



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran  
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران  
۱۴۵۹۳  
تجدید نظر اول  
۱۳۹۵

INSO  
14593  
1st. Revision  
2017

علف کش‌ها - اندازه‌گیری کلروفنوکسی اسید  
در پسماند با استفاده از HPLC

Herbicides – Determination of  
Chlorophenoxy Acid in Waste Using HPLC

ICS: 13.030.30



استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۵۹۳ (تجدیدنظر اول): سال ۱۳۹۵

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج - شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: [standard@isiri.org.ir](mailto:standard@isiri.org.ir)

وبگاه: <http://www.isiri.org>

### **Iranian National Standardization Organization (INSO)**

No.2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

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

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: [standard@isiri.org.ir](mailto:standard@isiri.org.ir)

Website: <http://www.isiri.org>



shaghoor.ir

## به نام خدا

### آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

- 1- International Organization for Standardization
- 2- International Electrotechnical Commission
- 3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
- 4- Contact point
- 5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« علف‌کش‌ها - اندازه‌گیری کلروفنوکسی اسید در پسماند با استفاده از HPLC »

**رئیس:**

ردائی، احسان

(کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)

**سمت و/یا محل اشتغال:**

اداره کل استاندارد استان همدان

**دبیر:**

افتخاری دافچاهی، سمیه

(کارشناسی ارشد شیمی فیزیک)

شرکت رویان پژوهان سینا

**اعضا:** (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

اسدی، ایرج

(دکتری آلودگی محیط زیست)

سازمان محیط زیست استان همدان

اسمعیلی طارم‌سری، معصومه

(کارشناسی ارشد شیمی فیزیک)

شرکت رویان پژوهان سینا

بیگدلی، داوود

(کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)

شرکت پارس کیمیا زیست بهسازان

حسینی، مرضیه

(کارشناسی آب و خاک)

آزمایشگاه پیرایه زیست قزوین

صنعتگر دلشاد، الهام

(کارشناسی ارشد شیمی فیزیک)

شرکت رویان پژوهان سینا

قاسملو، رقیه

(کارشناسی ارشد مهندسی منابع طبیعی، محیط زیست)

شرکت آب منطقه‌ای استان همدان

نجفی، امیر

(کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)

آزمایشگاه فنی و مکانیک خاک همدان

هاشمی، مهدی

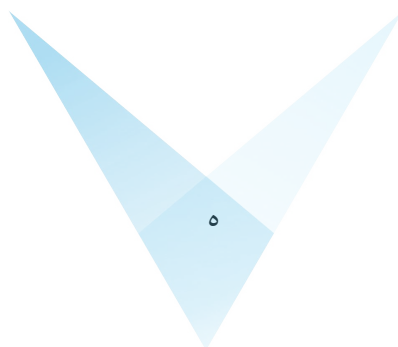
(دکتری شیمی تجزیه)

دانشگاه بوعلی سینا همدان

**ویراستار:**

حسن‌زاده، شهناز  
(کارشناسی بیولوژی)

اداره کل استاندارد استان کردستان



فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
	پیش‌گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصول آزمون
۲	۴ مزاحمت‌ها
۳	۵ وسایل
۳	۶ مواد و/یا واکنشگرها
۵	۷ آماده‌سازی محلول‌های استاندارد
۶	۸ جمع‌آوری، نگهداری و حمل نمونه
۶	۹ روش اجرای آزمون
۶	۱-۹ استخراج و هیدرولیز نمونه (با بافت آبی)
۶	۲-۹ استخراج و هیدرولیز نمونه (سایر بافت‌ها)
۷	۳-۹ آماده‌سازی برای تجزیه (محیط آبی)
۷	۴-۹ آماده‌سازی نمونه برای تجزیه (سایر محیط‌ها)
۸	۵-۹ واسنجی HPLC
۸	۶-۹ تجزیه HPLC
۸	۷-۹ شرایط HPLC
۹	۸-۹ کنترل کیفیت
۹	۱۰ روش محاسبه
۱۰	۱۱ دقت و اریبی

## پیش‌گفتار

استاندارد «علف‌کش‌ها- اندازه‌گیری کلروفنوکسی اسید در پسماند با استفاده از HPLC» که نخستین بار در سال ۱۳۹۰ تدوین و منتشر شد، بر اساس پیشنهادهای دریافتی و بررسی و تأیید کمیسیون‌های مربوط برای اولین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در یکصد و سی‌امین اجلاس کمیته ملی استاندارد محیط زیست مورخ ۱۳۹۵/۱۱/۱۰ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۵۹۳: سال ۱۳۹۰ می‌شود.

منبع و مأخذی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ASTM D5659: 2014, Standard Test Method for Chlorophenoxy Acid Herbicides in Waste Using HPLC

## علفکش‌ها - اندازه‌گیری کلروفنوکسی اسید در پسماند با استفاده از HPLC

هشدار - در این استاندارد تمام موارد ایمنی و بهداشتی درج نشده است. در صورت مواجهه با چنین مواردی، مسئولیت برقراری شرایط بهداشت و ایمنی مناسب و اجرای آن بر عهده کاربر این استاندارد است.

### ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، ارائه روش آزمون اندازه‌گیری ۴،۲-دی‌کلرو فنوکسی استیک اسید (D-۴،۲)<sup>۱</sup>، ۴،۲، ۵-تری‌کلرو فنوکسی استیک اسید (T-۵، ۴، ۲)<sup>۲</sup> و ۴،۲، ۵-تری‌کلرو فنوکسی پروپیونیک اسید (سیلوکس)<sup>۳</sup> در مایعات و جامدات، به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به یک آشکارساز فرابنفش (HPLC/UV)<sup>۴</sup> است.

این استاندارد برای موارد زیر کاربرد دارد:

الف- برای گستره غلظت حدود ۵۰ mg/kg تا ۱۰۰۰ mg/kg. این گستره در آماده‌سازی نمونه و رقیق‌سازی ذکر شده در بند ۹ مدنظر قرار می‌گیرد. حدود تشخیص پایین‌تر با استفاده از نمونه‌هایی با اندازه بزرگ‌تر، حجم‌های نهایی کمتر یا استفاده از استخراج فاز جامد یا پیوسته، تغلیظ و/یا پاک‌سازی یا ترکیبی از موارد مذکور قابل حصول می‌باشد. علفکش‌های کلرو فنوکسی می‌توانند به صورت انواع گسترده‌ای از نمک‌ها یا استرها وجود داشته باشند که به اسید مربوطه تبدیل و تجزیه شده و به صورت اسید مربوطه گزارش می‌شوند.

ب- برای آزمون پسماندهای جامد و مایع، بافت‌های حاصل از استخراج شامل: محلول‌های آبی، روغن، حلال‌های مصرف شده، خاک، خاکستر، عصاره حاصل از آب‌شویی و غیره.

پ- برای آزمون سایر علفکش‌های فنوکسی‌اسیدی.

### ۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

1- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

2- 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid

3- Silvex

4- high performance liquid chromatography with an ultraviolet detector



در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

#### 2-1 ASTM D1193, Specification for Reagent Water

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸ سال ۱۳۸۱، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون، با استفاده از استاندارد ISO 3696:1987 تدوین شده است.

#### 2-2 Method 8150, Chlorinated Herbicides, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods SW-846 Third Edition

#### 2-3 Method 8000A, Gas Chromatography, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, SW-846, 3rd Edition, Final Update 1

#### 2-4 Method 555, Determination of Chlorinated Acids in Water by High Performance Liquid Chromatography with a Photodiode Array Ultraviolet Detector EPA/600/R-92/129, Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water, Supplement No. 2

### ۳ اصول آزمون

کلرو فنوکسی اسیدها و کلرو فنوکسی استرها، با هم زدن و گرما دادن در محیط آبی بازی هیدرولیز شده و نمک‌های مربوط به خود را تشکیل می‌دهند. سپس این نمک‌ها با افزودن HCl به اسیدهای متناظر تبدیل شده و محلول آبی اسیدهای آزاد با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مجهز به آشکارساز فرابنفش تجزیه می‌شوند.

### ۴ مزاحمت‌ها

۱-۴ مایعات آلی که دارای درصد بالایی از مواد آلی کلردار بوده و از آب چگال‌تر می‌باشند، ممکن است برای استخراج سیلوکس ایجاد مزاحمت کنند. ضروری است این نمونه‌ها را قبل از هیدرولیز، با هگزادکان به نسبت ۱:۱ مخلوط کنید.

۲-۴ فنول‌ها، به‌ویژه کلرو فنول‌ها، به همراه گونه موردنظر شویش شده و از این رو در روش ایجاد مزاحمت می‌کنند.

۳-۴ سایر مواد آلی که نور ماوراء بنفش را در طول موج مشخص شده، جذب می‌کنند می‌توانند مزاحم باشند. همچنین ترکیباتی که به فاصله نزدیکی از نمونه شویش می‌شوند شناسایی را چنانچه تنها بر اساس

زمان بازداری باشد، پیچیده می‌کنند. هنگامی که چنین مزاحمت‌هایی وجود داشته باشد، آزمون‌گر باید برای شناسایی قطعی به منابع اطلاعاتی دیگری مانند آنچه که در زیر آمده است، مراجعه نماید:

۱-۳-۴ طول موج‌های تاییدی ثانویه، مانند ۲۲۷ nm یا ۲۳۵ nm؛

۲-۳-۴ استفاده از یک ستون تاییدکننده؛

۳-۳-۴ استفاده از یک برنامه کروماتوگرافی تاییدکننده مانند تغییر در ترکیب یا شیب غلظتی فاز متحرک.

## ۵ وسایل

۱-۵ دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالای تجزیه‌ای، با قابلیت کار در فشار ۴۰۰۰ psi و سرعت جریان ۳ ml/min.

۲-۵ آشکارساز فرابنفش با طول موج متغیر، با قابلیت پایش طول موج‌های ۲۰۷ nm، ۲۲۷ nm و ۲۳۵ nm به صورت همزمان یا مجزا.

۳-۵ ستون کروماتوگرافی، C18 با تراکم شعاعی ۸، ۱۰۰ mm، اندازه ذرات ۴ μm. ستون‌های تراکم شعاعی یا فولاد ضد زنگ معادل نیز می‌توانند استفاده شوند.

۴-۵ ستون محافظ، C18، اندازه ذرات ۴ μm.

۵-۵ سامانه تزریق، شیر تزریق دستی، نمونه‌بردار دستگاهی خودکار، مجهز به یک لوپ ۵۰۰ μl یا معادل.

۶-۵ سامانه داده، مناسب برای کنترل سامانه HPLC و برای دریافت داده.

۷-۵ ویال‌های شیشه‌ای، با ظرفیت ۱۶ ml و با درپوش پیچی از جنس TFE-فلوروکربن.

۸-۵ میکرو سرنگ، با ظرفیت‌های ۱۰ μl، ۱۰۰ μl، ۵۰۰ μl.

۹-۵ ترازوی تجزیه‌ای، مناسب برای توزین صحیح با تقریب ۰٫۰۰۰۰۱ g.

۱۰-۵ پیپت پاستور، با شیشه یکبار مصرف.

۱۱-۵ پیپت، با شیشه یکبار مصرف، در حجم‌های ۱ ml و ۱۰ ml، واسنجی شده.

۱۲-۵ کاغذ pH، با گستره سنجش pH از ۱ تا ۱۱.

۱۳-۵ صفحه داغ، با همزن.

۱۴-۵ وسایل تصفیه آب، جهت استفاده در تصفیه اب برای HPLC، مطابق با زیربند ۴-۶.

۱۵-۵ صافی‌های تصفیه آب، ۰٫۲۲ μm.

۱۶-۵ بالن، با گنجایش ۱۰۰ ml.

۵-۱۷ سانتریفیوژ (گریزانه)

۵-۱۸ میله همزن

۵-۱۹ قیف، از جنس شیشه.

۵-۲۰ کاغذ صافی، بدون خاکستر.

## ۶ مواد و/یا واکنشگرها

۶-۱ خلوص واکنشگرها، در طول تجزیه، فقط از واکنشگرهایی با خلوص تجزیه‌ای استفاده کنید، مگر اینکه نوع دیگری مشخص شده باشد. موادی با خلوص دیگر نیز ممکن است استفاده شوند، مشروط بر آنکه ابتدا معلوم شود که این مواد دارای خلوص کافی هستند تا کاربرد آن‌ها، بدون کاهش صحت اندازه‌گیری‌ها مجاز گردد.

۶-۲ خلوص آب، در طول تجزیه، به غیر از موارد مشخص شده، از آب درجه ۲ مطابق با ویژگی‌های استاندارد ASTM D1193 استفاده شود.

۶-۳ استون، با کیفیت آفت‌کش یا معادل آن برای تهیه استانداردها. در صورتی که از متانول در تهیه محلول‌های اسیدی استاندارد استفاده شود، گونه‌های اسیدی علف‌کش اضافی به شکل متیل استری خود تبدیل خواهند شد.

۶-۴ آب صاف شده با فسفریک اسید ۰٫۵٪ (FWPA)<sup>۱</sup>، ۵ ml فسفریک اسید با خلوص بالا را به ۹۹۵ ml آب (زیربند ۷-۲) در یک بالن حجم‌سنجی اضافه کنید. محلول را با یک صافی ۰٫۲۲ μm صاف کنید.

۶-۵ استانداردهای مرجع علف‌کش، ترکیبات واسنجی<sup>۲</sup> مرجع زیر موردنیاز است. محلول‌های مرجع را می‌توان از مواد استاندارد خالص تهیه کرده یا به صورت محلول‌های تایید شده خریداری نمود.

۶-۵-۱ D-۴، ۲، ۴، T-۵، سیلوکس و ۲ و D-۴ متیل استر.

۶-۵-۲ T-۵، ۴، ۲، سیلوکس متیل استر.

۶-۶ هگزا دکان، ۹۹٪.

۶-۷ هیدروکلریک اسید (با چگالی ۱٫۱۹۵ g/ml)، هیدروکلریک اسید (HCl) غلیظ.

۶-۸ متانول، با درجه خلوص مناسب برای آفت‌کش یا معادل.

1- Filtered Water Phosphoric Acid  
2- Calibration

۹-۶ استونیتریل، با کیفیت آفت کش یا معادل. استفاده از استونیتریل به عنوان فاز متحرک به جای متانول مجاز است.

۱۰-۶ فسفریک اسید،  $H_3PO_4$  ۸۵٪، ارتو فسفریک اسید، با درجه HPLC.

۱۱-۶ محلول پتاسیم هیدروکسید ۳۷٪، به دقت ۳۷ g دانه‌های پتاسیم هیدروکسید (KOH) را به ۵۰ ml آب موجود در یک بالن حجمی ۱۰۰ ml اضافه کرده و با حرکت دادن بالن به صورت دورانی مخلوط کنید. سپس با آب به حجم برسانید.

احتیاط - هنگام افزودن پتاسیم هیدروکسید به آب اقدامات احتیاطی را در نظر بگیرید، زیرا باعث یک واکنش گرمازا می‌شود. در هنگام مخلوط کردن، خنک کردن بالن توصیه می‌شود.

## ۷ آماده‌سازی محلول‌های استاندارد

۱-۷ محلول‌های استاندارد ذخیره را به شرح زیر تهیه کنید:

برای متیل استر یا اسیدهای علف‌کش، درون یک بالن حجمی شیشه‌ای ۱۰ ml به دقت مقدار ۰٫۱۰۰ g از آن را وزن کنید و با استونی که دارای درجه علف‌کش می‌باشد به حجم برسانید. برای سهولت کار تجزیه‌گر می‌توان از حجم‌های بیشتری استفاده نمود. اگر خلوص ترکیب ۹۶٪ یا بیشتر باشد، می‌توان وزن را بدون تصحیح برای محاسبه غلظت محلول استاندارد ذخیره به کار برد.

۲-۷ محلول‌های استاندارد ذخیره را به ویال‌های درپوش‌دار از جنس TFE-فلوروکربن منتقل کنید. در دمای  $4^{\circ}C$  و دور از نور نگه‌داری کنید. محلول‌های استاندارد ذخیره را باید مرتب برای علائم تخریب یا تبخیر، مخصوصاً قبل از آن که برای تهیه محلول‌های واسنجی استفاده شوند، بررسی کرد. علامت‌گذاری سطح مقعر مایع بر روی ویال استاندارد هنگام پایش تبخیر توصیه می‌شود.

۳-۷ محلول‌های استاندارد ذخیره را باید پس از یک سال یا زودتر، در صورتی که مقایسه با یک استاندارد کنترلی نشان‌دهنده وجود مشکل باشد، تعویض کرد.

۴-۷ محلول‌های استاندارد واسنجی را در حداقل ۵ سطح غلظت برای هر پارامتر، از محلول استاندارد ذخیره تهیه کنید. مقدار مناسبی از محلول استاندارد ذخیره را به یک بالن حجمی افزوده و با FWPA رقیق کنید. حدود غلظتی باید با گستره غلظت پذیرفته شده در نمونه‌های واقعی یا گستره کاری دستگاه HPLC/UV همخوانی داشته باشد. گستره کاری ۰٫۵ mg/l تا ۵ mg/l مناسب می‌باشد. محلول‌های واسنجی را باید پس از شش ماه یا زودتر، در صورتی که مقایسه با یک استاندارد کنترلی نشان‌دهنده وجود مشکل باشد، تعویض کرد. انحراف ۲۰٪ پاسخ بین کنترل روزانه و واسنجی اولیه نشان‌دهنده یک مشکل بالقوه می‌باشد.

## ۸ جمع‌آوری، نگهداری و حمل نمونه

- ۸-۱ جمع‌آوری نمونه باید طبق دستورالعمل‌های نمونه‌برداری مناسب انجام شود.
- ۸-۲ نمونه‌های استخراج شده باید در ظروف شیشه‌ای نگهداری شوند. نگهداری طولانی مدت باید در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  انجام شود. ۱۰۰ ml نمونه برای بافت‌های آبی و ۵ g نمونه برای جامدات یا مایعات آلی لازم است.
- ۸-۳ با مواد نمونه استفاده نشده، رقیق‌سازی‌های آزمایشگاهی و پسماند نمونه باید مطابق با مقررات رفتار شود. برای هرگونه راهنمایی در خصوص حمل و دور ریز پسماندهای آزمایشگاهی، به افراد متخصص و مقررات موجود، و/یا هر دو مراجعه کنید.

## ۹ روش اجرای آزمون

### ۹-۱ استخراج و هیدرولیز نمونه (با بافت آبی)

- ۹-۱-۱ ۵۰ ml یا ۵۰ g از نمونه را به یک ارلن مایر یا بالن حجمی ۱۰۰ ml اضافه کنید.
- ۹-۱-۲ ۱۰ ml محلول KOH (۳۷٪) را به بالن افزوده و pH آن را بررسی کنید. اگر pH از ۱۰ کمتر است، محلول KOH بیشتری اضافه کنید. حجم محلول KOH استفاده شده را بر حسب میلی‌لیتر و pH نهایی را ثبت کنید.
- ۹-۱-۳ یک میله هم‌زن را در بالن انداخته و بالن را بر روی یک صفحه داغ مجهز به همزن مغناطیسی قرار دهید. سپس در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  تا  $90^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۲ ساعت حرارت داده و هم بزنید.
- ۹-۱-۴ مطابق با زیربند ۹-۳ ادامه دهید.

### ۹-۲ استخراج و هیدرولیز نمونه (سایر بافت‌ها)

- ۹-۲-۱ مقدار ۵ g از نمونه را در یک بالن حجمی ۱۰۰ ml یا ارلن مایر وزن کنید.
- یادآوری- از نوع بافت نمونه، مخصوصاً مواد جامد مانند خاک و خاکستر، آگاه باشید. ممکن است خرد کردن یا پودر کردن نمونه برای حصول اطمینان از استخراج کامل، لازم باشد.
- ۹-۲-۱-۱ اگر نمونه، مایعی آلی با چگالی بالا برای مثال روغن‌هایی با PCB بالا، حلال‌های کلردار و مانند آن‌ها باشد، ۲٫۵ g از نمونه را در یک بالن حجمی ۱۰۰ ml وزن کنید و ۲٫۵ گگزا دکان به آن اضافه کنید. با چرخاندن بالن، مواد را مخلوط کنید.

یادآوری- از مطالعات بازیابی مشخص شده است که علف‌کش‌های کلرو فنوکسی پس از هیدرولیز در مایعات آلی شدیداً کلرینه می‌شوند و در ته بالن حجمی باقی می‌مانند. با مخلوط کردن نمونه با گگزا دکان نمونه در سطح بالن قرار می‌گیرد و علف‌کش‌ها پس از هیدرولیز در فاز آبی استخراج و نگهداری یا جمع‌آوری می‌شوند.

- ۹-۲-۱-۲ ۵۰ ml آب را به بالن افزوده و با چرخاندن بالن، مواد را مخلوط کنید.
- ۹-۲-۱-۳ ۱۰ ml محلول KOH (۳۷٪) را به بالن افزوده و pH آن را بررسی کنید. اگر pH از ۱۰ کمتر است، محلول KOH بیشتری اضافه کنید. حجم محلول KOH استفاده شده را بر حسب میلی‌لیتر و pH نهایی را ثبت کنید.
- ۹-۲-۱-۴ یک میله هم‌زن را در بالن انداخته و بالن را بر روی یک صفحه داغ مجهز به همزن مغناطیسی قرار دهید. سپس در دمای ۷۰ °C تا ۹۰ °C، به مدت ۲ ساعت حرارت داده و هم بزنید.
- ۹-۲-۱-۵ برای نمونه‌های روغن، پس از کامل شدن هم‌زدن، میله هم‌زن را خارج کرده و محلول را در بالن حجمی با آب به حجم برسانید. سطح مقعر آب باید با نشانه مماس باشد. اجازه دهید تا زمانی که لایه‌ها از هم جدا شوند باقی بماند.
- ۹-۲-۱-۶ لایه روغنی که ممکن است بر روی آب شکل گرفته باشد را خارج کرده و دور بریزید.
- ۹-۲-۱-۷ برای نمونه‌های جامد، مایع استخراج شده را با استفاده از کاغذ صافی در یک بالن حجمی ۱۰۰ ml جداگانه صاف کنید. کاغذ صافی را شستشو دهید، سپس با آب به حجم برسانید.
- ۹-۲-۱-۸ مطابق با زیربند ۹-۴ ادامه دهید.
- یادآوری- در صورت نیاز به توقف آزمون، در این مرحله می‌توان آزمون را متوقف کرد. نمونه استخراج شده را در طول شبانه روز در یخچال نگهدارید.
- ۹-۳-۳ آماده‌سازی برای تجزیه (محیط آبی)
- ۹-۳-۱ ۵ ml HCl غلیظ را به یک بالن حجمی حاوی محلول آماده شده در زیربند ۹-۱، اضافه کنید و به خوبی مخلوط کنید.
- احتیاط- همواره، هنگام افزودن اسید غلیظ به آب لوازم حفاظت شخصی استفاده کنید، زیرا احتمال تولید حرارت وجود دارد.
- ۹-۳-۲ با استفاده از یک کاغذ pH با محدوده وسیع، pH را اندازه‌گیری کنید. قبل از تجزیه HPLC باید pH زیر ۲ باشد.
- ۹-۳-۳ اگر pH از ۲ کمتر نیست، مقدار بیشتری HCl به بالن بیفزایید، pH نهایی را بررسی و ثبت کنید.
- ۹-۳-۴ بالن حجمی را با آب به حجم برسانید.
- ۹-۴-۴ آماده‌سازی نمونه برای تجزیه (سایر محیط‌ها)
- ۹-۴-۱ مقدار ۸ ml از FWPA آماده شده مطابق زیربند ۶-۴، ۱ ml از HCl غلیظ و ۱ ml از نمونه آماده شده مطابق با زیربند ۹-۲ را به یک ویال شیشه‌ای ۱۶ ml افزوده و تکان دهید.

۲-۴-۹ با استفاده از یک کاغذ pH با محدوده وسیع، pH را اندازه‌گیری کنید. قبل از مرحله HPLC باید pH کمتر از ۲ باشد.

۳-۴-۹ اگر pH از ۲ کمتر نیست، نمونه را مجدداً مطابق با زیربند ۱-۴-۹ و با استفاده از ۷ ml از FWPA و ۲ ml از HCl غلیظ آماده کنید، pH نهایی را بررسی و ثبت کنید.

۴-۴-۹ اگر ذرات جامد معلق در نمونه دیده می‌شوند، نمونه را قبل از تزریق به HPLC سانتریفیوژ کنید. با توجه به ماهیت HPLC و مشکلات احتمالی آن، حذف کردن مقدار مواد جامد معلق تزریق شده به ستون و سیستم HPLC بسیار اهمیت دارد.

#### ۵-۹ واسنجی HPLC

۱-۵-۹ با استفاده از محلول‌های استاندارد واسنجی تهیه شده در زیربند ۴-۷، منحنی واسنجی که محدوده کاری یا محدوده موردنظر سامانه HPLC را تعریف می‌کند رسم کنید. برای قبول یک منحنی واسنجی معتبر، ضریب همبستگی ۰٫۹۹۵ و  $RSD \%$  پایین‌تر ۲۰ توصیه می‌شود.

۲-۵-۹ به صورت روزانه منحنی واسنجی اولیه را با تزریق استاندارد سطح میانی بررسی کنید. اگر پاسخ بیش از ۲۰٪ با مقدار واسنجی اولیه تفاوت دارد، توصیه می‌شود مجدد واسنجی را انجام دهید. اگر استاندارد کردن روزانه و واسنجی اولیه قابل قبول باشد، پاسخ استاندارد روزانه را برای مقدار  $H_{std}$  در بند ۱۰ ثبت کنید.

#### ۶-۹ تجزیه HPLC

محلول آماده شده در زیربند ۳-۹ یا زیربند ۴-۹ را به HPLC تزریق کنید. مثالی از یک کروماتوگرام و طیف UV در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

#### ۷-۹ شرایط HPLC

۱-۷-۹ فاز متحرک، ۷۵٪ متانول - ۲۵٪ FWPA.

یادآوری- در صورت استفاده از استونیتریل به جای متانول به عنوان فاز متحرک برای جداسازی بهینه، درصد‌های متفاوتی از اجزای آبی و آلی موردنیاز خواهند بود.

۲-۷-۹ سرعت جریان، ۲٫۵ ml/min.

۳-۷-۹ طول موج آشکارساز، کمی‌سازی اولیه در طول موج ۲۰۷ nm.

## ۸-۹ کنترل کیفیت

۱-۸-۹ توصیه می‌شود هر آزمایشگاهی که از این روش آزمون استفاده می‌کند، یک برنامه کنترل کیفیت را انجام دهد. حداقل الزامات این برنامه شامل اثبات اولیه قابلیت‌های آزمایشگاه و تجزیه همگام شاهد‌های روش، نمونه‌های دوتایی و نمونه‌های افزوده شده به منظور ارزیابی و مستند کردن داده‌های کیفی می‌باشد.

۲-۸-۹ قبل از انجام آزمون بر روی هر نمونه، آزمون‌گر باید از طریق یک شاهد روش، ثابت کند که مزاحمت‌های ناشی از سامانه تجزیه‌ای، ظروف شیشه‌ای و واکنشگرها تحت کنترل می‌باشند. هرگاه مجموعه‌ای از نمونه‌ها آماده شده یا تغییری در واکنشگرها ایجاد شده باشد، باید یک شاهد روش را به عنوان محافظی در برابر آلودگی‌های معمول آزمایشگاهی انجام داد. شاهد روش باید دربرگیرنده تمام مراحل آماده‌سازی نمونه و اندازه‌گیری باشد.

۳-۸-۹ آزمایشگاه باید یک نمونه دوتایی و بافت غنی شده و/یا بافت غنی شده و بافت غنی شده دوتایی را تجزیه کند. با انجام آزمون بر روی نمونه‌های مذکور، آزمایشگاه می‌تواند دقت و صحت این روش آزمون را تعیین نماید.

## ۱۰ روش محاسبه

غلظت ترکیب در نمونه را بر حسب میکروگرم بر گرم، با استفاده از معادله ۱ محاسبه کنید:

$$C_{\text{samp}} = \frac{H_{\text{samp}}}{H_{\text{std}}} \times C_{\text{std}} \times \frac{FV}{W} \quad (1)$$

که در آن:

$C_{\text{samp}}$  غلظت ترکیب در نمونه، بر حسب  $\mu\text{g/g}$ ؛

$C_{\text{std}}$  غلظت ترکیب در استاندارد، بر حسب  $\mu\text{g/ml}$ ؛

$H_{\text{samp}}$  ارتفاع پیک ترکیب در نمونه، بر حسب AU؛

$H_{\text{std}}$  ارتفاع پیک ترکیب در استاندارد، بر حسب AU؛

$FV$  حجم نهایی، بر حسب m؛

یادآوری -  $FV$ ، حجم اولیه به علاوه هرگونه رقیق‌سازی بعدی را شامل می‌شود. در این روش آزمون، برای جامدات و مایعات آلی، حجم نهایی ( $FV$ ) ۱۰۰۰ ml (۱۰۰ ml حجم اولیه ضرب در ۱۰ بار رقت) می‌باشد. این روش آزمون برای نمونه‌های آبی با حجم کل ۱۰۰ ml می‌باشد. برای تجزیه ترکیب مرطوب، جایگزین نمودن برخی از بافت‌های جامد (به عنوان مثال خاک) مجاز می‌باشد.

$W$  وزن نمونه استفاده شده، بر حسب g؛



یادآوری- برای نمونه‌های آبی، میلی‌لیتر را به گرم وزن معادل تبدیل کنید.

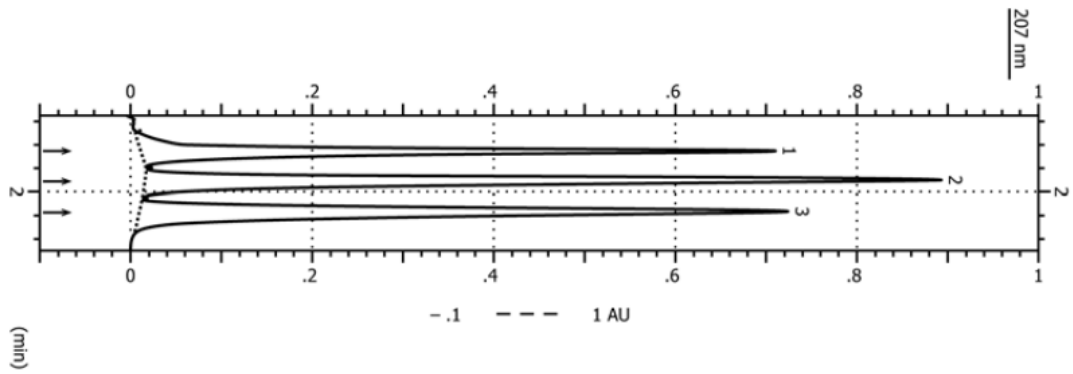
$AU$  واحد جذب.

یادآوری- جایگزین کردن مساحت پیک با ارتفاع پیک مجاز است.

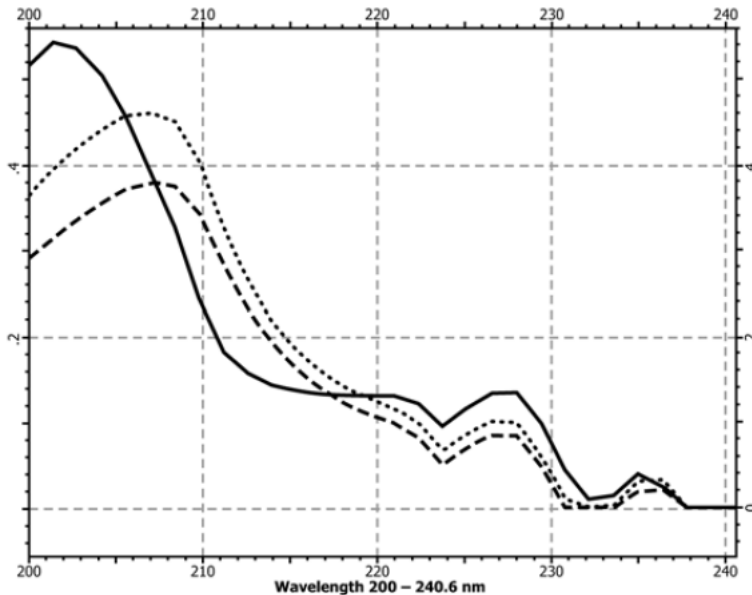
## ۱۱ دقت و اریبی

۱-۱۱ داده‌های ارائه شده در جدول ۱ بیانگر دقت به دست آمده با استفاده از یک آزمون گر می‌باشد.

یادآوری- همه داده‌های دقت با هشت بار تکرار به دست آمده‌اند.



شکل ۱- مثالی از یک کروماتوگرام با استفاده از شرایط زیر بند ۷-۹



پ

شکل ۲- طیف UV، ۲،۴-D، ۲،۴، T-۵ و سیلوکس از ۲۰۰ nm تا ۲۴۰ nm

جدول ۱- دقت و اریبی

دقت آزمونگر منفرد %RSD	بازیابی متوسط، %	غلظت، ppm	ترکیب
			<b>بافت: مخلوط آب و روغن</b>
۳٫۹	۱۰۶	۱۸۶	D-۴، ۲
۲٫۴	۱۰۱	۱۴۰	T-۵، ۴، ۲
۱٫۷	۱۱۵	۱۹۵	سیلوکس
			<b>بافت: خاک</b>
۳٫۳	۱۰۲	۱۹۹	D-۴، ۲
۲٫۴	۱۱۳	۱۸۵	T-۵، ۴، ۲
۳٫۲	۹۸	۱۹۸	سیلوکس
			<b>بافت: روغن PCB</b>
۵٫۰	۱۰۰	۱۹۹	D-۴، ۲
۲٫۸	۱۱۸	۱۸۵	T-۵، ۴، ۲
۵٫۷	۸۸	۱۹۴	سیلوکس
			<b>بافت: حلال‌های آبی</b>
۱٫۸	۱۰۵	۹۵۳	D-۴، ۲
۲٫۹	۱۰۳	۹۴۳	T-۵، ۴، ۲
۹٫۴	۹۱	۹۶۹	سیلوکس