**ĐỊNH LƯỢNG ĐA DƯ LƯỢNG**

**HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT TRONG RAU QUẢ**

**BẰNG SẮC KÝ LỎNG ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA TỨ CỰC VÀ SẮC KÝ KHÍ ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ (LC/MS/MS - GC/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** | Mục A. I  Phạm vi áp dụng | Bổ sung chỉ tiêu được đánh giá | 01/03/2018 |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

1. **TỔNG QUAN**
2. **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 rau quả. Quy trình xác nhận giá trị sử dụng tham khảo theo SANTE/11945/2015. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0.01 mg/kg và giới hạn định lượng là 0.03 mg/kg.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Hợp chất** | **Phân loại nhóm HCBVTV** | **Thiết bị phân tích** |
| 1 | @ 2,4-DDD | Organochlorine | GC/MS |
| 2 | @ 2,4-DDE | Organochlorine | GC/MS |
| 3 | @ 2,4-DDT | Organochlorine | GC/MS |
| 4 | @ 4,4-DDD | Organochlorine | GC/MS |
| 5 | @ 4,4-DDE | Organochlorine | GC/MS |
| 6 | @ 4-4-DDT | Organochlorine | GC/MS |
| 7 | @ Aldrin | Organochlorine | GC/MS |
| 8 | @ alpha-HCH | Organochlorine | GC/MS |
| 9 | @ beta-HCH | Organochlorine | GC/MS |
| 10 | @ Chlodane{cis} | Organochlorine | GC/MS |
| 11 | @ Chlodane{trans} | Organochlorine | GC/MS |
| 12 | @ Chlorobenzilate | Organochlorine | GC/MS |
| 13 | @ delta-HCH | Organochlorine | GC/MS |
| 14 | @ Dieldrin | Organochlorine | GC/MS |
| 15 | @ Endosulfan I | Organochlorine | GC/MS |
| 16 | @ Endosulfan II | Organochlorine | GC/MS |
| 17 | @ Endosulfan sulfate | Organochlorine | GC/MS |
| 18 | @ Endrin | Organochlorine | GC/MS |
| 19 | @ Endrin aldehyde | Organochlorine | GC/MS |
| 20 | @ Endrin ketone | Organochlorine | GC/MS |
| 21 | @ gama-HCH (Lindane) | Organochlorine | GC/MS |
| 22 | @ Heptachlor | Organochlorine | GC/MS |
| 23 | @ Heptachloro epoxide | Organochlorine | GC/MS |
| 24 | @ Hexachlorobenzene | Organochlorine | GC/MS |
| 25 | @ Methoxychlor | Organochlorine | GC/MS |
| 26 | 2 Phenylphenol | No data | GC/MS |
| 27 | 6-Benzylaminopurin (6-BAP) | Cytokinin | LC/MS/MS |
| 28 | Acephate | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 29 | Acetamiprid | Neonicotinoid | LC/MS/MS |
| 30 | Altrazine | Triazine | LC/MS/MS |
| 31 | Azinphos-methyl | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 32 | Azoxystrobin | Strobilurin | LC/MS/MS |
| 33 | Benalaxyl | Acylalanine | LC/MS/MS |
| 34 | Bendiocarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 35 | Benthiocarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 36 | Bifenthrine | Pyrethroids | GC/MS |
| 37 | Bitertanol | Triazole | LC/MS/MS |
| 38 | Boscalid | Pyridinecarboxamide | LC/MS/MS |
| 39 | Bromuconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 40 | Buprofezin | Thiadiazin | GC/MS |
| 41 | Cadusafos | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 42 | Carbaryl | Carbamate | LC/MS/MS |
| 43 | Carbendazim | Benzimidazole | LC/MS/MS |
| 44 | Carbofuran | Carbamate | LC/MS/MS |
| 45 | Chlorfenvinfos | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 46 | Chlorothalonil | Chloronitrile | GC/MS |
| 47 | Chlorpropham | Carbamate | LC/MS/MS |
| 48 | Chlorpyrifos | Organophosphorus | GC/MS |
| 49 | Chlorpyrifos methyl | Organophosphorus | GC/MS |
| 50 | Clothianidin | Neonicotinoid | LC/MS/MS |
| 51 | Coumaphos | Organophosphorus | GC/MS |
| 52 | Cyfluthrine | Pyrethroids | GC/MS |
| 53 | Cypermethrine | Pyrethroids | GC/MS |
| 54 | Cyproconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 55 | Cyprodinil | Anilinopyrimidine | LC/MS/MS |
| 56 | Cyromazine | Triazine | LC/MS/MS |
| 57 | Deltamethrine | Pyrethroids | GC/MS |
| 58 | Diazinon | Organophosphorus | GC/MS |
| 59 | Dichlorvos | Organophosphorus | GC/MS |
| 60 | Difenoconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 61 | Dimethenamid | Chloroacetamide | LC/MS/MS |
| 62 | Dimethoate | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 63 | Dimethomorph | Cinnamic acid | LC/MS/MS |
| 64 | Diniconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 65 | Dinotefuran | Neonicotinoid | LC/MS/MS |
| 66 | Diphenylamine | No data | LC/MS/MS |
| 67 | Disulfoton | Organophosphorus | GC/MS |
| 68 | Epoxiconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 69 | Ethiofencarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 70 | Ethion | Organophosphorus | GC/MS |
| 71 | Ethofenprox | Organophosphorus | GC/MS |
| 72 | Ethoprophos | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 73 | Ethoxyquin | Quinoline | LC/MS/MS |
| 74 | Fenamidone | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 75 | Fenamiphos | Organophosphorus | GC/MS |
| 76 | Fenarimol | Pyrimidine | LC/MS/MS |
| 77 | Fenbuconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 78 | Fenchlorphos(Ronnel) | Organophosphorus | GC/MS |
| 79 | Fenhexamid | Hydroxyanilide | LC/MS/MS |
| 80 | Fenitrothion | Organophosphorus | GC/MS |
| 81 | Fenobucarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 82 | Fenoxaprop-ethyl | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 83 | Fenpropathrin | Pyrethroids | GC/MS |
| 84 | Fenpropimorph | Morpholine | LC/MS/MS |
| 85 | Fenthion | Organophosphorus | GC/MS |
| 86 | Fenvalerate | Pyrethroids | GC/MS |
| 87 | Fipronil | Phenylpyrazole | GC/MS |
| 88 | Flucythrinate | Pyrethroids | GC/MS |
| 89 | Fludioxonil | Phenylpyrrole | GC/MS |
| 90 | Fluopicolide | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 91 | Fluopyram | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 92 | Flusilazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 93 | Flutolanil | Oxathiin | LC/MS/MS |
| 94 | Flutriafol | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 95 | Fluxapyroxad | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 96 | Folpet | Phthalimide | LC/MS/MS |
| 97 | Hexaconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 98 | Imazalil | Imidazole | LC/MS/MS |
| 99 | Imidacloprid | Neonicotinoid | LC/MS/MS |
| 100 | Indoxacarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 101 | Iprodione | Dicarboximide | GC/MS |
| 102 | Iprovalicarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 103 | Isofenphos - oxon | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 104 | Isoprocarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 105 | Isoprothiolan | No data | LC/MS/MS |
| 106 | Isopyrazam | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 107 | Kresoxim methyl | Strobilurin | LC/MS/MS |
| 108 | Lambda-Cyhalothrin | Pyrethroids | GC/MS |
| 109 | Malathion | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 110 | Mandipropamid | No data | LC/MS/MS |
| 111 | Mecarbam | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 112 | Metalaxyl | Acylalanine | GC/MS |
| 113 | Methacrifos | Organophosphorus | GC/MS |
| 114 | Methidathion | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 115 | Methiocarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 116 | Methomyl | Oxime carbamate | LC/MS/MS |
| 117 | Methoxyfenozide | Diacylhydrazine | LC/MS/MS |
| 118 | Metrafenone | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 119 | Molinate | Thiocarbamate | GC/MS |
| 120 | Myclobutanil | Triazole | LC/MS/MS |
| 121 | Omethoate | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 122 | Paclobutrazol | Triazole | LC/MS/MS |
| 123 | Parathion ethyl | Organophosphorus | GC/MS |
| 124 | Parathion methyl | Organophosphorus | GC/MS |
| 125 | Penconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 126 | Penthiopyrad | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 127 | Permethrin | Pyrethroids | GC/MS |
| 128 | Phenthoate | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 129 | Phosalone | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 130 | Phosmet | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 131 | Phosphamidon | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 132 | Phoxim | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 133 | Piperonyl butoxide | No data | LC/MS/MS |
| 134 | Pirimicarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 135 | Pirimiphos - ethyl | Organophosphorus | GC/MS |
| 136 | Pirimiphos - methyl | Organophosphorus | GC/MS |
| 137 | Procloraz | No data | LC/MS/MS |
| 138 | Profenofos | Organophosphorus | GC/MS |
| 139 | Propamocarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 140 | Propiconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 141 | Propoxur | Carbamate | LC/MS/MS |
| 142 | Prothiofos | Organophosphorus | GC/MS |
| 143 | Pyraclostrobin | Strobilurin | LC/MS/MS |
| 144 | Pyrazophos | Organophosphorus | GC/MS |
| 145 | Pyrimethanil | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 146 | Quinalphos | Organophosphorus | GC/MS |
| 147 | Quintozene | Organochlorine | GC/MS |
| 148 | Resmethrine | Pyrethroids | GC/MS |
| 149 | Sedaxane | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 150 | Spinetoram | No data | LC/MS/MS |
| 151 | SpinosadA | No data | LC/MS/MS |
| 152 | SpinosadD | No data | LC/MS/MS |
| 153 | Spirotetramat | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 154 | Sulfoxaflor | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 155 | Tau-Fluvalinate | Pyrethroids | GC/MS |
| 156 | Tebuconazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 157 | Terbufos | Organophosphorus | GC/MS |
| 158 | Tetrachlorvinphos | Organophosphorus | GC/MS |
| 159 | Thiabendazole | Benzimidazole | LC/MS/MS |
| 160 | Thiacloprid | Neonicotinoid | LC/MS/MS |
| 161 | Thiamethoxame | Neonicotinoid | LC/MS/MS |
| 162 | Thiodicarb | Carbamate | LC/MS/MS |
| 163 | Thiophanate-methyl | Benzimidazole | LC/MS/MS |
| 164 | Triadimefon | Triazole | LC/MS/MS |
| 165 | Triadimenol | Triazole | LC/MS/MS |
| 166 | Triazophos | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 167 | Trichlorfon | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 168 | Trichloronat | Organophosphorus | GC/MS |
| 169 | Tricyclazole | Reductase | LC/MS/MS |
| 170 | Trifloxystrobin | Strobilurin | LC/MS/MS |
| 171 | Trifluralin | No data | GC/MS |
| 172 | Triticonazole | Triazole | LC/MS/MS |
| 173 | Vamidothion | Organophosphorus | LC/MS/MS |
| 174 | Vinclozolin | Dicarboximide | GC/MS |

1. **Tài liệu tham khảo.**
2. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate; AOAC Official Method 2007.01
3. ISO/IEC 17025:2005, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
4. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANTE/11945/2015.
5. **Nguyên tắc.**

Phương pháp này dựa trên quá trình chiết HCBVTV từ nền mẫu rau quả lên dung môi hữu cơ Acetonitril (ACN), sử dụng hỗn hợp muối QuEChERS. Sau đó mẫu được phân tích trên thiết bị sắc ký khí đầu dò MS (GC/MS) và sắc kí lỏng cột C-18, đầu dò MS (LC/MS/MS). Nồng độ HCBVTV được tính toán trực tiếp từ sắc kí đồ thông qua diện tích hoặc chiều cao peak so với dung dịch chuẩn.

1. **Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.**
2. Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động trong phòng thí nghiệm.
3. Báo cáo tất cả các vấn đề gây tổn thương tới con người và các sự cố gây đổ vỡ hóa chất.
4. Dung môi hữu cơ ACN, và các chất thải từ pha động chạy máy sau khi phân tích được thu hồi vào trong thùng chứa có dán nhãn và lưu giữ chúng như các chất thải độc hại.
5. **PHÂN TÍCH**
6. **Thiết bị và dụng cụ phân tích.**
7. Thiết bị cơ bản.

* Pipet thủy tinh (thể tích 5±0.1 mL và 10±0.1 mL)
* Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg,
* Máy ly tâm cho ống 50ml và 15mL
* Bình định mức 10 mL
* Micropipet các loại 20 µL, 200 µL, 1000 µL.
* Pipet các loại 1 mL, 2 mL, 5mL, 10 mL.
* Ống ly tâm 50 mL, 15 mL.
* Màng lọc 0.45µm, vial và xylanh.

1. Thiết bị phân tích

* Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ ba tứ cực TSQ Quantum Ultra hoặc tương đương.
* Hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ một tứ cực GC 6890 – MS 5973 hoặc tương đương.

1. **Hoá chất và chất chuẩn.**
2. Hoá chất.

* **Hỗn hợp muối QuEChERS:** Cân 4g muối MgSO4 và 1g muối CH3COONa vào ống ly tâm 50 ml.
* **Hỗn hợp muối clean up:** Cân 150mg MgSO4 và 50mg PSA vào ống ly tâm 15 ml.
* **Dung dịch chiết ACN (1% acetic acid):** Pha 40 ml acetic acid vào 4L dung môi ACN

1. Chất chuẩn.

***a. Chuẩn gốc:***

* Các hóa chất chuẩn HCBVTV dạng rắn và lỏng từ chuẩn của 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
* 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).

***b. Dung dịch chuẩn gốc***

* Dung dịch chuẩn gốc các chất HCBVTV: Cân chính xác khoảng 10 mg các chất chuẩn thuộc các họ nói trên vào các bình định mức 10 mL riêng biệt, hoà tan bằng Acetonitril 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:

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 tính định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

* Nội chuẩn Carbendazim-D3, alpha Lindane-D6 (α-HCH-D6) và chuẩn Triphenylphosphate (TPP) được pha và tính toán nồng độ tương tự như dung dịch chuẩn gốc HCBVTV.
* Bảo quản và lưu trữ theo SANTE/11945/2015: 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.

***c. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc***

* Tất cả các dung dịch chuẩn làm việc đều được pha trong dung môi ACN tinh khiết phân tích.
* Chuẩn hỗn hợp (10 mg/L): Từ mỗi dung dịch gốc trên (1000 mg/L) tương ứng lấy 100 µL cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với Acetonitril. Chuẩn hỗn hợp được pha theo các họ HCBVTV.
* Hỗn hợp chuẩn 10 mg/L HCBVTV nhóm Pyrethroids.
* Hỗn hợp chuẩn 10 mg/L HCBVTV nhóm Organophosphorus
* Hỗn hợp chuẩn 10 mg/L HCBVTV nhóm Carbamat
* Hỗn hợp chuẩn 10 mg/L HCBVTV nhóm Organochlor
* Hỗn hợp chuẩn 10 mg/L HCBVTV nhóm Acylalanine, Benzimidazol, Phenylpyrazole, Pyridinecarboxamide, Strobilurin, Reductase, Triazole, Triazine.
* Chuẩn hỗn hợp (1 mg/L): Rút 1.00 mL mỗi loại 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/L. Từ dung dịch gốc (1000 mg/L) rút 100 µL 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 µL TPP 1000mg/L và 20 µL Carbendazim-D3 1000mg/L vào bình định mức 10mL. Sau đó định mức lại bằng Acetonitril
* Bảo quản và lưu trữ theo SANTE/11945/2015: Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc 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 năm.
* Pha dãy chuẩn làm việc:
  + Định tính: Sử dụng 1 điểm chuẩn ở hàm lượng LOQ để định tính các mẫu không phát hiện HCBVTV
  + Định lượng:

LC/MS/MS: Pha các điểm chuẩn có nồng độ 1µg/L, 2 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L trong dung môi ACN-DI (2-8).

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nồng độ dãy chuẩn (µg/L ) | 1.0 | 2.0 | 5.0 | 10.0 | 20.0 | 40 |
| Thể tích TPP 20mg/L(µl) | 20 | | | | | |
| Thể tích chuẩn làm việc 1mg/L (µl) | 10 | 20 | 50 | 100 | 200 | 400 |
| Thể tích định mức (ml) ACN-DI | 10ml | | | | | |

GC/MS : Pha các điểm chuẩn có nồng độ 10 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L, 200 µg/L trong nền mẫu rau, trái cây thích hợp không phát hiện HCBVTV theo bảng sau:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| V (μL)  Chuẩn hỗn hợp 1mg/L | ST1 (10µg/L) | ST2 (25µg/L) | ST3 (50µg/L) | | ST4 (100µg/L) | | ST5 (200µg/L) | |
| 10 | 25 | 50 | | 100 | | 200 | |
| V (μL)  SS - CB-D3  (20mg/L - 2mg/L) | 10 | | | | | | | |
| V (μL)  IS – apha Lindane (20mg/L) | 20 | | | | | | | |
| V (μL) nền mẫu rau | 770 | | | | | | | |
| V (μL) ACN | 190 | 175 | | 150 | | 100 | | 0 |

* Bảo quản và lưu trữ: Dãy chuẩn làm việc 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 3 tháng.
* Khoảng tuyến tính của đường chuẩn : Đường chuẩn sau khi lập phải có R2 nằm trong khoảng từ 0.99-1.00.

***Ghi chú :***

* Nếu đường chuẩn không đạt được độ tuyến tính R2 từ 0.99-1.00 thì kiểm nghiệm viên phải pha lại đường chuẩn.
* Nếu mẫu có nồng độ cao hơn đường chuẩn thì phải pha loãng mẫu để nồng độ mẫu nằm trong đường chuẩn.

1. **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: 0.01 mg/kg

**a. Mẫu Blank matrix:** Mẫu blank rau quả không phát hiện chất phân tích hoặc phát hiện ở nồng độ nhỏ hơn LOD

**b. Mẫu thêm chuẩn (QC)**

* + Phân tích 01 mẫu thêm chuẩn với nồng độ thêm là 0.01 mg/kg sau khi phân tích 20 mẫu hoặc một mẻ mẫu. Mẫu thêm chuẩn được thực hiện cùng lúc với lô mẫu phân tích.
  + 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 của 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”

1. **Phương pháp tiến hành.**

* Cân 10 ± 0.1 g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL, thêm 100 µL chuẩn SS 20 mg/L.
* Mẫu QC-spike: Thêm 100 µL dung dịch chuẩn HCBVTV nồng độ 1mg/L vào mẫu blank để kiểm soát hiệu suất thu hồi.
* Bổ sung từ 2 – 5 mL nước cất trong trường hợp mẫu có ít nước hoặc sệt, vortex 15-30 giây). Nếu mẫu chứa 80% hàm lượng nước thì bỏ qua bước này.
* Thêm vào 10 mL ACN (1% CH3COOH), đậy nắp, lắc mạnh trong 1 phút.
* Thêm tiếp vào hỗn hợp MgSO4 (4 ± 0.2 g) và CH3COONa (1 ± 0.05 g), lắc mạnh trong 1 phút, ly tâm 3000 vòng /phút trong 5 phút.
* Làm sạch dịch chiết: Rút 1.5 mL dịch chiết thô ACN cho vào ống ly tâm 15 mL chứa sẵn hỗn hợp muối 225 mg MgSO4 khan + 75 mg bột PSA , vortex 1-2 phút, ly tâm 3000 vòng /phút (3-5phút).
* Dịch chiết sạch sau ly tâm được chia thành 2 phần:

+ Xác định trên GC/MS: Rút 490 µl dịch chiết vào vial có chứa sẵn 10 µl nội chuẩn α-HCH-D6 10 mg/L.

+ Xác định trên LC/MS/MS: Rút 200 µL dịch chiết cho vào ống ly tâm 15mL, thêm 800 µL nước cất khử ion, vortex 10-15 giây, lọc mẫu qua màng lọc 0.45 µm vào vial 2 mL.

**V. Phân tích**

1. **Thông số thiết bị**

* Điều kiện LC/MS/MS
  1. **Điều kiện LC**
* Cột C-18 (150 x 2.1 mm, 5μm)
* Pha động: methanol (0.1% HCOOH) và H2O khử ion (0.1% HCOONH4)
* Tốc độ dòng: 350 µl/phút
* Thể tích tiêm 20µL

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Thời gian, phút** | **H2O (0.1 %HCOONH4) %** | **MeOH (0.1 % HCOOH) %** |
| 0 | 90 | 10 |
| 1.5 | 90 | 10 |
| 5 | 20 | 80 |
| 8 | 10 | 90 |
| 9 |  | 100 |
| 11 |  | 100 |
| 11.5 | 90 | 10 |
| 13 | 90 | 10 |

* 1. **Điều kiện MS**

- Nguồn ion hóa: ESI+

- Chế độ: SRM

- Ion định tính, định lượng

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Hợp chất | Ion mẹ  m/z | Ion định lượng m/z | Ion định tính m/z |
| Acetamiprid | 223 | 126 | 56.1 |
| Atrazine | 216.1 | 174.1 | 96.1 |
| Azoxystrobin | 404 | 372 | 329 |
| Benalaxyl | 326.1 | 148 | 91 |
| Bitertanol | 338.1 | 70.1 | 99.1 |
| Boscalid | 342.9 | 307 | 139.9 |
| Bromuconazole | 376 | 158.9 | 70.1 |
| Carbendazim | 192.1 | 160.1 | 132.1 |
| Clothianidin | 250 | 169 | 132 |
| Cyproconazole | 292.2 | 70.2 | 125.1 |
| Difenoconazole | 406 | 251.1 | 111.1 |
| Diniconazole | 326.1 | 70.2 | 159 |
| Epoxiconazole | 330 | 121 | 101 |
| Fenbuconazole | 337 | 70.1 | 125 |
| Flusilazole | 316 | 247 | 165 |
| Imidacloprid | 256.1 | 175.1 | 209.1 |
| Kresoxim-methyl | 314.1 | 116 | 206 |
| Myclobutanil | 289.1 | 70.2 | 125.1 |
| Paclobutrazol | 294.1 | 125.1 | 70.2 |
| Phosalone | 367.9 | 181.9 | 110.9 |
| Phosphamidon | 300.1 | 174.1 | 127.1 |
| Propiconazole | 342 | 69 | 159 |
| Pyraclostrobin | 388.1 | 163 | 193.9 |
| Pyrazophos | 374 | 222.1 | 194 |
| Tebuconazole | 308 | 70.1 | 125 |
| Thiabendazole | 202 | 175 | 131 |
| Thiamethoxam | 292 | 211.2 | 132 |
| Thiophanate-methyl | 343 | 151 | 93 |
| Triadimefon | 294.1 | 69.3 | 197.2 |
| Triadimenol | 296.1 | 70.2 | 99.1 |
| Triazophos | 314.1 | 161.9 | 118.9 |
| Tricyclazole | 190 | 163 | 136 |
| Trifloxystrobin | 409 | 186 | 145 |
| Triticonazole | 318.1 | 70.1 | 124.9 |
| Acephate | 184.1 | 143.0 | 125.1 |
| Atrazine | 216.1 | 174.1 | 96.1 |
| Bendiocarb | 224.1 | 167 | 109 |
| Cadusafos | 271.1 | 159.0 | 131.0 |
| Carbaryl | 202.0 | 145.0 | 117.0 |
| Carbofuran | 222.1 | 165.1 | 123.0 |
| Chlorpropham | 214.1 | 172.0 | 154.0 |
| Cyprodinil | 226.0 | 93.0 | 108.0 |
| Cyromazine | 167.0 | 60.2 | 108.1 |
| Dimethenamid | 276.0 | 244.0 | 168.0 |
| Dimethoate | 230.1 | 125.0 | 199.0 |
| Dimethomorph | 388.1 | 300.9 | 165.0 |
| Diphenylamine | 170.0 | 93.0 | 92.0 |
| Ethiofencarb | 226.1 | 107.0 | 164.0 |
| Ethoprophos | 243.2 | 97.0 | 131.0 |
| Ethoxyquin | 218.2 | 148.1 | 160.1 |
| Fenarimol | 331.0 | 268.0 | 81.0 |
| Fenhexamid | 302.1 | 97.2 | 55.3 |
| Fenobucarb | 208.0 | 94.9 | 152.0 |
| Fenoxaprop-ethyl | 362.1 | 288.1 | 121.1 |
| Fenpropimorph | 304.2 | 147.1 | 57.2 |
| Flutolanil | 324.1 | 262.1 | 65.0 |
| Hexaconazole | 314.0 | 70.1 | 159.0 |
| Imazalil | 297.0 | 159.0 | 69.0 |
| Indoxacarb | 528.0 | 150.0 | 203.0 |
| Iprovalicarb | 321.1 | 119.1 | 203.1 |
| Isoprocarb | 194.1 | 95.1 | 137.1 |
| Malathion | 331.0 | 127.0 | 99.0 |
| Mecarbam | 330.0 | 227.1 | 97.0 |
| Methidathion | 303.0 | 85.1 | 145.0 |
| Methiocarb | 226.0 | 121.0 | 169.0 |
| Methomyl | 163.0 | 88.0 | 106.0 |
| Methoxyfenozide | 369.1 | 149.1 | 313.2 |
| Omethoate | 214.1 | 125.1 | 183.1 |
| Penconazole | 284.0 | 70.1 | 159.0 |
| Phenthoate | 321.0 | 163.0 | 135.0 |
| Phosmet | 318.0 | 160.0 | 77.0 |
| Piperonyl butoxide | 356.3 | 176.9 | 119.0 |
| Pirimicarb | 239.1 | 72.0 | 182.1 |
| Procloraz | 376.0 | 307.1 | 70.1 |
| Propamocarb | 189.1 | 102.0 | 144.0 |
| Propoxur | 210.0 | 111.0 | 168.0 |
| SpinosadA | 732.6 | 142.0 | 98.1 |
| SpinosadD | 746.5 | 142.0 | 98.1 |
| Tebufenozide | 353.1 | 133.0 | 297.1 |
| Thiacloprid | 253.0 | 126.0 | 90.1 |
| Thiodicarb | 355.0 | 87.9 | 107.9 |
| Trichlorfon | 257.0 | 109.0 | 79.0 |

* Điều kiện GC/MS

## Điều kiện GC

- Cột HP-5MS (30 m x 0.25mm x 0.25μm)

- Khí mang: Heli

- Chương trình nhiệt: 90 0C ( 2 phút), tăng 25 0C/phút đến 150 0C ( 0 phút), tăng 30C/phút đến 200 0C (0 phút), tăng 8 0C/phút đến 280 0C (11 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: 280 0C

- Nhiệt độ transferline: 280 0C

## Điều kiện MS

- Nguồn ion hóa: EI , nhiệt độ 230 0C

- Dòng phát xạ: 34.6 µA

- Chế độ: SIM

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Hợp chất** | **Ion định lượng** | **Ion định tính** | | |
|
| @ 2,4-DDD | 235 | 237 | 165 |  |
| @ 2,4-DDE | 248 | 249 | 182 | 154 |
| @ 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 |  |
| @ Chlorobenzilate | 251 | 253 | 139 |  |
| @ delta-HCH | 219 | 181 | 183 |  |
| @ Dieldrin | 263 | 277 | 279 |  |
| @ Endosulfan I | 241 | 237 | 195 |  |
| @ Endosulfan II | 241 | 159 | 195 |  |
| @ Endosulfan sulfate | 272 | 274 | 387 |  |
| @ 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 |  |
| 2 Phenylphenol | 170 | 169 | 171 |  |
| Benalaxyl | 148 | 91 | 206 | 204 |
| Bifenthrine | 181 | 166 | 165 |  |
| Chlorothalonil | 266 | 264 | 268 |  |
| Chlorpyrifos | 314 | 316 | 197 |  |
| Chlorpyrifos methyl | 286 | 288 | 125 |  |
| Coumaphos | 362 | 364 | 226 |  |
| Cyfluthrine | 226 | 206 | 163 | 165 |
| Cypermethrin | 181 | 163 | 165 | 209 |
| Deltamethrine | 181 | 251 | 253 | 255 |
| Diazinon | 179 | 137 | 304 |  |
| Dichlorvos | 4.96 | 109 | 185 | 79 |
| Disulfoton | 274 | 186 | 153 |  |
| Ethion | 384 | 231 | 153 |  |
| Ethofenprox | 163 | 183 | 376 |  |
| Fenamiphos | 303 | 288 | 154 |  |
| Fenchlorphos(Ronnel) | 285 | 287 | 125 |  |
| Fenitrothion | 277 | 260 | 125 |  |
| Fenpropathrine | 181 | 265 | 97 | 349 |
| Fenthion | 278 | 279 | 280 |  |
| Fenvalerate | 225 | 419 | 167 | 125 |
| Fipronil | 367 | 369 | 213 |  |
| Fipronil | 367 | 369 | 213 | 215 |
| Flucythrinate | 199 | 157 | 181 |  |
| Fludioxonil | 246 | 248 | 176 |  |
| Fluvalinate | 250 | 252 | 181 |  |
| Iprodione | 314 | 316 | 187 |  |
| Lamda-Cyhalthrine | 181 | 197 | 208 |  |
| Metalaxyl | 249 | 206 | 160 |  |
| Methacrifos | 180 | 125 | 240 |  |
| Molinate | 187 | 126 | 98 |  |
| Parathion ethyl | 291 | 139 | 155 |  |
| Parathion methyl | 263 | 109 | 125 |  |
| Permethrin | 183 | 163 | 165 |  |
| Pirimiphos - ethyl | 333 | 318 | 304 |  |
| Pirimiphos - methyl | 277 | 260 | 125 |  |
| Profenofos | 337 | 374 | 339 |  |
| Prothiofos | 267 | 309 | 239 |  |
| Quinalphos | 146 | 157 | 298 |  |
| Quintozene | 295 | 237 | 249 |  |
| Resmethrin | 123 | 171 | 143 | 128 |
| Trìluralin | 306 | 286 |  |  |
| Terbufos | 231 | 288 | 153 |  |
| Tetrachlorvinphos | 331 | 329 | 109 |  |
| TPP (SS) | 326 | 325 |  |  |
| Trichloronat | 297 | 109 | 269 |  |
| Vinclozolin | 212 | 285 | 198 |  |
| α-HCH-D6 (IS) | 224 | 222 |  |  |

1. **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 diện tích của chuẩn với nồng độ chuẩn. Hàm lượng HCBVTV trong mẫu được tính toán theo công thức:

# C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, ng/g (µg/L)

# Co­: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, ng/mL

# Vextract: Thể tích dịch chiết

# f: hệ số pha loãng

# m: khối lượng cân (g) hoặc thể tích mẫu (mL)

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 so với ion định lượng 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% | ± 10% | ± 30% |
| 20-50% | ± 15% | ± 30% |
| 10%-20% | ± 20% | ± 30% |
| <10% | ± 50% | ± 30% |

* Độ lệch của thời gian lưu không quá 2.5% cho LC và 0.5% cho GC
* Độ lệch của dung dich chuẩn kiểm tra không quá 15%
* Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart).

Thực hiện kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích theo SANTE/11945/2015 với 10% số chất trong tổng số các chất HCBVTV ở mức thêm chuẩn 0.01 mg/kg. Giá trị hiệu suất thu hồi các chất đại diện được ghi nhận vào control chart sau mỗi lô mẫu phân tích .

* Các chất thực hiện spike kiểm soát đại diện dành cho GC: Cypermethrin, Permethrin, Cis-chlordan, Diazinon, Chlorpyrifos, Profenofos, Metalaxyl, Fipronil.
* Các chất thực hiện spike kiểm soát đại diện dành cho LC: Fenobucarb, Pirimicarb, Acetamipride, Quinalphos, Triazophos, Azoxystrobin, Carbendazim, Difenoconazol, Tebuconazol.

Các chất HCBVTV còn lại được định kì kiểm tra sau mỗi 6 tháng ở mức thêm chuẩn 0.01 mg/kg. Các giá trị hiệu suất thu hồi được ghi nhận vào control chart.

1. **BÁO CÁO KẾT QUẢ.**

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