

## Növényminták nitráttartalmának meghatározását befolyásoló tényezők vizsgálata

THAMM FRIGYESNÉ

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

Oldatokban lévő nitrátionok meghatározására - különösen az autoanalizátorok elterjedése óta - a GRIESS és ILOSVAY által, a nitritionok minőségi kimutatására kidolgozott, igen specifikus szulfanilsav + 1-naftilaminos reakció különféle változatai terjedtek el. Ezek közül is a szulfanilamid + N-(1-naftil-)etilén-diamin-diklorid (=NNED) reagenst alkalmazzák a legszélesebb körben. A színeképző reakció - mely ennek a meghatározási eljárásnak az utolsó lépése - azon alapszik, hogy a nitritionok savanyú közegben diazotálják a szulfanilamidot és a keletkezett diazovegyület a NNED-del vörös színű azofestéket képez. A színreakció gyorsan megy végbe, s a keletkezett színes vegyület meglehetősen széles koncentráció-tartományban követi a Lambert-Beer-törvényt.

Ha ugyanezzel a színreakcióval nitrátionokat kívánunk kimutatni, akkor ezeket előzetesen nitráttá kell redukálni. Az irodalomban található adatok szerint jelenleg a kémiai redukálószeresek közül a fém cinket, a fém kadmiumot /önmagában és rezegett alakban is/ és a hidrazinszulfátot, a biológiai redukálószeresek közül pedig a nitrát-reduktáz enzimkészítményeket használják erre a célra. A nitrátionok meghatározásával - így a redukciójukkal kapcsolatos irodalmat korábbi közleményemben foglaltam össze /THAMMNÉ, 1987/1988/.

### Kísérleti rész

E módszer adaptálásának problémái a kísérleti munka során két kérdés körül csoportosultak:

1. Hogyan lehet a meghatározáshoz megfelelő növényi kivonatot készíteni? és

2. milyen redukálószerrel, milyen feltételek mellett lehet a nitrátionokat meglehetősen nagy arányban és egyben reprodukálhatóan nitritionokká redukálni?

A kísérletek során a két kérdés megoldása folyamatosan összekapcsolódott, az áttekinthetőség kedvéért azonban igyekeztem szétválasztani a két problémakört.

### Növényi kivonatok készítése

Az irodalomban található leírások szerint többféle kivonószert használnak a nitrátok növényi anyagokból történő kivonására. Ezek közül - mivel a nitrátok szobahőmérsékleten is jól oldódnak vízben - kivonószerként a desztillált víz mellett döntöttünk.

A bemért minta nagyságára és a kivonószert mennyiségére vonatkozóan is sok eltérő adatot lehetett találni. Munkánkat a NOVOZAMSKY és munkatársai /1983/ által javasolt módon, 0,5 g száraz, darált növényi mintához 50 cm<sup>3</sup> desztillált vizet adva /1:100 arány/ kezdtük el. A mintákat a lehető leg-rövidebb ideig - ez a gyakorlatban sorozatvizsgálatoknál 30 perc - kör-körös rázógépen ráztuk, majd szűrtük.

Az így készült kivonatok nitráttartalmát nemcsak desztillált vizes NO<sub>3</sub>-standardsor segítségével, hanem - ellenőrzésképpen - addíciós módszerrel is meghatároztuk. Az addíciós módszernél a kivonatok azonos térfogatú aliquotrészeihez ugyanannyi nitrátot adtunk, mint a desztillált vizes standardsor egyes tagjaihoz. Ekkor azonban azt tapasztaltuk, hogy egységnyi NO<sub>3</sub>-mennyiség - a vizsgálandó növényi anyagtól, s így a kivonatban lévő egyéb anyagoktól függően - kisebb mértékű extinkció-emelkedést eredményezett, mint a desztillált vizes KNO<sub>3</sub>-oldatok esetében. Így nem kaptunk a desztillált vizes NO<sub>3</sub>-standardsor kalibrációs egyenesével párhuzamos görbesereget, hanem /a csak a növényi kivonatot tartalmazó oldat extinkciójának levonása után/ a desztillált vizes kalibrációs egyenes alatt elhelyezkedő, egymástól is eltérő meredekségű egyeneseket.

Amikor a növényi kivonatokból egyre kisebb térfogatokat használtunk fel a meghatározáshoz, akkor a KNO<sub>3</sub>-oldat hozzáadásával előállított kalibrációs egyenesek egyre meredekebben emelkedtek, s érthető módon, a segítségükkel kiszámított nitráttartalom ugyanannál a mintánál egyre nagyobbnak adódott. Ezt a kivonatba került zavaró anyagok mennyiségének csökkenésével lehet magyarázni.

Az 1:100 kivonási arányt tehát tágítani kellett, amennyire ezt laboratóriumi technikánk megengedte. Így jutottunk el végül a jelenleg használt 0,5 g növényi anyag/400 cm<sup>3</sup> desztillált vízzel készített kivonathoz. Az 1. táblázatból az is látható, hogy ha a töményebb kivonatokból az 1:800 arányú kivonatnak megfelelő hígítást készítünk, akkor a vizsgált növény minta nitráttartalma megközelítően azonosnak adódik.

A "kalibrációs egyenesek" lefutása azonban még ennél az igen tág aránynál sem teljesen független a meghatározáshoz felhasznált aliquotrész mennyi-

#### 1. táblázat

Búzanövény NO<sub>3</sub>-N-tartalma táguló kivonási arányokkal készült kivonatokban, ill. a legtágabb aránynak megfelelő hígítással készített oldatokban (mg NO<sub>3</sub>-N/g)

/1/ Kivonási arány	/2/ Hígítatlan kivonatból	/3/ Az 1:800 kivonási aránynak meg- felelően hígított kivonatból
1 : 800	1,56	1,56
1 : 400	1,36	1,58
1 : 200	0,52	1,42
1 : 100	0,28	1,46

ségétől, illetve a minták  $\text{NO}_3\text{-N}$ -tartalmától. Az 1:800 arányú kivonatokból is csak 0,5-1,0  $\text{cm}^3$ -nyi - nagyon kevés nitrátot tartalmazó minták esetében esetleg 2  $\text{cm}^3$ -nyi - kivonatot lehet a meghatározáshoz felhasználni.

#### *A nitrátionok redukciójának vizsgálata*

A redukciós folyamat körülményeinek és technikájának vizsgálata céljából eleinte desztillált vizes  $\text{KNO}_3$ -oldattal végeztük a méréseket. A vizsgálatok során kizárólag kémiai redukálószerekkel dolgoztunk.

A Zn-poros redukciót FRIES és GETROST /1975/ leírása szerint végeztük el. Az előírt körülmények gondos betartása ellenére, többször megismételve az eljárást, nem sikerült a vizsgált oldatok  $\text{NO}_3$ -tartalmával lineárisan növekvő, jól reprodukálható extinkció-értékeket kapni. Ennek oka feltehetően - amint erre HEANES /1975/ is felhívta az analitikusok figyelmét -, hogy csak megfelelő tisztasági fokú Zn-por-készítményekkel lehet reprodukálhatóan dolgozni, ilyen készítmények pedig nem álltak rendelkezésünkre.

A cinknél megbízhatóbb redukálószer - az irodalmi adatok alapján - a fém kadmium. Vizsgálataink alapjául az AOAC-módszerkönyvben /1970/ lévő leírás szolgált. A Cd-szemcséket  $\text{CdSO}_4$ -oldatból Zn-lemezek segítségével nyertük, majd a 0,4-0,8 mm átmérőjű szemcséket elkülönítettük, s a redukáló oszlopokat ezekkel töltöttük meg.

A Cd-oszloppal végezve a redukciót, akkor értük el a legjobb redukálhatóságot, amikor a vizsgálandó oldatokat a kb. 1 cm átmérőjű és 10-12 cm magas oszlopokon 3-5  $\text{cm}^3$ /perc sebességgel engedték át. 2  $\text{cm}^3$ /perc-re csökkentve az átfolyási sebességet, az eredmények csak jelentéktelen mértékben javultak, viszont az elemzéshez szükséges idő annyira megnyúlt, hogy nagyobb /50-60 mintából álló/ sorozatokat már nem lehetett egy nap alatt redukálni. Ha viszont 5  $\text{cm}^3$ /perc fölé emeltük az átfolyási sebességet, akkor a redukció határfoka jelentősen csökkent. A 3-5  $\text{cm}^3$ /perc átfolyási sebességet és az AOAC-módszerkönyv előírásait betartva, jó hatásfokkal / $\text{NaNO}_2$ -standardoldatokhoz viszonyítva átlagosan 98,8 %-ban/ lehetett a vizes oldatok  $\text{NO}_3$ -tartalmát redukálni.

Több szerzőnek az a véleménye, hogy a rezegett Cd-szemcsék jobban redukálják a nitrátot, mint a kadmium egymaga, ezért Cu-Cd-szemcsékkel töltött oszlopokat is készítettünk. Ezek az oszlopok azonban csak 60-80 %-át redukálták a desztillált vizes  $\text{KNO}_3$ -oldatok  $\text{NO}_3$ -tartalmának.

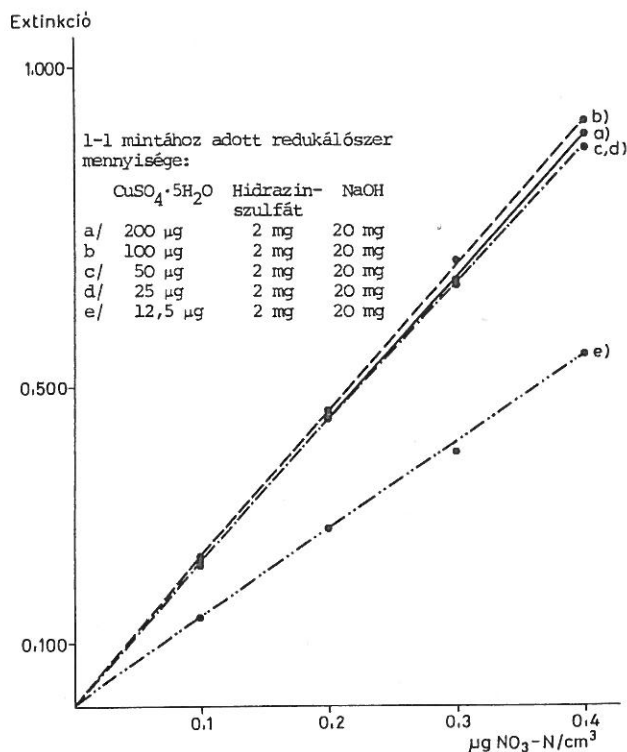
A Cd-oszlopokkal jó hatásfokkal lehet a nitrátionokat redukálni, azonban ez az eljárás idő- és munkaigényes. Ahhoz, hogy egy 60-80 mintából álló sorozatot redukálni lehessen, feltétlenül több /3-4/ oszloppal kell egyidejűleg dolgozni. Az oszlopok átfolyási sebességét nem lehet teljesen azonosra beállítani, s az oszlopok redukálóképessége a használat során csökken, ezért munkanaponként mindegyik oszlopon a vizsgálandó oldatokon kívül még egy - legalább 4 tagból álló - standardsorozatot is kell redukálni. Egy-egy minta redukciójához /az oszlop atmoszfáját is beleszámítva/ 15-20 perc szükséges, így egy munkanap folyamán egy-egy oszlopon legfeljebb 25 minta redukálható. Az eddigieken felül az oszlopokkal végzett munka a laboratóriumban dolgozótól fokozott figyelmet kíván és állandó helyhez kötöttséget jelent.

Az említettek miatt tértünk rá a hidrazinszulfáttal végzett redukcióra. A hidrazinszulfát - bár irodalmi adatok szerint a  $\text{NO}_3$ -ionoknak csak 50-85 %-át redukálja - a laboratóriumi munkát tekintve számos előnnyel rendelkezik a fémes redukálószerrel szemben: oldat alakjában adható; redukció után nem kell a vizsgálandó oldattól elválasztani; esetleges feleslege acetonnal hozzáadására elbomlik; s eléggé gyenge redukálószer ahhoz, hogy megfelelő

koncentrációban alkalmazva és bizonyos feltételeket betartva a nitrátionokat csak nitritté redukálja, illetve a keletkezett nitritionokat nem, vagy csak jelentéktelen mértékben redukálja tovább. Hátránya azonban, hogy a vegyszer minőségétől és a külső körülményektől függően naponként eltérő hatásfokkal mehet végbe a redukció.

Az irodalomban található eltérő adatok, valamint a leírt módszerekkel kapott kalibrációs egyenesek nem teljesen egyenesek voltak miatt a redukció főbb tényezőit részletesen megvizsgáltuk. Kiinduló pontként SAWICKI és SCARINGELLI /1971/ desztillált vizes oldatok, valamint MULLIN és RILEY /1955/ a tengervíz nitráttartalmának meghatározására alkalmazott /nem auto-analizátorra leírt/ módszere szolgált. Mivel a desztillált vizes  $\text{NO}_3$ -oldatokkal és a növényi kivonatokat is tartalmazó  $\text{NO}_3$ -standardsorral kapott egyenesek iránytangense nem volt azonos, a következőkben ismertetett méréseket lucernakivonathoz adott  $\text{NO}_3$ -standardsorral végeztük.

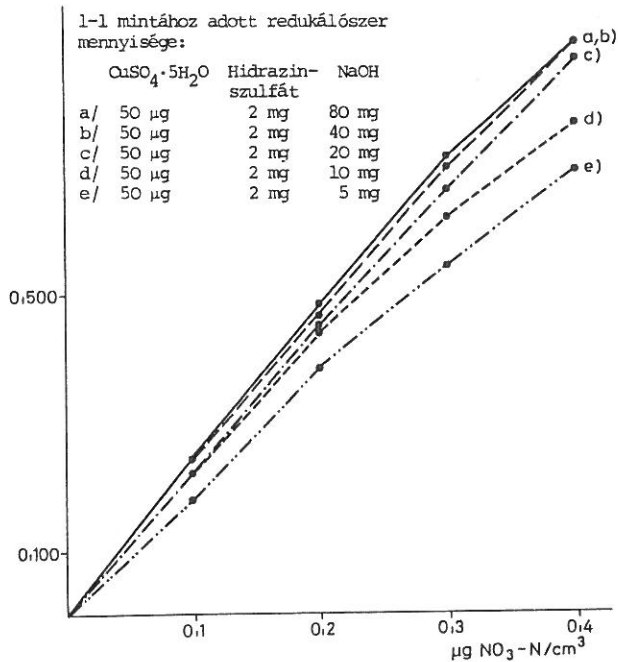
A lucernakivonat készítéséhez 0,5 g száraz, darált lucernát  $400 \text{ cm}^3$  desztillált vízzel 30 percig rázattunk, majd szűrés után 1-1  $\text{cm}^3$ -t adagoltunk a  $\text{NO}_3$ -standardsor minden tagjához. A redukció főbb tényezőinek vizsgálatakor a fotométerálandó /színes/ oldatra számítva 0-0,4  $\mu\text{g NO}_3\text{-N/cm}^3$  koncentráció-tartományban végeztük a méréseket.



1. ábra

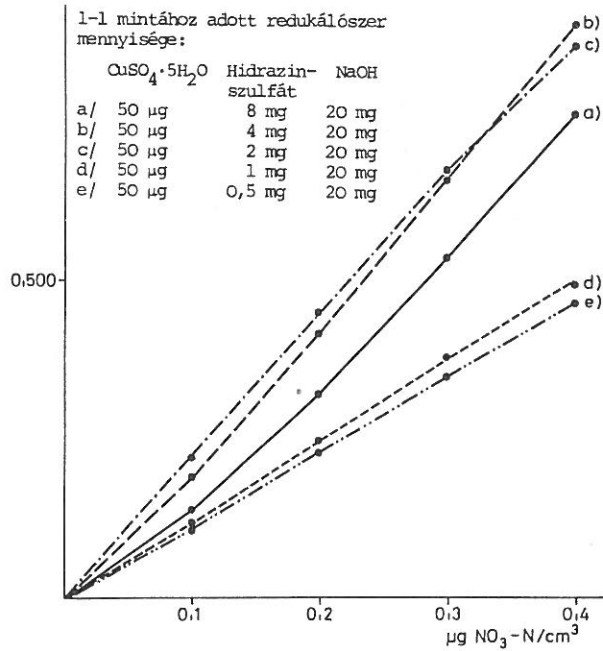
A  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  mennyiségének hatása a  $\text{NO}_3$ -ionok hidrazinszulfátos redukciójára

Extinkció



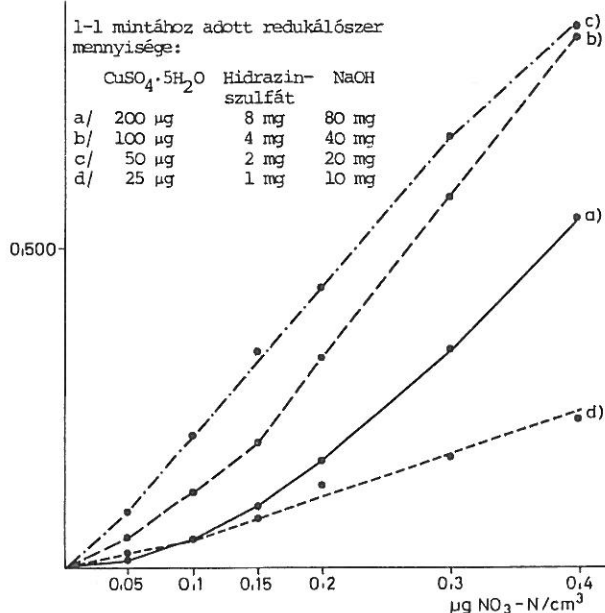
2. ábra  
A NaOH mennyiségének hatása a  $\text{NO}_3^-$ -ionok hidrazinszulfátos redukciójára

Extinkció



3. ábra  
A hidrazinszulfát mennyiségének hatása a  $\text{NO}_3^-$ -ionok redukciójára

Extinkció



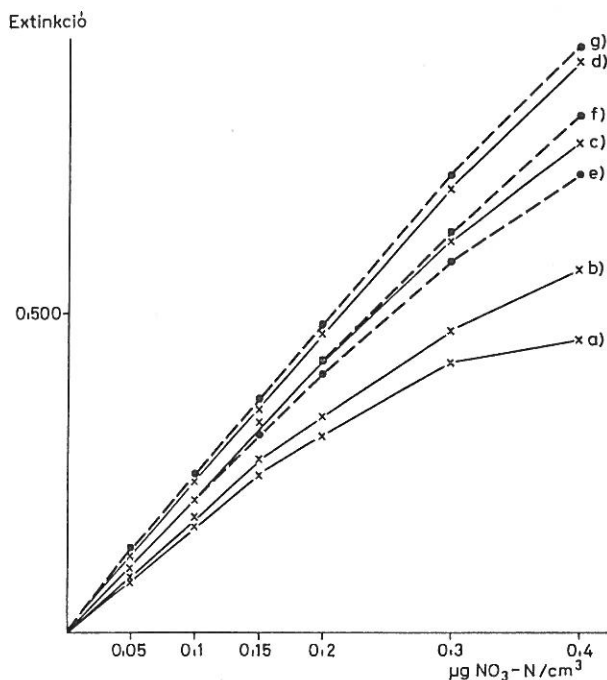
4. ábra

A redukálódott  $\text{NO}_3^-$ -ionok mennyisége a redukálószer mennyiségének változtatása és arányuk állandóan tartása mellett

A redukálószer mennyiségének és arányainak a redukcióra gyakorolt hatását az 1-4. ábrán láthatjuk. A redukcióhoz használt három reagens közül a  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  mennyiségének változtatása fejtette ki a legkisebb hatást a redukcióra, csak a legkisebb /12,5  $\mu\text{g}$ / adag okozott jelentős csökkenést a redukált nitrát mennyiségében /1. ábra/. A NaOH mennyiségének hatása /2. ábra/ már jelentősebb, különösen az 5 és 10 mg-mos NaOH-adaghoz tartozó görbe lefutása hajlik el a nagyobb koncentrációjú görbétől. A hidrazinszulfát mennyiségének hatása /3. ábra/ - amint ez várható is - a legjelentősebb. A legjobb volt a redukció hatásfoka /a legmeredekebb a görbék emelkedése/, amikor a redukálódó oldat 2 ill. 4 mg hidrazinszulfátot tartalmazott. Több /8 mg/, ill. kevesebb /0,5 és 1 mg/ hidrazinszulfát adagolásakor egyaránt rosszabb volt a redukció eredménye.

Amikor a redukálószer arányát állandóan tartva változtattuk mennyiségüket, egyértelműen a mintánként 50  $\mu\text{g}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -ot, 20 mg NaOH-ot és 2 mg hidrazinszulfátot tartalmazó redukálóközegeben redukálódtak a  $\text{NO}_3^-$ -ionok a legnagyobb mértékben. Ekkor kaptuk a legmeredekebb és legegyszerűsebb kalibrációs görbét /4. ábra/.

A redukciós folyamatot a ráfordított idő és a redukció alatt fenntartott hőmérséklet is jelentősen befolyásolja /5. ábra/. Magasabb hőmérsékleten rövidebb idő alatt megy végbe a redukció, de a 60-70 °C-on végzett re-



5. ábra

A hőmérséklet és a redukció időtartamának befolyása a redukált  $\text{NO}_3^-$ -N mennyiségére. 20-24 °C: a/ 0,5 óra; b/ 1 óra; c/ 2 óra; d/ 20-24 óra; 38°C: e/ 0,5 óra; f/ 1 óra; g/ 2 óra

dukciónál jobban szórtak az eredmények, mint a szobahőmérsékleten 20-24 órán át végzett redukciónál. 38 °C-on 2 óra hosszat végezve a redukciót kb. azonos eredményeket kaptunk, mint amikor 20-24 órán át, szobahőmérsékleten hagytuk állni a redukciós keveréket. Sorozatvizsgálatok végzésekor azonban az utóbbi redukciós idő csak látszólag nyújtja meg a meghatározáshoz szükséges időt. Egy kb. 60 mintából álló sorozatnál u.i. az első munkanap végére fejezzük be a redukálószerkelet adagolását, s az éjszakai állás után, a következő napon azonnal folytathatjuk a meghatározást a szín elhívásával, majd a fotometrálassal.

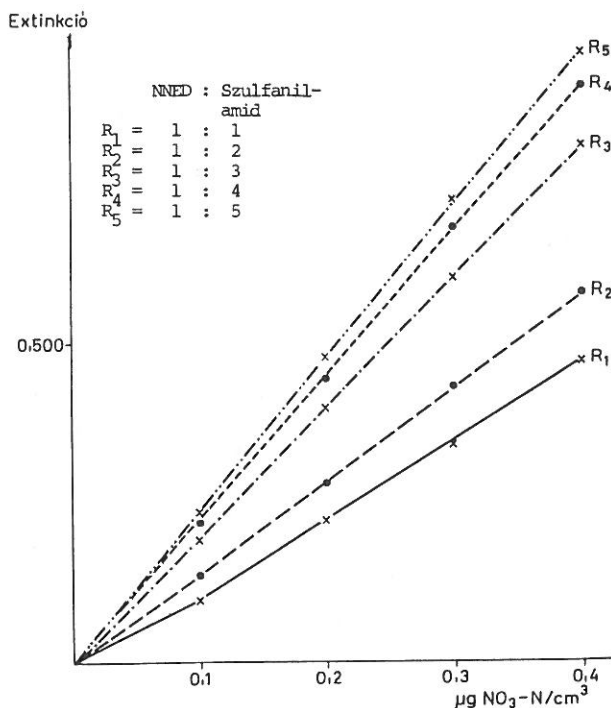
A redukció előkészítése munkaigényes, ezért MULLIN és RILEY /1955/ javasolta a  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  és a hidrazinszulfát egy oldatból történő adagolását. Ugyanakkor ilyen lépést más analitikusok módszerleírásaikban sohasem közöltek, sőt SAWICKI és SCARINGELLI /1971/ szerint a  $\text{CuSO}_4$  - NaOH - hidrazinszulfát adagolási sorrendet szigorúan be kell tartani. Megpróbáltuk tehát a vizsgálatokhoz használt  $\text{CuSO}_4$ - és hidrazinszulfát-oldatokat 1:1 arányban elegyíteni. Ebből a reagensből 2  $\text{cm}^3$ -t adagoltunk aztán a redukáló egyedhez. A kapott eredmények jól egyeztek a külön-külön adagolt  $\text{CuSO}_4$  és hidrazinszulfáttal kapott eredményekkel a 0-0,5  $\mu\text{g NO}_3\text{-N/cm}^3$  tartományban.

A redukció befejezésekor a hidrazinszulfát feleslegének elbontására a manuálisan végzett meghatározásnál acetont adagolnak /MULLIN és RILEY, 1955/; FISHMAN et al., 1964; SAWICKI és SCARINGELLI, 1971/, autoanalizáto-

roknál azonban KAMPHAKE és munkatársai /1967/ javaslatára ez a lépés el-  
hagyható. A laboratóriumi munka csökkentése és a vegyszertakarékosság ér-  
dekében ezt a kérdést is megvizsgáltuk. Az acetont elhagyása után a 0-0,5  $\mu\text{g}$   
 $\text{NO}_3\text{-N}/\text{cm}^3$  koncentráció-tartományban az extinkció-értékek jól egyeztek az  
acetont alkalmazása mellett kapott értékekkel. A két eredmény között szigni-  
fikáns eltérés nem volt.

#### A színelőhíváshoz szükséges reagens mennyisége és a szín stabilitása

Takarékossági okokból megvizsgáltuk a fotometrálsra kerülő azoszine-  
zék képződéséhez szükséges vegyszerek mennyiségét is. SAWICKI és SCARINGELLI  
/1971/ az általuk megadott reagensben 1:5 NNED:szulfanilamid arányt határoz-  
tak meg, s ebből a reagensből 1-1 mintához meglehetősen nagy mennyiséget  
/7,143 mg NNED-et és 35,714 mg szulfanilamidot/ adagoltak. Vizsgálatainknál  
először a reagens arányát változtattuk /6. ábra/. A NNED mennyiségének  
állandóan tartása mellett a szulfanilamid mennyiségét növelve a kalibrációs  
egyenesek meredeksége nőtt, s a legmeredekebb egyenest végül is az 1:5 ará-  
nyú reagens adta. Ezért a következő lépésben az 1:5 arány megtartása mellett  
a reagens 1-1 mintához adott mennyiségét változtattuk. Ennél a mérésnél a  
legnagyobb extinkció-értékeket, tehát a legmeredekebb kalibrációs egyenest



6. ábra

A színelőhíváshoz használt reagens összetételének változtatása.  $R_1 = 1:1 =$   
0,5 g NNED + 0,5 g szulfanilamid 350  $\text{cm}^3$  reagensben



akkor kaptuk, amikor mintánként 2,857 mg NNED-et és 14,286 mg szulfanilamidot /azaz az eredeti 5 cm<sup>3</sup> reagens helyett 2 cm<sup>3</sup>-t/ adtunk.

A fotometrálandó oldatok színintenzitása a reagensek hozzáadásától számítva 0,5-4 órányi időtartam alatt állandó volt. Másnap reggelre /kb. 20 órai állás után/ a nagyobb NO<sub>3</sub>-koncentrációjú oldatok extinkciója kismértékben /max. 10 %-kal/ csökkent.

#### Az elemzés eredményeinek kiszámítása

Mint már említettük, az igen híg növényi kivonatokhoz adott NO<sub>3</sub>-oldatok extinkció-értékeivel felrajzolható kalibrációs egyenes és a desztillált vizes NO<sub>3</sub>-oldatokkal kapott kalibrációs egyenes az esetek túlnyomó többségében nem esik egybe. Ezért a desztillált vizes standard-görbe segítségével számított NO<sub>3</sub>-tartalom az általunk vizsgált növénymintáknál 1,1-1,6-szor nagyobbak adódtak, mint az addíciós eljárás segítségével számított NO<sub>3</sub>-tartalom.

Addíciós eljárással azonban igen munka-, idő- és anyagigényes nagyszámú mintát megemelni /mert ez növénymintánként 4 fotometrálandó oldatot jelent/. Megoldást kerestünk tehát az addíciós eljárás helyettesítésére, elsősorban azonos növényvel végzett kísérletek növénymintáinak vizs-

2. táblázat  
Növényminták NO<sub>3</sub>-N tartalma különböző standardsorok segítségével számítva

/1/ A növénymin- ták megneve- zése	/2/ A mege- lemzett minták száma /n x i/	/3/ A növéyminták NO <sub>3</sub> -N-tartalma, mg N/g				/9/ SzD <sub>5%</sub>
		/4/ desztil- lált vizes	/5/ lucerna kivo- natos	/6/ "0"	/8/ addi- cióval	
		/7/ standardsorról				
a/ len /zöld növény/	4 x 2	0,17	0,14	0,11	0,10	0,05
b/ lucerna	3 x 2	0,19	0,16	0,16	0,14	0,08
c/ őszi búza /zöld növény/	4 x 2	0,75	0,66	0,62	0,56	0,10
d/ szója /levél/	4 x 2	1,00	0,85	0,82	0,82	0,07
e/ kukorica /zöld növény/	3 x 2	2,58	2,28	2,24	2,26	0,13
f/ cukorrépa /levél/	4 x 2	2,70	2,49	2,39	2,42	0,13
g/ paraj /holland standard/	1 x 2	4,15	4,08	4,08	4,00	0,16

n = növényminták száma, i = ismétlések száma.

gálatánál. Az előbb említett standard-sorok mellett ezért még két másik standardsorral is meghatároztuk a vizsgált növények  $\text{NO}_3$ -tartalmát. Az egyik standardsor úgy készült, hogy a vizsgált azonos fajú növények közül a várhatóan legkevesebb  $\text{NO}_3$ -t tartalmazó növény minta kivonatát adagoltuk a  $\text{NO}_3$ -standardsor minden egyes tagjához. /Ezt "O"-standardsornak neveztük./ A másik esetben a laboratóriumunkban az analízisek ellenőrzésére használt ún. standard lucerna /mely szintén igen kevés  $\text{NO}_3$ -t tartalmaz/ kivonatát használtuk fel a standard-görbe felvételéhez.

A négyféle standardsor alkalmazhatóságát úgy ellenőriztük, hogy többféle növénymintát /őszi buza, kukorica, lucerna, cukorrépa, szója, len/ elemeztünk 2-2 párhuzamos beméréssel. A kivonatokra kapott extinkció-értékekből mind a négy standardsorral kiszámítottuk a minták  $\text{NO}_3$ -N-tartalmát. A kapott adatokat növényenként elkülönítve variancia-analízissel értékeltük. Az itt nem részletezett variancia-analízis szerint az egyes növények adatain belül a minta x módszer kölcsönhatások nem voltak szignifikánsak, ezért a 2. táblázatban növényenként közöljük az elemzések átlagait. Látható, hogy a lucerna standardsorral és a "O"-standardsorral, valamint az addícióval kapott adatok 5 %-os valószínűségi szinten nem térnek el szignifikánsan egymástól, míg a desztillált vizes standardsorral kapott értékek hét eset közül ötben statisztikusan igazolhatóan nagyobbak.

Ezért abban az esetben, amikor különböző módon kezelt, de azonos fajú növények  $\text{NO}_3$ -tartalmát akarjuk meghatározni, az ún. "O"-standardsor segítségével határozhatjuk meg az eredményeket. Ha viszont eltérő növényekből áll a vizsgálandó mintaanyag, akkor valamelyik, kevés  $\text{NO}_3$ -t tartalmazó növény minta kivonatát célszerű a standardsor egyes tagjaihoz hozzáadni.

#### *A javasolt módszer összehasonlítása más módszerekkel*

A javasolt eljárás ellenőrzésére kétféle összehasonlító vizsgálatot végeztünk:

1. A fotometriás meghatározással kapott eredményeket vízgőzdesztillálással kapott eredményekkel hasonlítottuk össze. Ehhez 7 növénymintából 4-ismétlésben 1:100 arányú desztillált vizes kivonatokot készítettünk. A kivonatokból a  $\text{NO}_3$ -tartalmat hígítás nélkül, Dewarda ötvözzel végzett redukció és vízgőzdesztillálás után titrálassal határoztuk meg. Ugyanezen kivonatok másik részét 8-szorosra hígítottuk, majd hidrazinszulfáttal végzett redukció után fotometriás uton határoztuk meg  $\text{NO}_3$ -tartalmukat.

A kétféle módon kapott adatokkal végzett variancia-analízis eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze: eszerint sem az egyes minták kétféle módon meghatározott  $\text{NO}_3$ -N-tartalma, sem ezek átlagai között nem volt szignifikáns eltérés.

Ezen összehasonlító vizsgálat másik részeként a növényminták 1:100 arányú kivonataihoz ismert mennyiségben  $\text{NO}_3$ -ot adtunk két ismétlésben, s a továbbiakban a fent leírt módon jártunk el. Ebben az esetben is variancia-analízissel értékeltük az adatokat: sem a bemért és visszamért  $\text{NO}_3$  mennyisége között, sem a kétféle eljárással /vígőzdesztillálás és fotometrállás/ visszamért  $\text{NO}_3$ -mennyiségek között nem lehetett szignifikáns eltérést kimutatni.

2. Végül a Wageningen-i Egyetem /Hollandia/ által körelemzésre kiadott, igen eltérő fajú növényminták /gabonafélék, zöldségfélék, trópusi növények, dísznövények, stb./ általunk mért  $\text{NO}_3$ -N-eredményeit vetettük egybe az Egyetem Talajtani és Növénytaplálási Osztálya által összesített, általában 15-20 laboratóriumból származó eredményekkel. Mindegyik laboratórium az általa

3. táblázat  
Növényminták NO<sub>3</sub>-N-tartalma desztillálással és fotometrálassal meghatározva

/1/ Minták jele	/2/ NO <sub>3</sub> -N-tartalom, mg/g		/5/ SzD <sub>5%</sub>
	/3/ desztillálással	/4/ fotometrálassal	
1.	2,70	2,65	0,31
2.	2,96	3,13	
3.	4,56	4,74	
4.	8,50	8,62	
5.	4,28	4,46	
6.	4,40	4,50	
7.	4,15	4,44	
a/ Átlag	4,51	4,65	0,18

rutinszerűen alkalmazott módszerrel dolgozott. Az ankétmintákat a következőkben leírt módszer szerint elemeztük. Az adatokat a NO<sub>3</sub>-N-tartalom nagysága szerint 4 csoportba soroltuk, majd variancia-analízissel értékeltük, melynek eredményeit a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat  
Nemzetközi ankétminták NO<sub>3</sub>-N-tartalma  
/mg/g/

/2/ NO <sub>3</sub> -N tar- talom	/1/ Saját mérési eredményeink				/7/ A nemzetközi körelemzés adatai		
	/3/ desztill- lált vi- zes standardról	/4/ lucer- nás	/5/ addi- cióval	/6/ SzD <sub>5%</sub>	/8/ Minimum érték	/9/ Maximum érték	/10/ Átlag /n=15-20/
I. csoport /n=14/							
a/ minimum	0,34	0,26	0,23	0,06	0,21	0,27	0,24
b/ maximum	1,27	1,18	1,19		0,78	1,15	0,94
c/ átlag	0,64	0,52	0,50	0,02	0,35	0,51	0,43
II. csoport /n=10/							
a/ minimum	1,38	1,18	1,16	0,49	1,08	1,30	1,19
b/ maximum	4,10	3,88	3,55		3,71	4,26	4,06
c/ átlag	2,28	2,04	2,01	0,16	1,76	2,38	2,05
III. csoport /n=10/							
a/ minimum	4,26	4,19	3,99	0,44	3,93	4,55	4,34
b/ maximum	6,16	5,69	5,40		4,90	6,37	5,67
c/ átlag	5,02	4,84	4,80	0,14	4,10	5,33	4,71
IV. csoport /n=9/							
a/ minimum	6,54	6,32	6,05	0,86	5,80	6,73	6,37
b/ maximum	9,60	9,43	10,10		8,62	10,53	9,56
c/ átlag	7,70	7,61	7,39	0,29	6,84	8,31	7,67

Mérési eredményeinket feldolgozva a következőket állapítottuk meg. A kis /kb. 4 mg  $\text{NO}_3\text{-N/g}$  és ezalatti/  $\text{NO}_3$ -tartalmaknál a 2. táblázatban összefoglalt adatoknál már említett törvényszerűségeket tapasztaltuk, hogy a desztillált vizes standardsorral meghatározott adatok nagyobbak, mint a lucernás standardsorral kapottak, ezek viszont nagyobbak, mint az addíciós eljárással számított értékek. A nagyobb /4-10 mg  $\text{NO}_3\text{-N/g}$ /  $\text{NO}_3$ -tartalmi mintáknál a háromféle standardsorral számított adatok nagyságbeli sorrendje mintáról mintára változik.

Ha azt vizsgáljuk meg, hogy a különböző laboratóriumok által mért - és elfogadott - minimális és maximális értékekhez képest hogyan helyezkednek el az általunk mért adatok, akkor azt látjuk, hogy a desztillált vizes standard segítségével számított adatok kis /kb. 1,2-1,3 mg  $\text{NO}_3\text{-N/g}$ /  $\text{NO}_3$ -tartalom esetében igen jelentősen /1,3-1,4-szeresen/ meghaladják a 15-20 laboratórium által meghatározott maximális értékeket. Ha a minták  $\text{NO}_3\text{-N}$ -tartalma meghaladja az 1,3 mg/g-ot, akkor a mért értékek a maximális értékek körül - 0,9-1,05-szörös sávban - helyezkednek el.

Kis  $\text{NO}_3$ -tartalmaknál /kb. 0,9 mg  $\text{NO}_3\text{-N/g}$ -ig/ a lucernás standardsorral számított adatok is nagyobbak a nemzetközi laboratóriumok maximális értékeinél, de az eltérés kisebb mértékű /kb. 1,1-szeres/. 0,9 mg/g  $\text{NO}_3\text{-N}$ -tartalom felett a lucernás standardsorral számított eredmények főként a nemzetközi adatok átlagértékei körül - a 0,95-1,05-szörös sávban - helyezkednek el.

Az addíciós eljárás adataiból számolt  $\text{NO}_3\text{-N}$ -tartalmak 0,9 mg/g-ig 14 eset közül csak 5 esetben haladják meg a nemzetközi laboratóriumok maximális értékeit, s ekkor is csak kismértékben. A 0,9 mg  $\text{NO}_3\text{-N/g}$ -nál több nitrátot tartalmazó minták esetében a mért értékek a nemzetközi laboratóriumok minimális és maximális értékei között helyezkednek el.

Ebből következik - ha a relatív hiba játssza a lényeges szerepet -, hogy a kevés /kb. 1 mg  $\text{NO}_3\text{-N/g}$  és ennél kevesebb/ nitrátot tartalmazó növény-minták vizes kivonatai esetében nem lehet desztillált vizes standardsor segítségével kiszámítani a minták  $\text{NO}_3\text{-N}$ -tartalmát, hanem célszerű addíciós eljárással dolgozni, vagy, szükség esetén lucernás standardsorral, tudomásul véve, hogy utóbbi esetben viszonylag magas értékeket fogunk kapni. Ha a minták  $\text{NO}_3\text{-N}$ -tartalma 1-4 mg/g közé esik, akkor már desztillált vizes standardsorral is dolgozhatunk, de megbízhatóbbak az eredmények, ha lucernás standardsorral vagy addícióval végezzük a meghatározást. Végül a sok /4-5 mg/g és ennél több/  $\text{NO}_3\text{-N}$ -t tartalmazó mintáknál a kétféle standardsort vagy az addíciós eljárást egyaránt használhatjuk a nitráttartalom meghatározására. Természetesen, ha az abszolút  $\text{NO}_3\text{-N}$ -értékek a lényegesek, akkor a nagyobb  $\text{NO}_3$ -tartalmaknál is célszerű addíciós eljárással dolgozni.

#### *Az ajánlott módszer részletes ismertetése*

##### *Növényi kivonat készítése*

60 °C-on szárított, darált, homogén növénymintából 0,5 g-ot mérünk be 500 cm<sup>3</sup>-es műanyag palackba és 400 cm<sup>3</sup> desztillált vizet adunk hozzá. A palackok lezárása után, szobahőmérsékleten, kör-körös rázógéppel 30 percig rázatjuk a mintákat, majd szűrjük /Macharey-Nagel MN 640 w, szürke szűrőpapíron/. A szűrletből hígítás nélkül határozzuk meg a nitrátot.

#### A kivonat nitráttartalmának meghatározása

##### Reagensek:

1.  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  oldat: először 0,25 %-os  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  /alt./ oldatot készítünk, majd ezt 50-szeresre hígítjuk /pl.  $10 \text{ cm}^3$ -t  $500 \text{ cm}^3$ -re töltjük fel desztillált vízzel/;
2. 0,5 mol/l NaOH alt. oldat /20 g NaOH alt./l/;
3. 0,2 % hidrazinszulfát /alt./-oldat;
4. NNED + szulfanilamid reagens:
  - a/ N-(naftil-1-)etiléndiamin-dikloridból (=NNED) /alt./  $100 \text{ cm}^3$ -nyi 0,5 %-os desztillált vizes oldatot készítünk,
  - b/ Szulfanilamidből /at/ 1:10 hígítású HCl-dal /alt./  $250 \text{ cm}^3$  1 %-os oldatot készítünk.  
Az a/ és b/ oldat külön-külön 1-2 hétig is eltartható hűtőszekrényben.
  - c/ Színelőhíváshoz a meghatározás napján az a/ és b/ reagenst a minták számától függő mennyiségben, 1:2,5 arányban elegyítjük egymással.
5.  $\text{NO}_3$ -N-standard oldat:
  - a/ 0,4512 g, 105 °C-on szárított, alt.  $\text{KNO}_3$ -t desztillált vízzel  $500 \text{ cm}^3$ -re oldunk. Ez az oldat  $\text{NO}_3$ -N-re  $125 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  koncentrációjú.
  - b/ Az 5/a alatti oldatból 50-szeres hígítást készítünk  $2,5 \mu\text{g NO}_3\text{-N}/\text{cm}^3$ /.  
c/ Az 5/b oldatból  $100 \text{ cm}^3$ -es normállombikokba sorra 0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 - 25,0 - 30,0 - 40,0  $\text{cm}^3$ -t pipetázunk és desztillált vízzel jelig töltjük.  
A desztillált vizes standardsor elkészítéséhez mindegyik normállombikból  $20 \text{ cm}^3$ -t pipetázunk ki  $50 \text{ cm}^3$ -es normállombikokba, majd a növényi minták meghatározásánál leírt módon járunk el a továbbiakban.  
Ha növényi kivonatot is tartalmazó standardsort készítünk /lucernás vagy "0"-standardsor/, akkor az  $50 \text{ cm}^3$ -es normállombikokba a fenti 20-20  $\text{cm}^3$ -nyi standardtagokon kívül a növényi kivonatból annyi  $\text{cm}^3$ -t adagolunk a lombikokba /0,5-2,0  $\text{cm}^3$  között/, amennyit a meghatározáshoz a többi növényi kivonatból is fel fogunk használni, majd a növényi minták meghatározásánál leírt módon járunk el.
  - d/ Az addíciós eljáráshoz az 5/a alatti oldatot  $125 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  /100-szorosra hígítjuk. Az így kapott  $1,25 \mu\text{g NO}_3\text{-N}/\text{cm}^3$ -es oldatból /5/d/ 1 ill. 2  $\text{cm}^3$ -t adunk a meghatározandó mintát is tartalmazó  $50 \text{ cm}^3$ -es normállombikokba.

##### A meghatározás menete:

A szűrt növényi kivonatokból 0,5 vagy 1,0 /ritkán 2,0/  $\text{cm}^3$ -t pipetázunk  $50 \text{ cm}^3$ -es normállombikokba, majd desztillált vízzel  $20 \text{ cm}^3$ -re egészítjük ki az oldatot. Ezt követően  $1 \text{ cm}^3$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -oldatot /1. oldat/,  $1 \text{ cm}^3$  NaOH-oldatot /2. oldat/ és  $1 \text{ cm}^3$  hidrazinszulfát oldatot /3. oldat/ adagolunk a lombikokba. Mindegyik reagens hozzáadásakor összerázzuk az oldatokat. A lombikokat gumidugóval vagy "Parafilm" fóliával zárjuk, majd 20-24 órára szobahőfokon labor-szekrénybe helyezzük. Másnap az 4/c reagensből  $2 \text{ cm}^3$ -t adagolunk mindegyik lombikba, desztillált vízzel jelig töltjük, összerázzuk és legalább 30 percig állni hagyjuk a színes oldatokat. A fotometrálist  $540 \text{ nm}$ -nél végezzük spektrofotométeren.

Akár standardsorral dolgozunk, akár addícióval, minden esetben készítünk desztillált vizes vakpróbát is, melynél ügyelni kell, hogy a meghatározáshoz felhasznált desztillált vízzel készüljön.

Ha addíciós eljárással kívánjuk a minták nitráttartalmát meghatározni, akkor minden minta elemzéséhez 4 db  $50 \text{ cm}^3$ -es normállombik szükséges. A növényminták kivonatából 0,5-2,0  $\text{cm}^3$  közötti /de azonos/ mennyiséget pipetá-

zunk a négy lombikba. Majd az  $1,25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$   $\text{NO}_3\text{-N}$ -t tartalmazó /5/d/ oldatból a 3. lombikba  $1 \text{ cm}^3$ -t, a 4. lombikba  $2 \text{ cm}^3$ -t adagolunk. Valamennyi lombikban desztillált vízzel  $20 \text{ cm}^3$ -re egészítjük ki az oldat mennyiségét. A redukálószer-  
szerek közül az 1. lombikba nem adagolunk hidrazinszulfát-oldatot /3. oldat/  
/ez lesz a "vak" érték/, a 2., 3. és 4. lombikba a fent leírt sorrendben  
adagoljuk a redukálószeret. A továbbiakban az előzőekben leírtak szerint  
járunk el.

#### A minták $\text{NO}_3\text{-N}$ -tartalmának kiszámítása:

A desztillált vizes és lucernás standardsor egyes tagjai a színes oldatra számítva 0 - 0,025 - 0,05 - 0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,25 - 0,3 - 0,4  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_3\text{-N}/\text{cm}^3$ -nek felelnek meg. A standardsor egyes tagjaira kapott extinkció-  
értékekkel kalibráló egyenest készítünk, s ennek segítségével - a "vak"-  
érték, a hígítás és a bemérés figyelembe vételével - kiszámítjuk a minták  
 $\text{NO}_3\text{-N}$ -tartalmát, melyet  $\text{mg NO}_3\text{-N}/\text{g}$ -ban, vagy sok nitrát esetén  $\text{NO}_3\text{-N} \%$ -ban  
adunk meg.

Ha addíciós eljárással dolgoztunk, akkor kiszámítjuk, hogy a mintához  
adott 0,025, ill. 0,05  $\mu\text{g NO}_3\text{-N}/\text{cm}^3$ -nek mekkora extinkció-érték felel meg  
átlagosan, s ezzel számoljuk ki a meghatározandó mintára kapott extinkció-ér-  
tékből a "vak" levonása után, a hígítás és bemérés figyelembe vételével a  
minta  $\text{NO}_3\text{-N}$ -tartalmát.

## Összefoglalás

Száritott, darált növényminták vizes kivonatából hidrazinszulfáttal  
végzett redukció után N-(1-naftil)-etilén-diamin-dikloriddal (=NNED) + szul-  
fanilamiddal képződő színes vegyület fotometráálásával határoztuk meg manuá-  
lis technikával a kivonatok nitráttartalmát. Az eljárás adaptálása során a  
növényi kivonatok készítését, a hidrazinszulfátos redukciót, valamint a szí-  
nes azovegyület keletkezését befolyásoló fontosabb tényezőket hőmérséklet,  
időtartam, kivonószer és reagensek mennyisége és arányai/ vizsgáltuk meg  
részletesen. Ezen adatok felhasználásával, a zavaró tényezők lehetőséghez  
mért csökkentése ill. esetleges kiküszöbölése után készült a javasolt és  
itt közölt meghatározási módszer leírása.

## Irodalom

- A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 1970. Nitrate and nitrite nitrogen  
in animal feed. 126-127. 11th Ed., Washington, D.C.  
FISHMAN, M. J., SKOUGSTAD, M. W. and SCARBRO, G. F., 1964. Diazotization  
method for nitrate and nitrite. J. Amer. Water Works. 56. 633-640.  
FRIES, J. und GETROST, H., 1975. Organische Reagenzien für die Spuren-  
analyse. Nitrat. 267-272. E. Merck, Darmstadt.  
HEANES, D. L., 1975. Determination of nitrate in soil and water by an  
adaptation of an Orange I Method. Analyst. 100. 316-321.  
KAMPHAKE, L. J., HANNAH, S. A. and COHEN, J. M., 1967. Automated analysis  
for nitrate by hydrazine reduction. Water Research. 1. 205-216.  
MULLIN, J. B. and RILEY, J. P., 1955. The spectrophotometric determination  
of nitrate in natural waters, with particular reference to sea-water.  
Anal. Chim. Acta. 12. 464-480.

- NOVOZAMSKY, I. et al., 1983. Notes on determinations of nitrate in plant material. *Netherland J. Agric. Sci.* 31. 239-243.
- SAWICKI, C. R. and SCARINGELLI, F. P., 1971. Colorimetric determination of nitrate after hydrazine reduction to nitrate. *Microchem. J.* 16. 657-672.
- THAMM F.-né, 1987-1938. Növényminták nitráttartalmának meghatározása. *Agrokémia és Talajtan.* 36-37. 323-337.

*Érkezett: 1989. június 15.*

## Investigation of Some Factors Influencing the Nitrate Determination of Plant Samples

B. THAMM

Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

### Summary

To determine the water soluble nitrate content of dried plant samples, a procedure using hydrazine sulphate as reducing agent and N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine (=NNED) + sulphanilamide as colour producing reagents has been adapted to the facilities of our laboratory. In the course of this work we had to investigate the techniques of preparing a water extract from the plant material, as well as the factors influencing the reduction of nitrate by hydrazine sulphate, and finally those being related to the colour formation /i.e. amounts and ratios of reagents, temperature during the reduction, length of reaction time/.

Taking into consideration the results of the above measurements, the following procedure is suggested. To prepare the extract, 0.5 g of dried ground plant material was weighed in plastic bottles and 400 cm<sup>3</sup> of distilled water were added. After 30 minutes shaking in a rotating shaking machine, the extracts were filtered. Very small volumes /0.5-2.0 cm<sup>3</sup>/ of the extracts were pipetted into 50 cm<sup>3</sup> volumetric flasks. Distilled water was added to make up the volume of the extracts to 20 cm<sup>3</sup>. Then 1 cm<sup>3</sup> of 50 µg/cm<sup>3</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1 cm<sup>3</sup> of 0.5 Mole/l NaOH, and finally 1 cm<sup>3</sup> of 0.2% hydrazine sulphate solutions were added. The flasks were stoppered and let to stand at room temperature for 20 to 24 hours. Next day 2 cm<sup>3</sup> of the colour producing reagent /a mixture of 100 cm<sup>3</sup> of a 0.5% NNED solution prepared with distilled water, and of 250 cm<sup>3</sup> of a 1% sulphanilamide solution prepared with HCl /diluted 1:10// were added to each flask and the contents were filled up to mark with distilled water. The coloured solutions were measured after standing for at least 30 minutes, at 540 nm using a spectrophotometer. Standard solutions were prepared in the range of 0.025-0.4 µg NO<sub>3</sub>-N/cm<sup>3</sup> of the coloured solution.

Results of analysis received by this procedure were compared with the data of N-determination by steam distillation, and with those of the international plant sample exchange of the University of Wageningen /The Netherlands/. Steam distillation was carried out with samples containing NO<sub>3</sub>-N in a range of 2.5-8.5 mg/g and there was no significant difference between the results



solution series prepared with /4/ Distilled water; /5/ Alfalfa extract; /6/ An extract of the same kind of plant containing small amount of  $\text{NO}_3$ . /8/  $\text{NO}_3\text{-N}$  calculated by "Addition" method. /9/  $\text{LSD}_{5\%}$ .

*Table 3.*  $\text{NO}_3\text{-N}$  content of plants determined by distillation and photometry. /1/ No. of sample. a/ Mean. /2/  $\text{NO}_3\text{-N}$  content, mg/g /3/ by distillation; /4/ by photometry. /5/  $\text{LSD}_{5\%}$ .

*Table 4.*  $\text{NO}_3\text{-N}$  content of plant samples of international plant sample analyses /mg/g/. /1/ Data obtained by the described method. /2/  $\text{NO}_3\text{-N}$  content. a/ Minimum; b/ Maximum; c/ Mean. Standard solution series prepared with /3/ distilled water; /4/ alfalfa extract. /5/ By the "addition" method. /6/  $\text{LSD}_{5\%}$ . /7/ Data of international plant sample analyses. /8/ Minimum value. /9/ Maximum value. /10/ Mean /number of laboratories: 15-20/. Group I, II, III and IV.

*Fig. 1.* Effect of the amount of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  on the reduction of  $\text{NO}_3$  by hydrazine sulphate. Amount of reducing agents added to each sample: See on Figure. Vertical axis: Extinction.

*Fig. 2.* Effect of the amount of  $\text{NaOH}$  on the reduction of  $\text{NO}_3$  by hydrazine sulphate. Amount of reducing agents added to each sample: See on Figure. Vertical axis: Extinction.

*Fig. 3.* Effect of the amount of hydrazine sulphate on the reduction of  $\text{NO}_3$ . Amount of reducing agents added to each sample: See on Figure. Vertical axis: Extinction.

*Fig. 4.* Reduction of  $\text{NO}_3$  with increasing quantities of the reducing agents, at a constant ratio. Amount of reducing agents added to each sample: See on Figure. Vertical axis: Extinction.

*Fig. 5.* Effect of temperature and reduction time on the reduction of  $\text{NO}_3$ . 20-24°C: a/ 0.5 hour; b/ 1 hour; c/ two hours; d/ 20-24 hours. 38°C: e/ 0.5 hour; f/ 1 hour; g/ 2 hours.

*Fig. 6.* Changes of the composition of the NNED + sulphonylamide reagent.  $R_1 = 1:1 = 0.5 \text{ g NNED} + 0.5 \text{ g sulphonylamide in } 350 \text{ cm}^3 \text{ reagent/}$ . of the two methods. In the international plant sample exchange, comparison of  $\text{NO}_3\text{-N}$  content could be made in the range of 0.2-10.0 mg/g. The results showed that in the case of samples containing a very small amount of  $\text{NO}_3\text{-N}$  /up to 1 mg/g/, the  $\text{NO}_3\text{-N}$  content of the samples can be calculated only with the aid of addition techniques.

*Table 1.*  $\text{NO}_3\text{-N}$  content of wheat plants /mg  $\text{NO}_3\text{-N/g}$ / determined in extracts prepared with different sample:solution ratios, and in the same extracts after a dilution corresponding to the widest extraction ratio. /1/ Sample:water ratio at extraction. /2/ Data determined from the original /undiluted/ extracts. /3/ Data determined from extracts after a dilution corresponding to the widest extraction ratio /1:800/.

*Table 2.*  $\text{NO}_3\text{-N}$  content of plant samples, determined by different standard series. /1/ Plant samples: a/ flax /young plants/; b/ alfalfa; c/ winter wheat /young plants/; d/ soybean /leaves/; e/ maize /young plants/; f/ sugar beet /leaves/; g/ spinach /Dutch standard sample/. /2/ Number of analyzed samples. /3/  $\text{NO}_3\text{-N}$  content of plant samples, mg N/g. /7/ Standard