



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

265 012

(21) PV 8262-86.U
(22) Přihlášeno 14 11 86

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/18

(40) Zveřejněno 15 12 88
(45) Vydáno 15 01 90

(75)
Autor vynálezu

SLÁDKOVÁ JARMILA RNDr.,
SVOBODA VLASTIMIL ing., BRNO

Stabilní reagenční proužky ke stanovení dusičnanů

(54)

(57) Předmětem řešení jsou reagenční proužky ke stanovení dusičnanů v oblasti hygieny a zemědělství. Proužky obsahují jako kyselou reagující látku kyselý tlumič o pH 1,5 až 4,5, např. pufr vinanový, pufr kyseliny p-toluensulfonové nebo pufr citrátový a jako stabilizátor substituovaný terc. butyl-fenol se substituenty R₁ až R₅ nebo sирnou N-acetylaminokyselinou se substituenty R₆ a R₇ a popřípadě pyrosiřičitan sodný nebo draselný, kyseliny ethylendiamintetraoctovou nebo kyselinu 1,2-diaminocyklohexan-tetraoctovou nebo jejich sodné soli.

Předmětem vynálezu jsou stabilní reagenční proužky ke stanovení dusičnanů obsahující modifikované Griessovo činidlo, práškový kov jako reduktor a stabilizátory.

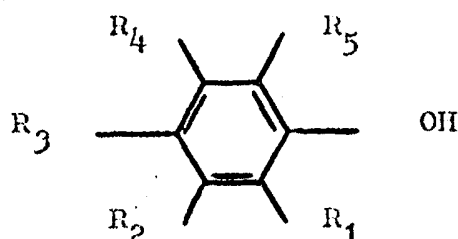
Stanovení nízkých koncentrací dusičnanů v nejrůznějších materiálech nabývá v poslední době stále většího významu v souvislosti se zvyšujícím se znečišťováním životního prostředí. Zejména aktuální je tento problém u pitných a napájecích vod a poživatin a krmiv rostlinného původu, v nichž se stále častěji vyskytují zvýšené obsahy dusičnanů jako důsledek nadbytečného používání dusíkatých hnojiv. Ve všech těchto případech mohou zvýšené obsahy dusičnanů vést k vážnému ohrožení zdraví až již hospodářských zvířat nebo i lidí, takže stálá a spolehlivá kontrola všech těchto materiálů na obsah dusičnanů je zcela nezbytná.

Pro přesné, kvantitativní stanovení dusičnanů v nejrůznějších materiálech je známa a obecně používána celá řada fyzikálních nebo chemických metod, jako jsou například stanovení pomocí ion-selektivní dusičnanové elektrody, polarografie, metody založené na vzniku zbarvených aromatických nitrosloučenin, fotometrické stanovení dusičnanů pro redukci na dusitany nebo amoniak a podobně. Všechny tyto metody poskytují sice relativně velmi přesné výsledky, jsou však většinou značně složité a zdlouhavé a jejich provedení vyžaduje speciální laboratorní zařízení a přístroje. V praxi je však často nutné stanovit dusičnany přímo v terénu, mimo laboratoř a bez použití uvedených přístrojů a zařízení. K tomu účelu byla v minulosti vyvinuta celá řada poměrně jednoduchých testů, založených vesměs na oxidačním účinku dusičnanů v silně kyselém prostředí. Všechny tyto testy však mají společnou nevýhodu v tom, že k jejich provedení je nutné použít buď silně žíravé nebo i prudce jedovaté chemikálie, jako je například kyselina sírová nebo brucin. V tomto ohledu je výhodnější použití tzv.

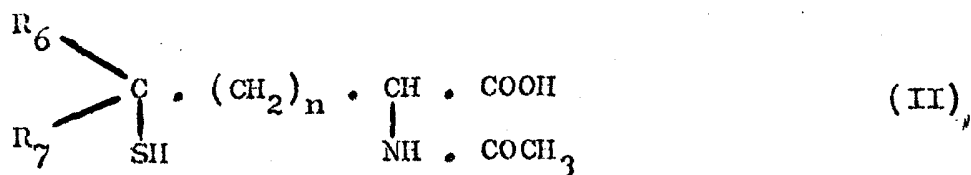
reagenčních proužků, u nichž všechna činidla potřebná pro stanovení dusičnanů jsou obsažena v pevném, suchém stavu na vhodném nasákavém nosiči. Tyto reagenční proužky jsou vesměs založeny na principu redukce dusičnanů vhodným kovem na ekvivalentní množství dusitanů, které se pak stanoví barevnou diazotační a azokopulační reakcí, obecně známou pod názvem Griessova reakce. Ačkoliv způsob přípravy a složení takových proužků je předmětem řady vynálezů, žádný z nich neřeší problém přípravy dokonalých proužků zcela uspokojivým způsobem. Důvodem je inkompatibilita jednotlivých činidel a chemikálií, potřebných k průběhu všech reakcí, na nichž je stanovení založeno. Americký patentní spis č. 3,511,608 obchází tuto skutečnost tím, že inkompatibilní látky, jako je například kyselina citrónová a zinkový prach jako reduktor, jsou nanášeny na dvou různých proužcích papíru, které se spojí přiložením teprve v okamžiku použití proužků. Prakticky stejným způsobem řeší tento problém i NSR-patentní spis DE č. 2436598, jako jeden z nosičů však používá ve vodě rozpustný papír z vláken karboxymethylcelulose, na němž je nanášeno kyselé reagující Griessovo činidlo. Jak je v popisu tohoto vynálezu výslovně uvedeno, je použití dvou oddělených nosičů nezbytné, neboť při nanášení všech látek na jeden papír dochází k rychlému rozkladu zinku kyselinou, a tím ke znehodnocení proužků. Přípravu reagenčních proužků, u nichž jsou všechna potřebná činidla inkorporována do jednoho nosiče, popisuje NDR-patentní spis č. 77841. U těchto proužků je jako reduktor použit práškový hořčík, jemně rozetřený s kyselinou šťavelovou a nanášený v suchém stavu na filtrační papír, na nějž byl nanášen roztok Griessova činidla a papír vysušen. Práškový nános reduktoru a kyseliny je potom fixován k papíru blíže nepopsaným způsobem vrstvou polyethylenglykolu. Nevýhodou těchto proužků je však vedle poměrně složitého způsobu přípravy i jejich nedostatečná citlivost a velmi malá stabilita. Další NDR-patentní spis č. 216542 pak popisuje obdobné reagenční papírky, u nichž je však jako reduktoru použito práškové kadmium, nanášené na papír ve formě suspenze ve vodném roztoku dextranu; Griessovo činidlo spolu s potřebnou kyselinou je pak nanášeno na vysušený papír jako druhá impregnace z metanolového roztoku. Tyto proužky, jejichž obdoba je v současné době

vyráběna jak s kadmiovým, tak se zinkovým reduktorem, vykazují již značně zlepšené funkční vlastnosti. Jejich společným nedostatkem je však jejich malá stabilita, vedoucí k poměrně rychlému rozkladu celého reakčního systému proužků, nejsou-li extrémně dobře chráněny před působením vlhkého okolního vzduchu a přímého světla. U proužků s kadmiovým reduktorem je pak další nevýhodou nejen silná toxicita, kancerogenita a mutagenita kadmia, ale i okolnost, že tento reduktor v systému použitým na vyráběných proužcích redukuje nejen dusičnany na dusitany, ale i azobarvivo vznikající při pozitivní Griessově reakci. Tato skutečnost může samozřejmě vést k falešně nižším nálezců dusičnanů, neprovede-li se vyhodnocení barevné reakce proužku v přesně určené době po nanesení vzorku.

Všechny tyto nedostatky snižují reagenční proužky k semikvantitativnímu stanovení dusičnanů, obsahující v jedné vrstvě nasákavého nosiče práškový reduktor, modifikované Griessovo činidlo, kyselé reagující látku obsahující kyselé tlumič o pH 1,5 až 4,5, například pufr vinanový, pufr kyseliny p-toluensulfonové nebo pufr citrátový a jako stabilizátor substituovaný terciární butyl-fenol obecného vzorce I



v němž substituenty R_1 až R_5 jsou stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny, například vodík, hydroxyl, alkyl nebo alkoxyl o počtu uhlíků 1 až 2, přičemž však alespoň jeden z těchto substituentů je skupina terc.-butylová, a/nebo sirnou N-acetylamínokyselinu obecného vzorce II



v němž substituenty R_6 a R_7 představují nezávisle na sobě vodík

nebo methyl a n představuje celé číslo 0 nebo 1 a popřípadě pyrosiřičitan sodný nebo draselný, a/nebo kyselinu ethylendi-amintetraoctovou nebo kyselinu 1,2-diaminocyklohexan-tetraoctovou nebo jejich sodné soli.

Reagenční proužky pro stanovení dusičnanů o tomto složení vykazují velmi dobré funkční vlastnosti, jako je citlivost vůči iontům NO_3^- , pohybující se na úrovni 3 až 5 mg/l a velmi dobrá gradace barevné odezvy na stoupající koncentrace dusičnanů, dovolující velmi přesné semikvantitativní stanovení dusičnanů v koncentračním rozmezí 10 až 1000 mg/l. Jejich největší předností proti známým a v současné době vyráběným proužkům je však jejich poměrně vysoká stabilita, zaručující zachování nezměněných funkčních vlastností po dobu mnoha měsíců při běžném skladování a používání.

I když tyto dobré funkční vlastnosti a vysoká stabilita proužků pro stanovení dusičnanů podle tohoto vynálezu je dána celkovým reakčním systémem i způsobem, jakým je tento systém nanesen na nasákový nosič, představuje nejvýznamnější znaky vynálezu použití tlumiče o pH 1,5 až 4,5 a výše definovaného stabilizátoru. Použitím tlumiče o pH 1,5 až 4,5, s výhodou pH = 2,0 až 2,8, se proužky podle vynálezu výrazně liší od všech dosud známých řešení, popisujících výhradně použití pevných organických kyselin, jako citronové, vinné nebo šťavelové, popřípadě jejich směsi. Použití těchto kyselin samotných však vede k vytvoření příliš nízkého pH, většinou pod hodnotu 1,5, v reakční zóně proužků, což má za následek nejen sníženou stabilitu proužků, ale vytváří i suboptimální prostředí pro průběh všech reakcí, potřebných ke stanovení dusičnanů. Naproti tomu použití tlumiče o pH 2,0 až 2,8, vede jak ke zvýšení stability kovového reduktoru v kyselém prostředí tlumiče, tak i k žádoucímu posunu elektrolytického potenciálu reduktoru ke kladnějším hodnotám s důsledkem značně potlačené redukce vznikajícího azobarviva. Vedle toho však toto vyšší pH značně stabilizuje i aromatické aminy, které tvoří Griessovo činidlo, proti autooxidaci a citlivosti vůči působení okolního prostředí a přímého světla. Tato skutečnost je značně překvapivá, neboť obecně jsou aromatické aminy stabilnější ve formě svých solí, přičemž tvorbu

těchto solí a jejich stabilitu zpravidla pozitivně ovlivňuje co nejnižší pH.

Jako tlumič lze v reakčním systému proužků podle vynálezu použít jakýkoliv z běžně užívaných tlumičů, pokud ovšem sestává z pevných, netěkavých složek, které chemicky nereagují s ostatními činidly reakčního systému a nebrání průběhu reakcí, které při stanovení dusičnanů na proužku probíhají. Jako příklady takových vhodných tlumičů je možné uvést tlumiče citrátové, vinanové nebo tlumiče na bázi kyseliny p-toluensulfonové, jablečné a jejich alkalických solí.

Další základní nezbytnou složkou proužků podle vynálezu je kovový reduktor, jehož účelem v reakčním systému proužků je redukce dusičnanů na analyticky lépe stanovitelné dusitany. Teoreticky lze sice použít kterýkoliv kov, jehož elektrodový potenciál má zápornou hodnotu, v praxi je však nejvýhodnější použití zinku. Tento kov se s výhodou používá ve formě prášku o velikosti částic pod $15\text{ }\mu\text{m}$ a v množství 10 až 500, s výhodou 50 až 100 μg zinku na 1 cm^2 nasáklavého nosiče.

Další hlavní součástí reakčního systému je Griessovo činidlo, sestávající z diazotovatelného a azokopulovatelného aromatického aminu. V běžné analytické literatuře bylo popsáno několik desítek modifikací, lišících se navzájem výběrem a kombinací těchto dvou aminů. Principiálně je možné v reakčním systému proužků podle vynálezu použít jakoukoliv z těchto modifikací, pokud ovšem vykazuje vůči dusitanům dostatečnou citlivost a vzniklé azobarvivo dostatečně vysoký molární extinkční koeficient. Je samozřejmé, že nejvhodnější jsou kombinace aminů, poskytujících s dusitany červeně až fialově zbarvená azobarviva. Těmto všem požadavkům nejlépe vyhovují sulfanilamid nebo kyselina sulfanilová jako diazotovatelný amin a 1-naftylamin, popřípadě substituovaný na dusíku, jako je např. N-(1-naftyl)-ethylendiamin nebo 3-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-(h)-benzochinolin jako azokopulovatelný amin; použití těchto látek v proužcích podle vynálezu je také nejvýhodnější.

Dalším podstatným znakem vynálezu je stabilizátor, sestá-

vající z výše definovaného terc.-butyl-fenolu I. a sирné N-acetylaminokyseliny II a popřípadě ještě pyrosiřičitanu a/nebo kyseliny ethylendiamintetraoctové nebo 1,2-diaminocyklohexan-N,N,N',N'-tetraoctové nebo jejich sodných solí.

Základní složky tohoto stabilizátoru tvoří terc.-butylfenol I. a sирná N-acetylaminokyselina II. Typickými představiteli terc.-butylfenolů I použitelnými v reagenčních proužcích podle vynálezu jsou 2- nebo 3-terc.-butyl-4-methoxyfenol, 3-methyl-6-terc.-butyl-fenol, 2,6-di-terc.-butyl-4-methylfenol, 2,5-di-terc-butyl-hydrochinon, 2,4-dimethyl-6-terc.-butyl-fenol a podobné látky, které jsou již delší dobu známy a používány ve velkém měřítku jako antioxidanty a stabilizátory například kaučuku, minerálních olejů a benzinů, jedlých tuků a různých potravin, kosmetických přípravků, nátěrových hmot a podobných průmyslových výrobků. Je proto překvapující, že uvedené terc.-butylfenoly vykazují výborné antioxidační a stabilizační účinky i na celý reakční systém reagenčních proužků sestávající z kovového reduktoru, tlumiče a aromatických aminů.

Obdobně nepředvídaný je i stabilizační účinek výše definovaných sирných N-acetylaminokyseliny obecného vzorce II, mezi něž patří zejména N-acetyl-cystein, N-acetylhomocystein nebo N-acetylpenicillamin. Obě skupiny stabilizátorů mohou být použity v reagenčních proužcích podle vynálezu samostatně, největšího účinku se však dosáhne, použije-li se obou typů stabilizátorů současně; v tomto případě se zřejmě uplatňuje zcela neočekávaný silný synergický účinek. Tento účinek lze popřípadě ještě dále zvýšit, jestliže se tyto látky použijí ve směsi s alkalickým pyrosiřičitanem a/nebo kyselinou ethylendiamintetraoctovou nebo 1,2-diaminocyklohexan-tetraoctovou, nebo jejich sodnými solemi.

Je samozřejmé, že vedle výše uvedených hlavních složek reakčního systému mohou proužky pro stanovení dusičnanů podle vynálezu obsahovat i další látky, používané obecně ke zlepšení vlastností, případně stability reagenčních nebo diagnostických proužků.

Jsou to v první řadě různé povrchově aktivní látky kation-aktivního, anionaktivního nebo neionogenního typu. Tyto látky zvyšují nasákavost indikační zóny proužků, čímž urychlují přístup vyšetřované kapaliny k činidlům reakčního systému, a tím

i barevnou odezvu proužků na stanovovaný analyt. I když v tomto smyslu lze v indikačním systému proužků použít povrchově aktivní látku jakéhokoliv z výše uvedeného typu, je nejvýhodnější použití anionaktivních látek, které vedle urychlení průběhu celé indikační reakce, zvyšují i citlivost proužků a stabilizují azobarvivo vznikající při pozitivní reakci proužků.

Dále mohou proužky pro stanovení dusičnanů podle vynálezu obsahovat různá tak zvaná "zahušťovadla", tj. přirozené nebo syntetické polymerní látky, jako je například alginát, karaginan, želatina, polyvinylalkohol nebo polyvinylpyrrolidon. Tyto látky jsou obecně používány i v indikačních zónách jiných reagenčních proužků pro svůj mírně stabilizační účinek a hlavně jistý "egalizační" vliv na zbarvení proužků při pozitivní reakci.

Proužky pro stanovení dusičnanů podle výše popsaného vynálezu se připravují o sobě známým postupem tak, že se jednotlivé komponenty reakčního systému nanесou ve formě roztoku na nasákový nosič, který se potom důkladně vysuší. Vzhledem k výše uvedené inkompatibilitě některých složek reakčního systému se tyto látky nanášejí na nosič odděleně formou dvou až tří roztoků, přičemž s výhodou se pro první impregnaci použije vodný roztok, pro druhou, případně třetí impregnaci pak roztok zbylých činidel v nevodném rozpouštědle, jako například metanolu, etanolu, acetonu nebo toluenu. Je samozřejmé, že po každé z těchto impregnací je nutné nasákový nosič pečlivě vysušit, nejlépe proudem horkého vzduchu. Jako nasákový nosič je přitom možné použít zejména filtrační papír nebo rouno ze syntetických nebo hydrofilizovaných skleněných vláken, případně ze směsi celulózových a syntetických - s výhodou polyamidových - vláken. Nasákový nosič se po nanesení všech impregnačních roztoků s činidly potřebnými pro zdárný průběh analytické reakce a po důkladném vysušení rozřeže na čtyřúhelníčky o rozměru například 6 x 6 mm, které se pak nalepí na podložku z plastické hmoty, například z polyvinylchloridu nebo polystyrenu.

Příklad provedení

1. Impregnační roztok 1 :

Tlumič vinanový, pH = 2,23 (0,2 M)	99,17 % hmot.
Pyrosiřičitan sodný	0,65 %
Chelatonát tetrasodný	0,18 %

Vinanový tlumič pH 2,23 (0,2 M) obsahuje:

Kyselina vinná	3,00 % hmot.
Hydroxid sodný	0,72 %
Destilovaná voda	96,28 %

Impregnační roztok 2 :

Polyvinylpyrrolidon K 90	5,83 % hmot.
Zinek práškový	0,70 %
Ethylalkohol 96 %	93,47 %

Impregnační roztok 3 :

Ethylalkohol 96 %	96,29 % hmot.
Kyselina vinná	3,00 %
Sulfanilamid	0,24 %
N-(1-naftyl)-ethylendiamin, hydrochlorid	0,14 %
N-acetyl-L-cystein	0,06 %
2,6-di-terc.-butyl-4-methyl-fenol	0,02 %
di-N-oktyl-sulfojantaran sodný	0,24 %

Impregnační roztoky se připraví postupným rozpouštěním, případně smícháním jednotlivých složek ve výše uvedeném pořadí a nanese postupně na filtrační papír o plošné hmotnosti $120 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ tak, aby papír byl impregnačním roztokem právě

nasyčen; mezi jednotlivými impregnacemi se papír vždy důkladně vysuší proudem teplého vzduchu. Vysušený papír se nařeže na čtverečky o rozměru 6 x 6 mm, které se nalepí - například pomocí oboustranné samolepící pásky - na konec podložky z bílé plastické fólie o rozměrech 6 x 80 mm. Takto připravené proužky reagují na přítomnost dusičnanů vznikem červenofialového zbarvení, jehož intenzita je úměrná koncentraci dusičnanů v koncentračním rozmezí 10 až 1000 mg . l⁻¹ NO₃⁻.

2. Impregnační roztok 1 :

Tlumič kyseliny p-toluensulfonové, pH = 1,50	99,50 % hmot.
Pyrosiřičitan sodný	0,50 %

Tlumič kyseliny p-toluensulfonové, pH 1,50 obsahuje :

Kyselina p-toluensulfonová - monohydrát	0,72 % hmot.
p-toluensulfonan sodný	1,32 %
Destilovaná voda	97,96 %

Impregnační roztok 2 :

Polyvinylpyrrolidon K 90	5,79 % hmot.
Zinek práškový	0,69 %
Kyselina sulfanilová	0,29 %
1-naftylamin	0,12 %
N-acetyl-DL-homocystein	0,09 %
2,5-di-terc.-butylhydrochinon	0,06 %
Laurylsulfát sodný	0,17 %
Ethylalkohol 96 %	92,79 %

3. Impregnační roztok 1 :

Citrátový tlumič, pH 3,04 (0,2 M)	99,15 % hmot.
Pyrosiřičitan sodný	0,65 %
Sodná sůl kyseliny 1,2-diaminocyklohexan-tetraoctové	0,20 %

Citrátový tlumič, pH 3,04 (0,2 M) obsahuje :

Kyselina citrónová	3,84 % hmot.
Hydroxid sodný	0,48 %
Voda destilovaná	95,68 %

Impregnační roztok 2 :

Polyvinylpyrrolidon K 90	5,83 % hmot.
Zinek práškový	0,70 %
Ethylalkohol 96 %	93,47 %

Impregnační roztok 3 :

Ethylalkohol 96 %	99,13 % hmot.
Sulfanilamid	0,25 %
N-(1-naftyl)-ethylendiamin, hydrochlorid	0,15 %
2,6-di-terc.-butyl-4-methyl-fenol	0,22 %
di-N-oktyl-sulfojantaran sodný	0,25 %

4. Impregnační roztok 1 :

Vinanový tlumič, pH 4,5 (0,2 M)	99,10 % hmot.
Pyrosiřičitan draselný	0,65 %
Kyselina ethylendiamintetraoctová	0,25 %

Vinanový tlumič, pH 4,5 (0,2 M) obsahuje :

Kyselina vinná	3,00 % hmot.
Hydroxid sodný	1,44 %
Voda destilovaná	95,56 %

Impregnační roztok 2 :

Polyvinylpyrrolidon K 90	5,79 % hmot.
Zinek práškový	1,39 %
Ethylalkohol 96 %	92,82 %

Impregnační roztok 3 :

Ethylalkohol 96 %	96,48 % hmot.
Kyselina vinná	3,01 %
Sulfanilamid	0,24 %
N-(1-naftyl)-ethylendiamin, hydrochlorid	0,14 %
N-acetyl-L-cystein	0,12 %

5. Impregnační roztok č. 1 :

Vinanový tlumič, pH 3,58 (0,2 M)	99,35 % hmot.
Pyrosiřičitan sodný	0,65 %

Vinanový tlumič, pH 3,58 (0,2 M) obsahuje :

Kyselina vinná	3,00 % hmot.
Hydroxid sodný	0,96 %
Voda destilovaná	96,04 %

Impregnační roztok 2 :

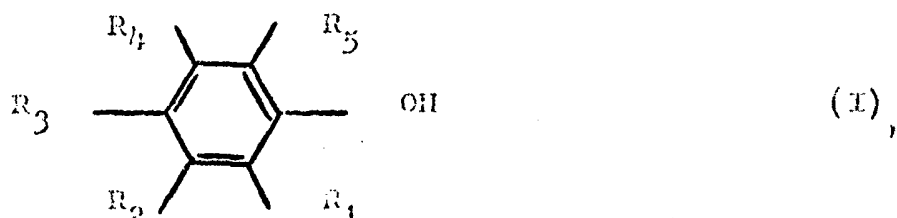
Polyvinylpyrrolidon K 90	5,82 % hmot.
Zinek práškový	0,35 %
Ethylalkohol 96 %	93,24 %
Sulfanilamid	0,23 %
3-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-(h)- benzochinolin hydrochlorid	0,13 %
2,5-di-terc.-butyl-hydrochinon	0,06 %
Laurylsulfát sodný	0,17 %

Impregnační roztoky a proužky pro stanovení dusičnanů uvedené v příkladech 2 až 5 se připraví způsobem popsáním pod příkladem 1. Proužky vykazují obdobné funkční vlastnosti jako proužky připravené podle příkladu 1, zabarvení indikační zóny při pozitivní reakci je však růžové až karminově červené.

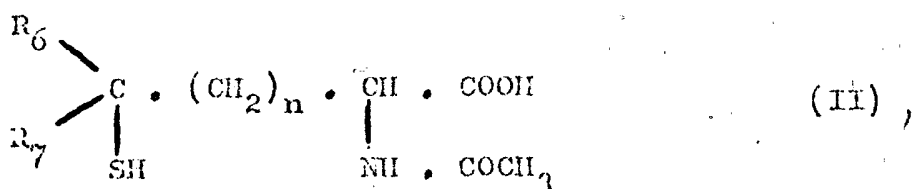
P Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

265 012

Reagenční proužky ke stanovení dusičnanů obsahující v jedné vrstvě nasákového nosiče práškový reduktor, modifikované Griessovo činidlo, kyselá reagující látka a stabilizátor, vyznačené tím, že jako kyselá reagující látka obsahují kyselý tlumič o pH 1,5 až 4,5, například pufr vinanový, pufr kyseliny p-toluensulfonové nebo pufr citrátový a jako stabilizátor substituovaný terc. butyl-fenol obecného vzorce I



v němž substituenty R_1 až R_5 jsou stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny, například vodík, hydroxyl, alkyl nebo alkokyl o počtu uhlíků 1 až 2, přičemž však alespoň jeden z těchto substituentů je skupina terc.-butylová, a/nebo sirnou N-acetylaminokyselinu obecného vzorce II



v němž substituenty R_6 a R_7 představují nezávisle na sobě vodík nebo methyl a n představuje celé číslo 0 nebo 1 a popřípadě pyrosiřičitan sodný nebo draselný, a/nebo kyselinu ethylen-diamintetraoctovou nebo kyselinu 1,2-diaminocyklohexan-tetraoctovou nebo jejich sodné soli.