سازمان حفاظت محیط زیست ایران

بخش هیدروکربنهای نفتی و سموم آزمایشگاه مرجع

دستورالعمل سنجش سموم کلره در نمونه های آب، خاک و بافت زنده

Determination of Chlorinated Pesticides in Water, Sediment and Biota

سازمان حفاظت محیط زیست

تهیه کنندگان :

اعظم صادق اسدی

آزاده اکرام جعفری

المیرا دارابی

هنگامه اکبرنژاد

نسخه :

۰۰ - ۱۳۸۸

۱- هدف :

اندازه‌گیری سموم کلره در نمونه‌های خاک، رسوب، آب و بافت زنده توسط دستگاه GC مجهز به دتکتور ECD.

۲- دامنه کاربرد :

این دستورالعمل برای کلیه نمونه های خاک، رسوب، آب و بافت زنده (Biota) کاربرد دارد.

۳- تجهیزات :

- ظروف شیشه ای شامل بالون، در شیشه ای سنباده ای، بشر، ارلن مایر، قیف جداکننده، پیپت پاستور، استوانه مدرج
- فریز درایر و هاون چینی
- روتاری اواپریتور و پمپ خلاء
- آون
- اجاق منتلی و ظروف شیشه ای سوکسله
- ترازوی آنالیتیکال با دقت ۰/۱ میلی گرم
- ترازوی الکتروبالانس با دقت ۱ میکرو گرم
- دسیکاتور
- منبع جریان گاز نیتروژن تمیز
- ستون کروماتوگرافی شیشه ای
- دستگاه کروماتو گرافی گازی با دتکتور ECD (GC/ECD)

٤- مواد شیمیایی مصرفی :

- اسید سولفوریک غلیظ ٪۹۸-۹۵ Extra pure
- اسید کلریدریک غلیظ ٪۳۷ Extra pure
- هگزان نرمال n-Hexane for liquid chromatography
- دی کلرومتان Dichloromethane for chromatography
- متانول Gradient grade for liquid chromatography
- استون Acetone for residue analysis

سازمان حفاظت محیط زیست

- سیلیکا با مش ۴۰۰-۲۳۰
- آلومینا با مش ۲۳۰-۷۰
- پودر مس با مش ۲۰۰
- پشم شیشه
- سولفات سدیم بدون آب
- سنگ جوش
- تیمبل با سایز ۳cm*۹
- استاندارد داخلی PCB۲۹, PCB۱۹۸, Endosulfan Id$_۴$, ε-HCH

۵- آماده سازی

۵-۱- شستشوی ظروف

- کلیه ظروف مورد استفاده جهت آنالیز مقادیر کم ترکیبات آلی از جنس Pyrex می باشد.
- جهت شستشوی ظروف ابتدا آنها را با آب داغ و برس تمیز کرده و سپس به مدت چند ساعت (یک شب) داخل محلول رقیق شده مایع ظرفشویی گذاشته و بعد از این مرحله ده مرتبه با آب داغ آنها را تمیز می کنیم. (در مورد قطعات کوچک ظروف می توان آنها را به مدت ده دقیقه در حمام اولتراسونیک با دترجنت قرار داد و سپس با آب داغ آنها را شستشو داد.) بعد از این مرحله ظروف را با آب دیونیزه شستشو داده سپس در داخل آون در دمای ۲۰۰ درجه قرار داده می شود.

نکته ۱) بایستی دقت نمود این دما برای ظروف شیشه ای حجم سنجی استفاده نمی شود.

نکته ۲) آونی که جهت تمیز کردن ظروف شیشه ای استفاده می شود نباید جهت موارد دیگر مورد استفاده قرار گیرد.

نکته ۳) از آنجا که ممکن است آلودگیهای محیطی بر روی سطح ظروف شیشه ای جمع شوند باید بلافاصله بعد از شستشوی ظروف آنها را با استون و هگزان آب کشی نموده و از آنها استفاده گردد یا در هود لامینار نگهداری شود. در صورت در دسترس نبودن این هود از فویل آلومینیومی که با حلال استون یا هگزان تمیز شده است جهت حفاظت ظروف شیشه ای استفاده می گردد.

نکته ۴) با توجه به موارد ذکر شده زمان نگهداری ظروف شسته شده محدود می باشد.

سازمان حفاظت محیط زیست

۵-۲- تمیز کردن واکنشگرها

تمامی پودرها یا واکنشگرهای کریستالی مانند سولفات سدیم و هیدروکسید پتاسیم، پشم شیشه و سنگ جوش باید قبل از استفاده تمیز شوند. برای این کار ابتدا هشت ساعت با هگزان و سپس هشت ساعت دیگر با متانول یا دی کلرومتان (و یا هشت ساعت با مخلوط هگزان : دی کلرومتان با نسبت ۱:۱) سوکسله می شوند و پس از آن ۲۴ ساعت در کوره ۴۰۰ درجه سانتیگراد خشک می شوند.

۵-۳- خشک کردن نمونه (Freeze Dry)

نمونه های خاک و Biota (بافت موجود زنده) قبل از استخراج باید خشک شوند که برای این منظور از دستگاه فریز درایر استفاده می شود.

٦- شرح انجام آزمون

٦-١- نمونه های آب

٦-١-١- استخراج

حدود ۱ لیتر از آب مورد نظر را داخل دکانتور ریخته و سپس ۸۰ میلی لیتر هگزان نرمال به آن اضافه نموده، سپس یک میلی لیتر از محلول PCB۲۹, PCB۱۹۸, Endosulfan $Id_{۴}$, ε-HCH با غلظت حدود ۲۰ ng/ml که به عنوان استاندارد داخلی به کار می رود، به محتویات دکانتور اضافه می نماییم. حال آن را ۳ بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه تکان داده (بهتر است تکان دادن بصورت عدد ۸ باشد) پس از تشکیل دو فاز، فاز زیرین (آبی) را در دکانتور دیگری ریخته و فاز رویی (آلی) را در یک بالون ۲۵۰ میلی لیتری جمع می کنیم. به محتویات دکانتور مجددا ۸۰ میلی لیتر هگزان نرمال افزوده و دوباره تکان می دهیم. صبر می کنیم تا دو فازمورد نظر (آبی و آلی) تشکیل شود. حجم فاز زیرین (آبی) را به وسیله استوانه مدرج اندازه گرفته و فاز رویی (آلی) را در بالون قبلی جمع آوری می کنیم. لازم به ذکر است پارامترهای مورد نظر در فاز آلی جمع آوری می شوند.

٦-١-٢- محاسبه بازده استخراج

- محاسبه بازده استخراج PCB ۲۹, PCB ۱۹۸

بازده استخراج PCB ۲۹ به صورت زیر محاسبه می شود :

$$Q\ PCB\ ۲۹ = \frac{\text{سطح زیر پیک استاندارد داخلی در نمونه} * \text{مقدار استاندارد داخلی (pg)} * \text{حجم نهایی (µl)}}{\text{سطح زیر پیک استاندارد داخلی به تنهایی} * \text{حجم تزریق (µl)}}$$

$$R= \frac{Q\ PCB\ ۲۹}{\text{مقدار استاندارد داخلی در (ml)}۱} \times ۱۰۰$$

به همین روش بازده استخراج PCB ۱۹۸ را نیز محاسبه کرده و میانگین می گیریم :

$$Q\ PCB\ ۱۹۸ = \frac{\text{سطح زیر پیک استاندارد داخلی در نمونه} * \text{مقدار استاندارد داخلی (pg)} * \text{حجم نهایی (µl)}}{\text{سطح زیر پیک استاندارد داخلی به تنهایی} * \text{حجم تزریق (µl)}}$$

$$R= \frac{Q\ PCB\ ۱۹۸}{\text{مقدار استاندارد داخلی در (ml)}۱} \times ۱۰۰$$

$$\bar{R}= \frac{R\ PCB\ ۲۹ + R\ PCB۱۹۸}{۲}$$

-محاسبه بازده استخراج $Endosulfan\ Id_۴$ و ε-HCH

بازده استخراج $Endosulfan\ Id_۴$ و ε-HCH را مانند PCB ۲۹ محاسبه می کنیم. بازده $\bar{R}$ PCB در محاسبه ترکیبات بدست آمده در فراکسیون اول بازده ε-HCH جهت فراکسیون دوم و بازده استخراج $Endosulfan\ Id_۴$ در فراکسیون سوم به کار می رود.

٦-۱-۳- تغلیظ

نمونه را با روتاری اواپریتور به حجم ۱۵-۱۰ میلی لیتر رسانده و سپس آن را با گاز نیتروژن خشک و تمیز با درجه خلوص (٪۹۹/۹۹۹۵) به حجم ۱ میلی لیتر می رسانیم. لازم است روتاری اواپریتور با دور ۹۰ r/min تنظیم شده و دمای حمام بیش از ۳۰ °C نباشد.

نکته : قدرت خلأ و دمای حمام دو عامل وابسته به یکدیگر در روتاری اواپریتور می باشند. زمانیکه خلأ ضعیف باشد دمای حمام آب باید افزایش یابد. (۴۰-۳۵°C)

سازمان حفاظت محیط زیست

٦-١-٤-جداسازی

برای جداسازی از ستون فلورسیل که به صورت زیر آماده می شود، استفاده می کنیم. به منظور حذف هر گونه آلودگی ابتدا فلورسیل را هشت ساعت با هگزان و سپس هشت ساعت دیگر با متانول یا دی کلرومتان (یا ۸ ساعت مخلوط هگزان : دی کلرومتان با نسبت ۵۰ :۵۰) سوکسله و در آون خشک می کنیم. فلورسیل را با قرار دادن در آون $130^{\circ}C$ به مدت ۱۲ ساعت فعال می کنیم. سپس با آب مقطر به مقدار ۰/۵ درصد وزنی فلورسیل آن را غیر فعال کرده در ظرف شیشه ای با در محکم ریخته و خوب تکان می دهیم. اجازه می دهیم یک شب بماند تا به تعادل برسد.

از یک بورت شیشه ای ۵۰ میلی لیتری با قطر ۱ cm و شیر تفلونی جهت کروماتوگرافی ستونی استفاده می کنیم. انتهای ستون را با پشم شیشه پر می کنیم. ۱۸ گرم فلورسیل وزن کرده، اجازه می دهیم به تدریج فلورسیل داخل ستون بنشیند. سپس ۱ گرم سولفات سدیم بدون آب تمیز شده بالای ستون اضافه می کنیم تا از سطح فلورسیل محافظت کند.

نمونه را روی سولفات سدیم داخل بورت ریخته و در نهایت فراکسیون F_1 از ستون خارج می شود. نحوه جداسازی هر یک از فراکسیون های F_1، F_2 و F_3 به شرح ذیل می باشد :

: F1

برای خارج کردن این فراکسیون ۷۰ میلی لیتر هگزان را داخل ستون می ریزیم. سرعت عبور حلال باید طوری باشد که نه زیاد پیوسته و نه خیلی کند باشد. زمانیکه ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر هگزان در بالای ستون است شیر بورت را می بندیم. در طی این مرحله ظرف زیر ستون حاوی فراکسیون F_1 است که شامل Organo Chlorinated Pesticides مثل HCB (هگزاکلروبنزن) و PP',OP'-DDE و آلدرین و هپتاکلر و DDMU (DDE متابولیزه شده) می باشد.

: F2

جهت خارج کردن این فراکسیون ۴۵ میلی لیتر مخلوط هگزان : دی کلرومتان (۷ : ۳) را داخل ستون می ریزیم. سرعت عبور حلال باید طوری باشد که نه زیاد پیوسته و نه خیلی کند باشد. زمانیکه ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر هگزان در بالای ستون است شیر بورت را می بندیم. در طی این مرحله ظرف زیر ستون حاوی فراکسیون F_2 است که شامل OC ها مثل α -HCH , Lindane , OP-DDD , PP'-DDD , OP-DDT , DDT , PP'- Toxaphen و استاندارد داخلی ε-HCH می باشد.

:F۳

جهت خارج کردن این فراکسیون ۷۰ میلی لیتر دی کلرومتان را داخل ستون می ریزیم. سرعت عبور حلال باید طوری باشد که نه زیاد پیوسته و نه خیلی کند باشد. زمانیکه ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر هگزان در بالای ستون است شیر بورت را می بندیم. در طی این مرحله ظرف زیر ستون حاوی فراکسیون F_3 است که شامل OC ها مانند Endosulfan Sulphate , Endrin , Dieldrin , α,β-Endosulphan و استاندارد داخلی $Endosulfan\ Id_4$ می باشد.

٦-١-٥-تغلیظ مجدد

نمونه را با روتاری اواپریتور به حجم ۱۵-۱۰ میلی لیتر رسانده و سپس آن را با گاز نیتروژن خشک و تمیز با درجه خلوص (٪۹۹/۹۹۹۵) به حجم ۱ میلی لیتر می رسانیم. در نهایت ۱ میکرولیتر از فراکسیونهای F_1، F_2 و F_3 تغلیظ شده را به منظور آنالیز سموم کلره به دستگاه GC/ECD تزریق کنید.

٦-٢- نمونه های خاک و رسوب

٦-٢-١-استخراج

ابتدا نمونه فریز درای شده را از الک ۲۵۰ µm عبور داده، سپس ۲۰-۱۰ گرم از این نمونه را وزن کرده و داخل تیمبل (Thimble) می ریزیم. نباید تیمبل را با دست گرفت به همین دلیل آن را با پنس گرفته یا دور انگشتان فویل آلومینیومی می پیچیم.

یک میلی لیتر از محلول$PCB_{29}, PCB_{198}, Endosulfan\ Id_4, \varepsilon$- HCH با غلظت حدود ۲۰ ng/ml به عنوان استاندارد داخلی به تیمبل اضافه می کنیم. به این ترتیب عمل استخراج به کمک ۲۵۰ میلی لیتر مخلوط حلالهای هگزان-دی کلرومتان به نسبت (۵۰ : ۵۰) و تعدادی سنگ جوش به مدت ۸ ساعت انجام می گیرد.

لازم است استاندارد داخلی، جزء اجزا تشکیل دهنده نمونه نبوده و پیک آن هم خارج از محدوده پیک نمونه ظاهر شود. علت افزایش استاندارد داخلی این است که می توان بازده استخراج را تعیین نمود.

٦-٢-٢-محاسبه بازده استخراج

جهت محاسبه بازده استخراج به بند ۶-۱-۲ مراجعه کنید.

٦-٢-٣-گوگرد زدایی با استفاده از پودر مس

از پودر مس برای حذف گوگرد آزاد و مرکاپتانهای موجود در نمونه های خاک و رسوب استفاده می شود. زیرا این ترکیبات هنگام آنالیز با GC باعث ایجاد مزاحمت می شوند. آماده سازی به صورت زیر می باشد :

۲۰ گرم از پودر مس را داخل ارلن مایر ریخته و به آن اسید HCl غلیظ اضافه می کنیم تا سطح پودر مس را بپوشاند. آن را تکان می دهیم سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار می دهیم. ارلن را از حمام بیرون آورده و تکان می دهیم و بمدت ۱۰ دقیقه دیگر در حمام قرار می دهیم. اسید استفاده شده قبلی که روی پودر مس قرار دارد را دور ریخته، مقداری HCl تازه به آن اضافه کرده و ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار می دهیم. این عمل را ۴ بار تکرار می کنیم.

(در هر بار اسید قبلی را دور ریخته و مقداری اسید جدید می افزاییم.) سپس اسید را دور ریخته و آب مقطر اضافه می کنیم. ارلن را تکان می دهیم و آب را دور می ریزیم. مجددا آب اضافه کرده و ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار می دهیم. پس از آن آب را دور ریخته و این عمل را تا خنثی شدن pH تکرار می کنیم. سپس مس را با استون شسته، تکان می دهیم و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار می دهیم. این عمل را نیز ۴ بار تکرار می کنیم. همین کار را با حلال هگزان نیز انجام می دهیم. در پایان مس را داخل هگزان نگهداری می کنیم. (مس باید سریع استفاده شود و سطح آن با هوا تماس نداشته باشد زیرا ممکن است با سولفور موجود در هوا واکنش دهد.) مقداری از پودر مس را به نمونه استخراج شده می افزاییم و اجازه می دهیم یک شب بماند تا مس واکنش دهد. حضور گوگرد و ترکیبات آن در نمونه با سیاه شدن رنگ مس مشخص می شود.

٦-٢-٤- تغلیظ

نمونه را با روتاری اواپریتور به حجم ۱۵-۱۰ میلی لیتر رسانده و سپس آن را با گاز نیتروژن خشک و تمیز با درجه خلوص (٪۹۹/۹۹۹۵) به حجم ۱ میلی لیتر می رسانیم. لازم است روتاری اواپریتور با دور ۹۰ r/min تنظیم شده و دمای حمام بیش از ۳۰ °C نباشد.

٦-٢-٥-جداسازی

جهت جداسازی ترکیبات به بند ۶-۱-۴ مراجعه کنید.

٦-٢-٦-تغلیظ مجدد

نمونه را با روتاری اواپریتور به حجم ١٥-١٠ میلی لیتر رسانده و سپس آن را با گاز نیتروژن خشک و تمیز با درجه خلوص (٪٩٩/٩٩٩٥) به حجم ١ میلی لیتر می رسانیم. در نهایت ١ میکرولیتر از فراکسیونهای F_1، F_2 و F_3 تغلیظ شده را به منظور آنالیز سموم کلره به دستگاه GC/ECD تزریق کنید.

٦-٣- نمونه های Biota

٦-٣-١-استخراج

ابتدا نمونه فریز شده را داخل هاون ریخته و خوب خرد میکنیم. ١٠-٥ گرم از این نمونه را وزن کرده، داخل تیمبل (Thimble) می ریزیم. برای این کار نباید تیمبل را با دست گرفت به همین دلیل آن را با پنس گرفته یا دور انگشتان فویل آلومینیومی می پیچیم. یک میلی لیتر از محلول PCB٢٩, PCB١٩٨, Endosulfan Id_4, ε-HCH با غلظت حدود ٢٠ ng/ml به عنوان استاندارد داخلی به تیمبل اضافه می کنیم. به این ترتیب عمل استخراج به کمک ٢٥٠ میلی لیتر حلال هگزان و تعدادی سنگ جوش به مدت ٨ ساعت انجام می گیرد. لازم است استاندارد داخلی، جزء اجزا تشکیل دهنده نمونه نبوده و پیک آن هم خارج محدوده پیک نمونه ظاهر شود. علت افزایش استاندارد داخلی این است که می توان بازده استخراج را تعیین نمود.

٦-٣-٢-محاسبه بازده استخراج

جهت محاسبه بازده استخراج به بند ٦-١-٢ مراجعه کنید.

٦-٣-٣-تعیین مقدار لیپید ها

برای تعیین مقدار لیپیدها نیاز به Hot Plate داریم تا بتوانیم هگزان موجود در نمونه ها را تبخیر کنیم.
محاسبات بصورت زیر صورت می گیرد :
یک تکه کوچک کاغذ آلومینیومی را بصورت ظرف کوچکی درآورده روی ترازو قرار می دهیم . وزن آنرا صفر می کنیم. مقدار ١٠ مایکرولیتر از نمونه را با دقت ١ میکروگرم وزن کرده و بر روی این کاغذ آلومینیوم ریخته، کاغذ را روی Hot Plate قرار می دهیم. بعد از تبخیر شدن حلال دوباره کاغذ آلومینیوم را وزن می کنیم. این کار را سه بار تکرار می کنیم.

Hexane Extractable Organic Matter : Calculations

۱- Weight of ۱۰ µl of extract : ۴۸۰ µg
۲- Weight of ۱۰ µl of extract : ۵۲۰ µg
۳- Weight of ۱۰ µl of extract : ۵۰۰ µg

Average of ۳ determinations : ۵۰۰ µg
For ۱ µl : ۵۰ µg
If the total volume of the extract is ۱۰ ml , the total quantity of lipids in the sample will be : ۵۰ x ۱۰۰۰۰ = ۵۰۰۰۰۰ µg or : ۵۰۰ mg .

For ۱۰ g of sample extracted : H.E.O.M. = ۵۰ mg/g .

چون مقدار چربی موجود در ۱ میلی لیتر از نمونه ۵۰ mg می باشد بنابراین ۲ میلی لیتر از نمونه را برداشته و برای ترکیبات دیلدرین و اندرین فراکسیون سوم که در اثر فر آیند چربی گیری با اسید سولفوریک از بین می روند ستون می زنیم. باقیمانده نمونه را چربی گیری می کنیم.

Dieldrin and Endrin in Biota Sample :

With the sample above : H.E.O.M. = ۵۰۰ mg of lipids in ۱۰ ml = ۵۰ mg lipids / ml of extract .

An aliquot of ۲ ml of the extract will contain ۱۰۰ mg of lipids , this aliquot can be applied to the Florisil column in order to obtain Dieldrin and Endrin .

٦-٣-٤-خارج کردن چربی با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ

برای این کار نمونه را در یک قیف دکانتور ۵۰۰ میلی لیتری ریخته و حدود ۵۰-۴۰ میلی لیتر هگزان به آن افزوده تا نمونه رقیق شود. سپس ۱۵-۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن افزوده و شیک می کنیم. فاز هگزانی را جدا کرده و به آن سولفات سدیم افزوده تا از ورود چربی چسبیده به جداره و یا منتقل شده از دکانتور به فاز هگزان جلوگیری شود.

سازمان حفاظت محیط زیست

٦-٣-٥-تغلیظ

فاز آلی بدست آمده (هگزان) را با روتاری اواپریتور به حجم ١٥-١٠ میلی لیتر رسانده و سپس آن را با گاز نیتروژن خشک و تمیز با درجه خلوص (٪٩٩/٩٩٩٥) به حجم ١ میلی لیتر می رسانیم.

٦-٣-٦-جداسازی

جهت جداسازی ترکیبات به بند ٦-١-٤ مراجعه کنید.

٦-٣-٧-تغلیظ مجدد

نمونه را با روتاری اواپریتور به حجم ١٥-١٠ میلی لیتر رسانده و سپس آن را با گاز نیتروژن خشک و تمیز با درجه خلوص (٪٩٩/٩٩٩٥) به حجم ١ میلی لیتر می رسانیم. در نهایت ١ میکرولیتر از فراکسیونهای F_1، F_2 و F_3 تغلیظ شده را به منظور آنالیز سموم کلره به دستگاه GC/ECD تزریق کنید.

٧- آنالیز

اندازه گیری سموم کلره با تزریق ١ میکرولیتر از فراکسیونهای F_1، F_2 و F_3 تغلیظ شده بوسیله دستگاهGC/ECD با ستون کاپیلاری HP٥ صورت می گیرد. برنامه دمایی مورد استفاده جهت آنالیز بر طبق کتاب استاندارد MOOPAM به صورت زیر می باشد :

Carrier gas: N٢

Detector: ٣٥٠°c

Injector: ٢٢٥°c

Initial temperature: ٦٠°C hold ٢ min

Temperature program: ٦٠°C to ٢٦٠ °C at ٣ °C /min

Final temperature: ٢٦٠°C hold ١٥ min

٨- محاسبات

مقدار ترکیب Y در نمونه تزریق شده **Qy = Quantity of compound Y in the sample injected**

$$Qy = \frac{PAySampl. \times QStd \times FVol}{} \times \frac{١٠٠}{}$$

PAyStd x Vol.Inj. % Recovery

[C Y] = Qy / Quantity Extracted

Where :

PAySam. = Peak Area of compound Y in the Sample سطح زیر پیک ترکیب Y در نمونه

QStd = Quantity of Standard injected غلظت استاندارد تزریق شده

FVol. = Final Volume of the Extract in µl حجم تغلیظ شده نهایی

PAyStd.= Peak Area of Standard Y injected سطح زیر پیک استاندارد Y تزریق شده

Vol.Inj. = Volume of Sample Injected in µl حجم نمونه تزریق شده

CY = Concentration of Compound Y in the Sample غلظت ترکیب Y در نمونه

۹-گزارش

موارد زیر در گزارش ذکر شود :

- ارجاع به استاندارد بین المللی
- مشخصات کامل نمونه
- نتیجه آنالیز با دو رقم اعشار
- هر گونه مشکل و وضعیت خاص در طی مراحل آزمون

۱۰- مراجع و مستندات مرتبط

-استاندارد MOOPAM

سازمان حفاظت محیط زیست