

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

CHEMILUMINISCENČNÍ PRŮTOKOVÉ STANOVENÍ DUSIČNANŮ VE VODĚ

PAVEL MIKUŠKA a ZBYNĚK VEČEŘA

Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno
e-mail: mikuska@iach.cz

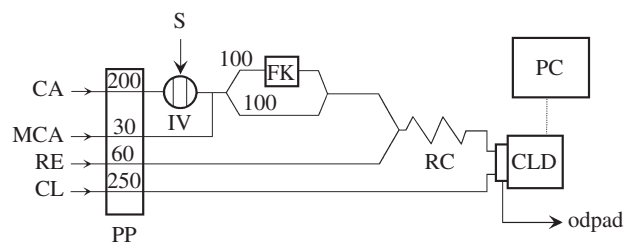
Došlo dne 26.IX.2001

Klíčová slova: dusičnan, fotolýza, FIA, chemiluminiscence, voda

Úvod

Dusičnany jsou důležitou součástí dusíkového cyklu ve spodních a povrchových vodách¹ a společně se sírany tvoří i dominantní anorganickou složku tzv. kyselých srážek². Vzhledem k potenciálnímu škodlivému dopadu dusičnanů na lidské zdraví se stanovují zejména v pitné vodě a potravinách. U lidí je toxicita dusičnanů důsledkem redukce na dusitany *in vivo*; dusitany reakcí s hemoglobinem tvoří methemoglobin, jehož obsah v krvi je limitující pro schopnost krve transportovat kyslík³. Kromě toho mohou být v lidském těle dusitany konvertovány na karcinogenní nitrosaminy^{3,4}.

V současné době se pro stanovení dusičnanů ve vodě používají spektrofotometrické^{5,6}, elektrochemické^{7,8}, separační^{9–11} nebo průtokové metody^{12–19}. Pro rutinní analýzy velkých sérií vzorků se používá nejčastěji tzv. průtoková injekční analýza (FIA), metoda, která je instrumentačně jednoduchá, značně flexibilní, vyznačuje se vysokou rychlostí, spolehlivostí a reprodukovatelností analýz²⁰. Metody FIA používané pro stanovení dusičnanů jsou založeny převážně na konverzi



Obr. 1. Schéma FIA systému pro stanovení dusičnanů ve vodě: CA – nosná kapalina (deionizovaná voda), MCA – modifikátor nosné kapaliny (alkalický roztok siřičitanu), CL – chemiluminiscenční roztok (alkalický roztok luminolu), RE – roztok činidla (kyselý roztok H₂O₂), S – vzorek, IV – injekční ventil, RC – reakční smyčka, CLD – chemiluminiscenční detektor, FK – fotolytický konvertor; PC – počítač, PP – peristaltická pumpa; průtoky jednotlivých kapalin jsou uvedeny v µl.min⁻¹

dusičnanu na dusitan, který se stanovuje spektrofotometricky jako produkt diazotačně-kopulační reakce^{13–17}. Dusičnan lze redukovat na dusitan hydrazinem v přítomnosti měďnatých iontů¹⁹, většinou se však k redukci využívá poměděné kadmium^{13–18}. V reduktoru s takto upraveným kadmíem lze dosáhnout téměř 100 % konverze dusičnanu na dusitan, avšak k dlouhodobému zajištění vysoké účinnosti reduktoru je nutné kadmium pravidelně promývat a kondicionovat. Problematická je i likvidace toxického odpadu. Výše zmíněné nevýhody byly řešeny fotolytickou konverzí dusičnanu na dusitan^{10,21–23}. Omezením dosud popsaných fotokonvertorů je nízký stupeň konverze dusičnanu na dusitan ve vodě. Ke zvýšení účinnosti konverze je nutné používat speciální pufrů a aktivátorů.

V tomto příspěvku je popsáno průtokové stanovení dusičnanu ve vodě, které využívá fotolytickou konverzi dusičnanu na dusitan bez přítomnosti aktivátorů, přičemž vzniklý dusitan je stanoven chemiluminiscenčně²⁴.

Experimentální část

Aparatura a postup

Schéma systému FIA je na obrázku 1. Reakční roztoky a nosná kapalina (deionizovaná voda) jsou transportovány peristaltickými pumpami. Vzorek je nasáván přes iontoměnič (katex) do šesticestného dávkovacího ventilu a je dávkováno 100 µl do proudu deionizované vody. Nosná kapalina s dávkovaným vzorkem je po smíchání s modifikátorem (alkalický roztok siřičitanu) rozdělena do dvou proudů. První proud prochází fotokonvertorem, kde je dusičnan redukován on-line na dusitan a druhý je veden krátkou kapilárou (by-pass) do T-kusu, v němž se oba proudy spojují. Výsledný roztok je smícháván s kyselým roztokem peroxidu vodíku, který oxiduje dusitan na kyselinu peroxodusitou. Uvnitř chemiluminiscenčního (CL) detektoru kyselina peroxodusitá reaguje s alkalickým roztokem luminolu a emitované chemiluminiscenční záření je detegováno fotonásobičem²⁴. Při průchodu vzorku detektorem jsou registrovány dva píky, první odpovídá dusitanu původně přítomnému ve vzorku a druhý sumě původního dusitanu a dusitanu vzniklého redukcí dusičnanu. Koncentrace dusičnanu ve vzorku je vypočítána z rozdílu obou signálů.

Konvertor dusičnanu

Fotolytický konvertor dusičnanu obsahuje nízkotlakou rtuťovou lampu (3 W, 8 mm vnější průměr × 60 mm délka, typ NRV 2-I, Teslamp Praha), která ozařuje 4 kapiláry z křemenného skla umístěné symetricky kolem podélné osy lampy. Do série propojené kapiláry (tavený křemen po odstranění ochranné polyimidové vrstvy, vnitřní průměr 750 µm, délka jedné kapiláry 55 mm) jsou fixovány ve vzdálenosti 2 mm od křemenné baňky lampy. Účinnost konverze byla zvýšena použitím reflexních hliníkových fólií umístěných za křemennými kapilárami ve směru od zdroje UV záření.

Referenční metoda

Jako referenční metoda při analýze dusičnanů v reálných vzorcích vod byla použita nízkotlaká kapalinová chromatografie. Dusičnany byly separovány od dusitanů na koloně s anexem (Dowex 2-X-8, 400 mesh, 1,6 mm × 13 mm), separované ionty byly stanoveny spektrofotometricky v UV oblasti při 210 nm. Jako eluent byl použit 0,08 M- $B_4O_7^{2-}$ (pH 7,1), průtoková rychlost eluentu byla 0,10 ml.min⁻¹.

Reagencie

Roztoky byly připravovány z destilované-deionizované vody. Všechny chemikálie s výjimkou luminolu (čistý; Serva Heidelberg, Německo) byly analyticky čisté (Lachema, Brno).

Kolona s katexem (vrstva 1,6 mm × 1 mm) byla naplněna Dowexem^R 50W-X₂ (200–400 mesh) v H⁺ formě (Bio-Rad, Richmond, USA).

Výsledky a diskuse

Redukce dusičnanu

Fotoredukce dusičnanu indukovaná absorpcí UV záření umožňuje elegantní způsob konverze dusičnanu na dusitan²⁵. Přestože je fotolýza dusičnanu poměrně komplikovaný proces zahrnující mnoho reakcí, výslednou reakci lze popsat jednoduchou stechiometrickou rovnicí^{26,27}.



Při hledání optimálních podmínek pro UV redukci dusičnanu byla zpočátku používána teflonová kapilára (vnitřní průměr 0,75 mm, vnější průměr 1,10 mm, délka 18–50 cm) obtočená ve tvaru spirály kolem rtuťové lampy. Při použití deionizované vody jako nosné kapaliny nebyla pozorována žádná konverze dusičnanu. V přítomnosti fosfátového pufru (0,1 M, pH 6,8) bylo konvertováno 28 % dusičnanu na dusitan (PTFE hadička o délce 30 cm). Po přidavku aktivátoru (0,001 M-EDTA) do fosfátového pufru účinnost konverze dusičnanu (poměr signálů ekvimolárních koncentrací dusičnanu po průchodu přes UV konvertor a dusitanu bez průchodu přes UV) vzrostla na 52 %. Ačkoliv účinnost konverze dusičnan–dusitan je relativně vysoká, přítomnost aktivátoru a pufru není kompatibilní s použitým chemiluminiscenčním způsobem detekce dusitanu a omezuje detekční limit metody na 1.10⁻⁶ M (3 S/N).

V další fázi byl pro fotoredukci dusičnanu vyvinut a studován systém obsahující křemenné kapiláry (popsané v experimentální části). Účinnost konverze dusičnanu na dusitan závisí především na intenzitě UV záření a době ozařování vzorku. Doba ozařování je funkcí průtokové rychlosti vzorku přes reduktor a použité křemenné kapiláry (délka, vnitřní průměr kapiláry, počet kapilár). Na obr. 2 je znázorněna konverze dusičnanu na dusitan v závislosti na počtu křemenných kapilár o vnitřním průměru 750 μm pro průtokovou rychlost vzorku přes fotoreduktor 60 a 100 μl.min⁻¹. Pro další experimenty byly pro redukci dusičnanu zvoleny 4 kapiláry a průtoková rychlost vzorku přes reduktor 100 μl.min⁻¹. Bylo

zjištěno, že konverze dusičnanu závisí významně také na pH roztoku. Při pH 7 (deionizovaná voda) je konvertováno pouze 10 % dusičnanu na dusitan, s rostoucím pH roztoku účinnost konverze roste a při pH 12,5 je konvertováno na dusitan 35 % dusičnanu. Předpokládá se, že tato poměrně nízká účinnost konverze dusičnanu na dusitan je způsobena zpětnou recombinační fotolýzou vzniklého dusitanu a rozpuštěného kyslíku pod UV lampou²². Přidávkem siřičitanu do nosné kapaliny, který reaguje s rozpuštěným kyslíkem, se zvýšil výtěžek konverze ve prospěch dusitanu. Optimální koncentrace siřičitanu je 0,002 mol.l⁻¹, účinnost konverze dusičnanu na dusitan vzrostla na 63 %.

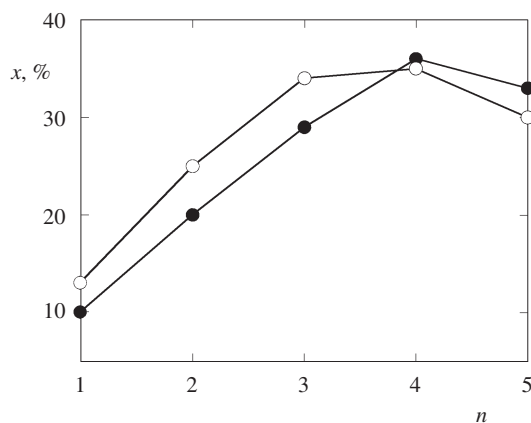
Interference

Při stanovení dusitanu na základě chemiluminiscenční reakce peroxidusitanu s luminolem interferují různé kationty a anionty²⁴. Interference kationtů je eliminována prosáváním vzorku přes kolonu s katexem umístěnou na vstupu vzorku do dávkovacího ventilu. Běžné anionty, jako jsou chloridy, hydrogenuhličitan, fosforečnan, sírany, hydrogensířičitan a bromidy v koncentraci 10⁻⁷–10⁻⁴ M stanovení dusičnanu navrženým postupem neovlivňují. Pozitivní interferenci (20 %) vykazoval pouze chlornanový anion; to je důsledkem přímé reakce chlornanu s luminolem.

Analytická charakterizace metody

Detekční limit stanovení dusičnanu je 2. 10⁻⁷ M (0,013 mg.l⁻¹ NO₃⁻) pro poměr signál/šum = 3. Citlivost metody tedy zcela vyhovuje pro stanovení dusičnanu v pitné vodě, ale i v dalších vzorcích povrchových vod (dle čs. normy je max. obsah dusičnanu v pitné vodě 50 mg NaNO₃, tj. ≈ 5.10⁻⁴ M). Kalibrační graf dusičnanu byl měřen v rozmezí 2.10⁻⁷–1.10⁻⁵ M, graf je lineární v celém studovaném rozsahu.

Stupeň konverze dusičnanu (63 %) je konstantní v celém studovaném rozsahu. Relativní standardní odchylka (*n* = 10), počítaná z výšky píků, je 2,3 % pro 1.10⁻⁶ M roztok dusičnanu a 1,6 % pro 5.10⁻⁶ M-NO₃⁻. Doba analýzy je 5 min.



Obr. 2. Závislost konverze dusičnanu *x* (%) na dusitan na počtu *n* křemenných kapilár a průtoku nosné kapaliny; 1.10⁻⁶ M-NO₃⁻; kapilára: vnitřní průměr 750 μm, délka 55 mm; průtok nosné kapaliny: ● 60 μl.min⁻¹, ○ 100 μl.min⁻¹

Tabulka I
Analýza dusičnanů v různých vodách

Vzorek vody	Koncentrace dusičnanů [mg.l ⁻¹] ^a	
	A	B
Pitná voda I	24,6	21,1
Pitná voda II	39,3	34,8
Studna I	105,8	107,2
Studna II	63,1	61,5
Minerální voda Mattoni	0,71	0,22
„Dobrá voda“	0,07	0,09
Stolní voda JASO	9,8	10,3
Dešťová voda	0,65	0,69
Spodní voda	95,2	91,5
Ríční voda (Svratka)	23,2	21,8

^a A – navržená metoda, B – referenční metoda (LC)

Analýza reálných vzorků

Navržená metoda byla použita při stanovení dusičnanů v různých vzorcích vod. Vzorky byly paralelně analyzovány i referenční chromatografickou metodou. Výsledky uvedené v tabulce I ilustrují dobrou shodu výsledků mezi navrženou a referenční metodou.

Závěr

Je popsána jednoduchá a rychlá metoda FIA umožňující automatizované a citlivé stanovení dusičnanu v pitné, podzemní i povrchové vodě. Metoda je založena na kombinaci fotolytické on-line konverze dusičnanu v křemenné kapiláře a následného chemiluminiscenčního stanovení vzniklého dusitanu. Fotolytická konverze nabízí ekologický způsob stanovení dusičnanu ve srovnání s metodou založenou na redukci dusičnanu na koloně s poměděným kadmíem.

Detekční limit dusičnanu je $2 \cdot 10^{-7}$ M, kalibrační křivka je lineární do $1 \cdot 10^{-5}$ M. Účinnost konverze dusičnanu na dusitan je 63 %. Metodu lze použít pro současné stanovení dusičnanu a dusitanu ve vodě.

Tato práce byla podporována Grantovou agenturou Akademie věd ČR v rámci projektu IAA4031105, grantem 203/98/0943 Grantové agentury ČR a grantem č. EVK2-CT-1999-0052 SUB-AERO of 5th Framework Program Commission of the European Communities.

LITERATURA

- Puckett L. J.: Environ. Sci. Technol. 29, 408A (1995).
- Radojević M.: Atmos. Environ. 20, 1309 (1986).
- Knotek Z., Schmidt P.: *Dusičnanová alimentární methemoglobinémie*. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha 1965.
- Bruning-Fann C. S., Kaneene J. B.: Vet. Hum. Toxicol. 35, 521 (1993).
- Scheiner D.: Water Res. 8, 835 (1974).
- West P. W., Ramachandran T. P.: Anal. Chim. Acta 35, 317 (1966).
- Langmaier J.: Chem. Listy 84, 697 (1989).
- Nygaard D. D.: Anal. Chim. Acta 130, 391 (1981).
- Mou S., Wang H., Sun Q.: J. Chromatogr. 640, 161 (1993).
- Lookabaugh M., Krull I. S.: J. Chromatogr. 452, 295 (1988).
- Okemgbo A. A., Hill H. H., Siems W. F., Metcalf S. G.: Anal. Chem. 71, 2725 (1999).
- Elliot C. L., Snyder G. H., Cisar J. L.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. 20, 1873 (1989).
- Anderson L.: Anal. Chim. Acta 110, 123 (1979).
- Oms M. T., Cerdà A., Cerdà V.: Anal. Chim. Acta 315, 321 (1995).
- Giné M. F., Bergamin H. F., Zagatto E. A. G., Reis B. F.: Anal. Chim. Acta 114, 191 (1980).
- van Staden J. F.: Anal. Chim. Acta 138, 403 (1982).
- Maimó J., Cladera A., Mas F., Forteza R., Estela J. M., Cerdà V.: Int. J. Environ. Anal. Chem. 35, 161 (1989).
- Pai S. C., Riley J. P.: Int. J. Environ. Anal. Chem. 57, 263 (1994).
- Kamphake L. J., Hannah S. A., Cohen J. M.: Water. Res. 1, 204 (1967).
- Růžička J., Hansen E. H.: Anal. Chim. Acta 114, 19 (1980).
- Takeda K., Fujiwara K.: Anal. Chim. Acta 276, 25 (1993).
- Motomizu S., Sanada M.: Anal. Chim. Acta 308, 406 (1995).
- Martínez Calatayud J. M., García Mateo J. V. G., David V.: Analyst 123, 429 (1998).
- Mikuška P., Zdráhal Z., Večeřa Z.: Anal. Chim. Acta 316, 261 (1995).
- Daniels M., Meyers R. V., Belardo E. V.: J. Phys. Chem. 72, 389 (1968).
- Mack J., Bolton J. R.: J. Photochem. Photobiol., A 128, 1 (1999).
- Mark G., Korth H. G., Schuchmann H. P., von Sonntag C.: J. Photochem. Photobiol., A 101, 89 (1996).

P. Mikuška and Z. Večeřa (Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno):
Chemiluminescent Flow Determination of Nitrates in Water

A fast and simple flow-injection method for sensitive automated determination of nitrates in various water samples is described. The method is based on the on-line photolytic conversion of nitrate in a quartz capillary to nitrite, which is determined by a chemiluminescent reaction. The photolytic conversion provides ecological detection of nitrate as compared with nitrate reduction at coppered cadmium.

The detection limit is 2×10^{-7} M nitrate, the calibration curve is linear to 1×10^{-5} mol.l⁻¹. The efficiency of conversion of nitrate to nitrite is 63 %. The method is usable for the simultaneous determination of nitrate and nitrite in water.