

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Спектрофотометрическое определение  
субтилизина (протеазы) в атмосферном воздухе**

**Методические указания  
МУК 4.1.1959—03**

ББК 51.21  
С79

С79 **Спектрофотометрическое определение субтилизина (протеазы) в атмосферном воздухе: Методические указания.**— М.: **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006.**—9 с.

ISBN 5—7508—0656—1

1. Разработаны ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им А Н Сысина РАМН (к х н. А А Беззубовым) и НИЦ «ЭКОС» (В А Смирновым)

2 Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г Г. Онищенко 21 апреля 2005 г

3 Введены в действие с 1 июля 2005 г

4 Введены впервые

ISBN 5—7508—0656—1

© Роспотребнадзор, 2006

© **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006**

**УТВЕРЖДАЮ**

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека,  
Главный государственный санитарный  
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

21 апреля 2005 г.

Дата введения: 1 июля 2005 г

**4.1 МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Спектрофотометрическое определение субтилизина  
(протеазы) в атмосферном воздухе**

**Методические указания  
МУК 4.1.1959—05**

---

**1. Область применения**

Настоящие методические указания устанавливают количественный спектрофотометрический анализ атмосферного воздуха для определения в нем субтилизина (протеазы) в диапазоне концентраций 0,005—0,05 мг/м<sup>3</sup>.

Методические указания предназначены для использования лабораториями центров гигиены и эпидемиологии при осуществлении аналитического контроля химического загрязнения атмосферного воздуха в районе расположения производства субтилизина (протеазы), производственными лабораториями предприятий, научно-исследовательскими институтами, работающими в области гигиены окружающей среды.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ГОСТ Р 8.563—96 «Методика выполнения измерений», ГОСТ 17.2.4.02-81 «Охрана природы. Атмосфера. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ».

Методические указания одобрены и рекомендованы к практическому применению на бюро секции по физико-химическим методам исследования объектов окружающей среды Проблемной комиссии «Научные основы экологии человека и гигиены окружающей среды» и бюро Комиссии по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

## 2. Физико-химические и токсикологические свойства

Субтилизин (протеаза) является ферментом класса гидролаз и катализирует гидролиз белков и пептидов, а также сложных эфиров и амидов N-защищенных аминокислот. Продуцируется *Bacillus subtilis* и родственными бактериями. Молекулярная масса более 27000. Выпускается в виде гранул кремового цвета со слабым запахом. Растворим в воде и растворах щелочей. Применяется в химической промышленности, в частности, как добавка к синтетическим моющим средствам.

Субтилизин (протеаза) обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки глаз, является аллергеном. В атмосферном воздухе находится в виде аэрозоля. ОБУВ протеазы щелочной – 0,01 мг/м<sup>3</sup>

## 3. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью, не превышающей  $\pm 21$  %. При доверительной вероятности 0,95.

## 4. Метод измерений

Измерение концентраций субтилизина (протеазы) основано на улавливании его из воздуха и концентрировании на фильтре с последующей десорбцией 2Н раствором гидроксида натрия, реакции образования окрашенного комплекса с солью меди (метод Лоури) и последующем спектрофотометрировании при длине волны 650 нм.

Нижний предел измерения содержания субтилизина (протеазы) в анализируемом объеме пробы – 10 мкг.

Измерению мешают фенол, тимол, сульфосалицил, а также белки.

## 5. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы.

### 5.1. Средства измерений

Спектрофотометр СФ-46 или

аналогичный прибор

Весы аналитические ВЛА-200

Меры массы

Колбы мерные, вместимостью 25, 100 и 1 000 см<sup>3</sup>

Пипетки, вместимостью 1, 2, 5 и 10 см<sup>3</sup>

Бюксы, вместимостью 25 см<sup>3</sup>

Пробирки колориметрические с притертыми

пробками, вместимостью 20 см<sup>3</sup>

ГОСТ 24104—01

ГОСТ 7328—01

ГОСТ 1770—74Е

ГОСТ 29196—91

ГОСТ 25336—83Е

ГОСТ 25336—82Е

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| Барометр-анероид М-67                | ТУ 2504-1797—75 |
| Термометр лабораторный шкальный ТЛ-2 | ГОСТ 215—73Е    |
| Секундомер                           | ГОСТ 5072—79    |
| Электроаспиратор марки 822           | ГОСТ 2.6.01—86  |

### 5.2. Вспомогательные устройства

|   |                 |
|---|-----------------|
| Фильтродержатель с металлической сеткой | ТУ 6-09-1706—77 |
| Баня водяная                            | ТУ 64-1-2850—76 |
| Дистиллятор                             | ТУ 61-1-721—79  |

### 5.3. Материалы

|                  |              |
|------------------|--------------|
| Фильтр АФА-ХА-20 | ТУ 95-743—80 |
|------------------|--------------|

### 5.4. Реактивы

|   |               |
|---|---------------|
| Протеаза с содержанием основного вещества не менее 95 % | СП 23701—81   |
| Гидроксид натрия, хч                                    | ГОСТ 4328—77  |
| Кислота соляная, хч                                     | ГОСТ 4461—77  |
| Натрий углекислый, хч                                   | ГОСТ 84—76    |
| Калий-натрий тартрат, хч                                | ГОСТ 5845—70  |
| Медь серно-кислая, хч                                   | ГОСТ 4165—78  |
| Натрий вольфрамово-кислый, хч                           | ГОСТ 18289—76 |
| Натрий молибденово-кислый, хч                           | ГОСТ 10931—74 |
| Литий серно-кислый, хч                                  | ГОСТ 10563—76 |
| Кислота ортофосфорная, хч                               | ГОСТ 10678—76 |
| Бром  |               |
| Фенолфталеин  |               |

## 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 выполнении измерений концентраций субтилизина (протеазы) с использованием спектрофотометра СФ-46 и электроаспиратора следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкциями по эксплуатации приборов.

## 7. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке их результатов на спектрофотометре и электроаспираторе допускаются лица, знающие устройство и правила эксплуатации приборов.

## 8. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

8.1. Процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ , атмосферном давлении 630—800 мм рт. ст. и влажности воздуха не более 80 %.

8.2. Выполнение измерений на спектрофотометре СФ-46 проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору и настоящими методическими указаниями.

## 9. Подготовка к выполнению измерений и проведение измерений

Перед выполнением измерений проводят следующие работы: приготовление реактивов, подготовка спектрофотометра к работе, установление градуировочной характеристики, отбор проб

### 9.1. Приготовление растворов

*Исходный раствор протеазы для градуировки* ( $c = 1 \text{ мг/см}^3$ ) В мерную колбу емкостью  $25 \text{ см}^3$  вносят 26,3 мг (95 % основного вещества), доводят 2Н раствором гидроксида натрия до метки и тщательно перемешивают. Срок хранения исходного раствора 6 часов.

*Рабочий раствор протеазы для градуировки* ( $c = 100 \text{ мкг/см}^3$ ). В мерную колбу емкостью  $25 \text{ см}^3$  помещают  $2,5 \text{ см}^3$  исходного раствора, доводят 2Н раствором гидроксида натрия до метки и тщательно перемешивают. Срок хранения рабочего раствора 6 часов.

*0,1 Н раствор гидроксида натрия* В колбу емкостью  $1\,000 \text{ см}^3$  помещают 4,0 г гидроксида натрия, приливают дистиллированную воду до метки и тщательно перемешивают до полного растворения.

*2 Н раствор гидроксида натрия*. В колбу емкостью  $1\,000 \text{ см}^3$  помещают 80,0 г гидроксида натрия, приливают дистиллированную воду до метки и тщательно перемешивают до полного растворения.

*Рабочий раствор № 1*. В колбу емкостью  $100 \text{ см}^3$  помещают 10,0 г углекислого натрия, 0,2 г калий-натрий тартрата, 0,05 г серно-кислой меди, приливают дистиллированную воду до метки и тщательно перемешивают.

*Исходный раствор реактива Фолина*. В круглодонную колбу емкостью  $1\,000 \text{ см}^3$  помещают 50,0 г натрия вольфрамово-кислого, 12,5 г натрия молибденово-кислого, добавляют  $360 \text{ см}^3$  дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения реактивов. К полученному раствору добавляют  $25 \text{ см}^3$  85 % раствора ортофосфорной кисло-

ты, 50 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты и смесь кипятят в течение 10 ч с обратным холодильником. Затем добавляют 76 г лития серно-кислого, 25 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 3 капли брома. Кипятят под тягой без обратного холодильника для удаления остатка брома. Охлаждают до комнатной температуры и доводят дистиллированной водой до объема 500 см<sup>3</sup>, перемешивают и фильтруют. Из фильтрата отбирают 1 см<sup>3</sup>, добавляют 9 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и титруют 0,1 н раствором гидроксида натрия по фенолфталеину. Реактив Фолина с установленным титром доводят дистиллированной водой до 1 н концентрации. Раствор хранят в темной склянке с притертой пробкой в холодильнике. Срок хранения реактива – 1 месяц.

*Рабочий раствор реактива Фолина* готовят перед употреблением путем разбавления 1 см<sup>3</sup> исходного раствора реактива Фолина дистиллированной водой до объема 8 см<sup>3</sup> в расчете на одну пробку.

### **9.2. Подготовка спектрофотометра к работе**

Подготовку спектрофотометра к работе проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

### **9.3. Установление градуировочной характеристики**

Градуировочную характеристику устанавливают на градуировочных растворах. Она выражает зависимость оптической плотности растворов от массы субтилизина (протеазы) и устанавливается по 5 сериям растворов для градуировки.

Каждую серию, состоящую из 6 растворов, готовят в пробирках с притертыми пробками. Для этого в них вносят рабочий раствор протеазы и 2 Н раствор гидроксида натрия в соответствии с таблицей. После этого в каждую пробирку приливают 2,0 см<sup>3</sup> рабочего раствора № 1, тщательно перемешивают и выдерживают в течение 10 мин. Затем добавляют 8 см<sup>3</sup> рабочего раствора реактива Фолина, перемешивают и нагревают на водяной бане при температуре 50 °С в течение 5 мин. После быстрого охлаждения измеряют оптическую плотность растворов в кювете с толщиной оптического слоя 2,0 мм при длине волны 650 нм по отношению к раствору № 1 в таблице. Строят градуировочную характеристику, нанося на ось ординат значения оптических плотностей градуировочных растворов, а на ось абсцисс – соответствующие им величины содержания протеазы. Градуировку проверяют 1 раз в 3 месяца или в случае использования новой партии реактивов.

Таблица

Растворы для установления градуировочной характеристики при определении концентрации субтилизина (протеазы)

| Номер раствора  | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6     |
|---|-----|------|------|------|------|-------|
| Объем рабочего раствора протеазы, см <sup>3</sup>     | 0   | 0,1  | 0,2  | 0,5  | 0,8  | 1,0   |
| Объем раствора 2 Н гидроксида натрия, см <sup>3</sup> | 1,0 | 0,9  | 0,8  | 0,5  | 0,2  | —     |
| Содержание протеазы, мкг                              | 0   | 10,0 | 20,0 | 50,0 | 80,0 | 100,0 |

#### 9.4. Отбор проб

Отбор проб воздуха, содержащего субтилизин (протеазу), проводят согласно ГОСТ 17.2.3.01—86. Воздух аспирируют с помощью электроаспиратора через фильтр со скоростью 200 дм<sup>3</sup>/мин в течение 30 мин. Отобранные пробы помещают в пробирки с притертыми пробками. Срок хранения — 3 дня.

### 10. Выполнение измерений

Фильтр с отобранной пробой помещают в бюкс, заливают 3 см<sup>3</sup> 2 Н раствора гидроксида натрия и оставляют на 10—15 мин, периодически помешивая стеклянной палочкой. Степень десорбции протеазы с фильтра 98 %. Фильтр отжимают и отбрасывают. Для анализа отбирают 1,0 см<sup>3</sup> полученного раствора и далее проводят анализ в условиях, описанных в п. 9.3.

Расчет содержания субтилизина (протеазы) проводят по градуировочной характеристике.

### 11. Вычисление результатов измерений

Концентрацию субтилизина (протеазы) в атмосферном воздухе (мг/м<sup>3</sup>) вычисляют по формуле

$$C = \frac{m \cdot V}{V_1 \cdot V_0}, \text{ где}$$

$m$  — содержание субтилизина (протеазы) в анализируемом объеме пробы, мкг;

$V$  — общий объем пробы, см<sup>3</sup>;

$V_1$  — объем пробы, взятой для анализа, см<sup>3</sup>;

$V_0$  — объем воздуха, взятого для анализа и приведенного к нормальным условиям, дм<sup>3</sup>;

$$V_0 = \frac{V \cdot 273 \cdot P}{(273 + t) \cdot 760}, \text{ где}$$



$V$  – объем воздуха, взятого для анализа,  $\text{дм}^3$ ;

$P$  – атмосферное давление,  $\text{мм рт. ст.}$ ;

$T$  – температура воздуха в месте отбора пробы,  $^{\circ}\text{C}$ .

## 12. Оформление результатов измерений

Результаты измерений концентраций субтилизина (протеазы) оформляют протоколом в виде:  $C$ ,  $\text{мг/м}^3$ ;  $\Delta \pm 21\%$  с указанием даты проведения анализа, места отбора пробы, названия лаборатории, юридического адреса организации, ответственного исполнителя и руководителя лаборатории.

## 13. Контроль погрешности измерений

Контроль погрешности измерений содержания субтилизина (протеазы) проводят на градуировочных растворах в соответствии с пп. 10 и 11. Рассчитывают среднее значение результатов измерения содержания протеазы в градуировочных растворах:

$$\bar{C}_i = \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n C_{ni} \right), \text{ где}$$

$n$  – число измерений в градуировочной смеси,

$C_{ni}$  – результат измерения содержания вещества в  $i$ -ой пробе градуировочного раствора,  $\text{мг/дм}^3$ .

Рассчитывают среднее квадратичное отклонение измерений концентрации:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{ni} - \bar{C}_i)^2}{n - 1}}$$

Рассчитывают доверительный интервал:

$$\Delta C_i = \frac{S}{\sqrt{n}} \cdot t, \text{ где}$$

$t$  – коэффициент нормированных отклонений, определяемый по табл. Стьюдента, при доверительной вероятности 0,95, и затем относительную погрешность определения концентраций:

$$\delta = \frac{\Delta \bar{C}_i}{C_i} \cdot 100, \%$$

Если  $\delta \leq 21\%$ , то погрешность измерения удовлетворительная. Если данное условие не выполняется, то выясняют причину и повторяют измерения.

**Спектрофотометрическое определение карбоксиметилцеллюлозы  
натриевой соли в атмосферном воздухе**

**Методические указания  
МУК 4.1.1958—05**

**Спектрофотометрическое определение субтилизина (протеазы)  
в атмосферном воздухе**

**Методические указания  
МУК 4.1.1959—05**

Редакторы Л. С. Кучурова, Е. И. Максакова  
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 21 06 06

Формат 60x88/16

Тираж 100 экз

Печ л 1,25  
Заказ 26

Федеральная служба по надзору  
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован  
Издательским отделом  
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора  
117105, Москва, Варшавское ш., 19а  
Отделение реализации, тел. 952-50-89