

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH DƯ LƯỢNG THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT HỌ CÚC SỬ DỤNG QUECHERS AOAC 2007.01 TRÊN THIẾT BỊ GC/MS/MS

Lê Minh Tuấn¹*, Nguyễn Ngọc Phương¹,

Nguyễn Lê Kim Phụng¹, Lê Thu Thủy²

TÓM TẮT

Xây dựng phương pháp xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật họ Cúc tổng hợp trong hồ tiêu xanh, ứng dụng vào kiểm soát chất lượng hồ tiêu xuất khẩu. Phương pháp được xây dựng dựa trên tiêu chuẩn AOAC 2007.01, sử dụng QuEChERS trong quá trình xử lý mẫu để loại bỏ các chất gây ảnh hưởng đến quá trình tách chiết như chất béo, màu,... Dịch chiết thu được sẽ phân tích trên thiết bị sắc ký khí ghép nối đầu dò khối phổ MS (GC/MS/MS). Thực hiện phân tích các chất gồm: Acrinathrin, Cyfluthrin, Cyhalothrin, Cypermethrin, Deltamethrin, Etofenprox, Fenvalerate, Permethrin, Tetramethrin trên nền mẫu hạt hồ tiêu xanh. Kết quả nghiên cứu cho thấy, độ tuyến tính tương đối tốt với hệ số tương quan (R^2) đều đạt trên 0,995, hiệu suất thu hồi đạt trên 89%, giới hạn phát hiện thấp nhất của phương pháp đạt từ 1,642 ppb, độ lệch chuẩn tốt nhất của phương pháp đạt 1,37%.

Từ khóa: Sắc ký khí khối phổ, thuốc bảo vệ thực vật họ Cúc tổng hợp, AOAC 2007.01, QuEChERS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thời gian gần đây, vấn đề dư lượng thuốc BVTV trên hồ tiêu ngày càng trở nên quan trọng do hồ tiêu Việt Nam liên tục nhận được cảnh báo từ các nước nhập khẩu.... Một trong những nguyên nhân của vấn đề này là lợi nhuận cao nên thúc đẩy người trồng hồ tiêu luôn chạy theo năng suất, sản lượng mà ít quan tâm đến sản xuất hồ tiêu an toàn, bền vững [2].

Một số loại bệnh phổ biến trên cây tiêu thường sử dụng các loại hóa chất BVTV họ Cúc để chữa trị như mối tiêu (*Coptoteranes* sp), rệp sáp giả. Bệnh mối tiêu thường tạo những đường hầm đất trên dây tiêu và dưới mặt đất quanh gốc tiêu để gây hại, bệnh rệp sáp giả thường gây hại đột non, lá non, chùm quả, dây tiêu trên mặt đất. Thuốc BVTV họ Cúc (Pyrethroid) là dẫn xuất của este cacboxylat. Các hoạt chất pyrethrin có thể được chiết xuất từ hoa, lá khô và rễ cây bằng một dung môi, chúng có tác dụng gây chết tức thời đối với côn trùng. Trong dịch chiết của pyrethrin có sáu este của hai axit cacboxylic với ba xyclopentenolon với tỷ lệ khác nhau. Pyrethrin có phổ trừ sâu rộng, hiệu lực diệt cao, độc tính thấp với

động vật có thân nhiệt ổn định, nhưng dễ bị phân hủy quang hóa nên chỉ dùng để diệt và loại côn trùng trong nhà. Chính nhờ tính chất này của pyrethrin, đã thúc đẩy quá trình nghiên cứu tổng hợp các đồng đẳng của nó với hiệu lực cao hơn và độ bền quang hóa tốt hơn nhằm đưa vào sử dụng rộng rãi thay thế cho những hợp chất diệt côn trùng nhóm clo hữu cơ và photpho hữu cơ. Do đó, xây dựng phương pháp phân tích dư lượng thuốc BVTV họ Cúc sử dụng QuEChERS AOAC 2007.01 trên thiết bị GC/MS/MS là rất cần thiết.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lựa chọn cây hồ tiêu xanh giai đoạn thu hoạch được trồng tại khu vực tỉnh Kon Tum làm đối tượng trong nghiên cứu này.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu này nhằm xây dựng phương pháp phân tích tồn dư thuốc BVTV họ Cúc (Pyrethroid) trong sản phẩm hạt hồ tiêu xanh. Bao gồm các chất sau: Acrinathrin, Cyfluthrin, Cyhalothrin, Cypermethrin, Deltamethrin, Etofenprox, Fenvalerate, Permethrin, Tetramethrin. Phương pháp được phát triển dựa trên phương pháp tiêu chuẩn AOAC 2007.01 [3].

¹ Trung tâm Công nghệ Môi trường tại thành phố Hồ Chí Minh, Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

* Email: tuanlm@ietvn.vn

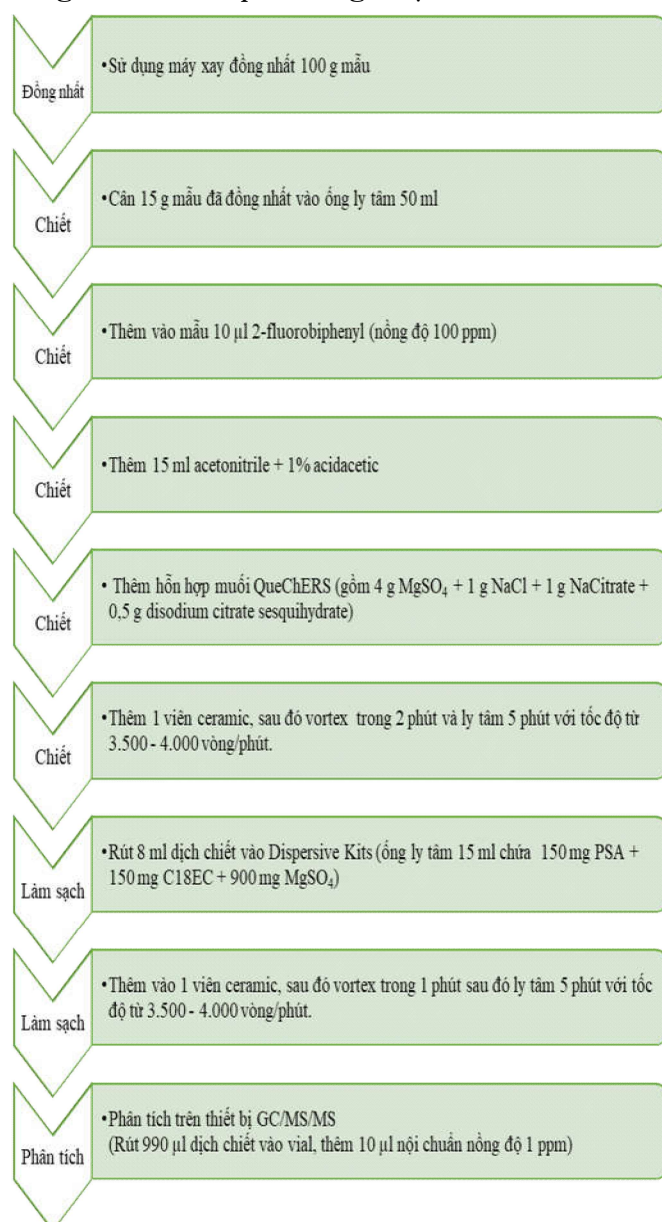
² Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội

2.2.1. Nguyên tắc của phương pháp

Dư lượng thuốc BVTV họ Cúc tổng hợp trong mẫu được ly trích bằng acetonitrile đã được axit hóa bằng axit acetic 1%. Dịch chiết được làm sạch bằng hỗn hợp bột PSA, C18 và $MgSO_4$ để loại bỏ các thành phần gây nhiễu trong quá trình phân tích sắc ký như các axit béo, chất màu, nước trong dịch chiết. Dung dịch sau khi làm sạch được phân tích trên hệ thống Thermo Scientific TRACE 1310 Gas Chromatograph - TSQ 9000 Mass Spectrometer [1].

2.2.2. Quy trình xử lý mẫu

Mẫu được xử lý và phân tích ngay sau khi đồng nhất. Trong trường hợp cần lưu trữ thì mẫu sẽ được đồng nhất rồi bảo quản trong tủ lạnh - 18°C.



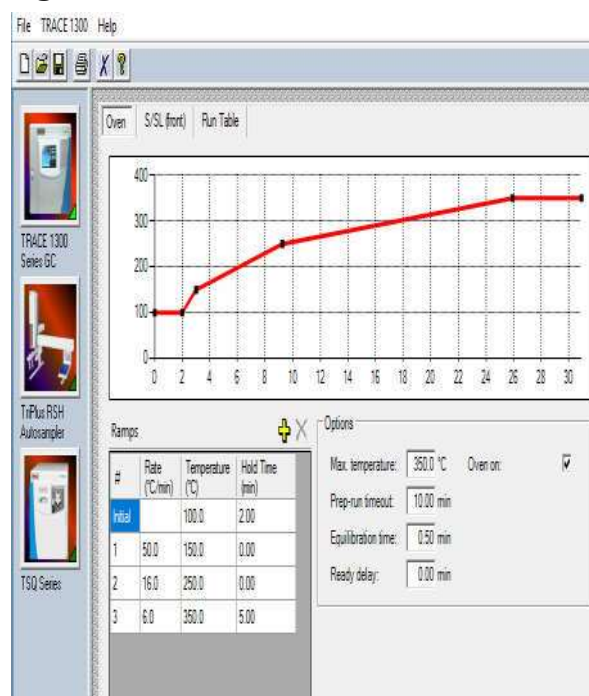
Hình 1. Quy trình xử lý mẫu

2.2.3. Quy trình phân tích mẫu trên thiết bị Thermo Scientific TRACE 1310 Gas Chromatograph - TSQ 9000 Mass Spectrometer (Bảng 1)

Bảng 1. Thiết lập thông số cho thiết bị

Buồng tiêm mẫu	
Kiểu tiêm	Không chia dòng
Nhiệt độ	250°C
Buồng cột	
Nhiệt độ đầu	100°C (giữ 2 phút)
Tốc độ gia nhiệt 1	50°C/phút
Nhiệt độ giữa 1	150°C
Tốc độ gia nhiệt 2	16°C/phút
Nhiệt độ giữa 2	250°C
Tốc độ gia nhiệt 3	6°C/phút
Nhiệt độ cuối	320°C (giữ 5 phút)
Cột	
30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m	TG-5 MS
MS (TSQ 9000)	
Chế độ quét	SRM
Source temp	300°C
Transfer line temp	280°C
Chế độ Ion hoá	EI
Khí va chạm	Heli

Chu trình nhiệt được tối ưu riêng cho thiết bị sử dụng trong nghiên cứu này (Hình 2). Với các thiết bị tương tự cần có quá trình khảo sát cụ thể để đưa ra thông số tối ưu.



Hình 2. Chu trình nhiệt

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thông số MS

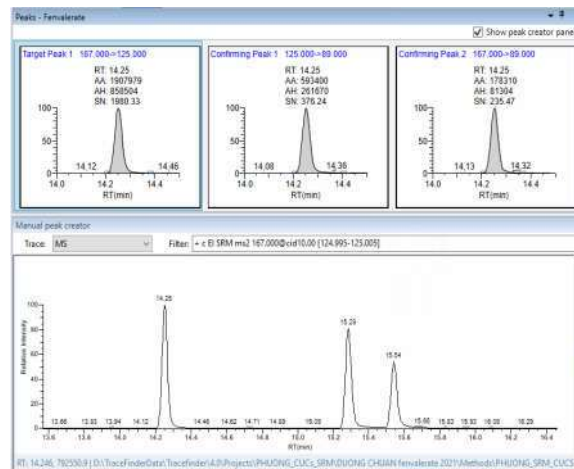
Với các thông số về chu trình nhiệt, nhiệt độ cột, nhiệt độ lò, kiểu tiêm...như đã trình bày ở hình 2, nghiên cứu xây dựng được bảng thông số MS (Mass spectrometry) như sau (Bảng 2).

Bảng 2. Thông số MS

Tên chất	Thời gian lưu (phút)	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
Acrinathrin	12,51	181	152
Acrinathrin	12,51	208,1	180,9
Acrinathrin	12,51	289	93,1
Cyfluthrin	13,88	163	65,1
Cyfluthrin	13,88	163	91,1
Cyfluthrin	13,88	163	127,1
Cyhalothrin	12,28	180,9	152
Cyhalothrin	12,28	197,1	141,1
Cyhalothrin	12,28	207,9	180,9
Cypermethrin	14,19	163	91,1
Cypermethrin	14,19	163	127,1
Cypermethrin	14,19	180,9	152,1
Deltamethrin	16,2	181	152,1
Deltamethrin	16,2	252,8	92,9
Deltamethrin	16,2	252,8	172
Etofenprox	14,5	163,1	77,1
Etofenprox	14,5	163,1	107,1
Etofenprox	14,5	163,1	135,1
Fenvalerate	14,25	125	89
Fenvalerate	14,25	167	89
Fenvalerate	14,25	167	125
Permethrin	13,24	163	91,1
Permethrin	13,24	183,1	153
Permethrin	13,24	183,1	168
Tetramethrin	11,4	164	77,1
Tetramethrin	11,4	164	107,1
Tetramethrin	11,4	164	135,1

Các thông số trên có thể sai lệch tùy điều kiện cụ thể từng thiết bị. Thông số MS thể hiện mảnh

(mass) dùng cho định lượng và hai mảnh (mass) dùng cho khẳng định chất.



Hình 3. Sắc ký đồ Fenvalerate

3.2. Độ chọn lọc

Thực hiện quét toàn khối chất chuẩn, định danh và xác định thời gian lưu của chất cần phân tích. Sau đó lựa chọn mảnh định lượng và các mảnh định danh chất cần phân tích. Tính toán tỉ lệ giữa diện tích tín hiệu mảnh định danh và mảnh định lượng.

Bảng 3. Độ chọn lọc

Tên chất	Tỉ lệ diện tích	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
Acrinathrin	117,22	208,1	180,9
Acrinathrin	25,49	289	93,1
Cyfluthrin	12,29	163	65,1
Cyfluthrin	82,91	163	91,1
Cyhalothrin	98,20	197,1	141,1
Cyhalothrin	94,90	207,9	180,9
Cypermethrin	79,17	163	91,1
Cypermethrin	54,14	180,9	152,1
Deltamethrin	42,58	252,8	92,9
Deltamethrin	38,75	252,8	172
Etofenprox	22,52	163,1	77,1
Etofenprox	82,29	163,1	107,1
Fenvalerate	31,08	125	89
Fenvalerate	9,35	167	89
Permethrin	75,43	163	91,1
Permethrin	90,35	183,1	153
Tetramethrin	77,41	164	77,1
Tetramethrin	49,30	164	135,1

Chỉ số độ chọn lọc giúp xác định chính xác tín hiệu thu được có đúng là chất cần phân tích hay

không. Các chỉ số này có thể sai khác tùy điều kiện cụ thể từng thiết bị.

3.3. Độ tuyến tính

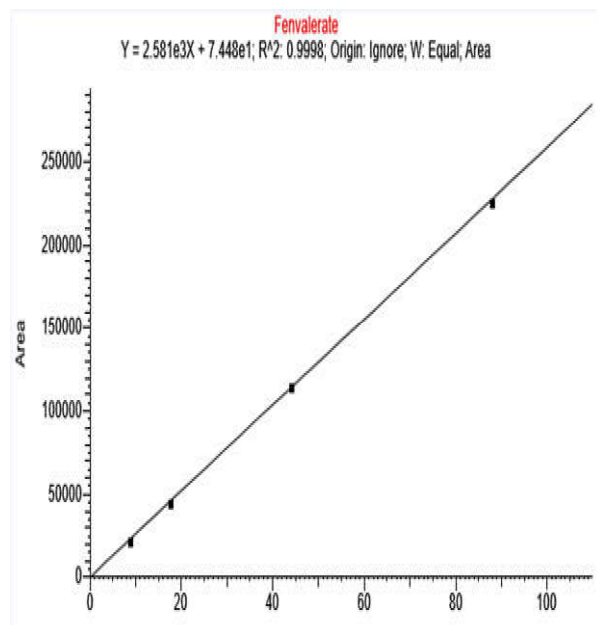
Dựng ba đường chuẩn (khoảng nồng độ từ 0 ppb - 100 ppb) ở ba ngày khác nhau, lập phương trình đường chuẩn, xác định hệ số tương quan (R^2). Kết quả chi tiết được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Độ tuyến tính

Tên chất	A0	A1	Hệ số tương quan (R^2)
Acrinathrin	-5,34E3	1,45E3	0,9957
Cyfluthrin	-3,25E3	1,09E3	0,9954
Cyhalothrin	-2,18E4	4,83E3	0,9987
Cypermethrin	-6,45E4	3,23E3	0,9992
Deltamethrin	-3,23E3	7,25E2	0,9999
Etofenprox	-2,04E5	5,46E4	0,9993
Fenvalerate	7,45E1	2,58E3	0,9998
Permethrin	-8,60E3	3,99E3	0,9991
Tetramethrin	1,73E4	4,44E3	0,9963

Ghi chú: Phương trình đường chuẩn có dạng $Y = A1 \cdot X + A0$.

Kết quả từ bảng 4 cho thấy, độ tuyến tính tương đối tốt với hệ số tương quan (R^2) đều đạt trên 0,995. Kết quả độ tuyến tính trong nghiên cứu tương đồng với kết quả trong một nghiên cứu về so sánh hai phương pháp phân tích thuốc BVTV họ Cúc sử dụng đầu dò ECD (Electron Capture Detection) và MS (Mass Spectrometric) của Sannino và cs (2003) [5].



Hình 4. Đường chuẩn Fenvalerate

3.4. Xác định hiệu suất thu hồi

Chuẩn bị 5 dãy mẫu hồ tiêu xanh, mỗi dãy mẫu gồm 1 mẫu trắng (không thêm chuẩn) 3 mẫu thêm chuẩn lần lượt ở 3 nồng độ khác nhau (2 ppb, 10 ppb, 50 ppb). Tiến hành xử lý và phân tích mẫu theo quy trình như trên. Kết quả hiệu suất thu hồi trung bình của 9 chất trong nghiên cứu được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Hiệu suất thu hồi

Nồng độ thêm ($\mu\text{g/l}$)	Hiệu suất thu hồi (%)
2	89,151
10	89,053
50	90,762
Trung bình (%)	89,655

Kết quả từ bảng 5 cho thấy, hiệu suất thu hồi của phương pháp cho kết quả tương đối tốt (đều trên 89%), đạt yêu cầu phân tích theo AOAC 2007.01.

3.5. Giới hạn phát hiện

Bảng 6. Giới hạn phát hiện

Tên chất	Giới hạn phát hiện (ppb)
Acrinathrin	2,906
Cyfluthrin	3,523
Cyhalothrin	3,831
Cypermethrin	1,642
Deltamethrin	1,942
Etofenprox	2,735
Fenvalerate	1,646
Permethrin	2,941
Tetramethrin	3,453

Chuẩn bị 10 mẫu hồ tiêu xanh đã đồng nhất, thêm chuẩn ở nồng độ sao cho tỉ lệ $S/N = 3$. Tiến hành xử lý và phân tích theo quy trình. Tính S/N trung bình, xác định giới hạn phát hiện của phương pháp. Kết quả được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6 cho thấy, độ nhạy của phương pháp tương đối cao. Độ nhạy của phương pháp càng cao tương ứng với khả năng phát hiện chất cần khảo sát trong mẫu ở nồng độ càng thấp. Giới hạn phát hiện của phương pháp trong khoảng 1,6 ppb - 3,8 ppb. Giới hạn phát hiện trong nghiên cứu này tương đồng với kết quả trong một nghiên cứu về so sánh hai phương pháp phân tích thuốc BVTV họ Cúc sử dụng đầu dò ECD (Electron Capture Detection) và MS (Mass Spectrometric) của Sannino và cs (2003) [5].

3.6. Xác định độ lặp lại

Kỹ thuật viên tiến hành phân tích lặp 5 mẫu thử thêm chuẩn cùng một nồng độ (5 ppb). Tính độ lệch chuẩn tương đối.

Bảng 7. Độ lặp

Tên chất	Nồng độ trung bình (ppb)	Độ lặp (%)
Acrinathrin	5,0	1,37
Cyfluthrin	5,8	1,43
Cyhalothrin	5,63	2,14
Cypermethrin	5,2	2,94
Deltamethrin	5,71	2,21
Etofenprox	5,25	2,62
Fenvalerate	5,88	2,85
Permethrin	5,68	2,08
Tetramethrin	5,22	1,72

Bảng 7 cho thấy, kết quả độ lặp thu được tương đối tốt chứng minh độ ổn định của phương pháp phân tích cao.

3.7. Xác định độ tái lập

Hai kỹ thuật viên tiến hành phân tích 10 lần mẫu thêm chuẩn (nồng độ 5 ppb). Tính độ lệch chuẩn tương đối.

Bảng 8. Độ tái lập

Tên chất	Nồng độ trung bình (ppb)	Độ tái lập (%)
Acrinathrin	5,0	3,69
Cyfluthrin	5,8	2,0
Cyhalothrin	5,63	2,97
Cypermethrin	5,2	2,28
Deltamethrin	5,71	3,31
Etofenprox	5,25	2,99
Fenvalerate	5,88	2,42
Permethrin	5,68	3,25
Tetramethrin	5,22	2,29

Bảng 8 cho thấy, độ tái lập tốt thể hiện độ ổn định của phương pháp cao, đáp ứng yêu cầu phân tích.

3.8. Kết quả kiểm định phương pháp bằng mẫu thật và mẫu thêm chuẩn

Thực hiện phân tích 5 mẫu hồ tiêu xanh được thu thập tại Kon Tum (A1 - A5). Lựa chọn ngẫu nhiên 3 trong 5 mẫu là A1, A3, A5 thực hiện thêm chuẩn với nồng độ lần lượt là 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb. Xử lý mẫu và phân tích đồng thời các mẫu trên. Kết quả thu được như sau:

+ Các mẫu A1, A2, A3: kết quả tất cả các chất đều không phát hiện.

+ Các mẫu A4, A5 có phát hiện Cypermethrin nhưng nằm ngoài giới hạn định lượng của phương pháp.

+ Kết quả 3 mẫu thêm chuẩn được thể hiện ở bảng 9.

Bảng 9. Kết quả mẫu thêm chuẩn

Chỉ tiêu	Kết quả mẫu thêm chuẩn		
	A1 10 ppb	A3 20 ppb	A5 50 ppb
Acrinathrin	9,22 ppb	20,94 ppb	48,94 ppb
Cyfluthrin	8,96 ppb	23,99 ppb	42,82 ppb
Cyhalothrin	10,42 ppb	22,3 ppb	54,55 ppb
Cypermethrin	9,05 ppb	19,03 ppb	51,31 ppb
Deltamethrin	10,84 ppb	21,2 ppb	44,92 ppb
Etofenprox	8,85 ppb	16,9 ppb	45,89 ppb
Fenvalerate	9,49 ppb	20,89 ppb	47,87 ppb
Permethrin	8,38 ppb	22,53 ppb	54,75 ppb
Tetramethrin	8,02 ppb	16,05 ppb	41,38 ppb

Bảng 9 cho thấy, kết quả mẫu thêm chuẩn có sự sai lệch giữa nồng độ lý thuyết và nồng độ thực tế lần lượt là 8%, 2% và 4%. Kết quả này đáp ứng yêu cầu phân tích.

Kết quả nghiên cứu này có sự tương đồng với nghiên cứu của Lin và cs (2018) về phân tích thuốc BVTV họ Cúc trong rau quả tại Trung Quốc [4] và kết quả trong một nghiên cứu về so sánh hai phương pháp phân tích thuốc BVTV họ Cúc sử dụng đầu dò ECD (Electron Capture Detection) và MS (Mass Spectrometric) của Sannino và cs (2003) [5].

4. KẾT LUẬN

Phương pháp đáp ứng yêu cầu phân tích với độ tuyến tính cao ($R^2 > 0,995$); hiệu suất thu hồi lớn hơn 89%; độ ổn định của phương pháp tương đối tốt với độ lệch chuẩn nhỏ hơn 3%; giới hạn phát hiện thấp nhất đạt 1,6 ppb; kết quả kiểm định phương pháp bằng mẫu thật thêm chuẩn cho thấy sai số giữa nồng độ thực tế và lý thuyết dưới mức 10%.

Kết quả này có thể được kế thừa để xây dựng phương pháp phân tích trên các nền mẫu tương đồng khác và ứng dụng vào các nghiên cứu liên quan đến thuốc BVTV họ Cúc trên nền mẫu hồ tiêu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài cấp cơ sở của Viện Công nghệ Môi trường “Phân tích hàm lượng dư lượng thuốc bảo vệ thực vật họ Cúc

(Pyrethroid) trong hạt hồ tiêu xanh giai đoạn thu hoạch trên thiết bị GC/MS/MS”, mã số CSCL.09/21-21.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dinh Xuan Tung, Dang Thi Phuong Lan, Cu Thi Thanh Phuc, Nguyen Thi Thao, Lai Thi Thu Hang, Pham Thi Tam, Nguyen Thi Hang Nga, Le Thanh Tung (2018). Evaluation of the current status of pesticide use and management of used pesticide containers in some communes of Can Giuoc district, Long An province. *Vietnam Science and Technology Journal* – No 6 (91)/2018, 106 - 109 (in Vietnamese).
2. Hoàng Hiệp (2021). *Báo cáo thị trường hồ tiêu quý II, năm 2021*, VietnamBiz, quý II/2021.
3. AOAC - 2007. 01. Pesticide Residues in Foods

by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.

4. Lin, X. Y., Mou, R. X., Cao, Z. Y., Cao, Z. Z., & Chen, M. X. (2018). Analysis of pyrethroid pesticides in Chinese vegetables and fruits by GC–MS/MS. *Chemical Papers*, 72 (8), 1953 - 1962. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0447-1>.

5. Sannino, A., Bandini, M. & Bolzoni, L. (2003) Determination of Pyrethroid Pesticide Residues in Processed Fruits and Vegetables by Gas Chromatography with Electron Capture and Mass Spectrometric Detection. <https://academic.oup.com/jaoac/article/86/1/101/5656968>.

DEVELOPING A METHOD OF ANALYZING PESTICIDES RESIDUES USING QUECHERS AOAC 2007.01 ON GC/MS/MS EQUIPMENT

Le Minh Tuan^{1*}, Nguyen Ngoc Phuong¹,
 Nguyen Le Kim Phung¹, Le Thu Thuy²

¹Centre of Environment Technology in Ho Chi Minh city, Institute of Environmental Technology,
 Vietnam Academy of Science and Technology

* Email: tuanlm@ietvn.vn

²Ha Noi University of Natural Resources and Environment

Summary

A new method was developed base on AOAC 2007.01 standard applied to analysis of Pyrethroid pesticides residues in vegetable and fruit by Gas chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry (GC/MS/MS) system using QuEChERS for sample preparation. Analysis of Pyrethroid pesticides compounds: Acrinathrin, Cyfluthrin, Cyhalothrin, Cypermethrin, Deltamethrin, Etofenprox, Fenvalerate, Permethrin, Tetramethrin in green pepper. QuEChERS using for sample preparation and extraction to reduce of fatty acid or colors affects. The final liquid extraction will be analysis by Gas chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry (GC/MS/MS). The result of this study showed that the linearity (R^2) of the method for each analyte was over 0.995; the recovery efficiency on each sample platform was over 89% with the best standard deviation of the method reached 1.37%; the lowest detection limit of the method was 1.642 ppb.

Keywords: Gas chromatography/mass spectrometry, Pyrethroid pesticides, AOAC 2007.01, QuEChERS.

Người phản biện: TS. Trần Đăng Ninh

Ngày nhận bài: 03/11/2021

Ngày thông qua phản biện: 03/12/2021

Ngày duyệt đăng: 10/12/2021