



آزمایشگاه کنترل غذا و دارو

۱- شماره SOP :	۲- عنوان : اندازه گیری ترکیبات تری هالومتان در آب با استفاده از تکنیک HS GC-MSS
۳- شماره بازنگری :	۴- نویسندگان: اعظم کرانی، کامبیز حسن زاده، محمدرزگار ذره بین، ناصر مفاخری، عابد رستمی، سهراب شریفی، ناسو ویسی، بیژن نوری
۵- بخش مربوطه : آنالیز دستگاهی و سم شناسی	۶- ویرایشگر: اعظم کرانی امضاء
۷- تاریخ :	۸- تایید کننده: امضاء
۹- تعداد صفحات	۱۰- تصویب کننده: امضاء

۱- هدف:

در این روش هدف اندازه گیری کمی ترکیبات تری هالومتان در نمونه های آب است.

۲- دامنه عملکرد:

این روش برای اندازه گیری کمی ترکیبات تری هالومتان در انواع مختلف نمونه های آب از جمله آب آشامیدنی شهری، آب دریا، آب رودخانه ها و آب استخراج کاربرد داد.

۳- مسئولیت:

۴- مواد و تجهیزات:

۴-۱) مواد شیمیایی و معرف ها:

۴-۱-۱) استانداردهای مربوطه شامل

کلروفرم (analytical standard grad)

دی کلرو برومومتان (analytical standard grad)

کلرودی برومومتان (analytical standard grad)

برومو فرم (analytical standard grad)

۴-۱-۲) حلال های شیمیایی

متانول (HPLC grad)

۴-۲) تجهیزات:

۴-۲-۱) دستگاه GC MS

۴-۲-۲) دستگاه تزریق خودکار مجهز به ماژول استخراج در فاز فوقانی (HEAD SPACE (HS))

۴-۳) لوازم شیشه ای وغیره:

۴-۳-۱) ویال های شیشه ای ۲۰ ml

۴-۳-۲) درب تفلونی دارای خاصیت مغناطیسی

۵- ایمنی و توصیه:

۵-۱) ایمنی:

هنگام تعریف ماژول HS برای دستگاه تزریق خودکار، در تنظیم نقاط مرجع نهایت دقت را داشته باشید، کمترین خطایی در این تنظیمات باعث ایجاد مشکلات جدی حتی شکسته شدن سوزن سرنگ ضمن نمونه برداری خواهد شد.

۵-۲) توصیه:

۵-۲-۱) میزان نفوذ سرنگ داخل ویال ها بایستی طوری تنظیم شود که نمونه برداری در فضای بالای سطح نمونه انجام شده و تماسی بین سرنگ و نمونه وجود نداشته باشد.

۵-۲-۲) با توجه به فراریت ترکیبات مورد اندازه گیری، پس از ریختن نمونه ها داخل ویال های مخصوص درب ویال ها را محکم ببندید که ضمن نگهداری در دمای آون و نمونه برداری، نمونه هدر نرفته و خطایی رخ ندهد.

۶- اصطلاحات و تعاریف:

تکنیک استخراج در فضای فوقانی (HS) ، تکنیکی قوی جهت استخراج نمونه های فرار می باشد که دارای مزایایی از جمله عدم نیاز به حلال های آلی، کاهش آلودگی و مزاحمت ضمن استخراج و صرفه جویی در زمان است.

۷- روش کار عملی:

۷-۱) مقدمه:

اندازه گیری ترکیبات تری هالومتان با استفاده از این تکنیک بسیار ساده بوده و هیچگونه آماده سازی نمونه قبل از تزریق مورد نیاز نمی باشد. تنها هنگام نوشتن برنامه تزریق، بایستی پارامترها به درستی تعریف شوند.

۷-۲) تهیه محلول ها:

ابتدا محلول های استاندارد ترکیبات تری هالومتان، با غلظت ۱۰۰۰ ppm با استفاده از متانول (۴-۱-۲) به عنوان حلال تهیه کنید. محلول های حاصل در صورت نگهداری در ظروف تیره و دمای یخچال به مدت یک ماه قابل استفاده می باشند. با استفاده از محلول فوق، مخلوط استانداردها با غلظت ۱ ppm نسبت به هر کدام از ترکیبات تری هالومتان را تهیه کنید. در مرحله پایانی، از محلول فوق، محلولهایی با غلظت ۱۵۰، ۱۰۰، ۷۰، ۵۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰ ppm با استفاده از آب آشامیدنی به عنوان حلال رقیق کننده تهیه کنید.

۷-۳) آماده سازی نمونه:

در این تکنیک آماده سازی خاصی مورد نیاز نیست.

۷-۴) مراحل انجام آزمایش:

۷-۴-۱) ابتدا ۵ ml از محلول های استاندارد با غلظت ۱ ppm را داخل ویال های مخصوص این تکنیک ریخته و با استفاده از مد scan دستگاه، Rt و پیک شاخص هر کدام از ترکیبات را مشخص کنید.

۲-۴-۷) سپس با استفاده از اطلاعات به دست آمده برنامه دستگاه را با مد SIM ، نوشته و load کنید.

۳-۴-۷) در این مرحله ۵ml از محلول های استاندارد نهایی تهیه شده در بخش ۲-۷ داخل ویال ها ریخته و برنامه مربوطه را run کنید.

۴-۴-۷) پس از اتمام Run با استفاده از تکنیک extract ion مساحت هریک از پیک ها را به دست آورده و منحنی کالیبراسیون را با رسم مساحت سطح زیر هریک از پیک ها بر حسب غلظت استانداردهای تزریق شده رسم کنید.

۵-۴-۷) نمونه های مورد بررسی هم به همین صورت به دستگاه تزریق و پس از به دست آوردن مساحت هر یک از پیک ها با استفاده از منحنی کالیبراسیون، غلظت ترکیبات تری هالومتان در نمونه مجهول را محاسبه کنید.

۶-۴-۷) شرایط دستگاه تزریق خودکار، گاز کروماتوگراف و اسپکترومتر جرمی به شرح زیر است:

Syringe temperature: 90 °C

Aven temperature: 80 °C

Incubation time: 10 min

Injection Volume: 250 µl

Injector temperature: 200

split ratio: 1/10

Aven temperature (column):

Initial temperature: 60 hold time: 3min

Ramp1: 4 to value: 70 hold: 2min

Ramp2: 4 100 5min

Ramp3: 20 150 5min

Flow: 1

Auxiliary temperature: 280

Mass source temperature: 230

Quadrupole temperature: 150

۵-۷) محاسبات:

با توجه به اینکه محلول های استاندارد و نمونه مجهول به یک صورت تهیه و به دستگاه تزریق می شوند. غلظت ترکیبات تری هالومتان در نمونه مجهول به طور مستقیم با استفاده از منحنی کالیبراسیون قابل گزارش است و محاسبات دیگری مورد نیاز نمی باشد.

۸- گزارش:

نتایج به دست آمده پس از انجام محاسبات با استفاده از منحنی کالیبراسیون در فرم های گزارش مربوطه ثبت خواهند شد.

۹- مدارک مرجع و منابع:

[1] JORMA KUIVINEN, HAË KAN JOHNSON, DETERMINATION OF TRIHALOMETHANES AND SOME CHLORINATED SOLVENTS IN DRINKING WATER BY HEADSPACE TECHNIQUE WITH CAPILLARY COLUMN GAS-CHROMATOGRAPHY, Wat. Res. Vol. 33, No. 5, pp. 1201-1208, 1999

نتایج اعتباربخشی آزمون اندازه‌گیری
ترکیبات تری‌هالومتان در آب با استفاده
از تکنیک HS-GC MS

فهرست مطالب

بررسی ویژه بودن روش و شناسایی کیفی ترکیبات تری‌هالومتان **(Specificity)**

رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین محدوده خطی **(Linearity)**

تعیین حد تشخیص و بالاترین غلظت قابل اندازه‌گیری

بررسی تکرارپذیری **(Repeatability)**

درصد بازیافت و صحت **(Recovery and Accuracy)**

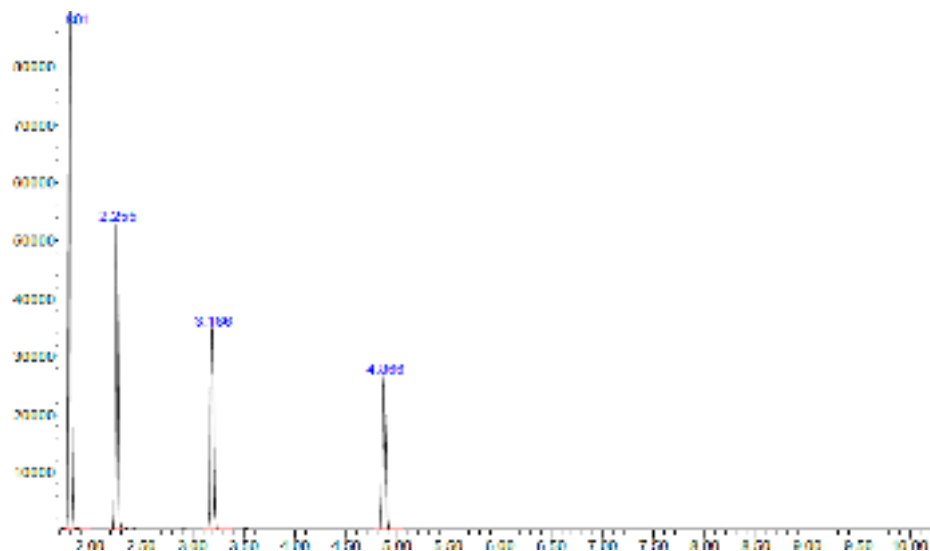
جدول ضمیمه (۱)

منابع

(1) بررسی ویژه بودن روش و شناسایی کیفی ترکیبات تری‌هالومتان (Specificity)

در این مرحله ابتدا مخلوط ترکیبات استاندارد تری‌هالومتان تزریق شده، در مرحله بعد محلول آماده شده نمونه آب آشامیدنی و سپس مخلوط ترکیبات تری‌هالومتان به نمونه اضافه و به دستگاه تزریق می‌شود.

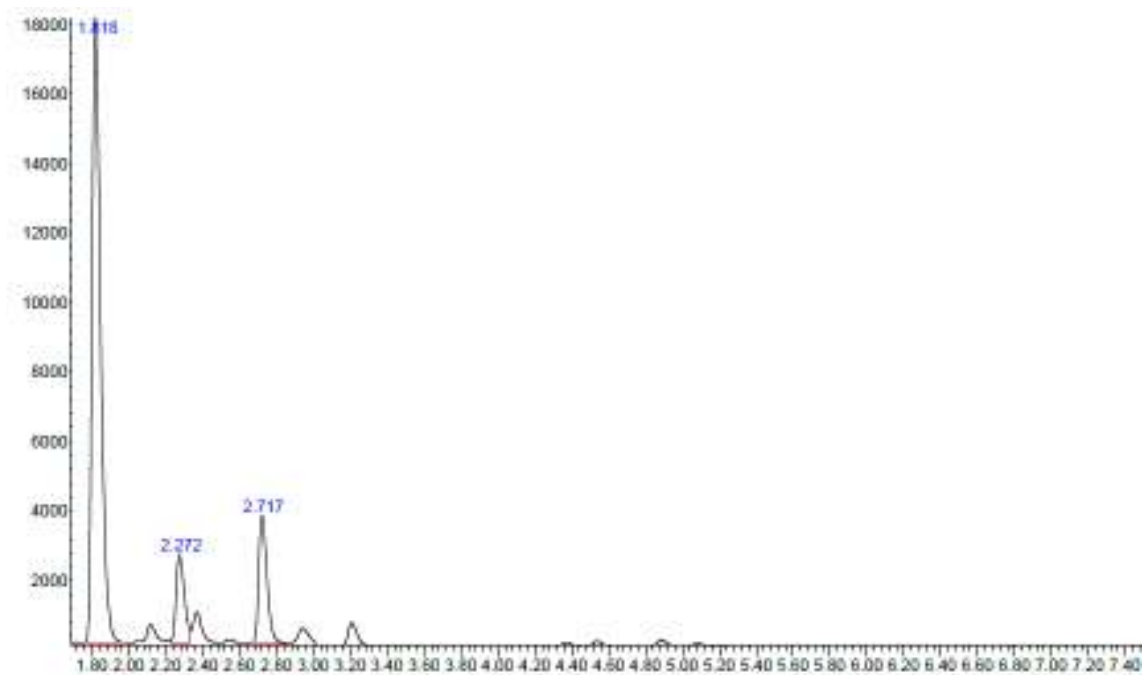
(a) کروماتوگرام حاصل از تزریق مخلوط استانداردهای ترکیبات تری‌هالومتان تهیه شده در آب دیونیزه به دستگاه



(b) کروماتوگرام حاصل از تزریق نمونه آب آشامیدنی به دستگاه



(c) کروماتوگرام حاصل از تزریق مخلوط استانداردهای ترکیبات تری‌هالومتان اضافه شده به نمونه آب آشامیدنی



در جدول زیر زمان بازداری محلول استاندارد ترکیبات تری‌هالومتان، کلروفرم، دی‌کلروبرومتان و دی‌برموکلرومتان موجود در نمونه و محلول‌های استاندارد اضافه شده به نمونه مقایسه شده است. تفاوت‌های بسیار جزئی مشاهده شده بیانگر ویژه بودن (specificity) روش است. نتایج گزارش شده میانگین زمان بازداری پیک‌های حاصل پس از ۳ بار اندازه‌گیری متوالی می‌باشد.

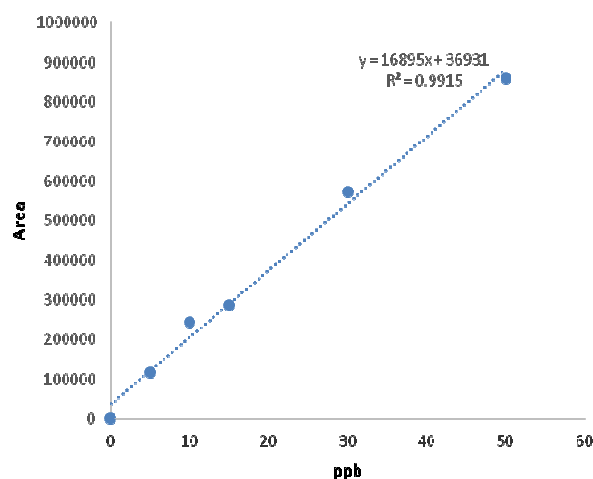
	کلروفرم	دی‌کلروبرومتان	دی‌برموکلرومتان	برموفرم
زمان بازداری استانداردهای تزریق شده (min)	1/801	2/255	3/186	4/866
زمان بازداری ترکیبات تری‌هالومتان در نمونه آب آشامیدنی (min)	1/827	2/281	3/213	-
زمان بازداری استانداردهای اضافه شده به نمونه آب آشامیدنی (min)	1/818	2/272	3.200	-

۲) رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین محدوده خطی (Linearity)

لازم به توضیح است که در این کار به منظور در نظر گرفتن اثر ماتریس نمونه، محلول‌های استاندارد با استفاده از محلول نمونه آب آشامیدنی به عنوان حلال تهیه شده‌اند، نمونه مورد استفاده خود دارای مقداری از ترکیبات تری‌هالومتان است که ضمن رسم منحنی کالیبراسیون مساحت پیک مشاهده شده برای محلول **blank** از مساحت پیک مربوط به هر ترکیب تری‌هالومتان برای سایر محلول‌های استاندارد کم شده است.

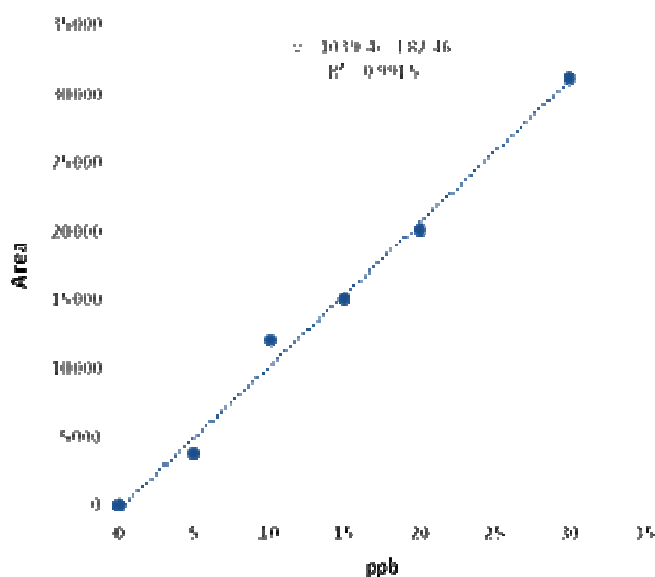
(a) منحنی کالیبراسیون مربوط به ترکیب CHCl_3

CHCl_3	
ppb	Peak Area
0	0
5	117780
10	244574
15	287399
30	572052
50	858229



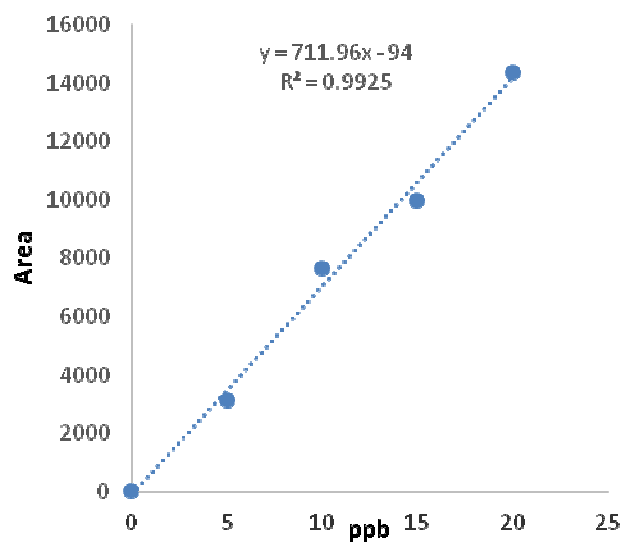
(b) منحنی کالیبراسیون مربوط به ترکیب CHCl_2Br

CHCl_2Br	
ppb	Peak Area
0	0
5	3777
10	12050
15	15005
20	20083
30	31145



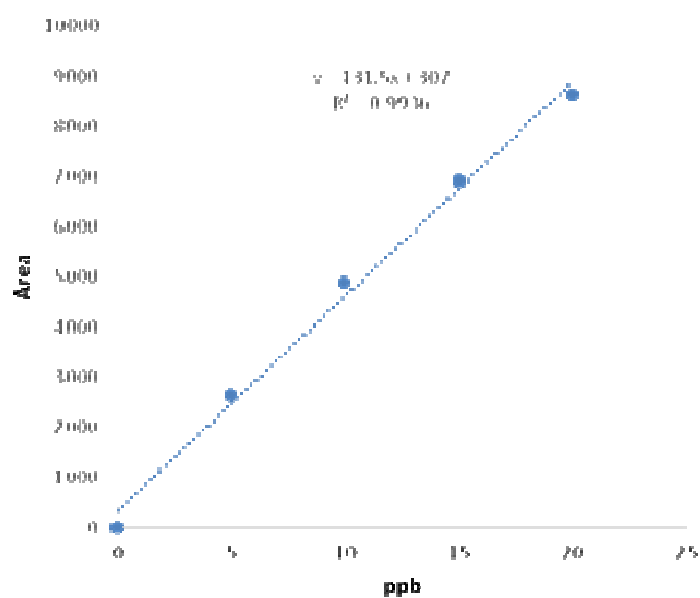
(c) منحنی کالیبراسیون مربوط به ترکیب CHClBr_2

CHClBr_2	
ppb	Peak Area
0	0
5	3119
10	7664
15	9973
20	14372



(d) منحنی کالیبراسیون مربوط به ترکیب CHBr_3

CHBr_3	
ppb	Peak Area
0	0
5	2650
10	4886
15	6923
20	8651



۳) حد تشخیص، کمترین غلظت قابل اندازه‌گیری و محدوده خطی

	CHCl_3	CHCl_2Br	CHClBr_2	CHBr_3
LOD (ppb)	0.5	0.5	0.5	0.5
LOQ (ppb)	5	5	5	5
Linear range (ppb)	5-50	5-30	5-20	5-20

۴) بررسی تکرارپذیری (Repeatability)

به منظور بررسی تکرارپذیری روش معرفی شده برای اندازه‌گیری ترکیبات تری‌هالومتان، نمونه محتوی ترکیبات CHClBr_2 و CHCl_2Br شش بار آماده‌سازی و به دستگاه GC MS تزریق شده‌اند. نتایج به دست‌آمده که در جداول زیر نشان داده شده است، تاییدی بر تکرارپذیری مناسب و دقت بالای این روش است.

sample number	CHCl_2Br		CHClBr_2	
	Rt	Area	Rt	Area
1	2.272	30542	3.204	9574
2	2.273	30646	3.207	9624
3	2.28	29948	3.214	9563
4	2.276	30650	3.211	9641
5	2.278	30839	3.213	9739
6	2.279	31632	3.214	9875
X	2.2763333	30709.5	3.2105	9669.3333
Sd	0.003266	544.66274	0.0041352	118.66367
RSD	0.143476	1.773597	0.128803	1.227217

(Recovery and Accuracy) درصد بازیافت و صحت

به منظور بررسی صحت نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیبات تری‌هالومتان در آب آشامیدنی، با استفاده از روش معرفی شده درصد بازیافت این ترکیبات مورد بررسی قرار گرفته است. در اینجا نیز نتایج حاصل تاییدی بر صحت قابل قبول اندازه‌گیری‌های انجام شده با استفاده از روش معرفی شده هستند. قابل یادآوریست که هر یک از نتایج گزارش شده میانگین سه اندازه‌گیری متوالی هستند.

		peak area	ppb	Real	recovery percent
CHCl ₃	Sample	107438	4.173247	-	-
	Sample + 25 ppb CHCl ₃	505112	27.71122	25	94.15188
CHCl ₂ Br	Sample	28910	27.98967	-	-
	Sample + 25 ppb CHCl ₂ Br	56422	54.45878	25	105.8765
	Sample +30 ppb CHCl ₂ Br	61833	59.66467	30	105.5833
CHClBr ₂	Sample	9072	12.87432	-	-
	Sample + 15 ppb CHClBr ₂	16483	23.28361	15	69.39528
	Sample +20 ppb CHClBr ₂	18823	26.56469	20	70.45188
CHBr ₃	Sample	595	0.667439	-	-
	Sample + 20 ppb CHBr ₃	9063	20.292	20	98.12283
	Sample + 10 ppb CHBr ₃	3956	8.456547	10	77.89108

جدول ضمیمه ۱

AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanical, 2002

Validation parameters	Accepted range
Linearity	$r^2 \geq 0.99$
Repeatability	6%
Recovery percent	70-120%
R_s	>1

منابع:

[1] International Accreditation Service, Guidelines for Food Testing Laboratories August, 2015

[2] AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanical, 2002