrate+Nitrite Nitrogen by automated colorimetry. Revision 2.0. August 1993.
12. ГОСТ 26488-85. Почвы. Определение нитратов по методу ЦИНАО (Москва, 1985).
13. Heckman J.R. // HortTechnology. 2002. 12:706-710 (DOI: 10.21273/HORTTECH.12.4.706).
14. Christodouleas D.C., Nemiroski A., Kumar A.A.,

- Whitesides G.M. // Anal. Chem. 2015. Vol. 87. P. 9170-9178 (DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01612).
15. Oskolok K.V., Shults E.V., Monogarova O.V., Chaplenko A.A. // Talanta. 2018. Vol. 178. P. 377 (DOI: 10.1016/j.talanta.2017.09.049).
16. Oskolok K.V., Monogarova O.V., Garmay A.V., Pastukhova A.A. // Moscow University Chemistry Bull. 2021. Vol. 76. P. 33 (DOI: 10.3103/S0027131421010119).
17. <https://www.irfanview.com>

Информация об авторах

Андрей Владимирович Гармай – мл. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (andrew-garmay@yandex.ru);

Оксана Викторовна Моногарова – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (o_monogarova@mail.ru);

Кирилл Владимирович Осколок – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (k_oskolok@mail.ru);

Павел Михайлович Радзиковицкий – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (radzikovitsky@gmail.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 11.12.2023;
одобрена после рецензирования 16.03.2024;
принята к публикации 25.09.2024.