

KHẢO SÁT CÁC DUNG MÔI CHIẾT NHẪM TĂNG KHẢ NĂNG THU HỒI VÀ RỬA GIẢI THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT CƠ PHỐT PHO ĐỂ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TRONG RAU QUẢ

Đến tòa soạn 24 -05 - 2022

Phạm Ngọc Thuật

Viện Công nghệ, Tổng cục Công nghiệp Quốc phòng

Email: thuatpn@gmail.com

SUMMARY

INVESTIGATION OF EXTRACTION SOLVENTS TO INCREASE THE RECOVERY AND ELUTION OF PHOSPHORUS BASED PESTICIDES TO DETERMINE RESIDUES IN FRUITS AND VEGETABLES

A simple and rapid method for the simultaneous determination of organophosphorus pesticide residues (Thionazine, Sulfotep, Phorate, Disulfoton, Methyl parathion and Parathion) in fruits and vegetables was established based on solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. Pesticide residues are extracted with acetone. The extract was purified by solid phase extraction (SPE) using a C18 column and a hexane:acetone solvent system (5:1). The analytical recovery of organophosphorus pesticides simultaneously determined by gas chromatography mass spectrometry was in the range of 72% to 94% with an RSD <5%.

Keyword: solid phase extraction (SPE), organophosphorus pesticide, gas chromatography, mass spectrometry

1. MỞ ĐẦU

Trong sản xuất nông nghiệp nói chung và trồng rau quả nói riêng, việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) để bảo vệ cây trồng, chống lại sâu hại bảo vệ mùa màng là cần thiết. Tuy nhiên, trên thực tế vì nhiều lý do khác nhau mà tình trạng lạm dụng thuốc BVTV trong sản xuất rau gây ô nhiễm dư lượng thuốc BVTV đang diễn ra khá phổ biến. Đặc biệt dư lượng thuốc BVTV trên nông sản vượt quá tiêu chuẩn quy định đã và sẽ gây ra những hậu quả nghiêm trọng cho sức khỏe của người tiêu dùng. Hiện nay việc phân tích các thuốc BVTV còn gặp nhiều khó khăn do hạn chế về trang thiết bị phân tích, quy trình phân tích, nhất là phân tích rau quả có chứa nhiều hoạt chất bảo vệ thực vật bởi thực tế các loại thuốc BVTV thường chứa nhiều loại hoạt

chất khác nhau, đặc biệt nhiều loại thuốc không có nguồn gốc xuất xứ rõ ràng nên có thể có chứa cả các hoạt chất có độc tính rất cao không nằm trong danh mục cho phép sử dụng ở Việt Nam. Trong danh mục các hoạt chất BVTV sử dụng ở Việt Nam các chất thuộc nhóm photpho hữu cơ được dùng phổ biến vì các chất này có phổ tác động rộng và thời gian bán phân hủy trong môi trường nhanh [1, 3, 4, 5]. Phương pháp thường sử dụng để xác định các thuốc BVTV cơ photpho là sắc ký khí (GC) ghép nối detector cộng kết điện tử (ECD) hoặc ghép nối khối phổ (MS) [4, 6, 8, 11, 13]. Hiện nay, có rất nhiều phương pháp chiết tách như chiết thông thường (chiết lỏng - lỏng, chiết Soxhlet), chiết pha rắn (SPE) và vi chiết pha rắn (SPME); mỗi phương pháp đều có ưu nhược điểm khác nhau, nhưng

phương pháp chiết pha rắn (SPE) kết hợp với một số dung môi để làm sạch được sử dụng rộng rãi [4, 6, 9, 11, 12, 13]. Trong nghiên cứu này, phương pháp GC/MS kết hợp với xử lý mẫu bằng phương pháp chiết pha rắn với cột C18 sử dụng dung môi n-hexan:acetone (5:1) rửa giải để xác định đồng thời 6 hợp chất Thionazin, Sulfotep, Phorate, Disulfoton, Methyl parathion, Parathion. Các thuốc BVTV cơ photpho này được lựa chọn để nghiên cứu nhằm góp phần xây dựng quy trình phân tích được đồng thời một số loại các thuốc BVTV trong một số loại rau quả, từ đó bước đầu áp dụng quy trình để phân tích xác định và đánh giá mức độ ô nhiễm các hoạt chất nghiên cứu trên một số loại rau quả trên thị trường Hà Nội.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hoá chất

Chuẩn OPs gồm: Thionazin, Sulfotep, Phorate, Disulfoton, Methyl parathion, Parathion của hãng Dr. Ehrenstorfer GmbH, Đức.

Các loại hóa chất và thuốc thử loại tinh khiết của hãng Meck: Methanol, n-hexan, Diclofometan, Ete dầu hỏa, Toluene, Na₂SO₄ khan, NaCl.

2.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký khí GC 6790 Plus với cột tách Agilent DB-5ms Ultra Inert GC Column 15 mm x 0,25 mm x 0,25 µm và detector MS 5973N Agilent.

Máy lắc vortex; Máy đồng nhất mẫu Ultra Turax T25; Máy li tâm Hettich; Máy cắt quay chân không Buchi; Bộ chiết pha rắn.

2.3. Chương trình làm việc của thiết bị sắc ký và detector khối phổ

2.3.1. Thiết bị sắc ký GC 6790 Plus

Chương trình nhiệt độ cột tách: nhiệt độ ban đầu 70 °C giữ trong 2 phút, nâng lên 150 °C với tốc độ gia nhiệt 25 °C/phút, tiếp tục nâng lên 250 °C với tốc độ gia nhiệt 5 °C/phút giữ trong 5 phút. Nhiệt độ injector: 250 °C. Nhiệt độ detector: 200 °C. Thể tích bơm mẫu 2 µl, bơm ở chế độ không chia dòng.

2.3.2. Khối phổ MSD 5973N

Nhiệt độ nguồn ion 230 °C; Năng lượng ion hóa Ei 70 eV; Detector gain 1,2 kV; Thời gian ngắt dung môi 7 phút; Chế độ TIC: quét các ion trong khoảng m/z: 50 đến 550 amu; Chế độ SIM hoặc SCAN. Nhiệt độ kết nối (interface): 250 °C

2.4. Quy trình xử lý mẫu

Cân 10 g mẫu chính xác tới 0,1 mg cho vào ống ly tâm. Cho vào 40 ml acetone, đồng nhất bằng thiết bị Ultra-Turrax với tốc độ 13 500 vòng/phút trong 3 phút. Thêm lần lượt 20 ml petroleum ether, 20 ml dichlorometane và thêm khoảng 10 g natri sulphat khan để loại nước, đồng nhất 1 phút, ly tâm 30 phút ở tốc độ 5 000 vòng/phút ta thu được dịch chiết. Làm sạch dịch chiết bằng phương pháp chiết pha rắn với cột C18: đổ 10 ml dung môi n-hexan cho chảy qua cột với tốc độ 1 ml/phút. Chuyển 8 ml dịch chiết trên cho vào cột đã hoạt hóa. Để dịch chảy tự nhiên, sau đó dùng 10 ml hỗn hợp dung môi n-hexan:acetone (5:1) để rửa giải (chia làm 2 lần). Thu hồi dịch rửa giải, làm bay hơi dưới luồng khí nitơ ở nhiệt độ 30 °C tới cạn. Hòa tan cặn trong 1 ml n-hexan rồi đem phân tích bằng GC/MS.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

Từ dung dịch chuẩn gốc pha một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ từ 50 ppb đến 1 500 ppb từ dung dịch chuẩn gốc 100 ppm và chuẩn trung gian 10 ppm. Các dung dịch chuẩn được pha trong n-hexan. Tiến hành xử lý mẫu và phân tích theo đúng quy trình, mỗi điểm lặp lại thí nghiệm 3 lần lấy giá trị trung bình. Trong khoảng nồng độ của các chất từ 50 ppb đến 1 000 ppb thì mối quan hệ giữa diện tích pic và nồng độ các chất OPs là tuyến tính tốt.

Giá trị LOD và LOQ của quy trình được tính theo phương trình hồi quy đường chuẩn và phương pháp loãng mẫu đều cho giá trị tương đương nhau. Giá trị LOD được tính khi S/N = 3

và LOQ = 3,3 LOD. Giá trị LOD và LOQ của phương pháp được chỉ ra ở bảng 1.

3.2. Khảo sát độ lặp lại

Để đánh giá độ lặp lại của quy trình, tiến hành khảo sát độ lặp lại ở 3 nồng độ trong khoảng tuyến tính là: 50 ppb, 500 ppb và 1 000 ppb. Thực nghiệm cũng cho thấy khi bơm lặp lại 5 lần tại nồng độ 50 ppb, 500 ppb và 1 000 ppb theo các điều kiện tối ưu tìm được thì thiết bị có độ ổn định cao với RSD < 6 %.

3.3. Khảo sát quá trình chiết

3.3.1. Khảo sát chọn dung môi chiết

Để tách chiết các chất phân tích nhóm photpho hữu cơ ra khỏi nền mẫu, phương pháp này chọn hai loại dung môi là acetone và acetonitril (ACN) để khảo sát theo các điều kiện để lấy chất phân tích. Kết quả hai loại dung môi chiết là acetone và acetonitril đều cho hiệu suất chiết gần như tương đương nhau, nhưng dung môi acetonitril rất độc đối với sức khỏe con người và có giá thành rất cao. Do đó, chúng tôi chọn dung môi acetone làm dung môi chiết cho nghiên cứu này.

Bảng 1. Giá trị LOD và LOQ của phương pháp

Chất phân tích	Phương trình hồi quy $y = a + bx$	Hệ số góc (b)	Độ lệch chuẩn (S_y)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Thionazin	$y = 2368,73x - 135661$	2368,73	8072,04	10,22	34,08
Sulfotep	$y = 2635,89x - 124252$	2635,89	8592,09	9,78	32,60
Phorate	$y = 3596,39 - 204410$	3596,39	12109,48	10,10	33,67
Disulfoton	$y = 2443,31x - 121789$	2443,31	8449,19	10,37	34,58
Methyl parathion	$y = 1075,87x - 9082$	1075,87	7570,89	21,11	70,37
Parathion	$y = 1133,54x - 56168$	1133,54	7522,04	19,91	66,36

Bảng 2. Hiệu suất thu hồi của các chất phân tích 200 ppb khi chiết bằng acetone và acetonitril
($n = 3$)

Dung môi	Thionazin	Sulfotep	Phorate	Disulfoton	Methyl parathion	Parathion	
Acetone	303752	310287	363472	277985	136427	93189	Diện tích pic
	178,23	174,18	169,87	170,03	166,67	172,38	Nồng độ thu được
	89,11	87,09	84,93	85,01	83,33	86,19	R(%)
	3,72	5,01	3,66	6,01	3,53	7,28	% RSD
ACN	301012	316723	376102	312505	195868	141921	Diện tích pic
	168,88	164,75	174,01	180,21	176,05	160,86	Nồng độ thu được
	84,44	82,37	87,01	90,10	88,02	80,43	R(%)
	6,57	4,61	3,72	4,19	4,83	6,27	% RSD

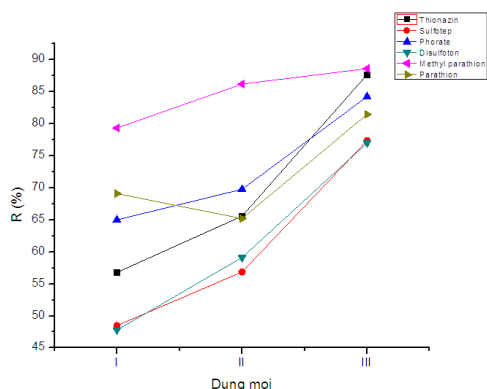
3.3.2. Khảo sát dung môi rửa giải

Để khảo sát chúng tôi sử dụng phương pháp chiết pha rắn với cột C18 để làm sạch mẫu và được rửa giải bằng các hỗn hợp dung môi khác nhau:

- Loại I: hexan:petroleum ete (1:1)
- Loại II: acetone:petroleum ete (1:1)
- Loại III: hexan:acetone (5:1)

Bảng 3. Kết quả khảo sát loại dung môi rửa giải đối với các chất phân tích

Dung môi	Thionazin	Sulfotep	Phorate	Disulfoton	Methyl parathion	Parathion	
Aceton :Petroleum ether (1:1) Loại I	134037	140850	229209	140873	89272	62769	Diện tích pic
	113,57	96,97	129,99	95,59	158,69	138,22	Nồng độ thu được
	56,79	48,49	65,00	47,80	79,35	69,11	R(%)
	2,32	3,01	3,67	4,12	3,88	5,06	% RSD
Hexan: Petroleum ether (1:1) Loại II	177805	196093	263312	202145	106930	77376	Diện tích pic
	131,15	113,72	139,55	118,23	172,41	130,39	Nồng độ thu được
	65,58	56,86	69,78	59,12	86,21	65,20	R(%)
	3,28	2,77	5,04	3,32	4,11	4,25	% RSD
Hexan :Aceton (5:1) Loại III	304679	304744	366920	278383	134070	92633	Diện tích pic
	175,34	164,75	168,49	154,01	177,25	162,98	Nồng độ thu được
	87,67	82,37	84,24	79,75	85,62	81,49	R(%)
	3,42	4,16	3,79	3,06	4,55	3,28	% RSD



Hình 1. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc hiệu suất thu hồi chất phân tích vào các loại dung môi rửa giải

3.3.3. Khảo sát thể tích dung môi rửa giải

Các hợp chất thuốc trừ sâu nhóm photpho hữu cơ được chiết ra khỏi mẫu bằng acetone theo mục 3.1.1 được làm sạch bằng cách cho qua cột C18 và dùng hỗn hợp dung môi hexan:acetone (5:1). Chúng tôi tiến hành khảo sát thể tích dung môi rửa giải với nồng độ của các chất phân tích là 1 000 ppb. Kết quả chỉ ra ở bảng 3.

Bảng 4. Hiệu suất rửa giải từng phân đoạn với hỗn hợp chuẩn OPs 1 000 ppb

V rửa giải \ Hoạt chất	Phân đoạn 1 5 ml, (%)	Phân đoạn 2 5 ml (%)	Phân đoạn 3 5 ml (%)	Tổng (%)
Thionazin	77,2	15,5	0	92,7
Sulfotep	74,3	17,1	0	91,4
Phorate	82,8	11,9	0	94,7
Disulfoton	82,6	8,1	0	90,7
Methyl parathion	85,7	5,6	0	91,3
Parathion	79,9	13,7	0	93,6

3.2. Đánh giá độ chính xác của phương pháp

Chúng tôi tiến hành phân tích trên hai nền mẫu rau cải và cà chua, sử dụng phương pháp thêm chuẩn. Tại mỗi mức thêm chuẩn mức 0,05 mg/kg nằm trong khoảng theo MRLs của Nhật Bản và EU, làm lặp 5 mẫu, tính hiệu suất thu hồi và độ lệch chuẩn lặp lại, độ chụm của phương pháp phân tích. Hiệu suất thu hồi của phương pháp nằm trong khoảng 72% đến 94% với RSD <5%.

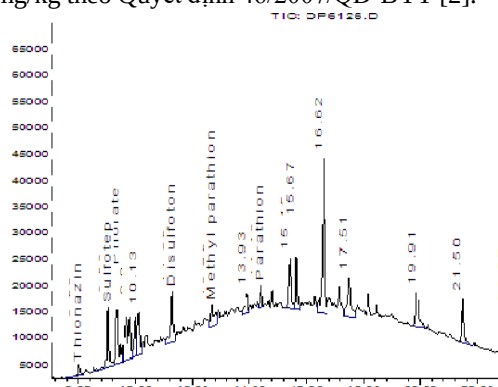
Bảng 5. Hiệu suất thu hồi và RSD của các chất phân tích với các mẫu thêm chuẩn 0,05 mg/kg

Hoạt chất	Cải ngọt		Cà chua	
	R, %	RSD, %	R, %	RSD, %
Thionazin	72	2,8	89	3,3
Sulfotep	85	3,4	94	1,2
Phorate	88	2,3	79	4,1
Disulfoton	86	4,1	85	3,6
Methyl parathion	81	1,9	91	2,4
Parathion	90	2,6	87	2,8

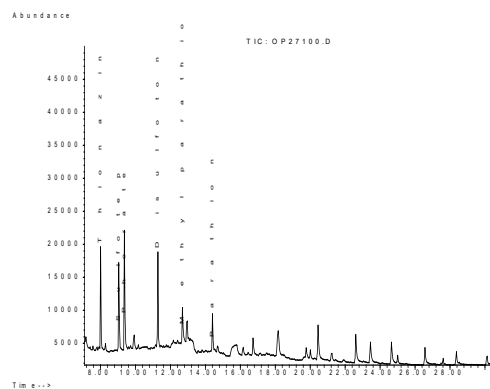
3.3. Phân tích mẫu thực tế

Sau khi nghiên cứu các điều kiện tách chiết các hợp chất nhóm photpho hữu cơ, chúng tôi tiến hành phân tích một số mẫu thực. Đối tượng mẫu là một số loại rau quả sau: dưa leo, táo đỏ, nho, cải xanh, bắp cải. Các mẫu rau và quả trước khi đem phân tích cần phải xử lý sơ bộ. Các mẫu được xác định trực tiếp và thêm chuẩn, mỗi mẫu được làm lặp lại 3 lần, kết quả chỉ ra ở bảng 6.

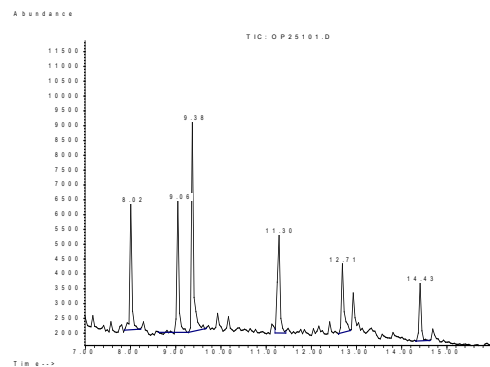
Từ kết quả phân tích thu được trên các mẫu rau quả ngoài thị trường ta thấy vẫn xuất hiện dư lượng thuốc BTVT trên mẫu cải xanh trong đó dư lượng chất Methyl parathion tương đối lớn nhưng vẫn nhỏ hơn giới hạn cho phép (MRL) 0,2 mg/kg theo Quyết định 46/2007/QĐ-BYT [2].



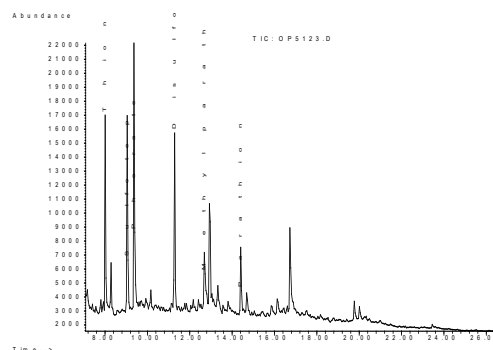
Hình 2. Sắc ký đồ của mẫu rau cải xanh thêm chuẩn 200 µg/kg



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu dưa leo thêm chuẩn 200 µg/kg



Hình 4. Sắc ký đồ của mẫu rau bắp cải thêm chuẩn 200 µg/kg



Hình 5. Sắc ký đồ của mẫu nho đỏ Mỹ thêm chuẩn 200 µg/kg

Bảng 6. Kết quả phân tích các mẫu rau, quả

Loại rau, loại thuốc	Dư lượng (mg/kg)	Dư lượng cho phép của FAO/WHO (mg/kg)	Loại rau, loại thuốc	Dư lượng (mg/kg)	Dư lượng cho phép của FAO/WHO (mg/kg)
1. Cải xanh			3. Dưa leo		
Thiazinon	0,031	0,5	Thiazinon	-	0,5
Sulfotep	-	0,5	Sulfotep	-	0,5
Phorate	0,044	0,5	Phorate	-	0,5
Disulfoton	0,046	0,5	Disulfoton	-	0,5
Methyl parathion	0,102	0,2	Methyl parathion	-	0,2
Parathion	-	0,2	Parathion	-	0,2
2. Bắp cải			4. Nho đỏ (Mỹ)		
Thiazinon	-	0,5	Thiazinon	-	
Sulfotep	-	0,5	Sulfotep	-	0,5
Phorate	-	0,5	Phorate	-	0,5
Disulfoton	-	0,5	Disulfoton	-	0,5
Methyl parathion	-	0,2	Methyl Parathion	-	0,5
Parathion	-	0,2	Parathion	-	0,2
					0,2

(-): Không xác định thấy

4. KẾT LUẬN

Phương pháp sắc ký khí khối phổ kết hợp với kỹ thuật chiết pha rắn rất thích hợp để xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật nhóm cơ photpho hữu cơ trong một số loại rau quả. Phương pháp này đã nghiên cứu và tối ưu hóa được các điều kiện chạy sắc ký khí khối phổ, đánh giá được khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các loại thuốc trừ sâu nhóm photpho hữu cơ. Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp nằm trong khoảng 72% đến 94% với %RSD <5%. Nghiên cứu và đưa ra điều kiện tối ưu để chiết tách và làm sạch các hợp chất cơ photpho trong một số loại rau quả. Tiến hành phân tích trên 04 mẫu rau quả và phát hiện mẫu rau cải xanh có chứa dư lượng Methyl parathion (Vofatox) 0,102 mg/kg nhưng vẫn dưới mức hàm lượng tối đa cho phép của WHO/FAO.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và phát triển Nông thôn (2010), Quyết định số 23/2007/QĐ-BNN của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và phát triển Nông thôn về việc ban hành danh mục thuốc BVTV sử dụng trong nông nghiệp, Hà Nội.
2. Bộ Y tế (2007), Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19 tháng 12 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế về Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm.
3. Cục Bảo vệ thực vật, phòng quản lý thuốc (1998), Tình hình sử dụng thuốc BVTV ở Việt Nam và tồn dư thuốc BVTV trong đất, nước, nông sản, Hội thảo quản lý thuốc BVTV - Dự án SEMA, Hà Nội.
4. Bùi Sỹ Doanh (2001), Nghiên cứu phân tích, đánh giá dư lượng thuốc trừ sâu Cypermethin đối với rau, quả, đất và nước, Luận án tiến sĩ hóa

học, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐH Quốc gia Hà Nội.

5. Đỗ Hàm (2007), Hóa chất dùng trong nông nghiệp và sức khỏe cộng đồng, NXB Lao động và Xã hội, Hà Nội.

6. Trần Việt Hùng (2006), Khảo sát và nghiên cứu phân tích dư lượng một số hóa chất bảo vệ thực vật trong dược liệu, Luận án tiến sĩ dược học, Trường ĐH Dược Hà Nội.

7. Lê Quang Hường, Trần Hải Anh, Vũ Đức Nam, Nguyễn Quang Trung, Phạm Thị Ngọc Mai (2019), Dùng các phương pháp thống kê vào tối ưu điều kiện phân tích hóa chất bảo vệ thực vật cơ clo trên thiết bị sắc ký khí ghép nối khối phổ (GC-MS), Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, Tập 24, Số 4A, tr. 76-80.

8. Lê Quang Hường, Phạm Thị Phương Thảo, Vũ Đức Nam, Nguyễn Quang Trung, Nguyễn Thị Ánh Hường, Phạm Thị Ngọc Mai (2018), Phân tích dư lượng thuốc trừ sâu cơ clo (OCPs) trong chè bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ GC/MS, Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, Tập 23, Số 5, tr. 102-106.

9. Alvin Chai Lian Kuat and Lau Seng (2004), Solid - phase extraction cleanup method for the determination of organophosphorous pesticides in vegetables, Malaysian Journal of Chemistry, Vol 6, No.1, pp. 28-38.

10. Ameerli Adeali (2006), Risk management and occupational safety and health practices in Singapore, The 22st annual conference of the Pacific Occupational Safety and Health Organization, Bangkok, Thailand pp. B127-32.

11. Chu X.G, Hu X.Z, Yao H.Y (2005), Determination of 266 pesticides residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography - mass selective detection, Journal of Chromatography A 1055: 98-114.

12. Ligang Wang, Yongchao Liang, Xin Jiang (2008), Analysis of eight organophosphorus in fresh vegetables retailed in agricultural product markets of Nanjing, China, Bull Environ Contam Toxicol 81, pp. 377-382.

13. Masuru Kawasaki, Tsuyoshi Inoue, Katsuharu Fukuhara, Sadao Uchiyama (1999), Study on GC/MS (SIM) for determination of carbamate and organonitrogen pesticides in foods with simple clean-up by SPE method, J. Japan, Vol 4, No.5.

** Tác giả liên hệ:* Phạm Ngọc Thuật

Viện Công nghệ, Tổng cục Công nghiệp Quốc phòng
Phố Văn Hội, P. Đức Thắng, Q. Bắc Từ Liêm,
TP. Hà Nội.

Email: thuapn@gmail.vn;

Điện thoại: 0904.481.980