**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации**

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение вредных веществ в биологических средах

**Сборник методических указаний по методам контроля МУК 4.1.2771—4.1.2774—10**

Издание официальное

**Москва • 2011**

gost.e-ecolog.ru

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение вредных веществ в биологических средах

**Сборник методических указаний по методам контроля МУК 4.1.2771—4.1.2774—10**

ББК 28.072
О60

О60 **Определение** вредных веществ в биологических средах: Сборник методических указаний по методам контроля.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—67 с.

ISBN 978—5—7508—0893—9

Методические указания разработаны Федеральным государственным учреждением науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора.

**ББК 28.072**

ISBN 978—5—7508—0893—9

**© Роспотребнадзор, 2011**
**© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011**

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение массовых концентраций формальдегида, ацетальдегида, пропионового альдегида, масляного альдегида и ацетона в желчи методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Методические указания**
**МУК 4.1.2771—10**

1. Разработаны Федеральным государственным учреждением науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора (авторы Н. В. Зайцева, Т. С. Уланова, Т. Д. Карнажицкая, Н. В. Кислицина, М. В. Антипьева, Л. А. Бельтюкова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 14.10.2010 № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 22 ноября 2010 г.

4. Введены впервые.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
22 ноября 2010 г.
Дата введения: с момента утверждения.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение массовых концентраций формальдегида, ацетальдегида, пропионового альдегида, масляного альдегида и ацетона в желчи методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Методические указания**
**МУК 4.1.2771—10**

## 1. Общие положения и область применения

Свидетельство о метрологической аттестации № 223.1.11.11.95/2009.

1.1. Методические указания по определению массовых концентраций альдегидов (формальдегида, ацетальдегида, пропионового альдегида, масляного альдегида) и ацетона в желчи предназначены для использования территориальными органами и подведомственными организациями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лечебными и научными учреждениями, осуществляющие деятельность в области профпатологии и экологии человека, научно-исследовательскими институтами, занимающимися вопросами гигиены окружающей среды.

1.2. Методические указания разработаны с целью обеспечения контроля за содержанием альдегидов и ацетона в биологических средах у населения, проживающего в районах с повышенным уровнем загрязнения окружающей среды.

1.3. Формальдегид (HCHO), молекулярная масса 30,03.

Формальдегид (муравьиный альдегид, метаналь) – бесцветный газ с резким раздражающим запахом. Температура кипения: –19,2 °С, плотность: 0,8153 г/см$^3$. Хорошо растворим в воде, спиртах и других поляр-

ных растворителях. При низких температурах смешивается с неполярными растворителями (толуолом, диэтиловым эфиром, этилацетатом) [пункт 5 приложения к настоящему МУК]*. Обладает раздражающим, сенсибилизирующим и кожно-резорбтивным действием, оказывает гепатотропный эффект, относится к веществам, обуславливающим канцерогенную опасность [3].

1.4. Ацетальдегид ($CH_3CHO$), молекулярная масса 44,05.

Ацетальдегид (уксусный альдегид) – бесцветная жидкость с удушающим запахом. Температура кипения: 20,16 °С, плотность: 0,778 г/см$^3$. Смешивается во всех соотношениях с водой и большинством органических растворителей [1]. Оказывает наркотическое, раздражающее, мутагенное и канцерогенное действие [3].

1.5. Пропионовый альдегид ($CH_3CH_2CHO$), молекулярная масса 58,08.

Пропионовый альдегид (пропаналь) – бесцветная жидкость с характерным запахом. Температура кипения: 48,8 °С, плотность: 0,8058 г/см$^3$. Растворим в воде, смешивается со многими органическими растворителями [4]. Оказывает наркотическое действие, вызывает изменения со стороны дыхательной системы, паренхиматозных органов, угнетает гемопоэз [3].

1.6. Масляный альдегид ($CH_3(CH_2)_2CHO$), молекулярная масса 72,11.

Масляный альдегид (бутаналь) – бесцветная прозрачная жидкость с резким запахом. Температура кипения: 75,7 °С, плотность: 0,817 г/см$^3$ [2]. Растворим в воде, смешивается со многими органическими растворителями. Оказывает наркотическое, раздражающее и кожно-резорбтивное действие [3].

1.7. Ацетон ($CH_3COCH_3$), молекулярная масса 58,08.

Ацетон (диметилкетон) – летучая бесцветная жидкость с характерным запахом. Температура кипения: 56,1 °С, плотность: 0,792 г/см$^3$ [1]. Смешивается с водой и органическими растворителями (эфиром, хлороформом, бензолом, четыреххлористым углеродом). Обладает наркотическим и кожно-резорбтивным действием, угнетает репродуктивную функцию. Преимущественно действует на центральную нервную систему [3].

1.8. Диапазон измерений массовых концентраций альдегидов и ацетона приведен в табл. 1.

---

* Далее по тексту ссылка на номер пункта приложения указывается одним номером в квадратных скобках.

Таблица 1

**Название определяемого вещества и диапазоны измерений**

| Название определяемого вещества | Диапазон измерений, мкг/см$^3$ |
|---|---|
| Формальдегид | от 0,001 до 0,1 включ. |
| Ацетальдегид | » 0,001 » 0,1 » |
| Пропионовый альдегид | » 0,001 » 0,1 » |
| Масляный альдегид | » 0,001 » 0,1 » |
| Ацетон | » 0,01 » 2,0 » |

## 2. Приписанные характеристики погрешности измерений

Методика обеспечивает получение результатов измерений с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в табл. 2.

Таблица 2

**Диапазон измерений, значения показателей точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, воспроизводимости**

| Диапазон измерений, мкг/см$^3$ | Показатель повторяемости (относительное значение среднеквадратического отклонения повторяемости), $\sigma_r$,% | Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное значение среднеквадратического отклонения внутрилабораторной прецизионности), $\sigma_{Rл}$,% | Показатель воспроизводимости (относительное значение среднеквадратического отклонения воспроизводимости), $\sigma_R$,% | Показатель точности* (границы относительной погрешности при вероятности $P = 0.95$), $\pm \delta$,% |
|---|---|---|---|---|
| от 0,001 до 0,01 включ. | 6 | 12 | 15 | 30 |
| св. 0,01 » 0,1 » | 5 | 8 | 10,5 | 21 |
| ». 0,1 » 2 » | 4 | 5 | 6 | 12 |
| * Соответствует относительной расширенной неопределенности измерений при коэффициенте охвата 2. | | | | |

## 3. Сущность метода

Методика основана на предварительном переводе альдегидов и ацетона в производные 2,4-динитрофенилгидразина, концентрировании продуктов дериватизации из биологического материала экстракцией гексаном и количественном определении полученных гидразонов альдегидов и ацетона на жидкостном хроматографе с УФ-детектором.

Измерению не мешают спирты, органические кислоты, кетоны и другие альдегиды.

## 4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, растворы и реактивы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

### *4.1. Средства измерений*

| | |
|---|---|
| Жидкостный хроматограф с УФ-детектором | |
| Весы лабораторные ВЛР-200 аналитические | ГОСТ 24104—01 |
| Гири $Г_2$-210 | ГОСТ 7328—01 |
| Термометр стеклянный | ГОСТ 28498—90 |
| Микрошприцы МШ-1, МШ-10 | ТУ 2.833.106—00 |
| Цилиндр мерный вместимостью 50 $см^3$ | ГОСТ 1770—74 |
| Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 $см^3$ | ГОСТ 29227—91 |
| Пипетка градуированная вместимостью 0,1 $см^3$ | ГОСТ 20292—74 |
| Колбы мерные вместимостью 100, 200, 500, 1 000, 2 000 $см^3$, | |
| Термостойкий стакан вместимостью 2 000 $см^3$ | |
| Пробирки мерные вместимостью 10 $см^3$ | ГОСТ 1770—74 |
| Редуктор кислородный | ТУ 26-05-236—73 |
| Стандартные образцы: | |
| Формальдегид в воде с концентрацией 1,0 мг/$см^3$ | ГСО 7347—96 |
| Ацетон в воде с концентрацией 1,0 мг/ $см^3$ | ГСО 8460—2003 |

### *4.2. Вспомогательные устройства*

| | |
|---|---|
| Колонка хроматографическая металлическая (длина 80 мм, внутренний диаметр 2 мм) с сорбентом Диасорб $С_{16}$ зернением 5-6-7 мкм | |
| Предколонка металлическая 12 × 1,5 мм, аполненная сорбентом Диасорб $С_{16}$ | |
| Центрифуга ЦЛМН-Р10-01-«Элекон» | ТУ 9443-001-245.23530—97 |
| Дистиллятор | ТУ 61-1-721—79 |
| Сушильный шкаф ШСС-80 П УХЛ 4.2 | ТУ 16.531.743—83 |
| Дефлегматор длиной 300 мм | ГОСТ 25336—82 |
| Холодильник шариковый ХШ-300 (6 шар.) | ГОСТ 1770—74 |
| Холодильник прямой ХПТ-3-300 | ГОСТ 1770—74 |
| Воронка Шотта (пор 16) | ГОСТ 25336—82 |
| Воронки делительные вместимостью 100 $см^3$ | ГОСТ 23932—90 |
| Бюксы СВ 19/9 | ТУ 92-891.029—91 |

| | |
|---|---|
| Колбы для перегонки круглодонные вместимостью 1,0; 2,0 дм$^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Стакан термостойкий вместимостью 2 дм$^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Пробирки центрифужные пропиленовые с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 см$^3$ | |
| Фильтры обеззоленные «Синяя лента» | ТУ 2642-001-42624157—98 |
| Универсальная индикаторная бумага pH 1,0—10,0 | ПНД 50-975—84 |

### *4.3. Реактивы*

| | |
|---|---|
| Гексан для хроматографии, ос ч | ТУ 6-09-4521—77 |
| Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, осч | ТУ 6-09-14-2167—84 |
| Вода дистиллированная | ГОСТ 6709—72 |
| Ацетальдегид для хроматографии, чистота не менее 99,5 % | |
| Пропионовый альдегид для хроматографии, чистота не менее 99,5 % | |
| Масляный альдегид для хроматографии, чистота не менее 99,5 % | |
| 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ), ч | ТУ-6-09-2394—77 |
| Кислота хлористоводородная (плотность 1,19), хч | ГОСТ 3118—77 |
| Перманганат калия, ч | ГОСТ 20490—75 |
| Спирт этиловый, ректификованный, из пищевого сырья | ГОСТ Р 51652—2000 |
| Калий двухромовокислый, чда | ГОСТ 4220—75 |
| Серная кислота | ГОСТ 4204—77 |
| Уксусная кислота, хч | ГОСТ 61—75 |
| Диэтиламин, ч, перегнанный для хроматографии | ТУ 6-09-68—89 |

### *4.4. Материалы*

| | |
|---|---|
| Гелий газообразный | ТУ 51-940—80 |

Допускается применение других типов средств измерений, вспомогательного оборудования, химических реактивов и материалов по метрологическим и техническим характеристикам не уступающих перечисленным.

## 5. Требования безопасности

5.1. При работе с реактивами соблюдают требования безопасности по ГОСТ 12.1.007—76 [6] и ГОСТ 12.1.005—88 [7].

5.2. При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают меры безопасности, указанные в «Руководстве по правилам эксплуатации прибора», правила электробезопасности в

соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 [8], противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 [9] и имеют средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83 [10].

5.3. Помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

5.4. При работе с биологическими средами необходимо соблюдать правила в соответствии с требованиями СП 1.3.2322—08 от 01.05.2008 [11].

5.5. При выполнении измерений на приборе соблюдают правила, указанные в Руководстве по правилам эксплуатации жидкостного хроматографа.

## 6. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений допускаются лица, имеющие квалификацию не ниже инженера-химика с опытом работы на жидкостном хроматографе, освоившие метод анализа и уложившиеся в нормативы оперативного контроля при выполнении процедур контроля погрешности анализа.

## 7. Условия измерений

7.1. При подготовке проб к анализу и приготовлении растворов соблюдают следующие условия:

- температура воздуха 15—25 °С;
- атмосферное давление 630—800 мм рт. ст.;
- влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С.

7.2. Выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендуемых технической документацией по прибору.

## 8. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений проводят следующие работы: подготовка посуды и растворителей, приготовление растворов, подготовка хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики.

### *8.1. Подготовка посуды*

Используемую посуду замочить на 1 ч в хромовой смеси, промыть проточной водопроводной водой, ополоснуть дистиллированной водой и просушить при температуре 120 °С.

### *8.2. Подготовка растворителей*

8.2.1. Очистка ацетонитрила от примесей. В колбу вместимостью 2 $дм^3$ помещают 1 $дм^3$ ацетонитрила и 20 г $KMnO_4$, кипятят с шариковым холодильником в течение 1 ч, затем перегоняют с дефлегматором при температуре 81,6 °С, отбирая фракции по 200 $см^3$. Когда в колбе останется около 200 $см^3$ продукта, перегонку прекращают. Остаток можно смешивать с новой порцией растворителя. Первую фракцию (200 $см^3$) отбрасывают, а остальные проверяют на поглощение в УФ-области (оптическая плотность при 200 нм не должна превышать 0,05 о.е./см).

8.2.2. Очистка диэтиламина от примесей. В колбу вместимостью 1,0 $дм^3$ помещают 0,5 $дм^3$ диэтиламина и перегоняют с прямым холодильником. Первые и последние порции (50 $см^3$) отбрасывают, оставляют среднюю порцию. Перегнанный раствор должен быть бесцветным.

8.2.3. Очистка этилового спирта от альдегидов и кетонов. К 1 $дм^3$ 96 % спирта добавляют 2 г 2,4-динитрофенилгидразина, 0,5 $см^3$ концентрированной хлористоводородной кислоты и кипятят с шариковым холодильником 1 ч. Перегоняют с дефлегматором в приборе со стеклянными шлифами, отбрасывая первые и последние 100 $см^3$, после этого отгоняют вторично.

### *8.3. Приготовление растворов*

8.3.1. *Хромовая смесь.* В термостойкий стакан вместимостью 2 $дм^3$ насыпают 50 г хромовокислого калия, осторожно приливают по палочке частями, тщательно перемешивая, 1 $дм^3$ концентрированной серной кислоты.

8.3.2. *Элюент для хроматографии.* 600 $см^3$ ацетонитрила смешивают с 400 $см^3$ дистиллированной воды. Смесь фильтруют через воронку Шотта (пор 16) и дегазируют барботированием гелия в течение 5 мин со скоростью 50—60 $см^3$/мин. Добавляют 25 $см^3$ уксусной кислоты и 10 $см^3$ диэтиламина и перемешивают содержимое колбы. Срок хранения элюента 5 дней в стеклянной посуде с притертой пробкой в темном месте.

8.3.3. *Хлористоводородная кислота, 2 моль/$дм^3$.* В мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$, наполненную до половины объема дистиллированной водой, прибавляют 61,0 $см^3$ концентрированной хлористоводородной кислоты (плотность 1,19 г/$см^3$), доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

8.3.4. *2,4-динитрофенилгидразин, 0,2 %-ный раствор в 2М растворе хлористоводородной кислоты.* 0,2 г 2,4-динитрофенилгидразина вносят в мерную колбу на 100 $см^3$ и доводят до метки 2М раствором хлористоводородной кислоты.

8.3.5. *Исходный раствор альдегидов для градуировки (раствор А).* В мерную колбу объемом 500 $см^3$, содержащую 450 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют 5 $см^3$ 0,2 %-го раствора 2,4-динитрофенилгидразина, переносят 4 $см^3$ ГСО формальдегида с концентрацией 1,0 мг/$см^3$ (4,0 мг), и реактивы по п. 4.3 в количестве 5,0 $мм^3$ (3,9 мг) ацетальдегида, 5,0 $мм^3$ (4,03 мг) пропионового альдегида, 5,0 $мм^3$ (4,08 мг) масляного альдегида и доводят дистиллированной водой до метки.

Градуировочные растворы готовят с предварительным охлаждением альдегидов и дистиллированной воды, которые выдерживают при температуре (–10 ± 2) °С в течение 20 мин. Используют свежеприготовленный раствор. Содержание альдегидов в *растворе А* составляет (с учетом плотности и содержания основного вещества): формальдегида – 8,0 мкг/$см^3$; ацетальдегида – 7,8 мкг/$см^3$; пропионового альдегида – 8,1 мкг/$см^3$; масляного альдегида – 8,2 мкг/$см^3$.

*Исходный раствор ацетона для градуировки (раствор В).* В мерную колбу объемом 200 $см^3$, содержащую 180 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют 5 $см^3$ 0,2 % раствора 2,4-динитрофенилгидразина, переносят 5,0 $мм^3$ (3,96 мг) ГСО ацетона и доводят водой до метки. Используют свежеприготовленный раствор. Содержание ацетона в *растворе В* составляет (с учетом плотности и содержания основного вещества) 19,8 мкг/$см^3$.

8.3.6. Получение 2,4-динитрофенилгидразонов альдегидов и ацетона. В колбу с притертой пробкой вместимостью 500 $см^3$ вносят 300 $см^3$ 0,2 % раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2М хлористоводородной кислоте, прибавляют 0,17 г формальдегида (для получения 2,4-ДНФгидразона ацетальдегида прибавляют 0,24 г ацетальдегида, пропионового альдегида – 0,38 г, масляного альдегида – 0,46 г, ацетона – 0,32 г), перемешивают и оставляют смесь на 12 часов. После выпадения окрашенного осадка 2,4-динитрофенилгидразона соответствующего альдегида или ацетона его отфильтровывают через фильтр «Синяя лента», промывают 100 $см^3$ 2М раствора хлористоводородной кислоты, дистиллированной водой до нейтральной реакции среды, которую проверяют по индикаторной бумаге, высушивают на воздухе. Проверяют качество производного методом ВЭЖХ, приемлемый уровень чистоты 99,0 % и выше. Если уровень чистоты неудовлетворительный, перекристаллизовывают гидразон из этилового спирта и повторяют проверку качества.

### *8.4. Подготовка хроматографической колонки*

Колонку устанавливают на хроматограф и подают элюент, приготовленный в соответствии с п. 8.3.2, со скоростью 100 $мм^3$/мин до уста-

новления равновесия колонки, которое определяют по стабильности нулевой линии детектора.

### *8.5. Установление градуировочной характеристики*

*8.5.1.* Строят две зависимости площади хроматографического пика от концентрации альдегидов и ацетона в желчи в диапазонах 0,001—0,020 мкг/см$^3$ и 0,02—0,50 мкг/см$^3$ – для альдегидов; 0,005—0,10 мкг/см$^3$ и 0,1—2,0 мкг/см$^3$ – для ацетона. Градуировочные характеристики устанавливают по пяти сериям растворов для градуировки. Каждую серию, состоящую из трех растворов, готовят из растворов А и В.

*8.5.2.* Для приготовления градуировочных смесей отбирается проба желчи объемом 125 см$^3$ (при сборе желчь хранится при температуре не выше 0 °С). В соответствии с п. 9 проводят анализ пробы желчи на содержание альдегидов. При наличии анализируемых веществ в холостой пробе вычитают их фоновое содержание при построении калибровки.

*8.5.3.* Градуировочные растворы готовят в мерных пробирках вместимостью 10 см$^3$. Для этого в каждую колбу вносят микрошприцем или микропипеткой растворы А и В в соответствии с табл. 3 и 4, доводят объем до 5 см$^3$ желчью и перемешивают. Анализируют свежеприготовленные растворы.

Таблица 3

**Растворы для установления градуировочной характеристики при определении в желчи альдегидов в диапазоне концентраций 0,001—0,020 мкг/см$^3$ и ацетона в диапазоне концентраций 0,01—0,10 мкг/см$^3$**

| Номер раствора | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Объем *раствора А*, мм$^3$ | 0,6 | 1,2 | 2,6 | 6,0 | 12,0 |
| Массовая концентрация формальдегида, мкг/см$^3$ | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,010 | 0,020 |
| Массовая концентрация ацетальдегида, мкг/см$^3$ | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,010 | 0,020 |
| Массовая концентрация пропионового альдегида, мкг/см | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,010 | 0,020 |
| Массовая концентрация масляного альдегида, мкг/см | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,010 | 0,020 |
| Объем *раствора В*, мм$^3$ | 2,6 | 5,0 | 12,6 | 20,0 | 25,0 |
| Массовая концентрация ацетона, мкг/см$^3$ | 0,01 | 0,02 | 0,05 | 0,08 | 0,10 |

Таблица 4

**Растворы для установления градуировочной характеристики при определении в желчи альдегидов в диапазоне концентраций 0,02—0,1 мкг/см$^3$ и ацетона в диапазоне концентраций 0,1—2,0 мкг/см$^3$**

| Номер раствора | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Объем *раствора А*, мм$^3$ | 12,0 | 24,0 | 36,0 | 48,0 | 60,0 |
| Массовая концентрация формальдегида, мкг/см$^3$ | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,10 |
| Массовая концентрация ацетальдегида, мкг/см$^3$ | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,09 |
| Массовая концентрация пропионового альдегида, мкг/см | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,10 |
| Массовая концентрация масляного альдегида, мкг/см | 0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,10 |
| Объем *раствора В*, мм$^3$ | 25,0 | 50,0 | 125,0 | 250,0 | 500,0 |
| Массовая концентрация ацетона, мкг/см$^3$ | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 |

В делительную воронку объемом 100 см$^3$ помещают 2,0 см$^3$ градуировочного раствора, разводят дистиллированной водой до объема 40 см$^3$, добавляют 2,0 см$^3$ 0,2 %-го раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 М растворе хлористоводородной кислоты, 2 капли концентрированной хлористоводородной кислоты, 5 см$^3$ гексана и экстрагируют 15 мин. После расслоения жидкостей верхний слой переносят в центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой и центрифугируют 5 мин со скоростью 2 800 об./мин, затем 2 см$^3$ гексана переносят в бюкс и высушивают в потоке воздуха до сухого остатка. Высушенный остаток растворяют в 0,4 см$^3$ элюента и анализируют аликвотную часть (10 мм$^3$) в условиях:

элюент – раствор, приготовленный по п. 8.3.2;
скорость движения элюента 100 мм$^3$/мин;
длина волны УФ-детектора 358 нм;
время удерживания:
2,4-динитрофенилгидразона формальдегида 4,1 ± 0,2 мин;
2,4-динитрофенилгидразона ацетальдегида 5,0 ± 0,2 мин;
2,4-динитрофенилгидразона ацетона 6,2 ± 0,2 мин;
2,4-динитрофенилгидразона пропионового альдегида 7,5 ± 0,2 мин;
2,4-динитрофенилгидразона масляного альдегида 8,5 ± 0,2 мин.

Градуировочный коэффициент рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i / S_i}{n}, \text{ где}$$

$C_i$- концентрация вещества в градуировочном растворе, мкг/см$^3$;

$S_i$ – среднее значение пяти измерений площади пика $i$-ой концентрации, расхождение между минимальным и максимальным значением из которых не должно превышать 4 % относительно среднего значения $S_i$.

$n$ – количество градуировочных смесей ($n$ = 5).

*8.5.4. Контроль стабильности градуировочной характеристики*

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят 1 раз в квартал в анализируемой серии измерений. Образцами для контроля стабильности являются градуировочные растворы, выбранные таким образом, чтобы массовая концентрация альдегида (ацетона) соответствовала нижней, верхней границам и середине диапазона построения градуировочной характеристики. Градуировка признается стабильной при выполнении условия:

$$|X - C| \le 0{,}10 \cdot C, \text{ где}$$

$C$ – заданная концентрация альдегида (ацетона) в градуировочном растворе;

$X$ – результат измерения массовой концентрации альдегида (ацетона) в градуировочном растворе.

При невыполнении условия стабильности градуировочной характеристики эксперимент повторяют с другим градуировочным раствором. При повторном невыполнении условия стабильности градуировочной характеристики выясняют и устраняют причины нестабильности градуировочной характеристики.

### *8.6. Отбор проб*

Отбор проб желчи в объеме не менее 4 см$^3$ проводят в чистую пробирку с притертой пробкой. Срок хранения пробы в холодильнике 2 дня.

## 9. Выполнение измерений

9.1. Выполняют два параллельных измерения образца желчи. В делительную воронку 100 см$^3$ помещают 2,0 см$^3$ желчи, разбавляют дистиллированной водой до объема 40 см$^3$, добавляют 2,0 см$^3$ 0,2 %-го раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2М растворе хлористоводородной кислоты, 2 капли концентрированной хлористоводородной кислоты, 5 см$^3$ гексана и экстрагируют 15 мин. После отстаивания верхний слой переносят в центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой и

центрифугируют 5 мин со скоростью 2 800 об./мин. После расслоения жидкостей 2 $см^3$ гексанового экстракта переносят в бюкс и высушивают в потоке воздуха до сухого остатка. Высушенный остаток растворяют в 0,4 $см^3$ элюента, вводят в хроматограф аликвотную часть (10 $мм^3$) и анализируют в условиях, указанных в п. 8.5.3.

9.2. Идентификацию хроматографических пиков 2,4-динитрофенилгидразонов формальдегида, ацетальдегида, пропионового и масляного альдегидов и ацетона проводят путем сравнения времен удерживания хроматографических пиков в анализируемой пробе и в растворах 2,4-динитрофенилгидразонов альдегидов и ацетона, полученных согласно п. 8.3.6.

## 10. Обработка (вычисление) результатов измерений

10.1. Массовые концентрации альдегидов и ацетона в желчи (мкг/$см^3$) вычисляют по формуле:

$$X = S_1 \cdot K, \text{ где}$$

$X$ – массовая концентрация вещества в анализируемой пробе, мкг/$см^3$;

$S_1$ – площадь пика соответствующего 2,4-динитрофенилгидразона альдегида (или ацетона) на хроматограмме, е.о.п.;

$K$ – градуировочный коэффициент.

10.2. За результат измерения $\overline{X}$ принимают среднее арифметическое значение двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости $X_1$, $X_2$ (параллельных определений), для которых выполняется условие:

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r \cdot \frac{X_1 + X_2}{2}, \text{ где} \qquad (1)$$

$r$ – предел повторяемости. Значения предела повторяемости приведены в табл. 5.

При невыполнении условия (1) получают дополнительно еще два результата измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое четырех результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, для которых выполняется условие:

$$|X_{max,4} - X_{min,4}| \le 0{,}01 \cdot CR_{0,95}(4) \cdot \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_4}{4}, \text{ где} \qquad (2)$$

$CR_{0,95}(4)$ – критический диапазон. Значения предела повторяемости приведены в табл. 5.

При невыполнении условия (2) в качестве окончательного результата измерений принимают медиану четырех результатов измерений,

полученных в условиях повторяемости (параллельных определений). Дополнительно выявляют и устраняют причины, приводящие к невыполнению условия (1).

10.3. Расхождение между результатами измерений, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости:

$$\left|\overline{X}_1 - \overline{X}_2\right| \le 0{,}01 \cdot R \cdot \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2}, \text{ где} \qquad (3)$$

$\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ – результаты измерений массовых концентраций альдегидов и ацетона, полученные в разных лабораториях – средние арифметические двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, для которых выполняется условие (1).

При выполнении условия (3) приемлемы оба результата измерений, и в качестве окончательного может быть использовано их среднее арифметическое значение. Значения предела воспроизводимости приведены в табл. 5.

Таблица 5

**Значения пределов повторяемости, воспроизводимости и критического диапазона при доверительной вероятности $P = 0{,}95$**

| Диапазон измерений, мкг/см$^3$ | Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости), $r$, % | Критический диапазон (относительное значение допускаемого расхождения между наибольшим и наименьшим четырех результатов измерений, полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости), $CR_{0,95}(4)$, % | Предел воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях), $R$, % |
|---|---|---|---|
| от 0,001 до 0,01 включ. | 17 | 34 | 42 |
| св. 0,01 » 0,1 » | 14 | 22 | 29 |
| » 0,1 » 2 » | 11 | 14 | 17 |

## 11. Оформление результатов измерений

Результат измерения представляют в виде ( $\overline{X} \pm \Delta$ ) мкг/см$^3$, где

$\Delta$ – характеристика погрешности, мкг/см$^3$, при $P = 0{,}95$, значение $\Delta$ рассчитывают по формуле: $\Delta = \frac{\delta \cdot \overline{X}}{100}$,

где значение δ приведено в табл. 2.

В случае, если содержание компонента меньше нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде: «содержание альдегида < 0,001 мкг/см$^3$, содержание ацетона < 0,01 мкг/см$^3$».

## 12. Контроль стабильности результатов измерений в пределах лаборатории

Контроль стабильности результатов измерений в пределах лаборатории организуют и проводят в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725—6 [12] и РМГ 76—2004 ГСИ [13].

Периодичность получения результатов контрольных процедур и формы их регистрации приводят в документах лаборатории, устанавливающих порядок и содержание работ по организации методов контроля стабильности результатов измерений в пределах лаборатории.

## 13. Алгоритм оперативного контроля процедуры измерений с использованием метода добавок

Оперативный контроль процедуры измерений проводят путем сравнения результата отдельно взятой контрольной процедуры $K_к$ с нормативом контроля $K$.

Результат контрольной процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = \left|\overline{X}' - \overline{X} - C_д\right|, \text{ где}$$

$\overline{X}'$ – результат измерений массовой концентрации альдегида (или ацетона) в пробе с известной добавкой – среднее арифметическое двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, расхождение между которыми удовлетворяет условию (1).

$\overline{X}$ – результат измерений массовой концентрации альдегида (или ацетона) в исходной пробе – среднее арифметическое двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, расхождение между которыми удовлетворяет условию (1).

Норматив контроля $K$ рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta^2_{л,X'_{ср}} + \Delta^2_{л,X_{ср}}}, \text{ где}$$

$\Delta^2_{л,X'_{ср}}$, $\Delta^2_{л,X_{ср}}$ – значения характеристики погрешности результатов измерений, установленные в лаборатории при реализации методики, соответствующие массовой концентрации альдегида (или ацетона) в пробе с известной добавкой и в исходной пробе соответственно.

**Примечание.** Допустимо характеристику погрешности результатов измерений при внедрении методики в лаборатории устанавливать на основе выражения: $\Delta_л = 0{,}84 \cdot \Delta$, с последующим уточнением по мере накопления информации в процессе контроля стабильности результатов измерений.

Процедуру измерений признают удовлетворительной, при выполнении условия:

$$K_к \le K \qquad (4)$$

При невыполнении условия (4) контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (4) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

## 14. Алгоритм проведения контрольной процедуры при контроле внутрилабораторной прецизионности

Контрольные процедуры при контроле промежуточной прецизионности получают с использованием рабочих проб желчи.

При реализации контрольной процедуры получают два результата контрольных измерений (первичного $\overline{X}_1$ и повторного $\overline{X}_2$) массовой концентрации альдегида (или ацетона) в условиях внутрилабораторной прецизионности.

Результат контрольной процедуры признают удовлетворительным при выполнении следующего условия:

$$\left|\overline{X}_1 - \overline{X}_2\right| \le 0{,}01 \cdot R_л \cdot \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2} \qquad (5)$$

Значения предела внутрилабораторной прецизионности приведены в табл. 6.

Таблица 6

**Значения предела внутрилабораторной прецизионности при доверительной вероятности $P = 0{,}95$**

| Диапазон измерений, мкг/см$^3$ | Предел внутрилабораторной прецизионности (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности), $R_д$, % |
|---|---|
| от 0,001 до 0,01 включ. | 34 |
| св. 0,01 »0,1 » | 22 |
| ». 0,1 » 2 » | 14 |

Приложение

## Список литературы

1. Химическая энциклопедия /Под. ред. И. Л. Кнунянц. М.: «Советская энциклопедия», 1988. Т. 1.

2. Химическая энциклопедия /Под. ред. И. Л. Кнунянц. М.: «Советская энциклопедия», 1990. Т. 2.

3. Филов В. А., Тиунов Л. А. Справ.: Вредные химические вещества. Галоген- и кислородсодержащие органические соединения. С.-П.: «Химия», 1994.

4. Химическая энциклопедия /Под. ред. Н. С. Зефирова. М.: «Большая российская энциклопедия», 1995. Т. 4.

5. Химическая энциклопедия /Под. ред. Н. С. Зефирова. М.: «Большая российская энциклопедия», 1999. Т. 5.

6. ГОСТ 12.1.007—76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

7. ГОСТ 12.1.005—88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

8. ГОСТ 12.1.019—79 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

9. ГОСТ 12.1.004—91 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования».

10. ГОСТ 12.4.009—90 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание».

11. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322—08 от 01.05.2008 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

12. ГОСТ Р ИСО 5725—6 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

13. РМГ 76—2004 ГСИ «Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа».

Приложение

## Список литературы

1. Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей /Под ред. Н. В. Лазарева и И. Д. Гадаскиной. Л.: «Химия», 1977. Т. III. С. 350, 444, 507.

2. Ермаченко Л. А. Атомно-абсорбционный анализ в санитарно-гигиенических исследованиях: Методическое пособие. М., 1997. 207 с.

3. ГОСТ 12.1.004—91 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования».

4. ГОСТ 12.4.009—83 «Система стандартов безопасности труда Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание».

5. ГОСТ 12.1.019—79 «Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

6. ГОСТ 12.1.007—76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

7. ГОСТ 12.1.005—88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

8. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

9. ГОСТ 4212—76 «Межгосударственный стандарт. Методы приготовления растворов».

10. ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

11. РМГ 76—2004 ГСИ «Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа».

## Содержание

Определение массовых концентраций формальдегида, ацетальдегида, пропионового альдегида, масляного альдегида и ацетона в желчи методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2771—10 ..... 3

Определение массовой концентрации фталевой кислоты в пробах крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2772—10 ..... 21

Определение массовых концентраций летучих жирных кислот (уксусная, пропионовая, изо-масляная, масляная, валериановая, изо-капроновая, капроновая) в биосредах (кровь) газохроматографическим методом: МУК 4.1.2773—10 ..... 35

Определение массовых концентраций марганца, свинца, никеля в желчи методом атомно-абсорбционной спектрометрии: МУК 4.1.2774—10 ..... 51

**Определение вредных веществ в биологических средах**

**Сборник методических указаний по методам контроля**
**МУК 4.1.2771—4.1.2774—10**

Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 12.01.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 4,25

Тираж 200 экз. Заказ 1

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru