**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 TỨ 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 |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

1. **TỔNG QUAN**

### 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 | Benzenhexachloride | 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 đươc 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.

1. **PHÂN TÍCH**

### Thiết bị và dụng cụ phân tích

## 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 lanh.

Phễu lọc bằng thủy tinh.

Phễu chiết 1L.

Ống đong 1L.

Bếp đun cách thủy.

Bình cầu 100mL.

Pipet 5mL.

## 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

### 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 thuốc 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\*1000 / V\*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 tính 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 µL 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 | ST1 (25µg/kg) | ST2 (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 (-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 (80C), sử dụng trong thời gian 1 tháng,

### 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 aceton 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



Trong đó:

R = Độ thu hồi

Cs = Nồng độ mẫu thêm chuẩn

C= Nồng độ của mẫu nền

S= Nồng độ chất phân tích thêm vào mẫu

### XỬ LÝ MẪU

1. Chuẩn bị mẫu

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

1. 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 loăng 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 loăng 200 lần bằng DI phân tích trên LC/MS/MS.

### ĐIỀU KIỆN PHÂN TÍCH

## 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 0C (2 phút), tăng 12 0C/phút đến 120 0C (3phút), tăng 120C/phút đến 220 0C (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 0C.

- Nhiệt độ buồng tiêm: 220 0C.

- Nhiệt độ transferline: 220 0C.

*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, 0.5um

- Nguồn ion hóa: EI , nhiệt độ 220 0C

- 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: 350oC

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 |

## 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.

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

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

Vextract: thể tích dịch chiết

f: hệ số pha loãng

m: khối lượng cân, g

1. **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 đọ 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.

1. **BÁO CÁO KẾT QUẢ.**

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