

کارگاه آموزشی یکسان سازی روش های اندازه گیری فلزات سنگین

برگزار کننده: اداره کل آزمایشگاه های کنترل مواد غذایی، آشامیدنی و بهداشتی-تهران

آذر ماه ۱۳۹۱

تعاریف گوناگون از فلزات سنگین

منابع انتشار و نحوه گردش آنها در طبیعت و مکانیسم سمیت این فلزات

تعریف ۱: فلزات سنگین عناصری از جدول تناوبی که: ۱- فلز هستند ۲- جرم حجمی بالا دارند. ارسنیک پودری است چرا جزء فلزات سنگین است.

آلومینوم ظاهری فلزی دارد ولی سبک است.

جیوه جزء فلزات سنگین است اما به صورت مایع است بنابراین تعریف بالا نمی تواند فلزات سنگین را خوب بیان کند. فلزات سنگین همیشه به عنوان مجموعه ای از فلزات و شبه فلزاتی که در مواد غذایی آلودگی ایجاد می کنند.

- Metal ← عنصری با درخشش فلزی
- Metalloid / Semi metal ← عنصری با خواص و ظاهر فلزی و رفتار شیمیایی غیر فلزی
- Light metal ← یک واژه بسیار مبهم که اولین بار توسط Bjemen برای فلزات بیان شد
- Heavy metal ← عنصری با خواص فلزی و جرم حجمی بالا
- Essential metal ← عناصر مغزی که مورد نیاز بدن هستند و در دوز پایین خواص سمی ندارند.
- Beneficial metal ← فلزات مفید برای بدن که حیاتی نیستند ولی مضر هم نیستند.
- Toxic metal ← از نظر سم شناسی صحیح نیست، چون هر ماده در دوز بالا می تواند سمی باشد.
- Trace metal ← وجود این فلزات در طبیعت بسیار پایین است. (pb)
- Micro nutrient ← برای تغذیه موجودات زنده مفید هستند.
- Abundant metal ← فلزات که در محیط زیست خیلی زیاد و فراوان هستند.

۱- تعریف بر مبنای دانسیته: عناصری که دانسیته آنها بالاتر از 7 g/cm^3 است. (سال ۱۹۳۶)
دانسیته بیش از 4 g/cm^3 (سال ۱۹۶۴)
دانسیته بیش از 5 g/cm^3 (سال ۱۹۸۹)

۲- تعریف بر مبنای وزن اتمی: وزن اتمی بالاتر از ۲۳ با این تعریف فلزات سنگین از منیزیم (Mg) شروع می شوند.
وزن اتمی بالاتر از ۴۰ با این تعریف فلزات سنگین از اسکاندیم (Sc) شروع می شوند.
ایراد این تعریف (دانسیته Sc کمتر از ۳ است)

۳- تعریف بر مبنای عدد اتمی: فلزاتی با عدد اتمی بیشتر از ۲۰ (Ca)
فلزاتی با عدد اتمی بین ۲۱ (Sc) و ۹۲ (U)

۴- تعریف بر مبنای سمیت: باز هم معیار نادرستی است. زیرا خواص فلز در حالت فلزی و در حالت ترکیبات آلی گاهی تفاوت های زیادی با هم دارند.

قلع خالص و سمیت کم اکسید تری بوتیل قلع ← بسیار سمی برای برخی آبزیان

فلزات سنگین یک اصطلاح بی معنا (بنا به تعاریف گفته شده) تعاریف گوناگون از آن باعث گمراه کنندگی شده است. هیچ ارتباطی بین دانسیته و خواص فیزیکوشیمیایی آن وجود ندارد.

فعلاً به طور کلی فلزات سنگین را چه عناصری می دانند: به طور کلی فلزات و شبه فلزاتی که دانسیته نسبتاً بالا (بیشتر از ۵ یا ۴ mg/cm³) دارند و در غلظت های پایین اثرات سمی ایجاد می کنند. (مثل: Ca, AS, Cd, Pb, Ag, Fe, Cr, Hg, pt, .)

منابع انتشار ← در پوسته زمین و صخره ها به صورت سنگ معدن از طریق استخراج معادن انتشار می یابند.

سنگ معدن های سولفیدی ← Fe, As, pb, Co, Zn, Au, Ni

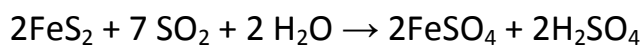
سنگ معدن های اکسیدی ← Al, Mn, Au, se, sb

سنگ معدن های سولفیدی، اکسیدی ← Co, Cu, Fe

منابع دیگر انتشار ← آتشفشان ها، صنایع، محصولات صنعتی حاوی فلزات سنگین که پس از استفاده در طبیعت رها می شوند. ریخته گری ها، سوخت ها

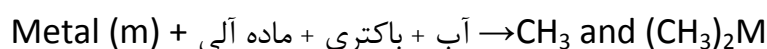
استخراج یک معدن ۵-۱۵ سال طول می کشد اما آلودگی های فلزی منتشر شده از آنها صدها سال

مهمترین و شایع ترین عوامل آلودگی استخراج معدن، پدیده نشت آب اسیدی معادن



اسید تولید شده سبب آلودگی اسیدی منابع آبی شده و با تاثیر بر معادن های دیگر سبب آزاد شدن عناصر سمی (Cd) و ورود آنها به محیط زیست می شوند.

تشکیل اشکال آلی شبه فلزات:



آیا برای آزاد شدن همه فلزات در محیط زیست نیاز به پدیده نشت آب اسیدی (AMD) است؟ خیر

پدیده AMD و آلوده شدن آبهای سطحی و زیر زمینی به فلزات سنگین

آلوده شدن خاکهای کشاورزی ← جذب شدن فلزات در گیاهان و تجمع در بافتهای آنها ← تغذیه حیوانات و

آبزیان از آنها و گیاهان آلوده ← تجمع در بافت های حیوانی ← ورود فلزات سنگین به بدن انسان با مصرف آب و

محصولات گیاهی و حیوانی آلوده

راههای ورود فلزات سنگین به بدن: ۱- همه راههای نفوذ (پوستی، تنفسی، خوراکی دهانی)

سمیت فلزات سنگین

- ۱- (Fe , Zn , Ca, Mg) Eessential metals
- ۲- (Pb , Cd, As, Hg,Ag) Toxic metals

علائم کمی مسمومیت : اختلالات گوارشی، اسهال، استفراغ، ورم مخاط ها، تومور (لرزش)

انواع مسمومیت های ممکن: حاد، مزمن، تروتوکسیک

بیوشیمی فلزات سنگین:

ورود فلزات سنگین به بدن از راه خوراکی ← تبدیل به حالت اکسیداسیون پایدار در محیط اسیدی معده مثل Pb^{2+} , Cd^{2+} , AS^{2+}

← تشکیل پیوندهای قوی با پروتئینها، آنزیم ها

فلزات سنگین به ۳ شکل با بیومولکول های بدن واکنش داده و عوارض بیولوژیک ایجاد می کند.

۱- ترکیب با محصول نهایی یک زنجیره آنزیمی و ایجاد کمپلکس غیرقابل مصرف توسط بدن

نتیجه : غیرقابل مصرف شدن محصول نهایی ← مهار دائمی آنزیم ← تجمع فلز (کمپلکس فلز - آنزیم در بافت ← ایجاد اختلال در بخشی از سیستم بیولوژیکی

۲- جایگزینی فلز سنگین به جای یون ساختاری یک آنزیم با پروتئین با همان اندازه مثل جایگزینی Cd^{2+} به جای Zn^{2+} در آنزیم های هیدروژناز

۳- تخریب ساختار آنزیم ها مثل حمله AS^{3+} موجود در ساختمان بعضی آفت کش ها به گروههای سولفیدریل آنزیم های بدن و توقف فعالیت آنزیمی

اشکال سمی تر فلزات سنگین:

سمی ترین اشکال فلزات سنگین یون هایی هستند که حالت اکسیداسیون پایدارتر داشته باشند مثل Pb^{2+} , cd^{2+} , AS^{3+} , Ag^{2+} , Hg^{2+} درمان مسمومیت در این حالت مشکل تر می باشد.

شیمی تجزیه

شاخه ای از علم شیمی است و شامل جداسازی، تعیین و اندازه گیری مواد به طریق تجزیه کمی و کیفی

انواع روش های تجزیه

۱- کلاسیک: نیتراسیون، وزن سنجی و ...

۲- دستگاهی: پاسخی به صورت تبدیل غلظت به سیگنال الکتریکی به ما می دهد.

مراحل تجزیه شیمیایی

نمونه برداری، آماده سازی، تجزیه شیمیایی و جمع آوری داده ها، نتیجه گیری

منشاء انواع خطاها

۱- خطای معین systematic (a) ثابت (b) متناسب

۲- خطای نامعین Random

آمار

هستیوگرام ← رسم فراوانی برحسب نتایج

برای بیان دقت: از انحراف معیار و انحراف استاندارد استفاده می کنیم.

هرچه (انحراف) کمتر باشد دقت بیشتر است.

برای چک کردن صحت جوابهای بدست آمده مثلاً با دستگاه اتمیک باید یک مرجع داشته باشیم حال چون مرجع گران است می توان از استاندارد ها کمک گرفت مثلاً استاندارد سرب را با غلظت مشخص به نمونه آماده شده اضافه کرده و غلظت آن را با دستگاه خواند.

درجه بندی روش های دستگاهی

با دو استثنا تمام روش های دستگاهی به درجه بندی نیاز دارند. فرایندی که علامت تجزیه ای اندازه گیری شده را به غلظت آنالیت ارتباط می دهد.

متداولترین روش های درجه بندی عبارت اند از:

- تهیه و استفاده از یک منحنی درجه بندی،
- روش افزایش استاندارد
- روش استاندارد درونی

۱- منحنی های درجه بندی: برای استفاده از این منحنی درجه بندی، چند استاندارد حاوی غلظت های دقیقاً معلومی از آنالیت به درون دشتگاه وارد و جواب دشتگاه ثبت می شود. معمولاً این جواب با خروجی دشتگاه به دست آمده با یک شاهد تصحیح می شود. الزاماً نباید نمودار خطی باشد باید تعداد نمونه ها را افزایش داد تا شیب آن و انحراف منحنی را به ما بدهد.

۲- روش افزایش استاندارد:

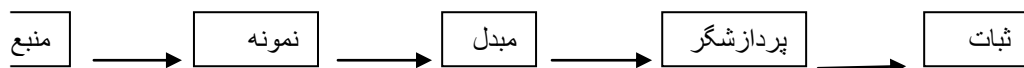
به نمونه مجهول مقدار مشخصی (حجم مشخصی) از استاندارد اضافه می کنیم.

۳- استاندارد داخلی

اساس طیف سنجی : بر همکنش بین ماده و امواج الکترومغناطیس

انواع روش های طیف بینی: ۱- جذبی ۲- نشری ۳- پراکندگی

ساختمان دستگاههای طیف سنجی: (۱) منبع تابش (۲) موتوکروماتور (۳) اشکارساز (۴) پردازشگر (۵) ثبات



فیلترها قیمت دشتگاه را مشخص می کند.

اصول تجزیه فلزات مواد غذایی:

- (کاهش اندازه ← برای نمونه های جامد
- (تخریب با استفاده از محلولهای اسیدی قوی و دمای بالا ← حذف ترکیب غیر فازی
- (فیلتر کردن ← حذف باقیمانده نامطلوب
- (اندازه گیری با دستگاه ← جذب و نشر اتمی - پلاسما و ..
- (فراهم کردن یک نمونه معرف (نمونه بقدر کافی هموزن باش)
- (جلوگیری از آلودگی احتمالی نمونه با :
- تجهیزات آزمایشگاهی (نظیر چاقو، آسیاب و ...)
- رعایت نکردن شستشوی کامل ظروف
- آلودگی محیطی از گزد و غبار موجود در هوا و ذرات ناشی از لباس و ...
- (خشک کردن: اگر نمونه ها باید قبل از آنالیز ذخیره شود و یا اگر نتایج وزن خشک مورد نیاز است خشک کردن تا وزن ثابت مورد نیاز است.
- (خلوص واکنشگرهای شیمیایی و آب: آب مورد استفاده برای رقیق کردن نمونه ها و واکنشگرها می تواند منبع بالقوه آلودگی باشد. آب برون یونی که دارای هدایت خیلی کمی است به شدت مورد نیاز است . تمام واکنشگرهای شیمیایی باید کیفیت بالایی داشته باشد.
- (ظروف ← یک شبانه روز در قلیا غوطه ور باشد. بعد آبکشی کرده و دوباره در HCL غوطه ور کنیم و آبکشی نماییم.

هضم مواد غذایی

- (ماده آلی باید هضم شود (به خاطر ایجاد تداخل)
- (نمونه هایی مثل آب باید رقیق شود.
- (مواد آلی نمونه های غذایی عموماً بوسیله اکسایش با اسیدهای اکسید کننده در یک هضم مرطوب و یا بوسیله خاکستر سازی خشک در حضور هوا و یا اکسیژن خالص تخریب می شود.
- (روش بکار رفته برای هضم به نوع فلزات تجزیه شده و طبیعت غذا بستگی دارد.
- (در خاکستری دماهای بالا برای فلزات فرار نظیر جیوه، آرسنیک، سلنیم و سرب مناسب نیست
- (در مقایسه با خاکستری هضم مرطوب انعطاف پذیری بهتری دارد.

روش های آماده سازی نمونه

الف) هضم اسیدی ب) خاکستری

اصول کلی در تهیه نمونه آزمایش

الف) نمونه برداری (Sampling)

نمونه ها باید حتما همگن باشد (تکان دادن و هم زدن برای نمونه های مایع و آسیاب کردن برای نمونه های جامد (تهیه دوغاب))

یک نمونه مناسب مجموعه ای از ۱۰-۵ نمونه کوچکتر از یک نمونه اصلی (بطور کامل نماینده کل نمونه)

ب) آماده سازی نمونه (sample preparation)

قاعده کلی در همه روش های آماده سازی نمونه، دستیابی به یک محلول نمونه شفاف و همگن است.

اصول مورد توجه در آماده سازی نمونه:

(شستشوی اسیدی ظروف با اسید نیتریک ۱۰٪ برای کروزه ها از اسید نیتریک ۲۰٪ (به مدت یک شبانه روز)

(استفاده از ظروف مناسب که جاذب یون های مورد سنجش نباشد
استفاده از ظروف و ابزار پلاستیکی بجای شیشه ای (لوله های فالكون برای نگهداری محلول نمونه) یکبار مصرف
استفاده از ظروف سیلیسی که کمتر احتمال جذب فلزات را دارد.
عدم استفاده از کروزه های پلاتینی برای عناصر خاص مثل Fe- Hg – Au – Pd
عدم استفاده از ظروف مناسب و یا اسید واش نکردن ظروف

(جلوگیری از تبخیر و تغییر غلظت نمونه آماده شده با قرار دادن در یخچال

(عدم استفاده از حرارت زیاد برای عناصر فرار مثل جیوه و آرسنیک، دماهای بالاتر از ۴۵۰ موجب خروج pb ، Cd و Se می شود (دما از ۴۵۰° بالاتر نرود در روش های معمول). عوامل مؤثر در فراریت یک عنصر (ماهیت عنصر) و ماتریس نمونه

(استفاده از اسیدها در شرایط ایمن دستکش حلال (نیتریلی) و پوشش محافظتی لباس
مخلوط کردن اسیدهای غلیظ و اکسید کننده ها برای هضم نمونه خطر آفرین است، سوختگی سریع پوست، خطر انفجار مخلوط کردن اسیدهای غلیظ و اکسید کننده ها برای هضم نمونه خطر آفرین است، سوختگی سریع پوست، خطر انفجار
بدلیل احتمال واکنش شدید بین اسید غلیظ و نمونه، بهتر است ابتدا مقدار کمی از اسید رقیق به نمونه اضافه شود و بعد اسید غلیظ استفاده شود.

اکسید کننده های قوی مثل پرکلریک اسید فقط زمانی باید اضافه شود که بخش زیادی از نمونه توسط اسید نیتریک اکسیدی و تخریب شده باشد.

HF به راحتی جذب پوست شده. با شستشو بطور کامل پاک نمی شود و باعث سوختگی شدید می شود. باید بعد از شستشو حتماً پادکلسیم گلوکونات داشته باشیم.

(آماده سازی و تزریق نمونه در هوای کاملاً تمیز و تهویه شده

از آنجا که کل نمونه مورد آزمایش در هنگام تزریق به دستگاه فقط به چند میکرولیتر کاهش می یابد، یک ذره کوچک غبار هوا نیز حتی با قرار گرفتن روی نمونه، می تواند تفاوت های قابل توجه در نتیجه ایجاد کند.

بنابراین لازم است آماده سازی نمونه و بخصوص تعیین مقدار دستگاهی در هوای کاملاً تمیز صورت گیرد.

(استفاده از حلال های

(اجتناب از رساندن به حجم زیاد (در صورت عدم اطلاع از میزان تقریبی باید حتماً حجم کم باشد)

(فاصله آماده سازی و تزریق کوتاه باشد.

الف) هضم اسیدی:

فرایند هضم ماتریس نمونه، توسط یک اسید قوی انجام می شود. در مورد ماتریس های آلی برای تخریب کامل ماتریس نمونه ممکن است از یک اکسید کننده نیز استفاده شود.

اسید استفاده شده معمولاً اسید نیتریک است چرا؟ نمک های حاصل از آن (نیترات فلز) معمولاً محلول هستند در حالیکه اسید کلریدریک یا اسید سولفوریک نمک های نامحلول ایجاد می کند.

اگر در نمونه سیلکون وجود داشته باشد برای هضم از HF استفاده می کنیم.

انواع روش های هضم اسیدی:

(**هضم باز** : ساده ترین روش هضم مرطوب است که در یک ظرف در باز انجام می شود.

نمونه پس از توزین در یک بشر قرار داده می شود ← افزودن محلول هضم کننده ← پوشاندن بشر با شیشه ساعت ← حرارت دادن روی هات پلیت ← نمونه به آرامی شروع به جوشیدن می کند. نباید پاشیده شود.

باید هر از چندگاه مقداری اسید به نمونه اضافه شود تا نمونه خشک نشود.

می توان در آب اکسیژنه هم برای کمک به اکسیداسیون بیشتر استفاده کرد.

پس از هضم کامل نمونه و ظاهر شدن یک محلول شفاف و کمرنگ تا نزدیک به خشک شدن تبخیر می شود ← انتقال به ظروف حجمی ← به حجم رسانی با آب یا اسید رقیق

نکات: نمونه نباید بطور کامل خشک شود- در صورت صاف کردن محلول نمونه، کاغذ صافی نیز باید به دقت شسته شود تا آنالیت جذب شده روی آن به محلول نمونه برگردد.

انتخاب اسید برای هضم

استفاده از اسید رقیق: برای نمونه های غیرآلی محلول و نمک ها (معمولاً اسید نیتریک ۱ مولار)

استفاده از اسید نیتریک غلیظ: برای نمونه های نامحلول

استفاده از HCl (۱+۱) برای هضم بهتر: بعد از هضم اسید نیتریکی و قبل از صاف کردن و به حجم رسانی

استفاده از اسید سولفوریک: اگر نمونه با اسید نیتریک تنها و با اسید نیتریک همراه با HCl هضم خوبی پیدا نکند

محلول اسید نیتریک+ اسید سولفوریک (۲+۱)

روش هضم شدیدتر: هضم با اسید نیتریک ← سرد کردن نمونه ← افزودن مخلوط اسید نیتریک و اسید پرکلریک

(۱+۱) ← ادامه حرارت تا ظاهر شدن بخارات سفید متراکم پرکلریک اسید

استفاده از HF : برای هضم نمونه های سخت تر

استفاده از تیزاب سلطانی: اسید کلریدریک و نیتریک (۱+۳) حتی طلا و پلاتین را در خود حل می کند.

ترکیب اسید سولفوریک و پراکسید هیدروژن: بعنوان یک اکسید کننده قوی عمل می کند.

(**هضم بسته**: ظرف هضم کاملاً در بسته و قابلیت تحمل فشار زیاد داشته باشد و در برابر خاصیت خوردگی اسیدهای

داغ مقاوم باشد. معمولاً از ظروف دردار PTFE استفاده می شود.

دستگاه هضم ماکروویو نمونه رایج دستگاه هضم بسته

ویژگی های روش هضم اسیدی

(ظروف هضم از پلیمرهای مقاوم به دماهای زیاد

(احتمال انتقال آلودگی های فلزی از این ظروف

(حذف احتمال نفوذ آلودگی ناشی از گرد و غبار

(نیاز به حجم کمتر اسیدها در ظروف در بسته تحت فشار

(کاهش قابل توجه از دست رفتن عناصر فرار

(کاهش نیاز در وقت اپراتور به دلیل سیستم خودکار

(بخارات اسیدی مشکل ساز نیستند(این بخارات باعث خوردگی هود و لوازم آزمایشگاهی می شود)

ب) روش خاکستری (Dry Ashihy)

روش مناسب برای نمونه های آلی مرطوب مثل نمونه های مواد غذایی و گیاهی. بدلیل سرعت و سهولت در تخریب مقادیر زیاد مواد آلی مناسب برای عناصر غیر فرار Cu, Fe, Zn, Cd, pd. خاکستری نوعی روش هضم باز (Open vesse) است.

انتقال نمونه به داخل یک کروزه (از جنس چینی، سلیس، پیرکس یا پلاتین) ← حرارت دادن روی شعله تا کربنیزه شدن ← انتقال به کوره الکتروکی سرد و رساندن به حرارت ۴۵۰ درجه ← چند ساعت ماندن در کوره تا تشکیل یک خاکستر سفید (حداقل بین ۳ تا ۵ ساعت البته بعد از رسیدن به دمای ۴۵۰°)

در صورت عدم خاکستر سفید: خارج کردن کروزه از کوره ← مرطوب کردن نمونه با اسید نیتریک غلیظ ← تبخیر روی هات پلیت ← انتقال مجدد به کوره (۲ ساعت) ← افزودن حدود ۵ سی سی HCl ۶ مولار به خاکستر ← تبخیر اسید روی هات پلیت ← افزودن اسید نیتریک ۰/۱ مولار به کروزه ← صاف کردن (در صورت احتیاج به صاف کردن) ← و رساندن به حجم مورد نظر

ترجیحاً از صافی استفاده نکنیم چون خود صافی هم جاذب است.

برای عناصر سرب، کادمیوم، Cu، Fe و Zn در مواد غذایی در دمای ۴۵۰ درجه، درصد بازیافت کافی نشان داده است. روش مناسبی است برای تعیین مقدار عناصر مغزی در مواد غذایی پتاسیم، آهن، منیزیم، منگنز و کلسیم (مقدار زیاد در مواد غذایی و پایداری در دماهای بالا)

ترکیبات کمکی در روش خاکستری

- (اسید سولفوریک (ذغال کنندگی شیمیایی) در صورتیکه چند بار از اسید نیتریک استفاده کردیم و باز خاکستر سفید نشد از اسید سولفوریک استفاده می کنیم.
- (نیترات منیزیم، کربنات سدیم، اکسید منیزیم (کمک به نگهداری بعضی عناصر)

مشکلات روش خاکستری

برای عناصر فرار مناسب نیست.

احتمال آلوده شدن نمونه از هوای آزمایشگاه یا داخل کروزه (سیستم باز)

نیاز به اسیدشویی کامل ظروف بدلیل احتمال جذب فلزات در آزمایشگاه قبلی

دشواری در خاکستری نمونه های روغن و چربی بدلیل احتمال شعله ور شدن روی شعله (نمونه روغن را بین ۱-۵ گرم برداریم و از دمای پایین روی هات پلیت شروع می کنیم به سوختن و کم کم دما را بالا می بریم تقریباً یک روز باید روی هیتر باشد) نمونه قهوه ای می شود بعد روز دوم آنرا روی شعله و یا هیتر های قوی قرار می دهیم که در اینصورت دود کرده و به جامد تبدیل می شود و می سوزد و روز سوم تازه داخل کوره قرار می دهیم)

اگر دستگاه اتمیک کوره داشته باشیم می توان نمونه روغن را مستقیماً به دستگاه تزریق کرد اما باید حتماً حلال های ارگانو متالیک و استانداردهای مربوط به هرفلز را داشته باشیم.

تعیین مقدار دستگاهی فلزات سنگین

دستگاه جذب اتمی (ASS)

یکی از پرکاربردترین و دقیق ترین دستگاههای سنجش میزان فلزات سنگین اساس: تشکیل بخار اتمی از عنصر مورد نظر و تعیین مقدار از طریق جذب نور لامپ هالوکاتد یک سیستم کامل جذب اتمی مشتمل از ۳ دستگاه کوره، شعله، هیدرید، که هر سه در قسمت main و محفظه لامپ ها مشترک هستند اما در جواب دهی دقت متفاوت دارند.

۱. دستگاه جذب اتمی کوره

مهمترین نوع سیستم های جذب اتمی در آزمایشگاه مواد غذایی بدون داشتن آن، آزمایشگاه از توانایی لازم جهت اندازه گیری مقادیر trace فلزات برخوردار نخواهد بود ترجیحاً مجهز به اتوسمپلر دقت اندازه گیری آن برای استانداردها (در حد ppb) برای کادمیوم حتی زیر (ppb)

اساس اندازه گیری

تزریق محلول نمونه به داخل یک لوله گرافیتی ← گرم شدن چند مرحله ای لوله گرافیتی ← تبخیر نمونه و تشکیل بخار اتمی ← تعیین غلظت بر اساس میزان جذب نور هالوکاتد
(Drying دماحدود ۱۰۰ درجه ← حلال همراه نمونه تبخیر می شود)
(Ashing دمای ۵۰۰° ← ترکیبات کربنی باقی مانده از بین می رود)
(atomizin دما ۲۱۰۰ درجه سانتیگراد به صورت یک شوک به نمونه داده می شود ← نمونه به صورت اتمی در می آید.
(Cooling دما افت می کند و برای تزریق بعدی آماده می شود.

جریان گاز در مرحله آخر ashing و مرحله اول atomizin قطع می شود برای اینکه بخار اتمی بتواند زمان داشته تا تعیین مقدار شود از گاز ارگون در این نوع دستگاه استفاده می کنند که بی اثر است و گاز اکسیژن را از بین می برد و از انفجار جلوگیری می کند.

نکات مورد توجه در کار با اتمیک کوره

محلول ها

(رسیدن استانداردها به دمای محیط قبل از تزریق

(استانداردهای کاری را روزانه تهیه کنید بدلیل غلظت پایین آنها

دستگاهی

بررسی سالم بودن لوله گرافیتی و موقعیت صحیح آنها
ابتدای هرکار باید لوله گرافیتی توسط نرم افزار تمیز شود
تنظیم عبور نور هالوکاتد لامپ از داخل لوله گرافیتی از طریق پیچ های حرکت دهنده لوله گرافیتی با پیچ های
لامپ(بیشترین تابش و کمترین gain) می توان تنظیم نور را با کاغذ انجام داد.
گرم شدن لامپ به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قبل از کار
روشن کردن هود بالای دستگاه
نوک سمپلر را توسط نرم افزار تمیز کنید.
از ویال های اسیدواش شده، کاملاً تمیز و خشک حتماً باید از آب دیونیزه استفاده کرد با هدایت الکتریکی حدود ۱۸
میکرواهم
تنظیم دقیق ورود نوک اتوسمپلر به داخل گرافیت (توسط دوربین دستگاه)

استانداردها

(تعیین محدوده غلظتی استانداردهای کالیبراسیون

مرحله اول ، شناسایی خطی شدن نسبت Dose/response به کمک اطلاعات موجود در دفترچه فنی و تجربه
(منحنی باید خطی باشد)
منحنی کالیبراسیون باید ۴ نقطه داشته باشد.

مرحله دوم : ساخت استانداردهای کالیبراسیون بر اساس غلظت مورد انتظار آنالیت در نمونه

البته غلظت ها نباید از LOQ کمتر باشد. پاسخ های زیر LOQ قابل استفاده نیست. استانداردها را باید بالاتر از LOQ
تهیه کرد.

حذف یک نقطه پرت و بدست آوردن $r > 0.99$ برای heavy metal حتما باید نمودار خطی را در نظر گرفت جوری
باید استانداردها را ساخت که روی یک خط قرار گیرد. اگر یک استاندارد پرت باشد باید آنرا حذف کرد بعد دید که
آیا منحنی خطی شده یا نه. حداقل ۳ نقطه برای استاندارد کافی است

r: (شیب خط، تا دو رقم ۹ بعد از ممیز قابل قبول است)

$$\text{Abs} = 0.01152 \times C$$

(استانداردسازی Automix سریعتر و دقیقتر از Premix

(استفاده از ترکیبات اصلاح کننده (مودیفایر) برای کاستن از تداخلات

بررسی نتایج

- (تلاش شود جذب خاص مربوط به یک استاندارد خاصی که در دستگاه مشخص شده (شرایط ایده ال) بدست آید (با تنظیم دقیقتر)
- (مقایسه میزان جذب استانداردها و بلانک با دفعات پیش. تفاوت زیاد ممکن است نشان دهنده وجود اشکال در تهیه یا خواندن استانداردها باشد
- (حداقل ۳ تزریق از هریک از استانداردها و نمونه ها
- $RSD \leq 10\%$ قابل پذیرش بودن نتیجه
- $RSD > 10\%$ وجود اشکال در تزریق نمونه (در غلظت های پایین اهمیت ندارد) باید جذبی که پرت است را حذف کرد. بعد بررسی کرد که RSD پایین آمد یا نه
- (مشاهده پیک تزریق های انجام شده. پیک استانداردها باید بر روی هم و پیک نمونه ها نیز در همان محل و بهمان شکل باشد. اگر یک پیکی در جای دیگر ظاهر شود ممکن است مربوط به ناخالصی های درون نمونه باشد و یا به علت استفاده نکردن از مودیفایر باشد.
- (بررسی جذب تک تک نمونه ها: باید در محدوده منحنی کالیبراسیون باشد. نمونه هایی که جذب بیشتر از کالیبراسیون دارند ← رقیق سازی بطور دستی یا از طریق سیستم خودکار دستگاه ← تزریق مجدد ← تاثیر دادن ضریب رقت در جواب نهایی.
- (استفاده از اتمیک شعله در صورت نیاز به رقیق سازی های زیاد (بیشتر از ۵۰ بطور تقریبی) بدلیل افزایش احتمال بروز خطا در تعیین غلظت
- (وارد کردن وزن و حجم دقیق و ضریب رقت نمونه در برنامه دستگاه
- (تعیین مقدار حداقل یک نمونه اسپایک یا مرجع (CRM) در کنار هر سری از نمونه ها (یعنی استاندارد را به نمونه اضافه کنیم و جذب را بررسی کنیم) به این کار recovery گفته می شود.

۱. دستگاه اتمیک شعله

- (دقت در حد ppm
- (اساس اندازه گیری : مکش محلول نمونه توسط نازل بر روی برنری که شعله پر قدرت را روشن نگه دارد.
- (اتمی شدن نمونه در حرارت زیاد و تشکیل بخار اتمی
- (جذب نور هالوکاتد لامپ توسط بخار اتمی
- (تعیین غلظت عنصر
- محلول ها ← مانند کوره

دستگاهی

بررسی تمیز بودن تیغه برنر (محل خروج شعله) توسط یک تیغ نازک
تنظیم تابش نور لامپ هالوکاتد بر ارتفاع مشخصی از تیغه (۹ppm)

گرم شدن لامپ بمدت ۱۵-۱۰

روشن کردن هود

خالی کردن ظرف ضایعات خروجی

توجه به میزان گاز استیلن

زمان کافی برای کشیدن محلول در شعله

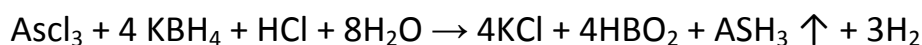
استانداردها ← مانند روش کوره

بررسی نتایج ← مانند روش کوره

۱. دستگاه جذب اتمی هیدرید

اساس کار:

انجام یک واکنش شیمیایی منجر به تولید هیدرید عنصر مورد نظر که به دلیل گازی بودن به سمت شعله حرکت می کند.



گاز به وجود آمده چون قرار است به سمت شعله حرکت کند معمولاً برای عناصر Bi, Sb, Sn, Te, Pb, Se, Hg, As استفاده می شود.

دقت در حد ppb

محلول ها ← مانند روش های قبل

دستگاهی

تنظیم بیشترین عبور نور هالوکاتد لامپ از داخل سل کوآرتزی

گرم شدن لامپ ۱۵-۱۰

روشن کردن هود

در صورتی که عناصر آرسنیک و جیوه باید در یک نمونه تعیین مقداری شوند: اول جیوه دوم آرسنیک

خالص کردن ظرف خروجی

استفاده از مرجع

نکات کلیدی جهت اطمینان از صحت نتایج

قبل از اعلام نتایج نمونه ها، باید از این موارد مطمئن باشید:

- (مقایسه میزان جذب استاندارد های کالیبراسیون با جذب روز های قبل
- (آزمایش حداقل دو نمونه اسپایک یا CRM همراه با نمونه ها و در صورت قابل قبول بودن ریکاوری ← تاثیر دادن میزان ریکاوری در نتیجه همه نمونه ها
- (منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظت مورد نظر رسم و خطی باشد، حداقل با ۴ نقطه و در صورت لزوم یک نقطه پرت حذف شود ($r \geq 0.99$).
- (انجام reslope بین هر ۵-۶ نمونه و انجام recalibration در صورت بد بودن میزان reslope
- (هر نمونه حداقل ۳ بار تزریق شود و RSD آن بررسی شود. در صورتیکه کمتر از ۱۰ باشد میانگین پاسخ نمونه قابل قبول بوده و در صورت بیشتر بودن باید یک نتیجه پرت حذف شود یا مجدداً ۳ بار تزریق شود.
- (درصد ریکاوری بدست آمده در نتیجه نمونه ها تاثیر داده شود تا نتیجه واقعی هر نمونه مشخص شود.
- (تشخیص نتایج کمتر از حد تعیین مقدار (LOQ):

- . تعیین LOQ دستگاه در زمان اعتبار سنجی روش
- . مشخص کردن LOQ نمونه در هر یک از نمونه ها (با توجه به ضریب رقت آن)
- . LOQ نمونه = ضریب رقت نمونه $LOQ \times X$ دستگاه
- . نتایج نمونه های کمتر از LOQ بصورت $< LOQ$ و نتایج بیشتر از LOQ پس از اعمال ریکاوری بصورت عددی اعلام شوند.

دستور العمل تعیین صحت آزمایش (آزمایشات ریکاوری)

آزمایشات تعیین صحت در دو هنگام باید انجام شود:

- ۱- در هنگام راه اندازی یک روش جدید
 - ۲- پس از راه اندازی روش و همراه با هر سری از نمونه ها در یک روز کاری
- ۱- آزمایشات تعیین صحت، در بدو راه اندازی روش در آزمایشگاه، باید حداقل در ۳ سطح غلظتی: MRL ، سطح $1/2$ و سطح ۲ برابر آن انجام شود.
- از هر سطح ۳ تکرار در یک روز و بمدت ۳ روز کاری.
- ۲- پس از راه اندازی روش و همراه با هر سری از نمونه ها در یک روز کاری:
- حداقل دو تکرار در سطح غلظتی MRL

محاسبات مرحله ای تعیین صحت آزمایش

نکته مهم: اسپایک کردن نمونه باید حتما قبل از شروع مراحل استخراج انجام شود.

۱- تعیین سطح غلظتی اسپایک با توجه به حد مجاز آنالیت (MRL):

اسپایک در سطح خود MRL و سطح $\frac{1}{2}$ و سطح ۲ برابر آن انجام می شود.

مثال: اندازه گیری میزان سرب در برنج پس از هضم میکروویوی:

حد مجاز سرب در برنج 150 ppb (استاندارد ملی):

سه سطح اسپایک: 75 - 150 - 300 ppb (ng/g)

۲- بررسی امکان تشخیص سطح اسپایک با توجه به روش مورد استفاده:

با توجه به ضریب رقت نمونه ها، باید بررسی شود آیا سطح غلظتی اسپایک پس از به حجم رسانی نهایی، در محدوده کالیبراسیون قرار می گیرد یا خیر.

(اگر جواب خیر بود، وزن یا حجم نمونه و یا حتی در صورت امکان غلظتهای کالیبراسیون خطی باید تغییر داده شود).

عدد بدست آمده باید در میانه = ضریب رقت نمونه / سطح اسپایک (ppb)

محدوده کالیبراسیون خطی باشد (ppb)

مثال برنج: اگر ۱ گرم برنج برداشته و به روش هضم میکروویو استخراج و در هنگام تزریق به حجم 10 ml رسانده شده باشد:

اسپایک در سطح پایین (75 ng/g): $75/10=7.5$

اسپایک در سطح MRL (150 ng/g): $150/10=15$

اسپایک در سطح بالا (300 ng/g): $300/10=30$

۳- تهیه نمونه بلانک

مثال برنج: برنج آسیاب شده ای که با چندین بار آزمایش، بلانک بودن آن از نظر سرب تایید شده باشد.

۴- محاسبه مقداری از آنالیت که جهت اسپایک باید به نمونه بلانک اضافه شود:

مثال برنج: چون ۱ گرم برنج برداشته شده، برای اسپایک در سطح پایین (75 ng/g):

75 ng Pb 1 g rice
X = 75 1

۵- استفاده از غلظت استاندارد مناسب جهت اسپایک:

غلظتی از استاندارد باید انتخاب شود که حجم مورد نیاز آن جهت اسپایک، نه خیلی کم و نه خیلی زیاد باشد
(50-500 µL)

مثال برنج: اگر استاندارد 1 µg/ml اسپایک شود:

1000 ng Pb 1000 µl

75 X=75

۶- برداشتن استاندارد با سمپلر و پخش کردن آن روی تمام قسمت‌های نمونه بلانک

۴۵-۳۰ دقیقه بماند و بعد استخراج شود.

۷- استخراج نمونه بلانک و اسپایک در کنار سایر نمونه ها

۸- تعیین درصد بازیافت

با وارد کردن وزن و حجم دقیق نمونه های بلانک و اسپایک در برنامه دستگاه، غلظت آنالیت در نمونه اسپایک مشخص می شود:

۱۰۰ x (غلظت اسپایک شده / غلظت بدست آمده) = میزان بازیافت (ریکاوری)

مثال برنج: اگر جواب اسپایک 75 ppb عدد 60 ppb بدست آید:

$$\text{Recovery} = (60/75) \times 100 = 80$$

یاد آوری:

در هنگام راه اندازی روش، این کار در ۳ سطح غلظتی و از هر کدام ۳ تکرار در یک روز و بمدت ۳ روز کاری انجام می شود (۳۰ نمونه همراه با بلانک).

محدوده قابل قبول ریکاوری: ۷۰-۱۲۰٪

پس از راه اندازی روش و همراه با هر سری از نمونه ها:

حداقل ۲ اسپایک در سطح MRL و یا دو نمونه CRM مشابه نمونه ها گذاشته می شود ←

در صورتیکه ریکاوری آنها در محدوده ۱۲۰-۷۰٪ ←
میانگین ریکاوری در تمام نتایج آن سری تاثیر داده می شود.

- تعمیم درصد ریکاوری به نتیجه همه نمونه ها:

میزان واقعی آنالیت در هر نمونه = میزان ریکاوری / (۱۰۰ × غلظت نمونه)

(پس از اعمال ریکاوری)

مثال برنج: تاثیر دادن میزان ریکاوری در برنجی با سرب 50 ppb:

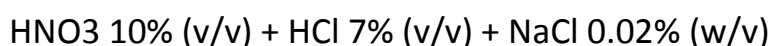
$$(50 \times 100) / 80 = 62.5 \text{ ppb}$$

روش اندازه گیری جیوه پس از هضم میکروویو و اندازه گیری با هیدرید بخار سرد

مرجع: Hight et al. (FDA, 2005)

توزین حدود $0.5 \leq$ گرم نمونه همگن ← انتقال به وسل میکروویو ←
افزودن ۵ میلی لیتر HNO_3 + ۱ میلی لیتر 1% w/v NaCl ←
۱۰ دقیقه زیر هود بماند ← قرار دادن داخل دستگاه هضم میکروویو ←
بعد از اتمام کار میکروویو: انتقال نمونه هضم شده با پیپت به لوله فالکن ←
افزودن ۵ میلی لیتر آب دیونیزه + ۳,۵ میلی لیتر HCL ←
محلول را کمی تکان دهید و ۵ دقیقه بماند ←
رساندن به حجم ۴۰ میلی لیتر با آب ←
با روش هیدرید بخار سرد تعیین مقدار شود.
نکته مهم: رساندن محلول نمونه به حجم کمتر از ۴۰ میلی لیتر، سبب افزایش اسیدیته آن شده و میزان شناسایی جیوه را کاهش می دهد.

محیط استانداردها:



محلول های دستگاه هیدرید:



فاز حامل: آب دیونیزه

نکته مهم:

سل کوارتزی جیوه حتما جدا از سل ارسنیک باشد (تداخل شدید KI موجود در سل ارسنیک با بخار جیوه و عدم شناسایی جیوه).

روش اندازه گیری ارسنیک و سلنیوم پس از هضم مایکروویو و اندازه گیری با هیدرید

مرجع: Mindak et al. (FDA, 1999)

انتقال نمونه هضم شده توسط مایکروویو به بالن حجمی ← افزودن 2 ml محلول *ashing aid ←
تبخیر روی هات پلیت ← کوره 450°C بمدت ۴-۵ ساعت ←
افزودن HCl 6M به خاکستر (۴,۵ میلی لیتر) ←
در بالن نیمه بسته گذاشته شده و حدود ۱۰ دقیقه روی هات پلیت حرارت ملایم داده شود ←
انتقال توسط پیپت از بالن به لوله فالکن (آماده برای اندازه گیری سلنیوم - البته بهتراست مدت حرارت مرحله قبل ۲۰ دقیقه باشد) ←
افزودن ۲ میلی لیتر هیدروکسیل آمین هیدروکلراید (50% (m/v) به محلول ←
افزودن ۰,۵ میلی لیتر محلول **KI-Ascorbic acid ←
به حجم 10 ml رسانده و حداقل یک ساعت بعد تعیین مقدار شود.

محیط استاندارد ها:

پایه محیط استاندارد ها HCl 10% (v/v) است که پس از افزودن استاندارد به آن، بترتیب:
هیدروکسیل آمین هیدروکلراید 10% (m/v)
یدید پتاسیم 1% (m/v)
اسید اسکوربیک 0.8% (m/v)
اضافه شده و حداقل یک ساعت باید بماند.

محلول های دستگاه هیدرید:

محلول احیا کننده: NaBH₄ (0.6%) + NaOH (0.5%)
فاز حامل: HCL 5%

Ashing aid solution= Mg (NO₃)₂.6H₂O 20% + MgO 2% (m/v)

**KI (25%) + Ascorbic acid (20%) (m/v)

روش اندازه گیری Zn, Fe, Cu, Cd, Pb پس از خاکستر گیری و اندازه گیری با اتمیک کوره و شعله

مرجع: AOAC International 2002

توزین حدود ۵ گرم نمونه همگن در یک بوته چینی ← حرارت روی شعله یا هات پلیت بمدت چند ساعت تا کربونیزه شدن نمونه ← انتقال به کوره الکتریکی سرد، رسیدن به دمای 450°C و ۴-۵ ساعت ماندن در این دما ← خارج کردن کروزه از کوره و افزودن کمی آب یا اسید نیتریک (۳-۱ میلی لیتر) به محتویات آن ← خرد کردن باقیمانده های سخت (در صورت لزوم) ← انتقال مجدد به کوره در دمای 450°C بمدت ۱-۲ ساعت دیگر ← خارج کردن از کوره (اگر خاکستر سفید تشکیل نشده باشد دوباره آب یا اسید اضافه شده و در کوره قرار داده شود) ← افزودن حدود ۵ میلی لیتر HCl 6M به خاکستر ← تبخیر اسید روی هات پلیت ← افزودن اسید نیتریک 0.1 M و رساندن به حجم

محیط استانداردها: اسید نیتریک 0.1 M

مودیفایر جهت تعیین مقدار سرب و کادمیوم: اسید ارتو فسفریک

روش اندازه گیری عناصر غیر فرار پس از هضم مایکروویو و اندازه گیری با اتمیک کوره

توزین حدود ۰.۵-۱ گرم نمونه همگن ← انتقال به وسل مایکروویو ←

افزودن اسید نیتریک (5 ml) + آب اکسیژنه (2 ml) ←

نیم ساعت قرار دادن زیر هود جهت خروج گازهای تشکیل شده ←

قرار دادن داخل دستگاه هضم مایکروویو

بعد از اتمام کار مایکروویو: انتقال نمونه هضم شده با پیپت به لوله فالکن کوچک جهت تعیین حجم

توجه مهم: محیط استاندارد ها نیز باید مشابه محیط نمونه ها باشد،

یعنی محلولی از اسید نیتریک + آب اکسیژنه به نسبت ۲+۵