

**PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÁN PHA RẮN NỀN MẪU (MATRIX
SOLID PHASE DISPERSION - MSPD)
ĐỂ XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT
TRONG TRÀ BẰNG KỸ THUẬT LC-MS**

Đến tòa soạn 9-11-2016

**Nguyễn Tiến Đạt, Nguyễn Thanh Nhân, Dương Văn Đông
Tạ Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Thị Hồng Thắm, Đặng Trung Tín**
Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt

SUMMARY

**DEVELOPMENT OF MATRIX SOLID PHASE DISPERSION (MSPD)
METHOD FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES
IN TEA BY LC-MS**

A matrix solid-phase dispersion (MSPD) method was developed to extract and determine methomyl and imidacloprid in tea products using the mixture of silica gel and zirconia-modified activated charcoal as dispersant sorbent and clean-up sorbent. The best results were obtained using the mixture of $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (13.5:1.5:5.0, v/v/v) as eluting solvent. The procedure has got the best recoveries for two pesticides. Mean recoveries from seven replicates ranged from 87.5% to 103% with relative standard deviation between 4.8% and 10.4%. The method detection limit (MDL) was in 0.013mg/kg and 0.058mg/kg for methomyl and imidacloprid, respectively. The sample preparation time is about 40 min. This method is more environmental-friendly with only 30ml solvent consumption.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản phẩm trà bao gồm trà xanh và trà đen với những đặc tính chống oxy hóa và những ảnh hưởng có lợi cho sức khỏe con người nên đã được tiêu thụ trên khắp thế giới trong nhiều thập kỷ qua. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, để chống lại những yếu tố gây hại

đến sản lượng trà như nấm bệnh, côn trùng và cỏ dại, một lượng lớn hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) đã được sử dụng. Theo tổng hợp của Chi cục BVTV Lâm Đồng, năm 2012, lượng thuốc BVTV sử dụng trên cây chè tại Lâm Đồng khoảng 869.5 tấn; trong đó, có 352.5 tấn thuốc trừ sâu, 423 tấn

thuốc trừ bệnh và 94 tấn thuốc trừ cỏ. Với lượng lớn HCBVTV được sử dụng mà trong những năm gần đây các quốc gia đã thiết lập các mức dư lượng tối đa cho phép (MRLs). Các mức MRLs cũng thay đổi liên tục nhằm tạo ra hàng rào kỹ thuật khắt khe hơn cho sản phẩm trà. Đã có rất nhiều công trình công bố về phương pháp chuẩn bị mẫu cho phân tích dư lượng HCBVTV; các công trình này chủ yếu tập trung vào xử lý nền mẫu, lượng dung môi và kỹ thuật chiết nhằm giải quyết bài toán về thời gian chuẩn bị mẫu. Nổi trội lên vẫn là các phương pháp QuEChERS được giới thiệu vào năm 2003 bởi Anastassiades và các cộng sự. Song song với các phương pháp QuEChERS được sử dụng rộng rãi, một số lớn các phòng thí nghiệm cũng đang cải tiến và đưa vào ứng dụng phương pháp chuẩn bị mẫu bằng kỹ thuật phân tán pha rắn nền mẫu (Matrix Solid Phase Dispersion - MSPD) [1, 2]. Trong công trình này chúng tôi phát triển phương pháp MSPD để ly trích hai loại HCBVTV (methomyl and imidacloprid) có trong mẫu trà với việc sử dụng hỗn hợp silica gel và than hoạt tính có phối trộn thêm zirconi như là chất hấp phụ để phân tán trong nền mẫu và làm sạch dịch trích nhằm loại trừ yếu tố ảnh hưởng của nền mẫu, bao gồm cả việc loại trừ các sắc tố thực vật [3, 4]; Xác định hàm lượng của chúng bằng LC-MS.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, dụng cụ và Hóa chất

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Hệ sắc ký lỏng cao áp gắn khối phổ, LC-MS 2020 của hãng Shimadzu, Nhật Bản. Cột C18 (150mm x 2.1mm), kích thước hạt 5 μ m; cột bảo vệ (40mm x 2.1mm).
- Máy nghiền mẫu bằng inox TS-530 Tiross, Đài Loan. Các cột chiết bằng thủy tinh loại 10ml (9cm x 2cm) và

dụng cụ thủy tinh các loại trong phòng thí nghiệm.

- Máy nước cất hai lần Automatic waterstill của hãng 4 Lab Tech
- Máy lọc nước siêu sạch của hãng ElGa, Vương quốc Anh
- Tủ sấy Memmert của Đức, có dải nhiệt độ 30⁰C – 300⁰C

2.1.2. Hóa chất

- Silica gel 60 của hãng Merck (70 – 230 mesh), Cộng hòa Liên bang Đức,
- Na₂SO₄ tinh khiết phân tích của hãng Merck, được sấy ở 150⁰C qua đêm và bảo quản trong bình hút ẩm.- Than hoạt tính của hãng Merck được điều kiện hóa với dung dịch HCl 3N, đun nóng nhẹ trong 30 phút ở 80⁰C, tiến hành lọc nóng. Phần than sau khi lọc được cho vào cốc chứa dung dịch ZrF₄ 5M; điều chỉnh môi trường của dung dịch tới pH ~ 8 với NH₄OH; đặt cốc trên máy khuấy từ, khuấy liên tục qua đêm. Sau khi lọc, rửa than với nước cất nhiều lần; tiếp tục rửa than bằng cách chiết với acetone. Sau đó, sấy than ở 130⁰C–150⁰C trong vòng 24h. Trước khi tiến hành thí nghiệm than này được phối trộn với silica gel 60 theo tỉ lệ 1: 2 (m/m). Hỗn hợp C-Zr-Si này được sấy ở 130⁰C – 150⁰C trong vòng 24h và được bảo quản trong bình hút ẩm.

- Các chất chuẩn methomyl và imidacloprid được mua từ hãng Fluka, Đức và đều có độ tinh khiết 99.7%. Dung dịch gốc và các dung dịch làm việc được chuẩn bị trong CH₃CN.

- Các hóa chất CH₃CN, CH₃COOC₂H₅, C₆H₅CH₃, HCOOH đều là dạng tinh khiết dùng cho HPLC của hãng Scharlau, Tây Ban Nha.

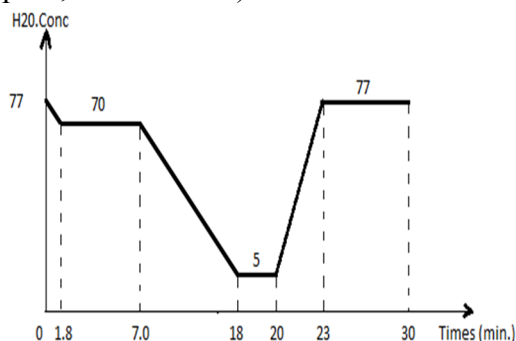
2.2. Ly trích HCBVTV trong nền mẫu trà bằng kỹ thuật MSPD

2.0g mẫu trà đen đã được đồng nhất hóa bằng máy nghiền mẫu, được trộn đều với 0.5g hỗn hợp C-Zr-Si. Sau khi trộn đều, toàn bộ phần mẫu và hỗn hợp C-

Zr-Si được chuyển định lượng vào cột chiết thủy tinh loại 10ml (9cm x 2cm) đã chứa sẵn 1.0g hỗn hợp C-Zr-Si ở cuối cột chiết. Toàn bộ cơ chất nền trong cột chiết được nén lại và phủ lên lớp cơ chất một lớp Na_2SO_4 khan, khoảng 2cm. Dùng 5ml CH_3CN thấm ướt từ từ toàn bộ cơ chất trong cột chiết. Sau đó tiến hành giải hấp dư lượng ra khỏi cột bằng 25ml hỗn hợp dung môi $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (13.5:1.5:5.0, v/v/v). Toàn bộ dịch giải hấp được làm bay hơi đến khô, hòa tan cạn với 2ml CH_3CN , lọc qua syringe màng PTFE 0.22mm. Bơm 5 μl vào thiết bị LC theo chương trình và các thông số hoạt động thiết bị như sau:

+ Tốc độ dòng pha động 0.13ml/phút. Pha động chứa 0.13% $\text{HCOOH}/\text{CH}_3\text{CN}$ (dung môi A); 0.07% $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ (dung môi B); với tỷ lệ các thành phần pha động A : B = 23% : 77% (v/v) và chương trình gradient dung môi như được mô tả ở Hình 1.

+ Đầu dò MS với các thông số Drying gas = 13.6 L/phút, nebulizer gas = 1.5L/phút, nhiệt độ DL = 250 $^\circ\text{C}$, nhiệt độ khối nhiệt (heat block) 200 $^\circ\text{C}$. Nguồn ion hóa ESI (+). Thời gian lưu và mảnh SIM của các hoạt chất khảo sát tương ứng: methomyl (R_t = 4.73 phút; m/z 163 164), imidacloprid (R_t = 5.56 phút; m/z 256 258)



Hình 1. Chương trình gradient dung môi pha động

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của dung môi giải hấp đến hiệu suất thu hồi

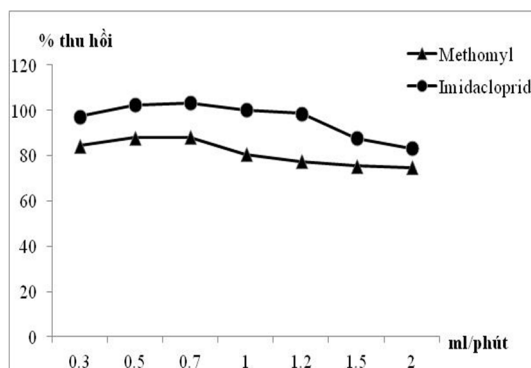
Xét về độ phân cực, methomyl với hệ số octanol/nước ($\log P_{o/w}$ = 0.6) phân cực hơn so với imidacloprid với hệ số octanol/nước ($\log P_{o/w}$ = 0.8). Do đó, để giải hấp methomyl và imidacloprid với hiệu suất cao nhất, mà chỉ tác động đến một phần nhỏ những chất đa lượng khác trong nền mẫu, một dãy các dung môi một cấu tử, hai hoặc ba cấu tử đã được đưa vào khảo sát với các độ phân cực khác nhau. Kết quả trên bảng 1 cho thấy với hệ dung môi có độ phân cực quá cao hoặc quá thấp cũng đều cho kết quả không tốt. Độ phân cực tương đối của hệ dung môi 3 và 5 nằm trong khoảng 4.44 và 4.85, so với hệ dung môi 4 và 7 với độ phân cực tương ứng 4.67 và 4.59. Từ kết quả khảo sát này cho thấy, ngoài yếu tố độ phân cực thì lực giải hấp của dung môi đối với chất hấp phụ cũng đóng vai trò không nhỏ, khi các hệ 3 cấu tử 5, 6 và 7 với độ phân cực tương ứng 4.85; 4.76 và 4.59.

Bảng 1. Ảnh hưởng của dung môi giải hấp imidacloprid và methomyl trên cột đến độ thu hồi

ST T	Hệ dung môi giải hấp	Độ thu hồi (%R)	
		Methomyl	Imidacloprid
1	CH_3CN	15.5	10.2
2	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (7 : 3, v/v)	46.8	28.7
3	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (3 : 2, v/v)	50.4	47.6
4	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (13 : 7, v/v)	73.1	70.5
5	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (13.5 : 1.5 : 5, v/v/v)	52.9	68.8
6	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (13.7 : 0.3 : 6, v/v/v)	80.3	87.2
7	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (12.7 : 0.3 : 7, v/v/v)	87.6	100

3.2. Ảnh hưởng của lưu tốc qua cột đến hiệu suất thu hồi

Cũng như chiết pha rắn, lưu tốc qua cột có ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất thu hồi. Với chiết pha rắn các chất được hấp phụ lên bề mặt của pha rắn. Trong khi đó với MSPD các tương tác diễn ra đa dạng hơn nhiều. Do đó yếu tố lưu tốc rất được quan tâm. Với những tốc độ lớn, cân bằng động giữa các tương tác chưa được thiết lập kịp thời dẫn đến hiệu suất thu hồi không đạt được như mong muốn. Kết quả trên hình 2 cho thấy hiệu suất thu hồi ổn định đạt được trong khoảng giá trị lưu tốc 0.5 – 0.7ml/phút.



Hình 2. Ảnh hưởng của lưu tốc qua cột đến hiệu suất thu hồi

3.3. Ảnh hưởng của tỉ lệ mẫu/chất phân tán (chất hấp phụ) đến hiệu suất thu hồi

Tỉ lệ mẫu/chất phân tán được khảo sát ở 5 mức 1:1; 2:1; 1:2; 3:1; 4:1 (m/m). Việc gia tăng lượng chất hấp phụ làm giảm ảnh hưởng của nền mẫu nhưng không đáng kể, đồng thời cũng làm giảm hiệu suất thu hồi. Kết quả trên Bảng 2 cho thấy hiệu suất thu hồi tốt nhất nhận được với tỉ lệ 4:1 (2g mẫu : 0.5g chất hấp phụ)

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỉ lệ mẫu/chất phân tán đến hiệu suất thu hồi

Hoạt chất	Hiệu suất thu hồi (%R) – lượng mẫu : lượng chất hấp phụ (m/m)				
	1:1	2:1	1:2	3:1	4:1
Methomyl	47.6	60.6	42.8	72.4	88.3
Imidacloprid	52.3	78.7	50.2	84.3	102

3.4. Độ thu hồi, độ lặp lại, độ tái lập và giới hạn phát hiện của phương pháp

Độ thu hồi, độ lặp lại, độ tái lập và giới hạn phát hiện của phương pháp được thực hiện với 7 lần phân tích trên cùng một mẫu trà đen, với một lượng chuẩn cố định được thêm vào mẫu tương ứng với các hoạt chất khảo sát để được hàm lượng methomyl (0.05mg/kg) và imidacloprid (0.12mg/kg). Độ lặp lại và độ tái lập được đánh giá thông qua giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Giới hạn phát hiện của phương pháp được thiết lập trên cơ sở độ lệch chuẩn của 7 lần thí nghiệm lặp lại và giá trị thống kê t_{student} một phía với bậc tự do n-1 và mức ý nghĩa 99% [5]. Kết quả trên Bảng 3 cho thấy phương pháp có độ thu hồi, độ lặp lại và độ tái lập khá tốt khi so sánh với giá trị RSD tính theo hàm Horwitz.

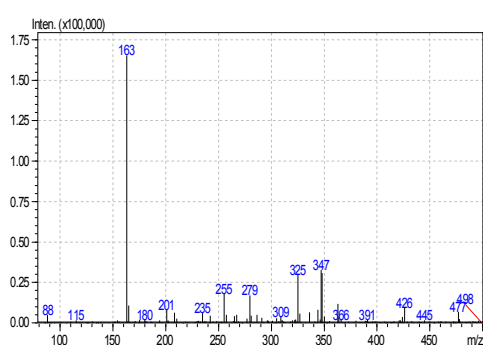
Bảng 3. Kết quả thẩm định phương pháp

Hoạt chất	Độ thu hồi (%R, n=7)	Độ lặp lại (*) %RSD _r	Độ tái lập (**) %RSD _R	Giới hạn phát hiện (MDL, n=7)
Methomyl	87.5	4.8	4.3	0.013
Imidacloprid	103	10.4	10.5	0.058

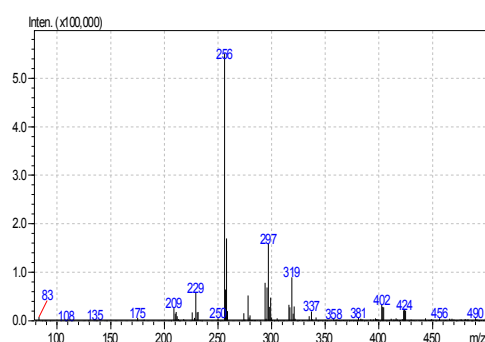
(*) – Repeatability relative standard deviation; (**) – Reproducibility relative standard deviation

Kết quả độ thu hồi của methomyl đạt được ở mức tương đối khá, có lẽ phần nào do một số yếu tố nhiễu trong nền

mẫu vẫn chưa được loại bỏ triệt để gây ra. Có thể thấy phần nào qua yếu tố nhiễu trong phổ SCAN trên Hình 3a với các mảnh m/z 325 và m/z 347. Và cũng chính các yếu tố nhiễu với các mảnh m/z 297 và m/z 319 trên Hình 3b phần nào đã ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi của imidacloprid. Tuy nhiên, theo các tiêu chí đưa ra bởi một số tổ chức trên thế giới về việc thẩm định phương pháp thì các giá trị độ thu hồi này hoàn toàn phù hợp và nằm trong dải độ thu hồi 70 – 120% [6]



Hình 3a. Phổ SCAN của methomyl trong nền mẫu trà chiết bằng phương pháp MSPD



Hình 3b. Phổ SCAN của imidacloprid trong nền mẫu trà chiết bằng phương pháp MSPD

4. KẾT LUẬN

Phương pháp MSPD đã được nghiên cứu, cải tiến để tách các hoạt chất methomyl và imidacloprid trong nền

mẫu trà đen. Sau khi được tách chiết, làm giàu và làm sạch chỉ trong một bước chuẩn bị mẫu, methomyl và imidacloprid đã được xác định bằng kỹ thuật LC-MS. Với lượng mẫu 2g; lượng chất hấp phụ dùng phân tán mẫu là 0.5g và 1.0g sử dụng cho việc làm sạch dịch trích; lượng dung môi tiêu thụ 30ml; thời gian ly trích hoạt chất khoảng 40 phút/mẫu; hiệu suất thu hồi đạt 87,5% đối với methomyl và 103% đối với imidacloprid, kỹ thuật MSPD hoàn toàn đáp ứng yêu cầu tách và xác định methomyl và imidacloprid trong nền mẫu trà đen. Phương pháp này cũng có thể được áp dụng để xác định HCBVTV trên trong các nền mẫu khác như dược liệu, trầm tích, đất,...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bożena Łozowicka, Magdalena Jankowska, Ewa Rutkowska, Izabela Hrynko, Piotr Kaczyn'ski, Jan Micin'ski. (2014) *The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography*. Journal of Natural Medicines, Volume 68, Issue 1, pp 95-111.
2. Jeong-In Hwang, Young-Hwan Jeon, Hyo-Young Kim, Ji-Hwan Kim, Yoon-Jeong Lee, Ju-Young Park, Do-Hoon Kim and Jang-Eok Kim. (2011) *Application of Macroporous Diatomaceous Earth Column for Residue Analysis of Insecticide Endosulfan in Herbal Medicines*. Korean Journal of Environmental Agriculture, Vol. 30, No.1, pp.60-67.