2. Биологическая характеристика B. subtilis 65 и его гигиенический норматив

Штамм-продуцент растет на жидких и агаризованных средах. Оптимальная температура роста 37 °С, оптимальная pH 6,6—7,2, культивирование 18—24 часа. Для размножения используется мясопептонная агаризованная среда (МПА) с глюкозой (1 %).

Систематическое положение микроорганизма

Класс	*Schizomycetes*
Отряд	*Eubacteriales*
Семейство	*Bacillaceae*
Род	*Bacillus*
Вид	*subtilis*
Штамм	*65*

На МПА штамм образует небольшие округлые колонии, максимальный диаметр которых составляет 0,5—0,7 см. Край колоний изрезанный, с характерным белым налетом в центральной верхней части. Колонии гладкие, плоские, матовые, сухие. Не врастают в агар и легко отделяются от него. Цвет от слабо кремового до желтоватого.

Морфологически штамм представлен подвижными мелкими палочками, образующими центрально расположенные эндоспоры, располагаются поодиночке или цепочками различной длины. Палочки снабжены жгутиками, расположенными перитрихиально.

B. subtilis 65 строгий аэроб, сапрофит, мезофил, грамположителен. Штамм интенсивно разлагает белковые среды благодаря действию протеолитических энзимов, при этом, на желатине происходит разжижение, на среде лакмус-молоко – пощелочение, пептонизация. Чувствителен к целому ряду антибиотиков, устойчив к ампицилину.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в атмосферном воздухе рабочей зоны – 4 000 кл/м^3, пометка А.

3. Пределы измерений

Методика обеспечивает выполнения измерений количества клеток микроорганизма в атмосферном воздухе в диапазоне концентраций от 50 до 50 000 клеток в 1 м^3 воздуха при доверительной вероятности 0,95.

gost.e-ecolog.ru

4. Метод измерений

Прямой метод основан на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на агаризованную среду МПА с глюкозой (1 %) и подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

Косвенный метод основан на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на поверхность плотной питательной среды (молочный агар Эйкмана) и подсчета прозрачных зон, образующихся вокруг выросших колоний и четко выделяющихся на общем молочно-мутном фоне среды через 18—24 часа.

При данном методе на одной чашке Петри после забора пробы может быть учтено не более 50 колоний т. к. большее количество колоний на чашке образуют сливающиеся зоны пептонизации молочного белка казеина.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства и материалы.

5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы

Прибор для бактериологического анализа воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова)	ТУ 64-12791—77
Термостаты электрические суховоздушные или водяные	
Автоклав электрический	ГОСТ 9586—75
Бокс, оборудованный бактерицидными лампами	
Холодильник бытовой	
Весы лабораторные, аналитические типа ВЛА-200	
Микроскоп биологический с иммерсионной системой типа «Биолам» Л-211	
Лупа с увеличением х10	ГОСТ 25706—83
Чашки Петри бактериологические плоскодонные, стеклянные, диаметром 100 мм	
Пробирки биологические, вместимостью 20 и 35 мл	ГОСТ 10515—75
Пипетки мерные на 1, 5, и 10 мл	ГОСТ 1770—74
Колбы конические, вместимостью 250 и 500 мл	ГОСТ 1770—74
Секундомер	ГОСТ 9586—75

135

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения
Российской Федерации
Г.Г. Онищенко

31.10.03

МУК 4.1.1786-03

Дата введения: 01.02.2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по измерению концентраций крезоксим-метила в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест методами газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии

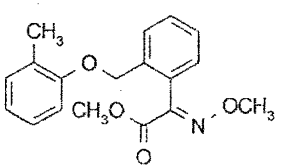
1. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

Фирма производитель: БАСФ (Германия)

Торговое название: СТРОБИ

Действующее вещество: крезоксим-метил

(Е)-Метил-2-метоксиимино-2-[2-(*о*-толилоксиметил)фенил]ацетат (IUPAC)



Эмпирическая формула: $C_{18}H_{19}NO_4$

Молекулярная масса: 313,3

Кристаллическое вещество белого цвета со слабым ароматным запахом

Температура плавления: 101,6 - 102,5° С

Давление паров при 20° С : $2,3*10^{-3}$ мПа

Растворимость в органических растворителях при 20°С (г/дм^3): ацетон - 217; метанол - 14,9; дихлорметан - 939; этилацетат - 123; толуол - 111; н-гептан - 1,7. Растворимость в воде - 0,002 мг/дм^3.

Может присутствовать в воздухе в виде аэрозоля.

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность:

LD_{50} крысы - более 5000 мг/кг,

Острая дермальная токсичность:

LD_{50} крысы - более 2000 мг/кг;

Не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистую оболочку глаз, не обладает сенсибилизирующим действием.

Рекомендуемые гигиенические нормативы:

ОБУВ в воздухе рабочей зоны - 1 мг/м^3

ОБУВ в атмосферном воздухе - 0,1 мг/м^3

ПДК в воде водоемов - 0,01 мг/дм^3

ОДК в почве - 0,2 мг/кг

Область применения препарата

Крезоксим-метил - синтетический фунгицид из класса стробилуринов, эффективен против широкого круга грибных патогенов хлебных злаков, овощных, кормовых, технических и плодовых культур. Обладает защитным, лечебным и искореняющим действием.

Проходит регистрационные испытания в России и странах СНГ под торговым названием Строби, 500 ВДГ (500 г/кг) с нормой расхода 140 - 320 г/га при трехкратной обработке (по розовому бутону, после опадения 75% лепестков и по мелким плодам).

2. МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ КРЕЗОКСИМ-МЕТИЛА В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И АТМОСФЕРНОМ ВОЗДУХЕ НАСЕЛЕННЫХ МЕСТ МЕТОДАМИ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип методики

Методика основана на определении крезоксим-метила методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором.

Отбор проб воздуха осуществляется концентрированием аэрозоля на бумажные фильтры "синяя лента". Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2. Избирательность метода

В предлагаемых условиях метод специфичен в присутствии компонентов препаративной формы.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода (P = 0,95)

Число параллельных определений - 6

Предел обнаружения в хроматографируемом объеме - 0,1 нг (измерение по п. 2.7.1., ГЖХ) и 2 нг (измерение по п. 2.7.2., ВЭЖХ).

Предел обнаружения в воздухе (при отборе 10 $дм^3$) - 0,05 $мг/м^3$

Диапазон определяемых концентраций: 0,05 - 0,5 $мг/м^3$ (при отборе 10 $дм^3$); 0,1 - 1,0 $мг/м^3$ (при отборе 5 $дм^3$)

Среднее значение определения - 97%.

Стандартное отклонение (S) - 4,72% (ГЖХ), 2,50% (ВЭЖХ).

Относительное стандартное отклонение (DS) - 1,93% (ГЖХ), 1,02% (ВЭЖХ),

Доверительный интервал среднего - ± 4,96(ГЖХ), ± 2,62% (ВЭЖХ).

Суммарная погрешность измерения не превышает 16% (ГЖХ), 12% (ВЭЖХ).

2.2. Реактивы, растворы и материалы

Крезоксим-метил с содержанием д.в. 99,9%, (БАСФ, Германия)

Азот особой чистоты, из баллона, ГОСТ 9293-79

Ацетонитрил для хроматографии, хч, ТУ 6-09-4326-76

Вода бидистиллированная или деионизованная

н-Гексан, хч, ТУ 6-09-4521-77

Кислота *орто*-фосфорная , хч, ГОСТ 6552-80

Метиловый спирт, хч, ГОСТ 6995-77

Толуол ч.д.а., ГОСТ 5789-78

Этиловый эфир уксусной кислоты, ч, ГОСТ 22300-76

Хроматон-Супер с 5% OV-17 (0,16 -0,20 мм)

Бумажные фильтры "синяя лента", обеззоленные, ТУ 6-09-2678-77, предварительно промытые последовательно этанолом, затем этилацетатом.

Стекловата

Фильтродержатели

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Газовый хроматограф "Цвет" или аналогичный, снабженный детектором постоянной скорости рекомбинации ионов (ДПР) с пределом детектирования по линдану 4 х 10 $^{-14}$ г/см^3

Хроматографическая колонка стеклянная, длиной 1 м, внутренним диаметром 3 мм

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором фирмы Perkin-Elmer (США) или аналогичный

Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая Zorbax ODS, зернением 5 мкм.

Микрошприц типа МШ-1М , ТУ 2.833.105, вместимостью 1 мкл

Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50 - 100 мкл

Аспирационное устройство типа ЭА-1,ТУ 25-11-1414-78, или аналогичное

Барометр, ТУ 2504-1797-75.

Весы аналитические типа ВЛА-200, ГОСТ 34104-80Е

Насос водоструйный, ГОСТ 10696-75

Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М, ТУ 25-11-917-76 или аналогичный

Термометр лабораторный шкальный ТЛ-2, цена деления 1 $^{\circ}$ С, пределы измерения 0-55^0 С, ГОСТ 215-73Е

Воронки химические, конусные, диаметром 34-40 мм, ГОСТ2533682 Е

Колбы грушевидные со шлифом, ГОСТ 10394-72, вместимостью 100 мл.

Колбы мерные, ГОСТ 1770-74, вместимостью 50 и 100 мл.

Пипетки, ГОСТ 20292-74, вместимостью 1, 2 и 5 мл.

Цилиндры мерные, ГОСТ 1770-74Е, вместимостью 10, 50 и 250 мл.

Пробирки центрифужные, ГОСТ 25336-82Е

Ректификационная стационарная установка РУТ, ТУ 25-11-1103-75

Стаканы химические, ГОСТ 25336-82Е, вместимостью 100 мл

Груша резиновая

Стеклянные палочки

Установка для перегонки растворителей при атмосферном давлении

Фильтродержатели

2.4.Отбор проб

Отбор проб воздуха рабочей зоны следует осуществлять в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 "ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны" или ГОСТ 17.2.4.02-81 "ОПА. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ в воздухе населенных мест".

Воздух с объемным расходом 1- 4 $дм^3$/мин аспирируют через фильтр "синяя лента", помещенный в фильтродержатель.

Для измерения 0,5 рекомендуемого ОБУВ в воздухе рабочей зоны следует отобрать 1 $дм^3$ воздуха; 0,8 ОБУВ в атмосферном воздухе - 7 $дм^3$.

Фильтры с отобранными пробами, упакованные в полиэтиленовые пакеты, можно хранить в холодильнике при температуре 4-6^0 С в течение 20-ти дней.

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. Подготовка органических растворителей

2.5.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 часа, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

2.5.1.2. Очистка этилацетата

Этилацетат промывают последовательно 5%-ным водным раствором карбоната натрия, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют.

Необходимую чистоту растворителя можно достичь перегонкой коммерческого этилацетата на ректификационной колонне с числом теоретических тарелок не менее 50.

2.5.1.3.Очистка толуола

Толуол выдерживают над безводным хлористым кальцием и перегоняют перед употреблением , отбрасывая предгон объемом 10 - 15% от исходного.

2.5.2. Метод ГЖХ. Подготовка и кондиционирование колонки

Готовую насадку (5% OV-17 на Хроматоне-супер, 0,16 - 0,20 мм) засыпают в стеклянную колонку, предварительно промытую последовательно этиловым спиртом, ацетоном и гексаном, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают в термостате хроматографа, не подсоединяя к детектору, и стабилизируют в токе азота при температуре 260 °С в течение 10-12 часов.

2.5.3. Метод ВЭЖХ

2.5.3.1.Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 50 мл метилового спирта, 350 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл *орто*-фосфорной кислоты и 600 мл ацетонитрила, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

2.5.3.2. Кондиционирование колонки

Промывают колонку для ВЭЖХ смесью ацетонитрил - метанол - вода-*орто*-фосфорная кислота, (60 : 5 : 35 : 0,05, по объему) в течение 30 - 45 мин при скорости подачи растворителя 1 мл/мин до получения стабильной базовой линии.

2.5.4. Приготовление стандартных растворов

Стандартный раствор крезоксим-метила с содержанием 1 мг/мл готовят растворением 0,0500 г вещества в толуоле (измерение по п. 2.7.1., ГЖХ) или ацетонитриле (измерение по п п. 2.7.2., ВЭЖХ) в мерной колбе на 50 мл. Раствор хранится в холодильнике в течение 3-х месяцев.

Для приготовления стандартного раствора крезоксим-метила с содержанием 10 мкг/мл в мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл основного стандартного раствора (1 мг/мл), доводят объем до метки толуолом (измерение по п. 2.7.1., ГЖХ) или ацетонитрилом (измерение по п п. 2.7.2., ВЭЖХ). Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

Рабочие стандартные растворы с концентрацией 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 и 1,0 мкг/мл готовят путем последовательного разбавления раствора, содержащего 10 мкг/мл крезоксим-метила в толуоле или ацетонитриле, толуолом (измерение по п. 2.7.1., ГЖХ) или подвижной фазой для ВЭЖХ (измерение по п п. 2.7.2., ВЭЖХ). Растворы хранятся в холодильнике в течение 3-х дней.

2.5.5. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика в инжектор хроматографа вводят по 1мкл (ГЖХ) или 20 мкл (ВЭЖХ) рабочих стандартных растворов крезоксим-метила с концентрацией 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 и 1,0 мкг/мл.

Осуществляют не менее 5 параллельных измерений. Находят среднее значение высоты (ГЖХ) или площади (ВЭЖХ) хроматографического пика для каждой концентрации. Строят градуировочный график (А или Б) зависимости высоты или площади хроматографического пика (в мм или относительных единицах, соответственно) от концентрации крезоксим-метила в растворе (в мкг/мл).

2.6.Описание определения

Фильтр с отобранной пробой переносят в химический стакан вместимостью 100 мл, заливают 10 мл этилацетата, оставляют на 5 - 7 минут, периодически перемешивая. Растворитель сливают, отжимая фильтр стеклянной палочкой. Фильтр еще дважды обрабатывают новыми порциями этилацетата объемом 10 мл.

Объединенный экстракт упаривают в грушевидной колбе на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани 40 - 45^0 С почти досуха, оставшийся растворитель отдувают потоком теплого воздуха, остаток растворяют в 5 мл этилацетата (измерение по п. 2.7.1., ГЖХ) или подвижной фазы для ВЭЖХ (измерение по п. 2.7.2., ВЭЖХ), центрифугируют или фильтруют через слой стекловаты, помещенный в конусную химическую воронку, и хроматографируют.

2.7.Условия хроматографирования

2.7.1. ГЖХ

Хроматограф газовый "Цвет-560" с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов

Колонка стеклянная длиной 1 м, внутренним диаметром 3 мм, заполненная 5% OV-17 на Хроматоне-супер (0,16 - 0,20 мм)

Рабочая шкала электрометра $64*10^{10}$ ом

Скорость движения ленты самописца 240 мм/час

Температура термостата колонки - 240° С

детектора - 320° С

испарителя - 270° С

Скорость газа-носителя (азота) - 30 ± 2 мл/мин

Объем вводимой пробы - 1 мкл

Время выхода крезоксим-метила - 3 мин 50 сек

Линейный диапазон детектирования: 0,1 - 1 нг

Образцы, дающие пики, большие, чем стандартный раствор с концентрацией 1 мкг/мл, разбавляют этилацетатом.

2.7.2. ВЭЖХ

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором фирмы Perkin-Elmer (США)

Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая Zorbax ODS, зернением 5 мкм

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: ацетонитрил - метанол - вода - *орто*-фосфорная кислота (60 : 5 : 35 : 0,05, по объему)

Скорость потока элюента: 1 мл/мин

Рабочая длина волны: 236 нм

Чувствительность: 0,005 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 мкл

Время выхода крезоксим-метила: 6,49 - 6,52 мин

Линейный диапазон детектирования: 2 - 20 нг

Образцы, дающие пики, большие, чем стандартный раствор с концентрацией 1,0 мкг/мл, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

2.8. Обработка результатов анализа

Содержание крезоксим-метила рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = C * W/V \quad \text{, где}$$

X - содержание крезоксим-метила в пробе воздуха, мг/м3;

C - концентрация крезоксим-метила в хроматографируемом растворе, найденная по градуировочному графику, мкг/мл;

W - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

V - объем пробы воздуха, отобранный для анализа, приведенный к стандартным условиям (давление 760 мм рт.ст., температура 20 ° С), дм ^{3}.

$$V= 0,386 *P* ut/(273+T),$$

где Т - температура воздуха при отборе пробы (на входе в аспиратор), град.С,

Р - атмосферное давление при отборе пробы, мм рт.ст.

u - расход воздуха при отборе пробы, дм^3/мин,

t - длительность отбора пробы, мин.

3.ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Необходимо соблюдать требования безопасности при работе в химических лабораториях в соответствии с "Правилами устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемиологического режима и личной гигиены при работе в лечебных и санитарно-эпидемиологических учреждениях системы МЗ СССР" (N 2455-81 от 20.10.81 г.), а также требования, изложенные в документации на приборы.

4. Контроль погрешности измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335-95. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

5. Разработчики

Юдина Т.В., Федорова Н.Е., Волкова В.Н., Волчек С.И. (Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана Минздрава России, г. Мытищи Московской обл.)

gost.e-ecolog.ru