
**Качество воды. Определение
глифосата и АМФК. Метод с
использованием высокоэффективной
жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с
тандемной масс-спектрометрией**

*Water quality — Determination of glyphosate and AMPA — Method using
high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass-
spectrometric detection*

*iTeh STANDARDS
(standards.iteh.ai)*

ISO 16308:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9339019-a2a3-4962-9933-e428696be650/iso-16308-2014>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава



Ссылочный номер
ISO 16308:2014(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на установку интегрированных шрифтов в компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами – членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просим информировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16308:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9339019-a2a3-4962-9933-e428696be650/iso-16308-2014>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2014

Все права сохраняются. Если не задано иначе, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия офиса ISO по адресу, указанному ниже, или членов ISO в стране регистрации пребывания.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие.....	iv
Введение	v
1 Область применения.....	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Сущность метода.....	1
4 Помехи	2
5 Реактивы.....	2
6 Аппаратура	4
7 Отбор проб	5
8 Проведение испытания	5
8.1 Предварительная обработка (при подозрении на содержание определенного материала).....	5
8.2 Разрушение хелатов и дериватизация	5
8.3 Предварительное концентрирование	7
8.4 Хроматографическое определение	8
8.5 Идентификация и подтверждение аналитов	8
8.6 Мониторинг холостых контролей	9
9 Градуировка	9
9.1 Диапазоны концентрации	9
9.2 Градуировка подходящей матрицы	9
9.3 Градуировка внутреннего стандарта	10
10 Обработка результатов	11
11 Протокол испытания	12
Приложение А (информативное) Данные по эффективности	13
Приложение В (информативное) Примеры условий проведения хроматографии.....	16
Приложение С (информативное) Примеры хроматограмм	17
Приложение D (информативное) Анализ глюкофозината.....	18
Приложение Е (информативное) Предварительная обработка проб жесткой воды	22
Библиография	24

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) всемирная федерация национальных органов по стандартизации (комитеты-члены ISO). Работа по подготовке международных стандартов обычно ведется через технические комитеты ISO. Каждый комитет-член ISO, проявляющий интерес к тематике, по которой учрежден технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, государственные и негосударственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работе. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Процедуры, используемые для разработки данного документа, и процедуры, предусмотренные для его дальнейшего ведения, описаны в Директивах ISO/IEC Directives, Part 1. В частности, следует отметить различные критерии утверждения, требуемые для различных типов документов ISO. Проект данного документа был разработан в соответствии с редакционными правилами Директив ISO/IEC Directives, Part 2: www.iso.org/directives.

Необходимо обратить внимание на возможность того, что ряд элементов данного документа могут быть предметом патентных прав. Международная организация ISO не должна нести ответственность за идентификацию таких прав, частично или полностью. Сведения о патентных правах, идентифицированных при разработке документа, будут указаны во Введении и/или в перечне полученных ISO объявлений о патентном праве: www.iso.org/patents.

Любое торговое название, использованное в данном документе, является информацией, предоставляемой для удобства пользователей, а не свидетельством в пользу того или иного товара или той или иной компании.

Для пояснения значений конкретных терминов и выражений ISO, относящихся к оценке соответствия, а также информация о соблюдении Международной организацией ISO принципов ВТО по техническим барьерам в торговле (ТБТ), см. следующий унифицированный локатор ресурса (URL): [Foreword - Supplementary information](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9339019-a2a3-4962-9933-e438696be650/iso-16308-2014).

Технический комитет, несущий ответственность за данный документ, ISO/TC 147, *Качество воды*, Подкомитет SC 2, *Физические, химические и биохимические методы*.

Введение

Глифосат [*N*-(фосфонометил)глицин] является неизбирательным гербицидом широкого спектра. Эффективность этого соединения делает его самым продаваемым и одним из наиболее широко распространенных гербицидов в мире с момента его поступления на рынок в 1974 г. Вместе с основным продуктом его разложения, аминометилфосфоновой кислотой (АМРА = АМФК), глифосат является одним из самых обнаруживаемых веществ в водоемах большинства развитых стран. Необходимо также отметить, что АМФК может выделяться в процессе обработки сточных вод, например, за счет разложения моющих средств для текстиля.

Глифосат и АМФК принадлежат к семейству аминокислот и имеют конкретные физико-химические свойства, которые требуют разработки сложных аналитических методов для анализа и обнаружения. Сложность анализа, главным образом, связана с высокой растворимостью глифосата и АМФК и их хелатной природой. Для решения подобных проблем используют их предколонную дериватизацию с 9-торенилметилхлороформатом (FMOC-Cl) с образованием менее полярных производных, что обеспечивает лучшее разделение с помощью жидкостной хроматографии.

Глюфозинат, другой аминокислот, подлежит регулированию в меньшей степени и может быть определен одновременно, при условии возможности продемонстрировать, что это не мешает анализу пробы.

В настоящее время имеется международный стандарт на определение методом жидкостной хроматографии с флуориметрическим обнаружением; но определение методом ВЭЖХ–ESI–МС/МС может оказаться гораздо более специфичным (однозначная идентификация) и более чувствительным (пределы количественного обнаружения составляют примерно 30 нг/л как для глифосата, так и для АМФК). Данный международный стандарт основан на данной методике анализа и предназначен для лабораторий, задействованных в нормативном регулировании водной среды. Большинство таких лабораторий в настоящее время оснащено таким типом оборудования.

ISO 16308:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9339019-a2a3-4962-9933-e428696be650/iso-16308-2014>

Качество воды. Определение глифосата и АМФК. Метод с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемной масс-спектрометрией

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Пользователи данного международного стандарта должны быть знакомы с обычной лабораторной практикой. Настоящий стандарт не преследует цели рассмотреть все вопросы, связанные с безопасностью, если они возникают при его использовании. Пользователь сам несет ответственность за разработку соответствующих правил техники безопасности и охраны здоровья, а также за обеспечение соответствия условиям национальных регламентов.

ВНИМАНИЕ! – Самое главное, чтобы анализ в соответствии с настоящим международным стандартом выполнялся обученным персоналом.

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод определения растворенной доли глифосата и его основного метаболита, аминометилфосфоновой кислоты (АМФК), в питьевой воде, грунтовой воде, и поверхностных водах в концентрации от 0,03 мкг/л до 1,5 мкг/л. Он не распространяется на морскую или соленую воду. Этот метод можно применять к другим типам вод, при условии, что метод подтверждается для каждого отдельного случая.

2 Нормативные ссылки

Следующие ниже стандарты являются обязательными для применения настоящего документа. В отношении датированных ссылок действительно только приведенное издание. В отношении недатированных ссылок действует последнее издание (включая любые изменения).

ISO 3696, *Вода для лабораторного анализа. Технические условия и методы испытаний*

ISO 5667-3, *Качество воды. Отбор проб. Часть 3: Консервация проб воды и обращение с ними*

ISO 8466-1, *Качество воды. Калибровка и оценивание аналитических методов, а также эксплуатационных характеристик. Часть 1: Статистическая оценка линейной калибровочной функции*

3 Сущность метода

Глифосат и АМФК (растворенная доля после фильтрации) дериватизируют с помощью 9-флуоренилметилхлороформат (FMOC-Cl) (5.17) для снижения их полярности увеличения удерживания соединения при разделении в колонке с обращенной фазой (например, C18), а также улучшения масс-спектрометрического детектирования. Если масс-спектрометр имеет достаточную способность к обнаружению, можно пропустить этап твердофазной экстракции и анализировать аналиты методом прямого ввода (см. 8.2.1).

Дериватизированную пробу очищают посредством экстракции жидкость/жидкость, а затем концентрируют с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ = SPE).

Выполняют анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией через источник ионизации электрораспылением (ВЭЖХ-ЭСИ-МС/МС = HPLC-ESI-MS/MS), используя калибровку с совпадающей матрицей.

Таблица 1 — Референтные вещества

Наименование	Формула	Молекулярная масса г/моль	Номер по CAS-RN ^a
Глифосат <i>N</i> -(фосфометил)глицин	$C_3H_8NO_5P$	169,1	1071–83–6
АМФК Аминометилфосфоновая кислота	CH_6NO_3P	111,0	1066–51–9
^a CAS-RN Регистрационный номер Службы Chemical Abstracts			

ПРИМЕЧАНИЕ Глюфозинат, принадлежащий к семейству аминифосфонатов, можно определять одновременно, при условии возможности продемонстрировать отсутствие помех в отношении пробы (матрицы), подлежащей анализу.

4 Помехи

Данный метод подтвержден для жесткой воды, содержащей до 3,2 ммоль/л кальция и магния в сумме. Для воды с высоким содержанием кальция и магния может потребоваться увеличение концентрации ЭДТА-Na₂ (5.16) на этапе дериватизации (см. Приложение D).

Может потребоваться включение этапа ацидификации, описанной в Приложении D, даже для некоторых типов воды, содержащей кальция и магния в сумме меньше 3,2 ммоль/л. Лаборатория должна проверить необходимость такой процедуры для повседневного анализа.

Присутствие свободного хлора, например, в очищенной воде, может привести к потере глифосата за счет окисления. Следовательно должен использоваться тиосульфат натрия (см. Раздел 7).

5 Реактивы

Если нет иных указаний, все реактивы и растворители должны быть достаточной чистоты, например, “для анализа микропримесей”.

5.1 Деионизованная вода.

5.2 Ультрочистая вода, соответствующая классу 1 по ISO 3696.

5.3 Азот, N₂, чистота ≥ 99,996 % по объему.

5.4 Лабораторное моющее средство, щелочное.

5.5 Тиосульфат натрия, Na₂S₂O₃.

5.6 Ацетонитрил, C₂H₃N, для ВЭЖХ.

5.7 Метанол, CH₄O, для ВЭЖХ.

5.8 Этанол, C_2H_6O , 95 % по массе, для ВЭЖХ.

5.9 Этилацетат, $C_4H_8O_2$, для ВЭЖХ.

5.10 Ацетат аммония, $C_2H_7O_2N$.

5.11 Триэтиламин, $C_6H_{15}N$.

5.12 Гидроксид аммония, NH_4OH , 28 % по массе.

5.13 Муравьиная кислота, CH_2O_2 .

5.14 Соляная кислота, HCl , 300 г/л

5.15 Ледяная уксусная кислота, $C_2H_4O_2$.

5.16 Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА = EDTA), двунариевая соль, дигидрат, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$, минимальной чистоты 99 % по массе.

5.17 9-флуоренилметилхлороформат (FMOC-Cl), $C_{15}H_{11}ClO_2$, минимальной чистоты 97 % по массе.

FMOC-Cl используют для приготовления **реактива для дериватизации**, раствор FMOC-Cl, 50 мг/мл, в ацетонитриле (5.6). Этот раствор можно хранить при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев.

Для прямого ввода (8.2.1), используют раствор FMOC-Cl в ацетонитриле концентрацией 0,5 мг/мл.

5.18 Референтные вещества, по Таблице 1.

5.18.1 Глифосат, *N*-(фосфометил)глицин, $C_3H_8NO_5P$, чистотой > 98 % по массе.

5.18.2 АМФК, аминометилфосфоновая кислота, CH_6NO_3P , чистотой > 98 % по массе.

5.18.3 Глифосат, изотопно-меченый $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$, суррогатный стандарт (стандарт-суррогат), чистотой > 98 % по массе.

5.18.4 АМФК, изотопно-меченая $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$, суррогатный стандарт, чистотой > 98 % по массе.

5.19 Градуировочные растворы.

Отдельные исходные растворы глифосата (5.18.1) и АМФК (5.18.2), концентрацией 100 мг/л, приготовленные в ультрачистой воде (5.2). Эти растворы можно хранить при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 месяца.

Отдельные исходные растворы $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ -изотопно-меченного глифосата (5.18.3) и $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -изотопно-меченой АМФК (5.18.4), концентрацией 100 мг/л, приготовленные в ультрачистой воде (5.2). Эти растворы можно хранить при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 месяца.

Многокомпонентный раствор суррогатов: $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ - изотопно-меченного глифосата и $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -изотопно-меченой АМФК, концентрацией 20 мкг/л, приготовленные в ультрачистой воде (5.2). Этот раствор можно хранить при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 месяца.

ПРИМЕЧАНИЕ Исходные и градуировочные растворы можно хранить в течение более длительного срока при условии соответствующего подтверждения их стабильности.

5.20 Буферный раствор ацетата триэтиламония, 0,1 %-ный раствор триэтиламония (5.11) доводят до pH 9,5 ледяной уксусной кислотой (5.15) (подвижная фаза).

5.21 Тетраборат натрия, декагидрат, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

5.22 Буферный раствор бората натрия, 0,05 моль/л; pH = 9,2.

Растворяют $19 \pm 0,1$ г тетрабората натрия (5.21), декагидрата в 1 л воды (5.1). Этот раствор можно хранить в течение приблизительно 1 месяца при температуре $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$.

5.23 Минеральная вода, содержащая менее 3,2 ммоль/л двухвалентных катионов (Mg^{2+} и общего Ca^{2+}), для подготовки градуировки с соответствующей матрицей.

6 Аппаратура

На материале или частях, которые могут прийти в соприкосновение с пробой, не должны оставаться остатков, которые могли бы стать заметной помехой в холостых опытах.

Можно использовать емкости из стекла или пластика для отбора проб и для всех этапов до дериватизации. После дериватизации должны применяться только стеклянные вials (6.10) и пробирки (6.11).

6.1 Обычная стеклянная лабораторная посуда, или оборудование и, в частности, следующее.

6.2 Стеклянные, полиэтиленовые (PE) или полипропиленовые (PP) бутылки, минимальной вместимостью 50 мл, для отбора проб.

6.3 Стеклянный, полиэтиленовый (PE) или полипропиленовый (PP) шприц, 50 мл, для фильтрования пробы.

6.4 Фильтр однократного использования для шприца, диаметр 25 мм, с гидрофильной мембраной, 0,45 мкм, например из регенерированной целлюлозы.

6.5 Стеклянные или одноразовые PE или PP конические пробирки, 9^{мл} вместимостью приблизительно 50 мл, для дериватизации.

6.6 Микропипетки, регулируемые от 100 мкл до 500 мкл.

6.7 pH-метр.

6.8 Картриджи SPE, например, Oasis HLB^{®1} Waters, 60 мг, 3 мл, или аналогичные.

6.9 Центрифуга, обеспечивающая скорость вращения $6\,500\text{ м}^{-1}$.

6.10 Стеклянные вials, подходящие для автодозатора, с крышками и септами (самоуплотняющимися мембранами для хроматографии) из политетрафторэтилена (ПТФЭ = PTFE) или силиконовой резины.

6.11 Стеклянные пробирки, вместимостью 15 мл или меньше.

¹ Oasis HLB[®], XBridge C18[®] и Gemini[®]-NX являются примерами подходящей продукции, имеющейся в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей данного документа и не указывает на предпочтение, оказываемое ISO этой продукции.

6.12 Колонка для обращено-фазовой хроматографии, например, колонка XBridge C18^{®1} [колонка Waters, 50 мм × 2,1 мм внутренним диаметром (ВД) 2,5 мкм,] с предколонкой (Waters, 10 мм × 2,1 мм ВД 2,5 мкм).

Настоятельно рекомендуется колонка с неподвижной фазой, устойчивой к действию щелочей (pH 9 - pH 9,5).

ПРИМЕЧАНИЕ Также подойдет колонка Gemini[®]-NX¹ (Phenomenex) аналогичных размеров. Можно использовать другие колонки при условии соответствия условий разделения.

6.13 Высокоэффективный жидкостной хроматограф (ВЭЖХ), состоящий из 6.13.1 - 6.13.5.

6.13.1 Дозатор, ручной или автоматический.

6.13.2 Градиентный насос.

6.13.3 Печь с терморегулятором, для колонки ВЭЖХ.

6.13.4 Масс-спектрометр, с тройным квадрупольным анализатором и источником электрораспыления.

6.13.5 Система сбора и обработки данных.

7 Отбор проб

Если бутылки для пробоотбора не однократного пользования, их (6.2) споласкивают деионизованной водой (5.1), затем моют лабораторным моющим средством (5.4). Споласкивают водой (5.1), затем ультрачистой водой (5.2), и, наконец, 95 %-ным этанолом (5.8).

Отбор проб производят в соответствии с ISO 5667-3 в эти бутылки (6.2) (приблизительно 50 мл).

При подозрении, что вода содержит свободный хлор, добавляют примерно 2 мг тиосульфата натрия (5.5) или любого другого вещества, снижающего содержание хлора на 100 мл пробы.

Пробы хранят в соответствии с ISO 5667-3 при температуре $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и предварительно обрабатывают в течение 24 ч.

8 Проведение испытания

8.1 Предварительная обработка (при подозрении на содержание определенного материала)

Помещают фильтр (6.4) на шприц (6.3). Споласкивают порцией объемом 5 мл ультрачистой воды (5.2).

Фильтруют пробу (приблизительно 50 мл), первые 5 мл отбрасывают. Фильтрат собирают в пробирку с конической нижней частью (6.5).

Хранят профильтрованные пробы при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение максимум одной недели перед этапом дериватизации.

8.2 Разрушение хелатов и дериватизация

8.2.1 Общие положения

Адаптируют этап дериватизации к типу аналитического анализа, следующему за дериватизацией:

- при использовании масс-спектрометра с достаточной способностью обнаружения предварительного концентрирования не требуется, и дериватизированную пробу вводят непосредственно после дериватизации согласно 8.2.2;
- в противном случае, можно использовать этап предварительного концентрирования, чтобы достичь нужного предела количественного обнаружения (LOQ), а дериватизации выполняют согласно 8.2.3.

8.2.2 Разрушение хелатов и дериватизация для прямого ввода

Помещают, например, 5 мл пробы (различные количества пробы требуют применения эквивалентных количеств следующих реактивов) в колбу Эрленмейера вместимостью 25 мл со стеклянной пробкой и якорем магнитной мешалки внутри.

Добавляют 50 мкл многокомпонентного водного раствора концентрацией 20 мкг/л (5.19), включающего $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -изотопно-меченый глифосат (5.18.3) и $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -изотопно-меченую АМФК (5.18.4) в ультрачистой воде (5.2) в качестве суррогата дериватизации.

Добавляют 100 мкл ЭДТА- Na_2 (5.16) [раствор в ультрачистой воде концентрацией 0,1 моль/л (5.2)], встряхивают и выдерживают в течение 10 мин в закрытой колбе.

Добавляют, например, 2 мл буферного раствора бората Na (5.22), концентрацией 0,05 моль/л и перемешивают в течение 30 мин со скоростью 400 мин^{-1} , чтобы отрегулировать значение pH 9,0 - pH 9,5.

Добавляют 400 мкл раствора FMOC-Cl (5.17 для прямого ввода); перемешивают в течение 4 ч со скоростью 400 мин^{-1} и выдерживают в течение приблизительно 12 ч (на ночь).

Нейтрализуют раствор соляной кислотой концентрацией 30 % (5.14).

Фильтруют и используют для анализа (8.4).

Конечный объем предварительно обработанной пробы должен учитываться при расчете конечного результата.

ПРИМЕЧАНИЕ Кран, перекрывающий поток элюата за колонкой до и после прохождения аналитов в отходы, является хорошим средством защиты источника ионов детектора МС/МС от загрязнения.

8.2.3 Разрушение хелатов и дериватизация до предварительного концентрирования

С помощью микропипетки, например, (6.6), пипетки из полиэтилена или полипропилена, переносят 5 мл пробы в пробирку из полипропилена с конической нижней частью (6.5).

Добавляют 50 мкл многокомпонентного водного раствора, 20 мкг/л, $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ - изотопно-меченого глифосата (5.18.3) и $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ - изотопно-меченой АМФК (5.18.4) в ультрачистой воде (5.2) в качестве суррогата дериватизации.

Добавляют 325 мкл буферного раствора бората Na (5.22) и встряхивают.

Добавляют 200 мкл раствора ЭДТА- Na_2 (5.16) [0,1 моль/л в ультрачистой воде (5.2)], встряхивают и дают постоять в течение 5 мин. Добавление ЭДТА позволяет выделить глифосат и АМФК из комплексов с двухвалентными катионами (например, Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Добавляют 4,5 мл ацетонитрила (5.6). Энергично встряхивают в течение 1 мин для гомогенизации (на этом этапе не должно происходить разделения фаз).