**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT TRONG ĐẤT BẰNG HỆ THỐNG SẮC KÝ KHÍ GHÉP KHỐI PHỔ (GC/MS) VÀ HỆ THỐNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ BA TỨ CỰC (LC/MS/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 |  |  |  |
|  |  |  |  |

1. **TỔNG QUAN**

### 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.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Hợp chất** | **Họ** | **Thiết bị** | **LOD (µg/kg)** | **LOQ (µg/kg)** |
| 1 | Altrazine | Triazine | LC/MS/MS | 1.3 | 4.4 |
| 2 | Benthioacrb | Carbamate | LC/MS/MS | 1.9 | 6.3 |
| 3 | Dimethoate | Organophosphorus | LC/MS/MS | 2.1 | 6.8 |
| 4 | Fenobucarb | Carbamate | LC/MS/MS | 1.5 | 5.0 |
| 5 | Fenoxaprop-ethyl | Organophosphorus | LC/MS/MS | 2.2 | 7.5 |
| 6 | Isoprothiolane | Nodata | LC/MS/MS | 1.7 | 5.7 |
| 7 | Methamidophos | Organophosphorus | LC/MS/MS | 2.5 | 8.3 |
| 8 | Metolachlor | Nodata | LC/MS/MS | 2.5 | 8.2 |
| 9 | Monoprotophos | Organophosphorus | LC/MS/MS | 2.2 | 7.5 |
| 10 | Phosphamidone | Organophosphorus | LC/MS/MS | 1.7 | 5.8 |
| 11 | Simazine | Triazine | LC/MS/MS | 1.4 | 4.6 |
| 12 | Trichlorfon | Organophosphorus | LC/MS/MS | 2.2 | 7.3 |
| 13 | Cypermethrin | Pyrethroid | GC/MS | 1.2 | 4.0 |
| 14 | Diazinon | Organophosphorus | GC/MS | 1.6 | 5.5 |
| 15 | Aldrin | Organochlorine | GC/MS | 1.8 | 5.9 |
| 16 | Chlordan | Organochlorine | GC/MS | 1.3 | 4.3 |
| 17 | DDT | Organochlorine | GC/MS | 1.1 | 3.7 |
| 18 | Dieldrin | Organochlorine | GC/MS | 2.2 | 7.3 |
| 19 | Endosulfan | Organochlorine | GC/MS | 2.1 | 7.1 |
| 20 | Endrin | Organochlorine | GC/MS | 1.3 | 4.5 |
| 21 | Heptachlor | Organochlorine | GC/MS | 1.5 | 4.9 |
| 22 | Hexachlorobenzene | Organochlorine | GC/MS | 2.7 | 9.0 |
| 23 | Lindane | Organochlorine | GC/MS | 2.6 | 8.7 |
| 24 | Captan | Organochlorine | GC/MS | 2.0 | 6.8 |

### 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

### Nguyên tắc

Mẫu đươc 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.

### 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.

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

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:



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 (%).

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 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.

Dung dịch nội chuẩn α-HCH-D6 10 mg/kg. 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

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 |
| 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 | ST1 (25µg/kg) | ST2 (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,

### 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 mẩu thông thường thì thực hiện kèm theo 1 mẫu QC.

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

### 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 loăng 10 lần bằng DI đối với LC/MS/MS.

### 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 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 0C

- Dòng phát xạ: 34.6 µA

- 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: 350oC

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 |

## 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.

# TÍNH TOÁN KẾT QUẢ

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

# 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% | ±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 vào control chart sau mỗi lô mẫu phân tích thực tế ở mức spike 0.01 mg/kg.

# BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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