

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный  
врач Российской Федерации,  
Первый заместитель Министра здраво-  
охранения 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<sup>3</sup>.

#### **2. Характеристика вещества**

##### **2.1. Общая характеристика вещества.**

β-глюканазу получают путем микробиологического синтеза с использованием штамма-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<sup>3</sup>.

### 3. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений массовых концентраций  $\beta$ -глюканазы с погрешностью, не превышающей  $\pm 24\%$ , при доверительной вероятности 0,95.

### 4. Метод измерений

Измерение массовой концентрации  $\beta$ -глюканазы выполняется методом фотометрии.

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

За единицу активности (ЕД) принята способность  $\beta$ -глюканазы в стандартных условиях ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 6,5) катализировать гидролиз  $\beta$ -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  $\beta$ -глюканазы в анализируемой пробе ( $0,1\text{ см}^3$ ) — 5,0 мкг.

Нижний предел измерения концентрации  $\beta$ -глюканазы в воздухе при отборе  $500\text{ дм}^3$  —  $1,0\text{ мг/м}^3$ .

Определению не мешает наличие в воздухе ксиланазы, фитолиазы,  $\alpha$ -амилазы.

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

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

Колориметр фотоэлектрический КФК-2; интервал длии волн 630—670 нм, погрешность 0,01 Д ТУ 3-3,1766—82

Весы лабораторные аналитические ВЛА-200,

погрешность  $\pm 0,2\text{ мг}$  ГОСТ 24104—88Е

Баня водяная, до  $(100 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  ТУ 64-1-2850—76

Ультратермостат  $(50,0 \pm 0,2)\text{ }^{\circ}\text{C}$  ГОСТ 20790—75

Центрифуга ЦЛК-1, 7 000 об./мин ГОСТ 375-4166

pH-метр-милливольтметр лабораторный pH-121,  $(0—14) \pm 0,1$  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  $^{\circ}\text{C}$  ГОСТ 16317—76

## МУК 4.1.1624—03

Шкаф сушильный 2В-151, $(105 \pm 1)^\circ\text{C}$	ТУ-64-1-1411—72
Мешалка магнитная ММ5, 700—800 об./мин	ТУ-25.11.834—80
Термостат суховоздушный ТС-80, 20—100 °C	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 $\text{cm}^3$	ГОСТ 1770—74Е
Пробирки П-4-15-180 ХС или П 1-16-150 ХС	ГОСТ 25336—82Е
Пипетки измерительные 1, 2, 5, 10 $\text{cm}^3$	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 $\text{dm}^3/\text{мин}$	ТУ 64-1-862—82

### 5.2. Реактивы

$\beta$ -глюканаза, активность $(2\ 000 \pm 44)$ ЕД/г	ТУ 9291-02-512472—02
$\beta$ -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  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ , 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 $\beta$ -глюканазы, 2 г/дм<sup>3</sup>

В коническую колбу вместимостью 500 см<sup>3</sup> наливают 200—250 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и ставят ее на магнитную мешалку. Затем аккуратно вносят 1,00 г  $\beta$ -глюканазы. Перемешивание продолжают в течение 15 мин. Затем раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 500 см<sup>3</sup>, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и центрифицируют 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  $\beta$ -глюкана (субстрат), 5 мг/см<sup>3</sup>*

В коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> наливают около 70 см<sup>3</sup> фосфатного буферного раствора (рН 6,5) при перемешивании его на магнитной мешалке, вносят 0,5 г  $\beta$ -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  $\beta$ -глюкана не более 20 мин. Далее субстрат охлаждают до комнатной температуры, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводят объем до метки буферным раствором и центрифицируют 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<sup>3</sup> наливают около 70 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup>*

Навеску 2,39 г натрия фосфорно-кислого двузамещенного 12-водного помещают в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup>*

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

Раствор хранят в холодильнике до одного месяца.

*9.1.6. Приготовление фосфатного буферного раствора, рН 6,5*

Смешивают приготовленные растворы калия и натрия фосфорно-кислого концентрацией 1/15 моль/дм<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> дистиллированной воды 24,0 г натрия углекислого и 12 г калия-натрия винно-кислого, затем добавляют 40 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> в мерной колбe.

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<sup>3</sup> дистиллированной воды 25,0 г молибденово-кислого аммония в мерной колбе вместимостью 500 см<sup>3</sup> при постоянном перемешивании, добавляют сначала 21,0 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты и затем 3,0 г мышьяково-кислого натрия, предварительно растворенного в 25 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Объем полученного раствора доводят до метки дистиллированной водой и выдерживают в термостате при 36—40 °C 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<sup>3</sup> помещают 2,7 г бензойной кислоты, приливают 700 см<sup>3</sup> 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 °C) 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  $\beta$ -глюканазы в соответствии с табл. 1.

Таблица 1  
Приготовление растворов  $\beta$ -глюканазы для определения градуировочной характеристики

№ градуировочного раствора	Объем стандартного раствора $\beta$ -глюканазы (2 мг/см <sup>3</sup> ), см <sup>3</sup>	Объем разбавляющего раствора бензойной кислоты, см <sup>3</sup>	Содержание $\beta$ -глюканазы в объеме пробы (0,1 см <sup>3</sup> ), 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 цокалы наливают по 0,9 см<sup>3</sup> субстрата, предварительно термостатированного при температуре 50 °C в течение 10 мин. Затем добавляют по 0,1 см<sup>3</sup> каждого градуировочного раствора  $\beta$ -глюканазы, включая раствор, не содержащий  $\beta$ -глюканазу (раствор № 1 по табл. 1). Градуировочные растворы также предварительно термостатируют при 50 °C в течение 10 мин.

Через 10 мин во все пробирки вносят по 1 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> реактива Нельсона и по 7 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и выдерживают в течение 10 мин для развития окраски.

Измеряют оптическую плотность растворов при длине волн 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—0,86D.

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  $\text{дм}^3/\text{мин}$  аспирируют в течение 25 мин через фильтр АФА-ВП-10, помещенный в фильтродержатель. Для определения  $\frac{1}{2}$  ОБУВ  $\beta$ -глюканазы следует отобрать 500  $\text{дм}^3$  воздуха.

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

### **10. Выполнение измерения**

#### *10.1. Экстракция $\beta$ -глюканазы с фильтра*

Фильтр с отобранный пробой переносят в стаканчик, приливают в нее 5  $\text{см}^3$  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  $\text{см}^3$  раствора бензойной кислоты. Затем фильтр тщательно отжимают и удаляют. Растворы сливают в одну пробирку. Таким образом получают 10  $\text{см}^3$  элюата  $\beta$ -глюканазы.

Степень десорбции  $\beta$ -глюканазы с фильтра ( $K_o$ ) равняется 93 %.

#### *10.2. Проведение анализа*

Анализ 0,1  $\text{см}^3$  элюата на содержание  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -глюканазы.

## 11. Расчет концентрации $\beta$ -глюканазы в воздухе

Концентрацию  $\beta$ -глюканазы в воздухе ( $C$ ,  $\text{мг}/\text{м}^3$ ) вычисляют по формуле:

$$C = \frac{a \cdot b}{b \cdot V}, (\text{мг}/\text{м}^3), \text{ где}$$

$a$  – содержание  $\beta$ -глюканазы, определенное в объеме пробы, взятой для анализа,  $\text{мкг}$ ;

$b$  – общий объем пробы,  $\text{см}^3$ ;

$b$  – объем пробы, взятой для анализа,  $\text{см}^3$ ;

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

## 12. Оформление результатов анализа

Результат количественного анализа представляют в виде  $(C \pm C \cdot \Delta/100) \text{ мг}/\text{м}^3$ ,  $P = 0,95$ , где  $\Delta$  – 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 $\beta$ -глюканазы, $\text{мг}/\text{м}^3$	Характеристика погрешности $\Delta, \%$ ( $P = 0,95$ )	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  $C$ ,

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 погрешности 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),  $\text{мг}/\text{м}^3$ ;

$X$  – измеренное содержание (концентрация) анализируемого вещества,  $\text{мг}/\text{м}^3$ ;

$K$  – 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 Российской государственным медицинским университетом (А. В. Лиманцев).