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

Г. Г. Онищенко
29 июня 2003 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Фотометрическое измерение массовых концентраций эндо-1,3в-ксиланазы (ксиланазы) в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.1.1642—03

1. Область применения

Настоящие методические указания устанавливают количественный фотометрический анализ воздуха рабочей зоны на содержание ксиланазы в диапазоне концентраций 0,5—5,0 мг/м^3.

2. Характеристика вещества

Ксиланаза (Tr. viride) является сложным продуктом микробиологического синтеза. Включает в себя также остатки среды культивирования, микроорганизмов-продуцентов и продукты их жизнедеятельности. При действии ксиланазы на ксилан (гемицеллюлоза, относящаяся к гетерополисахаридам, в состав которой входят в основном D-ксилоза и другие моносахариды, в т. ч. D-глюкоза) последний расщепляется на моно- и олигосахариды.

2.1. Физико-химические свойства.

Ксиланаза представляет собой однородный порошок светло-серого цвета без резкого запаха; хорошо растворима в воде.

Ферментативная активность – 500 Ед/г.

Агрегатное состояние в воздухе – аэрозоль.

2.2. Токсикологическая характеристика.

Ксиланаза не действует раздражающе на конъюнктиву и кожу, не обладает сенсибилизирующей активностью.

gost.e-ecolog.ru

Предельно допустимая концентрация (ПДК) ксиланазы в воздухе рабочей зоны 1,0 мг/м^3; класс опасности – второй.

3. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений массовых концентраций ксиланазы с погрешностью, не превышающей ± 19 %, при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Измерение массовой концентрации ксиланазы выполняется методом фотометрии.

Метод основан на способности ксиланазы, при её действии на ксилан, образовывать восстанавливающие сахара. Измерение концентрации восстанавливающих сахаров проводят при длине волны 670 нм.

За единицу ферментативной активности (Ед) принята такая масса ксиланазы, которая в течение 1 мин (50 °С, pH 5,0) вызывает образование восстанавливающих сахаров в количестве, эквивалентном 1 мкМ глюкозы.

Отбор проб проводят с концентрированием на фильтр.

Нижний предел измерения содержания ксиланазы в анализируемой пробе (0,5 см^3) – 10,0 мкг.

Нижний предел измерения концентрации ксиланазы в воздухе при отборе 400 дм^3 – 0,5 мг/м^3.

Определению ксиланазы не мешает наличие в воздухе α-амилазы, фитолиазы, β-глюканазы.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы

Колориметр фотоэлектрический КФК-2; интервал длин волн 630—670 нм, погрешность 0,01D	ТУ 3-3,1766—82
Весы лабораторные аналитические ВЛА-200, погрешность ± 0,2 мг	ГОСТ 24104—88Е
Баня водяная, до (100 ± 1) °С	ТУ 64-1-2850—76
Ультратермостат, (50,0 ± 0,2) °С	ГОСТ 20790—75
Центрифуга ЦЛК-1, 7 000 об./мин	ТУ 375-4166
pH-метр-милливольтметр лабораторный pH-121, (0—14) ± 0,1 ед. pH	ТУ-25.05.1689—74
Термометр стеклянный ртутный группы 2	ГОСТ 13646—68
Электроплитка с терморегулятором	ГОСТ 14919—83

Холодильник бытовой, 4—6 °С	ГОСТ 16317—76
Шкаф сушильный 2В-151, (105 ± 1) °С	ТУ-64-1-1411—72
Мешалка магнитная ММ5, 700—800 об./мин	ТУ-25.11.834—80
Термостат суховоздушный ТС-80, 20—100 °С	ТУ-64-1-1382—72
Секундомер	ТУ 25-1819.002—90
Бюксы СВ $^{25}/_{35}$	ГОСТ 25336—82Е
Эксикатор любого исполнения	ГОСТ 25336—82Е
Стаканы В-1-50С, В-1-100ТС, В-1-250ТС, В-1-600ТС	ГОСТ 25336—82Е
Колбы мерные 1-го или 2-го исполнения, 50—1 000 см^3	ГОСТ 1770—74Е
Пробирки П-4-15-180 ХС или П 1-16-150 ХС	ГОСТ 25336—82Е
Пипетки измерительные 1, 2, 5, 10 см^3	ГОСТ 29227—91Е
Цилиндры 1(2,3,4)-50 (100)	ГОСТ 1770—74Е
Фильтры АФА-ВП-10	ТУ 95-743—80
Фильтродержатель	ТУ 96-72-05—77
Аспирационное устройство, модель 822, расход воздуха до 20 дм^3/мин	ТУ 64-1-862—82

5.2. Реактивы

Ксиланаза, активность (500 ± 25) ЕД/г	ТУ 9291-02-512472—02
Ксилан из ячменя производства фирмы «SIGMA», X4252, CAS 9014-63-5	
Д-глюкоза, предварительно высушенная при температуре 105 °С в течение 1 ч, чда	ГОСТ 6038—79
Калий-натрий винно-кислый 4-водный, чда	ГОСТ 5845—79
Кальций хлористый безводный, чда или ч	ТУ 6-09-4711—91
Кислота бензойная, чда	ГОСТ 10521—78
Кислота серная, хч	ГОСТ 4204—77
Медь серно-кислая 5-водная, хч	ГОСТ 4165—78
Натрий мышьяково-кислый, трехзамещенный, хч, фирмы «Fluka» (Швейцария), CAS 7783-43-0	
Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный, хч или чда	ГОСТ 4172—76
Калий фосфорно-кислый однозамещенный, хч или чда	ГОСТ 4198—75
Натрий серно-кислый, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый кислый, хч	ГОСТ 4201—79
Натрий углекислый, хч	ГОСТ 83—79
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72

Аммоний молибденово-кислый, хч ГОСТ 3765—78

Примечание. Допускается применение иных средств измерения, вспомогательных устройств, реактивов и материалов, обеспечивающих показатели точности, установленные для данной методики выполнения измерений (МВИ).

6. Требования безопасности

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

6.2. При проведении анализов горючих и вредных веществ должны соблюдаться меры противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—76.

6.3. При выполнении измерений с использованием фотоэлектроколориметра соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкцией по эксплуатации прибора.

6.4. При выполнении измерений с использованием фотоэлектроколориметра соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкцией по эксплуатации прибора.

Работа на фотоэлектроколориметре должна проводиться в чистом помещении, свободном от пыли, паров кислот и щелочей. Вблизи фотоэлектроколориметра не должны располагаться громоздкие изделия, создающие неудобства в работе оператора (ГОСТ 15150—69).

7. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица с высшим и средним специальным образованием, имеющие навыки работы на фотоэлектроколориметре.

8. Условия измерений

8.1. Приготовление растворов и подготовку проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха (20 ± 5) °С, атмосферном давлении 84—106 кПа и влажности воздуха не более 80 %.

8.2. Измерения на фотоэлектроколориметре проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

9. Подготовка к выполнению измерений

9.1. Приготовление растворов

9.1.1. Приготовление стандартного раствора ксиланазы (1 мг/см^3)

Помещают в стаканчик 0,100 г ксиланазы, тщательно растирают стеклянной палочкой с небольшим количеством дистиллированной во-

ды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и центрифугируют в течение 15 мин при 7 000 об./мин.

9.1.2. Приготовление раствора ксилана с массовой долей 1 % (субстрат)

Помещают в стаканчик 1,00 г ксилана, размешивают стеклянной палочкой с 20—30 см^3 дистиллированной воды и выдерживают в течение 1 ч на кипящей водяной бане с периодическим перемешиванием (15—20 раз).

После охлаждения величину pH раствора доводят до 5,0 раствором цитратно-фосфатного буфера (25—30 см^3), проверяя его на pH-метре. Раствор количественно переносят в мерную колбу на 100 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор центрифугируют в течение 15 мин при 7 000 об./мин. Надосадок (субстрат) декантируют в стерильную колбу и закрывают пробкой.

Субстрат должен быть однородным и прозрачным. Хранят субстрат при температуре 5 °С до 3-х суток.

9.1 3. Приготовление раствора меди серно-кислой 5-водной, 10 %

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 наливают около 70 см^3 дистиллированной воды. При перемешивании её на магнитной мешалке, вносят 10 г меди серно-кислой 5-водной. Доливают до метки дистиллированной водой.

Раствор хранят в холодильнике до 3 месяцев.

9.1.4. Приготовление раствора натрия фосфорно-кислого двузамещенного 12-водного, 1/15 Моль/дм^3

Навеску 2,39 г натрия фосфорно-кислого двузамещенного 12-водного помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и заполняют до метки дистиллированной водой.

Раствор хранят в холодильнике до одного месяца.

9.1.5. Приготовление раствора калия фосфорно-кислого однозамещенного, 1/15 Моль/дм^3

Навеску 0,91 г калия фосфорно-кислого однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и заполняют до метки дистиллированной водой.

Раствор хранят в холодильнике до одного месяца.

9.1.6. Приготовление цитратно-фосфатного буферного раствора, pH 5,0

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 наливают 48,5 см^3 приготовленного раствора натрия фосфорно-кислого и доводят объем до метки приготовленным раствором лимонной кислоты.

Хранят в холодильнике (4—6 °С) в течение месяца.

9.1.7. Приготовление реактива Шомодьи

Растворяют в 450 см^3 горячей дистиллированной воды 18,0 г серно-кислого натрия и кипятят 40 мин для удаления углекислого газа. Раствор охлаждают (раствор А).

Растворяют в 250 см^3 дистиллированной воды 24,0 г натрия углекислого и 12,0 г калия-натрия винно-кислого, добавляют 40 см^3 приготовленного раствора серно-кислой меди и 16,0 г натрия углекислого кислого (раствор Б).

Растворы (А и Б) соединяют и объем доводят дистиллированной водой до 1 л.

Реактив хранят в темной посуде с плотно притертой пробкой в темном месте не более 3 месяцев.

9.1.8. Приготовление реактива Нельсона

Растворяют в 400 см^3 дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 500 см^3 25,0 г молибденовокислого аммония. Туда же, при постоянном перемешивании, добавляют 21,0 см^3 концентрированной серной кислоты и 30 г мышьяково-кислого натрия, предварительно растворенного в 25 см^3 дистиллированной воды. Объем полученного раствора доводят до метки дистиллированной водой и выдерживают в термостате при 36—40 °С в течение 2-х суток.

Реактив имеет желтую окраску. Хранят реактив в темной посуде с плотно притертой пробкой в защищенном от света месте не более 3-х месяцев.

9.1.9. Приготовление насыщенного раствора бензойной кислоты

Помещают в мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 2,7 г бензойной кислоты, приливают 700 см^3 дистиллированной воды и растворяют при нагревании в кипящей водяной бане. После растворения содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят до метки дистиллированной водой.

Хранят в холодильнике (4—6 °С) до 3-х месяцев.

9.2. Подготовка прибора

Подготовку фотоэлектроколориметра проводят в соответствии с руководством по его эксплуатации.

9.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость величины оптической плотности от массы анализируемого вещества в пробе, взятой для анализа, устанавливают при помощи градуировочных растворов ксиланазы в соответствии с табл. 1.

Таблица 1

Приготовление растворов ксиланазы для определения градуировочной характеристики

№ градуировочного раствора	Объем стандартного раствора ксиланазы (1 мг/см^3), см^3	Объем разбавляющего раствора бензойной кислоты, см^3	Содержание ксиланазы в объеме пробы (0,5 см^3), взятой для анализа, мкг
1	0,00	100,0	0,0
2	2,00	98,0	10,0
3	3,00	97,0	15,0
4	5,00	95,0	25,0
5	8,00	92,0	40,0
6	13,00	87,0	65,0
7	20,00	80,0	100,0

Градуировочные растворы изготавливаются непосредственно перед измерениями. Хранить не более 6 ч в бытовом холодильнике.

В пробирки наливают по 0,5 см^3 раствора ксилана (субстрат). Пробирки термостатируют при 50 °С в течение 5 мин. Затем добавляют по 0,5 см^3 каждого градуировочного раствора ксиланазы и проводят гидролиз в термостате в течение 30 мин при температуре 50 °С.

Одновременно с опытными пробами готовят холостую. Для этого в пробирку наливают 0,5 см^3 субстрата, затем добавляют 0,5 см^3 раствора бензойной кислоты (градуировочный раствор № 1).

После проведения гидролиза в опытные и холостую пробирки добавляют по 1 см^3 реактива Шомодьи и кипятят 15 мин на водяной бане. Затем пробирки охлаждают, приливают по 1 см^3 реактива Нельсона и 7 см^3 дистиллированной воды. Растворы тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре для развития окраски.

Оптическую плотность опытной пробы определяют по отношению к холостой пробе на фотоэлектроколориметре при длине волны 670 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 5 мм.

По полученным значениям оптических плотностей строят градуировочный график.

Рабочая зона оптического поглощения для градуировочного графика лежит в пределах 0,11—1,10.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности из пяти параллельных измерений.

Проверку градуировочного графика проводят 1 раз в 3 месяца или в случае смены партии реактивов, оборудования или приборов.

9.4. Отбор проб воздуха

Воздух с объемным расходом 20 дм^3/мин аспирируют в течение 20 мин через фильтр АФА-ВП-10, помещенный в фильтродержатель. Для определения ½ ПДК ксиланазы следует отобрать 400 дм^3 воздуха.

Отобранные пробы хранятся в условиях сухого помещения в закрытом сосуде при комнатной температуре до 5 суток.

10. Выполнение измерения

10.1. Экстракция ксиланазы с фильтра

Фильтр с отобранной пробой переносят в стаканчик, приливают в него 5 см^3 раствора бензойной кислоты и оставляют на 10 мин, периодически помешивая стеклянной палочкой для лучшего растворения вещества. Полученный раствор отливают в пробирку, а экстракцию продолжают, добавив в стаканчик с фильтром 5 см^3 раствора бензойной кислоты. Затем фильтр тщательно отжимают и удаляют. Растворы сливают в одну пробирку. Таким образом получают 10 см^3 элюата ксиланазы.

Степень десорбции ксиланазы с фильтра ($K_д$) равняется 94 %.

10.2. Проведение анализа

Анализ 0,5 см^3 элюата на содержание ксиланазы проводят точно так же, как при построении градуировочной характеристики.

Оптическую плотность анализируемого раствора измеряют аналогично градуировочным растворам по сравнению с холостым, который готовят одновременно и аналогично пробам, используя чистый фильтр.

По градуировочному графику находят количество ксиланазы в объеме пробы, взятой для анализа, соответствующее полученным значениям оптических плотностей.

Если значения оптических плотностей находятся за пределами рабочей зоны градуировочного графика, то опыт необходимо повторить с раствором, имеющим большее или меньшее содержание ксиланазы.

11. Расчет концентрации вещества в воздухе

Концентрацию ксиланазы в воздухе (C, мг/м^3) вычисляют по формуле:

$$C = \frac{а \cdot в}{б \cdot V}, \text{ где}$$

$а$ – содержание ксиланазы, определенное в объеме пробы, взятом для анализа, мкг;

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

$в$ – общий объем пробы, см^3;

V – объем воздуха, отобранного для анализа и приведенного к стандартным условиям, дм^3 (см. прилож. 1).

12. Оформление результатов анализа

Результат количественного анализа представляют в виде ($C \pm C \cdot \Delta/100$) мг/м^3, $P = 0{,}95$, где Δ – характеристика погрешности, выраженная в процентах.

13. Контроль погрешности методики

Значения полученных метрологических характеристик погрешности, норматива оперативного контроля точности и норматива оперативного контроля воспроизводимости приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты метрологической аттестации методики количественного химического анализа (КХА)

Диапазон определяемых массовых концентраций ксиланазы, мг/м^3	Наименование метрологической характеристики		
	Характеристика погрешности, Δ, % ($P = 0{,}95$)	Норматив оперативного контроля погрешности, K, % ($P = 0{,}90$, $m = 2$)	Норматив оперативного контроля воспроизводимости D, % ($P = 0{,}95$, $m = 2$)
0,5—5,0	21	16	17

13.1. Внутренний оперативный контроль воспроизводимости

Оперативный контроль воспроизводимости выполняют в одной серии с анализом рабочих проб. Отбирают реальные пробы воздуха рабочей зоны из одного традиционного места отбора двумя пробоотборни-

ками одновременно. Анализируют в соответствии с прописью методики, максимально варьируя условия проведения анализа: партии реактивов, наборы мерной посуды и т. д., и получают два результата (C_1 и C_2) анализов. Результаты анализа не должны отличаться друг от друга на величину большую, чем норматив оперативного контроля воспроизводимости D (%):

$$\frac{(C_1 - C_2)\cdot 200}{(C_1 + C_2)} < D$$

При превышении расхождения между двумя результатами норматива оперативного контроля воспроизводимости эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Периодичность проведения внутреннего оперативного контроля воспроизводимости и интервал между первичным и повторным анализами пробы устанавливают с учётом стабильности условий выполнения контрольных измерений; периодичности и длительности проведения КХА, устанавливаемых соответствующими нормативными документами; вариации состава анализируемых проб; плана выборочного статистического контроля воспроизводимости (как правило, интервал между получением первичного и повторного результатов КХА пробы составляет 1—3 дня).

13.2. Внутренний оперативный контроль точности

Внутренний оперативный контроль точности проводят для каждого интервала определяемых концентраций. Единичные контрольные измерения выполняют в одной серии с КХА рабочих проб за период, в течение которого условия проведения КХА допустимо считать постоянными. Число контрольных измерений зависит от установленных планов статистического контроля точности.

Образцами для оперативного контроля точности являются стандартные образцы с известным содержанием измеряемого вещества, величина которого должна быть близкой к анализируемым пробам.

При контроле качества результатов КХА состава воздушных сред при отсутствии в лаборатории промышленных смесей или невозможности их создания, в качестве образца для контроля используют стандартный образец, нанесенный на фильтр или другое устройство, на которое концентрируют исследуемые вещества. При этом, следует иметь в виду, что погрешность процедуры отбора проб контролируется путем поверки используемых пробоотборников, и расчет норматива контроля точности

осуществляют, исходя из характеристики погрешности методики КХА за вычетом характеристики погрешности используемого пробоотборника и характеристики погрешности, связанной с неполным извлечением анализируемых компонентов.

Решение об удовлетворительной погрешности принимают при выполнении условия:

$$\frac{|C_{оа} - X| \cdot 200}{C_{оа} + X} < K, \text{ где}$$

$C_{оа}$ – содержание (концентрация) анализируемого вещества в образце для анализа (по приготовлению), мг/м^3;

X – измеренное содержание (концентрация) вещества, мг/м^3;

K – величина характеристики оперативного контроля точности, %.

14. Нормы затрат времени на анализ

Для проведения серии анализов из 6 параллельных проб требуется 2,5 ч.

Методические указания разработаны Российским государственным медицинским университетом (А. В. Лиманцев).

gost.e-ecolog.ru