

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Естественнонаучный институт
Кафедра «Химии»

Утверждено на заседании кафедры
«Химии»
«18» января 2022 г., протокол № 6

Заведующий кафедрой



к.х.н., В.А. Алферов

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)
«Приборы биоэкологического контроля»

основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы магистратуры

по направлению подготовки (*специальности*)

06.04.01 Биология

с направленностью (профилем) (*со специализацией*)

Биоэкология

Форма(ы) обучения: *очная*

Идентификационный номер образовательной программы: 060401-01-22

Тула 2022 год

Разработчик(и) методических указаний

Бабкина Е.Е., к.х.н, доц.

(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



(подпись)

Содержание

Лабораторная работа №1 Экспресс-определение глюкозы в крови с использованием глюкометра

Лабораторная работа № 2. Биосенсорный анализатор биохимического потребления кислорода

Лабораторная работа № 3. Определение биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах

Лабораторная работа №4. Биодиагностика почв по ферментативной активности

Лабораторная работа № 5. Определение нефтепродуктов (на примере гексадекана) в ростовых средах методом газовой хроматографии

Лабораторная работа № 6. Определение массовой концентрации бенз(а)пирена в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Лабораторная работа № 7. Определение содержания анионов в почве методом капиллярного электрофореза

Лабораторная работа № 8. Определение массовой концентрации анионных ПАВ спектрофотометрией

Лабораторная работа №9. Измерение массовой концентрации анионных поверхностно-активных веществ в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости "Флюорат-02"

Лабораторная работа №10. Определение массовой концентрации общего железа флуориметрическим методом

Лабораторная работа №11. Атомно-эмиссионная фотометрия пламени

Лабораторная работа № 12. ИК-спектроскопия органических веществ

Лабораторная работа № 13. Определение числа клеток микроорганизмов методом фототурбидиметрии

Лабораторная работа № 14. Потенциометрическое определение нитратов в овощах

Лабораторная работа 15. Определение железа в пробах природных и сточных вод методом атомно-абсорбционной спектроскопии

Лабораторная работа 16. Турбидиметрическое определение иона сульфата в водной вытяжке

Лабораторная работа №1 Экспресс-определение глюкозы в крови с использованием глюкометра

Глюкометры применяют для количественного определения содержания глюкозы в крови с людьми, страдающими сахарным диабетом, в домашних условиях. А так же медицинским персоналом в медучреждениях в качестве средства отслеживания уровня глюкозы в крови. Для людей страдающих сахарным диабетом, определение содержания глюкозы в крови — необходимый ежедневный анализ.

Содержание глюкозы в крови для людей, не страдающих сахарным диабетом, зависит от времени прошедшего после последнего приема пищи:

Время после приема пищи	До завтрака (12 ч после приема пищи)	До обеда или ужина (8-4 ч после приема пищи)	Через 1 час после приема пищи	Через 2 часа после приема пищи
Диапазон, ммоль/л	3,9-5,9	3,9-6,1	Менее 8,9	Менее 6,7

Рекомендации по суточному графику измерения сахара для людей страдающих сахарным диабетом:

определение сахара в крови глюкометром в случае диагностирования 1-го типа диабета нужно производить 4 раза в сутки, до приема пищи и перед сном;

при диабете 2 типа — один или два теста в сутки.

В России наибольшее распространение получили глюкометры One Touch (Johnson and Jonson, США), Accu-Chec (Roche, Франция), Elite (Байер, Германия), Сателлит (ЭЛТА, Россия). Глюкометры представляют собой биосенсор. Биосенсор — это аналитический прибор, в котором для определения химических соединений используются реакции этих соединений, катализируемые ферментами, иммунохимические реакции или реакции, проходящие в органеллах, клетках или тканях. Принцип детекции, реализованный в биосенсорах, основан на том, что биоматериал,

иммобилизованный на физическом датчике (преобразователе), при взаимодействии с определяемым соединением генерирует зависимый от его концентрации сигнал, который регистрируется преобразователем того или иного типа и после обработки данных представляется в численном виде (рис.14.1).



Рисунок 14.1. Схематическое представление биосенсора

Принцип работы глюкометра

Самые распространенные глюкометры — это фотометрические и электрохимические устройства. Принцип работы глюкометра первого типа основан на анализе изменения цвета тестовой полоски при нанесении на нее капли крови. Прибор, используя оптический блок и контрольные образцы, проводит сравнение и выводит результаты.

Важно! Показания глюкометра фотометрического типа отличаются низкой точностью. В ходе эксплуатации линзы оптики прибора могут загрязниться, потерять фокус из-за смещения от ударов или вибрации.

Поэтому сегодня мерить сахар в крови диабетики предпочитают электрохимическими измерителями, которые представляют собой миниатюрные амперометрические биосенсоры с одноразовыми электродами (тест-полосками), изготовленными методом трафаретной печати. На полимерной подложке тест-полоски расположены три электрода (рис.14.2):

Электрод сравнения в виде серебряной нити с добавлением хлорида калия на поверхности нити (хлорсеребряный электрод);

Вспомогательный графитовый электрод;

Рабочий графитовый электрод.

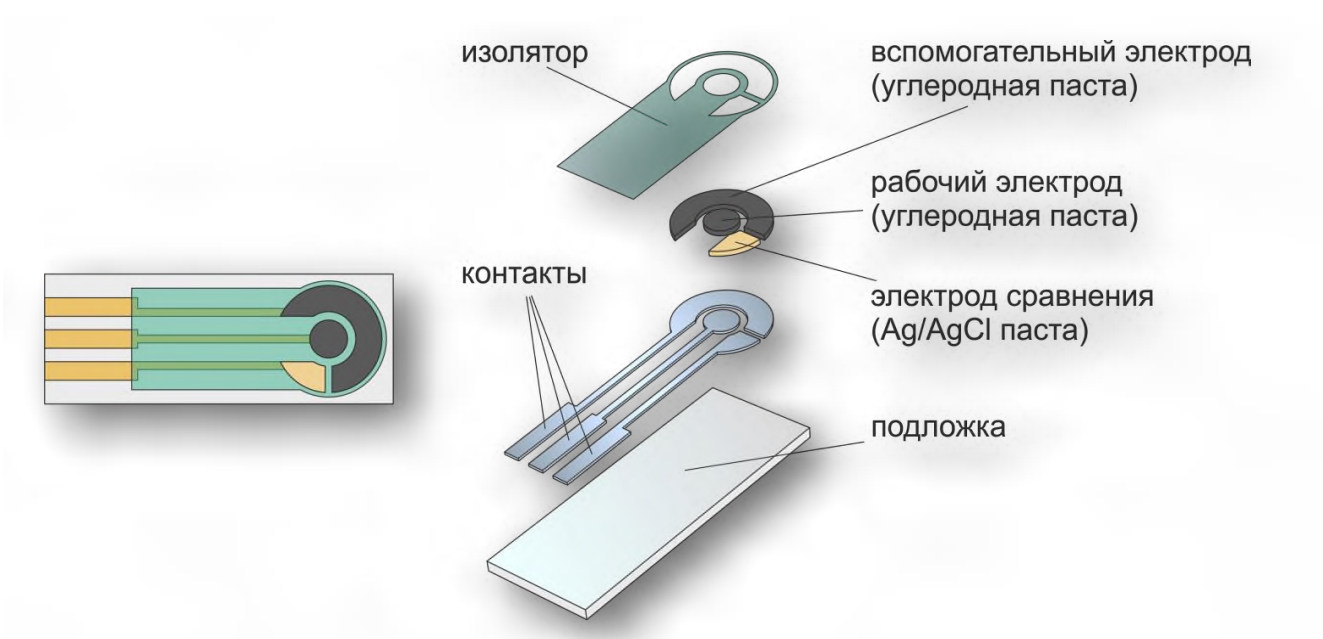
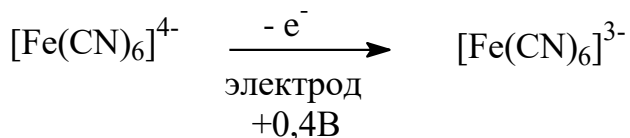
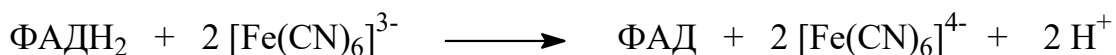
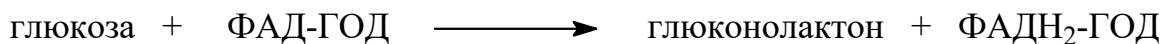


Рисунок 14.2 Одноразовый электрод, полученный методом трафаретной печати

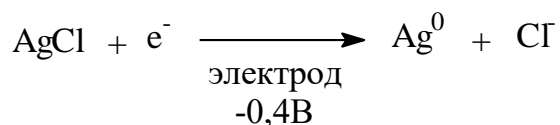
На поверхность рабочего графитового электрода иммобилизован фермент глюкозооксидаза, медиатор электронного транспорта – гексацианоферрат (III) калия и соли для создания буферной системы. Полупроницаемая мембрана ограничивает доступ форменных элементов крови и белков плазмы к поверхности электрода, что позволяет проводить анализ без пробоподготовки. Высокая чувствительность метода позволяет минимизировать объем пробы крови до 1-2 мкл (капля).

Принцип биосенсорной детекции глюкозы в крови с помощью медиаторного глюкозооксидазного электрода представлен на схеме:

Анод (подаётся потенциал +0,4 В относительно электрода сравнения):



Катод:



Ток окисления медиатора пропорционален содержанию глюкозы в анализируемом образце крови.

Глюкометры One Touch (Johnson and Jonson, США) имеют диапазон измерений 1,1-33,3 ммоль/л.

Цель работы. Определить концентрацию глюкозы в исследуемых образцах с использованием портативного глюкометра.

Объекты и средства исследования.

Глюкометр, инструкция по пользованию, стерильный ланцет, тест-полоска, вата, химический стакан, этиловый спирт, пинцет.

Ход работы (для глюкометра One Touch (Johnson and Jonson, США).

Для глюкометров других производителей и моделей ход анализа может отличаться! Смотреть инструкцию!

1. Устройство биосенсора (рис.14.3):



Рисунок 14.3 Устройство глюкометра

Перед первым использованием нужно проверить код полоски для калибровки глюкометра. Для этого прибор выключают. Контейнер с полосками открывают, берут одну и сразу же закрывают крышку. После этого:

- полоску вставляют в гнездо прибора;
 - убеждаются, что начался процесс включения;
 - при отображении знаков «—» на экране, действуя кнопками управления вверх и вниз, устанавливают правильный код.
2. Взятие пробы крови.

Каплю крови можно получить как из кончика пальца, так и из предплечья. Вымойте руки и место прокола теплой водой с мылом и тщательно просушите. Протрите место будущего прокола этиловым спиртом. Проколите палец ланцетом. Объем полученной крови должен составлять не менее 1 мкл, иначе получится неправильный результат.

3. Введение тест-полоски.

Возьмите тест-полоску из флакона пинцетом. Прежде, чем ввести тест-полоску, проверьте номер кода на флаконе с тест-полосками. Немедленно закройте флакон крышкой. Введите тест-полоску контактными полосами и лицевой стороной вверх. Тест-полоска должна войти до упора. Прибор включится и на короткий промежуток времени возникнет изображение контрольного экрана. Убедитесь, что номер кода на экране соответствует номеру кода на флаконе с тест-полосками.

4. Нанесите каплю крови.

Когда на экране глюкометра появится мигающий символ капли крови, поднесите палец с проколом к узкому каналу у верхнего края тест-полоски и удерживайте тест-полоску у края капли крови, пока контрольное поле не заполнится целиком и прибор начнет обратный отчет.

5. Получение результата.

Результат определения глюкозы в крови появится по окончании отсчета прибором от 5 до 1 секунд.

Оформление работы. Опишите принцип метода, ход работы, практическое значение работы и занесите полученные значения содержания глюкозы в крови в лабораторную работу. Сделайте вывод об уровне глюкозы в крови у испытуемого.

Контрольные вопросы:

1. Принцип работы амперометрического биосенсора?
2. Преимущества использования медиаторных биосенсоров.

3. Сколько электродная система используется в глюкометрах и почему?
4. Уравнение ферментативной кинетики.
5. Примеры медиаторов (природные, синтетические)
6. Почему в глюкометрах используют в качестве биокompонента фермент глюкозооксидазу?
7. Специфичность ферментов.
8. Какие способы подачи пробы вы знаете?
9. Практическое значение работы.

Лабораторная работа № 2. Биосенсорный анализатор биохимического потребления кислорода

Биохимическое потребление кислорода (БПК) — количество растворенного кислорода (мг), необходимое для окисления всех биоразлагаемых органических веществ, находящихся в 1 дм³ воды. БПК не включает расходование кислорода на нитрификацию. Полученный результат характеризует суммарное содержание биохимически окисляемых органических примесей в воде, БПК характеризует способность воды к самоочищению.

Различают полное биохимическое потребление кислорода (БПК_{полн.}) и биохимическое потребление за определённый период времени (обычно берут период 5 суток – БПК₅). Полным биохимическим потреблением кислорода (БПК_{полн.}) считается количество кислорода, требуемое для окисления органических примесей до начала процессов нитрификации. Количество кислорода, расходуемое для окисления аммонийного азота до нитритов и нитратов, при определении БПК не учитывается.

Считается, что время достижения БПК_{полн} равно времени, в течение которого процесс заканчивается на 99%. Для бытовых сточных вод (без существенной примеси производственных) определяют БПК₂₀, считая, что эта величина близка к БПК_{полн.} Полная биологическая потребность в кислороде БПК_{полн.} для внутренних водоемов рыбохозяйственного назначения (I и II категории) при 20°C не должна превышать 3 мг/дм³. В лабораторных условиях наряду с БПК_{полн.} определяется БПК₅ - биохимическая потребность в кислороде за 5 суток. В поверхностных водах величины БПК₅ изменяются обычно в пределах 0,5 – 4 мг/дм³ и подвержены сезонным и суточным колебаниям.

Биохимическое окисление различных органических веществ происходит с разной скоростью. К легкоокисляемым, «биологически мягким», веществам относят формальдегид, глюкозу, мальтозу, низшие алифатические спирты, фенол, фурфурол и др. Константы скорости их

окисления составляют $1,4 - 0,3$ суток⁻¹. Среднее место ($K = 0,29 - 0,05$ сут.⁻¹) занимают крезолы, нафтолы, ксиленолы, резорцин, пирокатехин, пирогаллол, анионоактивные ПАВ и другие. К медленно разрушающимся **«биологически жестким»** веществам ($K = 0,049 - 0,02$ сут.⁻¹) относятся тимол, гидрохинон, неионогенные ПАВ и др. Зависит скорость окисления и от того, в какой мере присутствующая микрофлора адаптировалась именно к тем веществам, которые находятся в исследуемой воде.

Сезонные изменения БПК зависят в основном от изменения температуры и от исходной концентрации растворенного кислорода. Влияние температуры сказывается через ее воздействие на скорость процесса потребления, которая увеличивается в 2-3 раза при повышении температуры на 10°C. Влияние начальной концентрации кислорода на процесс биохимического потребления кислорода связано с тем, что значительная часть микроорганизмов имеет свой кислородный оптимум для развития в целом и для физиологической и биохимической активности.

Суточные колебания величин БПК₅ также зависят от исходной концентрации растворенного кислорода, которая может в течение суток изменяться на 2,5 мг/дм³ в зависимости от соотношения интенсивности процессов его продуцирования и потребления. Весьма значительны изменения величин БПК₅ в зависимости от степени загрязненности водоемов (таблица 10.1).

Таблица 10.1. Классы качества вод в зависимости от значения БПК.

Степень загрязненности воды	Значения БПК, мг/дм ³	Класс качества воды
Очень чистая	до 0,2	I
Чистая	0,2–1,0	II
Умеренно загрязненная	1,0–2,0	III
Загрязненная	2,0–4,0	IV
Грязная	4,0–6,0	V

Очень грязная	6,0–10,0	VI
Чрезвычайно грязная	>10,0	VII

В классическом методе определения БПК загрязненная вода смешивается с чистой аэрируемой водой. Смесь разливается в пузырьки, которые закрываются таким образом, чтобы над жидкостью не оставалось слоя воздуха.



Рисунок 10.1. Колба для стандартного метода определения БПК

Микроорганизмы из загрязненной воды потребляют кислород, поэтому нужно быть уверенным, что он сохраняется в анализируемой воде все пять дней. Если кислород исчерпан или его концентрация становится очень низкой, результаты такого анализа использовать нельзя. Следовательно, разведение следует провести таким образом, чтобы хотя бы в одной склянке уровень кислорода оставался бы высоким и через 5 суток. Исходя из потребления кислорода в течение 5 суток и объема загрязненной воды в склянке, можно рассчитать БПК (в г/м³ или мг/дм³).

Для оперативного анализа разрабатываются методы оценки БПК, основанные на использовании биосенсорных анализаторов. Исследования по созданию БПК – биосенсоров проводятся с конца 70 годов прошлого века, но разработки таких систем интенсивно продолжаются и в настоящее время. Следует отметить, что с помощью биосенсоров возможно быстрое определение БПК (БПК_{бс}), которое не всегда идентично величине традиционного БПК₅. В последнее время развиваются новые подходы в

биосенсорном анализе БПК, которые позволяют достичь приемлемой корреляции между показаниями биосенсора и традиционных методов. Корреляция данных, полученных с помощью биосенсорного анализатора, с данными, полученными методом БПК₅, могут иметь значения порядка 0,95 – 0,98. Так, для калибровки БПК биосенсора используют специализированные синтетические сточные воды, или биораспознающий элемент БПК биосенсора создают на основе специфических микроорганизмов, способных к эффективному окислению веществ конкретных стоков.

В качестве растворов для калибровки БПК-биосенсоров используют смеси органических соединений (так называемые синтетические сточные воды) обычно используется раствор смеси глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС) с концентрацией 150мг/дм³ каждого компонента (суммарно 300мг/дм³, что соответствует БПК 205 мг/дм³ согласно ПНДФ 14.1:23.4.123-97). Таким образом, $\text{БПК} = 0,683 \cdot \text{С(ГГС)}, \text{ мг/дм}^3$

Цель работы. Познакомиться с методом экспресс-определения БПК с использованием микробного амперометрического биосенсора.

Объекты и средства исследования

1. Пробирки на 1,5 см³ типа «Эппендорф»
2. Автоматические пипетка переменного объема от 0,5 до 5000 мкл
3. Магнитная мешалка
4. рН-метр-иономер-БПК-термооксиметр ЭКСПЕРТ-001-4.0.1
(научно-производственная фирма «Эконикс-эксперт», Москва)
5. Персональный компьютер
6. Измерительная ячейка (кювета) объемом 5 мл.
7. Глюкоза
8. Глутаминовая кислота
9. Вода дистиллированная.

Ход работы

Принцип метода. Для определения индекса БПК используется кислородный электрод, модифицированный микроорганизмами и анализатор

рН-метр-иономер-БПК-термооксиметр ЭКСПЕРТ-001-4.0.1, который позволяет регистрировать содержание растворенного кислорода в кювете (рисунок 10.2).

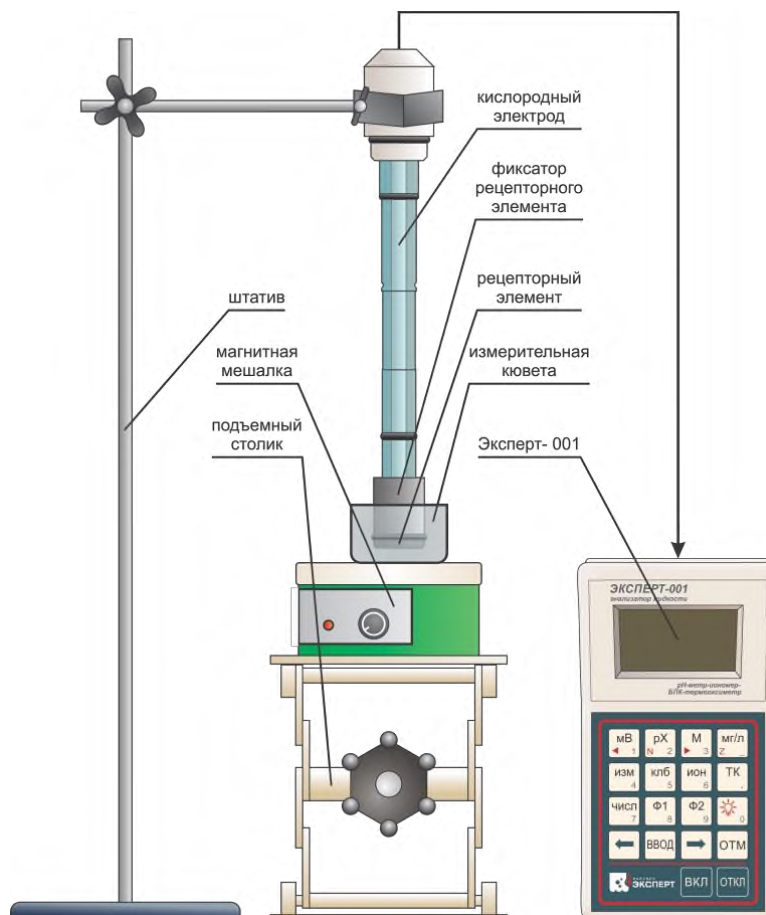


Рисунок 10.2. Макет-БПК-биосенсора на основе БПК-термооксиметра ЭКСПЕРТ-001-4.0.1

Подключение к персональному компьютеру позволяет управлять прибором, измерительный датчик представляет собой кислородный электрод типа Кларка, модифицированный биорецепторным элементом на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов. Измерения проводятся в кювете объемом 5 см³, снабженной якорем магнитной мешалки. В кювету помещают буферный раствор и анализируемую пробу. При введении субстрата в измерительную ячейку микроорганизмы окисляют его, в результате возрастает дыхательная активность клеток и в приэлектродном пространстве снижается концентрация кислорода, что регистрируется с помощью датчика растворенного кислорода, подключенного к анализатору

«Эксперт – 001». На монитор компьютера, интегрированного с биосенсорной системой, выводится графическое отображение изменения содержания растворенного кислорода от времени (рисунки 10.3). По полученному графику с помощью программы Microsoft Excel вычисляется ответ сенсора (R) как максимальная скорость изменения содержания кислорода от времени.

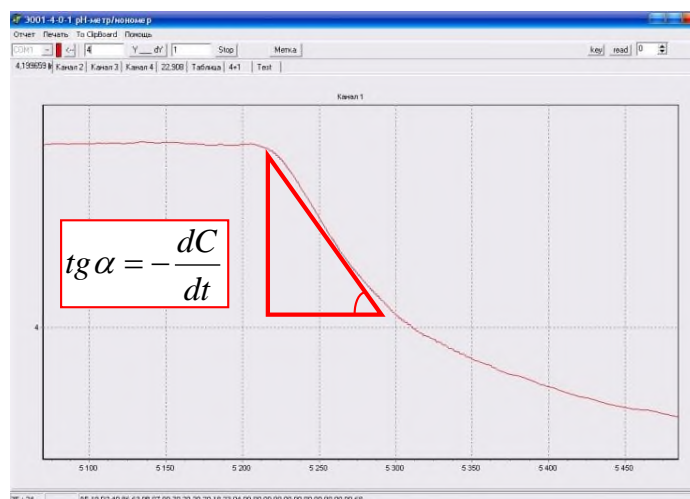


Рисунок 10.3. Вид ответа биосенсора кюветного типа на добавление субстрата

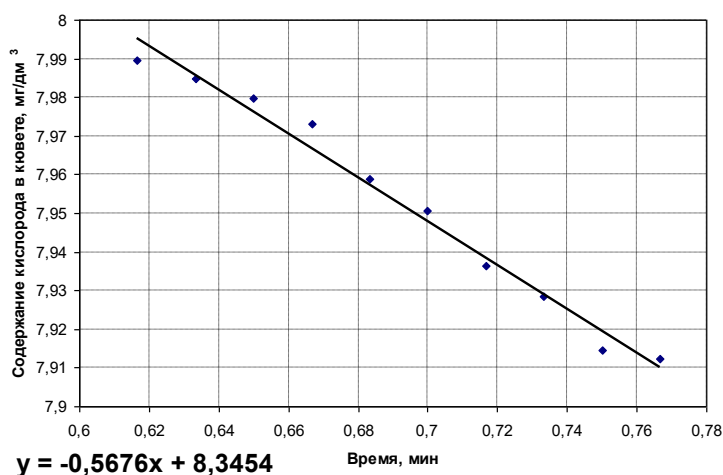


Рисунок 10.4. Обработка ответа биосенсора в компьютерной программе Microsoft Excel (ответ биосенсора 0,5676 мг/дм³ мин).

Подготовка к измерению. Включение прибора «Эксперт – 001» осуществляют нажатием кнопки «ВКЛ» на рабочей панели анализатора. Выбирают режим работы – термооксиметр. На компьютере запускают программу «Exp2pr».

Проверяют работу электрода. Для подготовки датчика к работе заполняют внутреннее пространство электрода раствором электролита хлорида калия (прилагается в комплекте к датчику). Помещают электрод в свежеприготовленный перемешиваемый 2 % раствор сульфита натрия. В случае нормальной работы электрода по истечении 1-2 мин величина растворенного кислорода изменится до 0 мг/дм³. Фиксируют на поверхности кислородного электрода рецепторный элемент и опускают его в электрохимическую ячейку, содержащую буферный раствор.

Проведение измерений. Для получения аналитического сигнала (отклика биосенсора) погружают электрод с биорецепторным элементом в буферный раствор, включают мешалку. В программе Exr2pr выбирают номер порта и подтверждают выбор клавишей <·, затем выбирают интервал значений оси концентраций кислорода и нажимают кнопку «**Start**». После получения стационарной концентрации кислорода в кювете, сохраняющейся в течение 1-2 минут, начинают запись данных нажатием кнопки «Записать интервал» и вводят с помощью автоматической микропипетки анализируемую пробу. Анализ проводят в течение 2-3 минут, считая от начала снижения концентрации кислорода на кривой отклика (концентрация кислорода функция времени).

Для завершения анализа снимают галочку в разделе «Записать интервал» и сохраняют таблицу в файл. Открывают сохраненный файл в программе Microsoft Excel, строят точечную диаграмму зависимости изменения концентрации кислорода от времени. На построенной диаграмме выбирают нисходящий прямолинейный участок и рассчитывают для него тангенс угла наклона (**рисунок 82**). Тангенс угла наклона соответствует коэффициенту “а” в уравнении прямой, полученном при аппроксимации линейного участка. Строят градуировочную зависимость ответа модифицированного электрода от концентрации ГТС. Между измерениями проводят промывание кюветы и электрода раствором буфера по 3 см³ до выхода содержания кислорода в кювете на начальный уровень.

При этом принимают в расчет, что значение БПК пробы стандартной смеси = $0,683 \cdot \text{концентрация смеси} (C_{\text{глюкозы}} + C_{\text{глутаминовой кислоты}})$. Оценку индекса БПК, соответствующего анализируемой пробе производят с помощью полученной градуировочной зависимости по раствору глюкозо-глутаминовую смеси (ГГС).

Выключение прибора осуществляют в последовательности: закрыть компьютерную программу, выключить прибор кнопкой «ОТКЛ» на приборной панели.

Оформление работы

- 1) Нарисовать схему биосенсорной установки, описать формирование рецепторного элемента.
- 2) Заполнить таблицу для построения градуировочной зависимости, которая содержит столбец с расчетными данными БПК
- 3) Построить график зависимости в координатах: ответ сенсора (мг/дм³ с) – БПК (мг/дм³) с помощью компьютерных программ обработки данных.
- 4) Привести результаты статистической обработки полученной прямой: параметры уравнений со стандартным отклонением, коэффициент смешанной корреляции R^2 .
- 5) Рассчитать БПК неизвестной пробы. Данные представить с доверительным интервалом.

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение понятию «биосенсор».
2. К биосенсорам какого типа относится биосенсор, используемый в работе?
3. Принцип работы кислородного электрода Кларка.

**Лабораторная работа № 3. Методика выполнения измерений
биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации в
поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и
очищенных сточных водах**

Данная методика позволяет проводить количественный химический анализ проб природных поверхностных пресных, грунтовых, сточных и очищенных сточных вод для определения в них биохимического потребления кислорода после n-дней (БПКполн.) инкубации.

Для анализа с содержанием БПКполн. выше 300 мг/дм³ проводят дополнительные разбавления.

Диапазон измеряемых концентраций биохимического потребления кислорода от 0,5 до 1000 мг О₂/дм³.

Принцип метода:

1. Метод определения биохимического потребления кислорода основан на способности микроорганизмов потреблять растворенный кислород при биохимическом окислении органических и неорганических веществ в воде.

2. Биохимическое потребление кислорода определяют количеством кислорода в мг/дм³, которое требуется для окисления находящихся в воде углеродосодержащих органических веществ, в аэробных условиях в результате биохимических процессов. За полное биохимическое потребление кислорода (БПКполн.) принимается окончательная минерализация биохимически окисляющихся органических веществ до начала процесса нитрификации (появление нитритов в исследуемой пробе в концентрации 0,1 мг/дм³).

3. По разности содержания растворенного кислорода в обогащенной растворенным кислородом и зараженной аэробными микроорганизмами исследуемой воде до и после инкубации в стандартных условиях

устанавливается значение БПК. Разбавлением исследуемой воды обеспечивается достаточное содержание кислорода для его потребления микроорганизмами.

4. Метод заключается в разбавлении исследуемой пробы различными объемами специально приготовленной разбавляющей воды с большим содержанием растворенного кислорода, зараженной аэробными микроорганизмами, с добавками, подавляющими нитрификацию. Уменьшение содержания кислорода за определенный период инкубации в темном месте, при контрольной температуре, в полностью заполненной и герметически закрытой пробкой склянке, обусловлено, главным образом, протекающими в аэробных условиях бактериальными биохимическими процессами, которые приводят к минерализации органического вещества. Время, необходимое на полную минерализацию, зависит от природы органического вещества. После измерения концентрации растворенного кислорода до и после инкубационного периода рассчитывается масса кислорода, поглощенного из одного дм^3 воды. Величина уменьшения кислорода в склянке, умноженная на степень разведения, дает численную величину БПК, выраженную в $\text{мг O}_2/\text{дм}^3$.

Ход работы

Отбор проб. Для отбора глубинных проб воды из озер, водохранилищ, прудов и рек следует использовать батометры системы Молчанова, Рутнера или Скадовского-Зернова. Для отбора проб поверхностных пресных вод с глубины не более 0,5 м используется бутыл с привязанной пробкой, которую помещают в футляр или пробоотборник с грузом. Футляр снабжен петлей, к которой привязывают веревку с размеченными отрезками, указывающими глубину погружения. На требуемой глубине, с помощью привязанной к пробке веревки выдергивают пробку из горла бутыл. После заполнения бутыл водой (на поверхности воды не появляются пузырьки воздуха) ее поднимают на поверхность.

Пробы сточной воды с глубины 0,5 м отбираются пробоотборником любого типа.

Отбор природных и сточных вод следует производить в местах наибольшего перемешивания.

На очистных сооружениях отбирать пробы для анализа на БПК следует до системы хлорирования, т.к. активный хлор является мешающим определению веществом. Если необходимо проанализировать пробу после хлорирования, следует удалить из исследуемой воды свободный хлор.

При взятии проб измеряют температуру воды. Для этого **используют термометр от 0 до 100°C, 2-го класса точности по ГОСТ 28498*)**. Для определения температуры на месте взятия пробы, 1 дм³ воды наливают в склянку, нижнюю часть термометра погружают в воду и через 5 мин отсчитывают показания, держа его вместе со склянкой на уровне глаз. Точность определения $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Не допускается консервирование проб, предназначенных для определения в них БПК.

Отобранные пробы наливают, предварительно ополаскивая отбираемой водой, в банки или флаконы объемом 1,5 дм³, заполняя их до краев и закрыв без пузырей воздуха пришлифованными стеклянными пробками или полиэтиленовыми крышками. Под полиэтиленовые крышки подкладываются тефлоновые или из алюминиевой фольги прокладки. Пробы упаковываются в деревянные ящики для переноски проб и прокладываются бумагой или ветошью. При транспортировке не держать пробы на свету.

Хранение проб

Необходимо анализировать пробы тотчас же после отбора. В том случае, если обработать пробу сразу после отбора невозможно, ее следует хранить не более 24 часов при температуре 4 °C.

Предварительная обработка пробы

БПК определяют в натуральной (взболтанной) пробе при осуществлении экоаналитического контроля за соблюдением нормативов качества. БПК определяют в отстаиванной и фильтрованной пробе при осуществлении производственного контроля за эффективностью технологического процесса очистки сточных вод на разных стадиях.

Определение в натуральной (взболтанной) пробе. В лаборатории перед началом определения проба тщательно перемешивается (с помощью встряхивающего аппарата или вручную).

Определение после отстаивания. Проба отстаивается в цилиндрах в течение 2 часов.

Сифоном отбирают в бутыль для анализа верхние 3/4 прозрачного слоя жидкости над осадком, не захватывая взмученный осадок.

Определение в фильтрованной пробе. Проба тщательно перемешивается и фильтруется через обеззоленный фильтр «синяя лента».

Приготовление разбавляющей воды и растворов

Дистиллированная вода, применяемая для приготовления всех растворов и разбавляющей воды, не должна содержать веществ, влияющих на определение БПК (меди более 0,01 мг/дм³, цинка более 1 мг/дм³, свободного хлора, хлорамина, органических веществ и кислот). Дистиллированную воду для приготовления разбавляющей воды хранят тщательно защищенной от какого бы то ни было загрязнения при температуре 20 °С. Сосуды для этой воды нельзя использовать для других целей.

Разбавляющую воду готовят из дистиллированной воды, полученной накануне анализа, выдержанной при температуре 20 °С; ее насыщают кислородом воздуха, аэрируя до концентрации растворенного кислорода не

менее 8 мг/дм³ и не более 9 мг/дм³. Можно обогащать кислородом воду длительным встряхиванием бутылки, наполненной на 2/3 дистиллированной водой. В день применения в разбавляющей воде измеряют содержание растворенного O₂, затем добавляют 0,3 г/дм³ бикарбоната натрия для доведения рН до оптимальных значений. рН разбавляющей воды должна быть в диапазоне 7,0 - 8,0. В разбавляющую воду добавляют фосфорные и аммонийные соли, гексагидрат хлорида железа, хлорид кальция и сульфат магния для создания устойчивой буферной системы, которая позволяет поддерживать постоянное значение рН в течение любого времени инкубации, не изменяющееся при выделении СО₂ (продукт метаболизма бактерий).

Растворы солей для приготовления разбавляющей воды.

Фосфатный буферный раствор рН = 7,2.

8,5 г однозамещенного фосфорнокислого калия (KH₂PO₄), 21,75 г двухзамещенного фосфорнокислого калия (K₂HPO₄), 33,4 г двухзамещенного фосфорнокислого натрия 12-водного (Na₂HPO₄ x 12H₂O) и 1,7 г хлорида аммония (NH₄Cl) растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 дм³.

Сульфат магния.

22,5 г MgSO₄ x 7H₂O ч.д.а. растворяют в дистиллированной воде, доводят объем до 1 дм³.

Хлорид железа.

0,25 г FeCl₃ x 6H₂O ч.д.а. растворяют в дистиллированной воде, доводят объем до 1 дм³.

Хлорид кальция.

27,5 г CaCl₂ ч.д.а. безводного растворяют в дистиллированной воде, доводят объем до 1 дм³.

Растворы хранят в темноте, при комнатной температуре не более месяца. Не используют при появлении осадка.

В день анализа к 1 дм³ разбавляющей воды прибавляют 1 см³ фосфатного буферного раствора, 1 см³ раствора сульфата магния, 1 см³ раствора хлорида кальция, 1 см³ раствора хлорида железа.

Заражение микрофлорой.

В разбавляющую воду в день анализа добавляют бактериальную затравку. (При анализе сточных вод сооружений биологической очистки такой затравки не требуется). Бактериальную затравку добавляют при исследовании искусственно приготовленных растворов, производственных сточных, олиготрофных поверхностных пресных, грунтовых, глубоко очищенных и обеззараженных сточных вод.

Бактериальная затравка может отбираться из разных источников, при приготовлении разбавляющей воды используется один из предлагаемых вариантов:

а) Сточные воды с городских сооружений биологической очистки, отобранные после песколовок. Добавляют 0,3 - 1,0 см³ на 1 дм³ разбавляющей воды.

б) Аквариумная вода. Добавляют 5,0 - 10,0 см³ на 1 дм³ разбавляющей воды.

в) Речная вода. Добавляют 10,0 - 20,0 см³ на 1 дм³ разбавляющей воды.

Проверка степени чистоты разбавляющей воды холостым опытом.

При определении БПК₅ или БПК_{полн.} четыре кислородные колбы заполняют разбавляющей водой, в двух определяют кислород сразу в день исследования («нулевой» день), время между разбавлением пробы и определением кислорода в «нулевой» день не должно превышать 15 мин. В

остальных двух колбах, которые помещают в термостат вместе с анализируемыми пробами, - через 5 суток. Разница средней концентрации кислорода в пробе холостого опыта нулевого дня и через 5- суточный срок инкубации не должна превышать 0,5 мг/дм³ кислорода.

Основные условия для получения достоверных результатов биохимического потребления кислорода - инкубация пробы при постоянной температуре 20 °С без доступа воздуха и света. Кроме основных условий при определении необходимо соблюдать следующие правила:

проба должна быть насыщена вначале опыта кислородом (около 8 мг/дм³ при температуре 20 °С);

потребление кислорода во время инкубационного периода должно быть около 50 % (минимальное потребление 2 мг/дм³);

остаточная концентрация кислорода после срока инкубации должна быть не менее 3 мг/дм³.

Выполнение измерений без разбавления пробы

Относительно чистые речные и очищенные сточные воды с содержанием БПК₅ до 5 мг/дм³ можно исследовать без разбавления.

Исследуемую воду наливают в лаборатории в бутылку не более чем на 2/3 объема, устанавливают температуру воды 20 °С (нагреванием на водяной бане или охлаждением) и сильно встряхивают для насыщения кислородом до 8 мг/дм³. После этого сифоном исследуемой водой заполняют, слегка переполняя, необходимое количество кислородных колб. При определении БПК₅ наполняется шесть колб, при определении БПК_{полн.} - шестнадцать. Предварительно каждую колбу ополаскивают приблизительно 30 см³ пробы. Наполненные кислородные колбы закрывают притертой пробкой так, чтобы

внутри не оставалось пузырьков воздуха. В двух кислородных колбах тотчас же (не более 15 мин) определяют кислород.

Остальные колбы с испытуемой водой помещают в термостат. Можно применять специальные колбы, снабженные притертыми стеклянными колпачками. В последние наливают испытуемую воду, и они служат водяным затвором. Кислородные колбы хранят при температуре 20 °С в темноте в течение необходимого времени инкубации, (при определении БПК₅ в течение 5 суток, а при определении БПК_{полн.} - до появления в пробе нитритов 0,1 мг/дм³).

Для анализа пробы на нитриты можно наполнять испытуемой водой дополнительные склянки объемом 25 см³ и инкубировать их в тех же условиях. Через 2, 5, 7, 10, 15, 20 и 25 суток от начала инкубации вынимают из термостата по две колбы с испытуемой водой, определяют в них растворенный кислород и содержание нитритов.

В расчете используют результат содержания растворенного кислорода в той колбе, где остаточное содержание растворенного кислорода после срока инкубации не менее 3 мг/дм³ и потреблено около 50 % кислорода. Если это условие выполняется в обеих колбах, вычисляют средний результат из двух колб.

Выполнение измерений с разбавлением пробы

Для загрязненных речных и сточных вод с БПК₅ выше 6 мг/дм³ требуется предварительное разбавление пробы.

Определение производят в разбавленной пробе по разности содержания кислорода до и после инкубации в стандартных условиях.

Для разбавления пробы применяют искусственно приготовленную разбавляющую воду.

При приготовлении разбавлений температура исследуемой пробы должна соответствовать температуре 18 - 20 ° С.

Для расчета необходимых разбавлений пробы следует ожидаемое содержание БПК в пробе разделить на 4 - 5 (поскольку в воде после инкубации при правильном разбавлении должно остаться 4 - 5 мг/дм³ кислорода). Если нельзя предположить ожидаемое БПК, необходимое разбавление рассчитывается по результатам определения бихроматной окисляемости (ХПК). Условно принимают биохимическое потребление кислорода 50 % ХПК, а поскольку в воде после инкубации должно остаться 4 - 5 мг/дм³ кислорода, вычисленное значение (ХПК : 2) делят на 4 или 5. Полученный результат показывает, во сколько раз надо разбавить анализируемую воду.

Пробы, для которых нельзя примерно рассчитать величину БПК, берут в двух и более разбавлениях. Результаты, полученные при анализе проб с различным разбавлением, не должны быть одинаковыми. Наиболее достоверным является результат определения, при котором израсходовано около 50 % первоначально содержащегося кислорода.

При определении БПК в воде, содержащей большое количество промышленных сточных вод, могут возрастать значения БПК с увеличением степени разведения. В этих случаях берут максимальное значение БПК, которое получено при наибольшем разведении.

В мерную колбу вместимостью 1 дм³ наливают хорошо перемешанную испытуемую жидкость, отбирают пипеткой определенный объем и вносят в другую колбу (цилиндром отмеряются объемы больше 50 см³). Затем доливают до метки разбавляющей водой и хорошо перемешивают; полученную смесь сифоном, опущенным до дна колбы, наливают в шесть (если определяется БПК₅) или 16 (если определяется БПК_{полн.}) кислородные колбы объемом 250 см³, закрывают пробкой, следя за тем, чтобы внутри не

осталось пузырьков воздуха. Затем оставшейся смесью заполняют колпачки от колб и, наклонив колбу, вставляют их в колпачки с водой, вытесняя из них воду, чтобы не осталось пузырьков воздуха. Для каждого разбавления заполняют две колбы.

В первых двух кислородных колбах немедленно определяют кислород. Все остальные колбы (4 при определении БПК₅ и 10 - 14 при определении БПК_{полн.}) помещают в термостат при 20 °С для инкубации.

Через 2, 5, 7, 10, 15, 20 и 25 суток от начала инкубации вынимают из термостата по две колбы с испытуемой водой, определяют в них растворенный кислород и содержание нитритов. Нитриты определяют в воде, налитой в колпачок колбы, который снимают так же, как надевали.

Если в пробе начался процесс нитрификации, (что определяют по образованию нитритов в концентрации, превышающей 0,1 мг/дм³) определение БПК полное считают законченным. При появлении на пятые сутки следов нитритов следующее определение проводят через 5 - 8 суток. При отсутствии в лаборатории колб с пришлифованными стеклянными колпачками для контроля процесса нитрификации в термостат можно ставить дополнительно наполненные испытуемой и разбавляющей водой 12 неградуированных склянок объемом 25 см³ и в них определять содержание нитритов по истечению установленного срока инкубации. Наиболее точным считается определение БПК в пробах, где нитрификация только началась.

Расчет БПК при определении без разбавления пробы:

$$X = Cx_1 - Cx_2,$$

где X - величина БПК_n, мг/дм³ кислорода;

Cx₁ - содержание растворенного кислорода до инкубации, мг/дм³;

Cx₂ - то же, после инкубации, мг/дм³.

Расчет БПК при определении с разбавлением пробы:

$$X = [(C_{x1} - C_{x2}) - (C_{y1} - C_{y2})]N,$$

где X - величина БПК, мг O₂/дм³;

C_{x1} - содержание растворенного кислорода в исследуемой воде до инкубации, мг/дм³;

C_{x2} - то же, после инкубации, мг/дм³;

C_{y1} - содержание растворенного кислорода в разбавляющей воде до инкубации, мг/дм³;

C_{y2} - то же, после инкубации, мг/дм³;

N - величина разбавления.

5.3. За результат анализа X_{ср} принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений X₁ и X₂

$$X_{\text{ср}} = \frac{X_1 + X_2}{2},$$

для которых выполняется следующее условие:

$$|X_1 - X_2| \leq r \cdot (X_1 + X_2)/200$$

где r - предел повторяемости, значения которого приведены в таблицах 1.

Таблица 1.

Значения пределов повторяемости при определении растворенного кислорода амперометрическим методом с БПК-тестером (P = 0,95)

Диапазон измерений, мг O ₂ /дм ³	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами параллельных определений), г, %
от 0,5 до 200 вкл.	11
св. 200	6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА

Определение содержания растворенного кислорода в диапазоне от 0,1 мг/дм³ до 10,0 мг/дм³ амперометрическим методом

Принцип метода. Действие преобразователя концентрации кислорода основано на электрохимическом восстановлении кислорода, диффундирующего на его катод через селективнопропускающую мембрану (мембрана непроницаема для воды и растворенных веществ, но пропускает кислород, а также некоторое количество других газов). Генерируемый при этом электрический ток пропорционален концентрации кислорода в анализируемой воде. Показания стрелки прибора соответствуют массовой концентрации кислорода в анализируемой воде. Изменения растворимости кислорода при различных температурах и атмосферном давлении пересчитывается по таблицам. Некоторые приборы компенсируют изменения растворимости кислорода в зависимости от температуры и атмосферного давления автоматически. Для измерения растворенного кислорода при определении БПК пригодны различные модификации БПК-тестеров и оксиметров, позволяющих воспроизводить метрологические характеристики, приведенные в табл. 1.

Выполнение измерений. Выполняя измерение следует руководствоваться инструкцией по эксплуатации прибора.

При использовании БПК-тестера для инкубирования проб исследуемой воды используются кислородные колбы с тефлоновыми прокладками в крышках и переливную вставку, входящие в комплект. Переливная вставка обеспечивает сбор переливающейся из колбы воды при измерениях растворенного кислорода.

При использовании оксиметров любой марки требуется подобрать кислородные колбы с притертыми пробками, в горлышко которых свободно

входит электрохимический датчик кислорода и чашки Петри, которые применяются как переливные подставки.

Кислородную колбу с исследуемой пробой открывают, одевают на нее переливную вставку (если она прикладывается к комплекту) или ставят колбу на чистую чашку Петри, опускают в колбу магнитный стержень в стеклянном корпусе, ставят чашку Петри с кислородной колбой на магнитную мешалку и обеспечивают скорость вращения стержня указанную в инструкции, но не менее 5 см/сек. Вставляют в горло колбы электрохимический датчик кислорода и через 3 минуты записывают показания прибора. Результаты выражаются в мг $O_2/дм^3$ с точностью до первого десятичного знака.

После того, как измерение кислорода произведено, датчик кислорода вынимают из кислородной колбы, снимают переливную вставку и из нее или из чашки Петри пипеткой отбирается перелившаяся в процессе измерения исследуемая вода и ею дополняется кислородная колба доверху без пузырей воздуха (если колбу нельзя наполнить доверху перелившейся исследуемой водой, то можно добавлять несколько капель стерильной дистиллированной воды), после чего колба закрывается крышкой и ставится в термостат для дальнейшей инкубации.

Повторное измерение концентрации кислорода в одной и той же колбе повышает достоверность измерений БПК_п и позволяет уменьшить количество инкубируемых кислородных колб.

Оформление работы

Результат анализа X_{cp} в документах, предусматривающих его использование, может быть представлен в виде: $X_{cp} \pm \Delta$, $P = 0,95$,

где Δ - показатель точности методики.

Значение Δ рассчитывают по формуле: $\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot X_{cp}$.

Значение δ приведено в таблице 2.

Таблица 2.

Диапазон измерений, значения показателей точности, повторяемости и воспроизводимости методики при определении растворенного кислорода амперометрическим методом

Диапазон измерений, мг O ₂ /дм ³	Показатель точности (границы относительной погрешности при вероятности P = 0,95), ± δ , %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_R , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %
от 0,5 до 200 вкл.	14	4	5
св. 200	12	2	3

Лабораторная работа №4. Биодиагностика почв по ферментативной активности

Почва - это единственный компонент ландшафта, который возникает в результате взаимодействия всех других его компонентов: горных пород, климата, природных вод, растительности, микроорганизмов и животных. Являясь основной депонирующей средой, почвы сами могут рассматриваться как интегральный индикатор загрязнения природно-территориального комплекса. Загрязненные почвы являются источниками вторичного загрязнения приземного слоя воздуха, поверхностных и грунтовых вод; из почв растения поглощают минеральные вещества, вовлекая их в биологический круговорот. Таким образом, почвенный покров определяет миграцию химических элементов по цепи питания, поэтому изучение его состояния представляет собой существенную часть работ по оценке влияния антропогенных факторов на природную среду. Основные характеристики почв, которые являются объектом биоиндикации, – кислотность, механический состав, влажность, содержание питательных веществ. По степени накопления некоторых токсичных веществ в растениях (аккумулятивная биоиндикация) судят о степени загрязнения ими почвы. Принцип метода – определение активности почвенных ферментов – основан на учете количества переработанного в процессе реакции субстрата или образующегося продукта реакции в оптимальных условиях температуры и pH среды. Определяют каталазу (катализирует разложение перекиси), образованную в результате биохимических реакций окисления веществ молекулами кислорода; дегидрогеназы (группа ферментов из класса оксидоредуктаз, катализирующих перенос протонов); инвертазу (гидролизует гликозидную связь в сахарозе и других сахарах с образованием фруктозы и глюкозы); уреазу (катализирует реакцию гидролиза мочевины до аммиака и углекислого газа).

Цель работы: определение биологической активности почв на разном удалении от дороги (на примере определения инвертазной и каталазной активности).

Материалы и средства исследования:

1. Фотоколориметр;
2. 5%-й раствор сахарозы;
3. Ацетатный буфер (pH 4,7);
4. Тoluол;
5. Гидроксид калия,
6. Раствор Феллинга;
7. Система для газометрии;
8. 10%-й раствор H_2O_2 ;
9. CaCO_3 .

Ход работы

Определение инвертазной активности

Приготовление раствора Феллинга (раствор *а* и *б* 1:1): Раствор *а* — 40 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в воде и доводят до 1 л, фильтруют через бумажный фильтр, раствор *б* — 200 г сегнетовой соли ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) растворяют в дистиллированной воде, прибавляют 150 г КОН и доводят до 1 л.

В пробирки вместимостью 30 мл поместить по 5 г каждого образца почвы, добавить по 10 мл 5%-го раствора сахарозы, 10 мл ацетатного буфера (pH 4,7) и 5 – 6 капель толуола. Пробирки закрыть пробками, встряхнуть, поместить в термостат при температуре 30 °С на 24 ч и периодически встряхивать их. После инкубации содержимое пробирок отфильтровать в мерные колбы на 25 мл. Довести до метки. Из фильтратов взять по 6 мл в большие пробирки, добавить по 3 мл раствора сегнетовой соли и 3 мл раствора сернокислой меди, хорошо перемешать и кипятить на водяной бане 10 мин. Получается красный осадок.

Пробирки с раствором охладить в воде, содержимое отфильтровать в большие пробирки. Прозрачный фильтрат колориметрировать на ФЭК, используя светофильтр с длиной волны 630 нм, ширина кюветы 1 см.

Для получения калибровочной кривой приготовить стандартный раствор: 6 мг глюкозы в 1 мл. Разведением приготовить серию растворов. Фотоколориметрировать и построить кривую: оптическая плотность — концентрация глюкозы в 1 мл. Активность инвертазы (X) выражают в миллиграммах глюкозы на 1 г почвы за 24 ч по формуле:

$$X = \frac{A2V}{Mv};$$

где А– количество глюкозы, полученное по калибровочной кривой из оптической плотности, мг/мл; М– навеска почвы, 5 г; V – общий объем фильтрата, 25 мл; v – объем фильтрата, взятого для анализа, 6 мл. Ошибка определения – до 5 %. **По таблице 7.1** оценить степень насыщения исследуемых почв инвертазой.

Таблица 7.1. Шкала для оценки степени обогащенности почв ферментами

Степень обогащенности почв	Инвертаза, мг глюкозы на 1 г за 24 ч
Очень бедная	<5
Бедная	5-15
Средняя	15-50
Богатая	50-150
Очень богатая	>150

Приготовление ацетатных буферных смесей. Для области рН 3,6–5,6 (0,01 М). Основные растворы: А – 0,2 М уксусная кислота (11,55 мл уксусной кислоты в 1 л воды); Б – 0,2 М раствор ацетата натрия (16,4 г $C_6H_5O_2Na$ или 27,2 г $C_6H_5O_2Na \cdot 3H_2O$ в 100 мл воды); х мл раствора А + у мл раствора Б и разбавить водой до 1 л.

Таблица 7.2. Приготовление ацетатных буферных смесей

X	У	pH	X	У	pH	X	У	pH
46,3	3,7	3,6	30,5	19,5	4,4	10,5	39,5	5,2
44,0	6,0	3,8	25,5	24,5	4,6	8,8	41,2	5,4
41,0	9,0	4,0	20,0	30,0	4,8	4,8	45,2	5,6
36,8	13,2	4,2	14,8	35,2	5,0			

Определение каталазной активности.

1. Подготовка системы для газометрии к работе:

Прибор состоит из: измерительной бюретки 2, соединенной посредством резиновых трубок с уравнительным сосудом 3 и реакционным сосудом 1 (пробирка или колба) (рисунок 7.1).

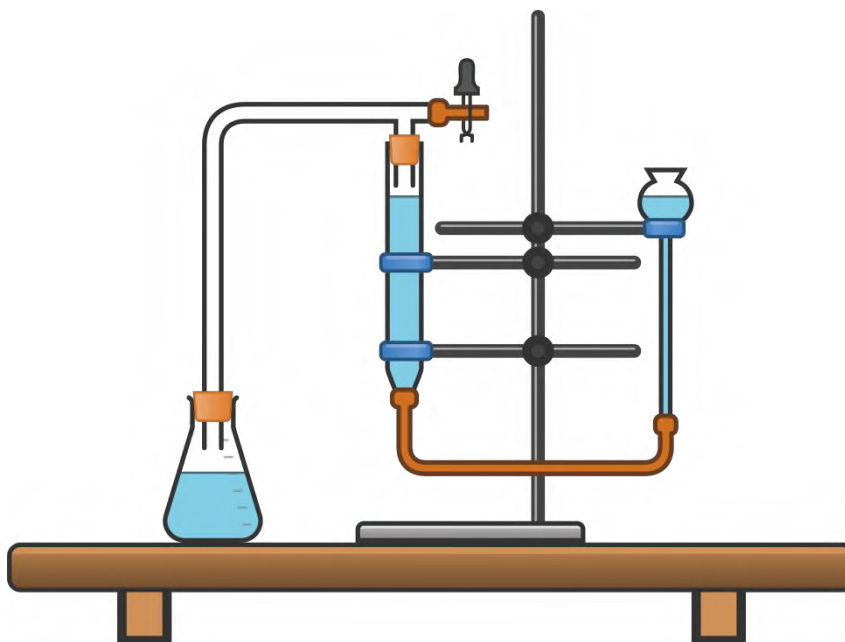


Рисунок 7.1. Установка для газометрического определения каталазной активности в почвенных образцах

Бюретка имеет два отвода: один отвод соединяет ее с атмосферой, другой - с реакционным сосудом. Регулировка осуществляется краном 5. Бюретка и уравнительный сосуд, заполненный подкрашенной дистиллированной водой. Присоедините пустой реакционный сосуд к измерительной части прибора. Соедините бюретку с помощью крана 4 с отводом и установите с помощью уравнительного сосуда 3 уровень жидкости в бюретке 2 точно на нулевой отметке. Отсоедините бюретку от атмосферы и

испытайте прибор на герметичность, для чего опустите уравнильный сосуд так, чтобы уровень жидкости в нем был ниже, чем в бюретке. Укрепите неподвижно уравнильный сосуд и если в течение 1-2 мин уровень воды в бюретке будет неподвижен, то можно считать, что прибор герметичен. После проверки прибора на герметичность верните уравнильный сосуд в начальное положение и приступайте к выполнению основного эксперимента. Запишите в таблицу температуру окружающей среды и атмосферное давление в начале и в конце опыта. При расчетах используйте среднее значение.

1. Навеску просеянной почвы 1 г внести в пробирку, добавить 0,5 г CaCO_3 и смочить 4 мл дистиллированной воды.

2. В пробирку с почвой прилить 1,7 мл 10%-го раствора перекиси водорода, быстро присоединить к колбе (пробирке) системы для газометрии и отметить начало опыта по секундомеру.

3. Взбалтывать смесь в пробирке следует во все время опыта, не касаясь непосредственно дна пробирки руками. Выделяющийся кислород вытесняет из бюретки воду, уровень которой отмечают. Количество выделившегося молекулярного кислорода учитывают при температуре 18–20°C.

4. Измерить уровень воды в измерительной бюретке через 5 минут после начала опыта.

5. Активность каталазы выражают в объеме (см^3) кислорода, выделившегося на 1 г почвы в минуту. Ошибка определения до 5%.

$$A = \frac{V_{\text{кислорода}}}{5};$$

Таблица 7.2. Шкала для оценки степени обогащенности почв ферментами

Степень обогащенности почв	Каталаза, O_2 $\text{см}^3/\text{г}$ за 1 мин
Очень бедная	<1
Бедная	1-3
Средняя	3-10

Богатая	10-30
Очень богатая	>30

6. Аналогичные процедуры проделать со всеми образцами почв и оценить по **таблице 7.2** обогащённость исследуемых почв каталазой.

Контрольные вопросы:

1. Определение биоиндикации
2. Определение биотестирования.
3. Тест-функции объектов биотестирования.
4. Биохимический подход биотестирования.
5. Принцип метода определения активности почвенных ферментов.
6. Ферменты, относящиеся к классу оксидоредуктаз.
7. Классификация ферментов.
8. Специфичность ферментов.
9. Ингибирование ферментативной активности.
10. Зависимости активности ферментов от температуры и pH.

Лабораторная работа № 5. Определение нефтепродуктов (на примере гексадекана) в ростовых средах методом газовой хроматографии

Гексадекан (*цетан*) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$ — ациклический насыщенный углеводород нормального строения. Цетан используют как эталон для оценки качества (цетанового числа) дизельного топлива, считая его цетановое число за 100, а так же является компонентом нефти. Практически все углеводороды, входящие в состав нефти, могут быть объектом микробиологического воздействия. Углеводороды в почве разлагаются в результате деятельности углеродоокисляющих микроорганизмов, способных окислять углеводороды до CO_2 и воды или превращать их в соединения, утилизируемые другими микроорганизмами.

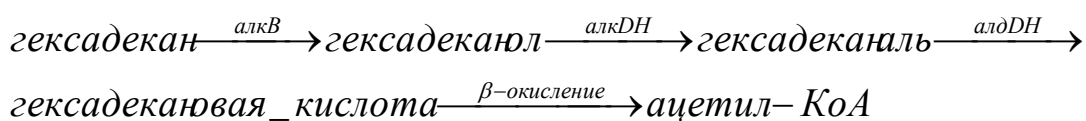
По степени снижения окисляемости микроорганизмами компоненты нефти и нефтепродуктов располагаются в такой последовательности:

н-алканы → разветвленные алканы → разветвленные алкены → низкомолекулярные н-алкил ароматические соединения → моноароматические соединения → полициклические ароматические углеводороды → асфальтены.

Из всех компонентов нефти наиболее доступны для биodeградации н-алканы $\text{C}_{12}-\text{C}_{22}$. Оптимальные для роста микроорганизмов концентрации н-алканов в различных средах варьируют от 0,5 до 2–5%. Ароматические углеводороды более токсичны, поэтому оптимальными для их биodeградации являются концентрации в 10–100 раз меньшие, чем концентрации н-алканов. Наиболее труднодоступны для биodeградации полициклические ароматические углеводороды. Нефть и ее фракции обладают, как правило, средней доступностью для микроорганизмов, однако токсичность сырой нефти часто бывает усугублена примесями сернистых соединений и тяжелыми металлами.

Наиболее распространенным путем ассимиляции углеводов является монотермальное окисление, которое характеризуется гидроксильрованием одного концевых атома углерода цепи n-алкана в первичную спиртовую группу. В этом случае молекулярный кислород используется только для получения первичного спирта, дальнейшее окисление происходит с помощью алкоголь- и альдегидогеназ.

Метаболическое превращение гексадекана протекает следующим образом:



Дальнейшее окисление протекает по пути, известному как бета-окисление жирных кислот, при котором за каждый цикл длина цепочки жирной кислоты укорачивается на два углеродных атома.

В целом можно сказать, что все или почти все углеводороды низкомолекулярной фракции нефти в сравнительно короткие сроки удаляются из среды: одни за счет испарения, а другие за счет метаболической активности углеродоокисляющих микроорганизмов.

Цель работы. Определение содержания гексадекана в ростовой среде методом газовой хроматографии с использованием капиллярных колонок.

Объекты и средства исследования.

1. Газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, с уровнем шумов нулевого сигнала не более $2 \cdot 10^{-14}$ А, с дрейфом нулевого сигнала детектора не более $2 \cdot 10^{-12}$ А/ч, с пределом детектирования не более $2 \cdot 10^{-12}$ гС/с.

2. Колонка газохроматографическая капиллярная SGE Analytical Science forte GC Capillary Column BP1 J08 30м*0,3мм*0,53мкм. Допускается

применение других капиллярных колонок с аналогичными техническими характеристиками, обеспечивающими аналогичное разделение.

3. Компьютер с соответствующим программным обеспечением
4. Газ-носитель — гелий или азот сжатый марки А в баллоне по ГОСТ 9293 или азот особой чистоты по ГОСТ 9293.
5. Водород технический марки А по ГОСТ 3022. Допускается использовать генераторы водорода.
6. Воздух сжатый по ГОСТ 17433. Допускается использовать компрессоры любого типа, обеспечивающие необходимое давление и чистоту воздуха.
7. Микрошприц вместимостью 10 мкл.
8. Вода дистиллированная.
9. Гексадекан, х.ч.
10. Гексан, х.ч.
11. Мерная колба на 100 мл.
12. Пипетки мерные.
13. Слянка для хранения градуировочной смеси любого типа пробкой, обеспечивающей герметичность.

Ход работы

Приготовление градуировочных смесей.

Монтаж, наладку и вывод хроматографа на рабочий режим проводят в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору. Прибор градуируют по искусственным смесям методом абсолютной градуировки. Состав градуировочной смеси должен быть близким к анализируемым пробам. Для построения градуировочной зависимости готовят серию из 5 растворов с различным содержанием гексадекана в гексане: 1, 5, 10, 15, 25%.

Пробоподготовка.

Исследуемый образец (250 мл) подкисляли 1,5 мл серной кислоты

(1:1) и дважды экстрагировали н-гексаном (по 25 мл) в стеклянной делительной воронке емкостью 1 л в течение 5 мин при периодическом встряхивании содержимого воронки.

После расслаивания жидкостей слой н-гексана, содержащий извлеченные НП, отделяли от водного слоя и пропускали через стеклянную колонку (15 см х 1 см) с оттянутым нижним концом, заполненную оксидом алюминия, для отделения полярных соединений.

Оксид алюминия (II степени активности, «для хроматографии») прокаливали в муфельной печи в течение 3-х ч при 600°C и после охлаждения помещали в стеклянную колбу с притертой пробкой, добавляли дистиллированную воду в количестве 4% от массы адсорбента и встряхивали в течение 1-2 мин. Использовали через сутки.

Проведение анализа.

Газовый хроматограф включают в соответствии с инструкцией по его эксплуатации и устанавливают параметры хроматографирования.

Условия хроматографирования с капиллярными колонками:

- Газохроматографическая капиллярная колонка: SGEAnalyticalScienceforteGCCapillaryColumnBP1 J08 30м*0,3мм*0,53мкм;
- температура термостата — 250°C;
- температура испарителя (инжектора) — 300°C.
- инжектор с делением потока – коэффициент деления потока 1:1.
- детектор ионизации в пламени (ДИП):
- температура детектора — 200 — 250°C;
- расход воздуха — 18 дм³/ч;
- расход водорода — 1,8 дм³/ч;
- скорость потока газа-носителя — 17,4 см³/мин
- объем пробы — 1 мм³.

Для определения гексадекана методом газовой хроматографии на следующем этапе работы построили градуировочную зависимость площади пика на хроматограмме от содержания гексадекана. Каждый градуировочный раствор измеряют по три раза. На основе полученных данных строится градуировочная зависимость площади пика на хроматограмме от концентрации гексадекана. Порядок выхода пиков представлен на рисунке 5.1.

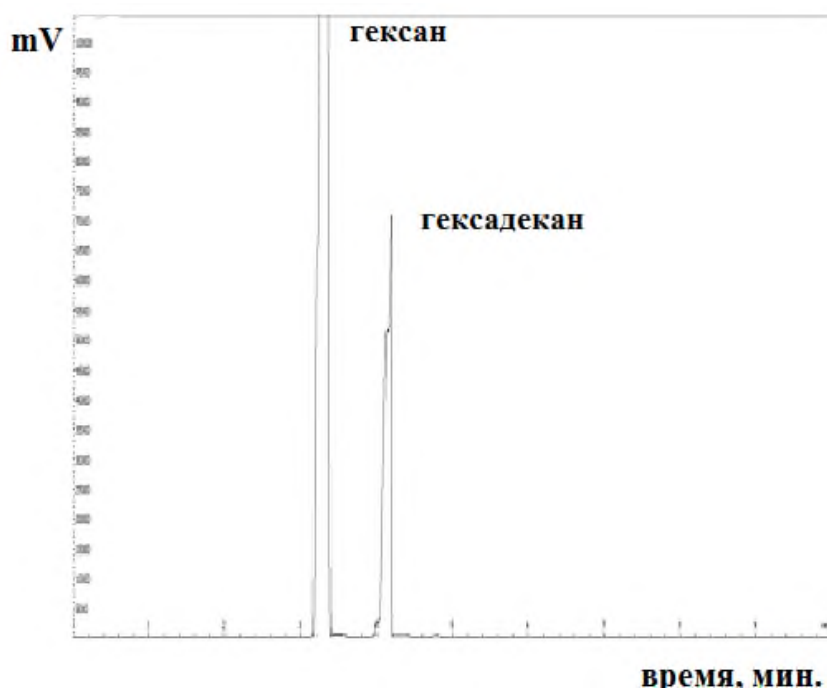


Рисунок 5.1. Хроматограмма гексадекана, растворитель гексан.

В испаритель (инжектор) вводят 1 мм³ образца экстракта и осуществляют хроматографическое разделение. Регистрируют пики в области времени удерживания, соответствующие компонентам градуировочной смеси. По полученным хроматограммам можно рассчитать концентрацию гексадекана с использованием градуировочной зависимости.

Обработка экспериментальных данных.

Обработка экспериментальных данных проводится согласно пункту 3. лабораторной работы № 4

Лабораторная работа № 6. Определение массовой концентрации бенз(а)пирена в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Жидкостная хроматография (ЖХ) - метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкостной хроматографии выполняет двоякую функцию: 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии); 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ.

В ЖХ природа подвижной фазы имеет существенно большее значение. В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа, различных по составу, подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого числа встречающихся на практике задач. Метод ЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие вещества неустойчивы при высоких температурах.

В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре. ЖХ подразделяется на варианты в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий: — в ситовой хроматографии разделение компонентов осуществляется за счет разницы в растворимости молекул при их прохождении (фильтрации) через слой сорбента; — в адсорбционной хроматографии — за счет разницы в адсорбируемости молекул, проходящих через слой частиц сорбента, покрытых неподвижной фазой в виде тонкого слоя или поверхностнопривитых радикальных групп; — в ионообменной и ионной хроматографии — за счет разницы в способности к обмену ионами с ионообменниками; Для анализа объектов окружающей среды наиболее

широко используют ВЭЖХ в адсорбционном варианте.

В лабораторной работе представлена методика измерений массовой концентрации бенз(а)пирена в пробах природных (поверхностных, подземных и морских), питьевых (в том числе расфасованных в емкости) и сточных вод методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием жидкостного хроматографа «Люмахром» с флуориметрическим спектрофлуориметрическим детектором или хроматографической приставки ВЭЖХ-3 с анализатором жидкости «Флюорат-02» в качестве флуориметрического детектора.

Бенз(а)пирен (3,4-бензпирен) относится к классу полиядерных ароматических углеводородов (ПАУ). Структурная формула молекулы представлена ниже.

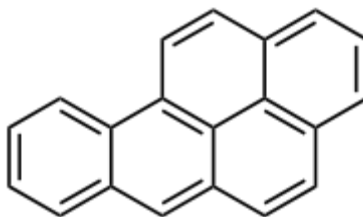


Рисунок 12.1 Структурная формула молекулы Бенз(а)пирена

Вещество является продуктом неполного сгорания (пиролиза) органических соединений и обладает канцерогенной активностью. В водных матрицах находится как в растворенном состоянии, так и в адсорбированном на взвешенных частицах виде. При хранении проб происходит значительная адсорбция бенз(а)пирена на взвесах и стенках сосуда; при этом содержание бенз(а)пирена в пробе может уменьшаться за счет микробиологической активности.

В таблице 12.1 приведены нормируемые значения ПДК бенз(а)пирена в различных типах вод. Диапазон измеряемых значений массовой концентрации бенз(а)пирена в пробах природных и питьевых вод составляет

0,5 – 500 нг/дм³, или 0,0005 - 0,5 мкг/дм³, в пробах сточных вод 2 – 500 нг/дм³, или 0,002 – 0,5 мкг/дм³.

Таблица 12.1 Предельно допустимые концентрации (ПДК) бенз(а)пирена в природных и питьевых водах

Объекты анализа	ПДК бенз(а)пирена, мкг/дм ³	Нормативный документ
Водные объекты хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования	0,01	ГН 2.1.5.2280-07
Питьевая вода, расфасованная в емкости	Первая категория 0,005	СанПиН 2.1.4.1116-02
	Высшая категория 0,001	

Цель работы:

Определение массовой концентрации бенз(а)пирена в образцах сточных.

Объекты и средства исследования.

- 1) Жидкостный хроматограф «Люмахром» с флуориметрическим или спектрофлуориметрическим детектором
- 2) Анализатор жидкости «Флюорат-02-2М» («Флюорат-02-Панорама») с хроматографической приставкой ВЭЖХ-3
- 3) Весы лабораторные высокого класса точности с ценой наименьшего деления не более 0,01 г, наибольшим пределом взвешивания не более 210г

- 4) Колбы мерные 2-го класса точности объемом 25, 50, 100 см³
- 5) Пипетки градуированные 2-го класса точности объемом 1 и 5 см³ и/или дозаторы пипеточные с переменным объемом 50-200 мм³ и 100-1000 мм³ с пределом допускаемой погрешности измерения не более $\pm 2\%$
- 6) Цилиндры мерные объемом 10, 50, 100, 200 и 1000 см³
- 7) Государственный стандартный образец ГСО состава раствора бенз(а)пирена в ацетонитриле номинального значения массовой концентрации 100 мкг/см³ и погрешностью аттестованного значения не более $\pm 2\%$

Средства измерения должны быть поверены в установленные сроки. Допускается использование других средств измерения и стандартных образцов, имеющих аналогичные или лучшие характеристики.

- 8) Хроматографическая колонка спредколонкой, заполненные обращенно-фазовым сорбентом
- 9) Испаритель роторный пленочный любого типа или иное устройство для удаления растворителя (например, комплект для удаления растворителя производства ГК «Люмэкс»)
- 10) Холодильник бытовой любого типа
- 11) Воронки делительные вместимостью 1 или 2 дм³
- 12) Колбы остродонные или грушевидные для упаривания объемом 50 или 100 см³ НШ № 29
- 13) Вials с завинчивающейся крышкой вместимостью 1 - 5 см³
- 14) Баня водяная с подогревом
- 15) Устройство для перемешивания проб любого типа
- 16) Колбы плоскодонные вместимостью 100 и 250 см³ с пришлифованной пробкой
- 17) Воронки химические диаметром 25, 50 и 100 мм. Стаканы химические вместимостью 50 и 100 см³
- 18) Колонка хроматографическая стеклянная с пришлифованной пробкой (внутренний диаметр 10 мм, длина 20 см)

19) Эксикатор, заполненный осушителем например, хлористым кальцием

20) Насос лабораторный вакуумный (мембранный или водоструйный), обеспечивающий разрежение 7 - 10 кПа (50-75 мм рт.ст.) с вакуумными шлангами и краном регулировки вакуума Муфельная печь или электропечь сопротивления, обеспечивающая поддержание температурного режима от 150 до 600⁰С с погрешностью $\pm 25^0\text{C}$

21) Вата медицинская

22) Фильтры бумажные «красная лента»

23) Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, ос.ч.

24) Вода дистиллированная

25) Тиосульфат натрия, ч.д.а.

26) Кислота серная, ч.

27) Хлористый метилен, ч.д.а., перегнанный

28) Гексан, х.ч.

29) Натрий серноокислый безводный, х.ч.

30) Оксид алюминия для хроматографии, фракция 50 – 150

мкм

31) Кислота соляная, х.ч.

32) Натрий хлористый, х.ч.

33) Программное обеспечение для сбора и обработки хроматографических данных на основе персонального компьютера («Мульти-Хром» или «ПикЭксперт»)

Ход работы

Схема анализа основана на экстракции бенз(а)пирена из проб воды гексаном или хлористым метиленом, концентрировании экстракта, при необходимости очистке его методом колоночной хроматографии, и определении бенз(а)пирена методом ВЭЖХ с использованием флуориметрического детектирования. Схема распространяется на все типы вод.

Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: отбор проб, подготовка стеклянной посуды, приготовление растворов, проверка и градуировка хроматографа, проверка чистоты реактивов, подготовка стеклянной хроматографической колонки (только при необходимости дополнительной очистки экстракта), подготовка пробы к анализу.

Отбор проб воды

Отбор проб производится в посуду из темного стекла. **Посуду нельзя ополаскивать пробой перед отбором!** Пробу анализируют только целиком. Объем отбираемых проб питьевых и природных вод составляет от 0,8 до 1,0 дм³. Объем проб сточной воды может варьироваться от 0,25 дм³ до 1,0 дм³ в зависимости от ожидаемого содержания бенз(а)пирена и по результатам предыдущих определений. Рекомендуемый объем отбираемой пробы 0,5 дм³. Пробы могут храниться в темноте в течение 24 ч при температуре в холодильнике.

Подготовка стеклянной посуды

Посуду для приготовления и хранения элюента моют только серной кислотой (без применения других моющих средств) и ополаскивают дистиллированной водой и ацетонитрилом.

Остальную стеклянную посуду моют горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и сушат при температуре 105⁰С.

Стеклянную посуду, использовавшуюся для анализа проб сточных вод с высоким содержанием бенз(а)пирена, не рекомендуется применять для анализа проб питьевых и чистых природных вод.

Покрытые смазкой краны и шлифы новых делительных воронок

тщательно отмывают техническим хлороформом, затем гексаном, обрабатывают концентрированной серной кислотой, ополаскивают водой и затем дают высохнуть на воздухе.

Приготовление реактивов и растворов

Подвижная фаза (далее - ПФ, элюент): смесь ацето-нитрил - вода в объемном соотношении 4:1

Тщательно вымытый цилиндр вместимостью 1000 см³ ополаскивают примерно 20 см³ ацетонитрила и помещают в него 200 см³ дистиллированной воды. Доводят объём смеси до 1000 см³ ацетонитрилом, раствор переливают в заранее подготовленную стеклянную плотно закрывающуюся емкость для постоянного хранения и тщательно в ней перемешивают. Недопустимо использование резиновых и корковых пробок.

Перед употреблением элюент выдерживают для дегазации не менее 4 часов. Срок хранения в условиях, исключающих испарение компонентов смеси, не ограничен.

Растворы бенз(а)пирена заданной концентрации

Растворы бенз(а)пирена должны храниться в холодильнике в темноте в герметичной посуде, исключающей возможность испарения растворителя и контакт раствора с материалами иными, чем стекло и фторопласт. Растворы каждой концентрации готовят по потребности.

- Раствор бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 1 мкг/см³.

0,5 см³ ГСО состава раствора бенз(а)пирена в ацетонитриле номинального значения массовой концентрации 100 мкг/см³ (действительное значение массовой концентрации указано в паспорте) помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³, разбавляют до метки ацетонитрилом и перемешивают. Срок хранения в указанных

условиях - 1 год.

Действительное значение массовой концентрации раствора (C_i , мкг/см³) вычисляют по формуле

$$C_i = \frac{C_{исх} * V_{исх}}{V_i} \quad (12.1)$$

где $C_{исх}$ - массовая концентрация стандартного образца или раствора бенз(а)пирена, использованного для приготовления раствора, мкг/см³;

$V_{исх}$ - объем исходного раствора бенз(а)пирена, использованного для приготовления раствора, см³;

V_i - объем приготовленного раствора, см³.

- Раствор бенз(а)пирена массовой концентрации 50 нг/см³ (номинальное значение)

2,5 см³ раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 1 мкг/см³ помещают в мерную колбу объемом 50 см³, доводят до метки ацетонитрилом и перемешивают. Срок хранения раствора – 6 месяцев.

Действительное значение массовой концентрации раствора (C_i , мкг/см³) вычисляют по формуле (12.1)

Градуировочные растворы бенз(а)пирена в подвижной фазе

- Раствор бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 50 нг/см³

2,5 см³ раствора бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 1 мкг/см³ помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³, разбавляют до метки подвижной фазой и перемешивают. Действительное значение массовой концентрации раствора вычисляют по формуле (12.1). Срок хранения - 6 месяцев.

- Раствор бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 10 нг/см^3

5 см^3 раствора бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 50 нг/см^3 помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3 , разбавляют до метки подвижной фазой и перемешивают. Действительное значение массовой концентрации раствора вычисляют по формуле (12.1).
Срок хранения - 3 месяца.

- Раствор бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 2 нг/см^3

1 см^3 раствора бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 50 нг/см^3 помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3 , разбавляют до метки подвижной фазой и перемешивают. Действительное значение массовой концентрации раствора вычисляют по формуле (12.1).
Срок хранения - 1 неделя.

Подготовка хроматографа к работе

Подготовку хроматографа к работе проводят в соответствии с Руководством по эксплуатации жидкостного хроматографа «Люма-хром» или руководством по сборке и подготовке к работе ВЭЖХ-комплекса, а также с Руководством по эксплуатации флуориметрического (спектрофлуориметрического) детектора.

Условия проведения хроматографического анализа:

Условия хроматографического разделения:

- хроматографическая колонка для ВЭЖХ, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, в условиях анализа имеющая эффективность не менее 4000 теоретических тарелок по пику бенз(а)пирена, например колонка производства группы компаний «Люмэкс» длиной 100 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная сорбентом Кромасил C18

зернением 5 мкм;

- предколонка внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом;
- подвижная фаза: смесь ацетонитрил – вода (4:1);
- объемная скорость подачи ПФ 200 мм³/мин;
- петлевой кран-дозатор (инжектор) с объемом петли от 10 до 20 мм³;
- флуориметрический (спектрофлуориметрический) детектор;
- при наличии термостата колонок устанавливается температура 25 ° С;
- минимально определяемое значение массовой концентрации бенз(а)пирена в растворе (соотношение сигнал/шум, равное трем), должна быть не более 1 нг/см³.

Приведенная конфигурация и параметры могут быть изменены в зависимости от используемого оборудования.

Рабочие параметры и режим работы флуориметрического/спектрофлуориметрического детектора

Флуориметрический детектор Люмахром ФЛД 2410«Флюорат-02-2М»

При выполнении всех измерений в канале возбуждения используют светофильтр «292», а в канале регистрации - светофильтр « X3». Рекомендуемые параметры и режимы работы (см. также Руководство по эксплуатации) приведены в таблице 14.2.

При использовании системы сбора и обработки данных на основе персонального компьютера необходимые настройки производят в соответствии с руководством пользователя программного обеспечения (например, ПО «МультиХром»).

Таблица 12.2

Режим	Хроматография	
Регистрация	Время, мин.	60
	Сглаживание	10
Параметры	Чувствительность	Средняя
	Коррекция опорн.	Нет
	Коррекция проп.	Есть

Краткий алгоритм проведения хроматографических измерений

При подготовке и проведении измерений необходимо:

- проверить правильность сборки гидравлической схемы хроматографа в соответствии с Руководством по эксплуатации хроматографа «Люмахром» или Руководством по сборке и подготовке к работе ВЭЖХ-комплекса на основе насоса высокого давления «Питон» и анализатора жидкости типа «Флюорат-02»;
- подготовить насос к работе в соответствии с его руководством по эксплуатации;
- установить объемную скорость подачи ПФ 200 мм³/мин;
- запустить насос и дождаться прекращения роста давления;
- настроить регистрирующее устройство на прием хроматографических данных;
- перевести детектор в режим «Измерение» и дождаться стабилизации базовой линии, перевести детектор в режим «Ожидание»;
- промыть шприц и петлю крана-дозатора ацетонитрилом или подвижной фазой;
- заполнить петлю крана-дозатора анализируемым раствором (избегая попадания в нее пузырьков воздуха), вводя не менее 50 мм³, при

этом кран-дозатор должен находиться в положении «ПЕТЛЯ» («LOAD») (перед вводом в кран-дозатор при наличии капли на конце иглы шприца ее следует удалить фильтровальной бумагой);

- ввести пробу, для чего, не вынимая шприц, переключить кран-дозатор в положение « КОЛОНКА» («INJECT»); одно-временно запустить детектор и регистрирующее устройство;
- по окончании анализа детектор перевести в режим «Ожидание», переключить кран-дозатор в положение «ПЕТЛЯ» («LOAD») и вынуть шприц, после чего промыть узел ввода пробы и петлю крана-дозатора ацетонитрилом или подвижной фазой.

Градуировка хроматографа

В качестве образцов для градуировки хроматографа используют растворы бенз(а)пирена в подвижной фазе.

Диапазон построения градуировочной характеристики составляет от 2 до 50 нг/см³.

Регистрируют не менее двух хроматограмм каждого раствора, проверяют правильность автоматической разметки и, если необходимо, корректируют ее, удаляют лишние пики.

Далее проводят процедуру градуировки согласно практическим указаниям по использованию ПО «МультиХром» и определяют параметры градуировочной характеристики. Градуировку признают приемлемой, если вычисляемые программой относительное среднее квадратическое отклонение (далее - СКО) не более 5%, а коэффициент корреляции не ниже 0,99. Если хотя бы одно из этих условий не выполняется, заново регистрируют хроматограммы растворов и определяют параметры градуировочной характеристики. При использовании программного обеспечения «ПикЭксперт» используют только коэффициент корреляции.

Выполнение измерений

Подготовка пробы к анализу

При анализе питьевых и природных вод в качестве экстрагента используют или гексан, или хлористый метилен; для анализа сточных вод настоятельно рекомендуется использовать только хлористый метилен.

На бутылки с пробой делают отметку уровня жидкости для последующего измерения объема пробы.

Пробу воды целиком переносят в делительную воронку вместимостью 1000 или 2000 см³ и приливают 20 см³ раствора хлористого натрия

Если пробу не консервировали, то ополаскивают емкость, в которой находилась проба, 20 - 25 см³ гексана, переносят его в делительную воронку с пробой и встряхивают смесь в течение 2 мин вручную или 5 мин на механическом встряхивателе.

Если проба была законсервирована, то ополаскивание проводят второй порцией экстрагента.

После разделения слоев нижний водный слой переносят в сосуд, в котором находилась проба, а верхний слой - в коническую колбу вместимостью 200 или 250 см³. Повторяют экстракцию дважды такими же порциями гексана без добавления раствора хлористого натрия.

Экстракты объединяют. Воронку с фильтром «красная лента» заполняют осушителем (безводным сернокислым натрием) на высоту 2,5 - 3 см, предварительно промытым 10 см³ гексана, который отбрасывают. Объединенный экстракт фильтруют в емкость для удаления растворителя. Осушитель промывают 10 см³ гексана, который присоединяют к фильтрату.

Экстракт упаривают досуха в вакууме, поместив сосуд на водяную баню при 40 - 50⁰С; в случае использования хлористого метилена – при 30 -

40⁰С. Сухой остаток растворяют в 1 см³ подвижной фазы, тщательно обмывая стенки сосуда, и оставляют на 15 мин для полного растворения бенз(а)пирена. Для проб питьевой воды или питьевой воды, расфасованной в емкости, рекомендуется сухой остаток растворять в 0,5 см³ подвижной фазы.

Проведение хроматографических измерений

Регистрируют хроматограммы концентратов пробы (каждого не менее двух раз) в тех же условиях, при которых была проведена градуировка хроматографа. Идентификацию бенз(а)пирена в пробе проводят средствами программного обеспечения по совпадению времени удерживания бенз(а)пирена в реальной пробе с его временем удерживания полученном при контроле стабильности градуировочной характеристики, установив ширину окна идентификации 5 %.

Определяют содержание бенз(а)пирена в концентрате по каждой зарегистрированной хроматограмме и проверяют приемлемость полученных значений, используя неравенство (12.2).

$$\left| C_{K,1} - C_{K,2} \right| \leq 0,05 * \overline{C_K} \quad (12.2)$$

Где $C_{K,1}$ и $C_{K,2}$ - массовая концентрация бенз(а)пирена в образце для контроля по первой и второй хроматограммам соответственно, нг/см³

$\overline{C_K}$ - среднее арифметическое значений $C_{K,1}$ и $C_{K,2}$, нг/см³

Если условие (12.2) выполняется, то в качестве значения массовой концентрации бенз(а)пирена в концентрате пробы принимают среднее арифметическое полученных значений. Если условие не выполняется, находят и устраняют причины нестабильности, после чего ввод концентрата пробы повторяют.

Если массовая концентрация бенз(а)пирена в концентрате пробы превышает 50 нг/см³, то концентрат необходимо разбавить. Коэффициент

разбавления (Q) вычисляют по формуле:

$$Q = \frac{V_p}{V_a} \quad (12.3)$$

Где:

V_p -объем разбавленного концентрата пробы, см³;

V_a -объем аликвотной порции исходного концентрата пробы,взятый для разбавления, см³.

Для подтверждения правильности идентификации в случае сложных проб рекомендуется выполнить добавку раствора бенз(а)пирена к концентрату пробы. О достоверности идентификации можно судить по увеличению высоты предполагаемого пика бенз(а)пирена (и, соответственно, его массовой концентрации). Величина добавки должна составлять 50 - 150 % от найденного содержания бенз(а)пирена в концентрате пробы, кроме того, необходимо учитывать разбавление концентрата при введении добавки и для его снижения использовать более концентрированные растворы.

Обработка результатов эксперимента

Массовую концентрацию бенз(а)пирена в пробе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C_K * V_K * Q * 1000}{\eta * V_{np}} \quad (12.4)$$

Где:

X -массовая концентрация бенз(а)пирена в пробе, нг/дм³;

C_K – измеренное значение массовой концентрации бенз(а)пирена в концентрате пробы, нг/см³;

V_k - объем концентрата пробы, см³; $V_{пр}$ - объем пробы воды, см³;

η -коэффициент прохождения бенз(а)пирена

Q -коэффициент разбавления концентрата пробы;

1000- коэффициент согласования размерности единиц объема.

Оформление результатов измерений

Результат измерений в документах, предусматривающих его использование, может быть представлен в виде: $X \pm U$, нг/дм³,

где X -единичный результат измерений, нг/дм³;

U -значение показателя точности измерений(расширенная неопределенность измерений с коэффициентом охвата 2 для единичного результата измерений), нг/дм³:

$$U=0,01 * U_{отн} * X \quad (12.5)$$

Значение $U_{отн}$ для каждого компонента приведено в таблице 12.3.

Таблица 12.3

Диапазон измерений и значения показателей точности измерений

Диапазон измерений, нг/дм ³	Относительная расширенная неопределенность измерений при коэффициенте охвата $k=2^*$, $U_{отн.}, \%$
Природные и питьевые воды	
От 0,5 до 10 вкл.	45
Свыше 10 до 50 вкл.	30

Свыше 50 до 500 вкл.	20
Сточные воды	
От 2 до 10 вкл.	55
Свыше 10 до 50 вкл.	38
Свыше 50 до 500 вкл.	25

* доверительная вероятность $P=0,95$

Диапазон измерений и значения показателей точности измерений

Допускается результат измерений в документах, выдаваемых лабораторией, представлять в виде $X \pm U_{\text{л}}$, нг/дм³, при условии $U_{\text{л}} < U$, где $U_{\text{л}}$ - значение показателя точности измерений (расширенной неопределенности с коэффициентом охвата 2), установленное при реализации методики в лаборатории и обеспечиваемое контролем стабильности результатов измерений.

Лабораторная работа № 7. Определение содержания анионов в почве методом капиллярного электрофореза

Одним из самых современных и перспективных методов на сегодняшний день является капиллярный электрофорез (КЭ), вобравший в себя все лучшие качества хроматографических методов и электрофореза. В этом методе разделение смеси заряженных или нейтральных молекул основано на различии в их электрофоретической подвижности и (или) распределении между раствором и движущимися в электрическом поле заряженными частицами (мицеллами, коллоидными частицами, металлокомплексами, молекулами полиэлектrolита).

При анализе методом капиллярного электрофореза пробу небольшого объема (несколько нанолитров) вводят на анодном конце в кварцевый капилляр, заполненный ведущим электролитом (например, фосфатные и боратные буферные растворы с концентрациями 10-100 мМ, растворы органических и неорганических солей, кислот и оснований). К тонкому кварцевому капилляру (внутренний диаметр 25-100 мкм) длиной 20-100 см прикладывают напряжение от 10 до 30 кВ.

Под действием электрического поля компоненты пробы начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей от их структуры, заряда и молекулярной массы, и соответственно, в разное время достигают детектора. Полученная последовательность пиков называется электрофореграммой, при этом качественной характеристикой вещества является параметр удерживания (время миграции), а количественной – высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества.

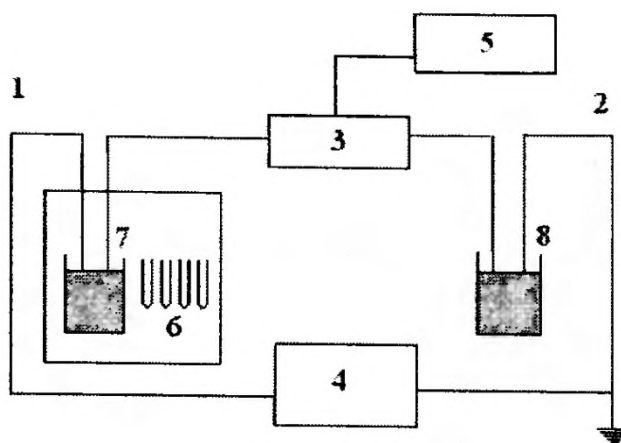


Рисунок 10.1. Схема установки капиллярного электрофореза: 1 – анодная зона, вход капилляра; 2 – катодная зона, выход капилляра; 3 – детектор; 4 – источник высокого напряжения; 5 – регистрирующее устройство; 6 – контейнеры для проб; 7, 8 – сосуды с буферным раствором.

На заряженную частицу в простейшем случае действуют две противоположно направленные силы – электростатического притяжения и сопротивления движению частицы. В равновесных условиях действие этих сил уравнивает друг друга, и скорость миграции частицы определяется выражением:

$$\mu = \frac{q \times E}{6 \times \pi \times \eta \times r} \quad (10.1)$$

где q – заряд иона, а E – напряженность электрического поля. η – вязкость среды, r – радиус частицы.

Электрофоретическая подвижность $\mu_{\text{эф}}$ определяется как скорость движения частицы, деленная на напряженность электрического поля:

$$\mu_{\text{эф}} = \frac{V_{\text{эф}}}{E} \quad (10.2)$$

где, $V_{\text{эф}}$ – скорость идеализированной сферической частицы.

При проведении разделения в капиллярах особенно важное значение приобретает электроосмотический поток (ЭОП), связанный с движением диффузной части двойного слоя, образующегося относительно заряженной

поверхности внутренней стенки капилляра. Результирующая подвижность частиц μ определяется суммой электрофоретической и электроосмотической подвижностей:

$$\mu = \mu_{\text{эф}} + \mu_{\text{эо}} \quad (10.3).$$

Это дает определенные преимущества при анализе смесей противоположно заряженных ионов, поскольку все определяемые компоненты будут двигаться в направлении детектора вследствие ЭОП. Однако скорость передвижения ионов с одинаковым направлением электрофоретической и электроосмотической подвижностей будет увеличиваться, а противоположным – уменьшаться. Для немодифицированного кварцевого капилляра в диффузной части двойного электрического слоя присутствует некоторая избыточная концентрация катионов, в результате движения которых возникает ЭОП, направленный к катоду. В результате катионы будут перемещаться быстрее и детектироваться до ЭОП, а анионы медленнее и детектироваться после ЭОП, нейтральные молекулы движутся с ЭОП.

Для повышения воспроизводимости КЭ в присутствии ЭОП, электроосмотический поток должен быть постоянным в течение всех проводимых определений, а сохранение постоянства ЭОП часто требует значительных усилий по подготовке до и после работы. В кварцевых капиллярах ЭОП уменьшается при увеличении концентрации электролита и добавлении органических растворителей и возрастает с увеличением pH, а также зависит от вязкости раствора в капилляре и температуры. Если же при добавлении катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) к разделительному буферу на поверхности капилляра адсорбируется положительный заряд, то ЭОП меняет направление и переносит разделительный буфер в направлении анода.

Метод определения анионов в почве основан на извлечении определяемых компонентов дистиллированной водой из проб, дальнейшем разделении и количественном определении методом капиллярного электрофореза с косвенным детектированием при длине волны 254 нм.

Цель работы:

Измерений массовых концентраций хлорид-ионов, нитрит-ионов, сульфат-ионов, нитрат-ионов, фторид-ионов и фосфат-ионов в почве методом капиллярного электрофореза.

Объекты и средства исследования.

1. Система капиллярного электрофореза «Капель» с отрицательной полярностью источника высокого напряжения (внутренний диаметр капилляра 75 мкм, полная длина капилляра 60 см, эффективная длина 50 см), оснащенная специализированным программным обеспечением на основе персонального компьютера.

2. Весы лабораторные специального класса точности с ценой наименьшего деления не более 0,1 мг, наибольшим пределом взвешивания не более 210 г

3. Колбы мерные 2-100-2, 2-50-2, 2-25-2

4. Пипетки градуированные 2-го класса

5. Микродозаторы с переменным объемом 10-100 мм³, 100 –1000 мм³, 1000-5000 мм³ и пределом допускаемой погрешности измерения не более 2 %

6. рН-метр лабораторный

7. Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 5000 оборотов в минуту

8. Пробирки одноразовые (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см³

9. Государственные стандартные образцы состава растворов анионов

10. Вода дистиллированная

11. Хрома (VI) оксид, ч.д.а
12. Цетилтриметиламмония гидроксид (гексадецилтриметиламмония гидроксид) (ЦТА-ОН)
13. Диэтаноламин
14. Гидроксид натрия, х.ч.
15. Соляная кислота, х.ч.

Программа работы.

Приготовление растворов.

Все растворы готовят на свежей дистиллированной воде, соответствующей ГОСТ 6709-72.

Раствор гидроксида натрия для промывки капилляра.

В стакан из термостойкого стекла помещают 2 г гидроксида натрия и растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Срок хранения в сосуде из полиэтилена - 6 месяцев. Молярная концентрация раствора приблизительно 0,5 моль/дм³.

Раствор соляной кислоты для промывки капилляра.

В стакан из термостойкого стекла помещают 100 см³ дистиллированной воды, затем приливают 8 см³ концентрированной соляной кислоты и перемешивают. Срок хранения не ограничен. Молярная концентрация приготовленного раствора приблизительно равна 1 моль/дм³.

Раствор оксида хрома (VI), молярная концентрация 0,05 моль/дм³.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают навеску 0,500 г оксида хрома (VI), растворяют в 50 - 60 см³ дистиллированной воды, затем доводят до метки дистиллированной водой. Срок хранения раствора в стеклянной емкости с притертой пробкой или плотно закрытом полиэтиленом сосуде не ограничен.

Раствор диэтанолamina(ДЭА), молярная концентрация 0,10 моль/дм³.

В мерную колбу вместимостью 25 см³ помещают 0,263 г диэтанолamina, предварительно замороженного до кристаллического состояния, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки дистиллированной водой. Срок хранения раствора в полиэтиленовой посуде в условиях, исключающих поглощение углекислого газа из воздуха – 1 месяц.

Раствор цетилтриметиламмония гидроксида (ЦТА-ОН), молярная концентрация 0,010 моль/дм³.

В мерную колбу вместимостью 25 см³, содержащую 4-5 см³ дистиллированной воды, помещают 0,75 см³ 10%-ного раствора ЦТА-ОН. По окончании растворения объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Срок хранения в пластиковой посуде в условиях, исключающих поглощение углекислого газа из воздуха при температуре 4 °С – 6 месяцев.

Хроматный буферный раствор (ведущий электролит).

В чистый сухой стакан вместимостью 50 см³ помещают 2,0 см³ раствора оксида хрома (VI), 3,0 см³ ДЭА, и 3,0 см³ дистиллированной воды. Тщательно перемешивают, а затем добавляют 2,0 см³ ЦТА-ОН. Сразу после смешения раствор фильтруют через мембранный фильтр, используя медицинский шприц, в пластиковую посуду с закрывающейся крышкой. Ведущий электролит содержит 10 ммоль/дм³ хромата, 30 ммоль/дм³ ДЭА и 2 ммоль/дм³ ЦТА-ОН. Раствор хранят при комнатной температуре и используют в течение 1 недели.

Подготовка капилляра к работе

Капилляр перед работой рекомендуется промыть по следующей схеме:

- 3 минуты дистиллированной водой;

- 5 минут раствором гидроксида натрия;
- 5 минут - дистиллированной водой;
- 10 минут – раствором ведущего электролита;

Все промывочные растворы собирают в сливную пробирку, не погружая в нее выходной конец капилляра.

В конце рабочего дня капилляр промывают дистиллированной водой 10 минут и оставляют на ночь в воде.

10.3.3. Градуировка системы капиллярного электрофореза.

Перед градуировкой необходимо проанализировать холостой раствор, в качестве которого служит дистиллированная вода, использованная для приготовления вспомогательных растворов и градуировочной смеси №1. Приготовление градуировочных смесей №№ 2-4 проводят только после проверки чистоты дистиллированной воды.

Приготовление градуировочной смеси № 1

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают по 1 см³ растворов ГСО состава раствора хлорид- и сульфат-ионов, по 2,5 см³ растворов ГСО состава нитрит-, нитрат-, фосфат-ионов и 0,5 см³ раствора ГСО состава раствора фторид-ионов, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Массовая концентрация хлорид- и сульфат-ионов в смеси составляет 200 мг/дм³, нитрат- и нитрит-ионов 50 мг/дм³, фосфат-ионов 25 мг/дм³ и фторид-ионов 10 мг/дм³. Срок хранения приготовленного раствора – 1 месяц.

Приготовление градуировочных смесей №№ 2 - 4

Состав смесей для градуировки системы приведен в таблице 10.1.

Таблица 10.1. Состав градуировочных смесей

Анионы	Массовая концентрация, мг/дм ³			
	1	2	3	4
Хлорид-ионы	200	100	20	2
Нитрит-ионы	50	25	5	0,5
Сульфат-ионы	200	100	20	2
Нитрат-ионы	50	25	5	0,5
Фторид-ионы	10	5	1	0,1
Фосфат-ионы	25	12,5	2,5	0,25

Для приготовления градуировочной смеси № 2 в чистый сухой сосуд с плотно завинчивающейся крышкой объемом не менее 10 см³ помещают 5 см³ градуировочной смеси № 1 и 5 см³ дистиллированной воды и перемешивают. Срок хранения раствора – 2 недели. Для приготовления градуировочной смеси № 3 в мерную колбу вместимостью 25 см³ помещают 2,5 см³ градуировочной смеси № 1, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Срок хранения раствора – 1 неделя. Для приготовления градуировочной смеси № 4 в мерную колбу вместимостью 25 см³ помещают 2,5 см³ градуировочной смеси № 3, доводят до метки дистиллированной водой. Срок хранения раствора – 1 день.

Построение градуировочной зависимости

Для проведения градуировки системы анализируют градуировочные смеси регистрируя подве электрофореграммы каждого раствора. Рекомендуемые условия анализа представлены в таблице 10.2. В таблице 10.3 представлена схема рекомендуемой установки пробирок в карусельный барабан автосемплера.

Таблица 10.2. Условия анализа градуировочных растворов

Определяемые компоненты	Хлорид-, нитрит-, сульфат-, нитрат-, фторид-, фосфат-ионы
Модификация системы «Капель»	104, 104Т
Длина волны, нм	254
Ввод пробы	30 мбар, 10 с
Напряжение, кВ	минус 17
Температура, °С	20 °С
Ориентировочное время анализа, мин	7

Таблица 10.3.

Пример установки пробирок с растворами в карусели автосемплера

Номер пробирки	Входная карусель	Выходная карусель
1	Анализируемый раствор	
2		
3		
4		
5		

6	Раствор соляной кислоты 1 моль/дм ³	
7	Вода дистиллированная	Вода дистиллированная
8	Раствор гидроксида натрия 0,5 моль/дм ³	Сливная пробирка
9	Ведущий электролит для промывки капилляра	Ведущий электролит для промывки капилляра
10	Ведущий электролит для анализа	Ведущий электролит для анализа

Диапазон построения градуировочной зависимости составляет для хлорид- и сульфат-ионов 0,5 - 200 мг/дм³, для нитрит- и нитрат-ионов 0,2 - 50 мг/дм³, для фосфат - ионов 0,25 – 25 мг/дм³ и для фторид-ионов 0,1 - 10 мг/дм³.

В таблице 10.4 представлена программа анализа для модификаций при использовании рекомендованных параметров и схемы установки пробирок в автосемплере.

Таблица 10.4. Пример программы анализа для модификаций «Капель-104/104Т»

Номер шага	Код операции	Условия	Содержание шага
1	4	№9	Установка на входе пробирки с рабочим буфером для промывки
2	7	№3	Установка на выходе пробирки для слива в опущенном состоянии

3	1	180 с	Промывка капилляра ведущим электролитом перед анализом
4	5	№10	Установка на выходе в рабочую позицию пробирки №10 с рабочим буферным раствором
5	4	№1	Установка на входе в рабочую позицию пробирки №1 с анализируемым раствором
6	2	30 мбар, 10 с	Ввод пробы
7	4	№10	Установка на входе в рабочую позицию пробирки №10 с рабочим буферным раствором
8	3	0 мбар, минус 17 кВ, 7 мин	Установка параметров и времени окончания анализа
9	4	№9	Установка на входе пробирки с рабочим буфером для промывки
10	7	№3	Установка на выходе пробирки для слива в опущенном состоянии
11	1	180 с	Промывка капилляра ведущим электролитом после анализа
12	5	№9	Установка пробирки с буферным раствором на выходном конце капилляра в поднятом положении

Непосредственно перед анализом все растворы дегазируют центрифугированием (скорость вращения 5000 об/мин, время 5 мин). Пример электрофореграммы градуировочного раствора приведен на рисунке 10.2.

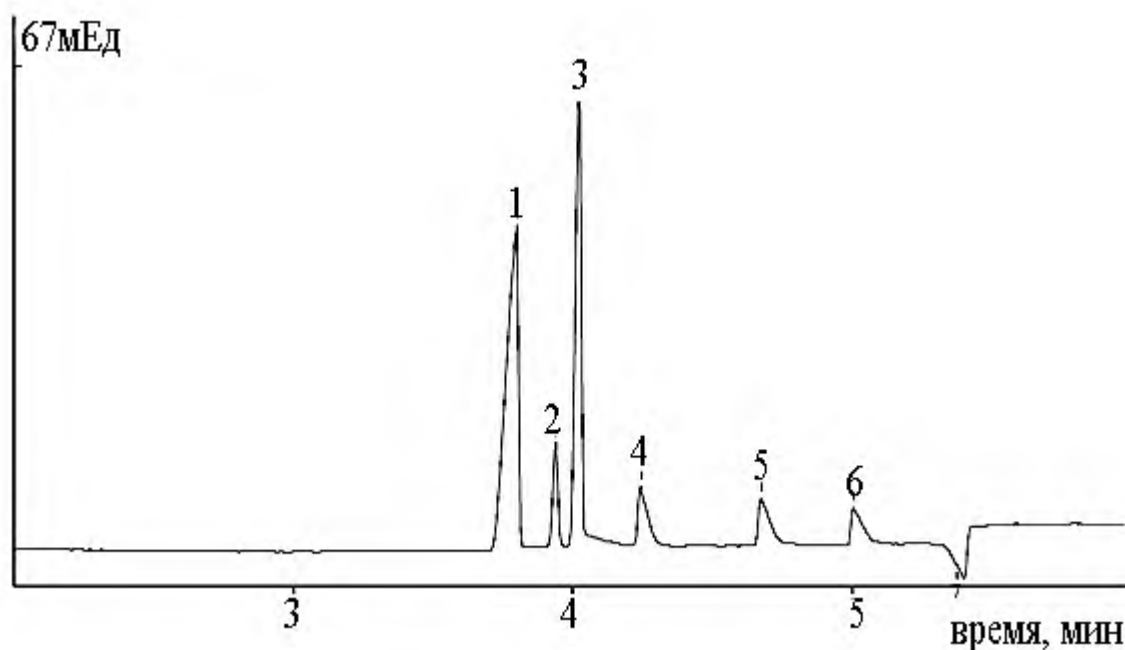


Рисунок 10.2. Пример электрофореграммы градуировочного раствора №2.1 – хлорид, 2 – нитрит, 3 – сульфат, 4 – нитрат, 5 – фторид, 6 – фосфат, 7 – гидрокарбонат.

На полученных электрофореграммах проверяют правильность автоматической разметки пиков и, если необходимо, корректируют ее, удаляют лишние пики. При использовании ПО «МультиХром» рекомендуется устанавливать следующие параметры сглаживания:

- выбросы – включено;
- медиана – 2;
- гауссиана – 3.

Необходимо применять одинаковые параметры сглаживания для данных, полученных при построении градуировочной характеристики и при анализе проб. Фильтрация шумов изменяет исходные данные, поэтому не рекомендуется использовать без необходимости большие значения медианы и гауссианы.

Далее обрабатывают электрофореграммы согласно процедуре градуировки в соответствии с Руководством пользователя программного обеспечения «МультиХром» или другого программного обеспечения, используемого для сбора и обработки данных.

Проверяют приемлемость полученной градуировочной характеристики. Градуировочная характеристика признается приемлемой при выполнении следующих условий:

- коэффициент корреляции, рассчитанный программой, превышает 0,99;
- при использовании ПО «МультиХром» значение относительного СКО не превышает 5%.

В противном случае находят и устраняют причины неудовлетворительных результатов, после чего градуировку системы повторяют.

Выполнение измерений

Работу с пробами необходимо начинать после проведения градуировки системы или после проверки стабильности градуировочной характеристики.

Подготовка образцов почвы

Первичную подготовку образцов проводят в соответствии с действующей нормативно-технической документацией на конкретный вид продукции или по ГОСТ 27753.2–88, ГОСТ 17.4.4.02–84. При необходимости пересчитывают массу воздушно-сухой пробы на массу абсолютно-сухой пробы, определив массовую долю гигроскопической влаги в образце.

Анализируют две навески пробы в условиях повторяемости (один оператор, один набор мерной посуды, одно средство измерений, короткий промежуток времени и т.п.). В плоскодонные конические колбы вместимостью 100 см³ помещают по (5,0±0,1) г воздушно-сухих проб, приливают по 25 см³ дистиллированной воды. Перемешивают, закрывают

пробками и встряхивают в течение 30 минут на перемешивающем устройстве. Сразу после окончания встряхивания приблизительно 7-10 см³ полученной водной вытяжки переносят в пластиковые центрифужные пробирки и центрифугируют при 5000 об/мин в течение 5 минут. Затем водную вытяжку фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,2 мкм), отбрасывая первые 0,5 см³ фильтрата. Полученные водные вытяжки необходимо проанализировать в день приготовления. Не допускается хранение водной вытяжки над осадком.

Измерение массовой концентрации анионов

В сухую одноразовую пробирку типа Эппендорф с помощью пипеточного дозатора помещают 0,5 – 1,0 см³ подготовленной пробы, центрифугируют в течение 5 минут при 5000 об/мин и анализируют в условиях, указанных в таблице 10.2. Регистрируют не менее двух электрофореграмм подготовленной пробы. По окончании анализа проверяют правильность автоматической разметки пиков, удаляют лишние пики. Используя программное обеспечение, проводят идентификацию компонентов в пробе по совпадению времен миграции компонентов в пробе и контрольной смеси при ширине окна идентификации 5 %.

Если анализируемые компоненты обнаружены, то определяют их массовую концентрацию с использованием градуировочной зависимости. Если измеренные значения массовой концентрации одного или нескольких компонентов превышают верхний предел диапазона линейности градуировочной характеристики, то необходимо дополнительно разбавить анализируемый раствор дистиллированной водой так, чтобы массовая концентрация компонента в разбавленной пробе находилась в середине этого диапазона, и повторить анализ. Коэффициент разбавления Q в этом случае вычисляют по формуле:

$$Q = V_k/V_a, \quad (10.4)$$

где V_k - объем колбы, см^3 ; V_a - объем аликвоты пробы, см^3 .

Оформление работы

С помощью программного обеспечения формируют отчет с указанием массовой концентрации определяемых компонентов, выраженной в мг/дм^3 . Массовую долю водорастворимых форм хлорид-, сульфат-, оксалат-, нитрат-, фторид-, формиат-, фосфат-, ацетат- ионов в пробе (млн-1) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C_i \cdot V \cdot Q}{m}, \quad (6)$$

где X – массовая доля компонента в пробе, млн^{-1} ;

C_i – измеренная массовая концентрация компонента, мг/дм^3 ;

V – объем дистиллированной воды, взятый для получения водной вытяжки, см^3 ,

m – масса воздушно - сухой пробы, г,

Q – коэффициент разбавления пробы дистиллированной водой по 9.2; если пробу не разбавляли, то $Q = 1$.

За результат измерений массовой доли водорастворимых форм соответствующего иона принимают среднее арифметическое значение результатов $n = 2$ параллельных определений, для которых выполняется условие:

$$X_{\max} - X_{\min} \leq 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (7)$$

где X_{\max} - больший результат параллельного определения, млн^{-1} ;

X_{\min} - меньший результат параллельного определения, млн^{-1} ;

\bar{X} - среднее арифметическое результатов параллельных определений, млн^{-1} ;

r - значение предела повторяемости (табл.4), %.

Результат измерения должен быть представлен в виде: $X \pm \Delta$, мг/дм^3 , $P = 0,95$, где X - результат измерений, мг/дм^3 , Δ - показатель точности методики, мг/дм^3 :

$$\Delta = 0,01 \times U_{\text{отн}} \times X \quad (10.6)$$

Значение $U_{\text{отн}}$ для каждого компонента приведено в таблице 10.5.

Таблица 10.5. Диапазон измерений и значения показателя точности методики

Наименование аниона	Диапазон измерений*, млн ⁻¹	Расширенная относительная неопределенность измерений при коэффициенте охвата $k=2^{**}$, $U_{\text{отн}}$, %
Хлорид-ионы	от 3 до 10 вкл.	24
	св. 10 до 20000 вкл.	15
Сульфат-ионы	от 3 до 10 вкл.	24
	св. 10 до 20000 вкл.	15
Оксалат-ионы	от 3 до 100 вкл.	15
Нитрат-ионы	от 3 до 10000 вкл.	15
Фторид-ионы	от 1 до 100 вкл.	15
Формиат-ионы	от 1 до 500 вкл.	15
Фосфат-ионы	от 3 до 5000 вкл.	15
Ацетат-ионы	от 3 до 1000 вкл.	15
<p>* 1 млн⁻¹ соответствует 1 мг/кг</p> <p>** Соответствуют характеристике погрешности измерений (доверительным границам относительной погрешности измерений для доверительной вероятности $P = 0,95$)</p>		

Лабораторная работа № 8. Определение массовой концентрации анионных ПАВ спектрофотометрическим методом

Метод основан на образовании в щелочной среде ассоциатов анионных поверхностно-активных веществ с метиленовым синим и экстракции этих ассоциатов хлороформом с последующей обработкой полученного экстракта кислотой для устранения мешающих факторов и определения концентрации АПАВ по оптической плотности полученного экстракта спектрофотометрией.

Цель работы. Определение массовой концентрации анионных ПАВ в образцах сточных вод спектрофотометрическим методом.

Материалы и средства исследования

Подготовку к работе спектрофотометра проводят в соответствии с рабочей инструкцией по эксплуатации прибора.

Приготовление растворов и реактивов

Приготовление нейтрального раствора метиленового синего

Для приготовления нейтрального раствора метиленового синего помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ 0,35 г метиленового синего, добавляют 500 см³ дистиллированной воды и оставляют на 24 ч до полного растворения навески. Содержимое колбы перемешивают и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор пригоден для использования в течение 6 мес при хранении в нормальных климатических условиях.

Приготовление кислого раствора метиленового синего

Для приготовления кислого раствора метиленового синего помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ 0,35 г метиленового синего, растворяют его в небольшом количестве дистиллированной воды, добавляют к раствору 6,5 см³ серной кислоты и доводят объем раствора до метки

дистиллированной водой. Раствор готовят за 24 ч до использования. Раствор пригоден для использования в течение 6 мес при хранении в нормальных климатических условиях.

Приготовление фосфатного буферного раствора

16,33 г калия фосфорнокислого помещают в стакан вместимостью 2 дм³ и растворяют его в 1,2 дм³ дистиллированной воды, отмеривая воду цилиндром. Затем помещают в стакан вместимостью 1 дм³ 5,04 г гидроокиси натрия и растворяют ее в 630 см³ дистиллированной воды, отмеривая воду цилиндром. Оба раствора смешивают в стакане вместимостью 2 дм³, доливая водный раствор гидроокиси натрия в раствор фосфорнокислого калия и выдерживают в течение суток. Измеряют рН-метром значение рН полученного буферного раствора. рН раствора должно быть равно 10 ед. При необходимости доводят значение рН до 10, прибавляя небольшими порциями раствор фосфорнокислого калия (если рН больше 10) или раствор гидроокиси натрия (если рН меньше 10).

Приготовление растворов АПАВ

Раствор массовой концентрации АПАВ 100 мг/дм³ готовят из государственного стандартного образца состава АПАВ путем растворения содержимого ампулы (0,1 г) в 1000 см³ дистиллированной воды. Раствор пригоден для использования в течение 1 мес при хранении в нормальных климатических условиях.

Градуировочный раствор массовой концентрации АПАВ 1,0 мг/дм³ готовят разбавлением 10 см³ раствора АПАВ концентрации 100 мг/дм³ в мерной колбе вместимостью 1000 см³, доводя объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор используют в день приготовления.

Приготовление градуировочных растворов АПАВ

Для приготовления градуировочных растворов АПАВ в 6 мерных колб вместимостью 100 см³ помещают, отмеривая пипетками соответствующей вместимости, 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0 см³ раствора АПАВ массовой концентрации 1 мг/дм³ по 5.4.5 и доводят объемы растворов в каждой колбе до метки дистиллированной водой. Одну колбу наполняют до метки дистиллированной водой; раствор АПАВ не помещают (холостая проба). Массовая концентрация додецилсульфата натрия в приготовленных градуировочных растворах $C_{ГР}$ (мг/дм³) составляет соответственно 0; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 и 0,25 мг/дм³. Градуировочные растворы используют в день приготовления.

Ход работы

Обработка проб воды, градуировочных растворов и холостой пробы

Каждую пробу, включая градуировочные растворы и холостую пробу (100 см³ дистиллированной воды) обрабатывают следующим образом. 100 см³ каждого испытуемого раствора помещают в делительную воронку вместимостью 250 см³, пипеткой добавляют 10 см³ фосфатного буферного раствора по и 5 см³ нейтрального раствора метиленового синего по Содержимое воронки перемешивают и добавляют 10 см³ хлороформа. Смесь энергично встряхивают в течение 2 мин и после расслоения фаз нижний слой сливают в другую делительную воронку, содержащую 100 см³ дистиллированной воды и 5 см³ кислого раствора метиленового синего по Содержимое второй воронки встряхивают в течение 1 мин и оставляют для расслоения фаз, затем нижний слой сливают в мерную колбу вместимостью 25 см³ через воронку с ватой, смоченной хлороформом.

В первую делительную воронку вновь наливают 10 см³ хлороформа и повторяют операции экстрагирования. Нижний слой сливают в одну и ту же мерную колбу.

В первую делительную воронку добавляют 5 см³ хлороформа и повторяют операции экстрагирования по 3.1.1. Объединенные в мерной колбе 3 порции экстракта доводят до метки хлороформом и измеряют не менее двух раз оптическую плотность экстракта D ($D_{ГР}$, $D_{ИЗМ}$) относительно холостой пробы на спектрофотометре или фотоколориметре при длине волны 650 нм в кюветах толщиной слоя 30 - 50 мм.

Значение оптической плотности экстракта холостой пробы D_0 относительно хлороформа при использовании кюветы толщиной слоя 30 мм не должно превышать 0,06.

Вычисляют среднее арифметическое результатов двух параллельных определений D .

Строят градуировочный график, выражающий зависимость оптической плотности от массовой концентрации АПАВ $C_{ГР}$ (мг/дм³). Градуировочный коэффициент вычисляют по формуле

где $C_{ГР}$ - массовая концентрация АПАВ в градуировочном растворе по 5.4.6;

$D_{ГР}$ - оптическая плотность экстракта градуировочного раствора по 5.5.1.3.

Вычисляют среднее арифметическое результатов f_2 .

Градуировку повторяют при замене реактивов и после ремонта прибора, но не реже 1 раза в 3 мес. При каждом испытании выполняют анализ одного градуировочного раствора с целью проверки стабильности градуировочного коэффициента f_2 . Отклонение значения f_2 от полученного при градуировке по 3.1.1 не должно превышать 15 %.

Если градуировочный коэффициент нестабилен, повторяют проверку с использованием других градуировочных растворов, предусмотренных методикой.

Вычисление и оформление результатов измерений

Массовую концентрацию АПАВ в пробе воды C_2 , мг/дм³, вычисляют по формуле

$$C_2 = f_2 \cdot D_{\text{изм}}$$

где f_2 - градуировочный коэффициент, вычисленный по 5.5.3;

$D_{\text{изм}}$ - оптическая плотность экстракта исследуемой пробы воды по 5.5.1.3.

Допустимая погрешность определения

Погрешность результатов определения при вероятности $P = 0,95$ приведена в таблице 1.

Диапазон измеряемой массовой концентрации АПАВ, мг/дм ³	Границы погрешности (Д), мг/дм ³
От 0,015 до 0,1 включ.	$\pm (0,003 + 0,18 c_2)$
Св. 0,1 » 0,25 »	$\pm (0,01 + 0,11 c_2)$

Нормативы контроля точности при вероятности $P = 0,95$ и числе измерений $n = 2$ приведены в таблице 2.

Лабораторная работа №9. Измерение массовой концентрации анионных поверхностно-активных веществ в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости "Флюорат-02"

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) - вещества, способные накапливаться на поверхности соприкосновения двух фаз, понижая их поверхностное натяжение. Это органические соединения, молекулы которых состоят из двух частей: полярной (гидрофильной) и неполярной (гидрофобной).

В зависимости от типа диссоциации различают анионные, катионные, неионогенные и амфолитные ПАВ.

Анионные ПАВ (АПАВ): производные карбоновых и ациламинокарбоновых кислот (карбоксилаты), например, смачиватели СВ-133, СВ-1226, пластификатор ПЛ-1299 и др.; соли алкилсерных кислот (алкилсульфаты), например, алкилсульфат натрия и аммония, додецилсульфат натрия и др.; соли алкан- и алкилароматических сульфокислот (сульфонаты), например, волгонат, сульфонат натрия, сульфонолы НП-1, НП-3 и др.; соли алкилфосфорных кислот и алканфосфорных кислот, например, оксифосы КД-6 и Б, эстефаты К-3 и 383 и др.

Физические свойства: натриевые соли алкилсерных кислот, алкан- и алкилароматических сульфокислот представляют собой порошки или жидкости от желтого до светло-коричневого цвета, без запаха или со слабым запахом керосина, хорошо растворимые в воде.

Токсическое действие АПАВ определяется главным образом неполярной частью молекулы, при этом оно более выражено при наличии в последней ароматического кольца. В первую очередь оно зависит от способности ПАВ нарушать проницаемость биологических мембран.

Особенно легко повреждаются мембраны эритроцитов, миелиновых оболочек нервов и эпителия кишечника. В связи с этим ПАВ обладают политропным действием, вызывают сдвиги в ЦНС, системе крови, желудочно-кишечном тракте, выделительной системе - поражают печень и почки.

Способность ПАВ нарушать проницаемость кишечных мембран способствует усилению всасывания пищи, но также и некоторых токсических веществ, например ДДТ, ФОС. Те же свойства ПАВ могут способствовать выведению токсических веществ из организма.

Существуют данные о возможности канцерогенного действия некоторых ПАВ, например 40%-ного сульфанола.

Многие ПАВ оказывают аллергенное действие при любом пути поступления в организм: через кожу, верхние дыхательные пути или желудочно-кишечный тракт. На кожу оказывают местное раздражающее действие, обезжиривая ее. ПАВ всех классов хорошо проникают через кожу, вызывая в равной степени токсический и аллергенный эффект.

Натриевые соли алкилбензолсульфоновых, алкилсерных и сульфокарбоновых кислот относятся к 4-му классу опасности, натрий п-алкилбензолсульфонат (фракции C_{11} - C_{14}) имеет 3-й класс опасности.

Предельно допустимые концентрации в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования для большинства АПАВ 0,5 мг/куб. дм (Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. ГН 2.1.5.689-98). Предельно допустимые концентрации АПАВ в питьевой воде 0,5 мг/куб. дм (Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. СанПиН 2.1.4.1074-01).

При санитарно-химическом контроле за содержанием АПАВ, если

в водоем поступает одно известное вещество, то расчет ведут на него и учитывают величину соответствующего норматива.

Если в водоем сбрасывается несколько АПАВ или состав их неизвестен, расчет ведут по додецилсульфату натрия - веществу, имеющему наименьший норматив 0,1 мг/куб. дм.

Метод основан на экстракции хлороформом ионных пар анионных поверхностно-активных веществ с красителем акридиновым желтым и измерении интенсивности флуоресценции полученного экстракта.

Цель работы: определить концентрацию АПАВ в пробах бытовых сточных вод.

Объекты и средства исследования

Раствор гидроксида натрия, массовая доля 5%. В 95 см³ дистиллированной воды растворяют 5 г гидроксида натрия. Срок хранения раствора в сосуде из полиэтилена - 2 месяца.

Раствор соляной кислоты, молярная концентрация 0,1 моль/дм³. В плоскодонную колбу помещают 500 - 600 см³ дистиллированной воды и приливают при перемешивании 8,4 см³ концентрированной соляной кислоты. После этого дистиллированной водой доводят содержимое колбы до 1000 см³. Срок хранения раствора не ограничен.

Раствор красителя, массовая концентрация 100 мг/дм³. В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 10,0 мг акридинового желтого, добавляют 50 - 60 см³ теплой (40...50 °С) дистиллированной воды и оставляют на несколько часов в темном месте до полного растворения красителя, периодически перемешивая. Затем доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор пригоден для использования в течение 1 месяца при хранении в стеклянной посуде в темном месте.

Раствор АПАВ, массовая концентрация 100 мг/дм³. Раствор

массовой концентрации АПАВ 100 мг/дм³ готовят из государственного стандартного образца состава АПАВ путем растворения содержимого ампулы (0,1 г) в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1000 куб. см. Раствор пригоден для использования в течение 1 месяца при хранении в лабораторных условиях.

Примечание. При отсутствии ГСО состава АПАВ допускается приготовление исходного раствора с концентрацией 100 мг/дм³ нижеприведённым способом. В мерную колбу вместимостью 500 см³ помещают точную навеску 50,0 мг додецилсульфата натрия, растворяют в дистиллированной воде и доводят раствор до метки дистиллированной водой.

Раствор АПАВ, массовая концентрация 10,0 мг/дм³

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 5 см³ раствора АПАВ с концентрацией 100 мг/дм³ и доводят до метки дистиллированной водой. Раствор устойчив в течение 1 недели.

Раствор АПАВ, массовая концентрация 1,0 мг/дм³

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 5 см³ раствора АПАВ с концентрацией 10,0 мг/дм³ и доводят до метки дистиллированной водой. Раствор используют свежеприготовленным.

Ход работы

При подготовке к выполнению измерений должны быть проведены следующие работы: отбор и при необходимости подготовка пробы, а также приготовление градуировочных растворов и градуировка анализатора "Флюорат-02".

Приготовление растворов для градуировки анализатора жидкости

"Флюорат-02"

При градуировке прибора и всех измерениях в канале возбуждения используют светофильтр N15, а в канале регистрации - светофильтр N 14.

Приготовление экстракта фонового раствора

Для приготовления экстракта фонового раствора в подготовленную делительную воронку помещают 9 см³ дистиллированной воды, приливают 1 см³ раствора красителя, 1 см³ раствора соляной кислоты, 5 см³ хлороформа и проводят экстракцию, интенсивно встряхивая воронку в течение 1 мин. После разделения фаз 0,5 - 1 см³ органического (нижнего) слоя используют для промывки крана и носика делительной воронки, а следующие 2,5 - 3 см³ помещают в кювету.

Измерение фонового раствора

При использовании анализатора модификаций "Флюорат-02-2М" и "Флюорат- 02-3М" входят в меню "Выбор метода" и выбирают метод "Люминесценция", затем входят в меню "Градуировка", устанавливают значения параметров "C0" - "C6" и "J0" - "J6" равными нулю. Затем перемещают курсор на ячейку со значением параметра J0, в кюветное отделение помещают кювету с экстрактом и нажимают клавишу "Ent". При этом измеряется интенсивность флуоресценции фонового раствора и автоматически заносится в память прибора.

Приготовление экстракта градуировочного раствора

В делительную воронку вместимостью 50 см³ помещают 5 см³ раствора додецилсульфата натрия с концентрацией 1,0 мг/дм³, 4 см³ дистиллированной воды, приливают 1 см³ раствора красителя, 1 см³ раствора соляной кислоты, 5 см³ хлороформа и проводят экстракцию, интенсивно встряхивая воронку в течение 1 мин. После разделения фаз 0,5 - 1 см³ нижнего слоя используют для промывки крана и носика делительной воронки, а 2,5 - 3 см³ помещают в кювету.

Измерение градуировочного раствора

При использовании анализатора модификаций "Флюорат-02-2М" и "Флюорат-02-3М" устанавливают значение параметра "C1" = 1,000, нажатием клавиши "Ent" вводят его в память прибора, переводят курсор на ячейку со значением параметра "J1", кювету с экстрактом помещают в кюветное отделение и нажимают клавишу "Ent". При этом измеряется интенсивность флуоресценции градуировочного раствора и автоматически заносится в память прибора.

Ход работы

Пробу воды объемом 5 см^3 помещают в делительную воронку вместимостью 50 см^3 , добавляют 4 см^3 дистиллированной воды и контролируют рН при помощи универсального индикатора.

Если рН водной фазы выходит за пределы диапазона 3 - 8, то, добавляя раствор гидроксида натрия или соляной кислоты, добиваются указанного значения рН. Затем в делительную воронку с пробой добавляют 1 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации $0,1\text{ моль/дм}^3$, 1 см^3 раствора красителя, 5 см^3 хлороформа и проводят экстракцию в течение 1 мин. путем интенсивного встряхивания делительной воронки.

После разделения фаз $0,5 - 1\text{ см}^3$ нижнего слоя используют для промывки крана и носика делительной воронки, а $2,5 - 3\text{ см}^3$ помещают в кювету и измеряют концентрацию АПАВ в режиме "Измерение".

Допускается увеличение объема пробы до 20 см^3 при анализе проб с ожидаемой концентрацией АПАВ менее $0,1\text{ мг/дм}^3$. В этом случае пробу помещают в делительную воронку вместимостью 50 см^3 , устанавливают значение рН 3 - 8, добавляют 2 см^3 раствора соляной кислоты, после чего проводят анализ, как описано выше, начиная с добавления 1 см^3 раствора красителя.

Если измеренная концентрация АПАВ превышает 2 мг/дм³, то пробу воды необходимо разбавить дистиллированной водой таким образом, чтобы измеренная концентрация АПАВ в экстракте после разбавления составляла от 0,1 до 2,0 мг/дм³. При разбавлении используются только пипетки и мерные колбы. В том случае, если проба содержит видимый осадок или взвесь, перед отбором аликвотной порции ее перемешивают не менее 3 мин. Разбавленную пробу обрабатывают в точном соответствии с настоящим разделом.

Примечания. 1. Попадание капель водного слоя в кювету с экстрактом недопустимо!

2. Фильтровать экстракты через бумажные фильтры или слой осушителя не рекомендуется.

Обработка результатов измерений

Массовую концентрацию АПАВ в пробе (X, мг/дм³) вычисляют по формуле:

$$X = C \cdot Q_1 \cdot Q_2$$

где C - массовая концентрация АПАВ, измеренная анализатором, мг/дм³;

Q₁ - коэффициент разбавления пробы, равный соотношению объёмов мерной колбы и пипетки, использованных при разбавлении. если пробу не разбавляют, то Q₁=1.

Q₂ - коэффициент концентрирования пробы при экстракции. если объём пробы 5 см³, то Q₂=1, при объёме пробы 20 см³ Q₂=0,25.

За результат измерения массовой концентрации АПАВ в пробе принимают единичный результат или среднее арифметическое значение результатов n=2 параллельных определений, для которых выполняется условие:

$$X_{\max} - X_{\min} \leq 0,01 \cdot \overline{X} \cdot r,$$

где X_{\max} - больший результат параллельного определения, мг/дм³;

X_{\min} - минимальный результат параллельного определения, мг/дм³;

\overline{X} - среднее арифметическое результатов параллельных определений, мг/дм³;

r - значение предела повторяемости (табл. 3), %.

Таблица 1. Значение пределов повторяемости для доверительной вероятности $P=0,95$

Диапазон измерений	Предел повторяемости (относительное значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r , %
Питьевые воды	
От 0,025 до 0,1 вкл	36
Свыше 0,1 до 1,0 вкл	25
Свыше 1,0 до 2,0 вкл	20
Природные и сточные воды	
От 0,025 до 0,1 вкл	39
Свыше 0,1 до 1,0 вкл	31
Свыше 1,0 до 2,0 вкл	20

Оформление работы

Результат измерений может быть представлен в виде:

1. $\overline{X} \pm \Delta \overline{x}, \text{мг} / \text{дм}^3, P = 0,95,$

где \bar{X} - среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений;

$\Delta\bar{x}$ - показатель точности методики (границы абсолютной погрешности при вероятности $P=0,95$ для $n=2$ параллельных измерений):

$$\Delta\bar{x} = \frac{\delta_x \cdot \bar{X}}{100},$$

Значение δ_x приведено в табл. 2.

2. $X \pm \Delta x, \text{мг/дм}^3, P = 0,95,$

где X - единичный результат измерений;

Δx - показатель точности методики (границы абсолютной погрешности при вероятности $P=0,95$ для $n=1$):

$$\Delta x = \frac{\delta_x \cdot X}{100},$$

Значение δ_x приведено в табл. 2.

Таблица 2. Диапазон измерений, значения показателей повторяемости, воспроизводимости и точности

Диапазон измерений, мг/дм ³	$\sigma_r, \%$	$\sigma_R, \%$	$\pm \delta, \%$	$\pm \delta_x, \%$
Питьевые воды				
От 0,025 до 0,1 вкл	13	18	36	32
Свыше 0,1 до 1,0 вкл	9	13	26	22
Свыше 1,0 до 2,0 вкл	7	10	20	18
Природные и сточные воды				
От 0,025 до 0,1 вкл	14	20	40	34
Свыше 0,1 до 1,0 вкл	11	15	30	26
Свыше 1,0 до 2,0 вкл	7	10	20	18

Примечание. $\sigma_r, \%$ - показатель повторяемости (относительное значение среднего квадратического отклонения повторяемости), $\sigma_R, \%$

- показатель воспроизводимости (относительное значение среднего квадратического отклонения воспроизводимости), $\pm \delta, \%$ - показатель точности (границы относительной погрешности при вероятности $P=0,95$ для $n=1$ результате параллельных определений), $\pm \delta_x, \%$ - показатель точности (границы относительной погрешности при вероятности $P=0,95$ для $n=2$ параллельных измерений).

Лабораторная работа №10. Определение массовой концентрации общего железа флуориметрическим методом

Нормативный документ ПНДФ 14.1:2:4.29-95 устанавливает методику выполнения измерений массовой концентрации железа общего (далее железа) в пробах питьевых, природных и сточных вод флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02».

Диапазон измеряемых значений массовой концентрации железа без разбавления пробы 0,05 -5,0 мг/дм³. При более высоком содержании железа допускается разбавление проб дистиллированной водой, но более чем в 100 раз.

Допустимо присутствие до 1 г/дм³ аммиака, щелочных, щелочноземельных элементов, сульфатов, хлоридов, алюминия, до 200 мг/дм³ хрома (III), фосфатов, до 100 мг/дм³ меди, до 50 мг/дм³ фторидов.

Цель работы. Определение массовой концентрации железа общего (далее железа) в образцах питьевых, природных или сточных вод флуориметрическим методом

Объекты и средства исследования

1. Приготовление растворов

1.1.Получение бидистиллированной воды

Бидистиллированную воду получают путем повторной дистилляции воды, соответствующей ГОСТ 6709 - 72, в бидистилляторе или лабораторной установке для перегонки воды, выполненной из кварца или стекла. Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

1.2.Раствор соляной кислоты, молярная концентрация 0,1 моль/дм³

В стакан вместимостью 1000 см³ помещают 500-600 см³ бидистиллированной воды и при помешивании добавляют 8,5 см³

концентрированной соляной кислоты, а затем разбавляют до 1000 см³ бидистиллированной водой. Срок хранения не ограничен.

1.3. Раствор соляной кислоты, молярная концентрация 0,01 моль/дм³

100 см³ раствора соляной кислоты по п 1.2 разбавляют бидистиллированной водой до 1000 см³. Раствор хранят в сосуде из полиэтилена или фторопласта. Срок хранения не ограничен.

1.4. Раствор о-фенилендиамина, молярная концентрация 0,001 моль/дм³

Навеску 21,6 мг о-фенилендиамина основания (или 36,2 мг дигидрохлорида) помещают в мерную колбу вместимостью 200 см³, растворяют в разбавленной соляной кислоте по п.1.3 и доводят до метки этим же раствором.

Срок хранения раствора - не более трех дней в холодильнике. Признаком его непригодности является появление окраски.

1.5. Раствор виннокислого калия-натрия, массовая доля 15%

15 г виннокислого калия-натрия растворяют в 85 см³ бидистиллированной воды и при необходимости фильтруют. Срок хранения раствора 1 месяц. Признаком его непригодности является появление осадка или мути.

1.6. Раствор гидроксида натрия, массовая доля 5%

5 г гидроксида натрия растворяют в 95 см³ бидистиллированной воды. Срок хранения раствора в посуде из полиэтилена - не более 2 месяцев.

1.7. Раствор роданистого калия, массовая доля 5%

5 г роданистого калия растворяют в 95 см³ бидистиллированной воды. Срок хранения - 1 месяц.

1.8. Раствор железа, массовая концентрация 50 мг/дм³

Раствор готовят разбавлением 5 см³ ГСО состава раствора железа массовой концентрации 1 г/дм³ в мерной колбе вместимостью 100 см³ раствором соляной кислоты по п.1.3. Срок хранения раствора - 3 месяца.

1.9. Раствор железа, массовая концентрация 0,5 мг/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 1 см³ исходного раствора по п.1.8 и разбавляют до метки раствором соляной кислоты по п.1.3. Срок хранения раствора - 2 недели.

2. Метод измерений

Метод измерений основан на образовании продукта взаимодействия железа (III) и о-фенилендиамина, его экстрагирования высшими спиртами (гексанол, гептанол, октанол или изоамиловый спирт) и измерении интенсивности флуоресценции экстракта на анализаторе жидкости «Флюорат-02».

3. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: отбор и консервирование пробы, приготовление градуировочных растворов и градуировка анализатора жидкости «Флюорат-02».

3.1. Отбор и консервирование проб воды

Общие требования к отбору проб по ГОСТ Р 51592-2000, отбор проб питьевых вод производится по ГОСТ Р 51593-2000, поверхностных вод - по ГОСТ 17.1.5.05-85, проб сточных вод – согласно ПНД Ф 12.15.1-08.

Объем отбираемой пробы должен быть не менее 100 см³. Для хранения и транспортировки проб используют посуду из полиэтилена или фторопласта.

При определении железа общего пробу не фильтруют. Срок хранения незаконсервированной пробы - не более 4 час. Для консервирования прибавляют концентрированную азотную кислоту из расчета 3 см³ на 1000 см³ пробы. Срок хранения законсервированной пробы - 3 дня.

При определении растворенных форм железа пробу перед анализом фильтруют через фильтр «синяя лента», предварительно промытый раствором соляной кислоты по п.1.2 до отрицательной реакции на железо (проба с роданистым калием - отсутствие розовой окраски), а затем водой до pH не менее 5 (контроль по универсальному индикатору). Время хранения пробы не должно превышать 4 ч, консервировать пробу запрещается.

3.2. Приготовление растворов для градуировки анализатора «Флюорат-02»

В делительную воронку вместимостью 50 см³ помещают 10 см³ раствора соляной кислоты по п.1.3 (раствор №1).

Во вторую делительную воронку вместимостью 50 см³ помещают 10 см³ раствора железа по п.1.9 массовой концентрации 0,5 мг/дм³ (раствор №2). К обоим растворам приливают по 5 см³ раствора о-фенилендиамина по п.1.4 и оставляют на 40-50 мин.

Затем к обоим растворам приливают по 5 см³ раствора винно-кислого калия-натрия по п.1.5 и добавляют раствор гидроксида натрия по п.1.6 до pH 8 (контроль по универсальному индикатору).

Затем приливают по 5 см³ гептанола, или гексанола, или октанола, или изоамилового спирта и аккуратно перемешивают в течение 30 с.

После разделения отбирают верхний (органический) слой в кювету анализатора.

3.3. Градуировка анализатора жидкости «Флюорат-02»

Градуировку анализатора осуществляют путем измерения сигналов флуоресценции растворов, приготовленных по п.3.2.

При градуировке анализатора и всех измерениях в канале возбуждения используют светофильтр №15, а в канале регистрации - светофильтр №14.

Входят в меню «Градуировка», устанавливают $C0=0$ и $C1=0,500$. Значение параметра «J0» устанавливают по раствору № 1, а «J1» - по раствору № 2. При этом значения параметров «C2» - «C6» и «J2» - «J6» должны быть равны нулю.

4. Ход работы

Для проведения определения отбирают не менее двух аликвот анализируемой пробы. Объем аликвоты зависит от предполагаемого значения массовой концентрации железа (табл.3). Одновременно проводят анализ холостой пробы (не менее двух аликвот).

При проведении рутинных анализов допускается анализировать только одну аликвоту пробы.

При выполнении измерений должны быть выполнены следующие работы: разрушение органических веществ, приготовление рабочих растворов и измерение в них массовой концентрации железа.

4.1. Разрушение органических веществ

Аликвоту пробы (табл.3) помещают в кварцевую чашку вместимостью 50 см³ или термостойкий стакан вместимостью 50 см³, прибавляют 5 см³ концентрированной азотной кислоты и 0,5 см³ пероксида водорода. После упаривания досуха (избегать прокаливания!) смесь обрабатывают при нагревании 10 см³ раствора соляной кислоты по п.1.3 и используют для проведения определения по п.4.2.

Необходимо убедиться, что по окончании разрушения органических веществ рН пробы не менее 3. В противном случае раствор вновь упаривают досуха, избегая прокаливания, остаток обрабатывают раствором соляной кислоты по п.3.4.3 и вновь контролируют рН.

Одновременно приготавливают холостую пробу, для чего отбирают 10 см³ бидистиллированной воды, если проба не консервировалась. В противном случае в качестве холостой пробы используют 10 см³ раствора азотной кислоты, полученного разбавлением 3 см³ концентрированной азотной кислоты, использовавшейся при консервации пробы, до 1000 см³ бидистиллированной водой.

С холостой пробой проводят все операции, описанные в настоящем пункте.

Таблица 3 - Рекомендуемые аликвоты пробы в зависимости от предполагаемого значения массовой концентрации железа

Диапазон значений массовой концентрации железа, мг/дм ³	Объем аликвоты, см ³	Коэффициент разбавления Q
от 0,05 до 0,5 включительно	10	1
свыше 0,5 до 5,0 включительно	1	10

4.2. Приготовление рабочих растворов и измерение массовой концентрации железа

В делительную воронку вместимостью 50 см³ переносят раствор, полученный по п.4.1. Прибавляют 5 см³ раствора о-фенилендиамина (п.1.4), оставляют на 45 - 50 мин, а затем вводят 5 см³ раствора виннокислого калия-натрия по п.1.5, добавляют раствор гидроксида натрия по п.1.6 до рН 8. Экстрагируют, аккуратно перемешивая с 5 см³ гептанола, или гексанола, или октанола или изоамилового спирта в течение 30 с. После разделения верхний слой отбирают в кювету анализатора жидкости «Флюорат-02» и измеряют

массовую концентрацию железа, делая не менее двух последовательных отсчетов в режиме «Измерение» и вычисляя среднее арифметическое.

Проверяют приемлемость полученных результатов измерений для двух параллельных холостой пробы ($C_{хол,1}$ и $C_{хол,2}$, мг/дм³). Результаты признаются приемлемыми при выполнении одного из двух условий:

- оба значения не превышают 0,025 мг/дм³;
- при более высоких значениях холостой пробы выполняются

условия (1) и (2):

$$|C_{хол,1} - C_{хол,2}| \leq 0,25 \cdot C_{хол} \quad (1)$$

где $C_{хол}$ - среднее арифметическое значений $C_{хол,1}$ и $C_{хол,2}$, мг/дм³.

$$C_{изм} \geq 1,5 \cdot C_{хол} , \quad (2)$$

где $C_{изм}$ - измеренное значение массовой концентрации железа в анализируемой пробе, мг/дм³.

Если результаты параллельных измерений холостой пробы признаны приемлемыми, то в качестве результата измерения массовой концентрации железа в холостой пробе ($C_{хол}$) принимают среднее арифметическое полученных измерений. В противном случае подготовку холостой пробы проводят заново.

Если условие (2) не выполняется, необходимо найти и устранить источник загрязнения, например, ещё раз тщательно вымыть посуду, заменить азотную кислоту и (или) перекись водорода на более чистые, после чего повторить анализ проб, для которых условие приемлемости холостой пробы (2) не было выполнено.

5. Обработка результатов измерений

Массовую концентрацию железа в пробе вычисляют по формуле:

$$X = (C_{изм} - C_o) \cdot Q \quad (3)$$

где X - массовая концентрация железа в пробе, мг/дм³;

$C_{изм}$ - измеренное значение массовой концентрации железа в рабочем растворе (п.9.2) , мг/дм³;

C_o - измеренное значение массовой концентрации железа в растворе холостой пробы (п.9.2), мг/дм³;

Q - коэффициент разбавления (табл.3).

За результат измерения массовой концентрации железа в пробе принимают единичный результат или среднее арифметическое значение результатов $n=2$ параллельных определений, для которых выполняется условие:

$$X_{max} - X_{min} \leq 0,01 \cdot \bar{X} \cdot r, \quad (4)$$

где X_{max} - больший результат параллельного определения, мг/дм³;

X_{min} - меньший результат параллельного определения, мг/дм³;

\bar{X} - среднее арифметическое результатов параллельных определений, мг/дм³;

r - значение предела повторяемости (табл.4), %.

Таблица 4 - Значения пределов повторяемости для доверительной вероятности $P=0,95$

Диапазон измерений, мг/дм ³	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r , %
Питьевые воды	
от 0,05 до 0,2 включительно	20
свыше 0,2 до 5 включительно	14
Природные и сточные воды	
от 0,05 до 0,2 включительно	31
свыше 0,2 до 5 включительно	22

6. Оформление работы

Результат измерения в документах, предусматривающих его использование, может быть представлен в виде:

1. $\bar{X} \pm U(\bar{X})$, мг/дм³,

где \bar{X} - среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, мг/дм³;

$U(\bar{X})$ - значение показателя точности измерений (расширенная неопределенность измерений с коэффициентом охвата 2 для $n = 2$ параллельных определений), мг/дм³:

$$U(\bar{X}) = 0,01 \cdot U_{\text{отн}}(\bar{X}) \cdot \bar{X} \quad (5)$$

Значения $U_{\text{отн}}(\bar{X})$ приведены в таблице 1.

2. $X \pm U(X)$, мг/дм³,

где X - единичный результат измерений, мг/дм³;

$U(X)$ - значение показателя точности измерений (расширенная неопределенность измерений с коэффициентом охвата 2 для единичного результата измерений), мг/дм³:

$$U(X) = 0,01 \cdot U_{\text{отн}}(X) \cdot X. \quad (6)$$

Значения $U_{\text{отн}}(X)$ приведены в таблице 1.

Допускается результат измерения в документах, выдаваемых лабораторией, представлять в виде: $X \pm U_n$, мг/дм³

где X - результат измерений, полученный в точном соответствии с прописью методики [единичный результат или среднее (среднее арифметическое или медиана) результатов параллельных определений], мг/дм³;

U_n - значение показателя точности измерений (расширенная неопределенность с коэффициентом охвата 2), установленное при реализации методики в лаборатории для единичного результата или среднего арифметического параллельных определений, и обеспечиваемое контролем стабильности результатов измерений, мг/дм³.

Таблица 1 - Значения показателей точности измерений

Диапазон измерений, мг/дм ³	$U_{отн}(X), \%$	$U_{отн}(\bar{X}), \%$
Питьевые воды		
От 0,05 до 0,2 вкл.	24	22
Свыше 0,2 до 5 вкл.	16	14
Природные и сточные воды		
От 0,05 до 0,2 вкл.	34	30
Свыше 0,2 до 5 вкл.	24	21
<p><i>П р и м е ч а н и е -1. $U_{отн}(X)$ - относительная расширенная неопределенность с коэффициентом охвата 2 единичного результата измерений, $U_{отн}(\bar{X})$ - относительная расширенная неопределенность с коэффициентом охвата 2 для $n = 2$ результатов параллельных определений.</i></p>		

Лабораторная работа №11. Атомно-эмиссионная фотометрия пламени

Пламенная фотометрия – один из методов атомно-эмиссионного спектрального анализа. Этот метод состоит в том, что анализируемый образец переводят в раствор, который затем с помощью распылителя превращается в аэрозоль и подается в пламя горелки. Растворитель испаряется, а элементы, возбуждаясь, излучают спектр. Анализируемая спектральная линия выделяется с помощью прибора — монохроматора или светофильтра, а интенсивность ее свечения измеряется фотоэлементом. Пламя выгодно отличается от электрических источников света тем, что поступающие из баллона газ-топливо и газ-окислитель дают очень стабильное, равномерно горящее пламя. Из-за невысокой температуры в пламени возбуждаются элементы с низкими потенциалами возбуждения в первую очередь щелочные элементы, для определения которых практически нет экспрессных химических методов, а также щелочно-земельные и другие элементы. Всего этим методом определяют более 70 элементов. Использование индукционного высокочастотного разряда и дуговой плазменной горелки плазмотрона позволяет определять элементы с высоким потенциалом ионизации, а также элементы, образующие термостойкие оксиды, для возбуждения которых пламя малоприспособно.

Метод определения калия основан на фотометрировании дублетов спектральных линий калия $4^2S_{1/2} - 4^2P^0_{1/2,3/2}$ 769,9 и 766,5 нм излучаемых в низкотемпературном (пропан — воздух) пламени.

Цель работы. Изучение работы фотометрических приборов, овладение навыками практического применения фотометрического метода анализа.

Материалы и средства исследования

1. Пламенный фотометр – ПФМ;

2. Рабочий раствор хлорида калия $T(K^+) = 100 \text{ мкг/см}^3$. Навеску 0,0191 г х.ч. KCl вносят в мерную колбу объемом $100,0 \text{ см}^3$, растворяют соль и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой;
3. Мерные колбы объемом $100,0 \text{ см}^3$, 7 шт;
4. Градуированная пипетка объемом $10,0 \text{ см}^3$, 1 шт;
5. Мерные пробирки объемом 25 см^3 , 7 шт.

Ход работы

1. Приготовление серии стандартных растворов:

Из рабочего раствора, содержащего 100 мкг/см^3 калия, готовят 6 стандартных растворов с концентрацией калия 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; $10,0 \text{ мкг/см}^3$.

Для этого 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 и $10,0 \text{ см}^3$ исходного раствора хлорида калия (натрия, кальция) вводят в мерные колбы объемом $100,0 \text{ см}^3$, доводят объём каждого раствора до $100,0 \text{ см}^3$ дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

2. Подготовка прибора к работе:

Включить сетевой шнур фотометра и компрессора в электрическую сеть;

Ручкой “ВОЗДУХ” установить подачу воздуха. Значение давления воздуха должно быть в пределах от 50 — 70 кПа;

Затем ручкой “Газ” осуществить подачу газа.

Электрозажигалкой поджечь пламя. Наблюдая в смотровое окно, регулировать пламя, так чтобы восстановительный конус пламени был резко очерчен, имел минимальную высоту (3-4 мм) и окрашен в зеленовато-голубой цвет, при этом пламя не должно отрываться от насадки и не должно быть турбулентным.

Установить стакан с дистиллированной водой под капилляр подачи пробы. Во время прогрева и в паузах между измерениями устанавливать под капилляр стакан с дистиллированной водой. Оставлять прибор работающим в отсутствие пробы, во избежание загрязнения системы подачи пробы и горелки, не рекомендуется.

Включить фотометр тумблером;

Установить на фотометре 2-ой диапазон измерения. Стрелку переключателя светофильтров установить против обозначения измеряемого элемента. Стрелку микроамперметра установить ручкой “Нуль грубый” на середину шкалы.

Прогреть прибор в течение 30 мин.

При устойчивом положении стрелки микроамперметра установить нуль по шкале прибора ручкой “Нуль грубый”.

Измерение концентраций натрия, калия и кальция в исследуемых растворах начинается с построения градуировочной кривой, которая строится для каждого элемента по эталонным растворам.

После завершения работы промывают тракт поступления пробы подачей в распылитель дистиллированной воды в течение 10 минут.

Перекрыть вентиль газа на фотометре.

Выключить прибор тумблером.

Отключить компрессор от сети.

3. Построение градуировочного графика:

Устанавливают светофильтр на калий (положение переключателя “СВЕТОФИЛЬТР” — “K”).

Выводят стрелку микроамперметра прибора на нуль, по дистиллированной воде при необходимости корректируя его ручкой «Нуль грубый».

Распыляют стандартный раствор с максимальной концентрацией калия и, изменяя усиление аналитического сигнала, устанавливают стрелку микроамперметра на отсчет 100 мкА.

Снова распыляют дистиллированную воду до возвращения стрелки в нулевое положение при необходимости корректируя его ручкой «Нуль грубый».

Добиваются воспроизводимости крайних значений рабочего диапазона шкалы микроамперметра, поочерёдно распыляя дистиллированную воду и стандартный раствор с максимальной концентрацией калия.

Затем фотометрируют эталонные растворы калия с известной, равномерно возрастающей концентрацией. После каждого раствора промывают систему

дистиллированной водой до возвращения стрелки микроамперметра на нуль. Данные заносят в таблицу 1 (при определении натрия и кальция в таблицы 4 и 7, соответственно).

Градуировочный график строят в координатах: показания микроамперметра — концентрация калия (мкг/см³).

4. Контрольная задача. Определение содержания калия в анализируемом растворе:

Доводят объём анализируемого раствора в мерной колбе до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Фотометрируют раствор 3-5 раз и по среднему значению I находят концентрацию калия в растворе по градуировочному графику.

Рассчитывают содержание калия в испытуемом образце с учетом разбавления.

Оформление работы

1. Цель и задачи работы.
2. Ход определения.

Данные для построения градуировочного графика.

Таблица 1

№	$T(K^+)$, мкг/см ³	Показания микроамперметра, мкА				
		I_1	I_2	I_3	\bar{I}	$I = \bar{I} - \bar{I}_0$
1						
2						
3						
4						
5						
6						
Холостой опыт	0				$\bar{I}_0 =$	0
Контрольный р-р						

С помощью компьютерных программ Microsoft Excel или Sigmaplot определяют параметры линейной регрессии (таблица 2)

Параметры линейной регрессии $I = f(T(K^+))$.

Таблица 2

Прибор	s_a	s_b	$\bar{a} \pm \Delta a$	$\bar{b} \pm \Delta b$	R

Рассчитывают относительную погрешность определения K^+ по массе

$$D\% = \frac{m_{\text{найд.}}}{m} 100\%$$

Рассчитывают концентрацию и содержание калия и хлорида калия в анализируемом растворе. Результаты заносят в таблицу 3.

Результаты определения для калия.

Таблица 3

$c(K^+)$, моль/дм ³	$T(K^+)$, мг/см ³	$v(K^+)$, моль	$m(K^+)$, мг	D, %
$c(KCl)$, моль/дм ³	$T(KCl)$, мг/см ³	$v(KCl)$, моль	$m(KCl)$, мг	

Определение натрия по методу градуировочного графика

Метод определения натрия основан на фотометрировании дублетов спектральных линий натрия $3^2S_{1/2} - 3^2P_{1/2,3/2}^{0,1}$ 589,6 и 589,0 нм, излучаемых в низкотемпературном пламени (пропан — воздух).

Материалы и средства исследования

1. Используют то же оборудование и посуду, что и при определении калия, заменяя рабочий раствор:
2. Рабочий раствор хлорида натрия $T(Na^+) = 100$ мкг/см³. Навеску 0,0254 г х.ч. $NaCl$ вносят в мерную колбу объемом 100,0 см³, растворяют соль и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой;

Ход работы

Приготовление серии стандартных растворов:

Приготовление серии осуществляют по пункту 1.

Построение градуировочного графика:

Построение осуществляется по пункту 2-3 с установкой светофильтра на натрий (положение переключателя “СВЕТОФИЛЬТР” — “Na”), в интервале концентраций 0,5-8,0 мкг/см³.

1.2.2.3. Контрольная задача:

Определение осуществляется по пункту 4.

Оформление лабораторного журнала. Определение натрия по методу градуировочного графика

1. Цель и задачи работы.

2. Ход определения.

Данные для построения градуировочного графика.

Таблица 4

№	$T(Na^+)$, мкг/см ³	Показания микроамперметра, мкА				
		I_1	I_2	I_3	\bar{I}	$I = \bar{I} - \bar{I}_0$
1						
2						
3						
4						
5						
6						
Холостой опыт	0				$\bar{I}_0 =$	0
Контрольный р-р						

С помощью компьютерных программ Microsoft Excel или Sigmaplot определяют параметры линейной регрессии (таблица 5).

Параметры линейной регрессии $I = f(T(Na^+))$.

Таблица 5

Прибор	S _a	S _b	$\bar{a} \pm \Delta a$	$\bar{b} \pm \Delta b$	R

Рассчитывают относительную погрешность определения Na^+ по массе

$$D_{\%} = \frac{m_{\text{найд.}}}{m} 100\%$$

Рассчитывают концентрацию и содержание натрия и хлорида натрия в анализируемом растворе. Результаты заносят в таблицу 6.

Результаты определения натрия.

Таблица 6

c(Na ⁺), моль/дм ³	T(Na ⁺), мг/см ³	v(Na ⁺), моль	m(Na ⁺), мг	D, %
c(NaCl), моль/дм ³	T(NaCl), мг/см ³	v(NaCl), моль	m(NaCl), мг	

Контрольные вопросы:

1. Какова природа происхождения атомных спектров?
2. На использовании какого явления основана пламенная фотометрия?
3. На измерении каких величин осуществляется качественный и количественный анализ в атомных спектральных методах?
4. Что определяется термином «потенциал возбуждения». Как он соотносится с интенсивностью спектральной линии?
5. Приведите эмпирическую зависимость интенсивности излучения от концентрации определяемого компонента.
6. Какие процессы происходят с веществами в пламени катализатора?
7. В чём заключается явление самопоглощения? Как оно влияет на проведение анализа?
8. Приведите принципиальную схему прибора для атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС).
9. Какие отличия имеет пламенный фотометр от приборов АЭС? Покажите на принципиальной схеме.

10. Каково назначение основных узлов пламенного фотометра?
11. Какие элементы и почему можно анализировать методами АЭС и пламенной фотометрии?
12. Какие преимущества и недостатки имеет пламенная фотометрия перед АЭС?
13. В чём заключаются методы определения элементов АЭС:
- градуировочного графика;
 - трёх эталонов;
 - добавок;
 - ограничивающих растворов?
14. Каковы основные характеристики атомно-эмиссионного метода анализа?

Лабораторная работа № 12. ИК-спектроскопия органических веществ

Инфракрасная (ИК) спектроскопия является одним из основных методов анализа органических соединений. Современная ИК-спектроскопия представляет собой экспресс-метод установления структурных особенностей органических соединений. С помощью ИК-спектроскопии быстро и надёжно идентифицируются разнообразные функциональные группы: карбонильная, гидроксильная, карбоксильная, амидная, аминок-, циано- и др.; а также различные непредельные фрагменты: двойные и тройные углерод-углеродные связи, ароматические или гетероароматические системы. Методами ИК-спектроскопии изучают внутри- и межмолекулярные взаимодействия, например, образование водородных связей.

1. Идентификация сыпучих веществ по ИК-спектру

Метод основан на получении и идентификации ИК-спектра неизвестного вещества в таблетке бромида калия.

Цель работы. Изучение возможностей и аппаратного оформления ИК-спектроскопии, овладение навыками практического применения спектроскопического метода анализа.

Материалы и средства исследования

1. ИК-фурье-спектрометр ФСМ 1201;
2. Сушильный шкаф;
3. Пресс с набором пресс-форм;
4. Бромид калия для ИК-спектроскопии;
5. Набор образцов сыпучих веществ для анализа;
6. Агатовая ступка и пестик, 1 шт;

7. Шпатель лабораторный, 1 шт.

Ход работы

Подготовка пробы к анализу:

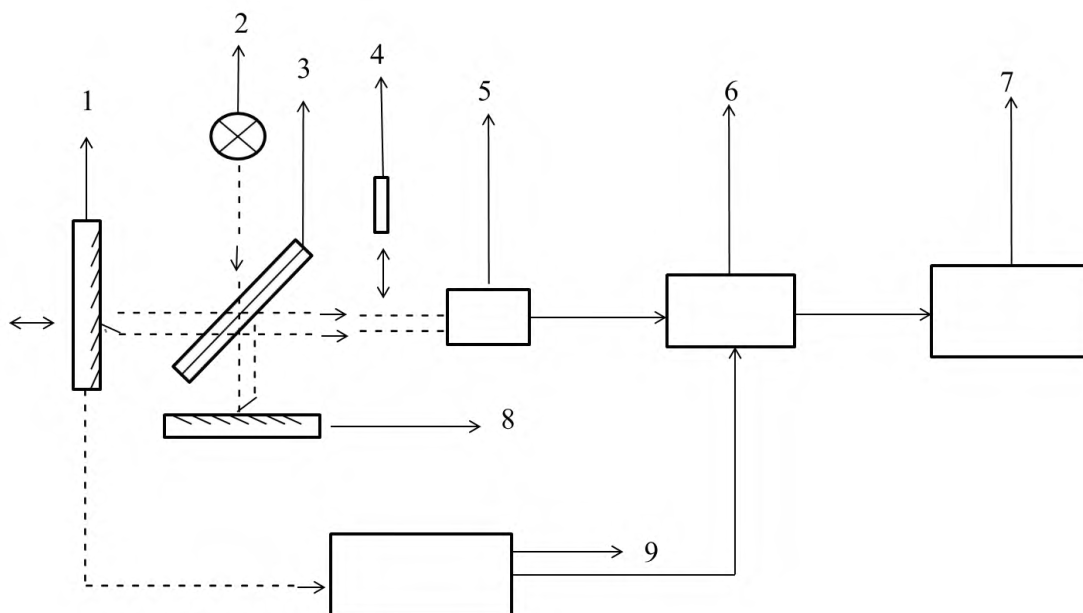
Для обезвоживания анализируемых образцов и бромида калия проводят их высушивание в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 1 часа.

Порядок работы на ИК-фурье-спектрометре ФСМ 1201:

Для снятия ИК-спектров используют приборы, называемые ИК-спектрометрами. Лабораторные инфракрасные фурье-спектрометры марки «ФСМ» предназначены для регистрации и исследования оптических спектров в инфракрасной области, а также для количественного анализа и контроля качества продукции в химической, нефтехимической, фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности, осуществления экологического контроля, криминалистической и др. видов экспертиз.

Основным элементом оптической схемы фурье-спектрометра является двухлучевой интерферометр Майкельсона, состоящий из полупрозрачного светоделителя и двух плоских зеркал. Фурье-спектрометр позволяет получать информацию о спектральном составе ИК излучения и, следовательно, об оптических свойствах исследуемых образцов.

Схема получения спектров показана на рисунке 3. Излучение от излучателя падает на полупрозрачную поверхность светоделителя и расщепляется на два пучка. После отражения от соответствующих зеркал интерферометра излучение от двух пучков складывается на светоделителе и направляется на детектор, преобразующий его в электрический сигнал. Если одно из зеркал двухлучевого интерферометра Майкельсона перемещать, то оптический путь для соответствующего пучка будет изменяться, и в точке приема интенсивность излучения будет меняться вследствие интерференции пучков, отражающихся от подвижного и неподвижного зеркала.



1 – подвижное зеркало; 2 – излучатель; 3 – светоделитель; 4 – образец; 5 – детектор; 6 – АЦП; 7 – вычислитель; 8 – неподвижное зеркало; 9 – датчик разности хода.

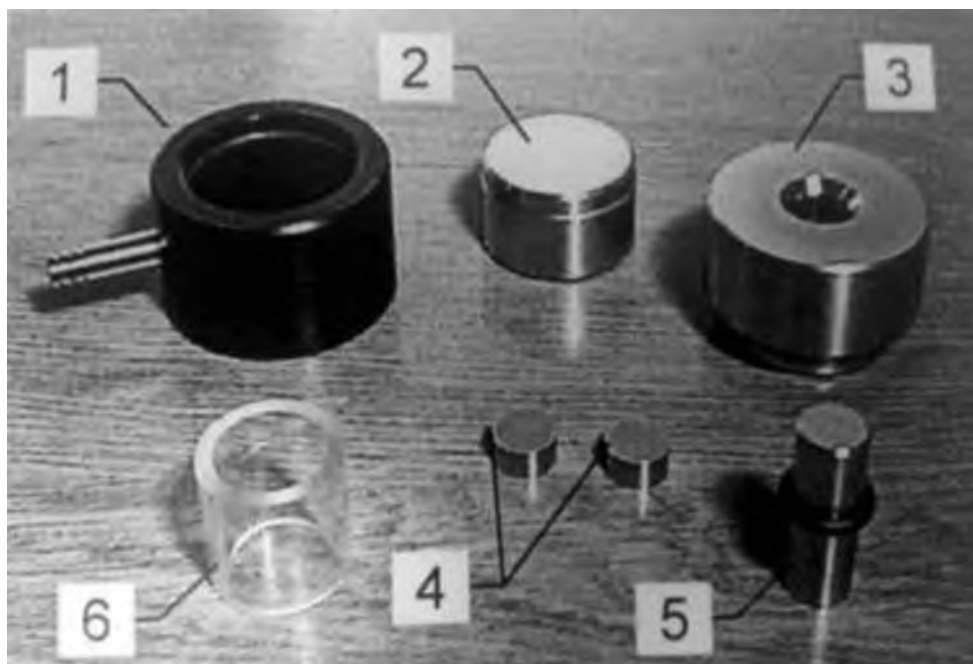
Рисунок 3. Схема получения спектров.

Измерение спектров осуществляется с помощью программы «FSpec». Прежде, чем начать измерение, необходимо выбрать режим и значения основных параметров. Имеется три режима измерений: пропускание, интенсивность и интерферограмма. Режим и значения основных параметров (спектральное разрешение, спектральный диапазон, число сканов) устанавливается в панели измерения:

Режим	Диапазон	Разрешение	Сканов	Спектр сравнения	<input type="checkbox"/> Серия	Пуск
Пропускание ▼	2857 - 22222 см ⁻¹	4.0 ▼ см ⁻¹	1	Для кажд. спектра ▼		

При измерении спектра пропускания рассчитывается отношение спектров интенсивности излучения прошедшего через образец к спектру интенсивности излучения падающего на образец, так называемый спектр сравнения. Процесс получения спектра пропускания состоит из двух этапов. Измерение начинается нажатием кнопки «Пуск». Если в панели «Параметры

образцов (таблеток) для оптических спектральных измерений используется пресс-форма ПФ13 совместно с прессом с усилием до 10 Тс. Пресс-форма представлена на рисунке 5.



1 – корпус со штуцером и двумя уплотнительными кольцами; 2 – основание; 3 – цилиндр; 4 – верхняя и нижняя наковальни; 5 – шток с уплотнительным кольцом; 6 – вспомогательное кольцо.

Рисунок 5. Составные детали пресс-формы ПФ13.

Для изготовления таблетки берут 2-3 мг анализируемого образца и 200 мг бромида калия. Реактивы перетирают в агатовой ступке до мелкодисперсного состояния и помещают в пресс-форму ПФ13. Прессование проводят при давлении 150 бар в течение 3 минут.

Идентификация неизвестного образца сыпучего вещества

В качестве контрольного образца берут навеску вещества неизвестного состава, выданного преподавателем. Готовят из него таблетку с бромидом калия и снимают спектр полученного образца как описано в предыдущем пункте. На полученном ИК-спектре проводят идентификацию полос

поглощения с использованием программы «FSpec» и справочников по ИК-спектроскопии. Составляют список предполагаемых химических связей, полосы поглощения которых присутствуют в спектре. На основании полученных данных записывают структурную формулу выданного контрольного образца.

Оформление работы

1. Цели и задачи работы

2. Ход работы

2.1. Ход подготовки пробы к анализу

2.2. ИК-спектр контрольной пробы.

2.3. Привести полосы поглощения, наблюдаемые на спектре и соответствующие им колебания (таблица 44).

Результаты идентификации ИК-спектра сыпучих веществ.

Таблица 44

Номер полосы поглощения	Волновое число, см ⁻¹		Структурный фрагмент
	Экспериментальное значение	Литературные данные	
1...			

Сделать вывод о структуре предполагаемого контрольного вещества и отметить на ней видимые на ИК-спектре связи.

2. Идентификация жидких веществ по их ИК-спектру

Метод основан на получении и идентификации ИК-спектра неизвестного вещества в виде жидкости с использованием приставки МНПВО.

Материалы и средства исследования

1. ИК-фурье-спектрометр ФСМ 1201 с приставкой МНПВО;
2. Набор образцов жидких веществ для анализа;
3. Мерная пипетка объемом 10 см³, 1 шт.

Ход работы

Порядок работы на ИК-фурье-спектрометре ФСМ 1201 с приставкой МНПВО

Приставка многократного нарушенного полного внутреннего отражения горизонтального типа МНПВО36 предназначена для исследования химического состава жидких сред, мелкодисперсных неабразивных порошков и полимерных пленок. Метод многократного нарушенного полного внутреннего отражения позволяет существенно упростить подготовку образцов и может использоваться для реализации экспресс-методик контроля качества продукции. Приставка МНПВО36 (рисунок 6) состоит из трех частей: 1) основание приставки, 2) призма МНПВО в держателе, 3) прижимное устройство.



Рисунок 6. Приставка многократного нарушенного полного внутреннего отражения горизонтального типа МНПВО36.

Оптическая схема приставки включает два плоских зеркала, одно из которых направляет поток ИК излучения на входную грань призмы МНПВО, другое – принимает излучение с выходной грани призмы и направляет его на выходное сферическое зеркало камеры кювет. Призма МНПВО закреплена в держателе. Края держателя и верхняя грань призмы формируют ванночку, предназначенную для размещения образцов. Держатель с призмой размещаются в фиксирующем углублении на верхней поверхности основания приставки.

Приставка МНПВО36 успешно заменяет кюветы и приспособления, применяемые для проведения анализа жидких, полужидких и твердых веществ. Приставка многократного нарушенного полного внутреннего отражения подходит как для качественного, так и для количественного анализа. Подготовка пробы сводится к размещению образца на кристалле призмы. Способ нанесения образца зависит от его вязкости. Например, жидкости с низкой вязкостью удобно наносить с помощью пипетки. Полимерные образцы механически прижимают к поверхности призмы. В качестве спектра сравнения используется спектр «чистой» призмы, т.е. сначала снимают спектр при отсутствии образца. Алгоритм снятия ИК-спектра в программы «FSpec» аналогичен описанному выше.

Идентификация неизвестного образца жидкого вещества

В качестве контрольного образца берут 1 мл вещества неизвестного состава, выданного преподавателем. Вещество наливают на призму приставки МНПВО, так чтобы вся поверхность призмы была закрыта, и снимают спектр полученного образца. На полученном ИК-спектре проводят идентификацию полос поглощения с использованием программы «FSpec» и справочников по ИК-спектроскопии. Составляют список предполагаемых химических связей,

полосы поглощения которых присутствуют в спектре. На основании полученных данных рисуют структуру выданного контрольного образца.

Оформление работы

1. Цели и задачи работы

2. Ход работы

2.1. Ход подготовки пробы к анализу

2.2. ИК-спектр контрольной пробы.

2.3. Привести полосы поглощения, наблюдаемые на спектре и соответствующие им колебания (таблица 45).

Результаты идентификации ИК-спектра жидких веществ.

Таблица 45

Номер полосы поглощения	Волновое число, см ⁻¹		Структурный фрагмент
	Экспериментальное значение	Литературные данные	
1...			

Сделать вывод о структуре предполагаемого контрольного вещества и отметить на ней видимые на ИК-спектре связи.

Контрольные вопросы:

1. На чём основан метод ИК-спектроскопии?
2. На чём основано устройство ИК-фурье-спектрометра?
3. Чем отличаются спектры пропускания и спектры поглощения?
4. Чем отличаются валентные и деформационные колебания?
5. Как проводят измерение фона? Для чего это делают?

6. С какой целью прессуют «таблетки» из порошка исследуемого образца?
7. Принцип работы приставки МНПВО?
8. Как связано волновое число с длиной волны.
9. Какую информацию можно получить из ИК – спектров.
10. Что служит источником непрерывного спектра в инфракрасной области спектра?
11. Как проводится количественный анализ по ИК-спектрам?
12. Интерферометр Майкельсона. Оптическая схема. Основные характеристики.
13. Области применения ИК-спектроскопии.

Лабораторная работа № 13. Определение числа клеток микроорганизмов методом фототурбидиметрии

Турбидиметрическим методом анализа (турбидиметрией) называют метод, основанный на измерении интенсивности света, прошедшего через светорассеивающую (мутную) среду, например, суспензию клеток. Интенсивность прошедшего через мутную среду света в общем случае зависит от светорассеяния и поглощения. При турбидиметрических измерениях поглощение стараются исключить соответствующим выбором длины волны падающего света. Например, при исследовании суспензии эритроцитов используют свет с длиной волны не менее 750 нм (красный и ближний инфракрасный).

Определение содержания клеток микроорганизмов в суспензии. Метод основан на измерении интенсивности светового потока, проходящего через дисперсную систему.

Цель работы. Изучение работы фотометрических приборов, овладение навыками практического применения фототурбидиметрического метода.

Материалы и средства исследования

1. Фотоэлектроколориметр (Эксперт-003);
2. Суспензия микроорганизмов, $T(\text{клеток}) = 2 \text{ мг/см}^3$;
3. Физиологический раствор, $\omega(\text{NaCl}) = 0,9\% \text{ масс}$;
5. Мерные колбы вместимостью $50,0 \text{ см}^3$, 8 шт.;
6. Градуированная пипетка 10 см^3 , 1 шт.

Ход работы

Приготовление стандартных растворов и раствора сравнения:

Готовят 7 стандартных растворов, содержащих 5; 8; 10; 15; 20; 30; 40 мг клеток микроорганизмов в $50,0 \text{ см}^3$ раствора. В мерные колбы вносят следующие количества исходной суспензии: 2,5; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; $20,0 \text{ см}^3$ соответственно. Растворы доводят до метки физиологическим

раствором, перемешивают. В качестве раствора сравнения используют физиологический раствор.

Выбор рабочей длины волны:

Раствор, имеющий наиболее интенсивную окраску, фотометрируют относительно раствора сравнения, со всеми светофильтрами поочерёдно, записывая результаты измерений в таблицу 54. Для проведения анализа используют кюветы с длиной светового пути 1 см.

Строят спектральную характеристику раствора в координатах $A = f(\lambda)$ и выбирают в качестве рабочего светофильтр, соответствующий наибольшему значению оптической плотности.

Построение градуировочного графика:

Для стандартных растворов, содержащих известное количество клеток, определяют оптическую плотность при установленной длине волны. Измерения проводят не менее пяти раз и результаты фотометрирования вносят в таблицу 55.

По полученным значениям строят градуировочный график зависимости оптической плотности от содержания клеток в стандартных растворах $A = f(m_{\text{клеток}})$. Полученную зависимость обрабатывают в рамках линейной регрессии, параметры которой представляют в таблице 56.

Определение содержания клеток микроорганизмов в контрольном растворе:

Контрольный раствор доводят до метки физиологическим раствором и определяют оптическую плотность при выбранной длине волны не менее 5 раз. Результаты измерений вносят в таблицу 55.

С использованием уравнения линейной регрессии определяют содержание клеток в модельном образце для всех значений оптической плотности.

Оформление работы.

1. Цель и задачи работы.
2. Ход определения.
 - 2.1. Ход приготовления серии стандартных растворов.
 - 2.2. Ход приготовления раствора сравнения.

2.3. Выбор рабочей длины волны.

Данные для построения спектральной суспензии клеток.

Таблица 54

№ светофильтра	λ , нм	Оптическая плотность
1	375	
2	400	
3	470	
4	505	
5	525	
6	572	
7	590	
8	605	
9	615	
10	626	
11	655	
12	700	
13	850	

Строят спектральную характеристику раствора в координатах $A = f(\lambda)$.

Делают вывод о выборе рабочей длины волны.

2.4. Определение содержания клеток методом градуировочного графика.

Данные для построения градуировочных зависимостей.

Таблица 55

№ Раствора	$m(\text{клеток})$, мг	Оптическая плотность						s(A)
		A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	$\bar{A} \pm \Delta A$	
1	5							
2	8							
3	10							
4	15							
5	20							

6	30							
7	40							
Контрольная задача, X								

Для определения содержания микроорганизмов строят графики зависимости в координатах $A = f(m(\text{клеток}))$ методом градуировочного графика. С помощью компьютерных программ Microsoft Excel или Sigmaplot определяют параметры линейной регрессии (таблица 56).

Параметры линейной регрессии $A = f(m(\text{клеток}))$.

Таблица 56

Прибор	l , см	s_a	s_b	$\bar{a} \pm \Delta a$	$\bar{b} \pm \Delta b$	R

Рассчитывают титр и содержание микроорганизмов в анализируемом растворе. Результаты заносят в таблицу 57.

Результаты определения содержания микроорганизмов.

Таблица 57

$m(\text{клеток})$, мг	$T(\text{клеток})$, мг/см ³	D, %

Рассчитывают относительную погрешность определения содержания клеток:

$$D = \frac{|m_{\text{найд}} - m_{\text{теор}}|}{m_{\text{теор}}} \cdot 100\%$$

Контрольные вопросы:

1. В чем заключается суть и отличие методов турбидиметрии и нефелометрии?
2. Привести основной закон светорассеяния (уравнения Рэлея) и охарактеризовать величины, входящие в это уравнение.
3. Как зависит интенсивность рассеянного света: а) от спектральной характеристики падающего излучения; б) от размера рассеивающих частиц?

4. Какой свет рассеивается в наибольшей степени частицами, находящимися в растворе во взвешенном состоянии: а) желтый; б) синий; в) зеленый; г) красный?
5. Какое свойство используется в нефелометрических методах анализа: а) поглощение света атомами; б) рассеяние света частицами; в) излучение света молекулами и ионами?
6. Для каких целей при приготовлении суспензии необходимо вводить в рабочие растворы стабилизирующие реагенты, соблюдать определенный порядок смешения компонентов, постоянную температуру и проводить измерения через строго определенное время?
7. Приведите примеры применения методов нефелометрии и турбидиметрии в химическом анализе. Перечислите недостатки и достоинства этих методов.

Лабораторная работа № 14. Потенциометрическое определение нитратов в овощах

Неорганический азот в растительном сырье в наибольшем количестве представлен в виде нитратов и нитритов, избыточное накопление которых наблюдается при неконтролируемом применении азотных удобрений.

Нитраты входят в группу азотных удобрений, наибольшее распространение среди которых получили калийная селитра (нитрат калия) KNO_3 , чилийская селитра (нитрат натрия) NaNO_3 , кальциевая селитра (нитрат кальция) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, аммиачная селитра (нитрат аммония) NH_4NO_3 . Нитраты не оказывают токсического действия на растения, поэтому и при избыточном использовании азотных удобрений урожай будет получен. Нитраты являются естественным компонентом пищевых продуктов растительного происхождения.

Однако количество нитратов в растительных продуктах определяется не только количеством вносимых азотных удобрений. Когда питание растений разбалансировано по азоту, калию, фосфору, микроэлементам или растениям не хватает воды и света, они аккумулируют большое количество нитратов. Некоторые пестициды усиливают накопление нитратов в 10–20 раз. Если овощи выращены без дополнительного внесения азотных удобрений, содержание в них нитратов будет примерно следующим (мг/кг): салат – 2900, капуста – 100, картофель – 20. При избытке азота в почве наибольшее количество нитратов (мг/кг) накапливается в шпинате (до 6900), свекле (до 5000), салате (до 4400), редисе (до 3500); наименьшее количество нитратов при таких условиях выращивания накапливается в томатах.

На концентрацию нитратов в растениях оказывают влияние сроки уборки урожая. Так, увеличение продолжительности вегетационного периода приводит к снижению содержания нитратов в овощах: в молодых растениях нитратов на 50–70 % больше, чем в зрелых. Кроме того, содержание нитратов возрастает ближе к корню. Например, в листьях белокочанной капусты нитратов на 60–70 % меньше, чем в кочерыжке; в листьях салата их на 40–50 % меньше, чем в листовых черенках.

Причиной повышенного содержания нитратов в овощах, выращенных под пленкой или в теплицах при большой загущенности посева, является недостаток света, поэтому овощи с повышенной склонностью аккумулировать нитраты не следует выращивать в затемненных местах. Недостаток воды и пониженные температуры оказывают аналогичное действие, приводя к увеличению количества нитратов в растительной продукции.

Таким образом, способность растений аккумулировать нитраты в значительной степени зависит от видов и сортов сельскохозяйственных культур, способов и условий их подкормки, состава почвы и других факторов.

До недавнего времени нитраты относили к малотоксичным веществам. Человек относительно легко переносит дозу в 150–200 мг нитратов в сутки, 500 мг считается предельно допустимой дозой, а 600 мг/сут – токсичная для взрослого человека доза.

Допустимая суточная доза (ДСД) нитратов для взрослого человека составляет от 300 до 325 мг.

Потенциальная токсичность нитратов, содержащихся в повышенной концентрации в пищевом сырье и продуктах питания, заключается в том, что они при определенных условиях могут

окисляться до нитритов – солей азотистой кислоты, которые для человека являются ядами. В организме человека нитриты из нитратов образуются в пищеварительном тракте (ротовая полость, желудок, кишечник).

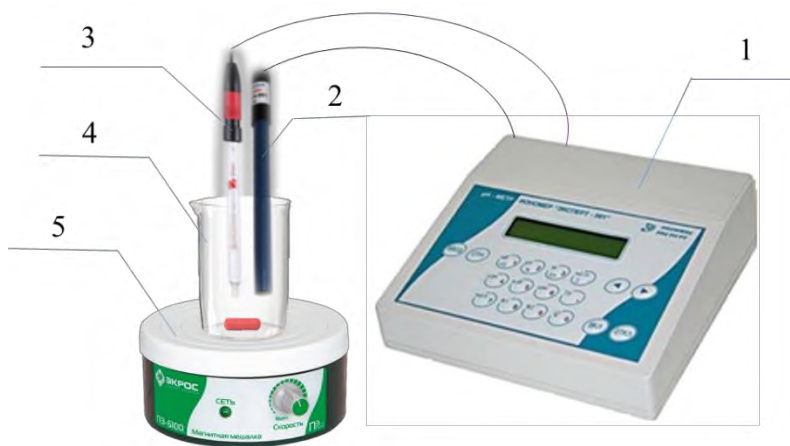
Цель работы. Определить содержание нитратов в растительном материале с помощью ионометрического экспресс-метода определения нитратного азота.

Определение нитрат-ионов методом прямой потенциометрии

Ионометрический метод основан на извлечении нитратов раствором алюмокалиевых квасцов или дистиллированной водой с последующим измерением концентрации нитратов с помощью ионселективного нитратного электрода.

Оборудование и реактивы

1. Установка для прямых потенциометрических исследований, общая схема которой представлена на рисунке 9;



1 – иономер (1-канальный высокоточный иономер «Эксперт-001-1.0.1»); 2 – ион-селективный электрод (нитрат-селективный электрод ЭЛИС-121); 3 – хлоридсеребряный электрод; 4 – электрохимическая ячейка, вместимостью 50 см³; 5 – магнитная мешалка.

Рисунок 9. Установка для прямых потенциометрических измерений.

2. Рабочий раствор, $c(1/l \text{ NaNO}_3) = 0,1000 \text{ моль/дм}^3$;

3. Алюмокалиевые квасцы, раствор, $\omega = 1\%$;
4. Пипетка Мора 10,0 см³, 1 шт.;
5. Пипетка Мора 20,0 см³, 1 шт.;
6. Мерные колбы 100,0 см³, 3 шт.;
7. Мерные колбы 50,0 см³, 6 шт.

Ход работы

Приготовление экстракта растительного материала

В стеклянный стаканчик объемом 50 мл берут навеску растительного материала массой 12,5 г и переносят ее в стакан гомогенизатора, смывая остатки измельченного материала 1 %-м раствором алюмокалиевых квасцов (объем раствора алюмокалиевых квасцов составляет 50 мл), и гомогенизируют в течение 1 мин при 6000 об/мин.

При отсутствии гомогенизатора навеску растирают в ступке до однородной массы, переносят в плоскодонные колбы с притертыми крышками и перемешивают на встряхивателе в течение 3 мин.

Содержание нитратов в полученной суспензии определяют в трех-кратном измерении.

Работа с прибором

Индикаторный электрод и электрод сравнения поместить в потенциометрическую ячейку со стандартным раствором и подключить к иономеру. Включить иономер в режим измерения потенциала.

Определение нитрат-ионов методом градуировки электрода:

В потенциометрическую ячейку помещают 20,0 см³ контрольного раствора, измеряют pNO_3 , измерения повторяют 5 раз, результаты фиксируют в таблице 93. Сравнивают полученные значения с заявленными с помощью простого теста Стьюдента.

Определение нитрат-ионов методом градуировочного графика:

1. Приготовление серии стандартных растворов.

Стандартные растворы готовят из стандартного раствора в результате последовательного разбавления рабочего раствора. Для этого в колбу

вместимостью 100,0 см³ помещают аликвоту часть рабочего раствора в соответствие с таблицей 91 и доводят раствор до метки дистиллированной водой.

Приготовление растворов стандартной серии

Таблица 91

№ раствора	$c(1/1NO_3^-)$, моль/дм ³	pNO_3	$V_{ал}$, см ³	$V_{колб}$, см ³
1 (рабочий раствор)	0,1	1	-	-
2	0,01	2	10,0 (раствора №1)	100,0
3	0,001	3	10,0 (раствора №2)	100,0
4	0,0001	4	10,0 (раствора №3)	100,0

Таким образом, приготовленный раствор №2 используется для приготовления раствора №3 и так далее.

2. Градуировка электрода.

В потенциометрическую ячейку поочередно, начиная с самого разбавленного (раствор №4), помещают 20,0 см³ стандартного раствора, и при перемешивании измеряют потенциал индикаторного электрода относительно вспомогательного электрода. Запись величины потенциала производят после того, как значение перестает изменяться в пределах ± 1 мВ.

Измеряя потенциал каждого стандартного раствора, вводят величины pNO_3 и величины E (мВ) в память прибора, следуя инструкции по эксплуатации.

Перед каждым измерением электроды тщательно промывают дистиллированной водой до $pNO_3=6$. Затем переходят к более концентрированному раствору №3 и так далее.

На основе полученных данных строят градуировочный график зависимости $E = f(pNO_3)$.

3. Контрольная задача

Помещают в потенциометрическую ячейку 20 см³ контрольного раствора, повторяют измерения 5 раз. Находят искомую концентрацию по градуировочному графику.

Определение нитрат-ионов методом добавок (графически):

В 6 мерных колб вместимостью 50,0 см³ добавляли по 1,0 см³ анализируемого раствора с неизвестной концентрацией нитратов. Начиная со второй колбы помещают аликвоту часть рабочего раствора в соответствии с таблицей 92 и доводят объемы всех растворов до метки 1%-ным раствором алюмокалиевых квасцов. В потенциометрическую ячейку переносят 20 см³ раствора, начиная с самого разбавленного раствора №1, и измеряют потенциал. Перед каждым измерением электроды тщательно промывают дистиллированной водой до $pNO_3=6$. Затем переходят к более концентрированному раствору №2 и так далее.

Подготовка анализируемых образцов к анализу по методу добавок.

Таблица 92

№ раствора	$c(1/1NO_3^-)_{доб}$, моль/дм ³	$(pNO_3)_{доб}$	Объем аликвоты $V_{ал}$, см ³	$V_{колб}$, см ³
1	0	0	0,0	50,0
2	$2 \cdot 10^{-4}$	3,7	0,1	50,0
3	$1 \cdot 10^{-3}$	3,0	0,5	50,0
4	$2 \cdot 10^{-3}$	2,7	1,0	50,0
5	$5 \cdot 10^{-3}$	2,3	2,5	50,0
6	$1 \cdot 10^{-2}$	2,0	5,0	50,0

На основе полученных данных строят градуировочный график зависимости $E = f(pNO_3)_{доб}$. С помощью параметров линейной регрессии определяют концентрацию нитрат-ионов в исследуемом образце.

Оформление работы.

1. Цель и задачи работы.
2. Ход определения.
 - 2.1. Работа с прибором. Схема установки.

2.2. Определение нитратов методом градуировки электрода.

Экспериментальные данные определения нитратов в исследуемом образце с использованием методики градуировки электрода

Таблица 93

№ промера	1	2	3	4	5	S	s _r , %
pNO_3							
$c(1/1NO_3^-)$, моль/дм ³							

Проводят расчёт результатов определения NO_3^- (точность расчётов – 4 значащих цифры, для массы 0,0001 г), приводят все расчётные формулы и расчёты, все значения записывают в таблицу 98.

2.3. Определение нитратов методом градуировочного графика.

Ход приготовления стандартных растворов.

Данные для построения градуировочного графика

Таблица 94

№ Раствора	pNO_3	$c(1/1NO_3^-)$, моль/дм ³	Потенциал, мВ				s(E)
			E ₁	E ₂	E ₃	$\bar{E} \pm \Delta E$	
1	1	0,1					
2	2	0,01					
3	3	0,001					
4	4	0,0001					
Контрольная задача, X							

С помощью компьютерных программ Microsoft Excel или Sigmaplot определяют параметры линейной регрессии (таблица 95).

Параметры линейной регрессии $E = f(pNO_3)$.

Таблица 95

Прибор	s _a	s _b	$\bar{a} \pm \Delta a$	$\bar{b} \pm \Delta b$	R	Крутизна электродной функции, мВ
--------	----------------	----------------	------------------------	------------------------	---	-------------------------------------

						$\bar{S} \pm \Delta S,$	Паспортное значение
							58±6

Рассчитывают крутизну электродной функции, учитывая, что $\bar{S} = \bar{a} = 59/n$, сравнивают с паспортными данными.

Рассчитывают относительную погрешность определения крутизны электродной функции по формуле:

$$D_{\%} = \frac{|S_{\text{найд}} - S_{\text{пасп}}|}{S_{\text{пасп}}} \cdot 100\%$$

С помощью параметров линейной регрессии проводят расчёт результатов определения NO_3^- в анализируемом растворе (точность расчётов – 4 значащих цифры, для массы 0,0001 г), приводят все расчётные формулы и расчёты, все значения записывают в таблицу 98.

2.4. Определение нитратов методом добавок.

Данные для построения градуировочных зависимостей.

Таблица 96

№ Раствора	$c(1/1NO_3^-)_{\text{доб}},$ моль/дм ³	$(pNO_3)_{\text{доб}}$	Потенциал, мВ				s(E)
			E ₁	E ₂	E ₃	$\bar{E} \pm \Delta E$	
1	0	0					
2	$2 \cdot 10^{-4}$	3,7					
3	$1 \cdot 10^{-3}$	3,0					
4	$2 \cdot 10^{-3}$	2,7					
5	$5 \cdot 10^{-3}$	2,3					
6	$1 \cdot 10^{-2}$	2,0					

С помощью компьютерных программ Microsoft Excel или Sigmaplot определяют параметры линейной регрессии (таблица 97).

Параметры линейной регрессии $E = f(pNO_3)$.

Таблица 97

Прибор	S_a	S_b	$\bar{a} \pm \Delta a$	$\bar{b} \pm \Delta b$	R	Крутизна электродной функции, мВ	
						$\bar{S} \pm \Delta S,$	Паспортное значение
							58±6

Рассчитывают крутизну электродной функции, учитывая, что $\bar{S} = \bar{a} = 59/n$, сравнивают с паспортными данными.

Рассчитывают относительную погрешность определения крутизны электродной функции по формуле:

$$D_{\%} = \frac{|S_{\text{найд}} - S_{\text{пасп}}|}{S_{\text{пасп}}} \cdot 100\%$$

Проводят расчёт результатов определения NO_3^- в анализируемом растворе, исходя из параметров линейной регрессии, приравнивая $E=0$ (точность расчётов – 4 значащих цифры, для массы 0,0001 г). Приводят все расчётные формулы и расчёты, все значения записывают в таблицу 98.

Метод градуировки электрода	$c(NO_3^-),$ моль/дм ³	$T(NO_3^-),$ мг/см ³	$n(NO_3^-),$ моль	$\nu(NO_3^-),$ моль	$m(NO_3^-),$ мг	D, %
	$c(NaNO_3),$ моль/дм ³	$T(NaNO_3),$ мг/см ³	$n(NaNO_3),$ моль	$\nu(NaNO_3),$ моль	$m(NaNO_3),$ мг	
Метод градуировочного	$c(NO_3^-),$ моль/дм ³	$T(NO_3^-),$ мг/см ³	$n(NO_3^-),$ моль	$\nu(NO_3^-),$ моль	$m(NO_3^-),$ мг	D, %
	$c(NaNO_3),$ моль/дм ³	$T(NaNO_3),$ мг/см ³	$n(NaNO_3),$ моль	$\nu(NaNO_3),$ моль	$m(NaNO_3),$ мг	

Метод добавок	$c(NO_3^-)$, моль/дм ³	$T(NO_3^-)$, мг/см ³	$n(NO_3^-)$, моль	$\nu(NO_3^-)$, моль	$m(NO_3^-)$, мг	D, %
	$c(NaNO_3)$, моль/дм ³	$T(NaNO_3)$, мг/см ³	$n(NaNO_3)$, моль	$\nu(NaNO_3)$, моль	$m(NaNO_3)$, мг	

Рассчитывают относительную погрешность определения NO₃⁻ по массе

$$D = \frac{|m_{\text{найд}} - m_{\text{теор}}|}{m_{\text{теор}}} \cdot 100\%$$

Лабораторная работа 15. Определение железа в пробах природных и сточных вод методом атомно-абсорбционной спектроскопии

Методика предназначена для выполнения измерений массовой концентрации железа в пробах природных и сточных вод в диапазоне измерений от 0,05 до 10 мг/дм³. Определение производят методом беспламенной атомно-абсорбционной спектрометрии с использованием спектрометра «МГА-915». Содержание элементов рассчитывается автоматически по предварительно установленной градуировочной зависимости.

Цель работы. Определение массовой концентрации железа в пробах природных и сточных вод с использованием атомно-абсорбционного спектрометра с электротермической атомизацией модификаций МГА-915.

Материалы и средства исследования

1. Атомно-абсорбционный спектрометр с электротермической атомизацией «МГА-915»;
2. Автоматический дозатор переменного объема 5 – 50 мм³;
3. Колбы конические термостойкие вместимостью 100 см³;
4. Колбы мерные вместимостью 50 см³;
5. Стекланные воронки;
6. Пипетки градуированные вместимостью 2 см³ и 5 см³;
7. Электроплитка бытовая;
8. Фильтры обеззоленные «синяя лента»;

Реактивы:

1. Вода деионизованная или бидистиллированная;
2. Кислота азотная, ос.ч.;
3. Перекись водорода (30%), ос.ч.

Ход работы

Отбор проб природной воды производится по ГОСТ 17.1.5.05-85, сточной – по ПНД Ф 12.15.1-08. Объем отбираемой пробы составляет не менее 250 см³.

1. Подготовка проб к анализу

Одновременно готовят две пробы воды. Отмерить 50 см³ анализируемой воды и перенести в конические термостойкие колбы вместимостью 100 см³. К аликвоте анализируемой пробы добавить 2,5 см³ концентрированной азотной кислоты и 1,5 см³ перекиси водорода, колбы накрыть стеклянными воронками и нагреть на плитке в течение двух часов, не допуская кипения. Упаренные холодные растворы перенести в мерные колбы вместимостью 50 см³ и довести раствор до метки деионизованной или бидистиллированной водой. Растворы отфильтровать и отбросить первые порции фильтрата (10 см³).

Две холостые пробы приготовить и проанализировать одновременно с пробами анализируемой воды.

2. Проведение отжига графитовой кюветы

Провести отжиг графитовой кюветы при выбранных условиях определения элемента (таблица 1) без ввода пробы.

Таблица 1. Условия определения элементов

Элемент	Модификатор	Длина волны, нм	Сушка		Пиролиз 1		Пиролиз 2		Атомизаци я		Очистка	
			Время, с	Температура, °C	Время, с	Температура, °C	Время, с	Температура, °C	Время, с	Температура, °C	Время, с	Температура, °C
Fe	-	372,0	30 - 40	120	20 - 30	750	-	-	2	2450	2	2750
	-	372,0	30 - 40	120	20 - 30	750	5	150	2	2450	2	2750

		0	40		30			0				0
--	--	---	----	--	----	--	--	---	--	--	--	---

3. *Контроль холостой пробы*

Измерить массовую концентрация железа в каждой холостой пробе и рассчитать среднее арифметическое значение (C_0). Объем пробы, вводимый в графитовую кювету атомизатора, составляет 40 мм³.

Холостая проба считается приемлемой, если измеренное значение массовой концентрации элемента не превышает 30 % нижней границы диапазона измерений.

4. *Измерение массовой концентрации элементов в подготовленной пробе*

Подготовленную пробу объемом от 10 до 40 мм³ (не менее трех раз) ввести в графитовую кювету спектрометра и провести измерительный цикл.

Если аналитический сигнал превышает верхнюю границу диапазона градуировочной характеристики, то пробу разбавляют раствором разбавления (0,3 % раствор азотной кислоты) и повторяют измерение. Коэффициент разбавления вычисляют по формуле 1.

$$Q = \frac{V_k}{V_a}; \quad 1$$

где V_k – объем разбавленной пробы, см³; V_a – аликвота подготовленной пробы, взятая для разбавления, см³.

Используя программное обеспечение к спектрометру, рассчитать среднеарифметическое значение массовой концентрации элемента и соответствующее ОСКО. Полученные результаты считают приемлемыми, если ОСКО не превышает 6%.

5. *Обработка результатов измерений*

Массовую концентрацию железа в пробе (X , мг/дм³) вычисляют по формуле 2:

$$X = 0,001 \cdot (C_{изм} - C_0) \cdot Q; \quad 2$$

где $C_{\text{изм}}$ - среднее арифметическое значение массовой концентрации элемента в подготовленной пробе (в исходной или разбавленной), мг/дм³;

C_0 – среднее арифметическое значение массовой концентрации элемента в холостой пробе, мг/дм³;

Q - коэффициент разбавления, вычисленный по формуле (1); если пробу не разбавляли, то $Q = 1$;

0,001 - коэффициент согласования размерности единиц массы.

Оформление работы

Результат измерений представить в виде: $X \pm \Delta$, мг/дм³.

где X – результат измерений массовой концентрации элемента, мг/дм³;

Δ – значение показателя точности измерений (таблица 2).

$$\Delta = \delta \cdot X \cdot 0,01;$$

2

Таблица 2. Значения точности измерений

Элемент	$\pm \delta$, %
Железо (до 0,1 мг/дм ³ вкл.)	30
Железо (свыше 0,1 мг/дм ³)	20

Оформить результаты и сделать выводы по работе.

Контрольные вопросы:

1. Опишите принцип метода атомно-абсорбционной спектроскопии?
2. Какие способы атомизации используются в атомно-абсорбционном анализе?
3. Из каких основных узлов состоит атомно-абсорбционный спектрофотометр? Приведите принципиальную схему атомно-абсорбционного спектрофотометра.

4. Назовите области применения атомно-абсорбционного анализа.

Лабораторная работа №16. Турбидиметрическое определение иона сульфата в водной вытяжке

Сущность метода заключается в осаждении иона сульфата хлористым барием и турбидиметрическом определении его в виде сульфата бария. В качестве стабилизатора взвеси используют поливиниловый спирт или глицерин. Метод не применяется для анализа водных вытяжек, окрашенных органическим веществом.

1. Подготовка к анализу

1.1. Приготовление основного осаждающего раствора с поливиниловым спиртом

Взвешивают 5 г поливинилового спирта и 20 г хлористого бария и помещают в стакан из термостойкого стекла вместимостью 1000 см³. Приливают примерно 800 см³ дистиллированной воды, 60 см³ раствора соляной кислоты концентрации 1 моль/дм³ и нагревают смесь при перемешивании до полного растворения реактивов. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³, доводят объем до метки дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют. Раствор хранят в склянке с притертой пробкой не более 3 мес. В случае помутнения, образования хлопьев, осадка раствор заменяют свежеприготовленным.

1.2. Приготовление рабочего осаждающего раствора с поливиниловым спиртом

В день проведения анализа основной осаждающий раствор разбавляют дистиллированной водой в отношении 2:1.

1.3. Приготовление осаждающего раствора с глицерином

Взвешивают 20 г хлористого бария и помещают в мерную колбу вместимостью 500 см³. Приливают примерно 300 см³ дистиллированной воды и 60 см³ соляной кислоты концентрации 1 моль/дм³. После полного растворения хлористого бария объем раствора доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Приготовленный раствор смешивают с глицерином в отношении 1:1. Раствор хранят не более 3 мес.

1.4. Приготовление раствора сернокислого натрия концентрации 0,2 моль/дм³ (0,2 н.)

14,2 г безводного сернокислого натрия, высушенного до постоянной массы при температуре 100-105°C, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и растворяют в дистиллированной воде, доводя объем раствора до метки. Приготовленный раствор тщательно перемешивают. В случае помутнения, образования хлопьев, осадка раствор заменяют свежеприготовленным.

1.5. Приготовление растворов сравнения

В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают указанные в таблице объемы раствора, приготовленного по п. 1.4. Объемы растворов доводят до меток дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Растворы хранят в склянках с притертыми пробками не более 1 мес.

Характеристики раствора	Номер градуировочного раствора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Объем раствора, см ³	0	1	2	4	6	8	10	12
C (1/2 SO ₄ ²⁻) в град. растворах, моль/дм ³	0	0,002	0,004	0,008	0,012	0,016	0,020	0,024
C (1/2 SO ₄ ²⁻) на 100 г почвы, ммоль	0	1	2	4	6	8	10	12

1.6. Приготовление щелочного раствора ЭДТА

30 г ЭДТА растворяют в 1000 см³ раствора гидроокиси натрия с массовой долей 0,5 %.

Раствор используют для мытья кювет фотоэлектроколориметра и пробирок, в которых проводят определение. Кюветы и пробирки помещают в раствор на 1 ч.

2. Проведение анализа

2.1. Приготовление вытяжки из почвы

Для анализа используют фильтраты вытяжек, приготовленных по ГОСТ 26423-85.

2. 2. Определение иона сульфата

Отбирают дозатором или пипеткой по 1 см³ анализируемых вытяжек и растворов сравнения в пробирки. К пробам приливают дозатором или из бюретки по 10 см³ рабочего осаждающего раствора, приготовленного по п. 1.2 или п. 1.3 и тщательно перемешивают. Фотометрирование взвеси проводят не ранее чем через 10 мин после прибавления осаждающего раствора, в кювете с толщиной просвечиваемого слоя 10 мм относительно раствора сравнения № 1, при длине волны 520 нм или используя светофильтр с максимумом пропускания в области 500-540 нм. Перед помещением в кювету фотоэлектроколориметра содержимое пробирки необходимо взболтать. Взвесь оптически устойчива в течение 7 ч.

2.3. Обработка результатов

По результатам фотометрирования растворов сравнения строят градуировочный график. По оси абсцисс откладывают концентрации иона сульфата в растворах сравнения в пересчете в миллимоли в 100 г почвы, а по оси ординат - соответствующие им показания фотоэлектроколориметра.

Количество эквивалентов сульфата в анализируемой почве определяют непосредственно по градуировочному графику. Если результат определения выходит за пределы градуировочного графика, определение повторяют, предварительно разбавив вытяжку дистиллированной водой. Результат, найденный по графику, увеличивают во столько раз, во сколько была разбавлена вытяжка.

Массовую долю иона сульфата в анализируемой почве (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X=C \cdot 0,048$$

где C - количество эквивалентов иона сульфата в анализируемой почве, ммоль в 100 г;

0,048 - коэффициент пересчета в проценты.