

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение вредных веществ
в биологических средах**

Сборник методических указаний
МУК 4.1.2102—4.1.2116—06

Издание официальное

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека**

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение вредных веществ
в биологических средах**

**Сборник методических указаний
МУК 4.1.2102—4.1.2116—06**

Определение вредных веществ в биологических средах:
Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр
гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.—183 с.

1. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 11.07.06 № 2).

2. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 9 августа 2006 г.

3. Введены впервые.

ББК 28.072

© Роспотребнадзор, 2008

© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008

Содержание

| | |
|---|-----|
| Измерение массовой концентрации селена в моче методом атомно-абсорбционной спектрометрии: МУК 4.1.2102—06..... | 4 |
| Определение массовой концентрации ванадия в пробах крови методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией: МУК 4.1.2103—06 | 14 |
| Определение массовой концентрации меди, магния, кадмия в пробах мочи методом атомно-абсорбционной спектрометрии: МУК 4.1.2104—06..... | 25 |
| Определение массовой концентрации марганца, свинца, магния в пробах волос методом атомно-абсорбционной спектрометрии: МУК 4.1.2105—06 | 37 |
| Определение массовой концентрации марганца, свинца, магния в пробах крови методом атомно-абсорбционной спектрометрии: МУК 4.1.2106—06 | 50 |
| Определение массовой концентрации фенола в биосредах (моча) газохроматографическим методом: МУК 4.1.2107—06..... | 63 |
| Определение массовой концентрации фенола в биосредах (кровь) газохроматографическим методом: МУК 4.1.2108—06..... | 74 |
| Определение массовой концентрации 2-хлорфенола в биосредах (моча) газохроматографическим методом: МУК 4.1.2109—06..... | 85 |
| Определение массовой концентрации формальдегида, ацетальдегида, пропионового альдегида, масляного альдегида и ацетона в пробах мочи методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2110—06 | 96 |
| Измерение массовой концентрации формальдегида, ацетальдегида, пропионового альдегида, масляного альдегида и ацетона в пробах крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2111—06 | 110 |
| Определение массовой концентрации хлороформа, 1,2-дихлорэтана, тетрахлорметана, хлорбензола в биосредах (кровь) газохроматографическим методом: МУК 4.1.2112—06..... | 125 |
| Определение массовой концентрации хлороформа, 1,2-дихлорэтана, тетрахлорметана в биосредах (моча) методом газохроматографического анализа равновесного пара: МУК 4.1.2113—06..... | 137 |
| Определение массовой концентрации хлороформа, 1,2-дихлорэтана, тетрахлорметана, хлорбензола в биосредах (моча) газохроматографическим методом: МУК 4.1.2114—06..... | 149 |
| Определение массовой концентрации хлороформа, 1,2-дихлорэтана, тетрахлорметана в биосредах (кровь) методом газохроматографического анализа равновесного пара: МУК 4.1.2115—06..... | 162 |
| Определение массовой концентрации стирола в пробах крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2116—06 | 174 |

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

Г. Г. Онищенко

9 августа 2006 г.

Дата введения: 1 сентября 2006 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение массовой концентрации стирола в пробах крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.2116—06

1. Область применения

Методические указания по определению концентрации стирола в крови предназначены для использования Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лечебными и научными учреждениями, работающими в области профпатологии и экологии человека, научно-исследовательскими институтами, занимающимися вопросами гигиены окружающей среды.

Методические указания разработаны с целью обеспечения контроля за содержанием стирола в биологических средах у населения, проживающего в районах с повышенным уровнем загрязнения окружающей среды.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями ГОСТ Р 8.563—96 «ГСОЕИ. Методики выполнения измерений», ГОСТ Р 1.5—92 «ГСС. Общие требования к построению, изложению, оформлению и содержанию стандартов». Методика выполнения измерений обеспечивает определение стирола в диапазоне концентраций 0,1—5,0 мкг/см³ с погрешностью, не превышающей 23 %, при доверительной вероятности $P = 0,95$.



Молекулярная масса: 103,07

Стирол (винилбензол, фенилэтилен) – бесцветная жидкость с резким запахом. Температура кипения: 145 °С, плотность 0,9059. Растворяется в большинстве органических растворителей, растворимость в воде 0,032 % по объему (20 °С) [1]. Стирол оказывает общетоксическое, сенсибилизирующее, эмбриотропное, раздражающее действия, отрицательно влияет на ЦНС, обладает кумулятивным эффектом [2].

2. Сущность метода

Методика основана на извлечении стирола из крови экстракцией гексаном и анализе экстракта на жидкостном хроматографе.

Измерение концентрации стирола выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием УФ-детектора.

Нижний предел измерения – 0,001 мкг.

Определению не мешают фенол, бензол, толуол, этилбензол, ксилолы, карбоновые кислоты.

Длительность анализа, включая пробоподготовку – 20 мин.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

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

3.1. Средства измерений

| | |
|---|-------------------|
| Жидкостный хроматограф с насосом высокого давления и ультрафиолетовым детектором | |
| Весы лабораторные ВЛР-200 аналитические | ГОСТ 24104—01 |
| Гири Г ₂ -210 | ГОСТ 7328—01 |
| Микрошприцы МШ-10 | ТУ 2.833.106—00 |
| Колбы мерные, вместимостью 50 см ³ | ГОСТ 1770—74 |
| Пипетки градуированные, вместимостью 1, 5, 10 см ³ | ГОСТ 29227—91 |
| Редуктор кислородный | ТУ 26-05-236—73 |
| Аттестованная смесь стирола в этиловом спирте с концентрацией 1,00 мг/см ³ | ГСО МСО 0056.1998 |

3.2. Вспомогательные устройства

| | |
|---|--------------------------|
| Колонка стеклянная длиной 150 мм и внутренним диаметром 3,3 мм, заполненная сорбентом Separon SGX C ₁₈ зернением 7 мкм | |
| Центрифуга ЦЛМН-Р10-01-«Элекон» | ТУ 9443-001-245.23530—97 |
| Экстрактор ПЭ-8 | ТУ 3614-001-23050963—97 |

| | |
|--|------------------|
| Дистиллятор | ТУ 61-1-721—79 |
| Сушильный шкаф ШСС-80 | ТУ 16.531.743—83 |
| Воронки делительные, вместимостью 250 см ³ | ГОСТ 23932—90 |
| Воронка Шотта (пор 16) | ГОСТ 25336—82 |
| Бюксы СВ 19/9 | ТУ 92-891.029—91 |
| Пробирки центрифужные пропиленовые с завинчивающейся крышкой, производство «Sargstedt», Германия | |

3.3. Реактивы

| | |
|---|--------------------|
| Гексан для хроматографии, осч | ТУ 6-09-4521—77 |
| Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, осч | ТУ 6-09-14-2167—84 |
| Вода дистиллированная | ГОСТ 6709—72 |
| Гидроксид натрия, хч | ГОСТ 4328—77 |
| Спирт этиловый | ГОСТ Р 51652—2000 |
| Серная кислота | ГОСТ 4204—77 |
| Калия дихромат, хч | ГОСТ 4220—75 |
| Раствор гепарина в ампулах (5 000 ед. в 1 см ³) | |

3.4. Материалы

| | |
|--------------------|--------------|
| Гелий газообразный | ТУ 51-940—80 |
|--------------------|--------------|

3.5. Растворы

Элюэнт для хроматографии
Раствор гидроксида натрия, 10 %-й
Раствор дихромата калия в серной кислоте, 3 %-й

Допускается применение других типов средств измерений, вспомогательного оборудования, химреактивов и материалов, по метрологическим и техническим характеристикам не уступающих перечисленным.

4. Требования к безопасности

4.1. При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.007—76 и ГОСТ 12.1.005—88.

4.2. При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79, противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и меры безопасности, указанные в «Руководстве по правилам эксплуатации прибора».

5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений допускаются лица, имеющие квалификацию не ниже инженера-химика и владеющие техникой жидкостно-хроматографического анализа.

6. Условия измерений

6.1. При подготовке проб к анализу и приготовлении растворов соблюдают следующие условия:

- температура воздуха 15—25 °С;
- атмосферное давление 630—800 мм рт. ст.;
- влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С.

6.2. Выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендуемых технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений проводят следующие работы: подготовка посуды, приготовление растворов, подготовка хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики.

7.1. Подготовка посуды

Используемую посуду замочить на 1 ч в свежеприготовленном 3 %-м растворе двуххромовокислого калия в серной кислоте, отмыть в проточной водопроводной воде, ополоснуть дистиллированной водой и просушить при температуре 120 °С.

7.2. Приготовление растворов

7.2.1. *Элюент для хроматографии.* Смешивают 60 см³ ацетонитрила с 40 см³ дистиллированной воды. Подвижную фазу фильтруют через воронку Шотта (пор 16) и дегазируют барботированием гелия в течение 3—5 мин со скоростью 50—60 см³/мин.

7.2.2. *Раствор гидроксида натрия 10 %-й.* Вносят в мерный стакан с меткой на 100 см³ 10 г гидроксида натрия, прибавляют 90 см³ дистиллированной воды и перемешивают содержимое стакана до полного растворения гидроксида натрия. Срок хранения раствора – 30 дней при 4 °С.

7.2.3. *Раствор двуххромовокислого калия в серной кислоте 3 %-й.* Растворяют 3,0 г двуххромовокислого калия в 53 см³ концентрированной серной кислоты (плотность 1,84). Использовать свежеприготовленный раствор.

7.3. Подготовка хроматографической колонки

Колонку устанавливают в хроматограф и подают элюирующую жидкость, подготовленную в соответствии с п. 7.2.1, со скоростью 0,6 см³/мин до установления равновесия колонки, которое определяют по стабильности нулевой линии детектора.

7.4. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика на хроматограмме от концентрации стирола в крови, устанавливают по шести сериям растворов для градуировки. Каждую серию, состоящую из трех растворов, готовят разбавлением аттестованной смеси стирола в этиловом спирте (растворы А, Б).

7.4.1. *Приготовление раствора А:* 1 см³ аттестованной смеси стирола в этиловом спирте с концентрацией 1,0 мг/см³ вносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки. Используют свежеприготовленный раствор.

7.4.2. *Приготовление раствора Б:* 10 см³ аттестованной смеси стирола в этиловом спирте с концентрацией 1,0 мг/см³ вносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки. Используют свежеприготовленный раствор.

7.4.3. В соответствии с п. 8 проводят анализ образца крови на отсутствие стирола. Объем образца крови для приготовления градуировочных смесей должен быть не менее 12 см³. Образец крови с гепарином (из расчета 0,05 см³ гепарина на 2 см³ крови) может храниться 2 дня при температуре 4 °С.

7.4.4. Для установления градуировочной характеристики в 2 см³ крови добавляют 0,05 см³ раствора гепарина, вносят раствор А или Б в соответствии с табл. 1 и помещают в делительную воронку, в которую добавляют 40 см³ дистиллированной воды, 0,2 см³ 10 %-го раствора щелочи NaOH и 2 см³ гексана. Содержимое воронки перемешивают экстрактором со скоростью 2 500 об./мин в течение 45 с. После расслоения жидкостей переносят гексановый экстракт в центрифужную пробирку с крышечкой и центрифугируют в течение 5 мин при скорости 1 500 об./мин. Аликвотную часть экстракта в количестве 10 мм³ вводят в колонку хроматографа и анализируют в рабочем режиме прибора.

Таблица 1

**Растворы для установления градуировочной характеристики
при определении концентрации стирола в крови**

| Номер раствора | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|------|------|-------|------|------|-------|
| Объем раствора А, мм ³ ($C = 0,01$ мг/см ³) | 20,0 | 40,0 | 100,0 | – | – | – |
| Объем раствора Б, мм ³ ($C = 0,10$ мг/см ³) | – | – | – | 20,0 | 50,0 | 100,0 |
| Массовая концентрация стирола в крови, мг/дм ³ | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,5 | 5,0 |

Режим работы хроматографа:

- 3,3 мм, заполненная сорбентом Separon SGX C₁₈;
- подвижная фаза – ацетонитрил/вода в соотношении 60 : 40;
- скорость подвижной фазы – 0,6 см³/мин;
- длина волны УФ-детектора 254 нм;
- время выхода стирола в заданных условиях – 6 мин.

Градуировочную характеристику устанавливают с помощью градуировочного коэффициента, который рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^n C_i/S_i}{n}, \text{ где}$$

C_i – заданная концентрация стирола в градуировочной смеси, мг/дм³;
 S_i – среднее значение трех измерений площади пика, мм² или единицы оптической плотности (е.о.п);

n – количество градуировочных смесей ($n = 6$).

Градуировку проверяют 1 раз в квартал и при смене партии реактивов.

7.5. Отбор проб

Отбор проб венозной крови в объеме 4 см³ производят в тщательно вымытую стеклянную пробирку с притертой пробкой, в которую предварительно вносят 0,1 см³ раствора гепарина. Срок хранения проб в холодильнике не более 2-х суток.

8. Выполнение измерений

Проводят два параллельных измерения образца крови: 2 см³ крови помещают в делительную воронку, в которую добавляют 40 см³ дистиллированной воды, 0,2 см³ 10 %-го раствора щелочи NaOH и 2 см³ гексана. Перемешивают содержимое воронки экстрактором со скоростью

2 500 об./мин в течение 45 с. После расслоения жидкостей переносят гексановый экстракт в центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой и центрифугируют в течение 5 мин при скорости 1 500 об./мин. Аликвотную часть экстракта в количестве 10 мм³ вводят в колонку хроматографа и анализируют в рабочем режиме хроматографа, указанном в п. 7.4.4.

Идентификация хроматографического пика стирола проводится путем сопоставления времен удерживания хроматографических пиков в стандартном растворе стирола и в анализируемой пробе.

9. Вычисление результатов измерения

Концентрацию стирола в крови (мг/дм³) вычисляют по формуле:

$$X = S_i \cdot K, \text{ где}$$

X – концентрация стирола в анализируемой пробе, мг/дм³;

S_i – площадь пика стирола на хроматограмме, мм² или е.о.п.

K – градуировочный коэффициент.

За результат измерения принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений X_{max} , X_{min} , расхождение между которыми не должно превышать значения предела повторяемости r_n (табл. 2).

Результат измерения представляют в виде $(\bar{X} \pm \Delta)$ мг/дм³, где

$$\bar{X} \text{ – средний результат анализа, мг/дм}^3, \bar{X} = \frac{X_{max} + X_{min}}{2}$$

Δ – характеристика погрешности, мг/дм³, при $P = 0,95$ равная:

$$\Delta = \frac{\delta \cdot \bar{X}}{100}, \text{ где}$$

δ – относительное значение характеристики погрешности, %.

10. Внутренний контроль качества результатов измерений

Внутренний контроль качества (ВКК) результатов измерений – повторяемость, внутрिलाбораторная прецизионность (воспроизводимость), точность – осуществляют с целью получения оперативной информации о качестве результатов измерений и принятия при необходимости оперативных мер по его повышению в соответствии с нормативным документом МИ 2335—2003 «ГСОЕИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа».

Методика выполнения измерений обеспечивает получение результатов измерений с нормативами, не превышающими значений, приведенных в табл. 2 и 3.

Таблица 2

**Значения пределов повторяемости и воспроизводимости
при доверительной вероятности $P = 0,95$**

| Наименование определяемого компонента и диапазон измерений, мг/дм ³ | Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r_n , % | Предел внутрилабораторной воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории, но в разных условиях), $R_{\bar{x}_t}$, % |
|--|---|--|
| Стирол, от 0,1 до 5,0 вкл. | 26,5 | 27,6 |

Таблица 3

**Диапазон измерений, значения показателей точности,
повторяемости, воспроизводимости**

| Наименование определяемого компонента и диапазон измерений, мг/дм ³ (мкг/см ³) | Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_r , % | Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R , % | Показатель точности (границы относительной погрешности при вероятности $P = 0,95$), $\pm \delta$, % |
|---|--|---|---|
| Стирол, от 0,1 до 5,0 вкл. | 10,0 | 13,5 | 23,0 |

10.1. Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят 1 раз в квартал в анализируемой серии измерений. Определяют содержание исследуемого соединения в градуировочных растворах, которые соответствует началу, середине и концу диапазона измерений. Градуировка признается стабильной, если расхождение между заданным и измеренным значением концентраций не превышает 5 %.

10.2. Контроль повторяемости

Относительное расхождение между результатами двух измерений, выполненных в соответствии с методикой одним оператором при измерении образцов одной и той же рабочей пробы, с использованием одних и тех же средств измерений и реактивов в течение возможно минимального интервала времени, не должно превышать значения предела повторяемости r_n (табл. 2).

Повторяемость результатов параллельных определений признают удовлетворительной, если выполняется условие:

$$X_{\max} - X_{\min} \leq \frac{r_n}{100} \cdot \frac{X_{\max} + X_{\min}}{2}, \text{ где}$$

r_n – значение предела повторяемости, %;

X_{\max}, X_{\min} – максимальный и минимальный результаты двух параллельных измерений содержания i -го вещества, мг/дм³.

Если условие не выполняется, эксперимент повторяют. При повторном получении отрицательного результата выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

10.3. Контроль воспроизводимости

Внутренний контроль качества воспроизводимости проводят с использованием рабочей пробы. Пробу делят на две равные части и анализируют в соответствии с методикой, максимально варьируя условия проведения анализа (разные операторы, разное время, разные партии реактивов одного типа, разные наборы мерной посуды и т. д.). Воспроизводимость результатов контрольных измерений признают удовлетворительной, если выполняется условие:

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq \frac{R_{\bar{X}_t}}{100} \cdot \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \text{ где}$$

\bar{X}_1 – средний результат анализа рабочей пробы из 2-х параллельных измерений, мг/дм³;

\bar{X}_2 – средний результат анализа рабочей пробы из 2-х параллельных измерений, полученный в других условиях, мг/дм³;

$R_{\bar{X}_t}$ – значение предела внутрилабораторной воспроизводимости, % (табл. 2).

Расхождение между результатами измерений \bar{X}_1 и \bar{X}_2 , полученных в разных условиях, не должно превышать значений показателя воспроизводимости $R_{\bar{X}_t}$ при доверительной вероятности $P = 0,95$, указанных в табл. 2.

Если условие не выполняется, эксперимент повторяют. При повторном получении отрицательного результата выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

10.4. Контроль точности

Контроль точности с использованием метода добавок состоит в сравнении результата контрольной процедуры, равного разности между

результатом контрольного измерения содержания определяемого компонента в пробе с известной добавкой (\bar{X}'), в рабочей пробе без добавки (\bar{X}) и величиной добавки C_o (добавка должна составлять не менее 40 % от содержания анализируемого компонента в рабочей пробе) с нормативом точности K . Результаты контроля признаются удовлетворительными, если выполняется условие:

$$|\bar{X}' - \bar{X} - C_o| = K_k, \text{ где}$$

\bar{X}' – средний результат контрольного измерения содержания определяемого компонента в рабочей пробе с известной добавкой из 2-х параллельных измерений, мг/дм³;

\bar{X} – средний результат контрольного измерения содержания определяемого компонента в рабочей пробе из 2-х параллельных измерений, мг/дм³;

C_o – величина добавки к пробе, мг/дм³.

$$K = 0,84 \cdot \sqrt{\left(\frac{\delta}{100} \cdot \bar{X}\right)^2 + \left(\frac{\delta}{100} \cdot \bar{X}'\right)^2}$$

Качество контрольной процедуры признают удовлетворительной при выполнении условия: $K_k \leq K$.

При превышении норматива контроля точности эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля, и устраняют их.

Периодичность контроля воспроизводимости и точности регламентируется в руководстве по качеству лаборатории.

Литература

1. Химическая энциклопедия /Под. ред. Н. С. Зефирова. М.: «Большая российская энциклопедия», 1995. Т. 4.
2. Лазарев Н. В. Вредные вещества в промышленности. Органические вещества: Справочник. М.: «Химия», 1976. Т. 1. С. 113—117.

Методические указания разработаны Пермским научно-исследовательским клиническим институтом детской экопатологии (Т. С. Уланова, Т. Д. Карнажицкая).