

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.275 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 1/7
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG BENZO(a)PYRENE,
BENZO(e)PYRENE TRONG THỦY HẢI SẢN BẰNG HỆ
THỐNG SẮC KÝ KHÍ GHÉP KHỐI PHỔ (GC/MS)**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
LA THỊ TRẦM	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			
4			
5			
6			
7			

A. TỔNG QUAN

I. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng benzo(a)pyrene, benzo(e)pyrene trong thủy hải sản. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 5 µg/kg.

II. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- AOAC official method 2007.01: AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate

III. NGUYÊN TẮC

- Mẫu sau khi được đồng nhất sẽ được chiết với acetonitril/đệm acetate và magie sulfat. Dịch chiết được làm sạch và được xác định trên GC/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 Acetonitril (ACN), 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 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL
- Ống ly tâm 50 mL, 15 mL.
- Màng lọc 0.45µm, vial và xy lạnh.
- Phễu lọc bằng thủy tinh.
- Phễu chiết 1L.

- Ống đong 1L.
- 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.

II. HÓA CHẤT VÀ CHẤT CHUẨN

1. Hóa chất

- Nước cất khử ion (nước DI)
- Acetonitrile (ACN), Acid acetic của Fisher hoặc tương đương
- 1% Acid acetic trong Acetonitrile: Pha 40 ml Acid acetic vào 4 L Acetonitrile.
- Hỗn hợp muối QuEChERS: Cân 4g muối $MgSO_4$ và 1g muối CH_3COONa vào ống ly tâm 50 ml.
- Hỗn hợp muối clean up: Cân 150mg $MgSO_4$ và 50mg C18 vào ống ly tâm 15 ml.

2. Chất chuẩn

- Chất chuẩn Benzo(a)pyrene, Benzo(e)pyrene, Anthracene-D10 của hãng Sigma Aldrich hoặc tương đương.
- Các dung dịch chuẩn Benzo(a)pyrene, Benzo(e)pyrene 1000 mg/kg: cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn rắn vào bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetone. 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 (%).

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp Benzo(a)pyrene, Benzo(e)pyrene 100 mg/kg:
Rút 1mL của các dung dịch chuẩn 1000 mg/kg ở trên vào bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetone.
- Dung dịch chuẩn hỗn hợp Benzo(a)pyrene, Benzo(e)pyrene 10 mg/kg:
Rút 1mL của các dung dịch chuẩn 100 mg/kg ở trên vào bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetone.
- Dung dịch chuẩn hỗn hợp Benzo(a)pyrene, Benzo(e)pyrene 1 mg/kg:
Rút 1mL của dung dịch chuẩn 10 mg/kg ở trên vào bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetone.
- Nội chuẩn Anthracene-D10 500 mg/kg: cân chính xác khoảng 5 mg chuẩn rắn vào bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetone. Công thức tính toán như trên.
- Dung dịch Anthracene-D10 10 mg/L: Rút 0.2mL dung dịch nội chuẩn gốc cho vào bình định mức 10mL, định mức đến vạch bằng acetone.

Đường chuẩn

	ST1 (100µg/kg)	ST2 (500µg/kg)	ST3 (1000µg/kg)	ST4 (2000µg/kg)	ST5 (4000µg/kg)
V (µL) Chuẩn 100 mg/kg	10	50	100	200	400
V(µL) IS 10 mg/kg	20				
V (µL) ACN	Định mức đến 10 mL				

- Bảo quản và lưu trữ:
 - o Các chuẩn rắn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất.

- o 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 1 năm.
- o 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 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 hóa chất.
- Mẫu Blank matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.
- Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu

IV. PHÂN TÍCH MẪU

1. XỬ LÝ MẪU

- Cân 15 ± 0.1 g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL
- Thêm 10 mL nước DI, vortex trong 2 phút, để yên khoảng 20 phút.
- Thêm 15 mL 1% Acetic acid/ACN, lắc mạnh trong 5 phút.
- Thêm tiếp vào 5g hỗn hợp muối QuEChERS (4g MgSO_4 và 1g CH_3COONa), lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm 3000 vòng /phút trong 5 phút.
- Làm sạch dịch chiết: Rút 13 mL dịch chiết cho vào ống ly tâm 50 mL đã chứa sẵn 2.8 g hỗn hợp muối 150 mg MgSO_4 khan + 0.05 g bột C 18 , vortex 1-2 phút, ly tâm 3000 vòng /phút (3-5 phút).
- Rút 8 mL dịch chiết sau khi ly tâm vào bình cầu, cô quay đến khô. Định mức lại bằng 0.8 mL ACN, vortex kỹ, lọc vào vial qua màng lọc $0.45 \mu\text{m}$. Phân tích trên GC/MS.

2. Điều kiện phân tích

a. GC

- Cột DB-5MS (30 m x 0.25mm x $0.25 \mu\text{m}$)

- Khí mang: Heli
- Chương trình nhiệt: 120 °C (1 phút), tăng 20 °C/phút đến 320 °C (8phút), 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.

b. Điều kiện MS

- 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	Ion 4
Benzo(a)pyrene	252	250	253	251
Benzo(e)pyrene	252	250	253	251
Anthracene-D10	188	189	184	186

3. Trình tự của quá trình tiêm 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 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:

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

- o C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/kg.
- o C₀: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, µg/kg
- o V_{extract}: thể tích dịch chiết
- o f: hệ số pha loãng
- o m: khối lượng cân, g

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với $R^2 \geq 0.99$
- 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%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu: BM.15.04a và BM.15.06