



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003295

(51) **G01N 33/50**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00359

(22) 05/08/2020

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/12/2020 393

(73) Trường Đại học Y tế Công Cộng (VN)

Số 1A đường Đức Thắng, phường Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, thành phố Hà Nội

(72) Đặng Thế Hưng (VN); Vũ Thị Cúc (VN); Nguyễn Văn Long (VN); Trần Thị Tuyết Hân (VN); Hoàng Văn Minh (VN); Bùi Thị Thu Hà (VN).

(74) Công ty TNHH Dịch vụ Sở hữu trí tuệ GREENIP (GREENIP CO., LTD)

(54) **PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT NHÓM
CLO HỮU CƠ TRONG MÁU BẰNG SẮC KÝ KHÍ GHÉP KHỐI PHỔ**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp pháp xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật (BVTV) nhóm clo hữu cơ trong máu bằng cách sắc ký ghép khối phổ bao gồm các bước: (1) tối ưu hóa các điều kiện của hệ thống sắc ký-khối phổ (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, viết tắt là GC-MS); (2) chuẩn bị mẫu dùng cho phân tích GC-MS; (3) thiết lập sắc ký đồ của tập hợp các chất chuẩn mà là hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ; (4) thiết lập bộ đường chuẩn cho tập hợp các hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ, trong đó bộ đường chuẩn này dùng để xác định nồng độ hóa chất BVTV trong mẫu phân tích; và (5) xác định dư lượng hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ trong mẫu máu thực tế bằng cách sử dụng điều kiện tối ưu hóa thu được từ bước (1), mẫu phân tích được chuẩn bị theo bước (2), sắc ký đồ chuẩn được thiết lập theo bước (3) và bộ đường chuẩn được thiết lập theo bước (4).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa học phân tích, cụ thể là đề cập đến phương pháp xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ trong máu bằng cách sắc ký khí ghép khối phổ (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, viết tắt là GC-MS), ứng dụng trong lĩnh vực nghiên cứu y dược học.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Thuốc hay hóa chất bảo vệ thực vật (BVTV) là tên gọi chung để chỉ các sản phẩm hóa chất được dùng trong nông nghiệp, lâm nghiệp nhằm mục đích ngăn ngừa, phòng trừ và tiêu diệt các đối tượng gây hại cho cây trồng, cho nông lâm sản hay để điều hòa, kích thích sinh trưởng cho cây trồng từ đồng ruộng cho đến kho bảo quản. Hiện nay, thuốc BVTV rất đa dạng và phong phú về mọi mặt trên tất cả các loại cây trồng. Theo nguồn gốc hóa học thì thuốc BVTV được phân thành các nhóm chính sau: nhóm thuốc thảo mộc, nhóm lân hữu cơ, nhóm carbamat, nhóm clo hữu cơ. Nhóm clo hữu cơ là hợp chất của dẫn xuất hydrocacbon, trong phân tử có nhiều nhóm thế là các nguyên tử clo. Do có liên kết giữa cacbon và clo trong phân tử nên các hợp chất clo hữu cơ rất bền vững và khó phân hủy. Sau khi được sử dụng, chúng tồn tại lâu trong môi trường và có khả năng tích lũy dần trong cơ thể con người do phơi nhiễm theo thời gian qua nguồn thực phẩm, nước, không khí, tiếp xúc qua da, dẫn tới hệ lụy không tốt tới sức khỏe của cộng đồng.

Đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra mối liên quan giữa nồng độ thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ trong máu với bệnh rối loạn thần kinh (Stephens et al., 1995; Parron et al., 1996; Mathur et al., 2002; Hernandez et al., 2003; Salvi et al., 2003) và ung thư (Mathur et al., 2002; Bolognesi, 2003; Clary et al., 2003; Hernandez et al., 2003). Vì vậy, xác định được dư lượng thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ trong máu có vai trò rất quan trọng trong nghiên cứu đánh giá nguy cơ sức khỏe môi trường do phơi nhiễm với nhóm hoạt chất độc hại này, từ đó đưa ra các biện pháp phòng chống hữu ích để nâng cao sức khỏe của cộng đồng.

Đã biết một số phương pháp phân tích đã được nghiên cứu trên thế giới để xác định dư lượng thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ và dẫn chất chuyển hóa của chúng trong máu, chẳng

hạn xem Matos et al 1998; Frias et al., 2001; Liu and Pleil, 2002; Ramesh and Ravi, 2004; Ariffin and Anderson, 2006). Các phương pháp sắc ký đặc biệt là sắc ký khí và sắc ký lỏng là những phương pháp được sử dụng phổ biến với đầu dò phát hiện là đầu dò phát hiện nitơ phospho (Nitrogen Phosphorous Detector, viết tắt là NPD) (Tarbah et al., 2001; Tsoukali et al., 2005), đầu dò phát hiện bắt electron (Electron Capture Detector, viết tắt là ECD) (Mathur et al., 2002; Heudorf et al., 2003) và đầu dò khối phổ (Mass Spectroscopy, viết tắt là MS) (Angerer et al., 1997; Hernandez et al., 2002; Schettgen et al., 2002; Ariffin and Anderson, 2006; Bouwman et al., 2006; Petropoulou et al., 2006; Inoue et al., 2007). Các phương pháp này đa số mới ứng dụng để xác định được một vài chất trong nhóm clo hữu cơ, với độ nhạy và độ đặc hiệu phát hiện còn hạn chế. Hơn nữa, việc phơi nhiễm qua môi trường có thể tiếp xúc với nhiều dẫn chất khác nhau trong cùng một nhóm chất. Vì vậy vẫn cần có phương pháp xác định được nhiều dẫn chất trong một quy trình phân tích với độ nhạy tốt để khắc phục các hạn chế của các phương pháp trước đó. Đồng thời giải pháp xác định được nhiều dẫn chất của nhóm thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ trong máu với độ nhạy và đặc hiệu cao bằng phương pháp phân tích sắc ký khí khối phổ hiện đại sẽ có giá trị hữu ích trong đánh giá nguy cơ sức khỏe môi trường một cách toàn diện và đầy đủ nhất.

Danh mục các tài liệu trích dẫn:

Matos et al 1998: Methods for the determination of organochlorine pesticide residues in human serum. *Journal of Chromatography*. B. 716:147-152;

Moreno Frias M, Garrido Frenich A, Martínez Vidal JL, Mateu Sánchez M, Olea Serrano MF and Olea N. Analyses of lindane, vinclozolin, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2001; 760: 1–15;

Liu S, Pleil JD (2002). Human blood and environmental media screening method for pesticides and polychlorinated biphenyl compounds using liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. B*. 769:155-167;

Ramesh A, Ravi PE (2004). electron ionization gas chromatography– mass spectrometric determination of residues of thirteen pyrethroid insecticides in whole blood. *J. Chromatogr. B*. 802:371-376;

Ariffin MM, Anderson RA (2006). LC/MS/MS analysis of quaternary ammonium drugs and herbicides in whole blood. *J. Chromatogr. B.* 842:91-97;

Tarbah RA, Mahler H, Temme O, Daldrup T (2001). An analytical method for the rapid screening of organophosphate pesticides in human biological samples and foodstuffs. *Forensic Sci. Int.* 121:126- 133;

Tsoukali H, Theodoridis G, Raikos N, Grigoratou I (2005). Determination of amphetamines in human urine by headspace solidphase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. B.* 822:194-200;

Mathur V, Bhatnagar P, Sharma RG, Acharya V, Sexana R (2002). Breast cancer incidence and exposure to pesticides among women originating from Jaipur. *Environ. Int.* 28:331-336;

Heudorf U, Angerer J, Drexler H (2003). Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: blood plasma levels of pentachlorophenol (PCP), lindane (γ -HCH), and dichloro(Diphenyl)ethylene (DDE), a biostable metabolite of dichloro(diphenyl) trichloroethane (DDT). *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 206:485-512;

Angerer J, Ritter A (1997). Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 695:217-226;

Hernandez AF, Mackness B, Rodrigo L, Lopez O, Pla A, Gil F, Durrington PN, Pena G, Parron T, Serrano JL, Mackness MI (2003). Paraoxonase activity and genetic Polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Human Exp. Toxicol.* 22:565-574;

Schettgen T, Koch HM, Drexler H, Angerer J (2002). New gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. *J. Chromatogr. B.* 778:121-130;

Ariffin MM, Anderson RA (2006). LC/MS/MS analysis of quaternary ammonium drugs and herbicides in whole blood. *J. Chromatogr. B.* 842:91-97;

Bouwman H, Sereda B, Meinhardt HM (2006). Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. *Environ. Pollut.* 144:902-917;

Petropoulou SSE, Tsarbopoulos A, Siskos PA (2006). Determination of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in plasma samples of agricultural populations using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 385:1444-1456;

Inoue S, Saito T, Maseb H, Suzuki Y, Takazawa K, Yamamotoa I, Inokuchi S (2007). Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS. *J. Pharmaceut. Biomed.* 44:258-264.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất phương pháp xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ trong máu với độ nhạy và độ đặc hiệu phát hiện cao, đồng thời có thể xác định được nhiều dẫn chất trong một quy trình phân tích với độ nhạy tốt để khắc phục các hạn chế của các phương pháp đã biết. Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật (BVTV) nhóm clo hữu cơ trong máu bằng cách sắc ký ghép khối phổ bao gồm các bước sau:

bước 1: tối ưu hóa các điều kiện của hệ thống sắc ký khí-khối phổ (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, viết tắt là GC-MS), trong đó hệ thống GC-MS bao gồm hệ thống Autosystem GC-600/Turbo Mass 600D (hãng sản xuất Perkin-Elmer), và bộ bơm mẫu chia dòng/không chia dòng khả lập trình (Programmable Split/ Splitless Injector, viết tắt là PSSI), cột mao quản Elite-5 MS (hãng sản xuất Perkin-Elmer) với các điều kiện tối ưu như sau:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| - năng lượng ion hóa Ei: | 70 eV |
| - năng lượng khuếch đại đầu dò: | 1,2 kV |
| - nhiệt độ nguồn ion: | 230 ⁰ C |
| - nhiệt độ bộ phận kết nối GC-MS: | 250 ⁰ C |
| - nhiệt độ cổng bơm: | 240 ⁰ C |
| - khí mang: | heli |
| - pha tĩnh qua cột: | 1,4-bis(dimetylsiloxy)phenylen dimetyl polysiloxan |
| - tốc độ dòng khí mang qua cột: | 1,7 ml/phút |
| - thời gian ngắt dung môi: | 7 phút |
| - chế độ bơm mẫu: | không chia dòng |

- chế độ sắc ký đồ ion tổng (Total Ion Chromatogram, viết tắt là TIC): 50 đến 550 đơn vị khối lượng nguyên tử (Atomic Mass Unit, viết tắt là amu)
- chế độ chạy: chế độ ghi ion được chọn (Selected Ion Recording, viết tắt là SIR) và chế độ quét (SCAN)
- thể tích bơm mẫu: 1 μ l
- chương trình nhiệt độ của buồng cột: 70°C giữ 1 phút, tăng 15°C/phút đến 180°C giữ 0 phút, sau đó tăng 5°C/phút đến 210°C giữ 0 phút, tiếp tục tăng 15°C/phút đến 280°C giữ 3 phút

bước 2: chuẩn bị mẫu dùng cho phân tích GC-MS; trong đó mẫu được chuẩn bị theo quy trình bao gồm các công đoạn sau:

i) đồng hóa huyết thanh, sau đó bổ sung H₂O đã loại ion vào huyết thanh đồng hóa với tỷ lệ theo thể tích của H₂O: huyết thanh là từ 0,5:1 đến 3:1 để thu được hỗn hợp huyết thanh;

ii) chuẩn bị dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước bằng cách lần lượt thêm MgSO₄ và NaCl vào axetonitril, trong đó lượng MgSO₄ sử dụng cho mỗi ml axetonitril nằm trong khoảng 100-500 mg, lượng NaCl sử dụng cho mỗi ml axetonitril nằm trong khoảng 50-100mg, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO₄:NaCl nằm trong khoảng từ 1:1 đến 9:1;

iii) thêm hỗn hợp huyết thanh nêu trên vào dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước nêu trên theo tỷ lệ thể tích của hỗn hợp huyết thanh: dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước là 1:1 đến 1:3, tiếp theo lắc và ly tâm để thu được dung dịch trên bề mặt;

iv) làm sạch dung dịch trên bề mặt thu được bằng cách thêm dung dịch này vào hỗn hợp MgSO₄ và chất hấp phụ amin bậc một và bậc hai (Primary Secondary Amine, viết tắt là PSA), trong đó lượng MgSO₄ sử dụng cho mỗi ml dung dịch trên bề mặt nằm trong khoảng 50-150mg, lượng PSA được sử dụng cho mỗi ml dung dịch trên bề mặt nằm trong khoảng 100-200mg, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO₄:PSA nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:2, tiếp theo lắc và ly tâm để thu được dung dịch trên bề mặt đã được làm sạch;

v) cô đặc dung dịch trên bề mặt đã làm sạch bằng thiết bị cô có sử dụng khí nitơ;

vi) thêm n-hexan vào dung dịch trên bề mặt cô đặc, trong đó n-hexan được sử dụng với lượng sao cho tỷ lệ thể tích n-hexan và dung dịch trên bề mặt trước khi được cô đặc ở công đoạn v) là từ 0,5:1 đến 1:1, lắc để thu dịch chiết bên trên và lọc dịch chiết bên trên này để thu được mẫu phân tích;

bước 3: thiết lập sắc ký đồ chuẩn của tập hợp các chất chuẩn mà là hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ;

bước 4: thiết lập bộ đường chuẩn cho tập hợp các chất chuẩn mà là hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ, trong đó bộ đường chuẩn này dùng để xác định nồng độ hóa chất BVTV trong mẫu phân tích; và

bước 5: xác định dư lượng hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ trong mẫu máu thực tế bằng cách sử dụng điều kiện tối ưu hóa thu được từ bước 1, mẫu phân tích được chuẩn bị theo bước 2, sắc ký đồ chuẩn được thiết lập theo bước 3, và bộ đường chuẩn được thiết lập theo bước 4.

Theo một phương án, trong công đoạn i) của bước 2, tỷ lệ theo thể tích của H₂O: huyết thanh là 1:1.

Theo một phương án, trong công đoạn ii) của bước 2, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO₄:NaCl là 4:1.

Theo một phương án, trong công đoạn iii) của bước 2, tỷ lệ theo thể tích của hỗn hợp huyết thanh:dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước là 1:1.

Theo một phương án trong công đoạn iv) của bước 2, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO₄ và PSA là 11:18.

Theo một phương án, trong công đoạn vi) của bước 2, tỷ lệ theo thể tích của n-hexan và dung dịch trên bề mặt trước khi được cô đặc ở công đoạn v) của bước 2 là 1:1.

Theo giải pháp hữu ích các hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ bao gồm các chất α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, heptaclo, aldrin, heptaclo epoxit, alpha- endosulfan, p,p'-DDE, dieldrin, endrin, beta- endosulfan, p,p'-DDD, endrin aldehyt, endosulfan sulfat, p,p'-DDT, endrin keton, và metoxyclo.

Theo một phương án, bộ đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ chất chuẩn với diện tích đỉnh của chất chuẩn đó như sau:

số thứ tự	chất chuẩn	mối tương quan	hệ số xác định R ²
1	α -BHC	$y = 77,9x - 46,925$	0,9999
2	β -BHC	$y = 85,927x - 25,427$	0,9999
3	γ -BHC	$y = 76,343x + 26,429$	0,9999
4	δ -BHC	$y = 54,801x - 40,872$	0,998
5	heptaclo	$y = 51,314x + 14,483$	0,9993
6	aldrin	$y = 50,063x - 5,1076$	0,9993
7	heptaclo epoxit	$y = 28,897x + 8,35$	0,9994
8	alpha-endosulfan	$y = 16,008x - 2,0825$	0,9998
9	p,p' - DDE	$y = 137,14x - 13,189$	0,9997
10	dieldrin	$y = 67,419x - 6,0791$	0,9996
11	endrin	$y = 7,3704x - 5,7915$	0,9979
12	beta- endosulfan	$y = 6,5056x - 12,024$	0,9957
13	p,p'-DDD	$y = 140,99x - 54,642$	0,9998
14	endrin aldehyt	$y = 9,6285x - 18,969$	0,9953
15	endosulfan sulfat	$y = 3,6144x - 10,745$	0,9959
16	p,p' -DDT	$y = 29,808x - 62,177$	0,9973
17	endrin keton	$y = 11,377x - 18,729$	0,9971
18	metoxyclo	$y = 29,808x - 62,177$	0,9973

trong đó, y là diện tích mảnh phổ của chất chuẩn (đơn vị là m/z (mass-to-charge ratio, tỷ lệ khối lượng - điện tích)) và x là nồng độ của chất chuẩn (phần tỷ (part per billion, viết tắt là ppb)).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Giải pháp hữu ích sẽ được mô tả chi tiết dưới đây có dựa vào các hình vẽ, trong đó:

Hình 1: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ của thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ với chương trình nhiệt 1;

Hình 2: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ của thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ với chương trình nhiệt 2;

Hình 3: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ của thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ với chương trình nhiệt 3;

Hình 4: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ của thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ với chương trình nhiệt 4;

Hình 5: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ của thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ với chương trình nhiệt 5;

Hình 6: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ của thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ với chương trình nhiệt 6;

Hình 7: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ của hỗn hợp 18 chất chuẩn theo chế độ quét SCAN;

Hình 8: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ mẫu trắng;

Hình 9: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ của hỗn hợp 18 chất chuẩn theo chế độ quét SIR;

Hình 10: là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 2ppb;

Hình 11: là đồ thị đường chuẩn alpha-BHC;

Hình 12: là đồ thị đường chuẩn beta-BHC;

Hình 13: là đồ thị đường chuẩn gama-BHC;

Hình 14: là đồ thị đường chuẩn delta-BHC;

Hình 15: là đồ thị đường chuẩn heptaclo;

Hình 16: là đồ thị đường chuẩn aldrin;

Hình 17: là đồ thị đường chuẩn heptaclo epoxy;

Hình 18: là đồ thị đường chuẩn alpha- endosulfan;

Hình 19: là đồ thị đường chuẩn p,p'-DDE;

Hình 20: là đồ thị đường chuẩn dieldrin;

Hình 21: là đồ thị đường chuẩn endrin;

Hình 22: là đồ thị đường chuẩn beta- endosulfan;

Hình 23: là đồ thị đường chuẩn p,p'- DDD;

Hình 24: là đồ thị đường chuẩn endrin- aldehyt;

Hình 25: là đồ thị đường chuẩn endosulfan sulfat;

Hình 26: là đồ thị đường chuẩn p,p'- DDT;

Hình 27: là đồ thị đường chuẩn endrin keton;

Hình 28: là đồ thị đường chuẩn metoxyclo.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Phương pháp theo giải pháp hữu ích sẽ được mô tả một cách chi tiết trong phần trong phần mô tả chi tiết dưới đây theo từng bước của phương pháp.

Bước 1: Tối ưu hóa các điều kiện của thiết bị GC-MS

Chọn điều kiện bơm mẫu

Các tác giả của giải pháp hữu ích đã tiến hành nhiều thực nghiệm dựa trên các tài liệu tham khảo trước đó với hệ thống Autosystem GC-600/Turbo Mass 600D (Hãng sản xuất Perkin-Elmer), với bộ bơm mẫu chia dòng/không chia dòng khả lập trình (Programmable Split/ Splitless Injector, viết tắt là PSSI), và lựa chọn được các điều kiện tối ưu cho thiết bị này. Cụ thể, thể tích bơm mẫu là 1 μl , chế độ tiêm không chia dòng (splitless) được chọn. Điều này phù hợp cấu hình máy và đạt được yêu cầu về độ chính xác, độ lặp lại của thiết bị, phù hợp với phân tích xác định các hóa chất BVTV trong máu ở hàm lượng vết.

Chọn cột tách

Cột tách góp một phần khá quan trọng trong việc quyết định quá trình tách có độ phân giải tốt hay không. Để chọn loại cột có pha tĩnh phù hợp cần căn cứ vào cấu trúc phân tử và độ phân cực của chất phân tích. Việc xác định đồng thời hỗn hợp nhiều loại hóa chất bảo vệ thực vật cần đòi hỏi phải khảo sát pha tĩnh. Pha tĩnh là 1,4-bis(dimethylsiloxy)phenylen dimethyl polysiloxan, cột Elite-5 MS (chiều dài cột 30m, đường kính trong 0,32 mm, độ dày pha tĩnh 0,25 μm) của PerkinElmer, Mỹ đã được sử dụng. Đây là loại pha tĩnh có bản chất phân cực yếu, có ứng dụng rất rộng nên phù hợp để phân tích các hợp chất thơm đa vòng, các hydrocacbon đã được clo hóa, phtalat, phenol, amin, thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ, thuốc bảo vệ thực vật gốc phospho hữu cơ.

Chọn chương trình nhiệt độ của buồng cột

Chương trình nhiệt độ của cột phân tích phụ thuộc vào các yếu tố sau:

- Nhiệt độ giới hạn trên của cột phân tích
- Nhiệt độ sôi của cấu tử cần phân tích
- Độ phức tạp của mẫu: số lượng các cấu tử nhiều hay ít, nhiệt độ sôi xấp xỉ hay khác xa nhau.

Dựa vào các tài liệu của hãng sản xuất và các tài liệu tham khảo, các tác giả giải pháp hữu ích đã chọn ra một số chương trình nhiệt để khảo sát và chọn lựa ra điều kiện tối ưu nhất. Qua kết quả khảo sát với các chương trình nhiệt khác nhau từ 1 đến 6 như được thể hiện trên các hình vẽ từ Hình 1 đến Hình 6, thì chương trình nhiệt số 6 mang lại kết quả tốt nhất với sự tách pic rõ ràng giữa các chất, nền ổn định và pic dung môi tách hẳn so với pic chất và diện tích pic chất là lớn nhất.

- Chương trình 1: 70°C giữ 1 phút, tăng 15°C/phút đến 180°C giữ 0 phút, sau đó tăng 3,5°C/phút đến 230°C giữ 2 phút, tiếp tục tăng 20°C/phút đến 280°C giữ 3 phút.
- Chương trình 2: 65°C giữ 1 phút, tăng 15°C/phút đến 180°C giữ 0 phút, sau đó tăng 3°C/phút đến 230°C giữ 1 phút, tiếp tục tăng 30°C/phút đến 280°C giữ 3 phút.
- Chương trình 3: 70°C giữ 1 phút, tăng 15°C/phút đến 180°C giữ 0 phút, sau đó tăng 3,5°C/phút đến 200°C giữ 3 phút, tiếp tục tăng 10°C/phút đến 280°C giữ 3 phút.
- Chương trình 4: 70°C giữ 1 phút, tăng 15°C/phút đến 180°C giữ 0 phút, sau đó tăng 4°C/phút đến 210°C giữ 0 phút, tiếp tục tăng 15°C/phút đến 280°C giữ 3 phút.
- Chương trình 5: 70°C giữ 1 phút, tăng 15°C/phút đến 180°C giữ 0 phút, sau đó tăng 4,5°C/phút đến 210°C giữ 0 phút, tiếp tục tăng 15°C/phút đến 280°C giữ 3 phút.
- Chương trình 6: 70°C giữ 1 phút, tăng 15°C/phút đến 180°C giữ 0 phút, sau đó tăng 5°C/phút đến 210°C giữ 0 phút, tiếp tục tăng 15°C/phút đến 280°C giữ 3 phút.

Thời gian lưu và diện tích pic mảnh của các chương trình nhiệt này cũng được thể hiện trong Bảng 1 và Bảng 2 dưới đây.

Bảng 1. Thời gian lưu và diện tích pic mảnh của các chương trình nhiệt 1 đến 3

STT	Thuốc BVTV		Chương trình 1		Chương trình 2		Chương trình 3	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích
1	α -BHC	181	9,48	654665	9,84	751712	9,52	631509
		219						
2	β -BHC	181	9,95	518909	10,31	607923	9,99	529692
		219						
3	γ -BHC	181	10,13	621099	10,51	661960	10,17	610487
		219						
4	δ -BHC	181	10,72	495078	11,09	594084	10,76	500452
		219						

5	Heptaclo	272	11,84	477053	12,28	538759	11,89	418133
		100						
6	Aldrin	263	12,83	409474	13,33	465913	12,88	406241
		66						
7	Heptaclo epoxit	253	14,02	109219	14,60	99193	14,08	96607
		81						
8	alpha-Endosulfan	241	15,25	153094	15,92	188058	15,40	166603
		170						
9	p,p'- DDE	246	16,16	1346152	16,95	1414457	16,54	1480395
		318						
10	Dieldrin	263	16,22	196506	16,99	184485	16,60	175780
		79						
11	Endrin	263	16,98	224491	17,83	216721	17,57	195825
		181						
12	Beta- Endosulfan	241	17,4	153094	18,30	98855	18,03	163980
		195						
13	p,p'-DDD	235	17,77	1935541	18,74	1859785	18,44	1833614
		165						
14	Endrin aldehyt	345	17,99	207199	18,94	159316	18,62	102772
		67						
15	Endosulfan sulfat	272	18,96	283518	20,04	236942	19,47	290221
		387						
16	p,p'- DDT	235	19,32	1626098	20,45	1360153	19,76	1260159
		65						
17	Endrin keton	317	20,84	209289	22,14	169397	20,84	222502
		67						
18	Metoxyclo	227	21,86	2663736	23,37	1972772	21,44	2143944
		152						

Bảng 2. Thời gian lưu và diện tích pic mảnh của các chương trình nhiệt 4 đến 6

STT	Thuốc BVTV		Chương trình 4		Chương trình 5		Chương trình 6	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích
1	α -BHC	181	9,39	697928	9,30	775908	9,47	678817
		219						
2	β -BHC	181	9,84	588636	9,74	570601	9,92	523223
		219						
3	γ -BHC	181	10,03	612170	9,91	730026	10,09	561204
		219						
4	δ -BHC	181	10,57	497942	10,45	547691	10,64	424564

		219						
5	Heptaclo	272	11,65	361427	11,47	409242	11,65	308238
		100						
6	Aldrin	263	12,57	419990	12,35	375672	12,50	355805
		66						
7	Heptaclo epoxit	253	13,69	95484	13,39	92234	13,50	81137
		81						
8	alpha-Endosulfan	241	14,82	159171	14,44	157509	14,50	159900
		170						
9	p,p' - DDE	246	15,63	1239450	15,19	1361460	15,12	1118918
		318						
10	Dieldrin	263	15,71	169681	15,24	172932	15,18	146945
		79						
11	Endrin	263	16,36	171462	15,78	168658	15,63	151505
		181						
12	Beta- Endosulfan	241	16,66	125776	16,05	120000	15,86	111630
		195						
13	p,p'-DDD	235	16,90	1693742	16,26	1638045	16,01	1546335
		165						
14	Endrin aldehyt	345	17,04	152465	16,40	153704	16,16	141685
		67						
15	Endosulfan sulfat	272	17,60	234915	16,91	250135	16,62	231525
		387						
16	p,p' -DDT	235	17,78	1106172	17,05	1029568	16,73	988109
		65						
17	Endrin keton	317	18,54	192787	17,78	214623	17,42	185611
		67						
18	Metoxyclo	227	18,88	1992612	18,09	1687052	17,68	1799056
		152						

Khảo sát nhiệt độ cổng bơm

Nhiệt độ cổng bơm ở các nhiệt độ 200°C, 210°C, 220°C, 230°C, 240°C, 250°C, 260°C được khảo sát, kết quả như được thể hiện tại Bảng 3 và Bảng 4. Khi nhiệt độ cổng bơm tăng thì đa số diện tích pic tăng nhưng chỉ tăng đến một giới hạn là 240°C sau đó diện tích pic chất lại giảm khi tăng nhiệt độ. Kết quả cho thấy tại nhiệt độ 240°C cho diện tích pic chất lớn nhất với tất cả các chất nghiên cứu.

Bảng 3: Thời gian lưu và diện tích pic chất khảo sát nhiệt độ cổng bơm dưới 220°C

STT	Thuốc BVTV	Mảnh phổ	Tại 200°C		Tại 210°C		Tại 220°C	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích
1	α -BHC	181	9,47	920686	9,50	1189943	9,49	1009863
		219		885212		914676		906232
2	β -BHC	181	9,91	820675	9,95	1002592	9,95	860292
		219		799827		770768		749800
3	γ -BHC	181	10,08	913337	10,12	1049631	10,12	1018282
		219		804405		811264		773328
4	δ -BHC	181	10,63	683131	10,66	806564	10,66	772333
		219		632973		731367		642783
5	Heptaclo	272	11,65	497378	11,68	552880	11,68	655124
		100		708741		872327		798788
6	Aldrin	263	12,50	473264	12,54	529044	12,54	516932
		66		536543		627099		604438
7	Heptaclo epoxit	253	13,51	140994	13,54	164636	13,54	61749
		81		452730		527141		524378
8	alpha-Endosulfan	241	14,51	240629	14,54	272138	14,54	204692
		170		165360		178873		185675
9	p,p' - DDE	246	15,12	1941016	15,15	2319244	15,15	2478274
		318		1332713		1333357		1584104
10	Dieldrin	263	15,19	320442	15,21	378728	15,21	372958
		79		1013616		1233269		1201458
11	Endrin	263	12,50	473264	15,67	263653	15,67	282132
		181		20423		58288		62111
12	Beta- Endosulfan	241	14,51	240629	15,89	189666	15,89	204692
		195		264347		265452		261974
13	p,p'-DDD	235	16,02	2280967	16,04	3107458	16,04	3167841
		165		1222138		1405531		1473926
14	Endrin aldehyt	345	16,16	200643	16,19	219705	16,19	202140
		67		347655		407884		422957
15	Endosulfan sulfat	272	16,62	274875	16,64	329296	16,64	375515
		387		114007		139359		150846
16	p,p' -DDT	235	19,32	1816232	16,75	1949806	16,75	1806817
		65						
17	Endrin keton	317	20,84	255161	17,44	284540	17,44	382170
		67		293888		366708		392741

18	Metoxyclo	227	21,86	2377975	17,77	3177065	17,71	2639463
		152		189798		218954		212006

Bảng 4: Thời gian lưu và diện tích pic chất khảo sát nhiệt độ cổng bơm trên 220°C

STT	Thuốc BVTV	Mảnh phổ	Tại 230°C		Tại 240°C		Tại 250°C		Tại 260°C	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích
1	α -BHC	181	9,51	1059808	9,51	1114024	9,5	991456	9,5	970363
		219		797638		926396		779184		823973
2	β -BHC	181	9,95	865599	9,95	938022	9,95	724174	9,94	839641
		219		787275		822402		625132		741121
3	γ -BHC	181	10,12	1045293	10,13	1076928	10,12	853506	10,13	840560
		219		838086		736210		611633		809859
4	δ -BHC	181	10,67	743715	10,67	780143	10,66	660318	10,67	750256
		219		684117		718393		508283		562677
5	Heptaclo	272	11,69	617739	11,69	608216	11,68	553122	11,67	518913
		100		848208		764493		675591		717340
6	Aldrin	263	12,55	550179	12,55	534751	12,53	433072	12,54	476203
		66		632834		595963		487756		549980
7	Heptaclo epoxit	253	13,55	166441	13,55	163438	13,54	132909	13,55	127549
		81		535639		525011		425857		468611
8	alpha-Endosulfan	241	14,55	317865	14,55	297638	14,53	228863	14,55	251855
		170		215014		202755		152429		171003
9	p,p'-DDE	246	15,16	2151202	15,16	2264516	15,15	1967892	15,16	2114492
		318		1424113		1386824		1166951		1100887
10	Dieldrin	263	15,22	397891	15,22	377810	15,21	289276	15,22	346548
		79		1260676		1204765		1018355		1037577
11	Endrin	263	15,68	272088	15,68	271222	15,66	254490	15,68	248034
		181		69200		64238		51086		57235
12	Beta-Endosulfan	241	15,90	223730	15,90	251556	15,88	225487	15,90	201365
		195		278492		334285		232626		258534
13	p,p'-DDD	235	16,05	3059678	16,06	3062903	16,04	2300792	16,06	2537483
		165		1567942		1602483		1073724		1311788
14	Endrin aldehyt	345	16,20	237696	16,20	223843	16,18	196964	16,20	208013
		67		443229		416445		346682		353512
15		272	16,65	400110	16,65	447501	16,63	329189	16,65	354731

	Endosulfan sulfat	387		161997		163354		145978		154107
16	p,p' -DDT	235	16,76	2323403	16,77	2045736	16,74	1905588	16,77	2537483
		65								
17	Endrin keton	317	17,45	443035	17,45	440748	17,44	314720	17,45	361106
		67		423897		443241		332795		389037
18	Metoxyclo	227	17,71	3487709	17,71	3276337	21,86	2693371	17,71	2845984
		152		239601		223436		234892		234926

Khảo sát tốc độ khí mang heli

Tốc độ khí mang heli (99,999%) ảnh hưởng đến thời gian lưu và diện tích pic ở các mức 1,3 ml/phút, 1,4 ml/phút, 1,5 ml/phút, 1,6 ml/phút, 1,7 ml/phút được khảo sát, với kết quả được thể hiện ở Bảng 5. Kết quả cho thấy khi tốc độ khí mang heli tăng lên thì thời gian lưu giảm, các pic vẫn tách rời khỏi nhau một cách rõ ràng, diện tích pic của các chất tăng. Để đảm bảo cho các chất được tách hoàn toàn khỏi nhau, tốc độ của dòng khí mang heli là 1,7ml/phút đã được chọn.

Bảng 5: Thời gian lưu và diện tích pic chất khảo sát tốc độ dòng khí heli

STT	Thuốc BVTV	Mảnh phổ	Tại 1,3ml/ phút		Tại 1,4ml/ phút	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích
1	α -BHC	181	9,68	677949	9,59	979237
		219		679923		848411
2	β -BHC	181	10,11	693977	10,05	757682
		219		533382		626218
3	γ -BHC	181	10,33	760090	10,23	751503
		219		551142		688469
4	δ -BHC	181	10,89	578213	10,79	669551
		219		491585		593750
5	Heptaclo	272	11,93	431012	11,81	479877
		100		492108		665116
6	Aldrin	263	12,81	370292	12,68	480535
		66		442467		553713
7	Heptaclo epoxit	253	13,84	104089	13,7	149709
		81		349271		456138
8	alpha-Endosulfan	241	14,83	180808	14,69	269759
		170		136338		186998
9	p,p' - DDE	246	15,40	1839202	15,28	1981810
		318		992331		1273076
10	Dieldrin	263	15,47	266545	15,35	336290

		79		846124		1046619
11	Endrin	263	15,91	186720	15,79	250593
		181		23507		60956
12	Beta- Endosulfan	241	16,12	169740	16,01	219810
		195		232438		268259
13	p,p'-DDD	235	16,26	2225151	16,16	2718942
		165		1054316		1423811
14	Endrin aldehyt	345	16,41	144993	16,3	200924
		67		275463		378538
15	Endosulfan sulfat	272	16,86	278967	16,75	331232
		387		120018		152272
16	p,p' -DDT	235	16,96	1409676	16,86	1792390
		65				
17	Endrin keton	317	17,65	274923	17,54	401660
		67		315918		396610
18	Metoxyclo	227	17,90	2274048	17,8	2978676
		152		161416		204878

Bảng 5. Thời gian lưu và diện tích pic chất khảo sát tốc độ dòng khí heli (Tiếp)

STT	Thuốc BVTV	Mảnh phổ	Tại 1,5ml/phút		Tại 1,6ml/phút		Tại 1,7ml/phút	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích
1	α -BHC	181	9,5	991456	9,41	1127219	9,32	1246260
		219		779184		1002923		904984
2	β -BHC	181	9,95	724174	9,85	882688	9,76	908595
		219		625132		906539		805936
3	γ -BHC	181	10,12	853506	10,02	1118357	9,92	1062974
		219		611633		729535		884115
4	δ -BHC	181	10,66	660318	10,56	696558	10,46	842243
		219		508283		638994		745900
5	Heptaclo	272	11,68	553122	11,56	598750	11,45	629937
		100		675591		737903		856837
6	Aldrin	263	12,53	433072	12,41	495931	12,29	514024
		66		487756		573336		633785
7	Heptaclo epoxit	253	13,54	132909	13,41	139632	13,27	162662
		81		425857		485405		478245
8	alpha-Endosulfan	241	14,53	228863	14,4	251559	14,26	288861
		170		152429		167470		191788
9	p,p'- DDE	246	15,15	1967892	15,09	2090062	14,92	2222546
		318		1166951		1182549		1394131
10	Dieldrin	263	15,21	289276	15,1	317353	14,98	342234

		79		1018355		1036678		1074952
11	Endrin	263	15,66	254490	15,55	317353	15,44	269083
		181		51086		28242		57168
12	Beta-Endosulfan	241	15,88	225487	15,78	232585	15,68	206661
		195		232626		268600		289097
13	p,p'-DDD	235	16,04	2300792	15,94	2622206	15,84	2798282
		165		1073724		1336892		1253044
14	Endrin aldehyt	345	16,18	196964	16,08	209787	15,98	210818
		67		346682		373506		395356
15	Endosulfan sulfat	272	16,63	329189	16,54	381933	16,44	351685
		387		145978		150579		146108
16	p,p' -DDT	235	16,74	1905588	16,67	1773113	16,57	1769370
		65						
17	Endrin keton	317	17,44	314720	17,35	378585	17,25	366368
		67		332795		398404		415995
18	Metoxyclo	227	21,86	2693371	17,62	3027368	17,54	2986710
		152		234892		235862		237088

Khảo sát nhiệt độ bộ phận kết nối GC-MS

Nhiệt độ của bộ phận kết nối GC-MS ở các mức 230°C, 240°C, 250°C, 260°C, 270°C và 280°C đã được khảo sát. Kết quả từ Bảng 6 cho thấy rằng nhiệt độ bộ phận kết nối GC-MS tại 250°C thì các pic vẫn tách khỏi nhau một cách rõ ràng và diện tích pic chất là lớn nhất. Do đó để tối ưu hóa cho quá trình phân tích, nhiệt độ của bộ phận kết nối GC-MS là 250°C được chọn.

Bảng 6. Thời gian lưu và diện tích pic chất khảo sát

STT	Thuốc BVTV	Mảnh phổ	Tại 230°C		Tại 240°C		Tại 250°C	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích
1	α -BHC	181	9,29	3279	9,29	2764	9,31	3846
		219						
2	β -BHC	181	9,72	2827	9,72	2395	9,75	3133
		219						
3	γ -BHC	181	9,89	2830	9,89	2417	9,92	3317
		219						
4	δ -BHC	181	10,42	2013	10,42	1623	10,45	2402
		219						
STT	Thuốc BVTV	Mảnh phổ	Tại 260°C		Tại 270°C		Tại 280°C	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích

1	α -BHC	181	9,29	2737	9,29	2767	9,30	3007
		219						
2	β -BHC	181	9,73	2301	9,72	2378	9,74	2550
		219						
3	γ -BHC	181	9,90	2353	9,89	2429	9,90	2592
		219						
4	δ -BHC	181	10,43	1600	10,42	1675	10,44	1793
		219						

Khảo sát nhiệt độ nguồn

Khảo sát các nhiệt độ của nguồn tại 200°C, 210°C, 220°C, 230°C, 240°C, 250°C được thực hiện. Kết quả từ Bảng 7 cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 200°C đến 230°C thì diện tích pic tăng và sau đó diện tích pic giảm nên nhiệt độ nguồn tại 230°C được chọn.

Bảng 7. Thời gian lưu và diện tích pic chất khảo sát nhiệt độ nguồn

STT	Thuốc BVTV	Mảnh phổ	Tại 200°C		Tại 210°C		Tại 220°C	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích
1	α -BHC	181	9,31	1733	9,31	2395	9,28	3599
		219						
2	β -BHC	181	9,75	1218	9,75	1855	9,73	2911
		219						
3	γ -BHC	181	9,92	1295	9,92	1940	9,90	3087
		219						
4	δ -BHC	181	10,45	933	10,44	1186	10,43	2091
		219						
STT	Thuốc BVTV	Mảnh phổ	Tại 230°C		Tại 240°C		Tại 250°C	
			Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích	Thời gian	Diện tích
1	α -BHC	181	9,31	3846	9,29	3209	9,31	3519
		219						
2	β -BHC	181	9,75	3133	9,72	2653	9,75	3024
		219						
3	γ -BHC	181	9,92	3317	9,90	2796	9,92	3115
		219						
4	δ -BHC	181	10,45	2402	10,43	1941	10,45	2110
		219						

Tổng hợp điều kiện tối ưu của GC-MS được xác định ở Bảng 8 dưới đây.

Bảng 8. Điều kiện tối ưu để xác định thuốc BVTV trên thiết bị GC-MS

Thông số	GC-MS
Năng lượng ion hóa Ei	70 eV
Năng lượng khuếch đại đầu dò	1,2 kV
Nhiệt độ nguồn ion	230 ⁰ C
Nhiệt độ bộ phận kết nối GC-MS	250 ⁰ C
Nhiệt độ công bơm	240 ⁰ C
Khí mang	Heli
Cột sắc ký	Cột mao quản Elite-5
Kích thước cột	chiều dài cột 30m, đường kính trong 0,32 mm, độ dày pha tĩnh 0,25 μ m
Tốc độ dòng qua cột	1,7 ml/phút
Thời gian ngắt dung môi	7 phút
Chế độ bơm mẫu	Không chia dòng
Chế độ TIC	50 đến 550 amu
Chế độ chạy	SIR và SCAN
Thể tích bơm mẫu	1 μ l

Xác định thời gian lưu của các chất phân tích

Với điều kiện được tối ưu, các dẫn chất thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ đã được tách nhau rõ ràng và hoàn toàn trong khoảng 20 phút như được thể hiện ở Bảng 9 dưới đây.

Bảng 9. Thời gian lưu của các chất trong hỗn hợp 18 chất chuẩn

TT	Tên chất	Thời gian lưu (phút)	TT	Tên chất	Thời gian lưu (phút)
1	α -BHC	9,32	10	Dieldrin	14,98
2	β -BHC	9,76	11	Endrin	15,44

TT	Tên chất	Thời gian lưu (phút)	TT	Tên chất	Thời gian lưu (phút)
3	γ -BHC	9,92	12	Endosulfan I	15,68
4	δ -BHC	10,46	13	p,p' - DDD	15,84
5	Heptaclo	11,45	14	Endrin aldehyd	15,98
6	Aldrin	12,29	15	Endosulfan sulfat	16,44
7	Heptaclo epoxit	13,27	16	p,p' -DDT	16,57
8	Endosulfan II	14,26	17	Endrin keton	17,25
9	p,p' - DDE	14,92	18	Metoxyclo	17,54

Xác định các chất theo mảnh ion (m/z) thu được

Ngoài việc xác định chất theo thời gian lưu thì trong GC-MS còn dựa vào giá trị mảnh phổ m/z của các chất cần phân tích với giá trị mảnh phổ của chất chuẩn trong thư viện phổ có sẵn (qua kỹ thuật phân tích SCAN). Các mảnh khối chính để định lượng và các mảnh đặc trưng để định tính đối với mỗi chất trong hỗn hợp 18 chất chuẩn đã được xác định (Bảng 10).

Bảng 10. Các mảnh phổ đặc trưng và mảnh chính sử dụng theo GC-MS/SIR

STT	Tên chất	Các mảnh khối đặc trưng	Mảnh định lượng
1	α -BHC	181, 219	181
2	β -BHC	181, 219	181
3	γ -BHC	181, 219	181
4	δ -BHC	181, 219	181
5	Heptaclo	100, 272	272
6	Aldrin	66, 263	263
7	Heptaclo epoxit	253, 81	253
8	p,p' - DDE	241, 170	241
9	Endosulfan II	246, 318	246
10	Dieldrin	263, 79	263

STT	Tên chất	Các mảnh khối đặc trưng	Mảnh định lượng
11	Endrin	263, 181	263
12	p,p'-DDD	241, 195	241
13	Endosulfan I	235, 165	235
14	Endrin aldehyt	345, 67	345
15	Endosulfan sulfat	272, 387	272
16	p,p'-DDT	235, 65	235
17	Endrin keton	317, 67	317
18	Metoxyclo	227, 152	227

Bước 2: Chuẩn bị mẫu dùng cho phân tích GC-MS

Dựa trên các nguyên tắc của kỹ thuật xử lý mẫu huyết thanh, dựa trên tính chất lý hóa của thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ, sau khi khảo sát thực nghiệm các phương pháp, phương pháp xử lý mẫu theo phương pháp QueChERS được sử dụng.

Phương pháp QueChERS với dung chiết một lần bằng axetonitril đã được đệm hóa và tách khỏi nước có trong mẫu bằng phân bố lỏng lỏng nhờ muối magie sulfat (MgSO_4) và natri clorua (NaCl). Quá trình làm sạch bằng chiết phân tán pha rắn (d-SPE) được dùng để loại các axit hữu cơ, nước còn dư và các thành phần khác nhờ phối hợp chất hấp phụ amin bậc 1 và bậc 2 (Primary Secondary Amine, viết tắt là PSA) và MgSO_4 . Sau đó dịch chiết được cô cạn và hòa tan bằng dung môi n-Hexan. Cuối cùng dịch chiết được phân tích bằng sắc ký khí. Tỷ lệ MgSO_4 : NaCl được thay đổi khác nhau để chọn được hiệu suất thu hồi cao nhất. Các công đoạn của quy trình chiết bao gồm:

i) đồng hóa huyết thanh, sau đó bổ sung H_2O đã loại ion vào huyết thanh đồng hóa với tỷ lệ theo thể tích của H_2O : huyết thanh là từ 0,5:1 đến 3:1 để thu được hỗn hợp huyết thanh;

ii) chuẩn bị dung môi chiết axetonitril được đệm hóa và tách nước bằng cách lần lượt thêm MgSO_4 và NaCl vào axetonitril, trong đó lượng MgSO_4 sử dụng cho mỗi ml axetonitril nằm trong khoảng 100-500 mg, lượng NaCl sử dụng cho mỗi ml axetonitril nằm trong khoảng 50-100 mg, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO_4 : NaCl nằm trong khoảng từ 1:1 đến 9:1;

iii) thêm hỗn hợp huyết thanh nêu trên vào dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước nêu trên theo tỷ lệ thể tích của hỗn hợp huyết thanh: dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước là từ 1:1 đến 1:3, tiếp theo lắc và ly tâm để thu được dung dịch trên bề mặt;

iv) làm sạch dung dịch trên bề mặt thu được bằng cách thêm dung dịch này vào hỗn hợp MgSO_4 và PSA, trong đó lượng MgSO_4 sử dụng cho mỗi ml dung dịch trên bề mặt nằm trong khoảng 50-150 mg, lượng PSA sử dụng cho mỗi ml dung dịch trên bề mặt nằm trong khoảng 100-200 mg, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO_4 :PSA nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:2, tiếp theo lắc và ly tâm để thu được dung dịch trên bề mặt đã làm sạch;

v) cô đặc dung dịch trên bề mặt đã làm sạch bằng thiết bị cô có sử dụng khí nitơ;

vi) thêm n-hexan vào dung dịch trên bề mặt cô đặc, trong đó n-hexan được sử dụng với lượng sao cho tỷ lệ thể tích n-hexan và dung dịch trên bề mặt trước khi được cô đặc ở công đoạn v) là từ 0,5:1 đến 1:1, lắc để thu dịch chiết bên trên và lọc dịch chiết bên trên này để thu được mẫu.

Bước 3: Thiết lập sắc ký đồ chuẩn của tập hợp các chất chuẩn mà là hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ

Xác định tính đặc hiệu

Bơm lần lượt dung dịch chuẩn chứa hỗn hợp 18 chất chuẩn với nồng độ đã biết, mẫu thêm chuẩn và mẫu trắng ở trong cùng điều kiện phân tích vào cột sắc ký. Thuật ngữ “mẫu thêm chuẩn” dùng để chỉ mẫu thực tế dùng để nghiên cứu được thêm chất chuẩn. Thuật ngữ “mẫu trắng” dùng để chỉ mẫu kiểm soát được thành phần và không chứa chất quan tâm. Phân tích lặp lại 10 lần đối với mẫu dung dịch chuẩn và 10 lần với mẫu thêm chuẩn để xác định thời gian lưu của các chất. Thời gian lưu của hỗn hợp thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ được thể hiện ở Bảng 11 và trên Hình 7. Độ lệch chuẩn (Standard Deviation, viết tắt là SD) và độ lệch chuẩn tương đối (Relative Standard Deviation, viết tắt là RSD) về thời gian lưu của mỗi chất được trình bày ở Bảng 12. Từ kết quả của Hình 7 và Hình 9 cho thấy tại hai chế độ quét SCAN và SIR, tại các điều kiện đã được khảo sát khi phân tích dung dịch chuẩn và mẫu thêm chuẩn có tín hiệu của 18 pic tương đối cân xứng nhau tại thời gian lưu từ 9,2 đến 17,8 phút. Trong khi đó, khi bơm mẫu trắng (kết quả thể hiện trên Hình 8 không thu được tín hiệu pic trong khoảng thời gian từ 9,2 đến 17,8 phút. Kết quả từ Bảng 12 cho thấy, giá trị SD rất

nhỏ. Điều đó nghĩa là thời gian lưu của mỗi chất xác định được sau 10 lần phân tích lặp lại là ổn định và chính xác. Như vậy hệ thống GC-MS và phương pháp phân tích có thể dùng để phân tích định tính, định lượng các hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ.

Bảng 11. Thời gian lưu của hỗn hợp hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ

STT	Tên chất	Thời gian lưu (phút)	STT	Tên chất	Thời gian lưu (phút)
1	α -BHC	9,30	10	Dieldrin	14,95
2	β -BHC	9,74	11	Endrin	15,42
3	γ -BHC	9,90	12	Beta-Endosulfan	15,66
4	δ -BHC	10,44	13	p,p' - DDD	15,83
5	Heptaclo	11,43	14	Endrin aldehyd	16,14
6	Aldrin	12,27	15	Endosulfan sulfat	16,42
7	Heptaclo epoxit	13,25	16	p,p' -DDT	16,55
8	Alpha-Endosulfan	14,25	17	Endrin keton	17,24
9	p,p' - DDE	14,90	18	Metoxyclo	17,52

Bảng 12. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của phương pháp

STT	Thuốc BVTV	SD	RSD (%)
1	α -BHC	0,004082	0,04384
2	β -BHC	0,004082	0,04190
3	γ -BHC	0,007528	0,07594
4	δ -BHC	0,005164	0,04944
5	Heptaclo	0,005477	0,04789
6	Aldrin	0,008367	0,06821
7	Heptaclo epoxit	0,005477	0,04129
8	alpha-Endosulfan	0,004082	0,02864

9	p,p'- DDE	0,008165	0,05481
10	Dieldrin	0,004082	0,02729
11	Endrin	0,005164	0,03346
12	Beta- Endosulfan	0,004082	0,02606
13	p,p'-DDD	0,005477	0,03461
14	Endrin aldehyt	0,01169	0,07324
15	Endosulfan sulfat	0,005477	0,03332
16	p,p' -DDT	0,004082	0,02465
17	Endrin keton	0,005164	0,02994
18	Metoxyclo	0,005164	0,02946

Giới hạn phát hiện (limit of detection, viết tắt là LOD) và giới hạn định lượng (limit of quantitation, viết tắt là LOQ)

Thực hiện thử nghiệm lặp trên nền mẫu trắng được thêm chuẩn ở hàm lượng thấp là 2ppb (nhỏ hơn giới hạn phát hiện). Giới hạn phát hiện được tính theo công thức:

$$LOD = \bar{X} + 3SD$$

Trong đó $\bar{X}$: Kết quả nồng độ trung bình khi thử mẫu trắng, mẫu thêm chuẩn

SD: Độ lệch chuẩn khi thử mẫu trắng, mẫu thêm chuẩn

Vì nồng độ mẫu thấp hơn giới hạn định lượng dự kiến nên:

$$LOD = 3 * SD$$

Giới hạn định lượng được tính theo công thức:

$$LOQ = 3 * LOD$$

Kết quả: Sắc ký đồ của mẫu thêm chuẩn tại 2ppb được thể hiện trên Hình 10. Sau đó tiến hành ước lượng các giá trị LOD và thêm chuẩn tại nồng độ LOQ để khẳng định độ ổn định của phương pháp tại LOQ. Kết quả của Bảng 13 cho thấy hiệu suất thu hồi và độ lệch tiêu chuẩn tương đối tại giá trị LOQ là phù hợp (khi so sánh với phương pháp AOAC 2003 theo tài liệu “Các phương pháp phân tích chính thức” (Official Methods of Analysis) của Hiệp hội các nhà hóa học phân tích chính thức (Association of Official Analytical Chemists)).

Bảng 13. LOD và LOQ của phương pháp theo giải pháp hữu ích

STT	Thuốc BVTV	LOD (ppb)	LOQ _{mong muốn} (ppb)	Nồng độ thêm chuẩn (ppb)	Độ thu hồi (R%)	RSD (%)
1	α -BHC	1,561	4,683	5	89	3,97

2	β -BHC	1,162	3,486	5	93,07	4,76
3	γ -BHC	1,627	4,881	5	105,55	5,42
4	δ -BHC	1,205	3,615	5	87,52	7,27
5	Heptaclo	1,625	4,875	5	86,31	5,52
6	Aldrin	1,126	3,378	5	93,59	4,98
7	Heptaclo epoxit	1,104	3,312	5	105,94	4,13
8	alpha-Endosulfan	1,353	4,059	5	102,34	5,97
9	p,p' - DDE	1,109	3,327	5	99,25	7,33
10	Dieldrin	1,22	3,66	5	97,44	8,84
11	Endrin	3,366	10,098	10	97,74	7,31
12	Beta- Endosulfan	3,165	9,495	10	100,96	7,29
13	p,p'-DDD	1,129	3,387	5	109,5	4,75
14	Endrin aldehyt	3,427	10,281	10	95,32	6,54
15	Endosulfan sulfat	3,401	10,203	10	85,17	9,34
16	p,p' -DDT	3,524	10,572	10	100,32	9,54
17	Endrin keton	3,126	9,378	10	104,79	9,81
18	Metoxyclo	1,473	4,419	5	100,99	10,31

Bước 4: Thiết lập bộ đường chuẩn cho tập hợp các chất chuẩn mà là hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ

Đường chuẩn được chuẩn bị trên nền mẫu huyết thanh người để loại trừ ảnh hưởng của nền. Mẫu trắng được chiết theo quy trình để thu lấy dịch chiết, pha dung dịch chuẩn trên nền mẫu trắng ở các khoảng nồng độ 0; 5; 10; 20; 50; 100; 200 ng/ml. Đồ thị đường chuẩn của các chất phân tích được thể hiện trên Hình 11 đến Hình 28 với hệ số xác định R^2 thỏa mãn

$$0,995 \leq R^2 \leq 1$$

Độ thu hồi:

- Thêm một lượng chất chuẩn xác định vào mẫu phân tích sau đó phân tích các mẫu thêm chuẩn đó bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích với 10 lần lặp, tính độ thu hồi theo công thức sau đây:

+Đối với mẫu phân tích:

$$R\% = \frac{C_{m+c} - C_m}{C_c} \times 100$$

+ Đối với mẫu trắng:

$$R\% = \frac{C_{tt}}{C_c} \times 100$$

trong đó:

R%: Độ thu hồi, %

C_{m+c}: Nồng độ chất phân tích trong mẫu thêm chuẩn

C_m: Nồng độ chất phân tích trong mẫu phân tích

C_c: Nồng độ mẫu thêm chuẩn (lý thuyết)

C_{tt}: Nồng độ chất phân tích trong mẫu trắng thêm chuẩn

Sau đó tính độ thu hồi chung là trung bình của độ thu hồi các lần lặp được thể hiện ở Bảng 13 và Bảng 14.

- Thêm chất chuẩn ở hai mức nồng độ là thấp (cụ thể là tại nồng độ LOQ = 5ppb và 10ppb), và mức trung bình trong khoảng nồng độ làm việc, cụ thể là tại nồng độ 50ppb. Kết quả xác định đối với mẫu thêm chuẩn tại nồng độ LOQ đã được thể hiện ở bảng 13 và kết quả thêm chuẩn tại nồng độ 50ppb được xác định và thể hiện ở bảng 14. Các kết quả thu được đối với mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 50ppb cho độ thu hồi tốt và đáp ứng điều kiện được quy định trong AOAC 2003.

Bảng 14. Kết quả độ thu hồi tại nồng độ 50ppb

STT	Thuốc BVTC	Thời gian	R(%)
1	α -BHC	9,31	83,00
2	β -BHC	9,74	88,69
3	γ -BHC	9,91	86,41
4	δ -BHC	10,44	93,12
5	Heptaclo	11,44	78,17
6	Aldrin	12,28	82,10
7	Heptaclo epoxit	13,26	85,34
8	Alpha- Endosulfan	14,24	91,49
9	p,p'- DDE	14,9	85,89

10	Dieldrin	14,96	91,24
11	Endrin	15,43	102,23
12	Beta- Endosulfan	15,66	96,99
13	Endosulfan sulfat	15,83	90,82
14	p,p'-DDD	15,97	89,20
15	Endrin aldehyt	16,43	108,98
16	p,p' -DDT	16,56	93,83
17	Endrin keton	17,25	101,40
18	Metoxyclo	17,53	94,74

Độ lặp lại, độ tái lập:

- Với cùng một mẫu đã được làm đồng nhất, tiến hành phân tích bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích với 10 lần lặp như sau:
- Xác định độ lặp lại: Một người thực hiện trên cùng một thiết bị, trong một khoảng thời gian tương đối ngắn, với các điều kiện thực hiện thí nghiệm giống nhau với 10 lần thử nghiệm.
- Xác định độ tái lập nội bộ: Bố trí 2 người thực hiện phân tích cùng một mẫu tại hai ngày khác nhau, mỗi người thực hiện phân tích 10 lần.
- SD_r ; SD_R hoặc RSD_r ; RSD_R được tính theo công thức:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad RSD (\%) = \frac{100 \times SD}{\bar{X}}$$

trong đó:

x_i : là giá trị đo được thứ i

$\bar{X}$: là giá trị trung bình

n : là số lần đo.

SD_r : Độ lệch chuẩn lặp lại

RSD_r : Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại

SD_R : Độ lệch chuẩn tái lập (nội bộ)

RSD_R : Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (nội bộ)

Kết quả thu được ở Bảng 15 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối lặp lại và độ lệch chuẩn tương đối tái lập (nội bộ) của phòng thí nghiệm đáp ứng yêu cầu trong AOAC 2003, cụ thể là $RSD_r < 21\%$ và $RSD_R < 31,7\%$.

Bảng 15. Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại và độ lệch chuẩn tương đối tái lập của phương pháp

STT	Thuốc BVTC	RSD (%)	RSD _R (%)
1	α -BHC	3,92	7,07
2	β -BHC	4,36	5,22
3	γ -BHC	5,42	5,36
4	δ -BHC	4,27	4,93
5	Heptaclo	5,52	6,26
6	Aldrin	4,62	4,76
7	Heptaclo epoxit	4,13	5,51
8	Apha- Endosulfan	4,97	6,85
9	p,p' - DDE	6,33	6,39
10	Dieldrin	5,84	4,91
11	Endrin	7,93	8,43
12	Beta- Endosulfan	7,19	9,66
13	Endosulfan sulfat	4,50	5,38
14	p,p' -DDD	9,63	9,72
15	Endrin aldehyt	7,24	10,25
16	p,p' -DDT	5,63	5,72
17	Endrin keton	4,34	9,91
18	Metoxyclo	5,81	8,89

Bước 5: xác định dư lượng hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ trong mẫu máu thực tế

Mẫu phân tích được chuẩn bị theo bước 2, và được đưa vào phương pháp phân tích GC-MS sử dụng điều kiện tối ưu hóa thu được từ bước 1 để thu được pic của mỗi hợp chất. So sánh pic thu được với sắc ký đồ chuẩn thu được từ bước 3 để định tính có những chất quan tâm nào trong mẫu phân tích. Từ diện tích pic thu được, sử dụng bộ đường chuẩn thu

được từ bước 4 để xác định nồng độ của hợp chất tương ứng – tức là xác định hàm lượng của chất quan tâm trong mẫu phân tích. (OK)

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích được minh họa thêm bằng ví dụ sau. Ví dụ này được đưa ra nhằm mục đích minh họa và không dự định giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ áp dụng phương pháp xác định dư lượng hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ trong máu của bệnh nhân ung thư vú (nhóm bệnh) và người có sức khỏe bình thường (nhóm chứng) để nghiên cứu xác định mối liên quan giữa lượng hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ trong máu và bệnh ung thư vú (Bảng 16), tức nhằm tìm ra hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ có phải là một trong những nguyên nhân gây ra bệnh ung thư vú ở Việt Nam hay không.

Thực hiện phân tích mẫu máu đối với hai nhóm đối tượng là nhóm bệnh gồm 146 bệnh nhân ung thư vú, và nhóm chứng gồm 146 người có sức khỏe bình thường. Bệnh nhân tuyến vào nghiên cứu đến khám và điều trị tại Bệnh viện Ung bướu Hà Nội, người có sức khỏe bình thường đến khám tại Phòng khám đa khoa-Trường Đại học Y tế công cộng và được xác định là có sức khỏe bình thường, không mắc bệnh mãn tính. Mẫu thu thập được lưu giữ ở nhiệt độ âm sâu và được phân tích trong cùng thời điểm. Ở mỗi đối tượng, thực hiện lấy 2 ml máu. Mẫu máu thu được từ mỗi đối tượng được gán tên mẫu (bằng số mã hóa cho từng đối tượng) và được tách lấy huyết thanh để phân tích. Pha loãng huyết thanh thu được bằng nước loại ion với tỷ lệ thể tích huyết thanh:nước bằng 1:1.

Chuẩn bị ống nghiệm có thể ly tâm được với dung tích 15ml, thêm 2ml ACN, 800mg MgSO_4 , 200mg NaCl, tiếp theo thêm 2 ml huyết thanh đã pha loãng, lắc ống mạnh trong 1 phút bằng máy lắc vortex, đảm bảo dung môi tương tác tốt với mẫu và các tinh thể muối bị vỡ ra khi lắc, sau đó ly tâm 10 phút ở tốc độ 4000 vòng/ phút để thu được dung dịch trên bề mặt.

Hút lấy 1,5ml dung dịch trên bề mặt vào ống nghiệm có dung tích 15ml, sau đó thêm vào 110mg MgSO_4 và 180 mg PSA, lắc ống mạnh trong 1 phút bằng máy lắc vortex rồi lại ly tâm trong vòng 10 phút ở 4000 vòng/phút để thu được dung dịch trên bề mặt được làm sạch. Tiếp theo, hút 1000 μl dung dịch trên bề mặt đã làm sạch để chuyển vào lọ dung tích 12ml và đưa vào thiết bị cô có sử dụng khí nitơ để cô đặc. Sau đó, hút 1ml dung dịch n-hexan chuyển vào lọ chứa dung dịch cô đặc đã nêu, lắc ống mạnh trong 1 phút bằng máy lắc

vortex để thu được dịch chiết bên trên, rồi lọc dịch chiết bên trên này qua đầu lọc 0,45µm để thu được mẫu.

Mẫu được bơm vào hệ thống sắc ký khối phổ GC-MS bao gồm hệ thống Autosystem GC-600/Turbo Mass 600D (hãng sản xuất Perkin-Elmer), và bộ bơm mẫu chia dòng/không chia dòng khả lập trình (Programmable Split/ Splitless Injector, viết tắt là PSSI), cột mao quản Elite-5 MS (hãng sản xuất Perkin-Elmer) với các điều kiện tối ưu như sau:

- năng lượng ion hóa Ei: 70 eV
- năng lượng khuếch đại đầu dò: 1,2 kV
- nhiệt độ nguồn ion: 230⁰C
- nhiệt độ bộ phận kết nối GC-MS: 250⁰C
- nhiệt độ cổng bơm: 240⁰C
- khí mang: Heli
- pha tĩnh qua cột: 1,4-bis(dimetylsiloxy)phenylen dimetyl polysiloxan
- tốc độ dòng khí mang qua cột: 1,7 ml/phút
- thời gian ngắt dung môi: 7 phút
- chế độ bơm mẫu: không chia dòng
- chế độ sắc ký đồ ion tổng (Total Ion Chromatogram, viết tắt là TIC): 50 đến 550 đơn vị khối lượng nguyên tử (Atomic Mass Unit, viết tắt là amu)
- chế độ chạy: chế độ ghi ion được chọn (Selected Ion Recording, viết tắt là SIR) và chế độ quét (SCAN)
- thể tích bơm mẫu: 1µl
- chương trình nhiệt độ của buồng cột: 70⁰C giữ 1 phút, tăng 15⁰C/phút đến 180⁰C giữ 0 phút, sau đó tăng 5⁰C/phút đến 210⁰C giữ 0 phút, tiếp tục tăng 15⁰C/phút đến 280⁰C giữ 3 phút

Kết quả phân tích được đối chiếu với sắc ký đồ của hỗn hợp 18 chất chuẩn theo chế độ quét SCAN được thể hiện trên Hình 7, và bộ đường chuẩn của 18 chất chuẩn (Hình 11-28) để xác định định tính và định lượng các chất quan tâm trong mẫu. Kết quả xác định đối

với một phần trong số tập hợp đối tượng tham gia thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 16. Kết quả cho thấy trong số 18 chất phân tích thì chỉ có DDE, là sản phẩm chuyển hoá của DDT, được phát hiện chính trong một số mẫu bệnh nhân ung thư vú. Vì vậy, điều đó cho thấy thuốc trừ sâu clo hữu cơ DDE có liên quan tới bệnh ung thư vú ở Việt Nam.

Bảng 16: Kết quả xác định dư lượng thuốc BVTV nhóm clo hữu cơ trong máu của đối tượng nghiên cứu

STT	Tên mẫu	α -BHC	β -BHC	γ -BHC	δ -BHC	Heptaclo	Aldrin	Heptaclo epoxit	Alpha- Endosulfan	p,p'- DDE	Dieldrin	Endrin	Beta- Endosulfan	p,p'-DDD	Endrin aldehyt	Endosulfan sulfat	p,p' - DDT	Endrin keton	Metoxyclo
1	1572	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	7,52	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
2	1573	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	8,74	33,12	KPH	KPH	5,54	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
3	1574	KPH	KPH	KPH	KPH	93,08	KPH	KPH	KPH	54,7	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
4	1575	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	6,93	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
5	1576	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	12,17	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
6	1577	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	14,5	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
7	1578	KPH	KPH	KPH	KPH	8,32	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
8	1579	KPH	KPH	KPH	KPH	1288,4	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
9	1625	6,0		3041,68	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	359,7	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
10	1627			6,9	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	1009,8	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	46,25	KPH	KPH	KPH
11	1628	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
12	1629	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	473,5	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
13	1780	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	20,6	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
14	1781	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	19,9	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
15	1782	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	16,05	KPH	KPH	KPH	5,12	KPH	68,6	KPH	KPH	KPH
16	1786	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	5,66	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH
17	1788	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	5,35	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH	KPH

Chú thích: KPH: Không phát hiện; Đơn vị nồng độ xác định dư lượng thuốc BVTV trong máu: ppb (phần tỷ)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật (BVTV) nhóm clo hữu cơ trong máu bằng sắc ký khí ghép khối phổ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

bước 1: tối ưu hóa các điều kiện của hệ thống sắc ký khí-khối phổ (GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry), trong đó hệ thống GC-MS bao gồm hệ thống Autosystem GC-600/Turbo Mass 600D (hãng sản xuất Perkin-Elmer), và bộ bơm mẫu chia dòng/không chia dòng khả lập trình (Programmable Split/ Splitless Injector, viết tắt là PSSI), cột mao quản Elite-5 MS (hãng sản xuất Perkin-Elmer) với các điều kiện tối ưu như sau:

- năng lượng ion hóa Ei: 70 eV
- năng lượng khuếch đại đầu dò: 1,2 kV
- nhiệt độ nguồn ion: 230⁰C
- nhiệt độ bộ phận kết nối GC-MS: 250⁰C
- nhiệt độ công bơm: 240⁰C
- khí mang: heli
- pha tĩnh qua cột: 1,4-bis(dimetylsiloxy)phenylen dimetyl polysiloxan
- tốc độ dòng khí mang qua cột: 1,7 ml/phút
- thời gian ngắt dung môi: 7 phút
- chế độ bơm mẫu: không chia dòng
- chế độ sắc ký đồ ion tổng (Total Ion Chromatogram, viết tắt là TIC): 50 đến 550 đơn vị khối lượng nguyên tử (Atomic Mass Unit, viết tắt là amu)
- chế độ chạy: chế độ ghi ion được chọn (Selected Ion Recording, viết tắt là SIR) và chế độ quét (SCAN)
- thể tích bơm mẫu: 1µl
- chương trình nhiệt độ của buồng cột: 70⁰C giữ 1 phút, tăng 15⁰C/phút đến 180⁰C giữ 0 phút, sau đó tăng 5⁰C/phút đến 210⁰C

giữ 0 phút, tiếp tục tăng $15^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến 280°C

giữ 3 phút

bước 2: chuẩn bị mẫu dùng cho phân tích GC-MS; trong đó mẫu được chuẩn bị theo quy trình bao gồm các công đoạn sau:

i) đồng hóa huyết thanh, sau đó bổ sung H_2O đã loại ion vào huyết thanh đồng hóa với tỷ lệ theo thể tích của H_2O : huyết thanh là từ 0,5:1 đến 3:1 để thu được hỗn hợp huyết thanh;

ii) chuẩn bị dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước bằng cách lần lượt thêm MgSO_4 và NaCl vào axetonitril, trong đó lượng MgSO_4 sử dụng cho mỗi ml axetonitril nằm trong khoảng 100-500 mg, lượng NaCl sử dụng cho mỗi ml axetonitril nằm trong khoảng 50-100 mg, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO_4 : NaCl nằm trong khoảng từ 1:1 đến 9:1;

iii) thêm hỗn hợp huyết thanh nêu trên vào dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước nêu trên theo tỷ lệ thể tích của hỗn hợp huyết thanh: dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước là từ 1:1 đến 1: 3, tiếp theo lắc và ly tâm để thu được dung dịch trên bề mặt;

iv) làm sạch dung dịch trên bề mặt thu được bằng cách thêm dung dịch này vào hỗn hợp MgSO_4 và chất hấp phụ amin bậc một và bậc hai (Primary Secondary Amine, viết tắt là PSA), trong đó lượng MgSO_4 sử dụng cho mỗi ml dung dịch trên bề mặt nằm trong khoảng 50- 150 mg, lượng PSA sử dụng cho mỗi ml dung dịch trên bề mặt nằm trong khoảng 100-200 mg, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO_4 :PSA nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:2, tiếp theo lắc và ly tâm để thu được dung dịch trên bề mặt đã làm sạch;

v) cô đặc dung dịch trên bề mặt đã làm sạch bằng thiết bị cô có sử dụng khí nitơ;

vi) thêm n-hexan vào dung dịch trên bề mặt cô đặc, trong đó n-hexan được sử dụng với lượng sao cho tỷ lệ thể tích n-hexan và dung dịch trên bề mặt trước khi được cô đặc ở công đoạn v) là từ 0,5:1 đến 1:1, lắc để thu dịch chiết bên trên và lọc dịch chiết bên trên này để thu được mẫu;

bước 3: thiết lập sắc ký đồ chuẩn của tập hợp các chất chuẩn mà là hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ;

bước 4: thiết lập bộ đường chuẩn cho tập hợp các chất chuẩn mà là hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ, trong đó bộ đường chuẩn này dùng để xác định nồng độ hóa chất BVTV trong mẫu phân tích; và

bước 5: xác định dư lượng hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ trong mẫu máu thực tế bằng cách sử dụng điều kiện tối ưu hóa thu được từ bước 1, mẫu phân tích được chuẩn bị theo bước 2, sắc ký đồ chuẩn được thiết lập theo bước 3, và bộ đường chuẩn được thiết lập theo bước 4.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trong công đoạn i) của bước 2, tỷ lệ theo thể tích của H₂O: huyết thanh là 1:1.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trong công đoạn ii) của bước 2, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO₄:NaCl là 4:1.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trong công đoạn iii) của bước 2, tỷ lệ theo thể tích của hỗn hợp huyết thanh:dung môi chiết axetonitril được đậm hóa và tách nước là 1:1.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trong công đoạn iv) của bước 2, tỷ lệ theo trọng lượng của MgSO₄ và PSA là 11:18.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trong công đoạn vi) của bước 2, tỷ lệ theo thể tích của n-hexan và dung dịch trên bề mặt trước khi được cô đặc ở công đoạn v) của bước 2 là 1:1.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó ở bước 3 và bước 4, sắc ký đồ và bộ đường chuẩn được thiết lập cho các hóa chất BVTV nhóm clo hữu cơ bao gồm các chất α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, heptaclo, aldrin, heptaclo epoxit, alpha- endosulfan, p,p'- DDE, dieldrin, endrin, beta- endosulfan, p,p'-DDD, endrin aldehyt, endosulfan sulfat, p,p' -DDT, endrin keton, và metoxyclo.

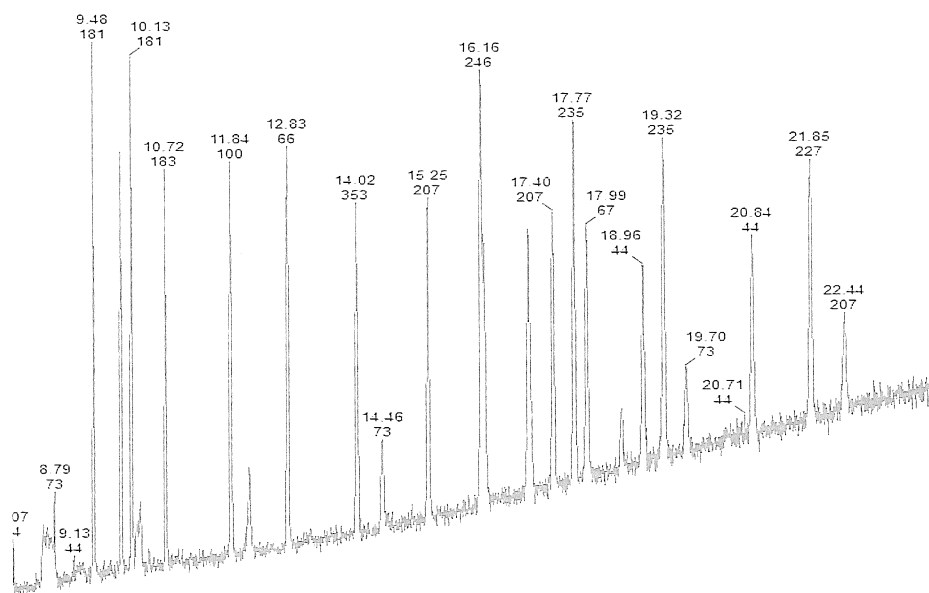
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó sắc ký đồ được thể hiện trên Hình 7.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó bộ đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ chất chuẩn với diện tích mảnh phổ của chất chuẩn đó như sau:

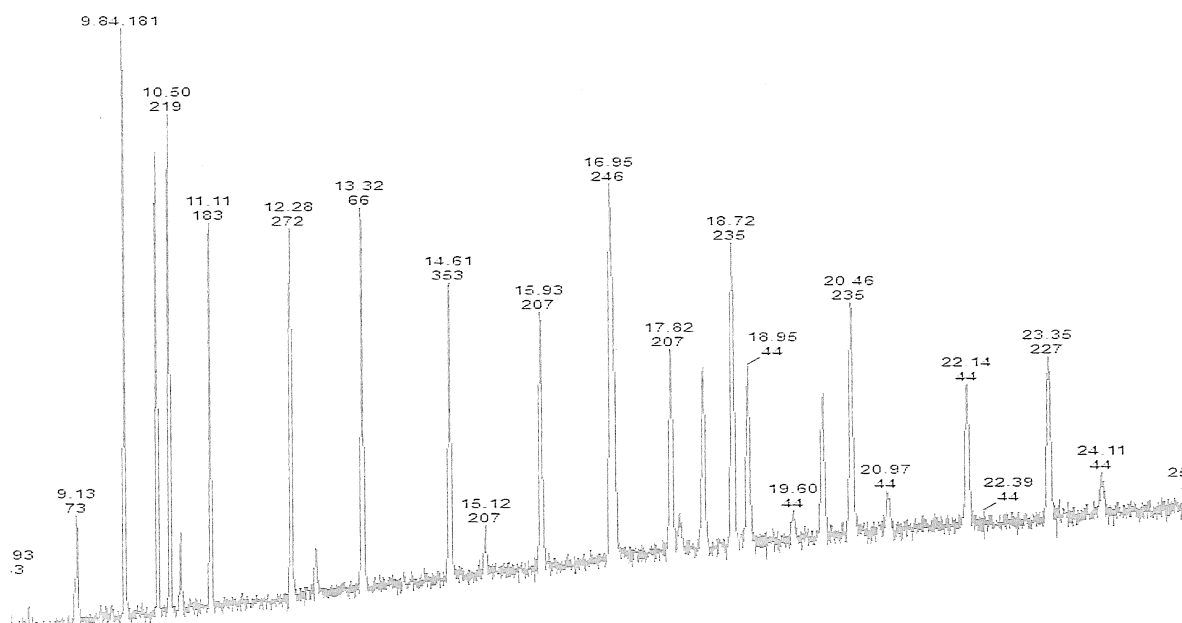
số thứ tự	chất chuẩn	mối tương quan	hệ số xác định R ²
1	α -BHC	$y = 77,9x - 46,925$	0,9999
2	β -BHC	$y = 85,927x - 25,427$	0,9999
3	γ -BHC	$y = 76,343x + 26,429$	0,9999

4	δ -BHC	$y = 54,801x - 40,872$	0,998
5	heptaclo	$y = 51,314x + 14,483$	0,9993
6	aldrin	$y = 50,063x - 5,1076$	0,9993
7	heptaclo epoxit	$y = 28,897x + 8,35$	0,9994
8	alpha-endosulfan	$y = 16,008x - 2,0825$	0,9998
9	p,p' - DDE	$y = 137,14x - 13,189$	0,9997
10	dieldrin	$y = 67,419x - 6,0791$	0,9996
11	endrin	$y = 7,3704x - 5,7915$	0,9979
12	beta- endosulfan	$y = 6,5056x - 12,024$	0,9957
13	p,p'-DDD	$y = 140,99x - 54,642$	0,9998
14	endrin aldehyt	$y = 9,6285x - 18,969$	0,9953
15	endosulfan sulfat	$y = 3,6144x - 10,745$	0,9959
16	p,p' -DDT	$y = 29,808x - 62,177$	0,9973
17	endrin keton	$y = 11,377x - 18,729$	0,9971
18	metoxyclo	$y = 29,808x - 62,177$	0,9973

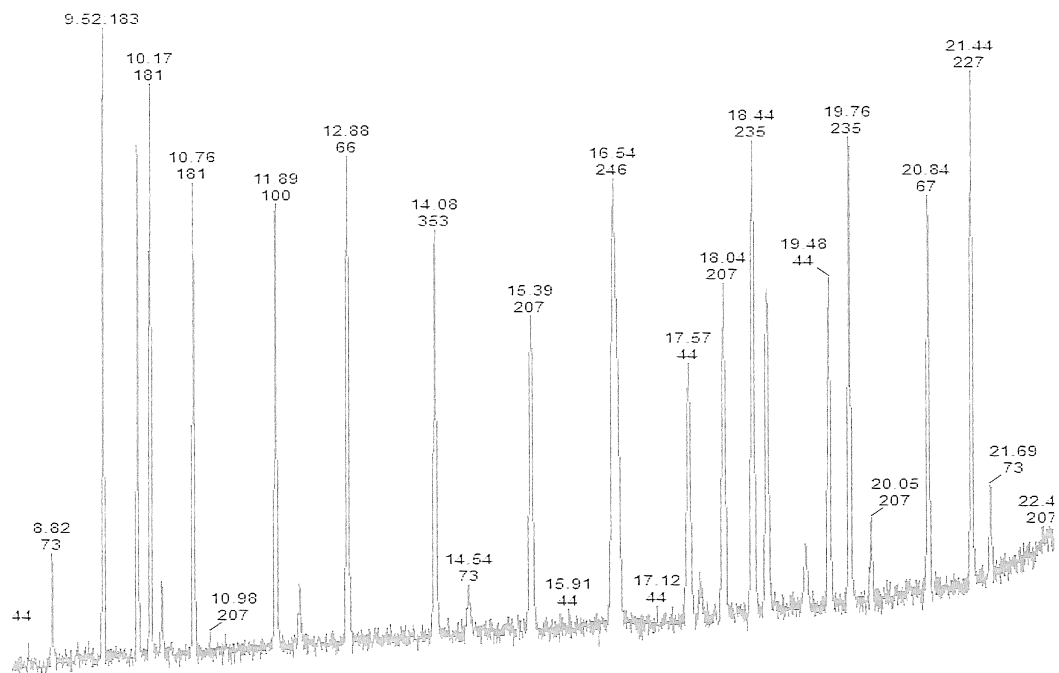
trong đó, y là diện tích mảnh phổ của chất chuẩn (đơn vị là m/z, (mass-to-charge ratio, tỷ lệ khối lượng-điện tích)) và x là nồng độ của chất chuẩn (phần tỷ (part per billion, viết tắt là ppb)).



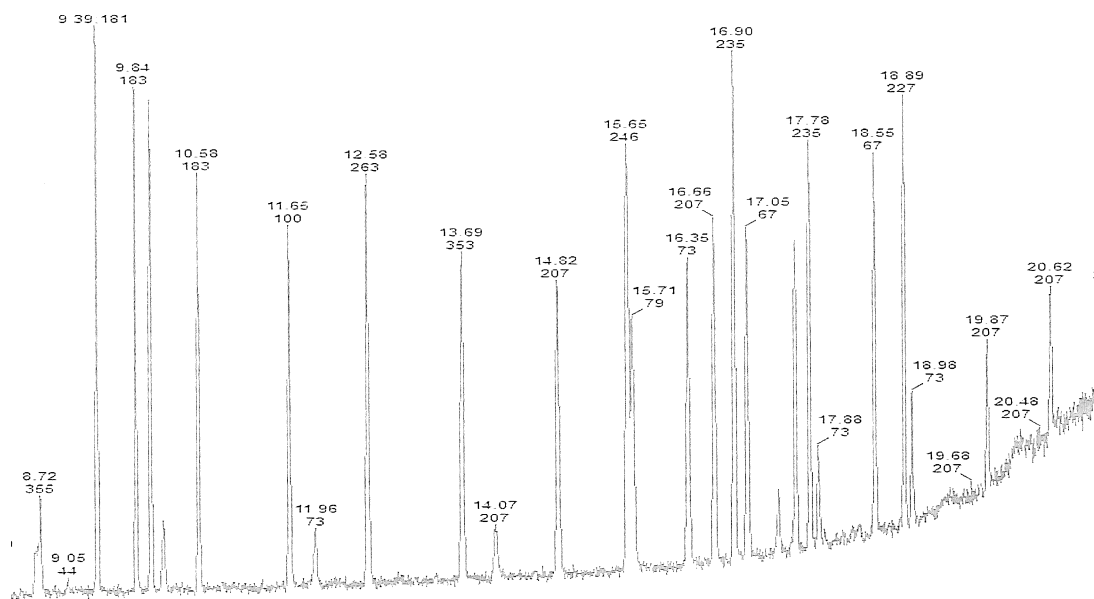
Hình 1



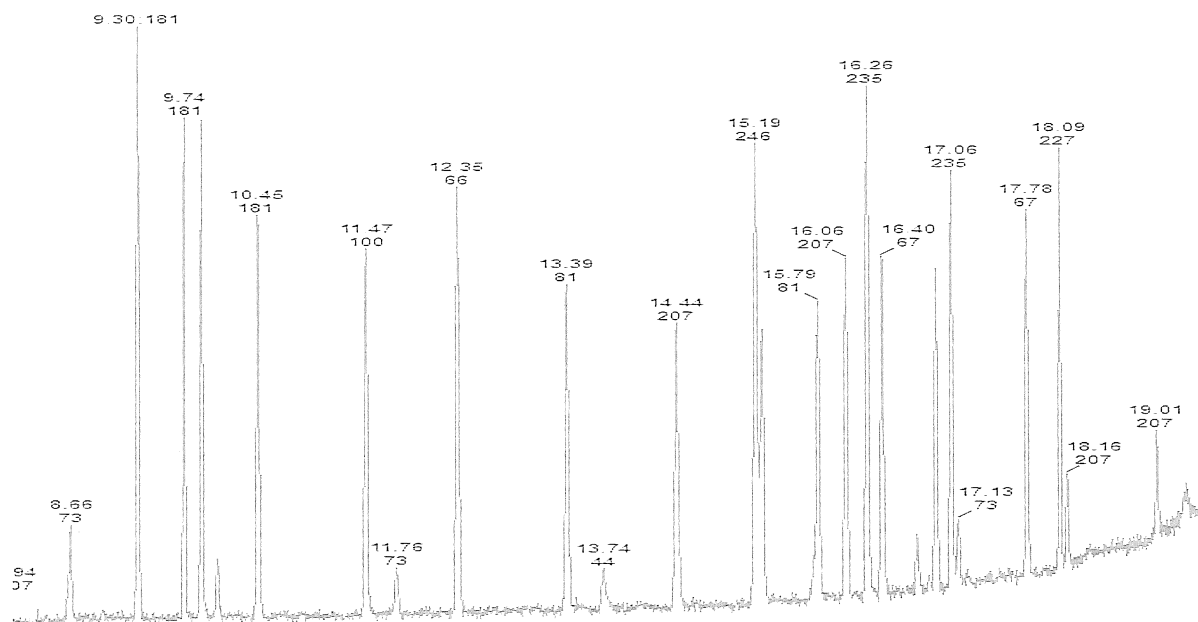
Hình 2



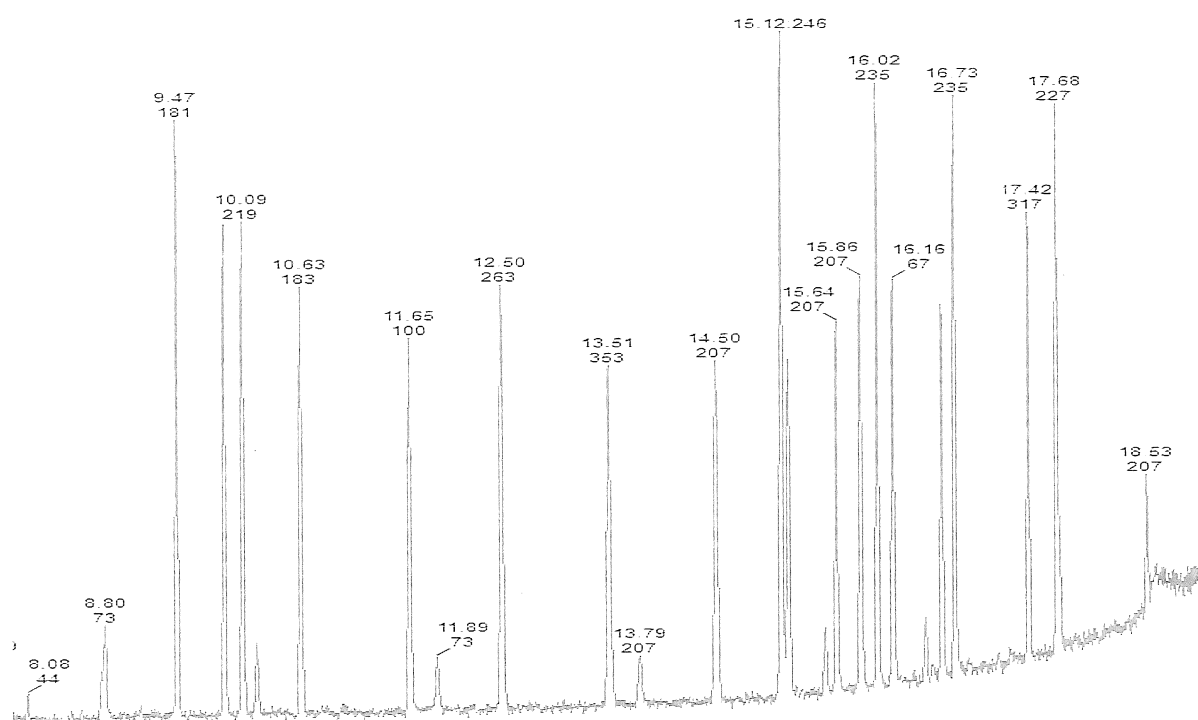
Hình 3



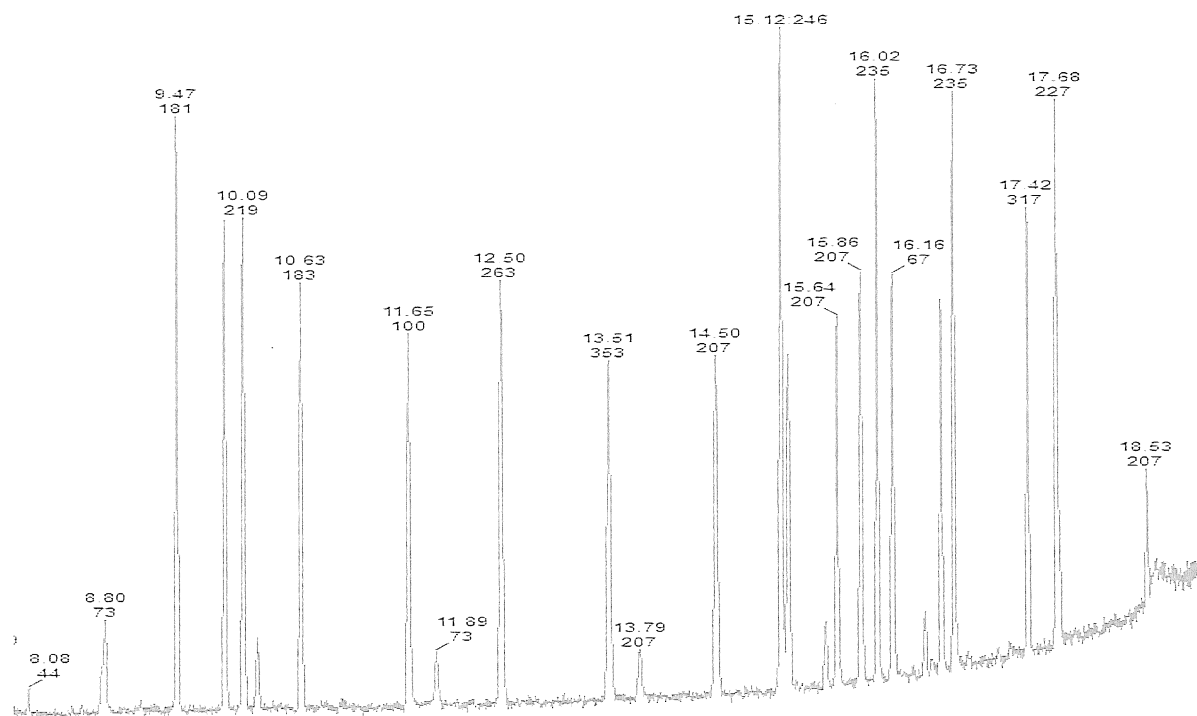
Hình 4



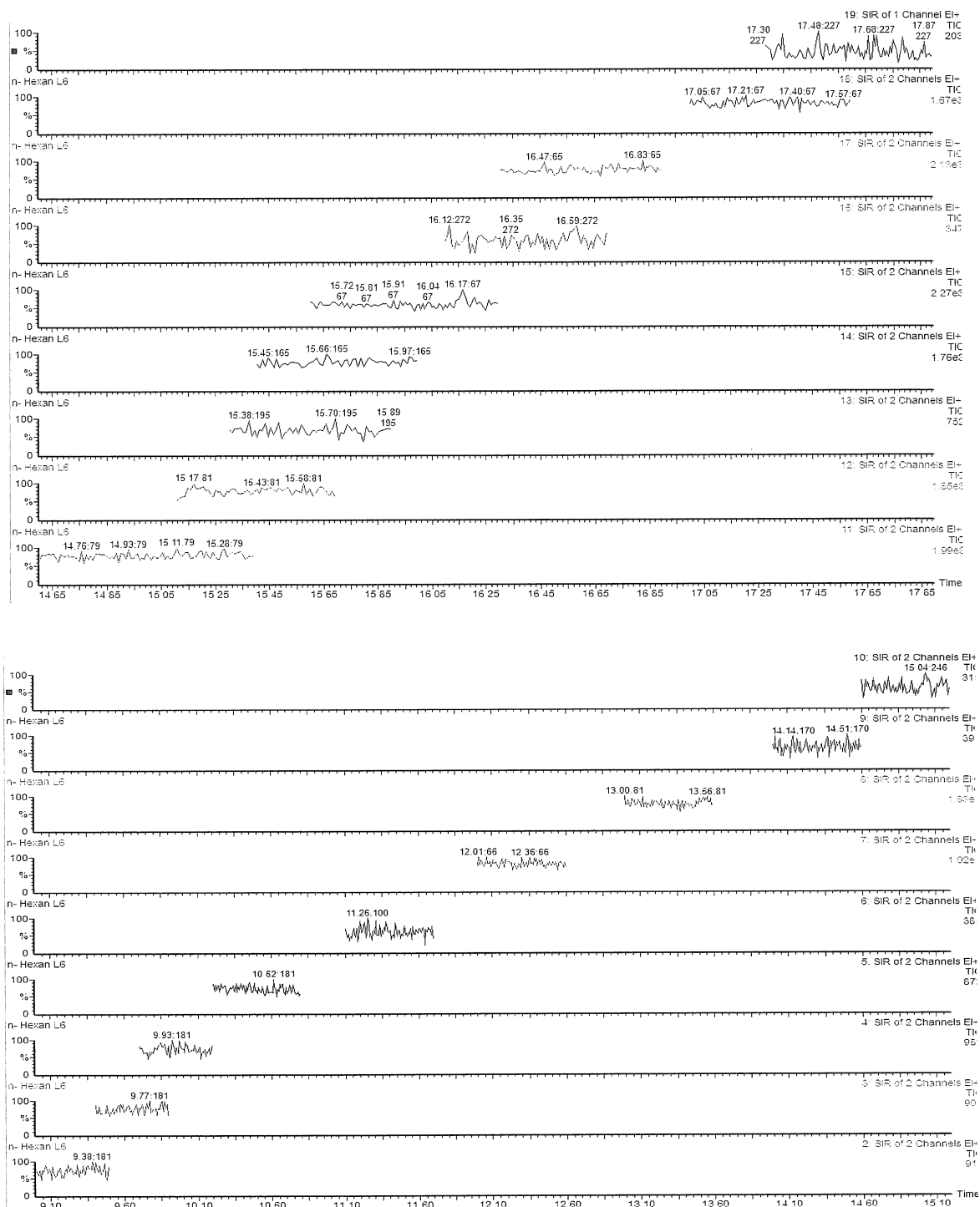
Hình 5



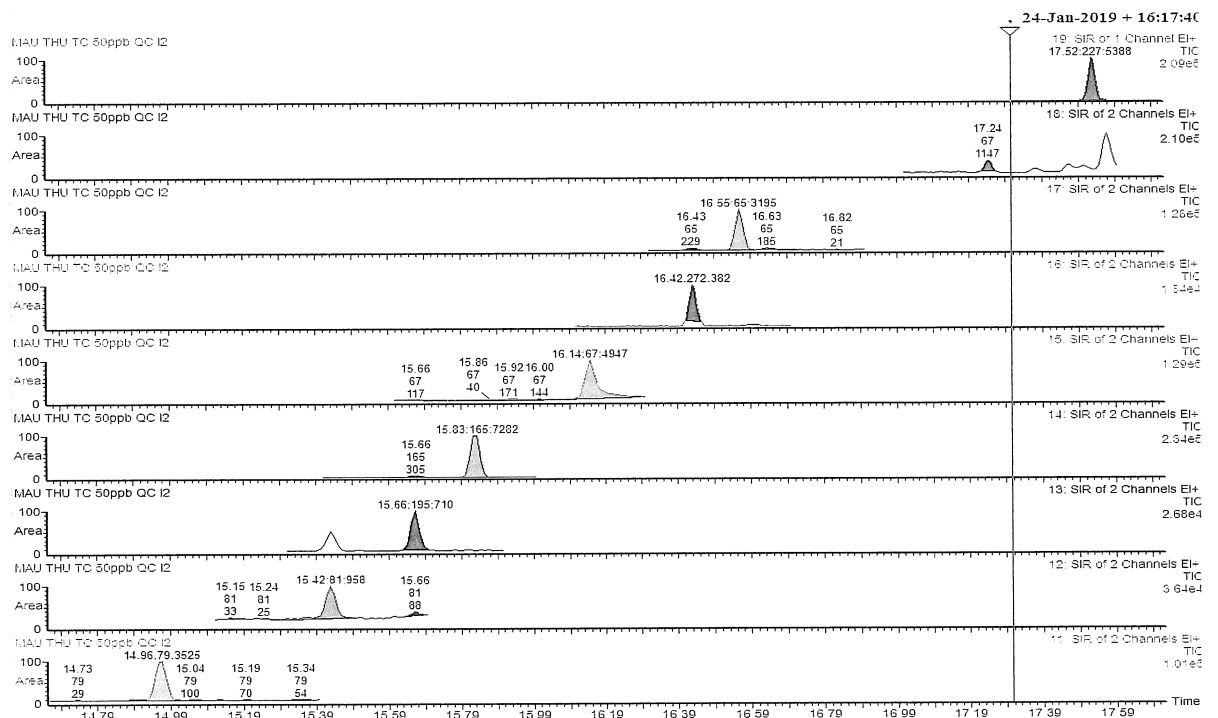
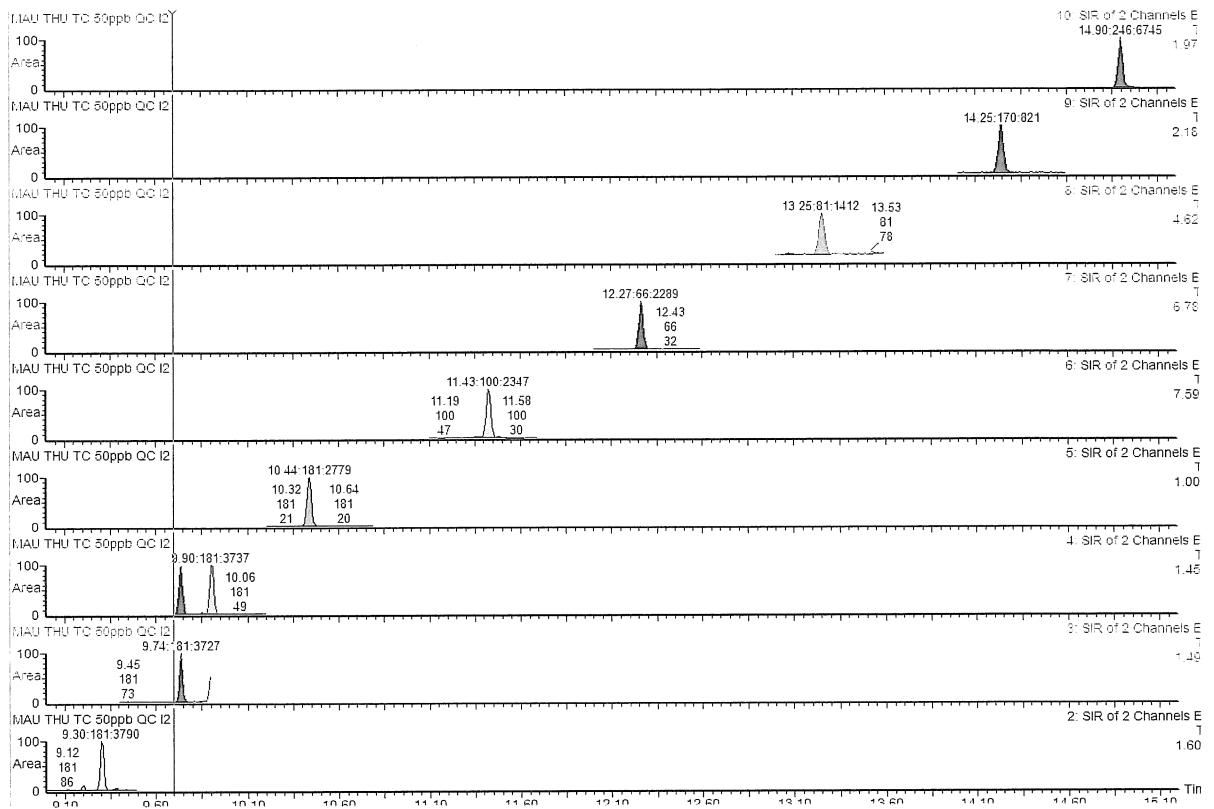
Hình 6



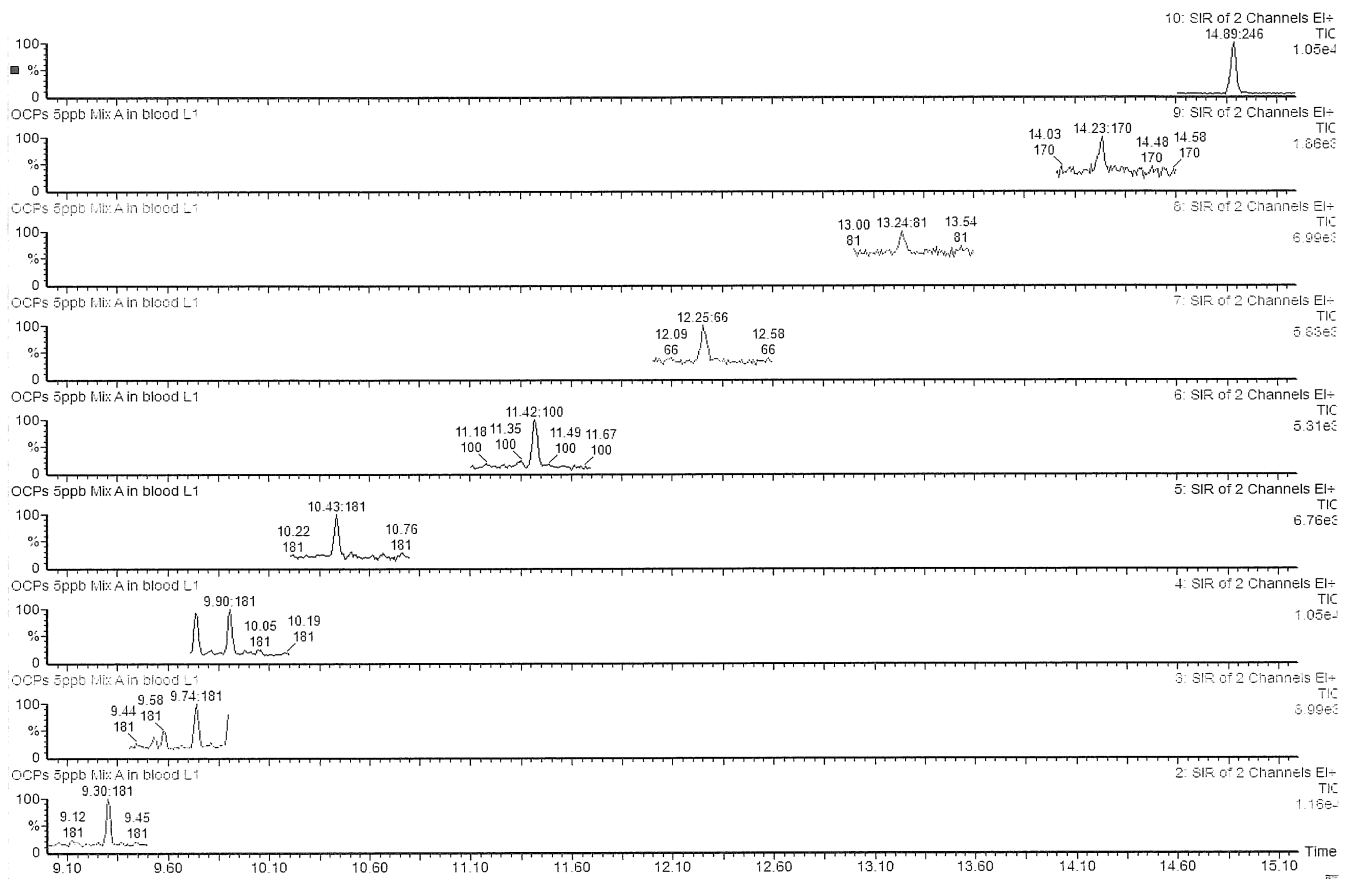
Hình 7



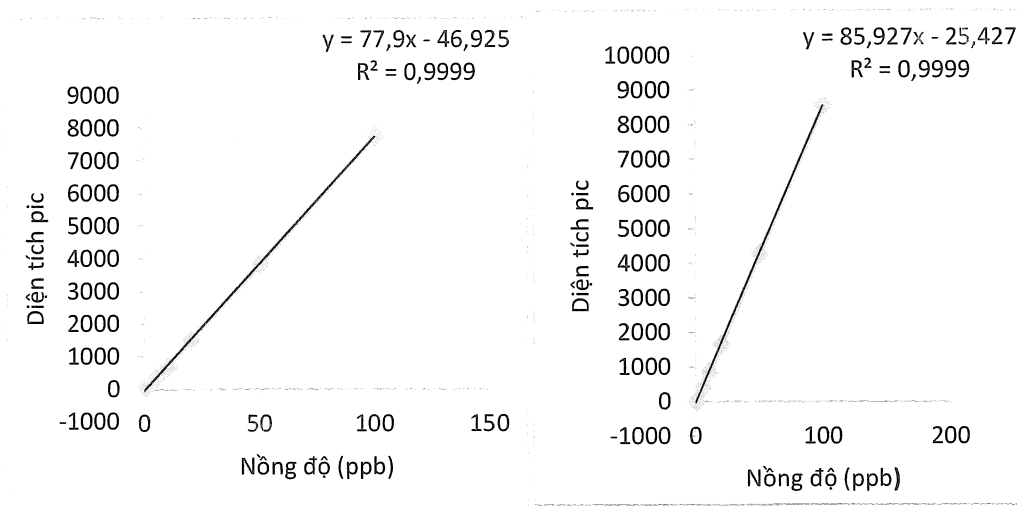
Hình 8



Hình 9

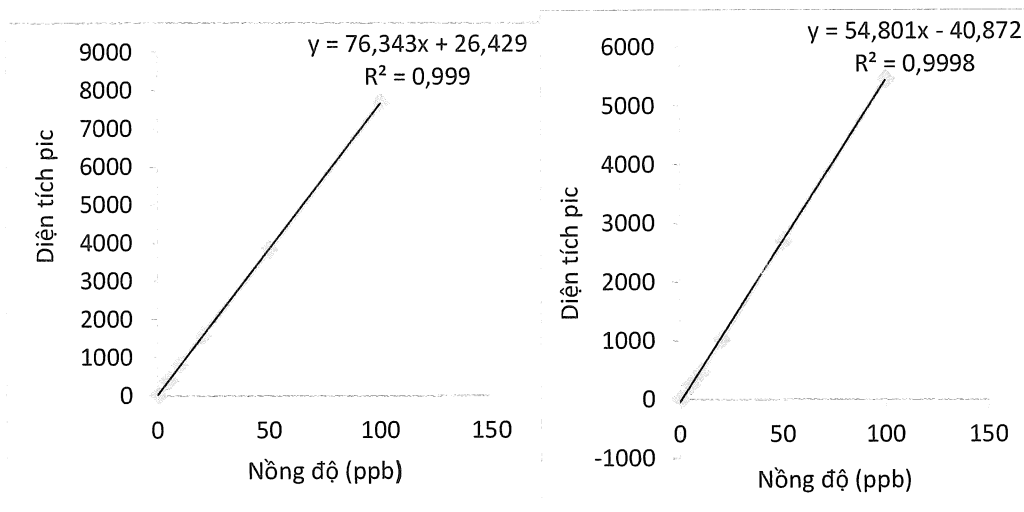


Hình 10



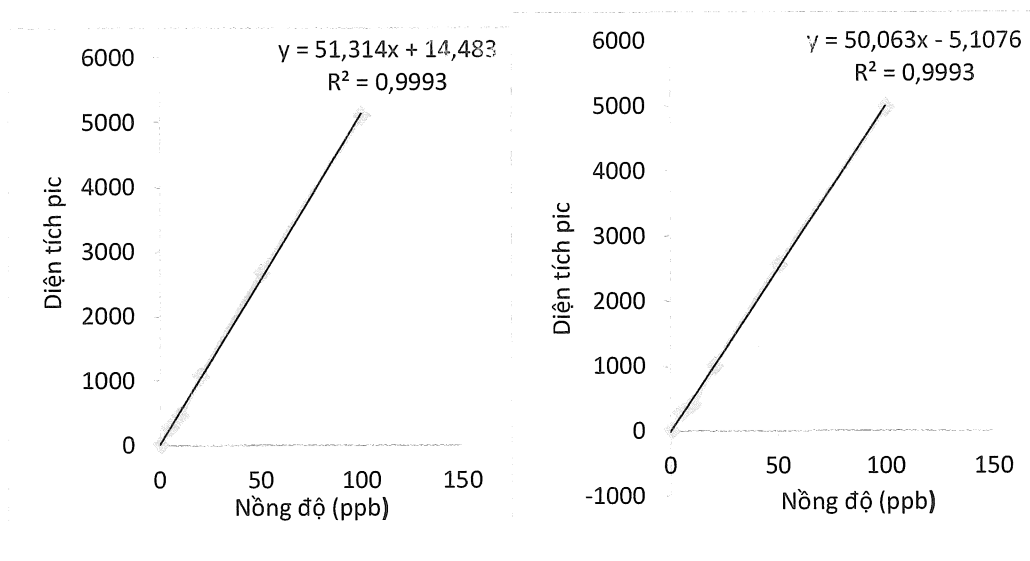
Hình 11

Hình 12



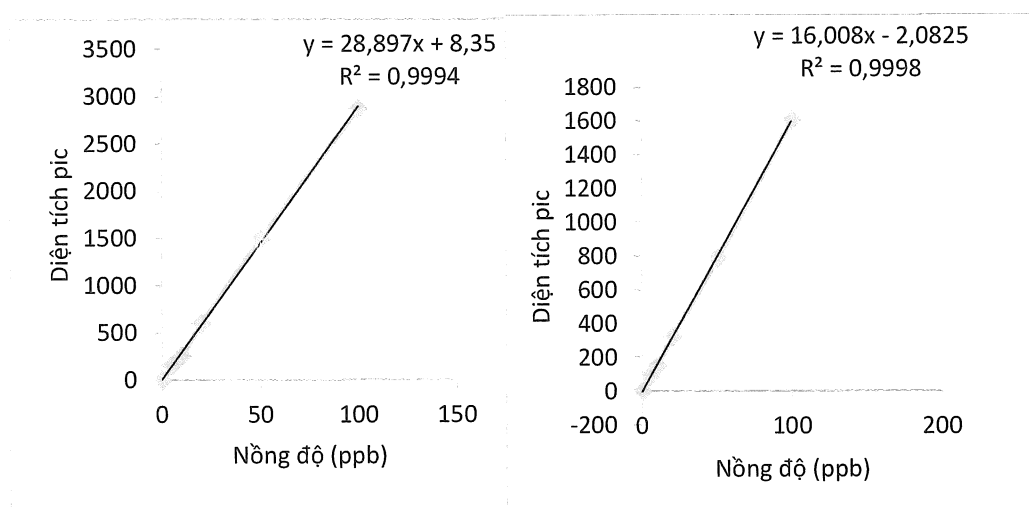
Hình 13

Hình 14



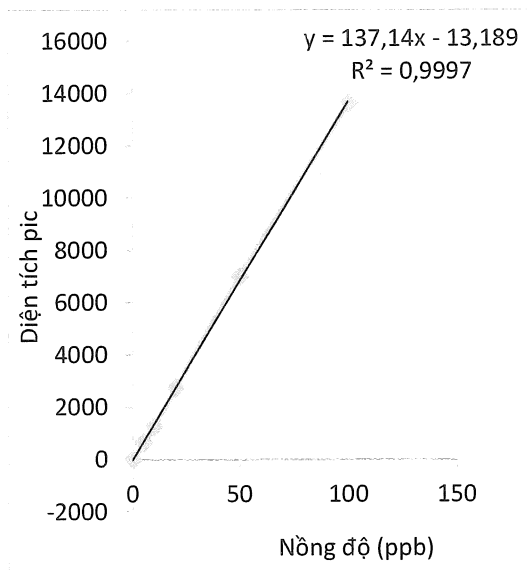
Hình 15

Hình 16

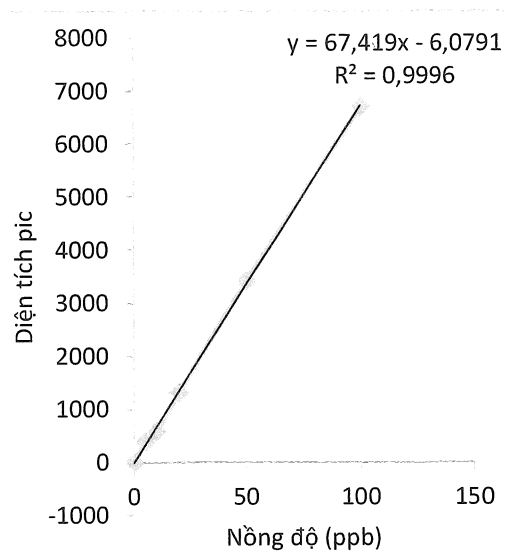


Hình 17

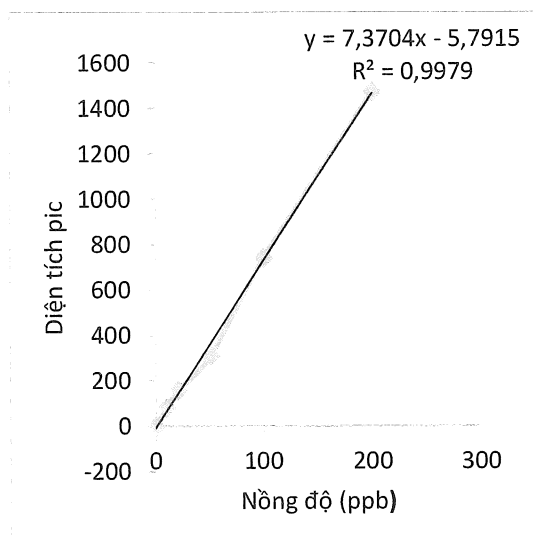
Hình 18



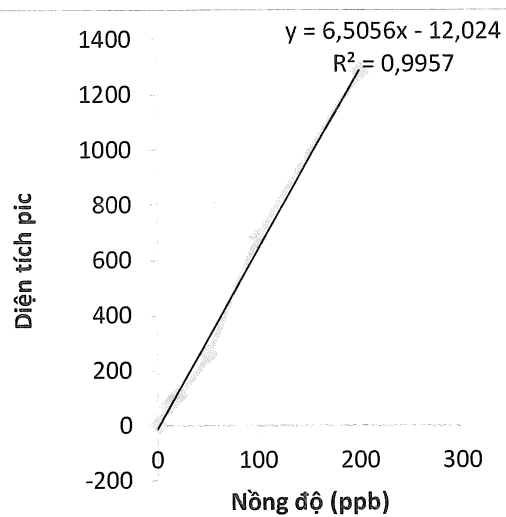
Hình 19



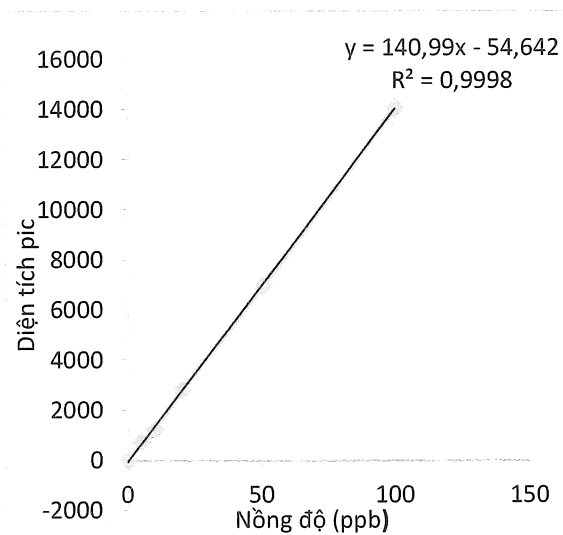
Hình 20



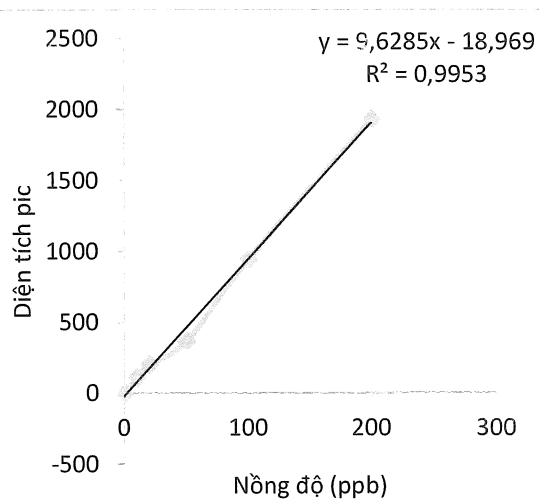
Hình 21



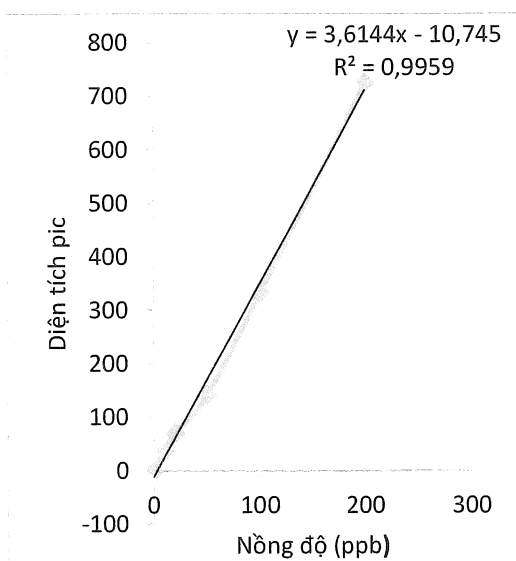
Hình 22



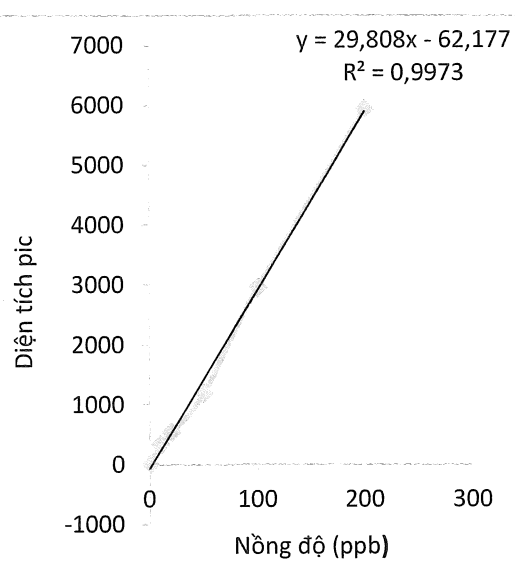
Hình 23



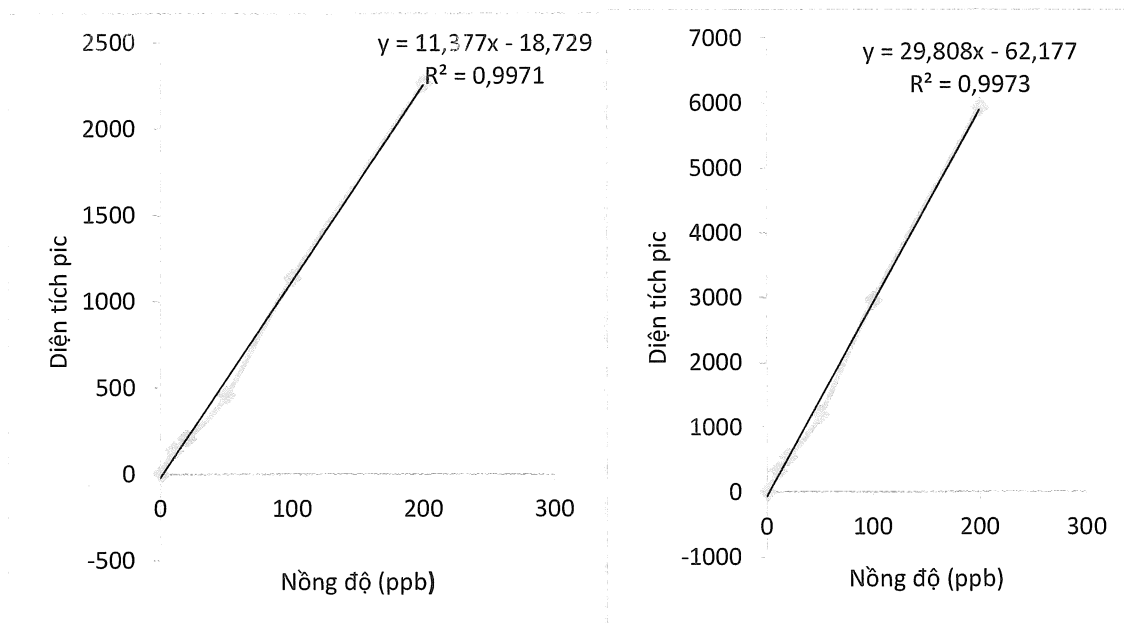
Hình 24



Hình 25



Hình 26



Hình 27

Hình 28