

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

TESTOVÁNÍ METODY STANOVENÍ DUSIČNANŮ S VYUŽITÍM PŘENOSNÉHO FOTOMETRICKÉHO ANALYZÁTORU

RENÁTA ŠELEŠOVSKÁ, BARBORA KRÁNKOVÁ,
ANNA KREJČOVÁ, LENKA JANÍKOVÁ
a JAROMÍRA CHÝLKOVÁ

Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
renata.selesovska@upce.cz

Došlo 30.9.15, přijato 12.11.15.

Klíčová slova: přenosný fotometrický analyzátor, FIA, spektrofotometricky sledovaná simultánní neutralizační mikrotitrace, dusičnany

Úvod

V oblasti monitorování kvality podzemních, povrchových a pitných vod hrají důležitou roli přenosné analyzátor, které umožňují rychlé a jednoduché stanovení vybraných ukazatelů jakosti vod. Hlavní výhodou těchto analyzátorů je okamžitá informace o obsahu příslušné látky ve vodě. Při analýze v terénu nemusí být vzorek zakonzervován a jsou omezena rizika spojená s transportem a uchováváním vzorku. Diskutabilní může být přesnost těchto analyzátorů a tedy využitelnost získaných výsledků v praxi. Proto byl v rámci této práce otestován přenosný analyzátor Fotometr PF-12 určený pro rychlou analýzu vod v terénu.

Jedním ze základních ukazatelů jakosti vod je obsah dusičnanů. Ve vodách mohou NO_3^- vznikat přirozenými biochemickými procesy nebo do nich pronikají v důsledku antropogenní činnosti, a to zejména ze zemědělství. Ve vztahu k životnímu prostředí mohou NO_3^- způsobovat eutrofizaci vod¹, která působí negativně jak na organismy žijící ve vodách, tak na člověka. Dále se sleduje obsah NO_3^- v pitné vodě, kde je upraven vyhláškou č. 252/2004 Sb. (cit.²), protože mohou při zvýšeném výskytu způsobovat methemoglobinemii nebo tvorbu nitrosaminů, které jsou organizací IARC (International Agency for Research on Cancer) klasifikovány jako pravděpodobné karcinogeny ze skupiny 2A (cit.³) a mohou způsobit vznik rakovinného bujení v játrech, žaludku i močovém měchýři. Proto je důležité mít rychlý a jednoduchý nástroj pro monitorování a kontrolu obsahu NO_3^- ve vodách.

Nejrozšířenější je stanovení NO_3^- spektrofotometrickou metodou s kyselinou sulfosalicylovou, které upravuje norma ČSN ISO 7890-3 (cit.⁴). Metoda je založena na reakci kyseliny sulfosalicylové s HNO_3 v prostředí H_2SO_4 . Vzniká žlutá sloučenina, jejíž absorbance se měří při vlnové délce 415 nm. Další možností je spektrofotometrické stanovení po reakci s 2,6-dimethylfenolem⁵ nebo destilační metoda s 4-fluorfenolem⁶. Pro stanovení NO_3^- lze použít rovněž voltametrii. Redukce ale probíhá za velmi negativního potenciálu a není možné ji sledovat ani na rtuťových elektrodách, které vykazují široké potenciálové okno v katodické oblasti. Stanovení proto probíhá na základě katalyzované elektrodové reakce v přítomnosti Ce^{3+} iontů obvykle na rtuťových nebo amalgámových elektrodách⁷. Stanovení NO_3^- metodou průtokové injekční analýzy (FIA) upravuje norma DIN EN ISO 13395:1996 (cit.⁸). NO_3^- přítomné ve vzorku jsou v kadmiovém reduktoru v prostředí imidazolového pufru o pH 7,5 redukovány na NO_2^- . Dále probíhá diazotace NO_2^- se sulfanilamidem za vzniku diazoniové soli, která reaguje s *N*-(1-naftyl)-ethylendiaminem za vzniku azosloučeniny, jejíž koncentrace, která je úměrná koncentraci NO_2^- , resp. NO_3^- , je stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 546 nm (cit.^{8,9}). V literatuře byla rovněž popsána spektrofotometricky sledovaná simultánní neutralizační mikrotitrace (SSSNM) a její využití při stanovení NO_3^- ve vodách¹⁰. Tato metoda umožňuje postupné stanovení amoniakálního dusíku i NO_3^- ve vodě. NH_4^+ ionty jsou vydestilovány z alkalického roztoku ve formě NH_3 , který je zachycen v roztoku NH_4Cl v absorpční koloně. pH prostředí je upraveno na hodnotu kolem 5. Absorpční náplň je pak alkalizována NH_3 . Barevná změna indikátoru methylčerveně se sleduje fotometricky a je kompenzována přidávkem HCl. NO_3^- se před vlastním stanovením redukuje Dewardovou slutinou (DS) v alkalickém prostředí opět na NH_3 . V jednom experimentu je možné stanovit nejdříve NH_4^+ a poté NO_3^- (cit.^{10,11}).

Cílem této práce je ověření možností stanovení NO_3^- ve vodách přenosným fotometrickým analyzátozem a současné porovnání samotné metody i dosažených výsledků s jinými metodami. Jde nejen o porovnání výsledků dosažených pomocí Fotometru PF-12, FIA a SSSNM, ale také o celkové zhodnocení použitých metod z hlediska přesnosti a správnosti stanovení, náročnosti obsluhy, nákladů na provoz apod.

Experimentální část

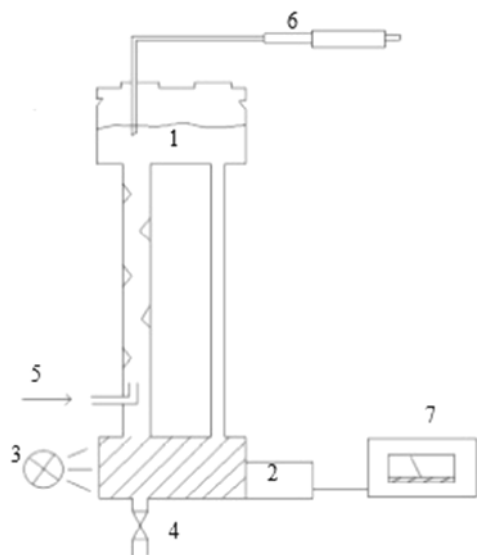
Přístroje a chemikálie

Pro stanovení NO_3^- ve vodách byl použit přenosný spektrofotometrický analyzátor Fotometr PF-12 (obr. 1, MACHEREY-NAGEL, Německo), destilační aparatura



Obr. 1. Přenosný fotometr PF-12 se sadou VISOCOLOR ECO pro stanovení NO_3^-

pro SSSNM napojená na mikroampérmetr a zahříváná topným tělesem (obr. 2, cit.¹⁰) a průtokový analyzátor FIA Compact (MLE, Německo) vybavený softwarem FIA Control 1.0. Pro přípravu standardních roztoků NO_3^- byly používány analytické váhy (Denver Instrument, USA) a pro dávkování roztoků mikropipety Biohit (Biohit PLC, Finsko). Měření, s výjimkou terénních analýz, probíhala za laboratorní teploty (23 ± 2 °C). Pro měření reakčního času sloužily stopyky.



Obr. 2. Schéma spektrofotometricky sledované simultánní neutralizační mikrotitrace; 1 – absorpční kolona, 2 – fotoelektrický snímač, 3 – zdroj viditelného světla, 4 – výpustní otvor, 5 – přívod amoniaku, 6 – mikrobyreta, 7 – monitorování barevných změn

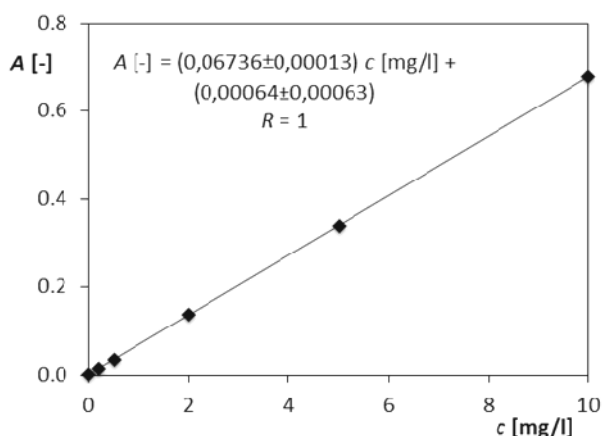
Chemikálie pro přípravu standardních roztoků byly čistoty p.a. Roztok NO_3^- (50 mg l^{-1}) byl připraven z pevného NaNO_3 (Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o., ČR) rozpuštěním přesné navážky v destilované vodě. Byl uchováván v lednici při 4 °C bez přístupu světla, a to po dobu 2 dnů. Roztok o koncentraci 15 mg l^{-1} a kalibrační standardy pro FIA byly připravovány denně čerstvé ředěním tohoto zásobního roztoku. Pro redukci NO_3^- na NO_2^- byl použit imidazol (Sigma-Aldrich, ČR), k diazotaci NO_2^- sulfanilamid (Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o., ČR) a ke kopulaci *N*-(1-naftyl)-ethylendiamin (Fluka, ČR). Pro redukci NO_3^- na NH_4^+ byla při SSSNM použita Dewardova slitina (MERCK, Německo) a k alkalizaci vzorků a standardů 4M NaOH (Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o., ČR). Absorpčním roztokem byl $0,1\text{M}$ NH_4Cl (Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o., ČR) s přidavkem indikátoru $0,001\text{M}$ methylčerveně (Lachema, Brno, ČR). $0,1071\text{M}$ HCl byla připravena nředěním 35% HCl (Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o., ČR). Pro Fotometr PF-12 byla použita sada VISOCOLOR ECO (MACHEREY-NAGEL, Německo) s příslušnými reagenčními.

Pracovní postupy

Skleněné kyvety Fotometru PF-12 byly opakovaně vypláchnuty vzorkem. Poté bylo nadávkováno 5 ml vzorku a do referenční kyvety 5 ml destilované vody. Ke vzorku, resp. k destilované vodě bylo přidáno 5 kapek činidla označeného výrobcem jako Nitrat-1, kyveta byla uzavřena a promíchána. Poté byla přidána lžička činidla Nitrat-2. Lžička byla součástí sady. Kyveta byla uzavřena, 1 min silně třepána a ponechána 5 min v klidu, aby proběhla příslušná chemická reakce. Mezi tím byla na analyzátoru nastavena metoda pro stanovení dusičnanů (použitelné koncentrační rozmezí $4\text{--}60 \text{ mg l}^{-1}$ NO_3^-), do kyvetového prostoru byla vložena kyveta se slepým vzorkem a byla nastavena nula. Po uplynutí reakční doby byl do analyzátoru umístěn vzorek, bylo provedeno měření stiskem tlačítka M a odečten výsledek.

U FIA byly vždy na úvod práce připraveny kalibrační roztoky ($0,2$; $0,5$; 2 ; 5 a 10 mg l^{-1} NO_3^-). Příklad získané kalibrační závislosti je uveden na obr. 3. Vzhledem k nastavenému koncentračnímu rozsahu analyzátoru a tomu odpovídajícímu rozsahu kalibrační závislosti byly vzorky pro analýzu ředěny. Bylo připraveno vždy 50 ml roztoku, a to zředěním 5 ml modelových roztoků (50 mg l^{-1} a 15 mg l^{-1}) a balené pitné vody, resp. 10 ml vody odebrané z rybníku Podhart' a z přehrady Les Království, v lokalitě Dvora Králové nad Labem (obr. 4). Pitná voda z veřejné vodovodní sítě byla analyzována bez ředění. Současně byly připraveny slepé vzorky. Vzorky byly převedeny do skleněných nádobek k analýze. Na počítačovém softwaru FIA Control byly nastaveny 3 opakování analýzy a zaznamenávaly se odpovídající hodnoty absorbance.

Při SSSNM bylo do tříhrdlé reakční baňky odměřeno 50 ml vzorku, byla uzavřena destilační aparatura (obr. 2) a přiveden stripovací proud vzduchu. Mikroampérmetr byl nastaven na nulu a po ustálení bylo do baňky přidáno



Obr. 3. Kalibrační závislost naměřená metodou FIA

10 ml 4M NaOH a 0,5 g DS. Poté byla spuštěna chladicí voda a zapnut vařič. Vznikající NH_3 byl jímán v absorpčním roztoku, což se projevilo žloutnutím původně růžové náplně. Změna byla sledována spektrofotometricky a projevila se výchylkou na mikroampérmetru. Ta byla průběžně kompenzována přidávkou HCl ($0,1071 \text{ mol l}^{-1}$). Stanovení bylo ukončeno v okamžiku, kdy se již barva absorpční náplně neměnila. Obsah NO_3^- byl vypočten ze spotřeby HCl. Při analýze přírodní vody bylo ověřeno, že se v ní nevyskytuje detegovatelné množství amonných iontů, které by muselo být před redukcí vzorku DS oddestilováno.

Byly odebírány dva vzorky přírodních vod z přehrady Les Království a z rybníku Podhart'. Voda byla odebírána do PET lahví, které byly 3× vypláchnuty vzorkem a poté naplněny po okraj a uzavřeny. Na místě odběru byl ihned stanoven obsah NO_3^- Fotometrem PF-12. Vzorky byly uchovávány v lednici při teplotě 4°C bez přístupu světla. Analýza pomocí FIA a SSSNM proběhla následující den po odběru.

Výsledky a diskuse

Cílem této práce bylo ověření možnosti stanovení NO_3^- přenosným analyzátozem Fotometr PF-12 a porovnání této metody i dosažených výsledků s dalšími postupy stanovení NO_3^- ve vodách. Vedle Fotometru PF-12 byla použita FIA a SSSNM. Stanovení NO_3^- bylo nejdříve testováno na modelových roztocích o koncentraci 50 a 15 mg l^{-1} . Tyto koncentrace byly vybrány vzhledem k hygienickým limitům pro NO_3^- v pitné vodě². Dalšími vzorky byly balená voda a pitná voda z veřejné vodovodní sítě. Balená nesycená voda značky ARO od výrobce FONTEA a.s. měla výrobcem deklarovanou koncentraci $11,2 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_3^-$. U vodovodní pitné vody odebrané z veřejné vodovodní sítě na Univerzitě Pardubice nebyl



Obr. 4. Lokality odběrů vzorků; 1 – přehrada Les Království, 2 – rybník Podhart'

obsah NO_3^- známý. Na závěr byly analyzovány vzorky přírodní vody, a to z přehrady Les Království a rybníka Podhart'. Stanovení NO_3^- bylo vždy zopakováno 3× a získané výsledky jsou shrnuty v tab. I.

Z výsledků vyplývá, že všechny tři metody jsou vhodné ke stanovení NO_3^- v modelových vzorcích vod a balené pitné vodě. Nejpřesnější, nejsprávnější (na hladině významnosti $\alpha=0,05$) a nejlépe opakovatelné výsledky při analýze vzorků se známým obsahem NO_3^- byly získány s využitím FIA. Rovněž hodnoty stanovené Fotometrem PF-12 se shodovaly s deklarovaným obsahem NO_3^- (na hladině významnosti $\alpha=0,05$) a relativní odchylky od dané koncentrace dusičnanů se až na výjimky pohybovaly kolem 1%. Výsledky získané s využitím SSSNM v modelových vzorcích vod a balené pitné vodě (na hladině významnosti $\alpha=0,05$) byly rovněž správné, relativní chyby stanovení se pohybovaly do 5%, ale rozptyl jednotlivých výsledků byl větší. Při analýze vzorků pitné vody opět poskytly všechny metody správné výsledky, i když v případě Fotometru PF-12 byl obsah dusičnanů v kohoutkové vodě pod mezí stanovitelnosti (LOQ) přístroje. I tento výsledek byl v souladu se závěry z dalších porovnávacích metod. Při analýze přírodních vod bylo dosaženo shodných výsledků (na hladině významnosti $\alpha=0,05$) při stanovení dusičnanů v terénu Fotometrem PF-12 a v laboratoři s využitím FIA, a to zejména v případě rybníku Podhart'. SSSNM poskytla pro tento typ vzorků výsledky, jejichž intervaly se v případě přehrady Les Království překrývaly a v případě rybníka Podhart' nepřekrývaly s intervaly spolehlivosti dalších dvou použitých přístrojů (na hladině významnosti $\alpha=0,05$). Rozdíl může být zdůvodněn zejména principiální odlišností jednotlivých metod, kdy i případné interferující látky přítomné ve vodách mohou mít různý vliv na sledovanou reakci, resp. odezvu analyzátoru. Důležitým závěrem je zjištění, že Fotometr PF-12 je velmi dobře použitelný pro stanovení NO_3^- ve vodách a poskytuje výsledky srovnatelné s ostatními testo-

Tabulka I

Výsledky stanovení NO_3^- v modelových a reálných vzorcích vod (hladina významnosti $\alpha=0,05$)

Vzorek	Fotometr PF-12		FIA		SSSNM	
	stanovení [mg l^{-1}]	výtěžnost [%]	stanovení [mg l^{-1}]	výtěžnost [%]	stanovení [mg l^{-1}]	výtěžnost [%]
Modelový roztok 50 mg l^{-1} NO_3^-	49,77±0,30	98,6–100,4	49,970±0,077	99,8–100,2	50,6±1,5	96,2–104,8
Modelový roztok 15 mg l^{-1} NO_3^-	15,23±0,25	98,7–103,3	15,000±0,066	99,3–100,7	15,13±0,37	97,3–104,7
Balená pitná voda 11,2 mg l^{-1} NO_3^-	11,33±0,23	98,2–104,5	11,200±0,066	99,1–100,9	11,07±0,20	96,4–101,8
Vodovodní pitná voda	< 4	---	3,770±0,038	---	3,65±0,10	---
Přehrada Les Království	6,700±0,066	---	6,620±0,066	---	6,92±0,24	---
Rybník Podhart'	18,200±0,066	---	18,300±0,066	---	16,77±0,20	---

vanými metodami, a to i při analýze provedené v terénu.

Stanovení NO_3^- Fotometrem PF-12 bylo navíc nejméně náročné ze všech použitých metod. Měření bylo jednoduché a rychlé. Analýza vzorku trvala maximálně 7 min od odběru vody až po výsledný obsah NO_3^- . Výhodou je zejména automatická kalibrace provedená výrobcem a připravené řady testů s příslušnými činidly. Výstupem měření je přímo stanovený obsah NO_3^- ve vodě. Metoda nevyžaduje výpočty s výjimkou ředění vzorku. Spotřeba chemikálií je velmi malá. Nespornou výhodou je velikost analyzátoru a uspořádání v kufříku včetně potřebného příslušenství, takže je přenosný a je možné analyzovat vzorky v terénu hned po odběru. Nevýhodou analyzátoru může být omezený využitelný koncentrační rozsah s LOQ 4 mg l^{-1} . Pro aplikace v souvislosti s monitorováním jakosti přírodních vod je však tato citlivost dostatečná.

FIA je rovněž poměrně jednoduchou automatickou laboratorní metodou pro stanovení NO_3^- . Z hlediska časové náročnosti ji lze považovat za velmi rychlou, protože umožňuje analyzovat velké množství vzorků v krátkém čase. Doba potřebná k analýze jednoho vzorku je kolem 2 min. Nevýhodou je nutnost kalibrace, která prodlužuje analýzu o čas potřebný k přípravě kalibračních roztoků a jejich analýzu. To souvisí i s větší spotřebou činidel. FIA klade také větší nároky na obsluhu a vyžaduje určité zacvičení. Velkou výhodou je široký využitelný koncentrační rozsah (0,2–20 mg l^{-1} NO_3^- v neředěném roztoku) a vysoká přesnost a opakovatelnost stanovení. SSSNM vyžadovala největší zručnost, zkušenosti analytika a kladla největší nároky na provedení. S tím mohou souviset výsledky, které vykazovaly větší rozptyl a horší opakovatelnost než při použití FIA i Fotometru PF-12. Celkově byla metoda SSSNM také časově nejnáročnější. Jedna analýza trvala kolem 1 hodiny nebo i výrazně déle, pokud bylo třeba odstranit přítomné NH_4^+ ionty. Rovněž spotřeba chemika-

lií byla větší. Naopak výhodou je možnost stanovení v jednom experimentu nejdříve NH_4^+ a následně NO_3^- . Citlivost metody je srovnatelná s přenosným analyzáto-rem, kdy LOQ se pohybuje kolem 1 mg l^{-1} NO_3^- .

Z hlediska pořizovacích nákladů je Fotometr PF-12 dostupný za několik desítek tisíc korun. K analyzátoru jsou dodávány řady testů pro stanovení různých parametrů souvisejících s jakostí vod. Například použitá sada pro stanovení dusičnanů umožní provedení přibližně 110 analýz a její cena se pohybuje do 1000 Kč. FIA patří do vyšší cenové relace s pořizovacími náklady v řádu několika set tisíc korun. Náklady na analýzu jednoho vzorku jsou v desítkách korun. Aparatura pro SSSNM je složená z různých částí, které jsou běžně dostupné v laboratořích. Celkové náklady na pořízení systému jsou srovnatelné s Fotometrem PF-12.

Závěr

Tato práce byla zaměřena na testování možností stanovení NO_3^- ve vodách přenosným analyzáto-rem Fotometr PF-12 a porovnání této metody i dosažených výsledků s dalšími postupy stanovení dusičnanů, a to průtokovou injekční analýzou a spektrofotometricky sledovanou simultánní neutralizační mikrotitrací. Lze konstatovat, že přenosný analyzátor Fotometr PF-12 je pro stanovení NO_3^- velmi dobře použitelný a poskytuje výsledky srovnatelné s ostatními testovanými instrumentálně náročnějšími metodami. Analýza je rychlá, levná a velmi jednoduchá na provedení.

Poděkování za finanční podporu patří Univerzitě Pardubice (projekt No. SGSFChT_2015006).

LITERATURA

1. Říhová Ambrožová J. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. VŠCHT Praha 2003.
2. Vyhláška č. 252/2004 Sb., *kteou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody* (duben 2004).
3. International Agency for Research on Cancer (IARC): http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php, staženo 22. 10. 2015.
4. ČSN ISO 7890-3: *Jakost vod. Stanovení dusičnanů. Část 3: Spektrometrická metoda s kyselinou sulfosalicilovou* (leden 1995).
5. ČSN ISO 7890-1: *Jakost vod. Stanovení dusičnanů. Část 1: Spektrometrická destilační metoda s 2,6-dimethylfenolem* (únor 1995, září 2006).
6. ČSN ISO 7890-2: *Jakost vod. Stanovení dusičnanů. Část 2: Spektrometrická destilační metoda s 4-fluorfenolem* (únor 1995, září 2006).
7. Fadrná R.: *Anal. Lett.* 37, 3251 (2005).
8. DIN EN ISO 13395:1996: *Water quality - determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection* (prosinec 1996).
9. Krejčová A., Návesník J., Jičínská J., Černohorský T.: *Food Chem.* 192, 242 (2016).
10. Chýlková J., Říha V., Rosa A.: *Vodní hospodářství* 1, 25 (1986).
11. Chýlková J., Obršálová I., Šelešovská R., Brunclík T., Danquah K. A. B.: *WSEAS Trans. Environ. Develop.* 7, 114 (2011).

R. Šelešovská, B. Kráňková, A. Krejčová, L. Janíková, and J. Chýlková (*University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Pardubice*): **Testing of Method for Determination of Nitrate Using a Portable Spectrophotometric Analyzer**

In this work, a method to determine NO_3^- using portable analyzer Photometer PF-12 (Macherey-Nagel, Germany) for analysis of model solutions, and drinking as well as natural water was tested. The obtained results have been compared with those achieved by flow injection analysis and by spectrophotometrically followed simultaneous neutralizing microtitration.