МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ИОНОМЕТРИИ И ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА СОДЕРЖАНИЕ НАТРИЯ, КАЛИЯ, КАЛЬЦИЯ И ХЛОРА

Методические рекомендации

Казань — 1988

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР

"СОГЛАСОВАНО"

Заместитель начальника Главного управления научных учреждений
А.М.Науменко
"30" июня 1988г.

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель министра
В.Г.Панов
"30" июня 1988г.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ИОНОМЕТРИИ И ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА СОДЕРЖАНИЕ НАТРИЯ, КАЛИЯ, КАЛЬЦИЯ И ХЛОРА

Методические рекомендации
(с правом переиздания местными органами здравоохранения)

КАЗАНЬ - 1988

Методы ионометрии и пламенной фотометрии позволяют быстро и точно определить содержание ионов натрия, калия, кальция и хлора в питательных средах. Второй метод определяет содержание макроэлементов, находящихся и в недиссоциированном состоянии, выявляет в средах дополнительные источники этих элементов.

При разработке питательных сред и их контроле необходимы сведения о минеральном составе питательных основ, отдельных ингредиентов её, самих питательных сред. В действующих "Методических указаниях по применению физико-химических методов контроля питательных сред" МЗ СССР (М., 1977) приводится методика определения хлорида натрия. Настоящее дополнение составлено с целью расширения набора методик для аналитического контроля питательных сред, в частности, определения содержания отдельно натрия , калия, кальция, хлора. Определение этих элементов возможно с помощью методов потенциометрии с ионоселективными электродами и пламенной фотометрии. Применение этих методов в микробиологии мало освоено,в то время как они являются специфичными, информативными, простыми и доступными экспресс-методами.

Настоящие дополнения к методическим указаниям по определению химического состава (ПС) обоснованы результатами сравнительного изучения описанных методов с известным, используемым для определения хлорида натрия в питательных средах с помощью азотнокислого серебра и роданида аммония, выявляющего общее содержание хлорид-ионов в растворе независимо от присутствия одного соединения хлора или нескольких с катионами натрия,калия,магния и др. Возможность применения ионометрии и пламенной фотометрии для определения ионов натрия,калия,хлора и кальция в питательных средах изучена на наборе широко применяемых сред на основе перевара мяса по Хоттингеру и образцах экспериментальных сред.

Предлагаемые методики позволили определить присутствие ионов натрия,калия,хлора в средах и их компонентах,вести целенаправленное конструирование среды.С помощью этих двух методов получены количественные данные отдельно ионов натрия,калия,хлора, находящихся как в диссоциированном,так и в "связанном" состоянии.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ НАТРИЯ И ХЛОРА МЕТОДОМ ИОНОМЕТРИИ

Ионометрия - раздел потенциометрии, использующей в качестве аналитических детекторов ионоселективные электроды (ИСЭ). ИСЭ - представляют собой электрохимические полуэлементы, для которых разность потенциалов на границе раздела фаз "электрод-раствор" зависит от концентрации определяемого иона в растворе. Катионочувствительные (Na^+) стеклянные электроды селективны (по отношению к другим катионам), устойчивы в редокс-системах, на них не воздействуют белки, они индифферентны к анионам. Анионочувстви - тельные электроды - индифферентны к катионам.

Для определения концентрации ионов с помощью ИСЭ используют прямую потенциометрию в среде с высокой ионной силой (методы градуировочного графика и стандартных добавок) и потенциометрическое титрование. Техника измерения аналогична измерению pH: необходимы потенциометр (pH-метр) и электрод сравнения. ИСЭ выпускает ЗИП в г.Гомеле и НПО "Аналитприбор" г.Тбилиси.

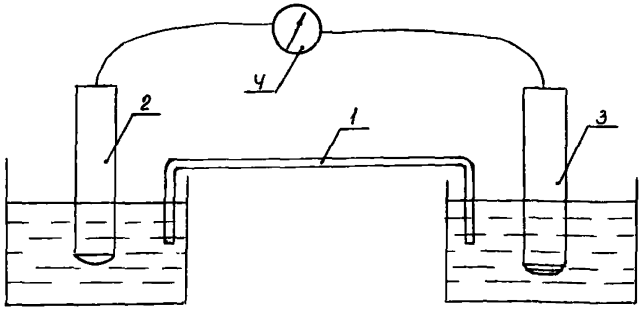
Определение ионов хлора и натрия методом двойной стандартной добавки

Методика определения ионов хлора и натрия в сложных микробиологических питательных средах, содержащих высокие концентрации посторонних компонентов, основана на измерении потенциала селективного электрода до и после введения в анализируемый раствор двух идентичных порций (добавок) раствора с известной концентрацией определяемого иона.

Анализ проводят с использованием натриевого (ЭСЛ-5II-05) и хлоридного (ЭМ-Cl^--01) селективных электродов. Измерение сигнала индикаторного электрода проводят на потенциометре типа pH-I2I и других типов относительно хлорсеребряного электрода сравнения (ЭВЛ-IМ3), соединенного с исследуемым раствором посредством элек-

тролитического моста, заполненного 3% гелем агар-агара с 10% раствором KNO_3 , при перемешивании раствора. Для приготовления геля навески агар-агара (0,75 г) и KNO_3 2,5 г, помещают в 25 мл H_2O и смесь оставляют для набухания, затем при интенсивном перемешивании доводят до кипения и горячий раствор заливают в трубку, избегая появления пузырьков воздуха. Постоянство ионной силы в системе осуществляется введением 2М раствора нитрата аммония к исследуемому раствору (рис.I).

Рис. I. Схема измерительной ячейки.



I - солевой мостик (электролитический мостик)

2 - электрод сравнения

3 - хлоридный (натриевый) селективный электрод

4 - pH-метр

Определение ионов Na^+

Подготовка электрода к работе.

Перед проведением серии анализов по определению ионов Na^+ в питательных средах Na^- -селективный электрод готовят к работе следующим образом:

I) выдерживают электрод в 10^{-1}М растворе $NaCl$ в течении суток для приведения мембраны в рабочее состояние;

2) по точной навеске готовят исходный I М раствор $NaCl$ (5,85 г в I00 мл), затем для калибровки электрода методом последовательного разбавления получают рабочие растворы следующих концентраций:

Таблица I. Калибровочные растворы для натриевого электрода

конц. $NaCl$, М	$I \cdot 10^{-3}$	$I \cdot 10^{-2}$	$I \cdot 10^{-1}$	I,0
$pNa = -lg a_{Na}$	3,02	2,04	I,II	0,22

Примечание: Таблица приведена из технического описания и инструкции по эксплуатации "pH-метр - милли вольтметр pH-I2I".

3) в каждом из приготовленных растворов, начиная с более разбавленного, измеряют значение потенциала индикаторного электрода (Na^+) относительно электрода сравнения и строят график зависимости потенциала электрода (Е) натрий ионов ($E - pNa$) в координатах Е - р Na;

4) определяют наклон (S) графика, имеющего вид прямой линии, по соотношению $S = \frac{E_1 - E_2}{pNa_1 - pNa_2}$. Если S близко к теоретическому значению (59,I6), то электрод пригоден к работе. Проверка работы электрода и построение градуировочного графика проводится один раз перед проведением серийных анализов образцов с близким содержанием определяемых компонентов. При постоянной эксплуатации электрода его характеристику достаточно проверять один раз в месяц по двум значениям концентраций в средней области градуировочного графика. При длительном хранении электрода подготовку его к работе необходимо начинать с "замачивания" мембраны.

Градуировочный график необходим для приближенного определения содержания ионов в исследуемом образце, а также для выбора концентрации и величины вводимой добавки стандартного раствора.

Ход анализа.

Навеску сухой среды или точно измеренный объем исследуемой жидкой или растопленной агаризованной питательной среды разбавляют дважды перегнаной водой в мерной колбе, тщательно перемешивают. Размер навески и кратность разбавления H_2O в мерной колбе подбирается в зависимости от содержания ионов Na^+ в исследуемом образце. В случае изучения агаризованной среды используют для разбавления подогретую воду до 45 - 50°С. Пипеткой отбирают 5 мл полученного раствора, помещают в стаканчик, прибавляют равный объем 2М NH_4NO_3, погружают Na -селективный электрод. 2М раствор нитрата аммония добавляют к раствору исследуемого образца в измерительной ячейке для поддержания постоянной ионной силы. Связь исследуемого раствора с раствором электрода сравнения осуществляют посредством электролитического моста. Раствор перемешивают с помощью магнитной мешалки. Отсчет значений потенциала E_I, мВ по шкале прибора производят через 1-2 мин. после погружения индикаторного электрода. Затем пипеткой вводят добавку $V_{ст}$ стандартного раствора $C_{ст}$ $NaCl$ 1 М (чтобы изменением объема можно было пренебречь, вводимая добавка не должна превышать 0,5 мл, а концентрация добавляемого раствора должна быть на 2 порядка больше исследуемого). Фиксируют значение E_2, мВ, введение добавки стандартного раствора должно вызвать изменение потенциала не менее, чем на 30-40 мВ. Затем вводят в исследуемый раствор вторую идентичную добавку и измеряют E_3, мВ.

Расчет содержания анализируемого иона проводят следующим образом:

вычисляют разность значений потенциалов между первоначальным и после введения каждой добавки: $E_I - E_2$; $E_I - E_3$

находят их отношение

$$R = \frac{E_1 - E_3}{E_1 - E_2}$$

пользуясь табл.3 определяют, какое значение $A = \frac{C_x}{\Delta C}$ соответствует вычисленному значению R ; преобразуют выражения

относительно $C_x = A \cdot \Delta C$

подставляют $\Delta C = \frac{C_{ст} \cdot V_{ст}}{V_{пробы}}$

тогда C_x Моль/л $= A \frac{C_{ст} \cdot V_{ст}}{V_{проб.}}$

$C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора, используемого в виде добавки, моль/л;

$V_{ст}$ – объем добавки, мл;

$V_{пробы}$ – объем пробы, взятого для анализа, мл.

Конечный результат в г/л определяют с учетом разбавления исходного образца:

$$C_{иссл} = \frac{C_x \cdot M \cdot V_{м.к.}}{V_{иссл.} \cdot 1000} \cdot 1000 \quad г/л$$

или величины навески, растворенной в мерной колбе

$$C_{иссл.} = \frac{C_x \cdot M \cdot V_{м.к.}}{a \cdot 1000} \cdot 1000 \quad г/л$$

где; $V_{м.к.}$ – объем мерной колбы, мл;

$V_{иссл.}$ – объем пробы, взятой для разбавления, мл;

a – навеска образца, г;

M – мольная масса определяемого иона (Na = 23,0 г);

или в %

$$C_{иссл.} = \frac{C_x \cdot M \cdot V_{м.к.}}{V_{иссл.} \cdot 1000} \cdot 100 \quad \%$$

Определение ионов Cl^-

Подготовка электрода к работе

I. Выдерживают хлорид-селективный электрод в 10^{-3} М растворе KCl в течение суток для приведения мембраны в рабочее сос-

тояние.

2. По точной навеске готовят исходный раствор KCl I М растворением 7,45 г реактива в мерной колбе емкостью 100 мл.

3. Последовательным разбавлением в мерной колбе емкостью 25 мл готовят серию калибровочных растворов KCl следующих концентраций:

Таблица 2. Калибровочные растворы для хлоридного электрода

конц. KCl, М	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$
$pCl = -lg a_{Cl^-}$	1,11	2,04	3,02	3,30	3,50

Примечание: Таблица приведена из паспорта электрода мембранного ЭМ-Cl-01.

Калибровочные таблицы I и 2 указывают область концентраций, в которой работает данный электрод. Таблицы дают конкретные значения концентраций калибровочных растворов, которые необходимы для проверки работы электродов.

4. В каждом из приготовленных растворов, начиная с более разбавленного, измеряют значение потенциала. Для этого калибровочный раствор помещают в стаканчик, погружают хлорид-селективный электрод. Электрод сравнения помещают в другой стаканчик с насыщенным раствором KNO_3. Оба раствора соединяют электролитическим ключом, электроды подключают к клеммам измерительного прибора.

5. По значениям Е, измеренным в растворах с различной концентрацией KCl, строят график зависимости Е, мВ – pCl. Находят крутизну электродной характеристики $S = \frac{E_1 - E_2}{pCl_1 - pCl_2}$; если соблюдается прямолинейная зависимость Е от pCl и значение S близко к теоретическому (59,16), электрод пригоден к работе.

Ход анализа.

Методика проведения анализа по определению содержания Cl^- - ионной аналогична описанной ранее. Молярная масса (М) определяемого иона Cl^- = 35,5 г. В качестве стандартного раствора используют I М KCl .

Если образец сухой, то берется навеска среды и растворяется в мерной колбе определенного объема. Величина навески и кратность разбавления водой подбирается в каждом конкретном случае в зависимости от содержания ионов Na^+ или Cl^- в образце. При этом руководствуются тем, что потенциал, измеренный в исследуемом растворе, должен лежать на среднем участке калибровочного графика. Работа в этой области чувствительности электрода дает наиболее точные результаты. В качестве примера приведем методики анализа жидкого образца (бульона) и сухой пробы питательной среды.

Анализ бульона на содержание Cl^- - ионов

I мл пробы растворяем в мерной колбе емкостью I0 мл. Отбираем 5 мл, помещаем в стаканчик, прибавляем 5 мл 2М NH_4NO_3 , погружаем индикаторный электрод. Исследуемый раствор соединяем с электродом сравнения посредством электролитического ключа. Электроды подключаем к клеммам прибора рН-I2I. Измеряем значение потенциала E_I. Делаем две идентичные добавки ($V_{ст}$) стандартного $C_{ст}$ IM KCl по 0,3 мл, каждый раз измеряя значения потенциала E_2 и E_3.

Результаты измерений заносим в таблицу:

V мл KCl IM	E, мВ
-	236
0,3	I96
0,3	I79

Производим вычисления:

$E_I - E_2 = 236 - I96 = 40$ мВ

$E_I - E_3 = 236 - I79 = 57$ мВ

$$R = \frac{E_I - E_3}{E_I - E_2} = \frac{57}{40} = 1{,}42$$

По таблице 3 находим, что R = 1,42 соответствует значение $A = \frac{C_x}{\Delta C}$ = 0,373; подставляем значение ΔC и решаем отно-но

$$C_x = A\,\frac{C_{ст} \cdot V_{ст}}{V_{иссл}}; \quad C_x = 0{,}373 \cdot \frac{1 \cdot 0{,}3}{10} = 0{,}011 \text{ моль/л}$$

Учитывая разбавление исходной пробы ($V_{м.к.}$) выразим результат определения Cl^- ионов в г/л:

$$C_{иссл} = \frac{C_x \cdot M_{Cl^-} \cdot V_{м.к.}}{V_{иссл}} = \frac{0{,}011 \cdot 35{,}5 \cdot 10}{1} = 3{,}9 \text{ г/л}$$

или в %

$$C_{иссл} = \frac{C_x \cdot M_{Cl^-} \cdot V_{м.к.}}{V_{иссл} \cdot 1000} \cdot 100\% = 0{,}39\%$$

<u>Анализ сухой пробы питательной среды</u>

Навеску пробы[x)] 0,65 г растворяем в мерной колбе емкостью 10 мл. Отбираем 5 мл раствора, помещаем в стаканчик, прибавляем 5 мл 2М NH_4NO_3. Дальнейший ход анализа аналогичен описанному выше.

Приводим результаты измерений:

V мл KCl 1М	E, мВ
–	266
0,4	231
0,4	216

Производим вычисления:

$$E_I - E_2 = 266 - 231 = 35$$

$$E_I - E_3 = 266 - 216 = 50$$

$$R = \frac{E_I - E_3}{E_I - E_2} = \frac{50}{35} = 1{,}43$$

По таблице 3 находим, что R = 1,43 соответствует значение $A = \frac{C_x}{\Delta C}$ = 0,399, подставляем значение ΔC и решаем относительно

$$C_x = A\,\frac{C_{ст} \cdot V_{ст}}{V_{иссл}}; \quad C_x = 0{,}399\,\frac{1 \cdot 0{,}4}{10} = 0{,}016 \text{ моль/л}$$

---

x) навеску берут в соответствии с рецептурой из расчета на 100 мл изучаемой среды.

Учитывая величину навески (а, г) и объем колбы ($V_{м.к.}$), используемый для её растворения, выразим результат определения Cl^- ионов в г/л:

$$C_{иссл} = \frac{C_x \cdot M_{Cl^-} \cdot V_{м.к.}}{a} = \frac{0,0I6 \cdot 35,5 \cdot I0}{0,65} = 8,7 \text{ г/л}$$

или в % $$C_{иссл} = \frac{C_x \cdot M_{Cl^-} \cdot V_{м.к.}}{a \cdot I000} \cdot I00\% = \frac{0,0I6 \cdot 35,5 \cdot I0}{0,65 \cdot I000} \cdot I00 = 0,87\%$$

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАТРИЯ, КАЛИЯ И КАЛЬЦИЯ МЕТОДОМ ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ

Пламенная фотометрия, является разновидностью эмиссионного спектрального анализа, широко применяется в клинических лабораториях для определения щелочных и щелочно-земельных металлов в биологических средах и тканях. Метод основан на измерении интенсивности излучения соответствующих элементов. Анализируемый раствор в виде мелких брызг (аэрозоля) с помощью распылителя вводят в пламя горелки. Излучение определяемого элемента отделяют посредством светофильтров (монохроматора) от других и направляют на фотоэлемент. Возникающий при этом фототок измеряют микроамперметром. Количественное определение натрия, калия и кальция в растворах проводят на пламенном фотометре – ФПЛ-I, функциональная схема которого представлена на рис.2. Метод надежнее химического, особенно при определении малых концентраций и одновременном присутствии нескольких элементов. Нижний предел определения: а) натрия и калия – 0,5 мг/л, для кальция – 5,0 мг/л. Верхний предел всех элементов составляет I00 мг/л, расход анализируемого раствора до 5 мл/мин. Продолжительность измерения 30 секунд.

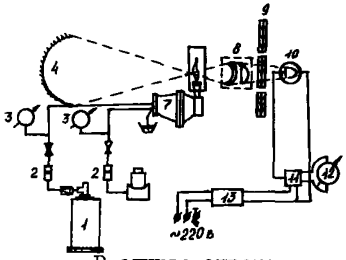
Приборы и реактивы: пламенный фотометр ФПЛ-I, стандартные растворы калия, натрия и кальция, мерные колбы вместимостью 50 и I00, градуированные пипетки на I,0 и 5,0 мл, испытуемые вещества, дистиллированная вода.

Таблица 3.*) Расчет анализа по методу двойных стандартных добавок (по данным фирмы "Orion")

R	$A=\frac{C_x}{aC}$	R	$A=\frac{C_x}{aC}$	R	$A=\frac{C_x}{aC}$	R	$A=\frac{C_x}{aC}$
I,270	0,I00	I,495	0,600	I,620	I,2I3	I,720	2,I26
I,280	0,II3	I,500	0,6I8	I,625	I,245	I,725	2,I90
I,290	0,I26	I,505	0,637	I,630	I,280	I,730	2,256
I,300	0,I40	I,5I0	0,655	I,635	I,3I5	I,735	2,326
I,3I0	0,I54	I,5I5	0,675	I,640	I,353	I,740	2,397
I,320	0,I70	I,520	0,694	I,645	I,39I	I,745	2,470
I,330	0,I86	I,525	0,7I4	I,650	I,430	I,750	2,549
I,340	0,203	I,530	0,735	I,655	I,469	I,755	2,629
I,350	0,22I	I,535	0,756	I,660	I,5I0	I,760	2,7II
I,360	0,240	I,540	0,778	I,665	I,554	I,765	2,80I
I,370	0,260	I,545	0,80I	I,670	I,598	I,770	2,892
I,380	0,280	I,550	0,823	I,675	I,643	I,775	2,985
I,390	0,302	I,555	0,847	I,680	I,69I	I,780	3,088
I,400	0,325	I,560	0,870	I,685	I,738	I,785	3,I93
I,4I0	0,349	I,565	0,896	I,690	I,787	I,790	3,30I
I,420	0,373	I,570	0,920	I,695	I,840	I,795	3,4I6
I,430	0,399	I,575	0,946	I,700	I,894	I,800	3,536
I,440	0,427	I,580	0,973	I,705	I,948	I,805	3,664
I,450	0,455	I,585	I,000	I,7I0	2,006	I,8I0	3,797
I,460	0,485	I,590	I,029	I,7I5	2,066	I,8I5	3,939
I,470	0,5I6	I,595	I,056				
I,475	0,532	I,600	I,086				
I,480	0,548	I,605	I,II6				
I,485	0,565	I,6I0	I,I47				
I,490	0,582	I,6I5	I,I79				

*) Таблица приведена из Камман К. (Camman K.) – В кн.: Работа с ионоселективными электродами. – М., Мир., I980. – С. 264.

Рис.2. Функциональная схема пламенного фотометра ФПЛ-I

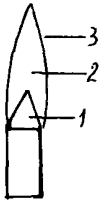


I - баллон с горючим газом; 2 - стеклянные фильтры; 3 - манометры; 4 - зеркало; 5 - компрессор; 6- анализируемый раствор; 7 - смеситель с горелкой; 8 - конденсатор; 9- светофильтры; I0 - фотоэлемент; II - усилитель; I2 - микроамперметр; I3 - стабилизатор.

В случае определения содержания элементов в сухих средах, берут навеску в соответствии с рецептурой из расчета на I00 мл среды и разводят бидистиллированной водой. Агаризованные среды перед исследованием расплавляются, в случае необходимости могут дополнительно разводиться подогретой бидистиллированной водой (t 50 - 55°С).

Анализируемый раствор в виде аэрозоля с помощью распылителя вводится в пламя горелки. Наилучшие показатели получаются при величине внутренних конусов пламени 3 - 4 мм и голубовато-зеленом их цвете (рис.3).

Рис. 3. Форма и строение пламени



I - внутренний конус;
2 - промежуточная зона;
3 - внешний конус

Прямая пропорциональность между интенсивностью спектральной линии и концентрацией анализируемого раствора наблюдается лишь при определенных концентрациях и зависит от природы спектральной

линии и пламени. Возникающий фототок, регистрируемый микроамперметром, является функцией концентрации определяемого элемента. Для выделения спектральной линии измеряемого элемента применяются интерференционные светофильтры со следующими длинами волн в максимуме пропускания: для измерения эмиссии натрия, калия и кальция λ_{max} соответственно равно 589 ± 5; 768 ± 5 и 622 ± ± 5 нм.

Определение натрия, калия и кальция

Для каждого элемента готовится разбавлением исходного раствора дистиллированной водой серия стандартных растворов в мерных колбах вместимостью 50 мл. Исходный стандартный раствор $NaCl$ и KCl содержит 200 мг/л натрия и 200 мг/л калия соответственно. Исходный стандартный раствор хлорида кальция содержит I,0 г/л кальция. Эти растворы используются для приготовления пяти более разбавленных растворов (табл.4).

Таблица 4. Приготовление стандартных растворов

Порядковые номера разведенных стандартных растворов	I	2	3	4	5
Объем исходного стандартного раствора, мл	0,25	0,5	I,0	I,5	2,0
Содержание натрия, калия, мг/л	I	2	4	6	8
Содержание кальция, мг/л	5	I0	20	30	40

Фотометрирование начинают с раствора, имеющего наибольшую концентрацию, чтобы избежать отклонения стрелки микроамперметра за пределы шкалы. Затем последовательно переходят от меньшей концентрации к большей. По полученным данным строят график зависимости $i = f(C)$, где i - сила фототока (мА), f -функция, (С) - концентрация (мг/л).

Перед фотометрированием анализируемых растворов распылитель и газовую горелку тщательно промывают дистиллированной водой в течение 2-3 мин, анализируемые растворы фотометрируют и по графику $i = f(c)$ находят искомые концентрации с учетом разбавления питательных сред.

Методические дополнения составлены сотрудниками:

Казанского химико-технологического института им. С.М.Кирова к.х.н. О.Б.Бибик, к.х.н. Н.В.Тремасовым ,
Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии к.м.н. Г.И.Рузаль, к.м.н. Л.М.Зориной.

Зак. Е-589 Тираж 300
Полиграфический комбинат им. К. Якуба Государственного комитета ТАССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. г. Казань, ул. Баумана, 19

gost.e-ecolog.ru