4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Спектрофотометрическое определение субтилизина (протеазы) в атмосферном воздухе

Методические указания
МУК 4.1.1959—03

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.21
С79

С79 **Спектрофотометрическое** определение субтилизина (протеазы) в атмосферном воздухе: Методические указания.— М.· Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006.—9 с.

ISBN 5—7508—0656—1

1. Разработаны ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им А Н Сысина РАМН (к х н. А А Беззубовым) и НИЦ «ЭКОС» (В А Смирновым)

2 Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г Г. Онищенко 21 апреля 2005 г

3 Введены в действие с 1июля 2005 г

4 Введены впервые

ISBN 5—7508—0656—1

© Роспотребнадзор, 2006
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г

4.1 МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Спектрофотометрическое определение субтилизина (протеазы) в атмосферном воздухе

Методические указания МУК 4.1.1959—05

1. Область применения

Настоящие методические указания устанавливают количественный спектрофотометрический анализ атмосферного воздуха для определения в нем субтилизина (протеазы) в диапазоне концентраций 0,005—0,05 мг/м^3.

Методические указания предназначены для использования лабораториями центров гигиены и эпидемиологии при осуществлении аналитического контроля химического загрязнения атмосферного воздуха в районе расположения производства субтилизина (протеазы), производственными лабораториями предприятий, научно-исследовательскими институтами, работающими в области гигиены окружающей среды.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ГОСТ Р 8.563—96 «Методика выполнения измерений», ГОСТ 17.2.4.02-81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ».

Методические указания одобрены и рекомендованы к практическому применению на бюро секции по физико-химическим методам исследования объектов окружающей среды Проблемной комиссии «Научные основы экологии человека и гигиены окружающей среды» и бюро Комиссии по государственному санитарно-эпидемиологическом нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

2. Физико-химические и токсикологические свойства

Субтилизин (протеаза) является ферментом класса гидролаз и катализирует гидролиз белков и пептидов, а также сложных эфиров и амидов N-защищенных аминокислот. Продуцируется Bacillus subtilis и родственными бактериями. Молекулярная масса более 27000. Выпускается в виде гранул кремового цвета со слабым запахом. Растворим в воде и растворах щелочей. Применяется в химической промышленности, в частности, как добавка к синтетическим моющим средствам.

Субтилизин (протеаза) обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки глаз, является аллергеном. В атмосферном воздухе находится в виде аэрозоля. ОБУВ протеазы щелочной – 0,01 мг/м^3

3. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью, не превышающей ± 21 %. При доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Измерение концентраций субтилизина (протеазы) основано на улавливании его из воздуха и концентрировании на фильтре с последующей десорбцией 2Н раствором гидрооксида натрия, реакции образозования окрашенного комплекса с солью меди (метод Лоури) и последующем спектрофотометрировании при длине волны 650 нм.

Нижний предел измерения содержания субтилизина (протеазы) в анализируемом объеме пробы – 10 мкг.

Измерению мешают фенол, тимол, сульфосалицил, а также белки.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы

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

5.1. Средства измерений

Спектрофотометр СФ-46 или аналогичный прибор	
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104—01
Меры массы	ГОСТ 7328—01
Колбы мерные, вместимостью 25, 100 и 1 000 см^3	ГОСТ 1770—74Е
Пипетки, вместимостью 1, 2, 5 и 10 см^3	ГОСТ 29196—91
Бюксы, вместимостью 25 см^3	ГОСТ 25336—83Е
Пробирки колориметрические с притертыми пробками, вместимостью 20 см^3	ГОСТ 25336—82Е

Барометр-анероид М-67	ТУ 2504-1797—75
Термометр лабораторный шкальный ТЛ-2	ГОСТ 215—73Е
Секундомер	ГОСТ 5072—79
Электроаспиратор марки 822	ГОСТ 2.6.01—86

5.2. Вспомогательные устройства

Фильтродержатель с металлической сеткой	ТУ 6-09-1706—77
Баня водяная	ТУ 64-1-2850—76
Дистиллятор	ТУ 61-1-721—79

5.3. Материалы

Фильтр АФА-ХА-20	ТУ 95-743—80

5.4. Реактивы

Протеаза с содержанием основного вещества не менее 95 %	СП 23701—81
Гидрооксид натрия, хч	ГОСТ 4328—77
Кислота соляная, хч	ГОСТ 4461—77
Натрий углекислый, хч	ГОСТ 84—76
Калий-натрий тартрат, хч	ГОСТ 5845—70
Медь серно-кислая, хч	ГОСТ 4165—78
Натрий вольфрамово-кислый, хч	ГОСТ 18289—76
Натрий молибденово-кислый, хч	ГОСТ 10931—74
Литий серно-кислый, хч	ГОСТ 10563—76
Кислота ортофосфорная, хч	ГОСТ 10678—76
Бром	
Фенолфталеин	

6. Требования безопасности

6.1. При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работы с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005—88 .

6.2 При выполнении измерений концентраций субтилизина (протеазы) с использованием спектрофотометра СФ-46 и электроаспиратора следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкциями по эксплуатации приборов.

7. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке их результатов на спектрофотометре и электроаспираторе допускаются лица, знающие устройство и правила эксплуатации приборов.

8. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия·

8 1. Процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха (20 ± 5) °С, атмосферном давлении 630—800 мм рт ст. и влажности воздуха не более 80 %.

8.2 Выполнение измерений на спектрофотометре СФ-46 проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору и настоящими методическими указаниями.

9. Подготовка к выполнению измерений и проведение измерений

Перед выполнением измерений проводят следующие работы: приготовление реактивов, подготовка спектрофотометра к работе, установление градуировочной характеристики, отбор проб

9.1. Приготовление растворов

Исходный раствор протеазы для градуировки (с = 1 мг/см³) В мерную колбу емкостью 25 см³ вносят 26,3 мг (95 % основного вещества), доводят 2Н раствором гидроокиси натрия до метки и тщательно перемешивают. Срок хранения исходного раствора 6 часов.

Рабочий раствор протеазы для градуировки (с = 100 мкг/см³). В мерную колбу емкостью 25 см³ помещают 2,5 см³ исходного раствора, доводят 2Н раствором гидрооксида натрия до метки и тщательно перемешивают. Срок хранения рабочего раствора 6 часов.

0,1 Н раствор гидрооксида натрия В колбу емкостью 1 000 см³ помещают 4,0 г гидрооксида натрия, приливают дистиллированную воду до метки и тщательно перемешивают до полного растворения.

2 Н раствор гидрооксида натрия. В колбу емкостью 1 000 см³ помещают 80,0 г гидроокиси натрия, приливают дистиллированную воду до метки и тщательно перемешивают до полного растворения.

Рабочий раствор № 1. В колбу емкостью 100 см³ помещают 10,0 г углекислого натрия, 0,2 г калий-натрий тартрата, 0,05 г серно-кислой меди, приливают дистиллированную воду до метки и тщательно перемешивают.

Исходный раствор реактива Фолина. В круглодонную колбу емкостью 1 000 см³ помещают 50,0 г натрия вольфрамово-кислого, 12,5 г натрия молибденово-кислого, добавляют 360 см³ дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения реактивов. К полученному раствору добавляют 25 см³ 85 % раствора ортофосфорной кисло-

ты, 50 см^3 концентрированной соляной кислоты и смесь кипятят в течение 10 ч с обратным холодильником. Затем добавляют 76 г лития сернокислого, 25 см^3 дистиллированной воды и 3 капли брома. Кипятят под тягой без обратного холодильника для удаления остатка брома. Охлаждают до комнатной температуры и доводят дистиллированной водой до объема 500 см^3, перемешивают и фильтруют. Из фильтрата отбирают 1 см^3, добавляют 9 см^3 дистиллированной воды и титруют 0,1 н раствором гидрооксида натрия по фенолфталеину. Реактив Фолина с установленным титром доводят дистиллированной водой до 1 н концентрации. Раствор хранят в темной склянке с притертой пробкой в холодильнике Срок хранения реактива – 1 месяц.

Рабочий раствор реактива Фолина готовят перед употреблением путем разбавления 1 см^3 исходного раствора реактива Фолина дистиллированной водой до объема 8 см^3 в расчете на одну пробу.

9.2. Подготовка спектрофотометра к работе

Подготовку спектрофотометра к работе проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

9.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику устанавливают на градуировочных растворах. Она выражает зависимость оптической плотности растворов от массы субтилизина (протеазы) и устанавливается по 5 сериям растворов для градуировки.

Каждую серию, состоящую из 6 растворов, готовят в пробирках с притертыми пробками. Для этого в них вносят рабочий раствор протеазы и 2 Н раствор гидрооксида натрия в соответствии с таблицей. После этого в каждую пробирку приливают 2,0 см^3 рабочего раствора № 1, тщательно перемешивают и выдерживают в течение 10 мин. Затем добавляют 8 см^3 рабочего раствора реактива Фолина, перемешивают и нагревают на водяной бане при температуре 50 °С в течение 5 мин. После быстрого охлаждения замеряют оптическую плотность растворов в кювете с толщиной оптического слоя 2,0 мм при длине волны 650 нм по отношению к раствору № 1 в таблице. Строят градуировочную характеристику, нанося на ось ординат значения оптических плотностей градуировочных растворов, а на ось абсцисс – соответствующие им величины содержания протеазы. Градуировку проверяют 1 раз в 3 месяца или в случае использования новой партии реактивов.

Таблица

Растворы для установления градуировочной характеристики при определении концентрации субтилизина (протеазы)

Номер раствора	1	2	3	4	5	6
Объем рабочего раствора протеазы, $см^3$	0	0,1	0,2	0,5	0,8	1,0
Объем раствора 2 Н гидроокиси натрия, $см^3$	1,0	0,9	0,8	0,5	0,2	–
Содержание протеазы, мкг	0	10,0	20,0	50,0	80,0	100,0

9.4. Отбор проб

Отбор проб воздуха, содержащего субтилизин (протеазу), проводят согласно ГОСТ 17.2.3.01—86 Воздух аспирируют с помощью электроаспиратора через фильтр со скоростью 200 $дм^3$/мин в течение 30 мин. Отобранные пробы помещают в пробирки с притертыми пробками Срок хранения – 3 дня.

10. Выполнение измерений

Фильтр с отобранной пробой помещают в бюкс, заливают 3 $см^3$ 2 Н раствора гидрооксида натрия и оставляют на 10—15 мин, периодически помешивая стеклянной палочкой. Степень десорбции протеазы с фильтра 98 %. Фильтр отжимают и отбрасывают. Для анализа отбирают 1,0 $см^3$ полученного раствора и далее проводят анализ в условиях, описанных в п. 9.3

Расчет содержания субтилизина (протеазы) проводят по градуировочной характеристике.

11. Вычисление результатов измерений

Концентрацию субтилизина (протеазы) в атмосферном воздухе (мг/$м^3$) вычисляют по формуле

$$C = \frac{m \cdot V}{V_1 \cdot V_0}, \text{ где}$$

m – содержание субтилизина (протеазы) в анализируемом объеме пробы, мкг;

V – общий объем пробы, $см^3$,

V_1 – объем пробы, взятой для анализа, $см^3$;

V_0 – объем воздуха, взятого для анализа и приведенного к нормальным условиям, $дм^3$;

$$V_0 = \frac{V \cdot 273 \cdot P}{(273 + t) \cdot 760}, \text{ где}$$

V – объем воздуха, взятого для анализа, дм^3;
P – атмосферное давление, мм рт ст.;
T – температура воздуха в месте отбора пробы, °С.

12. Оформление результатов измерений

Результаты измерений концентраций субтилизина (протеазы) оформляют протоколом в виде: C, мг/м^3; $\Delta \pm 21$ % с указанием даты проведения анализа, места отбора пробы, названия лаборатории, юридического адреса организации, ответственного исполнителя и руководителя лаборатории.

13. Контроль погрешности измерений

Контроль погрешности измерений содержания субтилизина (протеазы) проводят на градуировочных растворах в соответствии с пп. 10 и 11 Рассчитывают среднее значение результатов измерения содержания протеазы в градуировочных растворах:

$$\overline{C_i} = \frac{1}{n}\left(\sum_{i=1}^{n} C_{ni}\right), \text{ где}$$

n – число измерений в градуировочной смеси,
C_{ni} – результат измерения содержания вещества в i-ой пробе градуировочного раствора, мг/дм^3.

Рассчитывают среднее квадратичное отклонение измерений концентрации:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(C_{ni} - \overline{C_i}\right)^2}{n-1}}$$

Рассчитывают доверительный интервал:

$$\Delta\overline{C_i} = \frac{S}{\sqrt{n}} \cdot t, \text{ где}$$

t – коэффициент нормированных отклонений, определяемый по табл. Стьюдента, при доверительной вероятности 0,95, и затем относительную погрешность определения концентраций:

$$\delta = \frac{\Delta\overline{C_i}}{\overline{C_i}} \cdot 100, \%$$

Если $\delta \leq 21$ %, то погрешность измерения удовлетворительная. Если данное условие не выполняется, то выясняют причину и повторяют измерения.

Спектрофотометрическое определение карбоксиметилцеллюлозы натриевой соли в атмосферном воздухе

Методические указания
МУК 4.1.1958—05

Спектрофотометрическое определение субтилизина (протеазы) в атмосферном воздухе

Методические указания
МУК 4.1.1959—05

Редакторы Л. С Кучурова, Е. И. Максакова
Технический редактор Е В. Ломанова

Подписано в печать 21 06 06

Формат 60x88/16 Печ л 1,25

Тираж 100 экз Заказ 26

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер , д 18/20

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

gost.e-ecolog.ru