

XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG METHYL PARATHION VÀ METHIDATHION TRONG MẪU TRÀ HOA VÀNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾT QuEChERS KẾT HỢP SẮC KÝ KHÍ-KHỐI PHỔ

Đến tòa soạn 05-03-2021

Đỗ Anh Tuấn, Vũ Đình Hoàng, Trần Thu Quỳnh, Nguyễn Xuân Trường Viện Kỹ thuật Hóa học
Trường đại học Bách Khoa Hà Nội

SUMMARY

DETERMINATION OF METHYL PARATHION AND METHIDATHION RESIDUES IN GOLDEN CAMELLIA FRESH-LEAVES BY A CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROSCOPY COUPLED QuEChERS EXTRACTION METHOD

In this work, a gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) coupled QuEChERS extraction method has been introduced for the determination of methyl parathion and methidathion in the Golden Camellia fresh-leaves. The target analytes were isolated from real matrix by using QuEChERS technique. The extracted supernatants were analyzed on GC-MS system with an Agilent DB-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) at an optimized temperature program and helium gas. The method detection limits (MDL) are of 20 and 17 ng/g for methyl parathion and methidathion, respectively. The method quantitation limits (MQL) are of 67 and 57 ng/g for methyl parathion and methidathion, respectively. Other important parameters of the analytical method were also validated and presented. The method was applied for quantitation of methyl parathion and methidathion in several Golden Camellia samples collected from the local markets in Hanoi.

Keywords: Methyl parathion, methidathion, GC-MS, QuEChERS, Golden Camellia.

1. MỞ ĐẦU

Chè hoa vàng, trà hoa vàng hay còn gọi là kim hoa trà (danh pháp: *Camellia chrysantha*) là một loài thực vật hạt kín trong họ Theaceae, được tìm thấy ở Trung Quốc và Việt Nam. Trà hoa vàng là loài cây quý hiếm, có nhiều giá trị sử dụng như để lấy gỗ, có thể làm cây trồng tầng dưới ở các đai rừng phòng hộ, trồng làm cây cảnh và dược liệu, có tác dụng phòng và chống các bệnh huyết áp, tim mạch, tiểu đường, u bướu [1]. Thành phần hóa học trong trà hoa vàng hiện vẫn đang được nhiều chuyên gia nghiên cứu để phân lập các chất có hoạt tính hữu ích. Một số nghiên cứu về thành phần hóa học của lá và nụ hoa cây trà hoa vàng cho kết quả rất khả quan với việc tìm thấy một loạt

các hợp chất có hoạt tính sinh học. Một flavonoid mới, sexangularetin 3-O-(2''-O-(E)-p-Coumaroyl-β-d-Glucopyranoside), cùng với 9 hợp chất flavonoid đã biết, đã được phân lập từ hoa của cây trà hoa vàng [2]. Để đảm bảo năng suất cây trồng, hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) đã được sử dụng lâu nay. Tuy nhiên, do việc sử dụng không đúng cách và quá lạm dụng vào thuốc, chúng lại gây ra tác động tiêu cực đến sức khỏe người tiêu dùng, đặc biệt nếu có tồn dư trong dược liệu.

Methyl parathion và methidathion là hai trong số các HCBVTV điển hình thuộc nhóm phosphor hữu cơ (OP), chúng là các chất độc đối với hệ thần kinh của côn trùng, động vật và người. OP nhanh chóng bị phân hủy bởi phản

ứng thủy phân dưới ánh sáng, trong không khí và trong đất trồng. Các OP được sử dụng phổ biến ở Việt Nam, trong đó methyl parathion (wophatox) tuy đã bị cấm [3] nhưng theo một số điều tra cho thấy nó vẫn được sử dụng trái phép [4,5]. Việc xác định mức dư lượng HCBVTV trong dược liệu và các sản phẩm từ dược liệu có ý nghĩa quan trọng để sàng lọc, loại bỏ các sản phẩm không đáp ứng được sự an toàn cho người sử dụng. Ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu xác định dư lượng HCBVTV thường dùng trong dược liệu tại một số địa phương [6-10].

Trong nghiên cứu này, phương pháp chiết QuEChERS kết hợp GC-MS sẽ được áp dụng để xác định dư lượng methyl parathion (MP) và methidathion (MD) trong mẫu lá cây trà hoa vàng. Quy trình chiết QuEChERS có nhiều ưu điểm nổi trội dựa trên nguyên tắc chiết một lần bằng dung môi acetonitril, tách nước bằng phân bố lỏng-lỏng bởi muối $MgSO_4$, làm sạch bằng chiết phân tán pha rắn (loại các axit hữu cơ, nước còn dư và các thành phần khác) nhờ phối hợp chất hấp phụ anion yếu PSA (primary-secondary amine) và $MgSO_4$ cũng như loại bỏ chlorophyll bằng than đen hoạt tính. Dịch chiết được tách và phân tích bằng sắc ký khí - khối phổ [10-12].

Bảng 1. Đặc điểm của HCBVTV nghiên cứu

Chất phân tích	Nhóm cấu trúc	Công thức phân tử	Phân tử khối	Điểm chảy
Methyl parathion	Phospho hữu cơ	$C_8H_{10}NO_5PS$	263,2	37 °C
Methidathion	Phospho hữu cơ	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	302,3	39 °C

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Chất chuẩn và hóa chất

Chất chuẩn methyl parathion (MP) 1000 $\mu g/mL$, methidathion (MD) 1000 $\mu g/mL$ với độ tinh khiết >99,3% của hãng Prolabo, Pháp. Dung môi acetonitrile (ACN) với độ tinh khiết sắc ký của hãng Fisher Scientific, Mỹ. Các hóa chất khác gồm $MgSO_4$ khan >97% (Sigma-Aldrich), primary-secondary amine (PSA) (Agilent 5982-5753), KCl (TQ), than đen hoạt tính (GCB) (TQ).

2.2. Chuẩn bị mẫu

Các mẫu trà hoa vàng được thu mua từ 3 chợ dược liệu trên thị trường Hà Nội. Mẫu lá trà tươi ngắt từ các cây trà hoa vàng, được đồng nhất bằng máy xay và mã hóa.

Chiết QuEChERS: cân chính xác khoảng 1 g mẫu lá trà tươi đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 10 mL dung môi acetonitrile vào mẫu thử và lắc trộn đều. Tiếp tục, thêm hỗn hợp muối chiết đã chuẩn bị sẵn (hỗn hợp gồm 1 g muối $MgSO_4$ khan và 0,25 g muối KCl), lắc trộn đều hỗn hợp sau đó đem ly tâm 4000 rpm trong 5 phút.

Thu toàn bộ dịch chiết vào ống ly tâm 15 mL, thêm vào đó hỗn hợp làm sạch (gồm 0,05 g PSA và 0,15 g $MgSO_4$). Sau đó, lắc trộn đều hỗn hợp và đem ly tâm 4000 rpm trong 5 phút. Thu toàn bộ dịch nổi vào cốc, thêm vào đó 0,25 g GCB, lắc đều và để lắng. Lọc mẫu qua đầu lọc 0,45 μm , cô đuổi dung môi về chính xác 1 mL. Các điều kiện phân tích MP và MD bằng GC-MS được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Các điều kiện phân tích MP và MD bằng GC-MS

Điều kiện	Thông số
Khí mang	Heli
Tốc độ khí mang	1 mL/phút
Thể tích bơm mẫu	1 μL
Cột tách	DB-5MS, 30 m $\times$ 0,25 mm id $\times$ 0,25 μm
Chương trình nhiệt độ cột tách	Bắt đầu từ 80°C, tăng lên 200°C (tốc độ 40°C/phút), tăng tiếp đến 260 °C (tốc độ 5°C/phút) và sau cùng tăng đến 280 °C (tốc độ 20°C/phút, giữ 1 phút).
Nhiệt độ cổng bơm mẫu	270°C
Nhiệt độ ống chuyển	250°C
Nhiệt độ nguồn ion hóa	230°C
Năng lượng ion hóa	70eV
Chế độ đo	SIM

2.3. Thiết bị

Hệ thống sắc ký khí-khối phổ GC-MS của hãng Agilent Technology gồm GC system 7890B, Detector MSD 5977B và Auto Sampler 7693.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

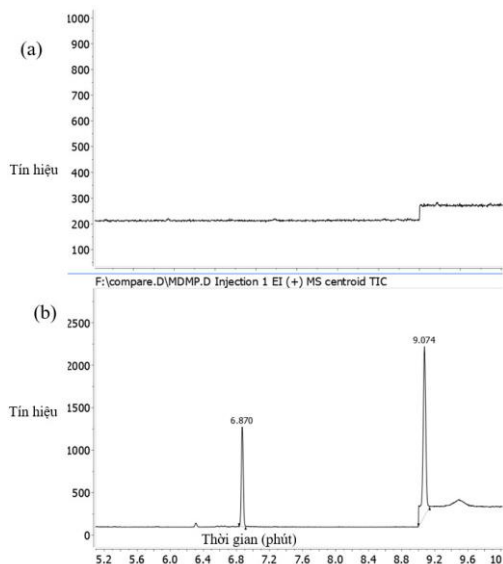
3.1. Đánh giá phương pháp phân tích

3.1.1. Tính đặc hiệu

Sắc ký đồ của chuẩn hỗn hợp MP và MD trong điều kiện phân tích tối ưu như ở Bảng 1 và 2 được chỉ ra ở Hình 1. Kết quả cho thấy các pic của MP và MD cân đối với thời gian lưu lần lượt là 6,88 và 9,08 phút. Sắc ký đồ của mẫu trà hoa vàng trắng (mẫu được chuẩn bị như ở mục 2.2) không xuất hiện pic của MP và MD tại các vị trí tương ứng. Điều này minh chứng rằng phương pháp phân tích có tính đặc hiệu cao. Do đó, mẫu được liệu trắng thêm chuẩn hỗn hợp chất phân tích được sử dụng trong các nghiên cứu đánh giá phương pháp phân tích tiếp theo.

Bảng 3. Các mảnh ion ghi phổ GC-MS (SIM) và thời gian lưu của MP và MD

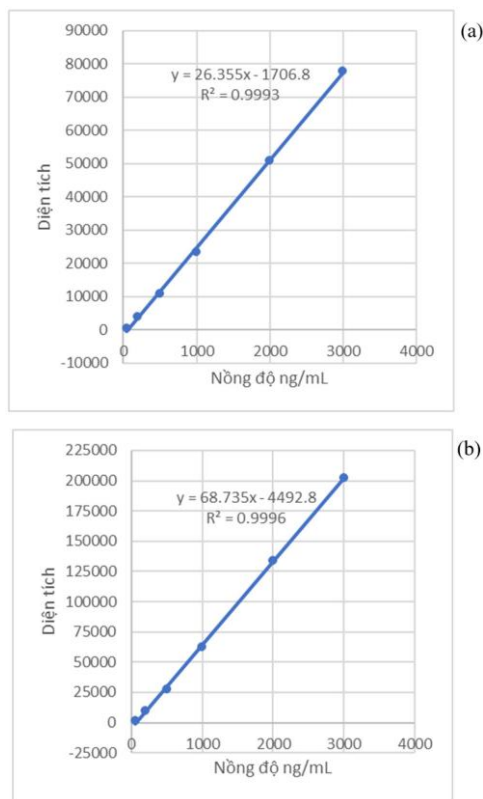
Chất phân tích	m/z	Thời gian lưu (phút)
MP	63 (41,4%); 125 (81,9%); 137 (4,8%); 263 (57,6%)	6,88
MD	85 (100%); 93 (30,5%); 145 (87,2%)	9,08



Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu được liệu trắng (a); chuẩn hỗn hợp MP và MD nồng độ 200 ng/mL (b)

3.1.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Đường chuẩn xác định MP và MD được xây dựa trên diện tích pic thu được ứng với các giá trị nồng độ chuẩn khác nhau (50, 200, 500, 1000, 2000 và 3000 ng/mL) được biểu diễn ở Hình 2. Kết quả cho thấy, hệ số tương quan tuyến tính (R^2) của các phương trình đường chuẩn (Bảng 4) đều đạt 0,999, như vậy có sự tương quan rất tốt giữa nồng độ chất phân tích và tín hiệu đo.



Hình 2. Đường chuẩn xác định MP (a) và MD (b)

Bảng 4. Kết quả đánh giá phương pháp xác định MP và MD

Chất phân tích	MP	MD
Phương trình hồi quy	$Y = 26,355X - 1706,8$	$Y = 68,735X - 4492,8$
Hệ số tương quan	$R^2 = 0,9993$	$R^2 = 0,9996$
MDL (ng/g)	20	17
MQL (ng/g)	67	57

3.1.3. Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp

Giới hạn phát hiện (LOD) của thiết bị với MP và MD được xác định theo tỷ lệ tín hiệu/nhiều

(S/N = 3) [4] của dung dịch mẫu trắng thêm chuẩn nồng độ 50 ng/mL. Giới hạn định lượng của thiết bị: LOQ = 3×LOD [12,13]. Từ các giá trị LOD và LOQ sẽ xác định được các giá trị MDL và MQL của phương pháp phân tích dựa trên khối lượng mẫu trà tươi (m = 1 g), thể tích dịch chiết cuối trước khi bơm mẫu (V = 1 mL). Bảng 4 chỉ ra các giá trị MDL và MQL. Giới hạn phát hiện MP và MD lần lượt là 20 và 17 ng/g. Giới hạn định lượng MP và MD tương ứng là 67 và 57 ng/g.

3.1.3. Độ lặp lại và độ đúng

Độ lặp lại của phương pháp phân tích được xác định bằng cách đo lặp 6 lần mẫu trắng thêm chuẩn hỗn hợp MP và MD tại các điểm nồng độ thấp (50 ppb), trung bình (1000 ppb) và cao

(3000 ppb) tương ứng. Kết quả ở Bảng 5 cho thấy, các điểm nồng độ đánh giá đều có độ lặp lại cao RSD < 7% (n=6) [12,13].

Độ đúng của phương pháp phân tích được đánh giá bằng cách xác định hiệu suất thu hồi của mẫu trắng thêm chuẩn hỗn hợp MP và MD, tại 3 điểm nồng độ lân cận giá trị giới hạn dư lượng tối đa cho phép MRL [14] là 200, 500 và 1000 ng/mL. Bảng 6 chỉ ra hiệu suất thu hồi trung bình (thực hiện lặp 4 lần) ứng với mỗi điểm nồng độ đánh giá. Hiệu suất thu hồi nằm trong khoảng 83,5-96,4% [12,13]. Kết quả đánh giá cho thấy, phương pháp phân tích có độ lặp lại và độ đúng rất tốt, phù hợp theo khuyến cáo của AOAC. Điều này chứng tỏ phương pháp phân tích cho kết quả tin cậy.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp phân tích thông qua diện tích peak (S_i)

STT	50 ppb		1000 ppb		3000 ppb	
	MD	MP	MD	MP	MD	MP
1	1127,15	563,41	31660,23	16687,37	150756,83	70517,86
2	1045,04	568,77	32338,42	17029,55	152305,75	72453,55
3	982,05	610,56	33256,41	17441,28	154304,00	73880,95
4	924,56	604,51	33181,76	17514,82	165096,67	77379,74
5	1006,23	586,12	32589,03	16892,01	164803,20	74257,49
6	1022,70	592,43	31465,21	17487,85	158242,10	75502,73
RSD	6,64	3,21	2,31	2,06	3,95	3,21

Bảng 6. Kết quả đánh giá hiệu suất thu hồi của phương pháp phân tích

Nồng độ thêm chuẩn	HC BVTV	Nồng độ xác định được	R (%)
200 ppb	Methyl Parathion	170,7 ± 1,3	85,4
	Methidathion	168,2 ± 2,2	84,1
500 ppb	Methyl Parathion	481,8 ± 1,7	96,4
	Methidathion	417,5 ± 8,6	83,5
1000 ppb	Methyl Parathion	933,1 ± 3,4	93,3
	Methidathion	873,9 ± 13,9	87,4

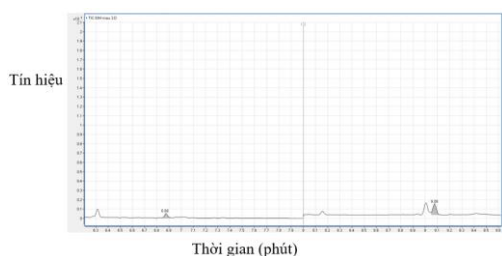
3.2. Kết quả phân tích MP và MD trong mẫu trà hoa vàng

Áp dụng quy trình và các thông số phân tích đã được tối ưu trong mục 2 đối với 3 mẫu trà hoa vàng thu thập tại các chợ được liệt kê trên địa bàn Hà Nội, thu được kết quả phân tích trong Bảng 7. Kết quả ban đầu cho thấy, 2 mẫu trà hoa vàng ký hiệu C1 và C2 không phát hiện (KPH) ra MP và MD. Mẫu trà hoa vàng ký hiệu C3 có phát hiện cả hai chất trên (Hình 3), tuy nhiên

dư lượng của chúng đều nhỏ hơn giới hạn định lượng của phương pháp phân tích.

Bảng 7. Kết quả phân tích dư lượng MP và MD trong mẫu trà hoa vàng

Mẫu trà	MP	MD
C1	KPH	KPH
C2	KPH	KPH
C3	<MDL	<MDL
MRL (mg/kg)	0	0,5



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu trà hoa vàng C3

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã áp dụng thành công quy trình phân tích methyl parathion và methidathion trong mẫu trà hoa vàng bằng phương pháp chiết QuEChERS kết hợp GC-MS. Giới hạn định lượng của phương pháp với methyl parathion và methidathion lần lượt là 67 và 57 ng/g.

Theo kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy, có 1 trong 3 mẫu trà hoa vàng trôi nổi ngoài thị trường được phân tích đã phát hiện là có dư lượng cả methyl parathion và methidathion, trong đó, dư lượng của methidathion nhỏ hơn nhiều lần dư lượng tối đa cho phép. Đây là 2 loại hóa chất đã bị cấm nhập khẩu và sử dụng từ năm 1996.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Red List vulnerable species (2010), World Conservation Monitoring Centre 1998. *Camellia chrysantha*, IUCN.

[2] Nguyen T. Tuyen, Tran Van Hieu, Vu D. Hoang, A New Sexangularetin Derivative From *Camellia hakodae*, Natural Product Communications, 14 (9), 2019, 1-4.

[3] Quyết định 1082-NN/BVTV-QĐ cấm nhập khẩu, sử dụng thuốc bảo vệ thực vật nông nghiệp Việt Nam, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, ngày 08 tháng 7 năm 1996.

[4] 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.

[5] Nguyễn Thị Bích Thu, Trần Việt Hùng, Ngô Quốc Luật, Đỗ Minh Trường, Dương Thị Giang, Lê Thành Nghị, *Kết quả điều tra sơ bộ tình hình sử dụng hoá chất bảo vệ thực vật trong trồng cây thuốc tại một số địa phương*, Tạp chí Dược liệu, 14(6), 2009, 263-269.

[6] Trịnh Văn Quý, Vương Trường Giang, Phạm Thị Giảng, Trần Việt Hùng (2005), *Nghiên cứu định tính và định lượng hóa chất bảo vệ thực vật tồn dư trong một số dược liệu được trồng và sử dụng ở Việt Nam*, Đề tài nghiên cứu – Bộ Y tế.

[7] Nguyễn Thị Bích Thu, Ngô Quốc Luật, Dương Thị Giang, Lê Thành Nghị (2009), *Nghiên cứu ứng dụng sắc ký khí khối phổ để phân tích dư lượng một số hóa chất bảo vệ thực vật thường dùng*, Đề tài nghiên cứu – Bộ Y tế.

[8] Trần Cao Sơn, Lê Thị Hồng Hào, Hoàng Thị Thúy Hằng, Thái Nguyễn Hùng Thu, *Xác định đa dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật trong dược liệu tươi bằng phương pháp QuEChERS và sắc ký lỏng khối phổ*, Tạp chí Dược học, 451, 2013, 15-20.

[9] Trần Cao Sơn, Đoàn Hạnh Dung, Lê Thị Hồng Hào, Thái Nguyễn Hùng Thu, *Xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật trong dược liệu khô bằng QuEChERS và sắc ký lỏng ghép nối khối phổ*, Tạp chí Dược học, 460, 2014, 13-18.

[10] Trần Cao Sơn (2015), *Nghiên cứu xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật trong một số dược liệu và sản phẩm từ dược liệu bằng sắc ký khối phổ*, Luận án tiến sĩ Dược học.

[11] Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 9333:2012 về Thực phẩm - Xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật bằng sắc ký khí khối phổ và sắc ký lỏng khối phổ hai lần - Phương pháp Quechers.

[12] AOAC International (2012), *AOAC Official Method 2007.01 - Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate*, Official Method of Analysis of AOAC International, 19th edition, AOAC, USA.

[13] Trần Cao Sơn (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích Hóa học & Vi sinh vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tr. 16-59.

[14] Thông tư số 50/2016/TT-BYT ngày 30 tháng 6 năm 2016, *Quy định tối đa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong thực phẩm*, Bộ Y tế.