

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8101 : 2009

ISO 8260 : 2008

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA –
XÁC ĐỊNH THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT
NHÓM CLO HỮU CƠ VÀ POLYCLOBIPHENYL –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ-LỎNG MAO QUẢN
CÓ DETECTOR BẮT GIỮ ELECTRON**

Milk and milk products –

*Determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls –
Method using capillary gas-liquid chromatography with electron-capture detection*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8101 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 8260 : 2008;

TCVN 8101 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Giới thiệu

Tiêu chuẩn này được sử dụng trong nghiên cứu, giám sát và kiểm soát các hợp chất clo hữu cơ có trong sữa và các sản phẩm sữa bằng cách phân lập chúng.

Trước đây, các hợp chất biphenyl đã polyclo hoá (PCB) thường được xác định theo "thực nghiệm", hầu hết các phương pháp này đều dùng "so sánh hình dạng pic" sử dụng sắc kí khi-lòng có detector bắt giữ electron (GLC-ECD) và cột nhồi. Đối với các hợp chất chuẩn, hỗn hợp được tạo thành do perclo hoá thành decaclobiphenyl (và xác định GLC-ECD) hoặc khử loại clo thành biphenyl đã được sử dụng. Tiến hành xác định bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao với detector tia tử ngoại (HPLC-UV) hoặc bằng sắc kí khi-lòng với detector ion hoá ngọn lửa (GLC-FID).

Các kĩ thuật nói trên có ba điểm hạn chế quan trọng:

- 1) Khi giảm thông tin về kiểu mô hình PCB ("hàm lượng PCB") còn một dạng thì sẽ mất thông tin về hình dạng phân bố của các đồng phân. Tuy nhiên, thông tin này lại cực kì hữu dụng để chứng minh nguồn gốc của ô nhiễm và sự khác biệt giữa nền với sự ô nhiễm gần đó.
- 2) "Hàm lượng PCB" được xác định bằng các phương pháp đề cập ở trên có thể thu được theo nhiều cách, trong hầu hết dữ liệu PCB, "hàm lượng PCB" không được định nghĩa rõ ràng. Do đó, không thể so sánh phần lớn các "hàm lượng PCB" ghi nhận được và rất khó khăn khi giải thích dữ liệu. "Hàm lượng PCB" không phải lúc nào cũng được xác định theo tổng của các đồng phân clobiphenyl có trong mẫu thử, như thường mong đợi.
- 3) Các hợp chất clobiphenyl là những hợp chất hoá học riêng lẻ có các đặc tính khác nhau (ví dụ như khả năng phân huỷ sinh học, các ảnh hưởng độc tố học, xu hướng tích lũy). Do đó, rất cần xác định riêng các hợp chất clobiphenyl này.

Theo nghĩa rộng, việc phân tích PCB cần áp dụng được cho sữa và các sản phẩm sữa ở các nước khác nhau trên thế giới. Để đạt được điều này, cần lưu ý các điểm sau:

- a) phải xem xét các tình huống khác nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, ví dụ: thiết bị sẵn có, mức độ đào tạo của nhân viên phòng thử nghiệm, ngân sách sẵn có cho các nhiệm vụ đặc biệt của phòng thử nghiệm;
- b) phải xác định mục đích của việc phân tích, ví dụ: để sàng lọc, giám sát và kiểm soát sự tuân thủ các giới hạn theo luật định, hoặc để nghiên cứu;
- c) phải xác định đồng thời hàm lượng PCB và thuốc bảo vệ thực vật clo hữu cơ (OCP);
- d) phải bao gồm thông tin về hình dạng phân bố đồng phân PCB đến mức có thể;
- e) phải xác định rõ các hàm lượng cần phải ghi lại;
- f) phải kiểm soát cẩn thận việc tách các PCB ra khỏi các OCP để tránh bị nhiễu.

Sữa và sản phẩm sữa – Xác định thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ và polyclobiphenyl – Phương pháp sắc ký khí-lỏng mao quản có detector bắt giữ electron

Milk and milk products – Determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls – Method using capillary gas-liquid chromatography with electron-capture detection

CẢNH BÁO – Người sử dụng tiêu chuẩn này phải thành thạo khi thực hành trong phòng thử nghiệm thông thường. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và đảm bảo sự phù hợp với các điều kiện trong quy chuẩn quốc gia.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng của các loại thuốc bảo vệ thực vật clo hữu cơ (OCP) và hàm lượng các biphenyl polyclo hoá (PCB) riêng lẻ trong sữa, sữa cô đặc, sữa đặc có đường, các sản phẩm sữa bột, bơ và butterfat, phomat và các sản phẩm sữa khác.

Phương pháp này có thể áp dụng để xác định các OCP cụ thể với hàm lượng thấp đến 5 µg OCP trên kilogram chất béo và các PCB cụ thể với hàm lượng đến 2,5 µg PCB trên kilogram chất béo, sử dụng sắc ký khí-lỏng mao quản với detector bắt giữ electron (GLC-ECD).

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 8103 : 2009 (ISO 14156), *Sữa và sản phẩm sữa – Phương pháp chiết lipid và các hợp chất tan trong lipid.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Hàm lượng OCP và PCB (OCP và PCB content)

Phần khối lượng của thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ và biphenyl đã polyclo hoá xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH 1 Đối với các sản phẩm chứa nhiều hơn 2 % chất béo, hàm lượng hợp chất clo hữu cơ được biểu thị bằng microgam hoặc miligam trên kilogam chất béo.

CHÚ THÍCH 2 Đối với các sản phẩm ít béo chứa 2 % chất béo hoặc nhỏ hơn, hàm lượng hợp chất clo hữu cơ được biểu thị bằng microgam hoặc miligam trên kilogam sản phẩm.

4 Nguyên tắc

Chất béo và các hợp chất clo hữu cơ được chiết tách ra khỏi phần mẫu thử. Các hợp chất clo hữu cơ được phân tách bằng cách chiết đông lạnh và làm sạch trong hai bước liên tiếp sử dụng các cột C18 và Florisil SPE (chiết pha rắn) tương ứng.

Chất rửa giải được cô đặc rồi hoà tan trong một thể tích *n*-hexan thích hợp. Các hợp chất clo hữu cơ được nhận biết và định lượng bằng sắc kí khí-lông mao quản, dùng chất chuẩn nội trans-nonaclo.

5 Thuốc thử và vật liệu

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích và thích hợp để phân tích dư lượng thuốc bảo vệ thực vật. Nước sử dụng phải là nước cất hoặc nước có độ tinh khiết ít nhất tương đương, thích hợp để phân tích dư lượng thuốc bảo vệ thực vật.

CẢNH BÁO — Tiêu chuẩn này có sử dụng một vài dung môi bay hơi mạnh có độc tính cao và/hoặc dễ cháy. Tuân thủ các cảnh báo an toàn hiện hành khi chuẩn bị, sử dụng và thải bỏ các dung môi này.

5.1 Axetontril (CH_3CN).

5.2 Metylen clorua, (CH_2Cl_2).

5.3 Ete dầu mỏ, có điểm sôi từ 40 °C đến 60 °C, được chưng cất bằng cột Raschig có chiều dài tối thiểu 500 mm, nếu cần.

5.4 Dietyl ete [$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$].

5.5 *n*-hexan (C_6H_{14}), được chưng cất bằng cột Raschig có chiều dài tối thiểu 500 mm, hoặc có thể thay thế bằng *iso*-octan (C_8H_{18}), nếu cần.

5.6 Natri sulfat (Na_2SO_4).

5.7 Natri oxalat ($Na_2C_2O_4$).

5.8 Axeton (CH_3COCH_3).

5.9 Metanol (CH_3OH).

5.10 Dodecan ($C_{12}H_{26}$).

5.11 Dung môi rửa giải, bao gồm:

5.11.1 Hỗn hợp axetonitril/metylen clorua, tỉ lệ 3 : 1.

Trộn 3 thể tích axetonitril (5.1) với 1 thể tích metylen clorua (5.2).

5.11.2 Hỗn hợp ete dầu hỏa/dietyl ete I, tỉ lệ 1 : 1.

Trộn 50 thể tích ete dầu hỏa (5.3) với 50 thể tích dietyl ete (5.4).

5.11.3 Hỗn hợp ete dầu hỏa/dietyl ete I, tỉ lệ 98 : 2.

Trộn 98 thể tích ete dầu hỏa (5.3) với 2 thể tích dietyl ete (5.4).

5.11.4 Hỗn hợp ete dầu hỏa/dietyl ete I, tỉ lệ 85 : 15.

Trộn 85 thể tích ete dầu hỏa (5.3) với 15 thể tích dietyl ete (5.4).

5.12 Cột C18 SPE, dung tích 6 ml, chứa 1 g vật liệu nhồi có kích thước hạt là 45 μm , cỡ lỗ 60 Å (ví dụ sản phẩm Mega Bond Elut¹⁾).

5.13 Cột Florisil¹⁾ SPE, dung tích 6 ml, chứa 1 g vật liệu nhồi có kích thước hạt là 150 μm đến 250 μm .

5.14 Dung dịch chuẩn nội, như sau:

5.14.1 Dung dịch chuẩn nội gốc *trans*-nonaclo, $c(C_{10}H_5Cl_9) = 10 \mu g/ml$.

5.14.2 Dung dịch chuẩn nội làm việc, chứa 1 000 ng/ml *trans*-nonaclo.

¹⁾ Mega Bond Elut[®] và Florisil[®] là tên của các sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này. ISO không ấn định phải sử dụng các sản phẩm đó.

TCVN 8101 : 2009

Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch chuẩn nội gốc trans-nonaclo (5.14.1) cho vào bình định mức một vạch dung tích 50 ml. Pha loãng đến vạch bằng *n*-hexan (hoặc iso-octan) (5.5) và trộn.

Nồng độ nói trên chỉ để hướng dẫn và có thể được hiệu chỉnh cho phù hợp với các yêu cầu khác nhau.

Nếu biết tỉ trọng của dung dịch và dung môi, thì có thể chuẩn bị các dung dịch này bằng phương pháp khối lượng.

5.15 Dung dịch chuẩn OCP và PCB, như sau:

5.15.1 Dung dịch chuẩn gốc, chứa 10 µg/ml mỗi hợp chất.

Chuẩn bị riêng các dung dịch chuẩn gốc đối với mỗi hợp chất sau đây bằng cách hoà tan 100 µg mỗi hợp chất trong *n*-hexan (hoặc iso-octan) (5.5) trong bình định mức một vạch dung tích 10 ml, pha loãng đến vạch bằng *n*-hexan (hoặc iso-octan) và trộn.

HCB (C₆Cl₆); Endrin (C₁₂H₈Cl₆O); α-HCH (C₆H₆Cl₆); pp'-TDE (C₁₄H₁₀Cl₄); β-HCH (C₆H₆Cl₆); op'-DDT (C₁₄H₉Cl₅); γ-HCH (C₆H₆Cl₆); pp'-DDT (C₁₄H₉Cl₅); Heptaclo (C₁₀H₅Cl₇); op'-dicofol (C₁₄H₉Cl₅O); Aldrin (C₁₂H₈Cl₆); Dicofol (C₁₄H₉Cl₅O); Heptaclo epoxid (C₁₀H₅Cl₇O); Oxyclofan (C₁₀H₄Cl₈O); γ-clodan (C₁₀H₆Cl₈); op'-DDE (C₁₄H₈Cl₄); α-endosulfan (C₉H₆Cl₆O₃S); α-clodan (C₁₀H₆Cl₈); pp'-DDE (C₁₄H₈Cl₄); Dieldrin (C₁₂H₈Cl₆O); op'-TDE (C₁₄H₁₀Cl₄); 2,4,4'-trichlobiphenyl (C₁₂H₇Cl₃, IUPAC No. 28); 2,5,2',5'-tetrachlobiphenyl (C₁₂H₆Cl₄, IUPAC No. 52); 2,4,5,2',5'-pentachlobiphenyl (C₁₂H₅Cl₅, IUPAC No. 101); 2,3',4,4',5-pentachlobiphenyl (C₁₂H₅Cl₅, IUPAC No. 118); 2,4,5,2',4',5'-hexachlobiphenyl (C₁₂H₄Cl₆, IUPAC No. 153); 2,3,4,2',4',5'-hexachlobiphenyl (C₁₂H₄Cl₆, IUPAC No. 138); 2,3,4,5,2',4',5'-heptachlobiphenyl (C₁₂H₃Cl₇, IUPAC No. 180).

CHÚ THÍCH Nồng độ sử dụng này chỉ để hướng dẫn.

Nếu biết tỉ trọng của dung dịch và dung môi, thì có thể chuẩn bị các dung dịch này bằng phương pháp khối lượng.

5.15.2 Dung dịch chuẩn làm việc I (1 µg/ml).

Dùng pipet lấy 5 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc (5.15.1) cho vào các bình định mức một vạch dung tích 50 ml riêng rẽ. Pha loãng mỗi bình đến vạch bằng *n*-hexan (hoặc iso-octan) (5.5) và trộn.

5.15.3 Dung dịch chuẩn làm việc II (10 ng/ml).

Dùng pipet lấy 1 ml mỗi dung dịch chuẩn làm việc I (5.15.2) cho vào các bình định mức một vạch dung tích 100 ml riêng rẽ. Pha loãng mỗi bình đến vạch bằng *n*-hexan (hoặc iso-octan) (5.5) và trộn.

CHÚ THÍCH Các dung dịch làm việc trên chỉ được dùng để nhận biết.

Nếu biết tỉ trọng của dung dịch và dung môi, thì có thể chuẩn bị các dung dịch này bằng phương pháp khối lượng.

5.15.4 Dung dịch chuẩn làm việc III (10 ng/ml mỗi hợp chất).

Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc III bằng cách trộn các dung dịch chuẩn làm việc I (5.15.2) và dung dịch chuẩn nội làm việc trans-nonaclo (5.14.2), như sau:

Dùng pipet lấy 1 ml mỗi dung dịch chuẩn làm việc I (5.15.2) cho vào một bình định mức một vạch dung tích 100 ml. Thêm 1 ml dung dịch chuẩn nội làm việc trans-nonaclo (5.14.2) và trộn. Pha loãng đến vạch bằng *n*-hexan (hoặc iso-octan) (5.5) và trộn kĩ dung dịch một lần nữa.

CHÚ THÍCH Dung dịch chuẩn làm việc III được dùng cho mục đích định lượng.

Nếu biết tỉ trọng của dung dịch và dung môi, thì có thể chuẩn bị các dung dịch này bằng phương pháp khối lượng.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 **Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến 1 mg, có thể đọc được đến 0,1 mg.

6.2 **Nồi cách thủy**, có thể duy trì nhiệt độ từ 35 °C đến 40 °C.

6.3 **Nồi cách thủy**, có thể duy trì nhiệt độ từ 40 °C đến 60 °C.

6.4 **Hộp chứa**, có kích thước khác nhau, có nắp kín, dùng để đồng hoá mẫu (xem 8.2 đến 8.4).

6.5 **Máy li tâm lạnh**, có thể tạo gia tốc hướng tâm 1 200 g ở -15 °C, được trang bị các ống li tâm có dung tích tối thiểu 5 ml.

6.6 **Máy cất quay**, có thể hoạt động ở nhiệt độ từ 35 °C đến 40 °C, được trang bị bơm chân không, bình ngưng và bình bay hơi.

6.7 **Pipet**, kích thước khác nhau.

6.8 **Máy sắc kí khí**, được gắn detector bắt giữ electron, thích hợp để xác định các hợp chất OCP và PCB.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc không bị biến đổi chất lượng trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

8 Chuẩn bị mẫu

8.1 Sữa

Làm ấm mẫu lên 35 °C đến 40 °C trên nồi cách thủy (6.2). Trộn kỹ mẫu bằng cách nhẹ nhàng đảo chiều chai đựng mẫu mà không tạo bọt. Sau đó nhanh chóng làm nguội nhanh mẫu đến nhiệt độ khoảng 20 °C

8.2 Sữa cô đặc

Lắc và đảo chiều hộp chứa mẫu. Mở hộp chứa mẫu và rót từ từ mẫu sang hộp thứ hai có nắp đậy kín (6.4) và chuyển mẫu qua lại giữa hai hộp để trộn, chú ý lấy hết chất béo hoặc thành phần khác của mẫu còn dính lại trên thành và đáy hộp thứ nhất. Cuối cùng, chuyển càng triệt để càng tốt sản phẩm sang hộp thứ hai. Đậy nắp hộp.

Đối với các mẫu đựng trong hộp kín, thì để nguyên hộp trên nồi cách thủy (6.3) duy trì ở 40 °C đến 60 °C, nếu cần. Cứ 15 min lấy hộp ra và lắc mạnh. Sau 2 h, lấy hộp ra và để nguội đến nhiệt độ phòng. Mở hẳn nắp và dùng thìa hoặc dao trộn để trộn kỹ mẫu.

8.3 Sữa đặc có đường

Mở hộp đựng mẫu và dùng thìa hoặc dao trộn để trộn kỹ. Lắc hộp theo chiều lên-xuống sao cho các lớp phía trên và phía góc hộp trộn được với nhau. Chú ý lấy hết mẫu dính lại thành và đáy hộp thứ nhất. Cuối cùng, chuyển càng triệt để càng tốt sản phẩm sang hộp thứ hai có nắp đậy kín (6.4). Đậy nắp hộp.

Nếu cần, đối với các khi mẫu đựng trong hộp kín, thì để hộp chưa mở trên nồi cách thủy (6.2) duy trì ở 30 °C đến 40 °C. Mở hộp, chuyển hết sữa còn dính trong hộp sang đĩa đủ rộng để có thể khuấy trộn kỹ cho đến khi thu được sản phẩm đồng nhất.

Khi mẫu đựng trong ống có thể gập được, thì cắt ống và chuyển lượng chứa bên trong ống sang bình. Sau đó cắt mở hẳn ống và chuyển tất cả sản phẩm còn dính phía trong ống sang bình.

8.4 Các sản phẩm sữa bột

Chuyển toàn bộ mẫu vào bình kín có nắp đậy (6.4) và dung tích thích hợp, sau đó trộn kỹ mẫu bằng cách xoay và đảo chiều hộp chứa mẫu liên tục, nếu cần.

8.5 Bơ và butterfat

Trộn mẫu bằng thìa hoặc dao trộn.

8.6 Phomat

Nạo hoặc nghiền mẫu, tùy thuộc vào cấu trúc của mẫu.

8.7 Các sản phẩm sữa khác

Đảm bảo sao cho mẫu đồng nhất.

9 Chuẩn bị mẫu thử

9.1 Chiết tách sữa

Cho 50 ml mẫu đã chuẩn bị (xem 8.1), 50 ml metanol (5.9) và 0,5 g natri oxalat (5.7) vào phễu chiết dung tích 250 ml. Lắc phễu chiết trong 1 min. Thêm 25 ml dietyl ete (5.4) và lắc trong 1 min nữa. Thêm 25 ml ete dầu hỏa (5.3) và lại lắc trong 1 min. Để yên phễu cho các pha phân tách. Trong trường hợp các pha khó phân tách, tiến hành li tâm với tốc độ 1 500 r/min trong 5 min.

Chuyển pha hữu cơ vào bình nón có dung tích phù hợp và pha nước vào phễu chiết khác. Chiết pha nước hai lần bằng 50 ml dung dịch ete dầu hỏa/dietyl ete I (5.11.2). Cho cả hai phần chiết vào bình nón chứa pha hữu cơ. Làm khô các phần chiết đã gộp lại bằng cách thêm khoảng 10 g natri sulfat vào bình nón và trộn. Lọc pha hữu cơ vào bình bay hơi (xem 6.6). Cho bay hơi dung dịch trên máy cất quay (xem 6.6) ở nhiệt độ được duy trì trong khoảng 35 °C đến 40 °C.

9.2 Chiết tách sữa đặc có đường, các sản phẩm sữa bột, bơ, butterfat và phomat

Phân tách chất béo ra khỏi mẫu theo TCVN 8103 : 2009 (ISO 14156 : 2001).

10 Cách tiến hành

10.1 Yêu cầu chung

Phương pháp này yêu cầu người sử dụng có kinh nghiệm trong việc sử dụng máy sắc kí khí mao quản. Cần đặc biệt lưu ý các vấn đề liên quan đến các tạp chất có trong khí mang, màng ngăn và khí cột, và kĩ thuật bơm, cũng như thiếu trợ của cột trong dải picogram thấp.

10.2 Phép thử trắng

Trong trường hợp của sữa, sữa đặc có đường, các sản phẩm sữa bột và phomat, thì chuẩn bị phép thử trắng theo 9.1 hoặc 9.2. Đối với sữa, thay mẫu bằng một lượng nước tương đương. Đối với sữa đặc có đường, các sản phẩm sữa bột và phomat, thực hiện theo 9.2 nhưng không có mẫu. Hoà tan phần cặn trong 3 ml hỗn hợp axetonitril/metylen clorua (5.11.1) và chuyển dung dịch vào ống li tâm. Thêm 100 µl dung dịch chuẩn nội làm việc (5.14.2) và trộn. Tiến hành như trong 10.3 bằng cách li tâm ống nhưng không làm nóng ống li tâm.

10.3 Chiết ở nhiệt độ đông lạnh

Cân 0,5 g chất béo sữa thu được trong 9.1 vào ống li tâm (xem 6.5). Thêm 100 µl dung dịch chuẩn nội làm việc (5.14.2) và 3 ml hỗn hợp axetonitril/metylen clorua (5.11.1). Trộn mạnh. Li tâm ống chứa chất lỏng với gia tốc hướng tâm 1 200 g ở nhiệt độ khoảng -15 °C trong 20 min. Chuyển lớp nổi lên trên vào một ống riêng.

Sau đó đun nóng nhẹ phía đáy ống li tâm trên nồi cách thủy (6.2) ở nhiệt độ 40 °C để làm tan chảy chất béo. Lặp lại quá trình chiết với 3 ml hỗn hợp axetonitril/metylen clorua (5.11.1) khác và li tâm lại. Chuyển lớp nổi phía trên vào ống riêng đã dùng trước đó. Cho bay hơi pha hữu cơ ở nhiệt độ khoảng 35 °C trong khí nitơ đến khi còn lại khoảng 2 ml đến 3 ml. Dung dịch này là dung dịch A.

10.4 Làm sạch

10.4.1 Làm sạch trên cột C18 SPE

Chuẩn bị một cột C18 SPE (5.12) bằng cách rửa giải hai lần với 5 ml ete dầu hòa (5.3), sau đó với 5 ml axeton (5.8) và cuối cùng với 5 ml metanol (5.9), khi mặt lõm của chất lỏng chạm tới vạch thủy tinh thì dừng. Loại bỏ các dung dịch rửa giải.

Thêm dung dịch A (xem 10.3) vào cột. Rửa giải dung dịch cho đến khi mặt lõm của chất lỏng chạm thủy tinh và để yên 3 min. Sau đó rửa giải dung dịch với 10 ml axetonitril (5.1) cứ 3 s nhỏ một giọt. Thu dung dịch rửa giải vào bình chứa thích hợp. Làm bay hơi dung dịch này bằng hệ thống thổi khí nitơ ở nhiệt độ khoảng 35 °C. Quan sát cẩn thận quá trình bay hơi, vì việc liên tục gia nhiệt khi đã khô có thể dẫn đến thất thoát các hợp chất cần xác định. Hoà tan phần còn lại trong 2 ml đến 3 ml *n*-hexan (5.5) và trộn để thu được dung dịch B.

10.4.2 Làm sạch trên cột Florisil SPE

Chuẩn bị cột Florisil SPE (5.13) bằng cách rửa giải với 10 ml *n*-hexan (5.5) đến khi mặt lõm của chất lỏng chạm tới thủy tinh.

Thêm dung dịch B (10.4.1) và để yên trong 3 min. Sau đó rửa giải dung dịch B với 10 ml dung dịch ete dầu hòa/dietyl ete II (5.11.3) với tốc độ 1 giọt/s. Thu phần rửa giải vào bình làm bay hơi (xem 6.6).

Sau đó rửa giải với 12 ml dung dịch ete dầu hòa/dietyl ete III (5.11.4) với tốc độ cứ 3 s một giọt. Thu phần rửa giải này vào bình chứa phần rửa giải lần đầu và trộn.

Thêm 100 µl dodecan (5.10) vào bình và trộn. Làm bay hơi chất lỏng trong bình trên máy cất quay (6.6). Hoà tan chất chiết cuối cùng thu được này trong ≤ 5 ml *n*-hexan (hoặc iso-octan) (5.5) để thu được dung dịch C dùng cho phân tích sắc ký khí.

Điều quan trọng là sử dụng cùng một loại dung môi cho các dung dịch chuẩn và mẫu thử.

10.5 Sắc kí khí

10.5.1 Điều kiện

Tối ưu hoá các điều kiện sắc kí khí một cách cẩn thận để thu được độ phân giải cao đối với các hợp chất cần xác định. Các điều kiện sau đây được đưa ra để làm ví dụ. Đây là những điều kiện cụ thể và được xác định với mỗi thiết bị và cột sử dụng.

VÍ DỤ

- cột CPSi15, sử dụng khí mang là heli ở áp suất 16 kPa (23 psi);
- nhiệt độ ban đầu của lò là 100 °C, duy trì trong 2 min và sau đó tăng nhiệt với tốc độ 7 °C/min lên đến 220 °C, duy trì nhiệt độ này trong 10 min và cuối cùng tăng với tốc độ 3 °C/min đến nhiệt độ cuối cùng là 285 °C;
- bộ bơm có nhiệt độ ban đầu là 50 °C, có thể tăng nhiệt với tốc độ 150 °C/min đến nhiệt độ cuối cùng là 250 °C và giữ nhiệt độ đó trong 52 min;
- detector, có thể duy trì nhiệt độ 320 °C, dùng khí nitơ với lưu lượng dòng 25 ml/min làm khí mới chế,
- thể tích bơm là 1 µl.

CHÚ THÍCH Phụ lục B đưa ra một ví dụ về sắc kí đồ. Với mỗi dãy phép xác định, nên chạy cùng một dung dịch chuẩn nội để hiệu chuẩn cũng như phép thử trắng và phép thử độ thu hồi.

Các kết quả quan trọng có thể được khẳng định bằng cách thực hiện phép đo bổ sung sử dụng cột thứ hai có độ phân cực khác (tốt nhất là thực hiện song song) hoặc bằng cách sử dụng detector đo khối phổ. Các quy trình này cho thấy thực hành tốt trong đo GC-ECD để khẳng định kết quả thu được bằng cách loại bỏ các chất cộng giải.

10.5.2 Nhận biết và định lượng

Khi không biết thứ tự giải hấp các hợp chất clo hữu cơ, thì trước tiên bơm dung dịch chuẩn làm việc II (5.15.3) và đo thời gian lưu của mỗi hợp chất quan tâm.

Sau đó bơm dung dịch chuẩn làm việc III (5.15.4). Đo chiều cao pic và thời gian lưu tương ứng của các hợp chất OCP và PCB. Tính toán độ nhạy (xem 11.1) và thời gian lưu tương đối (xem 11.5) của mỗi hợp chất.

Bơm dung dịch thử, dung dịch C (xem 10.4.2). Đo chiều cao pic và thời gian lưu tương ứng của các hợp chất OCP và PCB. Tính toán thời gian lưu tương đối (xem 11.5) và hàm lượng hợp chất OCP hoặc PCB (xem 11.3).

Nhận biết các hợp chất OCP và PCB bằng cách so sánh thời gian lưu tương đối của dung dịch chuẩn làm việc III (5.15.4) (của OCB-PCB) với thời gian lưu tương đối của dung dịch thử.

Dựa trên kinh nghiệm vận hành hoặc tiêu chí sử dụng của người vận hành, nếu mẫu thử chứa lượng đáng kể các hợp chất OCP hoặc PCB thì khẳng định lại việc nhận biết mỗi hợp chất, tốt nhất là sử dụng detector khối phổ hoặc sử dụng cột thứ hai có độ phân cực khác.

10.6 Kết quả phân tích mẫu trắng

Giá trị mẫu trắng thu được trong phép thử trắng (xem 10.2) được thực hiện song song với phép xác định không được vượt quá 2 µg/kg. Nếu giá trị thu được cao hơn, thì kiểm tra lại quy trình và độ tinh khiết của thuốc thử.

11 Tính toán và biểu thị kết quả

11.1 Tính toán hệ số đáp ứng

Đối với mỗi hợp chất clo hữu cơ, tính hệ số đáp ứng, r_i , theo công thức:

$$r_i = \frac{c_a \times h_i}{c_i \times h_a}$$

trong đó

c_a là nồng độ của hợp chất clo hữu cơ trong dung dịch chuẩn làm việc III (5.15.4), tính bằng nanogram trên mililit (ng/ml);

c_i là nồng độ của dung dịch chuẩn nội làm việc trans-nonaclo (5.15.2), tính bằng nanogram trên mililit (ng/ml);

h_i là chiều cao pic của chất chuẩn nội nonaclo trong dung dịch chuẩn làm việc III (xem 10.5.2);

h_a là chiều cao pic của hợp chất clo hữu cơ trong dung dịch chuẩn làm việc III (xem 10.5.2).

11.2 Biểu thị hệ số đáp ứng

Biểu thị hệ số đáp ứng đến hai chữ số thập phân.

11.3 Tính toán hàm lượng hợp chất clo hữu cơ

Đối với mỗi hợp chất clo hữu cơ, tính hàm lượng của hợp chất này, w_p , biểu thị bằng microgam trên kilogam chất béo hoặc kilogam sản phẩm (xem 3.1), theo công thức:

$$w_p = \frac{h_s \times C_{s,i}}{h_{s,i} \times m} \times V \times r_i$$

trong đó

h_s là chiều cao pic của hợp chất clo hữu cơ trong dung dịch thử (xem 10.5.2).

$h_{s,i}$ là chiều cao pic của chất chuẩn nội trong dung dịch thử (xem 10.5.2);

$c_{s,i}$ là nồng độ của dung dịch chuẩn nội làm việc (5.14.2) thêm vào mẫu chất béo (xem 10.3), tính bằng nanogram trên mililit (ng/ml);

m là khối lượng của mẫu chất béo (xem 10.3), tính bằng gam (g);

V là thể tích của dung dịch chuẩn nội làm việc (5.14.2) thêm vào mẫu chất béo (xem 10.3), tính bằng mililit (ml);

r_f là hệ số đáp ứng của hợp chất clo hữu cơ.

11.4 Biểu thị kết quả

Lấy kết quả thử đến số nguyên gần nhất nếu biểu thị theo microgam trên kilogam. Nếu biểu thị kết quả theo miligam trên kilogam, lấy đến hai chữ số thập phân.

11.5 Thời gian lưu tương đối

Đối với mỗi hợp chất clo hữu cơ, tính thời gian lưu tương đối, r_{ri} , theo công thức sau:

$$r_{ri} = \frac{r_i}{r_{ii}}$$

trong đó:

r_i là thời gian lưu của hợp chất clo hữu cơ (xem 10.5.2);

r_{ii} là thời gian lưu của chất chuẩn nội (xem 10.5.2).

11.6 Biểu thị thời gian lưu

Biểu thị thời gian lưu đến ba chữ số thập phân.

12 Độ chụm

12.1 Yêu cầu chung

Các giá trị giới hạn độ lặp lại và độ tái lập nhận được biểu thị với mức xác suất 95 % và có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

TCVN 8101 : 2009

Phụ lục A đưa ra chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) về độ chụm của phương pháp.

12.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, trong cùng phòng thử nghiệm, do cùng một người thao tác và sử dụng cùng một thiết bị trong cùng một khoảng thời gian ngắn như nhau, không quá 5 % trường hợp lớn hơn các giá trị đưa ra trong Phụ lục A đối với mỗi hợp chất.

12.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người thao tác khác nhau thực hiện và sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn các giá trị đưa ra trong Phụ lục A đối với mỗi hợp chất.

13 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được cho là tùy chọn, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, hoặc kết quả trích dẫn cuối cùng thu được nếu kiểm tra độ lặp lại.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các kết quả thử liên phòng thử nghiệm

Phép thử cộng tác liên phòng thử nghiệm gồm có 15 phòng thử nghiệm tham gia thực hiện do AFSSA của Pháp tổ chức, tiến hành trên các mẫu sữa^[4]. Các kết quả được phân tích thống kê theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) để đưa ra các dữ liệu độ chụm như trong Bảng A.1.

Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ nằm trong phần ngoặc đơn. Việc loại trừ được thực hiện trên cơ sở phép thử nội biến. PCB 118 đã không có mặt trong các mẫu. Việc bổ sung được tiến hành ở mức 40 µg/kg.

Bảng A.1 – Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Hợp chất	Giá trị chỉ định ^a µg/kg of chất béo	Độ thu hồi trung bình %	Số lượng phòng thử nghiệm ^b	s_r	RSD _r %	s_R	RSD _R %
α-HCH	39	98	15 (3)	3,4	8,7	17,6	45
β-HCH	33	83	14 (2)	3,1	9,4	10,7	33
HCB	27	68	14 (0)	5,2	19,2	12,7	46
γ-HCH	40	100	15 (2)	3,4	8,5	17,4	43
Heptaclo	36	90	15 (2)	4,1	11,4	12,5	35
Aldrin	31	78	15 (1)	2,7	8,7	11,8	38
HEP epoxit	45	113	15 (1)	3,9	8,7	18,6	42
Oxycodan	38	95	13 (0)	3,4	12,9	19,9	50
γ-clodan	37	93	15 (1)	5,1	13,8	14,8	39
op'-DDE	34	85	14 (1)	5,1	15,0	14,1	41
α-endosulfan	38	95	15 (0)	5,2	13,7	16,5	43
α-clodan	39	98	15 (0)	1,5	3,8	16,6	43
pp'-DDE	36	90	15 (0)	5,7	15,8	15,8	44
Dieldrin	41	103	15 (0)	5,7	13,9	16,4	40
op'-TDE	41	103	14 (0)	4,9	12,0	16,8	39
Endrin	42	105	15 (0)	6,0	14,3	16,0	39
pp'-TDE	41	103	15 (1)	5,2	12,7	19,4	43
op'-DDT	36	90	13 (2)	4,1	11,4	11,9	33
pp'-DDT	39	98	14 (1)	5,5	14,1	14,6	42
op'-Dicofol	45	113	7 (1)	9,1	20,2	30,4	67
Dicofol	45	113	9 (0)	5,5	12,2	11,5	67
PCB 28	45	113	15 (0)	6,8	15,1	20,8	46
PCB 52	38	95	14 (0)	6,3	16,6	17,2	46
PCB 101	32	80	15 (1)	3,1	17,5	11,2	35
PCB 153	30	75	15 (1)	4,3	14,3	11,0	37
PCB 138	26	65	15 (0)	3,7	14,2	12,8	42
PCB 180	26	65	14 (1)	6,2	23,8	11,1	43
Trung bình	37	98		4,7 ^c		15,6 ^{co}	

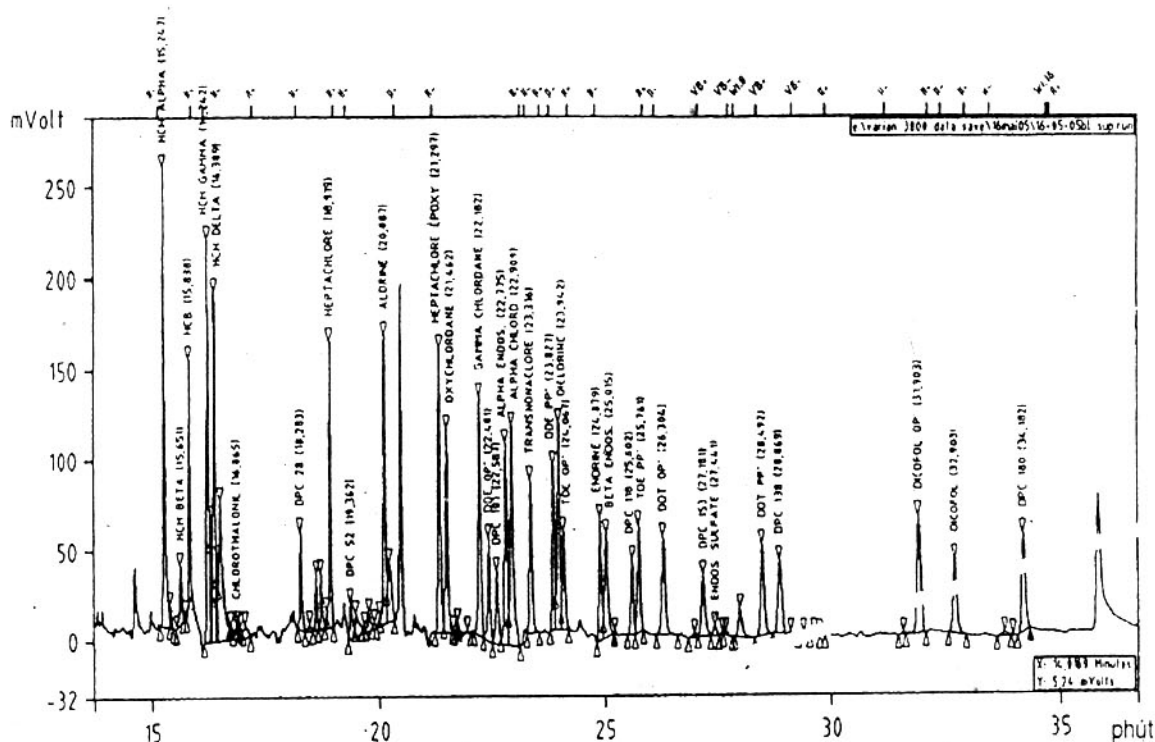
^a Giá trị bổ sung là 40 µg/kg chất béo.

^b Tổng số phòng thử nghiệm tham gia là 15. Số phòng thử nghiệm ngoại lệ được chỉ ra trong phần ngoặc đơn.

^c Tỷ lệ $s_R/s_r > 3$ do tính phức tạp của phương pháp và sự khác biệt về kinh nghiệm vận hành^[4].

Phụ lục B
(Tham khảo)

Ví dụ về sắc kí đồ



Hình B.1 – Sắc kí chuẩn điển hình của các loại thuốc bảo vệ thực vật clo hữu cơ và PCB

Bảng B.1 – Thời gian lưu của các hợp chất

(Các hợp chất có thời gian lưu dài nhất không được đưa ra trong sắc kí đồ)

Hợp chất	Thời gian lưu min
α -HCH	15,200
β -HCH	15,651
HCB	16,838
γ -HCH	16,242
Heptaclo	18,919
Aldrin	20,087
Heptaclo epoxit	21,297
Oxycloclodan	21,462
γ -clodan	22,182
<i>op'</i> -DDE	22,401
α -endosulfan	22,775
α -clodan	22,909
<i>pp'</i> -DDE	23,827
Dieldrin	24,942
<i>op'</i> -TDE	24,067
Endrin	24,879
<i>pp'</i> -TDE	25,761
<i>op'</i> -DDT	26,304
<i>pp'</i> -DDT	28,492
<i>op'</i> -Dicofol	31,903
Dicofol	32,693
PCB 28	18,283
PCB 52	19,362
PCB 101	22,587
PCB 118	25,602
PCB 153	27,181
PCB 138	25,602
PCB 180	34,182
λ -Cyhalothrin	37,169
Permethrin	40,277
Cyfluthrin (các pic từ 1 đến 4) ^a	42,118 đến 42,988
Cypermethrin (các pic từ 1 đến 4) ^a	43,227 đến 44,060
Fenvalerat (các pic từ 1 đến 2) ^b	46,544 đến 47,320
Deltamethrin	49,120

^a Bốn pic. Số liệu đưa ra là thời gian lưu tối thiểu và tối đa.
^b Hai pic. Số liệu đưa ra là thời gian lưu tối thiểu và tối đa.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
 - [2] TCVN 7082-2 (ISO 3890-2), Sữa và sản phẩm sữa – Xác định dư lượng hợp chất clo hữu cơ (thuốc trừ sâu) – Phần 2: Phương pháp làm sạch dịch chiết thô và thử khẳng định.
 - [3] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
 - [4] BORDET, F., INTHAVONG, D. and FREMY, J.-M. Interlaboratory study of a multiresidue gas chromatographic method for determination of organochlorine and pyrethroid pesticides and polychlorobiphenyls in milk, fish, eggs and beef fat, J. ofAOAC Intl., Vol. 85, 2002, 6, pp. 1398-1409
-