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

Спектрофотометрическое измерение массовых концентраций фитолиазы в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.1.1640—03

1. Область применения

Настоящие методические указания устанавливают количественный спектрофотометрический анализ воздуха рабочей зоны на содержание фитолиазы в диапазоне концентраций 1,0—6,0 мг/м^3

2. Характеристика вещества

2.1. Физико-химические свойства.

Фитолиаза относится к пектин-лиазам. Данная фитолиаза получена из Bacillus macerans.

Фитолиаза представляет собой сыпучий однородный порошок серого цвета со специфическим запахом. Массовая доля влаги не более 10 %; рабочая зона действия фитолиазы 35—45 °С, pH 5,5—8,5. Хорошо растворима в воде.

Пектин-лиазная активность фитолиазы составляет 500 ЕД/мг.

Агрегатное состояние в воздухе – аэрозоль.

2.2. Токсикологическая характеристика.

Фитолиаза относится к малоопасным ферментным препаратам. Фитолиаза не обладает аллергенными свойствами и не раздражает слизистую оболочку глаза.

Ориентировочный безопасный уровень воздействия (ОБУВ) фитолиазы в воздухе рабочей зоны 2,0 мг/м^3.

gost.e-ecolog.ru

3. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений массовых концентраций фитолиазы с погрешностью, не превышающей ± 23 %, при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Метод основан на способности фитолиазы проявлять пектин-лиазную активность.

Пектин-лиазная активность (ПлА) характеризует способность фитолиазы катализировать расщепление α-1,4-связей низкометоксилированного пектина с образованием продуктов реакции с ненасыщенными связями между 4 и 5 атомами углерода в молекуле галактуроновой кислоты.

Измерение массовой концентрации фитолиазы выполняется методом фотометрии.

Метод основан на определении концентрации ненасыщенных продуктов распада пектина, имеющих максимальную оптическую плотность при длине волны 235 нм.

За единицу активности (ЕД) принята такая масса фитолиазы, которая за 1 ч при 40 °С (в условиях данной методики) вызывает образование ненасыщенных продуктов реакции, увеличивающих оптическую плотность реакционной смеси на 0,1D.

Отбор проб проводят с концентрированием на фильтр.

Нижний предел измерения содержания фитолиазы в анализируемой пробе (2,0 $см^3$) – 80 мкг.

Нижний предел измерения концентрации фитолиазы в воздухе при отборе 400 $дм^3$ – 1,0 $мг/м^3$.

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

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы

Спектрофотометр СФ-46, измерение в области 235 нм с погрешностью 0,01 Д	ТУ 3-3.1766—82
Ультратермостат; температура (40 ± 1) °С	ГОСТ 20790—75
pH-метр-милливольтметр лабораторный pH-121; определение pH в диапазоне (0—14) ± 0,1 ед. pH	ТУ-25.05.1689—74
Мешалка магнитная ММ5, частота вращения до 1 000 об./мин	ТУ-25.11.834—80

Центрифуга ЦЛК-1, частота вращения 7 000 об./мин	ТУ 375-4166
Весы лабораторные аналитические ВЛА-200, погрешность ± 0,2 мг	ГОСТ 24104—88Е
Холодильник бытовой, температура 4—6 °С	ГОСТ 16317—76
Секундомер	ТУ 25-1819.002—90
Термометры с пределами измерения 0—100 °С и ценой деления не более 1 °С	ГОСТ 215—73
Колбы мерные наливные 2-го исполнения, вместимостью 25, 100, 200, 250 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74Е
Пробирки П-1-21-200, или П-1-16-150 или П-2-19-180, или П-2-16-150 (180)	ГОСТ 25336—82Е
Цилиндры 1-го и 2-го исполнения, вместимостью 10—1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74Е
Мензурки, вместимостью 50—1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74Е
Воронки типа В	ГОСТ 25336—82Е
Пипетки 1-го, 2-го, 3-го исполнения, вместимостью 0,2, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 $см^3$ и бюретки 20 и 100 $см^3$	ГОСТ 29227—91Е и ГОСТ 29169—91Е
Бюксы СВ $^{25}/_{35}$	ГОСТ 25336—82Е
Стаканы, вместимостью 100—2 000 $см^3$	ГОСТ 25336—82Е
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81
Марля медицинская	ГОСТ 9412—93
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

Фитолиаза, ферментативная активность (500 ± 5) ЕД/мг (по ОПР-34588571-77-2001)	
Пектин свекловичный со степенью метоксилирования не менее 35 %, массовая доля пектина 80 %	ОСТ 18-62—72
Кальций хлористый безводный, чда или хч	ТУ 6-09-4711—87
Кислота соляная, хч или чда, плотность 1,174 г/$см^3$	ГОСТ 3118—77
Трис-(оксиметил)-аминометан, хч или чда	ТУ 6-09-4292—76
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72

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 спектрофотометра или 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.

7. Трсбования к квалификации операторов

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

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 спектрофотометре проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

9. Подготовка к выполнению измерений

9.1. Приготовление растворов

9.1.1. Приготовление стандартного раствора фитолиазы, 1 мг/см^3

В стаканчик вместимостью 50 см^3 наливают 15—18 см^3 дистиллированной воды и ставят его на магнитную мешалку. Затем в него аккуратно вносят 0,05 г фитолиазы и перемешивают в течение 30 мин. Затем раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и центрифугируют при 7 000 об./мин в течение 10 мин. Раствор готовят в день проведения анализа.

9.1.2. Приготовление раствора пектина, массовая доля 0,8 %

Навеску пектина 1,00 г осторожно, во избежании комкования, переносят в колбу, содержащую 60 $см^3$ дистиллированной воды и 5—6 $см^3$ раствора трис-(оксиметил)-аминометана, при перемешивании на магнитной мешалке.

Если содержание пектина в реактиве не соответствует 80 %, проводят пересчет навески.

Полученный раствор при комнатной температуре перемешивают на магнитной мешалке при 200—250 об./мин в течение 1 ч. Затем раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и корректируют pH до значения 8,4 раствором трис-(оксиметил)-аминометана. Если pH раствора пектина превышает значение 8,4, корректировку проводят раствором соляной кислоты (0,1 моль/$дм^3$). После этого объем раствора доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр (4 слоя марли и 1 слой ваты).

Раствор пектина хранят в холодильнике при 4 °С не более 2 суток.

9.1.3. Приготовление раствора хлористого кальция, 0,01 моль/$дм^3$

Навеску хлористого кальция 0,11 г количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят общий объем до метки дистиллированной водой.

Раствор хранят в холодильнике не более 10 суток.

9.1.4. Приготовление раствора трис-(оксиметил)-аминометана, 0,2 моль/$дм^3$

Навеску трис-(оксиметил)-аминометана 24,23 г количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ и доводят общий объем дистиллированной водой до метки.

Раствор хранят в холодильнике не более 10 суток.

9.1.5. Приготовление раствора соляной кислоты, 0,1 моль/$дм^3$

В мерную колбу объемом 100 $см^3$ наливают примерно 70 $см^3$ дистиллированной воды и добавляют 0,89 $см^3$ соляной кислоты. Доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор хранят при комнатной температуре до 3-х месяцев.

9.1.6. Приготовление буферного раствора трис-соляно-кислого, pH 8,4

Смешивают 25 $см^3$ раствора трис-(оксиметил)-аминометана с 18 $см^3$ раствора соляной кислоты и добавляют дистиллированную воду до объема 85—90 $см^3$. При необходимости проводят подтитровку буферного раствора до значения pH 8,4 раствором трис-(оксиметил)-аминометана или кислоты и доводят общий объем до 100 $см^3$ дистиллированной водой.

Раствор хранят в холодильнике не более 10 суток.

9.1.7. Приготовление субстратной смеси

В строгой последовательности смешивают растворы пектина, трисоляно-кислого буфера и хлористого кальция в соотношении 5 : 2 : 1.

Готовят непосредственно перед проведением анализа.

Смесь хранят при комнатной температуре не более 8—12 ч.

9.2. Подготовка прибора

Подготовку спектрофотометра 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 фитолиазы в соответствии с табл. 1.

Таблица 1

Приготовление растворов фитолиазы для определения градуировочной характеристики

№ градуировочного раствора	Объем стандартного раствора фитолиазы (1 мг/см^3), см^3	Объем разбавляющей дистиллированной воды, см^3	Содержание фитолиазы в объеме пробы (2 см^3), взятой для анализа, мкг
1	0,0	100,0	0
2	4,0	96,0	80
3	6,0	94,0	120
4	10,0	90,0	200
5	15,0	85,0	300
6	24,0	76,0	480

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

Анализ производят следующим образом.

В каждую опытную пробирку наливают 8 см^3 субстратной смеси, прогревают в течение 5 мин при 40 °С, после чего добавляют 2 см^3 градуировочного раствора, содержащего фитолиазу, перемешивают встряхиванием и инкубируют в течение 15 мин строго по секундомеру при 40 °С. Затем отбирают 1 см^3 смеси и переносят в пробирку, содержащую 9 см^3 раствора соляной кислоты.

Одновременно с опытными пробами готовят холостую. Для этого в пробирку, содержащую 9 $см^3$ раствора соляной кислоты, добавляют 0,8 $см^3$ субстратной смеси и 0,2 $см^3$ дистиллированной воды.

Оптическую плотность опытного раствора измеряют против контрольного раствора на спектрофотометре в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 1 см при длине волны 235 нм.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности из 5 параллельных измерений.

По полученным значениям оптических плотностей строят градуировочный график, имеющий линейную зависимость оптической плотности от концентрации фитолиазы.

Рабочая зона оптической плотности лежит в области 0,1—0,6D.

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 фитолиазы 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 фитолиазы с фильтра

Фильтр с отобранной пробой переносят в стаканчик, приливают в него 5 $см^3$ дистиллированной воды, 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 $см^3$ дистиллированной воды. Затем фильтр тщательно отжимают и удаляют. Растворы сливают в одну пробирку. Таким образом получают 10 $см^3$ элюата фитолиазы.

Степень десорбции фитолиазы с фильтра составляет 96 %.

10.2. Проведение анализа

Анализ 2 $см^3$ элюата на содержание фитолиазы проводят точно так же, как при построении градуировочного графика.

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

По градуировочному графику находят количество фитолиазы в исследованных растворах.

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

11. Расчёт концентрации вещества в воздухе

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

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

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

$в$ – общий объем пробы, см^3;

$б$ – объем пробы, взятой для анализа, 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, выраженные в процентах, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты метрологической аттестации методики количественного химического анализа (КХА)

Диапазон определяемых массовых концентраций фитолиазы в воздухе, 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, % ($P = 0{,}95$, $m = 2$)
1—6	23	19	23

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 пробоотборниками одновременно. Анализируют в соответствии с прописью методики, максимально варьируя условия проведения анализа: партии реактивов, наборы мерной посуды и т. д., и получают два результата анализов – C_1 и C_2. 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 времени 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 времени 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 стандарт-

ный 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:

$$\frac{(C_{oa} - X)\cdot 200}{C_{oa} + X} < K, \text{ где}$$

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

X – измеренное содержание (концентрация) анализируемого 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