



استاندارد ملی ایران

۹۳۸۷ - ۱

چاپ اول



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI

9387-1

1st.Edition

آب - اندازه گیری هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای - قسمت اول: اندازه گیری ۶ هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای به روش کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا با آشکار سازی فلورسانس پس از استخراج مایع - مایع

Water quality-Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) - part 1: Determination of six PAH by high-performance thin-layer chromatography with fluorescence detection after liquid-liquid extraction.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

تهران - خیابان ولیعصر، ضلع جنوب غربی میدان ونک، پلاک ۱۲۹۴، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج - شهر صنعتی، میدان استاندارد، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵

تلفن: ۸-۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶۱)

دورنگار: ۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶۱)

پیام‌نگار: standard@isiri.org.ir

وب‌گاه: www.isiri.org

بخش فروش تلفن: ۲۸۱۸۹۸۹ (۰۲۶۱)، دورنگار: ۲۸۱۸۷۸۷ (۰۲۶۱)

بها ۴۸۷۵ ریال

Institute of Standards and Industrial Research of IRAN

Central Office: No.1294 Valiaser Ave. Vanak corner, Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: +98 (21) 88879461-5

Fax: +98 (21) 88887080, 88887103

Headquarters: Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163

Tel: +98 (261) 2806031-8

Fax: +98 (261) 2808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: www.isiri.org

Sales Dep.: Tel: +98(261) 2818989, Fax.: +98(261) 2818787

Price: 4875 Rls.

«بسمه تعالی»

آشنایی با موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه‌ی تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) می‌باشد.

تدوین استاندارد در رشته‌های مختلف توسط کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان موسسه، صاحب‌نظران مراکز و موسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط با موضوع صورت می‌گیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت‌ها و مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن‌آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد. پیش‌نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع و اعضای کمیسیون‌های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرات و پیشنهادهای در کمیته‌ی ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که توسط موسسه‌ها و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته‌ی ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ و منتشر می‌گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره (۵) تدوین و در کمیته‌ی ملی مربوط که توسط موسسه تشکیل می‌گردد، به تصویب رسیده باشد.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد می‌باشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی استفاده می‌نماید.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از

کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. موسسه می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید.

همچنین به منظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و موسسه های فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندگان سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، موسسه استاندارد این گونه سازمان ها و موسسه ها را بر اساس ضوابط نظام تایید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تایید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می‌نماید. ترویج سیستم بین‌المللی یکاها، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این موسسه می‌باشد.

کمیسیون استاندارد آب - اندازه گیری هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای
قسمت اول: اندازه گیری ۶ هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای به روش
کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا با آشکار سازی فلورسانس پس از استخراج
مایع - مایع

رئیس

اشرفی، فریدون

(دکترای شیمی فیزیک)

سمت یا نمایندگی

عضو هیات علمی دانشگاه پیام نور

اعضا

آزاد، علیرضا

(لیسانس مهندسی شیمی - طراحی فرایند)

رسولی، یلدا

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

ضرغامپور، زهره

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

فتوحی، لیلا

(فوق لیسانس شیمی تجزیه)

نوربخش، رویا

(فوق لیسانس سم شناسی)

دبیر

کندابی، جمیله

(فوق لیسانس شیمی فیزیک)

شرکت آب معدنی دماوند

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شرکت آب و فاضلاب تهران

شرکت خدماتی، آموزشی و تحقیقاتی مرجعان خاتم

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

صفحه	فهرست مندرجات
خ.....	پیشگفتار.....
د.....	مقدمه.....
۱.....	۱ هدف.....
۱.....	۲ دامنه‌ی کاربرد.....
۲.....	۳ مراجع الزامی.....
۴.....	۴ اساس کار.....
۵.....	۵ مزاحمت‌ها.....
۷.....	۶ مواد لازم.....
۱۰.....	۷ وسایل لازم.....
۱۳.....	۸ نمونه برداری.....
۱۴.....	۹ روش اجرای آزمون.....
۲۱.....	۱۰ ارزیابی.....
۲۶.....	۱۱ کالیبراسیون.....
۲۹.....	۱۲ اندازه گیری بازیابی.....
۳۰.....	۱۳ اندازه گیری نمونه تهی.....
۳۰.....	۱۴ محاسبه.....
۳۱.....	۱۵ بیان نتایج.....
۳۲.....	۱۶ گزارش آزمون.....
۳۲.....	۱۷ صحت.....
۳۳.....	پیوست الف.....
۳۴.....	پیوست ب.....
۳۵.....	پیوست پ.....
۳۸.....	پیوست ت.....

پیش گفتار

استاندارد " آب - اندازه گیری هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای قسمت اول: اندازه گیری ۶ هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای به روش کروماتو گرافی لایه نازک با کارایی بالا با آشکار سازی فلورسانس پس از استخراج مایع - مایع " که توسط کمیسیون فنی مربوط تهیه و تدوین شده و در چهارصد و شصت و پنجمین جلسه کمیته ملی استاندارد شیمیایی و پلیمر مورخ ۸۶/۸/۱۳ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده سه قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استاندارد های ملی ایران در موقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استاندارد ها ارایه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوطه مورد توجه قرار خواهد گرفت بنابراین برای مراجعه به استاندارد های ملی ایران باید از آخرین تجدیدنظر آن ها بهره گیری کرد.

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط و نیازهای جامعه، در حد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته، به شرح زیر است :

1- ISO 7981-1 2005: Water quality-Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) - part 1: Determination of six PAH by high-performance thin-layer chromatography with fluorescence detection after liquid-liquid extraction.

مقدمه

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای، (PAH)، به طور معمول در همه ی آب ها یافت می شوند. این ترکیب ها به همان اندازه که در فاز آبی حل می شوند روی مواد جامد (رسوب های مواد معلق) جذب سطحی می شوند. بعضی از هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای باعث سرطان می شوند. بیشترین مقدار قابل قبول PAH در خصوص آب مورد مصرف انسان در مراجع الزامی، بند ۱-۳، ۲-۳، ۳-۳ و ۴-۳ داده شده است. مجموع غلظت جرمی ۶ PAH در این استاندارد در حدود ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ میکروگرم بر لیتر در آب زیرزمینی و تا ۱ میکروگرم بر لیتر در آب سطحی مشخص شده است.

آب - اندازه گیری هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای - قسمت اول:
اندازه گیری ۶ هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای به روش کروماتوگرافی
لایه نازی با کارایی بالا با آشکار سازی فلورسانس پس از استخراج
مایع - مایع

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد اندازه گیری ۶ PAH شامل فلورانتن، بنزو[b] فلورانتن، بنزو[a]پیرن، بنزو[k] فلورانتن، ایندنو[1.2.3-cd]پیرن و بنزو[ghi]پیریلن (طبق جدول ۱)، در آب آشامیدنی به روش کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا با آشکار سازی فلورسانس پس از استخراج مایع - مایع است.

۲ دامنه‌ی کاربرد

دامنه‌ی کاربرد روش ارایه شده در این استاندارد، شامل موارد زیر است:
 روش الف: روش غربالگری^۱ است که در آن نمونه های حاوی کمتر از ۲۰٪ مقادیر حد داده شده در مراجع ۱-۳، ۲-۳، ۳-۳ و ۴-۳ را شامل نمی شود.
 روش ب: یک روش کمی است که مجموع مقدار قابل اندازه گیری ۶ PAH در این روش، از ۴۰ تا ۲۴۰ نانوگرم در لیتر است. غلظت های بالاتر نیز با استفاده از حجم های کمتری از نمونه، قابل اندازه گیری است.



با برخی از اصلاح ها، این روش می تواند برای آزمایش آب های زیر زمینی (۰/۰۱ تا ۰/۰۵ میکروگرم در لیتر) و آب های سطحی با آلودگی متوسط (تا ۱ میکروگرم در لیتر)، به کار گرفته شود.

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و/ یا تجدیدنظر، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. با این حال بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد، امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. مراجع ذکر شده برای کاربرد این استاندارد ضروری است.

در مورد مراجع تاریخ دار، تنها چاپ ذکر شده را به کار برید و در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و یا تجدیدنظر، آخرین چاپ و یا تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است.

3-1 Council Directive 80/778/EEC of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption.

3-2 Council Directive 75/440/EEC of 16 July 1975 concerning the quality required of surface water intended for the abstraction of drinking water in the Member States.

3-3 Council Directive 79/869/EEC of 9 October 1979 concerning the methods of measurement and frequencies of sampling and analysis of surface water intended for the abstraction of drinking water in the Member States.

3-4 Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.

3-5 DIN 38407-8: 1995-10 – German standard methods for the examination of water, waste water and sludge – Substance group analysis (group F) – Part 8: Determination of six polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (F8).

3-6 ISO 383: 1976, Laboratory glassware – Interchangeable conical ground joints.

3-7 ISO 5667-2:1991, water quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

3-8 ISO 5667-3:2003, water quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples.

3-9 ISO 8466-1:1990, Water Quality-Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics-Part 1: Statistical evaluation of linear calibration function.

۴ اساس کار

از آنجایی که PAH به مقدار زیادی روی مواد ذره ای جذب سطحی می‌شوند، تمام نمونه، آزمایش می‌شود.

یاد آوری: در آزمایش آب های سطحی، باید بین PAH محلول و نامحلول تفاوت قایل شد، اما این امر مربوط به آب های آشامیدنی نیست.

PAH از نمونه‌ی آب به وسیله استخراج مایع - مایع استخراج می‌شود. مایع استخراجی توسط تبخیر، خشک و باقی مانده در حلال حل شده و آزمایش می‌شود. مایع استخراجی حاصل از آب سطحی یا نمونه های آلوده شده، قبل از آزمایش پاکسازی^۱ می‌شوند (طبق بند ۹-۴).

PAH به روش کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC)^۲ و با یک فاز ساکن مناسب جداسازی می‌شود و به وسیله‌ی اندازه گیری فلورسانس در وضعیت موجود، در طول موج ثابت یا ترکیبی از طول موج ها، آشکار می‌شود.

1- Cleaned

2- High-Performance Thin-Layer Chromatography

جدول ۱ - هیدروکربن های آروماتیک هند ملقه ای قابل اندازه گیری با روش کروماتوگرافی

لایه نازک با کارایی بالا

نام	فرمول شیمیایی	وزن ملکولی (گرم بر مول)	درصد کربن	شماره CAS	ساختار
فلورانتن Fluoranthene	C ₁₆ H ₁₀	۲۰۲/۲۶	۹۵/۰	۲۰۶-۴۴-۰	
بنزو [b] فلورانتن Benzo[b]fluoranthene	C ₂₀ H ₁₂	۲۵۲/۳۲	۹۵/۲	۲۰۵-۹۹-۲	
بنزو [a] پیرن Benzo[a]pyrene	C ₂₀ H ₁₂	۲۵۲/۳۲	۹۵/۲	۵۰-۳۲-۸	
بنزو [k] فلورانتن Benzo[k]fluoranthene	C ₂₀ H ₁₂	۲۵۲/۳۲	۹۵/۲	۲۰۷-۰۸-۹	
ایندنو [1,2,3 - cd] پیرن Indeno[a]pyrene	C ₂₂ H ₁₂	۲۷۶/۳۴	۹۵/۶	۱۹۳-۳۹-۵	
بنزو [ghi] پیریلن Benzo[ghi]perylene	C ₂₂ H ₁₂	۲۷۶/۳۴	۹۵/۶	۱۹۱-۲۴-۲	

۵ مزاحمت ها

۵-۱ مزاحمت ها در روش غربالگری (روش الف)

سایر ترکیب ها و یا ناخالصی ها در روش غربالگری، ایجاد مزاحمت می کنند. بنابراین استفاده از روش شناسایی طیف سنجی برای کاهش احتمال رخداد خطای مثبت در نمونه های مورد آزمون به روش الف، توصیه می شود.

در صورت لزوم برای پاکسازی مایع استخراجی رنگی یا نمونه ای آزمون محتوی سایر مواد آلی، قبل از آزمایش از سیلیس (SiO₂)^۱، استفاده شود (طبق بند ۹-۴).

۲-۵ مزاحمت ها در نمونه برداری و استخراج

ظرف های مورد استفاده برای نمونه برداری باید از جنس موادی باشد که طی مدت زمان تماس با نمونه، تاثیری بر روی آن نداشته باشد (به طور ترجیحی ظرف های شیشه ای یا استیل).

از به کار بردن پلاستیک ها یا سایر مواد آلی در مدت نمونه برداری، نگهداری و استخراج خودداری کنید.

اگر از وسایل نمونه برداری خودکار استفاده می کنید، از به کار بردن مواد سیلیکونی یا پلاستیکی برای لوله ها خودداری کنید. در صورت وجود چنین موادی، لوله ها باید تا حد امکان کوتاه باشند. مسیر نمونه برداری را قبل از برداشتن نمونه ی مورد آزمون با همان آب، شستشو دهید. به مراجع الزامی بند ۳-۷ و ۳-۸ مراجعه کنید.

نمونه های مورد آزمون را از نور مستقیم خورشید و قرار دادن در مقابل نور به مدت طولانی محافظت کنید.

در زمان نگهداری نمونه ی مورد آزمون، مقدار PAH در اثر جذب سطحی بر روی دیوار ظرف کاهش می یابد که مقدار آن به زمان نگهداری نمونه بستگی دارد.

۳-۵ مزاحمت در HPTLC

ممکن است در مدت اندازه گیری، ترکیب هایی که خاصیت فلورسانس یا خاموش کننده فلورسانس و هم شویی با PAH مورد آزمایش دارند، ایجاد مزاحمت کنند. این مزاحمت ها به صورت علامت های تفکیک نشده و بنا بر بزرگی آنها، بر روی دقت و صحت نتایج تاثیر می گذارد. همپوشانی نوارها تفسیر نتایج را غیر ممکن می سازد. نوارهای نامتقارن و نوارهایی

که از نوارهای ترکیب مرجع پهن تر شده‌اند، نشان دهنده‌ی مزاحمت هستند. تشخیص و خلوص این نوارها به وسیله طیف نشری و تهییجی ثبت شده، بررسی می‌شود.

۶ مواد لازم

فقط از مواد شناخته شده با خلوص تجزیه ای (برای مثال با عنوان " برای آزمایش باقی مانده" یا "برای آزمایش HPTLC") و از آب مقطر یا آبی با کمترین فلورسانس استفاده کنید.

جهت اطمینان از عدم وجود PAH با غلظت قابل تشخیص، آزمون را برای محلول تهی انجام دهید (طبق بند ۱۳).

۶-۱ ملال ها

۶-۱-۱ ملال های استخراج کننده و تصفیه کننده^۱

۶-۱-۱-۱ سیکلوهگزان، C_6H_{12}

۶-۱-۱-۲ هگزان، C_6H_{14}

۶-۱-۱-۳ دی کلرومتان، CH_2Cl_2

سایر حلال های فرار در صورتی که بازده استخراج معادل و یا بهتری داشته باشند نیز می‌توانند استفاده شوند.

یاد آوری: دی کلرومتان اغلب دارای پایدار کننده هایی مثل اتانول یا آمیلن است که ممکن است بر قدرت شویندگی آن موثر باشد. بدون پایدار کننده ممکن است رادیکال ها گسترش یابند که این امر به



احتمال، منجر به تخریب PAH می‌شود. وجود هیدروژن کلرید دلیل بر وجود رادیکال‌ها است. مقدار هیدروژن کلرید را می‌توان با استخراج از دی کلرومتان به وسیله آب و اندازه‌گیری مقدار PH مشخص کرد.

۶-۱-۲ ملال‌های HPTLC

۶-۱-۲-۱ متانل، CH_2OH

۶-۲-۱-۲ استونیتریل، CH_2CN

۶-۲-۱-۳ دی‌متیل - ۳ - اکسی‌پنتان (دی‌ایزو پروپیل اتر)، $C_6H_{14}O$

۶-۲-۱-۴ پروپانل (ایزوپروپانل)، C_3H_7OH

۶-۲ سدیم تیوسولفات ۵ آب، $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$

۶-۳ سدیم کلرید، NaCl

۶-۴ سدیم سولفات، Na_2SO_4 ، بدون آب که در دمای ۵۰۰ درجه‌ی سلسیوس

پیش پاکسازی^۱ شده باشد.

۶-۵ نیتروژن، با خلوص (کسر حجمی) ۹۹/۹۹۹ درصد.

۶-۶ سیلیس، با اندازه میانگین ذره‌ها در حدود ۴۰ میکرومتر که برای اطمینان از فعالیت

حداکثر، در خشک کن آزمایشگاهی نگهداری شده باشد.

یاد آوری: کارتریج‌های پر شده با سیلیس که به طور تجاری در دسترس می‌باشد.

۶-۷ دانه‌های الک مولکولی، با سوراخ‌هایی به قطر ۰/۴ نانومتر.

۶-۸ کافیین، $C_8H_{10}N_4O_2$

۶-۹ پارافین مایع

۶-۱۰ مواد مرجع (طبق جدول ۱)

به دلیل ماهیت خطرناک این ترکیب ها به شدت توصیه می شود از محلول های استاندارد که به صورت تجاری در دسترس و دارای گواهی هستند، استفاده شود. از تماس آن با پوست خودداری کنید.

۶-۱۱ مملول های ذخیره ای تک جزیی، لیست شده در جدول ۱ که در سیکلو هگزان

(طبق بند ۶-۱-۱-۱) یا متانل (طبق بند ۶-۱-۲-۱) که برای مثال تا رسیدن به غلظت وزنی ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر رقیق شده اند.

۶-۱۲ مملول های ذخیره ای چند جزیی، تایید شده، که در سیکلو هگزان

(طبق بند ۶-۱-۱-۱) یا متانل (طبق بند ۶-۱-۲-۱) که برای مثال تا رسیدن به غلظت وزنی ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای فلورانتن و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر برای سایر مواد مرجع رقیق شده اند.

۶-۱۳ مملول های کالیبراسیون

۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میکرو لیتر از محلول ذخیره را در بالن ژوژه ای (طبق بند ۷-۱۴) ۱۰ میلی لیتر بریزید و با سیکلو هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۱) یا متانل (طبق بند ۶-۱-۲-۱) به حجم برسانید. ۱ میلی لیتر از این محلول مرجع حاوی ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ نانوگرم از فلورانتن و ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ نانوگرم از سایر مواد مرجع است (طبق بند ۶-۱۰).

یادآوری: محلول های ۶-۱۱ تا ۶-۱۳ برای مدت یک سال پایدار هستند، به شرط آن که در جای تاریک

و در دمای اتاق نگهداری و از تبخیر محافظت شوند.

۷ وسایل لازم

از وسایل آزمایشگاهی استاندارد استفاده کنید که پیش از به کار گیری به منظور حذف مزاحمت ها تمیز شده باشند. تمام ظرف های شیشه ای را تمیز کنید. برای شستشوی وسایل شیشه ای از پاک کننده ها و آب داغ استفاده کنید و آن ها را به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه ی سلسیوس خشک کنید. پس از سرد شدن آن ها را با استون شستشو داده، در پوش آن ها را گذاشته و در محیط تمیز نگهداری کنید.

از وسایل شیشه ای که در تماس با نمونه های فاضلاب یا نمونه های با غلظت بالای PAH بوده اند، برای آزمایش آب آشامیدنی استفاده نکنید.

۷-۱ بطری های شیشه ای قهوه ای، با دهانه باریک، ته صاف، ۱۰۰۰ میلی لیتری با درپوش شیشه ای.

۷-۲ همزن مغناطیسی با میله همزن، با فرکانس چرخشی ۱۰۰۰ دور در دقیقه که به وسیله ی تفلون پوشش داده و در سیکلو هگزان نگهداری شود.

۷-۳ استوانه ی مدرج، با ظرفیت اسمی ۲۵،۱۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتر.

۷-۴ قیف جداکننده، ۱۰۰۰ میلی لیتری که دارای شیر تفلون^۱ و در پوش شیشه ای باشد و در سیکلو هگزان نگهداری شود. به عنوان مثال قیف اسکویب^۲.

۷-۵ ارلن، با ظرفیت اسمی ۱۰۰ میلی لیتر با در پوش شیشه ای.

۷-۶ بالن تغلیظ، با ظرفیت اسمی ۵۰ میلی لیتر (طبق شکل پ-۱).

1- PTFE

2- Squibb Funnel

۷-۷ سانتریفوژ با لوله‌ی چرخان، با لوله‌های سانتریفوژ ته باریک به ظرفیت ۵۰ میلی لیتر (طبق شکل پ-۲) و با فرکانس چرخشی در حدود ۳۰۰۰ دور بر دقیقه.

۸-۷ پی پت پاستور

۹-۷ تجهیزات تبخیر^۱، به عنوان مثال تبخیر کن چرخان که دارای پایدارکننده‌ی حلال و حمام آبی باشد.

۱۰-۷ دستگاه لرزاننده^۲، که دارای سرعت لرزشی قابل تنظیم مناسب برای آزمایش لوله‌های آزمایش باشد.

۱۱-۷ دستگاه دمنده^۳، سیلندر فشار نیتروژن با شیر کاهش فشار و شیر سوزنی برای تنظیم جزئی.

۱۲-۷ کارتریج‌های شیشه‌ای یا پلی پروپن، پر شده با حداقل ۰/۵ گرم سیلیس (طبق بند ۶-۶).

۱۳-۷ ویال‌های شیشه‌ای، به عنوان مثال لوله‌های سانتریفوژ با ظرفیت اسمی ۱۰ میلی لیتر و دارای در پوش شیشه‌ای.

۱۴-۷ بالن ژوژه، با ظرفیت اسمی ۱۰، ۲۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی لیتر.

۱۵-۷ صفحه‌های آماده^۴ کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا، به عنوان مثال سیلیس ۶۰، بهتر است دارای معرف فلورسانس باشد که به طور یکنواخت پخش شده است.

-
- 1- Evaporation Assembly
 - 2- Shaking Apparatus
 - 3- Blow-down Assembly
 - 4- Precoated Plates

برای تهیه‌ی صفحه‌های سیلیس اشباع شده با کافین، صفحه‌ها از پیش پوشش داده شده را به مدت زمان ۴ ثانیه در محلولی شامل ۴ گرم کافین (طبق بند ۶-۸) در ۹۶ گرم دی کلرومتان (طبق بند ۶-۱-۱-۳) به وسیله‌ی دستگاه غوطه‌ور کننده، غوطه‌ور کنید. صفحه‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۱۰ درجه‌ی سلسیوس خشک کنید و تا زمان استفاده آن را داخل دستگاه خشک کننده^۱ قرار دهید.

یادآوری: این صفحه‌ها به صورت تجاری نیز در دسترس هستند.

۷-۱۶ صفحه‌های آماده‌ی کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا، به عنوان مثال RP-18.

بهتر است دارای معرف فلورسانس باشد که به طور یکنواخت پخش شده است.

۷-۱۷ مخزن کروماتوگرافی، برای مصرف کم فاز متحرک، مناسب برای اندازه‌گیری

مقادیر کم^۲.

۷-۱۸ وسایل برای نقطه‌گذاری به صورت اتوماتیک، مناسب برای نقطه‌گذاری و

نوارگذاری، یا **سرنگ‌های میکرو لیتر.**

۷-۱۹ لامپ UV ، با طول موج ۳۶۶ نانومتر.

۷-۲۰ اسکنر TLC، برای اندازه‌گیری رنگ‌سنجی^۳ مستقیم.

-
- 1- Desiccator
 - 2- Trace Analysis
 - 3- Fluorimetric

۸ نمونه برداری

اگر نمونه برداری آب آشامیدنی از شیر آب صورت گیرد، نمونه‌ی مورد آزمون را قبل از استریلیزه کردن شیر آب، برای نمونه برداری باکتری شناسی، جمع آوری کنید.

از مواد پلاستیکی - به استثناء پلی تترا فلورو اتن (تفلون) - نباید برای نمونه برداری استفاده شود، چون باعث جذب سطحی PAH بر روی این مواد می‌شود. در زمان بررسی نمونه‌ها آن‌ها را از تابش مستقیم نور محافظت کنید، در غیر این صورت PAH تجزیه می‌شود.

نمونه‌ی مورد آزمون را درون بطری شیشه‌ای قهوه‌ای (طبق بند ۷-۱) با وزن مشخص جمع آوری کنید. نمونه‌های مورد آزمون حاوی کلرین را بلافاصله با اضافه کردن حدود ۵۰ میلی گرم تیوسولفات سدیم (طبق بند ۶-۲) کلرزدایی کنید.

بطری را تا گلوپی آن (حدود ۱۰۰۰ میلی لیتر) پر کنید و نمونه‌های مورد آزمون را در دمای تقریبی ۴ درجه‌ی سلسیوس نگهداری کرده و تا مرحله‌ی استخراج، از نور دور نگهدارید. اطمینان حاصل کنید که استخراج در مدت ۲۴ ساعت بعد از نمونه برداری انجام می‌گیرد تا از افت ناشی از جذب سطحی جلوگیری شود. چنانچه نتوان آزمایش کامل را در مدت ۲۴ ساعت انجام داد، مرحله‌های زیر را انجام دهید: در صورت لزوم مقداری از نمونه همگن داخل بطری را بردارید تا داخل بطری 10 ± 1000 میلی لیتر نمونه باقی بماند و حجم نمونه را با وزن کردن بطری محاسبه کنید.

۲۵ میلی لیتر سیکلو هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۱) را به بطری اضافه کرده و خوب هم بزنید. نمونه‌ی مورد آزمون آماده شده اگر در معرض تابش نور قرار نگیرد، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس قابل نگهداری است.

۹ روش اجرای آزمون

۱-۹ استخراج

در زمان جابجایی و نگهداری^۱ نمونه ها آن‌ها را از تابش مستقیم نور محافظت کنید، در غیر این صورت PAH تجزیه می‌شود.

نمونه‌ی مورد آزمون را با یک همزن مغناطیسی، همگن کنید. مقداری از نمونه‌ی داخل بطری را بردارید تا داخل بطری حدود 10 ± 1000 میلی لیتر نمونه باقی بماند و حجم نمونه را با وزن کردن بطری محاسبه کنید. برای بهبود راندمان استخراج ۲۰ گرم سدیم کلرید (طبق بند ۶-۳) اضافه کنید. ۲۵ میلی لیتر سیکلو هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۱) را به بطری اضافه کرده و خوب هم بزنید. نمونه‌ی مورد آزمون را تا شروع استخراج در یک مکان سرد و تاریک نگهداری کنید.

مگنت را به داخل بطری انداخته و در پوش آن را بگذارید. سپس نمونه‌ی مورد آزمون را با استفاده از همزن مغناطیسی (طبق بند ۷-۲) با تنظیم ۱۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه به هم بزنید. نمونه‌ی مورد آزمون را در قیف جداکننده (طبق بند ۷-۴) بریزید و حداقل ۵ دقیقه صبر کنید تا فازها جدا شوند.

برای استخراج فاضلاب و سایر نمونه های آب با غلظت بالای PAH فقط ۱۰ تا ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه‌ی مورد آزمون همگن را به وسیله‌ی پی پت درون بالن ژوژه ۲۵۰ میلی لیتری (طبق بند ۷-۱۴) بریزید و با آب تا ۲۰۰ میلی لیتر رقیق کنید. پس از افزودن ۲۰ گرم سدیم کلرید (طبق بند ۶-۳) و ۲۵ میلی لیتر سیکلو هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۱) به روش توضیح داده شده در بالا عمل کنید. مرحله‌ی جداسازی می‌تواند با استفاده از یک ریزجداکننده^۲ انجام شود (طبق شکل پ-۳).

-
- 1- Handling
 - 2- Microseparator

اگر طی مرحله‌ی استخراج امولسیون پایداری تشکیل شود، آن را در لوله سانتریفوژ (طبق بند ۷-۷) جمع آوری کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ کنید.

فاز آبی را در بطری نمونه (طبق بند ۷-۱) بریزید و سیکلو هگزان استخراج شده را در یک ارلن (طبق بند ۷-۵) جمع آوری کنید. محلول استخراجی را مطابق بند ۹-۲ خشک کنید.

۹-۲ خشک کردن مایع استخراجی

قیف جداکننده را با ۱۰ میلی لیتر از سیکلو هگزان شستشو دهید (طبق بند ۶-۱-۱-۱) و به کل مایع استخراجی اضافه کنید. فاز استخراج شده را با سدیم سولفات (طبق بند ۶-۴) به مدت ۳۰ دقیقه خشک کنید. ظرف را گاه گاه بچرخانید. فاز خشک شده را در ظرف تغلیظ (طبق بند ۷-۶) بریزید. ارلن (طبق بند ۷-۵) را دو بار با ۵ میلی لیتر سیکلو هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۱) شستشو داده و به همان ظرف تغلیظ اضافه کنید.

۹-۳ غنی سازی

بخش استخراجی از سیکلو هگزان را که صاف شده است با استفاده از تبخیر کن چرخان (طبق بند ۷-۹) که دمای آن ۳۰ درجه‌ی سلسیوس و فشار آن ۱۲۰ هکتوپاسکال است، تبخیر کنید تا جایی که فاز آلی فقط قسمت باریک انتهای ظرف تغلیظ (طبق بند ۷-۶) را پر کند (تقریباً ۵۰۰ میکرو لیتر).

هر گونه باقی مانده روی دیوار شیشه را با تکان دادن مایع استخراجی با استفاده از دستگاه لرزاننده (طبق بند ۷-۱۰) حل کنید.

اگر مایع استخراجی بی رنگ یا مطابق بند ۹-۴ پیش پاکسازی شده باشد، باقی مانده‌ی سیکلو هگزان را با استفاده از دستگاه دمنده (طبق بند ۷-۱۱) با نیتروژن (طبق بند ۶-۵) تا خشک شدن اولیه تبخیر کنید. باقی مانده‌ی خشک را در ۴۰ میکرولیتر (برای نقطه گذاری) تا ۱۲۰ میکرو لیتر (برای نوارگذاری) از سیکلو هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۱) یا متانل (طبق بند ۶-۱-۲-۱) حل کنید.

در صورت نیاز پیش پاکسازی مایع استخراجی را طبق بند ۹-۴ انجام دهید.

۹-۴ تصفیه‌ی مایع استخراجی

به منظور تصفیه‌ی مایع استخراجی، از ستون‌ها یا کارتريج‌هایی (طبق بند ۷-۱۲) که حاوی حداقل ۰/۵ گرم سیلیس (طبق بند ۶-۶) باشد، استفاده کنید. سیلیس داخل ستون یا کارتريج را با دی کلرومتان، به حجم ۵ برابر ستون، شستشو دهید. حلال‌های مورد استفاده برای پاکسازی مایع استخراجی را با استفاده از الک مولکولی خشک کنید (طبق بند ۶-۷).

مایع استخراجی تغلیظ شده (طبق بند ۹-۳) را با استفاده از پی پت پاستور (طبق بند ۷-۸) روی سیلیس که با هگزان پوشش داده شده است بریزید و بگذارید تا مایع استخراجی به طور کامل به داخل سیلیس نفوذ کند. محلول حاصل از شستشو را در ویال شیشه‌ای جمع‌آوری کنید (طبق بند ۷-۱۳).

بالن تغلیظ را با استفاده از ۵۰۰ میکرو لیتر هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۲) بشوید و این محلول را به ستون اضافه کنید و اجازه دهید به طور کامل در سیلیس نفوذ کند.

PAH را با مخلوطی از دی کلرومتان (طبق بند ۶-۱-۱-۲) / هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۲) به نسبت حجمی ۱ به ۱ شستشو دهید. فاز آلی را با استفاده از تبخیر کن چرخان (طبق بند ۷-۹)، تبخیر کنید تا جایی که فاز آلی فقط قسمت باریک انتهای ظرف تغلیظ (طبق بند ۷-۶) را پر کند (به طور تقریبی ۵۰۰ میکرو لیتر) و با دستگاه دمنده (طبق بند ۷-۱۱) با جریان نیتروژن (طبق بند ۶-۵) تا خشک شدن اولیه تبخیر کنید.

رسوب های باقی مانده را در ۴۰ میکرو لیتر یا ۱۲۰ میکرو لیتر سیکلو هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۱) یا متانل (طبق بند ۶-۱-۲-۱) حل کنید.

یاد آوری: کارتریج تجاری در دسترس شامل ۰/۵ گرم سیلیس برای شستشو PAH، نیاز به حداقل ۳ میلی لیتر از مخلوط دی کلرو متان و هگزان به نسبت حجمی ۱ به ۱ دارد.

۵-۹ کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا

۱-۵-۹ کاربرد مملول های استخراجی

ممکن است بر روی یک صفحه HPTLC نمونه های متعددی با استفاده از دو یا چند محلول مرجع با غلظت های متفاوت، هم زمان آزمایش شوند. اگر تعداد قابل توجهی نمونه برای آزمون وجود داشته باشد، محلول استخراجی را در هر دو انتهای صفحه HPTLC نقطه گذاری کنید. صفحه را برای مخزن کروماتوگرافی افقی تهیه کنید.

کسری از محلول استخراجی (طبق بند ۹-۳) را به وسیله ی دستگاه نقطه گذار خودکار (طبق بند ۷-۱۸) یا به صورت دستی، نقطه گذاری و یا نوار گذاری کنید. در این آزمایش بخشی از محلول استخراجی را نقطه گذاری کنید. اگر از نوار گذاری استفاده می کنید، طول نوارها ۷ میلی متر و فاصله بین آنها ۳ میلی متر باشد.

۹-۵-۲ روش غربالگری (روش الف)**۹-۵-۱ کلیات**

این روش، آزمون مقدماتی برای حذف نمونه هایی است که کمتر از ۲۰٪ ماکزیمم مقدار قابل قبول را دارا می باشند (غلظت کل ۳۰ تا ۴۰ نانوگرم در لیتر).

یکی از دو روش زیر را جهت انجام روش غربالگری انتخاب کنید.

الف- جداسازی بر روی صفحه‌ی سیلیس اشباع شده با کافین (طبق بند ۹-۵-۲-۲)

ب- جداسازی در دمای اتاق بر روی ماده‌ی HPTLC-RP-18 (طبق بند ۹-۵-۲-۳)

روش الف) چنانچه در ۲۰- درجه‌ی سلسیوس انجام شود، می تواند به عنوان یک روش کار کمی نیز توصیه گردد. این روش یک رابطه خطی را بین ارتفاع پیک و جرم به کار گرفته شده در گستره‌ی ۲ تا ۱۲ نانوگرم برای فلورانتین و ۰/۴ تا ۲/۴ نانوگرم برای سایر PAH نشان می‌دهد. اگر ۱۰٪ از مایع استخراجی در ۱۰۰۰ میلی لیتر از نمونه‌ی آب در کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا به کار رود، غلظت فلورانتین در محدوده‌ی ۲۰ تا ۱۲۰ نانوگرم و سایر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در محدوده‌ی ۴ تا ۲۴ نانوگرم قابل اندازه گیری است.

۹-۵-۲-۲ جداسازی بر روی صفحه‌ی سیلیس اشباع شده با کافین در دمای اتاق

صفحه ها را پس از کاربرد مایع استخراجی، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در محفظه تعادل^۱ بر روی آب قرار دهید. بلافاصله صفحه ها را به صورت عمودی در مخزن کروماتوگرافی عمودی و یا به صورت افقی در یک مخزن کروماتوگرافی افقی قرار دهید.

از ۲، ۴- دی متیل - ۳- اکسی پنتان (طبق بند ۶-۱-۲-۳) / هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۲) به نسبت حجمی ۴ به ۱ به عنوان فاز متحرک استفاده کنید.

در یک مخزن عمودی کروماتوگرافی، زمان لازم برای طول پیمایش^۱ ۶/۵ سانتی متری در حدود ۲۵ دقیقه است. در یک مخزن افقی کروماتوگرافی، زمان لازم برای طول پیمایش ۶/۵ سانتی متری در حدود ۱۵ دقیقه و برای طول پیمایش ۴/۵ سانتی متری در حدود ۱۰ دقیقه است. صفحه را برای مدت ۲ دقیقه در جریان هوا در دمای اتاق خشک کنید و سپس برای ۲ ثانیه در محلول پارافین مایع (طبق بند ۶-۹) / هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۲) به نسبت حجمی ۱ به ۲ برای تثبیت و افزایش شدت فلورسانس قرار دهید (با ضریب ۵ برای بنزو [a] پیرن و بنزو [ghi] پیریلن و با ضریب ۲ برای سایر مواد). سپس دوباره برای مدت ۲ دقیقه آن را خشک کنید.

۹-۵-۲-۳ جداسازی بر روی صفحه های HPLC-RP-18

کروماتوگرافی را به صورت عمودی در مخزن کروماتوگرافی عمودی و یا به صورت افقی در یک مخزن کروماتوگرافی افقی انجام دهید (طبق بند ۷-۱۷).
از استونیتریل (طبق بند ۶-۱-۲-۲) / ۲- پروپانل (طبق بند ۶-۱-۲-۴) / متانل (طبق بند ۶-۱-۲-۱) به نسبت حجمی ۱ به ۲ به ۱ به عنوان فاز متحرک استفاده کنید. کروماتوگرام را به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق خشک کنید.
در یک مخزن عمودی کروماتوگرافی، زمان لازم برای طول پیمایش ۶/۵ سانتی متری در حدود ۲۰ الی ۲۵ دقیقه است. در یک مخزن افقی کروماتوگرافی، زمان لازم برای طول پیمایش ۶/۵ سانتی متری در حدود ۲۰ دقیقه و برای طول پیمایش ۴/۵ سانتی متری در حدود ۱۵ دقیقه است (بدون اشباع کردن محفظه).

یادآوری: در دمای پایین تر می توان به جداسازی بهتری دست یافت.

۳-۵-۹ جداسازی بر روی صفحه‌ی سیلیس اشباع شده با کافیین در ۲۰- درجه سلسیوس در فریزر (روش ب)

صفحه را در ۲۰- درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه قرار دهید. سپس از دی کلرو متان (طبق بند ۶-۱-۱-۳) به عنوان فاز متحرک در ۲۰- درجه‌ی سلسیوس استفاده کنید.

در یک مخزن عمودی کروماتوگرافی، زمان لازم برای مسافت مهاجرت ۶/۵ سانتی متری در حدود ۲۰ دقیقه است. در یک مخزن افقی کروماتوگرافی، زمان لازم برای مسافت مهاجرت ۶/۵ سانتی متری در حدود ۱۷ دقیقه و برای مسافت مهاجرت ۴/۵ سانتی متری در حدود ۱۲ دقیقه است.

صفحه را برای مدت ۲ دقیقه در جریان هوا در دمای مشخص خشک کنید و سپس برای ۲ ثانیه در محلول پارافین مایع (طبق بند ۶-۹) / هگزان (طبق بند ۶-۱-۱-۲) به نسبت حجمی ۱ به ۲ برای تثبیت و افزایش شدت فلورسانس قرار دهید (با ضریب ۵ برای بنزو [a] پیرن و بنزو [ghi] پیریلن و با ضریب ۲ برای سایر مواد)، سپس دوباره آن را برای مدت ۲ دقیقه خشک کنید.

۱۰ ارزیابی

۱۰-۱ ارزیابی پیش‌میشی روش غربالگری

برای مقدارهای R_f برای PAH تحت شرایط مختلف به پیوست الف مراجعه کنید. صفحه را برای مدت زمان ۲ دقیقه در جریان هوا در دمای اتاق خشک کنید و سپس آن را زیر لامپ UV (طبق بند ۷-۱۹) ($\lambda = 366 \text{ nm}$) قرار دهید و با مقایسه با محلول استاندارد به وسیله اختصاص دادن ناحیه‌ها به رنگ، مقدار R_f و موقعیت نسبی کروماتوگرام مرجع و شدت فلورسانس نمونه را ارزیابی کنید.

یادآوری: در صفحه‌ی RP-18 تنها ۳ ناحیه می‌تواند قابل تشخیص باشد (طبق شکل ۲).

تعیین طیف ماده-ویژه‌ی نقطه‌های منفرد لازم نیست.

اگر ۱۰۰۰ میلی لیتر آب استخراج شده باشد، باقی مانده‌ی پس از تبخیر را در ۴۰ میکرولیتر حلال حل کنید و ۲۰ میکرولیتر از آن را به کار برید. فلورسانس کروماتوگرام در هیچ کجا قویتر از استاندارد نیست (مجموع PAH به کار رفته ۱۰ میکروگرم). نتیجه عبارت است از: مجموع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای کمتر از ۲۰ میکروگرم در لیتر است (کنش‌های بیشتری لازم نیست).

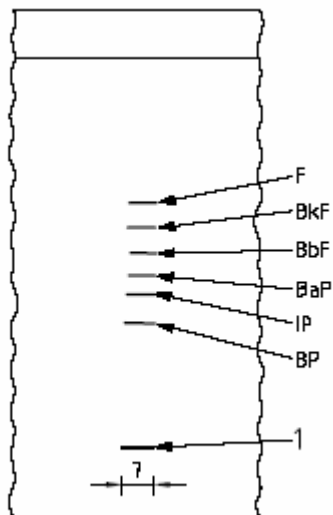
در صورتی که کروماتوگرام نمونه، فلورسانس قوی تری از کروماتوگرام استاندارد نشان داد، اندازه‌گیری‌های کمی ضروری است.

۱۰-۲ ارزیابی پگالی سنجی فلورسانس

کروماتوگرام را با در نظر گرفتن ارتفاع پیک یا سطح پیک در طول موج تهییجی ۳۶۶ نانومتر و طول موج فلورسانس ۴۳۰ نانومتر (صافی لبه ای) ارزیابی کنید. تابع کالیبراسیون برپا شده روی صفحه ای از همان گونه را به کار برید.

در صورت استفاده از نقطه ها در کروماتوگرام، شکاف اسکنر (طبق بند ۷-۲۰) باید پهن تر از بزرگترین ناحیه کروماتوگرام در جهت X باشد. در صورت استفاده از باندها، پهنای شکاف در جهت X، باید $\frac{1}{2}$ تا $\frac{2}{3}$ طول باند باشد و در جهت Y شکاف نباید کوچکتر از $\frac{0.3}{3}$ میلی متر باشد.

شکلهای ۱، ۲ و ۳ موقعیت، رنگهای فلورسانس و منحنی‌های موقعیت فلورسانس PAH ۶ را نشان می‌دهد (۱۰ نانوگرم برای فلورانتن و ۲ نانوگرم برای دیگر PAH). پیوست ب، اطلاعاتی در مورد شناخت اسپکتروسکوپی دربر دارد.



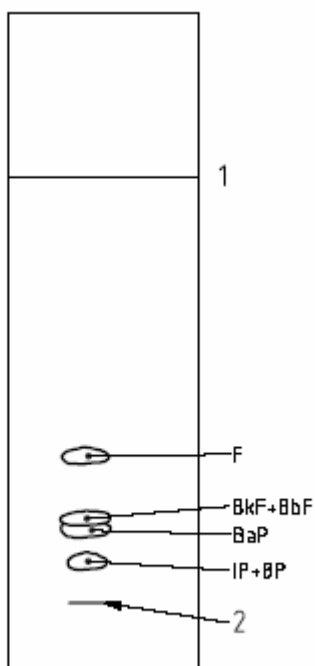
راهنمای شکل

شروع ۱

رنگ های فلورسانس

F	آبی روشن
BkF	آبی تیره
BbF	آبی
BaP	بنفش
IP	زرد روشن
BP	بنفش

شکل ۱ - کروماتوگرام PAH ۶ بر روی صفحه‌ی سیلیس اشباع شده با کافین در ۲۰- درجه‌ی سلسیوس



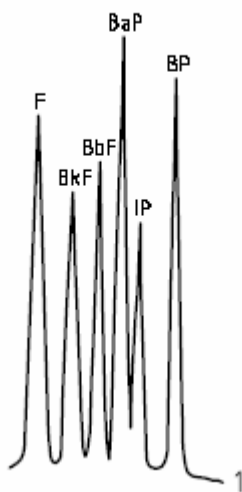
راهنمای شکل

پایان	۱
شروع	۲

رنگ های فلورسانس

F	آبی روشن
BkF	آبی تیره
BbF	آبی
BaP	بنفش
IP	زرد روشن
BP	بنفش

شکل ۲ - کروماتوگرام ۶ PAH بر روی صفحه‌ی RP-18



راهنمای شکل

شروع

۱

F	فلورانتین
BkF	بنزو [k]فلورانتین
BbF	بنزو [b]فلورانتین
BaP	بنزو [a]پیرن
IP	ایندنو [1,2,3-cd] پیرن
BP	بنزو [ghi]پیریلن

شکل ۳ - منحنی موقعیت ۶ PAH بر روی صفحه‌ی سیلیس اشباع شده با کافئین در ۲۰- درجه‌ی سلسیوس

۱۱ کالیراسیون

۱-۱۱ کلیات

با آزمایش همه‌ی مواد جدول ۱، تابع کالیراسیون را برقرار کنید. برای دستیابی به این امر، مقدار R_f مواد منفرد باید از پیش مشخص شده و یا به وسیله‌ی آزمایش رقت‌های مناسب از محلول‌های ذخیره‌ی تک‌جزیی (طبق بند ۶-۱۱) تحت شرایط مشخص کروماتوگرافی، تعیین شوند.

روش تجزیه‌ای را برای به دست آوردن یک تابع کالیراسیون خطی برای هر نوع ماده تنظیم کنید. گستره‌ی کالیراسیون را موافق با موضوع آزمایش انتخاب کنید.

اگر آزمونی با این روش وجود نداشت، داده‌های دقت را مطابق با بندهای ۱۱-۲ و ۱۱-۳ برقرار کنید.

الف) کالیراسیون مرحله‌ی HPTLC به تنهایی، با استفاده از استاندارد خارجی (طبق بند ۱۱-۲).
ب) کالیراسیون روش کل، شامل مرحله‌ی استخراج با استفاده از استاندارد خارجی (طبق بند ۱۱-۳)

روش شرح داده شده در بند ۱۱-۲ برای هدف‌های کار متداول، برای به دست آوردن بر روی هر نوع صفحه‌ی HPTLC توصیه می‌شود.

تابع کالیراسیون، تنها برای گستره‌ی انتخاب شده و صفحه‌ی مرتبط HPTLC معتبر است، و با دو نقطه روی هر صفحه تایید می‌شود.

جدول ۲ نمایه هایی را که در متن بعدی به کار می روند، شرح می دهد.

جدول ۲ - نمایه های استفاده شده در این قسمت از این استاندارد

نام	نمایه
شناسه ی ماده	i
مقدار اندازه گیری شده در کالیبراسیون	e
کل روش	t

۲-۱۱ کالیبراسیون HPTLC با استفاده از استاندارد خارجی

تابع کالیبراسیون را برای هر جزء مورد آزمون با استفاده از حداقل ۵ غلظت مختلف با به کار بردن حجم های متفاوت از محلول های ذخیره ی ماده ی چند جزئی (طبق بند ۶-۱۲) با رقت ۱ به ۵ بنا کنید.

حجم های توصیه شده عبارتند از: ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ میکرولیتر مطابق با ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ نانوگرم برای فلورانتن و ۰/۴، ۰/۸، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ نانوگرم برای سایر مواد هستند. به این ترتیب مجموع PAH به کار گرفته شده ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ نانوگرم است.

مقادیر اندازه گیری شده، y_{ie} ، را در برابر جرم، $\rho_{A,ie}$ ، رسم کنید. با استفاده از معادله ی ۱ تابع کالیبراسیون خطی را محاسبه کنید.

$$y_{ie} = (a_i \cdot \rho_{A,ie}) + b_i \quad \text{معادله ی ۱}$$

که در آن:

y_{ie} مقدار اندازه گیری شده جزء مورد آزمون i ، به عنوان مثال طول پیک یا سطح پیک است.

a_i شیب تابع کالیبراسیون جزء مورد آزمون i ، بر حسب ارتفاع پیک یا سطح پیک به ازای هر

نانوگرم / بر ناحیه کروماتوگرام است.

$\rho_{A,ie}$ جرم به کار گرفته شده جزء مورد آزمون i در صفحه HPTLC بر حسب نانوگرم / بر ناحیه‌ی کروماتوگرام است.

b_i عرض از مبدا تابع کالیبراسیون جزء مورد آزمون i با مختصات، به عنوان مثال ارتفاع پیک یا سطح پیک است.

۱۱-۳ کالیبراسیون کل روش با استفاده از استاندارد فارمی

۱ میلی لیتر از هر محلول کالیبراسیون (طبق بند ۶-۱۳) را به ۱۰۰۰ میلی لیتر از آب اضافه کنید و استخراج و غنی سازی را مطابق بند ۹ انجام دهید.

با استفاده از معادله‌ی ۲ تابع کالیبراسیون خطی را b_{it} محاسبه کنید.

$$y_{iet} = (a_{it} \cdot \rho_{iet}) + b_{it} \quad \text{معادله‌ی ۲}$$

که در آن:

y_{iet} مقدار اندازه گیری شده جزء مورد آزمون i ، به عنوان مثال ارتفاع پیک یا سطح پیک است.

a_{it} شیب تابع کالیبراسیون جزء مورد آزمون i است.

ρ_{iet} غلظت وزنی جزء مورد آزمون i در محلول کالیبراسیون، بر حسب نانوگرم بر لیتر است.

b_{it} عرض از مبدا تابع کالیبراسیون جزء مورد آزمون i با مختصات، به عنوان مثال ارتفاع پیک یا سطح پیک است.

۱۲ اندازه گیری بازیابی

میانگین بازیابی، $\bar{\eta}_i$ ، جزء مورد آزمون را با استفاده از معادله های ۳ و ۴ تعیین کنید.

$$\eta_{i,N} = \frac{\rho_{i,N_f}}{\rho_{i,N_e}} \quad \text{معادله ی ۳}$$

$$\bar{\eta}_i = \frac{\sum_{N=1}^n \eta_{i,N}}{n} \quad \text{معادله ی ۴}$$

که در آن:

$\eta_{i,N}$ بازیابی جزء مورد آزمون i موجود در تراز غلظت N_i است.

ρ_{i,N_f} غلظت وزنی جزء مورد آزمون i در تراز غلظت N_i که با تابع کالیبراسیون محاسبه می شود، بر حسب میکروگرم بر لیتر است.

ρ_{i,N_e} غلظت وزنی داده شده جزء مورد آزمون i در تراز غلظت N_i ، بر حسب میکروگرم بر لیتر است.

$\bar{\eta}_i$ میانگین بازیابی است.

n تعداد ترازهای غلظت است.

از مقدار به دست آمده، با داده های بازیابی که به طور هم فاصله در گستره ی کار توزیع شده اند، برای تصحیح نتایج استفاده کنید.

با روش استخراج شرح داده شده در بند ۹ به طور معمول بازیابی های بالایی به دست می آید.

بازیابی های ناسازگار اثر زمینه یا مشکل روش استخراج را نشان می دهد.

۱۳ اندازه گیری نمونه‌ی تهی

با انجام اندازه گیری های محلول های تهی، مواد و کارکرد صحیح دستگاه را بررسی کنید. برای این منظور ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر را مطابق بند ۹ آزمایش کنید. اگر در نمونه های تهی یک یا چند جزء مورد آزمون یافت شود، جستجو با روش معین را برای یافتن علت انجام دهید و منابع آلودگی را حذف کنید.

۱۴ محاسبه

غلظت وزنی جزء مورد آزمون i در نمونه آب، ρ_i را با استفاده از معادله‌ی ۵ محاسبه کنید.

$$\rho_i = \frac{(y_i - b_i) \cdot V_E}{a_i \cdot V_s \cdot V_a \cdot \bar{\eta}_i} \quad \text{معادله‌ی ۵}$$

که در آن:

ρ_i غلظت وزنی جزء مورد آزمون i در نمونه‌ی آب بر حسب میکروگرم بر لیتر است.
 y_i مقدار اندازه گیری شده جزء مورد آزمون i ، به عنوان مثال بر حسب سطح پیک است.
 b_i عرض از مبدا تابع کالیبراسیون با مختصات، به عنوان مثال بر حسب سطح پیک یا ارتفاع پیک است.

V_E حجم مایع استخراجی بر حسب میکرولیتر که مقداری از آن تزریق می‌شود.
 a_i شیب تابع کالیبراسیون جزء مورد آزمون i ، که فاکتور پاسخ ماده-ویژه نیز نامیده می‌شود. به عنوان مثال سطح پیک بر (نانوگرم بر ناحیه‌ی کروماتوگرام) است.

V_s حجم نمونه‌ی مورد آزمون بر حسب میلی لیتر است.

V_a حجم مایع استخراجی به کار رفته بر صفحه‌ی HPTLC بر حسب میکرولیتر است.

$\bar{\eta}_i$ میانگین بازیابی است.

۱۵ بیان نتایج

غلظت جرمی PAH را به صورت میکروگرم در لیتر طوری بیان کنید که حداکثر دو رقم معنی دار داشته باشد. غلظت های جرمی کوچکتر از ۰/۰۱ میکروگرم در لیتر را تا سه رقم بعد از اعشار گرد کنید.

مثال ۱

مقدار اندازه گیری شده (میکروگرم در لیتر)	نتیجه گزارش شده (میکروگرم در لیتر)	
۰/۱۴۳	۰/۱۴	فلورانتین
۰/۰۰۷۹	۰/۰۰۸	بنزو [a] پیرن

مثال ۲

مقدار اندازه گیری شده (میکروگرم در لیتر)	نتیجه گزارش شده (میکروگرم در لیتر)	نتیجه گزارش شده (مجموع PAH)	
۰/۱۱۳۲	۰/۱۱		فلورانتین
۰/۰۲۷۱	۰/۰۲۷		بنزو [b] فلورانتین
۰/۰۱۱۶	۰/۰۱۲		بنزو [k] فلورانتین
۰/۰۱۵۰	۰/۰۱۵		بنزو [a] پیرن
۰/۰۰۹۷	۰/۰۱۰		بنزو [ghi] پریلن
۰/۰۰۸۲	۰/۰۰۸		ایندینو [1,2,3 - cd] پیرن
مجموع غلظت ۶ PAH			
مجموع غلظت ۶ PAH،			
محاسبه شده بر حسب کربن			
	۰/۱۸۲	۰/۱۸	
	۰/۱۸×۰/۹۵	۰/۱۷	

اگر آب سطحی طبق بند ۲-۳ و ۳-۳ آزمایش شود، مجموع غلظت وزنی ۶ PAH باید تعیین شود و نتایج بر حسب میکروگرم بر لیتر بیان شوند، همانطور که در بالا مشخص شده است.

اگر آب آشامیدنی طبق بند ۳-۱ آزمایش شود، مجموع غلظت وزنی ۶ PAH باید تعیین شود و در ضریب ۰/۹۵ ضرب شود تا محتوی کربن به دست آید. نتایج باید بر حسب میکروگرم در لیتر بیان شوند، همانطور که در بالا مشخص شده است.

اگر آب آشامیدنی طبق بند ۳-۴ آزمایش شود، غلظت وزنی بنزو [a] پیرن و مجموع غلظت وزنی بنزو [b] فلورانتن، بنزو [k] فلورانتن، بنزو [ghi] پریلن و ایندنو [1,2,3 - cd] پیرن باید تعیین شود و نتایج بر حسب میکروگرم در لیتر بیان شوند، همانطور که در بالا مشخص شده است.

۱۶ گزارش آزمون

حداقل، آگاهی های زیر در باره ی آزمایش باید در گزارش آزمون ارایه شود.

الف) شماره ی استاندارد ملی.

ب) داده هایی که برای شناسایی نمونه ی آزمون لازم هستند.

پ) آگاهی های مربوط در مورد نمونه برداری و نگهداری نمونه.

ت) غلظت هر PAH، که مطابق با بند ۱۵ محاسبه و بیان شود.

ث) تمام کارهایی که در این قسمت از استاندارد گفته نشده است ولی بر نتایج اثر می گذارد.

ج) تاریخ انجام آزمون.

۱۷ صحت

داده های آماری که از نتایج یک تجربه ی بین آزمایشگاهی در آلمان (طبق بند ۳-۵) به دست آمده

است، در پیوست ت داده شده است.

پیوست الف

(اطلاعاتی)

مقدار Rf در PAH و تمت شرایط مختلف کروماتوگرافی

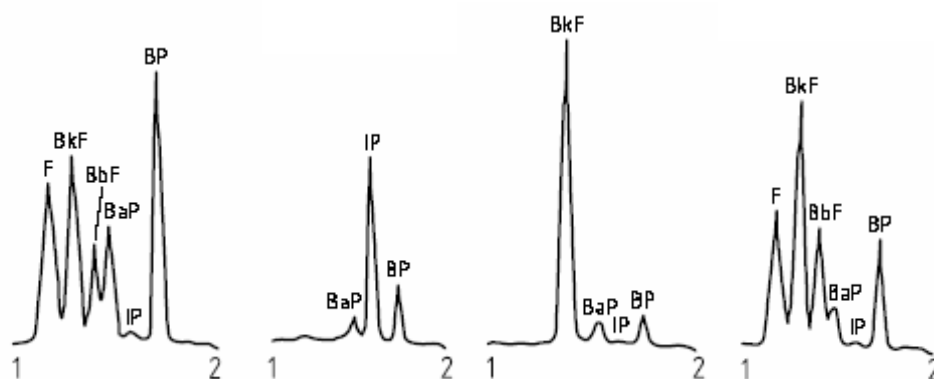
جدول الف.۱ - مقدار Rf در PAH و تمت شرایط مختلف کروماتوگرافی

فلورانتین	بنزو [k] - پیرن	بنزو [b] - فلورانتین	بنزو [a] پیرن	ایندو [1,2,3 - cd] - پیرن	بنزو [ghi] پرلین	
۸۰ تا ۸۵	۸۰ تا ۸۵	۷۵ تا ۸۰	۷۵ تا ۸۰	۷۰ تا ۷۵	۷۰ تا ۷۵	RP 18 عمودی ۶ سانتیمتر دمای اتاق
۸۰ تا ۸۵	۷۵ تا ۸۰	۷۰ تا ۸۰	۷۵ تا ۸۰	۷۰ تا ۷۵	۷۰ تا ۷۵	PR 18 افقی ۶ سانتیمتر دمای اتاق
۵۰ تا ۵۵	۳۵ تا ۴۰	۳۰ تا ۳۵	۱۵ تا ۳۰	۲۰ تا ۲۵	۱۵ تا ۲۰	سیلیس کافئین ناحیه ی غلظت عمودی ۶/۵ سانتیمتر دمای اتاق
۳۵ تا ۴۰	۲۵ تا ۳۰	۲۰ تا ۲۵	۱۵ تا ۲۰	۱۰ تا ۱۵	۵ تا ۱۰	سیلیس کافئین ناحیه ی غلظت افقی ۶/۵ سانتیمتر دمای اتاق
۵۵ تا ۶۰	۴۵ تا ۵۰	۴۰ تا ۴۵	۳۵ تا ۴۰	۳۰ تا ۳۵	۲۰ تا ۲۵	سیلیس کافئین ناحیه ی غلظت عمودی ۶/۵ سانتیمتر -۲۰ °C
۵۰ تا ۵۵	۴۵ تا ۵۰	۳۵ تا ۴۰	۴۰ تا ۴۵	۳۰ تا ۳۵	۲۰ تا ۲۵	سیلیس کافئین ناحیه ی غلظت افقی ۶/۵ سانتیمتر -۲۰ °C
۶۰ تا ۶۵	۵۰ تا ۵۵	۴۰ تا ۴۵	۴۵ تا ۵۰	۳۳ تا ۴۰	۲۵ تا ۳۰	سیلیس کافئین ناحیه ی غلظت افقی ۴/۵ سانتیمتر -۲۰ °C
۵۰ تا ۵۵	۴۰ تا ۴۵	۲۵ تا ۳۵	۳۰ تا ۳۵	۲۰ تا ۲۵	۱۰ تا ۱۵	سیلیس کافئین بدون ناحیه غلظت افقی ۶/۵ سانتیمتر -۲۰ °C

پیوست ب

(اطلاعاتی)

شناسایی اسپکتروسکوپی



- a) $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ $\lambda_{fl} = 436 \text{ nm}$ b) $\lambda_{exc} = 436 \text{ nm}$ $\lambda_{fl} = 578 \text{ nm}$ c) $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ $\lambda_{fl} = 436 \text{ nm}$ d) $\lambda_{exc} = 334 \text{ nm}$ $\lambda_{fl} = 436 \text{ nm}$

راهنمای شکل

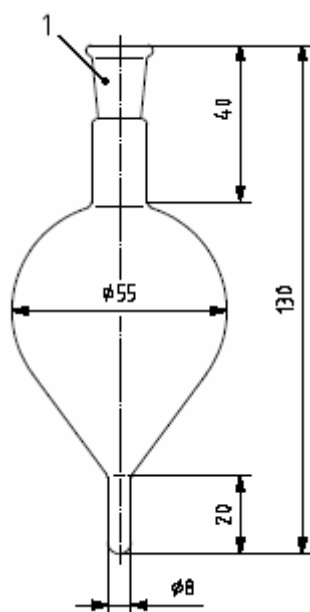
پایان	۱
شروع	۲
رنگ های فلورسانس	
F	آبی روشن
BkF	آبی تیره
BbF	آبی
BaP	بنفش
IP	زرد روشن
BP	بنفش
λ_{exc}	طول موج تهییج
λ_{fl}	طول موج فلورسانس

شکل ب.۱- آشکارسازی گزینشی PAH

پیوست پ

(اطلاعاتی)

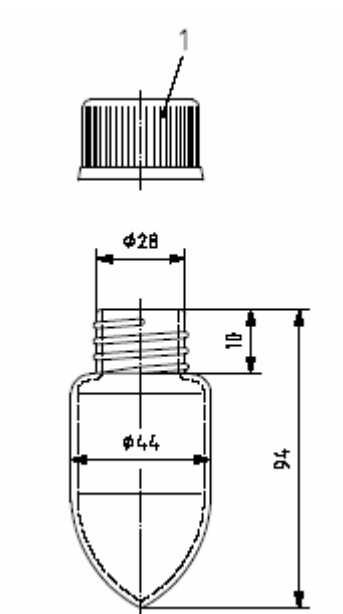
مثال هایی برای سافت تجهیزات ویژه



راهنمای شکل

سر بطری ۱

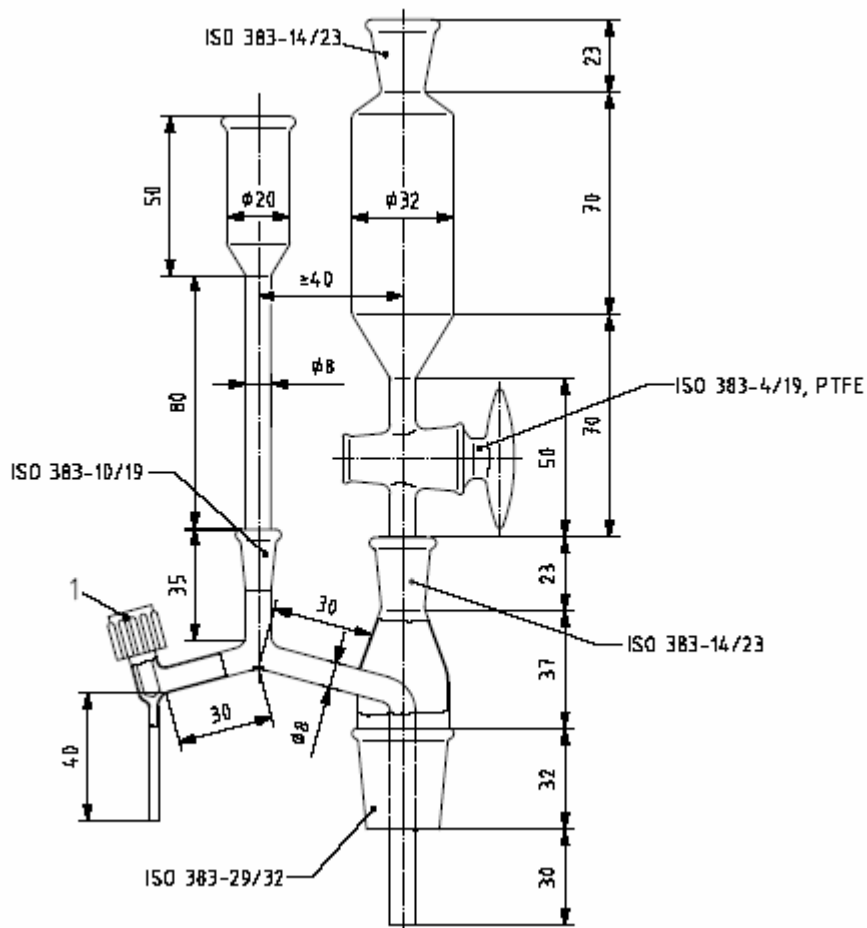
شکل پ.۱ - ظرف تخلیظ (۵۰ میلی لیتر)



راهنمای شکل

در پیچی تفلونی ۱

شکل پ.۲ - لوله‌ی سانتریفوژ با ته مخروطی و در پیچی



راهنمای شکل

در پیچی تفلونی

۱

شکل پ.۳ - ریز جداکننده

پیوست ت

(اطلاعاتی)

صمت

جدول ت.۱ - داده های آماری برای آب آشامیدنی و صاف شده ی ماسه ای

CV(R) %	S _R نانوگرم بر لیتر	CV(r) %	S _r نانوگرم بر لیتر	η %	$\bar{\rho}$ نانوگرم بر لیتر	ρ_{exp} نانوگرم بر لیتر	n _{AP} %	n	l	ترکیب	
۸/۹	۲/۴۸	۱۴/۱	۳/۹۱	۱۰۱/۴	۲۷/۸	۲۷/۴	۸/۷	۴۲	۱۱	فلورانتن	آب آشامیدنی
۸/۴	۰/۵۳	۱۹/۱	۱/۱۹	۹۲/۸	۶/۲	۶/۷	۸/۹	۴۱	۱۱	بنزو [k]فلورانتن	
۱۵/۹	۱/۲۱	۳۳/۶	۲/۵۷	۱۰۰/۷	۷/۷	۷/۶	۰/۰	۴۷	۱۲	بنزو [b]فلورانتن	
۱۸/۱	۰/۹۰	۳۶/۲	۱/۸۰	۱۰۵/۸	۵/۰	۴/۷	۲/۴	۴۱	۱۱	ایندنو [1,2,3-cd] پیرن	
۱۳/۰	۱/۳۵	۲۶/۴	۲/۷۴	۸۶/۵	۱۰/۴	۱۲/۰	۰/۰	۴۷	۱۲	بنزو [ghi]پیریلن	
۵/۷	۷/۰۱	۱۶/۳	۲۰/۰۲	۸۹/۸	۱۲۳/۰	۱۳۶/۹	۲/۳	۴۳	۱۲	فلورانتن	صاف شده ی ماسه ای
۹/۶	۳/۹۲	۱۸/۵	۷/۵۹	۹۲/۹	۴۱/۰	۴۴/۱	۰/۰	۴۴	۱۲	بنزو [k]فلورانتن	
۱۳/۲	۲/۳۰	۲۴/۳	۴/۲۴	۸۰/۲	۱۷/۵	۲۱/۸	۰/۰	۴۴	۱۲	بنزو [a]پیرن	
۱۵/۳	۷/۳۵	۱۹/۰	۹/۱۱	۹۰/۹	۴۸/۱	۵۲/۹	۰/۰	۴۳	۱۲	بنزو [ghi]پیریلن	
										تعداد آزمایشگاهها بعد از حذف موارد غیر قابل قبول	l
										تعداد نتایج بعد از حذف موارد غیر قابل قبول	n
										کسر موارد غیر قابل قبول	n _{AP}
										مقدار مرجع پذیرفته شده	ρ_{exp}
										متوسط میانگین کل نتایج مستقل از موارد غیر قابل قبول	$\bar{\rho}$
										بازیابی	η
										انحراف استاندارد تکرارپذیری	S _r
										ضریب تغییرپذیری تکرارپذیری	CV(r)
										انحراف استاندارد تجدیدپذیری	S _R
										ضریب تغییرپذیری تجدیدپذیری	CV(R)

جدول ت.۲ - داده های آماری برای استانداردهای الف و ب

CV(R) %	S _R نانوگرم بر لیتر	CV(r) %	s _r نانوگرم م بر لیتر	η %	$\bar{\rho}$ نانوگرم بر لیتر	ρ_{exp} نانوگرم بر لیتر	n _{AP} %	n	l	ترکیب	نمونه
۳/۵	۰/۰۹۶	۶/۸	۰/۱۸۹	۹۹/۲	۲/۷۷	۲/۷۹	۰/۰	۳۲	۱۱	فلورانتن	استاندارد الف
۴/۲	۰/۰۳۵	۸/۹	۰/۰۷۵	۹۵/۵	۰/۸۴	۰/۸۸	۰/۰	۳۲	۱۱	بنزو [k] فلورانتن	
۴/۶	۰/۰۱۹	۱۲/۱	۰/۰۵۰	۹۴/۶	۰/۴۲	۰/۴۴	۰/۰	۳۱	۱۱	بنزو [a] پیرن	
۶/۶	۰/۰۶۴	۷/۵	۰/۰۷۳	۹۱/۹	۰/۹۷	۱/۰۶	۶/۳	۳۰	۱۰	بنزو [ghi] پیریلن	
۳/۶	۰/۱۲۲	۷/۸	۰/۲۶۶	۹۹/۹	۳/۴۱	۳/۴۲	۰/۰	۳۲	۱۱	فلورانتن	استاندارد ب
۲/۶	۰/۰۲۰	۶/۴	۰/۰۴۹	۹۱/۳	۰/۷۷	۰/۸۴	۱۵/۶	۲۷	۱۰	بنزو [k] فلورانتن	
۲/۹	۰/۰۲۸	۱۴/۹	۰/۱۴۴	۱۰۱/۶	۰/۹۷	۰/۹۵	۰/۰	۳۲	۱۱	بنزو [b] فلورانتن	
۹/۸	۰/۰۵۷	۱۵/۷	۰/۰۹۱	۹۷/۹	۰/۵۸	۰/۵۹	۰/۰	۳۲	۱۱	ایندنو [1,2,3-cd] پیرن	
۳/۵	۰/۰۴۹	۱۷/۴	۰/۲۴۳	۹۶/۳	۱/۴۰	۱/۴۵	۰/۰	۳۲	۱۱	بنزو [ghi] پیریلن	

تعریف علامت های اختصاری در جدول ت.۱ داده شده است.



ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

.....



Water quality-Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) -
part 1: Determination of six PAH by high-performance thin-layer
chromatography with fluorescence detection after liquid-liquid extraction.

1st. Edition



ICS: 13.060

:
