

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

KINETICKÉ STANOVENÍ DUSITANŮ SE SPEKTROFOTOMETRICKOU DETEKČÍ

Kinetic Determination of Nitrites
with Spectrophotometric Detection

Bakalářská práce
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Pavla Vašíčková

-
- Název práce: Kinetické stanovení dusitanů se spektrofotometrickou detekcí
- Abstrakt: Cílem této bakalářské práce bylo navrhnout a optimalizovat metodu pro kinetické stanovení dusitanů ve vzorku vody. Stanovení je založeno na schopnosti dusitanů katalyzovat oxidaci toluidinové modři bromičnanem v kyselém prostředí. Průběh reakce je sledován spektrofotometricky, kdy je měřen pokles absorbance v konstantním časovém úseku od zahájení reakce při 635 nm. Byla navržena a optimalizována FIA aparatura se dvěma nosnými proudy. Byla proměřena kalibrační závislost v rozsahu koncentrací dusitanů 0,05–1,00 mg ml⁻¹ a vypočítán instrumentální limit detekce dusitanů na 0,038 mg ml⁻¹, a limit kvantifikace dusitanů 0,125 mg ml⁻¹. Metoda byla použita pro stanovení obsahu dusitanů v reálném vzorku říční vody.
- Klíčová slova: dusitany, injekční průtoková analýza, kinetické katalytické metody
- Title: Kinetic determination of nitrites with spectrophotometric detection
- Annotation: The proposal and optimization of the kinetic determination of nitrites in water samples is the aim of this bachelor thesis. The method is based on the ability of nitrites to catalyze the oxidation of toluidine blue by bromate in acidic media. The course of the reaction is monitored by spectrophotometrically, using a decrease of the absorbance band at 635 nm in the constant period of time from the beginning of the reaction. The dual-channel manifolds FIA apparatus was proposed and optimized. The calibration dependency in the range of 0,05–1,00 mg ml⁻¹ was measured. The instrumental limit of detection of 0,038 mg ml⁻¹ and limit of quantification of 0,125 mg ml⁻¹ were calculated. The method was applied on real sample of river water.
- Key words: nitrites, flow-injection analysis, kinetic catalytic methods

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Karla Nesměráka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 25. srpna 2010.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., za ochotu a trpělivost, cenné rady a předané zkušenosti. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| | Seznam použitých zkratk a symbolů | 6 |
| 1 | Úvod, cíl práce | 7 |
| 2 | Teoretický úvod | 8 |
| 2.1 | Dusitany | 8 |
| 2.1.1 | Vlastnosti, příprava a výskyt a využití dusitanů | 8 |
| 2.1.2 | Toxicita, expozice a limitní hodnoty dusitanů | 9 |
| 2.1.3 | Metody stanovení dusitanů | 10 |
| 2.2 | Kinetické metody chemické analýzy | 11 |
| 2.2.1 | Katalytické metody kinetické analýzy | 11 |
| 2.2.2 | Kinetické metody pro stanovení dusitanů | 15 |
| 2.3 | Injekční průtoková analýza | 15 |
| 3 | Experimentální část | 18 |
| 3.1 | Použité chemikálie | 18 |
| 3.2 | Použité přístroje a metody měření | 18 |
| 3.3 | Zpracování dat | 19 |
| 4 | Výsledky a diskuse | 20 |
| 4.1 | Vsádkové měření | 20 |
| 4.2 | Injekční průtoková analýza | 24 |
| 4.2.1 | Optimalizace stanovení | 24 |
| 4.2.2 | Kalibrační závislost | 25 |
| 4.2.3 | Analýza reálného vzorku | 26 |
| 5 | Závěr | 27 |
| | Literatura | 28 |

Seznam použitých zkratek a symbolů

| | | |
|-------------------------|--|--------------------------------------|
| A | absorbance | |
| $[A]_0$ | počáteční koncentrace reagentu A | $[\text{mol dm}^{-3}]$ |
| $[B]_0$ | počáteční koncentrace reagentu B | $[\text{mol dm}^{-3}]$ |
| $[B]_t$ | koncentrace reagentu B v čase t | $[\text{mol dm}^{-3}]$ |
| $[C]_0$ | počáteční koncentrace katalyzátoru | $[\text{mol dm}^{-3}]$ |
| $[Y]_t$ | koncentrace produktu Y v čase t | $[\text{mol dm}^{-3}]$ |
| A, B | reagenty | |
| C | katalyzátor | |
| c | koncentrace analytu | $[\text{mg ml}^{-1}]$ |
| CA | přechodný komplex katalyzátoru C s reagentem A | |
| f | funkce katalyzované reakce | |
| f' | funkce nekatalyzované reakce | |
| FIA | injekční průtoková analýza (z angl. flow injection analysis) | |
| h | výška FIA píku | |
| ILD | instrumentální limit detekce | $[\text{mg ml}^{-1}]$ |
| K | komplexní hodnota rychlostních konstant | |
| k_1, k_{-1}, k_2, k_3 | rychlostní konstanty | |
| LOQ | limit kvantifikace | $[\text{mg ml}^{-1}]$ |
| MB | methylenová modř | |
| S_{max} | maximální frekvence dávkování vzorku | $[\text{hod}^{-1}]$ |
| t | čas | $[\text{s}]$ |
| T | čas potřebný k dosažení maximálního signálu | $[\text{s}]$ |
| t' | časový rozdíl maximálního signálu a přední hrany toku | $[\text{s}]$ |
| T' | čas od maximálního signálu po konec detekce | $[\text{s}]$ |
| t_a | čas potřebný k dosažení přední hrany toku k detektoru | $[\text{s}]$ |
| UV-VIS | ultrafialová a viditelná oblast spektra | |
| v | rychlost katalyzované reakce | $[\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}]$ |
| X, Y | produkty | |
| α_c | komplexní hodnota koncentračních členů | |
| λ | vlnová délka | $[\text{nm}]$ |
| Δt | čas vzorku strávený v detektoru | $[\text{s}]$ |

1 ÚVOD, CÍL PRÁCE

Dusitany jsou ve větším množství toxické látky, proto se sleduje jejich obsah v pitné vodě a v potravinách, především v mase. Stanovení obsahu dusitanů je rovněž důležité pro objasnění chování a osudu dusíkatých sloučenin v životním prostředí.

Cílem mé bakalářské práce je navrhnout a optimalizovat metodu pro kinetické stanovení dusitanů se spektrofotometrickou detekcí. Při této metodě se využije schopnosti dusitanů katalyzovat oxidaci toluidinové modři bromičnanovým aniontem v kyselém prostředí. Díky modrému zabarvení roztoku lze ve viditelné oblasti spektra zaznamenat změnu (pokles) absorbance, na základě které se stanoví množství dusitanů ve vzorku.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Dusitany

2.1.1 Vlastnosti, příprava a výskyt a využití dusitanů

Dusitany jsou sloučeniny obsahující iont NO_2^- (cit. [1, 2]). Jsou odvozeny od kyseliny dusité, ale vykazují vyšší stabilitu než samotná kyselina dusitá. Dusitany jsou silnými oxidačními činidly, proto se snadno rozkládají při smíšení s hořlavými materiály, redukčními činidly a s kovy v prášku. Dusitan sodný není hořlavý, nicméně může zvýšit hořlavost jiných látek. Přídavek i slabé kyseliny (např. octové kyseliny) k dusitanům vede k jejich rozkladu za vývoje nitrosních plynů. Dusitany alkalických kovů mohou být taveny, aniž by docházelo k jejich rozkladu.

Dusitany se připravují zavedením ekvimolárního množství oxidu dusnatého a oxidu dusičitého do roztoku hydroxidu sodného



nebo redukcí dusičnanů olovem za tepla



Dusitany se spolu s dusičnany přirozeně vyskytují v podzemních a povrchových vodách a v půdě. Odpadní látky obsahující organický dusík jsou bakteriemi v půdě nebo ve vodě rozloženy na amoniak, poté oxidovány na dusitany a dusičnany (část koloběhu dusíku v přírodě). Dusitany také vznikají jako meziproduct při mikrobiální redukcí dusičnanů. Dusitany jsou ve vodním prostředí snadno oxidovány na dusičnany, koncentrace dusičnanů ve vodách je proto vyšší [3]. Obsah dusitanů v neznečištěných povrchových a podzemních vodách je velice nízký, obecně nižší než 2 ppb. Vyšší koncentrace dusitanů se mohou objevit blízko odpadních vývodů továren (potravinářský nebo hutnický průmysl) [4].

V lékařství se dusitany používají jako vazodilátory, jako protijed při otravě kyanidem nebo sulfanem a ke snížení křečového napětí hladkého svalstva. V potravinářském průmyslu se používají jako přísada pro konzervaci barvy masa. Dusitan sodný je přidáván jako antikoroziční složka do chladicích kapalin. Největší využití mají dusitany jako umělá hnojiva [3].

2.1.2 Toxicita, expozice a limitní hodnoty dusitanů

Dusitany patří do skupiny hematotoxických látek [3]. Působením dusitanů se dvojmocné železo hemoglobinu oxiduje na trojmocné. Vzniklý methemoglobin není schopen snadno vázat kyslík reverzibilní vazbou a navíc znesnadňuje uvolňování kyslíku z oxyhemoglobinu. Důsledkem toho se sníží množství kyslíku přenášeného krví do tkání a vzniká methemoglobinemie. Projevy methemoglobinemie jsou zkrácené dýchání, cyanóza, bolest hlavy, nechutenství a závratě. Smrtný podíl přeměněného methemoglobinu je 60–80 % z celkového množství hemoglobinu. Při methemoglobinemii je nutné odstranit škodlivou látku (v tomto případě dusitany) z organismu, aby se methemoglobin mohl působením enzymů zredukovat zpět na hemoglobin. Při ohrožení života lze tuto redukci urychlit intravenózním podáním toluidinové modři [5]. Kojenci jsou více citliví na toxicitu dusitanů a dusičnanů než dospělí, jelikož mají vyšší obsah střevní flóry (redukující dusičnany na dusitany) a nižší enzymovou schopnost redukovat methemoglobin na hemoglobin. Navíc hemoglobin F vyskytující se u dětí (tzv. fetal hemoglobin), je dusitany dvakrát rychleji přeměňován na methemoglobin než hemoglobin A (adult hemoglobin) dospělých. Kojenecká voda a voda používaná při výrobě dětské výživy se proto vyznačuje nejnižším obsahem dusitanů [3]. Akutní expozice vysokými dávkami dusitanů může způsobit poškození zraku, hypotenzi, zrychlení srdeční činnosti, dýchací potíže, cyanózu (jako důsledek methemoglobinemie) a ve fatálních případech smrt. Chronická expozice v dostatečně vysokých dávkách dusitanů a dusičnanů může způsobit zvýšení diurézy a krvácení do sleziny. Samotné dusitany nejsou řazeny mezi karcinogeny, ale v žaludku se z důvodu nízké hodnoty pH přeměňují na kyselinu dusitou, která reaguje se sekundárními aminy za vzniku N-nitrosaminů, které jsou prokázanými karcinogeny a mutageny [4]. Kyselina askorbová (vitamin C) omezuje přeměnu dusitanů na nitrosaminy, proto se přidává do některých potravin spolu s dusitany. Chronická dávka při orálním podání u dusitanů činí 0,1 mg kg⁻¹ váhy na den [3].

Expozice dusitanů může být orální, dermální, oční nebo inhalační. Dusitany mohou být přijímány v potravě, především v konzervovaném mase a zelenině (zejména brokolice, špenát, květák, kapusta a kořenová zelenina) a znečištěné pitné vodě. Dusitany přijaté potravou jsou absorbovány v tenkém střevě a poté jsou rychle distribuovány do organismu. Dusitany jsou metabolizovány v játrech, většina je vyloučena močí. Toxické působení dusitanů na organismus je obdobné při všech expozicích, stejně tak při jejich vzniku *in vivo* přeměnou z dusičnanů. Dusičnany přijaté potravou jsou metabolizovány a vyloučeny bez nežádoucích účinků, pokud nejsou zredukovány na dusitany (např. působením střevní flóry, vlivem vysokého pH) [3].

Maximální povolená koncentrace dusitanů v pitné vodě je 0,1 mg l⁻¹, mezní hranice dusičnanů je 50 mg l⁻¹ (cit. [6]), navíc musí být dodržena podmínka, aby součet jedné padesátiny obsahu dusičnanů v mg l⁻¹ a jedné třetiny obsahu dusitanů v mg l⁻¹ byl menší nebo roven 1, jak vyjadřuje následující rovnice

$$\frac{[\text{NO}_3^-](\text{mg l}^{-1})}{50} + \frac{[\text{NO}_2^-](\text{mg l}^{-1})}{3} \leq 1 \text{ mg l}^{-1} \quad (2.3)$$

Součet poměrů odpovídá svým významem nejvyšší mezní hodnotě. Obsah dusitanů v pitné vodě na výstupu z úpravný musí být nižší než 0,1 mg l⁻¹. Při konzervování masných výrobků nesmí celkový obsah dusitanů a dusičnanů přesáhnout hodnotu 200 ppm [3].

2.1.3 Metody stanovení dusitanů

Nejčastější metodou pro stanovení dusitanů je spektrofotometrické stanovení založené na diazotaci a následné kopulační reakci [7]. Dusitany reagují s primárními aromatickými aminy v kyselém prostředí (nejběžněji kyselina sulfanilová v prostředí octové kyseliny) za vzniku diazoniové soli. Diazoniová sůl poté reaguje s aromatickou sloučeninou obsahující hydroxylovou nebo amino skupinu (např. 1-naftylamin). Vzniká azobarvivo, které je vhodné pro další fotometrické měření. Reakce je zcela specifická, má několik modifikací jak u diazotační, tak u kopulační reakce. Existuje i řada jiných metod pro stanovení dusitanů. Mezi metody využívané především v minulosti se řadí titrace (manganometrie, jodometrie, alkalimetrie a řada dalších), gravimetrie, polarografie či gasometrie. Přehled metod stanovení dusitanů v různých typech vzorků používaných v současnosti je uveden v tab. 2.1. Pro stanovení dusitanů byla navržena i celá řada kinetických metod, podrobnosti jsou diskutovány níže v kap. 2.2.2.

Tabulka 2.1

Přehled metod pro stanovení dusitanů v různých typech vzorků

| metoda | vzorky | limit detekce | lit. |
|---|--|---------------|------|
| redukce dusitanů vanaditým kationtem na oxid dusný a jeho následná chemiluminiscenční detekce | přírodní vody, sedimenty, části rostlin, biologické tekutiny (krev, moč) | v řádech ppb | [8] |
| potenciometrické stanovení dusitanovou ISE | maso | 180 ppb | [9] |
| iontově výměnná chromatografie | kultivační medium (živná půda) | 10 ppb | [10] |
| iontově výměnná chromatografie | sliny, potraviny | 20 ppb | [11] |
| spektrofotometrické stanovení s užitím prekoncentrace na tuhé fázi | přírodní voda | 5 ppb | [12] |

2.2 Kinetické metody chemické analýzy

Na rozdíl od rovnovážných stanovení se při kinetických metodách chemické analýzy sleduje změna signálu s časem, plynoucí ze změny reakční rychlosti vhodné chemické reakce. Výhodou těchto analýz je možnost stanovení více podobných analytů vedle sebe bez separace – kinetické metody nekatalytické, nebo stanovení nízkých koncentrací, kdy analyt je katalyzátorem vhodné reakce – katalytické metody kinetické analýzy [13].

2.2.1 Katalytické metody kinetické analýzy

Při katalytických metodách kinetické analýzy vystupuje analyt v roli katalyzátoru vhodné chemické reakce. Využívá se toho, že v katalytických reakcích je reakční rychlost katalyzované reakce přímo úměrná koncentraci katalyzátoru. Protože u katalýzy může být množství stanovované látky (katalyzátoru) mnohem menší, než jaké by bylo možno určit pomocí klasických analytických metod, lze katalytické metody kinetické analýzy využít pro stanovení stopových množství látek. Katalytické kinetické metody mají vysokou citlivost, nízký detekční limit a dobrou selektivitu.

Katalyzátor je chemická látka urychlující reakci tím, že umožní reakci jinou cestu, která má značně nižší aktivační energii, aniž by ovlivnila polohu její rovnováhy. Katalyzátor není v důsledku cyklického mechanismu reakce trvale změněn. Nejjednodušší typ mechanismu katalýzy lze znázornit pomocí následujícího schématu



kde C označuje katalyzátor, A reagent tvořící s katalyzátorem přechodný komplex CA, Y je případný produkt tvořící se kromě komplexu CA, B je druhý reagent, který reaguje s komplexem CA za vzniku produktu X. Konstanty k_1 a k_2 jsou rychlostní konstanty první, resp. druhé reakce a konstanta k_{-1} je rychlostní konstanta rozpadu komplexu CA zpět na výchozí katalyzátor a reagent A.

Pro určení množství katalyzátoru pomocí kinetických metod je nutno měřit rychlost katalyzované reakce. Pro výše uvedené schéma reakce katalýzy odpovídá následující rovnice vyjadřující reakční rychlost

$$\left(\frac{dx}{dt} \right)_{\text{kat.}} = \frac{k_1 k_2 [\text{C}]_0 [\text{A}]_0 [\text{B}]_t}{k_1 ([\text{C}]_0 + [\text{A}]_0) + k_{-1} [\text{Y}]_t + k_2 [\text{B}]_t} \tag{2.5}$$

kde $[C]_0$, resp. $[A]_0$, jsou počáteční koncentrace katalyzátoru resp. substrátu, $[B]_t$, resp. $[Y]_t$, jsou koncentrace reagentu resp. látky Y v čase t . Tento rychlostní výraz může být dále pro praktické využití zjednodušen na obecnou formu pro vyjádření rychlosti katalyzované reakce

$$\left(\frac{dx}{dt}\right)_{\text{kat.}} = K\alpha_c[C]_0[B]_t \quad (2.6)$$

kde výraz K zahrnuje všechny rychlostní konstanty, α_c je komplexní hodnota koncentračních členů $[C]_0$ a $[A]_0$. Pro většinu katalyzovaných reakcí platí, že látka A může reagovat s látkou B také bez přítomnosti katalyzátoru



Rychlost této reakce, probíhající současně s katalyzovanou reakcí je dána výrazem

$$\left(\frac{dx}{dt}\right)_{\text{nekat.}} = k_3[A]_0[B]_t \quad (2.8)$$

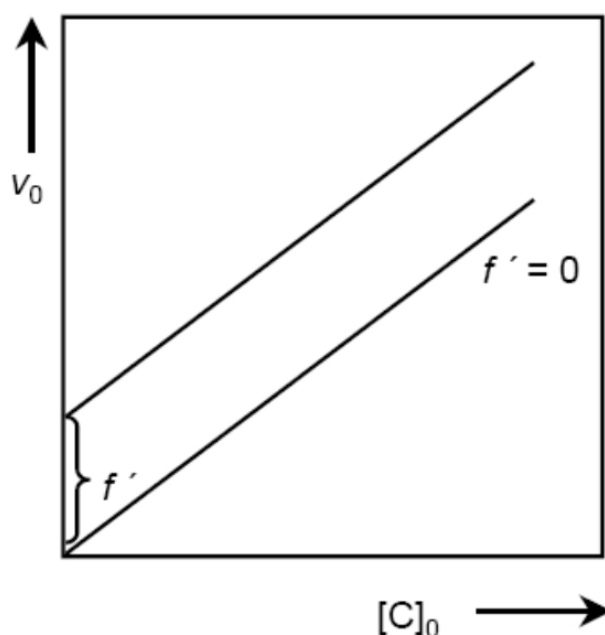
kde k_3 značí rychlostní konstantu nekatalyzované reakce (2.7). Celková rychlost současně probíhajících reakcí (2.4) a (2.7) je potom

$$\left(\frac{dx}{dt}\right)_{\text{celk.}} = \left(\frac{dx}{dt}\right)_{\text{kat.}} + \left(\frac{dx}{dt}\right)_{\text{nekat.}} = K\alpha_c[C]_0[B]_t + k_3[A]_0[B]_t \quad (2.9)$$

Pro praktické měření reakční rychlosti, resp. koncentrace katalyzátoru, byly z rovnice (2.9) odvozeny metody diferenciální nebo integrační (které jsou méně často využívané). Při diferenciálních metodách, nazývaných též metody počáteční reakční rychlosti, se derivace nahrazují měřením diferencí. Zavedením zjednodušujícího předpokladu, že na počátku reakce je úbytek reaktantu B minimální, takže $[B]_t \approx [B]_0$, lze rovnici (2.9) zjednodušit na tvar

$$\left(\frac{dx}{dt}\right)_{\text{celk.}} = f[C]_0 + f' \quad (2.10)$$

Tato rovnice může být reprezentována přímkou (obr. 2.1), jejíž směrnice odpovídá rychlostním konstantám a počátečním koncentracím reaktantů a úsek je dán rychlostí nekatalyzované reakce reaktantů.



Obr. 2.1 Závislost rychlosti katalyzované chemické reakce na koncentraci katalyzátoru (grafické znázornění rovnice (2.10), f' je rychlost nekatalyzované reakce.

Předností metod počáteční reakční rychlosti je zejména malá koncentrace vznikajících produktů (takže nedochází ke komplikacím typu zpětných reakcí nebo bočních reakcí), dále koncentrace reaktantů $[A]$ a $[B]$ jsou prakticky konstantní (lze tedy uplatnit nejjednodušší kinetiku nultého řádu), z čehož plyne vyšší reprodukovatelnost měření a jednodušší interpretace dat. V praktickém měření se derivace v rovnici (2.10) nahradí diferencí

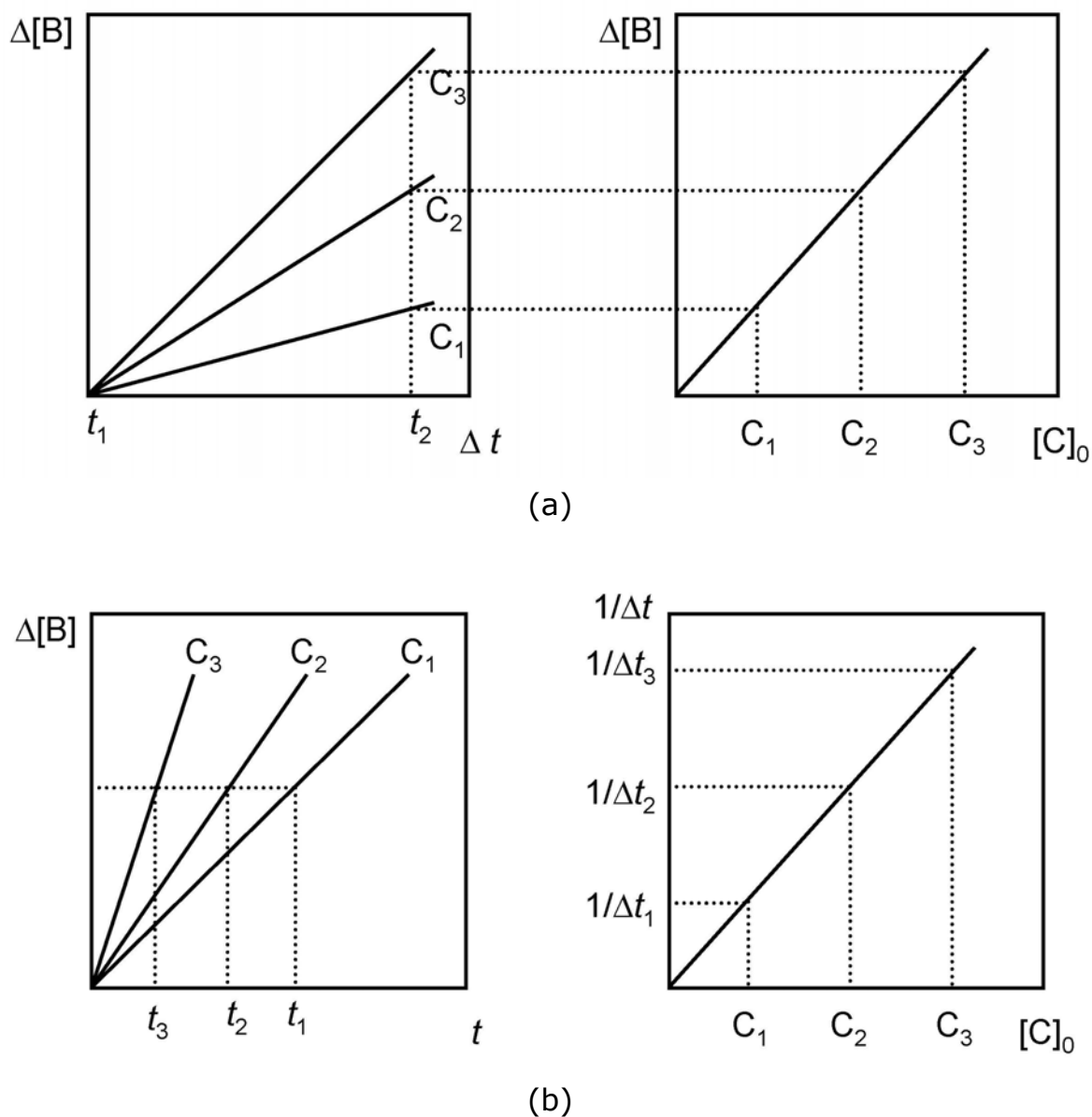
$$\left(\frac{\Delta x}{\Delta t}\right)_{\text{celk.}} = f[C]_0 + f' \quad (2.11)$$

Z rovnice (2.11) plynou dvě možnosti měření, a to

a) metoda konstantního času, při níž se měří změna koncentrace jednoho z reaktantů či produktu za konstantní časový úsek v závislosti na koncentraci katalyzátoru, tedy rovnice (2.11) přejde do tvaru

$$\Delta x = (f[C]_0 + f')\Delta t \quad (2.12)$$

měření se obvykle realizuje pomocí kalibrace, obr. 2.2.



Obr. 2.2 Kalibrační grafy pro stanovení katalyzátoru metodou počátečních reakčních rychlostí

(a) metoda konstantního času (grafické vyjádření rovnice (2.12),

(b) metoda konstantní koncentrace (grafické vyjádření rovnice (2.13)).

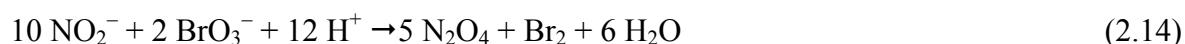
b) metoda konstantní koncentrace, při níž se měří doba, za níž se vytvoří konstantní změna koncentrace jednoho z reaktantů či produktu v závislosti na koncentraci katalyzátoru, tedy rovnice (2.11) přejde do tvaru

$$\frac{1}{\Delta t} = \frac{f[C]_0 + f'}{\Delta x} \quad (2.13)$$

měření se obvykle realizuje pomocí kalibrace, obr. 2.2.

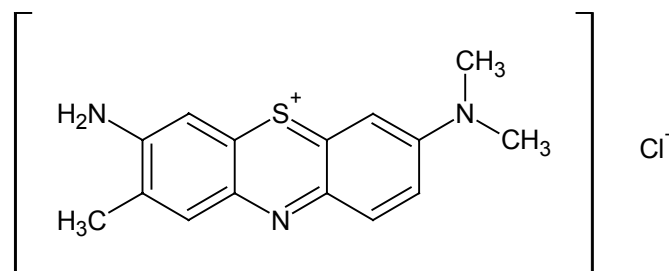
2.2.2 Kinetické metody pro stanovení dusitanů

Stanovení dusitanů pomocí katalytické kinetické chemické analýzy je založeno na jejich schopnosti katalyzovat oxidaci vhodného organického barviva v přítomnosti vhodného oxidačního činidla v kyselém prostředí. Základní princip navržený Fiddlerem a kol. [14] může být popsán následujícími rovnicemi



kde MB je methylenová modř. Kromě methylenové modři byla navržena řada modifikací využívajících jiná barviva jako karmínovou kyselinu [15], gallocyanin [16], chlorpromazin [17], methylovou červeň [18] a další.

V této bakalářské práci byla jako vhodné organické barvivo (na základě strukturní podobnosti s výše využívanými barvivy) pro stanovení dusitanů katalytickou kinetickou metodou vybrána toluidinová modř. Toluidinová modř, systematicky 3-amino-7-(dimethylamino)-2-methyl-fenothiazin-5-ium chlorid (obr. 2.3), je homologem alizarinových brilantních zelení [19]. Patří mezi kyselá antrachinonová barviva. Přípravuje se kondenzací 1,5-dihydroxyantrachinonu s *p*-toluidinem a následující sulfonací. V analytické chemii se využívá při spektrofotometrických stanoveních a při přípravě modifikovaných elektrod. V barvířství se pro svoji vynikající stálost na světle i ve vlhkém prostředí využívá k barvení živočišných vláken (vlna, hedvábí) a některých syntetických vláken (polyamid).

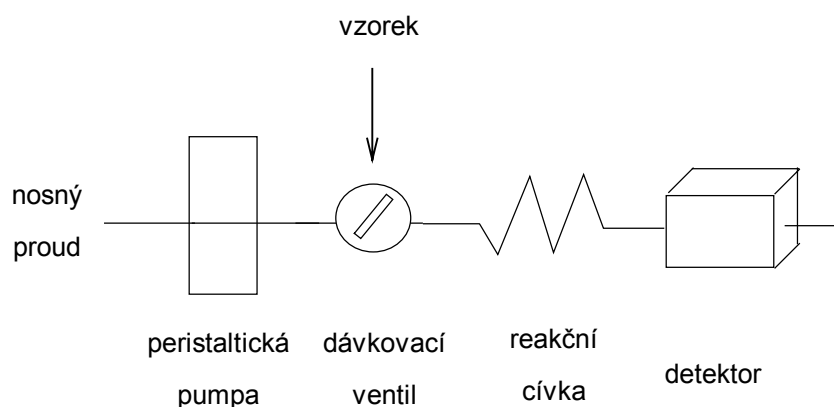


Obr. 2.3 Strukturální vzorec toluidinové modři

2.3 Injekční průtoková analýza

Kinetické měření může být realizováno řadou způsobů [13]. Nejjednodušším je vsádkový způsob, při němž se do vhodného reaktoru nadávkuje vzorek i činidla a následně se vhodnou instrumentální technikou (spektrometrickou či elektrochemickou) sleduje změna koncentrace reaktantu či produktu. Hlavním problémem vsádkového způsobu kinetických měření je malá reprodukovatelnost smíchání reagentů se vzorkem z čehož plyne snížení reprodukovatelnosti měření.

Výše uvedenou nevýhodu vsádkového měření lze snadno potlačit převedením měření do módu injekční průtokové analýzy (FIA, z angl. flow injection analysis) [20]. Největší výhodou FIA je schopnost automatizace širokého rozsahu „mokrých chemických analýz“ s použitím jednoduché aparatury. Tento systém nahrazuje opakovanou manuální činnost (například dávkování činidel). Automatizace má oproti „ruční práci“ řadu výhod: je méně časově i fyzicky náročná; další výhodou je rychlé a opakovatelné míšení vzorku s reagenциemi uvnitř průtokového systému, tudíž bez kontaminace z okolního prostředí. Injekční průtoková analýza navíc poskytuje možnost měření velkého množství vzorků s nízkou spotřebou (v řádech μl) v krátkém časovém intervalu. Vlastní provedení FIA je založeno na dávkování vzorku do plynule proudícího toku nosného činidla či činidel. Nejjednodušší schéma aparatury FIA metody je zobrazeno na obr. 2.4. Je zde použit jeden kanál s jedním činidlem. Systém využívá peristaltickou pumpu, která čerpá činidlo ze zásobníku a pohání nosný proud činidla přes vstřikovací ventil, reakční cívku až k detektoru. Prvním krokem je nástřik přesného objemu vzorku (pomocí vstřikovacího ventilu) do proudícího toku činidla. Jakmile se zóna vzorku pohybuje po proudu, vzorek je rozptýlen a mísí se s činidlem, na jejichž rozhraní se vytváří produkt. Detektor zaznamenává změnu barvy nebo změnu jiného parametru při průchodu roztoku vzorku průtokovou celou. Disperzí samotné zóny vzorku je vytvořen koncentrační gradient, vzniklý profil vzorku je parabolický, což je zobrazeno přechodovým signálem po průchodu zóny vzorku detektorem. V důsledku koncentračního gradientu vzniká axiální (rovnoběžná) a radiální (kolmá) difúze, která přispívá k disperzi vzorku.

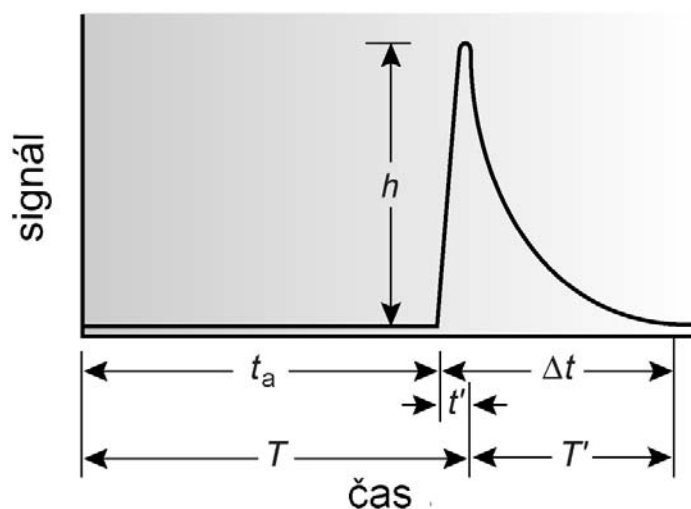


Obr. 2.4 Schéma uspořádání zařízení pro injekční průtokovou analýzu

Záznam přístroje je výsledkem dvou procesů probíhajících souběžně – disperzí vzorku a následné chemické reakce. Reakční čas a rozsah smíchání vzorku s činidlem jsou snadno kontrolovány pomocí nastavitelné průtokové rychlosti a délky reakční cívky. Udržením konstantní průtokové rychlosti je zajištěno, že časový interval mezi nadávkováním vzorku a detekcí analytu je reprodukovatelný. Všechny nadávkované roztoky vzorků a standardů

určené k analýze jsou zpracovány stejným způsobem. To dovoluje použití kalibrace ke stanovení neznámých vzorků, i když během chemické reakce nemusela být dosažena rovnováha.

Při použití FIA metody se sleduje závislost příslušného detekovaného signálu na čase. Grafické znázornění závislosti se nazývá FIA křivka (fiagram). Fiagram znázorněný na obr. 2.5 je charakterizován pomocí následujících veličin: t_a časový interval od nadávkování vzorku do okamžiku, kdy hrana profilu toku dorazí k detektoru, T čas potřebný k dosažení maximální odezvy, t' časový interval od dosažení přední hrany toku k detektoru po dosažení maximálního signálu ($t' = T - t_a$), T' uplynulý čas od hodnoty maximální odezvy po konec detekce, Δt celkový čas, který stráví vzorek v detektoru a h výška píku.



Obr. 2.5 Typická FIA křivka (fiagram) s charakteristickými parametry (upraveno podle [13]).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Jako modelový analyt byl použit dusitan sodný p.a. (Lachema). Zásobní roztok dusitanů o koncentraci 1 mg ml^{-1} byl připraven přesným odvážením 0,1500 g dusitanu sodného a jeho rozpuštěním v 1000 ml deionizované vody. K zvýšení stálosti byla do zásobního roztoku přidána jedna pecička pevného hydroxidu sodného.

Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty (p.a.): bromičnan draselný (Lachema, ČR), dusičnan draselný (Lachema, ČR), hydroxid sodný (Penta, ČR), kyselina sírová 96% (Lach-Ner, ČR) a toluidinová modř G (G.T.GURR, UK).

Jako reálný vzorek vody byla použita voda odebraná dne 16. května 2010 z říčky Rusavy ve městě Holešov (souřadnice: $49^{\circ}19'55''$ s. š., $17^{\circ}34'45''$ v. d.), do polyethylenové lahve. Lahev byla vodou několikrát vypláchnuta, naplněna po hrdlo a umístěna v chladničce při teplotě 4°C . Měření obsahu dusitanů bylo provedeno dne 24. května 2010.

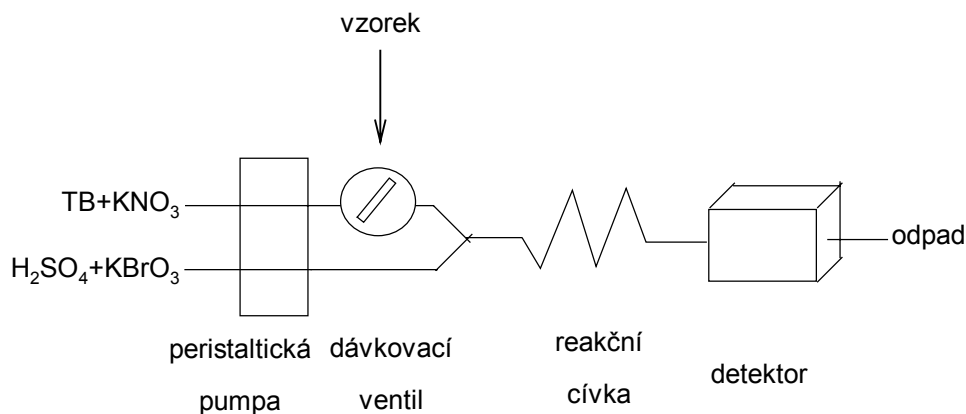
3.2 Použité přístroje a metody měření

Ke studiu kinetiky reakce byla použita spektrofotometrie. Všechna spektrofotometrická měření byla prováděna pomocí spektrofotometru s diodovým polem HP 8453 (Hewlett Packard) řízeným softwarem UV-Vis ChemStation.

Vsádkový způsob kinetického měření byl realizován v 1cm křemenné kyvetě upevněné v termostatovaném držáku kyvet s mícháním typ 89055A (Agilent). V kyvetě bylo magnetické míchadélko. Teplota kyvety byla udržována na $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ vodním termostatem U15 (Prüfgeräte-Werk, SRN).

Průtoková injekční analýza byla realizována v jednoduché FIA aparatuře, která využívala dva nosné proudy (obr. 3.1). První nosný proud obsahoval roztok toluidinové modři o koncentraci $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, který byl zároveň roztokem dusičnanu draselného o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$. Do tohoto nosného proudu byly dávkovány vzorky pomocí šesticestného dávkovacího ventilu V-450 (Upchurch Scientific) s dávkovacími smyčkami o objemu 30 nebo 100 μl . Druhý nosný proud obsahoval roztok bromičnanu draselného o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, který byl zároveň roztokem kyseliny sírové o koncentraci $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$. Oba proudy byly čerpány pomocí peristaltické pumpy MasterFlex (Cole-Palmer) čerpacími hadičkami Tygon R-3603 (Cole-Palmer). Průtoková rychlost obou nosných proudů byla $0,6 \text{ ml min}^{-1}$. Délka aparatury od smíchání obou nosných proudů k detektoru byla 50 cm, do této délky byla ale zařazována reakční cívka sestavená

navinutím hadičky Tygon R-3606 o délce 40 cm nebo 80 cm na trubici průměru 5 mm. Detekce byla prováděna pomocí spektrofotometru s diodovým polem HP 8453 (Hewlett Packard) s použitím křemenné průtokové kvyty o objemu 130 μl a délce optické dráhy 1 cm při vlnové délce 635 nm.



Obr. 3.1 Schéma FIA aparatury použité pro stanovení dusitanů kinetickou katalytickou metodou

3.3 Zpracování dat

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy na hladině 95% [20]. Veškerá presentovaná data jsou mediány nejméně tří měření. Ke zpracování dat byly použity software Origin 7.5 (Microcal Software, USA) a Microsoft Excel 2000.

Jako signál ve FIA měřeních byla zvolena výška FIA píků.

Lineární závislost dvou proměnných byla zpracována metodou lineární regrese se statistickým vyhodnocením v programu Microcal Origin 7.5. Instrumentální limit detekce (*ILD*), který představuje koncentraci, kdy lze ještě tvrdit, že je analyt přítomen, ovšem nelze určit jeho koncentraci, byl vypočítán z kalibrační křivky jako koncentrace odpovídající trojnásobku maximálního šumu základní linie fogramu změřeného po dobu pěti minut bez dávkování vzorku. Limit kvantifikace (*LOQ*), který představuje koncentraci, kdy lze již tvrdit, že je analyt přítomen v dané koncentraci, byl vypočítán jako 3,3 násobek instrumentálního limitu detekce. Maximální frekvence dávkování vzorku S_{\max} [hod^{-1}] byla vypočítána ze vztahu

$$S_{\max} = \frac{60}{\Delta t} \quad (3.1)$$

kde Δt je celkový čas, který stráví vzorek v detektoru (pro vzorek s nejvyšší koncentrací).

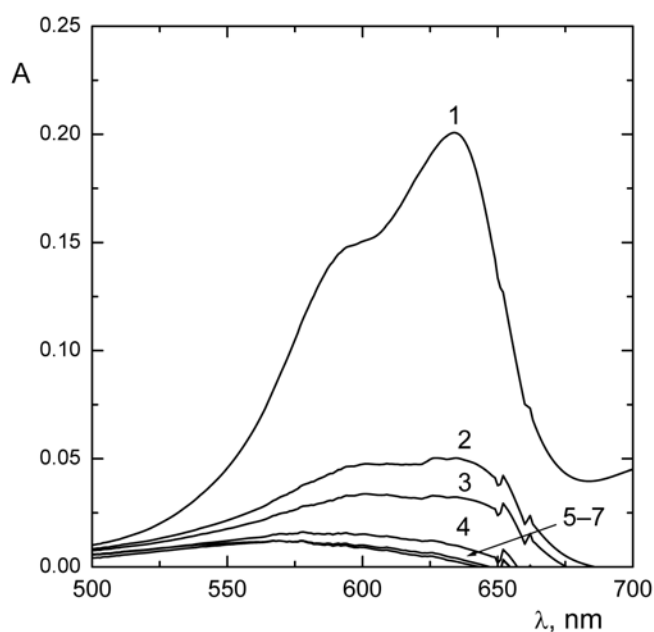
4 Výsledky a diskuse

4.1 Vsádkové měření

Podmínky vsádkového měření byly odvozeny na základě podmínek publikovaných v předchozích pracích [14–18]. Koncentrace jednotlivých reaktantů v reaktoru (kyvetě) byly nastaveny takto:

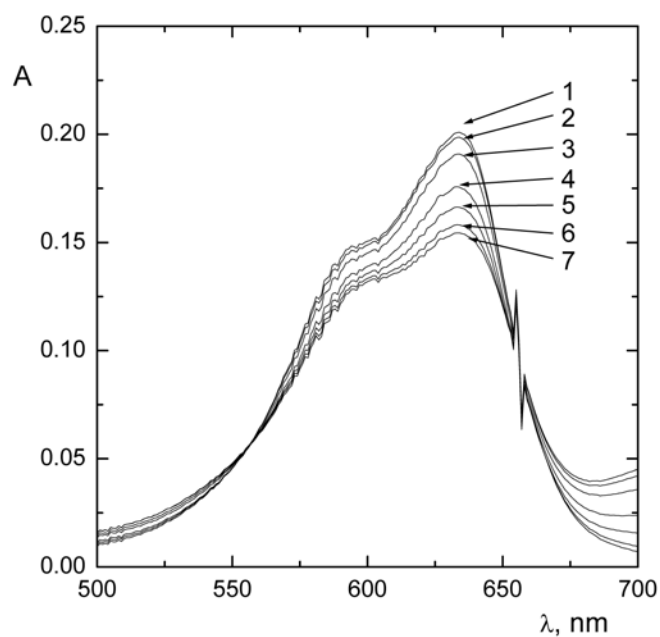
- toluidinová modř $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$
- kyselina sírová $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$
- dusičnan draselný (pro udržení konstantní iontové síly) $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$
- bromičnan draselný $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Vlastní měření bylo prováděno tak, že do měrné kyvety byly odpipetovány 2 ml směsného roztoku obsahujícího toluidinovou modř o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, kyselinu sírovou o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a zkoumaný vzorek dusitanů o koncentraci $0,0\text{--}1,0 \text{ mg ml}^{-1}$. Reakce byla zahájena přidávkem 20 μl roztoku bromičnanu draselného o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ (výsledná koncentrace v kyvetě se tedy rovnala $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). Následně byl měřen pokles absorbance toluidinové modři při vlnové délce 635 nm. Na obr. 4.1 je uveden příklad změn absorpčního spektra toluidinové modři při koncentraci dusitanu $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$.

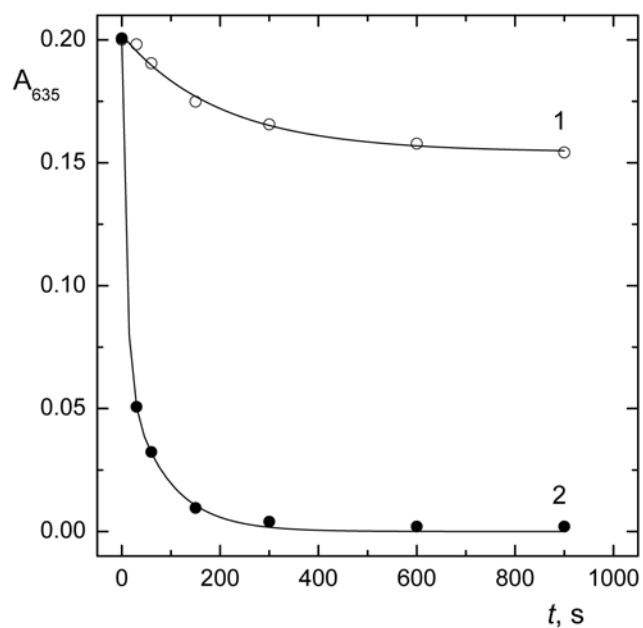


Obr. 4.1 Absorpční spektra průběhu oxidace toluidinové modři bromičnanem v kyselém prostředí katalyzované dusitanem. Čas od počátku reakce: (1) 0 s, (2) 30 s, (3) 60 s, (4) 150 s, (5) 300 s, (6) 600 s a (7) 900 s. (Měřeno v 1 cm kyvetě, složení roztoku: toluidinová modř 5×10^{-4} mol dm^{-3} , kyselina sírová 0,1 mol dm^{-3} , dusičnan draselný 0,5 mol dm^{-3} , bromičnan draselný 1×10^{-3} mol dm^{-3} , dusitany 0,25 mg ml^{-1}).

Při měření kalibračních závislostí poklesu maxima toluidinové modři při 635 nm na koncentraci dusitanů v koncentračním rozsahu 0,0–1,0 mg ml^{-1} však byla zjištěna značná nereprodukovatelnost dat. Dalším měřením bylo zjištěno, že důvodem je existence nekatalyzované reakce, tedy oxidace toluidinové modři bromičnanem v kyselém prostředí bez přítomnosti dusitanů (obr. 4.2). Rozdíl mezi rychlostí katalyzované a nekatalyzované oxidace toluidinové modři je znázorněn na obr. 4.3. K eliminaci možných časových vlivů od smíchání jednotlivých reagensů k zahájení měření byla celá metoda ze vsádkového způsobu převedena do módu průtokové injekční analýzy.



Obr. 4.2 Absorpční spektra průběhu oxidace toluidinové modři bromičnanem v kyselém prostředí bez přítomnosti dusitanů. Čas od počátku reakce: (1) 0 s, (2) 30 s, (3) 60 s, (4) 150 s, (5) 300 s, (6) 600 s a (7) 900 s. (Měřeno v 1 cm kyvetě, složení roztoku: toluidinová modř $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, kyselina sírová $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, dusičnan draselný $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, bromičnan draselný $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).



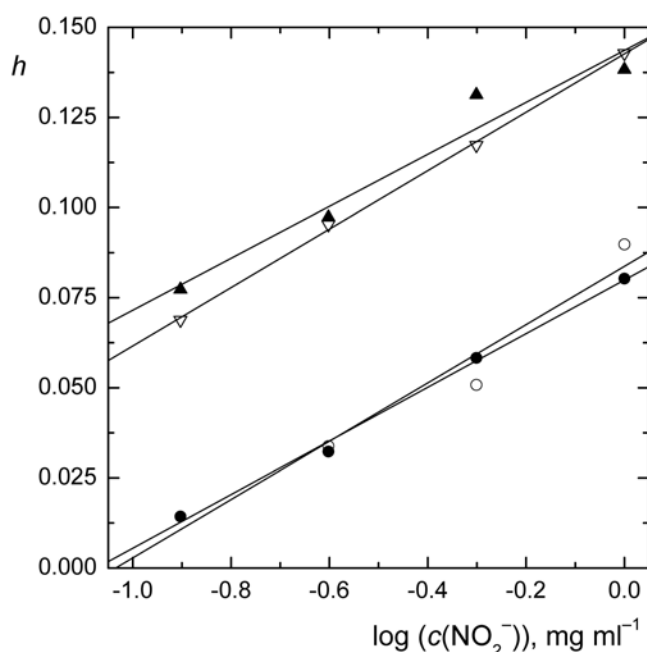
Obr. 4.3 Časová závislost absorpčního maxima toluidinové modři při 635 nm od počátku reakce pro (1) nekatalyzovanou oxidaci bromičnanem v kyselém prostředí, (2) katalyzovanou oxidaci bromičnanem v kyselém prostředí v přítomnosti dusitanů o koncentraci $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$. (Měřeno v 1 cm kyvetě, složení roztoku: toluidinová modř $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, kyselina sírová $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, dusičnan draselný $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, bromičnan draselný $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

4.2 Injekční průtoková analýza

4.2.1 Optimalizace stanovení

Měření ve FIA módu bylo realizováno v aparatuře se dvěma nosnými proudy popsané v kap. 3.2. Byl sledován vliv délky reakční cívky a dávkovaného objemu vzorku dusitanů na velikost analytického signálu (výšku FIA píku). Objem dávkovací smyčky byl 30 μl nebo 100 μl . Délka reakční cívky byla 40 nebo 80 cm. Měření bylo realizováno ve všech čtyřech možných variantách. Výsledky měření jsou uvedeny na obr. 4.4.

Z dosažených výsledků plyne, že nejvyššího analytického signálu (a tedy nejvyšší citlivosti) je dosaženo při použití dávkovací cívky 30 μl a reakční cívky 40 cm.



Obr. 4.4 Kalibrační závislosti výšky FIA píku na logaritmu koncentrace dusitanů pro (▲) dávkovaný objem 30 μl a reakční cívku délky 40 cm, (△) dávkovaný objem 30 μl a reakční cívku délky 80 cm, (●) dávkovaný objem 100 μl a reakční cívku délky 40 cm, (○) dávkovaný objem 100 μl a reakční cívku délky 80 cm. (Měřeno v 1 cm kyvetě při vlnové délce 635 nm, první nosný proud: roztok toluidinové modři o koncentraci 2×10^{-4} mol dm^{-3} , který je zároveň roztokem dusičnanu draselného o koncentraci 0,5 mol dm^{-3} , druhý nosný proud: roztok bromičnanu draselného o koncentraci 1×10^{-3} mol dm^{-3} , který je zároveň roztokem kyseliny sírové o koncentraci 0,4 mol dm^{-3} , průtoková rychlost obou nosných proudů 0,6 ml min^{-1} .)

4.2.2 Kalibrační závislost

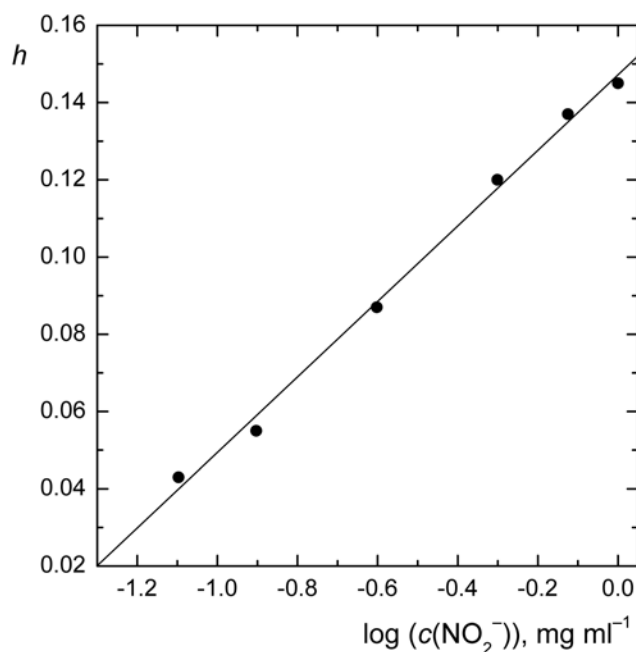
Kalibrační závislost (obr. 4.5) byla změřena v rozsahu koncentrací dusitanů 0,05–1,00 mg ml⁻¹ za podmínek optimalizovaných v kap. 4.2.1. Metodou lineární regrese byla zjištěna následující rovnice kalibrační závislosti

$$h = 0,098 \log c [\text{mg ml}^{-1}] + 0,147 \quad (4.1)$$

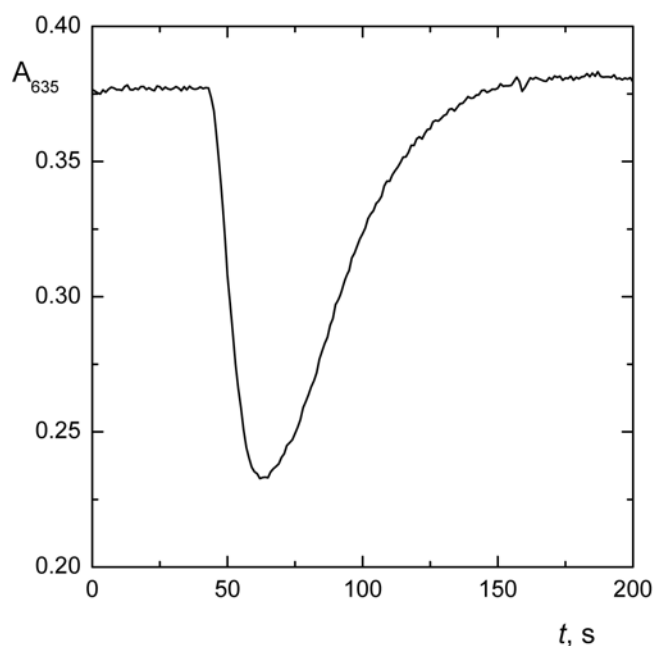
Vypočítaný regresní koeficient této závislosti je 0,9978.

Z hodnoty šumu fiagramu bez dávkování vzorku byl vypočítán instrumentální limit detekce 0,038 mg ml⁻¹, z něhož plyne limit kvantifikace 0,125 mg ml⁻¹.

Z fiagramu nejvyšší koncentrace kalibračního rozsahu (obr. 4.6) byla vypočítána maximální frekvence dávkování vzorku $S_{\text{max}} = 31 \text{ hod}^{-1}$.



Obr. 4.5 Kalibrační závislosti výšky FIA píku na logaritmu koncentrace dusitanů pro koncentrační rozmezí 0,05–1,00 mg ml⁻¹. (Měřeno v 1 cm kyvetě při vlnové délce 635 nm, první nosný proud: roztok toluidinové modři o koncentraci $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, který je zároveň roztokem dusičnanu draselného o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, druhý nosný proud: roztok bromičnanu draselného o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, který je zároveň roztokem kyseliny sírové o koncentraci $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$, průtoková rychlost obou nosných proudů $0,6 \text{ ml min}^{-1}$, dávkovaný objem vzorku 30 μl , reakční cívka 40 cm.)



Obr. 4.6 Diagram vzorku dusitanů o koncentraci 1 mg ml^{-1} (Měřeno v 1 cm kyvetě při vlnové délce 635 nm, první nosný proud: roztok toluidinové modři o koncentraci $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, který je zároveň roztokem dusičnanu draselného o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, druhý nosný proud: roztok bromičnanu draselného o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, který je zároveň roztokem kyseliny sírové o koncentraci $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$, průtoková rychlost obou nosných proudů $0,6 \text{ ml min}^{-1}$, dávkovaný objem vzorku $30 \text{ } \mu\text{l}$, reakční cívka 40 cm.)

4.2.3 Analýza reálného vzorku

Vyvinutá FIA metoda byla aplikována na reálný vzorek vody, který byl odebrán z řeky Rusavy dne 16. května 2010. Vzorek byl před analýzou pouze zfiltrován. Odečtením z kalibrační závislosti byla ve zkoumaném vzorku stanoven obsah dusitanů jako $0,042 \text{ mg ml}^{-1}$. Tato hodnota však leží pod limitem kvantifikace, tudíž byla pouze prokázána přítomnost dusitanů ve vzorku v koncentraci menší než limit kvantifikace.

5 Závěr

Cílem mojí bakalářské práce bylo navrhnout a optimalizovat metodu pro kinetické stanovení dusitanů ve vzorku vody. Stanovení bylo založeno na schopnosti dusitanů katalyzovat oxidaci toluidinové modři bromičnanem v kyselém prostředí. Pro spektrofotometrickou detekci bylo využito faktu, že během oxidace dochází k odbarvení roztoku a ve viditelné oblasti lze zaznamenat pokles absorbance, na základě kterého se stanoví množství dusitanů ve vzorku.

Při vsádkovém způsobu měření bylo zjištěno, že oxidace toluidinové modři bromičnanem v kyselém prostředí probíhá velmi zvolna i bez katalytického účinku dusitanů, z čehož plynuly velké chyby měření (obtížné dodržení stejných časů dávkování jednotlivých reagentů a vzorku). K odstranění vlivu této nekatalyzované reakce bylo kinetické měření převedeno do módu injekční průtokové analýzy. Byla navržena FIA aparatura se dvěma nosnými proudy a optimalizován vliv délky reakční cívky a objemu dávkovaného vzorku tak, aby dané stanovení bylo co nejcitlivější. Za optimálních podmínek byla proměřena kalibrační závislost v rozsahu koncentrací dusitanů 0,05–1,00 mg ml⁻¹. Byl vypočítán instrumentální limit detekce dusitanů navrženou metodou na 0,038 mg ml⁻¹, a limit kvantifikace dusitanů 0,125 mg ml⁻¹. Metoda byla použita pro stanovení obsahu dusitanů v reálném vzorku říční vody.

Literatura

- [1] Chambers C., Holliday A. K.: *Modern Inorganic Chemistry*. Chichester, Butterworth 1975, p. 245–246.
- [2] Holleman A. F., Wiberg E.: *Inorganic Chemistry*. 101st edition. San Diego, Academic Press 1995.
- [3] *Encyclopedia of Toxicology. Volume III*. 2nd edition. Academic Press 2005, p. 232–235.
- [4] Mazloum A. M., Shishehbore M. R., Nasirzadeh N., Hajishabani A. M., Tabatabaee M.: Highly selective catalytic spectrophotometric method for the determination of nitrite. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* **51** (2006), 117–124.
- [5] Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie. 2. české vydání*. Praha, Grada 2004.
- [6] Vyhláška 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.
- [7] *Treatise on Analytical Chemistry. Part II. Analytical Chemistry of the Elements. Volume 5*. I. M. Kolthoff, J. P. Elving (eds.). New York, Interscience 1961.
- [8] Braman R. S., Hendrix S. A.: Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Analytical Chemistry* **61** (1989), 2715–2718.
- [9] Pérez-Olmos R., Yoldi I., Ruiz M. P., Merino J. M.: Potentiometric determination of nitrite in meat products using a nitrite-selective electrode. *Analytical Sciences* **14** (1998), 1001–1003.
- [10] Threeprom J., Watanesk S., Watanesk R., Kijjanapanich P., Wiriyacharee P., Deming R. L.: Simultaneous determination of nitrite and nitrate ions in culture media by ion interaction chromatography. *Analytical Sciences* **18** (2002), 947–950.
- [11] Yu B.-S., Chen P., Nie L.-H., Yao S.-Z.: Simultaneous determination of nitrate and nitrite in saliva and foodstuffs by non-suppressed chromatography with bulk acoustic wave detector. *Analytical Sciences* **17** (2001), 495–498.
- [12] Abbas M. N., Mostafa G. A.: Determination of traces of nitrite and nitrate in water by solid phase spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* **410** (2000), 185–192.
- [13] Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*. New York, McGraw-Hill 2000.
- [14] Fiddler W., Doerr R. C., Gates R. A., Fox J. B.: Comparison of chemi-luminescent and AOAC methods for determining nitrite in commercial cured meat-products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **67** (1984), 525–528.

-
- [15] Manzoori J. L., Sorouraddin M. H., Haji-Shabani A. M.: Spectrophotometric determination of nitrite based on its catalytic effect on the oxidation of carminic acid by bromate. *Talanta* **46** (1998), 1379–1386.
- [16] Ensafi A. A., Dehaghei G.B.: Ultra-trace analysis of nitrite in food samples by flow injection with spectrophotometric detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **363** (1999), 131–133.
- [17] Tomiyasu T., Konagayoshi Y., Anazawa K., Sakamoto H.: A kinetic method for the determination of nitrite by its catalytic effect on the oxidation of chlorpromazine with nitric acid. *Analytical Science* **17** (2001), 1437–1440.
- [18] Ghasemi J., Jabbari A., Amini A., Oskoei A. G., Abdolahi B.: Kinetic spectrophotometric determination of nitrite based on its catalytic effect on the oxidation of methyl red by bromate. *Analytical Letters* **37** (2004), 2205–2214.
- [19] Arient J.: *Přehled barviv*. Praha, SNTL 1968.
- [20] Růžička J., Hansen E. H.: *Flow Injection Analysis*. 2nd edition. New York, Wiley 1988.
- [21] Konieczka P., Namiesnik J.: *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory. A Practical Approach*. Boca Raton, CRC Press 2009.