

TCVN 8424-2:2010

EN 12393-2:2008

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM CÓ NGUỒN GỐC TỪ THỰC VẬT
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ XÁC ĐỊNH
ĐA DƯ LƯỢNG THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT –
PHẦN 2: PHƯƠNG PHÁP CHIẾT VÀ LÀM SẠCH**

*Foods of plant origin – Multiresidue methods for the gas
chromatographic determination of pesticide residues –*

Part 2: Methods for extraction and cleanup

Lời nói đầu

TCVN 8424-2:2010 hoàn toàn tương đương với EN 12393-2:2008;

TCVN 8424-2:2010 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 8424 (EN 12393), *Thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật – Phương pháp sắc ký khí xác định đa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật* bao gồm các phần sau:

- TCVN 8424-1:2010 (EN 12393-1:2008), *Phần 1: Xem xét chung*;
- TCVN 8424-2:2010 (EN 12393-2:2008), *Phần 2: Phương pháp chiết và làm sạch*;
- TCVN 8424-3:2010 (EN 12393-3:2008), *Phần 3: Phương pháp xác định và phép thử khẳng định*.

Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn này đưa ra một loạt các phương pháp xác định đa dư lượng có giá trị ngang nhau: không có phương pháp nào được coi là phương pháp chính, bởi vì hiện nay các phương pháp này đang tiếp tục được xây dựng. Các phương pháp được chọn trong tiêu chuẩn này đã được xác nhận hiệu lực và/hoặc được sử dụng rộng rãi trên toàn châu Âu.

Vì những phương pháp này có thể áp dụng được cho phạm vi rất rộng các hàng hoá thực phẩm/các hỗn hợp thuốc bảo vệ thực vật, có sử dụng các hệ thống khác nhau để xác định, có các thay đổi về thiết bị, cách chiết, phương pháp làm sạch và các điều kiện sắc ký phù hợp để tăng hiệu năng của phương pháp, xem Điều 3.

Thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật – Phương pháp sắc ký khí xác định đa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật – Phần 2: Phương pháp chiết và làm sạch

Foods of plant origin – Multiresidue methods for the gas chromatographic determination of pesticide residues – Part 2: Methods for extraction and cleanup

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định các phương pháp chiết và làm sạch các mẫu thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật để xác định các dư lượng thuốc bảo vệ thực vật.

Đối với mục đích này có thể sử dụng các dung môi khác nhau. Các dư lượng thuốc bảo vệ thực vật này thường lẫn với các hợp chất được chiết cùng mà có thể gây nhiễu đến phép phân tích. Để tinh sạch các chất chiết thô cần phân tích, có thể sử dụng một vài phương pháp.

Tiêu chuẩn này bao gồm các phương pháp chiết và làm sạch sau đây đã qua các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm và/hoặc được chấp nhận trong toàn Châu Âu:

- Phương pháp L: Chiết bằng axeton, chiết phân đoạn lỏng-lỏng bằng diclorometan và làm sạch trên cột silica-gel/than [1];
- Phương pháp M: Chiết bằng axeton và chiết phân đoạn lỏng-lỏng bằng diclorometan/dầu nhẹ, nếu cần thì làm sạch trên cột Florisil®¹⁾ [2], [3], [4];
- Phương pháp N: Chiết bằng axeton, chiết phân đoạn lỏng-lỏng bằng diclorometan hoặc cyclohexan/etyl axetat và làm sạch bằng thẩm thấu gel và sắc ký silica gel [5], [6];
- Phương pháp P: Chiết bằng etyl axetat, có làm sạch bằng sắc ký thẩm thấu gel, nếu cần [7].

Tiêu chuẩn này qui định chi tiết các phương pháp từ L đến P để chiết và làm sạch các mẫu thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật. Một số dung môi có các thể tích khác nhau được dùng để chiết. Các kỹ thuật làm sạch đã được liệt kê như chiết phân đoạn lỏng-lỏng, sắc ký lỏng trên các chất hấp phụ khác nhau và sắc ký thẩm thấu gel.

¹⁾ là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, còn không ấn định phải sử dụng chúng.

TCVN 8424-2:2010

Bảng cung cấp các cặp chất nền/thuốc bảo vệ thực vật đã được nghiên cứu liên phòng thử nghiệm và danh mục khả năng áp dụng của phương pháp đối với các loại thuốc bảo vệ thực vật khác nhau được đưa ra cho từng phương pháp, khi có thể.

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 8424-1:2010 (EN 12393-2:2008), *Thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật – Phương pháp sắc ký khí xác định đa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật – Phần 1: Xem xét chung.*

TCVN 8424-3:2010 (EN 12393-3:2008), *Thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật – Phương pháp sắc ký khí xác định đa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật – Phần 3: Phương pháp xác định và phép thử khẳng định.*

3 Nguyên tắc

Như đã nêu trong phần giới thiệu, tùy từng trường hợp cụ thể, có thể thay đổi thiết bị sử dụng, điều kiện chiết, làm sạch và sắc ký để nâng cao hiệu quả của phương pháp. Những điều chỉnh đó phải được lập thành văn bản rõ ràng và được chứng minh cho kết quả hợp lệ.

Các dư lượng thuốc bảo vệ thực vật được chiết ra khỏi mẫu bằng cách sử dụng các dung môi thích hợp, sao cho thu được hiệu quả chiết tối đa các dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và giảm thiểu các chất bị chiết cùng mà có thể làm tăng sự gây nhiễu đến phép xác định. Loại bỏ hết mọi chất gây nhiễu ra khỏi dịch chiết mẫu để thu được dung dịch chứa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong dung môi thích hợp cho việc định lượng bằng phương pháp xác định đã chọn.

4 Yêu cầu chung: Tóm tắt các qui trình

4.1 Chiết

Qui trình chiết được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Qui trình chiết

Phương pháp	Khối lượng mẫu (MS) g	Thể tích dung môi (VS) ml	Tỷ lệ MS/VS g/ml
L	100	Axeton: 200	1/2
M	100	Axeton: 200	1/2
N	100 ^a	Axeton: 200	1/2
P	50	Etyl axetat: 100	1/2

^a Chỉ liên quan nếu hàm lượng nước của chất nền lớn hơn 70 %.

4.2 Làm sạch

4.2.1 Chiết phân đoạn lỏng-lỏng

Các qui trình chiết phân đoạn lỏng-lỏng được nêu trong Bảng 2.

Bảng 2 – Chiết phân đoạn lỏng-lỏng

Phương pháp	Phần dịch chiết (AE) ml	Thể tích nước được thêm vào (VW) ml	Thể tích dung môi (VS) ml	Tỷ lệ AE/VW
L	50 (= 20 %)	250	50	1/5
M	80	0	200	- ^a
N	200	x ^a	100	- ^a

^a Phụ thuộc vào hàm lượng nước của chất nền.

Hai kỹ thuật chiết phân đoạn lỏng-lỏng được khuyến nghị:

- có bổ sung nước (các phương pháp L, N);
- không bổ sung nước (phương pháp M).

4.2.2 Cột sắc ký hấp phụ

Các phương pháp: L, M, N với các chất hấp phụ khác nhau: silica gel, than, Florisil®, được sử dụng ở dạng tinh khiết hoặc hỗn hợp.

4.2.3 Sắc ký thẩm thấu gel với BioBeads® S-X 3²⁾

Phương pháp N có kết hợp với phương pháp P, nếu cần.

5 Phương pháp L: Chiết bằng axeton, chiết phân đoạn lỏng-lỏng bằng diclometan và làm sạch trên cột silica gel/than hoạt tính

5.1 Nguyên tắc

Phản mẫu thử được cắt nhỏ rồi đồng hóa trong axeton, sau đó dịch đồng hóa được lọc. Phần dịch lọc được pha loãng với nước rồi được chiết bằng diclometan. Pha hữu cơ được cô đặc, trên cột silica gel

²⁾ Biobeads® là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, không ấn định phải sử dụng chúng.

³⁾ Celite® là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, không ấn định phải sử dụng chúng.

TCVN 8424-2:2010

và than hoạt tính. Các dư lượng thuốc bảo vệ thực vật được rửa giải bằng hỗn hợp của diclometan, toluen và axeton. Dịch rửa giải được cô đặc để xác định bằng sắc ký khí (GC).

5.2 Thuốc thử

5.2.1 Yêu cầu chung

Sử dụng tất cả các thuốc thử có độ tinh khiết thích hợp để phân tích dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và phù hợp với Điều 4 của TCVN 8424-1:2010 (EN 12393-1:2008).

5.2.2 Axeton

5.2.3 Diclometan

5.2.4 n-Hexan

5.2.5 Toluen

5.2.6 Hỗn hợp rửa giải: diclometan/toluen/axeton, với tỷ lệ 5 : 1 : 1 (tinh theo thể tích)

5.2.7 Dung dịch natri clorua, bão hòa

5.2.8 Natri sulfat

Được nung ở 500 °C trong ít nhất 4 h, để nguội và bảo quản trong chai có nắp đậy kín.

5.2.9 Than hoạt tính

5.2.10 Silica gel 60 dùng cho cột sắc ký, cỡ hạt từ 63 µm đến 200 µm (70 mesh đến 230 mesh)

5.2.11 Celite[®] 545³⁾ (tùy chọn)

5.3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm trong TCVN 8424-1:2010 (EN 12393-1:2008) và cụ thể các thiết bị, dụng cụ sau:

5.3.1 Máy trộn tốc độ cao hoặc máy đồng hóa, có cốc trộn thích hợp

5.3.2 Bộ làm bay hơi dung môi, có nồi cách thủy, khả năng duy trì được nhiệt độ ở 40 °C

5.3.3 Cột sắc ký, có đĩa thủy tinh xốp và van khóa bằng polytetrafluoroethylene (PTFE), đường kính

³⁾ Celite[®] là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, không ấn định phải sử dụng chúng.

trong 25 mm, dài 400 mm.

5.4 Cách tiến hành

5.4.1 Chuẩn bị mẫu

Cắt mẫu thành các miếng nhỏ và trộn kỹ.

5.4.2 Chiết

Cân 100 g mẫu đã nghiền thô vào cốc có mỏ 1 lít, thêm 200 ml axeton và đồng hóa trong khoảng 30 s. Có thể sử dụng Celite[®] 545 để hỗ trợ cho việc lọc, nếu cần. Tráng bộ đồng hóa bằng 50 ml axeton và dùng để tráng luôn cốc có mỏ và sau đó tráng phễu Buchner. Lọc dịch đã đồng hóa bằng cách hút qua giấy lọc đã làm ẩm đựng trong phễu Buchner. Rửa sạch miếng giấy lọc bằng 50 ml axeton mà trước đó đã dùng để rửa.

Lắc kỹ dịch lọc và đo thể tích phần dịch lọc này. Lấy chính xác một phần năm phần dịch lọc này và lắc mạnh ít nhất trong 2 min với 250 ml nước, 25 ml dung dịch natri clorua (5.2.7) và 50 ml diclometan trong phễu chiết 1 lít. Nếu phần dịch lọc không được lắc kỹ, thì độ thu hồi có thể bị giảm đáng kể. Lặp lại việc chiết này dùng 50 ml diclometan. Gộp các pha chiết diclometan và làm khô bằng 30 g natri sulfat (5.2.8) trong 30 min. Lọc chất chiết đã làm khô qua giấy lọc. Tráng bình và giấy lọc ba lần mỗi lần dùng 30 ml diclometan. Làm bay hơi dịch lọc đến khoảng 2 ml và xoay bình bằng tay để loại bỏ hết dung môi. Hòa tan phần còn lại trong 10 ml diclometan.

5.4.3 Chuẩn bị cột

Cho diclometan vào cột sắc ký (5.3.3) đến một lớp dày 1 cm. Làm nhão 5 g silica gel (5.2.10) trong 15 ml hỗn hợp rửa giải (5.2.6) và rót hỗn hợp nhão này lên cột. Gạn lớp nổi phía trên. Tiếp theo, trộn kỹ 15 g silica gel và 1 g than hoạt tính trong cốc có mỏ 50 ml và thêm từ từ 35 ml hỗn hợp rửa giải (Cẩn thận: Có phát nhiệt). Không thêm quá 35 ml hỗn hợp rửa giải, nếu không thì huyền phù sẽ bị tách pha và các thành phần chính sẽ khó đi qua cột.

Cho hỗn hợp gel silica-than đã hoạt hóa vào silica gel trong cột sắc ký, bằng cách rót qua phễu, lần đầu tiên rót từ từ, sau đó rót mạnh, đồng thời khuấy liên tục và mở khóa van. Sử dụng hết dịch rửa giải đã đi qua cột để tráng bình. Rút hỗn hợp rửa giải đến mức còn 2 cm cách phía trên vật liệu nhồi và cho lên đỉnh cột từng lượng nhỏ natri sulfat cho đến tổng số 5 g. Tiếp theo tráng cột sơ bộ bằng 50 ml hỗn hợp rửa giải.

5.4.4 Làm sạch

Chuyển lượng dung dịch diclometan thu được từ 5.4.2 sang cột đã chuẩn bị, cuối cùng chuyển tổng số là 5 ml diclometan. Thu lấy chất lỏng đã chảy qua cột và sau đó rửa giải trong bình cầu đáy tròn

250 ml. Rửa giải cột với 140 ml hỗn hợp rửa giải (5.2.6). Làm bay hơi các dịch rửa giải thu được đến khoảng 30 ml. Chuyển vào bình cầu đáy tròn 50 ml và cho bay hơi lại đến khoảng 2 ml. Trước đó làm rỗng bộ phận thu nhận của bộ cô quay. Không làm bay hơi dung dịch đến khô trên bộ cô quay. Chuyển dung dịch sang ống nghiệm chia độ và pha loãng bằng n-hexan đến 5,0 ml.

5.5 Sắc ký khí

Sử dụng hệ thống sắc ký khí thích hợp để xác định các dư lượng thuốc bảo vệ thực vật nhóm halogen hữu cơ, phospho hữu cơ và nitơ hữu cơ.

5.6 Các nghiên cứu cộng tác

Các cặp chất nền và dư lượng thuốc bảo vệ thực vật đã qua nghiên cứu cộng tác⁴⁾ như trong Bảng 3.

Bảng 3 – Chất nền và thuốc bảo vệ thực vật

	cà rốt	khoai tây	bắp cải savoa	rau chân vịt	cà chua	đậu vàng
bromophos	+	+			+	
bromopropylate				+	+	
captan					+	
chlorpropham		+				
chlorpyrifos				+	+	
cypermethrin				+		
o, p'-DDE	+					
p, p'-DDE	+			+		
o, p'-DDT	+					
p, p'-DDT	+				+	
diazinon	+		+			+
dichlofluanid	+					
dicofol				+	+	
dieldrin	+	+	+	+	+	+
α-endosulfan					+	
β-endosulfan				+	+	
sulfate endosulfan				+	+	
endrin					+	
ethion					+	
fenarimol				+		
fenitrothion	+		+			
fenpropathrin				+		
folpet				+		
α-HCH					+	

⁴⁾ Đối với các nghiên cứu cộng tác, sử dụng thanh hoạt tính, silicagel 60 µm, 63 µm đến 200 µm (70 mesh đến 230 mesh) của công ty Merck. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, không ấn định phải sử dụng chúng.

Bảng 3 (kết thúc)

heptachlor epoxit	+		+			
iprodione				+		
Lindane (γ -HCH)	+	+	+	+	+	+
malathion				+		+
mecarbam				+		
parathion	+		+	+	+	
permethrin				+		
phosalone	+			+		+
pirimiphos-metyl		+		+	+	+
procymidone					+	
propham		+				
quintozene				+		+
tetradifon					+	
tolclofos-metyl				+		
vinclozoline	+	+		+	+	

5.7 Khả năng áp dụng

Các loại thuốc bảo vệ thực vật sau đây có thể phân tích được bằng phương pháp này:

Aldrin	Dieldrin	Metribuzin
Ametryn	Dimethachlor	Mevinphos
Atrazine	Dimethoate	Naled
Azinphos-etyl	Dioxathion	Nitrofen
Azinphos-metyl	Disulfoton	Paraoxon
Aziprotryne	Ditalimfos	Parathion
Bifenthrin	α -Endosulfan	Metyl parathion
Bromacil	β -Endosulfan	Pendimethalin
Bromophos	Endosulfan sulfate	Permethrin
Bromophos-etyl	Ethion	Perthane
Bromopropylate	Ethoprophos	Phenkaptan
Bupirimate	Etrimfos	Phorate
Captafol	Fenamiphos	Phosalone
Captan	Fenarimol	Pirimiphos-metyl
Carbophenothion	Fenchlorphos	Procymidone
Chlorbenseide	Fenitrothion	Profenofos

TCVN 8424-2:2010

Chlorfenson	Fenpropathrin	Profluralin
Chlorfenvinphos	Fenson	Prometryn
Chlorflurenol	Fensulfothion	Propazine
Chlorpropham	Fenthion	Propham
Chlorobenzilate	Fenvalerate	Propyzamide
Chloropropylate	Fluchloralin	Prothiofos
Chlorpyrifos	Flucythrinate	Pyrazophos
Chlorpyrifos-metyl	Fluorodifen	Pyrethrins
Chlorthal	Fluvalinate	Quinalphos
Chlorthiophos	Folpet	Quintozene
Cyanazine	Fonofos	Simazine
Cyanofenphos	Formothion	Sulfotep
Cyanophos	α -HCH	Tecnazene
Cyfluthrin	β -HCH	Terbacil
λ -Cyhalothrin	Heptachlor	Terbufos
Cypermethrin	Heptachlor epoxit	Terbutryn
p,p'-DDD	Heptenophos	Tetrachlorvinphos
o,p'-DDE	Iodofenphos	Tetradifon
p,p'-DDE	Iprodione	Tetramethrin
o,p'-DDT	Isofenphos	Tetrasul
p,p'-DDT	Lindane	Thionazin
Deltamethrin	Malaoxon	Tolclofos-metyl
Desmetryn	Malathion	Tolyfluanid
Dialifos	Mecarbam	Triadimefon
Diazinon	Metalaxyl	Tri-allate
Dichlobenil	Metazachlor	Triazophos
Oichlofenthion	Methidathion	Trichloronat
Dichlofluanid	Methoprotryne	Trifluralin
Dichlorvos	Methoxychlor	Vinclozolin
Dicofol	Metolachlor	

Phương pháp này đã được thử nghiệm trên các loại cây trồng và các loại thực phẩm sau:

Táo	Nho	Dứa
Mơ	Bắp cải	Mận
Cà tím	Mật ong	Khoai tây
Đậu	Cải củ	Củ cải (lớn và loại nhỏ)
Cà rốt	Tỏi tây	Bắp cải đỏ
Cần củ	Rau diếp	Bắp cải Xavoa
Anh đào	Quýt	Rau chân vịt
Ớt	Nấm	Dâu
Cải bắp Trung quốc	Cam	Ớt ngọt
Salad ngô	Mùi tây	Cà chua
Dưa chuột	Đào	Rau xà lách
Cây bồ công anh	Lê	
Rau diếp quăn	Đậu Hà lan	

6 Phương pháp M: Chiết bằng axeton và chiết phân đoạn lỏng-lỏng bằng diclometan/dầu nhẹ, làm sạch trên Florisil[®], nếu cần

6.1 Nguyên tắc

Phần mẫu thử được cắt nhỏ rồi đồng hóa trong axeton và phần mẫu đồng nhất được lọc. Lấy một phần dịch lọc chiết với hỗn hợp dầu nhẹ, diclometan và sau đó chiết bằng diclometan. Pha hữu cơ có thể được bơm trực tiếp vào máy sắc ký khí có detector thích hợp mà không cần phải làm sạch hoặc tinh sạch trên một cột Florisil[®]. Dịch rửa giải được cô đặc để kiểm tra bằng sắc ký khí.

6.2 Thuốc thử

6.2.1 Yêu cầu chung

Sử dụng tất cả các thuốc thử có độ tinh khiết thích hợp để phân tích dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và phù hợp với Điều 4 của TCVN 8424-1:2010 (EN 12393-1:2008).

6.2.2 Axeton

6.2.3 Dầu nhẹ, có nhiệt độ sôi trong khoảng từ 40 °C đến 60 °C

6.2.4 Natri clorua

Được nung ở 500 °C trong ít nhất 4 h, để nguội rồi bảo quản trong chai có nắp đậy kín.

6.2.5 Diclometan

6.2.6 Acetonitril

6.2.7 Natri sulfat

Được nung ở 500 °C trong ít nhất 4 h, để nguội rồi bảo quản trong chai có nắp đậy kín.

6.2.8 Florisil® (Floridin hoặc tương đương), cỡ hạt từ 150 µm đến 250 µm (60 mesh đến 100 mesh)

Được hoạt hóa bằng cách gia nhiệt ở 130 °C đến 135 °C ít nhất 5 h, để nguội trong bình hút ẩm và chuyển sang bình có nắp đậy kín khí. Chất hấp phụ được xử lý này giữ được hoạt tính của nó chỉ trong 4 ngày. Có thể phải được tái hoạt hóa bằng cách xử lý tương tự. Hoạt độ của chất hấp phụ cần được kiểm tra thường xuyên bằng cách rửa giải các chất chuẩn thuốc bảo vệ thực vật như mô tả trong phương pháp này.

6.2.9 Dietyl ete, không chứa peroxit, có chứa 2 % etanol (phần thể tích)

6.2.10 Dung dịch rửa giải A: ete dietyl/dầu nhẹ với tỷ lệ 6 : 94 (tính theo thể tích)

6.2.11 Dung dịch rửa giải B: ete dietyl/dầu nhẹ với tỷ lệ 15 : 85 (tính theo thể tích)

6.2.12 Dung dịch rửa giải C: ete dietyl/dầu nhẹ với tỷ lệ 50 : 50 (tính theo thể tích)

6.2.13 Dung dịch rửa giải D: diclometan/dầu nhẹ với tỷ lệ 20 : 80 (tính theo thể tích)

6.2.14 Dung dịch rửa giải E: diclometan/dầu nhẹ/acetonitril với tỷ lệ 50 : 49,65 : 0,35 (tính theo thể tích)

6.2.15 Dung dịch rửa giải F: diclometan/dầu nhẹ/acetonitril với tỷ lệ 50 : 48,5 : 1,5 (tính theo thể tích)

6.3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm như trong TCVN 8424-1:2010 (EN 12393-1:2008) và cụ thể như sau:

6.3.1 Máy trộn tốc độ cao hoặc máy đồng hóa, có cốc trộn phù hợp.

6.3.2 Cột sắc ký, có van khóa bằng PTFE, đường kính trong 22 mm, dài 300 mm.

6.3.3 Bộ làm bay hơi dung môi, Kuderna Danish hoặc loại tương đương.

6.4 Cách tiến hành

6.4.1 Chuẩn bị mẫu

Phân mẫu thử được cắt nhỏ và trộn kỹ để thu được phân mẫu thử đồng nhất.

Nếu hàm lượng nước của mẫu nhỏ hơn 30 %, thì chỉnh đến khoảng 80 % bằng cách thêm nước.

6.4.2 Chiết và chiết phân đoạn

Cân 100 g (*m*) mẫu đã được chuẩn bị vào cốc trộn (6.3.1) và thêm 200 ml axeton. Trộn ở tốc độ cao trong 3 min. Chuyển hỗn hợp vào phễu Buchner có chứa giấy lọc đã được làm ẩm bằng axeton, lọc vào bình Buchner và đo thể tích dịch lọc.

Rót 80 ml dịch lọc vào phễu chiết 1 lít với 100 ml diclometan và 100 ml dầu nhẹ (6.2.3). Lắc 3 min và để cho tách lớp. Chuyển pha nước phía dưới sang phễu chiết 1 lít thứ hai. Làm khô lớp hữu cơ phía trên trong phễu chiết thứ nhất bằng cách cho đi qua lớp natri sulfat (6.2.7) dày 3 cm để trên bông thủy tinh đã được rửa dày 10 cm trong phễu thu nhận trong bình cầu đáy tròn.

Cho 7 g natri clorua vào pha nước và lắc 30 s cho đến khi natri clorua (6.2.4) hòa tan. Thêm 100 ml diclometan và lắc trong 3 min. Để cho tách lớp. Chuyển pha nước sang phễu chiết thứ ba và làm khô lại pha hữu cơ trên cùng loại natri sulfat. Cho vào phễu chiết thứ ba này 100 ml diclometan và lắc 3 min, để cho tách pha rồi loại bỏ pha nước và làm khô pha diclometan trên cùng lớp natri sulfat. Rửa natri sulfat bằng 50 ml diclometan và cô đặc tất cả các pha hữu cơ đến 2 ml. Thêm 100 ml dầu nhẹ, cô đặc lại đến 2 ml và lặp lại cho đến khi hết hẳn diclometan. Thêm 20 ml axeton và cô đặc lại đến 2 ml (V_{final}). Phần cô đặc này có thể được bơm trực tiếp vào máy sắc ký khí được trang bị HECD (Hall detector), NPD hoặc FPD (**phương pháp M**).

Trong một số trường hợp, nên có bước làm sạch khi xác định bằng ECD: phương pháp **M₁** hoặc **M₂**. Để tinh sạch, cần cô đặc dịch chiết mẫu đến 1 ml bằng axeton (thay vì 2 ml) và được pha loãng bằng dầu nhẹ đến 10 ml.

6.4.3 Làm sạch

6.4.3.1 Phương pháp **M₁**

Đặt một nút sợi bông vào đáy cột sắc ký (6.3.2) và rót dầu nhẹ (6.2.3) đến 20 cm. Đổ 20 g Florisil[®] (6.2.8) và gõ thành cột để nén chặt hấp phụ. Phủ lên lớp trên cùng của chất hấp phụ một lớp natri sulfat (6.2.7) dày khoảng từ 1 cm đến 2 cm. Rửa chất hấp phụ bằng khoảng 30 ml dầu nhẹ. Đặt bình làm bay hơi dưới cột để thu lấy dịch rửa giải. Chuyển dịch chiết để tinh sạch như mô tả trong 6.4.2, sang cột, với tốc độ không quá 5 ml/min. Tráng rửa vật chứa hai lần, mỗi lần dùng 5 ml dầu nhẹ, cho nước rửa vào cột, rửa sạch thành cột sắc ký với các lượng nhỏ của dầu nhẹ và rửa giải với tốc độ 5 ml/min bằng 200 ml dung môi rửa giải A (6.2.10).

Rửa giải tiếp với 200 ml dung môi rửa giải B (6.2.11) vào một bình nhận riêng rẽ và với 200 ml dung môi rửa giải C (6.2.12). Cô đặc từng dịch rửa giải thu được đến một thể tích thích hợp (V_{final}) để kiểm tra bằng GC.

6.4.3.2 Phương pháp M₂

Đặt một nút sợi bông vào đáy cột sắc ký (6.3.2) và rót dầu nhẹ (6.2.3) đến 20 cm. Đổ 20 g của Florisil® (6.2.8) và gõ thành cột để nén chất hấp phụ. Phủ lên lớp trên cùng của chất hấp phụ một lớp natri sulfat (6.2.7) dày khoảng từ 1 cm đến 2 cm.

Rửa chất hấp phụ bằng khoảng 30 ml dầu nhẹ. Đặt bình làm bay hơi dưới cột để thu lấy dịch rửa giải. Chuyển dịch chiết sang cột để tinh sạch như mô tả trong 6.4.2, với tốc độ không quá 5 ml/min. Tráng vật chứa hai lần, mỗi lần dùng 5 ml dầu nhẹ, cho nước tráng vào cột, tráng sạch thành cột sắc ký với các lượng nhỏ của dầu nhẹ và rửa giải với tốc độ 5 ml/min bằng 200 ml dung môi rửa giải D (6.2.13).

Rửa giải tiếp bằng 200 ml dung môi rửa giải E (6.2.14) vào một bình nhận riêng rẽ và cuối cùng với 200 ml dung môi rửa giải F (6.2.15). Cô đặc từng dịch rửa giải để thu được thể tích thích hợp (V_{final}) để dùng cho GC.

6.5 Sắc ký khí và tính toán

Sử dụng hệ thống sắc ký khí thích hợp để xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật nhóm halogen hữu cơ, phospho hữu cơ và nitơ hữu cơ.

Khối lượng tương đương của mẫu tính bằng milligam trên microlit dịch chiết cuối cùng được tính theo công thức (1):

$$\rho = \frac{80}{200 + \frac{W}{\delta_w} - 10} \times \frac{m}{V_{final}}$$

Trong đó:

ρ là đương lượng mẫu tính bằng milligam trên microlit (mg/ μ l);

m là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam (g) (trong trường hợp này: 100 g);

W là lượng nước có trong mẫu, tính bằng gam (g);

δ_w là tỷ trọng của nước, milligam trên microlit (mg/ μ l);

V_{final} là thể tích dung dịch chiết cuối cùng, tính bằng mililit (ml);

10 ml là thể tích cô đặc.

Thể tích cô đặc được lấy là 10 ml đối với các mẫu có chứa 80 g/100 g đến 95 g/100 g nước khi dùng 200 ml axeton để chiết. Tham khảo các tài liệu tham khảo về hàm lượng nước trung bình của thành

phần thực phẩm. Ví dụ về hàm lượng nước trung bình đối với một số cây trồng và rau được nêu trong Bảng A.1. Hàm lượng nước của phần lớn các loại rau quả tươi được già định khoảng 85 g/100 g.

CHÚ THÍCH: Lượng mẫu trong dịch chiết cuối cùng đối với việc làm sạch bằng Florisil® hoặc sắc ký có thể tinh chỉnh xác được bằng cách đo tổng thể tích của dịch chiết bằng axeton ban đầu.

7 Phương pháp N: Chiết bằng axeton, chiết phân đoạn lỏng-lỏng bằng diclometan hoặc xyclohexan/etyl axetat, làm sạch bằng thẩm thấu gel và sắc ký gel silica

7.1 Nguyên tắc

Phần mẫu thử được cắt nhỏ rồi đồng hóa trong axeton sau khi bổ sung nước, tùy thuộc vào hàm lượng nước tự nhiên của mẫu để đảm bảo tỷ lệ của axeton và nước là 2 : 1 (tính theo thể tích). Dịch đã đồng hóa được lọc. Phần dịch đã lọc được bão hòa với natri clorua rồi được pha loãng bằng diclometan, làm tách phần nước dư. Cách khác, bổ sung natri clorua và hỗn hợp của etyl axetat xyclohexan vào dịch đã đồng hóa và lắc trộn mạnh hỗn hợp.

Pha hữu cơ được cô đặc và làm sạch bằng sắc ký thẩm thấu gel (GPC) trên BioBeads S-X3® (gel polystyren) sử dụng hỗn hợp của etyl axetat và xyclohexan làm chất rửa giải. Các phần có chứa dư lượng cô đặc và được phân tích trực tiếp bằng sắc ký khí sử dụng detector chọn lọc nitơ hoặc phospho. Đối với các phép phân tích sử dụng detector bắt giữ electron và trong một số trường hợp của detector chọn lọc nitơ có thể cần phải làm sạch thêm trên cột silica gel nhỏ. Trong bước làm sạch này, các loại thuốc bảo vệ thực vật được chiết trong vài phân đoạn, do đó cung cấp thêm thông tin cho việc nhận dạng.

7.2 Thuốc thử

7.2.1 Yêu cầu chung

Sử dụng tất cả các thuốc thử có độ tinh khiết thích hợp để phân tích dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và phù hợp với Điều 4 của TCVN 8424-1:2010 (EN 12393-1:2008).

7.2.2 Axeton

7.2.3 Diclometan

7.2.4 Etyl axetat

7.2.5 Xyclohexan

7.2.6 Hỗn hợp rửa giải GPC: xyclohexan/etyl axetat với tỷ lệ 1 : 1 (tính theo thể tích)

TCVN 8424-2:2010

7.2.7 *n*-Hexan

7.2.8 Isooctan

7.2.9 Toluen

7.2.10 Nước, được chưng cất bằng dụng cụ thủy tinh

7.2.11 Chất rửa giải 1: *n*-hexan/toluen với tỷ lệ 65 : 35 (tính theo thể tích)

7.2.12 Chất rửa giải 2: toluen

7.2.13 Chất rửa giải 3: toluen/axeton với tỷ lệ 95 : 5 (tính theo thể tích)

7.2.14 Chất rửa giải 4: toluen/axeton với tỷ lệ 80 : 20 (tính theo thể tích)

7.2.15 Chất rửa giải 5: axeton

7.2.16 Natri clorua

Nung ở nhiệt độ 500 °C ít nhất 4 h, để nguội và bảo quản trong chai có nắp đậy kín.

7.2.17 Natri sulfat, dạng bột

Nung ở nhiệt độ 500 °C ít nhất 4 h, để nguội và bảo quản trong chai có nắp đậy kín.

7.2.18 Hỗn hợp muối: natri sulfat/natri clorua: với tỷ lệ 1 : 1 (tính theo khối lượng)

7.2.19 Celite® 545

7.2.20 Silica gel 60 đối với cột sắc ký, cỡ hạt từ 63 µm đến 200 µm (70 mesh đến 230 mesh), đã khử hoạt tính bằng 1,5 % nước.

Làm nóng silica gel ít nhất 5 h ở 130 °C, để nguội trong bình hút ẩm và bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín để trong bình hút ẩm. Cho 1,5 ml nước chảy từng giọt từ buret vào 98,5 g silica gel khô đựng trong bình nón 300 ml (có khớp nối mài), trong khi xoay bình liên tục. Đậy ngay nắp bình bằng nút mài rồi lắc mạnh trong 5 min cho đến khi hết các mảng vón cục, sau đó cho lắc tiếp 2 h trên máy lắc cơ và bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín.

7.2.21 Bông thủy tinh, đã được chiết kỹ bằng axeton

7.2.22 Bông vải sợi, đã được chiết kỹ với axeton

7.2.23 BioBeads S-X3®, 38 µm đến 75 µm (200 mesh đến 400 mesh)

7.2.24 Giấy lọc, đường kính 6 cm và 13,5 cm, tốc độ lọc nhanh, đã được chiết kỹ bằng axeton

7.3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm như trong TCVN 8424-1:2010 (EN 12393-1:2008) và cụ thể như sau:

7.3.1 Máy trộn tốc độ cao hoặc máy đồng hóa, có cốc trộn thích hợp.

7.3.2 Bộ làm bay hơi dung môi, có nồi cách thủy

7.3.3 Dụng cụ dùng cho GPC, ví dụ GPC Autoprep 1001 hoặc 1002 ⁵⁾, được trang bị cột sắc ký, đường kính trong 25 mm, 50 cm, và hai mươi ba vòng mẫu 5 ml; cột được nhồi 50 g resin BioBeads S-X3 [®], đã được làm trương nở qua đêm trong hỗn hợp rửa giải GPC, cột cao khoảng 32 cm, đã được nhồi như trong 7.4.3.2.

7.3.4 Cột sắc ký, có đầu thoát được mở rộng, đường kính trong 7 mm, dài 230 mm

7.4 Cách tiến hành

7.4.1 Chiết

7.4.1.1 Yêu cầu chung

Hàm lượng nước trung bình của một số cây trồng và các loại thực phẩm được nêu trong Phụ lục A.

7.4.1.2 Nguyên liệu thực vật và các thực phẩm khác có hàm lượng nước trên 70 g/100 g

Dùng máy trộn (7.3.1) đồng hóa 100 g (*m*) phần mẫu đã xay có hàm lượng nước là *x* g/100 g với (100 - *x*) g nước và 200 ml axeton trong 3 min.

7.4.1.3 Nguyên liệu thực vật có hàm lượng nước thấp

Cân từ 10 g đến 50 g (*m*) chất nền khô hoặc sấy khô có hàm lượng nước là *x* g/100 g (ví dụ từ 25 g đến 50 g đối với rau quả khô; từ 10 g đến 20 g đối với gia vị và chè; 50 g đối với hạt ngũ cốc). Sau đó cho thêm đủ nước để điều chỉnh tổng lượng nước có mặt đến 100 g. Lượng nước (*W*) được thêm vào được tính từ công thức $W = 100 - (m \times x)/100$. Trộn rồi để yên khoảng từ 10 min đến 20 min. Sau đó tiếp thêm 200 ml axeton và đồng hóa trong 3 min.

7.4.2 Chiết phân đoạn

⁵⁾ GPC Autoprep 1001 hoặc 1002 [®] là những ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, không ấn định phải sử dụng chúng.

7.4.2.1 Chiết phân đoạn bằng diclometan

Thêm 10 g Celite® 545 và đồng hóa lại trong 10 s.

Lọc dịch đã đồng hóa thu được trong 7.4.1.2 hoặc 7.4.1.3 qua giấy lọc nhanh (7.2.24) trong phễu Buchner, có hút chân không nhẹ, cho đến khi thu được nhiều hơn 200 ml dịch lọc.

Để tránh thất thoát dung môi do chân không mạnh, thì nên sử dụng chân không thấp. Không để bánh lọc hút khô.

Đong lấy 200 ml dịch lọc (V_{R1}) trong ống đong và chuyển sang phễu chiết 500 ml. Thêm 20 g natri clorua (7.2.16) và lắc mạnh trong 3 min. Tiếp theo thêm 100 ml diclometan, lắc trong 2 min, sau đó để yên trong khoảng 10 min để cho tách pha. Loại bỏ pha nước phía dưới. Thu lấy pha hữu cơ cho vào bình cầu và thêm khoảng 25 g natri sulfat (7.2.17), để yên trong khoảng 30 min, thường xuyên xoay bình, rồi sau đó lọc qua một nút bông vải (7.2.22) có lớp natri sulfat dày 3 cm để trong phễu. Thu lấy phần dịch lọc cho vào bình cầu 500 ml đáy tròn và tráng phễu chiết cùng với bộ lọc hai lần mỗi lần dùng 20 ml etyl axetat. Cô đặc dung dịch đến 2 ml trên bộ cô quay (7.3.2). Loại hết các vết dung môi cuối cùng bằng dòng nitơ nhẹ.

7.4.2.2 Chiết phân đoạn bằng xyclohexan/etyl axetat

Thêm 35 g natri clorua (7.2.16) và chính xác 100 ml hỗn hợp rửa giải GPC (7.2.6) vào dịch đã đồng hóa thu được trong 7.4.1.2 hoặc 7.4.1.3 và đồng hóa lại trong 1 min. Khi có tách pha rõ, thu lấy pha hữu cơ phía trên. Trường hợp tách pha chưa đầy đủ hoặc bị tri hoãn (hơn 30 min) thì cho ly tâm hỗn hợp. Đong chính xác 200 ml (V_{R1}) pha hữu cơ vào ống đong chia độ và lọc lượng này qua nút bông vải (7.2.22) cùng với khoảng 100 g sulfat natri (7.2.17) trong phễu. Thu lấy phần dịch lọc vào bình cầu đáy tròn 500 ml, tráng ống đong chia độ và phễu chiết bốn lần mỗi lần khoảng 20 ml hỗn hợp rửa giải GPC. Cô đặc hỗn hợp dịch lọc (không để khô) sử dụng bộ cô quay (7.3.2).

7.4.3 Làm sạch bằng sắc ký thẩm thấu gel

7.4.3.1 Yêu cầu chung

Trong trường hợp chiết không dùng GPC cũng đủ sạch để có được sắc phổ không bị nhiễu đáng kể đến chất nền thì có thể bỏ qua bước làm sạch bằng GPC. Tuy nhiên, các dữ liệu xác nhận theo 7.7 và 7.8 đã thu được với GPC. Các kiểu loại và kích thước khác của cột GPC được mô tả trong 7.3.3 có thể được sử dụng nếu các điều kiện tương ứng phù hợp và nếu cho kết quả tương đương.

7.4.3.2 Cột nhồi thẩm thấu gel

Đề BioBeads® (khoảng 50 g) trương nở qua đêm trong hỗn hợp rửa giải GPC (7.2.6). Sau đó rót tất cả huyền phù cùng một lúc vào cột (dung tích khoảng 180 ml). Ngay sau khi lớp nền gel đã ổn định

(không có bọt khí) đến mức xấp xỉ 32 cm, thì chèn pittông, hạ thấp xuống đến mức nền và xoay vào vị trí. Nếu lớp nền gel bị lún xuống mức thấp hơn sau khi thao tác kéo dài, thì phải chỉnh pittông cho phù hợp (theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

7.4.3.3 Kiểm tra thể tích rửa giải

Đối với mỗi cột thẩm thấu gel trước khi sử dụng lần đầu, cần phải kiểm tra các điều kiện rửa giải trên vài hợp chất có khoảng thể tích rửa giải thấp hơn và cao hơn (xem Bảng 4) và trên các dịch chiết thô thích hợp. Để thực hiện điều này, nạp đầy các vòng mẫu bằng dịch chiết thô hoặc hỗn hợp các dung dịch chuẩn, rửa giải theo mô tả trong 7.4.3.4 và xác định bằng phương pháp phân tích thích hợp cho dù các hợp chất được thêm vào đã được thu hồi hoàn toàn hoặc các chất gây nhiễu sinh ra do các tạp chất chưa được tách. Tương tự, phải kiểm tra các cột sau khi đã qua thời gian sử dụng dài.

CHÚ THÍCH: Thực tế cho thấy rằng, một số các chất nền có thể cho thấy hiệu quả hấp phụ ngẫu nhiên của một số chất phân tích nhất định trên resin BioBeads® và có thể cho các kết quả âm tính giả hoặc dương tính giả.

7.4.3.4 Làm sạch dịch chiết thô

Thêm chính xác 7,5 ml etyl axetat vào phần dịch chiết thô cô đặc thu được trong 7.4.2.1 hoặc 7.4.2.2 và hòa tan bằng cách xoay nhẹ. Thêm khoảng 5 g hỗn hợp muối (7.2.18) để hút hết phần nước còn lại, xoay bình lần nữa và thêm chính xác 7,5 ml xylohexan để có tổng thể tích là 15,0 ml (V_{R2}). Lắc khoảng 20 s, để cho hỗn hợp muối lắng xuống, lọc qua giấy lọc nhanh và bơm dịch lọc này vào một vòng mẫu của sắc ký thẩm thấu gel (V_{R3}).

Rửa giải cột thẩm thấu gel bằng hỗn hợp rửa giải GPC với tốc độ dòng 5,0 ml/min. Bộ phận chuyển mạch của máy sắc ký thẩm thấu gel được điều chỉnh để kiểm tra thể tích dịch rửa giải. Việc cài đặt này phụ thuộc vào các thuốc bảo vệ thực vật mục tiêu. Việc cài đặt điển hình như sau (xem thêm Bảng 4):

- chế độ thải (dump) chuyển sang 18 min để loại bỏ 90 ml;
- chế độ thu nhận chuyển sang 15 min để thu được 75 ml;
- chế độ rửa chuyển sang 2 min để tráng cột dùng 10 ml.

Cô đặc thể tích thu được đến khoảng 1 ml trên bộ cô quay (quay chậm, chỉ ngâm nhẹ bình cầu), dùng pipet cho lượng này vào ống nghiệm chia độ được đầy bằng nút mài, tráng bộ cô quay bằng etyl axetat và pha loãng bằng etyl axetat đến 5,0 ml (V_{R4}). Việc bổ sung etyl axetat này không được bỏ qua để đảm bảo hòa tan hoàn toàn dư lượng.

Để xác định các dư lượng thuốc bảo vệ thực vật riêng rẽ, thì có thể cài đặt dụng cụ để thu được một lượng nhỏ hơn, phù hợp với hợp chất tương ứng, theo các giá trị nêu trong Bảng 4.

7.4.4 Sắc ký trên cột nhỏ silica gel

7.4.4.1 Chuẩn bị cột

Nhồi cột sắc ký (7.3.4) theo thứ tự sau: nút bông thủy tinh (7.2.21), 1,0 g của silica gel đã khử hoạt tính (7.2.20), lớp natri sulfat (7.2.17) dày từ 5 mm đến 10 mm, nút bông thủy tinh. Trước khi sử dụng, tráng cột bằng 5 ml *n*-hexan và loại bỏ dịch rửa giải. Ngay sau khi *n*-hexan đã rút khỏi đỉnh lớp silica gel, cho dung dịch mẫu lên đỉnh cột, phù hợp với 7.4.4.3.

7.4.4.2 Kiểm tra hiệu quả chiết của silica gel

Cho lên cột đã được rửa sơ bộ trong 7.4.4.1 như sau: 1,0 ml dung dịch chứa 0,05 µg/ml HCB, 0,10 µg/ml lindan, 0,20 µg/ml heptaclo epoxit, 0,25 µg/ml α-endosulfan, 0,25 µg/ml dieldrin và 1,25 µg/ml endosulfan sulfat trong *n*-hexan. Với điều kiện là hoạt tính của silica gel được điều chỉnh đúng, các hợp chất được bổ sung có mặt sau khi rửa giải như trong 7.4.4.3 và phép phân tích sắc ký khí bắt giữ electron trong các phân đoạn sau đây:

- dịch rửa giải 1: HCB (100 %), lindan (100 %), heptaclo epoxit (một phần), α-endosulfan (một phần);
- dịch rửa giải 2: Heptaclo epoxit (lượng còn lại), α-endosulfan (lượng còn lại), endosulfan sulfat (từ 95 % đến 100 %), dieldrin (100 %).

7.4.4.3 Phân đoạn của chất chiết mẫu

Dùng pipet lấy 2,5 ml (V_{RS}) dung dịch thu được trong 7.4.3.4 cho vào bình cầu đáy tròn cổ dài và 5 ml isoocetan. Cho bay hơi cẩn thận đến 1 ml (không để đến khô) trên bộ cô quay (quay chậm, chỉ nhúng nhẹ bình cầu). Nếu dung dịch này vẫn còn mùi của etyl axetat, thì lại thêm isoocetan và làm bay hơi.

Dùng pipet lấy dung dịch còn lại sau khi bay hơi cho lên cột silica gel đã được rửa sơ bộ trong 7.4.4.1 và tráng rửa bằng 1 ml *n*-hexan. Sau đó tráng sạch bình bằng 2 ml chất rửa giải 1 (7.2.11), ngay khi hexan đã rút khỏi đỉnh cột nhỏ, cho nước tráng lên cột. Lúc này thu lấy dịch rửa giải vào ống nghiệm chia độ. Sau đó tiếp tục rửa giải với 6 ml chất rửa giải 1 và đổ đầy chất rửa giải 1 vào ống thu nhận đến 10 ml (V_{end}). Dung dịch thu được này là dịch rửa giải 1.

Tráng rửa bình cầu đã được sử dụng để làm bay hơi dịch rửa giải GPC với 2 ml toluen (chất rửa giải 2). Sau đó cho nước rửa này sang cột. Thu lấy dung dịch vào ống nghiệm chia độ thứ hai và rửa giải với 6 ml toluen. Cho toluen vào ống nghiệm thứ hai đến 10 ml (V_{end}) để thu được dịch rửa giải 2. Tiếp tục chạy sắc ký theo cùng qui trình được thực hiện liên tục với chất rửa giải 3 (7.2.13), chất rửa giải 4 (7.2.14) và axeton (chất rửa giải 5) (7.2.15). Mỗi lần, tráng rửa bình bằng 2 ml, rửa giải tiếp với 6 ml và pha loãng dịch rửa giải đến 10 ml (V_{end}) để thu được dịch rửa giải 3, 4 và 5. Một ví dụ về phân bố các hợp chất trong các dịch rửa giải khác nhau được nêu trong Bảng 4.

Bảng 4 – Khoảng thể tích rửa giải trong sắc ký thấm thấu gel và phân bố các hợp chất trong các dịch rửa giải từ cột sắc ký silica gel

Các hợp chất	Khoảng thể tích rửa giải GPC ml	Dịch rửa giải silica gel ^{a)}				
		1	2	3	4	5
Acephate	từ 115 đến 145	0	0	0	0	5
Aclonifen	từ 115 đến 145	0	5	0	0	0
Alachlor	từ 125 đến 150	0	0	5	0	0
Aldrin	từ 120 đến 150	5	0	0	0	0
Ametryn	từ 115 đến 190	0	0	1	3	0
Amidithion	từ 115 đến 145	0	0	0	4	3
Anilazine ^a	từ 105 đến 135	0	0	5	0	0
Anthraquinon	từ 145 đến 185	0	2	4	0	0
Atrazine	từ 110 đến 135	0	0	4	3	0
Azinphos-ethyl	từ 130 đến 160	0	0	5	0	0
Azinphos-metyl	từ 145 đến 180	0	0	4	0	0
Azoxystrobin	từ 120 đến 155	0	0	0	5	0
Benfluralin	từ 100 đến 130	5	0	0	0	0
Benzoylprop-ethyl	từ 125 đến 150	0	3	3	0	0
Bifenox	từ 115 đến 150	0	3	3	0	0
Bifenthrin	từ 090 đến 120	0	5	0	0	0
Binapacryl	từ 100 đến 130	0	5	0	0	0
Bitertanol	từ 100 đến 130	0	0	0	4	2
Boscalid	từ 105 đến 130	0	0	5	0	0

Bảng 4 (tiếp theo)						
Các hợp chất	Khoảng thể tích rửa giải GPC	Dịch rửa giải silica gel ^{*)}				
		ml	1.	2	3	4
Bromacil ^b	từ 105 đến 140	0	0	0	5	0
Bromophos	từ 120 đến 150	4	2	0	0	0
Bromophos-ethyl	từ 110 đến 140	5	1	0	0	0
Bromopropylate	từ 095 đến 135	0	0	3	3	1
Bromoxynil	từ 120 đến 150	0	5	1	0	0
Camphechlor (Toxaphene)	từ 110 đến 150	5	1	0	0	0
Captafol ^c	từ 120 đến 150	0	0	5	0	0
Captan ^c	từ 120 đến 150	0	0	5	0	0
Carbophenothion	từ 120 đến 140	0	3	0	0	0
Carbophenothion-metyl	từ 120 đến 160	0	4	0	0	0
Chinomethionat	từ 170 đến 200	0	1	4	0	0
(Quinomethionate)	từ 170 đến 200	0	1	4	0	0
Chlorbenside ^d	từ 120 đến 155	0	0	1	0	0
Chlorbenside sulfone	từ 130 đến 160	0	0	5	0	0
α -chlordane	từ 110 đến 140	5	0	0	0	0
γ -chlordane	từ 100 đến 130	5	0	0	0	0
Chlorfenapyr	từ 085 đến 105	0	5	0	0	0
Chlorfenprop-metyl	từ 125 đến 150	0	5	0	0	0
Chlorfenson	từ 120 đến 150	1	5	0	0	0
Chlorfenvinphos	từ 110 đến 140	0	0	4	3	0
Chloridazon	từ 130 đến 155	0	0	0	4	1
Chlormephos	từ 115 đến 145	3	3	0	0	0
Chlorobenzilate	từ 100 đến 135	0	0	4	2	1
Chloroneb	từ 145 đến 170	0	5	0	0	0
Chloropropylate	từ 100 đến 135	0	0	4	2	0
Chlorothalonil	từ 125 đến 165	0	5	0	0	0
Chlorotoluron	từ 115 đến 150	0	0	0	5	2
Chloroxuron	từ 130 đến 155	0	0	1	5	0
Chlorpropham	từ 110 đến 135	0	2	4	0	0
Chlorpyrifos	từ 110 đến 140	2	4	0	0	0
Chlorpyrifos-metyl	từ 120 đến 150	1	4	0	0	0
Chlorthal-dimetyl	từ 135 đến 160	0	5	1	0	0
Chlorthiophos	từ 115 đến 155	0	4	0	0	0
Clodinafop-propargyl	từ 100 đến 125	0	0	5	0	0
Clomazone	từ 115 đến 145	0	0	5	0	0

Bảng 4 (tiếp theo)

Các hợp chất	Khoảng thể tích rửa giải GPC	Dịch rửa giải silica gel ^{a)}				
		ml	1	2	3	4
Cloquintocet-1-mexyl	từ 105 đến 130	0	0	2	4	0
Coumaphos	từ 135 đến 165	0	0	5	0	0
Crotoxyphos	từ 105 đến 145	0	0	0	4	0
Crufomate	từ 100 đến 140	0	0	0	3	4
Cyanazine	từ 110 đến 135	0	0	0	4	0
Cyanofenphos	từ 115 đến 145	0	2	4	0	0
Cyanophos	từ 115 đến 150	0	0	4	0	0
Cyfluthrin	từ 090 đến 120	0	5	0	0	0
λ -Cyhalothrin	từ 090 đến 110	0	5	0	0	0
Cymoxanil ^e	từ 110 đến 130	0	0	0	5	0
Cypermethrin	từ 100 đến 135	0	5	0	0	0
Cyprodinil	từ 105 đến 135	0	0	5	0	0
o, p', DDD	từ 110 đến 140	5	0	0	0	0
p,p'-DDD	từ 100 đến 140	5	0	0	0	0
o,p'-DDE	từ 120 đến 150	5	0	0	0	0
p, p'-DDE	từ 120 đến 150	5	0	0	0	0
o, p'-DDT	từ 120 đến 150	5	0	0	0	0
p,p'-DDT	từ 110 đến 140	5	0	0	0	0
DEF ^f	từ 115 đến 135	0	0	5	1	0
Deltamethrin	từ 100 đến 135	0	5	0	0	0
Demeton-S-metyl	từ 125 đến 155	0	0	0	0	0
Demeton-S-metyl sulfone	từ 120 đến 160	0	0	0	2	3
Demeton-S sulfone ^g	từ 115 đến 140	0	0	0	3	3
Demeton-S sulfoxid ^h	từ 140 đến 170	0	0	0	0	3
N-Desetyl-pirim iphos-metyl	từ 120 đến 155	0	0	1	5	0
Dialifos	từ 110 đến 140	0	3	3	0	0
Di-allate	từ 120 đến 150	0	4	1	0	0
Diazinon	từ 105 đến 135	0	0	5	0	0
Dichlobenil	từ 125 đến 155	1	5	0	0	0
Dichlofenthion	từ 110 đến 140	3	3	0	0	0
Dichlofluanid ⁱ	từ 100 đến 140	0	3	3	0	0
p,p'-Dichlorobenzophenone ^j	từ 125 đến 155	0	5	0	0	0
Dichlorvos	từ 115 đến 140	0	0	1	3	0
Diclofop-methyl	từ 135 đến 165	0	0	5	0	0
Dicloran	từ 105 đến 145	0	5	0	0	0

Bảng 4 (tiếp theo)						
Các hợp chất	Khoảng thể tích rửa giải GPC	Dịch rửa giải silica gel ^{a)}				
		ml	1	2	3	4
Dicofol ^k	từ 100 đến 150	2	4	0	0	0
Dicrotophos	từ 130 đến 160	0	0	0	0	5
Dieldrin	từ 120 đến 150	0	5	0	0	0
Diethofencarb	từ 105 đến 130	0	0	5	0	0
Difenoconazol	từ 110 đến 140	0	0	0	3	3
Diflufenican	từ 105 đến 125	0	0	5	0	0
Dimefox	từ 120 đến 155	0	0	0	0	5
Dimethachlor	từ 135 đến 165	0	0	4	2	0
Dimethoate	từ 120 đến 150	0	0	0	3	3
Dinitramine ^l	từ 105 đến 130	4	1	0	0	0
Dinobuton	từ 110 đến 140	0	4	2	0	0
Dinocap	từ 100 đến 120	0	5	0	0	0
Dioxathion	từ 110 đến 140	0	3	3	1	0
Diphenylamin	từ 130 đến 160	0	5	0	0	0
Disulfoton ^m	từ 115 đến 150	0	2	0	0	3
Disulfoton sulfone	từ 110 đến 140	0	0	5	0	0
Disulfoton sulfoxide	từ 120 đến 150	0	0	0	0	5
Ditalimfos	từ 120 đến 150	0	0	4	1	0
Edifenphos	từ 130 đến 160	0	0	4	0	0
α -Endosulfan	từ 110 đến 150	2	4	0	0	0
β -Endosulfan	từ 110 đến 150	0	5	0	0	0
Endosulfan sulfate	từ 100 đến 140	0	5	0	0	0
Endrin	từ 130 đến 160	0	5	0	0	0
EPN	từ 135 đến 160	0	5	0	0	0
Ethion	từ 100 đến 140	0	5	0	0	0
Ethofumesate	từ 110 đến 135	0	0	3	0	0
Ethoprophos	từ 120 đến 155	0	0	4	1	0
Etrimfos	từ 105 đến 140	0	0	5	0	0
Famophos	từ 125 đến 155	0	0	5	0	0
Fenamidone	từ 105 đến 140	0	0	4	1	0
Fenamiphos	từ 105 đến 140	0	0	0	4	2
Fenarimol	từ 125 đến 150	0	0	0	4	0
Fenazaquin	từ 105 đến 145	0	0	3	2	0
Fenchlorphos	từ 120 đến 150	4	2	0	0	0
Fenitrothion	từ 120 đến 150	0	4	0	0	0

Bảng 4 (tiếp theo)						
Các hợp chất	Khoảng thể tích rửa giải GPC	Dịch rửa giải silica gel ^{a)}				
		ml	1	2	3	4
Fenoxycarb	từ 120 đến 145	0	0	4	0	0
Fenpiclonil	từ 100 đến 130	0	0	3	3	0
Fenprothrin	từ 100 đến 120	0	5	1	0	0
Fenson	từ 130 đến 160	0	5	0	0	0
Fensulfotion	từ 120 đến 150	0	0	0	3	3
Fenthion	từ 130 đến 160	0	3	0	0	0
Fenvalerate	từ 105 đến 135	0	4	1	0	0
Flubenzimine ¹	từ 085 đến 120	0	5	0	0	0
Fluchloralin	từ 100 đến 120	5	1	0	0	0
Flucythrinat	từ 090 đến 120	0	5	0	0	0
Fludioxonil	từ 090 đến 120	0	0	5	0	0
Fluoroglycofen-etyl	từ 090 đến 115	0	0	5	0	0
Fluotrimazole	từ 100 đến 140	0	0	4	2	0
Fluquinconazol	từ 095 đến 125	0	0	3	3	0
Flurtamone	từ 085 đến 105	0	0	0	5	0
Flutriafol	từ 115 đến 135	0	0	0	3	3
Fluvalinate	từ 095 đến 120	0	5	0	0	0
Folpet	từ 140 đến 180	0	3	4	0	0
Fonofos	từ 120 đến 150	0	4	1	0	0
Formothion	từ 120 đến 150	0	0	4	1	0
Fuberidazole ¹	từ 120 đến 160	0	0	0	5	1
Genite	từ 135 đến 165	0	5	0	0	0
α -HCH-	từ 120 đến 150	5	0	0	0	0
β -HCH	từ 100 đến 130	5	0	0	0	0
δ -HCH	từ 100 đến 130	5	0	0	0	0
ϵ -HCH	từ 105 đến 135	5	0	0	0	0
Heptachlor	từ 110 đến 140	5	0	0	0	0
cis-Heptachlor epoxit	từ 125 đến 155	3	3	0	0	0
trans-Heptachlor epoxit	từ 125 đến 155	3	3	0	0	0
Heptenophos	từ 120 đến 150	0	0	1	4	0
Hexachlorobenzene	từ 140 đến 165	5	0	0	0	0
Imazalil ^{h1}	từ 120 đến 150	0	0	0	0	5
Indoxacarb	từ 095 đến 120	0	0	5	0	0
Iodofenphos	từ 120 đến 150	4	2	0	0	0
loxynil	từ 125 đến 155	0	5	1	0	0

Bảng 4 (tiếp theo)						
Các hợp chất	Khoảng thể tích rửa giải GPC	Dịch rửa giải silica gel ^{a)}				
		ml	1	2	3	4
Iprodione	từ 115 đến 145	0	0	5	1	0
Iprovalicarb	từ 085 đến 110	0	0	0	5	0
Isobenzan	từ 105 đến 140	5	0	0	0	0
Isocarbamid	từ 130 đến 165	0	0	0	1	5
Isodrin	từ 120 đến 150	5	0	0	0	0
Isopropalin	từ 110 đến 135	5	0	0	0	0
δ-Keto-endrin	từ 135 đến 165	3	4	0	0	0
Kresoxim-metyl	từ 120 đến 155	0	0	5	0	0
Lenacil	từ 130 đến 160	0	0	0	5	0
Leptophos	từ 120 đến 150	5	1	0	0	0
Lindane (γ-HCH)	từ 110 đến 140	5	0	0	0	0
Linuron	từ 120 đến 140	0	0	4	1	0
Malaoxon	từ 110 đến 140	0	0	0	4	0
Malathion	từ 110 đến 140	0	0	4	0	0
MCPA-(2-butoxyetyl) ester ^e	từ 115 đến 145	0	0	5	0	0
Mecarbam	từ 105 đến 145	0	0	4	0	0
Mefenpyr-dietyl	từ 100 đến 130	0	0	5	0	0
Mephosfolan	từ 140 đến 170	0	0	0	2	4
Merphos ⁿ	từ 125 đến 145	5	0	0	0	0
Metalaxyl	từ 115 đến 150	0	0	0	5	1
Metconazol	từ 085 đến 115	0	0	0	4	1
Methabenzthiazuron	từ 150 đến 180	0	0	0	5	0
Methamidophos	từ 120 đến 150	0	0	0	0	4
Methidathion	từ 130 đến 165	0	0	4	0	0
Methoprotryne	từ 115 đến 140	0	0	0	4	1
Methoxychlor	từ 125 đến 155	0	5	0	0	0
Metolachlor	từ 130 đến 160	0	0	5	1	0
Metribuzin	từ 125 đến 150	0	0	3	1	0
Mevinphos	từ 120 đến 150	0	0	0	5	0
Mirex	từ 130 đến 160	5	0	0	0	0
Monocrotophos	từ 115 đến 140	0	0	0	0	5
Monolinuron	từ 125 đến 150	0	0	4	2	0
Morphothion	từ 130 đến 170	0	0	0	5	0
Naled ^o	từ 115 đến 155	0	0	4	1	0
Napropamid	từ 135 đến 165	0	0	2	4	0

Bảng 4 (tiếp theo)						
Các hợp chất	Khoảng thể tích rửa giải GPC	Dịch rửa giải silica gel ^{a)}				
		ml	1	2	3	4
Nitralin	từ 115 đến 145	0	1	5	0	0
Nitrofen	từ 135 đến 165	2	5	0	0	0
Nitrothal-isopropyl	từ 105 đến 135	0	1	4	1	0
Nuarimol	từ 130 đến 155	0	0	0	5	0
Octachlorodipropyl ete (S 421)	từ 110 đến 130	5	0	0	0	0
Omethoate	từ 140 đến 160	0	0	0	0	5
Oxadiazon	từ 115 đến 145	0	0	5	0	0
Oxychlorthane (Octachlor epoxit)	từ 100 đến 160	5	0	0	0	0
Oxydemeton-metyl ^{b)}	từ 135 đến 165	0		0	0	0
Paraoxon	từ 110 đến 140	0	0	1	4	0
Paraoxon-metyl	từ 140 đến 170	0	0	1	4	1
Parathion	từ 110 đến 140	0	4	1	0	0
Metyl parathion	từ 120 đến 150	0	4	1	0	0
Pendimethalin	từ 125 đến 155	1	5	0	0	0
Pentachloroaniline	từ 110 đến 140	5	0	0	0	0
Pentachloroanisole	từ 125 đến 160	5	0	0	0	0
Pentachlorobenzene	từ 125 đến 165	5	0	0	0	0
Permethrin	từ 115 đến 145	0	5	1	0	0
Perthane	từ 110 đến 140	5	1	0	0	0
Phenkapton	từ 115 đến 145	3	3	0	0	0
Phenmedipham	từ 105 đến 130	0	0	3	3	1
Phenthoate	từ 115 đến 150	0	1	4	0	0
Phorate ^{c)}	từ 115 đến 145	0	2	0	0	0
Phosalone	từ 110 đến 140	0	0	4	0	0
Phosphamidon	từ 110 đến 145	0	0	0	1	5
Phoxim	từ 120 đến 150	0	5	0	0	0
Picoxystrobin	từ 100 đến 130	0	0	5	0	0
Piperonyl butoxide ^{e)}	từ 100 đến 130	0	0	4	1	0
Pirimicarb	từ 130 đến 170	0	0	0	5	0
Pirimiphos-etyl	từ 100 đến 135	0	0	4	0	0
Pirimiphos-metyl	từ 105 đến 145	0	0	4	0	0
Procymidone	từ 120 đến 150	0	0	5	0	0
Profenofos	từ 130 đến 155	0	0	4	1	0
Profluralin	từ 100 đến 125	5	0	0	0	0
Propachlor	từ 125 đến 150	0	0	5	0	0
Propanil	từ 105 đến 130	0	0	4	2	0
Propham	từ 100 đến 180	0	0	5	0	0

Bảng 4 (tiếp theo)						
Các hợp chất	Khoảng thể tích rửa giải GPC	Dịch rửa giải silica gel ^{a)}				
		ml	1	2	3	4
Propiconazole	từ 120 đến 150	0	0	0	4	2
Propoxur	từ 110 đến 130	0	0	4	2	0
Propyzamide	từ 095 đến 125	0	0	4	0	0
Prosulfocarb	từ 120 đến 145	0	2	3	0	0
Prothiofos	từ 105 đến 145	5	0	0	0	0
Pyrazophos	từ 110 đến 140	0	0	5	0	0
Pyrethrin ⁱ	từ 100 đến 130	0	0	5	1	0
Pyridaben	từ 095 đến 125	0	0	4	0	0
Pyrifenox	từ 125 đến 165	0	0	2	4	0
Pyriproxyfen	từ 105 đến 135	0	2	3	0	0
Quinaiphos	từ 115 đến 155	0	0	4	0	0
Quintozene	từ 135 đến 165	0	0	4	0	0
Rabenzazole ⁱ	từ 120 đến 160	0	0	5	0	0
Resmethrine ^e	từ 100 đến 130	0	5	0	0	0
Salithion	từ 125 đến 165	0	5	0	0	0
Silthiofam	từ 090 đến 120	0	0	5	0	0
Simazine	từ 095 đến 135	0	0	2	4	0
Spiroxamin ^g	từ 085 đến 105	0	0	0	0	4
Strobane T	từ 125 đến 160	5	0	0	0	0
Sulfotep	từ 100 đến 130	0	4	1	0	0
Sulprofos	từ 115 đến 155	0	3	0	0	0
Tebufenpyrad	từ 105 đến 145	0	0	5	0	0
Tecnazene	từ 130 đến 160	5	0	0	0	0
Terbacil	từ 120 đến 145	0	0	0	5	0
Terbufos	từ 125 đến 155	0	3	0	0	0
Terbutryn	từ 115 đến 175	0	0	1	2	0
2,3,4, 5-Tetrachloronitrobenzene	từ 130 đến 160	5	0	0	0	
Tetrachlorvinphos	từ 120 đến 140	0	0	4	1	0
Tetradifon	từ 120 đến 150	0	5	0	0	0
Tetramethrin	từ 120 đến 150	0	0	5	0	0
Tetrasul	từ 125 đến 155	5	0	0	0	0
Thionazin	từ 120 đến 150	0	1	4	0	0
Tolclofos-metyl	từ 130 đến 165	0	5	0	0	0
Tolyfluanid ⁱ	từ 105 đến 135	0	3	3	0	0
Triadimefon	từ 100 đến 130	0	0	3	3	0
Triadimenol	từ 100 đến 130	0	0	0	4	2
Tri-allate	từ 120 đến 150	0	5	0	0	0
Triamiphos	từ 125 đến 160	0	0	0	0	4
Triazophos	từ 120 đến 140	0	0	4	1	0
Triazoxide	từ 165 đến 195	0	0	0	5	0
Trichlorfon ^h	từ 100 đến 140	0	0	0	0	4
Trichloronat	từ 110 đến 140	5	1	0	0	0
Trifloxystrobin	từ 090 đến 110	0	0	5	0	0
Triflumizol	từ 085 đến 105	0	0	0	5	0
Trifluralin	từ 100 đến 130	5	0	0	0	0
Triticonazol	từ 100 đến 125	0	0	0	4	1

Bảng 4 (tiếp theo)						
Các hợp chất	Khoảng thể tích rửa giải GPC	Dịch rửa giải silica gel ^{a)}				
		ml	1	2	3	4
Vinclozolin	từ 100 đến 130	0	4	1	0	0
Zoxamid	từ 085 đến 125	0	0	5	0	0
<p>*) Silica gel dịch rửa giải:</p> <p>1 n-Hexan-toluen với tỷ lệ 65 : 35 (tính theo thể tích).</p> <p>2 toluen.</p> <p>3 toluen, axeton với tỷ lệ 95 : 5 (tính theo thể tích).</p> <p>4 toluen, axeton với tỷ lệ 80 : 20 (tính theo thể tích).</p> <p>5 axeton.</p> <p>CHÚ THÍCH: Các con số trong bảng cho thấy mức thu hồi: 5 = trên 90%; 4 = khoảng từ 60 % đến 90 %; 3 = khoảng từ 30 % đến 60 %; 2 = khoảng từ 10 % đến 30 %; 1 = nhỏ hơn 10 %; 0 = không thu hồi được.</p> <p>a Chiết mẫu phân tích có bổ sung kali axetat; đối với GC, bơm một lượng dung dịch mẫu có bổ sung axit axetic.</p> <p>b Chiều cao pic thuộc vào dung môi.</p> <p>c Cột sắc ký khí đã được ổn định tốt.</p> <p>d Khi chạy sắc ký trên silica gel, quan sát thấy có thêm một pic có thời gian lưu lâu hơn</p> <p>e Được phân tích bằng GC/MS.</p> <p>f Cũng từ Merphos.</p> <p>g Bơm dung dịch chuẩn trong vòng 2 min sau khi bơm dung dịch mẫu.</p> <p>h Độ thu hồi được cải thiện khi được rửa giải thêm với 8 ml axeton.</p> <p>i Chiết phần mẫu thử có bổ sung axit xitric và axit oxalic.</p> <p>j Sự phân hủy của dicofol.</p> <p>k Sự phân hủy về p,p'-dichlorobenzophenone.</p> <p>l Đối với việc chuẩn bị mẫu, tiến hành tránh hoàn toàn ánh sáng.</p> <p>m Sau sắc ký trên silica gel, quan sát được sulfoxid trong dịch rửa giải 5.</p> <p>n Một phần bị ôxi hóa đến DEF.</p> <p>o Khi chạy sắc ký trên silica gel, quan sát được các độ thu hồi khác nhau.</p> <p>p Một phần bị phân hủy trong quá trình sắc ký trên silica gel.</p> <p>q Dịch rửa giải 5 cần 12 ml axeton để rửa giải hoàn toàn hợp chất này.</p>						

7.5 Sắc ký khí

Sử dụng hệ thống sắc ký khí thích hợp để xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật nhóm halogen hữu cơ, phospho hữu cơ và nitơ hữu cơ như trong TCVN 8424-3:2010 (EN 12393-3:2008).

Bơm một lượng (V_i) các dịch rửa giải thu được trong 7.4.4.3 vào sắc ký khí. Đối với phép phân tích có detector ion hóa nhiệt và detector quang phổ ngọn lửa, thì cũng có thể bơm một lượng (V_i) dung dịch thu được trong 7.4.3.4 (V_{R4}) vào máy sắc ký khí.

7.6 Tính dư lượng

Dư lượng, R , được biểu thị bằng miligam trên kilogam, của một hợp chất đã được nhận biết, tính theo công thức (2):

CVN 8424-2:2010

$$R = \frac{F_A \times W_{St}}{F_{St} \times V_i \times m} \times f \quad (2)$$

ong đó:

$$f = \frac{V_{End} \times V_{Ex} \times V_{R2} \times V_{R4}}{V_{R1} \times V_{R3} \times V_{R5}} \quad (3)$$

ong đó:

m là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g);;

V_{EX} là thể tích của axeton và nước được thêm vào trong bước chiết 7.4.1.2 hoặc 7.4.1.3, cộng với nước có trong mẫu, ít hơn lượng thực tế trong 7.4.2.1 là 5 ml hoặc trong 7.4.2.2 là 15 ml, tính bằng mililit (ml);

V_{R1} là phần thể tích V_{EX} được sử dụng để chiết phân đoạn trong 7.4.2, tính bằng mililit (ml);

V_{R2} là thể tích dung dịch còn lại sau khi cho bay hơi được chuẩn bị cho sắc ký thẩm thấu gel bằng phương pháp mô tả trong 7.4.3.4, tính bằng mililit (ml);

V_{R3} là phần thể tích của V_{R2} được bơm cho sắc ký thẩm thấu gel (thể tích của vòng mẫu), tính bằng mililit (ml);

V_{R4} là thể tích của dung dịch thu được sau sắc ký thẩm thấu gel bằng qui trình mô tả trong 7.4.3.4, tính bằng mililit (ml);

V_{R5} là phần thể tích V_{R4} được sử dụng cho sắc ký trong 7.4.4.3, tính bằng mililit (ml);

V_{END} là thể tích cuối cùng của dịch rửa giải thu được trong 7.4.4.3, tính bằng mililit (ml);

V_i là phần thể tích của V_{END} hoặc thể tích của V_{R4} được bơm vào máy sắc ký khí, tính bằng microlit (μ l);

W_{St} là lượng hợp chất được bơm cùng với dung dịch chuẩn, tính bằng nanogam (ng);

F_A là diện tích pic thu được từ V_i ;

F_{St} là chiều cao pic thu được từ W_{St} .

7.7 Nghiên cứu cộng tác

Các cặp chất nền và thuốc bảo vệ thực vật đã được nghiên cứu cộng tác được nêu trong Bảng 5.

Bảng 5 – Chất nền và thuốc bảo vệ thực vật

	cà rốt	khoai tây	cải bắp Savoy	rau chân vịt	cà chua	dưa chuột	giống cam chanh	ngũ cốc	các loại hạt, bơ	đậu vàng
acephate				+						
aclonifen					+		+	+	+	
azoxystrobin					+		+	+	+	
boscalid						+	+	+	+	
bromophos	+	+			+					
bromopropylate				+	+					
captan					+					
chlorfenapyr						+	+	+	+	
chlorfenprop-metyl						+	+	+	+	
chlorothalonil				+						
chlorpropham		+								
chlorpyrifos				+	+					
clodinafop-propargyl					+		+	+	+	
clomazone					+		+	+	+	
cloquintocet-1-mexyl					+		+	+	+	
cyprodinil					+		+	+	+	
o,p'-DDE	+									
p,p'-DDE	+			+						
o,p'-DDT	+									
p,p'-DDT	+				+					
diazinon	+		+							+
dichlofuartid	+									
dicloran	+									
idicofol				+	+					
dieldrin	+	+	+	+	+					+
diethofencarb					+		+	+	+	
difenoconazole					+		+	+	+	
diflufenican					+		+	+	+	
diphenylamin					+		+	+	+	
α -endosulfan					+					
β -endosulfan				+	+					
endosulfan sulfate				+	+					
endrin					+					

Bảng 5 (tiếp theo)

	cà rốt	khoai tây	cải bắp Savoy	rau chân vịt	cà chua	dưa chuột	giống cam chanh	ngũ cốc	các loại hạt, bơ	đậu vàng
ethion					+					
ethofumesate					+		+	+	+	
fenamidone						+	+	+	+	
fenarimol				+						
fenazaquin					+		+	+	+	
fenitrothion	+		+							
fenoxycarb					+		+	+	+	
fenpicloriii					+		+	+	+	
fenpropathrin				+						
fludioxonil					+		+	+	+	
fluoroglycofen-etyl					+		+	+	+	
fluquinconazole					+		+	+	++	
flurtamone						+	+	+	+	
flutriafol					+		+	+	+	
folpet				+						
HCB	+	+		+	+					+
α -HCH					+					
Lindane (γ -HCH)	+	+	+	+	+					+
heptachlor epoxit	+		+							
indoxacarb						+	+	+	+	
iprodione				+						
iprovalicarb						+	+	+	+	
kresoxim-metyl					+		+	+	+	
malathion				+						+
mecarbam				+						
mefenpyr-dietyl					+		+	+	+	
metconazole					+		+	+	+	
napropamide					+		+	+	+	
nuarimol					+		+	+	+	
parathion	+		+	+	+					
permethrin				+						
phosalone	+			+						+
picoxystrobin						+	+	+	+	
pirimiphos-metyl		+		+	+					+

Bảng 5 (kết thúc)

	cà rốt	khoai tây	cải bắp Savoy	rau chân vịt	cà chua	dưa chuột	giống cam chanh	ngũ cốc	các loại hạt, bơ	đậu vàng
procymidone					+					
propham		+								
prosulfocarlo					+		+	+	+	
pyridaben						+	+	+	+	
pyrifenox					+		+	+	+	
pyriproxyfen						+	+	+	+	
quintozene				+						+
silthiofam						+	+	+	+	
spiroxamine						+	+	+	+	
tebufenpyrad					+		+	+	+	
tetradifon					+					
tolclofos-metyl				+						
trifloxystrobin						+	+	+	+	
triticonazole					+		+	+	+	
vinclozolin	+	+		+	+					
zoxamide						+	+	+	+	

7.8 Khả năng ứng dụng

Các loại thuốc bảo vệ thực vật có thể phân tích bằng phương pháp này được nêu trong Bảng 4.

Các loại cây trồng và thực phẩm đã thử nghiệm bằng phương pháp này là:

Táo	Nho đỏ Hy Lạp	Đậu Hà lan
Bơ	Nho	Dứa
Chuối	Bắp cải	Mận
Đậu	Cây hublong	Khoai tây
Bia	Cải củ	Bắp cải Savoy
Cà rốt	Rau diếp	Gia vị
Bông cải	Dưa vàng	Rau chân vịt
Ngũ cốc	Nước quả nho	Dâu
Anh đào	Các loại hạt	Củ cải đường
Quả cam quýt	Hành tây	Ớt ngọt
Các sản phẩm ca cao	Đào	Chè và sản phẩm tương tự

TCVN 8424-2:2010

Cà phê, dạng thô	Hạt lạc	Thuốc lá
Dưa chuột	Lê	Cà chua
Cải xoăn		Rượu vang

8 Phương pháp P: Chiết bằng etyl axetat và làm sạch bằng sắc ký thẩm thấu gel, nếu cần

8.1 Nguyên tắc

Phân mẫu thử được cắt nhỏ rồi đồng hóa với natri sulfat trong etyl axetat và phần dịch đồng hóa được lọc. Phần dịch lọc được cô đặc và có thể được bơm trực tiếp vào máy sắc ký khí có detector chọn lọc phospho mà không cần phải làm sạch, hoặc được tinh sạch bằng sắc ký thẩm thấu gel trên BioBeads®S-X3 dùng hỗn hợp etyl axetat và xyclohexan làm chất rửa giải, nếu cần. Dịch rửa giải được cô đặc để xác định bằng sắc ký khí.

8.2 Thuốc thử

8.2.1 Yêu cầu chung

Sử dụng tất cả các thuốc thử có độ tinh khiết thích hợp để phân tích dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và phù hợp với Điều 4 của TCVN 8424-1:2010 (EN 12393-1:2008).

8.2.2 Etyl axetat

8.2.3 Natri sulfat

Nung ở nhiệt độ 500 °C ít nhất 4 h, để nguội rồi bảo quản trong chai có nắp đậy kín.

8.2.4 Xyclohexan

8.2.5 Hỗn hợp rửa giải GPC: xyclohexan/etyl axetat với tỷ lệ 1 : 1 (tính theo thể tích)

8.2.6 Bio Beads® S-X3, cỡ hạt từ 38 µm đến 75 µm (200 mesh đến 400 mesh)

8.3 Thiết bị, dụng cụ

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

8.3.1 Máy trộn tốc độ cao hoặc máy đồng hóa, có cốc trộn thích hợp

8.3.2 Bộ làm bay hơi dung môi, có nồi cách thủy

8.3.3 Dụng cụ dùng cho GPC, ví dụ GPC Autoprep® 1001 hoặc 1002®, được trang bị cột sắc ký, đường kính trong 25 mm, 50 cm và hai mươi ba vòng mẫu 5 ml; cột được nhồi 50 g resin BioBeads

S-X3[®], đã được làm trương nở qua đêm trong hỗn hợp rửa giải GPC, cột cao khoảng 32 cm, đã được nhồi như mô tả trong 8.4.3.1.

8.4 Cách tiến hành

8.4.1 Chuẩn bị mẫu

Phần mẫu thử được cắt nhỏ và trộn kỹ để thu được phần mẫu thử đồng nhất.

8.4.2 Chiết

Cân 50 g mẫu đã chuẩn bị cho vào cốc trộn (8.3.1), thêm một lượng thích hợp ít nhất 50 g natri sulfat (8.2.3) để hấp thụ phần nước có trong mẫu (xem Bảng A.1 về hàm lượng nước) và 100 ml etyl axetat. Trộn từ 2 min đến 3 min. Lọc chất lỏng qua phễu Buchner có đường kính trong 90 mm, rửa cẩn thận bộ máy trộn và bánh lọc hai lần, mỗi lần dùng 25 ml etyl axetat. Đo thể tích dịch lọc, chuyển một phần tư dung dịch (tương đương 12,5 g mẫu) vào bình và cô đặc đến khoảng 2,5 ml bằng bộ cô quay (8.3.2). Chuyển sang ống đong và chỉnh bằng axetat etyl đến chính xác 5 ml. Dịch cô đặc này có thể được bơm trực tiếp vào sắc ký khi được trang bị detector FPD hoặc NPD.

Trong một số trường hợp, khi có chất gây nhiễu, thì nên làm sạch bằng GPC.

8.4.3 Làm sạch bằng sắc ký thẩm thấu gel (nếu cần)

8.4.3.1 Nhồi cột thẩm thấu gel

Để BioBeads[®] (8.2.6) (khoảng 50 g) trương nở qua đêm trong hỗn hợp rửa giải GPC (8.2.5). Sau đó rót tất cả huyền phù cùng một lúc vào cột (dung tích khoảng 180 ml). Ngay sau khi lớp nền gel đã ổn định (không có bọt khí) đến mức xấp xỉ 32 cm, thì chèn pittông, hạ thấp xuống đến mức nền và xoay vào vị trí. Nếu lớp nền gel bị lún xuống mức thấp hơn sau khi thao tác kéo dài, thì phải chỉnh pittông cho phù hợp (theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

8.4.3.2 Kiểm tra thể tích rửa giải

Đối với mỗi cột thẩm thấu gel trước khi sử dụng lần đầu, cần phải kiểm tra các điều kiện rửa giải trên vài hợp chất có khoảng thể tích rửa giải thấp hơn và cao hơn và trên các dịch chiết thô thích hợp. Để thực hiện điều này, nạp đầy các vòng mẫu bằng dịch chiết thô hoặc hỗn hợp các dung dịch chuẩn, rửa giải theo mô tả trong 8.4.3.3 và xác định bằng phương pháp phân tích thích hợp cho dù các hợp chất được thêm vào đã được thu hồi hoàn toàn hoặc các chất gây nhiễu sinh ra do các tạp chất chưa được tách. Tương tự, phải kiểm tra các cột sau khi đã qua một khoảng thời gian sử dụng dài.

8.4.3.3 Làm sạch dịch chiết thô

Thêm 5 ml xyclohexan và 5 ml dịch chiết etyl axetat (8.4.2). Lắc khoảng 20 s rồi lọc qua giấy lọc nhanh

TCVN 8424-2:2010

và bơm dịch lọc vào một vòng mẫu của máy sắc ký thẩm thấu gel.

Rửa giải cột thẩm thấu gel bằng hỗn hợp rửa giải với tốc độ 5,0 ml/min. Bộ phận chuyển mạch của máy sắc ký thẩm thấu gel được điều chỉnh để kiểm tra thể tích dịch rửa giải. Thông thường được cài đặt như sau:

- chế độ thải (dump) chuyển sang 18 min để loại bỏ 90 ml;
- chế độ thu nhận chuyển sang 15 min để thu được 75 ml;
- chế độ rửa chuyển sang 2 min để rửa cột dùng 10 ml.

Cô đặc thể tích thu được đến khoảng 1 ml trên bộ cô quay (quay chậm, ngâm nhẹ bình cầu), dùng pipet cho lượng này vào ống nghiệm chia độ được đậy bằng nút mài, tráng rửa bộ cô quay bằng etyl axetat và pha loãng bằng etyl axetat đến 5,0 ml. Việc bổ sung etyl axetat không được bỏ qua để đảm bảo hòa tan hoàn toàn dư lượng.

Để xác định các dư lượng thuốc bảo vệ thực vật riêng rẽ, thì có thể cài đặt dụng cụ để thu được một lượng nhỏ hơn, phù hợp với hợp chất tương ứng, theo các giá trị nêu trong Bảng 4.

8.5 Sắc ký khí

Sử dụng hệ thống sắc ký khí thích hợp để xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật nhóm phospho hữu cơ.

8.6 Nghiên cứu cộng tác

Các cặp chất nền và thuốc bảo vệ thực vật đã được nghiên cứu cộng tác mà không có bước làm sạch:

- Chất nền: táo; tỏi; bắp cải.
- Thuốc bảo vệ thực vật: bromophos-etyl, chlorfenvinphos; diazinon; mevinphos; parathion.

8.7 Khả năng áp dụng

Các thuốc bảo vệ thực vật sau đây có thể phân tích được trong rau quả bằng phương pháp này:

acephate	dichlofenthion	heptenophos	phosmet
azinphos-etyl	dichlorvos	isofenphos	phoxim
azinphos-metyl	dimethoate	malathion	pirimiphos-etyl
bromophos	dioxathion	methamidophos	pirimiphos-metyl

bromophos-etyl	disulfoton	methidathion	prothoate
carbophenothion	ditalimfos	menazon	pyrazophos
chlorfenvinfos	ethion	mevinphos	sulfotep
chlorpyrifos	ethoprophos	monocrotophos	temephos
chlorpyrifos-metyl	etrimfos	naled	TEPP
chlorthiophos	fenamiphos	omethoate	tetrachlorvinphos
coumaphos	fenchlorphos	oxydemeton-mEtyl	thiometon
cyanofenphos	fenitrothion	parathion	tolclofos-metyl
demeton-S-metyl	fensulfothion	-metyl parathion	triamiphos
demeton-S-metyl sulfone	fenthion	phorate	triazophos
dialifos	fonofos	phosalone	trichlorfon
diazinon	formothion	phosphamidon	trichloronate
			vamidothion

Phụ lục A

(Tham khảo)

Hàm lượng nước trung bình có trong các loại cây trồng và các loại thực phẩm**Bảng A.1 – Hàm lượng nước trung bình có trong các loại cây trồng và các loại thực phẩm**

Cây trồng và thực phẩm	Hàm lượng nước trung bình (g/100 g)
Bột cacao	5
Ngũ cốc, gia vị (rau thơm), cà phê (nguyên liệu), chè và sản phẩm tương tự	10
Chuối, cây cải ngựa	75
Đậu Hà Lan, nho Hy Lạp (đen), khoai tây, mùi tây, nho	80
Dứa, táo, lê, nho Hy Lạp (đỏ), anh đào, cam, mận, rau thơm	85
Súp lơ, đậu (hạt non), bông cải xanh, dâu tây, bưởi, cải xoăn, su hào, dưa hấu, cà rốt, nước quả nho, hạt tiêu, đào, nấm, củ cải đỏ, bắp cải đỏ, rau chân vịt, ngon cải, chanh, củ cải đường (ăn được gốc), hành tây	90
Rau diếp xoăn, rau xà lách, dưa chuột, củ cải, đại hoàng, rau diếp, cần tây, măng tây, cà chua	95

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Becker, G.: *Organohalogen, organophosphorus and triazine compounds*. In DFG Manual of Pesticide Residue Analysis, VCH Weinheim, Method S 8, in Vol. 1 (1987), pp. 283, and Vol. 2 (1992), pp. 313
 - [2] Luke, Milton A.; Froberg, Jerry E.; Masumoto, Herbert T., *Extraction and clean-up of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58,1020 -1026,1975
 - [3] Luke, Milton A.; Froberg, Jerry E.; Doose, Gregory M.; Masumoto, Herbert T. *Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64,1187-1195(1981)
 - [4] *Pesticide Analytical Manual -Vol.1, Multiresidue methods, Section 302,3rd Edition, 1994*
 - [5] Specht, W.: *Organochlorine, organophosphorus, nitrogen-containing and other pesticides*. In DFG, Manual of Pesticide Residue Analysis, VCH Weinheim, Method S 19, in Vol.1 (1987), pp. 383, and Vol.2 (1992), pp. 317
 - [6] Specht W., Pelz, S., Gilsbach, W.: *Gas-chromatographic determination of pesticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silica gel-column chromatography. Replacement of dichloromethane by ethyl acetate/cyclohexane in liquid-liquid partition and simplified conditions for extraction and liquid-liquid partition*, Fresenius J. Anal. Chem. 353,183-190 (1995)
 - [7] *Analytical Methods for Residues of Pesticides in Foodstuffs*, Sixth edition, The Hague (1996)
-