ИНФОРМАЦИОННО-ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ГОСКОМСАНЭПИДНАДЗОРА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИЗМЕРЕНИЮ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ

Выпуск 23/1

gost.e-ecolog.ru

УТВЕРЖДЕНО
Заместителем Главного
государственного
санитарного врача СССР
А.И.Заиченко
"12" декабря 1988г.
N 4802-88

# МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
## по фотометрическому измерению концентраций липазы микробной в воздухе рабочей зоны

Липаза микробная является ферментным препаратом, предназначенным для расщепления жиров, применяется в медицине, в меховой, кожевенной промышленности, в животноводстве, и других отраслях народного хозяйства.

Липаза микробная — мелкий порошок светло-коричневого цвета и легким дрожжевым запахом, растворим в воде, в солевых растворах (в частности, фосфатном буфере), не растворим в большинстве органических растворителях.

В воздухе находится в виде аэрозоля.

Ферментный препарат липаза микробная раздражает слизистые оболочки верхних дыхательных путей и легких, обладает аллергенным действием.

ПДК в воздухе 1 мг/м$^3$.

### Характеристика метода

Метод основан на фотометрическом определении цветного комплекса меди, образуемого свободными жирными кислотами, которые выделяются в результате гидролитического действия липазы, с диэтилдитиокарбаматом.

Отбор проб производится с концентрированием на фильтр.

Нижний предел измерения содержания жирной кислоты 1 мкг/мл в фотометрируемом растворе.

Нижний предел измерения липазы в воздухе 0,3 мг/м$^3$ (при отборе 4 л воздуха).

Диапазон измеряемых концентраций липазы в воздухе от 0,3 до 3,7 мг/м$^3$.

Измерению не мешают белковые вещества и фосфорнокислые соли.

Суммарная погрешность измерения не превышает 25%.

Время выполнения измерения, включая отбор проб, 1 час 30 мин.

### Приборы, аппаратура, посуда

Спектрофотометр.

Аспирационное устройство.

Фильтродержатели, ТУ 95.72.05-77.

pH-метр типа иономера ЭВ-74.

Размельчитель тканей РТ-2, ТУ 64-1-1305-79.

Аппарат инактивации сыворотки АИС, ТУ 64-1-1091-77 или лабораторная водяная баня.

Колбы конические, ГОСТ 10394-72, вместимостью 1000 мл.

Бюретка, ГОСТ 20292-74, вместимостью 25 мл.

Мерные колбы, ГОСТ 1770-74, вместимостью от 25 до 1000 мм.

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

Цилиндры мерные, ГОСТ 1770-74, вместимостью 100 мл.

Бюксы, ГОСТ 25336-82, вместимостью 2-5 мл.

Пробирки с пришлифованными пробками, ГОСТ 10515-75, вместимостью 15 мл.

Стаканы химические, ГОСТ 25336-82, вместимостью 50; 100; 250 мл.

### Реактивы, растворы и материалы

Липаза микробная.

Оливковое масло, ГОСТ 7580-55.

Спирт поливиниловый (ПВС0, ТУ 64-5-51-79, 2% водный р-р.

Натрий фосфорнокислый двухзамещенный, ГОСТ 4172-76, 1/15 М раствор (А).

Калий фосфорнокислый однозамещенный, ГОСТ 4198-75, 1/15 М раствор (Б).

Фосфатный буфер, 1/15 М раствор с pH 7,8. Готовят смешиванием растворов А и Б в соотношении 91,5 : 8,5. Величину pH проверяют на pH-метре.

Хлороформ, ГОСТ 215-74, хч.

Гептан, ГОСТ 5.395-78, хч.

Раствор экстракционный: готовят путем смешивания хлороформа и гептана 3:2.

Уксусная кислота, ледяная, ГОСТ 6175, 1 М раствор.

Медь азотнокислая трехводяная, ГОСТ 4163-68, чда.

Натрий хлористый, ГОСТ 4233-77, хч.

Триэтаноламин, ТУ 6-09-2448-72, ч.

Бутанол, ГОСТ 6006-78, чда.

Натрия N,N-диэтилдитиокарбамат, ГОСТ 8864-71, ч.

Реагент меди: готовят в мерной колбе на 200 мл, для этого к 10 мл 1 М раствора уксусной кислоты добавляют 12 мл триэтаноламина, 4,75 г меди азотнокислой и 100 мл воды, растворяют, добавляют 57 г хлористого натрия и 50 мл воды, затем 1 М уксусной кислотой устанавливают pH-8,1 и доводят до метки водой. Устойчив реагент месяц (до образования зеленого осадка).

Цветной реагент: в мерной колбе на 100 мл растворяют 100 мл натрия N,N-диэтилдитиокарбамата в 60 мл бутанола и доводят до метки хлороформом. Сохраняется при хранении в холодильнике в течение 2-х недель.

Эмульсия оливкового масла; готовят перемешиванием 40 мл оливкового масла с 60 мл 2% раствора ПВС в дистиллированной воде в стакане микроизмельчателя тканей при 3000 об/мин в течение 30-40 минут. Эмульсия готовится перед употреблением.

Пальмитиновая кислота, МРТУ 6-09-5841-69. Для стандарта возможно также применение олеиновой кислоты.

Стандартный раствор N 1 с концентрацией 1,5 мг/мл пальмитиновой кислоты готовят растворением кислоты в экстракционном растворе в мерной колбе на 50 мл. Раствор устойчив при хранении в холодильнике в течение недели.

Стандартный раствор N 2 и 3 с концентрацией 100 мкг/мл и 10 мкг/мл готовят путем соответствующего разбавления раствора N 1 экстракционным раствором. Готовят перед употреблением.

Фильтры АФА-ХА-20 или АФА-ХА-10.

## Отбор пробы воздуха

Воздух с объемным раствором 1 л/мин аспирируют через фильтр АФА-ХА, укрепленный в фильтродержателе.

Для определения 1/2 ПДК достаточно отобрать 2,5 л воздуха.

Пробы устойчивы длительное время.

## Подготовка к измерению

Градуировочные растворы готовят в пробирках, согласно таблице 12.

Таблица 12

| N стандарта | Стандартный раствор N 3, | Экстракционный раствор, мл | Концентрация пальмитиновой кислоты, мкг/мл |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,0 | 5,0 | 0 |
| 2 | 0,5 | 4,5 | 1 |
| 3 | 1,0 | 4,0 | 2 |
| 4 | 2,0 | 3,0 | 4 |
| 5 | 3,0 | 2,0 | 6 |
| 6 | 4,0 | 1,0 | 8 |
| 7 | 5,0 | 0,0 | 10 |

Во все пробирки с градуировочными растворами добавляют 0,5 мл насыщенного раствора натрия бромистого и 2,5 мл реагента меди. Пробирки закрывают и встряхивают при 1500 об/мин. По 3,5 мл органического слоя переносят в пробирки с 0,4 мл цветного реагента. Перемешивают и через 5-10 минут измеряют оптиче-

скую плотность при длине волны 440 нм. Измерение проводят в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм по отношению к раствору сравнения, не содержащего определяемого вещества (раствор N 1 по таблице). Окраска растворов устойчива 3 часа.

Строят градуировочный график зависимости значений оптических плотностей от соответствующих им концентраций жирной кислоты в градуировочном растворе (мкг/мл).

Проверка градуировочного графика проводится в случае использования новой партии реактивов, но не реже 1 раза в квартал.

### Проведение измерения

Фильтр с отобранной пробой переносят в химический стакан, добавляют 5 мл фосфатного буфера и перемешивают интенсивно в течение 10 мин стеклянной палочкой или на магнитной мешалке. В пробирки вносят 1 мл эмульсии оливкового масла и 8-10 минут выдерживают в водяной бане при $37 \pm 0{,}5^{o}C$, затем не вынимая добавляют в каждую пробирку по 0,5 мл раствора фермента (пробы), перемешивают и оставляют при $37^{o}C$ на 1 час (точно) для проведения липолиза. По истечении этого времени в каждую пробирку добавляют 5 мл экстракционного раствора из бюретки и интенсивно встряхивают в течение 3 минут.

Определение содержания образовавшейся жирной кислоты проводят аналогично градуировочным растворам. Раствором сравнения служит эмульсия с добавлением фосфатного буфера, которым обработан чистый фильтр. Остальные реактивы добавляют в том же количестве, как при анализе проб. Концентрацию жирной кислоты находят по графику.

### Расчет концентрации

Концентрацию липазы микробной (С) в воздухе (в $мг/м^3$) вычисляют по формуле:

$$C = [(a * B_1 * B_2) / (M * A * Б_3 * V)] * 1000,$$ где

а — концентрация жирной кислоты в анализируемом растворе, найденная по графику, мкг/мл;

$В_1$ — общий объем раствора для экстракции жирных кислот, мл;

$В_2$ — общий объем раствора пробы с ферментом, мл;

$Б_3$ — объем раствора пробы с липазой, взятый для инкубирования, мл;

V — объем воздуха, отобранный для анализа и приведенный к стандартным условиям, л (см. Приложение 1);

1000 — коэффициент пересчета на 1 $м^3$;

М — молекулярная масса жирной кислоты;

А — липолитическая активность липазы, ЛЕ/мг, ч. Единице липолитической активности (ЛЕ) соответствует такое количество фермента, которое освобождает 1 мкмоль жирной кислоты в течение часа при 37°С. Или это количество микроэквивалентов жирной кислоты, выделяющихся в результате гидролитического действия 1 мг фермента липазы. Использована липаза с активностью 200000 ЛЕ/гч (200 ЛЕ/мг ч).

### Пояснение к формуле расчета:

$(а * В_1)/М$ — количество мкмоль жирной кислоты в градуировочном растворе. Так как 200 мкэквив. жирной кислоты дает 1 мг липазы, то $(а * В_1) / М$ мкэквивалентов дает

$А = а/В_1/М * 2000$ мг липазы.

Эти А мг липазы содержит $Б_3 = 0,5$ мл пробы, объем всей пробы фермента $В_2 = 5$ мл.

V/1000 количество $м^3$ воздуха, отобранного для анализа.

Приведение объема воздуха к стандартным условиям проводят по следующей формуле:

$$V_{20} = [V * (273 + 20) * P ]/ [(273 + t^{O}) * 101,33],$$ где

V — объем воздуха, отобранный для анализа, л;

P — барметрическое давление, кПА (101,33 кПа = 760 мм рт. ст.)

t — температура воздуха в месте отбора пробы, $^{O}$C.

Для удобства расчета $V_{20}$ следует пользоваться таблицей коэффициентов (приложение 2). Для приведения воздуха к стандартным условиям надо умножить V на соответствующий коэффициент.

**Коэффициент К для приведения объема воздуха к стандартным условиям**

| °С | Давление Р, кПа (мм рт. ст.) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 97,33 (730) | 97,86 (734) | 98,4 (738) | 98,93 (742) | 99,46 (746) |
| -30 | 1,1582 | 1,1646 | 1,1709 | 1,1772 | 1,1836 |
| -26 | 1,1393 | 1,1456 | 1,1519 | 1,1581 | 1,1644 |
| -22 | 1,1212 | 1,1274 | 1,1336 | 1,1396 | 1,1458 |
| -18 | 1,1036 | 1,1097 | 1,1159 | 1,1218 | 1,1278 |
| -14 | 1,0866 | 1,0926 | 1,0986 | 1,1045 | 1,1105 |
| -10 | 1,0701 | 1,0760 | 1,0819 | 1,0877 | 1,0986 |
| -06 | 1,0640 | 1,0599 | 1,0657 | 1,0714 | 1,0772 |
| -02 | 1,0385 | 1,0442 | 1,0499 | 1,0556 | 1,0613 |
| 0 | 1,0309 | 1,0366 | 1,0423 | 1,0477 | 1,0535 |
| +02 | 1,0234 | 1,0291 | 1,0347 | 1,0402 | 1,0459 |
| +06 | 1,0087 | 1,0143 | 1,0198 | 1,0253 | 1,0309 |
| +10 | 0,9944 | 0,9990 | 1,0054 | 1,0108 | 1,0162 |
| +14 | 0,9806 | 0,9860 | 0,9914 | 0,9967 | 1,0027 |
| +18 | 0,9671 | 0,9725 | 0,9778 | 0,9880 | 0,9884 |
| +20 | 0,9605 | 0,9658 | 0,9711 | 0,9783 | 0,9816 |
| +22 | 0,9539 | 0,9592 | 0,9645 | 0,9696 | 0,9749 |
| +24 | 0,9475 | 0,9527 | 0,9579 | 0,9631 | 0,9683 |
| +26 | 0,9412 | 0,9464 | 0,9516 | 0,9566 | 0,9618 |
| +28 | 0,9349 | 0,9401 | 0,9453 | 0,9503 | 0,9955 |
| +30 | 0,9288 | 0,9339 | 0,9391 | 0,9440 | 0,9432 |
| +34 | 0,9167 | 0,9218 | 0,9268 | 0,9318 | 0,9368 |
| +38 | 0,9049 | 0,9099 | 0,9149 | 0,9198 | 0,9248 |

| °C | Давление Р, кПа (мм рт. ст.) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 100 (750) | 100,53 (754) | 101,06 (758) | 101,33 (760) | 101,86 (764) |
| -30 | 1,1899 | 1,1963 | 1,2026 | 1,2058 | 1,2122 |
| -26 | 1,1705 | 1,1763 | 1,1831 | 1,1862 | 1,1925 |
| -22 | 1,1519 | 1,1581 | 1,1643 | 1,1673 | 1,1735 |
| -18 | 1,1338 | 1,1399 | 1,1460 | 1,1490 | 1,1551 |
| -14 | 1,1164 | 1,1224 | 1,1284 | 1,1313 | 1,1373 |
| -10 | 1,0994 | 1,1053 | 1,1112 | 1,1141 | 1,1200 |
| -06 | 1,0829 | 1,0887 | 1,0945 | 1,0974 | 1,1032 |
| -02 | 1,0669 | 1,0726 | 1,0784 | 1,0812 | 1,0869 |
| 0 | 1,0591 | 1,0648 | 1,0705 | 1,0733 | 1,0789 |
| +02 | 1,0514 | 1,0571 | 1,0627 | 1,0655 | 1,0712 |
| +06 | 1,0363 | 1,0419 | 1,0475 | 1,0502 | 1,0557 |
| +10 | 1,0216 | 1,0272 | 1,0326 | 1,0353 | 1,0407 |
| +14 | 1,0074 | 1,0128 | 1,0183 | 1,0209 | 1,0263 |
| +18 | 0,9936 | 0,9989 | 1,0043 | 1,0069 | 1,0122 |
| +20 | 0,9868 | 0,9921 | 0,9974 | 1,0000 | 1,0053 |
| +22 | 0,9800 | 0,9853 | 0,9906 | 0,9932 | 0,9985 |
| +24 | 0,9735 | 0,9787 | 0,9839 | 0,9865 | 0,9917 |
| +26 | 0,9669 | 0,9721 | 0,9773 | 0,9755 | 0,9851 |
| +28 | 0,9605 | 0,9657 | 0,9708 | 0,9734 | 0,9785 |
| +30 | 0,9542 | 0,9594 | 0,9646 | 0,9670 | 0,9723 |
| +34 | 0,9418 | 0,9468 | 0,9519 | 0,9544 | 0,9595 |
| +38 | 0,9297 | 0,9347 | 0,9397 | 0,9421 | 0,9471 |

gost.e-ecolog.ru