

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG MỘT SỐ AMIN THOM
GIẢI PHÓNG RA TỪ THUỐC NHUỘM AZO CÓ TRONG SẢN PHẨM DA, GIẢ DA
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO
KẾT NỐI ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ KẾP**

Đến tòa soạn 30 - 1 - 2015

Tạ Thị Ngọc Ánh, Lê Thị Băng, Trần Mạnh Quân, Trần Quốc Trung
Trung tâm Phân tích và Công nghệ Môi trường, Viện Nghiên cứu Da Giấy

SUMMARY

**RESEARCH ON DETERMINATION OF AROMATIC AMINES RELEASED
FROM AZO DYES IN LEATHER, IMITATION LEATHER
BY USING HPLC-MS/MS METHOD**

An analytical procedure based on the use of high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry/mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was applied for the determination of banned azo dyes in leather and imitation leather. For the identification of the analytes one parent ion and two product ions were selected and the LC-MS/MS parameters optimized to obtain high sensitivity and selectivity. This method be able to determine 18 aromatic amines derived from azo colorants using C18 column and using MeOH: H₂O as a mobile phase. Sample was extracted in 17 mL of 0.06 M citrate buffer solution at pH 6 at a temperature of 70 °C. Then, the extracted colorants were reduced to aromatic amines using 3 mL of 200 mg/sodium dithionite solution. After an incubation of 30 min at 70°C, the mixture was allowed to cool to room temperature. The amines released in the process of reductive cleavage were transferred to a t-butyl methyl ether phase by means of liquid-liquid extraction, the t-butyl methyl ether extract was concentrated and was then filtered with syringe filters of 0.45-μm pore size. Method detection limit was 0.5 mg/Kg.

1. MỞ ĐẦU

Thuốc nhuộm là chất màu hữu cơ tạo thành bởi hợp chất diazoni kết hợp với phenol hoặc một amin thơm. Chúng là chất màu được sử dụng rộng rãi trong tất cả các sản phẩm như thực phẩm, giấy, da và dệt may. Tuy nhiên,

nhóm azo của một số loại thuốc nhuộm có thể bị khử trong cơ thể sống tạo thành các amin gây đột biến và gây ung thư [1,2]. Với nhận thức ngày càng cao về các nguy cơ tiềm ẩn cho người tiêu dùng, Nghị viện châu Âu mới đây đã chấp nhận việc sửa đổi thứ 19 của Hội

đồng số 76/769/EEC và ban hành Chỉ thị Châu Âu 2002/61/EC [3]. Chỉ thị này đặc biệt hạn chế bán và sử dụng thuốc nhuộm azo, mà sau khi khử sẽ phân tách tạo thành amin bất kỳ trong danh sách 22 amin thơm có hại trong các sản phẩm dệt và da và có thể tiếp xúc trực tiếp, lâu dài với da người hoặc khoang miệng. Hiện nay, một số phương pháp phân tích đã được mô tả trong các tài liệu để xác định thuốc nhuộm azo. Thuốc nhuộm azo thường được xác định gián tiếp bằng cách đo các amin tương ứng của chúng, được hình thành sau khi khử bằng natri dithionit hoặc thiếc (II) clorua. Có một số các phương pháp đã được ứng dụng phân tích cho các mẫu da. Phương pháp được sử dụng rộng rãi là phương pháp DIN 53316 [4]. Bên cạnh đó, Eskilsson đã tiến hành phân tích mẫu da thật với một quy trình mới dựa trên quá trình chiết có hỗ trợ vi sóng (MAE) và định lượng sử dụng ngoại chuẩn thông thường. Mặc dù thu được một số cải tiến đáng kể về tính chính xác so với các phương pháp DIN 53316, độ thu hồi thu được vẫn còn quá thấp (<60%) đối với một số loại thuốc nhuộm [5]. Phương pháp phân tích sử dụng kỹ thuật HPLC-MS/MS là một phương pháp phân tích hiện đại, được ứng dụng trong phân tích đồng thời dư lượng đa chất hữu cơ, có độ nhạy và độ chọn lọc rất cao, vì thế sẽ cho kết quả phân tích có độ chính xác và độ lặp lại tốt hơn so với các kỹ thuật đang sử dụng là GC, HPLC-DAD, HPCE và TLC như được mô tả trong TCVN 7536:2005 [6] và ISO 1734-1:2013 [7]. Hơn nữa, khi sử dụng kỹ thuật này, không cần phải sử dụng thêm bất cứ kỹ thuật tách sắc ký nào khác để có thể nhận dạng hay khẳng định chính xác sự có mặt của các amin thơm bị cấm có trong mẫu thử nghiệm [8].

2. THỰC NGHIỆM

Hóa chất

Chất chuẩn 22 amin thơm của hãng Accustandard, Inc, nồng độ gốc là 1000 mg/L trong Acetonitrile (ACN). Các dung môi metanol (MeOH), n-hexan, ACN, axit formic (FA) là hóa chất cấp độ HPLC (Merck). Một số hóa chất khác như amoni dihidrophotphat (NaH_2PO_4) và natri hidrophotphat (Na_2HPO_4) (độ tinh khiết >99,9%), natri hidroxit (NaOH) (độ tinh khiết >96%), axit citric (độ tinh khiết >99,5%), natri dithionit (hoá chất kỹ thuật – Labosi), axit acetic (độ tinh khiết >95,5%), amoni acetat (độ tinh khiết >98%) và nước cất deion.

Thiết bị

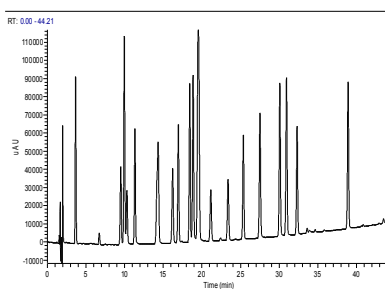
Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Ultimate 3000 HPLC kết nối đầu dò 2 lần khối phổ Thermo TSQ Quantum Access Max. Cột sắc ký lỏng Hypersil Gold C18 (150x2,1 mm, 5 μm), Hypersil Gold aQ (150x2,1 mm, 3 μm) và Hypersil Gold PFP (150x2,1mm, 3 μm). Trong nghiên cứu sử dụng đồng thời các thiết bị phòng thí nghiệm như thiết bị lắc gia nhiệt, bể siêu âm, hệ thống thổi khí nitơ, màng lọc và các dụng cụ thủy tinh khác.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

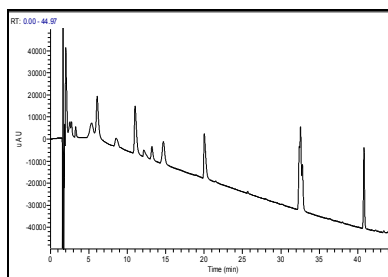
3.1. Khảo sát quá trình tách sắc ký

Khảo sát cột sắc ký

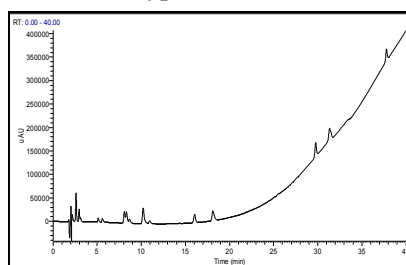
Tiến hành khảo sát quá trình tách sắc ký trên các cột sắc ký khác nhau là cột C18, aQ và PFP. Pha động sử dụng trong quá trình khảo sát theo đúng tiêu chuẩn ISO 17234-1: 2010 [7] với kênh A là đệm phosphat và kênh B là MeOH. Chế độ chạy gradien được bắt đầu từ 10% kênh B đến 80% kênh B trong 45 phút, nhiệt độ lò cột là 40°C.



Phân tách sắc ký các chất amin thơm trên cột Hypersil Gold C18



Phân tách sắc ký các chất amin thơm trên cột Hypersil Gold aQ



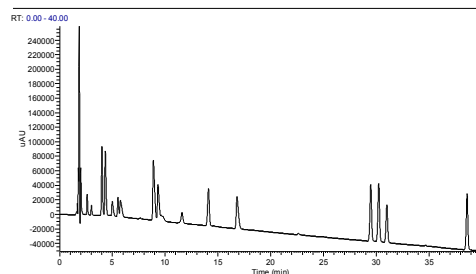
Phân tách sắc ký các chất amin thơm trên cột Hypersil Gold PFP

Hình 1. Sắc phổ đồ khảo sát cột sắc ký
Kết quả khảo sát từ Hình 1 cho thấy điều kiện tách sắc ký trên cột C18 là tối ưu nhất. Toàn bộ các amin thơm đều được tách khỏi nhau với độ phân giải cao, độ rộng chân pic nhỏ. Vì vậy, sử dụng cột sắc ký C18 để tách các chất amin thơm trong các nghiên cứu tiếp theo.

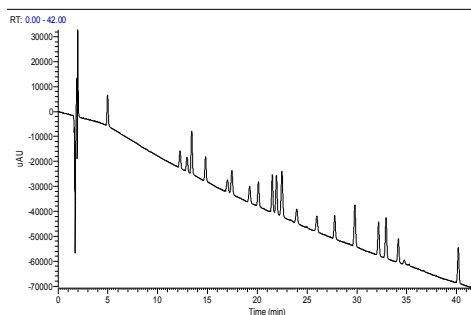
Khảo sát pha động

Tiến hành khảo sát 3 điều kiện pha động để phát hiện các chất amin trên hệ thống HPLC-MS/MS: Pha động 1: A-H₂O (FA 0,1%), B-MeOH; Pha động 2: A-H₂O

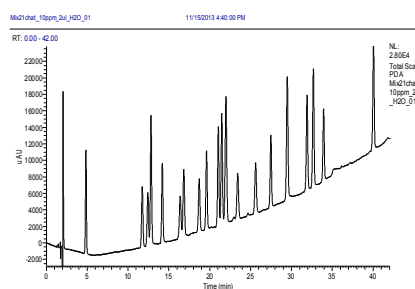
(CH₃COONH₄ 25mM), B-MeOH; Pha động 3: A-H₂O; B-MeOH. Ở cả ba điều kiện, pha động chạy ở chế độ gradien: bắt đầu từ 10% kênh B tăng dần đến 80% kênh B trong vòng 45 phút, cùng trên một cột Hypersil Gold C18. Trong Hình 2 là sắc đồ phân tách các amin thơm trên cột C18 với pha động khác nhau.



Phân tách chất amin thơm với pha động 1



Phân tách các amin thơm với pha động 2



Phân tách chất amin thơm với pha động 3

Hình 2. Sắc phổ đồ khảo sát pha động
Với điều kiện pha động A-H₂O (0,1% FA) và B-MeOH, nhiều amin thơm có chân pic trùng nhau. Với hai điều kiện pha động còn lại, các amin thơm được phân tách rõ ràng và chân pic không bị trùng lấp. Tuy nhiên, qua một số

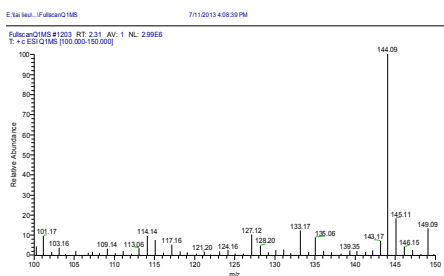
tài liệu tham khảo và quá trình thực nghiệm, nhận thấy sử dụng đệm ammoni acetat có thể làm giảm cường độ ion hóa của một số chất amin thơm như 4-chloroaniline, 4-chloro-o-toluidin. Do vậy, pha động gồm A-H₂O và B-MeOH được lựa chọn để phân tách các chất amin thơm trên hệ thống HPLC-MS/MS.

3.2. Khảo sát các thông số tối ưu cho đầu dò khối phổ

Bảng 4. Các thông số tối ưu thiết lập cho nguồn ion hóa ESI

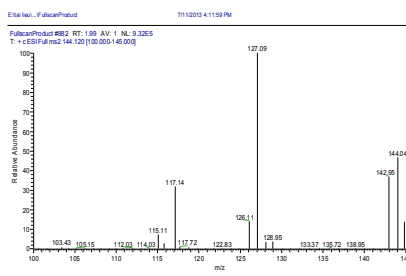
STT	Thông số	Positive (+)
1	Spray Voltage	4000 V
2	Sheath gas pressure	40 psi
3	Aux gas pressure	10 psi
4	Capillary Temperature	270° C
5	SkimmerOffset	-10
6	Tube Lens Offset	90 V

Khảo sát các mảnh phổ của từng amin thơm



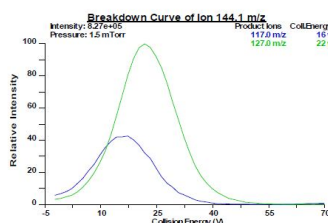
Chế độ Fullscan

Parent mass: m/z 144,12



Chế độ Fullscan – product

Product mass: m/z 127,09 và m/z 117,14



Năng lượng bắn phá

m/z 117 (16V), m/z 127 (22V)

Hình 3. Tối ưu hóa detector MS-MS cho chất 2-naphthylamine

Chế độ ion hoá của các amin thơm được thực hiện ở chế độ ion dương (positive). Các dung dịch chuẩn có nồng độ 200 ppb pha trong nước cất de ion và MeOH với tỉ lệ H₂O: MeOH = 50:50. Dung dịch chuẩn được đưa vào buồng ion hoá nhờ một vòng mẫu (loop) 5 µL và dòng dung môi pha động 250 µL (H₂O: MeOH = 50:50). Đầu

dò khối phổ TSQ Quantum để tìm mảnh mẹ được chạy ở chế độ quét scan Fullscan - Q1MS, tìm mảnh con chạy ở chế độ Fullscan – Product. Sắc đồ của 2-naphthylamine được biểu diễn trong Hình 3. Mảnh mẹ, mảnh con và thời gian lưu của các amin còn lại thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 5. Tổng hợp mảnh phổ của các hợp chất amin và năng lượng bắn phá tối ưu

TT	Amin thơm	Parent mass	Product mass 1	CE (eV)	RT	Product mass 2	CE (eV)
1	2,4-Diaminanisol	173,3	141,1	10	1,78	113,1	15
2	2,4-Diaminotoluen	123,1	108,2	14	3,69	79,2	19
3	2-Anisidine	124,2	109,1	14	11,62	80,3	29
4	O-Toluidine	108,1	93	15	12,35	91	17
5	Benzidine	185	167,9	17	12,43	151	32
6	4,4-Oxydianiline	201,1	108	23	13,78	80	19
7	4-Chloroaniline	128,1	111	23	16,41	93	17
8	4-Cresidine	138,1	123	14	18,68	106	21
9	4,4'-Diaminodiphenylmethane	199,1	182	19	19,36	106	23
10	3,3'-Dimethoxybenzidine	245,7	231,1	17	20,99	213,9	18
11	3,3'-Dimethylbenzidine	213,1	196	18	21,4	181	23
12	2-Naphthylamine	144,1	127	22	21,91	117	16
13	4,4'-Thiodianiline	217	200	18	21,91	124	19
14	4-Chloro-o-toluidine	142,1	125	21	23,43	107	16
15	2,4,5-Trimetylaniline	136,2	121,1	14	25,58	91,2	22
16	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethane	227,1	195	21	27,41	120	26
17	4-Aminobiphenyl	170,1	151,9	29	29,47	128,2	23
18	3,3'-Diclobenzidine	253,9	218	20	31,87	183	26
19	4-Aminoazobenzen	198,2	93	20	32,65	77	19
20	4,4'-Metylen-bis-2 (cloroaniline)	269,9	231	18	33,91	140	27
21	O-Aminoazotoluen	226	106,3	29	40,0	91,1	20

Trong quá trình nghiên cứu, nhóm tác giả chỉ có thể phát hiện được mảnh mẹ mà không thể phát hiện được mảnh con của chất 2-amino-4-nitrotoluene. Điều này cũng phù hợp với tài liệu nhóm thực hiện tham khảo [9].

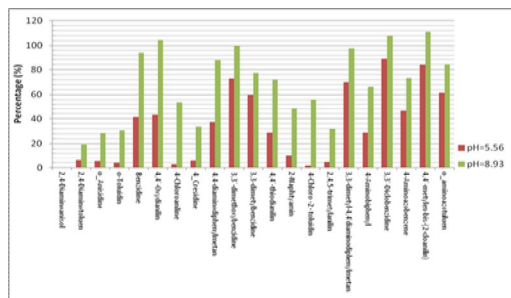
3. Khảo sát điều kiện tối ưu cho xử lý mẫu

Quá trình xử lý mẫu được kế thừa theo tiêu chuẩn CEN ISO/TS 17234 với các bước thực hiện lần lượt là: loại mỡ; chiết thuốc nhuộm azo; khử thuốc nhuộm azo thành các amin thơm; làm sạch dung dịch chiết và đem phân tích trên hệ thống HPLC-MSMS. Đối với mẫu giả da, quá trình xử lý mẫu theo ISO 24362-1:2014, theo hướng dẫn của tiêu chuẩn này, mẫu giả da sẽ được chiết bởi chlorobenzene ở nhiệt độ sôi trước

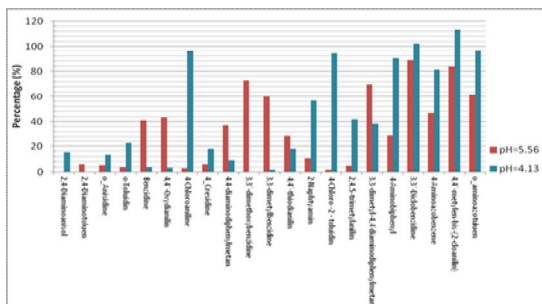
khi thực hiện quá trình khử bằng natri dithionit. Tuy nhiên, để tối ưu hóa cho quá trình xử lý mẫu, nhóm thực hiện đã tiến hành khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến độ thu hồi của phương pháp như pH, dung môi chiết, số lần chiết.

pH

Độ pH sẽ ảnh hưởng đến khả năng ion hóa của các amin thơm, thay đổi khả năng tan của các amin thơm trong nước và do đó ảnh hưởng đến hiệu suất của quá trình chiết lỏng-lỏng. Kết quả khảo sát sự phụ thuộc của hiệu suất thu hồi (tỉ lệ diện tích pic của mẫu và mẫu chuẩn ở nồng độ dự kiến) vào độ pH của dung dịch chiết được thể hiện trong Hình 4.



Ảnh hưởng của pH đến độ thu hồi
(pH= 8,93)



Ảnh hưởng của pH đến độ thu hồi (pH=4,13)

Hình 4. Khảo sát ảnh hưởng của pH đến độ thu hồi của các amin thơm

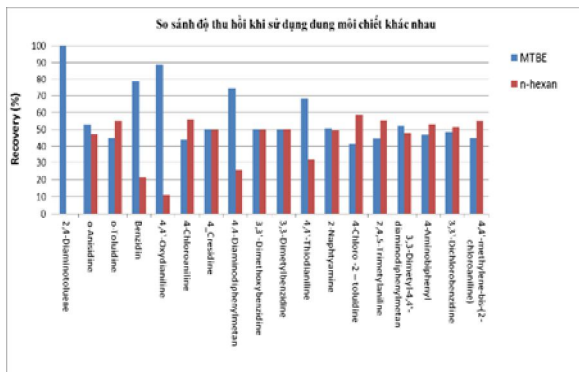
Khi dung dịch chiết có môi trường bazơ pH = 8,93 thì phần lớn các amin thơm đều chuyển sang trạng thái trung hòa, không bị ion hóa và do đó hiệu suất thu hồi của các amin thơm đều tăng lên. Khi dung dịch chiết có môi trường axit pH = 4,13 độ thu hồi của một số amin bị giảm đáng kể (benzidien; 4,4'-oxydianiline; 4,4'-diaminodiphenylmethane; 3,3-dimethylbenzidine; 3,3-dimethyl-4,4-

diaminodiphenylmethane). Các chất này đã bị ion hóa nên độ tan trong nước tăng lên, làm giảm độ thu hồi khi chiết lỏng-lỏng.

Dung môi chiết và số lần chiết

Ngoài việc sử dụng dung môi chiết là MTBE, nhóm thực hiện đã tiến hành khảo sát chiết với dung môi n-hexan. Hình 5.1 phản ánh độ thu hồi của MTBE và n-hexan. Tiến hành khảo sát hiệu suất thu hồi thông qua số lần

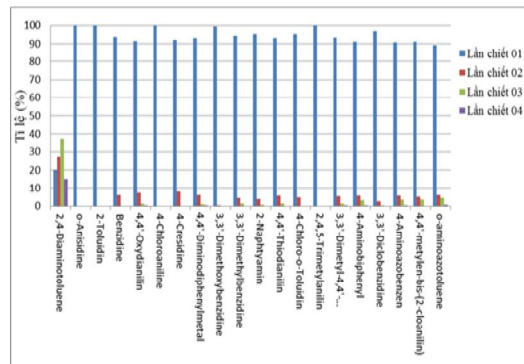
chiết để tìm được số lần chiết thích hợp. Khảo sát được tiến hành với 4 lần 10mL MTBE. Kết quả được thể hiện trong Hình 5.2



5.1. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết đến độ thu hồi

Hình 5. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết và số lần chiết đến độ thu hồi của các amin thơm

Qua Hình 5.1, kết luận sử dụng dung môi chiết MTBE sẽ cho độ thu hồi tốt hơn so với dung môi n-hexan. Khi sử dụng dung môi chiết MTBE, độ thu hồi đặc biệt tốt cho các chất amin thơm có độ phân cực cao như: bezidine; 2,4-diaminotoluen; 4,4'-oxydianilin; 4,4'-diaminodiphenylmetan; 4,4'-thiodianilin. Hình 5.2 cho thấy, ngoại trừ 2,4-diaminotoluen các amin còn lại được chiết gần như hoàn toàn sau lần chiết thứ 1. 2,4-diaminotoluen có độ thu hồi thấp,



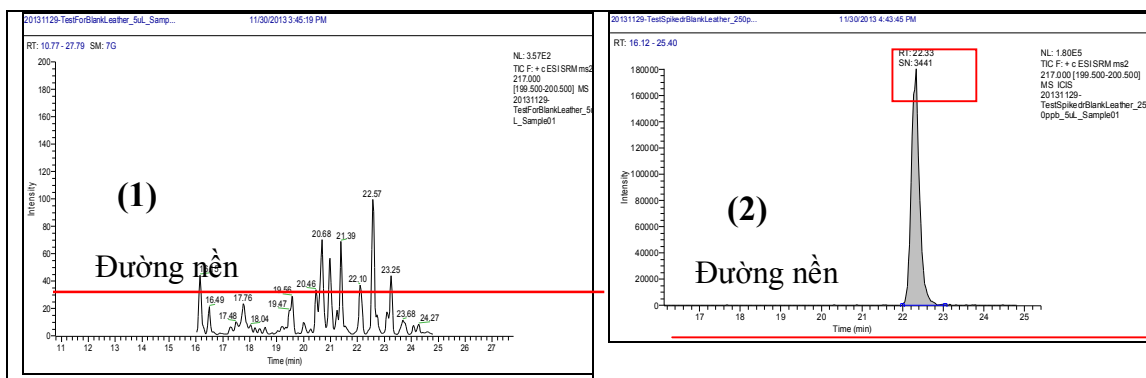
5.2. Khảo sát ảnh hưởng của số lần chiết đến độ thu hồi.

do đó để đạt yêu cầu độ thu hồi >50%, cần tiến hành chiết 2 lần với 10 mL MTBE.

3.4. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Độ chọn lọc

Độ chọn lọc được đánh giá dựa trên sự khác biệt trong sắc đồ giữa mẫu trắng và mẫu thêm chuẩn. Nếu mẫu trắng không phát hiện được pic tại thời gian lưu của chất đó và mẫu thêm chuẩn xuất hiện pic với độ cao rõ rệt ($S/N > 3$) thì phương pháp phân tích là chọn lọc cho chất cần phân tích.

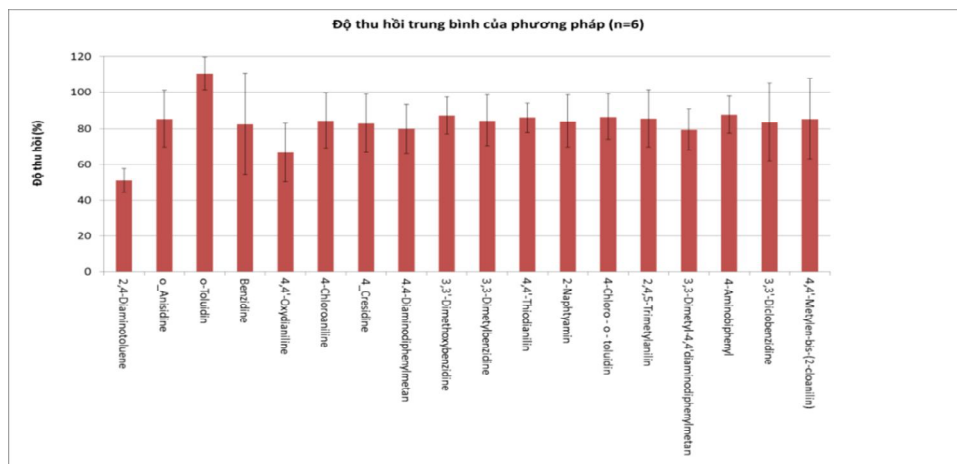


Hình 6. Độ chọn lọc của phương pháp phân tích đối với chất 4,4'-thiodianiline (1-Mẫu da trắng; 2-Mẫu da trắng thêm chuẩn 0,25 mg/kg)

Từ thực nghiệm cho thấy phương pháp phân tích các amin thơm giải phóng ra từ thuốc nhuộm azo bằng HPLC – MSMS có độ chọn lọc cao.

Độ thu hồi

Kết quả đánh giá độ thu hồi (Hình 7) cho thấy, độ thu hồi của 18 amin thơm là tốt với phần lớn các chất có độ thu hồi trung bình >70%; ngoại trừ 2,4-diaminotoluen có độ thu hồi trung bình 53%.



Hình 7. Độ thu hồi của phương pháp

Do 2,4-diaminoanisol có độ phân cực lớn và độ bền thấp dẫn đến độ thu hồi thấp trong quá trình chiết lỏng lỏng và xử lý mẫu. 2-amino-4-nitrotoluene không phân tích được do không bắn phá được thành các mảnh ion con trong chế độ MS/MS [9]. 4-aminoazobenzene và o-aminoazotoluen có độ thu hồi thấp do tương tác với chất khử natri dithionit trong quá trình xử lý mẫu [10].

Độ lặp lại

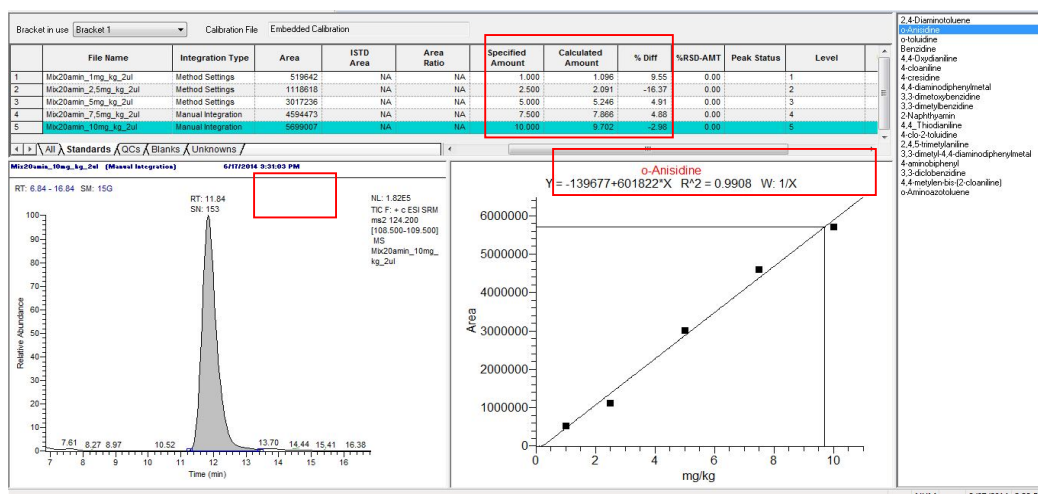
Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối – RSD (%). Nhóm nghiên cứu thực hiện thí nghiệm với số lần lặp lại n = 6 mẫu thêm chuẩn vào mẫu da thuộc. Kết quả thu được RSD nằm trong khoảng từ 4 đến 20%.

Giới hạn phát hiện

Đánh giá chung trên kết quả thực nghiệm, tính toán giới hạn phát hiện của phương pháp đưa ra một giới hạn phát hiện chung MDL = 0,5 mg/Kg cho các chất amin thơm trong sản phẩm da.

Độ tuyến tính

Đường chuẩn của các chất amin thơm được xây dựng với khoảng nồng độ từ 1 mg/kg; 2,5 mg/kg; 5,0 mg/kg; 7,5 mg/kg; 10 mg/kg bằng cách thêm chuẩn vào mẫu da trắng và thực hiện toàn bộ quá trình xử lý mẫu và phân tích như mẫu thật. Từ kết quả nghiên cứu, hệ số tương quan của từng amin thơm là $R^2 > 0,99$ trong khoảng tuyến tính từ 1 mg/Kg – 10 mg/Kg và Diff (%) <20% trên toàn bộ các đường chuẩn. Độ tuyến tính của o-Anisidine được thể hiện qua Hình 8.



Hình 8: Đường chuẩn của o-anisidine trong khoảng hàm lượng 1,0 – 10 mg/kg

3.5. So sánh phương pháp phân tích mới với TCVN 7536: 2005

Sử dụng giả thiết thống kê so sánh phương sai của hai tập số liệu lặp lại:

Dùng chuẩn Fisher để so sánh phương sai của hai tập số liệu thu được từ hai phương pháp. Với độ tin cậy là 95%, từ các kết quả thực nghiệm thu được các giá trị $F_{\text{tính}} < F_{\text{bảng}} = 19,00$. Từ kết quả so sánh cho thấy $F_{\text{tính}}$ không đáng tin cậy nên phương sai của phương pháp nghiên cứu và phương sai của phương pháp tiêu chuẩn khác nhau không có ý nghĩa. Nói cách khác, phương pháp nghiên cứu và phương pháp tiêu chuẩn có độ chụm như nhau [11,12].

So sánh từng cặp theo chuẩn Student:

Với độ tin cậy thống kê 95 % thu được các giá trị $t_{\text{tính}} < t_{\text{bảng}} = 4,303$. Điều này chứng tỏ phương pháp nghiên cứu có độ đúng tương đương với phương pháp tiêu chuẩn [11,12].

4. KẾT LUẬN

Phương pháp mới xây dựng để phân tích các amin bị cấm, giải phóng ra từ thuốc nhuộm azo có trong các sản phẩm da và giả da, trên hệ thống HPLC-MS/MS có độ

nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao. Xây dựng quy trình phân tích 18 amin thơm bị cấm, sinh ra từ các thuốc nhuộm azo trên các sản phẩm da và giả da, sử dụng cột C18 với pha động MeOH: H₂O, dung dịch đệm citrat có pH= 6, dung môi chiết được sử dụng là MTBE; Đánh giá xác nhận giá trị của phương pháp phân tích với độ thu hồi của các amin thơm từ 53%-110%. MDL = 0,5 mg/Kg. RSD nằm trong khoảng 4% - 20%. Độ tuyến tính của các amin thơm là 1,0-10 mg/Kg, hệ số tương quan là $R^2 \geq 0,99$; So sánh phương pháp phân tích mới xây dựng với phương pháp tiêu chuẩn TCVN 7536: 2005, (qua phân bố Fisher (F) và phân bố chuẩn Student (t)) cho thấy phương pháp nghiên cứu có độ chụm và độ đúng tương đương với phương pháp tiêu chuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Golka, S. Kopps, Z.W. Myslak. (2004) Carcinogenicity of azo colorants: Influence of solubility and bioavailability. *Toxicology Letter* 151 (203).
- [2] K.T. Chung, Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. C 18 (2000) 51.

- [3] European Commission, Off. J. Eur. Commun. L243 (2002) 15.
- [4] Deutsches Institut für Normung, (1997) DIN 53316 – Nachweis Bestimmer Azofarbstoffe in Leder, Berlin.
- [5] C.S. Eskilsson, R. Davidsson, L. Mathiasson, (2002) Harmful azo colorants in leather. Determination based on their cleavage and extraction of corresponding carcinogenic amines using modern extraction techniques. *J. Chromatogr A* 955 (215).
- [6] Tiêu chuẩn Việt Nam, TCVN 7536: 2005 Da – Phép thử hóa - Xác định thuốc nhuộm azo có trong da.
- [7] International Standard, ISO 17324 – 1:2010. Leather-Chemical test for the determination of certain azo colorants in dyed leathers – Part 1: Determination of certain aromatic amines derived from azo colorants.
- [8] Sutthivaiakit. (2005) LC-MS/MS method for the confirmatory determination of aromatic amines and its application in textile analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 268-276.
- [9] Sarah Kelly Mortensen et al, (2005) Specific determination of 20 primary aromatic amines in aqueous food simulants by liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1091 40 – 50.
- [10] International Standard, ISO 17324 – 2:2011, Leather-Chemical test for the determination of certain azo colorants in dyed leathers – Part 2: Determination of aminoazobenzene.
- [11] Lê Đức Ngọc, (2013) *Thống kê xử lý số liệu trong hoá phân tích*, Đại học Khoa học Tự nhiên.
- [12] Tạ Thị Thảo, *Giáo trình Thống kê trong hoá phân tích*, Đại học Khoa học Tự nhiên.