Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение химических соединений и элементов в биологических средах

Сборник методических указаний
МУК 4.1.3056—13, 4.1.3057—13
МУК 4.1.3158—4.1.3161—14
МУК 4.1.3230—4.1.3233—14

Издание официальное

Москва • 2015

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение химических соединений и элементов в биологических средах

Сборник методических указаний
МУК 4.1.3056—13, 4.1.3057—13
МУК 4.1.3158—4.1.3161—14
МУК 4.1.3230—4.1.3233—14

ББК 28.072
О62

О62 **Определение** химических соединений и элементов в биологических средах: Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—168 с.

ISBN 978—5—7508—1415—2

1. Сборник подготовлен творческим коллективом авторов в составе: д.б.н., проф. А. Г. Малышева (руководитель), к.б.н. А. А. Ермаков, В. А. Шохин (ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина» Минздрава России).

2. Методические указания рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Методические указания утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой.

4. Введены впервые.

ББК 28.072

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 17.12.15

Формат 60x84/16 Печ. л. 10,5
Тираж 125 экз. Заказ 87

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
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2015
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015

Содержание

Введение 4

Измерение массовых концентраций винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в пробах крови методом газохроматографического анализа равновесного пара: МУК 4.1.3056—13 5

Измерение массовой концентрации хлорэтанола в пробах крови методом капиллярной газовой хроматографии: МУК 4.1.3057—13 18

Измерение массовой концентрации акролеина в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.3158—14 31

Измерение массовой концентрации акрилонитрила в крови методом капиллярной газовой хроматографии: МУК 4.1.3159—14 45

Измерение массовых концентраций фталатов (диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата) в молоке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.3160—14 60

Измерение массовых концентраций свинца, кадмия, мышьяка в крови методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой: МУК 4.1.3161—14 76

Измерение массовых концентраций химических элементов в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой: МУК 4.1.3230—14 96

Измерение массовых концентраций N-нитрозоаминов (N-нитрозодиметиламин, N-нитрозодиэтиламин) в моче методом капиллярной газовой хроматографии: МУК 4.1.3231—14 123

Измерение массовой концентрации акролеина в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.3232—14 137

Измерение массовых концентраций 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в крови методом капиллярной газовой хроматографии: МУК 4.1.3233—14 151

МУК 4.1.3056—13, 4.1.3057—13, 4.1.3158—4.1.3161—14,
4.1.3230—4.1.3233—14

Введение

Включенные в сборник 10 методических указаний по определению химических соединений в биологических средах предназначены для использования в химико-аналитических исследованиях при проведении биомониторинга состояния здоровья населения, для практического использования в рамках социально-гигиенического мониторинга на территориях с высокой антропогенной нагрузкой, а также могут быть использованы для диагностических целей в рамках осуществления государственного санитарного надзора, контроля, экспертизы, расследований. Методические указания предназначены для специалистов химико-аналитических лабораторий системы Роспотребнадзора, научно-исследовательских институтов, работающих в области экологии человека, гигиены окружающей среды и защиты прав потребителей.

Методические указания, включенные в сборник, разработаны и подготовлены в соответствии с требованиями ГОСТ Р 8.563—96 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений», ГОСТ Р 1.5—92 «ГСС. Общие требования к построению, изложению, оформлению и содержанию стандартов», МИ 2335—95 «Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа», МИ 2336—95 «Характеристики погрешности результатов количественного химического анализа. Алгоритм оценивания».

Все методики измерения прошли метрологическую аттестацию в соответствии с правилами ПР 50.2.002—94 «ГСИ. Порядок осуществления государственного метрологического надзора за выпуском, состоянием и применением средств измерений, аттестованными методиками выполнения измерений, эталонами и соблюдением метрологических правил и норм».

В методических указаниях, включенных в сборник, приведены методы определения 15 органических соединений и 15 тяжелых металлов и элементов в биологических средах, в том числе 9 веществ и 15 элементов – в крови, 3 вещества и 12 элементов – в моче и 5 веществ – в молоке. Определение токсичных веществ и элементов основано на использовании современных высокочувствительных методов физико-химического анализа – капиллярной газовой хроматографии и газохроматографическом анализе равновесного пара, высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Методические указания одобрены и рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
19 декабря 2014 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение массовых концентраций 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в крови методом капиллярной газовой хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3233—14

Свидетельство о метрологической аттестации № 88-16374-241-01.00076-2012 от 26.11.2013.

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода капиллярной газовой хроматографии для измерения массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в пробах крови в диапазоне концентрации для 2,4-дихлорфенола от 0,05 до 0,8 мг/дм^3 и для 2,4,6-трихлорфенола от 0,05 до 0,9 мг/дм^3.

1.2. Методические указания по измерению массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в пробах крови предназначены для использования в санитарно-гигиенических, экологических, лечебных и научных организациях, осуществляющих деятельность в области профпатологии и экологии человека.

1.3. Методические указания носят рекомендательный характер.

2. Физико-химические и токсикологические свойства

2,4-дихлорфенол – бесцветные игольчатые кристаллы. Относится к опасным веществам.

2,4,6-трихлорфенол – ромбические кристаллы. Относится к опасным веществам.

2,4-дихлорфенол и 2,4,6-трихлорфенол оказывают эмбриотоксическое, тератогенное и мутагенное действие, вызывают поражение верхних дыхательных путей, легких, печени, почек, миокарда, селезенки.

2,4-дихлорфенол	
Регистрационный номер CAS	120-83-2
Формула	$C_6H_4C_{l2}O$
Молекулярная масса	163
$T_{пл.}$, °С	45 ± 1
$T_{кип.}$, °С	210
Растворимость в воде, г/100 мл при 20 °С	0,5
Давление паров, кПа при 53 °С	133
Класс опасности	4
2,4,6-трихлорфенол	
Регистрационный номер CAS	88-06-2
Формула	$C_6H_3C_{l3}O$
Молекулярная масса	197,44
$T_{пл.}$, °С	68 ± 1
$T_{кип.}$, °С	244,5
Растворимость в воде	не растворим
Давление паров, Па при 76,5 °С	133
Класс опасности	4

3. Метрологические характеристики методики выполнения измерений

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значения погрешности (и ее составляющих) результатов измерений не превышают значений, приведённых в табл. 1.

Таблица 1

Диапазон измерений, значения точности (правильности и прецизионности) методики

Объект измерения	Диапазон измерений массовой концентрации, мг/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, %	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории), r, %
2,4-дихлорфенол					
Кровь	от 0,05 до 0,8 вкл.	24	6	12	17
2,4,6-трихлорфенол					
Кровь	от 0,05 до 0,9 вкл.	22	5	11	14

Значения показателя точности используют:

- при оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- при оценке деятельности лабораторий на качество проведения измерений;
- при оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики измерений в конкретной лаборатории.

4. Метод измерения

Выполнение измерений массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в пробе крови проводят методом капиллярной газовой хроматографии с использованием детектора электронного захвата и применением химической модификации. Методика модификации и количественного определения 2,4-дихлорфенола в крови основана на экстракционном концентрировании 2,4-дихлорфенола из крови методом жидкостной экстракции в кислой среде, бромировании органического экстракта, содержащего 2,4-дихлорфенол, бромной водой и проведении этерификации трифторуксусным ангидридом в среде пиридина.

Методика количественного определения 2,4,6-трихлорфенола в крови основана на экстракционном концентрировании 2,4,6-трихлорфенола из крови методом жидкостной экстракции в кислой среде и проведении этерификации в органическом экстракте трифторуксусным ангидридом при добавлении пиридина.

Определению не мешают хлороформ, тетрахлорметан и другие хлорфенолы в количествах, не превышающих установленную величину.

Длительность анализа, включая экстракцию, бромирование и этерификацию биопробы, – 3 часа.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

5.1 Средства измерений

Хроматограф газовый с детектором электронного захвата и капиллярной колонкой	
Термометр жидкостной стеклянный	ГОСТ 28498
Секундомер 60-минутный счетчик с ценой деления 0,2 мин. Диапазон рабочих температур от –20 до + 40 °С	ТУ 25-1894.003—90
Микрошприцы, диапазон дозируемого объема 1—10 мкл с ценой деления 0,2 мкл, погрешность 1 %	ТУ 2.833.106—2000

Весы лабораторные равноплечие 2-го класса точности; наибольший предел взвешивания 200 г, диапазон взвешивания по шкале мг от 0 до 100 мг, цена деления делительного устройства – 0,05 мг. Погрешность взвешивания по шкале мг ± 0,15 мг	ГОСТ Р 53228—08
Меры массы	ГОСТ 7328—01
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-1000-2 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Пипетки градуированные 1-го класса точности вместимостью 1-2-1-1, 1-2-1-2, 1-2-2-5 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Мерный стакан вместимостью 1 $дм^3$	ГОСТ 23932—90
Воронка делительная	ГОСТ 23932—90
Дозаторы жидкости механические с погрешностью ± 0,1 $мм^3$, объемом дозирования 1—5 $см^3$, 100—1 000 $мм^3$, 20—200 $мм^3$ с одноразовыми наконечниками	ГОСТ 28311—89

Примечание. Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

5.2. Реактивы

Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная)	ГОСТ 52501—05
Спирт этиловый ректифицированный	ГОСТ Р 51652—2000
Калий двухромовокислый, чда	ГОСТ 4220—75
Серная кислота концентрированная, осч	ГОСТ 14262—78
Щавелевая кислота, хч	ГОСТ 22180—76
Толуол, осч 22-5	ТУ 263106544493179—01
Трифторуксусный ангидрид	
Пиридин, чда	ГОСТ 13647—78
Натрий сернисто-кислый, чда	ГОСТ 195—77
Натрий серно-кислый безводный, чда	ГОСТ 4166—76
Калий бромистый, хч	ГОСТ 4160—74
Бром, хч	ГОСТ 4109—79
Стандартный образец 2,4-дихлорфенола высокой чистоты	ГСО 7198—95
Стандартный образец 2,4,6-трихлорфенола высокой чистоты	ГСО 7103—94

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией.

5.3. Вспомогательные устройства, материалы

Хроматографическая капиллярная колонка из кварцевого стекла с внутренним диаметром 0,32 мм длиной 30 м и толщиной пленки 1,8 мкм	
Редуктор кислородный	ТУ 3645-032-00220531—97
Сушильный шкаф, обеспечивающий нагрев до 150 °С с погрешностью ± 5 °С	ТУ 16.531.743—83
Центрифуга лабораторная медицинская с частотой вращения от 1 000 до 8 000 об./мин	ГОСТ 12.2.025—76
Азот газообразный	ГОСТ 9293—74
Водород технический	ГОСТ 3022—80
Бумага фильтровальная лабораторная	
Пробирки вакуумные для забора крови с напылением гепарина вместимостью 6 $см^3$	
Пробирки из полипропилена конические градуированные на 15 $см^3$, ТС 15А	

Примечание. Допускается использование вспомогательных устройств и материалов аналогичного назначения, технические характеристики которых не уступают указанным.

6. Требования безопасности и охраны окружающей среды

6.1. При выполнении работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76.

6.2. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83.

6.3. При выполнении измерений с использованием газового хроматографа соблюдают правила электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцией по эксплуатации прибора.

6.4. При работе с сосудами, работающими под давлением, необходимо соблюдать правила их устройства и безопасной эксплуатации в соответствии с ПБ 03-576-03.

6.5. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005—88, ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03 и 2.2.5.2308—07.

6.6. Организуют обучение работающих безопасности труда по ГОСТ 12.0.004—90.

6.7. При работе с биологическими средами соблюдают санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322—08.

7. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие квалификацию не ниже инженера-химика и опыт работы в химической лаборатории, прошедшие обучение и владеющие техникой проведения работ на газовом хроматографе.

8. Условия измерений

При выполнении измерений в лаборатории соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха	(20 ± 5) °С;
– атмосферное давление	от 84,0 до 106,7 кПа (630—800 мм рт. ст.);
– относительная влажность воздуха	от 30 до 80 %;
– напряжение в сети	(220 ± 10) В;
– частота переменного тока	(50 ± 10) Гц.

Выполнение измерений на газовом хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

9. Подготовка к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы:

– подготовка стеклянной посуды;

– подготовка хроматографической системы;

– приготовление растворов для градуировки;

– построение градуировочной характеристики;

– отбор проб.

9.1. Подготовка посуды

В термостойкий стакан вместимостью 1 дм^3 помещают 25 г калия двухромовокислого, осторожно приливают по палочке частями, тщательно перемешивая, 1 дм^3 концентрированной серной кислоты.

Используемую посуду необходимо замочить в свежеприготовленном 3 %-м растворе бихромата калия в серной кислоте, промыть проточной водопроводной водой, ополоснуть дистиллированной водой и высушить в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

9.2. Подготовка хроматографической системы

Подготовку хроматографа к работе осуществляют в соответствии с инструкцией по эксплуатации хроматографа.

9.2.1. Подготовка хроматографической колонки.

Хроматографическую колонку перед эксплуатацией устанавливают в хроматограф и, не подключая к детектору, кондиционируют в токе газа-носителя (азота) с расходом 4 $см^3$/мин при температуре 240 °С в течение 2 ч. После охлаждения колонку подключают к детектору и проверяют стабильность нулевой линии при рабочей температуре термостата колонок. При отсутствии мешающих влияний колонка готова к работе.

9.2.2. Устанавливают режим работы газового хроматографа в соответствии со следующими условиями:

– температурный режим термостата колонки: 135 °С с выдержкой 10 мин, подъём со скоростью 10 °С/мин до 250 °С;

– режим испарителя: температура 260 °С;

– режим детектора: температура 280 °С;

– режим расхода газа-носителя (азота): 20 $см^3$/мин;

– время удерживания:

- 2,4-дихлорфенола: 7,08 ± 0,05 мин;
- 2,4,6-трихлорфенола: 14,08 ± 0,02.

Записывают нулевую линию при установленных режимных параметрах. При отсутствии флуктуации приступают к работе.

9.3. Приготовление растворов для градуировки

9.3.1. Приготовление исходного раствора 2,4-дихлорфенола. Используется готовый стандартный образец 2,4-дихлорфенола высокой чистоты ГСО 7198—95. Масса ГСО в ампуле составляет не менее 0,1 г. В мерной пробирке объемом 10 $см^3$ взвешивают 5 мг сухого вещества 2,4-дихлорфенола и добавляют пипеткой 10 $см^3$ метанола. Массовая концентрация 2,4-дихлорфенола в исходном растворе составляет 500 мкг/$см^3$. Срок хранения раствора в течение 30 дней.

9.3.2. Приготовление рабочего раствора 2,4-дихлорфенола. В мерную пробирку объемом 2 $см^3$, содержащую толуол в объеме 0,5 $см^3$, вводят дозатором 0,5 $см^3$ исходного раствора 2,4-дихлорфенола. Массовая концентрация 2,4-дихлорфенола в рабочем растворе для градуировки составляет 0,25 мг/$см^3$. Срок хранения раствора 5 часов.

9.3.3. Приготовление исходного раствора 2,4,6-трихлорфенола. Используется готовый стандартный образец 2,4,6-трихлорфенола высокой чистоты ГСО 7103—94. Масса ГСО в ампуле составляет не менее 0,1 г. В мерную колбу объемом 25 $см^3$, вносят навеску 2,4,6-трихлорфе-

нола массой 0,0221 г и заполняют колбу до метки толуолом. Массовая концентрация 2,4,6-трихлорфенола в исходном растворе составляет 0,884 мг/см^3. Срок хранения раствора в течение 30 дней.

9.3.4. Приготовление рабочего раствора 2,4,6-трихлорфенола. В мерную пробирку объемом 2 см^3, содержащую толуол в объеме 0,5 см^3, вводят дозатором 0,5 см^3 исходного раствора 2,4,6-трихлорфенола. Массовая концентрация 2,4,6-трихлорфенола в рабочем растворе для градуировки составляет 0,442 мг/см^3. Срок хранения раствора 5 часов.

9.3.5. Приготовление 10 %-го раствора щавелевой кислоты. 10 г щавелевой кислоты растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу на 100 см^3 и заполняют колбу до метки водой.

9.3.6. Приготовление раствора серной кислоты (1 : 3). В термостойкий химический стакан помещают 60 см^3 бидистиллированной воды, при непрерывном помешивании приливают 20 см^3 концентрированной серной кислоты. Раствор охлаждают. Срок хранения неограничен.

9.3.7. Приготовление 10 %-го раствора сернисто-кислого натрия. Растворяют 10 г сернисто-кислого натрия в небольшом количестве бидистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу на 100 см^3 и заполняют колбу до метки водой. Срок хранения 1 месяц.

9.3.8. Приготовление раствора бромирующего реактива. Растворяют 20 г бромистого калия в небольшом количестве бидистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу на 100 см^3 и заполняют колбу до метки водой. К полученному раствору приливают 0,5 см^3 брома. Раствор хранят в темной склянке. Срок хранения 1 месяц.

9.3.9. Приготовление растворов 2,4-дихлорфенола для градуировки. В пробирку объемом 13,0 см^3, содержащую 5,0 см^3 бидистиллированной воды, вводят микрошприцем различные объемы рабочих растворов 2,4-дихлорфенола для градуировки согласно табл. 2. Каждая серия состоит из 5 растворов для градуировки.

Таблица 2

Растворы для установления градуировочной характеристики при определении концентраций 2,4-дихлорфенола

Номер рабочего раствора для градуировки	1	2	3	4	5
Объем рабочего раствора (c = 0,25 мг/см^3), мм^3	1	2	4	8	16
Массовая концентрация 2,4-дихлорфенола, мг/дм^3	0,050	0,100	0,200	0,400	0,800

9.3.10. *Приготовление растворов 2,4,6-трихлорфенола для градуировки.* В пробирку объемом 13,0 см^3, содержащую 5,0 см^3 бидистиллированной воды, вводят дозатором различные объемы рабочих растворов 2,4,6-трихлорфенола для градуировки согласно табл. 3. Каждая серия состоит из 5 растворов для градуировки.

Таблица 3

Растворы для установления градуировочной характеристики при определении концентраций 2,4,6-трихлорфенола

Номер рабочего раствора для градуировки	1	2	3	4	5
Объем рабочего раствора (c = 0,442 мг/см^3), мм^3	0,6	1	2	6	10
Массовая концентрация 2,4,6-трихлорфенола, мг/дм^3	0,053	0,088	0,117	0,530	0,884

9.4. Построение градуировочной характеристики

Перед приготовлением градуировочных растворов необходимо удостовериться, что применяемая кровь не содержит 2,4-дихлорфенол и 2,4,6-трихлорфенол.

Градуировочные характеристики устанавливают на градуировочных растворах 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола методом абсолютной градуировки. Приготовленные растворы хроматографируют на капиллярной колонке не менее 5 раз. На полученной хроматограмме определяют площади пиков определяемых компонентов и по средним результатам измерений по 5 концентрациям для градуировки строят градуировочную характеристику. Она выражает зависимость площади пика исследуемых веществ на хроматограмме (мВ – при автоматическом обсчете с использованием программно-аппаратного комплекса) от содержания (мг/дм^3).

2,4-дихлорфенол. В пробирку объемом 13,0 см^3 помещают 5,0 см^3 бидистиллированной воды и градуировочный раствор 2,4-дихлорфенола (табл. 2). Затем добавляют 2,5 см^3 толуола и проводят экстракционное концентрирование в течение 5 мин. К полученному экстракту добавляют раствор бромирующего реактива V = 2 см^3 и 0,4 см^3 разбавленной серной кислоты (1 : 3) и бромируют в течение 5 мин. После завершения бромирования избыток брома нейтрализуют 0,6 см^3 раствора сернистокислого натрия. Для отделения органического растворителя (толуол) экстракт центрифугируют в течение 2—3 мин при 8 000 об./мин и затем сушат сульфатом натрия массой 0,5 г.

Превращение бромпроизводного в эфиры осуществляют путем ацетилирования с помощью трифторуксусного ангидрида ($V = 0{,}1$ см^3) в среде пиридина ($V = 0{,}1$ см^3) в органическом растворителе в течение 5 мин.

Полученный эфир (трифторацетата 2,4-дихлорфенол) в объеме 1 мм^3 анализируют методом ГХ/ЭЗД. Процедуру повторяют аналогично для каждого градуировочного раствора. На полученной хроматограмме определяют площади пиков определяемых компонентов и по средним результатам из 5 серий строят градуировочную характеристику.

2,4,6-трихлорфенол. В пробирку объемом 13,0 см^3 помещают 5,0 см^3 бидистиллированной воды и градуировочный раствор 2,4,6-трихлорфенола (табл. 3). Затем добавляют 2,5 см^3 толуола и проводят экстракционное концентрирование в течение 5 мин.

Полученный экстракт центрифугируют в течение 2—3 мин при 8 000 об./мин. и затем сушат сульфатом натрия массой 0,5 г. Превращение 2,4,6-трихлорфенола в простые эфиры осуществляют путем ацетилирования с помощью трифторуксусного ангидрида ($V = 0{,}1$ см^3) в среде пиридина ($V = 0{,}1$ см^3) в органическом растворителе в течение 5 мин.

Полученный эфир (2,4,6-трихлорфенилтрифторацетат) в объеме 1 мм^3 анализируют методом ГХ/ЭЗД. Процедуру повторяют аналогично для каждого градуировочного раствора. На полученной хроматограмме определяют площади пиков определяемых компонентов и по средним результатам из 5 серий строят градуировочную характеристику.

Градуировку проводят 1 раз в месяц и при смене реактивов.

9.5. 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 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола соответствовала нижней, верхней границам и середине диапазона построения градуировочной характеристики. Градуировка признается стабильной при выполнении условия:

$$\left|C_m - C\right| \le 0{,}10 \cdot C\text{, где} \qquad (1)$$

C – заданная массовая концентрация 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в градуировочном растворе;

C_m – результат измерения массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в образце для градуировки.

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.

9.6. Отбор проб

Отбор проб венозной крови объемом не менее 10 см^3 производят в одноразовый шприц, оттуда переносят в пластмассовые пробирки с антикоагулянтом и закручивающимися крышками (использование резиновых крышек недопустимо). В качестве антикоагулянта используется гепарин (из расчета на 5 см^3 крови – 0,05 см^3 гепарина с концентрацией 5 000 ЕД/см^3). Анализ крови проводят в течение суток. Возможно хранение пробы крови в морозильной камере не более пяти дней.

10. Выполнение измерений

2,4-дихлорфенол. Анализируемую пробу крови $V = 5$ см^3 помещают в пробирку вместимостью 13,0 см^3, приливают 3,0 см^3 бидистиллированной воды, 1 см^3 10 %-го раствора щавелевой кислоты и 2,5 см^3 толуола и проводят экстракционное концентрирование в течение 5 мин. К полученному экстракту добавляют 2 см^3 раствора бромирующего реактива и 0,4 см^3 разбавленной (1 : 3) серной кислоты и бромируют в течение 5 мин. После завершения бромирования избыток брома нейтрализуют 0,6 см^3 раствора сернисто-кислого натрия.

Для отделения органического растворителя (толуол) экстракт центрифугируют в течении 2—3 мин при 8 000 об./мин и затем сушат сульфатом натрия массой 0,5 г.

Превращение бромпроизводного в простые эфиры осуществляют путем ацетилирования с помощью трифторуксусного ангидрида (0,1 см^3) в среде пиридина (0,1 см^3) в органическом растворителе в течение 5 мин.

Полученный эфир (трифторацетата 2,4-дихлорфенол) в объеме 1 мм^3 анализируют и проводят количественное определение анализируемого соединения в подготовленной пробе. Процедуру повторяют аналогично для второго образца и проводят выполнение измерений двух параллельных проб крови. Условия выполнения измерений аналогичны условиям при установлении градуировочной характеристики (п. 9.4).

2,4,6-трихлорфенол. Анализируемую пробу крови – 5 см^3 помещают в пробирку вместимостью 13,0 см^3, приливают 3,0 см^3 бидистиллированной воды, 1 см^3 10 %-го раствора щавелевой кислоты и проводят экстракционное концентрирование 2,5 см^3 толуола в течение 5 мин.

Полученный экстракт центрифугируют в течение 2—3 мин при 8 000 об./мин и затем сушат сульфатом натрия массой 0,5 г. Превращение 2,4,6-трихлорфенола в простые эфиры осуществляют путем ацетилирования с помощью трифторуксусного ангидрида (0,1 $см^3$) в среде пиридина (0,1 $см^3$) в органическом растворителе в течение 5 мин.

Полученный эфир (2,4,6-трихлорфенилтрифторацетат) в объеме 1 $мм^3$ анализируют и проводят количественное определение анализируемого соединения в подготовленной пробе. Процедуру повторяют аналогично для второго образца и проводят выполнение измерений двух параллельных проб крови. Условия выполнения измерений аналогичны условиям при установлении градуировочной характеристики (п. 9.4).

11. Обработка результатов измерений

11.1. На хроматограмме рассчитывают площадь пика и по градуировочной характеристике определяют массовую концентрацию 2,4-дихлорфенола (C, мг/$дм^3$) и 2,4,6-трихлорфенола (C, мг/$дм^3$) в крови.

11.2. За окончательный результат измерения принимают результат среднего арифметического значения двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости C_1, C_2 (параллельных определений), для которых выполняется условие:

$$\left|C_1 - C_2\right| \le 0{,}01 \cdot r \cdot \frac{C_1 + C_2}{2}, \text{ где} \qquad (2)$$

r – предел повторяемости. Значения предела повторяемости приведены в табл. 4.

При невыполнении условия (2) получают дополнительно еще два результата измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое четырех результатов измерений (C_1, C_2, C_3, C_4), полученных в условиях повторяемости, для которых выполняется условие:

$$\left|C_{max,4} - C_{min,4}\right| \le 0{,}01 \cdot CR_{0,95}(4) \cdot \frac{C_1 + C_2 + C_3 + C_4}{4}, \text{ где} \qquad (3)$$

$CR_{0,95}(4)$ – критический диапазон. Значения критического диапазона приведены в табл. 4;

$C_{max,4}$ – наибольший результат измерений, полученный в условиях повторяемости;

$C_{min,4}$ – наименьший результат измерений, полученный в условиях повторяемости.

При невыполнении условия (3) в качестве окончательного результата измерений принимают медиану четырех результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (параллельных определений).

Дополнительно выявляют и устраняют причины, приводящие к невыполнению условий (1) и (2).

Таблица 4

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

Диапазон измерений, мг/дм^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 из четырех результатов измерений, полученных 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, %
2,4-дихлорфенол			
От 0,05 до 0,8 вкл.	17	23	34
2,4,6-трихлорфенол			
От 0,05 до 0,9 вкл.	14	19	31

12. Оформление результатов измерений

Результат измерений представляют в виде ($\overline{C} \pm \Delta$) мг/дм^3, где

$\overline{C}$ – результат измерений массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола, полученный в соответствии с процедурами раздела 9.4, мг/дм^3;

Δ – абсолютная характеристика погрешности измерений массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола, мг/дм^3 при $P = 0,95$, вычисляемое по формуле: $\Delta = \frac{\delta \cdot C}{100}$, где δ – относительное значение характеристики погрешности измерений массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола, %.

13. Процедуры обеспечения достоверности измерений

13.1. Обеспечение достоверности измерений в пределах лаборатории организуют и проводят путем проведения оперативного контроля процедуры измерений и контроля стабильности результатов измерений в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6 и РМГ 76.

Периодичность получения результатов контрольных процедур и формы их регистрации приводят в документах лаборатории, устанавли-

вающих порядок и содержание работ по организации методов контроля стабильности результатов измерений в пределах лаборатории.

13.2. Контроль процедуры измерений с использованием образцов для контроля.

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

Результат контрольной процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

$\overline{C}'$ – результат измерений массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в пробе с известной добавкой – среднее арифметическое двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, расхождение между которыми удовлетворяет условию (1);

$\overline{C}$ – результат измерений массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в исходной пробе – среднее арифметическое двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, расхождение между которыми удовлетворяет условию (1);

$C_д$ – величина добавки.

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

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

$\Delta_{л,C'_{ср}}$, $\Delta_{л,C_{ср}}$ – значения характеристики погрешности результатов измерений, установленные в лаборатории при реализации методики, соответствующие массовой концентрации 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола 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.

13.3. Проверка приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях внутрилабораторной прецизионности.

Образцами для проверки приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях внутрилабораторной прецизионности, являются образцы крови с внесенными в них добавками аттестованных растворов 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола, подготовленных в соответствии с пп. 9.3.1—9.3.5 и 9.3.10.

Проверку приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях внутрилабораторной прецизионности (в пределах одной лаборатории, разными операторами, в разное время), проводят по результатам измерений массовых концентраций 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола в образцах крови с одинаковым содержанием 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола.

Результаты измерений признают приемлемыми при выполнении условия:

$$\frac{|C_1 - C_2|}{(C_1 + C_2)/2} \cdot 100\,\% \leq R_л, \text{ где} \qquad (5)$$

C_1 и C_2 – результаты измерений массовых концентраций 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола, полученные в условиях внутрилабораторной прецизионности, т. е. в одной лаборатории в разное время, разными операторами;

$R_л$ – предел внутрилабораторной прецизионности, значения предела внутрилабораторной прецизионности приведены в табл. 5.

При невыполнении условия (5) процедуру повторяют. При повторном превышении предела внутрилабораторной прецизионности выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

Таблица 5

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

Диапазон измерений, мг/дм^3	Предел внутрилабораторной прецизионности (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории в разное время, разными операторами), $R_л$, %
2,4-дихлорфенол	
От 0,05 до 0,80 вкл.	22
2,4,6-трихлорфенол	
От 0,05 до 0,9 вкл.	20

13.4. Проверка приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях воспроизводимости.

Образцами для проверки приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях воспроизводимости, являются образцы крови с внесенными в них добавками аттестованного раствора 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола, подготовленные в соответствии с пп. 9.3.1—9.3.5 и 9.3.10.

Проверку приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях воспроизводимости, проводят по результатам измерений массовых концентраций 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола из образцов крови (специально подготовленные образцы крови с внесенными добавками аттестованного раствора 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола) с одинаковым содержанием 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола.

Результаты измерений признают приемлемыми при выполнении условия:

$$\frac{\left|\bar{C}_1 - \bar{C}_2\right|}{(\bar{C}_1 + \bar{C}_2)/2} \cdot 100\,\% \le R, \text{ где} \qquad (6)$$

$\bar{C}_1$ и $\bar{C}_2$ – результаты измерений массовых концентраций 2,4-дихлорфенола и 2,4,6-трихлорфенола;

R – предел воспроизводимости, значения предела воспроизводимости приведены в табл. 4.

При невыполнении условия (6) процедуру повторяют. При повторном превышении предела воспроизводимости выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.5. Оперативный контроль процедуры измерений, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов выполняемых измерений приводят в документах лаборатории, устанавливающих порядок и содержание работ по организации методов контроля стабильности результатов измерений в пределах лаборатории.

Список нормативно-технических документов

1. ГОСТ Р 51652—2000 «Спирт этиловый ректифицированный».

2. ГОСТ Р ИСО 5725-6—02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

3. ГОСТ 12.1.004—91 «ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования».

4. ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

5. ОСТ 12.1.007—76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

6. ГОСТ 12.1.019—09 «ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

7. ГОСТ 12.4.009—83 «ССБТ. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание».

8. ГОСТ 195—77 «Реактивы. Натрий сернисто-кислый. Технические условия».

9. ГОСТ 1770—74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки».

10. ГОСТ 4109—79 «Реактивы. Бром. Технические условия».

11. ГОСТ 4160—74 «Реактивы. Калий бромистый. Технические условия».

12. ГОСТ 4220—75 «Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия».

13. ГОСТ 7328—01 «Гири. Общие технические условия».

14. ГОСТ 9293—74 «Азот газообразный и жидкий. Технические условия».

15. ГОСТ 12026—76 «Бумага фильтровальная лабораторная».

16. ГОСТ 13647—78 «Реактивы. Пиридин. Технические условия».

17. ГОСТ 14262—78 «Кислота серная особой чистоты. Технические условия».

18. ГОСТ 22180—76 «Реактивы. Кислота щавелевая. Технические условия».

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

20. ГОСТ Р 53228—08 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. метрологические и технические требования. Испытания».

21. ГОСТ 28311—89 «Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний».

22. ГОСТ 28498—90 «Термометр жидкостной стеклянный. Общие технические требования. Методы испытаний».

23. ГОСТ 29227—91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования».

24. ГОСТ 52501—05 «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

25. РМГ 76—04 «Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа».

26. ТУ 25-11.1592—81 «Бидистиллятор стеклянный типа БС».

27. Система очистки воды Milli-QIntegral.

28. ТУ 25-11.1630—84 «Шкаф вытяжной химический».

29. ТУ 3645-032-00220531—97 «Редуктор кислородный. Технические условия».

Примечание. При использовании настоящей методики измерений целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории Российской Федерации по соответствующему указателю стандартов, составленному на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящей методикой измерений, следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

Методические указания разработаны ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (авторы: Т. С. Уланова, Н. В. Зайцева, Т. В. Нурисламова, Н. А. Попова, Г. И. Терентьев).

gost.e-ecolog.ru