Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Хромато-масс-спектрометрическое определение суммы стероидных сапонинов Yucca Schidigera в воде

Методические указания
МУК 4.1.2228—07

Издание официальное

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Хромато-масс-спектрометрическое определение суммы стероидных сапонинов Yucca Schidigera в воде

Методические указания
МУК 4.1.2228—07

ББК 51.21
Х88

Х88 Хромато-масс-спектрометрическое определение суммы стероидных сапонинов Yucca Schidigera в воде: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—20 с.

1. Разработаны ФГУН «Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов» (ФГУН НИЦ ТБП ФМБА) (В. Н. Алдобаев, Н. Р. Дядищев, А. В. Воробьев, С. И. Жуков, В. И. Сигаев, Л. А. Еременко, Т. М. Вирясова) и Центром Экотоксикологии (А. Ф. Фитин, С. М. Лукин).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-гигиеническому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 29 марта 2007 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 27 июня 2007 г.

4. Вводятся в действие с 17 сентября 2007 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 200 экз.

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
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
27 июня 2007 г.
Дата введения: 17 сентября 2007 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Хромато-масс-спектрометрическое определение суммы стероидных сапонинов Yucca Schidigera в воде

Методические указания МУК 4.1.2228—07

1. Область применения

Настоящие методические указания устанавливают методику количественного химического анализа в воде водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения для определения концентрации суммы стероидных сапонинов Yucca Schidigera, методом газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в диапазоне от 0,48 до 15 мг/дм^3. Экстракт растения Yucca Schidigera, содержащий стероидные сапонины, является составной частью (действующим веществом) ряда органических биоразлагаемых продуктов (ОБП), предназначенных экологически благоприятным способом производить эффективную очистку и (или) дезодорацию воздуха, различных типов вод, почвы, твердых бытовых отходов и т. д., исключающую нанесение вреда человеку и окружающей природной среде.

В настоящее время под фирменным наименованием ОБП производится и продается более 10 наименований продуктов, используемых в различных отраслях промышленности, сельскохозяйственном производстве, жилищно-коммунальном комплексе и т. д.

Методические указания предназначены для использования лабораториями центров гигиены и эпидемиологии при осуществлении аналитического контроля химического загрязнения в воде водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения в районах располо-

жения производства и применения стероидных сапонинов Yucca Schidigera, производственными лабораториями предприятий, научно-исследовательскими институтами, работающими в области гигиены окружающей среды.

Методические указания разработаны и подготовлены в соответствии с требованиями ГОСТ 17.1.5.05—85 «Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков», ГОСТ Р 51592—2000 «Вода. Общие требования к отбору проб», ГОСТ Р 8.563—96 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений», МИ 2335—2003 «Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа», МИ 2336—2002 «Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки».

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. Характеристика вещества

2.1. Название и структура

Сапонины Yucca Schidigera представляют собой набор стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана, выделенных из растительного сырья. Растительным сырьем для получения сапонинов служит холодный экстракт различных частей растений, относящихся к виду Yucca Schidigera. Большая часть сапонинов выделена в чистом виде и охарактеризована.

Название по ИЮПАК основных сапонинов Yucca Schidigera:

№ 1 *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-[*β*-D-ксилопиранозил – (1→3)]-*β*-D-глюкопиранозил-5*β* (25*R*)-спиростан-3*β*-ол-12-он;

№ 2 *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-*β*-D-глюкопиранозил-5*β* (25*S*)-спиростан-3*β*-ол;

№ 3 *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-[*β*-D-ксилопиранозил – (1→3)]-*β*-D-глюкопиранозил-5*β* (25*S*)-спиростан-3*β*-ол;

№ 4 *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-[*β*-D-глюкопиранозил – (1→3)]-*β*-D-глюкопиранозил-5*β* (25*R*)-спиростан-3*β*-ол-12-он;

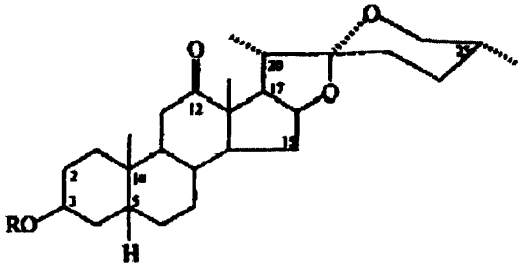
№ 5 *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-*β*-D-галактопиранозил-5*β* (25*S*)-*спиростан-2β,3β-диол*;

№ 6 *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-*β*-D-глюкопиранозил -5*β* (25*R*) – фуростан-*3β,22α*,26-триол 26-O-*β*-D-глюкопиранозид;

№ 7 *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-[*β*-D-ксилопиранозил – (1→3)] -*β*-D-глюкопиранозил-5*β* (25*R*)-фуростан-*3β,22α*,26-триол 26-O-*β*-D-глюкопиранозид;

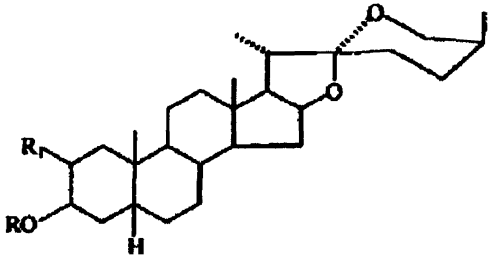
№ 8 *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-[*β*-D-ксилопиранозил – (1→3)] -*β*-D-глюкопиранозил-5*β* (25*R*)-фурост 20(22)-ен *3β*,26-диол-12-он 26-O-*β*-D-глюкопиранозид.

Структурные формулы:



№ 1 R – *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-[*β*-D-ксилопиранозил – (1→3)] -*β*-D-глюкопиранозил;

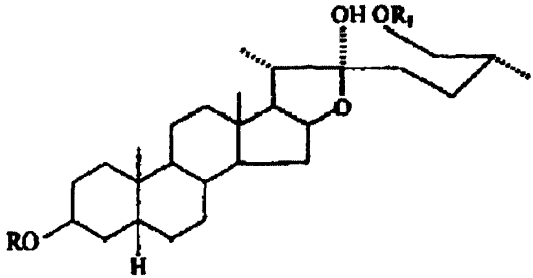
№ 4 R – *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-[*β*-D-глюкопиранозил – (1→3)] -*β*-D-глюкопиранозил



№ 2 R – *3-O-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-*β*-D-глюкопиранозил; R_1 – H;

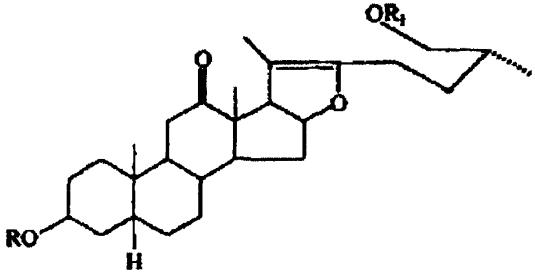
№ 3 R – *3-О-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-[*β*-D-ксилопиранозил – (1→3)] -*β*-D-глюкопиранозил; R_1– H;

№ 5 R – *3-О-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-*β*-D-галактопиранозил; R_1– OH



№ 6 R – *3-О-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-*β*-D-глюкопиранозил; R_1– *β*-D-глюкопиранозил;

№ 7 R – *3-О-β*-D-глюкопиранозил-(1→2)-[*β*-D-ксилопиранозил – (1→3)] -*β* -D-глюкопиранозил; R_1– *β*-D-глюкопиранозил



№ 8 R – *3-О-β*-D-глюкопиранозил- (1→2)-[*β*-D-ксилопиранозил – (1→3)] -*β*-D-глюкопиранозил; R_1–*β*-D-глюкопиранозил

2.2. Физико-химические свойства

Стероидные сапонины представляют собой бесцветные (желтоватые) кристаллические или аморфные вещества с высокой температурой плавления (плавятся с разложением); хорошо растворимы в воде, плохо – в этаноле, лучше – в метаноле, не растворимы в бензоле, хлороформе и диэтиловом эфире.

Сапонины	Температура плавления, °С	Удельное вращение плоскости поляризации, $[\alpha]_D^{25}$ (метанол, c = 0,1)
№ 1	197—198	-15,2
№ 2	260—261	-48,0
№ 3	298—299	-40,6
№ 4	234—236	-7,8
№ 5	273—274	-45,8
№ 6	207—208	-38,8
№ 7	235—236	-43,3
№ 8	193—195	-3,6

Экстракт Юкки Шидигера представляет собой жидкость темно-коричневого цвета (поглощение 10 %-го раствора при 520 нм – 1,63), pH = 4,0, удельный вес 1,21—1,24 г/см^3, общее количество растворенных веществ – 45—48 % брикс, содержание сапонинов – 10—12.

Агрегатное состояние в воздухе – в виде капельно-жидкого аэрозоля водных растворов при применении.

2.3. Токсикологическая характеристика

Значение $ЛД_{50}$ концентрата «ОБП-1054», содержащего 50 % стероидных сапонинов Yucca Schidigera, для мышей обоего пола составило 14 200 мг/кг.

$ЛК_{50}$ концентрата «ОБП-1054» при аэрозольном способе введения для белых беспородных крыс не установлена и превышает максимальную испытанную концентрацию – 6 285 мг/м^3.

Концентрат «ОБП-1054» не обладает кумулятивным действием при пероральном применении.

Концентрат «ОБП-1054» не обладает аллергизирующим действием на белых беспородных мышей и морских свинок-альбиносов при накожном и внутрикожном способах применения.

ОДУ для воды водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения – 5,0 мг/дм^3 .

3. Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значение погрешности (и ее составляющих) результатов измерений при доверительной вероятности P = 0,95 не превышают значений, представленных в таблице

Таблица 1

Диапазон измерений, значения показателей точности, правильности, повторяемости и воспроизводимости

Диапазон измерений, мг/дм^3	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Показатель точности (границы относительной погрешности методики при доверительной вероятности $P = 0,95$), $\pm\delta$, %
Сумма сапонинов Yucca Schidigera от 0,48 до 15	5	7	14

Таблица 2

Диапазон измерений, значения пределов повторяемости и воспроизводимости

Наименование определяемого компонента и диапазон измерений, мг/дм^3	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r, %	Предел воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами, полученными в разных лабораториях), R, %
Сумма сапонинов Yucca Schidigera от 0,48 до 15	14	20

4. Метод измерений

Измерение массовой концентрации суммы стероидных сапонинов Yucca Schidigera в воде водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения выполняется методом газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с предварительным кислотным гидролизом водных образцов и экстракцией продуктов гидролиза.

В основе метода количественного определения суммы сапонинов лежит определение продуктов их кислотного гидролиза – агликонов (сапогенинов), гомологов спиростана, представленных тремя основными веществами – сарсасапогенином ((25*S*)-5*β*-спиростан-3*β*-ол), глориогенином ((25*R*)-5β-спиростан-3β-ол -12-он) и маркогенином ((25*S*)-5*β*-спиростан-2*β*,3*β*-диол), с предварительной масс-спектрометрической идентификацией этих и подобных им веществ.

Нижний предел измерения концентрации суммы сапогенинов в хроматографируемом объеме пробы при доверительной вероятности $P = 0,95$ составляет 9,6 мкг/см^3.

Определению суммы стероидных сапонинов в воде не мешают использующиеся при производстве органических биоразлагаемых продуктов вспомогательные вещества.

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

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

5.1. Средства измерений

Хромато-масс-спектрометр «PolarisQ» фирмы «ThermoFinnigan», включающий в себя: масс-спектрометр с анализатором – ионной ловушкой и внешним ионным источником; газовый хроматограф «Trace GC»; колонку «Thermo TR-5ms» длиной 25 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной слоя фазы 0,25 мкм и жидкой фазой – «5 % фенил/95 % диметилполисилоксан»; систему обработки данных «Xcalibur™»; библиотеку масс-спектров NIST 02	
Весы аналитические ВЛР-200	ГОСТ 19491—74
Ротаметр РМ-063ГУЗ	ГОСТ-13045—81
Термометр лабораторный	ГОСТ 215—73Е4
Барометр	ГОСТ 23696—79
Колбы мерные 2-1000-2; 2-500-2; 2-200-2; 2-100-2; 2-50-2; 2-25-2	ГОСТ 1770—74
Пробирки мерные П-1-10-0.1	ГОСТ 1770—74
Автоматическая пипетка-степпер 10—5 000 мкл «TermoLabsystems» - «Ленпипет» с набором комбитипов объема 1,25 и 5,0 см^3	ГОСТ 28311—89
Цилиндры мерные вместимостью 10 и 100 см^3	ГОСТ 1770—74
Микрошприц МШ-10	ТУ 2.833.105

5.2. Вспомогательные устройства

Сушильный шкаф ШСС-80	ГОСТ 20790—93 ГОСТ 12.2.025—76 ГОСТ 23511—79 ТУ 92-0024346-01—92

Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—77
Колба коническая КН-1-250-29/32	ТУ 92-891.029—91
Холодильник ХШ-1-300-29-14	ГОСТ 25336—82
Флаконы из темного стекла с силиконовыми пробками, тефлоновыми прокладками, завинчивающимися пробками вместимостью 7 $см^3$ «Supelco».	
Электроплитка с закрытой спиралью	ГОСТ 14919—83
Воронка делительная ВД-3-250	ГОСТ 25336—82
Ротационный испаритель ИР-1М2	ТУ 25-1173.102—84
Колбы ГР-50-14/23	ТУ 92-891.029—91
Пробоотборная система для экологических исследований ПЭ 1420, АО «Экрос» Санкт-Петербург	
Устройство мембранной фильтрации для микробиологической пробы воды УМФ-01 ООО «Медприбор», г. Батайск	ТУ 9443-002-40557474—98

5.3. Материалы и реактивы

Метилен хлорид	ГОСТ 9968—86
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Соляная кислота, ОСЧ	ГОСТ 14261—77
Натрий сернокислый безводный, ЧДА	ГОСТ 4166—76
Ацетон	ГОСТ 2768—84
Натрий сернокислый кристаллизационный	ГОСТ 21458—75
Стандартный образец – диосгенин ((25*R*)-спирост-5-ен-3β-ol) «Fluka» (99 %) Filling code 40906254	Lot 1272227

Допускается применение других средств измерения и вспомогательных устройств, метрологические и технические характеристики которых не ниже вышеуказанных.

6. Требования безопасности

6.1. При выполнении анализов необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами ГОСТ 12.04.021—76.

6.2. При работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности по ГОСТ 12.1.019—79 и требования, изложенные в технической документации на использование приборов.

6.3. Организация обучения по безопасности труда осуществляется по ГОСТ 12.1.004—91.

6.4. Помещение должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.0.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—90

7. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке результатов допускают лиц, имеющих высшее инженерное, химическое или среднее специальное образование, владеющих методом хромато-масс-спектрометрии, знающих принцип действия, конструкцию и правила эксплуатации используемого оборудования.

К выполнению работ по отбору проб и пробоподготовке допускают лиц, имеющих квалификацию техника-химика, обученных методике подготовки проб для выполнения последующего хромато-масс-спектрометрического анализа.

8. Условия измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

Температура воздуха, °С	20 ± 5
Атмосферное давление, кПа (мм рт. ст.)	84,0—109,7 (630—800)
Влажность воздуха, %	не более 80
Напряжение в электросети, В	220 ± 10
Частота переменного тока, Гц	50 ± 1

9. Подготовка к выполнению измерений

Перед проведением измерений проводят следующие работы: подготовка лабораторной посуды, проверка работоспособности хромато-масс-спектрометра, приготовление растворов (стандартного образца и градуировочных), установление градуировочной характеристики, отбор проб.

9.1. Подготовка посуды.

При выполнении измерений необходимо использовать чистую химическую посуду. Посуду обезжиривают ацетоном, после чего ее многократно ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу при 120 °С.

9.1.1. Подготовку пробоотборной системы для экологических исследований ПЭ 1420 и устройства мембранной фильтрации УМФ-01 проводят в соответствии с инструкциями по эксплуатации этих вспомогательных устройств.

9.2. Подготовка хромато-масс-спектрометра.

Подготовку хромато-масс-спектрометра и системы обработки данных проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

9.3. Приготовление растворов

9.3.1. Приготовление основного раствора стандартного образца диосгенина от компании «Fluka» с массовой концентрацией 594,0 мкг/см^3.

Навеску диосгенина 59,4 мг, взятую на аналитических весах с точностью до второго десятичного знака переносят в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 100 см^3. Навеску растворяют в хлористом метилене, доводя объем раствора до метки. Раствор хранят в колбе не более 7-ми суток в холодильнике при +4 °С.

Абсолютная погрешность концентрации раствора стандартного образца по процедуре приготовления не превышает 0,6 мкг/см^3 (см. приложение, п. 1).

9.3.2. Приготовление градуировочных растворов.

Градуировочные растворы с массовой концентрацией в диапазоне 5,94—237,6 мкг/см^3 готовят разведением основного раствора стандартного образца диосгенина с концентрацией 594,0 мкг/см^3 хлористым метиленом в 100, 40, 20, 10, 5 и 2,5 раза, в мерных колбах на 25 см^3 с использованием пипетки-степпера 10—5 000 мкл «TermoLabsystems» - «Ленпипет» и мерного цилиндра объемом 10 см^3 (см. табл. 3).

Градуировочные растворы могут храниться в течение 2-х суток при комнатной температуре в аналитических колбах с притертой пробкой.

Таблица 3

Растворы для установления градуировочной характеристики при определении стероидных сапонинов Yucca Schidigera

№ раствора	Основной стандартный раствор диосгенина, см^3	Хлористый метилен, см^3	Концентрация диосгенина без учета погрешности приготовления растворов, мкг/см^3	Содержание диосгенина в хроматографируемом объеме пробы, мкг
1	0	25	0	0
2	0,25	до 25	5,94	0,006
3	0,625	до 25	14,85	0,014
4	1,25	до 25	29,7	0,029
5	2,5	до 25	59,4	0,059
6	5,0	до 25	118,8	0,119
7	10,0	до 25	237,6	0,238

9.4. Установление градуировочной характеристики

9.4.1. Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика диосгенина на хроматограмме стандартного раствора (в условных единицах) от его концентрации (мкг/см^3), строят с использованием градуировочных растворов, приготовленных в соответствии с табл. 3.

Для установления градуировочной характеристики отбирают микрошприцем установленное количество каждого из градуировочных растворов, приготовленных по п. 9.3.2 и вводят в инжекторное устройство хромато-масс-спектрометра.

9.4.2. Условия хроматографирования градуировочных смесей и анализируемых проб – следующие:

Температурная программа	80 °С изотерма 2 мин, далее программируемый нагрев до 320°С со скоростью 20 °С/мин и изотерма 5 мин при 320 °С
Условия инжекции	инжектор без деления потока, температура инжектора 275 °С
Объем вводимой пробы	0,001 см^3
Газ носитель	гелий со скоростью 1 см^3/мин
Время удерживания пика диосгенина	17,39 мин
Регистрация масс-спектров	в положительных ионах в диапазоне 30—600 m/z
Тип ионизации	электронный удар, стандартные условия
Идентификация веществ	по библиотеке масс-спектров NIST 02
Оценка площадей пиков	по полному ионному току

На хроматограмме стандартного раствора диосгенина присутствует пик № 1 (см. прилож. п. 3). Идентификацию пиков при построении градуировочной характеристики проводят по их временам удержания и регистрации масс-спектра в положительных ионах в диапазоне 30—600 m/z.

Для установления градуировочной характеристики каждый раствор хроматографируется не менее 5 раз. Градуировочный график в этом случае строится с учетом усредненных значений сумм площадей пика № 1.

9.4.3. Контроль стабильности градуировочной характеристики осуществляют еженедельно, а также при использовании новых реактивов и растворов. Критерий стабильности градуировочной характеристики приведен в приложении п. 2.

9.5. Отбор проб воды

9.5.1. Отбор проб воды для выполнения последующего хромато-масс-спектрометрического анализа проводят в соответствии с ГОСТ 17.1.5.05—85 и ГОСТ Р 51592—2000 с помощью устройства ПЭ 1420. Непосредственно после этого образцы воды отфильтровывают с помощью устройства УМФ-01 через мембранные фильтры МФАС-М-1 с размером пор 0,45 мкм (входят в комплект устройства УМФ-01). Фильтрат помещают в мерную колбу и доводят его объем до 100 $см^3$.

9.5.2. При маркировке проб указывают:

номер пробы;

наименование и местонахождение водоема

место отбора пробы (глубина, расстояние от берега);

время отбора пробы;

температура воды в день отбора пробы и за последние 10 дней, сила и направление ветра;

должность и ФИО лица, производившего отбор проб;

Срок хранения отфильтрованных проб – не более 3 суток.

Отфильтрованные пробы хранят в защищенном от света месте при 4 ± 1 °С.

9.5.3. Для определения суммы стероидных сапонинов Yucca Schidigera на уровне 0,5 ПДК (2,5 $мг/дм^3$) достаточно отобрать пробу воды объемом 8,0 $см^3$.

10. Выполнение измерений

10.1. Пробу из мерной колбы на 100 $см^3$ (п. 9.5.1) количественно переносят в коническую колбу КН-1-250-29/32 объемом 250 $см^3$ с обратным холодильником.

Затем добавляют в коническую колбу КН-1-100-29/32 с обратным холодильником 10 $см^3$ соляной кислоты и помещают на электроплитку с закрытой спиралью. Смесь в колбе кипятят с обратным холодильником 4 часа. Затем охлаждают до комнатной температуры и количественно переносят в делительную воронку. Добавляют в воронку 14 $см^3$ хлористого метилена и энергично встряхивают. После расслоения жидкости в воронке, нижний органический слой сливают в грушевидную колбу ГР-100-14/23, и повторяют процедуру экстракции еще дважды, объединяя порции хлористого метилена в колбе ГР-100-14/23. Добавляют в колбу 2 г безводного сульфата натрия для осушения экстракта, закрывают колбу пришлифованной пробкой и помещают колбу в темное место на 1 ч. Переливают содержимое колбы в новую колбу ГР-100-14/23,

осадок сульфата натрия должен остаться в первой колбе. Осадок и первой колбе обмывают два раза 5-ю $см^3$ хлористого метилена и объединяют эти фракции с основным экстрактом во второй колбе. Подсоединяют вторую колбу к ротационному испарителю ИР-1М2. Упаривают хлористый метилен до объема 2—4 $см^3$. Переносят остатки хлористого метилена в мерный цилиндр на 10 $см^3$, и доводят объем раствора до 5 $см^3$ хлористым метиленом. Содержимое цилиндра быстро переносят для хранения во флаконы вместимостью 7 $см^3$, из темного стекла с герметично закрывающимися крышками, снабженными силиконовыми уплотнителями с тефлоновыми прокладками. Флаконы маркируют, отмечая на каждом флаконе «номер пробы» п. 9.5.2, и передают в лабораторию для хромато-масс-спектрометрического анализа. Срок хранения проб – не более 7 суток при 4 ± 1 °С.

Хромато-масс-спектрометрический анализ проб проводят в условиях, соответствующих п. 9.4.2.

10.2. На хроматограмме экстракта гидролизата «ОБП-1054» (см. прилож. п. 4) в районе 15—18 мин присутствуют 9 пиков стероидных сапогенинов со временами удерживания 15,37; 15,47; 15,60; 16,74; 16,86; 17,09; 17,16; 17,35 (двойной) и 17,62 мин. По библиотеке спектров идентифицированы основные компоненты гидролизата: сарсасапогенин – 17,35 мин, глориогенин – 17,16 мин и маркогенин – 17,62 мин.

Для оценки общего количества сапогенинов в минерализате вычисляется сумма площадей всех 9-ти пиков. По градуировочной характеристике, п. 9.4, находят общее количество сапогенинов.

10.3. Для перехода от содержания сапогенинов в минерализате к сумме сапонинов в растворе, полученном в п. 10.1, применяется пересчетный коэффициент – *К*, учитывающий молекулярные массы сапогенинов и сапонинов Yucca Schidigera и массовое соотношение отдельных сапонинов в «ОБП-1054» (см. прилож. п. 5).

С учетом данных, приведенных в таблице в п. 2.1, *К* принимает значение 1,99.

10.4. Содержание суммы сапонинов Yucca Schidigera X_{Sap} (мг) в пробе, полученной в п. 9.5.1, вычисляют по формуле:

$$X_{Sap} = \frac{K \times C_{agl} \times 5}{1\,000} = \frac{1{,}99 \times C_{agl} \times 5}{1\,000} = 0{,}01 \times C_{agl}, \text{ где} \qquad (1)$$

C_{agl} – концентрация агликонов в минерализате, полученная по градуировочной характеристике, мкг/$см^3$

11. Вычисление результатов измерений

11.1. Концентрацию суммы сапонинов Yucca Schidigera (C, мг/дм^3)» в воде вычисляют по формуле:

$$C = \frac{X_{Sap} \times 1\,000}{100} = X_{Sap} \times 10, \text{ где} \qquad (2)$$

X_{Sap} – содержание суммы сапонинов Yucca Schidigera, из формулы (1), мг;

100 – объем воды, отобранный для анализа, см^3

11.2. За результат измерения массовой концентрации суммы сапонинов Yucca Schidigera в воде водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения $\overline{C}$ принимают среднее арифметическое значение «n» (двух) результатов измерений C_1 и C_2, полученных в условиях повторяемости (две пробы воды, взятые из одного устройства ПЭ 1420 при одном отборе)

$$\overline{C} = \frac{C_1 + C_2}{2} \qquad (3)$$

для которых выполняется следующее условие:

$$|C_1 - C_2| \le r \ (C_1 + C_2)/200, \text{ где} \qquad (4)$$

r – предел повторяемости, значения которого приведены в табл. 2.

При невыполнении условия (4) необходимо дополнительно получить еще два результата измерений.

Если при этом размах ($C_{max} - C_{min}$) четырех результатов измерений равен или меньше по значению критического диапазона для уровня значимости 95 % $CR_{0\,95(4)}$, то в качестве окончательного результата принимают среднее арифметическое значение результатов четырех измерений. Коэффициенты критического диапазона $f(n)$ представлены в таблице 1

ГОСТ Р ИСО 5725-2002, часть 6 и предназначены для использования в расчетах критического диапазона согласно равенству:

$$CR_{0\,95}(n) = f(n)\sigma_r, \ (\text{для } n = 4,\ f(n) = 3{,}6) \qquad (5)$$

Если диапазон результатов четырех измерений больше критического диапазона для $n = 4$, то в качестве окончательного результата должна фиксироваться медиана результатов четырех измерений.

12. Оформление результатов измерений

Результаты измерений концентрации суммы сапонинов Yucca Schidigera оформляют протоколом в виде:

$$C \pm 0{,}01 \cdot \delta \cdot C_{ср}, \text{ где} \qquad (6)$$

$C_{ср}$ – среднее арифметическое значение результатов n (двух) определений, признанных приемлемыми (п. 11.2), мг/м^3;

δ – границы относительной погрешности, %, значение приведено в таблице 1.

В случае, если содержание суммы сапонинов Yucca Schidigera в воде водоемов ниже нижней (выше верхней) границы диапазона измерений, отчет представляют в форме «массовая концентрация суммы сапонинов Yucca Schidigera в воде водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения ниже 0,48 мг/м^3 (выше 15 мг/дм^3).

13. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Периодичность контроля стабильности результатов выполненных измерений регламентируется в Руководстве по качеству лаборатории.

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории при реализации методики осуществляют по ГОСТ Р ИСО 5725-6, используя метод контроля стабильности среднеквадратичного (стандартного) отклонения повторяемости по п. 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6 и показателя правильности по п. 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта.

Рекомендуется устанавливать контрольный период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

14. Нормы затрат времени на анализ

Для проведения серии анализов из 5 проб воды с учетом дублирования каждой пробы, согласно п. 11.2, при условии отсутствия этапа хранения проб и при технической возможности проведения параллельной (п. 10.1) пробоподготовки 10-ти проб, требуется 12 часов.

Приложение

1. Абсолютная погрешность приготовления раствора стандартного образца рассчитывается по формуле:

$$\left(\frac{\sigma_X}{C_x}\right)^2 = \left(\frac{\sigma_m}{M}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_v}{V}\right)^2, \text{ где} \qquad (7)$$

σ_X – абсолютная погрешность приготовления раствора;

C_x– концентрация приготовленного раствора, 47,5 мкг/мл;

σ_m – погрешность взвешивания;

M – масса навески;

σ_v – волюметрическая погрешность для колбы 100 см^3;

V – объем мерной колбы.

2. Калибровочная характеристика считается стабильной при выполнении для каждого образца градуировочных растворов следующего условия:

$$| X - Cгр.| \le 1{,}96 \cdot \sigma_{R_л}(гр) \cdot Cгр./100, \text{ где} \qquad (8)$$

X – результат контрольного измерений массовой концентрации в образце для градуировки, мкг/см^3;

$Cгр.$ – аттестованное значение массовой концентрации диосгенина в образце для градуировки, мкг/см^3;

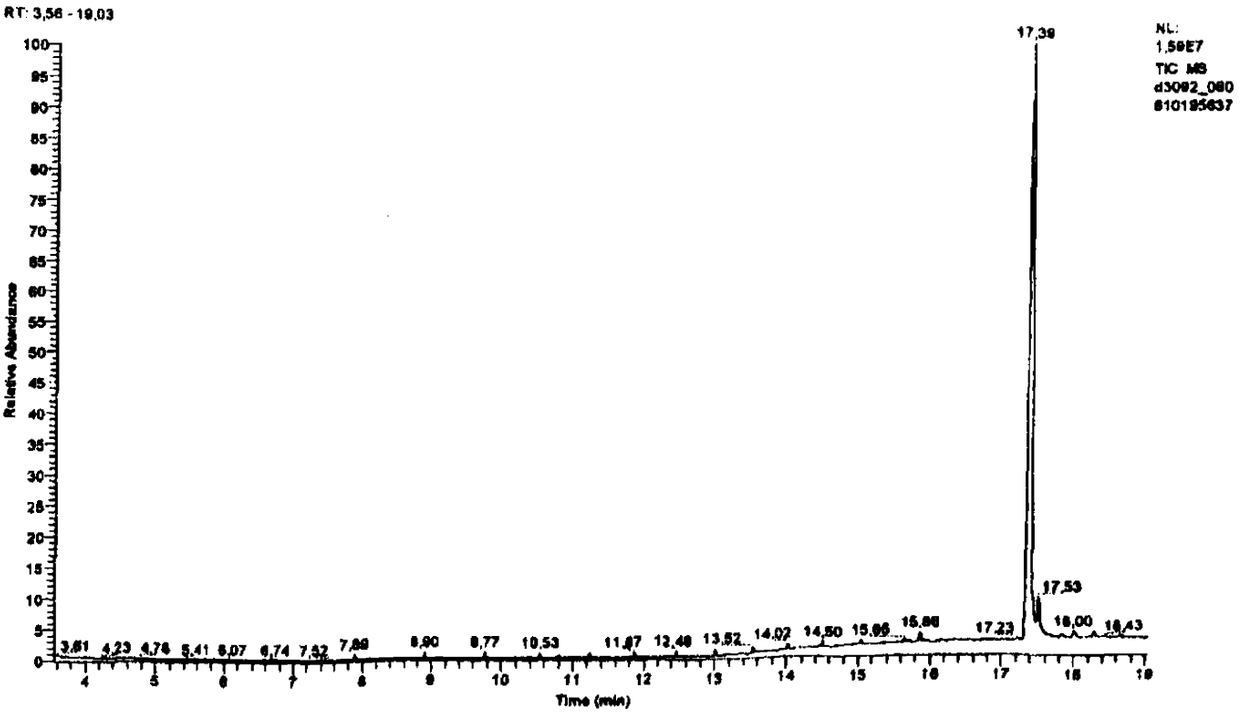
$\sigma_{Rл}(гр.)$ – среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности измерений, установленное при реализации методики в лаборатории, %.

Допустимое среднеквадратичное отклонение внутрилабораторной прецизионности измерений при внедрении методики в лаборатории устанавливать на основе выражения: $\sigma_{Rл}(гр.) = 0{,}84\sigma_R(гр.)$, с последующим уточнением по мере накопления информации в процессе контроля стабильности результатов измерений.

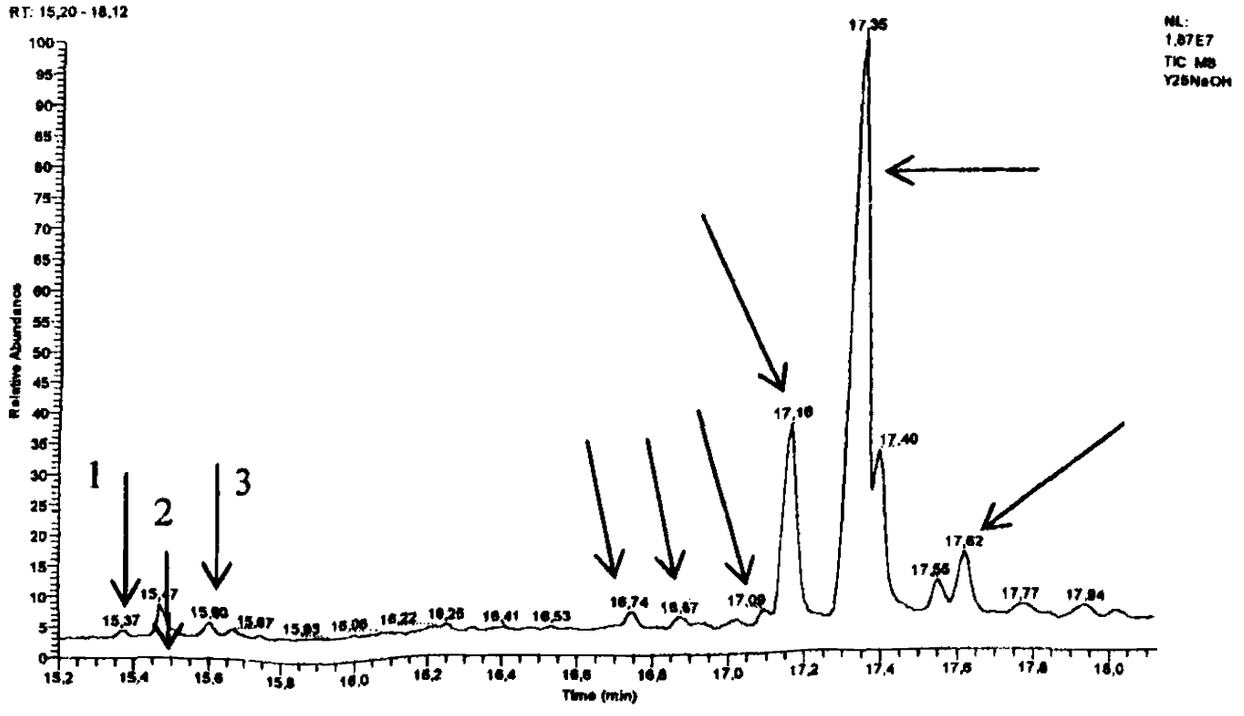
Значение $\sigma_R(гр.)$ составляет 1,4—6,8 % в пределах градуировочной характеристики.

В случае невыполнения данного условия, градуировочная характеристика строится заново.

3. Хроматограмма стандартного образца диосгенина.



4. Хроматограмма экстракта гидролизата образца водного раствора «ОБП-1054».



№ пика	время удерживания
1	15,37
2	15,47
3	15,60
4	16,74
5	16,87
6	17,09
7	17,16
8	17,35
9	17,62

5.

$$K = \frac{0,24\,M^{S}_{N1} + 0,66\,\bar{M}^{S}_{N2/N3} + 0,001 M^{S}_{N4} + 0,031\,M^{S}_{N5} + 0,068\,\bar{M}^{S}_{N6/N7/N8}}{0,24\,M^{a}_{N1} + 0,66\,\bar{M}^{a}_{N2/N3} + 0,001\,M^{a}_{N4} + 0,031\,M^{a}_{N5} + 0,068\bar{M}^{a}_{N6/N7/N8}} \quad (10)$$

В числителе находится средняя молекулярная масса сапонинов, в знаменателе – средняя молекулярная масса агликонов с учетом нормировки по содержанию сапонинов в «ОБП-1054».

gost.e-ecolog.ru