سازمان حفاظت محیط زیست ایران

بخش هیدروکربنهای نفتی و سموم آزمایشگاه مرجع

دستورالعمل سنجش هیدروکربنهای نفتی آلیفاتیک و آروماتیک در نمونه های آب، خاک و Biota

Determination of Petroleum Hydrocarbons, Aliphatic and PAHs in Water, Sediment and Biota

تهیه کنندگان :

اعظم صادق اسدی

المیرا دارابی

آزاده اکرام جعفری

هنگامه اکبرنژاد

نسخه :

۰۰ - ۱۳۸۸

سازمان حفاظت محیط زیست

۱- هدف

هدف آنالیز ترکیبات نفتی آلیفاتیک وآروماتیک در نمونه های مختلف آب، خاک، رسوب و بافتهای زنده توسط دستگاه GC/FID و HPLC می باشد.

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
- منبع جریان گاز نیتروژن تمیز
- منبع جریان هوای تمیز
- منبع جریان گاز هلیم تمیز
- ستون کروماتوگرافی شیشه ای
- دستگاه کروماتو گرافی گازی با دتکتور FID (GC/FID)
- دستگاه کروماتو گرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) یا دستگاه کروماتو گرافی گازی با دتکتور MASS (GC/MS)

سازمان حفاظت محیط زیست

٤- مواد شیمیایی مصرفی

- اسید سولفوریک غلیظ ٪۹۸-۹۵ Extra pure
- اسید کلریدریک غلیظ ٪۳۷Extra pure
- هگزان نرمال n-Hexane for liquid chromatography
- دی کلرومتان Dichloromethane for chromatography
- متانول Gradient grade for liquid chromatography
- استون Acetone for residue analysis
- پتاسیم هیدروکسید (۲ مولار)
- سیلیکا با مش ۴۰۰-۲۳۰
- پودر مس با مش ۲۰۰
- آلومینا با مش ۲۳۰-۷۰
- تیمبل با سایز ۳*۹ cm
- سولفات سدیم بدون آب
- سنگ جوش
- پشم شیشه
- استاندارد داخلی n-C۳۲d۶۶، n-C۱۹ d۴۰ جهت ترکیبات آلیفاتیک
- هگزامتیل بنزن،کادالن و نفتالن d۸ جهت ترکیبات آروماتیک

٥- آماده سازی

٥-١- 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 برای چند ساعت قرار داده می شود.

سازمان حفاظت محیط زیست

نکته ۱) بایستی دقت نمود این دما برای ظروف شیشه ای حجم سنجی استفاده نمی شود.
نکته ۲) از 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.

۵-۲- تمیز کردن واکنشگرها

تمامی پودرها یا واکنشگرهای کریستالی مانند سولفات سدیم، 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 از دستگاه فریز درایر استفاده می شود.

٦- شرح انجام آزمون

٦-۱- نمونه های آب

٦-۱-۱- استخراج

در این نمونه ها نیز عمل استخراج بوسیله حلال هگزان نرمال صورت می گیرد. اصول کار مبتنی بر جداسازی با استفاده از قیف جدا کننده است که مراحل آن به شرح ذیل می‌باشد :
به این منظور از دو قیف جدا کننده ۲ لیتری تمیز که قبلاً با استن و حلال هگزان نرمال آبکشی شده و دارای شیر تفلونی و درپوش است استفاده می کنیم. میزان نمونه مورد نیاز حدود ۴ لیتر یا ۱ گالن آب (نمونه) می باشد. ابتدا نصف نمونه (حدود ۲ لیتر) را به قیف جدا کننده شماره ۱ انتقال داده و ۵۰ cc

حلال هگزان به آن می افزاییم. استاندارد داخلی عبارت است از ۵۰ میکرولیتر از مخلوطی شامل ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر از n- C۱۹d۴۰ و n-C۳۲d۶۶ برای اولین فراکسیون و ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر از هگزامتیل بنزن، کادالن و نفتالن d۸ برای دومین فراکسیون. سپس قیف جدا کننده را به شدت برای چند دقیقه تکان داده و در آن را باز کرده تا بخارات حلال خارج شود (۵ بار این کار را تکرار کنید)، پس از این کار قیف جدا کننده را داخل حلقه گذاشته زمان داده تا دو فاز شود. سپس فاز پایین را که فاز آبی است داخل قیف جدا کننده۲ می ریزیم و فاز آلی داخلی قیف جدا کننده ۱ باقی می ماند.

حال به قیف جدا کننده ۲، cc ۵۰ هگزان اضافه کرده و مجدداً عمل تکان دادن مثل بالا صورت گرفته، آنرا در حلقه گذاشته تا دو فاز گردد و پس از این زمان فاز آب داخل قیف جدا کننده ۲ در استوانه مدرج ریخته و حجم آن اندازه گرفته شده و سپس دور ریخته می شود.

اکنون در قیف جدا کننده ۱ (که هنوز شامل cc ۵۰ حلال اولیه است)، نصف دیگر نمونه را ریخته و عمل تکان دادن طبق روش فوق صورت گرفته و مجدداً به آن زمان داده تا دو فاز گردد. این بار فاز آبی به قیف شماره ۲ انتقال یافته و دوباره عمل تکان دادن انجام شده و بازهم در حلقه ثابت نگهداشته شده تا دو فاز گردد. حال حجم فاز آبی بوسیله استوانه مدرج اندازه گیری و دور ریخته می شود.

در نهایت cc ۵۰ فاز آلی قیف جدا کننده ۱ با cc ۵۰ حجم فاز آلی قیف جدا کننده ۲ را در بالونی ریخته و برای آبگیری مقداری سولفات سدیم بدون آب به آن اضافه می گردد. در صورت وجود آب در نمونه، سولفاتهای سدیم به هم چسبیده و تکان نمی خورند. افزودن سولفات سدیم بدون آب را تا زمانی که همه آب نمونه توسط سولفات سدیم بدون آب گرفته شود، ادامه می دهیم بطوریکه درصورت تکان دادن بالون، سولفاتها در ته آن حرکت نمایند. (در این حالت هیچ ملکول آب در نمونه باقی نمانده است .) سپس فاز آلی داخل بالون را از یک قیف که رویش پشم شیشه ای که تمیز است و قبلاً با حلال شستشو داده ایم، رد کرده و وارد بالون دیگری می کنیم تا سولفات سدیم ها روی پشم شیشه صاف شود. بنابراین عملیات استخراج پایان پذیرفته و محلول آماده مراحل بعدی می شود.که به این منظور و جهت حصول اطمینان بیشتر مشخصات باید روی نمونه درج گردد.

٦-۱-۲- محاسبه بازده استخراج

۶-۱-۲-۱-محاسبه بازده ترکیبا ت آلیفاتیک

محلول استاندارد خارجی با غلظت مشخص را به دستگاه تزریق می کنیم . سپس RF را برای هر یک از ترکیبات آلیفاتیک به صورت جداگانه محاسبه و در نهایت RF متوسط را حساب می کنیم .

$$RF = \frac{QStd}{PAStd}$$

$$\overline{RF} = \frac{RF_{C۱۰} + \ldots\ldots + RF_{C۱۲} + RF_{C۱٤}}{n}$$

Quantity of Standard n-C۱۹ d٤۰= PAStdC۱۹d٤۰*$\overline{RF}$

Quantity of Standard n-C۳۲ d٦٦= PAStdC۳۲d٦٦*$\overline{RF}$

*Recover*y n-C۱۹ d٤۰:

$$\frac{\text{Final Volume}(\mu l) * \text{Quantity of Standard n-C۱۹ d٤۰(ng)}}{\text{Quantity of Internal Standard(ng)} * \text{injection Volume}(\mu l)}$$

*Recover*y n-C۳۲ d٦٦:

$$\frac{\text{Final Volume}(\mu l) * \text{Quantity of Standard n-C۳۲ d٦٦(ng)}}{\text{Quantity of Internal Standard(ng)} * \text{injection Volume}(\mu l)}$$

$$\overline{R} = \frac{R\ \text{n-C۱۹ d٤۰} + R\ \text{n-C۳۲ d٦٦}}{۲}$$

where:

QStd = Quantity of Standard injected	غلظت استاندارد تزریق شده
PAStd. = Peak Area of Standard injected	سطح زیر پیک استاندارد تزریق شده
Final Volume of the Extract in µl	حجم تغلیظ شده نهائی
Injection Volume(µl)	حجم نمونه تزریق شده
Quantity of Standard n-C۱۹ d۴۰	مقدار ترکیب n-C۱۹ d۴۰
Quantity of Standard n-C۳۲ d٦٦	مقدار ترکیب n-C۳۲ d۶۶

۶-۱-۲-۲- محاسبه بازده ترکیبات آروماتیک

به بند۶-۱-۲-۱ مراجعه کنید.

سازمان حفاظت محیط زیست

٦-١-٣- تغلیظ

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. لازم است روتاری اواپریتور با دور r/min ٩٠ تنظیم شده و دمای حمام بیش از $^{\circ}C$ ٣٠ 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. ($^{\circ}C$ ٤٠-٣٥)

٦-١-٤- جداسازی

برای جداسازی از ستون سیلیکا، آلومینا که به صورت زیر آماده می شود استفاده می کنیم. به منظور حذف هر گونه آلودگی ابتدا آلومینا و سیلیکا را هشت ساعت با هگزان و سپس هشت ساعت دیگر با متانول یا دی کلرومتان (یا ٨ ساعت مخلوط هگزان : دی کلرومتان به نسبت ١:١) سوکسله و در آون خشک می کنیم. مواد فوق را با قرار دادن در آون $^{\circ}C$ ٢٠٠ به مدت ۴ ساعت فعال می کنیم. سپس با آب مقطر به مقدار ۵ درصد وزنی مواد 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 cm ١ و شیر تفلونی جهت کروماتوگرافی ستونی استفاده می کنیم. انتهای ستون را با پشم شیشه پر می کنیم. سپس ۵ گرم (١٠ میلی لیتر) سیلیکا و ١٠ گرم (١٠ میلی لیتر) آلومینا و ١ گرم سولفات سدیم بدون آب به ترتیب به ستون منتقل می شوند. سولفات سدیم به منظور جلوگیری از برهم خوردن سطح جاذب هنگام ریختن حلال اضافه می شود.

نمونه را روی سولفات سدیم داخل بورت ریخته و در نهایت فراکسیون F_1 و F_2 از ستون خارج می شود. نحوه جداسازی هر یک از فراکسیون های F١ و F٢ به شرح ذیل می باشد :

F١:

برای خارج کردن این فراکسیون ٢٠ میلی لیتر هگزان را داخل ستون می ریزیم. سرعت عبور حلال باید طوری باشد که نه زیاد پیوسته و نه خیلی کند باشد. زمانیکه ٠/٥ تا ١ میلی لیتر هگزان در بالای ستون است شیر بورت را می بندیم. در طی این مرحله ظرف زیر ستون حاوی فراکسیون F_1 شامل ترکیبات آلیفاتیک اشباع است.

سازمان حفاظت محیط زیست

F_2:

جهت خارج کردن این فراکسیون،۳۰ میلی لیتر مخلوط هگزان : دی کلرومتان (۹ : ۱) 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. ظرف زیر ستون حاوی فراکسیون F_2 شامل هیدروکربنهای حلقوی و غیر اشباع می باشد.

٦-١-٥- تغلیظ مجدد

هر کدام از فراکسیونها را جداگانه 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 یا ۵ میکرولیتر از فراکسیون F_1 تغلیظ شده را به منظور آنالیز ترکیبات آلیفاتیک به دستگاه GC/FID و ۲۰ میکرولیتر از فراکسیون F_2 تغلیظ شده را به منظور آنالیز ترکیبات آروماتیک به دستگاه HPLC و یا حجم ۱ میکرولیتر را به دستگاه GC/MS تزریق کنید.

٦-٢- نمونه های خاک و رسوب

٦-٢-١-استخراج

ابتدا نمونه را وزن کرده، داخل تیمبل 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 .حدود ۲۰-۱۰ گرم نمونه خاک فریز درای شده که دارای ابعاد ۲۵۰ مایکرومتر می باشد را داخل Thimble ریخته سپس بوسیله محلول ۵۰: ۵۰ هگزان- دی کلرومتان در دستگاه سوکسله استخراج می کنیم. استاندارد داخلی را به منظور تعیین بازده به نمونه اضافه می کنیم. استاندارد داخلی عبارت است از ۵۰ میکرولیتر از مخلوطی شامل حدود ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر از d۴۰ n-C۱۹ و d۶۶ n-C۳۲ برای اولین فراکسیون و حدود ۲۰ نانو گرم بر میکرولیتر از هگزامتیل بنزن، کادالن و نفتالن d۸ برای دومین فراکسیون.

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

استخراج در سوکسله بوسیله ۲۵۰ میلی لیتر از مخلوط هگزان/ دی کلرومتان صورت گرفته و سیکل سیفون حدود ۱۰ بار در طول ۸ ساعت می باشد.

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 استفاده می شود. 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 اولترا سونیک 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

به منظور جداسازی رسوب تولید شده احتمالی و مس باقیمانده با استفاده از پشم شیشه و قیف تمیز مخلوط نمونه را صاف می کنیم و 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.

٦-٢-٥-جداسازی

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

سازمان حفاظت محیط زیست

٦-٢-٦-تغلیظ مجدد

به بخش ۶-۱-۵ مراجعه کنید.

٦-٣- نمونه های Biota

٦-٣-١-استخراج

ابتدا نمونه را وزن کرده، داخل تیمبل بریزید (برای این کار نباید تیمبل را با دست گرفت.) به همین دلیل آن را با پنس گرفته یا دور انگشتان فویل آلومینیومی می پیچیم. ۱۰- ۵ گرم نمونه فریز شده را داخل Thimble ریخته و ۸ ساعت با متانول سوکسله می کنیم. استاندارد داخلی مانند نمونه های خاک و رسوب به آن اضافه شود. پس از آنکه ۸ ساعت سوکسله تمام شد ۲۰ میلی لیتر از محلول هیدروکسید پتاسیم ۲ مولار به بالون اضافه کرده، سوکسله را برا ی ۲ ساعت دیگر به منظور صابونی شدن لیپیدها ادامه می دهیم. محتویات بالون را به یک قیف جداکننده منتقل کرده، ۳۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید. (۲ تا ۳ دقیقه تکان دهید.) ۹۰ میلی لیتر هگزان اضافه کرده و تکان دهید. فاز آلی و آبی را جداکرده، مجددا ۵۰ میلی لیتر هگزان به فاز آبی اضافه کرده و تکان دهید. دوباره فاز آبی و آلی را جدا کرده، ۵۰ میلی لیتر هگزان دیگر به فاز آبی اضافه کنید و تکان دهید. فاز آبی و آلی را جدا کنید. حال تمام فازهای آلی جدا شده در یک بالون جمع شده اند، آن را با پشم شیشه صاف کرده با سدیم سولفات بدون آب خشک نمایید (فاز آبی را برای تعیین وزن چربی دور نریزید.)

٦-٣-٢-محاسبه بازده استخراج

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

٦-٣-٣- تغلیظ

نمونه استخراج شده را با روتاری تغلیظ کرده به حجم۱۰ 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. (۳۵-۴۰°C)

٦-٣-٤-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 ۱۰ مایکرولیتر از نمونه را با دقت ۱ 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 .

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

٦-٣-٥-خارج کردن چربی با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ

برای این کار نمونه را در یک قیف جداکننده 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 تکان می دهیم. فاز هگزانی را جدا کرده و به آن سولفات سدیم افزوده تا از ورود چربی چسبیده به جداره و یا منتقل شده از قیف جداکننده به فاز هگزان جلوگیری شود.

٦-٣-٦-تغلیظ

فاز آلی بدست آمده (هگزان) 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.

٦-٣-٧-جداسازی

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

٦-٣-٨-تغلیظ مجدد

هر کدام از فراکسیونها را جداگانه 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 یا ۵ میکرولیتر از فراکسیون F_1 تغلیظ شده را به منظور آنالیز ترکیبات آلیفاتیک به دستگاه GC/FID و ۲۰ میکرولیتر از فراکسیون F_2 تغلیظ شده را به منظور آنالیز ترکیبات آروماتیک به دستگاه HPLC و یا حجم ۱ میکرولیتر را به دستگاه GC/MS تزریق کنید.

۷-آنالیز

اندازه گیری ترکیبات آلیفاتیک با تزریق ۵ میکرولیتر از فراکسیونهای F_1 و F_2 تغلیظ شده بوسیله دستگاهGC/FID با ستون کاپیلاری CP Sil۸ و اندازه گیری ترکیبات آروماتیک با تزریق فراکسیونهای F_1 و F_2 تغلیظ شده به دستگاه HPLC و یا GC/MS بر طبق روش MOOPAM صورت می گیرد.

۸-محاسبات

$$Cy = \frac{PAy * \overline{RF} * \text{Final Volume}(\mu l)}{\text{Quantity extracted}(lit) * R * \text{injection Volume}(\mu l)}$$

Where :

PAy = Peak Area of y سطح زیر پیک ترکیب y

Quantity extracted(lit) حجم نمونه آب اصلی بر حسب لیتر

سازمان حفاظت محیط زیست

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