

A nitrit mikro-mennyiségeinek meghatározása fotometrálással I.

Vizsgálatok tiszta nitrit — oldattal

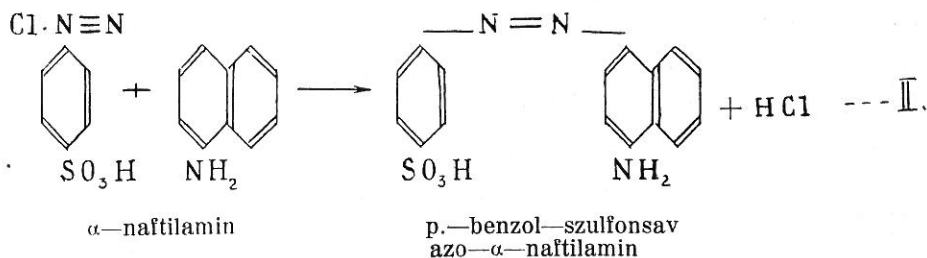
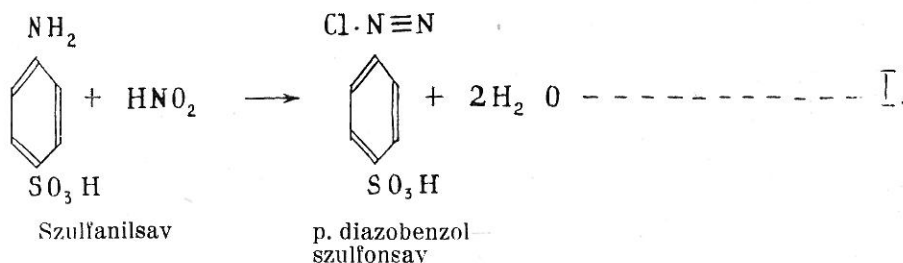
JÁMBOR BÉLA

Agrokémiai Kutató Intézet Biokémiai Osztálya, Budapest

A mezőgazdasági tudományos kutatás során gyakran merült fel igen kis mennyiségű nitrit mennyiségi meghatározásának szüksége: talajban, növényben, vízben stb. A nitritnek ugyanis a növények nitrogénforgalmában fontos szerepe van: egyrészt, mint a nitrátasszimiláció közbelső anyagának, másrészt, mint oxidáló anyagnak. Jelen vizsgálatok elvégzését az tette szükségessé, hogy a növény nitrogén-anyagcseréjének tanulmányozásához szükséges nitrit-meghatározási módszerek kipróbáláskor különböző nehézségek merültek fel, melyek elhárítására a szakirodalomban kielégítő módszert nem találtam. Így vizsgálat alá kellett venni a nitritmeghatározási módszereket egészen az alapoktól kezdve.

A nitrit mikro-meghatározására ezidőszert a diazotálási reakción alapuló GRIESS—ILOSVAJ-reakció (4., 5.) és annak változatai bizonyultak legjobbnak, mind érzékenység, mind az eredmények reprodukálhatósága szempontjából.

A GRIESS—ILOSVAJ-reakciót a szerzők mint **minőségi reakciót** közölték. Lényege az, hogy ecetsavas közegben a nitrittartalomra vizsgálendő oldatot szulfanilsav és α -naftilamin elegyével hozzuk össze. Erre a nitrit és szulfanilsav között diazotálási reakció játszódik le, (I.) a keletkező diazónium-sóhoz pedig az α -naftilamin hozzákapcsolódik (II.) és ciklámenpiros azofesték-oldat keletkezik.



E reakció kivételének további részleteivel foglalkozik BLOM (3), aki azt szintén mint **minőségi reakciót** tárgyalja; kézenfekvő lehetőségként megemlíti, hogy mennyiségi munkához is használható a reakció, de ezt igazoló vizsgálati eredményeket nem közöl.

Ugyancsak minőségi reakcióként foglalkoznak a GRIESS—ILOSVAY reakcióval LEMOIGNE, MONGUILLON és DÉSVEAUX (8) is, de lényegében újat nem mondanak és a BLOM (3) említett közleményében foglaltak gyakorlatbaviteléről számolnak be.

PRIANYISNYIKOV hasonló módon írja le a reakciót KLEIN (7) kézikönyvében.

RIDER és MELLON (12) a módszer mennyiségi viszonyait alapos kritikai vizsgálat alá vették és ajánlott módszerükben előírták azokat a kísérleti feltételeket, melyek mellett a reakció mennyiségi és megismételhető eredményeket ad.

Főbb megállapításaik:

1. Először az I. reakciónak teljesen végbe kell mennie, csak azután szabad hozzáadni az α -naftilamint.

2. Az I. reakció kedvező pH-ja 1.4, a II.-é 2.5.

3. 68 különféle ion hatását megvizsgálva megállapították, melyek zavarják a reakciót az erősen oxidáló, redukáló és színes ionok zavarják a reakciót az erősen oxidáló, redukáló és színes ionok

4. A színreakció a LAMBERT-BEER-törvényt csak $9\gamma(\text{NO}_2)\text{N}50$ ml alatti nitrit-koncentrációk esetén követi. Ennél töményebb nitrit-oldat vizsgálata esetén az α -naftilamin hozzáadására keletkező azofesték egy része kicsapódik.

RIDER és MELLON idézett közleményéből azt is megtudhatjuk, hogy a GRIESS—ILOSVAY módszer a 30-as években mint mennyiségi módszer több amerikai hivatalos módszerkönyvben is megjelent és többen ajánlottak kisebb-nagyobb módosításokat rajta. RIDER és MELLON mindezeket bevonták kritikai vizsgálatukba s ezek figyelembevételével dolgozták ki ajánlott módszerüket.

JENDRASSIK és FALCSIK—SZABÓ (6) a diazotálási reakcióhoz szulfanilsav helyett novokaint (p-aminobenzoil-dimetil-aminoetanolhidroklorid) vagy a vele rokon atoxikokaint ajánlja, mivel az ezekből képződő azofesték nagyobb koncentráció esetén sem csapódik ki s így a módszer mérési határa a szulfanilsavénak többszöröse. Közleményükben a mennyiségi módszerként való alkalmazás kísérleti feltételeit is előírják. Módszerüket ALTEN és KNIPPENBERG (1) átvették és növényi anyagokra alkalmazták, hangsúlyozva, hogy érzékenysége a szulfanilsavas módszerének tízszerese. A JENDRASSIK—FALCSIK—SZABÓ, ill. ALTEN—KNIPPENBERG módszert közlik LAINE és VIRTANEN (2) is összefoglaló munkájukban, mint az azidőszerint legjobbat.

A GRIESS—ILOSVAY reakció eredeti módját ajánlja SZELÉNYI (14) talajvizsgálatokhoz: a pH-ra nincs tekintettel, ezért különböző oldószereket használva a kapott eredmények egymástól igen eltérnek. Helytelen az is, hogy a két kémszert egyszerre adja az oldathoz, mert így a szín kifejlődése sokáig tart és a reakció érzékenysége is csökken.

A VIRTANEN-iskola kutatói napjainkban részben BLOM szerint határozzák meg a nitrit tartalmat (11, 15), részben JENDRASSIK és FALCSIK—SZABÓ szerint (10).

STEWART és STREET (13) a növények nitrogénvegyületeiről írt tanulmányukban a nitrit meghatározására a GRIESS—ILOSVAY—BLOM—LEMOIGNE módszert ajánlja, megjegyezve, hogy a pH-t és egyéb kísérleti feltételeket mennyiségi munkánál pontosan szabványosítani kell és utalnak RIDER és MELLON e téren végzett, már ismertett munkájára.

Kísérleti rész.

A fent ismertett szakirodalom áttanulmányozása után fennmaradt kérdések tisztázása végett vizsgálat alá vettem a GRIESS—ILOSVAY és a JENDRASSIK—FALCSIK—SZABÓ-féle módszereket különböző szempontból.

1. A használt oldatok

a) **A nitrit törzsoldat** pro. anal. NaNO_2 vizes oldatából úgy készül, hogy egy ml törzsoldatban 1 γ nitrogén legyen. A törzsoldat állandósága érdekében nátronlúggal pH = 8-ra állítottam be. Pontos nitrit-tartalmát n/10 KMnO_4 -es titrálással állapítottam meg. (9).

b) **Szulfanilsav**: 1% szulfanilsav oldata 25%-os ecetsavban.

c) **α -naftilamin**: 0.25% α -naftilamin oldata 25%-os ecetsavban.

d) **Novokain**: 3% novokain oldata 25%-os ecetsavban.

2. A használt készülékek

a) PULFRICH-fotométer.

b) LANGE-ROTH fényelektromos fotométer.

c) DI GLÉRIA rendszerű elektromos pH-mérő, kettős kinhidron elektród.

d) Tungstram gyártmányú luxmérő.

3. A kiindulás alapjául szolgáló **meghatározási módszer**: legfeljebb 10 γ nitrit-nitrogént tartalmazó oldatot 50 ml-es mérőlombikba pipettázunk, ecetsavval, ill. nátriumacetáttal 2.5 körüli pH-re hozzuk, hozzáadunk 1 ml szulfanilsavoldatot, 15 perc múlva 1 ml híjján jelig töltjük, hozzáadunk 1 ml α -naftilamint, pontosan jelig töltjük, felrázuk és a piros oldat extinkcióját PULFRICH-fotométeren S 53-as szűrővel 3 cm-es küvettában megmérjük. Így eljárva 1 γ nitrit-nitrogénnek 0.16 extinkció-érték felel meg.

4. **A nitrit-koncentráció hatása**. Különböző nitritmennyiségekkel végezve a meghatározást, azt tapasztalhatjuk, hogy a nitritmennyiség növelésével először csapadékképződés lép fel s a leszűrt oldat extinkciója 16-640 γ N-mennyiség közt végig kb. 4 γ N-nek felel meg 640 γ fölé emelve a nitrit-nitrogén mennyiségét, a csapadékképződés fokozatosan megszűnik s egyúttal az oldat színe bíborból narancson át világossárgába megy át. A kapott extinkcióértékeket, a csapadék- és színviszonyokat az 1. táblázat, a különböző nitritmennyiségek esetén kapott oldatok különböző hullámhosszú fényenél mért extinkcióit a 2. táblázat, a 8 γ és a 3200 γ nitrit-nitrogénnel kapott bíbor, illetőleg sárga oldat szingörbójét pedig az 1. ábra II. és III. görbéje mutatja.

I. táblázat

GRIESS—ILOSVAI reakció 16—64000 γ (NO_2^-)-N töménységű oldatokkal

γ (NO_2^-)-N	E (S 53, 3 cm küv.)	1 Csapadék	2 A leszűrt oldat színe
16—640	0.58	a.) A töménységgel nő	b.) bíborpiros
800	0.99	b.) A tömény— séggel csökken	b.) narancs
1600	0.39		
3200	0.32		
4800	0.18		
16000	0.00	c.) nincs	c.) sárga
64000	0,00		

Az 1. táblázat extinkcióértékeit tanulmányozva feltűnik, hogy 16 γ -nál nagyobb nitrit-nitrogén mennyiség esetén az extinkció kb. fele a 8 γ -nak megfelelőnek. Ez a körülmény arra enged következtetni, hogy a 4 γ -nak megfelelő oldat telített, e felett kb. 8-10 γ -ig túltelített azo-festék-oldatot kapunk, melyből a nitrit-koncentrációt növelve rövidebb-hosszabb idő után megindul a csapadékképződés, ami addig tart, míg a telítettségi állapot beáll. 320 γ (NO_2^-)-N-esetén feltűnően nagy, 2.4 extinkcióérték adódott, ez azonban másnapra csapadékkiválás kíséretében 0.6 körüli értékre szállt le. Ez az erősen túltelített oldat véletlen folytán keletkezett, megismételni nem sikerült.

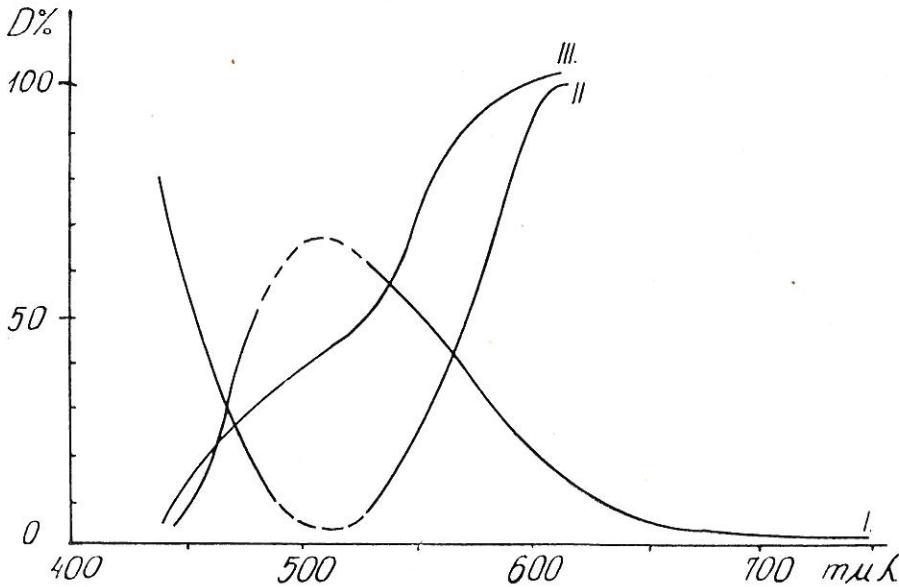
II. táblázat

Különböző hullámhosszakon mért extinkciók

γ	1. Mért anyag	2. LANGE- RÓTH készülék zöld szűrője	$\gamma/50 \text{ ml}(\text{NO}_2^-)\text{-N}$						
			8	800	1600	3200	4800	16000	64000
436	2.00	0.10	0.46	0.90	1.46	1.38	0.60	0.76	
465	0.82	0.36	0.60	0.58	0.72	0.75	0.15	0.20	
496	0.32	0.84	0.93	0.55	0.49	0.36	0.60	0.06	
533	0.23	1.30	0.90	0.39	0.32	0.18	0	0	
574	0.40	0.34	0.31	0.08	0.06	0	0	0	
619	0.91	0	0	0	0	0	0	0	
665	1.35	0	0	0	0	0	0	0	
726	1.55	0	0	0	0	0	0	0	
750	1.63	0	0	0	0	0	0	0	

A II. táblázat és az 1. ábra II. és III. görbéje azt mutatja, hogy a reakció után az oldat színe erősen megváltozik, jeléül annak, hogy nagyobb nitritkoncentráció esetén más reakció zajlik le.

5. A feltöltést mikor végezzük? Az előzők alapján kézenfekvő, hogy az 50 ml-re feltöltést az α -naftilamin hozzáadása előtt kell végezni, különben a feltöltetlen, esetleg csak 10 ml-nyi oldatban az azofesték koncentrációja átmenetileg a csapadékképződési (telítettségi) határ fölött van. Túltelített oldatról lévén azonban szó, a csapadékképződés irreverzibilis s így a már kivált csapadék a későbbi feltöltéskor már nem oldódik, sőt a kiválás a telítettség mértékéig folytatódhat. Így hibás eredményeket kaphatunk. Hogy ez a folyamat milyen mértékben zajlik le az elmondottak szerint, az egyebek közt attól függ, mennyivel van az azofesték kon-



I. ábra

Szingörbék PULFRICH fotométeren mérve

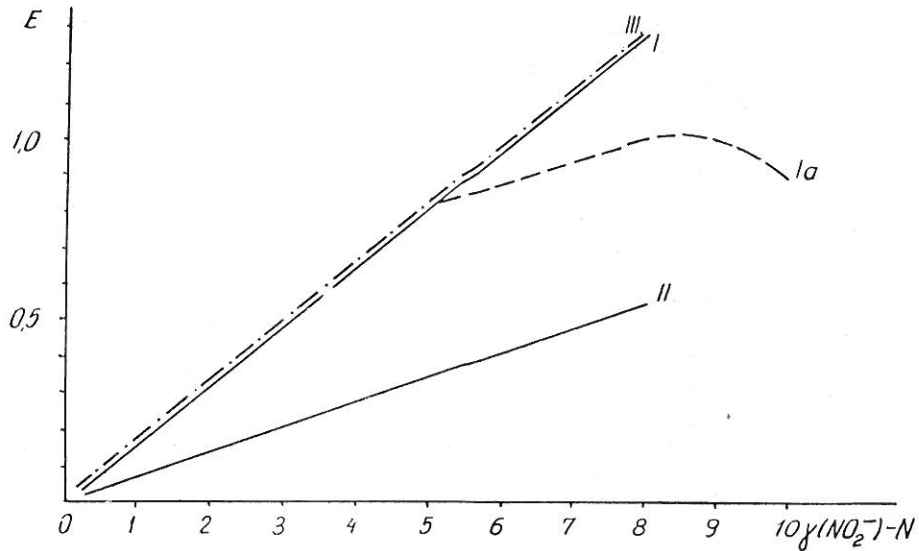
- I. A LANGE-RÓTH fotométer zöld szűrője.
- II. $8\gamma/\text{NO}_2/\text{-N}$ oldatból a kiindulási módszerrel kapott piros szín.
- III. $3200\gamma/\text{NO}_2/\text{-N}$ oldatból a kiindulási módszerrel kapott sárga szín.

centrációja a megengedett határ felett és hogy a feltöltésig mennyi idő telik el. Hogy ez gyakorlatilag hogyan érvényesül, arranézve párhuzamos kísérletsorozatot végeztem. Az egyik sorozatnál a 49 ml-re feltöltés az α -naftilamin hozzáadása előtt, a másik sorozatnál 10 perccel utána történt. A két sorozat tízszeres ismétléssel készült; a méréseknek a középértéktől való átlagos és legnagyobb eltérését feltüntető III. táblázat világosan mutatja, hogy a feltöltést az α -naftilamin hozzáadása után végezve az eredmények szórása, valamint a legnagyobb eltérés is kb. ötszöröse annak, mint ha az α -naftilamin hozzáadása előtt végezzük a feltöltést. A II. ábra I/a görbéje pedig a kapott extinkcióértékek csökkenését mutatja a helytelenül végzett feltöltés esetén.

III. táblázat

GRIESS-IOSVAY szerinti nitritmeghatározások közepes és legnagyobb eltérései az eredmények középértékének %-ában

$\gamma/50 \text{ ml}(\text{NO}_2^-)\text{-N}$	1.6	3.2	4.8	6.4	8.0	9.6	11.2	12.8	átlag
1) Közepes eltérés, ha α — naftilamin előtt töltünk fel	0.2	2.3	2.6	1.4	3.2	2.6	4.3	4.6	2.9
2) Legnagyobb eltérés fenti esetben	11.2	13.9	3.9	3.0	10.6	4.8	10.0	8.1	8.1
3) Közepes eltérés, ha α — naftilamin után töltünk fel	15.0	5.8	7.0	12.4	17.6	30.5	18.2	2.6	13.6
4) Legnagyobb eltérés fenti esetben	18.5	16.4	19.0	31.0	40.0	62.0	90.0	5.2	35.2



2. ábra

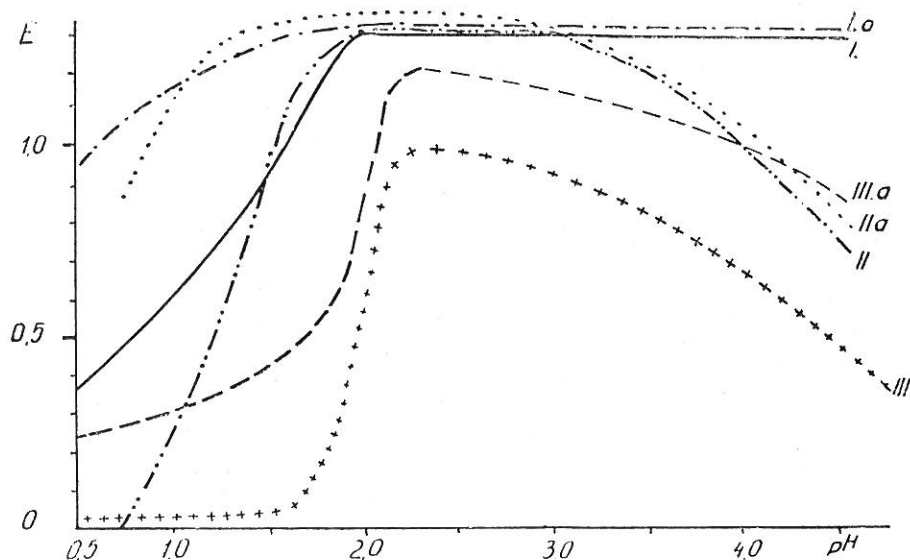
Nitrit alapgörbék

- I. A kiindulási módszer szerint felvéve. PULFRICH fotométer, S 53. szűrő, 3 cm küvetta
I/a. Feltöltés 10 perccel az α -naftilamin hozzáadása után PULFRICH fotométer,
S 53 szűrő, 3 cm küvetta.
- II. A kiindulási módszer szerint felvéve LANGE-RÓTH fotométer, zöld szűrő,
3 cm küvetta.
- III. A kiindulási módszer szerint felvéve, de sulfanilsav helyett novokaint használva.

RIDER és MELLON a feltöltést az α -naftilamin hozzáadása és az oldat pH-jának beállítása után írja elő, ami tehát fentiek szerint igen helytelen. Magától értetődik, hogy mindez csak akkor jelent zavart, ha az oldat mennyisége az α -naftilamin hozzáadása előtt lényegesen kevesebb, mint 50 ml és ugyanakkor az oldatban levő nitrit mennyisége nagy.

Növények vizsgálatánál ez ritkán fordul elő, de különféle modell-kísérleteknél annál gyakrabban.

6. A pH hatása az I. II. reakcióra. 8-8 γ /NO₂/N-t tartalmazó törzsoldatból meghatároztuk a nitrittartalmat részben úgy, hogy az I. reakciót különböző pH-n játszottuk le, a II.-at pedig egységesen 2,5 pH-n, részint pedig úgy, hogy az I. reakció zajlott le egységesen 2,5 pH-n és a II. reakció különböző pH-n; végül pedig úgy, hogy a két kémszert egyszerre adtuk a vizsgálandó oldathoz. A fotometrálist az α -naftilamin hozzáadása után 15 perccel és 2 órával is elvégeztük. A kapott értékeket a 3. ábra görbéi mutatják.



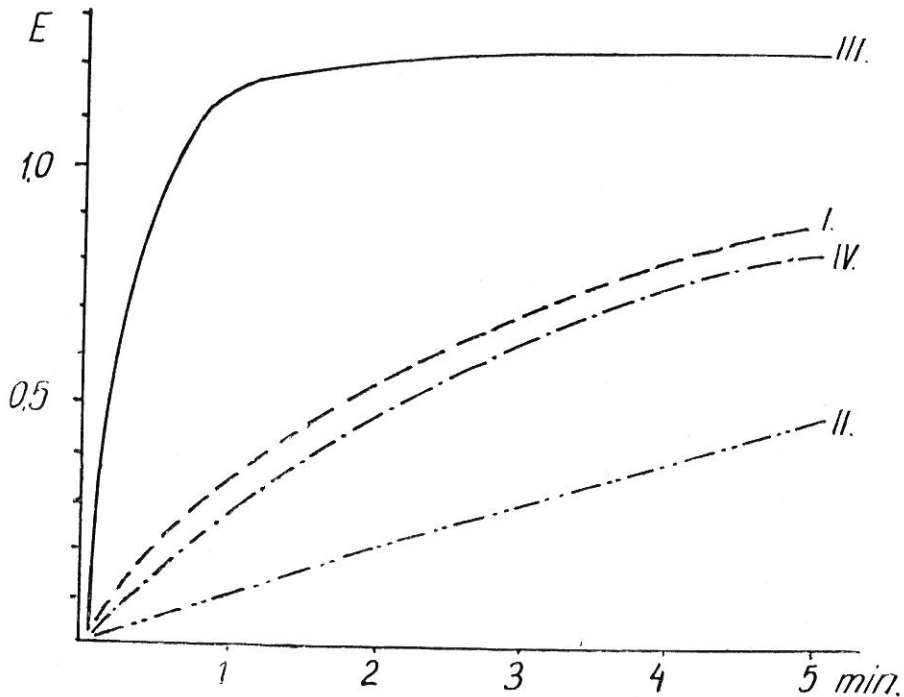
3. ábra

A kiindulási módszernél az I. és II. reakció függése a pH-tól.

- I. 8 γ (NO₂/N oldatból kapott extinkció értéke, ha az I. reakciót különböző pH-n a II.-at egységesen pH = 2,5-ön végezzük. Mérés 15 perc múlva.
- I a. Mint I., de 2 óra múlva mérve.
- II. Mint fent, de fordítva: az I. reakció folyik le állandó (2,5) pH-n és a II. pH-ját változtatjuk.
- II.a. Mint előbb, de a fotometrálist nem 15 perc, hanem 2 óra múlva végezzük.
- III. 8 γ (NO₂/N oldattal kapott extinkció értékek, ha a két kémszert egyszerre adjuk hozzá. Mérés 15 perc múlva.
- III/a. Mint III., de 2 óra múlva mérve.

Láthatjuk ezekből, hogy az I. reakció 2 pH alatt, a II. reakció 2 pH alatt és 3 pH felett nem folyt le teljesen, ezért az elméletinél kisebb extinkcióértékeket kapunk. Ezek az eredmények ellenkeznek RIDER és MELLON nézetével, akik szerint az I. reakció minél savasabb, a II. pedig minél lúgosabb közeget kíván, a tömeghatás törvénye értelmében. Ezt az ellentétet valószínűleg az okozta, hogy az idézett szerzők álláspontjukat közvetett kísérleti eredményekre alapozták. (A reakciósebességet mérték különböző pH-n, nem pedig a kapott extinkcióértéket.) Megjegyzendő, hogy az I. és II. reakció pH-érzékenysége lényegesen csökken, ha nem a szokásos módon 15 perc, hanem 2 óra időt engedünk a reakció lefolyásához. A két kémszer egyszerre történő hozzáadása esetén kapott görbékből is látható az a fentebb említett tény, hogy a reakció egyrészt lassúbb, másrészt nem kvantitatív.

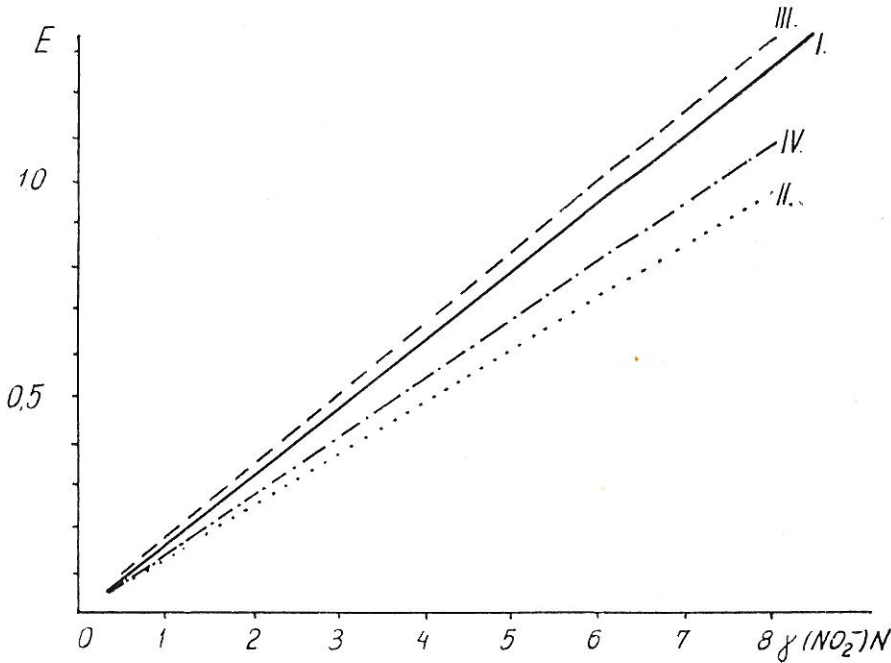
Mínthogy a 3. ábra első görbéje szerint a RIDER és MELLON által ajánlott 1,4 pH-nál dolgozva a kapott eredmény az elméletinél már valamivel kisebb, az általuk ajánlott 20%-os sósavas szulfanilsav alkalmazásától eltekintettünk. Ez egyébként azzal az előnnyel is jár, hogy a II. reakcióhoz szükséges 2,5 pH-ra való beállítás így elmarad, ami az eljárást lényegesen megrövidíti.



4. ábra

Nitrit színreakció időbeli lefolyása.

- I. A kiindulási módszer szerint eljárva.
- II. Mint fent, de a két kémszeret egyszerre hozzáadva.
- III. Mint I., de szulfanilsav helyett novokaint használva.
- IV. Mint III., de a novokaint és α -naftilamint egyszerre hozzáadva.



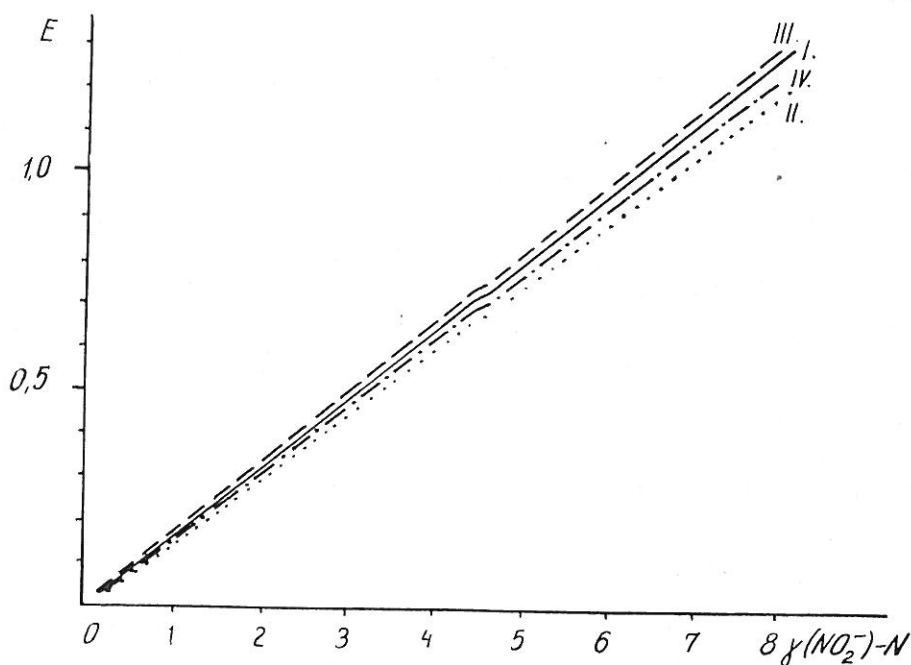
5. ábra.

Nitrit-alapgörbék,Mérés az α -naftilamin hozzáadása után 2 órával.

- I. A kiindulási módszer szerint eljárva.
- II. Mint I., de a két kémszert egyszerre hozzáadva.
- III. Mint I., de szulfanilsav helyett novokaint használva.
- IV. Mint III., de a két kémszert egyszerre hozzáadva.

7. **A fény hatásának** vizsgálatához az I. és II. reakciót különböző erősségű fény mellett elvégezve azt tapasztaltuk, hogy az I. reakció még közvetlen napfényre sem érzékeny, a II. pedig közvetlen napfényen kb. 10%-kal kisebb eredményt ad. A két reakció tehát fényre gyakorlatilag nem érzékeny, csak a közvetlen napfényt kerüljük. Tájékoztatásul megemlítjük, hogy a közvetlen napfény intenzitását 9000 Lux-nak, a rendes nappali szórt világításét, a laboratóriumban, 500-1000 Lux-nak mértük (ablak előtt).

8. **PULFRICH** helyett **LANGE-RÓTH** fotométert használva az extinkció-méréshez a kapott nitrit-alapgörbét a 2. ábra II. görbéje mutatja. Láthatjuk, hogy ez kb. fele olyan meredek, mint a PULFRICH-fotométerrel mért I. görbe; ez egyuttal azt is jelenti, hogy ugyanakkora nitrit-mennyiségnek félszázalékos extinkció felel meg, tehát a meghatározás érzékenysége kisebb. Ennek okát felderítendő, megmértük a LANGE-ROTH fotométer zöld szűrőjének fényátbocsátását különböző hullámhosszakon. Az 1. ábra I. görbéje mutatja a kapott szingörbét, mely szerint az említett szűrő átbocsátási maximuma a zöld színnek megfelelő hullámhosszon van ugyan, viszont a többi hullámhosszakon is átengedi a fényt kisebb-nagyobb mértékben. Ezzel szemben a PULFRICH-fotométer S.53. zöld szűrőjének



6. ábra.

Nitrit-alapgörbék.Mérés az α -naftilamin hozzáadása után 15 perccel.

I-IV. Ugyanaz, mint az 5. ábránál.

fényátbocsátása csak 10 $m\mu$ -os hullámsávra terjed. A két készülék szín-szűrőjének ez a különbsége tökéletesen megmagyarázza az extinkciós alapgörbék különböző meredekségét.

9. Szulfanilsav helyett novokaint használva, a kapott extinkciós alapgörbét a 2. ábra III. görbéje mutatja. Tévedés tehát ALTEN és KNIPPENBERG azon állítása, hogy vele tízszeres érzékenység érhető el. Ezt az állításukat egyébként összehasonlító kísérleti adatokkal nem is támasztották alá. A közölt ábra szerint az érzékenység novokain használata esetén kb. ugyanakkora, mint szulfanilsavval.

A diazotálási (I.) és kapcsolási (II.) reakció sebességére nézve a 4. ábra nyújt felvilágosítást. Láthatjuk ebből, hogy novokain használata esetén a reakció sokkal gyorsabb, mint szulfanilsavnál. Azt is láthatjuk az ábrából, hogy a diazotálási reagenst és az α -naftilamint célszerű nem egyszerre az oldathoz adni, mert a reakció így lassúbb és nem is kvantitatív.

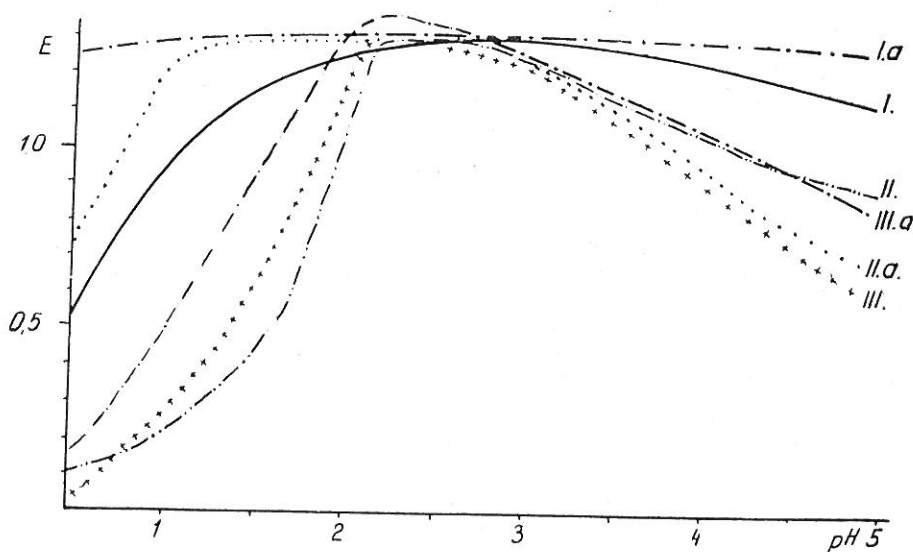
A szulfanilsav, ill. novokain használata esetén, az α -naftilamint egyszerre, illetőleg 15 perc után hozzáadva kapott nitrit alapgörbékét az 5. ábra mutatja, az α -naftilamin hozzáadása után $\frac{1}{4}$ órával végezve a fotometrálist; a 6. ábra ugyanezeket a görbékét mutatja, ha 2 óra múlva mérünk. A két ábrából láthatjuk, hogy ha a kémszereket nem egyszerre adjuk a nitrített oldathoz, az extinkció már kb. $\frac{1}{4}$ óra alatt véglegesen beáll, ellenkező esetben ehhez kb. 2 órára van szükség.

További előnye még a novokain használatának, hogy a belőle képződött azofesték sokkal vízoldhatóbb és csapadékképződés még szélsőségesen nagy nitritkoncentrációk esetén sem indul meg. (JENDRASSIK és FALCSIK-SZABÓ.)

Végül novokainnal is felvettük a reakciók pH-tól való függésének görbéit (7. ábra), ugyanúgy, mint szulfanilsav esetén (3. ábra). Láthatjuk a 7. ábrából, hogy a görbék lefutása nem különbözik lényegesen a szulfanilsavval kapott görbékétől, csak annyiban, hogy novokainnal a reakció pH-érzékenysége kisebb.

10. Az ajánlott módszer a fentiek figyelembevételével, JENDRASSIK és FALCSIK-SZABÓ módszerétől abban különbözik, hogy a reagenseket ne egyszerre, hanem egymás után 10 perccel adjuk az oldathoz, így fél óra múlva mérhetünk, továbbá, hogy mindkét rész reakciót 2,5 körüli pH-n játszassuk le.

A nitrittartalomra vizsgálandó oldatból az esetleges zavaró tényezőket kiküszöböljük, alikvot részét 50 ml-es mérőlombikba mérjük, pH-ját 2,5 körüli értékre hozzuk, hozzáadunk 1 ml novokain vagy szulfanilsav oldatot, felrázzuk, 10 perc múlva 1 ml α -naftilamint adunk hozzá, jelig töltjük, újból felrázzuk, fél óra múlva S.53. szűrővel, 3 cm-es küvettában, PULFRICH-fotométeren megmérjük a keletkezett piros oldat extinkcióját. Az eredményt tiszta nátrium-nitrittel készült alapgörbéből olvassuk le.



7. ábra.

Novokainnal végzett nitritmeghatározás eredményének függése a pH-tól

Bemérés: $8 \gamma (\text{NO}_2^-) \text{N}$

I-III/a Mint a 3. ábrán, csak szulfanilsav helyett novokaint alkalmazva.

Összefoglalás

Jelen munka kritikai vizsgálat alá veszi a szakirodalomban található nitrit-meghatározási mikro-módszereket. Főbb megállapításai:

1. Szulfanilsav használata esetén a mérhetőség felső határa 8-10% O_2-N Efelett irreverzibilis csapadékképződés lép fel: a túltelített azofestékoldatból a festék nagyrésze kicsapódik. Igen nagy nitritkoncentrációk esetén a reakció más irányt vesz és nem piros, hanem sárga oldat keletkezik.

2. Szulfanilsav használata esetén az oldat feltöltését az 1. pontban említett okból az α -naftilamin hozzáadása előtt kell elvégezni.

3. Mind az I. mind a II. reakció a pH-ra érzékeny, de nem olyan értelemben, mint azt RIDER és MELLON állítja.

4. Fényre a reakció nem érzékeny. Közvetlen napfény kissé csökkenti a kapott értéket.

5. A LANGE-RÓTH fotométer zöld szűrője nem szelektív, ezért a vele kapott nitrit-alapgörbe féle olyan meredek, mint a PULFRICH fotométer S,53. szűrőjének használata esetén.

6. Szulfanilsav helyett novokaint használva: a) a mérés felső határa erősen kitolódik; b) a reakciósebesség sokkal nagyobb; c) a színreakció érzékenysége kb. ugyanaz.

7. Mind szulfanilsav, mind novokain használata esetén az α -naftilamin csak az I. reakció (diazotálás) befejezte után adjuk hozzá, különben kisebb értéket kapunk és sokkal lassúbb is a reakció lefolyása.

8. Fentiek alapján közli a szerző az ajánlott módszert. Ennek lényege: a 2,5 pH-ju oldathoz 1 ml novokaint, vagy szulfanilsavat, 15 perc múlva 1 ml α -naftilamint adunk, fél óra múlva az extinkciót PULFRICH-fotométeren mérjük.

Érkezett: 1951 május 8.

Irodalom

1. ALTEN, F. & KNIPPENBERG, E.: *Bodenk. u. Pfl. Ern.* 47, 245, 1937.
2. BAMANN & MYRBÄCK: „Die Methoden der Fermentforschung“ c. könyvében: *Stickstoffassimilation.* 2731. lap, G. Thieme, Leipzig, 1941.
3. BLOM, J.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 59, 121, 1926.
4. ILOSVAY, L.: *Bull. Soc. Chim.* 2, 388, 1889.
5. ILOSVAY, L.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 2, 417.
6. JENDRASSIK, L. & FALCSIK-SZABÓ, E.: *Biochem. Z.* 261, 110, 1933.
7. KLEIN, G.: *Handbuch der Pflanzenanalyse*, II. Band. 1. Teil. p. 78-79. Springer, Wien, 1932.
8. LEMOIGNE, M., MONGUILLON, P. & DÉSVEAUX, R.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 18, 840, 1936.
9. PLANK, J.: *Utmutatás a mennyiségi kémiai elemzéshez*, Budapest, 1941.
10. RAUTANEN, N.: *A. Chem. Scand.* 2, 127, 1948.
11. RAUTANEN, N.: *Ann. Acad. Sci. Fennicae, A. II.* Helsinki 33, 34, 1948.
12. RIDER, B. F. & MELLON, M. G.: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18, 96, 1946.
13. STEWARD, F. C. & STREET, H. E.: *Ann. Rev. Biochem.* 16, 482, 1947.
14. SZELÉNYI, F.: *Agrokémia*, 2, 174, 1950.
15. VIRTANEN, A. & ELLFOLK, N.: *A. Chem. Scand.* 4, 93, 1950.

Микроопределение нитрита фотометрированием. I. Испытания с чистым раствором нитрита.

Б. Я м б о р

Биохимический Отдел Агробиохимического Исследовательского Института, Будапешт.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе дан критический обзор микрометодов определения нитритов, описанных в спецлитературе.

1. При применении сульфаниловой кислоты верхний предел измерения равен $8-10 \gamma (\text{NO}_2^-) \text{--- N}$. Свыше этого количества из пересыщенного раствора азокрасителя большая часть красителя необратимо осаждается. В случае очень больших концентраций нитрита, реакция проходит в другом направлении, вследствие чего образуется вместо красного желтый раствор.

2. При применении сульфаниловой кислоты, по причинам указанным в п. 1.), раствор должен пополняться раньше прибавления α -нафтиламина.

3. Реакции I и II чувствительны к pH, но в другом смысле, чем это утверждают Ридер и Меллон.

4. Реакция не является светочувствительной. Прямые солнечные лучи однако немного уменьшают полученную величину.

5. Так как зеленый фильтр фотометра Ланге-Рот не является избирательным, поэтому крутизна основной кривой нитрита, полученной при помощи указанного фотометра, в два раза меньше крутизны кривой, полученной при применении фильтра S-53 фотометра Пульфриха.

6. Применяя вместо сульфаниловой кислоты новокаи: а) верхний предел измерения и б) скорость реакции значительно увеличиваются, в) чувствительность цветной примерно одинаковая.

7. При применении сульфаниловой кислоты, так же как и при применении новокаина, α -нафтиламин прибавляется только после прохождения реакции I (диазотирование), так как в противном случае получается уменьшенная величина, и кроме того, прохождение реакции также значительно замедляется.

8. На основании изложенного, автор предлагает разработанный ним метод, сущность которого заключается в следующем: к раствору с pH 2,5 прибавляется 1 мл новокаина или сульфаниловой кислоты, через 15 минут 1 мл α -нафтиламина, еще через $\frac{1}{2}$ часа измеряется экстинкция фотометром Пульфриха.

Рисунки:

1. Кривые интенсивности окраски, измеренные фотометром Пульфриха.

I. Зеленый фильтр фотометра Ланге-Рот.

II. Интенсивность красной окраски, полученной при помощи исходного метода из раствора, содержащего $8 \gamma (\text{NO}_2^-) \text{--- N}$.

III. Интенсивность желтой окраски, полученной помощью исходного метода из раствора, содержащего $3200 \gamma (\text{NO}_2^-) \text{--- N}$.

2. Основанные кривые нитрита.

I. Кривые, снятые по исходному методу. Фотометр Пульфриха, фильтр S-53, кюветта 3 см.

I. а. Пополнение через 10 минут после прибавления α -нафтиламина. Фотометр Пульфриха, Фильтр S-53, кюветта 3 см

II. Кривая, снятая по исходному методу, Фотометр Ланге-Рот, зеленый фильтр. кюветта 3 см.

III. Кривая, снятая по исходному методу, но вместо сульфаниловой кислоты применялся новокаин.

3. Зависимость реакций I и II от pH при исходном методе.

I. Величина экстинкции, полученной помощью раствора, содержащего $8 \gamma (\text{NO}_2^-) \text{--- N}$; реакция I. проходит при различной величине pH, реакция же II. при постоянной (2,5) величине pH. Измерение после 15 минут.

I. а. То же, измерение после 2 часов.

II. То же, но реакция I проходит постоянной (2,5) величине pH, реакция же II при меняющейся величине pH.

- II. а. То-же, но фотометрирование проводится после 2 часов.
- III. Величина экстинкции, полученной при помощи раствора, содержащего 8γ (NO_2^-) — N, оба реактивы прибавляются одновременно. Измерение после 15 минут.
- III. а. То-же, но измерение проводится после 2 часов.
4. *Прохождение цветной реакции нитрита в зависимости от времени.*
- I. По исходному методу.
 - II. То-же, но оба реактивы прибавляются одновременно.
 - III. Как I., но вместо сульфаниловой кислоты применяется новокаин.
 - IV. Как III., но новокаин и α -нафтиламин прибавляются одновременно.
5. *Основные кривые нитрита.* Измерение производилось через 2 часа после прибавления α -нафтиламина.
- I. По исходному методу.
 - II. Как I., но оба реактивы прибавляются одновременно.
 - III. Как I., но вместо сульфаниловой кислоты применяется новокаин.
 - IV. Как III., но оба реактивы прибавляются одновременно.
6. *Основные кривые нитрита.* Измерение через $1/4$ часа после прибавления α -нафтиламина.
- I—IV. То-же, как в рисунке 5.
7. *Зависимость результатов определения нитрита при помощи новокаина, от pH.*
Навеска: 8γ (NO_2^-) — N.
- I—III. а. То-же, как в рисунке 3, но вместо сульфаниловой кислоты применяется новокаин.

Таблицы.

1. Реакция Грус-Илошван, $16 - 64,000 \gamma$ (NO_2^-) — N.
 1. Осадок.
 - а) С концентрацией увеличивается.
 - б) С концентрацией уменьшается.
 - с) Осадка нет.
 2. Окраска фильтрата.
 - а) Пурпурово-красная.
 - б) Оранжевая.
 - с) Желтая.
2. Экстинкции, измеренные при различной длине волны.
 1. Измеряемое вещество.
 2. Зеленый фильтр фотометра Ланге-Рот.
3. Средние и максимальные отклонения определений нитрита в %-ах от средней величины.
 1. Пополнение перед прибавлением α -нафтиламина (среднее отклонение).
 2. Пополнение перед прибавлением α -нафтиламина (максимальное отклонение).
 3. Пополнение после прибавления α -нафтиламина (среднее отклонение).
 4. Пополнение после прибавления α -нафтиламина (максимальное отклонение).

Photometrische Mikrobestimmung des Nitrits I. Versuche mit reinen Nitritlösungen

B. JÁMBOR

Biochemische Abteilung des Agrochemischen Forschungsinstitutes Budapest

Zusammenfassung

Vorliegende Arbeit befasst sich mit den in der Fachliteratur beschriebenen Mikrobestimmungsmethoden von Nitrit; die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Bei Verwendung von Sulfanilsäure liegt die obere Grenze des Messbereiches bei ca. 8-10 $\gamma(\text{NO}_2^-)\cdot\text{O}$ in 50 ml. Bei höheren Nitritmengen tritt irreversible Niederschlagsbildung auf, da aus der übersättigten Azofarbstofflösung sich ein grosser Teil des gelösten Farbstoffes ausscheidet. Bei extrem hohen Nitritkonzentrationen schlägt die Farbreaktion eine andere Richtung ein, und es entsteht statt der purpurroten eine gelbe Lösung.

2. Bei Verwendung von Sulfanilsäure soll die Auffüllung der Lösung vor Zugabe des α -Naphthylamins erfolgen gemäss der im Absatz 1. erörterten Ursache.

3. Die I., wie auch die II. Reaktionsphase ist pH-empfindlich, jedoch nicht in dem Sinne, wie RIDER und MELLON angeben.

4. Die Reaktion ist nicht lichtempfindlich, nur direktes Sonnenlicht soll vermieden werden.

5. Der Grünfilter des LANGE-ROTH-Photometers ist nicht selektiv deshalb ist die, mit ihm aufgenommene Nitrit-Standardkurve nur halb so steil, wie bei Verwendung vor Filter S.53 des PULFRICH-Photometers.

6. Bei Verwendung von Novocain statt Sulfanilsäure erhöht sich die obere Grenze des Messbereiches beträchtlich, und die Reaktion verläuft mit grösserer Geschwindigkeit; die Empfindlichkeit der Reaktion ist annähernd dieselbe wie mit Sulfanilsäure.

7. Sulfanilsäure, bzw. Novocain und α -Naphthylamin sollen nicht gleichzeitig zugegeben werden, denn das wirkt sich auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Empfindlichkeit der Reaktion ungünstig aus; α -Naphthylamin soll nur nach völligem Ablauf der I. Reaktionsphase (Diazotierung), etwa nach 15 Minuten zugegeben werden.

8. Auf Grund des Aufgeführten empfiehlt Verf. folgende Methode: Die Versuchslösung wird auf pH = 2,5 gebracht; man versetzt mit 1 ml Sulfanilsäure, bzw. Novocain, füllt auf cca 48 ml auf fügt nach 15 Minuten 1 ml α -Naphthylamin hinzu und misst nach 30 Minuten die Extinktion mit PULFRICH-Photometer.

Abbildungen.

1. *Farbenkurven, gemessen mit PULFRICH-Photometer.*

- I. Grünfilter des LANGE-ROTH-Photometers.
- II. Purpurrote Farbe, erhalten mit 8 $\gamma(\text{NO}_2^-)\cdot\text{N}$
- III. Gelbe Farbe, erhalten mit 3200 $\gamma(\text{NO}_2^-)\cdot\text{N}$

2. Nitrit-Standardkurven.

- I. Grundmethode („Stufo“.)
 - I. Auffüllung 10 Min. nach Zugabe des α -Naphthylamins („Stufo“).
- II. Grundmethode, LANGE-ROTH-Photometer.
- III. Grundmethode, Novocain.
 3. Reaktionen I. u. II. als Funktion des pH, bei Verwendung von Sulfanilsäure.
 - I. Extinktionswerte von 8 $\gamma(\text{NO}_2)$ -N, wenn Reaktion I. bei verschiedenen pH.-werten, Reaktion II. bei pH = 2,5 abläuft: Messung nach 15 Minuten.
 - I/a. Wie I. nach 2 Stunden.
 - II. Wie I., umgekehrt.
 - II/a. Wie II., nach 2 Stunden.
 - III. Gleichzeitiger Zusatz der beiden reagenzien. Messung nach 15 Minuten.
 - III/a. Wie III., nach 2 Stunden.

4. Zeitlicher Ablauf der Farbenreaktion.

- I. Grundmethode.
- II. Beide Reagenzien gleichzeitig zugesetzt.
- III. Novocain statt Sulfanilsäure.
- IV. Wie III., gleichzeitiger Zusatz beider Reagenzien.

5. Nitrit-Standardkurven. Gemessen 2 Stunden nach α -Naphthylamin-Zusatz.

I.—IV. S. Abb. 4.

6. Nitrit-Standardkurven. Gemessen 15 Minuten nach α -Naphthylamin-Zusatz.

I.—IV. S. Abb. 4.

7. Reaktionen I. u. II. als Funktion des pH, bei Verwendung von Novocain.

I.—III/a. S. Abb. 3.

Tabellen.

1. Reaktion nach GRIESS-ILOSVAY, 16-64.000 $\gamma(\text{NO}_2)$ -N.
 1. Niederschlagsbildung.
 - a) Nimmt mit vorgeschrittener Konzentration zu.
 - b) Vermindert sich mit der Konzentration.
 - c) Kein Niederschlag.
 2. Farbe des Filtrates.
 - a) Purpurrot.
 - b) Orange.
 - c) Gelb.
- II. Extinktionswerte, bei Verschiedenen Wellerlängen.
 1. Gemessen wurde.
 2. Grünfilter des LANGE-ROTH-Photometers.
- III. Die mittleren und grössten Abweichungen der nach GRIESS-ILOSVAY gefundenen Nitritmengen, in %-en der Mittelwerte.
 1. Auffüllung vor α -Naphthylaminzusatz (mittlere Abweichung).
 2. Wie 1., grösste Abw.
 3. Auffüllung nach α -Naphthylaminzusatz (mittlere Abw).
 4. Wie 3., grösste Abw.