

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.236 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 1/11
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT
TRONG ĐẤT BẰNG HỆ THỐNG SẮC KÝ KHÍ GHEP KHỐI
PHỔ (GC/MS) VÀ HỆ THỐNG SẮC KÝ LÔNG GHEP KHỐI
PHỔ BA TỬ CỰC (LC/MS/MS).**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
LA THỊ TRÂM	DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI	TRẦN THÁI VŨ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1			
2			
3			

A. TỔNG QUAN

I. PHẠM VI ÁP DỤNG

Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) (theo danh sách) trong đất. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 3 µg/kg.

XS TT	Hợp chất	Họ	Thiết bị
1	Altrazine	Triazine	LC/MS/MS
2	Benthioacrb	Carbamate	LC/MS/MS
3	Dimethoate	Organophosphorus	LC/MS/MS
4	Fenobucarb	Carbamate	LC/MS/MS
5	Fenoxaprop-ethyl	Organophosphorus	LC/MS/MS
6	Isoprothiolane	Nodata	LC/MS/MS
7	Methamidophos	Organophosphorus	LC/MS/MS
8	Metolachlor	Nodata	LC/MS/MS
9	Monoprotophos	Organophosphorus	LC/MS/MS
10	Phosphamidone	Organophosphorus	LC/MS/MS
11	Simazine	Triazine	LC/MS/MS
12	Trichlorfon	Organophosphorus	LC/MS/MS
13	Cypermethrin	Pyrethroid	GC/MS
14	Diazinon	Organophosphorus	GC/MS
15	Aldrin	Organochlorine	GC/MS
16	Chlordan	Organochlorine	GC/MS
17	DDT	Organochlorine	GC/MS
18	Dieldrin	Organochlorine	GC/MS
19	Endosulfan	Organochlorine	GC/MS
20	Endrin	Organochlorine	GC/MS
21	Heptachlor	Organochlorine	GC/MS
22	Hexachlorobenzene	Organochlorine	GC/MS
23	Lindane	Organochlorine	GC/MS
24	Captan	Organochlorine	GC/MS

II. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- ✓ QCVN 15:2008/BTNMT - Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về dư lượng hoá chất bảo vệ thực vật trong đất
- ✓ EPA Method 8270D (SW-846): Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS).
- ✓ METHOD 8081B: Organochlorine pesticides by gas chromatography.
- ✓ EPA 536: Determination of triazine pesticides and their degradates in drinking water by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS)
- ✓ SANTE/11945/2015: Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed

III. NGUYÊN TẮC

Mẫu được chiết trực tiếp với dung môi Dichlometan:Acetone bằng kỹ thuật siêu âm rồi làm sạch chiết pha rắn phân tán với Silica. Phân tích trên 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.

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

Nước cất một lần và nước cất khử ion.

Dung môi Acetone, Acetonitril, Dichlorometan hãng J.Backer hoặc tương đương.

Muối magie sulfat khan của Trung Quốc

Hỗn hợp muối Cleanup: Cân 150mg MgSO₄ và 150mg Silica vào ống ly tâm 15ml.

2. Chất chuẩn

Các chất chuẩn HCBVTV dạng rắn và lỏng của hãng Sigma Aldrich hoặc tương đương.

Nội chuẩn Carbendazim-D3, nội chuẩn alpha Lindane-D6 (α -HCH-D6), chuẩn surrogate Triphenylphosphate (TPP) của Sigma Aldrich hoặc tương đương

Dung dịch chuẩn gốc 1000mg/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:

$$C(mg/L) = \frac{m(mg) \times 1000}{V(ml)} \times P$$

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

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

V là thể tích định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

Chuẩn Carbendazim được cân và tính toán nồng độ tương tự nhưng hòa tan trong dung môi Dimethylformamide 0.1% acid formic.

Nội chuẩn alpha Lindane-D6 (α -HCH-D6), chuẩn surrogate: Triphenylphosphate (TPP) được pha và tính toán nồng độ tương tự như trên.

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.

Dung dịch nội chuẩn α -HCH-D6 10 mg/kg. Từ dung dịch gốc (1000 mg/L) rút 100 μ L cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với Acetonitril.

Dung dịch hỗn hợp surrogate TPP 20 mg/L, Carbendazim-D₃ 2mg/L (SS). Rút 200 μ L TPP 1000mg/L và 20 μ L Carbendazim-D₃ 1000mg/L vào bình định mức 10mL. Sau đó định mức lại bằng Acetonitril

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

Đối với LC/MS/MS

Nồng độ dãy chuẩn (μ g/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

SS + CB-D3 20 mg/kg (mL)	0.02
Acetonitril:DI (2:8)	Định mức 10 ml

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) SS - CB-D3 (20mg/kg - 2mg/kg)	10				
V (μL) IS – apha Lindane (20mg/kg)	20				
V (μL) nền mẫu blank	570				
V (μL) ACN	375	350	300	200	0

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 (-18⁰C), chuẩn lưu tủ mát (8⁰C) và chuẩn lưu ở nhiệt độ phòng (20⁰C).

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 (-18⁰C), 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 (2-8⁰C), sử dụng trong thời gian 6 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 matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.

Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu blank với nồng độ kiểm soát 10 µg/kg.

1. Mẫu Blank matrix:

Mẫu blank không phát hiện chất phân tích hoặc phát hiện ở nồng độ nhỏ hơn LOD

2. Mẫu thêm chuẩn (QC)

Tiến hành xử lý mẫu blank theo quy trình.

Nồng độ chuẩn thêm vào ở mức 0.010 mg/kg, khoảng 10 mẫu thông thường thì thực hiện kèm theo 1 mẫu QC.

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 của chất phân tích thêm vào mẫu

IV. XỬ LÝ MẪU

Cân 30g ± 0.03g mẫu đã đồng nhất vào cốc 400mL.

Mẫu QC: Thêm 0.3 mL chuẩn hỗn hợp thuốc trừ sâu 1mg/kg.

Thêm 100mL dung môi Dichlorometan:Acetone (1:1). Đậy cốc lại bằng Farafin. Siêu âm 15mL

Thực hiện 3 lần, gom dịch chiết lại vào bình cầu. Cô quay đến cạn, định mức lại bằng 3ml ACN.

Chuyển toàn bộ dịch chiết qua ống muối cleanup, vortex 30s, ly tâm 3000 vòng 3 phút.

Lọc vào vial. Tiêm trực tiếp với GC/MS và pha loãng 10 lần bằng DI đối với LC/MS/MS.

V. 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 (3 phút), 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 C18 (150 x 4.6mm, 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

- Nguồn ion hóa: EI , nhiệt độ 220 °C

- Dòng phát xạ: 34.6 μ A

- Chế độ: SIM

Hợp chất	Ion 1	Ion 2	Ion 3	Ion 4
Alpha lindane -D6	222	224	121.6	
TPP	326	325		
Cypermethrin	181	163	165	208
Diazinon	179	199	304	276
Aldrin	66	293	263	329
Chlordan	373	307	375	371
DDT	237	165	235	236
Dieldrin	263	79	81	277
Endosulfan	241	339	195	243
Endrin	263	281	81	345
Heptachlor	100	274	272	337
Hexachlorobenzene	284	286	282	288
Lindane	181	219	183	217
Captan	79	264	149	80

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

Hợp chất	Ion mẹ	Ion định lượng	Collision Energy	Ion định tính	CE
Altrazine	216.1	96.1	23	174.1	18
Benthioacrb	258.07	100.2	15	125	18
Dimethoate	230.1	125	20	199	10
Fenobucarb	208	94.9	14	152	8
Fenoxaprop-ethyl	362.13	121.1	25	288.08	20
Isoprothiolane	291.1	188.8	22	230.9	12
Methamidophos	142	93.9	13	124.9	13
Metolachlor	284.1	176.1	25	252.1	15
Monoprotophos	224.1	98.1	12	127.1	16

Phosphamidone	300.1	127.1	25	174.1	14
Simazine	202	96	22	124	16
Trichlorfon	257	79	30	109	18
CB-D3	195.1	132	30	160.18	18
TPP	327	77	60	152	60

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

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 (GC-EI/MS)	Sai số cho phép (LC/MS/MS)
>50%	±20%	30%
20-50%	±25%	

10%-20%	$\pm 30\%$	
<10%	$\pm 50\%$	

Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart):
 Giá trị hiệu suất thu hồi được ghi nhận vào control chart sau mỗi lô mẫu phân tích thực tế ở mức spike 0.01 mg/kg.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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