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-галактозидазы в воздухе рабочей зоны

Методические указания МУК 4.1.1619—03

1. Область применения

Настоящие методические указания устанавливают количественный фотометрический анализ воздуха рабочей зоны на содержание β-галактозидазы в диапазоне массовых концентраций 2,0—20,0 мг/м^3.

2. Характеристика вещества

β-галактозидаза представляет собой фермент, получаемый при глубинном культивировании продуцента β-галактозидазы – Penicillium canescens F-178. Обладает специфической β-галактозидазной активностью, которая характеризуется способностью фермента расщеплять β-галактозидазные связи с образованием галактозы.

Препарат предназначен для гидролиза лактозы молока и молочной сыворотки в молочной и хлебопекарной промышленности.

2.1. Физико-химические свойства.

β-галактозидаза – порошок светло-бежевого цвета, хорошо растворимый в воде.

Молекулярная масса – 120 кД.

Ферментативная активность – 5 000 Ед/г.

Агрегатное состояние в воздухе – аэрозоль.

2.2. Токсикологическая характеристика.

β-галактозидаза является малотоксичным веществом при поступлении в организм через желудочно-кишечный тракт, обладает слабым раздражающим действием на слизистые оболочки глаз.

gost.e-ecolog.ru

Предельно допустимая концентрация (ПДК) β-галактозидазы в воздухе рабочей зоны 4,0 мг/м^3. Класс опасности – III, «А».

3. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений массовых концентраций β-галактозидазы с погрешностью, не превышающей ± 22 %, при доверительной вероятности 0,95.

4. Метод измерений

Измерение массовой концентрации β-галактозидазы выполняется методом фотометрии.

Метод основан на определении концентрации орто-нитрофенола, образующегося при действии фермента β-галактозидазы на орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (НФГ). Измерение концентрации орто-нитрофенола проводят при длине волны 440 нм.

За единицу активности β-галактозидазы принимают такое количество фермента, которое за 1 мин гидролизует 1 мкмоль НФГ в стандартных условиях (30 °С, pH 4,2).

Отбор проб проводят с концентрированием на фильтр.

Нижний предел измерения содержания β-галактозидазы в анализируемой пробе (1,0 см^3) – 10,0 мкг.

Нижний предел измерения концентрации β-галактозидазы в воздухе при отборе 50 дм^3 – 2,0 мг/м^3.

Определению β-галактозидазы не мешает наличие в воздухе инвертазы и ксиланазы.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы

Колориметр фотоэлектрический КФК-2; длина волны 440 нм, погрешность 0,01D	ТУ 3-3.1766—82
Фотометрическая кювета с толщиной оптического слоя 30 мм	
Весы лабораторные аналитические ВЛА-200, ± 0,2 мг	ГОСТ 24104—88Е
Весы лабораторные общего назначения не ниже 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Ультратермостат, (30,0 ± 0,2) °С	ГОСТ 20790—75
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
Холодильник бытовой, 4—6 °С	ГОСТ 16317—76
Секундомер	ТУ 25-1819.002—90
Бюксы (для взвешивания веществ), СВ $^{19}/_{9}$ или СВ $^{24}/_{10}$	ГОСТ 25336—82Е
Бюксы (для экстракции β-галактозидазы), СВ $^{30}/_{45}$	ГОСТ 7148—70
Стаканы В-1-50С, В-1-100ТС, В-1-250ТС, В-1-500ТС	ГОСТ 25336—82Е
Цилиндры мерные 25-72-06-В-3-7, 100 см^3	ГОСТ 1770—74
Колбы мерные 1-го или 2-го исполнения, 25, 50, 100 и 1 000 см^3	ГОСТ 1770—74Е
Пробирки П-2-16-150 ХС	ГОСТ 25336—82
Пипетки измерительные 1, 2, 5, 10 см^3	ГОСТ 29227—91
Аспиратор для отбора проб воздуха модели 822, расход воздуха до 20 дм^3/мин	ТУ 64-1-862—82
Фильтродержатель	ТУ 96-72-05—77
Фильтры АФА-ВП-10	ТУ 95-743—80

5.2. Реактивы

β-галактозидаза, активность 5 000 ЕД/г, содержание основного вещества не менее 95 %	ТУ 7384-034-19627570—00
Орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид, фирма Sigma (США), CAS 369-07-3	
Натрий углекислый, чда	ГОСТ 83—79
Натрий уксусно-кислый 3-водный, чда	ГОСТ 199—78
Уксусная кислота (ледяная), хч	ГОСТ 61—75
Дистиллированная вода	ГОСТ 6709—72

Допускается применение иных средств измерения, вспомогательных устройств, реактивов и материалов, обеспечивающих показатели точности, установленные для данной 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.

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-галактозидазы, 1 г/дм^3

Количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 0,1 г β-галактозидазы, объем доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Раствор готовят в день проведения анализа.

9.1.2. Приготовление раствора НФГ (субстрат), 0,01 моль/дм^3

Навеску НФГ 0,075 г количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Раствор может храниться в холодильнике в течение 3-х суток. Пожелтевший раствор к употреблению непригоден.

9.1.3. Приготовление раствора натрия углекислого, 1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 вносят 106 г натрия углекислого, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Раствор может храниться до 6 месяцев в холодильнике.

9.1.4. Приготовление раствора кислоты уксусной, 0,2 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1 дм^3 вносят 11,6 см^3 уксусной кислоты. Доводят до метки дистиллированной водой. Раствор тщательно перемешивают.

Раствор может храниться до года в посуде с притёртой пробкой.

9.1.5. Приготовление раствора натрия уксусно-кислого, 0,2 моль/л

В мерную колбу вместимостью 1 дм^3 вносят 27,2 г натрия уксусно-кислого. Доводят до метки дистиллированной водой. Раствор тщательно перемешивают.

Раствор может храниться до 2-х месяцев в холодильнике.

9.1.6. Приготовление ацетатного буфера, 0,2 моль/дм^3, pH 4.2

Смешивают 73,5 см^3 раствора уксусной кислоты концентрацией (0,2 моль/дм^3) с 26,5 см^3 раствора уксусно-кислого натрия (0,2 моль/дм^3), тщательно перемешивают. Водородный показатель проверяют на pH-метре.

Раствор можно хранить при комнатной температуре в течение 15 суток.

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-галактозидазы в соответствии с табл. 1.

Таблица 1

Приготовление растворов для определения градуировочной характеристики β-галактозидазы

№ градуировочного раствора	Объем стандартного раствора β-галактозидазы (1 мг/см^3), см^3	Объем дистиллированной воды, см^3	Содержание β-галактозидазы в объеме пробы (1,0 см^3), взятой для анализа, мкг
1	0,0	100,0	0,0
2	1,0	99,0	10,0
3	2,0	98,0	20,0
4	3,0	97,0	30,0
5	4,0	96,0	40,0
6	6,0	94,0	60,0
7	10,0	90,0	100,0

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

В пробирки наливают по 3,5 $см^3$ ацетатного буфера и 0,5 $см^3$ раствора НФГ (субстратный раствор), прогревают в ультратермостате при 30 °С 10 мин. Затем в пробирки вносят по 1 $см^3$ градуировочных растворов, перемешивают и включают секундомер. Пробирки выдерживают в ультратермостате 10 мин, после чего из них отбирают по 1 $см^3$ в ранее приготовленные пробирки, содержащие по 1 $см^3$ 1-молярного раствора углекислого натрия.

Холостую пробу получают путём последовательного добавления в пробирку 3,5 $см^3$ ацетатного буфера, 0,5 $см^3$ раствора НФГ (субстратный раствор) и 1 $см^3$ дистиллированной воды. Пробирки выдерживают в ультратермостате 10 мин. Далее отбирают 1 $см^3$ в подготовленную пробирку, содержащую 1 $см^3$ 1-молярного раствора углекислого натрия.

Во все пробирки добавляют по 8 $см^3$ дистиллированной воды. В результате общий объем жидкости в каждой пробирке составляет 10 $см^3$.

Холостая проба практически бесцветна. Растворы, содержащие β-галактозидазу, имеют желтую окраску, интенсивность которой тем сильнее, чем выше концентрация определяемого вещества.

Измеряют оптическую плотность растворов в кюветах с толщиной оптического слоя 30 мм при длине волны 440 нм по отношению к холостой пробе, не содержащей определяемого вещества (раствор № 1 по таблице).

Строят градуировочный график зависимости значения оптической плотности (при длине волны 440 нм, в кюветах толщиной оптического слоя 30 мм) от концентрации β-галактозидазы.

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

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 10 $дм^3$/мин аспирируют в течение 5 мин через фильтр АФА-ВП-10, помещенный в фильтродержатель. Для определения ½ ПДК β-галактозидазы следует отобрать 50 $дм^3$ воздуха.

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

10. Выполнение измерения

10.1. Экстракция β-галактозидазы с фильтра

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

Степень десорбции β-галактозидазы с фильтра ($K_д$) равняется 97 %.

10.2. Проведение анализа

Анализ 1,0 $см^3$ элюата на содержание β-галактозидазы 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-галактозидазы 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 β-галактозидазы.

11. Расчет концентрации вещества в воздухе

Массовую концентрацию β-галактозидазы в воздухе (C, $мг/м^3$) вычисляют по формуле:

$$C = \frac{a \cdot b}{б \cdot V}, \text{ где}$$

a – содержание β-галактозидазы, найденное в анализируемом объеме раствора по градуировочному графику, 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 фотометрической методики

Наименование метрологической характеристики			
Диапазон определяемых массовых концентраций β-галактозидазы, мг/м^3	Характеристика погрешности Δ, % ($P = 0{,}95$)	Норматив оперативного контроля погрешности K, % ($P = 0{,}90$, $m = 2$)	Норматив оперативного контроля воспроизводимости D, % ($P = 0{,}95$, $m = 2$)
2—20	22	18	22

13.1. 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, набора 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.

13.2. 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:

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

C_{oa} – 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 анализа требуется 2,5 ч.

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

gost.e-ecolog.ru