

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.012 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 21/10/2017 Trang: 1/13
--	----------------------------------	--

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT
TRONG NƯỚC ĂN UỐNG, NƯỚC NGẦM, NƯỚC MẶT,
NƯỚC THẢI BẰNG HỆ THỐNG SẮC KÝ KHÍ GHÉP KHỐI
PHỔ (GC/MS) VÀ HỆ THỐNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP ĐẦU
DÒ KHỐI PHỔ BA TỬ CỰC (LC/MS/MS).**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
TỪ HIẾU HẬU	DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI	TRẦN THÁI VŨ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	21/10/2017

A. TỔNG QUAN

I. PHẠM VI ÁP DỤNG

Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng thuốc bảo vệ thực vật (TBVTV) (theo danh sách) trong nước ăn uống, nước mặt, nước ngầm, nước thải. Giới hạn phát hiện của phương pháp với nền nước uống, nước mặt, nước ngầm là 0.03 ug/L, với nền nước thải là 1.3 ug/L

Danh sách những chất đánh giá theo bảng sau:

Đối với nước thải:

STT	Hợp chất	Thiết bị phân tích
1	Azinphos-methyl	LC/MS/MS
2	Dimethoat	LC/MS/MS
3	Ethoprophos	LC/MS/MS
4	Mevinphos	LC/MS/MS
5	Phosmet	LC/MS/MS
6	Phosphamidon	LC/MS/MS
7	Trichlorfon	LC/MS/MS
8	4,4-DDE	GC/MS
9	2,4-DDD	GC/MS
10	4,4-DDD	GC/MS
11	Methoxychlor	GC/MS
12	Chlodane{trans}	GC/MS
13	Chlodane{cis}	GC/MS
14	Mirex	GC/MS
15	Trifluralin	GC/MS
16	Alachlor	GC/MS
17	alpha-HCH	GC/MS
18	beta-HCH	GC/MS
19	gamma-BHC	GC/MS
20	delta-HCH	GC/MS

21	Heptaclor	GC/MS
22	Molinate	GC/MS
23	Methaclor	GC/MS
24	Aldrin	GC/MS
25	Endrin	GC/MS
26	Heptachloro epoxide	GC/MS
27	Dieldrin	GC/MS
28	2,4-DDT	GC/MS
29	4-4-DDT	GC/MS
30	2,4-DDE	GC/MS

Đối với nước ăn uống:

STT	Hợp chất	Thiết bị phân tích
1	Alachlor	LC/MS/MS
2	Aldicarb sulfoxide	LC/MS/MS
3	Atrazine	LC/MS/MS
4	Carbofuran	LC/MS/MS
5	Chlortoluron	LC/MS/MS
6	Isoproturon	LC/MS/MS
7	Propanil	LC/MS/MS
8	Simazine	LC/MS/MS
9	2,4,5-T	LC/MS/MS
10	Fenoprop	LC/MS/MS
11	Fenoprop	LC/MS/MS
12	Chlodane{trans}	GC/MS
13	Chlodane{cis}	GC/MS
14	Trifluralin	GC/MS
15	Alachlor	GC/MS

16	alpha-HCH	GC/MS
17	beta-HCH	GC/MS
18	gamma-HCH	GC/MS
19	delta-HCH	GC/MS
20	Heptaclor	GC/MS
21	Molinate	GC/MS
22	Methaclor	GC/MS
23	Permethrin	GC/MS
24	Aldrin	GC/MS
25	Heptachloro epoxide	GC/MS
26	Dieldrin	GC/MS
27	2,4-DDT	GC/MS
28	4-4-DDT	GC/MS
29	Methoxychlor	GC/MS

Đối với nước mặt, nước ngầm:

STT	Hợp chất	Thiết bị phân tích
1	Aldrin	GC/MS
2	Heptachloro	GC/MS
3	Dieldrin	GC/MS
4	2,4-DDT	GC/MS
5	4-4-DDT	GC/MS
6	Heptaclo	GC/MS
7	Benzenhexachlorid e	GC/MS

II. TÀI LIỆU THAM KHẢO

EPA Method 8270D (SW-846): Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS).

METHOD 8081B: Organochlorine pesticides by gas chromatography.

III. NGUYÊN TẮC

Mẫu được chiết trực tiếp với dung môi Dichlometan bằng kỹ thuật chiết lỏng lỏng rồi được làm sạch và phân tích bằng hệ thống sắc ký khí ghép đầu dò khối phổ GCMS và hệ thống sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ LC/MS/MS.

IV. THÔNG TIN AN TOÀN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động phòng thí nghiệm

Sử dụng tủ hút, kính bảo hộ và găng tay khi cần thiết.

Các dung môi hữu cơ và các chất thải như Dichlorometan (DCM), Acetone phải được thu hồi vào các thùng chứa có dán nhãn và lưu giữ như các hóa chất thải độc hại.

B. PHÂN TÍCH

I. THIẾT BỊ VÀ DỤNG CỤ PHÂN TÍCH

1. Dụng cụ và thiết bị cơ bản

Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg,

Máy li tâm 50ml và 15mL

Bình định mức 10 mL

Micropipet các loại 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L

Ống ly tâm 50 mL, 15 mL.

Màng lọc 0.45 μ m, vial và xy lạnh.

Phễu lọc bằng thủy tinh.

Phễu chiết 1L.

Ống đông 1L.

Bếp đun cách thủy.

Bình cầu 100mL.

Pipet 5mL.

2. Thiết bị phân tích

Hệ thống sắc ký khí ghép khối một tứ cực GCMS 5973 hoặc tương đương.

Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ ba tứ cực TSQ7000 hoặc tương đương

II. HÓA CHẤT VÀ CHẤT CHUẨN

1. Hóa chất (hãng J.Backer hoặc tương đương)

Nước cất một lần và nước cất khử ion.

Dung môi Dichlorometan, Acetone, Acetonitril

Muối magie sulfat khan.

Muối natriclorua khan.

Silica gel

2. Chất chuẩn

Các hóa chất chuẩn thuộc BVTV dạng rắn và lỏng của hãng Sigma Aldrich hoặc tương đương.

Dung dịch chuẩn gốc khoảng 1000 mg/kg: Cân chính xác khoảng 10 mg các chất chuẩn vào các bình định mức 10 mL riêng biệt, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetonitril. Lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Khi đó nồng độ chất chuẩn trong dung dịch được tính được theo công thức sau:

$$C = m \cdot 1000 / V \cdot P$$

Trong đó: C là nồng độ chất chuẩn có trong dung dịch (mg/kg).

m là khối lượng cân của chất chuẩn (mg).

V là thể tích định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

Chuẩn hỗn hợp (10 mg/kg): Từ mỗi dung dịch gốc trên (1000 mg/kg) tương ứng lấy 100 μ L cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với Acetonitril.

Chuẩn hỗn hợp (1 mg/kg): Rút 1 mL từ hỗn hợp chuẩn 10 mg/L ở trên vào bình mức 10 mL, định mức tới vạch bằng Acetonitril.

- Định tính: Chạy một điểm chuẩn so sánh

- Định lượng: Pha các dung dịch dãy chuẩn có nồng độ theo bảng sau:

Đối với LC/MS/MS

Nồng độ dãy chuẩn (µg/kg)	1	2	5	10	20	40
Thể tích dung dịch chuẩn 1mg/kg (mL)	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4
Thể tích định mức 10mL Acetonitril:DI (2:8)	10					

Đối với GC/MS

V (µL) Chuẩn hỗn hợp 1mg/kg	ST 1 (25µg/kg)	ST 2 (50µg/kg)	ST3 (100µg/kg)	ST4 (200µg/kg)	ST5 (400µg/kg)
	25	50	100	200	400
V (µL) IS – apha Lindane (20mg/kg)	20				
V (µL) nền mẫu blank	780				
V (µL) ACN	Đến 1mL				

Bảo quản và lưu trữ:

Các chuẩn rắn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất. Cụ thể có 3 vị trí lưu trữ: chuẩn lưu tủ đông (-18°C), chuẩn lưu tủ mát (8°C) và chuẩn lưu ở nhiệt độ phòng (20°C).

Các dung dịch chuẩn gốc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ lạnh (-18°C), sử dụng trong thời gian 3 năm, theo SANTE/11945/2015

Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc và đường chuẩn sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (8°C), sử dụng trong thời gian 1 tháng,

III. KIỂM SOÁT QA/QC

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích.

Mẫu Blank hóa chất.

Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu blank với nồng độ kiểm soát 0.1 µg/kg đối với nước ngầm, nước uống và 5 µg/kg đối với nước thải.

1. Mẫu blank hóa chất

Phân tích ít nhất một mẫu blank hóa chất trong mỗi lần thực hiện phân tích. Đánh giá kết quả dựa vào giới hạn 0 ± 0.01 µg/kg.

Nếu mẫu blank hóa chất ngoài giới hạn kiểm soát, kiểm tra xem dụng cụ, hoá chất, chất chuẩn có bị nhiễm bẩn không. Nếu bị nhiễm bẩn, làm sạch dụng cụ bằng acetone hoặc metanol. Kiểm tra chất lượng nguồn nước của phòng thí nghiệm. Sử dụng hóa chất và chất chuẩn mới nếu thấy cần thiết.

2. Mẫu thêm chuẩn (QC)

Tiến hành xử lý mẫu QC theo quy trình.

Tính toán độ thu hồi theo phương trình

$$R(\%) = \frac{C_s - C}{S} \times 100$$

Trong đó:

R = Độ thu hồi

C_s = Nồng độ mẫu thêm chuẩn

C = Nồng độ của mẫu nền

S = Nồng độ chất phân tích thêm vào mẫu

IV. XỬ LÝ MẪU

1. Chuẩn bị mẫu

Theo “Hướng dẫn công việc đồng nhất mẫu trong phòng thí nghiệm – HD.KT.022”

2. Phương pháp tiến hành

- Đối với nước ăn uống, nước mặt.

Dùng ống đong 800ml mẫu vào phễu chiết 1L.

Thêm 80 ul chuẩn hỗn hợp thuốc trừ sâu 1mg/kg vào mẫu QC.

Thêm 15g muối NaCL khan, lắc mạnh tan hết muối.

Thực hiện chiết 3 lần với Dichlorometan, gom dịch chiết Dichlorometan lại vào bình cầu.

Cô quay đến cạn, định mức lại bằng 1ml ACN, cho vào vial. Tiêm trực tiếp đối với GC/MS, pha loãng 20 lần bằng DI đối với LC/MS/MS.

- Đối với nước thải

Dùng ống đong 200mL mẫu đã đồng nhất vào phễu chiết 250mL.

Thêm 1ml chuẩn hỗn hợp thuốc trừ sâu 1mg/kg vào mẫu QC

Thêm 3g muối NaCL khan, lắc mạnh tan hết muối.

Thực hiện chiết 3 lần với Dichlorometan, gom dịch chiết Dichlorometan lại vào bình cầu.

Cô quay đến cạn, định mức lại bằng 1ml ACN, chuyển mẫu vào ống ly tâm 15ml có chứa 100mg Silica gel, vortex 30s, ly tâm 3 phút. Lọc mẫu vào vial. Tiêm trực tiếp đối với GC/MS và pha loãng 200 lần bằng DI phân tích trên LC/MS/MS.

V. ĐIỀU KIỆN PHÂN TÍCH

1. Thông số thiết bị

Điều kiện phân tích

GC/MS

Cột DB-5MS (30 m x 0.25mm x 0.25µm)

- Khí mang: Heli

- Chương trình nhiệt: 60 °C (2 phút), tăng 12 °C/phút đến 120 °C (3phút), tăng 12°C/phút đến 220 °C (1 phút).

- Chế độ tiêm: không chia dòng.

- Tốc độ dòng: 2.3 ml/phút ở chế độ đẳng áp P=22.6 PSI tại 90 °C.

- Nhiệt độ buồng tiêm: 220 °C.

- Nhiệt độ transferline: 220 °C.

LC/MS/MS

Cột XDB C18 (150 x 4.6mm, kích thước hạt 5µm).

Pha động: methanol (0.1% acidformic) và H₂O(0.1% acidformic+0.1%amonia).

Tốc độ dòng: 0.3ml/phút

Thể tích tiêm 20µL

Điều kiện MS

GC/MS

- Column: HP5-MS: 30x0.25m, 0.5µm

- Nguồn ion hóa: EI , nhiệt độ 220 °C

- Dòng phát xạ: 34.6 µA

- Chế độ: SIM

Hợp chất	Ion 1	Ion 2	Ion 3
@ 2,4-DDD	235	237	165
@ 2,4-DDE	248	249	182
@ 2,4-DDT	237	165	246
@ 4,4-DDD	235	237	165
@ 4,4-DDE	246	248	176
@ 4-4-DDT	237	165	246
@ Aldrin	263	293	265
@ alpha-HCH	219	181	183
@ beta-HCH	219	181	183
@ Chlodane{cis}	373	375	377
@ Chlodane{trans}	373	375	377
@ delta-HCH	219	181	183
@ Dieldrin	263	277	279
@ Endrin	263	261	265
@ Endrin aldehyde	345	279	250
@ Endrin ketone	317	281	319
@ gama-HCH (Lindane)	219	181	183
@ Heptachlor	272	274	337
@ Heptachloro epoxide	353	355	351
@ Hexachlorobenzene	284	286	282
@ Methoxychlor	227	228	152
α-HCH-D6 (IS)	224	222	

Trifluralin	306	280	284
Permethrin	183	163	165

LC/MS/MS

Nguồn ion hóa: ESI(+)

Nhiệt độ capillary: 350°C

Sheath gas: 40 psi , Aux gas: 4 abs

Spray voltage: 4.0kV

CID gas: 1.5mT

STT	Hợp chất	Ion mẹ	Ion con 1	Colision Energy	Ion con 2	Colision Energy
1	Alachlor	271.1	162.1	20	238.1	11
2	Aldicarb sulfoxide	207.0	89.0	14	132.0	10
3	Atrazine	216.1	174.1	18	96.1	23
4	Carbofuran	222.1	165.1	16	123.0	16
5	Chlortoluron	213.0	72.0	18	46.0	16
6	Isoproturon	207.0	72.0	22	47.0	16
7	Propanil	217.9	161.9	16	127.0	22
8	Simazine	202.0	124.0	16	96.0	22
9	Azinphos-methyl	318.0	160.0	8	261.0	8
10	Dimethoat	230.1	125.0	20	199.0	10
11	Ethoprophos	243.2	97.0	31	131.0	20
12	Mevinphos	225.1	127.1	15	193.1	8
13	Phosmet	318.0	160.0	22	77.0	46
14	Phosphamidon	300.1	174.1	14	127.1	25
15	Trichlorfon	257.0	109.0	18	79.0	30

3. Trình tự của quá trình tiêu mẫu trên thiết bị phân tích.

Dung môi trắng → Các chuẩn có nồng độ từ thấp tới cao → Dung môi trắng → Mẫu cần kiểm nghiệm → Mẫu thêm chuẩn → Chuẩn kiểm tra.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ

Xây dựng các đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỷ lệ diện tích của chuẩn và nội chuẩn so với tỷ lệ nồng độ của chuẩn và nội chuẩn

Hàm lượng chất phân tích trong mẫu được tính toán theo công thức:

$$C = \left(\frac{C_0 \times V_{\text{extract}}}{m} \times f \right)$$

C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/kg. (ppb)

C₀: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, µg/kg

V_{extract}: thể tích dịch chiết

f: hệ số pha loãng

m: khối lượng cân, g

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với R² ≥ 0.99

Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.

Tỷ số ion.

Cường độ tương đối của ion định tính phải nằm trong khoảng cho phép.

Cường độ tương đối (so với ion định lượng)	Sai số cho phép
>50%	±20%
20-50%	±25%
10%-20%	±30%
<10%	±50%

Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart): Giá trị hiệu suất thu hồi được ghi nhận nồng độ của các chất: Dimethoat, Phosmet, Atrazine, Carbofuran vào control chart sau mỗi lô mẫu

phân tích thực tế ở mức spike 0.1 µg/kg đối với nước uống, nước mặt. 5 µg/kg đối với nước thải.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu: BM.15.04a