سازمان حفاظت محیط زیست ایران

بخش سنجش هیدروکربنهای نفتی و سموم
آزمایشگاه مرجع

روش استخراج، جداسازی و آنالیز کل هیدروکربنهای نفتی (TPH)
در نمونه های خاک، رسوب و Biota

تهیه کنندگان :

اعظم صادق اسدی

هنگامه اکبرنژاد

المیرا دارابی

آزاده اکرام جعفری

نسخه :

۰۰ - ۱۳۸۸

سازمان حفاظت محیط زیست

۱- هدف :

اندازه گیری کل هیدروکربنهای نفتی در نمونه های آب، خاک و Biota.

۲- دامنه کاربرد :

در نمونه های آب، خاک و Biota.

۳- تجهیزات :

ترازو ۰,۱mg

سوکسله و هیتر

روتاری

تیمبل

آون

بورت شیشه ای جهت کروماتوگرافی

ژنراتور نیتروژن

٤- مواد مصرفی :

هگزان

دی کلرو متان

متانول

اسید سولفوریک

اسید کلریدریک

فلوروسیل

سولفات سدیم

پودر مس

پشم شیشه

سازمان حفاظت محیط زیست

۵- شرح انجام کار

۱-۵- نمونه های خاک و رسوب

الف- استخراج :

ابتدا نمونه را وزن کرده، داخل تیمبل بریزید. (برای این کار نباید تیمبل را با دست گرفت.) به همین دلیل آن را با پنس گرفته یا دور انگشتان فویل آلومینیومی بپیچید. حدود ۲۰-۱۰ گرم نمونه خاک فریز درایر شده که دارای ابعاد ۲۵۰ مایکرومتر می باشد را داخل تیمبل ریخته سپس بوسیله محلول ۵۰: ۵۰ هگزان دی کلرومتان در دستگاه سوکسله استخراج کنید. به منظور تعیین ریکاوری به نمونه استاندارد داخلی اضافه شود. استاندارد داخلی : ۵۰ میکرولیتر از مخلوطی شامل حدود ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر از n-c۱۹ d۴۰ و d۶۶ n-c۳۲ برای اولین فراکسیون و حدود ۲۰ نانو گرم بر میکرولیتر از هگزامتیل بنزن، کادالن و نفتالن d۸ برای دومین فراکسیون می باشد.

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

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

هنگامیکه عمل استخراج تمام شد، نمونه استخراج شده بوسیله دستگاه روتاری اواپریتور تا حجم حدود ۱۵ میلی لیتر تبخیر می شود. (دمای آب حمام نباید بیشتر از ۳۰ درجه سانتیگراد باشد.)

توجه :

در حقیقت پارامترهایی که برای تغلیظ بوسیله روتاری اواپریتور مهم هستند عبارتند از : دمای ظرف آب و خلاء متصل به سیستم خلاء. این پارامترها بهم مربوط هستند بطوریکه اگر یکی از آنها به اندازه کافی قوی نباشد دیگری باید افزایش یابد. بعنوان مثال اگر سیستم خلاء ضعیف باشد، دمای ظرف آب باید افزایش یافته و به ۳۵ و حتی ۴۰ درجه سانتیگراد برسد. مشاهدات نقش مهمی را بازی می کند. تقطیر حلال باید آهسته باشد و میعان در بالون دیده شود. پارامترهای دما و خلاء باید طوری تنظیم شوند که تغلیظ ماده استخراج شده از ۲۵۰ به ۱۵ میلی لیتر، حدود ۲۰ دقیقه طول بکشد.

سازمان حفاظت محیط زیست

ب- تمیز کردن و جداسازی :

اهداف تمیز کردن :

از بین بردن چربیها هنگامیکه به مقدار زیادی وجود داشته باشد و از بین بردن سولفور و ترکیبات سولفور. هر دو این ترکیبات در تجزیه با دستگاه گاز کروماتوگرافی بعنوان مزاحم تلقی می گردند.

از بین بردن سولفور و ترکیبات سولفور :

آماده سازی مس :

حدود ۲۰ گرم از پودر مس را در ارلن مایر بریزید. به اندازه کافی HCl غلیظ به آن اضافه کنید تا پودر مس را بپوشاند. تکان دهید و آنرا در حمام اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه بگذارید. دوباره آنرا تکان داده، مجددا، به مدت ۱۰ دقیقه، درحمام اولتراسونیک قرار دهید. HCl مصرفی را دور بریزید و مقداری HCl تازه به آن اضافه کنید، به حمام اولتراسونیک منتقل کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام نگهدارید. این مراحل را ۴ با ر تکرار کنید. سپس با آب مقطر بشوئید، تکان دهید و دور بریزید، دوباره به آن آب اضافه کنید و در حمام اولتراسونیک به مدت ۱۵ دقیقه نگهدارید. آب مصرفی را بیرون بریزید و اینکار را دوباره انجام دهید تا PH آب به حالت خنثی برسد. پودر مس را با استن بشوئید آنرا تکان داده و در حمام اولتراسونیک به مدت ۱۵ دقیقه نگهدارید. این مراحل را ۴ بار دیگر تکرارکنید. سپس این مراحل را با حلال هگزان تکرار کنید. پودر مس را در هگزان نگهدارید (و از پودر مس سریع استفاده کنید، از تماس پودر مس با هوا اجتناب کنید.)

۳ تا ۴ قاشق (پیپت پاستور) از پودر مس به داخل بالن محتوی مواد استخراج شده با هگزان بریزید و یک شب آنرا نگهدارید. حضور ترکیبات گوگرد در نمونه با سیاه شدن پودر مس مشخص می شود. نمونه استخراج شده را با سولفات سدیم بدون آب خشک کرده و آنرا با استفاده از جریان نیتروژن تا حجم ۱ تا ۲ میلی لیتر تغلیظ کنید.

سازمان حفاظت محیط زیست

مقدار ماده آلی قابل استخراج (EOM) :

حجم مشخصی از رسوب را روی صفحهٔ ترازوی الکتروبالانس قراردهید تا حدود ۱۰۰ میکرو لیتر آن تبخیر شود. سپس باقیمانده را با دقت حدود ۱ µg ± وزن کنید. اگر باقیمانده کمتر از ۲ میکرو گرم باشد، نمونه اصلی باید تغلیظ شود.

$$EOM\ (\mu g/g) = \frac{\text{۱۰۰۰* حجم استخراج(میلی لیتر) * وزن باقی مانده (میکرو گرم)}}{\text{وزن اولیه نمونه (گرم)* حجم تبخیر شده (میلی لیتر)}}$$

آماده سازی سیلیکا و آلومینا :

به منظور تمیز کردن، سیلیکاژل و آلومینا را ۸ ساعت با متانول و ۸ ساعت دیگر با هگزان سوکسله کنید. سپس آنرا در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد خشک کنید و سپس به مدت ۸ ساعت در دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد قرار دهید و آنرا در شیشه تیره رنگ نگهداری کنید. قبل از استفاده، این مواد را به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد فعال کرده و سپس با آب مقطر ۵ در صد وزنی غیر فعال کنید.

ستون کروماتوگرافی با استفاده از بورت ۵۰ میلی لیتری که پشم شیشه در نزدیک شیر آن فشرده شده، درست می شود. سپس ۵ گرم (۱۰ میلی لیتر) سیلیکا و ۱۰ گرم (۱۰ میلی لیتر) آلومینا و ۱ گرم سولفات سدیم بدون آب به ترتیب به ستون منتقل می شوند. سولفات سدیم به منظور جلوگیری از برهم خوردن سطح جاذب هنگام ریختن حلال اضافه می شود.

نمونه (ماکزیمم ۱۰۰ میلی گرم چربی داشته باشد) را بالای ستون برده و فراکسیون اول را با شستن نمونه با ۲۰ میلی لیتر هگزان بدست آورید (F۱) این فراکسیون شامل ترکیبات آلیفاتیک اشباع خواهد بود. فراکسیون دوم (F۲) را با شستشوی ستون با ۳۰ میلی لیتر مخلوط حلال های هگزان و دی کلرومتان با نسبت ۹ به ۱ بدست آورید. این فراکسیون شامل هیدروکربنهای حلقوی و غیر اشباع خواهد بود.

۲-۵- نمونه های Biota

قبل از آنالیز، این نمونه ها باید در ظروف تمیز و در ۲۰- در جه سانتیگراد نگهداری شوند. برای آنالیز باید یخ زدایی شده و برای استخراج با حلال آماده شوند. برای دست یافتن به یک بازیابی رضایت بخش

نمونه ها باید فریز درای شوند. برای استخراج آن از حلال متانول استفاده می شود. پس از عملیات جداسازی و Clean up (حذف جزئی چربیها با صابونی شدن) نمونه استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی ستونی فراکسیون گیری شود.

الف-استخراج :

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

محاسبه بازده استخراج به صورت زیر می باشد :

$$QR = \frac{\text{سطح زیر پیک استاندارد داخلی در نمونه} \times \text{حجم تغلیظ} \times ۱۰۰}{\text{سطح زیر پیک استاندارد}}$$

تغلیظ :

هگزانهای جمع آوری شده در بالا را با روتاری تغلیظ کرده، به حجم ۱۵ میلی لیتر برسانید. (ماکزیمم دما ۳۰ درجه سانتیگراد می باشد.) سپس آنرا بوسیله جریان نیتروژن به حجم یک میلی لیتر بر گرم از نمونه فریز شده برسانید. اینکار از رسوب چربیها جلوگیری می کند.

سازمان حفاظت محیط زیست

حال فاز آبی را با اسید سولفوریک ۱ مولار اسیدی کنید و سه بار با ۳۰ میلی لیتر هگزان در دکانتور استخراج نمائید. سپس آنرا تغلیظ کرده و چربی آنرا با ترازوی الکتروبالانس وزن کنید. چربی کل شامل جمع این چربی و چربی بدست آمده از اولین فراکسیون هگزان (محاسبه ذیل) می باشد.

محا سبات مربوط به تعیین لیپید ها :

حجم مشخصی از رسوب را روی صفحهٔ ترازوی الکتروبالانس قراردهید تا حدود ۱۰۰ میکرو لیتر آن تبخیر شود. سپس باقیمانده را با دقت حدود ۱ µg ± وزن کنید. اگر باقیمانده کمتر از ۲ میکرو گرم باشد، نمونه اصلی باید تغلیظ شود.

$$EOM\ (\mu g/g) = \frac{\text{۱۰۰۰ * حجم استخراج(میلی لیتر) * وزن باقی مانده (میکرو گرم)}}{\text{وزن اولیه نمونه (گرم)* حجم تبخیر شده (میلی لیتر)}}$$

آماده سازی سیلیکا و آلومینا :

به منظور تمیز کردن، سیلیکاژل و آلومینا را ۸ ساعت با متانول و ۸ ساعت دیگر با هگزان سوکسله کنید. سپس آنرا در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد خشک کنید و سپس به مدت ۸ ساعت در دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد قرار دهید و آنرا در شیشه تیره رنگ نگهداری کنید. قبل از استفاده این مواد را به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد فعال کرده و سپس با آب مقطر ۵ در صد وزنی غیر فعال کنید.

ب- جداسازی و فراکسیون گیری :

ستون کروماتوگرافی با استفاده از بورت ۵۰ میلی لیتری که پشم شیشه در نزدیک شیر آن فشرده شده درست می شود. سپس ۵ گرم (۱۰ میلی لیتر) سیلیکا و ۱۰ گرم (۱۰ میلی لیتر) آلومینا و ۱ گرم سولفات سدیم آنهیدراز به ترتیب به ستون منتقل می شوند. سولفات سدیم به منظور جلوگیری از برهم خوردن سطح جاذب هنگام ریختن حلال اضافه می شود.

نمونه (ماکزیمم ۱۰۰ میلی گرم چربی داشته باشد.) را بالای ستون برده و فراکسیون اول را با شستن نمونه با ۲۰ میلی لیتر هگزان بدست آورید. (F۱) این فراکسیون شامل ترکیبات آلیفاتیک اشباع خواهد بود.

سازمان حفاظت محیط زیست

فراکسیون دوم (F۲) را با شستشوی ستون با ۳۰ میلی لیتر مخلوط حلال های هگزان و دی کلرومتان با نسبت ۹ به ۱ بدست آورید. این فراکسیون شامل هیدروکربنهای حلقوی و غیر اشباع خواهد بود.

۳-۵- نمونه های آب

الف- استخراج :

استخراج نمونه های آب بلافاصله بعد از نمونه گیری اگر که در دریا موقعیت و وسایل این کار مهیا باشد، می تواند صورت پذیرد و درغیر این صورت این کار وقتی که کشتی به ساحل دریا رسید انجام می گیرد. بطور کلی نمونه نباید بیش از ۴-۳ ساعت ذخیره گردد. اما اگر اینکار میسر نبود به نمونه مخلوط حلال هگزان دی کلرو متان (۷:۳) اضافه کرده تا نمونه فاسد نگردد. نمونه باید در یخچال یا جعبه یخ نگهداری گردد.

عمل استخراج بوسیله هگزان صورت می گیرد. متدی که برای اینکار استفاده میشود، متد جداسازی با قیف دکانتور است که مراحل کار به شرح ذیل می‌باشد :

لازمه این تکنیک دو قیف جدا کننده ۲ لیتری تمیز که قبلاً با استن و حلال آبکشی شده و دارای شیر تفلونی و درپوش است، می باشد. همچنین نیاز به ۴ لیتر یا ۱ گالن آب (نمونه) است. ابتدا نصف نمونه را به قیف جدا کننده شماره ۱ انتقال داده و ۵۰ cc از حلال هگزان به آن اضافه می گردد. سپس دکانتور را به شدت برای چند دقیقه تکان داده و در آن را باز می کنیم تا بخارات حلال خارج شود. (۵ بار اینکار را تکرار کنید)، سپس دکانتور را داخل حلقه گذاشته، زمان داده تا دو فاز شود. پس از آن فاز پائین را که فاز آبی است داخل دکانتور بریزید و فاز آلی داخلی دکانتور ۱ می ماند.

حال به دکانتور ۲، ۵۰ cc هگزان اضافه کرده و مجدداً پروسه تکان دادن مثل بالا صورت گرفته و بعد آنرا در حلقه می گذاریم تا دو فاز گردد و پس از این زمان فاز آب داخل دکانتور ۲ که در زیر جمع شده در مزور ریخته و حجم آن را اندازه گرفته و سپس دور بریزید.

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

در نهایت ۵۰ cc فاز آلی دکانتور ۱ را با ۵۰ cc حجم فاز آلی دکانتور ۲ در بالونی ریخته و برای آبگیری سولفات سدیم بدون آب را آنقدر اضافه کرده تا وقتی که بالن را تکان دهید سولفاتها در ته آن

حرکت نمایند. سپس فاز آلی داخل بالن را از یک قیف که رویش پشم شیشه ای که تمیز است و قبلاً با حلال شستشو داده اید، رد کرده و وارد بالن دیگری نمائید تا سولفات سدیم ها روی پشم شیشه بماند. تا کنون عملیات استخراج صورت گرفته است. شایان ذکر است که اگر بخواهید نمونه بماند حتما باید روی آن برچسب بزنید.

آماده سازی سیلیکا و آلومینا :

به منظور تمیز کردن، سیلیکاژل و آلومینا را ۸ ساعت با متانول و ۸ ساعت دیگر با هگزان سوکسله کنید. سپس آنرا در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد خشک کنید و سپس به مدت ۸ ساعت در دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد قرار دهید. و آنرا در شیشه تیره رنگ نگهداری کنید. قبل از استفاده این مواد را به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد فعال کرده و سپس با آب مقطر ۵ در صد وزنی غیر فعال کنید.

ب- جداسازی و فراکسیون گیری :

ستون کروماتوگرافی با استفاده از بورت ۵۰ میلی لیتری که پشم شیشه در نزدیک شیر آن فشرده شده، درست می شود. سپس ۵ گرم (۱۰ میلی لیتر) سیلیکا و ۱۰ گرم (۱۰ میلی لیتر) آلومینا و ۱ گرم سولفات سدیم بدون آب بترتیب به ستون منتقل می شوند. سولفات سدیم به منظور جلوگیری از برهم خوردن سطح جاذب هنگام ریختن حلال اضافه می شود.

نمونه (ماکزیمم ۱۰۰ میلی گرم چربی داشته باشد.) را بالای ستون برده و فراکسیون اول را با شستن نمونه با ۲۰ میلی لیتر هگزان بدست آورید. (F۱) این فراکسیون شامل ترکیبات آلیفاتیک اشباع خواهد بود. فراکسیون دوم (F۲) را با شستشوی ستون با ۳۰ میلی لیتر مخلوط حلال های هگزان و دی کلرومتان با نسبت ۹ به ۱ بدست آورید. این فراکسیون شامل هیدروکربنهای حلقوی و غیر اشباع خواهد بود.

ج-آنالیز ترکیبات خاک و Biota و آب :

اندازه گیری کل هیدروکربنهای نفتی بوسیله دستگاه اسپکتروفلوروفتومتر صورت می گیرد. در این روش اگر هدف فقط قرائت TPH است، در قسمت جداسازی و Clean up، فاز F۱ و F۲ را در یک بالون جمع کنید ولی اگر هدف قرائت هیدروکربنهای نفتی بصورت جزء به جزء نیز باشد، وقتی در قسمت

جداسازی و Clean up دو فاز F۲ , F۱ را گرفتید بعد از تزریق آنها به دستگاه GC، GC/MS یا HPLC دو فاز F۱ و F۲ را با هم مخلوط کرده و سپس با دستگاه اسپکتروفلوروفتومتر قرائت کنید.

برای شروع کار ابتدا باید دستگاه کالیبره گردد. (شایان ذکر است که هر روز استفاده باید دستگاه کالیبره گردد.)

در ابتدا از نفت راپمی و یا کرایزن استانداردهای ذیل ساخته می شود :

ppm ۵و۲و۱و۰/۵و۰/۲و۰/۱و۰/۰۵و۰/۰۲و۰/۰۱

برای این کار از میکرو پیپت (میکرو سرنگ) استفاده شده و حداقل ۱۰۰CC از هر کدام از آنها باید تهیه شود تا اگر در آن روز کل نمونه ها تمام نشد در روزهای بعد استفاده گردد. شدت فلورسانس نمونه های استاندارد بوسیله اسپکتروفلوروفتومتری اندازه گیری می شود که دارای سل سیلیکاتی به ابعاد ۱Cm بوده و طول موج تحریک در ۳۱۰ nm و طول موج نشر در۳۶۰nm تنظیم شده باشد. نتیجه این کار یک نمودار بر اساس شدت نشر در مقابل غلظت است و حداقل نمودار تا غلظتppm ۵ باید خطی باشد.

استاندارد کرایزن هم مثل استاندارد نفت راپمی ساخته می شود و در همان شرایط و حساسیت فوق به دستگاه اسپکتروفلوروفتومتر داده شده و منحنی کالیبراسیون آن بدست می آید.

برای محاسبه نسبت مقایسه (R) از منحنی استاندارد کرایزن و نفت خام طبق فرمول زیراستفاده می شود :

$$R = \frac{\text{شدت فلورسانس استاندارد نفت خام} \ * \ \text{غلظت استاندارد کرایزن بر حسب ppm}}{\text{شدت فلورسانس استاندارد کرایزن} \ * \ \text{غلظت استاندارد نفت خام ppm}}$$

حال برای آنالیز فلورسانس در نمونه های استخراج شده و شاهد، از همان روشی که برای استاندارد گفته شد، یعنی در طول موج تحریک۳۱۰ nm و طول موج نشر۳۶۰nm و در همان حساسیتی که کرایزن و نفت خام تنظیم شدند، استفاده می گردد. این روش حد تشخیص حدود ۰/۴ میکروگرم نفت راپمی (۰/۰۵ میکروگرم کرایزن) بر لیتر را برای دستگاه فراهم می کند.

پس از این کار ابتدا حلال خالی به دستگاه داده شده تا شدت نشر آن خوانده شود. بعد نمونه ها یکی پس از دیگری حجم تغلیظ شده شان یادداشت شده و در سل ریخته و به دستگاه داده شده و شدت نشر آنها خوانده میشود.

سپس برای محاسبه غلظت نمونه اصلی، غلظت هیدروکربن در نمونه استخراج شده معادل غلظت نفت خامی است که از منحنی کالیبراسیون خوانده می شود.

غلظت نمونه اصلی بشرح ذیل محاسبه می گردد :

$$A\ (TPH) = \frac{B * C}{D}$$

A (TPH) = غلظت هیدروکربن در نمونه اصلی بر حسب µg/L (ppb) آب یا µg/g (ppm) رسوب و Biota.

B = غلظت هیدروکربن در نمونه استخراج شده که توسط منحنی کالیبراسیون بدست آمده است بر حسب µg/ml (ppm).

C = حجم استخراج (حجم استخراج تغلیظ شده که در نهایت به دستگاه تزریق شده) بر حسب ml.

D = حجم نمونه آب اصلی (اولیه) بر حسب لیتر یا وزن نمونه رسوب یا Biota بر حسب گرم.

نتیجه بر اساس غلظت نفت خام یا کرایزن ppb در آب یا (µg/g) ppm در رسوب یا Biota گزارش می شود.

۹- مراجع و مستندات مرتبط :

- Moopam ۱۹۹۹

سازمان حفاظت محیط زیست