

**TCVN 6652 : 2000  
ISO 13877 : 1998**

**CHẤT LƯỢNG ĐẤT – XÁC ĐỊNH CÁC  
HYDROCACBON THƠM ĐA NHÂN – PHƯƠNG  
PHÁP SỬ DỤNG SẮC KÝ LỎNG CAO ÁP**

*Soil quality – Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons -  
method using high - performance liquid chromatography*

**HÀ NỘI -2000**

## **Lời nói đầu**

TCVN 6652 : 2000 hoàn toàn tương đương với ISO 13877 : 1998.

TCVN 6652 : 2000 do Ban Kỹ thuật Tiêu chuẩn TCVN/TC 190  
Chất lượng đất biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất  
lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

## Chất lượng đất - Xác định các hydrocacbon thơm đa nhân - Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng cao áp.

*Soil quality - Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons -  
Method using high - performance liquid chromatography*

**Cảnh báo :** một số hợp chất hydrocacbon thơm đa nhân (PAH) có khả năng gây ung thư cao, vì vậy phải rất cẩn thận khi xử lý. Không để các chất rắn, dung môi chiết và dung dịch PAH tiêu chuẩn tiếp xúc với cơ thể. PAH có thể bay hơi cùng với dung môi và đọng lại bên ngoài chai đã đóng nút, do đó khi vận chuyển tất cả các chai lọ có chứa dung dịch PAH cần luôn luôn sử dụng găng tay chịu được dung môi và tốt nhất là dùng một lần. Chai lọ đựng dung dịch PAH nên bảo quản để đứng trong cốc thủy tinh để chứa được chất đổ ra trong trường hợp đổ vỡ. Sự ô nhiễm PAH ở chai lọ có thể được phát hiện bằng cách chiếu ánh sáng có bước sóng 366 nm.

PAH ở thể rắn là nguy hiểm nhất và gây ra hiểm họa bụi tinh thể của chúng trở nên bị tích tĩnh điện. Làm việc với những chất này chỉ ở những nơi có sẵn các phương tiện phù hợp (ví dụ, tủ hút thích hợp, quần áo bảo hộ, mặt nạ che bụi...). Cần nhấn mạnh rằng các dung dịch chuẩn phải được chuẩn bị tập trung ở các phòng thí nghiệm được trang bị thích hợp hoặc mua từ những người cung cấp chuyên chuẩn bị những dung dịch này.

Thải bỏ dung dịch chứa PHA theo phương pháp phù hợp đối với các chất thải độc.

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả hai phương pháp định lượng hydrocacbon thơm đa nhân (PAH) trong đất.

### 2 Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 6661-1 : 2000 (ISO 8466-1) - Chất lượng nước – Hiệu chuẩn và đánh giá các phương pháp phân tích và ước tính các đặc tính hiệu quả. Phần 1 - Đánh giá thống kê hàm hiệu chuẩn tuyến tính bậc 2.

TCVN 6662-2 : 2000 (ISO 8466-2) - Chất lượng nước – Hiệu chuẩn và đánh giá các phương pháp phân tích và ước tính các đặc tính hiệu quả. Phần 2 – Phương pháp hiệu chuẩn cho hàm hiệu chuẩn thứ cấp không tuyến tính bậc 2.

## **TCVN 6652 : 2000**

ISO 10381-5 - Chất lượng đất - Lấy mẫu - Phần 5 - Hướng dẫn trình tự khảo sát sự ô nhiễm đất ở các khu đất đô thị và công nghiệp.

TCVN 6647 : 2000 (ISO11464) - Chất lượng đất - Xử lý sơ bộ mẫu để phân tích lý - hoá.

TCVN 6648 : 2000 (ISO 11465) - Chất lượng đất - Xác định hàm lượng chất khô và nước trên cơ sở khối lượng - Phương pháp khối lượng.

ISO 14507 - Chất lượng đất - Xử lý sơ bộ mẫu để xác định các chất gây ô nhiễm hữu cơ.

### **3 Nguyên tắc**

Đất tươi được chiết bằng axêton (phương pháp A) hoặc được chiết bằng toluen sau khi làm khô (phương pháp B).

Chú thích 1 - Khi áp dụng phương pháp B, sự mất naphtalen có thể xảy ra khi phơi khô đất không khí.

Phân tích dịch chiết được tiến hành bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Dùng detector tử ngoại hoặc detector huỳnh quang có các bước sóng kích thích và phát xạ. Việc định lượng được tiến hành bằng cách ghi lại những tín hiệu của detector (diện tích hoặc chiều cao) bằng phương pháp ngoại chuẩn.

16 hợp chất được liệt kê ở 5.11 (gọi là các chất ô nhiễm chính - EPA PAH[5]) có thể được xác định với PAH khác, tính hiệu lực của phương pháp còn phải được chứng minh.

Chú thích 2 - Acenaphthylen không thể đo được bằng phép đo huỳnh quang.

### **4 Thiết bị, dụng cụ**

#### **4.1 Khái quát**

**4.1.1 Cân phân tích**, với độ chính xác 0,01 g.

**4.1.2 Cân phân tích**, với độ chính xác 0,01 mg.

Chú thích - Cân này chỉ nên sử dụng cho việc chuẩn bị mẫu chuẩn.

**4.1.3 Buồng làm khô**, theo TCVN 6648 : 2000 (ISO 11465).

#### **4.2 Thiết bị dùng cho việc chuẩn bị mẫu (phương pháp A)**

**4.2.1 Bình hình nón**, dung tích 500 ml.

**4.2.2 Phễu lọc**, dung tích 1000 ml.

**4.2.3 Máy lắc**, chuyển động ngang với 200 lần lắc/phút.

**4.2.4 Máy cô đặc**, ví dụ máy Kuderua - Danish hoặc máy li tâm.

**4.2.5 Nồi cách thủy**, có thể điều chỉnh nhiệt độ đến 100°C.

**4.2.6 Cột sắc ký**, để tinh chế, đường kính trong 1 cm.

### **4.3 Thiết bị dùng cho việc chuẩn bị mẫu (phương pháp B)**

**4.3.1 Soxhlet**, khoảng 30 ml, có ống lót bằng giấy hoặc sợi thủy tinh, bình có đáy tròn dung tích 100 ml và bình ngưng.

Chú thích - Nếu các giá trị của mẫu trắng không thể bị loại trừ, trước khi sử dụng phải rửa sạch các ống lót bằng toluen.

**4.3.2 Bình định mức**, dung tích 50 ml và 100 ml.

### **4.4 Thiết bị dùng để phân tích**

**4.4.1 Máy sắc ký lỏng cao áp**, được trang bị theo yêu cầu hoặc với một hệ thống phát hiện tia tử ngoại (với bước sóng biến đổi) hoặc với một hệ thống phát hiện bằng huỳnh quang (với sự lựa chọn tự do các bước sóng kích thích và phát xạ). Nếu sử dụng hệ thống phát hiện bằng huỳnh quang thì cần loại bỏ khí (bỏ oxi) hoặc pha động, ví dụ bằng helium.

**4.4.2 Cột tách có cột bảo vệ**, sử dụng các vật liệu pha đảo để phân tích PAH.

Chú thích - Trong phân tích đất, việc sử dụng cột bảo vệ giúp cho việc nâng cao tuổi thọ của cột phân tích.

**4.4.3 Thiết bị ghi, bộ tích hợp máy tính nối với máy in/máy vẽ điểm**. Khoảng đo phù hợp với tín hiệu đầu ra của HPLC, tốt nhất là có biểu thị trên màn hình và khả năng hiệu chỉnh đường chuẩn liên tiếp.

## **5 Thuốc thử**

### **5.1 Thuốc thử chung**

Những hoá chất thoả mãn yêu cầu cho việc phân tích chất tồn dư và không chứa PAH là phù hợp cho việc chuẩn bị mẫu. Việc xác định giá trị mẫu trắng định kỳ phải được tiến hành để kiểm tra độ tinh khiết của hoá chất, thông thường sau khi đưa vào những loại dự trữ mới. Các loại dung môi có chứa PAH hoặc phải được thay thế bằng các loại dung môi không có PAH hoặc phải được làm tinh khiết bằng cách chưng cất (ví dụ qua một cột vigreux dài 1 m).

**5.2 Axeton**, loại p.a hoặc loại để phân tích chất tồn dư (A).

**5.3 Ete dầu hoả** (giải nhiệt độ sôi từ 40°C đến 60°C), loại p.a hoặc loại để phân tích chất tồn dư (A).

## **TCVN 6652 : 2000**

**5.4 Toluene**, loại p.a hoặc loại phân tích tồn dư (B).

**5.5 Natri sunfat** (khan), loại p.a.

**5.6 Nhôm oxit**, kiềm hoặc trung tính, diện tích bề mặt riêng đạt 200m<sup>2</sup> /g, hoạt tính cao loại I theo Brockmann.

**5.7 Metanol hoặc axetonitrin**, loại tinh khiết dùng cho HPLC.

### **5.8. Nước**

**5.8.1 Để chiết (A): nước cất 2 lần hoặc nước loại bỏ ion.**

**5.8.2 Dùng cho pha động của HPLC: nước siêu tinh khiết** (loại tinh khiết dùng cho HPLC).

**5.9 Heli**, độ tinh khiết thích hợp cho việc loại bỏ hình thành khí của các dung môi (xem 4.4.1).

**5.10 Nitơ**, độ tinh khiết thích hợp cho việc giảm thể tích.

Chú thích - Phải kiểm tra để đảm bảo các tạp chất không lẫn vào, ví dụ khi lắp đặt các thiết bị đường ống dẫn bằng chất dẻo.

### **5.11 Chất đối chiếu**

Chú thích - Chất đối chiếu và dung dịch chuẩn PHA chỉ có sẵn được giới hạn ở một số các nhà cung cấp.

<b>Số</b>	<b>Chất</b>	<b>Số CAS</b>
1	Naphthalen	91 - 20 - 3
2	Acenaphthylen	208 - 96 - 8
3	Acenaphthen	83 - 32 - 9
4	Fluoren	86 - 73 - 7
5	Phenanthren	85 - 01 - 8
6	Anthracen	120 - 12 - 7
7	Flouranthen	206 - 44 - 0
8	Pyrene	129 - 00 - 0
9	Benz[a]anthracen	56 - 55 - 3
10	Chrysen	218 - 01 - 9
11	Benzo[b]fluoranthen	205 - 99 - 2
12	Benzo[k]fluoranthen	207 - 08 - 9
13	Benzo[a]pyren	50 - 32 - 8
14	Dibenz[ah]anthracen	53 - 70 - 3
15	Benzo[gh]perylene	191 - 24 - 2
16	Indeno[1,2,3-cd]pyren	193 - 39 - 5.

## 5.12. Dung dịch chuẩn

**Cảnh báo: Không được chuẩn bị các chuẩn PAH từ vật liệu rắn trừ khi có sẵn phương tiện phù hợp. Sử dụng các kỹ thuật xử lý thích hợp.**

Cân khoảng 5 mg của mỗi chất đối chiếu (5.11 ) với độ chính xác 0.01 mg và cho vào bình định mức 100 ml. Cho metanol hoặc axetonitrin (5.7) tới vạch. Từ dung dịch gốc này dùng pipet đã hiệu chuẩn lấy 1 ml, với độ chính xác 1 %, cho vào một ampun nhỏ có thể bịt ống lại bằng cách nung chảy. Sau khi làm lạnh bằng nitơ lỏng, bịt ampun lại bằng cách nung chảy. Bảo quản ampun trong tủ lạnh chống tia lửa, chất chứa được để ổn định trong điều kiện này ít nhất là 1 năm.

Để sử dụng như một dung dịch hiệu chuẩn, chuyển lượng chất chứa trong ampun vào bình định mức 100 ml và bù thêm bằng axetonitrin (phương pháp A) hoặc toluen (phương pháp B). Nếu cho rằng nồng độ PAH trong đất quá thấp, và nếu sử dụng detector huỳnh quang thì chuẩn bị dung dịch hiệu chuẩn bằng axetonitrin và pha loãng thêm với tỷ lệ 1:10.

Chú thích - Nên sử dụng các chuẩn sẵn có trên thị trường trừ khi phòng thí nghiệm có nhiều kinh nghiệm xử lý các vật liệu nguy hiểm này.

## 5.13 Những chuẩn đã được chuẩn bị sẵn trên thị trường

Những dung dịch gốc ví dụ như axetonitrin có sẵn trên thị trường. Rất khuyến khích sử dụng những dung dịch này.

Để chuẩn bị dung dịch hiệu chuẩn, pha loãng dung dịch gốc theo 5.12.

## 6 Lấy mẫu, bảo quản và xử lý sơ bộ mẫu

Lấy mẫu được tiến hành theo ISO 10381-5 kết hợp với phòng phân tích. Giữ đất trong hộp không ảnh hưởng đến hàm lượng PAH của mẫu, ví dụ như thủy tinh hoặc kim loại. Khối lượng mẫu khoảng 500 g đến 1000 g.

Chú thích 1 - Bản báo cáo lấy mẫu chi tiết cần có kèm với mẫu.

Thông tin chi tiết về bảo quản và xử lý sơ bộ mẫu có thể xem ở ISO 14507.

Đá và vật liệu khác có đường kính lớn hơn 10 mm và rõ ràng không bị nhiễm bẩn nên được tách ra, cân và ghi lại kết quả. Những hạt lớn bị nhiễm bẩn nên được giảm cỡ và phân tích riêng rẽ hoặc cùng với vật liệu mẫu mịn hơn. Trong báo cáo kết quả, phải ghi rõ quá trình tiến hành để xác minh tình trạng ban đầu của mẫu và chỉ rõ phần nào kết quả phân tích có liên quan.

Để hạn chế đến mức tối thiểu sự phân huỷ, cần giữ mẫu ở chỗ tối và tốt nhất là ở nhiệt độ lạnh ( $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

## **TCVN 6652 : 2000**

Chú thích 2 - Mẫu phải được phân tích càng nhanh càng tốt. Sự phân huỷ mẫu do vi sinh vật có thể xảy ra đặc biệt khi khảo sát đất nông nghiệp.

Nếu sử dụng phương pháp B, phơi khô mẫu trong không khí trước khi phân tích, theo TCVN 6647 : 2000 ISO11464. Nếu đất có xu hướng kết thành khối trong quá trình phơi thì lại giã nhỏ trong cốc.

Mẫu được rây đến cỡ hạt 2 mm theo TCVN 6647 : 2000 (ISO11464). Tiến hành xác định và ghi lại phần trăm khối lượng cấp hạt có đường kính < 2 mm và > 2 mm.

Chú thích 3 - Sử dụng rây là tốt nhất.

Lấy 1 mẫu từ cấp hạt nhỏ hơn 2 mm theo TCVN 6647 : 2000 (ISO11464).

Nếu đất có hàm lượng chất nền cao ( ví dụ tro, gạch) hoặc các chất nền này cần được phân tích, thì nghiền toàn bộ mẫu tới cỡ hạt nhỏ hơn 2 mm. Quá trình này thường được chọn khi phải khảo sát đất lấy từ những vùng công nghiệp bỏ hoang.

## **7 Cách tiến hành**

### **7.1 Chiết theo phương pháp A: đất không ô nhiễm hoặc ô nhiễm nhẹ.**

#### **7.1.1 Tiến hành chiết**

Cân khoảng 20 g đất ( 4.2.1) chính xác đến 0,1 g cho vào bình tam giác dung tích 500 ml. Thêm 200 ml axeton và đóng bình lại. Lắc mạnh bằng máy lắc (4.2.3) trong vòng 15 phút.

Thêm 100 ml ete dầu hoả để trộn đất và axeton, và lắc thêm 15 phút.

Sau khi để lắng, gạn phần nổi trên bề mặt vào phễu lọc dung tích 1000 ml (4.2.2). Loại bỏ axeton và các hợp chất phân cực từ phần nổi đó bằng cách lắc 2 lần, mỗi lần với 800 ml nước. Thải bỏ nước.

Làm khô dịch chiết còn lại bằng natri sunphat khan, chuyển dịch chiết đã được làm khô vào một máy cô (4.2.4) và giảm thể tích đến khoảng 10 ml. Ở giai đoạn này nhiệt độ của nồi cách thuỷ phải giữ trong khoảng 40°C đến 60°C. Cô ở nhiệt độ phòng đều khoảng 1 ml bằng một luồng khí nitơ nhẹ.

#### **7.1.2 Tiến hành tinh chế**

Tùy thuộc vào mục đích khảo sát và giới hạn yêu cầu của sự phát hiện mà có thể cần phải tinh chế. Nếu cần thì tiến hành như sau:

Sấy khô nhôm oxit (5.6) qua đêm ở nhiệt độ 105°C. Làm nguội trong bình hút ẩm và cứ mỗi 89 g nhôm oxit thì thêm 11 g nước. Chuyển vào chai nút chặt. Lắc đến khi tất cả phần rắn bị phân tán và để cho nhôm oxit cân bằng trong ít nhất 16 giờ trước khi sử dụng.



Kiểm tra đều đặn hoạt tính của nhôm oxit đã chuẩn bị bằng cách tinh chế dung dịch chuẩn.

Chuẩn bị một cột hấp phụ bằng cách cân ( $2,0\text{g} \pm 0,1\text{ g}$ ) nhôm oxit không hoạt tính vào một ống sắc ký (4.2.6), lắp ở đáy một nút nhỏ làm bằng bông thủy tinh. Thêm vào đỉnh cột khoảng 1 cm natri sunphat khan.

Chú thích 1 - Cũng có thể sử dụng những loại cột dùng một lần có sẵn trên thị trường nếu thấy tương đối phù hợp.

Chuyển dịch chiết đã cô đặc tới đỉnh cột bằng pipet Pasteur. Rửa ống cô 2 lần, với 1 ml ete dầu hoả và thêm dịch rửa vào cột. Rửa giải hấp bằng 8 ml ete dầu hoả và tập trung hết phần nước rửa giải hấp đó vào ống thử hiệu chuẩn có đầu chia độ, ví dụ ống cô Kuderna -Danish. Thêm khoảng 0.8 ml axetonitril và cô đặc ở nhiệt độ phòng bằng một luồng khí nitơ nhẹ cho đến khi toàn bộ ete dầu hoả bay hết, nghĩa là cho đến khi đạt tới thể tích 0,8 ml. Thêm axetonitril tới vạch 1,0 ml.

Chú thích 2 - Trường hợp cần thiết ở giai đoạn này có thể thêm 20  $\mu\text{l}$  dung dịch chuẩn nội. Chuẩn nội chỉ được sử dụng cho việc kiểm tra thời gian bảo quản. Một dung dịch chuẩn nội bộ phù hợp được chuẩn bị bằng cách hoà tan 6-methylchrysen trong axetonitrin cho đến khi đạt tới nồng độ 15  $\mu\text{g/ml}$ .

## **7.2 Chiết theo phương pháp B : đất bị ô nhiễm:**

Cân 15 g đến 30 g đất khô trong không khí chính xác đến 0,1 g, cho vào một ống nhỏ và chiết trong dụng cụ Soxhlet (4.3.1) trong 4 h đến 8 h bằng 50 ml đến 100 ml toluen.

Xác định thời gian chiết thực tế cho mỗi trường hợp riêng biệt. Cá biệt, với những loại đất có lượng lớn vật liệu hạt mịn và bị ô nhiễm cao, cần thời gian chiết lâu hơn.

Cho dịch chiết vào bình định mức, thêm toluen tới 50 ml hoặc 100 ml và lấy ước số để phân tích.

## **7.3 Phân tích bằng HPLC**

### **7.3.1 Nhận định chung**

Những điều kiện tiến hành phân tích bằng HPLC có thể rất khác nhau. Để đưa ra những lời khuyên cho người sử dụng tiêu chuẩn này, có hai ví dụ về phân tích bằng HPLC được trình bày ở 7.3.2. Tuy nhiên, những điều kiện thao tác thích hợp phải được lựa chọn tùy theo thiết bị và cột được sử dụng.

Sắc ký đồ của các mẫu thực cho thấy nhiều đỉnh hơn là sắc ký đồ của riêng PAH. Vì vậy việc tối ưu hoá những điều kiện sắc ký không nên chỉ dựa vào dung dịch chuẩn.

Chú thích - Nhìn chung, yêu cầu tối thiểu là 25 phút để đạt được sự phân ly thích hợp của PAH và các thành phần khác trong mẫu.

## TCVN 6652 : 2000

Trước khi sử dụng các cột mới, kiểm tra sự phân ly và trình tự của giải hấp trong hỗn hợp hiệu chuẩn.

### 7.3.2 Ví dụ về các điều kiện thao tác HPLC

#### 7.3.2.1 Khái quát

Hai ví dụ về các điều kiện thao tác được trình bày, đó là dùng phép đo tia tử ngoại (hệ diốt) và huỳnh quang để phát hiện, ở cùng điều kiện của hai hệ thống riêng biệt.

Những thông số sau đây được coi là có lợi cho việc phân tích đất:

Kim tiêm	kim tiêm tự động
Thể tích tiêm	10 $\mu$ l
Cột:	pha đảo 250 mm x 4,6 mm, vật liệu C18 để phân tích PAH, cỡ hạt 5 $\mu$ m
Pha động:	methanon/nước
Tốc độ chảy:	1ml/phút
Gradient:	50% methanol, trong 20 phút đạt đến 100% sau đó 10 phút đạt đến isocratic
Thiết bị ghi:	hệ thống dữ liệu phòng thí nghiệm.

Chú thích 1 - Dùng toluen làm dung môi dẫn đến việc tăng bề rộng giải của chất rửa giải sớm. Do đó thể tích tiêm thường không nên vượt quá 10  $\mu$ l.

Chú thích 2 - Đối với một số lô vật liệu được sử dụng, đã chỉ ra rằng trong những điều kiện đã cho thì dibenz[ah]anthracen và benzo[ghi]perylene không bị phân ly. Tăng phân ly bằng cách thêm 10 % axetonitrin vào pha động.

#### 7.3.2.2 Qui trình sử dụng phép đo tia tử ngoại ( hệ diode) để phát hiện

Trong ví dụ này sử dụng detector hệ diode (DAD).Tuy nhiên kết quả so sánh có thể thu được bằng một detector tia tử ngoại thông thường với bước sóng biến đổi.

Detector hệ diode có khả năng lựa chọn các bước sóng thích hợp trong khi giải thích kết quả mà không gặp phải khó khăn gì, vì chỉ cần dịch chuyển các đường chuẩn khi bước sóng được thay đổi một cách cơ học trong quá trình đo.

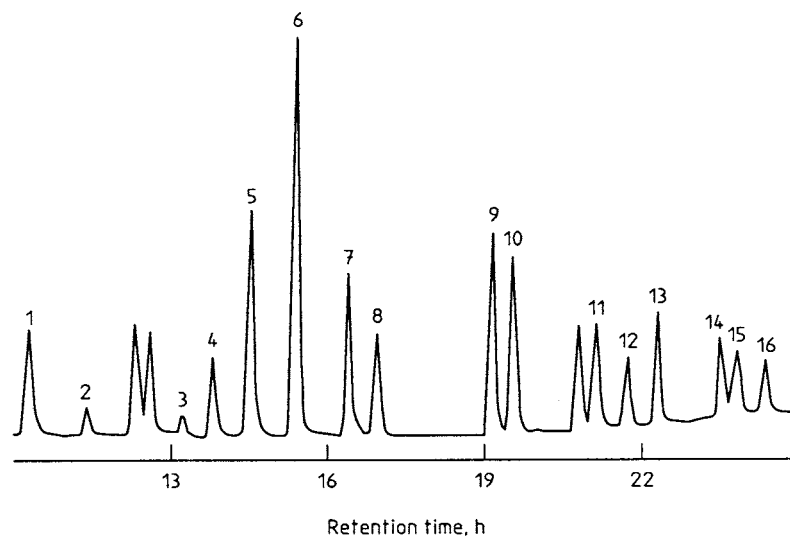
Thuận lợi thứ hai là với detector hệ diode, việc xác nhận kết quả có thể thu được từ cùng một phép đo, ví dụ bằng việc sử dụng các bước sóng khác nhau và /hoặc kiểm tra toàn bộ giải quang phổ.

Phép phát hiện bằng tia tử ngoại có thuận lợi của một dãy tuyến tính rộng. Điều bất lợi là độ nhạy thấp hơn so với detector huỳnh quang và cả độ chọn lọc thấp hơn. Detector hệ diode cho phép chuyển bước sóng trong quá trình đo. Điều này được sử dụng như sau:

Detector: detector hệ diode (UV)  
 Bước sóng: 280 nm (chuyển trước fluorene)  
 254 nm (chuyển trước fluoranthene)  
 270 nm.

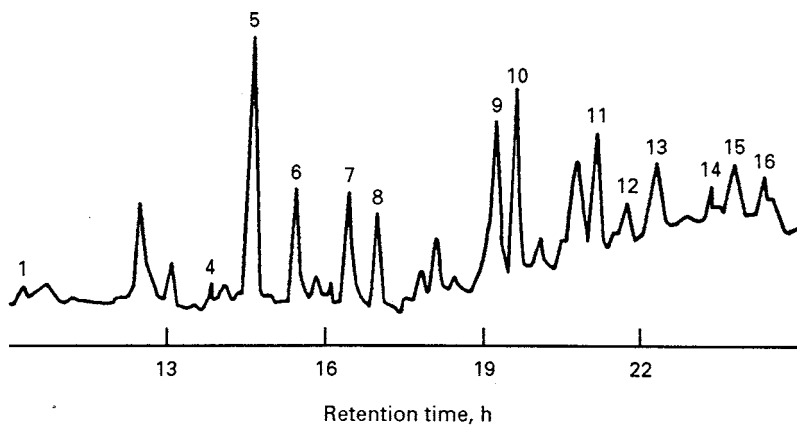
Trong những điều kiện này, có thể xác định được tất cả 16 thành phần được liệt kê ở 5.11. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn được thể hiện ở hình 1. Sắc ký đồ dung dịch chiết của đất được thể hiện ở hình 2.

Chú thích - Dung dịch chuẩn trong hình 1 bao gồm các hợp chất khác nhau không nằm trong phạm vi chi tiết của tiêu chuẩn này.



Chú thích - Để đánh số các đỉnh tham khảo các hợp chất liệt kê ở 5.11.

**Hình 1 - Sắc ký đồ PAH của dung dịch chuẩn (DAD)**



Chú thích - Để đánh số các đỉnh xem các hợp chất liệt kê ở 5.11.

**Hình 2 - Sắc ký đồ PAH của dịch chiết từ đất (DAD)**

### 7.3.2.3. Qui trình sử dụng detector huỳnh quang để phát hiện

## TCVN 6652 : 2000

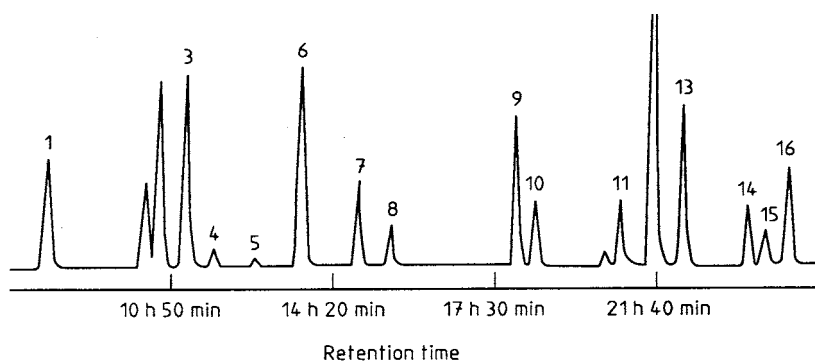
Detector huỳnh quang (FLD) có ưu điểm là độ nhạy và tính chọn lọc cao. Những ưu điểm này chỉ tính đến trong trường hợp lựa chọn tự do các bước sóng kích thích và phát xạ, và nếu những bước sóng này có thể chuyển được trong sắc ký đồ. Nhược điểm là ở các nồng độ cao dãy tuyến tính bị vượt quá khá nhanh.

Các thông số vận hành thay đổi theo phạm vi ứng dụng và theo các nhà sản xuất. Các điều kiện được sau đây đã được coi như là có lợi :

Detector :	detector huỳnh quang
Các bước sóng:	kích thích /phát xạ, 218 nm /332 nm (chuyển trước phenanthren) 260 nm/420 nm (chuyển trước benzo[b]fluoranthren) 290 nm/420 nm (chuyển trước indeno[1,2,3 - cd]pyren) 248 nm/500 nm

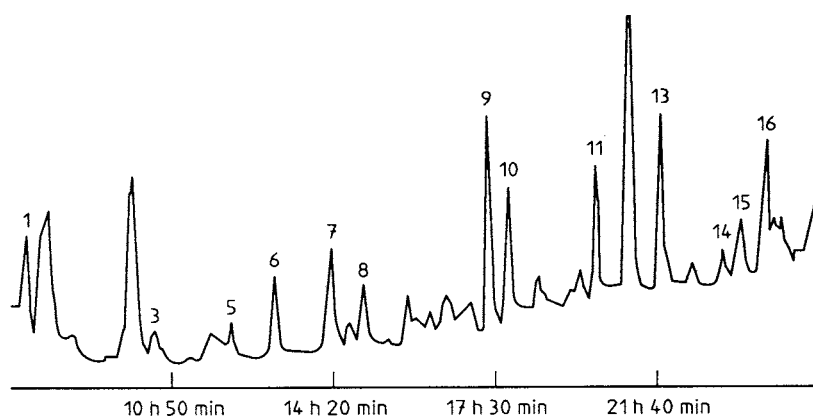
Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn được thể hiện ở hình 3. Sắc ký đồ của dịch chiết đất được thể hiện ở hình 4.

Chú thích - Acenaphthylen không thể xác định được bằng detector huỳnh quang.



Chú thích - Để đánh số các đỉnh tham khảo các hợp chất liệt kê ở 5.11.

**Hình 3 - Sắc ký đồ PAH của dung dịch chuẩn (FLD)**



Chú thích - Để đánh số các đỉnh tham khảo các hợp chất liệt kê ở 5.11

**Hình 4 - Sắc ký đồ PAH của dịch chiết đất (FLD)**

#### 7.4 Xây dựng chức năng hiệu chuẩn và kiểm tra để xác nhận giá trị đo

Sắc ký đồ HPLC biểu hiện thông tin định lượng và định tính. Một chất được đặc trưng bởi thời gian lưu của nó. Chỉ định một tín hiệu đo (đỉnh) cho một chất cụ thể được tiến hành bằng cách so sánh với các chất đối chiếu.

Chiều cao của đỉnh hay diện tích của pic tỷ lệ với khối lượng của chất được tiêm vào trong phạm vi khoảng tuyến tính.

Chú thích 1 - Việc chọn các cặp bước sóng và số lần chuyển đổi cần có sự cân nhắc sao cho giữa phép phát hiện tối ưu và điều kiện thực hành. Trong các ví dụ đưa ra, số lần chuyển phải hạn chế càng ít càng tốt. Đối với các cặp lựa chọn xem phụ lục A.

Để định lượng một PAH đơn, cần phải ghi đúng diện tích pic được qui định. Việc phân tách các đỉnh không đầy đủ, sự không đối xứng lớn của các đỉnh ( tạo đuôi), và các đường chuẩn không bằng phẳng (nhiều loạn, nền biến động phức tạp, di chuyển mạnh đường chuẩn) gây khó khăn cho sự tập hợp. ở các diện tích quyết định của sắc ký đồ, phải chú ý giữ cho sự thiết lập đường chuẩn của bộ tích phân được đúng đắn để đánh giá. Các bộ tích phân và các hệ thống dữ liệu hiện đại bao gồm việc hiệu chỉnh sau hành trình của các đường chuẩn.

## **TCVN 6652 : 2000**

Chiều cao của đỉnh cũng có thể được xét đến để định lượng, đặc biệt trong trường hợp phân tách không hoàn chỉnh các chất đơn. Qui trình này là có lợi trong phân tích đất.

Trước khi bắt đầu cũng như trong quá trình phân tích, hệ thống HPLC phải được hiệu chuẩn. áp dụng chức năng hiệu chuẩn theo TCVN 6661 – 1 : 2000 (ISO 8466-1 hoặc TCVN 6662 – 2 : 2000 (ISO 8466-2) bằng việc chuẩn bị và đo ít nhất 6 độ pha loãng từ dung dịch gốc. Đồ thị của kết quả hiệu chuẩn phải là đường tuyến tính.

Trong thực hành hàng ngày, kiểm tra sự hiệu chuẩn với một nồng độ là đủ. Khi sử dụng dụng cụ lấy mẫu tự động, cần phải kiểm tra sau 7 đến 10 lần tiêm, trong khi tiêm bằng tay thì chỉ 2 lần một ngày là đủ.

Chú thích 2 - Nếu hệ thống HPLC không được sử dụng liên tục, nó sẽ phải được kiểm tra trong điều kiện hoạt động trước khi bắt đầu hiệu chuẩn và phân tích. Kinh nghiệm cho thấy rằng, phụ thuộc vào hệ thống được áp dụng lần tiêm đầu tiên và đôi khi lần tiêm thứ 2 dung dịch hiệu chuẩn phải được loại bỏ, để sao cho lần tiêm thứ 2 hoặc thứ 3 có thể được sử dụng để kiểm tra hệ thống HPLC.

Chú thích 3 - Trong một loạt các thao tác hoặc với thời gian thao tác dài, sự sai lệch của thời gian lưu có thể xuất hiện. Thiết bị hiện đại được trang bị phần mềm thích hợp có thể bù trừ sự sai lệch này một cách tự động nhờ việc sử dụng hỗn hợp hiệu chuẩn giữa các mẫu.

Khi phân tích mẫu, các tín hiệu của mỗi thành phần phải nằm trong dãy tuyến tính của hệ thống phát hiện đã sử dụng. Nếu không phải là trường hợp này, chuẩn bị pha loãng dịch chiết của mẫu và phân tích lại.

Tiến hành định lượng bằng cách sử dụng phương pháp các chuẩn ngoại. Khi hoàn thành việc thực hiện phương pháp phân tích, các hoá chất, dung môi và thiết bị phải được kiểm tra sự không có mặt PAH, bắt đầu bằng cách chiết các ống lót rỗng. Các giá trị mẫu trắng không được vượt quá 10 % của giới hạn áp dụng thấp nhất. Các giá trị của mẫu trắng không được đưa vào tính toán.

Chú thích 4 - Cố gắng giữ các giá trị của mẫu trắng nhỏ hơn 10% giới hạn dưới.

Các giá trị mẫu trắng trong giải nồng độ PAH tồn tại trong các mẫu thực là không được chấp nhận. Nguồn gốc của chúng phải được xác định và loại bỏ bằng việc kiểm tra từng bước một của qui trình.

Trong trường hợp không chắc chắn, nên xác nhận kết quả đã nhận được. Điều này có thể thực hiện bằng việc sử dụng bước sóng khác nhau để hấp thụ tia tử ngoại; hoặc một sự kết hợp khác của các bước sóng với kỹ thuật phát hiện bằng detector huỳnh quang (xem phụ lục A) dựa trên các nguyên tắc khác nhau, ví dụ GC-MS cũng có thể được sử dụng cho việc xác nhận.

## **8. Tính toán kết quả**

Thừa nhận rằng diện tích pic hoặc độ cao đỉnh dự kiến nằm trong giải đường tuyến tính đo được, kết quả

định lượng của một chất được nhận dạng có thể nhận được bằng cách sử dụng công thức sau:

$$C_1 = \frac{A_i \cdot f_i \cdot V}{m}$$

trong đó:

- $C_i$  là nồng độ chất  $i$  của mẫu, tính bằng mg/kg đất khô;
- $A_i$  là diện tích đỉnh hoặc chiều cao đỉnh của chất  $i$  trên sắc ký đồ;
- $f_i$  là hệ số hiệu chỉnh ( hệ số đáp ứng) của chất  $i$ , tính bằng  $\mu\text{g/ml}$ ;
- $V$  là thể tích của dịch chiết, tính bằng ml;
- $m$  khối lượng đất khô, tính bằng g.

Kết quả được biểu thị bằng mg/kg đất khô. Ở các nồng độ nhỏ hơn 1 mg/kg, các kết quả phải được biểu thị bằng 2 số thập phân, và ở các nồng độ cao hơn phải được biểu thị đến 3 chữ số có nghĩa. Khối lượng đất khô được xác định trên mẫu riêng rẽ theo TCVN 6648 : 2000 (ISO 11465).

## 9. Các đặc trưng của tính năng

### 9.1 Khái quát

Đất là một thực thể phức tạp và bí ẩn. Bởi vì sự phân bố không đồng nhất của PAH và các chất ô nhiễm khác trong đất, cho nên làm đồng nhất mẫu hoàn toàn là rất khó. Thông thường nên tránh việc làm giảm kích thước của đất bằng cơ học, đặc biệt là nghiền nhỏ, một mặt vì các nguy cơ ô nhiễm và ô nhiễm chéo, mặt khác vì những tổn thất khi xử lý (qua việc tăng nhiệt độ và diện tích bề mặt). Trong một số trường hợp, việc giảm kích thước là không thể tránh khỏi.

### 9.2. Độ lệch chuẩn của việc phát hiện bằng tia cực tím ( hệ diode)

Trong các tiểu mục sau, đã liệt kê các độ lệch chuẩn và độ lặp lại do kết quả của một loạt phép đo bao gồm toàn bộ qui trình theo các điều kiện ở 7.2 (phương pháp B) và 7.3.

Mẫu được nghiền trước khi phân tích và làm đồng nhất nhanh trong 24 giờ.

Bảng 1 liệt kê các đặc trưng của tính năng ở các nồng độ cao hơn, dựa vào 5 phép xác định của toàn bộ qui trình.

Các độ lệch chuẩn nằm từ 4% đến 10%.

**Bảng 1 - Các giá trị trung bình, ( $\bar{x}$ ), và các độ lệch chuẩn, S, ở các nồng độ giữa 2 mg/kg và 30 mg/kg**

(thử trong phòng thí nghiệm)

Hợp chất	$\bar{X}$ mg/kg	S mg/kg	S <sub>rel</sub> %
Naphthalen	không có		
Fluorene	0,5	0,02	3,7
Phenanthrene	11,2	0,38	3,4
Anthracene	2,4	0,08	3,5
Flouranthene	26,7	0,91	3,4
Pyrene	18,2	0,70	3,8
Benz[a]anthracene	16,2	0,57	3,5
Chrysene	8,9	0,36	4,1
Benzo[b]fluoranthene	10,6	0,45	4,3
Benzo[k]fluoranthene	4,7	0,26	5,6
Benzo[a]pyrene	8,7	0,44	5,1
Dibenz[ah]anthracene	4,1	0,40	9,7
Benzo[ghi]perylene	5,1	0,48	9,5
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	4,9	0,28	5,7

### 9.3 So sánh độ lệch chuẩn của các phép phát hiện bằng UV và bằng huỳnh quang

Đặc trưng của các tính năng sử dụng phương pháp B cho cả hai phương pháp phát hiện đối với một mẫu đất "thực" được liệt kê ở bảng 2. Các độ lệch chuẩn của cả hai phương pháp phát hiện ở giữa 7 % và 20 % (tới 46 % đối với dibenz [ah]anthracene)



**Bảng 2 - Các giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của mẫu áp dụng**

Hợp chất	Đo bằng tia cực tím		Đo bằng huỳnh quang	
	X <sub>m</sub> m/kg	S <sub>rel</sub> %	X <sub>m</sub> m/kg	S <sub>rel</sub> %
Naphthalene	4,1	15	5,3	19
Fluorene	-	-	0,8	10
Phenanthrene	9,0	9	11,4	10
Anthracene	2,2	9	1,8	11
Fluoranthene	11,4	10	14,4	8
Pyrene	13,5	9	13,4	9
Benz[a]anthracene	8,8	11	6,9	16
Chrysene	4,7	10	6,3	21
Benzo[b]fluoranthene	6,6	7	6,6	13
Benzo[k]fluoranthene	5,1	7	3,6	9
Benzo[a]pyrene	6,7	11	7,0	12
Dibenz[ah]anthracene <sup>a</sup>	1,1	46	1,7	15
Benzo[ghi]perylene	5,4	10	5,0	14
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	4,6	11	3,7	11

<sup>a</sup> Dibenz[ah]anthracene thường chỉ có mặt ở các nồng độ thấp và nó không được tách rõ rệt với các đỉnh bên cạnh. Do vậy nên sử dụng huỳnh quang để phát hiện ở nồng độ thấp.

#### 9.4 Giới hạn của phép phát hiện/ giới hạn dưới của việc áp dụng

Trong các điều kiện của mẫu, bao gồm chiết 20 g đất, cho dịch chiết đến 50 ml và tiêm 10 µl mẫu, có thể xác định được các nồng độ 0,03 mg/kg và thậm chí thấp hơn đối với các hợp chất cá biệt bằng việc sử dụng detector UV.

Trong các hoàn cảnh này, có thể đảm bảo cho tất cả hợp chất một giới hạn dưới là 0,1 mg/kg của việc áp dụng.

Sử dụng phép phát hiện bằng huỳnh quang và lựa chọn thích hợp các cặp bước sóng, giới hạn dưới là 0,01mg/kg cho từng PAH.

Chú thích 1 - Vì nồng độ thấp hơn trên cột, có thể đạt được độ nhạy cao hơn của detector huỳnh quang sau khi pha loãng mẫu để đạt được hiệu quả tách khá hơn; hơn nữa có thể dùng một thể tích để tiêm nhỏ hơn.

## TCVN 6652 : 2000

Chú thích 2 - Đối với hợp chất benzo[a]pyrene điều quan trọng có thể là đạt được các kết quả định lượng thậm chí ở các nồng độ trong đất thấp hơn. Một giới hạn dưới cho việc áp dụng là 0,02 mg/kg đang được thảo luận. Tuy nhiên nên áp dụng phép phát hiện bằng huỳnh quang.

Chú thích 3 - Việc phát hiện với độ nhạy cao hơn thì giới hạn dưới của phép đo rộng hơn, nhưng kết quả không chính xác. ở các dãy nồng độ thấp, các giá trị mẫu trắng và đặc biệt tính không đồng nhất của đất đóng vai trò quan trọng.

### 9.5 Sự thu hồi

Để xác định sự thu hồi của các phần được tách qua rây, đất cát và đất lấy ở khu vườn đã được vô hiệu hoá với PAH (100 mg/kg đến 10 mg/kg cho 1 PAH và 30 mg/kg đến 4 mg/kg cho 1 PAH ) và được phân tích theo qui trình đã qui định.

Dầu anthracene nặng được hoà tan trong axeton và cho vào đất, chất dung môi được loại bỏ trong máy quay làm bay hơi nước ở điều kiện chân không và đất đã vô hiệu hoá được phân tích. Dầu anthracene còn lại trên thành bình được hoà tan bằng toluen và sau đó được phân tích, lượng này được trừ vào lượng của chất bị vô hiệu hoá. Việc phân tích được tiến hành theo phương pháp B.

Các mức độ tìm thấy (trừ naphthalene) như sau:

Loại đất	Tổng PAH
Cát 2 mm đến 1 mm	93,6 %
Cát 1 mm đến 0,1 mm	97,7 %
Cát 4 mm đến < 0,1 mm	93,4 %
Đất vườn	83,3 %

Độ tìm thấy ở các loại đất không chứa hoặc chứa ít chất hữu cơ khoảng 95 %, trong khi ở các loại đất chứa nhiều chất hữu cơ hơn thì độ thu hồi là thấp hơn khoảng 10 %.

### 9.6 Các độ lệch chuẩn của phương pháp A

Các đặc trưng của tính năng đối với phương pháp A phải được thử.

Trong một phép thử của liên phòng thí nghiệm, 3 mẫu đã được thử. Chỉ có tổng của 16 hợp chất đã liệt kê ở 5.11 (có thể xem ở mục 3) đã được sử dụng cho việc tính toán. Các kết quả được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3 - Các giá trị trung bình, độ lặp lại và độ tái lập  
của các mẫu khi sử dụng phương pháp A**

Mẫu	Giá trị trung bình mg/kg	Độ lặp lại %	Độ tái lập %
1	13	18,3	33,7
2	62	11,9	27,6
3	2 090	10,7	37,5

## 10 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả bao gồm các thông tin sau:

- a) theo tiêu chuẩn này;
- b) sự nhận biết hoàn chỉnh của mẫu;
- c) các chi tiết về lấy mẫu;
- d) các chi tiết xử lý sơ bộ mẫu;
- e) bản tham khảo các phương pháp được sử dụng (phương pháp A hay B)
- f) các kết quả của phép xác định;
- g) một số chi tiết không được qui định trong tiêu chuẩn này hoặc các chi tiết tùy ý cũng như một số nhân tố có thể ảnh hưởng đến kết quả.

**Phụ lục A**

(tham khảo)

**Độ dài bước sóng của tia cực tím (UV) và huỳnh quang dùng để phát hiện**

Hợp chất	Tối đa đối với UV nm	Đề nghị $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ nm	Tối ưu $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ nm
Naphthalene	220	280/340	280/334
Acenaphthene	227	280/340	280/324
Acenaphthylene	229	-	-
Fluorene	261	280/340	268/308
Phenanthrene	251	280/340	292/366
Anthracene	252	305/430	253/402
Fluoranthene	236	305/430	360/460
Pyrene	240	305/430	336/376
Benz[a]anthracene	287	305/430	288/390
Chrysene	267	305/430	268/383
Benzo[b]fluoranthene	256	305/430	300/436
Benzo[k]fluoranthene	307	305/430	308/414
Benzo[a]pyrene	296	305/430	296/408
Benzo[ghi]perylene	299	305/430	300/410
Dibenz[ah]anthracene	297	305/430	297/398
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	250	305/500	302/506

## Tài liệu tham khảo

- (1) G.D. Mur (ed). Sự may rủi trong phòng thí nghiệm hoá học, the Chemical Society London, 2nd, 1977.
  - (2) *Làm việc với các chất gây ung thư*, Viện an toàn lao động và y tế Liên bang xuất bản, số 77- 206, 1977.
  - (3) Qui tắc thực hành về xử lý các chất gây ung thư trong phòng thí nghiệm y học và vệ sinh lao động, Tổ chức an toàn và y tế, Phòng thí nghiệm vệ sinh và an toàn lao động 1979, Her Majestys Stationery Office
  - (4) Hướng dẫn làm việc với các chất hoá học gây ung thư của tổ chức MRC. Tiểu ban Hội đồng nghiên cứu Y học, Cell Biology and Disorders Board, tháng 10 – 1979 (tạm thời), (thông tin của DR. J. Wilki, cơ quan nghiên cứu y học, 20 Park Crescent, London, W1N 4AL).
  - (5) Keith, L.H. and Telliard, W.A. : *môi trường, khoa học và công nghệ*.
-