اندازه گيري هيدروكربن هاي آروماتيك چند حلقه اي در بافت چرب فك درياي خزر

عباس اسماعيلي ساري[1]*، محمد پيري[2]، لاله اسماعيلي[3]

۱- استادیار گروه محیط زیست دانشکده منابع طبیعي، دانشگاه تربیت مدرس، تلفن:۳-۱۰۱-۶۲۵۳۱۰۱-۰۱۲۲
۲- استادیار مؤسسه تحقیقات شیلات
۳- دانش آموخته کارشناسي ارشد آلودگي دریا

چکیده

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای از ترکیبات خطرناک و آلاینده زیست محیطی به شمار می‌روند که اختصاراً PAHs نامیده می شوند. این ترکیبات از قابلیت انباشتگی زیستی در بافت چرب موجودات زنده از طریق زنجیرهٔ غذایی برخوردارند. فک دریای خزر تنها گونه بسیار با ارزش و منحصر بفرد دریای خزر است که در سالهای اخیر متحمل صدمات زیادی ناشی از صید بی رویه، تلفات ناشی از CDV و همچنین آلودگیهای زیست محیطی شده است و به همین جهت فهرست گونه‌های حفاظت شده قرار دارد. در این تحقیق حاضر ترکیبات PAHs در بافت چرب به روش ROPME و استخراج n– هگزان مورد شناسایی کیفی وبا استفاده از دستگاه اسپکتروفتولومینسانس اندازه‌گیری کمی گردید. حاصل نتایج وجود ترکیبات نفتالین، آنتراسن و فنانترن را دربافت های چرب فک دریای خزر تأیید می‌کند.

کلیدواژگان: فک دریای خزر، ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای، آنتراسن، فنانترن، نفتالین

۱- مقدمه

هیدروکربن های چند حلقه‌ای معطر (PAHs) از عوامل آلاینده و خطرناک محیط زیست به شمار می روند که عمدتاً بر اثر سوخت ناقص ترکیبات فسیلی یا پیرولیز ترکیبات آلی در مراحل مختلف پالایش تولید می شود، ترکیبات PAHs به دلیل پتانسیل بالای سمی و سرطانزایی درانسان از اهمیت ویژه‌ای برخودارند[۱]. این آلاینده‌ها قادرند بر اثر ریزش مستقیم نزولات آسمانی یا جریان‌های سطحی وارد دریاها و محیطهای آبی شوند. رسوبات رودخانه ها ودریاها بزرگترین انبار ترکیبات PAHs بوده و به عنوان منبع دائمی این ترکیبات آلاینده برای آبزیان محسوب شوند. این ترکیبات قادرند ازطریق زنجیره غذایی وارد بدن انسان شوند و به مرور زمان تجمع یافته وپس از آنکه به غلظت مشخصی رسیدند ایجاد مشکلات متعددی از جمله سرطان نمایند[۲].

فک دریای خزرتنها پستانداری است که در آخرین حلقهٔ زنجیرهٔ غذایی دریای خزر قرار داشته ودر فهرست قرمز IUCN به عنوان موجودات آسیب پذیرطبقه بندی شده است. به دلیل منحصر به فرد بودن این جاندار از اهمیت زیست محیطی زیادی برخوردار است. هدف از انجام دادن این پروژه شناسایی ترکیبات PAHs دربافت چرب این گونه می باشد. در این تحقیق از روش استاندارد ROPME، برای شناسایی کیفی از دستگاه طیف GC-MS و برای اندازه‌گیری کمی از اسپکتروفتولومینسانس استفاده شده است(جدول۱).

Archive of SID
www.SID.ir

۲- مواد و روشها

برای مطالعه ترکیبات PAHs در این تحقیق از بافت هـای چـرب زیـر پوسـتی و همچنـین از کبـد فـک دریـای خـزر اسـتفاده شد(شکل۱و۲). تجزیه آزمایـشگاهی در مرکـز تحقیقـات محـیط زیست تهران با روش ROPME طی مراحل زیر صورت گرفت.

۲-۱- مرحله فریزدرایر

دراین مرحله با استفاده از لام شیشه‌ای نمونه ها را خـرد کـرده و توسط دستگاه فریزدرای خشک می شوند. تغلیظ نمونه‌هـا تـا ۵۰ درصد سبب می شود که در نهایت به بهبود بهتری دست یابیم.

۲-۲- استخراج

استخراج شامل سه مرحله سوکسله، صـابونی شـدن و اسـتخراج مایع- مایع به وسیله قیف جداکننده است. بـه ایـن ترتیـب کـه ۵ گرم از نمونه فریزدرای شده را در تیمبل (کـارتوش) ریختـه وبـا اسـتفاده از ۱٤۰ میلـی لیتـر متـانول، رفلاکـس (تقطیربرگـشتی) صورت می‌گیرد. قبل از شروع عملیات استخراج، نفتالین به عنوان استاندارد درونی به نمونه‌های تیمبل اضافه شـد. عمـل رفلاکـس دوبار و هـر بـار بـه مـدت ۸ سـاعت انجـام شـد. بعـد از عمـل رفلاکس، ۲۰ میلی لیتر محلول ۰/۷ مـولار KOH و۳۰ میلـی لیتـر آب به فلاسک اضافه گردید و استخراج به مدت ۲ سـاعت ادامـه یافت. سپس محتویات فلاسک استخراج به داخل قیف جداکننده منتقل و طی ۳ مرحله (ابتدا با ۹۰ میلی لیتر n- هگزان ودوبـار بـا ۵۰ میلی لیتر n- هگزان) صورت پذیرفت.

در خاتمه هگزان های سه مرحله را با هم مخلـوط و پـس از عبور از صافی پشم شیشه با سولفات سدیم (آنهیدراز) آب‌گیری و با استفاده از روتاری (تقطیر در خلأ تا حجم ۱۰ml) تغلیظ شد.

۲-۳- خالص سازي

دراین مرحله نمونه های استخراج شده بایدخالص شوند. تمام مواد نفتی که تولید نور فلورسنت می کنند یا موادی که مانع ایجاد فلورسنت به وسیلهٔ هیدروکربن ها می شوند، باید حذف گردنـد. خالص سازی نمونه به شرح زیر انجام شد.

ابتدا ژل سیلیکا و آلومینا به وسیله دستگاه سوکسله به مدت ۸ ساعت با متانول وسپس n- هگزان اسـتخراج و در آون ٦۰°C بـه منظور حذف حلال، خشک گردید؛ سـرانجام در آون ۲۰۰°C بـه مدت ٤ ساعت برای فعال شـدن قرارگرفـت. بـرای تهیـه سـتون کروماتوگرافی از یک بورت ۵۰ میلی لیتری استفاده شد که در تـه آن یک تکه پشم شیشه (به منظور نگهداری موادی که بعداً اضافه می شود) قـرار داده شـد. سـپس ۱۰ میلـی لیتـر سـیلیکاژل و۱۰ میلی‌لیتر آلومینا ویک گرم سولفات سدیم به آن اضافه شد.

۲-٤- جداسازي ترکیبات

بـا وارد سـاختن نمونـه از نـوک سـتون دو بخـش متمـایز در آن تشکیل شد؛ بخش اول نمونه حاصل از شویش بـا ۲۰ میلـی‌لیتـر هگزان و شامل آلیفاتیک های اشباع وبخش دوم نمونه حاصـل از شویش با ۳۰ میلی لیتر مخلوط هگـزان ودی کلرومتـان و شـامل آلیفاتیک های غیر اشباع و هیدروکربن های آروماتیک (حلقـوی) است. به این ترتیب نمونه ها بـرای تزریـق بـه دسـتگاه GC-MS بـرای شناسـایی کیفـی و دسـتگاه اسپکتروفتولومینـسانس بـرای شناسایی کمی آماده شد بر اساس فهرست EPA شـانزده ترکیـب خطرناک PAHs (جدول۱) مورد بررسی قرار گرفت.

این تحقیق بـا اسـتفاده از دسـتگاه GC-MS مـدل-HP 6890 Mass HP 5973 و اینجکتور از نوع Automatic Split / Splitless و سـتون HP5ms وگـاز حامـل هلیـوم ۹۹/۹۹۹ درصـد و کروماتوگراف یا ثبات Hp-Ce انجام شد؛ شرایط دستگاه دردمـای اینجکتور٢٤°C و دمـای دتکتـور شـامل محفظـه یـونش°C ۳۲ و آنالیزور جرمی ۱۵۰°C با سرعت گاز حامل ۱ میلی لیتر بر دقیقـه بود.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱ فهرست EPA

1) NAPHTHALENE	Nph
2) ACENAPHTENE	Acs
FLUORENE	Fl
PHENANTHRENE	Phe
ANTHRACENE	An
FLUORANTHENE	Fl
PYRENE	Py
BENZ(A)ANTHRACENE	B(a)A
CHRYSENE	Chy
BENZO(e)PYRENE	B(e)Py
BENZO(e)FLUORANTHENE	B(b)Fl
BENZO(k)FLUORANTHENE	B(k)Fl
BENZO(a)PYRENE	B(e)Py
DIBENZ(a,h)ANTHRACENE	Dib(a,h)A
BENZO(ghi)PERYLENE	B(ghi)Per
INDENO(1,2,3-cd)PYRENE	Py I(1,2,3-cd)

۲-۵- آنالیزکمي PHAs

بهره گیری از اسپکترفتومتری فلوئورسانس برای اندازه گیری ترکیبات PAHs به عنوان روش مؤثر و نسبتاً ساده شناخته شده است. این روش بعد از تغلیظ و جداسازی به وسیله ستون کروماتوگرافی به کارمی رود [۳].

ازآنجا که تمام PAHs دارای حداقل دوحلقه فلوئورسانس کننده است، لذا به سادگی غلظت آنها در آب به وسیلهٔ اسپکتروفتومترفلوئورسانس قابل تعیین می باشد.

این روش به وسیلهٔ ROPME و ASTM(D4763) برای آنالیز PAHs توصیه شده است. پس از استخراج PAHs به روش ROPME محلول تغلیظ شده را درسطل مخصوص دستگاه اسپکتروفتومترلومینسانس[1] وارد و مقدار جذب ترکیبات (PAHs) را قرائت و به کمک منحنی استانداردی نفت خام جدید (ROPME 1999) غلظت PAHs بر حسب میکروگرم برگرم وزن خشک نمونه محاسبه گردید. نتایج در جدول ۱ درج شده است.

1. Luminescence Spectrophotometer ls-s Perkin Elmer

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲ مشخصات فک های مورد مطالعه

	کد	وزن (Kg)	تاریخ	جنسیت	منطقه	وزن نمونه (گرم)	آب (گرم)	درصد آب
بافت چرب	۱	۳۰	۸۰/۳/۱۰	نر	انزلی	۳۳/۵۵۱	۸/۵۵۵	۲۵/٤
بافت چرب	۳	٤٦	۸۰/۲/٦	نر	چابکسر	۵۷/۸۵۵	۱٦/۳۷٤	۲۸/۳
بافت چرب	۷	۲٤	۸۰/۳/۷	نر	امیرآبادلنگرود	٤۵/۲۱۰	۱٦/۷۹۵	۳۷/۱
بافت چرب(فهوه‌اي)	٦	۲٤	۸۰/۳/۷	نر	امیرآبادلنگرود	٤۱/۸۱۸	٦/۲۸۲	۱۵/۰
کبد	۲	۳۰	۸۰/۳/۱۰	نر	انزلی	۷٤/۳۰۳	٤۹/٤۷۳	٦٦/۵
کبد	٤	۲٤	۸۰/۳/۷	نر	امیرآبادلنگرود	٦۵/۵۳۲	۳۷/۹۰۱	۵۷/۸
کبد	۸	٤٦	۸۰/۲/٦	نر	چابکسر	۳۷/٤٦٤	۲۰/۳۲۷	۵٤/۲

۳- نتایج

کروماتوگرام GC به دست آمده مربوط به نمونه ها شامل تعداد زیادی پیک می باشد (شکل‌های ۳ تا۱۱) هر کدام از پیک‌ها طیف جرمی مربوط به خود را داشتند که به وسیلهٔ دستگاه MS ارائه شده است. تعداد زیادی از پیک‌ها ترکیبات PAHs را نشان می دهد. مهم ترین ترکیبات شناسایی شده:

۱ و۲- دی هیدرونفتالین، ۱۰ و۹- دی کلروآنتراسن؛٤ و۱- دی متوکسی فنانترن می باشند. به طور خلاصه نتایج طیف های GC-MS به شرح زیر است:

شکل ۳: شناسایی شانزده ترکیب PAHs (مخلوط استاندارد) را در دستگاه GC-MS نشان می دهد.

شکل ٤: پس از افزودن نفتالین به عنوان استاندارد درونی در ابتدا به نمونه و انجام عملیات استخراج، نفتالین در زمان بازداری ۸/۳۳ دقیقه با احتمال ۹۰درصد و بازیافت٤۰درصد شناسایی شد.

شکل 5: در زمان بازداری ۵/٤٤ دقیقه در نمونه کبد با کد شماره دو، بنزن با سطح زیر پیک ۰/۵۸ درصد شناسایی شد.

شکل ٦: در زمان بازداری ۱۰/۰۵ دقیقه در نمونه کبد با کد شماره دو، ۱و۲و۳و٤ تتراهیدرونفتالین با سطح زیر پیک ٦/۸۳ درصد شناسایی شد.

شکل ۷: در زمان بازداری ۱۷/۱۸ دقیقه در نمونه کبد با کد شماره دو، بای فنیل با سطح زیرپیک ۱/٤۰ درصد شناسایی شد.

شکل ۸ : در زمان بازداری ۱۰/۰۳ دقیقه در نمونه بافت چرب فک با کد شماره یک، ۱و۲و۳و٤ تتراهیدرونفتالین با سطح زیرپیک ۲۷/۷۱ درصد شناسایی شد.

شکل ۹: در زمان بازداری ۱۰/۰٤ دقیقه در نمونه بافت چرب با کد شماره هفت، ۱و۲ دی هیدرونفتالین با سطح پیک ۷/۸۰ درصد شناسایی شد.

شکل ۱۰: در زمان بازداری ۱۲/۱۹ دقیقه در نمونه بافت چرب باکبد شماره یک، ۱و۲ دی کلروآنتراسن با سطح زیر پیک ۰/۷٦ درصد شناسایی شد.

شکل ۱۱: نفتالین فقط در n- هگزان حل شده است، با ظهور تنها یک پیک در زمان بازداری ۸/٤۲ دقیقه و با سطح زیر پیک ۱۰۰درصد اطلاعات دستگاه با احتمال ۹۷درصد نفتالین را شناسایی می کند، بنابراین می توان نتیجه گرفت که n- هگزان هیچ گونه ناخالصی مزاحم با ترکیبات PAHs ندارد.

همچنین ترکیبات زیادی در طیف GC-MS مشاهده شده است که تعدادی به عنوان نمونه در شکل۱۰ درج شده است. نتایج حاصل از روش کمی به وسیلهٔ اسپکتروفتولومینسانس در جدول۳ آمده است.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱ نمونه فک در حال بیومتری

شکل ۲ نمونه فک در حال کالبدشکافی

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۳ طیف GC-MS استاندارد

شکل ٤ طیف GC-MS نمونه استاندارد درونی

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۵ نمونه طیف GC-MS بافت چرب فک دریای خزر (بنزن)

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ٦ نمونه طیف GC-MS بافت چرب فک دریای خزر(نفتالین)

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۷ نمونه طیف GC-MS بافت چرب فک دریای خزر(بای فنیل)

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۸ نمونه طیف GC-MS بافت چرب فک دریای خزر(نفتالین)

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۹ نمونه طیف GC-MS بافت چرب فک دریای خزر(نفتالین)

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱۰ نمونه طیف GC-MS بافت چرب فک دریای خزر (آنتراسن)

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱۱ طیف GC-MS نفتالین خالص در حلال n- هگزان

www.SID.ir

جدول ۳ میزان PAHs کل دربافت چرب و کبد

میزان ترکیبات PAHs میکروگرم برگرم وزن خشك		
بافت چرب	کد۱	۱۲/۸
کبد	کد۲	No. peak
بافت چرب	کد۳	No. peak
کبد	کد٤	No. peak
بافت چرب	کد۷	۱۱/۷
کبد	کد٤	No. peak
چربي قهوه اي	کد٦	۳/۲

٤- بحث وپیشنهادات

در بخش شناسایی کیفی در نمونه های آنالیز شده با (GC-MS) مشتقات نفتالین (۱ و۲- هیدرونفتالین)، آنتراسن و فنانترن تشخیص داده شد؛ در بخش اندازه گیری کمی ترکیبات PAHs بیشترین مقادیر در فک های کوچک و کمترین مقدار در فک بزرگتریافت شد. این موارد نتایج تحقیقات سال ۱۹۹۰ جی‌هلاو و همکاران را تأیید می‌کند[٤].

مهره داران سیستم های آنزیمی قوی دارند که در متابولیسم و پاکسازی آلودگی های آلی مانند هیدروکربن ها نقش دارند. در این مطالعه میزان PAHs در بافت چرب بیشتر از کبد است، این نکته وجود سیستم آنزیمی سمیت زدایی سیتوکروم P -٤٥٠ را در فک مورد تأیید قرار می دهد.

مقادیر بدست آمده در این تحقیق در مقایسه با مقادیر و اندازه‌گیری شده در تالاب انزلی (جدول٤) نشان می دهد میزان PAHs در بافت چرب فک دریای خزر بسیار بیشتر از آن در تالاب انزلی است[٥] .

لذا به نظر می رسد منابع آلاینده PAHs در قسمت های شمالی دریای خزر (که زیستگاه اصلی فک در بیشترماههای سال است)، مخصوصاً نواحی ولگا وسواحل باکو وپشته آپشرون فراوانتر از سواحل جنوبی است.

در خاتمه پیشنهاد می شود با همکاری کشورهای منطقه کنترل دائمی آلاینده ها از طریق تشکیل یک سازمان حفاظت منطقه ای در دریای خزر انجام شود.

جدول٤ تعیین PAHs کل در آب تالاب انزلی

PAH(ppb)			
فصل	اسکله سپاه	قسمت مرکزی	اسکله غازیان
پائیز	۱٤۸/۳	۹/۱	۲۰۸
زمستان	۱۳۳	۵/۳	۱۹۵/٤۵

Archive of SID
www.SID.ir

٦- منابع

[1] Coccheri R. A. Arnese and Minicucci, A. M., 1990. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in marine organisms from Italian central Mediterranean coast, Marin. Pollution. Bulletin. 21, 15.

[۲] اسماعیلی ساری، عباس؛ ۱۳۷٦. "اندازه گیری ترکیباتPAHs در نزولات تهران، مجله منابع طبیعی ایران". شماره ۱. جلد ۵۰. ص ۳۲-۲۸.

[3] Fresenius W. Quentin K. E, scheider W., 1988. Water analysis. 533-538.

[4] Hellou J. stenson. G and payen J. F., 1990. Polycylic Aromatic Hydrocarbons in Muscle Tissue of Marine Mammals from the Northwest Ahantic., Marine Pollution Bulletin, 21, 469-473.

[۵] حسنی ضیابری. ابراهیم؛ ۱۳۷۹ "بررسی کیفی هیدروکربن‌های نفتی (PAHs) درآبهای اسکله صیادی تجاری بندر انزلی." پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشکده علوم وفنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

[6] MOOPANM. 1999. Manual of Oceanographic Observation and Pollutant Analyses Methods. Thrid Edition- Kuwait.

Archive of SID

www.SID.ir