

**XÁC ĐỊNH ĐƯ LƯỢNG HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT
NHÓM LÂN HỮU CƠ TRONG NHO Ở NINH THUẬN**

*Ngô Văn Tú
Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế
Nguyễn Thị Thụy Uyên
Trường Cao Đẳng nghề KTCN Dung Quất*

TÓM TẮT

Bài báo này mô tả phương pháp xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật nhóm lân hữu cơ (OPs) trong nho bằng phương pháp sắc ký khí (GC). Độ tin cậy của phương pháp được đánh giá qua giới hạn phát hiện, độ thu hồi và độ lặp lại. Với quy trình phân tích và điều kiện sắc ký thích hợp đã được lựa chọn, giới hạn phát hiện của phương pháp đối với Dimethoate, Diazinon, Metylparathion, Fenitrothion và Malathion lần lượt là 18, 19, 12, 19 và 16 ppb; độ lặp lại và độ thu hồi tốt. Phương pháp đã được áp dụng để xác định OPs trong một số mẫu nho ở Ninh Thuận.

1. Mở đầu

Nho tươi là loại trái cây giàu vitamin và chất khoáng. Giá trị dinh dưỡng trung bình của nho tính cho 100g nho tươi là: 75 calo, 0,4 g protein, 0,3 mg lipid, 6 mg Ca, 24 mg P, 0,4 mg Fe, 83UI vitamin A, 0,1 mg vitamin B1, 0,06 mg vitamin B2, 0,2 mg vitamin PP [9]. Ngoài tác dụng cung cấp dinh dưỡng, nho còn có tác dụng chữa bệnh, đặc biệt là các bệnh liên quan đến rối loạn trao đổi chất cùng các bệnh liên quan đến tim mạch [9].

Cây nho lại là đối tượng tấn công của nhiều loại sâu và bệnh hại [3]. Do vậy, việc lạm dụng hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) sẽ trở thành vấn nạn cần được quan tâm. Tuy nhiên, những thông tin về dư lượng OPs trong nho ở Ninh Thuận chưa được tìm thấy.

GC là phương pháp hữu hiệu để xác định HCBVTV trong nông sản thực phẩm. Đặc biệt, với trường hợp không có chuẩn rời, sắc ký khí detector quang kế ngọn lửa kính lọc photpho (GC/FPD – P) phối hợp với sắc ký khí detector khối phổ (GC/MS) là phương pháp tốt để định lượng OPs [4]. Phương pháp đã được áp dụng để xác định dư lượng OPs trong một số mẫu nho ở Ninh Thuận.

2. Thực nghiệm

2.1. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

- Hệ thống GC Agilent 7890A, detector FPD – P; hệ thống GC Perkin Elmer, detector MS; máy li tâm MIKRO 220R, UNIVERSAL 320R của hãng Hettich (Đức); hệ thống máy cô quay lạnh li tâm chân không hiệu LABCONCO (Mỹ); máy lắc REAX top của hãng Heidolph (Đức); cân phân tích Sartorius (sai số cho phép 0,1 mg); tủ lạnh, lò nung, máy xay.

- Micropipet, pipet, ống li tâm 50ml có nắp vặn, chai đựng mẫu phân tích (vial) 2ml có nắp vặn, các dụng cụ thủy tinh cần thiết, ...

- Hỗn hợp chuẩn OPs của hãng Supelco (Mỹ), PSA Bonded Silica (axit propylsulfonic trên nền SiO₂) của hãng Supelco (Mỹ), axetonitril (Merck – Đức), than hoạt tính (GCB), MgSO₄ khan (sấy ở 150°C trước khi sử dụng), Na₂SO₄ khan (sấy ở 450°C trước khi sử dụng), natriacetat (NaAc) khan, axit axetic (HAc) băng, nước cất, khí He tinh khiết 99,99%, khí H₂ tinh khiết phân tích.

2.2. Quy trình phân tích

2.2.1. Lấy mẫu và bảo quản mẫu

Mẫu đơn được lấy ngẫu nhiên theo hình chữ X theo các mặt cắt của lô sản phẩm. Số mẫu đơn được lấy ứng với mỗi lô khoảng 5 – 10 mẫu. Tất cả các mẫu đơn được trộn đều để thu được mẫu nghiên cứu phân tích (mẫu hiện trường) [1].

Mẫu hiện trường được lấy vào 2 đợt (gồm 2 loại nho phổ biến ở Ninh Thuận là nho đỏ Cardinal và nho xanh NH.01-48):

- Đợt 1 (vụ Đông – Xuân): 6 mẫu nho được chọn lấy ở các vườn nho của 6 hộ gia đình ở những vùng khác nhau (Phước Thuận - Ninh Phước, Nha Hồ – Ninh Sơn, Phan Rang – Tháp Chàm, Ninh Hải) khi thu hoạch và được ký hiệu: NH1.1, NH1.2, NH1.3, Card1.1, Card1.2 và Card1.3.

- Đợt 2 (vụ Hè – Thu): 5 mẫu nho được chọn lấy ở các vườn nho của 5 hộ gia đình (ở các vùng Phan Rang – Tháp Chàm, Ninh Sơn, Ninh Phước, Ninh Hải) khi thu hoạch và được ký hiệu: NH2.2, NH2.4, Card2.1, Card2.2 và Card2.3.

Lượng mẫu hiện trường được lấy khoảng 1 kg và cho vào túi PE sạch để bảo quản.

Mẫu phân tích dư lượng HCBVTV được bảo quản ở 0°C – 5°C không quá 3 ngày trước khi phân tích [5], hoặc có thể bảo quản trong thời gian 3 tháng ở –18°C [1].

Mẫu phòng thí nghiệm được lấy từ mẫu hiện trường theo quy tắc đường chéo khi phân tích [5].

2.2.2. Xử lý mẫu [5], [6], [7], [8]

Mẫu được xử lý theo tiêu chuẩn châu Âu CEN/TC 275/WG 4 N 204 [5]. Cân chính xác 10 g mẫu đã xay trên cân phân tích (sai số cho phép 0,1 mg) vào ống li tâm 50ml, thêm vào đó 15 ml HAc 1% trong axetonitril, lắc mạnh khoảng 1 phút. Sau đó thêm 1 g NaAc, lắc mạnh khoảng 1 phút. Li tâm ở 4°C, tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút.

Lấy 12 ml dịch chiết sau li tâm cho vào ống li tâm khác chứa sẵn 0,25 g PSA và 1g hỗn hợp GCB/MgSO₄ (tỉ lệ 1 : 19), lắc mạnh trong 2 phút. Thêm vào ống li tâm 1 g Na₂SO₄ khan, lắc mạnh trong 1 phút. Li tâm ở 4°C, tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút.

Lấy 10 ml dịch chiết đã được làm sạch đem cô quay chân không ở 35°C cho đến khô. Định mức bằng 1ml HAc 1% trong axetonitril và chuyển vào vial. Dịch chiết đã được làm sạch, làm giàu và axit hóa được chuyển vào trong vial của bộ bơm mẫu tự động để xác định OPs bằng GC.

2.2.3. Phân tích trên hệ thống GC

- Điều kiện làm việc: cột mao quản ZB-5, dài 30 m, đường kính trong 0,32 mm, lớp phim 0,25 µm; khí mang He, 25 psi; không khí 100 mL/phút; khí H₂ 70 mL/phút; nhiệt độ bơm mẫu 250°C; nhiệt độ detector 190°C đối với FPD – P (280°C đối với detector MS); thể tích bơm mẫu 1 µL; kiểu bơm mẫu không chia dòng.

Chương trình nhiệt độ (với cả 2 hệ thống GC/MS và GC/FPD – P):

70°C $\xrightarrow[30^\circ\text{C/phút}]{(1 \text{ phút})}$ 170°C $\xrightarrow[5^\circ\text{C/phút}]{(4 \text{ phút})}$ 220°C $\xrightarrow[30^\circ\text{C/phút}]{(4 \text{ phút})}$ 280°C (5 phút)

- Xác định thời gian lưu: dùng hỗn hợp chuẩn OPs 0,4 ppm để xác định thứ tự đi ra khỏi cột của OPs bằng hệ thống GC/MS, từ đó xác định thời gian lưu của OPs bằng hệ thống GC/ FPD – P.

- Khảo sát khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn (trên hệ GC/FPD – P): khoảng tuyến tính của detector được khảo sát qua các dung dịch chuẩn OPs có nồng độ 0,04 ppm; 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,4 ppm; 1 ppm; 2 ppm; 4 ppm, điều kiện kỹ thuật sắc ký như trên. Đường chuẩn xác định OPs được xây dựng trên cơ sở khảo sát khoảng tuyến tính.

- Đánh giá phương pháp qua giới hạn phát hiện, độ lặp lại, độ thu hồi [10].

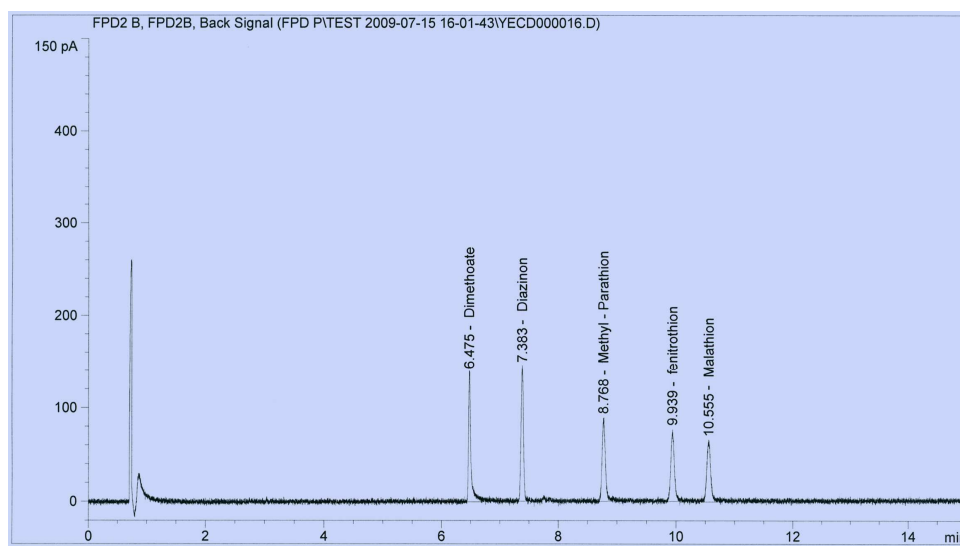
- Áp dụng quy trình phân tích để xác định OPs trong một số mẫu nho ở Ninh Thuận (trên hệ GC/FPD – P).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thời gian lưu của OPs

- Dùng hỗn hợp chuẩn OPs 0,4ppm để xác định thứ tự đi ra khỏi cột của OPs bằng hệ thống GC/MS.

- Tiến hành thí nghiệm trên hệ thống GC/ FPD – P đối với các dung dịch chuẩn chứa 5 chỉ tiêu (5ct) của OPs có nồng độ 0,04 ppm; 0,1ppm; 0,2 ppm; 0,4 ppm; 1 ppm; 2 ppm; 4 ppm. Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.



Hình 3.1. Sắc đồ dung dịch chuẩn 5ct của OPs 0,4ppm

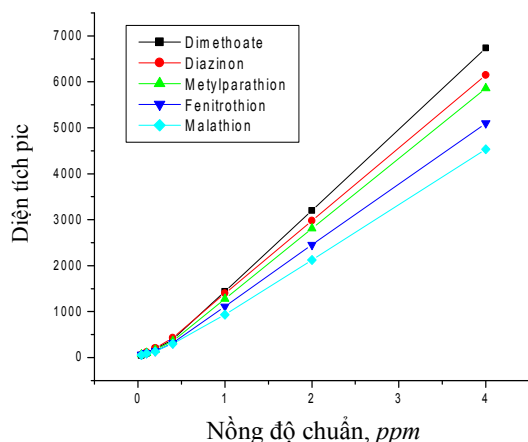
Bảng 3.1. Thời gian lưu của OPs

STT	Chất chuẩn	Thời gian lưu (phút) (P = 0,95)	Độ lệch chuẩn (S), phút	Độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) (n = 21)
1	Dimethoate	6,477 ± 0,116	0,0127	0,20
2	Diazinon	7,383 ± 0,053	0,0058	0,08
3	Metyl parathion	8,775 ± 0,078	0,0085	0,10
4	Fenitrothion	9,941 ± 0,078	0,0086	0,09
5	Malathion	10,554 ± 0,029	0,0032	0,03

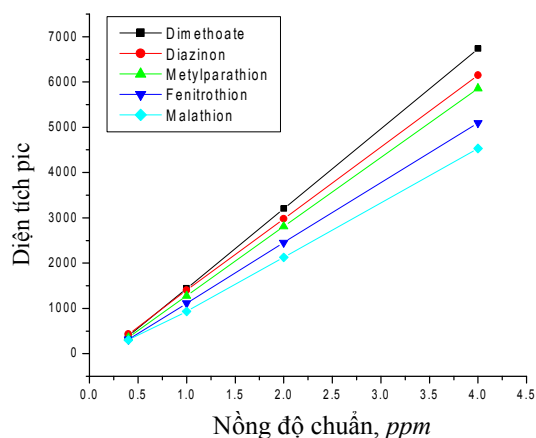
3.2. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn của OPs

Khoảng tuyến tính của detector được khảo sát qua các dung dịch chuẩn OPs có nồng độ 0,04 ppm; 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,4 ppm; 1 ppm; 2 ppm; 4 ppm. Kết quả cho thấy, detector cho kết quả tuyến tính tốt đối với tất cả OPs trong khoảng nồng độ khảo sát từ 0,4 – 4 ppm (hình 3.2). Trong khoảng này, đường chuẩn xác định OPs có hệ số tương

quan R đạt 1,0000 (riêng Malathion cho hệ số tương quan R = 0,9998 trong khoảng 0,4 – 4 ppm và R = 1,0000 trong khoảng từ 1 – 4 ppm), (hình 3.3 và bảng 3.2).



Hình 3.2. Đồ thị biểu diễn kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của OPs



Hình 3.3. Đường chuẩn xác định OPs

Bảng 3.2. Phương trình đường chuẩn của OPs

STT	Chất chuẩn	Phương trình đường chuẩn	R
1	Diazinon	$Y = (-197,252 \pm 7,694) + (1296,370 \pm 2,733)X$	1,0000
2	Dimethoate	$Y = (-319,113 \pm 6,302) + (1450,594 \pm 2,255)X$	1,0000
3	Fenitrothion	$Y = (-212,872 \pm 6,560) + (1509,967 \pm 3,242)X$	1,0000
4	Malathion	$Y = (-270,067 \pm 6,686) + (978,003 \pm 1,752)X$	1,0000
5	Metylparathion	$Y = (-249,478 \pm 3,696) + (1555,592 \pm 1,636)X$	1,0000

(Ghi chú: Y là diện tích pic; X là nồng độ, ppm)

* Thiết bị cho độ lặp lại tốt (RSD của tín hiệu diện tích pic khi xây dựng đường chuẩn từ 0,99 – 6,60% và các RSD này đều nhỏ hơn 0,5RSD tính theo hàm Hortwitz) [10].

* Kết quả tính toán giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của thiết bị theo "quy tắc 3σ" được trình bày ở bảng 3.3 [10].

Bảng 3.3. Giá trị LOD và LOQ của thiết bị

Giá trị	Diazinon	Dimethoate	Fenitrothion	Malathion	Metylparathion
LOD (ppb)	8	15	15	14	8
LOQ (ppb)	26,67	50,00	50,00	46,67	26,67

(Ghi chú: LOD được tính theo công thức $\frac{3S_y}{b}$; $LOQ = \frac{10LOD}{3}$)

3.3. Đánh giá phương pháp

3.3.1. Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Tiến hành phân tích mẫu Card1.1 theo quy trình trên với nồng độ thêm chuẩn như sau: (Dimethoate 0,972 ppm; Diazinon 0,979 ppm; Metylparathion 0,786ppm; Fenitrothion 0,704 ppm; Malathion 0,982 ppm). Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Kết quả phân tích 3 lần lặp lại và độ lặp lại của phương pháp được nêu ra ở bảng 3.4.

Độ thu hồi của phương pháp cũng được xác định bằng cách tiến hành phân tích 3 lần lặp lại đối với mẫu Card1.1 theo quy trình trên với nồng độ thêm chuẩn là 0,8 ppm. Kết quả độ thu hồi của phương pháp được nêu ra ở bảng 3.4.

Bảng 3.4. Kết quả xác định độ lặp lại và độ thu hồi (Re) của phương pháp

Hoạt chất	Hàm lượng OPs thêm chuẩn, ppm	Hàm lượng OPs xác định được, ppm				RSD (%) (n=3)	Re (%)
		lần 1	lần 2	lần 3	TB		
Dimethoate	0,972	0,971	0,971	0,940	0,961	1,86	98,9
Diazinon	0,979	0,901	0,887	0,914	0,901	1,50	92,0
Metylparathion	0,786	0,732	0,741	0,726	0,733	1,03	93,3
Fenitrothion	0,704	0,650	0,650	0,668	0,656	1,58	93,2
Malathion	0,982	0,946	0,916	0,946	0,936	1,85	95,3

Nhận xét: Kết quả tính toán cho thấy, phương pháp cho độ đúng tốt với độ thu hồi đạt 92,0 ÷ 98,9%

3.3.2. LOD và LOQ của phương pháp

Để xác định LOD và LOQ của phương pháp, tiến hành phân tích 3 lần lặp lại đối với các mẫu nhỏ Card1.1 được thêm chuẩn lần lượt 0,4 ppm; 0,6 ppm; 0,8 ppm; 1,0 ppm. Giá trị LOD, LOQ được xác định theo quy tắc "3σ". Kết quả tính toán LOD và LOQ của phương pháp được trình bày ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. LOD và LOQ của phương pháp xác định OPs trong nhỏ

Giá trị	Diazinon	Dimethoate	Fenitrothion	Malathion	Metylparathion
LOD (ppb)	19	18	19	16	12
LOQ (ppb)	63,33	60,00	63,33	53,33	40,00
R	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999

(Ghi chú: R là hệ số tương quan giữa diện tích đỉnh và nồng độ khi xác định LOD)

3.4. Xác định OPs trong một số mẫu nho ở Ninh Thuận

Quy trình phân tích ở trên được áp dụng để định tính (dựa vào thời gian lưu) và định lượng OPs trong một số mẫu nho ở Ninh Thuận. Kết quả cho thấy dư lượng OPs trong nho rất ít. Do vậy, các mẫu phân tích đều được làm giàu trước khi xác định. Các kết quả thu được khi định lượng OPs trong mẫu sau làm giàu đều lớn hơn LOQ tương ứng ở bảng 3.5.

Sau khi thực hiện những phép tính cần thiết, kết quả phân tích OPs trong một số mẫu nho được dẫn ra ở bảng 3.6.

Bảng 3.6. Hàm lượng OPs trong một số mẫu nho ở Ninh Thuận, ppm

		Hàm lượng OPs				
Chất		Diazinon	Dimethoate	Fenitrothion	Malathion	Metylparathion
Mẫu Đợt 1	NH1.1*	–	–	–	–	–
	NH1.2	–	–	–	–	–
	NH1.3	–	–	–	0,059±0,013	–
	Card1.1	–	–	–	–	–
	Card1.2	–	0,042±0,004	–	–	–
	Card1.3	–	0,037±0,004	0,024±0,004	–	–
Mẫu Đợt 2	NH2.4*	–	–	–	–	–
	NH2.2	–	–	0,026±0,004	–	–
	Card2.1	–	0,043±0,004	0,026±0,004	–	–
	Card2.2	–	–	–	0,061±0,013	–
	Card2.3	–	–	–	–	–

(Ghi chú: Dấu "*": Nho trồng theo kỹ thuật VietGAP (thực hành sản xuất nông nghiệp tốt); NH: ký hiệu nho NH.01 – 48; Card: ký hiệu nho Cardinal; dấu "–": không phát hiện được)

4. Kết luận

Đã lựa chọn được quy trình phân tích thích hợp để xác định OPs trong nho bằng phương pháp GC/FPD – P. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích OPs trong một số mẫu nho ở Ninh Thuận. Kết quả ban đầu cho thấy: vài OPs vẫn còn tồn lưu trong một số mẫu nho khảo sát. Điều đó nói lên rằng, một số OPs đã được sử dụng cho nho trong quá trình sản xuất. Dư lượng OPs trong nho có thể là do việc quá lạm dụng thuốc của người nông dân, nhưng lại thiếu quan tâm đến vấn đề liều lượng và thời gian cách ly khi sử dụng thuốc. Tuy nhiên, tất cả các mẫu nho đều có giá trị hàm lượng OPs thấp

hơn so với giới hạn dư lượng tối đa (MRL) theo tiêu chuẩn của Bộ Y tế (Diazinon 0,2 ppm; Dimethoate 1,0 ppm; Fenitrothion 0,5 ppm; Malathion 8,0 ppm; Metylparathion 0,5 ppm).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp & PTNT (1999), Tiêu chuẩn ngành số 10TCN 386 – 99, *Phương pháp lấy mẫu kiểm định chất lượng và dư lượng thuốc bảo vệ thực vật* (ban hành kèm theo Quyết định số 116/1999/QĐ–BNN–KHCV ngày 4 tháng 8 năm 1999 của Bộ Nông nghiệp và PTNT).
2. Bộ Y tế (2008), *Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm* (ban hành kèm theo Quyết định số 46/2007/QĐ – BYT ngày 19 tháng 12 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Y tế), Nhà xuất bản Hà Nội.
3. Phạm Hữu Nhượng, Nguyễn Hữu Bình, Lê Xuân Bình, Lê Quang Quyên (2000), *Kỹ thuật trồng nho*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
4. Cristina Aprea, Claudio Colosio, Teresa Mammone, Claudio Minoia, Marco Maroni (2002), *Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods*, Journal of Chromatography B, 769, 191 – 219.
5. CEN/TC 275/WG 4 (2006), *Foods of plant origin – Determination of pesticide residues using GC/MS or LC/MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning – QuEChERS-method (European Standard)*, the results of discussions at the 13th meeting of CEN/TC 275/WG 4 in Berlin.
6. J.S. Fritz (1999), *Analytical Solid Phase Extraction*, Wiley – VHC, New York.
7. William Horwitz (2005), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th Edition, USA.
8. Somenath Mitra (2003), *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, Inc., New York.
9. Nguyen Minh Chau, Pham Ngoc Lieu, Le Thi Thu Hong, Dang Kim Son, Nguyen Van Tinh, Nguyen Man (2002), *Fruits in Vietnam*, Agriculture Publishing House.
10. J. C. Miller and J. N. Miller (1988), *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood Limited.

DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES RESIDUES IN GRAPE IN NINH THUAN PROVINCE

Ngo Van Tu

College of Pedagogy, Hue University

Nguyen Thi Thuy Uyen

Dung Quat Vocational College of Technique and Technology

SUMMARY

This article describes the method of determining organophosphorus pesticides (OPs) residues in Grape using Gas Chromatography. This method was appreciated by means of detection limit, recovery and precision. With the analytical procedure and the working conditions for chromatographic system which was chosen, detection limit of the method for Dimethoate, Diazinon, Methylparathion, Fenitrothion and Malathion was 18, 19, 12, 19 and 16ppb, respectively and its recovery and precision might be accepted. This method was applied to determine OPs residues in some grape samples in Ninh Thuan province.