МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИИ
И МОНИТОРИНГУ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
(РОСГИДРОМЕТ)

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

РД
52.24.517-
2008

ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И ЭСТЕРАЗ СЕСТОНА В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДАХ. МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Ростов-на-Дону 2008

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН ГУ «Гидрохимический институт»

2 РАЗРАБОТЧИКИ Л.М. Предеина, канд. хим. наук, Т.И. Костенко

3 СОГЛАСОВАН с УМЗА Росгидромета и ГУ «НПО «Тайфун»

4 УТВЕРЖДЕН Заместителем Руководителя Росгидромета 25 января 2008 г.

5 АТТЕСТОВАН ГУ «Гидрохимический институт», свидетельство об аттестации № 171.24-2007 от 2 апреля 2007 г.

6 ЗАРЕГИСТРИРОВАН ГУ «НПО «Тайфун» за номером РД 52.24.517-2008 от 08.02.2008 г.

7 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Приписанные характеристики погрешности измерения 2
4 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы 3
4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства 3
4.2 Реактивы и материалы 4
5 Метод измерений 5
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды 6
7 Требования к квалификации операторов 7
8 Условия выполнения измерений 7
9 Отбор и хранение проб 7
10 Подготовка к выполнению измерений 8
10.1 Приготовление растворов и реактивов 8
10.2 Подготовка мембранных фильтров 9
10.3 Приготовление градуировочных растворов 9
10.4 Установление градуировочных зависимостей 10
10.5 Контроль стабильности градуировочной характеристики 12
11 Выполнение измерений 13
11.1 Подготовка пробы воды 13
11.2 Измерение показателя активности щелочной фосфатазы сестона 13
11.3 Измерение показателя активности эстераз сестона 15
12 Вычисление результата измерения 16
13 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории 17
13.1 Контроль качества результатов измерений 17
13.2 Алгоритм оперативного контроля процедуры выполнения измерений 17
13.3 Контроль внутрилабораторной воспроизводимости 18
Приложение А (рекомендуемое) Методика приготовления аттестованных растворов 19

Введение

Ферменты представляют собой белки, обладающие свойствами биологических катализаторов. В водных экосистемах ферменты играют важнейшую роль как в процессах новообразования, так и деградации органических веществ, отражая интенсивность метаболизма гидробиоценозов.

Под активностью ферментов понимают скорость преобразования веществ с их непосредственным участием. Активность ферментов обычно выражают в единицах образовавшегося продукта в единицу времени единицей объема или массы биологического материала.

Различают внутриклеточные и внеклеточные ферменты, которые выделяются живыми организмами или попадают во внешнюю среду при лизисе мертвых клеток. В водных экосистемах внеклеточные ферменты могут отрываться от секретировавших их клеток и находится в растворенном состоянии. Другая часть ферментов остается прикрепленной к клеточным мембранам или стенкам. Активность прикрепленных к клеткам ферментов более адекватно отражают функциональное состояние синтезирующих их организмов, которое зависит от загрязненности воды. Поэтому показатели активности внеклеточных, прикрепленных к клеткам ферментов наиболее информативны для интегральной оценки загрязненности вод.

В данном документе показатели активности внеклеточных, прикрепленных к клеткам ферментов называются показателями активности ферментов сестона.

Ферменты щелочная фосфатаза и эстеразы широко распространены в природных и сточных водах, участвуя в гидролизе органических веществ. Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) гидролизует фосфомоноэфиры с образованием ортофосфата, эстеразы (КФ 3.1.1.1 и КФ 3.1.1.2) – сложные эфиры карбоновых кислот. В водных экосистемах эти ферменты синтезируются и выделяются в водную среду преимущественно фитопланктоном и бактериопланктоном, состояние которых, главным образом, и определяет интенсивность метаболизма гидробиоценозов.

Установлено, что активность обоих ферментов повышается с увеличением трофности и загрязненности водных экосистем. В незагрязненных олиготрофных водных объектах показатели активности щелочной фосфатазы не превышают 0,2 мкмоль/(дм^3·ч) 1-нафтола, эстераз – 0,45 мкмоль/(дм^3·ч) 1-нафтола.

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И ЭСТЕРАЗ СЕСТОНА В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДАХ. МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Дата введения - 2008-04-02

1 Область применения

1.1 Настоящий руководящий документ устанавливает методику выполнения измерений (далее – методика) показателей активности щелочной фосфатазы $А_{щф}$ и эстераз $А_э$ сестона в пробах поверхностных вод суши и очищенных сточных вод фотометрическим методом в диапазоне значений образовавшегося в результате ферментативного гидролиза 1-нафтола от 0,02 до 4,00 мкмоль/(дм^3·ч) для щелочной фосфатазы и от 0,15 до 13.00 мкмоль/(дм^3·ч) для эстераз.

1.2 Настоящий руководящий документ предназначен для использования в лабораториях, осуществляющих анализ природных и очищенных сточных вод.

2 Нормативные ссылки

В настоящем руководящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 17.1.5.04-81 Охрана природы. Гидросфера. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия

ГОСТ 17.1.5.05-85 Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков

ГОСТ Р 51592-2000 Вода. Общие требования к отбору проб.

Примечание – Ссылки на другие нормативные документы, приведены в разделах 4, А.3.

3 Приписанные характеристики погрешности измерения

3.1 При соблюдении всех регламентируемых методикой условий проведения измерений характеристики погрешности результата измерения показателя активности щелочной фосфатазы с вероятностью 0,95 не должны превышать значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1 – Диапазон измерений, значения характеристик погрешности и ее составляющих для показателя активности щелочной фосфатазы при доверительной вероятности P=0,95

Диапазон измерений показателя активности щелочной фосфатазы $A_{щф}$, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Показатель точности (границы погрешности) $\pm\Delta$, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола
От 0,02 до 0,10 включ.	$0{,}140 \cdot A_{щф}$	$0{,}151 \cdot A_{щф}$	$0{,}289 \cdot A_{щф}$
Св. 0,10 до 4,00 включ.	$0{,}081 \cdot A_{щф}$	$0{,}088 \cdot A_{щф}$	$0{,}172 \cdot A_{щф}$

3.2 При соблюдении всех регламентируемых методикой условий проведения измерений характеристики погрешности результата измерения показателя активности эстераз с вероятностью 0,95 не должны превышать значений, приведенных в таблице 2.

Таблица 2 – Диапазон измерений, значения характеристик погрешности и ее составляющих для показателя активности эстераз при доверительной вероятности P=0,95

Диапазон измерений показателя активности эстераз $A_э$, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Показатель точности (границы погрешности) $\pm\Delta$, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола
От 0,15 до 13,00 включ.	$0{,}035 \cdot A_э$	$0{,}049 \cdot A_э$	$0{,}096 \cdot A_э$

3.3 Значения показателя точности методики используют при:
- оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- оценке деятельности лабораторий на качество проведения измерений;
- оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики в конкретной лаборатории.

4 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы

4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений и другие технические средства:

4.1.1 Фотометр или спектрофотометр любого типа (КФК-2, КФК-2мп, КФК-3, СФ-46, СФ-56 и др.).

4.1.2 Весы лабораторные высокого (II) класса точности по ГОСТ 24104-2001.

4.1.3 Весы лабораторные обычного (III) класса точности по ГОСТ 29329-92 с пределом взвешивания 200 г.

4.1.4 Термостат с температурой нагревания от 28 до 55 ^{0}С.

4.1.5 Иономер типа И-500 по ТУ 42155-002-29074628-96.

4.1.6 Секундомер механический типа СОПпр-2б-3 со шкалой 60 мин и ценой деления 0,2 с.

4.1.7 Насос вакуумный любого типа.

4.1.8 Колба с тубусом (колба Бунзена) исполнения 1 или 2 по ГОСТ 25336-82, вместимостью 2000 см^3.

4.1.9 Воронка для фильтрования пробы воды с использованием мембранных фильтров диаметром 90 мм.

4.1.10 Кисточка с мягкой щетиной шириной от 3 до 5 мм.

4.1.11 Штативы для пробирок диаметром 16 мм с ячейками, расположенными в четыре ряда.

4.1.12 Пробирки типа П1 диаметром 16 мм, высотой 150 мм по ГОСТ 25336-82 – 50 шт.

4.1.13 Колбы мерные 2-го класса точности исполнения 2, 2а по ГОСТ 1770-74 вместимостью: 50 см^3 – 20 шт., 100 см^3 – 4 шт., 250 см^3 – 2 шт., 500 см^3 – 2 шт.

4.1.14 Пипетки градуированные 2-го класса точности исполнения 2 по ГОСТ 29227-91 вместимостью: 1 $см^3$ – 6 шт., 2 $см^3$ – 9 шт., 5 $см^3$ – 4 шт., 10 $см^3$ – 4 шт.

4.1.15 Пипетки с одной отметкой 2-го класса точности по ГОСТ 29169-91 вместимостью 20 $см^3$ – 2 шт.

4.1.16 Цилиндры мерные исполнения 1, 3 по ГОСТ 1770-74 вместимостью: 100 $см^3$ – 4 шт., 250 $см^3$ – 4 шт., 500 $см^3$ – 1 шт., 1000 $см^3$ – 1 шт.

4.1.17 Стаканы В-1, ТХС по ГОСТ 25336-82 вместимостью: 50 $см^3$ – 10 шт., 100 $см^3$ – 2 шт., 1000 $см^3$ – 1 шт.

4.1.18 Стаканчик для взвешивания (бюкс) СВ 19/9 по ГОСТ 25336-82.

4.1.19 Центрифуга лабораторная с частотой вращения от 3000 до 6000 об/мин и объемом центрифугата от 10 $см^3$ до 15 $см^3$ или воронки лабораторные типа ВФ исполнения 1, диаметром 36 мм по ГОСТ 25336-82 – 20 шт.

4.1.20 Эксикатор исполнения 2, диаметром корпуса 140 или 190 мм по ГОСТ 25336-82.

4.1.21 Шкаф сушильный общелабораторного назначения.

4.1.22 Холодильник бытовой.

4.1.23 Мельничный газ № 76.

4.1.24 Воронка лабораторная типа ВФ исполнения 1 диаметром 75 мм по ГОСТ 25336-82.

4.1.25 Посуда стеклянная (в том числе из темного стекла) для хранения растворов вместимостью 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 $дм^3$.

4.1.26 Посуда полиэтиленовая (полипропиленовая) для хранения проб и растворов вместимостью 0,50; 1,50 и 2,0 $дм^3$.

4.1.27 Карандаш с черным грифелем типа М или 2М.

Примечание - Допускается использование других типов средств измерений, посуды и вспомогательного оборудования, в том числе импортных, с характеристиками не хуже, чем у приведенных в 4.1.

4.2 Реактивы и материалы

4.2.1 Трис-(оксиметил)-аминометан по ТУ 6-09-4292-76, х. ч.

4.2.2 Соляная кислота по ГОСТ 3118-77, х.ч.

4.2.3 Натрий углекислый по ГОСТ 83-79, ч. д.а.

4.2.4 Натрий двууглекислый по ГОСТ 4201-79, ч.д.а.

4.2.5 1-Нафтилацетат по ТУ 6-09-15-288-76, ч.д.а.

4.2.6 1-Нафтилфосфат по ТУ 6-09-13-449-75, ч.д.а.

4.2.7 4-Бензоиламино-2,5-диметоксифенилдиазония бортетрафторид (Fast Blue RR Salt) «CHEMAPOL».

4.2.8 Трихлоруксусная кислота (ТХУ) по ТУ 6-09-1926-77, ч.

4.2.9 Натрия гидроксид по ГОСТ 4328-77, ч. д. а.

4.2.10 Диметилсульфоксид по ТУ 6-09-3818-77, х.ч.

4.2.11 Спирт этиловый по ГОСТ 18300-87.

4.2.12 Ацетон по ТУ 2633- 039-44493179-00, ос. ч.

4.2.13 1-Нафтол по ТУ 6-09-5417-88, х.ч.

4.2.14 Глицерин по ГОСТ 6259-75, ч.

4.2.15 Хлорид кальция безводный (для эксикатора) по ГОСТ 450-77, ч.

4.2.16 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

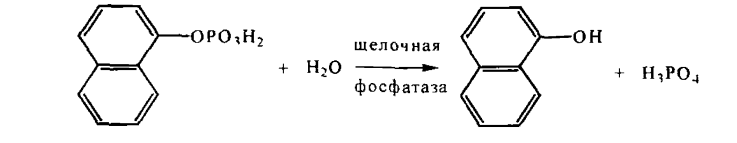
4.2.17 Фильтры мембранные «ВЛАДИСАРТ» типа ФМАЦ-02-d90-11107, диаметром 90 или 100 мм, с размером пор 0,20 или 0,30 мкм, по ТУ 9471-001-00212038-00, или другого типа, равноценные по характеристикам.

4.2.18 Фильтры бумажные ФОБ «красная лента» диаметром 70 мм по ТУ 2642-001-56452949-2003.

Примечание - Допускается использование реактивов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, в том числе импортных, с квалификацией не ниже указанной в 4.2.

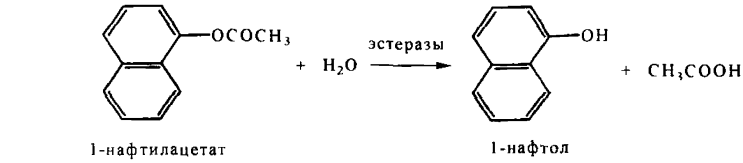
5 Метод измерений

Метод измерения основан на реакциях ферментативного гидролиза 1-нафтилфосфата щелочной фосфатазой (1) и 1-нафтилацетата эстеразами (2) с образованием 1-нафтола. 1-Нафтол количественно связывают в реакции азосочетания с 4-бензоиламино-2,5- диметоксифенилдиазония бортетрафторидом (3). В результате реакции образуется окрашенное азосоединение 4-(4-бензоиламино- 2,5- диметоксифенилазо)нафтол-1):



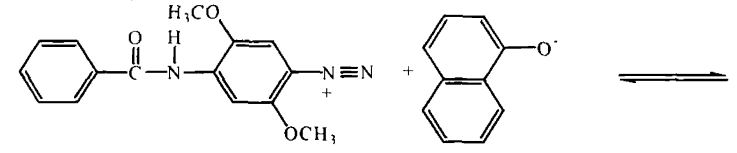
(1)

1-нафтилфосфат 1-нафтол



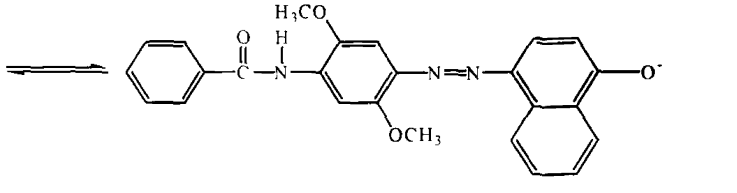
(2)

1-нафтилацетат 1-нафтол



Катион 4-бензоиламино-2,5-диметоксифенилдиазония Анион 1-нафтола

(3)



Азосоединение 4-(4-бензоиламино-2,5-диметоксифенилазо)нафтол-1

Максимум оптической плотности в спектре азосоединения при определении показателя активности щелочной фосфатазы наблюдается при 530 нм, эстераз – при 450 нм.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

6.1 При выполнении измерений показателей активности щелочной фосфатазы и эстераз сестона в пробах природных и очищенных сточных вод соблюдают требования безопасности, установленные в государственных стандартах и соответствующих нормативных документах.

6.2 По степени воздействия на организм вредные вещества, используемые при выполнении измерений, относятся ко 2, 3 классам опасности по ГОСТ 12.1.007.

6.3 Содержание используемых вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать установленных предельно допустимых концентраций в соответствии с ГОСТ 12.1.005.

6.4 Дополнительных требований по экологической безопасности не предъявляется.

7 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица с высшим и средним профессиональным образованием, освоившие методику.

8 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

Температура воздуха, °С.....22±5

Атмосферное давление, кПа (мм рт. ст.) .....от 84,0 до 106,7 (от 630 до 800)

Влажность воздуха, %..... ..... не более 80

Напряжение в сети, В..... .....220±10

Частота переменного тока, Гц.....50±1

9 Отбор и хранение проб

Отбор проб для определения показателей активности щелочной фосфатазы и эстераз сестона производится в соответствии с ГОСТ 17.1.5.05 и ГОСТ Р 51592. Оборудование для отбора проб должно соответствовать ГОСТ 17.1.5.04 и ГОСТ Р 51592. Пробы воды сразу же после отбора фильтруют через мельничный газ № 76 для удаления мезозоопланктона и помещают в стеклянную или полиэтиленовую посуду с плотно закрывающейся пробкой. Посуду заполняют водой до краев так, чтобы при транспортировке проба не взбалтывалась. Объем пробы составляет не менее 1,5 $дм^3$.

Показатели активности ферментов являются нестабильными, поэтому анализ должен быть проведен как можно быстрее после отбора пробы. Если анализ не может быть выполнен в день отбора, пробу хранят при температуре от 1 °С до 4 °С не более 3 сут.

10 Подготовка к выполнению измерений

10.1 Приготовление растворов и реактивов

10.1 1 Растворы реактивов для измерения показателя активности щелочной фосфатазы сестона

10.1.1.1 Гидрокарбонатный буфер, 0,15 моль/дм^3, pH 10,0. Раствор А: 7,95 г безводного карбоната натрия растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 500 см^3. Раствор В: 3,15 г гидрокарбоната натрия растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 250 см^3.

Смешивают 300 см^3 раствора А и 200 см^3 раствора В. Измеряют pH полученного буфера на иономере. В случае отклонения pH буфера от 10,0 в меньшую сторону его доводят до необходимого значения, приливая раствор карбоната натрия, при отклонении в большую сторону – раствор гидрокарбоната натрия. Хранят буфер в холодильнике не более 3 месяцев.

10.1.1.2 Раствор 1-нафтилфосфата, $14{,}9\cdot10^{-3}$ моль/дм^3. Растворяют 0,167 г 1-нафтилфосфата в гидрокарбонатном буфере, 0,15 моль/дм^3, pH 10,0, в мерной колбе вместимостью 50 см^3, доводя объем до метки. Раствор переливают в склянку из темного стекла. Раствор готовят перед использованием.

10.1.1.3 Раствор 4-бензоиламино-2,5-диметоксифенилдиазония бортетрафторида (РР-соль), 0,10 %-ный. Растворяют 0,010 г РР-соли в 0,5 см^3 диметилсульфоксида и приливают 9,5 см^3 дистиллированной воды. Раствор переливают в склянку из темного стекла. Раствор хранится в течение 1,5 сут при комнатной температуре .

10.1.1.4 Щелочной фиксирующий реактив. Растворяют 20 г натрия гидроксида в 80 см^3 дистиллированной воды и смешивают со 120 см^3 глицерина. Реактив хранится при комнатной температуре неограниченное время.

10.1.2 Растворы реактивов для измерения показателя активности эстераз сестона

10.1.2.1 Трис-HCl буфер, 0,05 моль/дм^3, pH 7,2-7,4.

Раствор А: 3,025 г трис-(оксиметил)-аминометана растворяют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 100 см^3. Раствор В: 2,2 см^3 концентрированной соляной кислоты помещают в

мерную колбу вместимостью 250 $см^3$ и приливают дистиллированную воду до метки.

Смешивают 100 $см^3$ раствора А и 200 $см^3$ раствора В и доводят объем буфера до 500 $см^3$ дистиллированной водой. Измеряют pH буферного раствора на иономере. При отклонении pH в щелочную сторону его доводят до необходимого значения раствором соляной кислоты, в кислую - готовят буфер заново, уменьшая объем раствора В при смешивании. Хранят в холодильнике в течение 3 месяцев.

10.1.2.2 Раствор 1-нафтилацетата, $1{,}72 \cdot 10^{-3}$ моль/$дм^3$. Растворяют в пробирке 0,016 г 1-нафтилацетата в 2,5 $см^3$ этанола, переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$. Пробирку 2-3 раза ополаскивают трис-HCl буфером, 0,05 моль/$дм^3$, pH 7,4, переносят каждый раз полученный раствор в колбу и доводят тем же буфером до метки Раствор переносят в склянку из темного стекла. Раствор готовят перед использованием.

10.1.2.3 Раствор 4-бензоиламино-2,5-диметоксифенилдиазония бортетрафторида (РР-соль), 0,10 %-ный. Готовят по 10.1.1.3.

10.1.2.4 Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 10 %-ный. Растворяют 20 г трихлоруксусной кислоты в 180 $см^3$ дистиллированной воды. Реактив хранится при комнатной температуре неограниченное время.

10.2 Подготовка мембранных фильтров

Фильтры помещают в термостойкий стакан вместимостью 1000 $см^3$, приливают 300-400 $см^3$ дистиллированной воды и кипятят в течение 20 мин. Фильтры хранят во влажном состоянии. После длительного хранения (10 дней и более) фильтры перед использованием вновь кипятят в дистиллированной воде в течение 10 мин.

10.3 Приготовление градуировочных растворов

10.3.1 Градуировочные растворы 1-нафтола готовят из аттестованных растворов с массовой концентрацией 1-нафтола 250 мг/$дм^3$ (АР2- 1-нафтола) и 50 мкг/$дм^3$ (АР3-1-нафтола), приготовленных из реактива вещества марки "хч". Согласно приложению А 0,125 г 1-нафтола взвешивают на весах высокого класса точности в стаканчике для взвешивания, растворяют в 50 $см^3$ этанола, приливая его тремя примерно равными порциями. Полученные растворы переносят

в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Ополаскивают стаканчик для взвешивания 2-3 раза дистиллированной водой с помощью промывалки, каждый раз перенося промывные воды в колбу. Доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и присваивают этому раствору массовую концентрацию 1250 мг/л дм^3 и шифр АР1-1-нафтола.

10.3.2 Из аттестованного раствора АР1- 1-нафтола с помощью пипетки с одной меткой отбирают 20 см^3, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят дистиллированной водой до метки на колбе. Раствор тщательно перемешивают и присваивают ему массовую концентрацию 250 мг/дм^3 и шифр АР2- 1-нафтола.

10.3.3 Из аттестованного раствора АР2- 1-нафтола с помощью пипетки с одной меткой отбирают 20 см^3, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят дистиллированной водой до метки на колбе. Раствор тщательно перемешивают и присваивают ему массовую концентрацию 50 мг/дм^3 и шифр АР3- 1-нафтола.

10.4 Установление градуировочных зависимостей

10.4.1 Для измерения показателя активности щелочной фосфатазы образцы для градуировки готовят следующим образом. В мерные колбы вместимостью 50 см^3 с помощью градуированных пипеток 2, 5 и 10 см^3 приливают 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 см^3 градуировочного раствора АР3- 1-нафтола с массовой концентрацией 1-нафтола 50 мг/дм^3 и 2,0 и 2,5 см^3 градуировочного раствора АР2- 1-нафтола с массовой концентрацией 1-нафтола 250 мг/ дм^3. Объемы растворов доводят до меток на колбах дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Массовая концентрация 1-нафтола в полученных растворах составит соответственно 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,5 мкг/см^3.

Из каждого раствора в мерных колбах с помощью градуированной пипетки вместимостью 2 см^3 дважды отбирают по 2,0 см^3 градуировочных растворов с концентрациями от 0 до 12,5 мкг/см^3 и помещают в пробирки. В образцах для градуировки будет соответственно 0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0; 25,0 мкг или 0; 0,014; 0,028; 0,056; 0,083; 0,111; 0,139; 0,174 мкмоль 1-нафтола. В каждую пробирку приливают по 1,5 см^3 гидрокарбонатного буфера, 0,4 см^3 раствора РР-соли и ровно через 3 мин. добавляют 0,6 см^3 фиксирующего раствора для щелочной фосфатазы. Содержимое пробирок перемешива-

ют и после исчезновения желтого окрашивания в холостой пробе в каждую пробирку приливают по 2,5 $см^3$ ацетона.

Оптические плотности градуировочных растворов измеряют при 530 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см относительно дистиллированной воды. Значение оптической плотности холостого опыта вычитают из оптической плотности растворов образцов для градуировки.

10.4.2 Для измерения показателя активности эстераз образцы для градуировки готовят следующим образом. В мерные колбы вместимостью 50 $см^3$ с помощью градуированных пипеток 2, 5 и 10 $см^3$ приливают 0; 2,0; 4,0; 6,0 $см^3$ градуировочного раствора АР3- 1-нафтола с массовой концентрацией 1-нафтола 50 $мг/дм^3$ и 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 и 6,0 $см^3$ градуировочного раствора АР2- 1-нафтола с массовой концентрацией 1-нафтола 250 $мг/дм^3$. Объемы растворов доводят до меток на колбах дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Массовая концентрация 1-нафтола в полученных растворах составит соответственно 0; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 и 30 $мкг/см^3$.

Из каждого раствора в мерных колбах с помощью градуированной пипетки вместимостью 2 $см^3$ дважды отбирают по 1,0 $см^3$ градуировочных растворов с концентрациями от 0 до 30 $мкг/см^3$ и помещают в пробирки. В образцах для градуировки будет соответственно 0; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 и 30,0 мкг или 0; 0,014; 0,028; 0,042; 0,069; 0,104; 0,139; 0,174; 0,208 мкмоль 1-нафтола. В каждую пробирку приливают по 1,0 $см^3$ трис-HCl буфера, 0,2 $см^3$ РР-соли и ровно через 3 мин добавляют 0,5 $см^3$ раствора трихлоруксусной кислоты и 4 $см^3$ ацетона. После добавления каждого реактива содержимое пробирок тщательно перемешивают.

Оптические плотности градуировочных растворов измеряют при 450 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см относительно дистиллированной воды. Значение оптической плотности холостого опыта вычитают из оптической плотности растворов образцов для градуировки.

Градуировочные зависимости значений оптической плотности от количества вещества 1-нафтола, выраженного в мкмоль, для каждого фермента рассчитывают методом наименьших квадратов.

Градуировочные зависимости устанавливают при использовании новой партии РР-соли и при замене измерительного прибора, но не реже 1 раза в квартал.

10.5 Контроль стабильности градуировочной характеристики

10.5.1 Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят каждый раз перед анализом серии проб. Средствами контроля являются образцы, используемые для установления градуировочной зависимости по 10.4 (не менее 3 для каждой градуировочной зависимости).

Градуировочная характеристика считается стабильной при выполнении следующих условий:

$$\frac{|X-n|}{n}\cdot 100\% \le \sigma_R, \qquad (4)$$

где X – результат контрольного измерения количества вещества 1-нафтола в образце, мкмоль;

n – приписанное значение количества вещества 1-нафтола в образце, мкмоль;

σ_R – показатель воспроизводимости для образца с количеству вещества n, % (таблицы 1 и 2).

Если условие стабильности не выполняется для одного образца для градуировки, необходимо выполнить повторное измерение этого образца для исключения результата, содержащего грубую погрешность. При повторном невыполнении условия, выясняют причины нестабильности, устраняют их и повторяют измерение с использованием других образцов, предусмотренных методикой. Если градуировочная характеристика вновь не будет удовлетворять условию (1), устанавливают новую градировочную зависимость.

10.5.2 При выполнении условия (1) учитывают знак разности между измеренными и приписанными значениями количества вещества 1-нафтола в образцах. Эта разность должна иметь как положительное, так и отрицательное значение, если же все значения имеют один знак, это говорит о наличии систематического отклонения. В таком случае требуется установить новую градуировочную зависимость.

11 Выполнение измерений

11.1 Подготовка пробы воды

Пробы воды объемом 0,5-1,0 дм^3 фильтруют под вакуумом через мембранный фильтр с диаметром пор 0,20-0,30 мкм с помощью устройства для фильтрования. Первую порцию профильтрованной воды объемом приблизительно 100 см^3 отбрасывают. Процесс фильтрования одной пробы не должен занимать больше 10-15 мин. Сразу же после исчезновения последней капли воды на фильтре процесс останавливают. Сестон на фильтре пересушивать не допустимо. Сконцентрированный на фильтре сестон с помощью градуированной пипетки вместимостью 10 см^3 смывают 10-ю см^3 профильтрованной через мембранный фильтр пробы воды. Для этого фильтр снимают с воронки пинцетом и помещают в чистый стакан вместимостью 50 см^3, прислонив к стенкам стакана так, чтобы фильтр не доставал 2-3 см до дна стакана. По каплям выпускают воду из пипетки на фильтр, смывая сестон в стакан мягкой кисточкой.

Сконцентрированный сестон хранится не более 2 ч при комнатной температуре.

Измерение показателей активности обоих ферментов сестона производится из одной пробы воды.

11.2 Измерение показателя активности щелочной фосфатазы сестона

Для проведения реакции ферментативного гидролиза в две пробирки градуированными пипетками вместимостью 2 см^3 приливают по 2,0 см^3 взвеси сестона и по 1,5 см^3 раствора 1-нафтилфосфата. Взвесь сестона в стаканчике перед каждым отбором пипеткой тщательно взбалтывают. Пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат при 30 °С на 1 или 2 ч (в зависимости от значений показателя активности фермента в пробе воды) для проведения ферментативного гидролиза. По истечении этого времени пробирки вынимают из термостата, приливают в них по 0,4 см^3 РР-соли, перемешивают и через 3 мин, в течение которых происходит полное связывание образовавшегося 1-нафтола, добавляют по 0,6 см^3 щелочного фиксирующего реактива для прекращения реакции. Растворы тщательно перемешивают и в каждую пробирку приливают по 2,5 см^3 ацетона. Содержимое пробирок вновь перемешивают и фильтруют через крупно-

пористый бумажный фильтр «красная лента» или центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Оптическую плотность полученных растворов измеряют при 530 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см.

Одновременно с опытными готовят 2 холостые пробы. Первая холостая проба ставится для учета доли 1-нафтола, образованного без участия сестон-связанных ферментов. В эту пробу вместо взвеси сестона приливают равный объем профильтрованной через мембранный фильтр пробы воды. Эту холостую пробу обрабатывают так же, как и опытные. Вторая холостая проба ставится для учета влияния сестона на оптическую плотность фотометрируемых растворов. По составу она не отличается от опытных, однако после проведения ферментативного гидролиза в нее не приливают раствор РР-соли, а сразу добавляют щелочной фиксирующий реактив. Далее эту холостую пробу обрабатывают так же, как и опытные. Значение оптической плотности, которое используют для расчета образовавшегося 1-нафтола по градуировочному графику, определяют по формуле

$$D_x=D_i-D_1-D_2, \qquad (5)$$

где D_x – значение оптической плотности для расчета массы образовавшегося в результате ферментативного гидролиза 1-нафтола;

D_i – измеренное среднее арифметическое значение оптической плотности опытной пробы;

D_1 и D_2 – значения оптических плотностей первой и второй холостых проб.

По градуировочному графику находят, какому количеству мкмоль 1-нафтола соответствуют оптические плотности полученных растворов. Показатель активности щелочной фосфатазы выражают в мкмоль 1-нафтола, освобожденного в течение 1 ч в результате ферментативного гидролиза сестоном, полученным из пробы воды объемом 1 $дм^3$ – мкмоль/($дм^3 \cdot ч$) 1-нафтола.

11.3 Измерение показателя активности эстераз сестона

Для проведения реакции ферментативного гидролиза в две пробирки градуированными пипетками вместимостью 2 $см^3$ приливают по 1,0 $см^3$ взвеси сестона и по 1,0 $см^3$ раствора 1-нафтилацетата. Взвесь сестона в стаканчике перед каждым отбором пипеткой тщательно взбалтывают.

Пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат при 30 °С на 0,5 или 1 ч (в зависимости от значений показателя активности фермента в пробе воды) для проведения ферментативного гидролиза. По истечении этого времени пробирки вынимают из термостата, приливают в них по 0,2 $см^3$ РР-соли и через 3 мин, в течение которых происходит полное связывание образовавшегося 1-нафтола, добавляют по 0,5 $см^3$ раствора трихлоруксусной кислоты и 4,0 $см^3$ ацетона. Полученные растворы фильтруют через крупнопористый бумажный фильтр «красная лента» или центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. После добавления каждого реактива содержимое пробирок тщательно перемешивают. Оптическую плотность полученных растворов измеряют при 450 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см.

Одновременно с опытными готовят 2 холостые пробы. Первая холостая проба ставится для учета доли 1-нафтола, образованного без участия сестон-связанных ферментов. В эту пробу вместо взвеси сестона приливают равный объем профильтрованной через мембранный фильтр с диаметром пор 0,30 мкм пробы воды. Эту холостую пробу обрабатывают так же, как и опытные, но не фильтруют (не центрифугируют) перед измерением оптической плотности. Вторая холостая проба ставится для учета влияния сестона на оптическую плотность фотометрируемых растворов. По составу она не отличается от опытных, однако после проведения ферментативного гидролиза в нее не приливают раствор РР-соли, а сразу добавляют раствор трихлоруксусной кислоты. Далее эту холостую пробу обрабатывают так же, как и опытные. Значение оптической плотности, которое используют для расчета образовавшегося 1-нафтола по градуировочному графику, определяют по формуле (1).

По градуировочному графику находят, какому количеству 1-нафтола соответствуют оптические плотности полученных растворов. Показатель активность эстераз выражают в мкмоль 1-нафтола, освобожденного в течение 1 ч в результате ферментативного гидро-

лиза сестоном, полученным из пробы воды объемом 1 $дм^3$ – мкмоль/($дм^3$ ч) 1-нафтола.

12 Вычисление результата измерения

12.1 Показатели активности щелочной фосфатазы и эстераз сестона рассчитывают по формуле

$$A = \frac{n \cdot V_1}{V_2 \cdot V \cdot T}, \quad (6)$$

где A – показатель активности щелочной фосфатазы ($A_{щф}$) или эстераз ($A_э$) сестона, мкмоль/(л·ч) 1-нафтола,

n – количество вещества образовавшегося 1-нафтола, мкмоль,

V_1 – объем взвеси сестона, полученной из пробы воды, $см^3$ (10 $см^3$),

V_2 – объем взвеси сестона, приливаемый в пробирку, $см^3$,

V – объем профильтрованной пробы воды, $дм^3$,

T – время инкубации, ч.

12.2 Результат измерения в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$$A_x \pm \Delta_л, \text{ мкмоль/}(дм^3 \cdot ч) \text{ 1-нафтола } (P=0,95), \quad (7)$$

где $\Delta_л$ – характеристика погрешности измерения для данного значения показателя активности щелочной фосфатазы (таблица 1) и эстераз (таблица 2) сестона.

Численные значения результата измерения должны оканчиваться цифрой того же разряда, что и значения характеристики погрешности.

13 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

13.1 Контроль качества результатов измерений

Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

- оперативный контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки повторяемости);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости).

13.2 Алгоритм оперативного контроля процедуры выполнения измерений

13.2.1 Контроль повторяемости осуществляют для каждого из результатов измерений, полученных в соответствии с методикой. Для этого отобранную пробу воды делят на две части и выполняют анализ в соответствии с разделом 11.

13.2.2 Результаты контрольной процедуры r_k, мкмоль/(дм^3·ч) 1-нафтола, рассчитывают по формуле

$$r_k = |X_1 - X_2|, \quad (8)$$

где X_1 и X_2 –результаты измерений значений показателей активности щелочной фосфатазы или эстераз сестона, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола.

13.2.3 Предел повторяемости r_n, мкмоль/(дм^3·ч) 1-нафтола, рассчитывают по формуле

$$r_n = 2{,}77\ \sigma_r \quad (9)$$

где σ_r – показатель повторяемости методики измерения показателя активности щелочной фосфатазы (таблица 1) или эстераз сестона (таблица 2).

13.2.4 Результат контрольной процедуры должен удовлетворять условию

$$r_k \leq r_n \quad (10)$$

13.2.5 Если условие (10) не выполняется, то процедуры контроля повторяют. При повторном превышении пределов внутрилабораторной воспроизводимости выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.3 Контроль внутрилабораторной воспроизводимости

13.3.1 Для одной и той же пробы воды получают 2 результата показателей активности щелочной фосфатазы и эстераз сестона в условиях внутрилабораторной воспроизводимости (разное время, но не более 3 ч при хранении проб при температуре от 1 до 4 °С, разные партии реактивов, посуды, разные исполнители).

13.3.2 Рассчитывают результаты контрольной процедуры $R_к$ по формулам

$$R_к = A_{щф1} - A_{щф2} \quad (11)$$

$$R_к = A_{э1} - A_{э2}, \quad (12)$$

где $A_{щф1}$, $A_{щф2}$, $A_{э1}$, $A_{э2}$ – результаты измерений значений показателей активности соответственно щелочной фосфатазы и эстераз сестона, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола.

13.3.3 Результаты контрольных процедур сравнивают с пределом внутрилабораторной воспроизводимости $R_л$ и признают удовлетворительными, если выполняются условия:

$$R_к \le R_{лщф} \quad (13)$$

$$R_к \le R_{лэ} \quad (14)$$

13.3.4 Если условия (13 и 14) не выполняются, то процедуры контроля повторяют. При повторном превышении пределов внутрилабораторной воспроизводимости выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

Приложение А
(рекомендуемое)

Методика
приготовления аттестованных растворов
1-нафтола для установления градуировочных характеристик МВИ и контроля точности измерений показателей активности щелочной фосфатазы и эстераз сестона фотометрическим методом
АР1- 1-нафтола, АР2- 1-нафтола, АР3- 1-нафтола

А.1 Назначение и область применения

Настоящая методика регламентирует процедуру приготовления аттестованных растворов 1-нафтола, предназначенных для установления градуировочных зависимостей и контроля точности результатов измерений показателей активности щелочной фосфатазы и эстераз сестона.

А.2 Метрологические характеристики

Метрологические характеристики аттестованных растворов приведены в таблице А.1.

Таблица А.1

Характеристика	Единица измерения	Значение характеристик для аттестованных растворов		
		АР1-1-нафтола	АР2-1-нафтола	АР3-1-нафтола
Аттестованное значение концентрации 1-нафтола	мг/ дм^3	1250,0	250,00	50,00
	ммоль/ дм^3	8,670	1,734	0,347
Граница погрешности аттестованного значения концентрации 1-нафтола (Р=0,95)	мг/ дм^3	13,00	2,75	0,58
	ммоль/ дм^3	0,090	0,0191	0,0040

А.3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы

А.3.1 Весы лабораторные высокого (II) класса точности по ГОСТ 24104-2001.

А.3.2 Шкаф сушильный общелабораторного назначения.

А.3.3 Колбы мерные 2-го класса точности исполнения 2, 2а по ГОСТ 1770-74 вместимостью100 $см^3$ – 3 шт.

А.3.4 Пипетка с одной отметкой 2-го класса точности по ГОСТ 29169-91 вместимостью 20 $см^3$ – 2 шт.

А.3.5 Стаканчик для взвешивания (бюкс) по ГОСТ 25336-82.

А.3.6 Воронка лабораторная типа ВФ исполнения 1 диаметром 56 мм по ГОСТ 25336-82.

А.3.7 Посуда из темного стекла вместимостью 0,1 $см^3$ – 3 шт.

А.3.8 1-Нафтол по ГОСТ 4217-77, х.ч.

А.3.9 Спирт этиловый по ГОСТ 18300-87.

А.3.10 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

А.4 Процедура приготовления аттестованного раствора 1-нафтола

А.4.1 Приготовление аттестованного раствора АР1-1-нафтола

Для приготовления аттестованного раствора АР1-1-нафтола на аналитических весах взвешивают в бюксе с точностью до четвертого знака после запятой 0,1250 г 1-нафтола. В бюкс приливают тремя приблизительно равными порциями по 10,0 $см^3$ этиловый спирт, растворяя в нем 1-нафтол, и количественно переносят каждую порцию в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Доводят объём раствора в колбе до метки этиловым спиртом и перемешивают.

Полученному раствору приписывают массовую концентрацию 1-нафтола 1250,0 мг/$дм^3$ (8,67 ммоль/$дм^3$).

А.4.2 Приготовление аттестованного раствора АР2-1-нафтола

Отбирают пипеткой с одной отметкой 20,0 $см^3$ раствора АР1-1-нафтола и переносят его в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Полученному раствору приписывают массовую концентрацию 1-нафтола 250,00 мг/$дм^3$ (1,734 ммоль/$дм^3$).

А.4.3 Приготовление аттестованного раствора АР3-1-нафтола

Отбирают пипеткой с одной отметкой 20,0 $см^3$ раствора АР2-1-нафтола и переносят его в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Полученному раствору приписывают массовую концентрацию 1-нафтола 50,00 $мг/дм^3$ (0,347 $ммоль/дм^3$).

А.5 Расчет метрологических характеристик аттестованных растворов

А.5.1 Расчет метрологических характеристик аттестованного раствора АР1-1-нафтола

Аттестованное значение массовой концентрации 1-нафтола C_1, $мг/дм^3$, рассчитывают по формуле

$$C_1 = \frac{m \cdot 1000 \cdot 1000}{V} \qquad (А.1)$$

где m – масса навески 1-нафтола, г;

V – вместимость мерной колбы, $см^3$;

Аттестованное значение массовой концентрации 1-нафтола C_1, $ммоль/дм^3$, рассчитывают по формуле

$$C_1 = \frac{m \cdot 1000 \cdot 1000}{144{,}17 \cdot V}, \qquad (А.2)$$

где 144,17 – молярная масса 1-нафтола, г/моль.

Расчет границы погрешности приготовления аттестованного раствора АР1- 1-нафтола Δ_1 выполняют по формуле

$$\Delta_1 = C_1 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_\mu}{\mu}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_V}{V}\right)^2}, \qquad (А.3)$$

где Δ_μ – границы возможного отклонения массовой доли основного вещества в реактиве от приписанного значения μ, %;

μ – массовая доля основного вещества (1-нафтола) в реактиве, приписанная реактиву квалификации «х.ч.», %;

Δ_m – границы погрешности взвешивания, г;

Δ_V – границы возможного отклонения вместимости мерной колбы от номинального значения, см^3;

Значение границы погрешности приготовления аттестованного раствора АР1-1-нафтола составит

$$\Delta_1 = 1250 \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{99}\right)^2 + \left(\frac{0{,}0002}{0{,}125}\right)^2 + \left(\frac{0{,}20}{100}\right)^2} = 13{,}0 \text{ мг/дм}^3 = 0{,}09 \text{ ммоль/дм}^3.$$

А.5.2 Расчет метрологических характеристик аттестованного раствора АР2-1-нафтола

Аттестованное значение массовой концентрации АР2- 1-нафтола C_2, мг/дм^3, рассчитывают по формуле

$$C_2 = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2}, \qquad (А.4)$$

где V_1 – объем раствора АР1- 1-нафтола, отбираемый пипеткой, см^3;

V_2 – вместимость мерной колбы, см^3.

Аттестованное значение раствора АР2 составит

$$C_2 = \frac{1250{,}0 \cdot 20{,}0}{100{,}0} = 250{,}0 \text{ мг/дм}^3 = 1{,}734 \text{ ммоль/дм}^3.$$

Расчет границы погрешности приготовления аттестованного раствора АР2-1-нафтола Δ_2 выполняют по формуле

$$\Delta_2 = C_2 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_1}{C_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2}, \qquad (А.5)$$

где Δ_1 – границы погрешности приготовления аттестованного раствора АР1-1-нафтола, мг/дм^3;

Δ_{V_1} – границы возможного отклонения объема V_1 от номинального значения, см^3;

Δ_{V_2} – границы возможного отклонения вместимости мерной колбы от номинального значения, см^3.

Значение границы погрешности приготовления аттестованного раствора АР2-1-нафтола составит

$$\Delta_2 = 250{,}00 \cdot \sqrt{\left(\frac{13{,}0}{1250}\right)^2 + \left(\frac{0{,}06}{20}\right)^2 + \left(\frac{0{,}2}{100}\right)^2} = 2{,}75 \text{мг/дм}^3 = 0{,}0191 \text{ммоль/дм}^3.$$

А.5.3 Расчет метрологических характеристик аттестованного раствора АР3- 1-нафтола

Аттестованное значение массовой концентрации АР3- 1-нафтола C_3, мг/дм^3, рассчитывают по формуле

$$C_3 = \frac{C_2 \cdot V_1}{V_2}, \qquad (А.6)$$

Аттестованное значение раствора АР3 - 1-нафтола составит

$$C_3 = \frac{250{,}0 \cdot 20{,}0}{100{,}0} = 50{,}0 \text{ мг/дм}^3 = 0{,}347 \text{ ммоль/дм}^3.$$

Расчет границ погрешности приготовления аттестованного раствора АР3- 1-нафтола Δ_3 выполняют по формуле

$$\Delta_3 = C_3 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_2}{C_2}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2}, \qquad (А.7)$$

Значение границы погрешности приготовления аттестованного раствора АР3-1-нафтола составит

$$\Delta_3 = 50{,}00 \cdot \sqrt{\left(\frac{2{,}75}{250}\right)^2 + \left(\frac{0{,}06}{20}\right)^2 + \left(\frac{0{,}2}{100}\right)^2} = 0{,}58 \text{ мг/дм}^3 = 0{,}004 \text{ ммоль/дм}^3.$$

А.6 Требования безопасности

Необходимо соблюдать общие требования техники безопасности при работе в химических лабораториях.

А.7 Требования к квалификации операторов

Аттестованный раствор может готовить инженер или лаборант со средним профессиональным образованием, прошедший специальную подготовку.

А.8 Требования к маркировке

На склянки с аттестованными растворами должны быть наклеены этикетки с указанием шифра аттестованного раствора, массовой концентрации 1-нафтола, погрешности ее установления и даты приготовления.

А.9 Условия хранения

Аттестованный раствор АР1- 1-нафтола хранится в холодильнике в течение 3 месяцев. Аттестованные растворы АР2- 1-нафтола и АР3- 1-нафтола хранению не подлежат.

Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ГИДРОХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ»

344090, г. Ростов-на-Дону
пр. Стачки, 198

Факс: (8632) 22-44-70
Телефон (8632) 22-66-68
E-mail gost.e-ecolog.ru

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики выполнения измерений № 171.24-2007

Методика выполнения измерений показателей активности щелочной фосфатазы и эстера сестона в поверхностных водах фотометрическим методом,

разработанная Государственным учреждением «Гидрохимический институт»

и регламентированная РД 52.24.517-2008. Показатели активности щелочной фосфатазы и эстераз сестона в поверхностных водах. Методика выполнения измерений фотометрическим методом,

аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-96.

Аттестация осуществлена по результатам экспериментальных исследований.

В результате аттестации установлено, что методика выполнения измерений соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает метрологическими характеристиками, приведенными в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 - Диапазон измерений, значения характеристик погрешности измерений и ее составляющих при принятой вероятности P=0,95

Измеряемый показатель активности ферментов сестона по скорости образования 1-нафтола	Диапазон измерений, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной воспроизводимости) σ_R, мкмоль/(дм^3·ч) 1-нафтола	Показатель точности (границы погрешности) $\pm\Delta$, мкмоль/(дм^3·ч) 1-нафтола
Щелочной фосфатазы $A_{щф}$	От 0,02 до 0,10 включ.	$0,140 \cdot A_{щф}$	$0,151 \cdot A_{щф}$	$0,289 \cdot A_{щф}$
	Св. 0,10 до 4,00 включ.	$0,081 \cdot A_{щф}$	$0,088 \cdot A_{щф}$	$0,172 \cdot A_{щф}$
Эстераз $A_э$	От 0,15 до 13,00 включ.	$0,035 \cdot A_э$	$0,049 \cdot A_э$	$0,096 \cdot A_э$

Таблица 2 - Диапазон измерений, значения пределов повторяемости и воспроизводимости при принятой вероятности P=0,95

Измеряемый показатель активности ферментов сестона по скорости образования 1-нафтола	Диапазон измерений, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Предел повторяемости $r_п$, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола	Предел воспроизводимости (для двух результатов измерений) $R_л$, мкмоль/(дм^3 ч) 1-нафтола
Щелочной фосфатазы $A_{щф}$	От 0,02 до 0,10 включ.	$0,388 \cdot A_{щф}$	$0,418 \cdot A_{щф}$
	Св. 0,10 до 4,00 включ.	$0,224 \cdot A_{щф}$	$0,244 \cdot A_{щф}$
Эстераз $A_э$	От 0,15 до 13,00 включ.	$0,096 \cdot A_э$	$0,136 \cdot A_э$

3 При реализации методики в лаборатории обеспечивают:

- оперативный контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки повторяемости и погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости, среднеквадратического отклонения внутрилабораторной прецизионности, погрешности).

Алгоритм оперативного контроля исполнителем процедуры выполнения измерений приведен в РД 52.24.517-2008.

Периодичность оперативного контроля и процедуры контроля стабильности результатов выполнения измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Дата выдачи 2 апреля 2007 г.

Директор А.М. Никаноров

Главный метролог А.А. Назарова

gost.e-ecolog.ru