

XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG PYRACLOSTROBIN VÀ METALAXYL TRONG MỘT SỐ LOẠI RAU, QUẢ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ (LC/MS/MS)

Đến tòa soạn 19-02-2021

Đinh Thị Trường Giang, Nguyễn Thanh Hoài

Ngành Hóa học, Viện Sư phạm tự nhiên, Đại học Vinh

Hoàng Văn Trung, Nguyễn Văn Quốc

Viện Công nghệ Hóa Sinh – Môi trường, Đại học Vinh

SUMMARY

DETERMINATION OF PYRACLOSTROBIN AND METALAXYL RESIDUES IN SOME VEGETABLES AND FRUITS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC/MS/MS)

Residue of pyraclostrobin, metalaxyl in some vegetables and fruits in Vinh city has been determined by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Samples are handled using the Quechers method. Results obtained for 10 studies with pyraclostrobin and 6 studies with metalaxyl content lower than LOD. The results of analysis showed that both of pyraclostrobin and metalaxyl are in the limited range of content according to maximum content regulation of residue of plant protection drugs in food (50/2016/TT-BYT). The detection limits are $0.019 \cdot 10^{-3}$ ppm for pyraclostrobin and $0.012 \cdot 10^{-3}$ ppm for metalaxyl. The relative standard deviations of the determinations are less than <1% for both. Performance recovery is from 95.8 and 97.2% for both substances.

Keywords: vegetable, fruit, LC/MS/MS, pyraclostrobin, metalaxyl.

1. MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong những quốc gia có thể mạnh về xuất khẩu nông nghiệp, với điều kiện khí hậu nhiệt đới gió mùa rất thuận lợi cho phát triển nông nghiệp, nhưng cũng tạo điều kiện cho sự phát triển của các loại sâu bệnh có hại. Việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) để phòng trừ sâu hại, dịch bệnh bảo vệ cây trồng đóng vai trò quan trọng trong phát triển nông nghiệp ở nước ta. Cùng với phân bón, thuốc BVTV là yếu tố quan trọng để bảo đảm an ninh lương thực quốc gia. Thuốc BVTV đã được sử dụng rộng rãi ở nước ta từ những năm 1960 với mục đích phòng trừ dịch hại bảo vệ cây trồng, phòng chống sốt rét. Do đó thuốc BVTV gắn liền với tiến bộ sản xuất công nghiệp về quy mô, số lượng, chủng loại ngày càng tăng. Tuy nhiên ngoài mặt tích cực

thì việc sử dụng sai mục đích, lạm dụng thuốc BVTV gây ra nhiều hậu quả nghiêm trọng về môi trường, hệ sinh thái và sức khỏe con người [2,3]. Căn cứ theo QCVN 54:2013/BTNMT của Bộ Tài nguyên và Môi trường về ngưỡng cho phép hàm lượng thuốc BVTV hữu cơ theo mục đích sử dụng đất thì hiện có hàng trăm điểm ô nhiễm tồn lưu thuốc BVTV có mức độ rủi ro cao gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng và đặc biệt nghiêm trọng, ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe cộng đồng. Việc phân tích và kiểm soát hàm lượng các thành phần gây hại có trong thuốc BVTV là hết sức cần thiết, góp phần bảo vệ sức khỏe con người và hệ sinh thái. Hiện nay, để xác định hàm lượng các hoạt chất trong thuốc BVTV, có nhiều phương pháp phân tích như: sắc ký khí, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), tuy nhiên phương

pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS/MS) được lựa chọn cho nghiên cứu vì có độ nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao, phù hợp với mục đích phân tích lượng vết [1,5,7].

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và hóa chất

2.1.1. Thiết bị

Tất cả các phép đo đều được thực hiện trên máy phân tích sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS/MS) Agilent Technologies 6420 Triple Quad bao gồm: bộ phận bơm dung môi, bộ loại khí, bộ phận điều nhiệt và detector MS, cột sắc ký EC-C₁₈ (2,1 x 150 mm, 2,7µm).

Các thiết bị khác: Cân phân tích độ chính xác 0,0001 gam, tủ sấy, máy đo pH (PL-600), máy hút chân không, máy ly tâm Mikro 22R, bể siêu âm (LC60H).

2.1.2. Hóa chất

Tất cả các loại hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều là hóa chất tinh khiết phân tích (merck) như: Chất chuẩn pyraclostrobin và metalaxyl, axit formic (HCOOH), methanol (MeOH), acetonitril (ACN) đều thuộc loại dùng cho LC/MS/MS, MgSO₄ khan, axit axetic – natri axetat, NaCl, natri xitrat, PSA, axit formic, nước cất đề ion.

Dung dịch chuẩn gốc 1000 ppm: Cân chính xác 10mg chất chuẩn cho vào bình định mức 10ml. Hòa và định mức đến vạch bằng MeOH.

2.2. Chuẩn bị mẫu phân tích

Các mẫu rau, quả được thu thập trên thị trường (chợ và siêu thị) trên địa bàn thành phố Vinh. Các loại mẫu sau khi lấy về phòng thí nghiệm được cắt, cân và mã hóa, ký hiệu mẫu thứ tự: M1 – M12 và được tiến hành bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ phù hợp, tên và ký hiệu các mẫu rau, quả được thể hiện ở bảng 2.

Mẫu được xử lý theo kỹ thuật phân tích Quechers. Mẫu được xay nhỏ đến kích thước phù hợp, cân 5,000 (g) mẫu cho vào ống ly tâm nhựa 50ml sau đó cho lần lượt 0,5g NaCl + 0,5g natricitrat (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O) và 0,5g natri hidrocitrat (C₆H₆Na₂O₇.1,5H₂O). Thêm chính xác 10ml ACN và đánh siêu âm trong 15 phút. Sau đó thêm 4g MgSO₄ rồi đem đi ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Hút lấy 4ml dung dịch sau ly tâm cho vào ống 15ml có chứa 100mg PSA và 600mg MgSO₄ tiến hành siêu âm trong 5 phút, sau đó tiếp tục đem đi ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Tiến hành lọc qua đầu lọc 0,22 µm, cho

vào vial và tiến hành phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS/MS).

Mẫu thêm chuẩn được tiến hành theo quy trình tương tự như các mẫu thực phẩm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu các thông số đo tối ưu để định lượng pyraclostrobin và metalaxyl

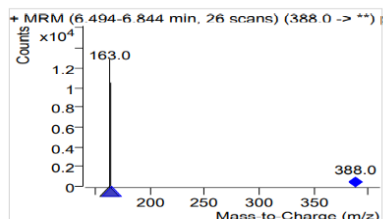
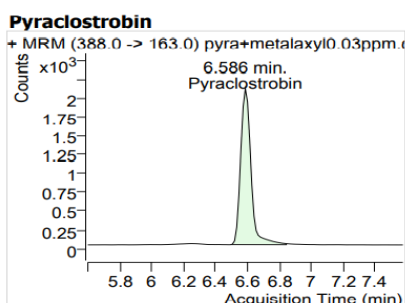
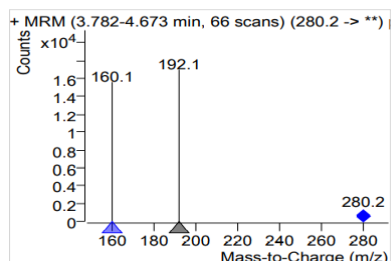
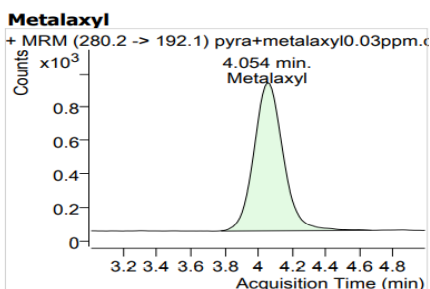
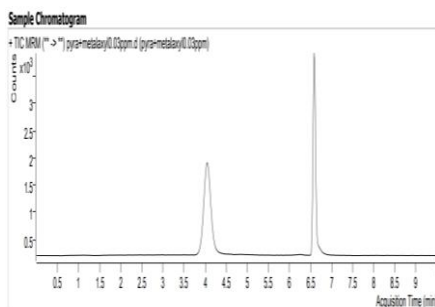
Các phép phân tích pyraclostrobin và metalaxyl đều được thực hiện trên thiết bị phân tích sắc ký lỏng khối phổ 2 lần (LC/MS/MS) theo điều kiện tối ưu đã khảo sát như sau: cột sắc ký EC-C₁₈ (2,1mm x 150 mm, 2,7µm), pha động: MeOH (A) – nước chứa 0,1% HCOOH (B) theo tỉ lệ 65:35 (v/v) chạy gradien, tốc độ dòng: 0,25 ml/min; thể tích tiêm mẫu: 3,0 µl; nhiệt độ buồng cột: 30°C; thời gian phân tích 10 phút. Điều kiện khối phổ bao gồm nguồn ion hóa ESI, loại ion dương, nhiệt độ nguồn ion hóa là 300°C, chế độ chạy MRM, pyraclostrobin với ion sơ cấp m/z 388,0 và ion thứ cấp m/z 163,0; metalaxyl với ion sơ cấp m/z 280,2 và ion thứ cấp m/z 192,1.

3.2. Kết quả xây dựng đường chuẩn, xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại, hiệu suất thu hồi.

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp pyraclostrobin và metalaxyl có nồng độ 0,003-30 ppm từ dung dịch chuẩn gốc ban đầu 1000ppm. Tiến hành đo trên hệ thống LC/MS/MS theo các điều kiện đã chọn tại mục 3.1. Kết quả nghiên cứu xây dựng đường chuẩn; giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) tính toán dựa vào đường chuẩn và theo quy tắc 3σ; RSD của 10 phép đo lặp lại được thể hiện trong bảng 1; hình ảnh đại diện của một số sắc đồ chuẩn thể hiện trong hình 1.

Bảng 1. Phương trình đường chuẩn, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại của

	<i>phương pháp</i>	
	pyraclostrobin	metalaxyl
Phương trình đường chuẩn	$Y = 306,1720 \times X + 75,8613$	$Y = 179,3793 \times X + 62,7846$
LOD (ppm)	$0,019 \cdot 10^{-3}$	$0,012 \cdot 10^{-3}$
LOQ (ppm)	$0,057 \cdot 10^{-3}$	$0,049 \cdot 10^{-3}$
RSD (%)	0,63	0,41
Hệ số tương quan (R ²)	0,9991	0,9996



Hình 1. Sắc đồ chuẩn pyraclostrobin và metalaxyl

Từ kết quả bảng 1 và hình 1 cho thấy: các đường chuẩn xây dựng được đều có hệ số tương quan $R^2 > 0,999$, các giá trị LOD, LOQ phản ánh độ nhạy cao và giá trị RSD% thấp phản ánh độ lặp lại đảm bảo và phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS/MS) được sử

dụng phù hợp cho quá trình định lượng pyraclostrobin và metalaxyl.

Hiệu suất thu hồi được xây dựng trên việc thêm chuẩn pyraclostrobin và metalaxyl có nồng độ 3ppm vào mẫu thực cà tím, sau đó xác định lại lượng thêm chuẩn này bằng phương pháp LC/MS/MS. Kết quả phân tích và tính toán thu được hiệu suất thu hồi đối với pyraclostrobin và metalaxyl lần lượt là 95,8 và 97,2%. Như vậy giá trị hiệu suất thu hồi cao phản ánh phương pháp phân tích có độ đúng đảm bảo, các kết quả phân tích có đủ độ tin cậy.

3.3. Kết quả xác định hàm lượng pyraclostrobin và metalaxyl trong các mẫu nghiên cứu

Tiến hành xử lý các mẫu nghiên cứu theo mục 2.2, các điều kiện phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS/MS) thể hiện trong mục 3.1 và đường chuẩn xây dựng được trong bảng 1, tiến hành định lượng pyraclostrobin và metalaxyl trong 12 mẫu rau, quả, kết quả phân tích và tính toán được thể hiện trong bảng 2

Bảng 2. Hàm lượng pyraclostrobin và metalaxyl nghiên cứu (mg/kg)

Mẫu	Địa điểm	pyraclostrobin	metalaxyl
Bắp cải (M1)	Chợ Đại học Vinh	< LOD	0,0074
Bắp cải (M2)	Chợ Vinh	0,0017	0,0012
Bắp cải (M3)	Siêu thị BigC Vinh	< LOD	0,0020
Cà chua (M4)	Chợ Vinh	< LOD	< LOD
Cà chua (M5)	Siêu thị BigC Vinh	< LOD	< LOD
Dưa chuột (M6)	Chợ Đại học Vinh	< LOD	< LOD
Dưa chuột (M7)	Chợ Vinh	< LOD	< LOD
Cà tím (M8)	Chợ Đại học Vinh	0,0031	0,0970
Cà tím (M9)	Siêu thị BigC Vinh	< LOD	< LOD
Mồng tơi (M10)	Chợ Đại học Vinh	< LOD	0,0008
Mồng tơi (M11)	Chợ Vinh	< LOD	0,0060
Mồng tơi (M12)	Siêu thị BigC Vinh	< LOD	< LOD

Theo thông tư số 50/2016/TT-BYT của Bộ Y tế ngày 30 tháng 12 năm 2016 về việc Quy định giới hạn tối đa dư lượng thuốc bảo vệ

thực vật trong thực phẩm [4], kết quả phân tích hàm lượng pyraclostrobin và metalaxyl trong các mẫu rau, quả đối với các mẫu thu thập đều dưới ngưỡng giới hạn cho phép hoặc nhỏ hơn giới hạn phát hiện.

4. KẾT LUẬN

Trên các đối tượng nghiên cứu, đã khảo sát điều kiện phân tích và xây dựng các phương trình đường chuẩn xác định hàm lượng pyraclostrobin và metalaxyl trên hệ thống sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS/MS).

Kết quả thu được khi tiến hành đo 12 mẫu nghiên cứu cho thấy: Đối với pyraclostrobin có 10 mẫu không cho tín hiệu, mẫu cà tím (M8) cho kết quả cao nhất là 0,0031 mg/kg. Đối với metalaxyl có 5 mẫu không cho tín hiệu, mẫu cà tím (M8) cho kết quả cao nhất là 0,0970 mg/kg. Tuy nhiên hàm lượng các chất nghiên cứu đều nằm dưới ngưỡng cho phép của Bộ Y tế.

Đánh giá độ nhạy cao của phương pháp phân tích được phản ánh qua giá trị giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) theo quy tắc 3 σ . Qua kết quả thực nghiệm và tính toán các giá trị của pyraclostrobin có LOD = 0,019.10⁻³ ppm, LOQ = 0,057.10⁻³ ppm, của metalaxyl có LOD = 0,012.10⁻³ ppm, LOQ = 0,049.10⁻³ ppm. Độ lặp lại cao thể hiện qua giá trị RSD% ở vùng nồng độ thấp 10ppb đều trong ngưỡng cho phép (theo kết quả nghiên cứu thì RSD <1% trong khi giới hạn theo AOAC phải đảm bảo là RSD < 21%). Độ đúng của quá trình phân tích và phương pháp phân tích được thể hiện qua giá trị hiệu suất thu hồi. Tiến hành xác định hiệu suất thu hồi đối với pyraclostrobin và metalaxyl cho kết quả lần lượt là 95,8 và 97,2% đáp ứng tiêu chuẩn AOAC.

Với các kết quả nghiên cứu trên cho thấy phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS/MS) có độ nhạy cao, đáp ứng việc định lượng hàm lượng các hoạt chất có trong

thuốc BVTV, các kết quả phân tích 2 chất dư lượng pyraclostrobin và metalaxyl có độ đúng đảm bảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AOAC Official Method (2007), “*Pesticide Residues in Food by Acetonitrile extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate GC-MS and LC-MS/MS*”.
2. Damalas, C.A.; Eleftherohorinos, I.G (2011), “*Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators*”, Int. J. Environ. Res. Public Health, 8, 1402–1419.
3. Akoto, O.; Gavor, S.; Appah, M.K.; Apau, J (2015),” *Estimation of human health risk associated with the consumption of pesticide-contaminated vegetables from Kumasi, Ghana*”, Environ. Monit. Assess, 187, 244.
4. Thông tư số 50/2016/TT-BYT của Bộ Y, “*Quy định giới hạn tối đa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong thực phẩm*”.
5. European Committee for Standardization (2008), “*Foods of plant origin- Determination of pesticide residues using LC-MS/MS following methanol extraction and clean-up using diatomaceous earth*”, EN 15637.
6. Sanco/12571/2013 (2014), “*Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*”.
7. Núñez, O.; Gallart-Ayala, H.; Ferrer, I.; Moyano, E.; Galceran, M.T (2012),” *Strategies for the multi-residue analysis of 100 pesticides by liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry*”, J.Chromatogr, 1249, 164–180.