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 β-глюканазы в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.1.1624—03

1. Область применения

Настоящие методические указания устанавливают количественный фотометрический анализ воздуха рабочей зоны на содержание β-глюканазы в диапазоне массовых концентраций 1,0—6,0 мг/м^3.

2. Характеристика вещества

2.1. Общая характеристика вещества.

β-глюканазу получают путем микробиологического синтеза с использованием штамм-продуцента Trichoderma longibrachiatum TW-1.

2.2. Физико-химические свойства.

β-глюканаза представляет собой однородный порошок светло-серого цвета; хорошо растворима в воде.

Ферментативная активность β-глюканазы – 2 000 ЕД/г.

Агрегатное состояние в воздухе – аэрозоль.

2.3. Токсикологическая характеристика.

β-глюканаза не обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки глаз, не проникает через неповрежденную кожу в количествах, вызывающих признаки интоксикации. β-глюканаза слабо кумулирует в организме при повторном введении в желудок. Сенсибилизирующее действие β-глюканазы не обнаружено.

Ориентировочно безопасный уровень (ОБУВ) в воздухе рабочей зоны – 2 мг/м^3.

gost.e-ecolog.ru

3. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений массовых концентраций β-глюканазы с погрешностью, не превышающей ± 24 %, при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Измерение массовой концентрации β-глюканазы выполняется методом фотометрии.

Метод основан на способности β-глюканазы, при её действии на 1,3/1,4 β-глюкан, образовывать восстанавливающие сахара. Измерение концентрации восстанавливающих сахаров проводят при длине волны 670 нм.

За единицу активности (ЕД) принята способность β-глюканазы в стандартных условиях (50 °С, pH 6,5) катализировать гидролиз β-глюкана с образованием восстанавливающих сахаров в количестве, эквивалентном 1 мкМ глюкозы в 1 мин.

Отбор проб проводят с концентрированием на фильтр.

Нижний предел измерения содержания β-глюканазы в анализируемой пробе (0,1 $см^3$) – 5,0 мкг.

Нижний предел измерения концентрации β-глюканазы в воздухе при отборе 500 $дм^3$ – 1,0 $мг/м^3$.

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

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 0,01 Д	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

β-глюканаза, активность (2 000 ± 44) ЕД/г	ТУ 9291-02-512472—02
β-глюкан производства фирмы «SIGMA», G6513; CAS 9041-22-9	
Аммоний молибденово-кислый, хч	ГОСТ 3765—78
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
Калий-натрий виннокислый 4-водный, чда	ГОСТ 5845—79
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 фотоэлектроколориметра соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкцией по эксплуатации прибора.

6.4. 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 β-глюканазы, 2 г/дм^3

В коническую колбу вместимостью 500 см^3 наливают 200—250 см^3 дистиллированной воды и ставят ее на магнитную мешалку. Затем аккуратно вносят 1,00 г β-глюканазы. Перемешивание продолжают в течение 15 мин. Затем раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 500 см^3, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и центрифугируют в течение 15 мин при 7 000 об./мин.

Раствор готовят в день проведения анализа.

Раствор используют в течение суток.

9.1 2. Приготовление раствора β-глюкана (субстрат), 5 мг/см^3

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 наливают около 70 см^3 фосфатного буферного раствора (pH 6,5) при перемешивании его на магнитной мешалке, вносят 0,5 г β-глюкана и продолжают перемешивать в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем колбу с субстратом помещают в кипящую водяную баню и выдерживают при непрерывном перемешивании до полного растворения β-глюкана не более 20 мин. Далее субстрат охлаждают до комнатной температуры, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки буферным раствором и центрифугируют в течение 15 мин при 7 000 об./мин.

Раствор хранят в холодильнике не более 2-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 фосфатного буферного раствора, pH 6,5

Смешивают приготовленные растворы калия и натрия фосфорно-кислого концентрацией $^1/_{15}$ моль/дм^3 в соотношении 7 : 3. Проверяют величину водородного показателя буферного раствора и, при необходимости, доводят ее одним из компонентов до требуемого значения.

Раствор хранят в холодильнике до одного месяца.

9.1.7. Приготовление растворов Шомодьи

Для приготовления раствора Шомодьи готовят растворы А и Б.

9.1.7.1. *Приготовление раствора А.*

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

9.1.7.2. *Приготовление раствора Б.*

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

9.1.7.3. *Приготовление раствора Шомодьи.*

Раствор А и Б соединяют и объем доводят дистиллированной водой до 1 $дм^3$ в мерной колбе.

Раствор хранят в темной посуде с плотно притертой пробкой в темном месте при комнатной температуре не более 3-х месяцев.

9.1.8. Приготовление раствора Нельсона

Растворяют в 400 $см^3$ дистиллированной воды 25,0 г молибденово-кислого аммония в мерной колбе вместимостью 500 $см^3$ при постоянном перемешивании, добавляют сначала 21,0 $см^3$ концентрированной серной кислоты и затем 3,0 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 при комнатной температуре не более 3-х месяцев.

9.1.9. Приготовление насыщенного раствора бензойной кислоты, 0,27 %

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 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.

Раствор 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 β-глюканазы в соответствии с табл. 1.

Таблица 1

Приготовление растворов β-глюканазы для определения градуировочной характеристики

№ градуировочного раствора	Объем стандартного раствора β-глюканазы (2 мг/см^3), см^3	Объем разбавляющего раствора бензойной кислоты, см^3	Содержание β-глюканазы в объеме пробы (0,1 см^3), взятой для анализа, мкг
1	0,0	100,0	0,0
2	2,5	97,5	5
3	4,0	96,0	8
4	7,5	92,5	15
5	10,0	90,0	20
6	15,0	85,0	30

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

Во все пробирки шкалы наливают по 0,9 см^3 субстрата, предварительно термостатированного при температуре 50 °С в течение 10 мин. Затем добавляют по 0,1 см^3 каждого градуировочного раствора β-глюканазы, включая раствор, не содержащий β-глюканазу (раствор № 1 по табл. 1). Градуировочные растворы также предварительно термостатируют при 50 °С в течение 10 мин.

Через 10 мин во все пробирки вносят по 1 см^3 раствора Шомодьи и прогревают в бурно кипящей водяной бане в течение 15 мин, после чего быстро охлаждают в проточной воде. В каждую из пробирок вносят по 1 см^3 реактива Нельсона и по 7 см^3 дистиллированной воды и выдерживают в течение 10 мин для развития окраски.

Измеряют оптическую плотность растворов при длине волны 670 нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм по отношению к холостому раствору.

Рабочая зона оптического поглощения для градуировочного графика располагается в пределах 0,14—0,86*D*.

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

По полученным значениям оптических плотностей строят градуировочный график.

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 25 мин через фильтр АФА-ВП-10, помещенный в фильтродержатель. Для определения ½ ОБУВ β-глюканазы следует отобрать 500 $дм^3$ воздуха.

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

10. Выполнение измерения

10.1. Экстракция β-глюканазы с фильтра

Фильтр с отобранной пробой переносят в стаканчик, приливают в нее 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 β-глюканазы.

Степень десорбции β-глюканазы с фильтра ($K_д$) равняется 93 %.

10.2. Проведение анализа

Анализ 0,1 $см^3$ элюата на содержание β-глюканазы 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 β-глюканазы в объеме пробы, взятой для анализа, соответствующее полученным значениям оптических плотностей.

Каждый элюат анализируют дважды.

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

11. Расчет концентрации β-глюканазы в воздухе

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

$$C = \frac{а \cdot в}{б \cdot V}, \text{ (мг/м}^3\text{), где}$$

$а$ – содержание β-глюканазы, определенное в объеме пробы, взятой 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 приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты метрологической аттестации методики количественного химического анализа (КХА)

Наименование метрологической характеристики			
Диапазон определяемых массовых концентраций β-глюканазы, мг/м^3	Характеристика погрешности Δ, % ($P = 0,95$)	Норматив оперативного контроля погрешности K, % ($P = 0,90$, $m = 2$)	Норматив оперативного контроля воспроизводимости D, % ($P = 0,95$, $m = 2$)
1,0—6,0	24	20	23

13.1. Внутренний оперативный контроль воспроизводимости

Внутренний 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 C_1

и C_2 анализов. Результаты анализа не должны отличаться друг от друга на величину, большую, чем норматив оперативного контроля воспроизводимости D (%):

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

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 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 пробоотборни-

ка 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