

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY PATENTU TYMCZASOWEGO

77 983

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 14.06.1972 (P. 156021)

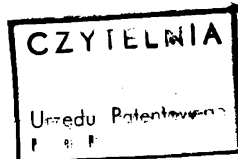
Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 30.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 30.05.1975

Kl. 421, 3/01

MKP G01n 31/00



Twórca wynalazku: Elżbieta Kocwa

Uprawniony z patentu tymczasowego: Politechnika Krakowska, Kraków (Polska)

Sposób ilościowego oznaczania fenolu w wodzie

Przedmiotem wynalazku jest sposób dyfuzyjnego przeprowadzania ilościowego oznaczania fenolu w wodzie z zastosowaniem żelu agarowego, jako środowiska reakcji oznaczania.

Do oznaczania ilościowego fenoli w wodzie stosuje się dotychczas metodę bromometryczną, jodometryczną i wagową, różnego rodzaju metody kolorymetryczne, chromatograficzne i spektrofotometryczne.

Metody bromometryczna, jodometryczna i wagowa wymagają zawsze destylacji badanych prób wody, a w metodach kolorymetrycznych można tylko wyjątkowo opuścić destylację. Destylacja jest czasochłonna i uciążliwa zwłaszcza, gdy laboratorium musi zbadać kilkanaście próbek dziennie.

Metody kolorymetryczne pociągają za sobą żmudne przygotowywanie wzorców, a ponadto nie zawsze dają możliwość bardzo dokładnego odczytu wyników, ponieważ w pewnym stopniu badana woda różni się od nich.

Metody chromatograficzne służą raczej do rozdzielania fenoli z mieszaniny i do ich identyfikacji, gdy zaś wykorzystuje się je do celów ilościowych, są one skomplikowane i pracochłonne, dając błąd wyniku około kilku procent.

Metody spektrofotometryczne wymagają drogiej aparatury, próby wody muszą być w większości destylowane, wymagają też fachowej obsługi.

Powszechnie zostało stwierdzone, iż wyniki analizy tej samej próbki wody, uzyskane różnymi metodami, są przeważnie mało zgodne lub też niezgodne. Dlatego też istnieje zasada podawania przy każdej ekspertyzie metody jaką zastosowano.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu ilościowego oznaczania fenolu w wodzie, taniego i prostego oraz szybkiego i dokładnego, w którym można by pominąć destylację i który nie będzie wymagał stosowania drogiej aparatury ani wysokokwalifikowanej obsługi.

Cechą charakterystyczną sposobu według wynalazku jest to, że ośrodkiem reakcji jest ok. 1,5% żel agarowy, związuje mieszaninę 1:1 dwóch odczynników, 1% roztworu wodnego FeCl_3 i 1% roztworu wodnego $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, a badany roztwór fenolu wprowadza się w ilości 0,25 ml do stalowych cylindrów tak, jak się to stosuje w biologicznej metodzie oznaczania mocy antybiotyków; fenol z roztworu wodnego dyfunduje do żelu agarowego, dając reakcję barwną w postaci okrągłych, granatowych stref, których średnicę można mierzyć

i wyniki odczytać z uprzednio sporządzonej krzywej wzorcowej lub z nomogramu.

P r z y k ł a d I. W zależności od ilości próbek wody zawierających fenole, dostosowuje się objętość potrzebnego roztworu agaru sproszkowanego.

Gdy bada się jedną próbkę wody przygotowuje się w erlenmajerce o pojemności około 50 ml, 1,5 ml agaru w roztworze, zawierającego 0,45 g agaru sproszkowanego w 15 ml wody destylowanej. Po wysypaniu agaru do wody rozpuszcza się go wstawiając erlenmajerkę do wrzącej łaźni wodnej, przetrzymując tam roztwór nadal aby nie zastygł.

Oddzielnie przygotowuje się w probówce 10 ml jednoprocentowego roztworu wodnego FeCl_3 , oraz w drugiej probówce 10 ml jednoprocentowego roztworu wodnego $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Probówki oznacza się napisami: odczynnik 1 i odczynnik 2. Następnie do trzeciej probówki odmierza się pipetą po 7,5 ml odczynnika 1 i odczynnika 2 (= 15 ml), szybko miesza się dokładnie i całość wlewa do erlenmajerki z roztworem agaru około 3%. W ten sposób uzyskuje się później żel agarowy około 1,5%.

Po wymieszaniu pręcikiem szklanym tej mieszaniny i poruszając erlenmajerką, odpipetowuje się po 10 ml roztworu agaru z odczynnikiem i wylewa na 2 płytki Petriego. Do pipetowania używa się pipety 10 ml z odciętym końcem, co znacznie przyspiesza wypływ roztworu agaru i zapobiega jego krzepnięciu. Następnie oczekuje się aż roztwór agaru, z odczynnikiem całkowicie zastygnie.

Przed wylewaniem mieszaniny agaru z odczynnikiem, płytki Petriego umieszcza się na wypoziomowanym blacie stołu celem uzyskania warstwy agaru o równomiernej wysokości.

Przed osadzeniem cylinderków na powierzchni agaru przygotowuje się podkładkę z papieru z rysunkiem. Rysunek, zawiera koło odpowiadające powierzchni dna płytki Petriego, która dzieli się na równe trzy części pod kątem 120° . W środku trzech promieni koła rysuje się trzy kółka odpowiadające średnicy cylinderków. Używając takiej podkładki osadza się trzy cylinderki na powierzchni żelu agarowego.

Do cylinderków wkrapla się po 0,25 ml badanej wody z fenolem, za pomocą pipetki 1-milimetrowej, lub strzykawki tuberkulinowej. Na dwóch płytkach przeprowadza się w ten sposób sześć równoległych oznaczeń, z których wyciąga się średnią z 6 wyników.

Sam żel agarowy z odczynnikiem jest przejrzysty, barwy zielonej. Fenol obecny w cylinderkach reaguje (drogą dyfuzji do żelu agarowego) z odczynnikiem w ten sposób, że naokoło cylinderków powstają regularne, okrągłe strefy, koloru granatowego.

Odczytywanie wyników odbywa się następująco: przy każdym cylinderku mierzy się średnicę powstałej strefy wraz z cylinderkiem, podając wyniki w milimetrach, a używając do tego celu cyrkla i papieru milimetrowego. Stosuje się też oświetlenie dna płytki tak, jak przy biologicznej metodzie oznaczania antybiotyków. Podobnie też jak w tej metodzie wyznacza się krzywą wzorcową lub opracowuje nomogram. Na podstawie wielkości średnicy granatowych stref określa się stężenie fenolu w wodzie. Każde laboratorium powinno sobie opracować krzywą wzorcową lub nomogram, dostosowane do swoich warunków oraz używanych płytek jakie zastosują. Płytki bowiem są różnej średnicy.

W opisanym przypadku stosowano płytki o średnicy 10 cm oraz znane roztwory fenolu w wodzie. Czas odczytywania wyników waha się w granicach 1 godziny do 12 godzin. W zależności od stężenia fenolu w cylinderkach. Barwa stref jest mniej intensywna przy niższych stężeniach fenolu niż przy wyższych. Przy wyższych stężeniach fenolu reakcja występuje szybciej i szybciej osiąga ostrą granicę stref.

P r z y k ł a d II. Gdy zachodzi potrzeba zbadania większej ilości próbek wody, można się ograniczyć do jednej płytki Petriego na jedną próbkę wody, uzyskując w podany wyżej sposób trzy równoległe oznaczenia, z których wyciąga się średnią z trzech wyników.

Badając 20 próbek wody przygotowuje się w dużej erlenmajerce 110 ml roztworu agaru sproszkowanego (3,3 g agaru) 110 ml wody destylowanej w łaźni wodnej jak opisano poprzednio w przykładzie pierwszym. Odczynniki przygotowuje się w odpowiednio większej ilości tak aby uzyskać 110 ml. Mieszaninę odczynników w stosunku 1 : 1 wlewa się szybko do roztworu agaru. Następnie po wymieszaniu, odmierza się za pomocą pipety z odciętym końcem po 10 ml i wlewa na dwadzieścia płytek.

U w a g a: lepiej jest przygotować roztwór agaru z odczynnikiem w nadmiarze, aby mieć do dyspozycji płytki rezerwowe. Dalsze postępowanie jest takie samo jak w przykładzie pierwszym.

P r z y k ł a d III. Celem uzyskania większych stref i większej różnicy w ich wielkości można zastosować dwie warstwy agaru, jak to stosuje się w metodzie biologicznej oznaczanie antybiotyków z tą różnicą, że zamiast 21 ml podkładu agarowego oraz 4 ml górnej warstwy, stosuje się 10 ml podkładu i 5 ml roztworu agaru z odczynnikiem jako górną warstwę.

Dolną warstwę żelu agarowego (podkład) przygotowuje się stosując roztwór agaru około 2% (2 g agaru na 100 ml H_2O dest.) Po jej zupełnym skrzepnięciu wlewa się górną warstwę zawierającą, jak poprzednio opisano,

mieszaninę roztworu około 1,5% agaru wraz z odczynnikami. Dalsze postępowanie przebiega jak w przykładzie I.

Sposób według wynalazku został opracowany w oparciu o eksperymentalne stwierdzenie dyfuzji fenolu (roztworów wodnych) do żelu agarowego, w których reakcja przebiega równomiernie, w różnych kierunkach, tworząc z odczynnikami okrągłe, regularne i barwne strefy o ostro odgraniczonych od podłoża brzegach.

Może znaleźć praktyczne zastosowanie do badania postępu rozkładu fenoli w poszczególnych etapach oczyszczalni biologicznej, określania siły aktywności nowo wyosobnionych szczepów drobnoustrojów rozkładających fenole, laboratoryjnych badań na modelach doświadczalnych, które wymagają masowych oznaczeń zawartości fenolu (w komorach napowietrzania z osadem czynnym lub w złożach biologicznych), ilościowego oznaczania fenoli w wodach i ściekach fenolowych o niskiej ich zawartości, ilościowego oznaczania fenoli w ściekach o wysokich stężeniach po zastosowaniu rozcieńczeń, które sprzyjają czułości reakcji a równocześnie pozwalają niwelować ewentualny wpływ innych niż fenole składników chemicznych.

Stosowanie sposobu według wynalazku jest proste i tanie, nie wymaga destylacji, która jest konieczna przy większości stosowania dotychczasowych sposobów, na jednej płytce Petriego można przeprowadzić trzy równoległe oznaczenia, z których otrzymuje się średnią z trzech wyników. W ciągu jednego dnia można wykonać analizy kilkunastu do kilkudziesięciu próbek wody. Sposób jest czuły, która to czułość polega na tym, że niebieska strefa pojawia się wyraźnie przy zawartości fenolu w próbce = 40 mg f. / l co w przeliczeniu na objętość cylinderka wynosi 0,01 mg/0,25 ml.

Mała objętość próbki badanej wody fenolowej wynosząca 0,25 ml w cylinderku, kwalifikuje sposób dyfuzyjny do grupy mikrometod.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób ilościowego oznaczania fenolu w wodzie na zasadzie dyfuzji, znamienny tym, że stosuje się jako ośrodek reakcji żel agarowy, przygotowany przez zmieszanie w stosunku 1 : 1 około 3% wodnego roztworu agaru z mieszaniną 1% roztworu FeCl_3 i 1% roztworu $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / 1 : 1/, a następnie wprowadza się po 0,25 ml badanego fenolu do ustawionych na powierzchni żelu agarowego trzech cylinderków stalowych, przy czym reakcja fenolu z odczynnikami występuje w postaci okrągłych, granatowych stref, których intensywność barwy i średnica zależne są od stężenia fenolu.

