

**4.1. Методы контроля. Химические факторы**

**Измерение массовых концентраций аверсектина С (смесь изомеров) в  
воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной  
хроматографии**

Методические указания  
МУК 4.1.1326 – 03

**Издание официальное**

**Минздрав России  
Москва 2004**

#### 4.1. Методы контроля. Химические факторы

### **Измерение массовых концентраций аверсектина С (смесь изомеров) в воздухе рабочей зоны методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

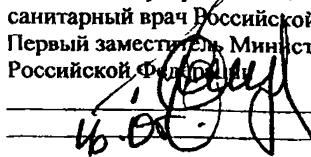
Методические указания  
МУК 4.1.1326 – 03

1. Подготовлены НИИ медицины труда РАМН (Макеева Л.Г., Муравьева Г.В.)
2. Разработаны ООО НБЦ “Фармбиомед” (В.Т. Тер-Симонян, Е.Б.Кругляк), Российским государственным медицинским университетом (Е.Б.Гутля).
3. Рассмотрены на совместном заседании группы Главного эксперта Комиссии по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию по проблеме “Лабораторно-инструментальное дело и метрологическое обеспечение” и методбюро подсекции “Промышленно-санитарная химия” Проблемной комиссии “Научные основы гигиены труда и профпатологии”.
4. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Министерстве Здравоохранения Российской Федерации. (Протокол № 18 от 27 марта 2003 года).
5. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации 16 мая 2003 года.
6. Введены впервые.

Содержание	Стр.
1. Общие положения и область применения	4
2. Характеристика вещества	4-5
3. Погрешность измерений	6
4. Метод измерений	6
5. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы	6
5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы	6
5.2. Реактивы	7
6. Требования безопасности	7
7. Требования к квалификации оператора	7
8. Условия измерений	7
9. Подготовка к выполнению измерений	7
9.1. Приготовление растворов	7
9.2. Подготовка прибора	8
9.3. Установление градуировочной характеристики	8
9.4. Отбор проб воздуха	9
10. Выполнение измерений	9
11. Вычисление результатов измерений	9
12. Оформление результатов анализа	10
13. Контроль погрешности измерений	10
13.1. Оперативный контроль воспроизводимости	10
13.2. Оперативный контроль точности	10
14. Нормы затрат времени на анализ	11

## УТВЕРЖДАЮ

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

  
Г. Г. Онищенко  
2003 г.

Дата введения: с момента утверждения

## 4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение массовых концентраций аверсектина С (смеси изомеров) в воздухе рабочей зоны методом высокочувствительной жидкостной хроматографии  
Методические указания

МУК 4.1 1326 - 03

## 1. Общие положения и область применения

Настоящие методические указания устанавливают количественный хроматографический анализ воздуха рабочей зоны на содержание аверсектина С в диапазоне массовых концентраций от 0,025 до 0,5 мг/м<sup>3</sup>.

Методические указания разработаны и подготовлены в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ "Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования", ГОСТ Р 8.563-96 "Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений", МИ 2335-95 "Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа", МИ 2336-95 "Характеристика погрешности результатов количественного химического анализа. Алгоритмы оценивания".

Методические указания предназначены для санитарных лабораторий промышленных предприятий, организаций и учреждений, где возможен контакт работающих с аверсектином С и других лабораторий, аккредитованных в установленном порядке на право проведения таких исследований.

## 2. Характеристика вещества

## 2.1. Структурная формула

Аверсектин С представляет собой смесь восьми близких в химическом отношении природных 16-членных макроциклических лактонов, продуктов жизнедеятельности культуры *Streptomyces avermitilis* (табл.1). Компоненты A<sub>1</sub> и B<sub>1</sub> имеют двойную связь в положении 22-23 (см. рисунок), у компонентов A<sub>2</sub> и B<sub>2</sub> эта связь восстановлена. Основные компоненты - авермектины B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub>, причем содержание компонента B<sub>1a</sub> (10E,14T,16E,22Z)-(1R,4S,5'S,6S,6'R,8R,12S,20R,21R,24S)-6'-[(S)]-sec-бутил]-21,24-гидрокси-S',11,13,22-тетраметил-2-оксо-3,7,19-триоксатетрацикло-[16,61]-4,8O,22,24-пентакоза-0,14,16,22-тетраен-6-спиро-2'(5',6'-дигидро-2H-пиран)-12-ил-2,6-дидеокси-4-2-(2,6O-дидеокси-3-O-метил-α-1-арабиногексапиранозил)-3-O-метил-α-арабиногексапиранозид) в смеси составляет не менее 40 %.

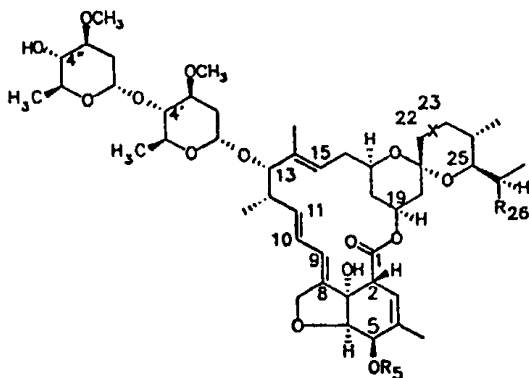


Таблица 1. Характеристика авермектинов.

Тип авер- мектина	Эмпирическая формула	Регистрацион- ные номера по CAS	Молекуляр- ная масса	Заместители	
				R <sub>5</sub>	R <sub>26</sub>
A <sub>1a</sub>	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>		886	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
A <sub>2a</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>15</sub>		904	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
B <sub>1a</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	65195-55-3	872	OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
B <sub>2a</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>15</sub>	65195-56-4	890	OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
A <sub>1b</sub>	C <sub>49</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>		872	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
A <sub>2b</sub>	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> O <sub>15</sub>		890	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
B <sub>1b</sub>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	65195-57-5	858	OH	CH <sub>3</sub>
B <sub>2b</sub>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>15</sub>	65195-58-6	876	OH	CH <sub>3</sub>

## 2.5. Физико-химические свойства.

Аверсектин С - порошок белого или желтовато-белого цвета, легко растворим в хлорированных углеводородах, ацетоне, бензоле, растворим в низших спиртах, практически нерастворим в воде, петролейном эфире. Температуры плавления авермектинов (с разложением) составляют около 150°C.

Агрегатное состояние в воздухе - аэрозоль.

## 2.6. Токсикологическая характеристика

Аверсектин С - противопаразитарный препарат, обладает нервно-паралитическим действием.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) аверсектина С в воздухе 0,05 мг/м<sup>3</sup>. Класс опасности - первый.

### 3. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений массовых концентраций аверсектина С с погрешностью не более  $\pm 24\%$  при доверительной вероятности 0,95.

### 4. Метод измерений

Измерение массовых концентраций аверсектина С основано на получении флуоресцирующих производных авермектинов путем их дериватизации 1-метилимидазолом и трифторуксусным ангидридом. Последующее количественное определение авермектина В<sub>1а</sub>, одного из компонентов аверсектина С, проводят методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением флуоресцентного детектора при длинах волн возбуждения и испускания 365 и 470 нм соответственно.

Отбор проб проводится с концентрированием на фильтре.

Нижний предел измерения содержания авермектина В<sub>1а</sub> в хроматографируемом объеме раствора 0,004 мкг.

Нижний предел измерения концентрации аверсектина С в воздухе 0,025 мг/м<sup>3</sup> (при отборе 140 дм<sup>3</sup> воздуха).

Определению не мешают другие авермектины.

### 5. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

#### 5.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы.

##### 5.1.1. Хроматограф жидкостной Du Pont 8800 (США) с флуоресцентным детектором

5.1.2. Колонка хроматографическая стальная длиной 250 мм и внутренним диаметром 4 мм, заолишенная сорбентом Диасорб-130-С16Т с размером частиц 5 мкм (фирма БиоХимМак, Россия)

5.1.3. Аспирационное устройство ПУ-3Э, ТУ 4215-000-11696625-95

5.1.4. Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 24104-88Е

5.1.5. Меры массы, ГОСТ 7328—82 Е

5.1.6. Фильтродержатель, ТУ 95.72.05-77

5.1.7. Набор для фильтрации жидкостей, производство НПФ «Биохром»

5.1.8. Колбы мерные вместимостью 25 и 100 см<sup>3</sup>, ГОСТ 1770-74Е

5.1.9. Пипетки вместимостью от 1, 2, 5 и 10 см<sup>3</sup>, ГОСТ 29227-91

5.1.10. Цилиндр мерный со шлифом вместимостью 100 см<sup>3</sup>, ГОСТ 1770-74Е

5.1.11. Бюксы 50/30, ГОСТ 25336-82Е

5.1.12. Пробирки с пришлифованными пробками вместимостью 10 см<sup>3</sup>, ГОСТ 25336-82Е

5.1.13. Воронка фильтровальная ВФ-20/16, ГОСТ 25336-82

5.1.14. Центрифуга низкоскоростная ЦЛС-3, ТУ 5-375-4170-73

5.1.15. Центрифужные пробирки стеклянные вместимостью 5 см<sup>3</sup> с полиэтиленовыми пробками

5.1.16. Ультразвуковой диспергатор УЗДН-А, ТУ 25-7401.0127-88

5.1.17. Холодильник бытовой, ГОСТ 16317-87

5.1.18. Вакуумный испаритель ротационный ИР-1М, ТУ 25-11-917-76

5.1.19. Фильтры АФА-ВП-10, ТУ 95-743-80

## 5.2. Реактивы

5.2.1. Авермектин В<sub>1</sub> РСО 9340-201-00-494189-99, содержание авермектина В<sub>1а</sub> 88,88 %

5.2.2. Аверсектин С, ТУ 9383-009-17266133-97, содержание авермектина В<sub>1а</sub> не менее 40 %

5.2.3. Ацетонитрил «для жидкостной хроматографии», ТУ-6-09-14-2167-84

5.2.4. Спирт этиловый, х.ч., ТУ 6-0951710-72

5.2.5. 1-Метилимидазол импортный, фирма Мерк

5.2.6. Трифторуксусный ангидрид импортный, фирма Мерк

5.2.7. Спирт метиловый, х.ч., ГОСТ 6995-77

5.2.8. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72

5.3. 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 работы с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005-88.

6.2. При проведении анализов горючих и вредных веществ соблюдают меры противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 -76.

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

## 7. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке результатов допускают лиц с высшим и средним специальным образованием, имеющих навыки работы на жидкостном хроматографе.

## 8. Условия измерений

8.1. Приготовление растворов и подготовку проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ , атмосферном давлении 84 -106 кПа и влажности воздуха не более 80%.

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

## 9. Подготовка к выполнению измерения

### 9.1. Приготовление растворов

9.1.1. Стандартный раствор №1 авермектина В<sub>1а</sub> для градуировки с концентрацией 88,8 мкг/см<sup>3</sup> готовят путем растворения точной навески 10 мг авермектина В<sub>1</sub> в этиловом спирте в мерных колбе объемом 100 см<sup>3</sup>. Раствор хранят не более 2-х месяцев в холодильнике.



9.1.2. Стандартный раствор № 2 авермектина  $B_1$  с концентрацией авермектина  $B_{1a}$  3,52 мкг/см<sup>3</sup> готовят путем разведения 4 см<sup>3</sup> стандартного раствора № 1 в мерной колбе на 100 см<sup>3</sup> этиловым спиртом. Раствор хранят не более 2-х недель в холодильнике.

9.1.3. Раствор элюента готовят смешиванием в мерном цилиндре 98 см<sup>3</sup> метилового спирта и 2 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Непосредственно перед измерением раствор фильтруют с помощью набора для фильтрации.

9.1.4. Реакционную смесь готовят из трифторуксусного ангидрида и ацетонитрила в соотношении 1:2 и помещают ее в холодильник при 0°C (смесь готовят в день работы и не хранят).

## 9.2. Подготовка прибора

Общую подготовку прибора осуществляют согласно инструкции по эксплуатации.

## 9.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика авермектина  $B_{1a}$  (в условных единицах) от количества массы (мкг) авермектина  $B_{1a}$  в хроматографируемом объеме пробы, устанавливают по методу абсолютной градуировки с использованием градуировочных растворов, которые готовят согласно табл.2.

Градуировочные растворы устойчивы в течение недели при хранении в холодильнике.

Таблица 2

Растворы для установления градуировочной характеристики при определении концентрации авермектина  $B_{1a}$

№	Стандартный раствор № 2 авермектина $B_{1a}$ , см <sup>3</sup>	Этиловый спирт, см <sup>3</sup>	Концентрация вещества, мкг/см <sup>3</sup>	Содержание вещества в хроматографируемом объеме пробы, мкг
1	0	25	0	0
2	1,0	24,5	0,141	0,0040
3	1,5	23,5	0,211	0,0060
4	2,5	22,5	0,352	0,0102
5	5,0	20,0	0,704	0,0201
6	10,0	15,0	1,408	0,0404
7	20,0	5,0	2,816	0,0804

Для построения градуировочного графика отбирают по 2,0 см<sup>3</sup> каждого градуировочного раствора, помещают в центрифужные пробирки и упаривают досуха на вакуумном испарителе. В каждую пробирку с сухим остатком вносят по 0,5 см<sup>3</sup> ацетонитрила, пробирку энергично встряхивают и обрабатывают ультразвуком в течение 30 с. Затем пробирку повторно встряхивают и повторно обрабатывают ультразвуком. В каждую пробирку вносят по 0,05 см<sup>3</sup> 1-метилимидазола. Пробирку закрывают, тщательно перемешивают содержимое в течение 5-10 с, обрабатывают ультразвуком, центрифугируют и помещают в холодильник при 0°C на 10 минут. После охлаждения в пробирку с образцом вносят 0,15 см<sup>3</sup> охлажденной реакционной смеси. Пробирку закрывают и выдерживают в холодильнике в течение 1 часа. Общий объем раствора пробы после проведения реакции - 0,7 см<sup>3</sup>.

Растворы помещают в пробоотборное устройство хроматографа. Условия хроматографирования градуировочных смесей и анализируемых проб:

состав элюента

метиловый спирт : дистиллированная вода, 98:2

скорость потока элюента

2,0 см<sup>3</sup>/мин

объем вводимой пробы	10 мм <sup>3</sup>
длины волн флуоресцентного детектора	365/470 нм

Время удерживания авермектина	$V_{1a}$	9,7 мин
	$V_{1a}$	12,2 мин

На полученной хроматограмме измеряют площадь пика с помощью интегратора хроматографа (в условных единицах) при анализе 6-и растворов разных концентраций и растворителя, проводя не менее 5-и параллельных определений для каждого раствора, и строят градуировочную кривую зависимости площади пика авермектина  $V_{1a}$  от количества компонента в пробе (в мкг).

Проверку градуировочного графика проводят при изменении условий анализа, но не реже 1 раза в неделю.

#### 9.4. Отбор проб воздуха

Воздух с объемным расходом 20 дм<sup>3</sup>/мин аспирируют через фильтр АФА ВП-20. Для измерения ½ ПДК достаточно отобрать 140 дм<sup>3</sup>. Пробы можно хранить не более десяти суток в защищенном от света месте.

Отбор проб сопровождается составлением акта отбора, с указанием, при какой температуре и давлении он проводился.

#### 10. Выполнение измерений

Фильтр с отобранной пробой помещают в бюкс и приливают пипеткой 10 см<sup>3</sup> раствора этанола. Периодически встряхивая, выдерживают раствор в течение 10 мин. Экстракт фильтруют через воронку с пористой пластинкой №1 или №2 и сливают в пробирку с притертой пробкой. Степень экстракции с фильтра 93 %. Отбирают 2 см<sup>3</sup> раствора, помещают в центрифужную пробирку и упаривают досуха. Далее проводят химическую трансформацию и хроматографический анализ, аналогично тому, как описано в п. 9.3 для градуировочных растворов. Количественное определение содержания анализируемого авермектина  $V_{1a}$  в растворе проводят по предварительно построенному градуировочному графику.

#### 11. Вычисление результатов измерений

Концентрацию аверсектина  $C$  "С" (в мг/м<sup>3</sup>) в воздухе вычисляют по формуле:

$$C = \frac{a \cdot V \cdot \Gamma}{K \cdot b \cdot V \cdot d}, \text{ где}$$

$a$  – содержание вещества в хроматографируемом объеме пробы, найденное по градуировочному графику, мкг;

$b$  – объем пробы, взятый для хроматографирования, см<sup>3</sup>;

$v$  – общий объем раствора пробы после проведения химической реакции, см<sup>3</sup>;

$\Gamma$  – объем жидкой пробы после экстракции с фильтра, см<sup>3</sup>;

$d$  – объем жидкой пробы, взятый для упаривания, см<sup>3</sup>;

$V$  – объем воздуха, отобранный для анализа и проведенный к стандартным условиям, дм<sup>3</sup> (см. Приложение 1);

$K = 0,4$  - массовая доля авермектина  $V_{1a}$  в аверсектине  $C$  согласно ТУ 9383-009-17266133-

## 12. Оформление результатов анализа

Результат количественного анализа представляют в виде  $C \pm \Delta \text{ мг/м}^3$ ,  $P=0,95$ , где  $\Delta$ -характеристика погрешности,  $\Delta = 0,20C+0,0006$ .

## 13. Контроль погрешности измерений

Значения характеристики погрешности, норматива оперативного контроля погрешности и норматива оперативного контроля воспроизводимости приведены в табл.3 в виде зависимости от значения массовой концентрации анализируемого компонента в пробе  $C$ .

Таблица 3. Результаты метрологической аттестации методики количественного химического анализа аверсектина  $C$ .

Диапазон определяемых концентраций аверсектина $C$ , $\text{мг/м}^3$	Наименование метрологической характеристики		
	Характеристика погрешности $\Delta$ , $\text{мг/м}^3$ ; $P=0,95$	Норматив оперативного контроля точности $K$ , $\text{мг/м}^3$ ; $P=0,90$ , $m=2$	Норматив оперативного контроля воспроизводимости $D$ , $\text{мг/м}^3$ ; $P=0,95$ , $m=2$
От 0,025 до 0,5	$0,20C+0,0006$	$0,21C+0,0007$	$0,12C + 0,0013$

### 13.1. Оперативный контроль воспроизводимости.

Оперативный контроль воспроизводимости выполняют в одной серии с анализом рабочих проб. Отбирают реальные пробы воздуха из одного традиционного места отбора двумя пробоотборниками одновременно. Анализируют в соответствии с прописью методики, привлекая различных исполнителей и максимально варьируя условия проведения анализа (партии реактивов, набора мерной посуды и т.д.), и получают два результата  $C_1$  и  $C_2$  анализов. Результаты не должны отличаться друг от друга на величину большую, чем норматив оперативного контроля воспроизводимости  $D$ :

$$|C_1 - C_2| \leq D$$

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.

Внутренний оперативный контроль воспроизводимости проводят не реже, чем 1 раз в неделю.

### 13.2. Оперативный контроль точности.

Оперативный контроль точности выполняют в одной серии с анализом рабочих проб. Отбирают реальные пробы воздуха из одного традиционного места отбора двумя пробоотборниками одновременно. Затем к одной пробе, отобранной на фильтр, делают добавку анализируемого компонента  $\delta C$  из раствора, нанося его на фильтр. Результаты анализа  $C_1$  без добавки и  $C_2$  с добавкой получают по возможности в одинаковых условиях: одним аналитиком, с одной партией реактивов, с одним набором посуды и т.д. Величина

добавки  $\delta C$  должна соответствовать 50 – 150 % от содержания компонента в пробе, а величина  $C_2$  не должна выходить за верхнюю границу диапазона измерения. Погрешность процедуры отбора проб контролируют путем проверки используемых пробоотборников. Расчет норматива оперативного контроля погрешности  $K$  проводят по

характеристике погрешности методики за вычетом характеристики погрешности пробоотборника. Решение об удовлетворительной погрешности принимают при выполнении условия:

$$| C_2 - C_1 - \delta C | \leq K$$

#### **14. Нормы затрат времени на анализ.**

Для проведения серии анализов из 6-и проб при последовательном проведении анализов воздуха требуется 9 часов.

Тиражировано Издательским отделом Федерального центра  
госсанэпиднадзора Минздрава России  
Тираж 300 экз.