

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11293:2016

Xuất bản lần 1

**THỦY SẢN - XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG PYRETHROID -
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ PHỔ KHỐI LƯỢNG**

*Fishery products - Determination of pyrethroid -
Gas chromatography mass spectrometric method*

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 11293:2016 do Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm sản và thủy sản biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thủy sản - Xác định dư lượng pyrethroid - Phương pháp sắc ký khí phổ khối lượng

Fishery products - Determination of pyrethroid - Gas chromatography mass spectrometric method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định dư lượng pyrethroid trong thủy sản bằng sắc ký khí phổ khối lượng.

Chú thích: Tiêu chuẩn này được xây dựng và thử nghiệm trên hai hoạt chất deltamethrin và cypermethrin (các đồng phân) thuộc nhóm pyrethroid. Giới hạn định lượng của hai hoạt chất là:

Deltamethrin: 5 µg/kg

Cypermethrin (tổng các đồng phân): 5 µg/kg

2 Nguyên tắc

Dư lượng cypermethrin và deltamethrin trong mẫu thử được chiết ra khỏi mẫu bằng axetonitril đã axit hóa. Dịch chiết được làm sạch bằng hỗn hợp chất hấp phụ C18 và chất hấp phụ amin, sau đó tiến hành chiết lỏng - lỏng với iso-octan và phân tích bằng kỹ thuật sắc ký khí - phổ khối lượng để xác định cypermethrin, deltamethrin.

3 Thuốc thử

Trong tiêu chuẩn này, chỉ sử dụng hóa chất, thuốc thử có cấp độ tinh khiết phân tích và nước cất hai lần đã khử ion.

- 3.1 **Chất nội chuẩn trans-cypermethrin D6**, nồng độ 10 µg/ml trong dung môi axetonitril;
- 3.2 **Chất chuẩn cypermethrin (các dạng đồng phân)**, nồng độ 10 µg/ml trong dung môi axetonitril;
- 3.3 **Chất chuẩn deltamethrin**, 10 µg/ml trong dung môi axetonitril;
- 3.4 **Axit axetic băng** (CH_3COOH);
- 3.5 **Natri axetat khan** (CH_3COONa);
- 3.6 **Magie sulfat khan** (MgSO_4);
- 3.7 **Natri clorua khan** (NaCl);

TCVN 11293: 2016

3.8 Chất hấp phụ C18;

3.9 Chất hấp phụ amin (PSA - Primary secondary amin), có cỡ hạt 40 μm ;

3.10 Axetonitril;

3.11 iso-octan, loại dùng cho sắc ký khí;

3.12 Khí hell, tinh khiết 99,9995 %;

3.13 Khí metan, tinh khiết 99,99 %.

3.14 Dung dịch chất nội chuẩn trans - cypermethrin D6, 2 $\mu\text{g/ml}$ trong axetonitril

Hút 1 ml dung dịch chất chuẩn trans-cypermethrin D6 10 $\mu\text{g/ml}$ (3.1) cho vào bình định mức 5 ml, định mức đến vạch bằng axetonitril (3.10). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở âm 18 °C, hạn sử dụng 6 tháng.

3.15 Dung dịch hỗn hợp chất chuẩn cypermethrin và deltamethrin, 2 $\mu\text{g/ml}$ trong axetonitril

Hút lần lượt 1 ml dung dịch chuẩn cypermethrin 10 $\mu\text{g/ml}$ (3.2) và 1 ml dung dịch chuẩn deltamethrin (3.3) cùng cho vào bình định mức 5 ml, định mức đến vạch bằng axetonitril (3.10). Dung dịch chuẩn hỗn hợp này được bảo quản ở âm 18 °C, hạn sử dụng 6 tháng.

3.16 Dung dịch natri clorua 5 % (NaCl 5 % (w/v))

Cân 5,0 g muối NaCl khan (3.7) vào cốc 250 ml, thêm chính xác 100 ml nước cất rồi khuấy cho đến khi muối NaCl tan hoàn toàn. Dung dịch này được bảo quản ở nhiệt độ phòng, hạn sử dụng 6 tháng.

3.17 Dung dịch axit axetic 0,1 % thể tích trong axetonitril

Dung dịch axit axetic 0,1 % thể tích trong axetonitril được pha với tỉ lệ 1:999 (v/v), Dung dịch này được bảo quản ở nhiệt độ phòng, hạn sử dụng tuần.

3.18 Hỗn hợp muối A

Cân 3,5 g magie suffat khan (3.6) và 0,5 g natri axetat khan (3.5) cùng cho vào ống ly tâm nhựa 50 ml (4.10) để được hỗn hợp muối A.

3.19 Hỗn hợp bột làm sạch B

Cân 0,5 g chất hấp phụ C18 (3.8) và 0,5 g PSA (3.9) vào ống ly tâm nhựa 15 ml (4.10) để thu được hỗn hợp làm sạch B.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị và dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường, cụ thể như sau:

4.1 Hệ thống máy sắc kí khí – phổ khối lượng

- Bao gồm hệ thống máy tính và phần mềm;
- Bộ tiêm mẫu: có khả năng tiêm mẫu ở chế độ không chia dòng, nhiệt độ gia nhiệt lên đến 300 °C
- Thân máy có khả năng gia nhiệt đến 350 °C, tốc độ gia nhiệt tối đa 60 °C/ min
- Đầu dò khối phổ;
- Cột sắc ký khí, pha tĩnh chứa 5 % diphenyl 95 % dimethyl polysiloxane; chiều dài cột 30 m, đường kính 0,25 mm, độ dày pha tĩnh 0,25 µm;

4.2 Máy đồng hóa;

4.3 Tủ lạnh đông, có thể hoạt động liên tục ở nhiệt độ thấp hơn hoặc bằng âm 20 °C;

4.4 Máy ly tâm, tốc độ 4000 r/min;

4.5 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,1 mg;

4.6 Bể siêu âm;

4.7 Máy lắc, tốc độ 400 r/min;

4.8 Lọ đựng mẫu, dung tích 2 ml;

4.9 Màng lọc mẫu, đường kính 13 mm, kích thước lỗ 0,2 µm, làm bằng Teflon.

4.10 Ống ly tâm nhựa, dung tích 50ml và 15 ml có nắp;

4.11 Ống ly tâm thủy tinh, dung tích 10 ml;

5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này nhưng mẫu phân tích tại phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

6 Chuẩn bị mẫu thử

Lượng mẫu cần lấy tối thiểu là 200 g, cắt nhỏ và đồng hóa bằng máy đồng hóa mẫu (4.2). Trong trường hợp mẫu không phân tích ngay, phải bảo quản mẫu trong tủ lạnh đông (4.3) trong tối đa 30 ngày.

TCVN 11293: 2016

7 Cách tiến hành

7.1 Chiết mẫu

Dùng cân phân tích (4.5) cân $5,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ mẫu thử đã chuẩn bị (xem Điều 6) vào ống ly tâm 50 ml (4.10). Thêm vào ống 25 μl dung dịch chất nội chuẩn trans – cypermethrin D6 $2 \mu\text{g/ml}$ (3.14) (nồng độ chất nội chuẩn thu được tương đương $10 \mu\text{g/kg}$), vặn kín ống. Trộn đều bằng máy lắc (4.7), để yên các mẫu ít nhất 15 min rồi mới tiến hành các bước phân tích tiếp theo.

Tiếp tục thêm 2 ml nước cất, vặn kín ống. Trộn đều bằng máy lắc (4.7) trong 30 s. Tiếp tục, thêm 5 ml dung dịch axit axetic 0,1 % thể tích trong axetonitril (3.17), trộn thật đều hỗn hợp bằng máy lắc khoảng 1 min, siêu âm trong bể siêu âm (4.6) 10 min.

Sau đó thêm từ từ cho đến hết hỗn hợp muối A (3.18) vào mẫu, trộn đều bằng máy lắc. Ly tâm ở tốc độ 4000 r/min (4.4) trong 6 min.

7.2 Xử lý dịch chiết

Lấy toàn bộ phần dung dịch nổi phía trên sau khi ly tâm ở điều 7.1 cho vào ống ly tâm chứa hỗn hợp bột làm sạch B (3.19). Vặn kín ống và lắc bằng tay (hoặc bằng máy lắc (4.7)) trong 30 s. Ly tâm với tốc độ 4000 r/min trong 5 min.

Lấy 2,5 ml phần nổi phía trên cho vào ống ly tâm thủy tinh (4.11). Thêm vào ống lần lượt 3 ml dung dịch natri clorua 5 % (3.16) và 1 ml iso-octan (3.11), đậy nắp rồi lắc đều trong 1 min. Ly tâm ở tốc độ 4000 r/min trong 6 min, hút khoảng 0,7 ml lớp trên lọc qua màng lọc (4.9) rồi cho vào lọ đựng mẫu 2 ml (4.8). Đậy nắp lọ, thực hiện phân tích trên thiết bị GC-MS.

7.3 Mẫu trắng

Dùng cân phân tích (4.5) cân $5,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ mẫu trắng (mẫu đã được xác định không chứa cypermethrin và deltamethrin). Mẫu trắng được tiến hành như mẫu thử. Thực hiện tối thiểu một mẫu trắng trong một dãy mẫu thử.

7.4 Mẫu kiểm soát ở nồng độ $10 \mu\text{g/kg}$

Dùng cân phân tích (4.5) cân $5,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ mẫu trắng (mẫu đã được xác định không chứa cypermethrin và deltamethrin), thêm 25 μl dung dịch hỗn hợp chuẩn cypermethrin và deltamethrin $2 \mu\text{g/ml}$ (3.15) vào mẫu để thu được nồng độ mẫu kiểm soát là $10 \mu\text{g/kg}$, sau đó tiến hành như mẫu thử. Thực hiện tối thiểu một mẫu kiểm soát trong một dãy mẫu thử.

7.5 Dụng đường chuẩn

7.5.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc

Đường chuẩn được xây dựng trên nền mẫu trắng thêm chuẩn.

Dùng cân phân tích (4.5) cân 6 mẫu trắng, mỗi mẫu 5,0 g \pm 0,1 g cho vào các ống ly tâm nhựa dung tích 50ml (4.10), đánh số thứ tự các ống từ C0 đến C5. Thêm dung dịch chuẩn hỗn hợp 2 $\mu\text{g/ml}$ vào các ống C0, C1, C2, C3, C4 và C5 theo thứ tự thể tích tương ứng như sau 0; 12,5 μl ; 25,0 μl ; 50,0 μl ; 75,0 μl và 100 μl . Đậy kín các ống, lắc mạnh ống trong 30 s. Để yên các ống ít nhất 15 min. Tiến hành chiết mẫu như điều 7.1 và 7.2.

Nồng độ dung dịch chuẩn làm việc là 0; 5; 10; 20; 30 và 40 $\mu\text{g/kg}$.

7.5.2 Đường chuẩn

Đường chuẩn có dạng: $y = ax + b$ với:

$y = \frac{S_s}{S_s}$ trong đó S_s là diện tích pic của chất chuẩn tương ứng và S_{is} là diện tích pic của chất nội chuẩn trans – cypermethrin D6 trong mẫu tương ứng;

$x = \frac{C_s}{C_s}$ trong đó C_s là nồng độ của chất chuẩn tương ứng và C_{is} là nồng độ của chất nội chuẩn trans – cypermethrin D6 trong mẫu tương ứng;

b là điểm cắt của đường chuẩn với trục tung;

a là hệ số góc của đường chuẩn.

Giá trị b nên gần giá trị 0 và hệ số tương quan hồi quy (r^2) phải lớn hơn 0,995.

7.6 Điều kiện phân tích của GC-MS

7.6.1 Ví dụ về điều kiện phân tích bằng GC-MS:

a) Điều kiện đối với GC

- Thiết bị GC: 7890A của Agilent¹⁾;
- Khí mang: Heli, tốc độ 1,6 ml/min;
- Chương trình nhiệt độ: nhiệt độ ban đầu: 80 °C giữ trong 1 min, tăng 40 °C/min lên 250 °C giữ trong 1 min và 4 °C/min lên 280 °C giữ trong 10 min;

¹⁾ Thông tin mà tiêu chuẩn này đưa ra nhằm thuận tiện cho người sử dụng và không ấn định phải sử dụng thiết bị này.

TCVN 11293: 2016

- Chế độ bơm mẫu: chế độ bơm mẫu không chia dòng, thể tích bơm mẫu 2 μ l, nhiệt độ buồng bơm mẫu 280 °C.

b) Điều kiện đối với MS:

- Thiết bị MS: 5975C của Agilent ¹⁾;

- Nguồn ion hóa: chế độ ion hóa hóa học (NCI), nhiệt độ nguồn 150 °C, tốc độ khí metan 40 %, nhiệt độ tứ cực 150 °C và năng lượng điện 140 eV; hoặc chế độ ion hóa bằng va chạm điện tử (EI), nhiệt độ nguồn 230 °C, nhiệt độ tứ cực 150 °C và năng lượng điện 70 eV;

- Chế độ chọn lọc: chọn lọc ion (SIM), các phân mảnh ion khi sử dụng kỹ thuật NCI, EI theo bảng 1 và bảng 2 .

Bảng 1 – Các phân mảnh ion (NCI)

Tên hợp chất	Ion định lượng (m/z)	Ion định tính 1 (m/z)	Ion định tính 2 (m/z)
trans - cypermethrin D6	213	215	177
Cypermethrin	207	209	171
Deltamethrin	297	299	295

Bảng 2 – Các phân mảnh ion (EI)

Tên hợp chất	Ion định lượng (m/z)	Ion định tính 1 (m/z)	Ion định tính 2 (m/z)	Ion định tính 3 (m/z)
trans - cypermethrin D6	169	171	-	-
Cypermethrin	163	165	209	208
Deltamethrin	181	253	255	251

7.6.2 Trình tự bơm mẫu:

Trình tự bơm mẫu theo thứ tự như sau: dung dịch chuẩn C0, dung dịch chuẩn C4 – nồng độ 30 μ g/kg, dung dịch chuẩn C2 – nồng độ 10 μ g/kg, mẫu thử 1 – 4 (04 mẫu thử), dung dịch chuẩn C1 - nồng độ 5 μ g/kg, dung dịch chuẩn C3 - nồng độ 20 μ g/kg, mẫu thử 1 – 4 (03 mẫu thử), mẫu kiểm soát, dung dịch chuẩn C5 - nồng độ 40 μ g/kg và dung môi iso-octan. Không có pic nhiễu trong mẫu dung môi iso octan.

8 Tính kết quả

Nồng độ cypermethrin và deltamethrin trong mẫu thử được biểu thị bằng microgam trên kilogam ($\mu\text{g}/\text{kg}$) và được tính theo công thức sau:

$$C_x = \left(\frac{S'_x - b}{S'_{IS}} \right) \times C'_{IS}$$

C_x là nồng độ của cypermethrin hoặc deltamethrin có trong mẫu thử;

S'_s là diện tích pic của mẫu thử;

S'_{IS} là diện tích pic của chất nội chuẩn trans-cypermethrin D6 thu được khi phân tích mẫu;

C'_{IS} là nồng độ chất nội chuẩn trans – cypermethrin D6 trong mẫu (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

a là hệ số góc của đường chuẩn;

b là điểm cắt trục tung của đường chuẩn.

LƯU Ý:

Đối với hoạt chất cypermethrin, việc xác định tổng các đồng phân của cypermethrin dựa trên khoảng thời gian lưu tương ứng của chất chuẩn hỗn hợp tất cả các đồng phân cypermethrin (3.2) và thời gian lưu của chất nội chuẩn trans – cypermethrin tương ứng thu được khi phân tích mẫu;

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được.

[1] The Association of Official Agricultural Chemists Official Method 2007.01 (10.1.04), *Pesticide Residue in Foods by Acefomitrile Extraction and Partitioning with Magnesium sulphate*, chương 10, trang 17-26.
