

**ИНФОРМАЦИОННО-ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ГОСКОМСАН-
ЭПИДНАДЗОРА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ИЗМЕРЕНИЮ КОНЦЕНТРАЦИЙ
ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ**

Выпуск 23/1



УТВЕРЖДЕНО
Заместителем Главного
государственного
санитарного врача СССР
А.И.Заиченко
"12" декабря 1988г.
N 4802-88

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по фотометрическому измерению концентраций
липазы микробной в воздухе рабочей зоны

Липаза микробная является ферментным препаратом, предназначенным для расщепления жиров, применяется в медицине, в меховой, кожевенной промышленности, в животноводстве, и других отраслях народного хозяйства.

Липаза микробная — мелкий порошок светло-коричневого цвета и легким дрожжевым запахом, растворим в воде, в солевых растворах (в частности, фосфатном буфере), не растворим в большинстве органических растворителях.

В воздухе находится в виде аэрозоля.

Ферментный препарат липаза микробная раздражает слизистые оболочки верхних дыхательных путей и легких, обладает аллергенным действием.

ПДК в воздухе 1 мг/м³.

Характеристика метода

Метод основан на фотометрическом определении цветного комплекса меди, образуемого свободными жирными кислотами, которые выделяются в результате гидролитического действия липазы, с диэтилдитиокарбаматом.

Отбор проб производится с концентрированием на фильтр.

Нижний предел измерения содержания жирной кислоты 1 мкг/мл в фотометрируемом растворе.

Нижний предел измерения липазы в воздухе 0,3 мг/м³ (при отборе 4 л воздуха).

Диапазон измеряемых концентраций липазы в воздухе от 0,3 до 3,7 мг/м³.

Измерению не мешают белковые вещества и фосфорнокислые соли.

Суммарная погрешность измерения не превышает 25%.

Время выполнения измерения, включая отбор проб, 1 час 30 мин.

Приборы, аппаратура, посуда

Спектрофотометр.

Аспирационное устройство.

Фильтродержатели, ТУ 95.72.05-77.

pH-метр типа ионометра ЭВ-74.

Размельчитель тканей РТ-2, ТУ 64-1-1305-79.

Аппарат инактивации сыворотки АИС, ТУ 64-1-1091-77 или лабораторная водяная баня.

Колбы конические, ГОСТ 10394-72, вместимостью 1000 мл.

Бюретка, ГОСТ 20292-74, вместимостью 25 мл.

Мерные колбы, ГОСТ 1770-74, вместимостью от 25 до 1000 мм.

Пипетки, ГОСТ 20292-74, вместимостью 1 и 5 мл.

Цилиндры мерные, ГОСТ 1770-74, вместимостью 100 мл.

Бюксы, ГОСТ 25336-82, вместимостью 2-5 мл.

Пробирки с пришлифованными пробками, ГОСТ 10515-75, вместимостью 15 мл.

Стаканы химические, ГОСТ 25336-82, вместимостью 50; 100; 250 мл.

Реактивы, растворы и материалы

Липаза микробная.

Оливковое масло, ГОСТ 7580-55.

Спирт поливиниловый (ПВС0, ТУ 64-5-51-79, 2% водный р-р.
Натрий фосфорнокислый двухзамещенный, ГОСТ 4172-76, 1/15
М раствор (А).

Калий фосфорнокислый однозамещенный, ГОСТ 4198-75, 1/15
М раствор (Б).

Фосфатный буфер, 1/15 М раствор с рН 7,8. Готовят смешива-
нием растворов А и Б в соотношении 91,5 : 8,5. Величину рН
проверяют на рН-метре.

Хлороформ, ГОСТ 215-74, хч.

Гептан, ГОСТ 5.395-78, хч.

Раствор экстракционный: готовят путем смешивания хлорофор-
ма и гептана 3:2.

Уксусная кислота, ледяная, ГОСТ 6175, 1 М раствор.

Медь азотнокислая трехводная, ГОСТ 4163-68, чда.

Натрий хлористый, ГОСТ 4233-77, хч.

Триэтанолламин, ТУ 6-09-2448-72, ч.

Бутанол, ГОСТ 6006-78, чда.

Натрия N,N-диэтилдитиокарбамат, ГОСТ 8864-71, ч.

Реагент меди: готовят в мерной колбе на 200 мл, для этого к
10 мл 1 М раствора уксусной кислоты добавляют 12 мл триэтанол-
ламина, 4,75 г меди азотнокислой и 100 мл воды, растворяют,
добавляют 57 г хлористого натрия и 50 мл воды, затем 1 М ук-
сусной кислотой устанавливают рН-8,1 и доводят до метки водой.
Устойчив реагент месяц (до образования зеленого осадка).

Цветной реагент: в мерной колбе на 100 мл растворяют 100
мл натрия N,N-диэтилдитиокарбамата в 60 мл бутанола и доводят
до метки хлороформом. Сохраняется при хранении в холодильнике
в течение 2-х недель.

Эмульсия оливкового масла; готовят перемешиванием 40 мл
оливкового масла с 60 мл 2% раствора ПВС в дистиллированной
воде в стакане микроизмельчителя тканей при 3000 об/мин в те-
чение 30-40 минут. Эмульсия готовится перед употреблением.

Пальмитиновая кислота, МРТУ 6-09-5841-69. Для стандарта
возможно также применение олеиновой кислоты.

Стандартный раствор N 1 с концентрацией 1,5 мг/мл пальми-
тиновой кислоты готовят растворением кислоты в экстракционном
растворе в мерной колбе на 50 мл. Раствор устойчив при хране-
нии в холодильнике в течение недели.

Стандартный раствор N 2 и 3 с концентрацией 100 мкг/мл и 10 мкг/мл готовят путем соответствующего разбавления раствора N 1 экстракционным раствором. Готовят перед употреблением. Фильтры АФА-ХА-20 или АФА-ХА-10.

Отбор пробы воздуха

Воздух с объемным раствором 1 л/мин аспирируют через фильтр АФА-ХА, укрепленный в фильтродержателе.

Для определения 1/2 ПДК достаточно отобрать 2,5 л воздуха.

Пробы устойчивы длительное время.

Подготовка к измерению

Градуировочные растворы готовят в пробирках, согласно таблице 12.

Таблица 12

N стандарта	Стандартный раствор N 3,	Экстракционный раствор, мл	Концентрация пальмитиновой кислоты, мкг/мл
1	0,0	5,0	0
2	0,5	4,5	1
3	1,0	4,0	2
4	2,0	3,0	4
5	3,0	2,0	6
6	4,0	1,0	8
7	5,0	0,0	10

Во все пробирки с градуировочными растворами добавляют 0,5 мл насыщенного раствора натрия бромистого и 2,5 мл реагента меди. Пробирки закрывают и встряхивают при 1500 об/мин. По 3,5 мл органического слоя переносят в пробирки с 0,4 мл цветного реагента. Перемешивают и через 5-10 минут измеряют оптичес-

скую плотность при длине волны 440 нм. Измерение проводят в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм по отношению к раствору сравнения, не содержащего определяемого вещества (раствор N 1 по таблице). Окраска растворов устойчива 3 часа.

Строят градуировочный график зависимости значений оптических плотностей от соответствующих им концентраций жирной кислоты в градуировочном растворе (мкг/мл).

Проверка градуировочного графика проводится в случае использования новой партии реактивов, но не реже 1 раза в квартал.

Проведение измерения

Фильтр с отобранной пробой переносят в химический стакан, добавляют 5 мл фосфатного буфера и перемешивают интенсивно в течение 10 мин стеклянной палочкой или на магнитной мешалке. В пробирки вносят 1 мл эмульсии оливкового масла и 8-10 минут выдерживают в водяной бане при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, затем не вынимая добавляют в каждую пробирку по 0,5 мл раствора фермента (пробы), перемешивают и оставляют при 37°C на 1 час (точно) для проведения липолиза. По истечении этого времени в каждую пробирку добавляют 5 мл экстракционного раствора из бюретки и интенсивно встряхивают в течение 3 минут.

Определение содержания образовавшейся жирной кислоты проводят аналогично градуировочным растворам. Раствором сравнения служит эмульсия с добавлением фосфатного буфера, которым обработан чистый фильтр. Остальные реактивы добавляют в том же количестве, как при анализе проб. Концентрацию жирной кислоты находят по графику.

Расчет концентрации

Концентрацию липазы микробной (С) в воздухе (в мг/м³) вычисляют по формуле:

$$C = [(a * V_1 * V_2) / (M * A * B_3 * V)] * 1000, \text{ где}$$

a — концентрация жирной кислоты в анализируемом растворе, найденная по графику, мкг/мл;

V_1 — общий объем раствора для экстракции жирных кислот, мл;

V_2 — общий объем раствора пробы с ферментом, мл;

B_3 — объем раствора пробы с липазой, взятый для инкубирования, мл;

V — объем воздуха, отобранный для анализа и приведенный к стандартным условиям, л (см. Приложение 1);

1000 — коэффициент пересчета на 1 м^3 ;

M — молекулярная масса жирной кислоты;

A — липолитическая активность липазы, ЛЕ/мг, ч. Единице липолитической активности (ЛЕ) соответствует такое количество фермента, которое освобождает 1 мкмоль жирной кислоты в течение часа при 37°C . Или это количество микроэквивалентов жирной кислоты, выделяющихся в результате гидролитического действия 1 мг фермента липазы. Использована липаза с активностью 200000 ЛЕ/гч (200 ЛЕ/мг ч).

Пояснение к формуле расчета:

$(a * V_1)/M$ — количество мкмоль жирной кислоты в градуировочном растворе. Так как 200 мкэквив. жирной кислоты дает 1 мг липазы, то $(a * V_1) / M$ мкэквивалентов дает

$A = a/V_1/M * 2000$ мг липазы.

Эти A мг липазы содержит $B_3 = 0,5$ мл пробы, объем всей пробы фермента $V_2 = 5$ мл.

$V/1000$ количество м^3 воздуха, отобранного для анализа.

Приложение 1

Приведение объема воздуха к стандартным условиям проводят по следующей формуле:

$$V_{20} = [V * (273 + 20) * P] / [(273 + t^{\circ}) * 101,33], \text{ где}$$

V — объем воздуха, отобранный для анализа, л;

P — барметрическое давление, кПа (101,33 кПа = 760 мм рт. ст.)

t — температура воздуха в месте отбора пробы, °С.

Для удобства расчета V_{20} следует пользоваться таблицей коэффициентов (приложение 2). Для приведения воздуха к стандартным условиям надо умножить V на соответствующий коэффициент.

Коэффициент К для приведения объема воздуха к стандартным условиям

°C	Давление P, кПа (мм рт. ст.)				
	97,33 (730)	97,86 (734)	98,4 (738)	98,93 (742)	99,46 (746)
-30	1,1582	1,1646	1,1709	1,1772	1,1836
-26	1,1393	1,1456	1,1519	1,1581	1,1644
-22	1,1212	1,1274	1,1336	1,1396	1,1458
-18	1,1036	1,1097	1,1159	1,1218	1,1278
-14	1,0866	1,0926	1,0986	1,1045	1,1105
-10	1,0701	1,0760	1,0819	1,0877	1,0936
-06	1,0640	1,0599	1,0657	1,0714	1,0772
-02	1,0385	1,0442	1,0499	1,0556	1,0613
0	1,0309	1,0366	1,0423	1,0477	1,0535
+02	1,0234	1,0291	1,0347	1,0402	1,0459
+06	1,0087	1,0143	1,0198	1,0253	1,0309
+10	0,9944	0,9990	1,0054	1,0108	1,0162
+14	0,9806	0,9860	0,9914	0,9967	1,0027
+18	0,9671	0,9725	0,9778	0,9880	0,9884
+20	0,9605	0,9658	0,9711	0,9783	0,9816
+22	0,9539	0,9592	0,9645	0,9696	0,9749
+24	0,9475	0,9527	0,9579	0,9631	0,9683
+26	0,9412	0,9464	0,9516	0,9566	0,9618
+28	0,9349	0,9401	0,9453	0,9503	0,9555
+30	0,9288	0,9339	0,9391	0,9440	0,9432
+34	0,9167	0,9218	0,9268	0,9318	0,9368
+38	0,9049	0,9099	0,9149	0,9198	0,9248

Приложение 2 (продолжение)

°С	Давление P, кПа (мм рт. ст.)				
	100 (750)	100,53 (754)	101,06 (758)	101,33 (760)	101,86 (764)
-30	1,1899	1,1963	1,2026	1,2058	1,2122
-26	1,1705	1,1763	1,1831	1,1862	1,1925
-22	1,1519	1,1581	1,1643	1,1673	1,1735
-18	1,1338	1,1399	1,1460	1,1490	1,1551
-14	1,1164	1,1224	1,1284	1,1313	1,1373
-10	1,0994	1,1053	1,1112	1,1141	1,1200
-06	1,0829	1,0887	1,0945	1,0974	1,1032
-02	1,0669	1,0726	1,0784	1,0812	1,0869
0	1,0591	1,0648	1,0705	1,0733	1,0789
+02	1,0514	1,0571	1,0627	1,0655	1,0712
+06	1,0363	1,0419	1,0475	1,0502	1,0557
+10	1,0216	1,0272	1,0326	1,0353	1,0407
+14	1,0074	1,0128	1,0183	1,0209	1,0263
+18	0,9936	0,9989	1,0043	1,0069	1,0122
+20	0,9868	0,9921	0,9974	1,0000	1,0053
+22	0,9800	0,9853	0,9906	0,9932	0,9985
+24	0,9735	0,9787	0,9839	0,9865	0,9917
+26	0,9669	0,9721	0,9773	0,9755	0,9851
+28	0,9605	0,9657	0,9708	0,9734	0,9785
+30	0,9542	0,9594	0,9646	0,9670	0,9723
+34	0,9418	0,9468	0,9519	0,9544	0,9595
+38	0,9297	0,9347	0,9397	0,9421	0,9471