

Středoškolská odborná činnost

**Stanovení dusitanů  
a dusičnanů v pitné  
vodě pomocí  
kapilární  
elektroforézy**

Eva Martínková

Mělník 2011

Středoškolská odborná činnost

Obor č. 03 CHEMIE

**Stanovení dusitanů  
a dusičnanů v pitné vodě  
pomocí kapilární  
elektroforézy**

**Determination of nitrites  
and nitrates in drinking  
water using capillary  
electrophoresis**

Eva Martínková

Gymnázium Jana Palacha Mělník, Pod Vrchem 3421

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Křížek

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Mělník 2011

Prohlašuji tímto, že jsem tuto práci vypracovala samostatně na základě pramenů uvedených v seznamu použité literatury a internetových zdrojů.

V Mělníku dne .....

.....

Podpis

**Poděkování:** Tímto bych chtěla poděkovat Akademii věd ČR a jejímu projektu Otevřená věda II, bez něhož by tato práce vůbec nevznikla, katedře analytické chemie PF UK, v jejichž laboratořích byla prováděna potřebná měření a Mgr. Tereze Drápalové-Šajtarové za konzultaci k formální stránce práce. Nejvíce však chci poděkovat svému lektorovi Mgr. Tomáši Křížkovi za jeho obdivuhodnou trpělivost a nemalou odbornou pomoc.

## Anotace

Tato práce se zabývá stanovením obsahu dusitanů a dusičnanů v pitné balené a vodovodní vodě. Ke stanovení byla použita metoda kapilární zónové elektroforézy. Cílem práce bylo vyvinout metodu pro současné stanovení dusitanů a dusičnanů, která by byla dostatečně citlivá pro stanovení dusitanů, jejichž mezní hodnota v pitné vodě se pohybuje již ve velmi nízkých koncentracích. Veškerá měření byla prováděna na přístrojích katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Klíčová slova: Dusitany; dusičnany; pitná voda; kapilární zónová elektroforéza

This study deals with determination of concentration of nitrites and nitrates in drinking water. For determination of these ions capillary zone electrophoresis has been used. Nitrites have very low limit of incidence in water. The aim of the study was to develop a new method, which would be sufficiently sensitive for analyzing them. All measurements were made with instruments of Department of analytical chemistry, Faculty of science, Charles' University in Prague.

Key words: Nitrites; nitrates; drinking water; capillary zone electrophoresis

# Obsah

Úvod.....	- 6 -
1 Teorie .....	- 7 -
1.1 Rozbor vody .....	- 7 -
1.2 Kapilární zónová elektroforéza .....	- 8 -
1.3 Problematika malých iontů .....	- 12 -
1.4 Dusitany a dusičnany ve vodě.....	- 13 -
1.4.1 Běžně používané metody stanovení .....	- 14 -
1.4.1.1 Dusitany .....	- 14 -
1.4.1.2 Dusičnany.....	- 15 -
1.4.2 CZE metody stanovení.....	- 15 -
2 Metodika .....	- 18 -
2.1 Chemikálie a přístroje .....	- 18 -
2.2 Původní CZE metoda.....	- 18 -
2.3 Nová CZE metoda.....	- 19 -
2.4 Spektrofotometrická metoda .....	- 19 -
3 Výsledky měření .....	- 21 -
3.1 Původní metoda.....	- 21 -
3.1.1 Kalibrace .....	- 21 -
3.1.2 Měření reálných vzorků .....	- 22 -
3.2 Nová metoda .....	- 24 -
3.2.1 Kalibrace .....	- 24 -
3.2.2 Měření reálných vzorků .....	- 25 -
3.3 Spektrofotometrická metoda .....	- 27 -
3.3.1 Kalibrace .....	- 27 -
3.3.2 Měření reálných vzorků .....	- 28 -
Závěr a diskuze .....	- 29 -
Seznam zkratk .....	- 34 -
Seznam použité literatury.....	- 35 -
Seznam použitých internetových zdrojů .....	- 36 -

# Úvod

Ve své práci se věnuji elektroforetickému stanovení dusitanových a dusičnanových iontů ve vodách. Toto téma jsem si vybrala, protože problematika kvality vody je v dnešní době velmi aktuální. Navíc mám dlouhodobý zájem o chemii a věřím, že jakákoli praxe mi v budoucnu bude k užtku. Přínos práce spatřuji především ve vyvinutí CZE metody pro současné stanovení dusitanů a dusičnanů v pitných vodách.

Práce sestává ze dvou částí – teoretické a praktické. Teoretická část obsahuje všeobecný úvod do problematiky rozborů vody, teorii kapilární elektroforézy a význam iontů dusíku ve vodách spolu s jinými možnostmi jejich stanovení. Poznatky k této kapitole jsem čerpala především od svého odborného lektora, jako doplňkový zdroj informací mi sloužil článek Václava Kašičky<sup>1</sup>, skripta Univerzity Karlovy *Analytické separační metody* od Karla Štulíka a kol<sup>2</sup> a skripta Vysoké školy chemicko-technologické *Analytika vody* od Marty Horákové a kol.<sup>3</sup>

Druhá a třetí kapitola spadají již do praktické části. Ve druhé části je shrnuta metodika práce – použité chemikálie a přístroje a separační podmínky v jednotlivých metodách. Jako podklad pro tuto část sloužil článek *Separation of inorganic and small organic anions by CE using phosphonium-based mono- and dicationic reagents*.<sup>4</sup> Ve třetí části přehledně uvádím výsledky kalibrací jednotlivých metod a měření praktických vzorků. V závěru pak diskutuji vývoj nové metody a vliv separačních podmínek na citlivost a účinnost separace.

---

<sup>1</sup>KAŠIČKA, Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. 1997, roč. 91, č. 5, s. 320-329, ISSN 0009-2770

<sup>2</sup>ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. 1. vydání. Praha: Karolinum. 2005. ISBN 80-246-0852-9

<sup>3</sup>HORÁKOVÁ, Marta a kol. *Analytika vody*, 2. vydání, Praha: VŠCHT Praha. 2003. ISBN 70-8070-520-X

<sup>4</sup>KŘÍŽEK, T., BREITBACH, Z. S., ARMSTRONG, D. W., TESAŘOVÁ, E., COUFAL, P. Separation of inorganic and small organic anions by CE using phosphonium-based mono- and dicationic reagents. *Electrophoresis*. 2009, roč. 30, č. 22, s 3955-3963. ISSN 1522-2683

# 1 Teorie

## 1.1 Rozbor vody

Rozbor vody se dělí na fyzikální, chemický, radiologický, mikrobiologický a hydrobiologický. Do fyzikálního rozboru se řadí například zápach, zabarvení či vodivost. K chemickým ukazatelům patří kvalitativní i kvantitativní stanovení obsahu minerálů. Mikrobiologický a hydrobiologický rozbor se týká přítomnosti bakterií a jiných mikroorganismů. Metody pro stanovení jednotlivých ukazatelů předepisuje příslušná ČSN. Jelikož by rozbor vody zahrnující všechny zmíněné ukazatele byl časově a především ekonomicky velmi náročný, nedělá se vždy kompletní, ale vybírají se konkrétní ukazatele, které mají pro příslušný typ vody (např. pitná, povrchová, odpadní) největší vypovídací hodnotu.

Pro kontrolu jakosti vod při úpravě na pitnou vodu jsou specifikovány tyto čtyři chemické a fyzikální rozborů:

- *Základní fyzikální a chemický rozbor (ZFChR)* obsahuje 43 obecných ukazatelů
- *Rozšířený fyzikální a chemický rozbor (RFChR)* obsahuje 72 ukazatelů
- *Výběrový fyzikální a chemický rozbor (VFChR)* se používá pro stanovení kvality vody pro konkrétní provoz, obsahuje ukazatele vybrané z RFChR tak, aby byla voda dostatečně charakterizována
- *Provozní rozbor* obsahuje hodnoty významné pro hodnocení provozu technologických stupňů úpravy, řídí se typem vody, technologií úpravy a hygienického zabezpečení vody

Požadavky na kvalitu balených vod jsou určeny vyhláškami MZd, které stanovují maximální obsah zdraví škodlivých látek. Z tohoto souboru se opět vybírají jednotlivé ukazatele pro dostatečnou charakteristiku konkrétní vody.



## 1.2 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza je analytická metoda používaná k separaci a následné detekci organických i anorganických iontů lišících se molekulovou hmotností, tvarem a nábojem. Její princip spočívá v pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Separace obvykle probíhá v křemenné kapiláře o vnitřním průměru do 100  $\mu\text{m}$ . Vzhledem k tomu, že samotná kapilára je velmi křehká, pokrývá se její povrch tenkou vrstvou polyimidu, čímž dojde ke značnému zvýšení pružnosti. Kapiláru je pak možné ohýbat i do velmi ostrých úhlů. Při separaci dochází ke dvěma jevům – elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli a elektroosmotickému toku.

Elektroforetickou migraci způsobuje elektrostatická přitažlivost daného iontu k elektrodě s opačným nábojem. Iont se pak pohybuje konstantní elektroforetickou rychlostí  $v_{ef}$ , která je přímo úměrná intenzitě elektrického pole  $E$  a mobilitě daného iontu  $\mu_{ef}$ :

$$v_{ef} = E \times \mu_{ef}$$

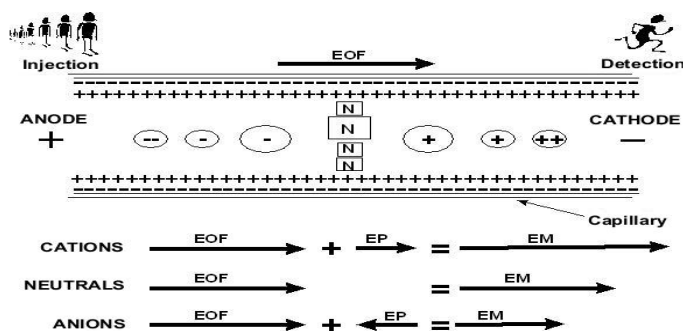
Pro elektroforetickou pohyblivost zároveň platí tento vztah:

$$\mu_{ef} = \frac{Q}{6\pi\eta r} \quad (Q \text{ je náboj konkrétního iontu, } \eta \text{ dynamická viskozita okolního prostředí a } r \text{ je hydratovaný poloměr iontu)}$$

Z těchto vztahů jasně vyplývá, že mobilita iontu úzce souvisí s jeho poloměrem a nábojem – čím větší je náboj iontu a čím menší poloměr má, tím se pohybuje v daném prostředí rychleji. Tak se mohou vzájemně separovat i ionty se stejným kladným nebo záporným nábojem, naproti tomu látky neutrální jsou jen odděleny od těch nabitých, aniž by však mohlo dojít k jejich odlišení v rámci neutrální zóny.

Působením roztoku elektrolytu dochází na stěnách kapiláry k disociaci silanolových skupin (Si-OH) a tím se stěny nabíjí záporně. Záporně nabitá stěna pak elektrostaticky přitahuje kationty z roztoku, takže v tenké vrstvě roztoku u stěny kapiláry je vyšší koncentrace kationtů než aniontů. Aplikací elektrického napětí mezi elektrody nacházející se na koncích kapiláry dojde k pohybu této kladně nabitě vrstvy směrem ke katodě. Díky viskozitě kapaliny s sebou tato vrstva zároveň strhává veškerý roztok přítomný v kapiláře. Tomuto jevu se říká elektroosmotický tok (EOF). Jeho rychlost lze regulovat typem elektrolytu, popřípadě jeho koncentrací a pH, protože rychlost EOF závisí na míře disociace silanolových skupin a povrchové hustotě takto vzniklého záporného náboje na stěnách kapiláry. Přesto je však jeho rychlost vyšší, než je elektroforetická rychlost většiny iontů, což vede k tomu, že se za normálních podmínek veškerý roztok pohybuje směrem ke katodě – kladně nabitě ionty součtem rychlosti EOF a elektroforetické a záporně nabitě jejich rozdílem (Obr. 1<sup>5</sup>). Rychlostní profil takto generovaného toku je plochý a nikoli parabolický, jak je tomu u toku vynuceného hydrodynamicky. To působí při dělení látek pozitivně, jelikož nedochází k rozmývání jejich zón. Existence EOF je tedy pro praxi důležitá tím, že významně ovlivňuje celkovou rychlost separace a zároveň umožňuje detekci kationtů i aniontů současně během jednoho měření. Tyto výhody ve většině případů převáží nevýhodu, kterou je do jisté míry problematická reprodukovatelnost EOF a tedy výsledků měření.

**Obr. 1** Vliv EOF na migrační rychlost iontů



<sup>5</sup>Převzato z *Swiss Laboratory for Doping Analyses* [online]. 9. 9. 2011 [cit. 25. 11. 2011]. Dostupné z World Wide Web: <<http://www.doping.chuv.ch/>>

Dalším faktorem, který může ovlivnit analýzu, je způsob dávkování vzorku. Používají se dva způsoby: elektrokinetické a hydrodynamické dávkování. Elektrokinetické dávkování se provádí tak, že se mezi elektrody na koncích kapiláry vloží po dobu několika sekund napětí řádově v jednotkách kilovoltů. EOF způsobí nasátí malého množství vzorku do vstupní části kapiláry. Výhodou elektrokinetického dávkování je možnost zakoncentrování stanovených látek při vhodné kombinaci složení vzorku a základního elektrolytu, což vede ke zvýšení citlivosti stanovení. Jeho nevýhodou je, že při dávkování dochází k preferenci kationtů před anionty, protože kationty jsou přitahovány směrem ke katodě, a tudíž do kapiláry, u aniontů je tomu naopak. Hydrodynamické dávkování neboli dávkování tlakem tento nedostatek odstraňuje. Klasicky se provádí tak, že se nádobka se vzorkem zvedne o něco výš, než je výstupní nádobka, čímž se na hladině vytvoří přetlak, vlivem kterého se nadávkuje několik nanolitů vzorku. U drtivé většiny moderní instrumentace se však k vytvoření přetlaku používá inertní plyn z tlakové nádoby nebo vzduchová pumpa zabudovaná v přístroji.

Výhodou CZE je poměrně krátká doba separace – od desítek sekund do přibližně dvaceti minut (déltrvající separace se většinou nepoužívají). Při vlastní separaci se pracuje s napětím několika desítek kV a proudem do 100  $\mu\text{A}$ . Pokud by proud přesáhl tuto hodnotu, došlo by k přílišnému zahřívání roztoku uvnitř kapiláry. Teplo, které takto vzniká, nepůsobí na výslednou separaci příliš příznivě, jelikož deformuje rychlostní profil analytu na parabolický. Změny teploty navíc výrazně ovlivňují rychlost migrace iontů. Teplota se během měření udržuje obvykle na 25 °C proudící chladicí kapalinou nebo vzduchem.

K detekci iontů se nejčastěji používá absorpční spektrometrický detektor. Pro jeho funkci je nutné vytvořit tzv. detekčního okénka. To je poblíž výstupního konce kapiláry a vzniká tepelným, mechanickým nebo chemickým odstraněním polyimidové vrstvy. Detektor měří úbytek intenzity paprsku o dané vlnové délce po jeho průchodu roztokem v kapiláře v místě detekčního okénka. Absorbance zón, které v daném čase procházejí detekčním okénkem, je zaznamenávána do grafu, který se nazývá elektroferogram. Průchod látky, která absorbuje

záření dané vlnové délky, se v něm projeví prudkým výkyvem absorbance. Pro tyto výkyvy se používá z angličtiny převzatý název “pík”. Počet takto získaných píků odpovídá počtu zón, které se při průchodu kapilárou vzájemně separovaly. Pokud separované látky absorbují v daném spektru více než okolní elektrolyt, projeví se to na elektroferogramu kladným píkem. Taková detekce se nazývá přímá. Pokud však dochází k separaci látek, které absorbují špatně nebo vůbec, přidá se do elektrolytu silně absorbující látka. Separované zóny pak absorbují méně než okolní elektrolyt a v elektroferogramu se projeví ve formě záporného píku. Další, méně častá metoda detekce je vodivostní detektor. Ten pracuje na principu měření vodivosti roztoku v kapiláře. Pokud se vodivost roztoku liší od vodivosti elektrolytu, detektor tuto změnu zaznamená. Tento způsob měření je vhodný především pro ionty, které UV záření absorbují špatně nebo vůbec.

Píky poskytují kvalitativní i kvantitativní informaci o látkách ve vzorku. Z migračního času lze vypočítat jejich elektroforetickou mobilitu a tím i do jisté míry určit, o jakou látku se jedná. Plocha zaznamenaného píku je pak přímo úměrná množství látky ve vzorku.

Existuje několik vyhodnocovacích metod. Nejčastější je metoda kalibrační přímky. Při té se změří několik (alespoň 5) vzorků o známé koncentraci dané látky a vytvoří se graf závislosti plochy píku na těchto koncentracích. Do takto vytvořeného grafu je pak možno vynést naměřenou hodnotu a odečíst koncentraci. Další možností je metoda tzv. standardního přídávku. Při té se změří několik koncentrací, každá je o známou hodnotu vyšší než ta předchozí. Z nárůstu plochy píků je pak možno dopočítat kalibrační závislost. Nevýhodou tohoto způsobu je mnohem větší nepřesnost než u metody kalibrační křivky.

K dispozici je široké spektrum různých CZE metod, každá je vhodná pro separaci jiných iontů. Použití konkrétní metody pro konkrétní vzorek proto záleží především na jeho povaze a předpokládaném složení (např. pitná voda, biologické vzorky, potraviny).

### 1.3 Problematika malých iontů

Jak už bylo řečeno dříve, EOF má většinou větší rychlost, než je migrační rychlost iontů, díky čemuž je možné analyzovat kationty i anionty současně. Problém však může nastat u aniontů s velmi malým poloměrem. Čím je menší poloměr iontu, tím migruje rychleji, a v tomto případě se může stát, že migrační rychlost iontu bude téměř stejná nebo dokonce větší než EOF. V případě kationtů to příliš nevádí, u aniontů ale tento fakt způsobí, že se doba jejich analýzy neúměrně prodlouží, popřípadě nepůjdou analyzovat vůbec, protože poputují k anodě, a tudíž směrem od detektoru. Tato situace se řeší potlačením až změnou směru EOF.

Toho lze docílit tak, že se do základního pufru přidá vhodné aditivum – kationtová povrchově aktivní látka. To je zpravidla organický kationt s dlouhým alifatickým řetězcem. Kladná část látky se naváže na záporně nabitou stěnu kapiláry a dlouhý řetězec je orientován směrem ke středu kapiláry. Další vrstva molekul přisedne díky hydrofobní interakci mezi alifatickými řetězci na první vrstvu tak, že kladně nabitě skupiny molekul druhé vrstvy jsou orientovány dovnitř kapiláry. Tím dojde v podstatě k převrácení znaménka náboje vnitřního povrchu kapiláry. Aplikace elektrického napětí do takového systému by způsobila, že veškerý roztok v kapiláře by začal vlivem EOF migrovat směrem k anodě, která se nachází u vstupního konce kapiláry, proto se současně používá i tzv. obrácená polarita napětí, díky které dojde k záměně elektrod a EOF tak opět směřuje k elektrodě na výstupním konci kapiláry.

Mezi látky s tímto účinkem patří například propan-1,3-bis(tripropylfosfonium)fluorid, který byl použit u první testované metody, či cetyltrimethylammonium chlorid (CTAC) použité při vývoji nové metody.

## 1.4 Dusitany a dusičnany ve vodě

Dusík se v pitných vodách vyskytuje ve třech základních formách – jako dusitany, dusičnany a amoniakální dusík. Ve své práci se věnuji stanovování prvních dvou zmíněných iontů.

Dusitany jsou velmi nestálé, ve vodách se proto vyskytují jen ve velmi malých koncentracích a to zpravidla při biologických přeměnách dusičnanů nebo amoniakálního dusíku. Jejich vliv na lidský organismus je nepříznivý, proto je jejich mezní hodnota velmi nízká – 0,1 mg/l pro pitné i kojenecké vody.

Dusičnany se ve vodách nacházejí v poměrně vysokých koncentracích, patří mezi čtyři nejhojněji zastoupené anionty vod. Vyskytují se ve vodách pitných, užitkových i odpadních. Dostávají se sem s deštěm, který je odplavuje z polí vyživovaných hnojivou na bázi dusíku (např. ledek), jako produkt metabolismu nebo důsledek fekálního nebo průmyslového znečištění.

Pro člověka nejsou samy o sobě příliš závadné, v trávicím traktu ale dochází k jejich redukci na dusitany a ty mohou způsobit zvláště u kojenců dusitanovou alimentární methemoglobinemii, při dlouhodobé konzumaci pak rakovinu jater, žaludku nebo močového měchýře. Z tohoto důvodu je stanovena limitní hodnota pro výskyt dusičnanů v pitné vodě na 50 mg/l a ve vodě kojenecké na 15 mg/l. Obsah dusičnanů je tak jedním ze základních ukazatelů celkové kvality (nejen pitné) vody.

## 1.4.1 Běžně používané metody stanovení

Existují desítky metod, které umožňují stanovit množství dusitanů i dusičnanů ve vodách. Každá má své výhody a nevýhody, nelze tedy jednoznačně doporučit konkrétní metodu. Její volba záleží především na typu kontrolované vody.

Dusitany se poměrně rychle oxidují na dusičnany, proto je vhodné odebírat a analyzovat vzorky v co nejkratším časovém intervalu a pouze v případě nutnosti je uchovávat při teplotě do 5 °C v lahvích z polyethylenu nebo boritokřemičitého skla. Potom se však musí počítat s jistou pozitivní chybou v naměřeném množství dusičnanů a negativní chybou v množství dusitanů.

### 1.4.1.1 Dusitany

Nejčastější metodou používanou pro stanovení těchto iontů je spektrofotometrie. Při té se využívá schopnosti kyseliny dusité uvolněné z dusitanů ve vzorku diazotovat aromatické aminy. Vznikají diazoniové soli, které další reakcí (tzv. kopulací) přecházejí na azobarvivo charakteristického zabarvení. Jeho intenzita je přímo úměrná obsahu dusitanů ve vzorku. Měří se při vlnové délce 520 nm. Původní postup pochází z roku 1889 a nazývá se po svých objevitelích Griesseho – Ilosvayova metoda. Její popis je uveden níže ve druhé kapitole.

Tato metoda využívala ke kopulaci  $\alpha$ -naftylamin, který je však od roku 1966 označen jako karcinogenní látka. Proto se běžně pro kopulační reakce používají jiné arylaminy. Hodně se doporučuje Cléve-kyselina (1-naftylamin-7-sulfonová kyselina) nebo NED-dihydrochlorid (N-(1-naftyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid). K diazotaci se používá buď kyselina sulfanilová, nebo její amid. Ten je používanější, neboť jeho roztok je stabilnější a reakční

rychlost jeho diazoniové soli při kopulaci je vyšší, než u samotné kyseliny sulfanilové. Reakce probíhají v prostředí kyseliny fosforečné nebo hydrogensíranu draselného.

V současně platné ČSN, mezinárodní normě ISO a evropské normě EU se pro diazotaci používá amid kyseliny sulfanilové a ke kopulaci NED-dihydrochlorid, přičemž obě reakce probíhají v prostředí kyseliny fosforečné.

### **1.4.1.2 Dusičnany**

Kyselina dusičná nitruje některé aromatické látky na příslušné nitroderiváty charakteristického zabarvení. Míra zabarvení je pak přímo úměrná obsahu dusičnanů v analyzovaném vzorku. Toho využívají příslušné spektrofotometrické metody, přesto neexistuje univerzální způsob pro stanovení dusičnanů ve vodě. ČSN kodifikuje tři spektrofotometrické metody, z nichž nejjednodušší je fotometrická metoda s použitím 2,6-dimethylfenolu ve fotometrických zkumavkách, která je zároveň nejvhodnější pro analýzu pitné vody.

V prostředí koncentrované kyseliny sírové a koncentrované kyseliny fosforečné reagují přítomné dusičnany s 2,6-dimethylfenolem. Vzniká 4-nitro-2,6-dimethylfenol cihlově červené barvy. Jeho množství se pak vyhodnocuje při vlnové délce 324 nm. Ke každému vzorku se vždy přidává amidosírová kyselina eliminující rušivý vliv dusitanů, které vlastní reakcí s 2,6-dimethylfenolem tvoří obdobně zbarvenou sloučeninu jako dusičnany.

## **1.4.2 CZE metody stanovení**

Jak již bylo zmíněno v předchozích dvou podkapitolách, používají se ke stanovení dusitanů a dusičnanů ve vodě především metody spektrofotometrické. Přesto však existuje



i množství metod pro kapilární elektroforézu, které umožňují tyto ionty v roztoku stanovit současně.

Při hledání podkladů pro vývoj nové metody bylo nalezeno několik stávajících, které byly též používány ke stanovování dusitanů a dusičnanů v různých vzorcích. Ve všech vybraných metodách je použita křemenná kapilára. Öztekin a kol.<sup>6</sup> používají kapiláru potaženou polyethyleniminem, který obrací EOF. Do pufru tak není nutné přidávat žádnou povrchově aktivní látku. Běžná povrchově aktivní látka přidávaná do pufru je CTAB (Martínez a kol.<sup>7</sup>) nebo CTAC (Guan a kol.<sup>8</sup>, Fukushi a kol.<sup>9</sup>). Boudko a kol.<sup>10</sup> používají do pufru přídavek tetradecyltrimethylamonium hydroxidu (TTAOH). Jako pufr se běžně používá různě koncentrovaný tetraboritanový (Guan a kol., Fukushi a kol.) nebo boritanový (Boudko a kol.). Zajímavostí v tomto případě je, že do pufru přidávají arginin, což není úplně běžné. Öztekin a kol. využívají TRIS a Martínez a kol. používají pufr fosfátový.

---

<sup>6</sup>ÖZTEKIN, NEVIN, NUTKU, M. SAID, ERIM, F. BEDIA. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis *Food chemistry* [online]. 2002, č. 76 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný z World Wide Web: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460100287>>. ISSN 0308-8146

<sup>7</sup>MARTÍNEZ, V., GARCÍA, N., ANTIGÜEDA, I., ALONSO, R. M., JIMÉNEZ, R. M. Capillary electrophoresis as a useful tool for the analysis of chemical tracers applied to hydrological systems. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, č. 1032/1-2 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný z World Wide Web: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303020508>>. ISSN 0021-9673

<sup>8</sup>GUAN, FUYU, WU, HUIFANG, LUO YI. Sensitive and selective method for direct determination of nitrite and nitrate by high-performance capillary electrophoresis *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, č. 719/2 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný z World Wide Web: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021967395007350>>. ISSN 0021-9673

<sup>9</sup>FUKUSHI, KEIICHI, TAKEDA, SAHORI, CHAYAMA, KENJI, WAKIDA, SHIN-ICHI. Application of capillary electrophoresis to the analysis of inorganic ions in environmental samples *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, č. 834/1-2 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný na World Wide Web: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967398010073>>. ISSN 0021-9673

<sup>10</sup>BOUDKO, D. Y., COOPER, B. Y., HARVEY, W. R., MOROZ, L. L. High-resolution microanalysis of nitrite and nitrate in neuronal tissues by capillary electrophoresis with conductivity detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2002, č. 774/1 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný z World Wide Web: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023202002192>>. ISSN 2570-0232

K detekci se používá absorpční detektor pracující při vlnové délce 191 – 220 nm (Guan a kol., Öztekin a kol., Martínez a kol.) nebo 260 nm (Fukushi a kol.). Boudko a kol. využívají k detekci vodivostní detektor. Tři z těchto pěti metod jsou používány k analýze různých druhů vody (říční, mořská, sníh apod.). Boudko a kol. svoji metodu využívají k analýze neurologických vzorků a Öztekin a kol. k analýze masa a zeleniny.

Nejnižšího limitu detekce dosáhli Guan a kol. (0,4 $\mu$ g/l u dusitanů a 1 ng/l u dusičnanů), nicméně ve své práci uvádí, že při měření praktických vzorků například říční vody měli problém s interpretací relativně malého píku dusitanů vedle velkého píku dusičnanů. Jako podklad pro vývoj nové metody byla pro svůj nízký LOD použita právě tato metoda, povedlo se však odstranit problém v analýze rozdílného množství dusičnanů a dusitanů pro pitné vody.

## 2 Metodika

### 2.1 Chemikálie a přístroje

TRIS (99,9%), kyselina chlorovodíková (38%), ACN (99,9%), CTAC (25% ve vodě) byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Kyselina fosforečná (85%), kyselina octová (čistá), kyselina sulfanilová (p. a.), naftylamin (p. a.), hydroxid sodný (98%), dusitan sodný (99%), dusičnan draselný (99,8%), jodid draselný (p. a.), jodičnan draselný (p. a.) a tetraboritan sodný – dekahydrát (99,5%) pochází ze závodu Chemapol (Praha, ČR). Chlorid draselný (99,5%) byl vyroben firmou Lach-Ner (Neratovice, ČR). K měření byla použita kapilární elektroforéza od firmy Agilent Technologies, (Waldbronn, Německo) a 8543 UV-Visible spektrofotometr od téhož výrobce.

### 2.2 Původní CZE metoda

K první sérii měření byla použita metoda vyvinutá na University of Texas at Arlington.<sup>11</sup> Cílem práce bylo ověřit, zda je daná metoda dostatečně citlivá, aby ji bylo možno využít pro detekci dusitanů a dusičnanů v pitné vodě.

K separaci je používána křemenná kapilára o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ . Její celková délka je 37 cm, délka od vstupní vialky k detektoru 28,5 cm. Dávkování vzorku je prováděno tlakem 2,5 kPa po dobu tří sekund. Napětí vložené mezi konce kapiláry je -15 kV. Teplota je udržována na hodnotě 25 °C. K detekci jednotlivých zón slouží absorpční spektrometrický detektor pracující při vlnové délce 200 resp. 214 nm, což je pro dané měření nejcitlivější oblast.

Každá nová kapilára je před použitím promyta deset minut hydroxidem sodným o koncentraci 1 mol/l a deset minut deionizovanou vodou. Před každým dalším měřením je

---

<sup>11</sup>KŘÍŽEK, T., BREITBACH, Z. S., ARMSTRONG, D. W., TESAŘOVÁ, E., COUFAL, P. Separation of inorganic and small organic anions by CE using phosphonium-based mono- and dicationic reagents. *Electrophoresis*, 2009, roč. 30, č. 22, s. 3955-3963. ISSN 1522-2683

navíc promyta po dobu dvou minut jednomolárním hydroxidem sodným, jednu minutu deionizovanou vodou a jednu minutu pufrem.

Pufř tvořĩ roztok 50 mM 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diolu (TRIS) a 20 mM propan-1,3-bis(tripropylfosfonium)fluoridu s přĩdavkem 5% acetonitrilu (ACN). Jeho pH je kyselinou trihydrogenfosforečnou upraveno na hodnotu 7.

### **2.3 Nová CZE metoda**

K separaci se používá křemenná kapilára o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ . Délka od vstupní vialky k detektoru je 53,54 cm, celková délka pak 62 cm. Je použito elektrokinetické dávkování o hodnotě napětí -5 kV po dobu 15 sekund. Teplota je udržována na hodnotě 25  $^{\circ}\text{C}$ . K detekci jednotlivých zón slouží absorpční spektrometrický detektor pracující při vlnové délce 200 nm.

Každá nová kapilára je před použitím promyta deset minut hydroxidem sodným o koncentraci 1 mol/l a deset minut deionizovanou vodou. Před každým dalším měřením je navíc promyta po dobu dvou minut jednomolárním hydroxidem sodným, jednu minutu deionizovanou vodou a jednu minutu pufrem.

Pufř tvořĩ roztok 50 mM TRIS a 0,1 mM CTAC. Jeho pH je kyselinou chlorovodĩkovou upraveno na hodnotu 7.

### **2.4 Spektrofotometrická metoda**

Ke stanovení dusitanů ve vzorcích vod byla vybrána původní spektrofotometrická metoda z roku 1889 (Griesseho – Ilosvayova metoda). 0,3% kyselina sulfanilová (4-aminobenzensulfonová kyselina) v 30% kyselině octové byla diazotována kyselinou dusičnou (z dusitanů ze vzorku). Následně došlo ke kopulaci s 0,5%  $\alpha$ -naftylaminem.

Intenzita zabarvení vzniklého azobarviva byla změřena pomocí absorpčního spektrofotometru při vlnové délce 527 nm. Měření probíhalo v kyvetě z čirého plastu o optické dráze<sup>12</sup> 1 cm. Před samotným měřením byla provedena i tzv. korekce na barvu. Při té se zpracuje duplikátní vzorek, ale bez vybarvovacího činidla. U něj se rovněž změří absorbance ( $A_b$ ). Naměřená absorbance se označí  $A_m$ . Výsledná hodnota absorbance odpovídající obsahu dusitanů je pak rovna  $A_m - A_b$ .

---

<sup>12</sup>Optická dráha je součin indexu lomu a geometrické dráhy, kterou musí světlo urazit

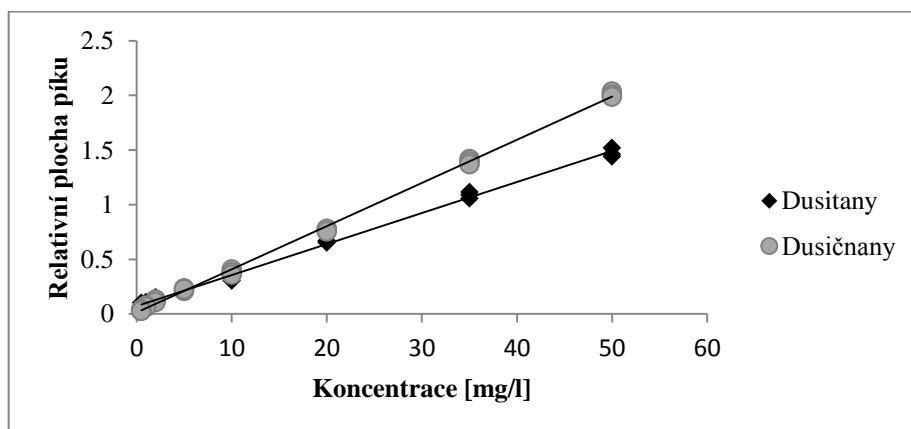
## 3 Výsledky měření

### 3.1 Původní metoda

#### 3.1.1 Kalibrace

Ke kalibraci metody byla použita kalibrační křivka. Bylo změřeno osm různých známých koncentrací dusitanů i dusičnanů. Tyto koncentrace se pohybovaly v hodnotách od 0,5 do 50 mg/l. Každá koncentrace byla pro dosažení větší přesnosti kalibrace změřena třikrát. Ke každému vzorku byl navíc přidán jodidový aniont v koncentraci 50 mg/l, jehož plocha zde slouží jako standard, ke které jsou vztaženy hodnoty ploch píků separovaných látek, aby se minimalizovaly odchylky jednotlivých měření. Ke kalibrační křivce byl zároveň vytvořen graf a rovnice závislosti (Obr. 2). Do rovnic pro kalibrační křivky se následně dosadí hodnoty naměřené u jednotlivých vzorků a vypočítá se konkrétní obsah iontů.

Obr. 2 Závislost relativní plochy píku na koncentraci dusitanů a dusičnanů



Základní parametry určené kalibrací jsou směrnice a úsek kalibrační přímky a dále limit detekce a limit kvantifikace. Limit detekce (LOD) je nejnižší možná hodnota koncentrace, pro kterou je ještě možno spolehlivě určit přítomnost daného analytu ve vzorku. Limit

kvantifikace (LOQ) je nejnižší hodnota, pro kterou lze spolehlivě určit nejen jeho přítomnost ve vzorku, ale i jeho koncentraci.

Pro dusičnany byl limit kvantifikace vypočten na 1,8 mg/l a limit detekce na 0,54 mg/l, což jsou velmi příznivé hodnoty (mezní hodnota pro obsah dusičnanů v kojenecké a pitné vodě je 15, resp. 50 mg/l) a metodu je tudíž možno bez problémů použít ke stanovení těchto iontů. Pro dusitany však limit detekce vyšel 0,75 mg/l a limit kvantifikace dokonce 2,50 mg/l, což 25× překračuje nejvyšší přípustnou hodnotu pro výskyt dusitanů v pitné vodě. Vyšší limit detekce pro dusitany byl způsoben systémovým píkem v blízkosti píku dusitanu, což znemožnilo jeho interpretaci v nízkých koncentracích a zároveň zvýšilo hodnotu úseku kalibrační přímky. Z toho důvodu byla následně použita metoda absorpční spektrofotometrie. Relativní směrodatná odchylka<sup>13</sup> měření je velmi nízká: pro migrační časy iontů se tyto hodnoty pohybují v desetinách procent (0,22 % pro dusitany a 0,19 % pro dusičnany) a rovněž pro plochy píků jsou velmi příznivé (pro dusitany 1,46% a pro dusičnany 2,18%).

**Tab. 1** Důležité hodnoty kalibrace pro dusitany a dusičnany

	<i>Dusitany</i>	<i>Dusičnany</i>
LOD [mg/l]	0,75	0,54
LOQ [mg/l]	2,50	1,80
Směrnice [l/mg]	0,04	0,03
Úsek	0,02	0,07

### 3.1.2 Měření reálných vzorků

K otestování přesnosti této metody bylo použito sedm vzorků balených vod a pět vzorků vod studničních a vodovodních. Měřené balené vody byly zakoupeny v Praze a šlo o tyto značky: Rajec, Bonaqua, Vittel, Evian, Contrex, San Benedetto a Toma Natura. Měření byla provedena před vypršením minimální expirační doby a vody byly otevřeny

<sup>13</sup>Relativní směrodatná odchylka je hodnota, která určuje, nakolik se od sebe liší výsledky opakovaných měření téhož vzorku. Uvádí se v procentech, a čím nižší je, tím se výsledky méně liší.

bezprostředně před analýzou. Podle měření všechny značky splňují normy na kvalitu kojenecké vody. V tabulce 2 je srovnání naměřených hodnot a hodnot uvedených výrobcem na etiketě.

**Tab. 2** Srovnání naměřených a výrobcem deklarovaných hodnot pro balené vody

<i>Balená voda</i>	<i>Obsah dusičnanů mg/l</i>	<i>Interval spolehlivosti +/- mg/l</i>	<i>Hodnota deklarovaná na etiketě</i>
Rajec	11,33	0,54	8,90
Bonaqua	6,81	0,45	6,80
Toma natura	7,16	0,42	6,00
Contrex	4,77	0,47	2,90
Evian	4,23	0,48	3,70
Vittel	7,05	0,45	4,30
San Benedetto	8,05	0,45	6,80

Pět vzorků vod studničních a vodovodních bylo vybráno s ohledem na jejich dostupnost. Všechny vzorky byly odebrány do lahví z PE a to nejpozději den před analýzou. Uchovávány byly v chladničce při teplotě 5° C. Voda odebraná na Mělníku pochází z vodovodního řadu, je podpovrchová z pramene Mělnická Vrutice, která svou kvalitou splňuje nároky na kojeneckou vodu. To potvrzuje ve svých rozborech i dodavatel, firma Veolia voda, a. s. Voda pražská splňuje parametry na pitnou vodu a stejně tak i studniční voda z Vehlovic. Naproti tomu voda z Cítova obsahuje téměř dvojnásobné množství dusičnanů, a není proto vhodná k trvalému užívání. Pramen Světice byl historicky nejstarší zdroj vody pro Mělník a ještě před několika lety obsahoval kvalitní pitnou vodu. O studnu se však nikdo nestaral a byla obnovena až v roce 2010. Voda k analýze byla odebrána krátce po obnovení studánky. Analýza prokázala, že voda není vhodná k pití, jelikož stanovenou hodnotu překračuje téměř 1,5×. Hodnoty jsou přehledně shrnuty v tabulce 3.



Jelikož byly tyto výsledky vyhodnocovány metodou standardního přídávku, jsou intervaly spolehlivosti širší než u výsledků balených vod, které byly vyhodnocovány metodou kalibrační křivky.

**Tab. 3** Hodnoty naměřené pro vodovodní a studniční vody

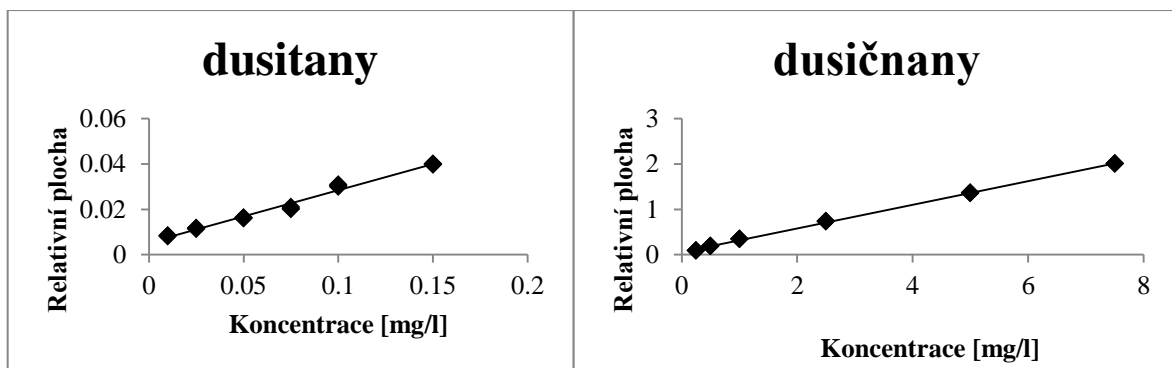
<i>Vodovodní &amp; studniční voda</i>	<i>Obsah dusičnanů mg/l</i>	<i>Interval spolehlivosti +/- mg/l</i>
Mělník	11,24	2,71
Světice	125,8	9,57
Cítov	97,9	21,76
Vehlovice	48,7	9,96
Praha	23,4	4,31

## 3.2 Nová metoda

### 3.2.1 Kalibrace

Ke kalibraci metody byla použita kalibrační křivka. Metoda byla kalibrována pro měření reálných vzorků, tedy pro rozdílné koncentrace dusitanů a dusičnanů. Bylo změřeno celkem šest různých dvojic koncentrací, které se pohybovaly v hodnotách od 0,15 do 0,01 mg/l pro dusitany a od 7,5 do 0,25 mg/l pro dusičnany. Každá dvojice koncentrací byla pro dosažení větší přesnosti kalibrace změřena třikrát. Ke každému vzorku byl přidán jako standard jodičnanový aniont v koncentraci 15 mg/l.

**Obr. 3** Kalibrační křivka pro dusitany a dusičnany



Pro dusičnany byl limit detekce vypočten na 0,08 mg/l a limit kvantifikace na 0,27 mg/l. Limit detekce pro dusitany je 0,01 mg/l a limit kvantifikace 0,03 mg/l, což je 3,3× méně než je přípustná hodnota pro dusitany. Nebyl tudíž problém metodu použít pro stanovení obou iontů současně.

RSD měření je velmi nízká. Pro migrační časy iontů se pohybuje v hodnotách 0,91% pro dusitany a 0,81% pro dusičnany. Rovněž pro plochy píků je při daných koncentracích velmi dobrá – 5,70% pro dusitany a 1,02% pro dusičnany.

**Tab. 4** Důležité hodnoty kalibrace pro dusitany a dusičnany

	<i>Dusitany</i>	<i>Dusičnany</i>
LOD [mg/l]	0,01	0,08
LOQ [mg/l]	0,03	0,27
Směrnice [l/mg]	0,23	0,26
Úsek	0,01	0,06

### 3.2.2 Měření reálných vzorků

K měření praktických vzorků bylo použito osm značek balených vod a pět vzorků vod vodovodních. Měřené balené vody byly zakoupeny v Praze a šlo o tyto značky: Aqua

Anna, Albert voda, Dobrá voda, Korunní, Máma a já, Ondrášovka, Perrier a Tesco voda. Měření byla provedena před vypršením minimální expirační doby a vody byly otevřeny bezprostředně před analýzou. Podle měření všechny značky splňují normy na kvalitu kojenecké vody v obsahu dusitanů i dusičnanů. Obsah dusitanů byl mnohdy tak nízký, že jej nebylo možno vůbec zaznamenat. V tabulce 5 je srovnání naměřených hodnot a hodnot uvedených výrobcem na etiketě.

**Tab. 5** Srovnání naměřených a výrobcem deklarovaných hodnot pro balené vody

<i>Balená voda</i>	<i>Obsah dusičnanů mg/l</i>	<i>Interval spolehlivosti +/- mg/l</i>	<i>Hodnota deklarovaná na etiketě</i>	<i>Obsah dusitanů mg/l</i>	<i>Interval spolehlivosti +/- mg/l</i>	<i>Hodnota deklarovaná na etiketě</i>
Aqua Anna	6,19	0,32	6,57	0,06	0,01	neuvádí
Albert	16,05	2,31	neuvádí	< LOD	-	neuvádí
Dobrá voda	< LOD	-	<0,03	0,04	0,04	<0,02
Korunní	1,11	0,03	neuvádí	< LOD	-	neuvádí
Máma a já	1,48	0,04	<0,1	< LOD	-	<0,02
Ondrášovka	< LOD	-	<0,1	< LOD	-	<0,01
Perrier	6,39	0,42	18,00	< LOD	-	neuvádí
Tesco	< LOD	-	neuvádí	< LOD	-	neuvádí

Pět vzorků vodovodních vod bylo odebráno na více místech republiky. Všechny vzorky byly odebrány do lahví z PE a to nejpozději den před analýzou. Uchovávány byly v chladničce při teplotě 5° C. Všechny vzorky splňují kritéria na kojeneckou vodu z hlediska obsahu dusitanů i dusičnanů. Hodnoty jsou přehledně shrnuty v tabulce 6.

**Tab. 6** Hodnoty naměřené pro vodovodní a studniční vody

<i>Vodovodní &amp; studniční voda</i>	<i>Obsah dusičnanů mg/l</i>	<i>Interval spolehlivosti +/- mg/l</i>	<i>Obsah dusitanů mg/l</i>	<i>Interval spolehlivosti +/- mg/l</i>
Mělník	11,11	1,36	< LOD	-
Český Krumlov	4,84	0,19	< LOD	-
Volyně	7,62	0,49	< LOD	-
Liběchov	16,48	3,09	< LOD	-
Praha	28,63	7,60	< LOD	-

### 3.3 Spektrofotometrická metoda

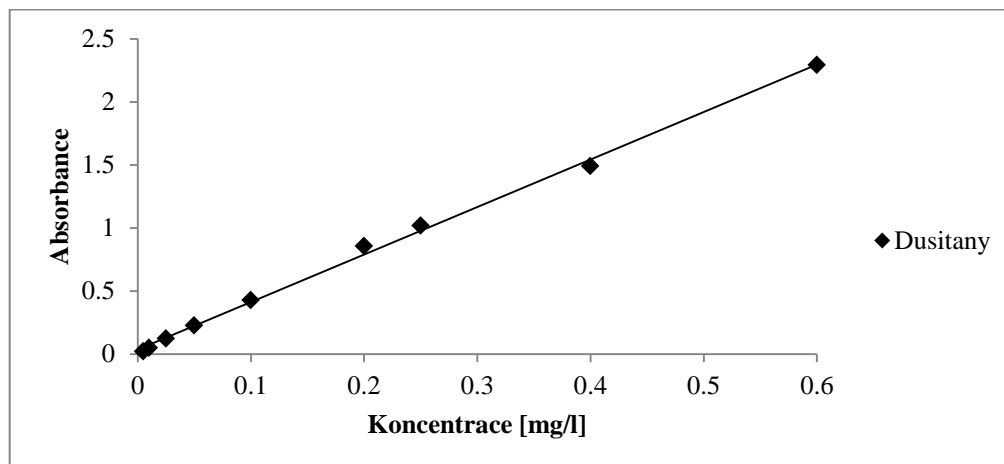
#### 3.3.1 Kalibrace

Ke kalibraci spektrofotometrické metody byla použita kalibrační křivka. Bylo změřeno deset známých koncentrací roztoku dusitanů v rozmezí od 5 do 600 µg/l. Absorbance byla změřena při vlnové délce 527 nm a pro každý vzorek jednou. Následně byl vytvořen graf lineární závislosti absorbance na koncentraci roztoku, podle něhož byly následně vyhodnocovány konkrétní vzorky vod.

**Tab. 7** Důležité hodnoty kalibrace pro dusitany

	<i>Dusitany</i>
LOD [mg/l]	0,02
LOQ [mg/l]	0,05
Směrnice [l/mg]	4,24
Úsek	0,01

**Obr. 4** Závislost absorpance vzorku na koncentraci dusitanů



### 3.3.2 Měření reálných vzorků

Tato metoda byla použita k doměření obsahu dusitanů ve vzorcích použitých k ověření funkčnosti první CZE metody. Jedná se o totožné vzorky daných vod změřených v rámci dvou dnů. Množství dusitanů ve všech vzorcích balených i vodovodních vod bylo tak nízké, že ani tato ČSN kodifikovaná metoda je nebyla schopna zaznamenat.

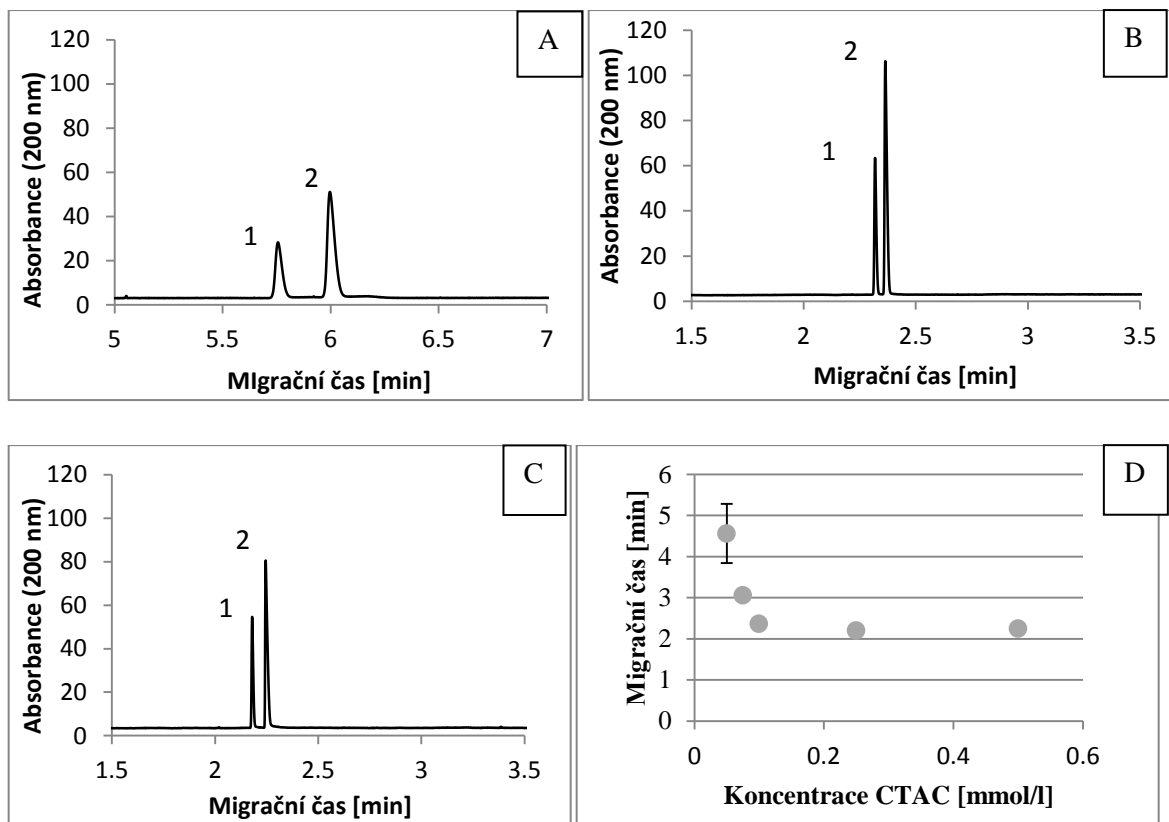
## Závěr a diskuze

Jelikož výsledky ukázaly, že původní metoda není pro své vysoké LOD a LOQ vhodná pro stanovení dusitanů a dusičnanů ve vodě, přistoupili jsme k vývoji nové metody, která by svými parametry již vyhovovala.

Pro vývoj této metody posloužila jako podklad již zmíněná metoda podle Guana a kol. Cílem bylo optimalizovat dostatečně citlivou metodu pro současné stanovení dusitanů i dusičnanů v reálných vzorcích. Bylo tudíž potřeba vhodně upravit separační podmínky – složení a pH pufru a způsob dávkování.

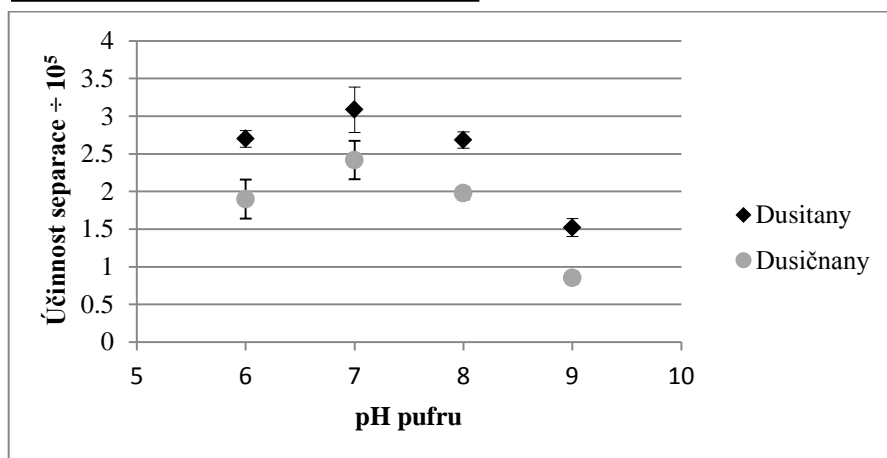
Jako první byl použit 20 mM fosfátový pufr, pH 7, s přídavkem 1 mM CTAC. Takto získané píky dusitanů i dusičnanů byly i při vysokých koncentracích rozmyté a tudíž špatně reprodukovatelné. Pufr byl proto změněn na 20 mM boritanový, pH 7, s přídavkem 1 mM CTAC, ale nevykazoval výrazné zlepšení separace. Byl proto vyzkoušen již v předchozí metodě osvědčený TRIS v koncentraci 50 mM, pH 7, také s přídavkem 1 mM CTAC. Při použití TRISu probíhala separace dobře. Píky byly ostré a doba separace nebyla příliš dlouhá. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že se pro další postup použije tento pufr. Bylo však třeba optimalizovat koncentraci aditiva. Pro tuto optimalizaci byly změněny koncentrace od 0,05 do 0,5 mM. Koncentrace aditiva ovlivňuje čas i účinnost separace. Nejlepší výsledky byly dosaženy 0,1 mM CTAC při pH roztoku 7. Migrační čas pro koncentraci CTAC 0,5 mM nebyl sice výrazně odlišný od toho při koncentraci 0,1 mM, ale vyšší obsah CTAC měl nepříznivý vliv na účinnost separace (Obr 5).

**Obr. 5** Elektroferogramy pro různé koncentrace CTAC – A – 0,05 mM, B – 0,1 mM, C – 0,5 mM, D - závislost migračního času na koncentraci CTAC pro dusičnany. Koncentrace obou iontů je 50 mg/l.



Vzhledem k tomu, že na účinnost separace má vliv i pH roztoku, byla ověřena účinnost separace při celočíselných hodnotách pH od 6 do 9. Experimentálně bylo potvrzeno, že při menších rozdílech hodnot pH než celočíselných se účinnost separace mění jen minimálně. Ukázalo se, že nejlepší hodnota pH pufru je 7 (Obr. 6).

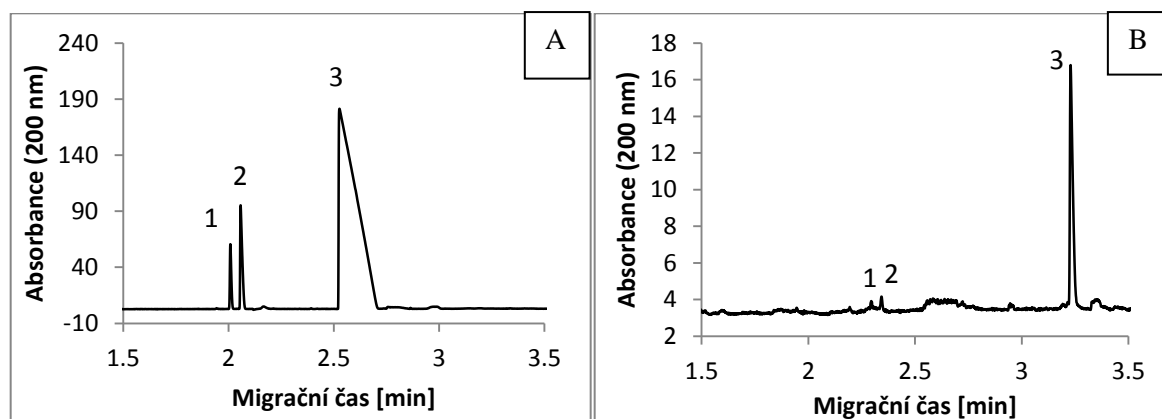
**Obr. 6** Závislost účinnosti separace na pH pufru



Pro toto složení separačního pufru byla naměřena kalibrační křivka. Limit detekce pro dusičnany vyšel vcelku dobře - 0,58 mg/l - a limit kvantifikace 1,95 mg/l. Problém však nastal v případě dusitanů. Limity detekce a kvantifikace byly sice nižší, než u původní metody (LOD – 0,33 mg/l, LOQ – 1,09 mg/l), přesto se ani v jednom případě nepodařilo překročit hranici 0,1 mg/l, což je maximální přípustná hodnota pro obsah dusitanů.

Možným řešením byla změna způsobu dávkování. Při všech dosavadních měřeních bylo použito hydrodynamické dávkování. Použití elektrokinetického dávkování přinesla neočekávané zvýšení citlivosti. Dávkování bylo provedeno aplikací napětí -5 kV po různě dlouhou dobu v rozmezí od 5 do 25 sekund. Při 15 s bylo dávkování nejefektivnější. Z obr. 7 je patrné, že při elektrokinetickém dávkování dochází k zakoncentrování analytů na rozhraní zóny vzorku a separačního pufru. Díky tomu jsou získané píky při tomto způsobu dávkování mnohonásobně vyšší.

**Obr. 7** Dávkování A – elektrokinetické -5 kV/15s, B – hydrodynamické - 2,5 kPa/3s.  
Koncentrace dusitanů a dusičnanů je 0,1mg/l, jodičnanů 15 mg/l

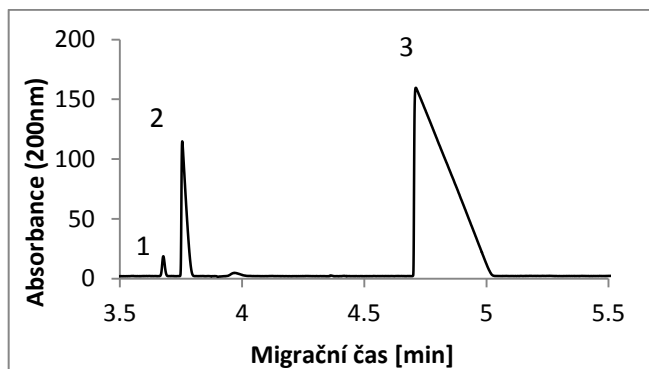


Kalibrační křivka naměřená za těchto podmínek (elektrokinetické dávkování po dobu 15 s, 50 mM TRIS, 0,1 mM přídavek CTAC) poskytla velmi dobré LOD i LOQ pro oba ionty. V případě reálných vzorků je koncentrace dusičnanů mnohonásobně vyšší než koncentrace dusitanů. Byla proto provedena kalibrace pro dvojice koncentrací pohybujících se v hodnotách od 0,15 do 0,01 mg/l  $\text{NO}_2^-$  a od 7,5 do 0,25 mg/l  $\text{NO}_3^-$  (Obr. 8). Tato kalibrace



poskytla následující výsledky: LOD 0,01 mg/l pro dusitany a 0,08 mg/l pro dusičnany a LOQ 0,03 mg/l pro dusitany, resp. 0,27 mg/l pro dusičnany.

**Obr. 8** Elektrokinetické dávkování -5 kV/15s pro 0,01 mg/l dusitanů, 0,25 mg/l dusičnanů a 15 mg/l jodičnanů



V reálných vzorcích se však zároveň vyskytují i jiné ionty, které mohou ovlivnit vodivost vzorku a tím i účinnost dávkování. Do vzorku byl proto přidán chlorid draselný v koncentraci 3,5 mM. Ten zvýšil vodivost vzorku na průměrnou vodivost pitné vody cca 40 mS/m (mezní hodnota vodivosti je 125 mS/m).<sup>14</sup> Kalibrační křivka naměřená s přidavkem KCl a pro různé hodnoty obsahu dusitanů a dusičnanů poskytla hodnoty LOD 0,35 mg/l a LOQ 1,15 mg/l pro NO<sup>3-</sup> a 0,03 mg/l (LOD) a 0,11 mg/l (LOQ) pro NO<sup>2-</sup>. Metoda tak je schopná i v reálném vzorku analyzovat zvýšené množství NO<sup>2-</sup>, než je mezní hodnota. LOD a LOQ pro jednotlivé podmínky separace jsou shrnuty v tabulce 8.

Konečná podoba vyvinuté metody je popsána ve druhé části práce. Metoda byla s úspěchem použita pro stanovení dusitanů a dusičnanů v reálných vzorcích balené a vodovodní vody. Výsledky měření a postup při kalibraci jsou shrnuty v části třetí.

<sup>14</sup>Vodivost vzorku (konduktivita) nepřímou vyjadřuje množství iontů rozpuštěných ve vodě, jelikož závisí na jejich koncentraci.

**Tab. 8** Přehledné shrnutí LOD a LOQ pro dusitany a dusičnany pro různé podmínky separace

<b>Podmínky separace</b>	<b>LOD pro dusitany [mg/l]</b>	<b>LOQ pro dusitany [mg/l]</b>	<b>LOD pro dusičnany [mg/l]</b>	<b>LOQ pro dusičnany [mg/l]</b>
50 mM TRIS, 0,1 mM CTAC, pH 7, hydrodyn. dáv.	0,33	1,9	0,58	1,95
50 mM TRIS, 0,1 mM CTAC, pH 7, elkin. dáv.	0,01	0,03	0,08	0,27
zvýšená vodivost vzorku	0,03	0,11	0,35	1,15

# Seznam zkratek

ACN – Acetonitril

CTAB – Cetyltrimethylamonium bromid

CTAC – Cetyltrimethylamonium chlorid

CZE – Capillary zone electrophoresis – kapilární zónová elektroforéza

ČSN – Česká státní norma

EOF – electroosmotic flow – elektroosmotický tok

ISO – International organization for standardization – Mezinárodní organizace pro standardy

LOD – Limit of detection – limit detekce

LOQ – Limit of quantification – limit kvantifikace

MZd – Ministerstvo zdravotnictví

PE - Polyethylen

RFChR – Rozšířený fyzikální a chemický rozbor

TRIS – 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

TTAOH – tetradecyltrimethylammonium hydroxid

VFChR – Výběrový fyzikální a chemický rozbor

ZFChR – Základní fyzikální a chemický rozbor

## Seznam použité literatury

HORÁKOVÁ, Marta a kol. *Analytika vody*. 2. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2003. 335 s.  
ISBN 80-7080-520-X

KAŠIČKA, Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. 1997, roč. 91, č. 5, s. 320-329, ISSN 0009-2770

KŘÍŽEK, Tomáš, BREITBACH, Zachary S., ARMSTRONG, Daniel W., TESAŘOVÁ, Eva, COUFAL, Pavel. Separation of inorganic and small organic anions by CE using phosphonium-based mono- and dicationic reagents. *Electrophoresis*. 2009, roč. 30, č. 22, s. 3955-3963. ISSN 1522-2683

ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2005. 264 s. ISBN 80-246-0852-9

## Seznam použitých internetových zdrojů

- BOUDKO, D. Y., COOPER, B. Y., HARVEY, W. R., MOROZ, L. L. High-resolution microanalysis of nitrite and nitrate in neuronal tissues by capillary electrophoresis with conductivity detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2002, č. 774/1 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný z World Wide Web:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023202002192>>. ISSN 2570-0232
- FUKUSHI, KEIICHI, TAKEDA, SAHORI, CHAYAMA, KENJI, WAKIDA, SHIN-ICHI. Application of capillary electrophoresis to the analysis of inorganic ions in environmental samples *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, č. 834/1-2 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný na World Wide Web:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967398010073>>. ISSN 0021-9673
- GUAN, FUYU, WU, HUIFANG, LUO YI. Sensitive and selective method for direct determination of nitrite and nitrate by high-performance capillary electrophoresis *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, č. 719/2 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný z World Wide Web:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021967395007350>>. ISSN 0021-9673
- KUČEROVÁ, EVA, DVOŘÁKOVÁ, MARCELA, VALENTOVÁ, VENDULA. *Voda pro vás* [online]. 2009, č. 1. [cit. 6. 10. 2011]. Dostupné z World Wide Web:  
<[http://www.veoliavoda.cz/czech-republic-water/ressources/documents/1/1951.voda\\_09\\_stredocesky.pdf](http://www.veoliavoda.cz/czech-republic-water/ressources/documents/1/1951.voda_09_stredocesky.pdf)>
- MARTÍNEZ, V., GARCÍA, N., ANTIGÜEDA, I., ALONSO, R. M., JIMÉNEZ, R. M. Capillary electrophoresis as a useful tool for the analysis of chemical tracers applied to hydrological systems. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, č. 1032/1-2 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný z World Wide Web:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303020508>>. ISSN 0021-9673
- ÖZTEKIN, NEVIN, NUTKU, M. SAID, ERIM, F. BEDIA. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis *Food chemistry* [online]. 2002, č. 76 [cit. 18. 11. 2011]. Dostupný z World Wide Web:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460100287>>. ISSN 0308-8146
- Swiss Laboratory for Doping Analyses* [online]. 9. 9. 2011 [cit. 25. 11. 2011]. Dostupné z World Wide Web: <<http://www.doping.chuv.ch/>>