

تماس تلفنی جهت دریافت مشاوره:

۱. مشاور دفتر تهران (آقای محسن ممیز)

۰۹۱۲ ۹۶۳ ۹۳۳۶

۲. مشاور دفتر اصفهان (سرکار خانم لیلا ممیز)

۰۹۱۳ ۳۲۲ ۸۲۵۹

مجموعه سیستم مدیریت ایزو با هدف بهبود مستمر عملکرد خود و افزایش رضایت مشتریان سعی بر آن داشته، کلیه استانداردهای ملی و بین المللی را در فضای مجازی نشر داده و اطلاع رسانی کند، که تمام مردم ایران از حقوق اولیه شهروندی خود آگاهی لازم را کسب نمایند و از طرف دیگر کلیه مراکز و کارخانه جات بتوانند به راحتی به استانداردهای مورد نیاز دسترسی داشته باشند.

این موسسه اعلام می دارد در کلیه گرایشهای سیستم های بین المللی ISO پیشگام بوده و کلیه مشاوره های ایزو به صورت رایگان و صدور گواهینامه ها تحت اعتبارات بین المللی سازمان جهانی IAF و تامین صلاحیت ایران می باشد.

هم اکنون سیستم خود را با معیارهای جهانی سازگار کنید...





جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization
Organization



استاندارد ملی ایران

۱۵۵۸۴

چاپ اول

۱۳۹۷

INSO

15584

1st.Edition

2018

Identical with
BS EN 16802:
2016

مواد غذایی - تعیین عناصر و گونه های
شیمیایی آنها - تعیین آرسنیک معدنی
در مواد غذایی با منشاء دریایی و گیاهی
به وسیله کروماتوگرافی مایع تبادل یونی
با کارایی بالا متصل به دستگاه پلاسمای
القایی جفت شده با آشکارساز طیف سنج
جرمی

Foodstuffs — Determination
of elements and their chemical
species — Determination of
inorganic arsenic in foodstuffs
of marine and plant origin by
anion-exchange HPLC-ICP-MS

ICS: 67.060

استاندارد ملی ایران شماره ۱۵۵۸۴ (چاپ اول): سال ۱۳۹۷

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: ۸۱۱۴-۳۲۸۰ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.gov.ir

وبگاه: <http://www.isiri.gov.ir>

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.gov.ir

Website: <http://www.isiri.gov.ir>

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بندیکماده^۳ قانون اصلاح قوانین ومقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱تنها مرجع رسمی کشوراست 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، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود 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، مصرف کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادهای سازمان های دولتی و غیردولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی بهره گیری می شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی 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 می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری کند. هم چنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهی نامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت میکند. ترویج دستگاه بین المللی 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

« مواد غذایی - تعیین عناصر و گونه های شیمیایی آنها - تعیین آرسنیک معدنی در مواد غذایی با منشاء دریایی و گیاهی به وسیله کروماتوگرافی مایع تبادل یونی با کارایی بالا متصل به دستگاه پلاسمای القایی جفت شده با آشکارساز طیف سنج جرمی »

رئیس :

نوربخش ، رویا

(کارشناسی ارشد سم شناسی)

دبیر :

حسنى گنجى، سمیه

(کارشناسی ارشد شیمی فیزیک)

اعضاء : (اسامی به ترتیب حروف الفباء)

اکبری، بهروز

(دکترای شیمی تجزیه)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی -
آزمایشگاههای مرجع کنترل غذا و دارو

حاجیان، مینو

(کارشناسی ارشد صنایع غذایی)

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی - سازمان
غذا و دارو

دانشمند ایرانی، کوروش

(کارشناسی ارشد شیمی فیزیک)

سازمان ملی استاندارد ایران - دفتر نظارت بر
استاندارد صنایع غذایی، آرایشی، بهداشتی و حلال

شارخی رضایی، شکوفه

(کارشناسی ارشد صنایع غذایی)

سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشگاه استاندارد

شهبازی، کریم

(دکترای شیمی خاک)

وزارت جهاد کشاورزی - موسسه تحقیقات خاک و
آب کشور

عشقی، کامران

(کارشناسی ارشد فیزیک)

آزمایشگاه همکار کیمیا شناسی (سهامی خاص)

غضنفری، معصومه

(کارشناسی ارشد بهداشت ایمنی مواد غذایی)

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی - سازمان
غذا و دارو

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء)

سمت و/یا محل اشتغال

فرجود، محمد جواد (کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)
آزمایشگاه همکار نظارت بر ضوابط بهداشت انسانی و
استاندارد قشم (سهامی خاص)

فرجی، محمد (دکترای شیمی تجزیه)
سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشگاه استاندارد

کشاوری، محسن (کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)
آزمایشگاه همکار پرهام گستر فارس (سهامی خاص)

محسنی، عاطفه (دکترای شیمی تجزیه)
آزمایشگاه IGI (سهامی خاص)

نجف زاده، جواد (کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)
شرکت تجهیز آزمایش شریف (سهامی خاص)

نژاد علی، عزیزالله (دکترای شیمی تجزیه)
هیئت علمی دانشگاه پیام نور مشهد

ویراستار:

نوربخش، رویا (کارشناسی ارشد سم شناسی)
سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشگاه استاندارد

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
و	پیش گفتار
۱	۱ هدف
۱	۲ دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۴ اصطلاحات و تعاریف
۲	۵ اصول آزمون
۲	۶ واکنشگرها
۴	۷ وسایل
۵	۸ روش آزمون
۹	۹ بیان نتایج
۹	۱۰ دقت
۱۰	۱۱ گزارش آزمون
۱۱	پیوست الف (آگاهی دهنده) داده های دقت
۱۲	پیوست ب (آگاهی دهنده) اطلاعات در مورد شرایط کروماتوگرافی

پیش گفتار

استاندارد « مواد غذایی - تعیین عناصر و گونه های شیمیایی آنها - تعیین آرسنیک معدنی در مواد غذایی با منشاء دریایی و گیاهی به وسیله کروماتوگرافی مایع تبادل یونی با کارایی بالا متصل به دستگاه پلاسمای القایی جفت شده با آشکارساز طیف سنج جرمی» که پیش نویس آن در کمیسیون های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین المللی / منطقه ای به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شماره ۵ تهیه و تدوین شده، در هزار و شصت و چهار و سومین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده های کشاورزی مورخ ۹۷/۲/۲۵ 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 می شود.

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

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد منطقه ای زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می باشد و معادل یکسان استاندارد منطقه ای مزبور است:

BS EN 16802:2016, Foodstuffs - Determination of elements and their chemical species
- Determination of inorganic arsenic in foodstuffs of marine and plant origin by anion-exchange HPLC-ICP-MS

مواد غذایی - تعیین عناصر و گونه های شیمیایی آنها - تعیین آرسنیک معدنی در مواد غذایی با منشاء دریایی و گیاهی به وسیله کروماتوگرافی مایع تبادل یونی با کارایی بالا متصل به دستگاه پلاسمای القایی جفت شده با آشکارساز طیف جرمی (IC/HPLC-ICP-MS)^۱

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش برای اندازه گیری آرسنیک معدنی در مواد غذایی با منشاء دریایی و گیاهی پس از استخراج در حمام آب با استفاده از IC/HPLC-ICP-MS است. این روش در آزمون های بین آزمایشگاهی روی برنج سفید، برنج سبوس دار، تره فرنگی، صدف، ماهی و جلبک دریایی با کسر جرمی آرسنیک معدنی در محدوده 0.73 mg/kg تا 10.3 mg/kg کاربرد دارد.

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 می شوند. در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آنها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه های بعدی برای این استاندارد الزام آور است. استفاده از مرجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

2-1 EN ISO 3696, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (ISO 3696)

یاد آوری - استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸ "آب-مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه -ویژگی ها و روش های آزمون" بر اساس منبع فوق تدوین شده است.

2-2 EN 13804, Foodstuffs- Determination of elements and their chemical species- General considerations and specific requirements

۳ اصول آزمون

این استاندارد، روشی برای تعیین آرسنیک معدنی ارائه می کند. آرسنیک معدنی شامل آرسنیت، (As (III)) و آرسنات (As(V)) می باشد. آزمون با اسید نیتریک رقیق و محلول پراکسید هیدروژن در حمام آب گرم آماده سازی می شود. به این ترتیب گونه های آرسنیک معدنی استخراج و (As(III)) به (As(V)) اکسید می شوند. برای جداسازی و اندازه گیری گونه های آرسنیک معدنی از IC/HPLC-ICP-MS استفاده می شود. کالیبراسیون خارجی با استانداردهای منطبق بر بافت^۲ برای اندازه گیری مقدار آرسنیک معدنی به کار می رود.

1 -Anion exchange High Performance Liquid Chromatography Coupled Inductively online to element- specific detector Coupled Plasma Mass Spectrometry

2- Matrix match

هشدار: استفاده از این استاندارد ممکن است، شامل استفاده از مواد، وسایل و تجهیزات خطرناک باشد. در این استاندارد تمامی موارد ایمنی و بهداشتی نوشته نشده است. در صورت مشاهده چنین مواردی مسئولیت برقراری شرایط ایمنی و سلامتی مناسب و اجرای آن بر عهده کاربر این استاندارد می باشد.

۴ واکنشگرها

۴-۱ کلیات

غلظت گونه های آرسنیک در آب و واکنشگرهای مورد استفاده باید به اندازه ای پایین باشد، که نتایج را تحت تاثیر قرار ندهد. هنگام استفاده از روشی با حساسیت بالا مانند ICP-MS کنترل سطوح آلودگی شاهد، آب و سایر واکنشگرها بسیار حائز اهمیت است.

به طور کلی پیشنهاد می شود از آب فوق خالص^۱ با ویژگی های مطابق با ویژگی های آب درجه ۱ طبق استاندارد منطقه ای EN ISO 3696 (به عنوان مثال آب با هدایت الکتریکی زیر $0.1 \mu\text{S}/\text{cm}$ در 25°C) و اسید با درجه خلوص بالا با تقطیر زیر نقطه جوش استفاده شود. واکنشگرها باید حداقل با کیفیت خلوص تجزیه ای باشند.

به منظور جلوگیری از آلودگی در طول مراحل آماده سازی و اندازه گیری، ممکن است از تمهیدات ویژه ای بهره جست (مانند استفاده از هود لامینار یا امکانات تهویه اتاق تمیز^۲).

۴-۲ اسید نیتریک، غلیظ با کسر جرمی $w \geq 65\%$ و غلظت جرمی تقریبی $\rho(\text{HNO}_3) = 1.4 \text{ g/l}$ به منظور جلوگیری از آلودگی بالقوه، فقط از اسید نیتریک موجود با درجه خلوص بالا استفاده کنید، یا اسید نیتریک را با تقطیر زیر نقطه جوش پاکسازی نمایید.^۳

۴-۳ پراکسید هیدروژن، $w(\text{H}_2\text{O}_2) \geq 98\%$

برای جلوگیری از آلودگی بالقوه، از پراکسید هیدروژن با درجه خلوص بالا استفاده کنید. پراکسید هیدروژن در دسترس باید از لحاظ میزان آلودگی آرسنیک بررسی شود.

۴-۴ محلول استخراجی ۱، $c(\text{HNO}_3) = 0.1 \text{ mol/l}$ در $3\% (\text{V/V}) \text{ H}_2\text{O}_2$

در یک بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری، به ترتیب ۸۰۰ ml از آب و ۶/۵ ml از اسید نیتریک (طبق زیربند ۴-۲) بریزید و سپس ۱۰۰ ml از هیدروژن پراکسید (طبق زیربند ۴-۳) را به آن بیفزایید و در نهایت آن را با آب به حجم برسانید.

۴-۵ محلول استخراجی ۲، $c(\text{HNO}_3) = 0.2 \text{ mol/l}$ در $6\% (\text{V/V}) \text{ H}_2\text{O}_2$

1 -Ultra Pure

2- laminar flow benches or comparable clean room facilities

3 -Clean up by a sub- boiling distillation

در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری، ۷۰ ml آب بریزید و سپس به ترتیب ۱/۳ ml از اسید نیتریک (طبق زیربند ۴-۲) و ۲۰ ml از هیدروژن پراکسید (طبق زیربند ۴-۳) را به آن بیفزایید. ظرف را با آب به حجم برسانید.

یادآوری - محلول های استخراجی ۱ و ۲ متناسب با حجم کل مورد نیاز، به صورت روزانه تهیه شود.

۴-۶ کربنات آمونیوم، $w[(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3] \geq 99/999\%$ ، برای تهیه محلول فاز متحرک.

۴-۷ آمونیاک^۱، $w[\text{NH}_3(\text{aq})] \geq 25\%$ ، برای تنظیم pH فاز متحرک.

۴-۸ متانول (CH_3OH)، با درجه خلوص HPLC، برای تهیه فاز متحرک.

۴-۹ فاز متحرک، شامل ۵۰ mmol/l کربنات آمونیوم در متانول ۳٪ با pH=۱۰/۳

به عنوان مثال ۴/۸۰ g کربنات آمونیوم (طبق زیربند ۴-۶) را در حدود ۸۰۰ ml آب حل کنید. محلول را با آمونیاک (طبق زیربند ۴-۷) روی pH= ۱۰/۳ تنظیم کرده، سپس ۳۰ ml اتانول (طبق زیربند ۴-۸) را به آن بیفزایید و با آب به حجم ۱۰۰۰ ml برسانید. قبل از استفاده، محلول فاز متحرک را از صافی ۰/۴۵ μm عبور دهید.

غلظت بهینه کربنات آمونیوم در فاز متحرک، به ستون کروماتوگرافی مورد استفاده (مانند: برند، اندازه و ابعاد) بستگی دارد. آزمون گر باید متناسب با معیارهای مورد نیاز دستگاه برای دستیابی به حداکثر میزان تفکیک آرسنیک، غلظت مناسبی از کربنات آمونیوم را تهیه کند (همان طور که در زیر بند ۵-۱۰ ذکر شده است).

متانول نیز برای افزایش شدت سیگنال آرسنیک (ترسیب کربن در پلاسما) به فاز متحرک افزوده می شود. آزمون گر باید بسته به تجهیز مورد استفاده، غلظت متانول را برای رسیدن به حداکثر پاسخ محاسبه کند.

۴-۱۰ دی آرسنیک تری اکسید، $w(\text{As}_2\text{O}_3) \geq 99/5\%$ اختیاری.

۴-۱۱ محلول هیدروکسید پتاسیم، $\rho(\text{KOH}) = 20 \text{ g}/100 \text{ ml}$ اختیاری

۴-۱۲ محلول های اسید سولفوریک، $w(\text{H}_2\text{SO}_4) = 20\%$ و $w(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1\%$ اختیاری.

۴-۱۳ فنول فتالئین، اختیاری

۴-۱۴ محلول های استاندارد، با غلظت جرمی ۱۰۰۰ mg/l آرسنیک.

استفاده از استانداردهای تجاری آرسنیک، مثل (آرسنیک III) و یا (آرسنیک V) با غلظت جرمی ۱۰۰۰ mg/l توصیه می شود.

اگر محلول آماده تجاری در دسترس نباشد. با استفاده دی آرسنیک تری اکسید (طبق زیربند ۴-۱۴) محلول های استاندارد تهیه می شود.

به عنوان مثال ۱/۳۲۰ g از دی آرسنیک تری اکسید (طبق زیربند ۴-۱۴) را در ۲۵ ml محلول هیدروکسید پتاسیم (طبق زیربند ۴-۱۱) حل کرده، سپس با محلول اسید سولفوریک ۲۰٪ (طبق زیربند ۴-۱۲) و در حضور شناساگر فنل فتالین (طبق زیربند ۴-۱۴) خنثی کنید. و محلول را در بالن حجمی با استفاده از محلول اسید سولفوریک ۱٪ (طبق زیربند ۴-۱۲)، به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید.

یادآوری - با آماده سازی محلول استاندارد در محلول استخراجی ۱ (طبق زیربند ۴-۴)، تمامی آرسنیت ها به طور کامل به آرسنات اکسید می شوند.

۴-۱۵ محلول های کالبراسیون

غلظت های مختلفی از محلول های استاندارد (شامل محلول شاهد) که گستره ی خطی مورد بررسی را پوشش می دهد، با رقیق سازی محلول مرجع آنالیت با محلول استخراجی ۱ (طبق زیربند ۴-۴) تهیه کنید. محلول های کالبراسیون منطبق بر بافت نیز باید با استفاده از محلول استخراجی ۱ (طبق زیربند ۴-۴) تهیه شود. این کار مانع از احیای آرسنات به آرسنیت می شود. قبل از آزمون، بخشی از محلول های استاندارد را به ویال های HPLC انتقال دهید (طبق زیربند ۶-۳-۲).

اکسیداسیون کامل آرسنیت به آرسنات در محلول های استاندارد، باید تأیید شود. (به عنوان مثال، این کار را می توانید با بررسی وجود هر گونه پیک آرسنیت یا کاهش پیک آرسنات در کروماتوگرام انجام دهید.)

۴-۱۶ محلول برای بررسی جداسازی کروماتوگرافی، ترکیبات دارای آرسنیک آلی (مثلاً $10 \mu\text{g/l}$) مونومتیل آرسنوس اسید (MMA)، دی متیل آرسنیک اسید (DMA)، آرسنوبتاین (AB) و نیز آرسنات (مثلاً $10 \mu\text{g/l}$) و کلرید (مثلاً 100 mg/l).

۵ وسایل

۵-۱ کلیات

تمامی دستگاه ها و تجهیزاتی که به طور مستقیم با نمونه و محلول ها در تماس هستند باید برای به حداقل رساندن آلودگی ها، به دقت بررسی شوند. با توجه به امکان آلودگی آرسناتی وسایل شیشه ای توصیه می شود از این وسایل استفاده نشود. (منبع [۳] کتابنامه را ببینید)

هشدار - برخی از سامانه های نمونه گیری خودکار (اتوسمپلر) دارای ویال های شیشه ای هستند. در این موارد فقط می توان به بررسی میزان آلودگی و به حداقل رساندن آن ها بسنده کرد.

۵-۲ آسیاب آزمایشگاهی، قادر به آسیاب کردن ذرات به اندازه ی کمتر از 0.5 mm .

۵-۳ ترازوی آزمایشگاهی، با دقت 1 mg .

۴-۵ ابزارهای لازم برای صاف کردن فاز متحرک (منیفولد)^۱، حداکثر اندازه حفره $0.45\mu\text{m}$.

۵-۵ حمام آب، قابل تنظیم روی ۹۰ درجه سلسیوس.

۶-۵ سانتریفیوژ، کمینه (4000 min^{-1}) 2010 g

۷-۵ صافی‌های یک بار مصرف سر سرنگی ($0.45\mu\text{m}$) یا ویال‌های HPLC دارای صافی، مناسب برای محلول‌های اسیدی برای صاف کردن محلول مورد آزمون پیش از شروع آنالیز.

۸-۵ بالن‌های حجم‌سنجی پلاستیکی، برای تهیه‌ی فاز متحرک، شاهد و محلول‌های کالیبراسیون.

یادآوری - در صورت تهیه محلول‌های استاندارد کالیبراسیون با روش وزنی، از ظروف پلاستیکی بدون نشانه نیز می‌توان استفاده کرد.

۹-۵ سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC).

۱۰-۵ ستون تعویض یونی قوی^۲ (SAX)، مناسب برای جداسازی انتخابی آرسنات از سایر ترکیبات آرسنیک موجود در نمونه‌ی استخراجی.

یادآوری - استفاده از محافظ ستون^۳، به منظور افزایش طول عمر ستون تجزیه ای، توصیه می‌شود.

معمولاً حداقل زمان بازداری قابل قبول برای آنالیت، دو برابر زمان بازداری مربوط به گونه ای است، که در ستون هیچ گونه زمان بازداری نداشته باشد. علاوه بر این، باید نزدیک‌ترین پیک در کروماتوگرام از پیک آنالیت، به وسیله کمینه یک پهنای پیک کامل در 10% ارتفاع پیک آنالیت، جدا شده باشد. توصیه می‌شود برای جداسازی مناسب پیک آنالیت از یک محلول دارای آرسنیک آلی (مثل مونومتیل‌آرسنوس اسید (MMA)، دی‌متیل‌آرسنیک اسید (DMA)، آرسنوبتاین (AB)) و آرسنات استفاده شود. مطمئن شوید که زمان آزمون HPLC^۴ برای کلراید ($m/z=35$) و همچنین برای ترکیبات آرسنیک‌دار با زمان‌های بازداری بیشتر از آرسنات، به اندازه کافی در نظر گرفته شده باشد تا شویش کامل این ترکیبات از ستون، پیش از تزریق بعدی انجام شود. همچنین باید از عدم شویش هم زمان آرسنات و کلراید اطمینان حاصل شود تا از مزاحمت یون چنداتمی $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ در طیف‌سنج جرمی جلوگیری شود. (مثال‌هایی از ستون‌های کروماتوگرافی SAX مورد استفاده در بررسی مشارکتی^۵ در پیوست ب و منبع [۱] کتابنامه آورده شده است).

۱۱-۵ طیف سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی (ICP-MS).

۱۲-۵ گاز آرگون، با خلوص بیشتر از 99.99%

1- Manifold

2- Strong anion exchange column (SAX)

3- Guard column

4-HPLC run

5- Collaborative trial

۶ روش اجرای آزمون

۶-۱ کلیات

مراحل آماده سازی نمونه را طبق دستور کار موجود در EN 13804 انجام دهید.

۶-۲ استخراج حمام آب

حدود 0.2 g تا 0.5 g از فرم پودر شده‌ی نمونه را با دقت تقریبی 0.1 g گرم وزن کرده و در یک لوله ریخته و با 10 میلی لیتر از محلول استخراجی ۱ (طبق زیربند ۴-۴) پر کنید. این محلول باید به همراه نمونه شاهد باشد. لوله‌ها باید به دقت با درپوشی مناسب بسته شوند. برای خیساندن نمونه و تماس بیشتر آن با محلول استخراجی ۱ (طبق زیربند ۴-۴) آن را به طور کامل تکان دهید. ممکن است برخی از نمونه‌های پودری به زمان بیشتری برای خیساندن نیاز داشته باشند (مثلاً یک شب).

اگر از نمونه تازه برای استخراج استفاده شود، باید در محاسبات، مقدار محتوای آب نیز مورد نظر قرار گیرد. وزن نمونه باید بین 0.2 g تا 0.5 g از ماده‌ی خشک باشد. غلظت محلول استخراجی باید با محتوای آب نمونه مطابقت داشته باشد به طوی که محلول‌های منطبق بر بافت در سطح یکسانی قرار گیرد. به عنوان مثال نمونه را وزن کنید، تا 5 ml آب به آن اضافه و کاملاً مخلوط کنید. سپس 5 ml از محلول استخراجی ۲ (طبق زیربند ۴-۵) را به آن افزوده و دوباره همه را با هم مخلوط کنید.

پس از آن محلول‌ها را به مدت 5 ± 60 دقیقه در حمام آب گرم $90^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ قرار داده و استخراج کنید.

پس از مرحله‌ی استخراج با حمام آب، به محلول اجازه دهید سرد شده و به دمای اتاق برسد، سپس لوله‌ها را سانتریفیوژ (10 دقیقه، 2010 g) 4000 min^{-1}) کنید. فاز جداسازی شده در سانتریفیوژ (محلول رویی)، به مدت حداکثر یک هفته برای انجام آزمایش در یخچال (با دمای 4 درجه سلسیوس) قابل نگهداری است. قبل از انجام آنالیز، تمامی نمونه‌های استخراجی باید با صافی سر سرنگی (طبق زیربند ۵-۷)، صاف شده و در ویال‌های HPLC ریخته شوند.

۶-۳ تعیین مقدار آرسنیک معدنی با استفاده از HPLC-ICP-MS

۶-۳-۱ آماده سازی HPLC-ICP-MS برای انجام آزمون

شرایط کار HPLC و ICP-MS باید بر اساس اطلاعات کلی ارائه شده توسط سازنده دستگاه و با در نظر گرفتن شرایط عملیاتی ستون باشد. یک محلول آرسنیک، مثلاً 10 میکروگرم بر لیتر آرسنات در متانول 3% را می‌توان بر اساس دستورالعمل سازنده برای بهینه‌سازی سامانه آزمون، استفاده کرد. آرسنیک تک ایزوتوپی است و می‌تواند نسبت جرم/بار (m/z) 75 داشته باشد.

توصیه می‌شود، به منظور اطمینان از پایداری شرایط و به تعادل رسیدن دستگاه HPLC (مانند ستون کروماتوگرافی)، پیش از آغاز آزمایش، فاز متحرک از دستگاه عبور داده شود. ممکن است برای دستیابی به کروماتوگرافی پایدار نیاز به تزریق‌های متوالی نمونه‌ی استخراجی باشد تا آزمایش‌های بعدی قابل اطمینان شوند. بسته به ماتریس و شرایط ستون، تغییر زمان بازداری قابل انتظار است و باید آن را در محاسبات در نظر گرفت.

۶-۳-۲ کالیبراسیون

حجم مناسبی از محلول کالیبراسیون آرسنیک (طبق زیربند ۴-۱۵) را به سیستم تعویض آنیونی HPLC-ICP-MS تزریق و برای رسم منحنی کالیبراسیون، سطح زیر پیک را برای هریک از نقاط کالیبراسیون محاسبه کنید.

۶-۳-۳ اندازه گیری محلول های شاهد و نمونه

حجم مناسبی از محلول خالص واکنش گر و محلول های نمونه‌ی مورد آزمون (طبق زیربند ۶-۲) را در دستگاه HPLC-ICP-MS تعویض آنیونی تزریق و سطح زیر پیک‌ها را بر اساس تنظیمات متناسب با HPLC-ICP-MS، مانند آنچه شده در جدول ۱ نوشته شده است، تعیین کنید. محلول های نمونه ای که نتایجی خارج از گستره‌ی خطی کالیبراسیون می‌دهند، باید به شکل مناسب با محلول استخراجی ۱ (طبق زیربند ۴-۴) رقیق شوند تا نتایج آنها در گستره‌ی خطی کالیبراسیون قرار بگیرد. چنانچه مقادیر قابل توجهی از آرسنیک در نمونه شاهد مشاهده شد، باید دلیل آن شناسایی و حذف گردد و آزمون ها دوباره تکرار شود، اگر مقدار آرسنیک شاهد ثابت و غیر قابل حذف بود، باید مقدار آن را از نتایج به دست آمده کسر کرد. (زیر بند ۷-۳ را ببینید).

۶-۳-۴ توالی HPLC

کنترل پایداری میزان حساسیت تجهیز را در طول اجرای آزمون انجام دهید. حساسیت تجهیز را به طور مثال با آزمایش یک محلول استاندارد کالیبراسیون در میان توالی خوانش (مثلاً هر ۵ تا ۱۰ خوانش) کنترل کنید. اگر نیاز بود از نتایج برای کالیبراسیون مجدد^۱ سیستم استفاده کنید. راهکار دیگر استفاده از استاندارد داخلی (به عنوان مثال ژرمانیوم) به صورت یک ستون اضافی^۲ (به وسیله‌ی T-Split) و استفاده از سیگنال آن برای تصحیح انحراف دستگاهی^۳ (در صورت وجود) در طول آزمون است.

۶-۳-۵ تنظیمات عمومی HPLC-ICP-MS

در جدول ۱، مثالی از تنظیمات معمول تجهیزات HPLC-ICP-MS فهرست شده است، همچنین منبع [۴] کتابنامه را نیز مشاهده کنید.

1 -Recalibration
2 -Post- column
3- Instrument drift

جدول ۱- مثالی از تنظیمات عمومی تجهیزات HPLC-ICP-MS

تنظیمات ICPMS	پارامتر
مدل Agilent 7 500ce	ICP-MS
۱۵۰۰	توان RF (w)
۱/۲	جریان گاز حامل (l min^{-1})
۱۵	جریان گاز پلاسما (l min^{-1})
۱/۰	جریان گاز کمکی (l min^{-1})
۰/۸ تا ۰/۶	دقت جرمی (amu)
۱۰۰۰	زمان ادغام (ms)
۷۵ (As)، ۳۵ (Cl)	ایزوتوپ‌های نمایش داده شده (m/z)
تنظیمات HPLC	پارامتر
مدل Agilent 1 100	HPLC
یون‌پک AS7 (250 mm×2mm)	ستون
۰/۱۵	سرعت جریان فاز متحرک (ml min^{-1})
دمای اتاق	دمای ستون
۵۰	فشار عملیاتی (bar)
۵	حجم تزریقی (μl)
دمای اتاق	دمای نمونه‌گیر خودکار (اتوسمپلر)
۱۵	زمان اندازه‌گیری (دقیقه)

۴-۶ کنترل کیفیت

به عنوان یک مورد کنترل تجزیه ای^۱، برای بررسی درستی^۲ باید نمونه‌های مرجعی که دارای مقادیر مشخصی از آرسنیک معدنی هستند را به موازات هر سری از نمونه‌های مورد ارزیابی، آنالیز کرد. تمامی مراحل آزمون، یعنی از مرحله‌ی استخراج با حمام آب، باید روی نمونه‌های مرجع اعمال گردد. این مورد باید برای تهیه‌ی محلول شاهد نیز مورد توجه قرار گیرد. اگر نمونه‌های مرجع در دسترس نباشند، باید آزمایشات موسوم به اسپایک^۳ انجام شود و از درصد بازیابی برای ارزیابی درستی نتایج، استفاده کرد. توصیه می‌شود اثرات حافظه نیز به عنوان مثال با بررسی محلول‌های شاهد پس از مواد مرجع، بررسی شود. اکسیداسیون آرسنیت به آرسنات باید با انجام آزمایش‌های بازیابی با اسپایک کردن^۴ مقدار مشخصی از آرسنیت به نمونه، در مرحله‌ی استخراج تأیید شود. اگر این اکسیداسیون کامل نیست، باید مقدار نمونه کاهش یابد، و یا محلول هیدروژن پراکسید (طبق زیربند ۳-۴) به منظور بررسی تخریب آن، بررسی شود.

1-Analytical control

2-Trueness

3 -Spike

4 -Spiking

۷ محاسبات

۷-۱ ادغام پیک‌ها

زمان بازداری آرسنات با آنالیز محلول‌های کالیبراسیون قابل شناسایی است. سطح زیر پیک آرسنات در محلول‌های استاندارد، واکنشگر خالص و محلول‌های نمونه استخراجی تعیین می‌شود.

۷-۲ آرسنیک معدنی در محلول‌های آزمون

غلظت آرسنیک معدنی در محلول‌های آزمون با استفاده از تابع کالیبراسیون حاصل از رگرسیون خطی منحنی کالیبراسیون محاسبه می‌شود.

۷-۳ محاسبه آرسنیک معدنی در نمونه‌ها

کسر جرمی w آرسنیک معدنی بر حسب میلی گرم بر کیلوگرم نمونه از فرمول ۱ قابل محاسبه است:

$$w = \frac{\rho \times V \times F}{m} \quad (1)$$

که در آن:

ρ	غلظت جرمی آرسنیک معدنی در محلول آزمون نمونه، بر حسب میکروگرم بر لیتر؛
V	حجم محلول استخراجی برای استخراج حمام آب (معمولاً ۱۰/۰)، بر حسب لیتر؛
m	جرم نمونه آزمون، بر حسب گرم؛
F	فاکتور رقت

اگر نمونه قبل از آزمایش خشک شود، نتایج باید برای محتوای رطوبت تصحیح شود.

غلظت جرمی آرسنیک معدنی در محلول شاهد، باید کم‌ترین مقدار ممکن باشد (زیر بند ۳-۳-۶ را ببینید). اگر غلظت آرسنیک معدنی در نمونه شاهد ثابت و غیر قابل تغییر باشد، مقدار آن باید از ρ کسر شود.

۸ دقت

۸-۱ کلیات

نتایج به دست آمده از آزمون بین آزمایشگاهی در پیوست الف این استاندارد ملی خلاصه شده است. مقادیر به دست آمده از این آزمون بین آزمایشگاهی برای محدوده‌های غلظتی و بافت‌های به جز آن‌چه در پیوست الف ذکر شده کاربرد ندارد. اطلاعات بیشتر در گزارشی روی نتایج و روند آزمون بین آزمایشگاهی در منبع [۱] کتابنامه ارائه شده است.

۸-۲ تکرار پذیری

اختلاف مطلق بین نتایج دو آزمون منفرد مستقل به دست آمده با روش آزمون مشابه روی یک آزمایش یکسان در آزمایشگاه یکسان توسط یک آزمایشگر با استفاده از وسایل یکسان با فاصله زمانی کم، جز در ۵٪ موارد نباید از حد تکرار پذیری R ذکر شده در جدول ۲ فراتر رود.

۸-۳ تجدید پذیری

اختلاف مطلق بین نتایج دو آزمون منفرد به دست آمده با روش آزمون مشابه روی یک آزمایش یکسان در آزمایشگاه های مختلف توسط آزمون کنندگان مختلف با استفاده از تجهیزات مختلف در ۵٪ موارد نباید از حد تجدید پذیری R ذکر شده در جدول ۲ فراتر رود.

جدول ۲ - مقادیر میانگین، حد تکرارپذیری (r) و حد تجدید پذیری (R) برای آرسنیک معدنی در مواد غذایی در

آزمون مشارکتی

ماده غذایی	$\bar{x}$ mg/kg	r mg/kg	R mg/kg
برنج سفید	۰/۰۷۳	۰/۰۱۰	۰/۰۲۲
برنج سبوس دار	۰/۰۴۷	۰/۰۰۳	۰/۰۱۲
تره فرنگی	۰/۰۸۶	۰/۰۱۵	۰/۰۳۳
صدف	۰/۰۳۳	۰/۰۰۶	۰/۰۱۴
ماهی	۰/۰۲۷	۰/۰۰۵	۰/۰۱۱
جلبک دریایی	۱۰/۳	۱/۲	۳/۴

۹ گزارش آزمون

گزارش آزمون دست کم باید حاوی موارد زیر باشد:

- ۹-۱ تمام اطلاعات لازم برای شناسایی کامل نمونه؛
- ۹-۲ روش آزمون به کار رفته و عناصر مشخص تعیین شده طبق این استاندارد ملی؛
- ۹-۳ نتایج به دست آمده و یکپارچگی که نتایج بر حسب آنها گزارش شده اند؛
- ۹-۴ تاریخ نمونه برداری و روش نمونه برداری (اگر معلوم باشد)؛
- ۹-۵ تاریخ انجام آزمون؛
- ۹-۶ همه جزئیات عملیاتی که در این استاندارد مشخص داده نشده است، یا اختیاری بوده است، همراه با جزئیات هرگونه رویدادی که حین اجرای آزمون رخ داده است و ممکن است بر نتایج تأثیرگذار باشد.

پیوست الف
(آگاهی دهنده)
داده های دقت

صحت و دقت روش به وسیله CEN TC 275 "روش جامع آنالیز مواد غذایی" گروه کاری شماره ۱۰ "عناصر و گونه های شیمیایی آنها" در یک آزمون بین آزمایشگاهی بین ۱۳ آزمایشگاه در سال ۲۰۱۳ با ابلاغ حکمی توسط کمیته EU بر طبق استاندارد بین المللی ISO 7525-2 انجام شد. (منبع [۵] کتابنامه را ببینید)

یادآوری - استاندارد ملی ۷۴۴۲-۲ بر اساس منبع فوق تدوین شده است.

شرکت کنندگان شش نمونه ماده غذایی متفاوت را (در دو تکرار) آزمون کرده اند. جزئیات بیشتر این مطالعه در گزارشی از آزمون بین آزمایشگاهی آورد شده است (منبع [۱] کتابنامه را ببینید).

جدول الف-۱ - داده های دقت

پارامتر	برنج سفید	برنج سیوس-دار	تره فرنگی	صدف آبی	(عضله) ماهی	جلبک دریایی
تعداد آزمایشگاه ها	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳
تعداد آزمایشگاه پس از حذف آزمایشگاه های با نتایج دور افتاده	۱۳	۱۲	۱۲	۱۳	۱۳	۱۳
تعداد آزمایشگاه با نتایج دور افتاده	۰	۱	۱	۰	۰	۰
مقدار میانگین $\bar{x}$ (mg/kg)	۰/۰۷۳	۰/۴۷	۰/۰۸۶	۰/۳۳	۰/۲۷	۱۰/۳
حد تکرار پذیری r (mg/kg)	۰/۰۱۰	۰/۰۲۵	۰/۰۱۵	۰/۰۵۷	۰/۰۴۹	۱/۲
انحراف استاندارد تکرار پذیری S_r (mg/kg)	۰/۰۰۳۶	۰/۰۰۹۰	۰/۰۰۵۴	۰/۰۲۰	۰/۰۱۷	۰/۴۴
RSD_r (%)	۴/۹	۱/۹	۶/۳	۶/۲	۶/۳	۳/۴
حد تجدید پذیری R (mg/kg)	۰/۰۲۲	۰/۱۲	۰/۰۳۳	۰/۱۴	۰/۱۱	۳/۴
انحراف استاندارد تجدید پذیری S_R (mg/kg)	۰/۰۰۸	۰/۰۴۳	۰/۰۱۲	۰/۰۴۹	۰/۰۳۸	۱/۲
RSD_R (%)	۱۱/۰	۹/۱	۱۳/۸	۱۴/۹	۱۳/۸	۱۱/۸
مقدار Horwits مطابق با Horwits [۶]	۲۳/۵۴	۱۷/۷۹	۲۲/۹۵	۱۸/۷۹	۱۹/۲۹	۱۱/۲۰
مقدار HorRat مطابق با Horwits [۶]	۰/۴۷	۰/۵۱	۰/۶۰	۰/۷۹	۰/۷۲	۱/۰۵
مقدار Horwits مطابق با Thompson [۷]	۲۲/۰۰	۱۷/۹۲	۲۲/۰۰	۱۸/۹۳	۱۹/۴۳	۱۱/۲۶
مقدار Horwits مطابق با Thompson [۷]	۰/۵۰	۰/۵۱	۰/۶۳	۰/۷۹	۰/۷۱	۱/۰۴

پیوست ب

(آگاهی دهنده)

اطلاعات در مورد شرایط کروماتوگرافی

ستون های تعویض یونی قوی (SAX) زیر توسط شرکت کنندگان در بررسی مشارکتی استفاده شده است.

- Ion Pac AS7
- IC Pep Ion 120
- HAMILTON PRP-X100

استفاده از یک ستون محافظ برای حفاظت و افزایش طول عمر ستون تجزیه ای توصیه می شود. دستورالعمل های تولید کنندگان ستون هنگام تنظیم شرایط کروماتوگرافی مانند دما، جریان فاز متحرک و حجم تزریق را دنبال کنید.

شرکت کنندگان در بررسی مشارکتی به طور معمول غلظت فاز متحرک در محدوده بین ۲۰ mmol/l تا ۵۰ mmol/l برای دستیابی به جداسازی قابل قبول پیک آرسنات از سایر ترکیبات آرسنیک استفاده کردند.

کتابنامه

- [1] SLOTH J.J. Determination of inorganic arsenic in foodstuffs of marine and plant origin by HPLCICPMS – results from a collaborative trial, 2014, http://www.food.dtu.dk/english/-/media/Institututter/Foedevareinstitutttet/Publikationer/Pub-2015/Report_on_Collaborative_Trial-Foodstuffs.ashx
- [2] LARSEN E.H., STÜRUP S. Carbon-enhanced Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection of Arsenic and Selenium and Its Application to Arsenic Speciation. J. Anal. At. Spectrom. 1994, 9 pp. 1099–1105
- [3] FRANCESCONI K.A., TANGGAARD R., MCKENZIE C.J., GOESSLER S. Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. Clin. Chem. 2002, 48 p. 539
- [4] EN ISO IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025)
- [5] ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
- [6] HORWITZ W., ALBERT R. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. J. AOAC Int. 2006, 89 pp. 1095–1109
- [7] THOMPSON M. Recent Trends in Inter-Laboratory Precision at ppb and sub-ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing. Analyst (Lond.). 2000, 125 pp. 385–386