

Dusitany ako kontaminanty vodných zdrojov

Nitrites as a contaminants of water resources

Dominika Valaská, Vladimír Frišták

Katedra chémie, Pedagogická fakulta, Trnavská univerzita v Trnave

Abstract: Increased nitrite distribution and subsequent contamination of drinking water can easily occur in nature. In this work, we focus on the determination of basic metrological characteristics of a standardized water quality method for the determination of nitrite content in water using molecular absorption spectrophotometry (STN EN 26777) with the application of N-(1-naphthyl)-1,2-ethanediamine as reagent coupling and published method with utilizing ethyl acetoacetate as a suitable alternative. In the case of the determination of nitrites by a standardized method, we found *LOD* values of 12,80 µg/L, *LOQ* 15,01 µg/L, the linear range of 25 – 437,5 µg/L, the absorption maximum of the obtained nitrite complex at λ 540 nm and its time stability 24 hours. The presence of interferents showed significant anion interference in the order of $\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{HCO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$ at concentrations of 12,5 and 250 µg/L NO_2^- in solution. For the second method, we found *LOD* values of 22 µg/L, *LOQ* 37 µg/L, a linear range of 0,05 – 7 mg/L, the absorption maximum of the obtained nitrite complex at λ 483 nm, resp. 507 nm and its time stability of 60 minutes. It was showed significant anion interference in the order of $\text{HCO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$ at the concentration of 0,5 mg/L NO_2^- and in order $\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{HCO}_3^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$ at 3,0 mg/L NO_2^- in solution. Analysis of real samples (drinking water from forest wells) confirmed the applicability of the standard method for all samples. In sample D (Streženice sampling site) was found the concentration of < LOD. Determination of NO_2 by the method using ethyl acetoacetate as coupling reagent showed values of < LOD in samples A (sampling site Nitrianska Blatnica), D, E (sampling site Bojnice). Sample B (Tesare sampling site) showed higher concentrations than the declared values for both methods. In sample C (Keblie sampling site), the nitrite concentration was found to be comparable in both methods and equally to the declared values.

Keywords: nitrites, water sources, contaminants, spectrophotometric determination.

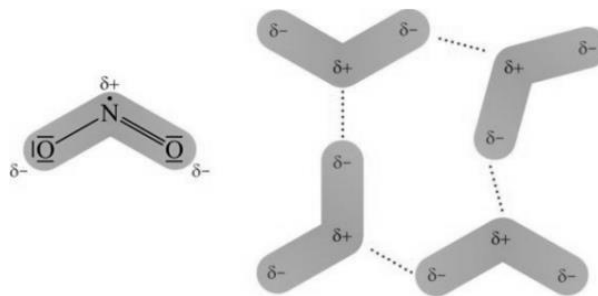
1 Úvod

Dusitany, soli kyseliny dusitej (vo forme M^+NO_2^-), tvoria prirodzenú zložku životného prostredia nevyhnutnú na život organizmov. Predstavujú chemickú formu dusíka, ktorá oxidačne ľahko prechádza na NO_3^- . Medzi dusitany zaraďujeme zlúčeniny ako napr. NaNO_2 , KNO_2 , AgNO_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_2)_2$ a i. Alkalické dusitany najčastejšie získavame

termickým rozkladom dusičnanov alkalických kovov a redukciou ich taveniny uhlíkom, železom, olovom. Dusitanový anión NO_2^- obsahuje polárne väzby N–O.

Podľa teórie VSEPR (Valence Shell Electron Pair Repulsion) má molekula dusitanov zlomený tvar (Boča, 2015). Ide o polárnu molekulu, ktorá má nenulový dipólový moment. Kladná časť molekuly je priťahovaná k zápornej časti susednej molekuly dipól-dipólovou interakciou (obrázok 1). Medzi molekulami NO_2 pôsobia aj disperzné sily, ale dipól-dipólové interakcie sú silnejšie. Atóm dusíka vytvára s dvomi hybridnými sp^2 -orbitálmi σ -väzby (Boča, 2015). Jedna poloha lomeného aniónu je obmedzená voľným elektrónovým párom (Kameníček et al., 2009). Z uvedeného možno usúdiť, že voľný elektrónový pár podmieňuje redukčné vlastnosti dusitanov.

Dusitany vo zvýšených koncentráciách predstavujú riziko pre živé organizmy. Sú často využívané ako aditívne látky v potravinárstve, ktoré sú ostro sledované práve kvôli ich toxicite. Sú prirodzene prítomné v mnohých druhoch zeleniny a používajú sa aj ako konzervačné látky potravín. Sledovanými potravinárskymi aditívami sú najmä dusitan sodný (E250) a dusitan draselný (E249). Dusitan sodný má značný prínos pre mäso spracujúcu časť potravinárskeho priemyslu. Umožňuje výrobu produktov s jedinečnými farbami, chuťou údených potravín a s výbornou stabilitou pri skladovaní vďaka antibakteriálnym a antioxidantným vlastnostiam, ktoré stabilizujú chuť a farbu (Lenghartová et al., 2015).



Obrázok 1: Dipól-dipólová interakcia medzi molekulami NO_2 (Kameníček a kol., 2009).

Na druhej strane sa však dusitany vyznačujú aj terapeutickými vlastnosťami pri ochoreniach kardiovaskulárneho systému. Mechanizmus terapeutického účinku spočíva v redukcii dusitanov na oxid dusnatý, pričom treba dodržať vhodné podmienky pre aciditu, koncentráciu kyslíka a tiež prítomnosť niektorých proteínov. Základným fyziologickým účinkom oxidu dusnatého je vazodilatačný efekt, t. j. rozširovanie ciev (Lefer, 2009).

Dusitany vznikajú antropogénne najmä z odpadov zo živočíšnej výroby a priemyslu. Niektoré priemyselné odpadové vody sú na dusitany veľmi bohaté. Ide najmä o odpadové vody z výroby farbív, kde sú dusitany obsiahnuté v kvapalinách používaných na chladenie obrábacích strojov. Tieto kvapaliny sú v priemysle výhodné vďaka ich protikoróznym účinkom. Súčasťou niektorých rozmrazovacích kvapalín môžu byť aj dusičnany ale aj amoniakálny dusík. Zvýšené množstvo amoniaku v povrchových vodách, najmä v letnom období, predstavuje hlavný zdroj dusitanov (Lenghartová et al., 2015).

Požívanie vody i v nižších množstvách, v ktorej sú obsiahnuté dusitany alebo dusičnany vo zvýšených koncentráciách, môže byť pre človeka zdravotne závažné. Ich dlhodobé prijímanie predstavuje pre človeka riziko ochorenia methemoglobinémie (Sreekumar et al., 2003), ktorá hrozí najmä deťom do 6 mesiacov. Dusičnany, ktoré sú obsiahnuté v potravinách či vode, sa v tráviacom trakte premieňajú na dusitany. Dusitany tak prechádzajú do krvi a oxidujú hemoglobín v červených krvinkách nevratným spôsobom, ktorý zabraňuje prenosu kyslíka v krvi. Nedostatok kyslíka sa v prvej fáze môže prejavovať modraním kože a pier, pri vážnejších stavoch dusením a poškodením funkcií mozgu až zlyhaním základných životných funkcií. V žalúdku môžu tiež dusitany reagovať s amínmi a inými dusíkatými látkami v požívatinách za vzniku N-nitrózo zlúčenín, ktoré sú karcinogénne (Kleijnans et al., 1991).

Dusitany do značnej miery patria medzi indikátory fekálneho znečistenia prírodných vôd. Indikátorovú hodnotu dusitany strácajú v prípade, že sú anorganického pôvodu, pretože môžu vznikajú vo vode redukciami dusičnanov kovov alebo fotochemickou cestou. Preto pri rozbere vody na jej komplexné stanovenie je zväčša nevyhnutné posudzovať závadnosť NO_2^- v súvislosti s mikrobiologickým rozborom a obsahom aj ďalších indikátorov fekálneho znečistenia (Kuypers, 2018). Autori uvádzajú, že koncentrácia NO_2^- v podzemných a povrchových vodách je spravidla veľmi malá ($\mu\text{g/L}$) v porovnaní s odpadovými a splaškovými vodami (mg/L). Prienik dusitanov do podzemných vôd je však častým javom. Preto je monitorovanie dusitanov v pitných neošetrených vodách kľúčové.

Pri povrchových a odpadových vodách, ale aj pri kontrole biologických čistiarní je stanovenie dusitanov súčasťou dusíkovej bilancie. Keďže sú dusitany vo vode veľmi nestále, je potrebné vzorky vody analyzovať ihneď po ich odbere alebo ich ochladiť na teplotu 3 až 4 °C a stanoviť čo najskôr (t. j. v deň odberu; Ilavský, 2015).

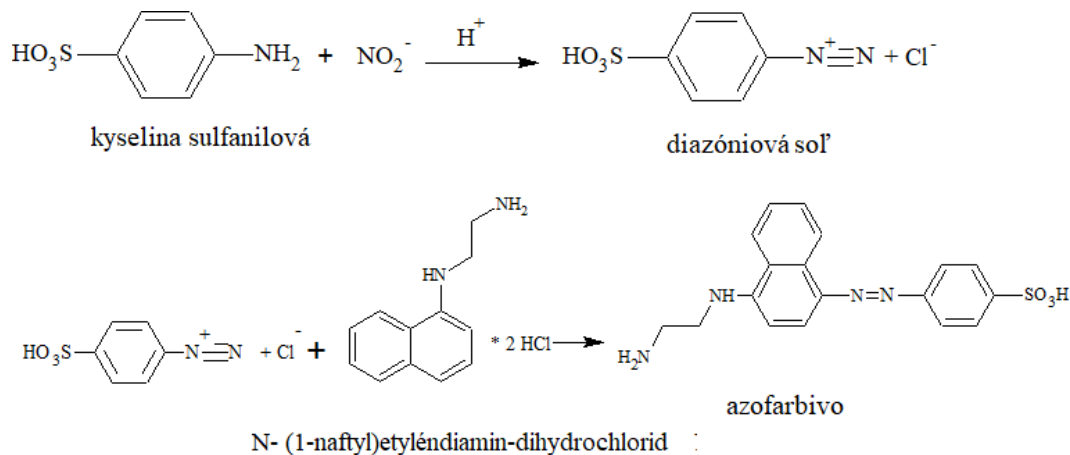
Podľa Nariadenia vlády Slovenskej republiky z 10. mája 2006, ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu, je najvyššie povolené množstvo koncentrácie dusitanov v pitných vodách stanovené na hodnotu 0,5 mg/L, pričom odporúčané množstvo dusitanov pre povrchové vody predstavuje do 0,1 mg/L (predpis č. 354/2006 Z. z. Nariadenie vlády SR).

Cieľom práce bolo zistenie základných metrologických charakteristík normovanej metódy kvality vody na stanovenie obsahu dusitanov vo vodách pomocou molekulárnej absorpčnej spektrofotometrie (STN EN 26777) s aplikáciou N-(1-naftyl)-1,2-diaminoetánu ako kapling činidla a publikovanej metódy s využitím etyl-acetoacetátu ako vhodnej alternatívy. Využitelnosť študovaných metód bola overená na vzorkách pitnej vody získaných z lesných studničiek.

2 Materiál a metódy

2.1 Stanovenie dusitanov metódou podľa STN EN 26777

Za najrozšírenejšiu fotometrickú metódu na stanovenie dusitanov vo vodách možno považovať spektrofotometrickú analýzu so sulfanilamidom a dihydrochloridom N-(1-naftyl)-1,2-diaminoetánu. Podľa súčasnej legislatívy ide o normovanú metódu (STN EN 26777). Jej priebeh opisuje schéma na obrázok 2.



Obrázok 2: Schéma diazotačnej reakcie kyseliny sulfanilovej za vzniku diazóniovej soli a jej následnej kopolácie s NED-dihydrochloridom za vzniku azofarbiva.

Určenie absorpčného maxima komplexu

Na zistenie absorpčného maxima dusitanového komplexu so skúmaným činidlom sme realizovali sériu skenov (12,5 µg/L – 625 µg/L NO₂⁻) v rozsahu λ 200 – 800 nm, s korekciou na slepý pokus. Pri získavaní farebného komplexu sme postupovali nasledujúco. Do 50 ml odmerných baniek sme pridali požadované množstvo štandardného roztoku dusitanov na dosiahnutie požadovanej koncentrácie. Objemy v jednotlivých odmerných bankách sme doplnili vždy deionizovanou vodou na objem 40 ± 2 ml. Pipetou sme do každého roztoku pridali 1,0 ml činidla, ktoré tvorila zmes H₃PO₄, 4-aminobenzénsulfónamidu a N-(1-naftyl)-1,2-diaminoetánu. Roztoky sme následne doplnili po značku deionizovanou vodou a dôkladne premiešali. Absorbanciu sme merali v kremennej kvete oproti blanku (deionizovaná voda ako náhrada štandardného roztoku) pomocou UV-VIS spektrofotometra Cary50 (Varian) s využitím zábleskovej xenónovej výbojky. Získané experimentálne dáta boli vyhodnotené pomocou programu Origin Lab Pro7.

Stanovenie linearít metódy

Linearitu skúmanej metódy sme sledovali v rozsahu koncentrácií NO₂, 12,5 – 625 µg/L. Na úpravu vzorky pred spektrofotometrickou analýzou a získanie farebného komplexu dusitanov so skúmaným činidlom sme postupovali rovnako ako v časti určenia absorpčného maxima komplexu. Absorbanciu vzoriek sme analyzovali pri zistenom absorpčnom

maxime, t. j. λ 540 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra Cary50 (Varian) s využitím zábleskovej xenónovej výbojky. Merania boli realizované v troch opakovaníach.

Určenie časovej stability komplexu

Časovú stabilitu komplexu dusitanov so sledovaným činidlom sme sledovali v rozsahu 5 – 10 080 min. Zmena absorpcie bola meraná v roztoku $0,25 \text{ mg/L NO}_2^-$ pri statických laboratórnych podmienkach ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Príprava vzoriek pred spektrofotometrickou analýzou bola realizovaná rovnako ako v časti určenia absorpčného maxima komplexu. Hodnoty absorpcie boli zisťované pri λ 540 nm. Merania boli uskutočnené v troch opakovaníach. Rovnako sme realizovali sériu skenov spektier vzoriek v rozsahu λ 200 – 800 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra Cary50 (Varian) s využitím zábleskovej xenónovej výbojky. Získané experimentálne dáta boli vyhodnotené pomocou programu Origin Lab Pro7.

Vplyv interferentov

Na zistenie rušivých vplyvov možných interferentov sme sledovali vplyv vybraných aniónov: Cl^- (forma CaCl_2), HCO_3^- (forma NaHCO_3), CH_3COO^- (forma $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) a NO_3^- (KNO_3) v koncentráciách $12,5 \text{ }\mu\text{g/L}$; $250 \text{ }\mu\text{g/L}$ a $500 \text{ }\mu\text{g/L}$ pri koncentráciách $12,5 \text{ }\mu\text{g/L}$ a $250 \text{ }\mu\text{g/L NO}_2^-$. Následná príprava vzoriek pred spektrofotometrickou analýzou bola realizovaná rovnako ako v časti určenia absorpčného maxima komplexu. Hodnoty absorpcie boli zisťované pri λ 540 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra Cary50 (Varian, GB) s využitím zábleskovej xenónovej výbojky. Merania boli realizované v troch opakovaníach. Získané experimentálne dáta boli vyhodnotené pomocou programu Origin Lab Pro7.

Zistenie metrologických parametrov stanovenia LOD a LOQ

Na určenie medze detekcie (z angl. limit of detection *LOD*) a medze stanovenia (z angl. limit of quantitation *LOQ*) sme vychádzali zo základnej definície metrologických parametrov stanovenia (IUPAC) a uplatnenia $3\text{-}\sigma$ prístupu (Uhrovčík, 2014). *LOD* predstavuje najnižšie množstvo analytu vo vzorke, ktoré sme schopní detegovať, ale ktoré nie je nutné kvantifikovať ako exaktnú hodnotu. *LOQ* predstavuje najnižšie množstvo analytu vo vzorke, ktoré sme schopní stanoviť ako exaktnú hodnotu zo stanovenou presnosťou. Na ich výpočet využívame vzťahy:

$$y_{\text{LOD}} = y_{\text{bl}} + 3.S_{\text{bl}}$$

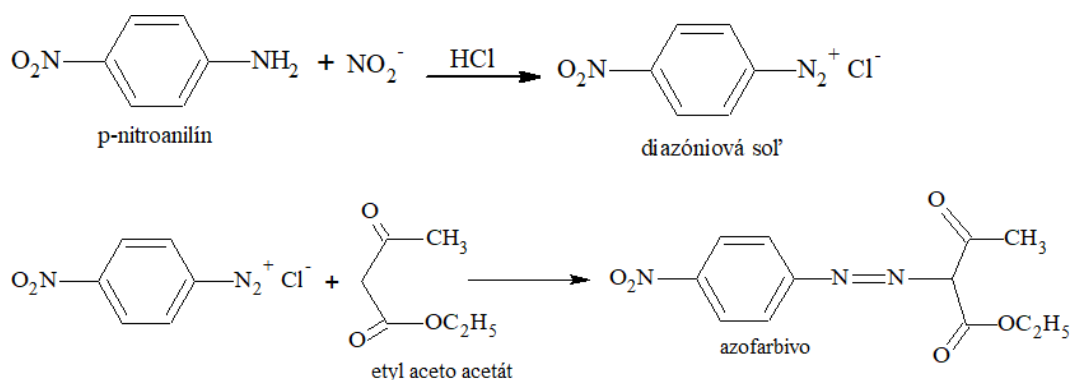
$$y_{\text{LOQ}} = y_{\text{bl}} + 10.S_{\text{bl}}$$

kde y_{bl} predstavuje priemernú hodnotu signálu slepého pokusu a S_{bl} je smerodajná odchýlka blanku.

Na stanovenie *LOD* a *LOQ* boli merané hodnoty blanku (slepého pokusu) po úprave vzorky realizovanej rovnakým spôsobom ako v časti určenia absorpčného maxima. Hodnoty absorpcie boli zisťované pri λ 540 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra Cary50 (Varian) s využitím zábleskovej xenónovej výbojky.

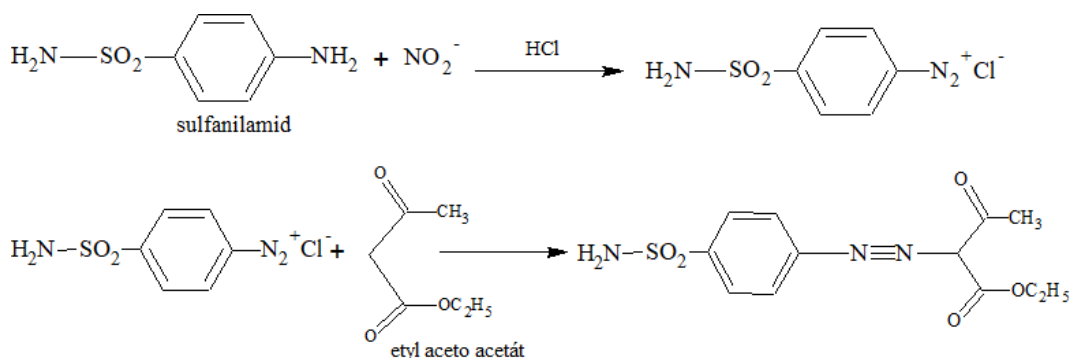
2.2 Stanovenie dusitanov metódou podľa Sreekumara

Skúmaná metóda podľa Sreekumara (2003) predstavuje jednoduchú a rýchlu spektrofotometrickú metódu založenú na diazotačnej reakcii p-nitroanilínu (PNA; obrázok 3) alebo sulfanilamidu (SA; obrázok 4) s etyl-acetoacetátom (EAA) ako kopulačným činidlom, pričom tieto reagenty sú diazotované v kyslom prostredí.



Obrázok 3: Schéma reakcie s použitím p-nitroanilínu.

Kopulačnou reakciou s EAA následne vzniká vo vode rozpustné alkalické farbivo, dávajúce absorpčné maximum pri λ 507 a 356 nm.



Obrázok 4: Schéma reakcie s použitím sulfanilamidu.

Určenie absorpčného maxima komplexu

Na zistenie absorpčného maxima dusitanového komplexu so skúmaným činidlom sme realizovali sériu skenov (0,05 – 7 mg/L NO₂⁻) v rozsahu λ 200 – 800 nm. Ako diazotačné činidlo sme v tejto metóde používali p-nitroanilín a ako kopulačné činidlo etyl-acetoacetát (Sreekumar, 2003).

Na úpravu roztokov dusitanov sme používali 1 mol/L hydroxid sodný a 0,5 mol/L Na₂EDTA ako maskujúce činidlo, ktoré zabezpečuje maskovanie iónov kovov tvoriacich

hydroxidy v alkalickom médiu. Pri získavaní farebného komplexu sme postupovali nasledujúco. Do sklenených skúmaviek sme odoberali vždy 5 ml vzorky určitej koncentrácie, ktoré sme upravili pomocou 0,5 ml 1 mol/L hydroxidu sodného a 0,5 mol/L Na₂EDTA. Roztoky sme následne premiešali na vortexe. Pridali sme 0,05 % roztok p-nitroanilínu a roztok sme dôkladne miešali cca 2 minúty na dostatočný priebeh diazotačnej reakcie a následne sme pridali 1 ml 5 % roztoku etyl-acetoacetátu. Po pridaní 2 ml 2 mol/L hydroxidu sodného sme roztoky opätovne premiešali na vortexe. Približne po 5 minútach stabilizácie sme zmerali absorbancie sady vzoriek vzniknutých azofarbív. Absorbanciu sme merali v kremennej kvete oproti blanku (deionizovaná voda ako náhrada štandardného roztoku) pomocou UV-VIS spektrofotometra Cary50 (Varian, GB) s využitím zábleskovej xenónovej výbojky. Získané experimentálne dáta boli vyhodnotené pomocou programu Origin Lab Pro7.

Stanovenie linearity metódy

Linearitu skúmanej metódy sme sledovali v rozsahu koncentrácií NO₂ (0,025 – 10 mg/L). Na úpravu vzoriek pred spektrofotometrickou analýzou a získanie farebného komplexu dusitanov so skúmaným činidlom sme postupovali rovnako ako v časti určenia absorpčného maxima komplexu. Absorbanciu vzoriek sme analyzovali pri zistenom absorpčnom maxime λ 482 nm a tiež pri literárne odporúčanom maxime t. j. λ 507 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra Cary50 (Varian, GB) s využitím zábleskovej xenónovej výbojky. Merania boli realizované v troch opakovaníach.

Určenie časovej stability komplexu

Časovú stabilitu komplexu dusitanov so sledovaným činidlom sme skúmali v rozsahu 5 – 10 080 min. Zmena absorbancie bola meraná v roztoku 3 mg/L NO₂⁻, pri statických laboratórnych podmienkach (25 ± 2°C). Príprava vzoriek pred spektrofotometrickou analýzou bola realizovaná rovnako ako v časti určenia absorpčného maxima komplexu. Hodnoty absorbancie boli zisťované pri λ 482 a 507 nm. Merania boli uskutočnené v troch opakovaníach. Rovnako sme realizovali sériu skenov spektier vzoriek v rozsahu λ 200 – 800 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra Cary50 (Varian, GB) s využitím zábleskovej xenónovej výbojky. Získané experimentálne dáta boli vyhodnotené pomocou programu Origin Lab Pro7.

Vplyv interferentov

Na zistenie rušivých vplyvov možných interferentov sme sledovali vplyv vybraných aniónov: Cl⁻ (forma CaCl₂), HCO₃⁻ (forma NaHCO₃), CH₃COO⁻ (forma CH₃COONH₄) a NO₃⁻ (KNO₃) v koncentráciách (0,5 mg/L; 20 mg/L; 40 mg/L), pri koncentráciách 0,5 mg/L a 3 mg/L NO₂⁻. Následná príprava vzoriek pred spektrofotometrickou analýzou bola realizovaná rovnako ako v časti určenia absorpčného maxima komplexu. Hodnoty absorbancie boli zisťované pri λ 482 a 507 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra Cary50 (Varian,

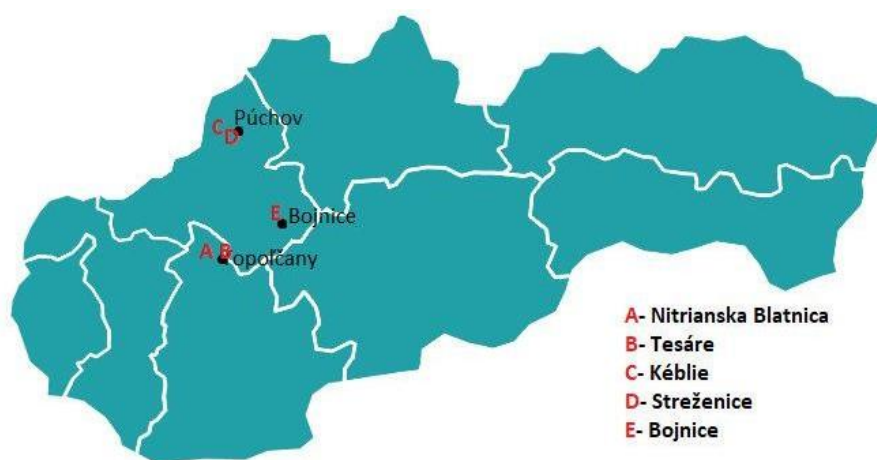
GB) s využitím zábleskovej xenónovej výbojky. Merania boli realizované v troch opakovaníach. Získané experimentálne dáta boli vyhodnotené pomocou programu Origin Lab Pro7.

Zistenie metrologických parametrov stanovenia LOD a LOQ

Na určenie medze detekcie (z angl. limit of detection *LOD*) a medze stanovenia (z angl. limit of quantification *LOQ*) sme vychádzali z rovnakej metodiky ako v prípade predchádzajúcej metódy. Na stanovenie *LOD* a *LOQ* boli merané hodnoty blanku (slepého pokusu) po úprave vzorky realizovanej rovnakým spôsobom ako v časti určenia absorpčného maxima. Hodnoty absorbancie boli zisťované pri λ 482 resp. 507 nm.

2.3 Odber reálnych vzoriek a ich analýza

Na analýzu reálnych vzoriek s potenciálnym obsahom dusitanov sme odoberali vodu z minerálnych prameňov Západoslovenského kraja (obrázok 5). Odborné miesta sú vyznačené na mapke veľkými písmenami A, B, C, D, E (pozri legendu). Vzorky spadajú do lokality Západných Karpát. Odber bol vykonaný v mesiaci marec 2019, kedy sme vzorky vody odoberali do polyetylénových vzorkovníč s uzáverom a skladovali v chladničke (cca 4°C). Analýzu sme uskutočnili v čo najkratšom čase po odbere. Obsah dusitanov bol zistený aplikáciou oboch validovaných metód.



Obrázok 5: Odberové miesta vodných vzoriek lesných studničiek.

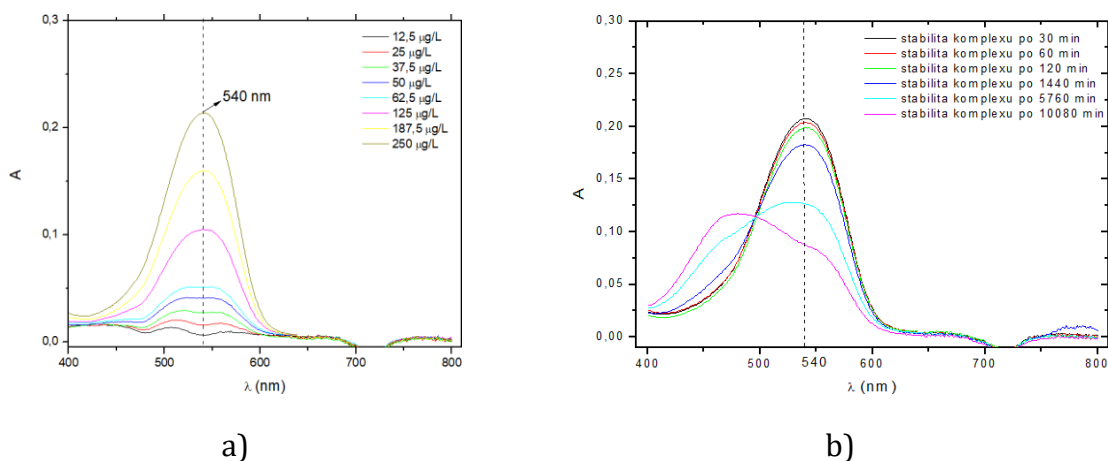
3 Výsledky a diskusia

Na stanovenie dusitanov vo vodných vzorkách existuje viacero analytických postupov v závislosti od ich koncentrácie, vplyvu matrixu, interferentov, prístrojového vybavenia a možností laboratória (Moorcroft et al., 2001). V predloženej štúdii sme sa zamerali na zistenie niekoľkých metrologických charakteristík normovanej metódy kvality vody na stanovenie dusitanov pomocou molekulárnej absorpčnej spektrofotometrickej metódy (STN EN 26777, Griess, 1879). Keďže táto metóda obsahuje aplikáciu pomerne karcino-

génneho N-(1-naftyl)-1,2-diaminoetánu ako kapling činidla, naším zámerom bolo overenie použitia publikovanej metódy s etyl-acetoacetátom ako vhodnejšej a prístupnejšej alternatívy (Sreekumar et al., 2003).

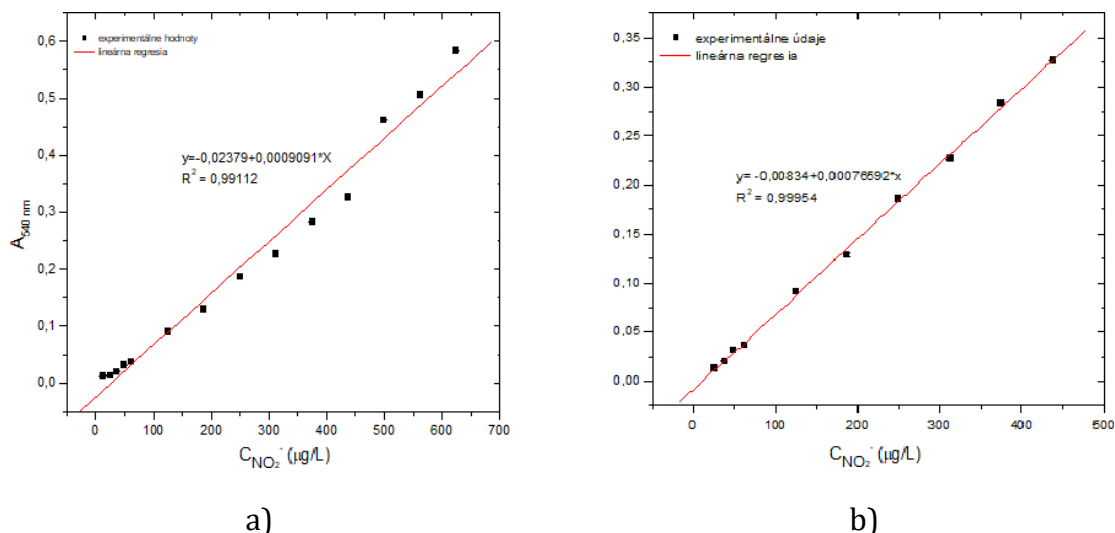
Rovnako sme realizovali porovnanie použitia metód pri stanovení dusitanov v odobraťých vzorkách vôd. Lineárny rozsah analytickej metódy nám určuje rozsah koncentrácií v ktorých je kalibračná krivka lineárna. Stanovuje, ako možno využiť uvedenú metódu či v akom intervale treba pripravovať kalibračné roztoky a v akom intervale treba pracovať, aby výsledky boli analyticky správne (Uhrovčík, 2014). Zhodnotenie linearít metódy (graf 1a) poukazuje na lepšiu aplikovateľnosť rozsahu dusitanov 25 – 437,5 $\mu\text{g/L}$ v porovnaní s 12,5 – 625 $\mu\text{g/L}$. Hodnoty koeficientov determinácie (R^2) 0,99954 a 0,99112, získaných lineárnou regresiou, potvrdili naše tvrdenia a na základe definície R^2 (čím hodnota bližšia k hodnote 1, tým vyššia linearita) poukázali na vhodnosť použitého koncentračného rozmedzia. Pre tento typ analýzy sme zistili hodnotu LOD , ktorá bola 12,80 $\mu\text{g/L}$ a hodnotu LOQ , ktorá bola 15,01 $\mu\text{g/L}$.

Stabilitu výsledného farebného komplexu sme sledovali v časovom intervale 5 – 10 080 min. Získané skeny absorpčných spektier v rozsahu 400 – 800 nm (graf 1b) poukázali na fakt, že stabilita azofarbiva sa už po 24 hodinách značne zmenila, a teda získaný komplex prejavuje značnú nestabilitu s časom, čo sme zaznamenali aj na zmene sfarbenia vzoriek. Je zrejmé, že so zvyšujúcim sa časom pravdepodobne nastáva rozklad získaného farbiva, čo vedie k zmenám v absorpčných charakteristikách a poklesu hodnoty A v absorpčnom maxime azofarbiva (540 nm).



Graf 1: Absorpčné maximum roztokov dusitanov rôznych koncentrácií, pri využití metódy stanovenia dusitanov podľa Griessa (a) a časová stabilita komplexu dusitanov s koncentráciou 250 $\mu\text{g/L}$ (b).

Pri testovaní vplyvu interferentov na stanovenie dusitanov sme zistili, ako vplyvajú iné anióny, potenciálne prítomné vo vzorkách povrchových vôd, na stanovenie a teda ovplyvňujú samotný výsledok stanovenia dusitanov. Sledovali sme vplyv vybraných aniónov: Cl^- , CH_3COO^- , HCO_3^- a NO_3^- na stanovenie NO_2^- v dvoch koncentráciách 12,5 a 250 $\mu\text{g/L}$.



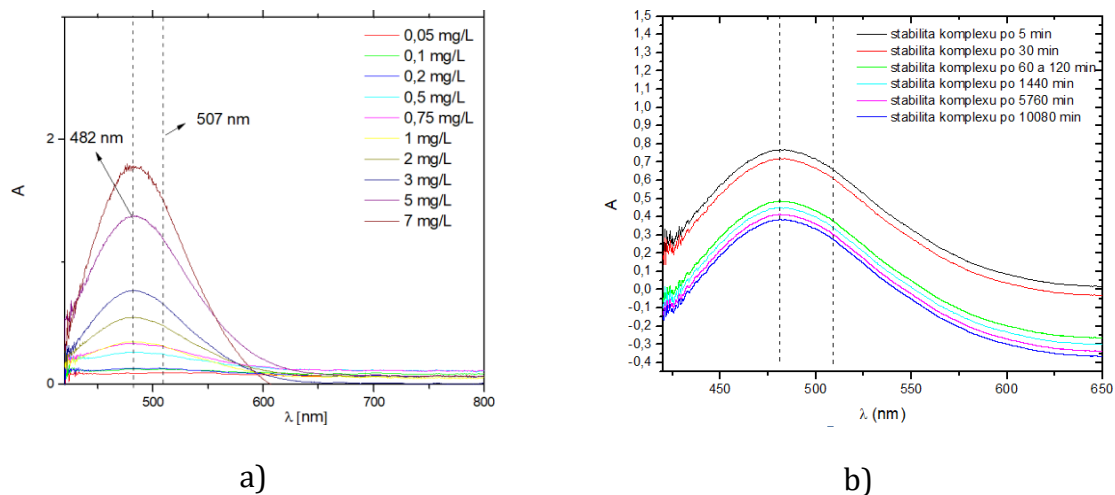
Graf 2: Lineárna regresia vzoriek s koncentráciou dusitanov v rozsahu 12,5 – 625,0 $\mu\text{g/L}$ (a) a v koncentračnom rozsahu 25 – 437,5 $\mu\text{g/L}$ (b) pri využití metódy stanovenia dusitanov podľa Griessa.

Najväčší vplyv na stanovenie dusitanov sme zaznamenali v prípade prítomnosti acetátového aniónu CH_3COO^- pri oboch skúmaných koncentráciách dusitanov. Prítomnosť CH_3COO^- mala v prípade nižších koncentrácií NO_2^- interferujúci vplyv $> 4\%$ a v prípade vyšších koncentrácií $\text{NO}_2^- > 1\%$. Najmenší vplyv na stanovenie sme zaznamenali v prípade prítomnosti dusičnanového aniónu NO_3^- , ktorý ovplyvnil stanovenie pri nižšej koncentrácii NO_2^- iba o 1,6 % a v prípade vyššej koncentrácie NO_2^- vplyv nebol zistený. Ostatné sledované anióny preukázali pozitívne vplyvy na stanovenie NO_2^- , avšak nie vyššie ako 5 %.

Podľa dostupnej technickej normy sa vplyv interferentov na samotné stanovenie pohybuje v rozmedzí 1 – 6 % pre sledované anióny. Druhá skúmaná metóda stanovenia dusitanov vo vodných vzorkách podľa Sreekumara vychádza zo základného predpokladu diazotačnej reakcie dusitanového aniónu so sulfanilamidom resp. p-nitroanilínom a následného kaplingu pomocou etylacetoacetátu. Zistenie absorpčného maxima vzniknutého azofarbiva sme realizovali v rozsahu λ 400 – 800 nm (graf 3a) s využitím vzoriek dusitanov s koncentráciou 0,05 – 7 mg/L. Vyhodnotením získaných skenov sme určili hodnoty absorpčného maxima pri vlnovej dĺžke 483 resp. 507 nm. Stanovené maximum sa približne zhoduje s výsledkami zistenými v prácach využívaných tento typ analýzy dusitanov v heterogénnych vzorkách pomocou UV/VIS spektrofotometrie (Sreekumar et al., 2003; Narayana et al., 2009).

Stabilitu výsledného farebného komplexu sme sledovali v časovom intervale 5 – 10 080 min. Získané skeny absorpčných spektier v rozsahu 400 – 600 nm (graf 3b) poukázali na fakt, že stabilita azofarbiva sa už po 60 minútach značne zmenila. Získaný komplex prejavoval značnú nestabilitu s časom, čo sme zaznamenali aj na zmene sfarbenia vzoriek. Je zrejmé, že so zvyšujúcim sa časom pravdepodobne nastáva rozklad získaného

farbiva, čo vedie k zmenám v absorpčných charakteristikách a poklesu hodnoty A v absorpčnom maxime azofarbiva, tak ako sme zaznamenali aj v predchádzajúcej metóde. Avšak v tomto prípade bol vznikajúci komplex ešte menej stabilný ako komplex azofarbiva, ktorý nám vznikal v prípade stanovenia podľa Griessa.

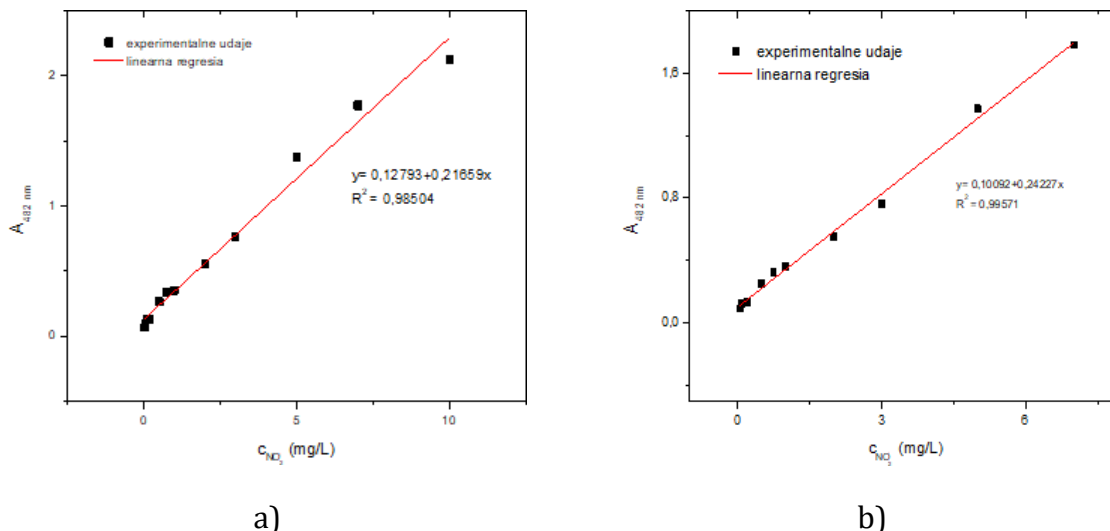


Graf 3: Absorpčné maximum roztokov dusitanov rôznych koncentrácií pri využití metódy stanovenia dusitanov podľa Sreekumara (a) a časová stabilita komplexu dusitanov s koncentráciou 3 mg/L (b).

Linearitu metódy sme určovali v rozsahu 0,025 – 10 mg/L NO_2^- (graf 4). Porovnanie koeficientov determinácie (R^2) získaných pomocou lineárnej regresie poukazuje na lepšiu aplikovateľnosť koncentračného rozsahu dusitanov 0,05 – 7 mg/L pri λ 482 nm. Hodnoty koeficientov determinácie (R^2) 0,99383 a 0,99579 získaných lineárnou regresiou potvrdili naše tvrdenia a na základe definície R^2 (čím hodnota bližšia k hodnote 1, tým vyššia linearita) poukázali na vhodnosť použitého koncentračného rozmedzia. Pre tento typ analýzy sme zistili hodnotu LOD , ktorá bola 22 $\mu\text{g/L}$ a hodnotu LOQ , ktorá predstavovala 37 $\mu\text{g/L}$.

Pri testovaní vplyvu interferentov na stanovenie dusitanov sme zistili, ako vplývajú iné anióny potenciálne prítomné vo vzorkách povrchových vôd na stanovenie a ovplyvňujú výsledok stanovenia dusitanov. Aj pri tejto metóde sme sledovali vplyv vybraných aniónov: Cl^- , CH_3COO^- , HCO_3^- a NO_3^- na stanovenie NO_2^- v dvoch koncentráciách 0,5 a 3,0 mg/L. Najväčší vplyv na stanovenie dusitanov sme zaznamenali v prípade prítomnosti acetátového aniónu CH_3COO^- a uhličitanového aniónu HCO_3^- a to pri oboch skúmaných koncentráciách dusitanov.

Prítomnosť CH_3COO^- mala v prípade nižších aj vyšších koncentrácií NO_2^- interferujúci vplyv > 4 %. Obdobný interferujúci vplyv vykazoval aj anión HCO_3^- , kedy bol taktiež > 4 %. Najmenší vplyv na stanovenie sme zaznamenali v prípade prítomnosti Cl^- aniónov. Tento anión ovplyvnil stanovenie pri nižšej koncentrácii NO_2^- o > 3 % a pri vyššej koncentrácii NO_2^- ovplyvnil stanovenie v prípade koncentrácie Cl^- 0,5 ml/L iba o 1,95 %. Ostatné sledované anióny preukázali pozitívne vplyvy na stanovenie NO_2^- , avšak nie vyššie ako 5 %, čo sa zhoduje aj so stanoveniami podľa Griessovej metódy.



Graf 4: Lineárna regresia vzoriek s koncentráciou dusitanov v rozsahu 0,025 – 10,0 mg/L (a) a v koncentračnom rozsahu 0,05 – 7,0 mg/L (b) pri využití metódy stanovenia podľa Sreekumara.

V prípade stanovenia reálnych vzoriek studničných vôd sme zistili, že takmer všetky vzorky majú obsah dusitanov pod limitnou hodnotou a tieto hodnoty sa výrazne nelíšia od hodnôt deklarovaných ich poslednými analýzami realizovanými akreditovanými laboratóriami. Vzorka B, t. j. vzorka vody z odberného miesta Tesáre, potvrdila prítomnosť desiatok NO_2^- v mg/L. Keďže podľa zdrojov sme zistili, že deklarovaná koncentrácia vody z tohto prameňa má hodnotu $\leq 0,1$ mg/L NO_2^- , môžeme usudzovať, že veľký vplyv pri stanovení mohli spôsobiť siričitaný, nakoľko prameň Tesáre je siričitým prameňom. Pred vybudovaním priehrady na mieste dnešnej studničky vyvierala kyselka a prameň bol neskôr vyvedený nad hladinu.

Tabuľka 1: Stanovené koncentrácie NO_2^- vo vzorkách pitnej vody (A: Nitrianska Blatnica, B: Tesáre, C: Kéblie, D: Streženice, E: Bojnice).

	vzorka				
	A	B	C	D	E
^a koncentrácia NO_2^- (mg/L)	0,02 ± 0,008	33,80 ± 2,2	0,05 ± 0,008	< LOD	0,03 ± 0,007
^b koncentrácia NO_2^- (mg/L)	< LOD	10,60 ± 2,5	0,06 ± 0,00	< LOD	< LOD
^c deklarovaná koncentrácia NO_2^- (mg/L)	0,03	≤ 0,1	0,07	e	0,02
^d limitná koncentrácia NO_2^- (mg/L)	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1

^a stanovenie NO_2^- metódou podľa Griessa, ^b stanovenie NO_2^- metódou podľa Sreekumara, ^c koncentrácie NO_2^- udávané správcom vodného zdroja na základe certifikovaného merania ^d limitná koncentrácia NO_2^- podľa výnosu MP, MZ SR 608/9/04, ^e hodnota koncentrácie neznáma

4 Záver

Kedže v SR je legislatívne určená metóda stanovovania obsahu dusitanov vo vodách s pomocou molekulárnej absorpčnej spektrofotometrie (STN EN 26777) a aplikáciou pomerne karcinogénneho N-(1-naftyl)-1,2-diaminoetánu ako kapling činidla. Naším zámerom bolo overenie použitia literárne publikovanej metódy s využitím etyl-acetoacetátu ako vhodnej a prístupnej alternatívy. Obidve metódy sme vyhodnotili ako vhodné na analýzu vodných vzoriek dusitanov. V prípade stanovenia dusitanov normovanou metódou sme zistili hodnoty LOD 12,80 $\mu\text{g/L}$, LOQ 15,01 $\mu\text{g/L}$, lineárny rozsah 25 – 437,5 $\mu\text{g/L}$, absorpčné maximum získaného dusitanového komplexu pri λ 540 nm a jeho časovú stabilitu 24 hodín. Prítomnosť interferentov preukázalo signifikantný rušivý vplyv aniónov v poradí $\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{HCO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$ pri koncentráciách 12,5 a 250 $\mu\text{g/L}$ NO_2^- v roztoku.

V prípade druhej metódy sme zistili hodnoty LOD 22 $\mu\text{g/L}$, LOQ 37 $\mu\text{g/L}$, lineárny rozsah 0,05 – 7 mg/L , absorpčné maximum získaného dusitanového komplexu pri λ 483 nm resp. 507 nm a jeho časovú stabilitu 60 minút. Prítomnosť interferentov preukázalo signifikantný rušivý vplyv aniónov v poradí $\text{HCO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$ pri koncentrácii 0,5 mg/L NO_2^- a v poradí $\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{HCO}_3^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$ pri koncentrácii 3,0 mg/L NO_2^- v roztoku. Analýza reálnych vzoriek (pitná voda z lesných studničiek) potvrdila využiteľnosť normovanej metódy v prípade všetkých vzoriek. Vo vzorke D (odberové miesto Streženice) bola zistená koncentrácia $< LOD$.

Stanovenie NO_2^- metódou s použitím etyl-acetoacetátu ako kapling činidla poukázalo na hodnoty $< LOD$ vo vzorkách A (odberové miesto Nitrianska Blatnica), D, E (odberové miesto Bojnice). Vzorka B (odberové miesto Tesáre) preukázala vyššie koncentrácie ako sú deklarované hodnoty v prípade oboch metód. Vo vzorke C (odberové miesto Kéblie) bola zistená hodnota koncentrácie dusitanov porovnateľná v oboch metódach, ktorá zodpovedá rovnako deklarovanej hodnote. Zistené výsledky poukazujú na využiteľnosť testovanej metódy s etyl-acetoacetátom ako kapling činidlom pri stanovení vyšších koncentrácií dusitanov pomocou molekulárnej absorpčnej spektrofotometrie po vhodnej predúprave vzorky.

The authors gratefully acknowledge the support of Assoc. prof. Martin Pipiška at water sampling.

Literatúra

1. Boča, Roman. 2015. *Anorganická chémia*. 3. vyd. Trnava : Univerzita sv. Cyrila a Metoda, 379 s. ISBN 978-80-8105-661-1.
2. Griess, Peter. 1879. Bemerkung zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „ueber einige Azoverbindungen.“ In *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. Vol. 12, no. 1, pp. 426–428. ISSN 1099-0682. (<https://doi.org/10.1002/cber.187901201117>).
3. Ilavský, Ján. 2015. *Chémia vody*. Bratislava : Slovenská technická univerzita, 189 s. ISBN 978-80-227-4421-8.

4. Kameníček, Jiří – Šindelář, Zdeňek – Pastorek, Richard – Kašpárek, František. 2009. *Anorganická chemie*. 4. vyd. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 314 s. ISBN 978-80-244-2387-6.
5. Kleinjans, Jos – Albering, Harma – Marx, Anita – Maanen, Jan – Agen, Ben – Hoor, Foppe – Swaen, Gerard – Mertens, Paul. 1991. Nitrate contamination of drinking water: evaluation of genotoxic risk in human populations. In *Environmental Health perspectives*. Vol. 94, pp. 189–193. ISSN 94-1567968.
6. Kuypers, Marcel – Marchant, Hannah – Kartal, Boran. 2018. The microbial nitrogen-cycling network. In *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 16, pp. 263–276. ISSN 1740-1534. (<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>).
7. Lefer, David. 2009. Emerging role of nitrite in myocardial protection In *Archives of Pharmaceutical Research*. Vol. 32, no. 8, pp. 1127–1138. ISSN 1976-3786. (<https://doi.org/10.1007/s12272-009-1804-y>).
8. Lenghartová, Katarína – Lauko, Lukáš – Beinrohr, Ernest. 2015. Analytické metódy na stanovenie dusitanov. In *Chemické listy*. Vol. 109, no. 3, pp. 191–197. ISSN 0009-2770.
9. Moorcroft, Matthew – Davis, James – Compton, Richard. 2001. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. In *Talanta*. Vol. 54, no. 5, pp. 785–803. ISSN 0039-9140.
10. Narayana, Badiadka – Sunil, Kenchaiah. 2009. A spectrophotometric method for the determination of nitrite and nitrate. In *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 4, no. 2, pp. 204–214. ISSN 1306-3057.
11. Predpis č. 354/2006 Z. z. *Nariadenie vlády SR, ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú pre ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu, čiastka 124/2006*.
12. Sreekumar, Noel – Narayana, Badiadka – Hegde, Pol – Manjunatha, Busnur – Sarojini, Balladka. 2003. Determination of nitrite by simple diazotization method. In *Microchemical Journal*. Vol. 74, no. 1, pp. 27–32. ISSN 0026-265X. ([https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(02\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(02)00093-0)).
13. STN EN 26777 (75 7438) *Kvalita vody – Stanovenie dusitanov molekulárnou absorpčnou spektrofotometrickou metódou, 01.1993*.
14. Uhrovčík, Jozef. 2014. Strategy for determination of LOD and LOQ values – some basic aspects. In *Talanta*. Vol. 119, pp. 178–180. ISSN 0039-9140. (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.061>).
15. ÚVZ SR, *Výsledky analýz – svetový deň vody 2019* [online]. 2019 [cit. 2019-04-5]. Dostupné na internete: (<http://www.uvzsr.sk/index.php>).
16. Vyhláška č. 247/2017 Z. z. – *vyhláška Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o kvalite pitnej vody, kontrole kvality pitnej vody, programe monitorovania a manažmente rizík pri zásobovaní pitnou vodou*.

Kontakt

RNDr. Vladimír Frišták, PhD.

Katedra chémie, Pedagogická fakulta, Trnavská univerzita v Trnave

Priemyselná 4, P. O. BOX 9, 918 43 Trnava

vladimir.fristak@truni.sk