

Phân tích hóa chất bảo vệ thực vật fenitrothion và fenobucarb trong đối tượng mẫu cá bằng phương pháp phân tích sắc ký khí

Nguyễn Thúy Ngọc*, Dương Hồng Anh, Nguyễn Thị Kim Cúc,
Nguyễn Hoàng Tùng, Trương Thị Kim, Phạm Hùng Việt

*Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Môi trường và Phát triển Bền vững,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 15 tháng 10 năm 2012

Tóm tắt. Fenobucarb và fenitrothion là hai hóa chất bảo vệ thực vật (HC BVTV) cơ photpho và carbamat được sử dụng phổ biến và đang được lưu hành (trong danh mục HC BVTV của bộ NN và PTNT - No. 10 /2012) để trừ sâu bệnh cho cây trồng. Sự tồn dư của HC BVTV nói chung và 2 hóa chất này nói riêng luôn phải được thường xuyên theo dõi trong môi trường và đặc biệt là trong các mẫu thực phẩm. Cá là loại thực phẩm được người dân sử dụng với số lượng lớn. Cá được xem là một chỉ thị sinh học để kiểm soát sự tồn dư HC BVTV. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát qui trình phân tích fenobucarb và fenitrothion trong mẫu cá sử dụng phương pháp chiết đồng hóa mẫu với dung môi axetonitril, làm sạch dịch chiết sử dụng cột C18, NH₂ và than hoạt tính; và sử dụng thiết bị sắc ký khí khối phổ để định tính và định lượng. Hiệu suất thu hồi của qui trình phân tích thu được đối với fenobucarb là 91% (với CV là 5,9%) và với fenitrothion là 79% (với CV là 6,7%). Giới hạn phát hiện (MDL) của fenobucarb là 0,87 ng/g và fenitrothion là 2,03 ng/g mẫu khô. Phương pháp phân tích này hoàn toàn có thể áp dụng để xác định lượng tồn dư lượng vết của 2 HC BVTV fenobucarb và fenitrothion trong mẫu cá với hiệu suất cao và độ lệch chuẩn tương đối thấp (CV<10%). Áp dụng qui trình phân tích này vào phân tích mẫu cá môi trường và đã phát hiện thấy 2 HC BVTV fenobucarb và fenitrothion.

1. Mở đầu

Hàng năm, Việt Nam sử dụng một lượng lớn HC BVTV, theo con số thống kê là trên 70.000 tấn thành phẩm (Tạp chí Môi trường số 05/2011). Do vậy, sự tồn dư các HC BVTV trong môi trường là không thể tránh khỏi. Sự tồn dư đó có thể ngay chính trên thực phẩm như

rau, lúa cũng và sau đó có thể đi qua một chu trình vận chuyển, tích lũy sinh học. Con người là mắt xích cuối cùng của chuỗi thức ăn đó và sẽ phải tiếp nhận sự tồn dư các loại hóa chất không mong muốn ở mức độ cao. HC BVTV cơ clo được sản xuất và dùng đại trà từ những năm 1970-1980, hiện đã bị cấm và thay thế bằng các HC BVTV cơ photpho, nitơ, carbamat và pyrethroid. Fenitrothion và Fenobucarb là hai thuốc trừ sâu cơ photpho và carbamat có trong danh mục HC BVTV đang được phép sử dụng

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-917655657.
E-mail: ngthngoc@yahoo.com

ở Việt Nam [3]. Fenitrothion và Fenobucarb là những hoạt chất trừ sâu có nhiều trong các sản phẩm thương mại như Difetigi 75EC, Subatox 75EC, Sumibass 75EC.... Chúng chủ yếu để trừ rầy nâu, sâu cuốn lá, sâu đục thân, bọ xít cho lúa; rệp sáp cho cây có múi, cây cà phê.

Một số HC BVTV họ cơ photpho, nitơ, cacbamát và pyrethroid có độc tính cao với hệ sinh thái và con người, tuy nhiên, thời gian phân hủy của chúng trong môi trường nhanh hơn. Các hợp chất này có khuynh hướng tan trong nước và hấp thụ yếu trong đất. Do rửa trôi từ hoa màu, đất, hay nước tưới tiêu, các HC BVTV có mặt trong nước. Cá là một loại sinh vật sống trong nước. Chúng sẽ bị hấp thụ và tích lũy trong cơ thể HC BVTV nếu trong môi trường nước có những hóa chất đó. Hiện nay việc kiểm soát, theo dõi lượng HC BVTV trong thực phẩm là rất cần thiết được tiến hành thường xuyên và cá là một trong những loại thực phẩm được người dân sử dụng nhiều trong ăn uống. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện việc khảo sát xây dựng qui trình phân tích 2 HC BVTV fenitrothion và fenobucarb đang được phép sử dụng trong đối tượng mẫu cá để đóng góp vào việc kiểm soát theo dõi sự tồn dư của HCBVTV trong mẫu thực phẩm nói chung.

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất

- n-Hexan, GC và p.a, Merck
- Axeton, p.a, Merck
- Axetonitril, p.a, Merck
- Toluene, p.a, Merck
- Cột chiết pha rắn amin bậc 1: NH₂ – OROCHEM – SY NH₂ 2000-12
- Cột chiết pha rắn C18: RP-18-Merck K91203423

- Than hoạt tính, loại cho sắc ký, kích cỡ hoạt 0,3-0,5mm, Merck (Lot: A875731 730); (P/N:1.09631.0500)

Các dung dịch chuẩn gốc cho phân tích:

- Chất nội chuẩn (IS): Chrysen - d12 10 µg/mL trong cyclohexan, Dr.Ehrenstorfer, Đức.
- Chất đồng hành (SR): Diazinon - d10 10 µg/mL trong axeton, Dr.Ehrenstorfer, Đức, (XA12210100AC).
- Fenitrothion, Dr.Ehrenstorfer, Đức, (C13480000).
- Fenobucab, 10 ng/µL trong cyclohexan, Dr.Ehrenstorfer, Đức (L13485000CY)
- Hỗn hợp chuẩn Pesticides Mix 6, 100 µg/ml trong toluen, LGC, Đức (SL21964)

2.2. Thiết bị và dụng cụ

- Cân phân tích Metler, Thụy Sĩ
- Máy lắc Voltex, Đức
- Máy đồng hóa mẫu KIKA, Đức
- Thiết bị cô cất chân không Buchi, Thụy Sĩ
- Thiết bị đông khô mẫu, Alpha, Mỹ
- Thiết bị sắc khí ký GCMS 2010 với detector khối phổ, Shimadzu, Nhật Bản
- Dụng cụ: bình định mức 1ml, 5ml, 10ml; Bình cầu 250ml; Phễu thủy tinh; Cốc thủy tinh 100ml, 250ml; Ống đong 100ml; Cột làm sạch d.0.5cm, 1.20cm; Ống nghiệm chia vạch 10ml; Lọ đựng mẫu nhỏ 4ml, 2ml.

2.3. Khảo sát điều kiện chạy sắc ký

Mẫu chuẩn đơn fenitrothion và fenobucarb, diazinon-d10 (SR) và chrysen-d12 (IS) được chạy chế độ Scan trên thiết bị GC/MS 2010, Shimadzu để xác định thời gian lưu và các mảnh khối đặc trưng. Sau khi xác định được mảnh phổ, thời gian lưu, hỗn hợp chuẩn được

chuyển sang chạy trên máy với chế độ SIM. Tối ưu hóa các điều kiện phân tích để nhận được tín hiệu tách rõ ràng và cường độ tín hiệu tốt nhất.

Bom hỗn hợp chuẩn nồng độ nhỏ vào thiết bị sắc ký để xác định giới hạn phát hiện của thiết bị (IDL) và sau đó tiến hành bơm dãy nồng độ chuẩn để lập đường chuẩn.

2.4. Thu thập và bảo quản mẫu

Mẫu cá sau khi được thu thập về, loại bỏ đầu, vây và vây. Rửa sạch bằng nước thường. Sau đó lạng bỏ phần xương. Phần thịt cá được thái lát mỏng đem đi đông khô. Mẫu sau khi khô được đựng trong các lọ màu nâu, đậy nắp, dán nhãn và bảo quản trong tủ lạnh sâu (-18°C).

2.5. Khảo sát qui trình xử lý mẫu

Quy trình phân tích mẫu: bao gồm giai đoạn chiết bằng phương pháp đồng hóa mẫu, làm sạch/làm giàu bằng chiết pha rắn, phân tích định tính và định lượng bằng phương pháp sắc ký khí với các detector chuyên dụng.

Thịt cá đã được đông khô đem xay nghiền mịn thành dạng bột bằng máy xay sinh tố. Cân 2 g mẫu cho vào lọ thủy tinh, thêm chất đồng hành diazinon-d10, đồng hóa mẫu với dung môi axetonitril. Dịch mẫu trong dung môi chiết axetonitril được cô cất chân không về 1ml và sau đó được làm sạch qua cột C18, cột NH₂, cột than (0,5g than/ cột thủy tinh dài 20cm x đường kính 0,5cm). Thể tích dung môi rửa giải các

thuốc trừ sâu trên các cột làm sạch cần phải được khảo sát. Chuyển đổi dung môi và thêm chất nội chuẩn chrysen-d12, trước khi bơm mẫu vào thiết bị sắc ký.

Thêm chất chuẩn Fenobucarb và fenitrothion vào mẫu cá và tiến hành toàn bộ qui trình xử lý mẫu, thực hiện làm mẫu lặp, xác định hiệu suất thu hồi, độ chính xác, độ lặp lại của phương pháp.

3. Kết quả

3.1. Phân tích trên GCMS:

* Điều kiện chạy GC/MS như sau:

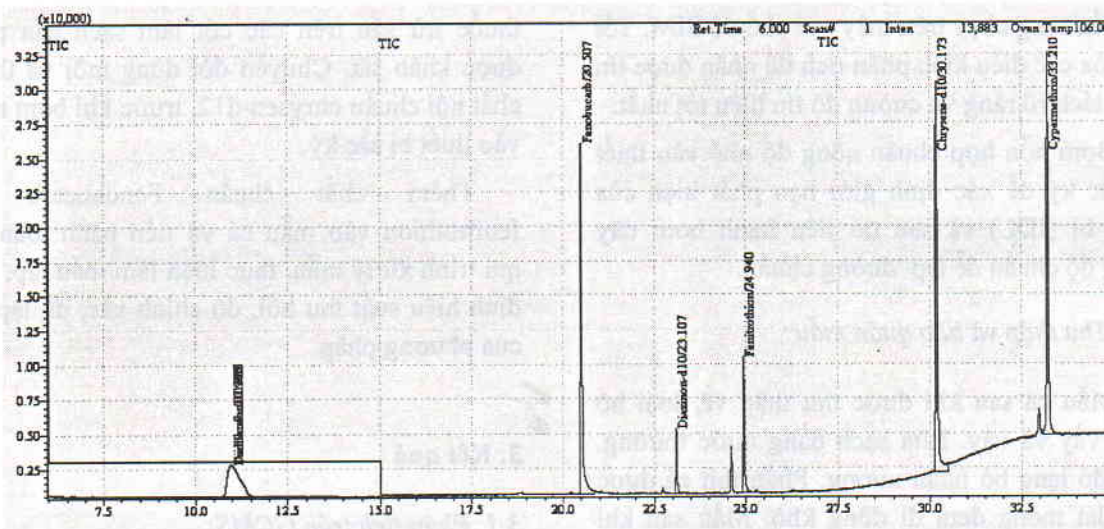
Cột tách mao quản OV-5MS (30m x 0,25mm I.d, 0,25 μm), khí mang He qua cột với tốc độ 0,65ml/phút với Chương trình nhiệt độ của lò: bắt đầu từ 100°C giữ 3 phút sau tăng lên 120°C với tốc độ 2°C/phút và tiếp tục tăng lên 300°C với tốc độ 10°C/phút, giữ ở 300°C trong 10 phút. Nhiệt độ của cổng bơm mẫu: 250°C; nguồn ion: 230°C; detector: 290°C.

Thế của detector: ±0,2kV so với kết quả của file tuning; Thời gian cất dung môi: 5 phút. Chương trình chạy MS từ 6 đến 35 phút theo chế độ chọn lọc ion (SIM) với các mảnh phổ đặc trưng và so sánh được trình bày trong bảng 1.

*Mảnh phổ đặc trưng của TTS, chất nội chuẩn và chất đồng hành:

Bảng 1. Thời gian lưu và mảnh khối

Chất phân tích	Thời gian lưu (phút)	Mảnh khối (m/z)	
		Định lượng	So sánh
Fenobucarb	20,56	121	150
Diazinon-d10 (SR)	23,13	183	314, 138
Fenitrothion	24,97	277	260, 125
Chrysen-d12 (IS)	30,21	240	236



Hình 1. Sắc đồ chuẩn Fenitrothion và Fenobucarb nồng độ 100ppb.

***Giới hạn phát hiện của thiết bị (IDL):**

Fenobucarb và fenitrothion được bơm 2μl ở nồng độ 10ppb vào thiết bị GC 2010-MS, Shimadzu lặp lại 7 lần. Giới hạn phát hiện của thiết bị đối với mỗi chất được tính bằng 3 lần

độ lệch chuẩn của tín hiệu chất phân tích với chất nội chuẩn của tất cả các lần đo. Kết quả được trình bày trong bảng 2 dưới đây. IDL của fenobucarb là 0,354 ppb và IDL của fenitrothion là 1,019 ppb.

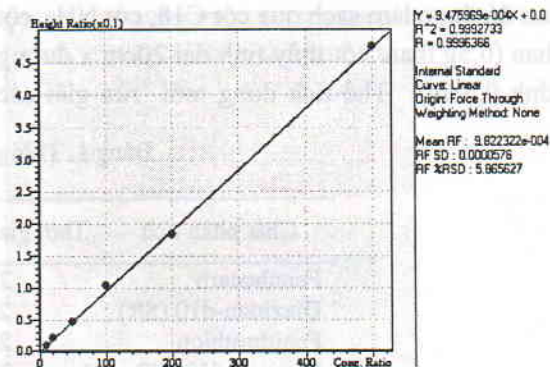
Bảng 2. Giới hạn phát hiện của Fenobucarb và Fenitrothion trên thiết bị GC2010-MS, Shimadzu

Tên chất	1	2	3	4	5	6	7	TB	Nồng độ (ppb)	SD	SD (ppb)	3SD (ppb)
	H/His	H/His	H/His	H/His	H/His	H/His	H/His					
Fenobucarb	0,0296	0,0300	0,0303	0,0296	0,0303	0,0301	0,0306	0,0301	10	0,0004	0,118	0,354
Fenitrothion	0,0028	0,0026	0,0027	0,0029	0,0028	0,0027	0,0029	0,0028	10	0,0001	0,340	1,019

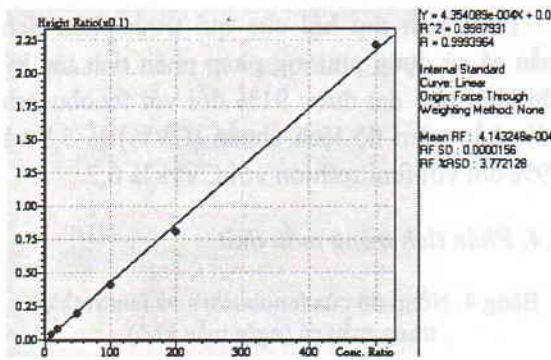
H: chiều cao tín hiệu phân tích; His: Chiều cao tín hiệu nội chuẩn; TB: giá trị trung bình; SD: độ lệch chuẩn.

*** Dựng đường chuẩn:**

Đường chuẩn của fenobucarb và fenitrothion được lập trên thiết bị GC2010-MS của Shimadzu theo phương pháp nội chuẩn trong khoảng nồng độ từ 10 - 500ppb với hệ số tuyến tính (R) là 0,9996 đối với fenobucarb và 0,9993 đối với fenitrothion.



Hình 2. Đường chuẩn Fenobucarb.



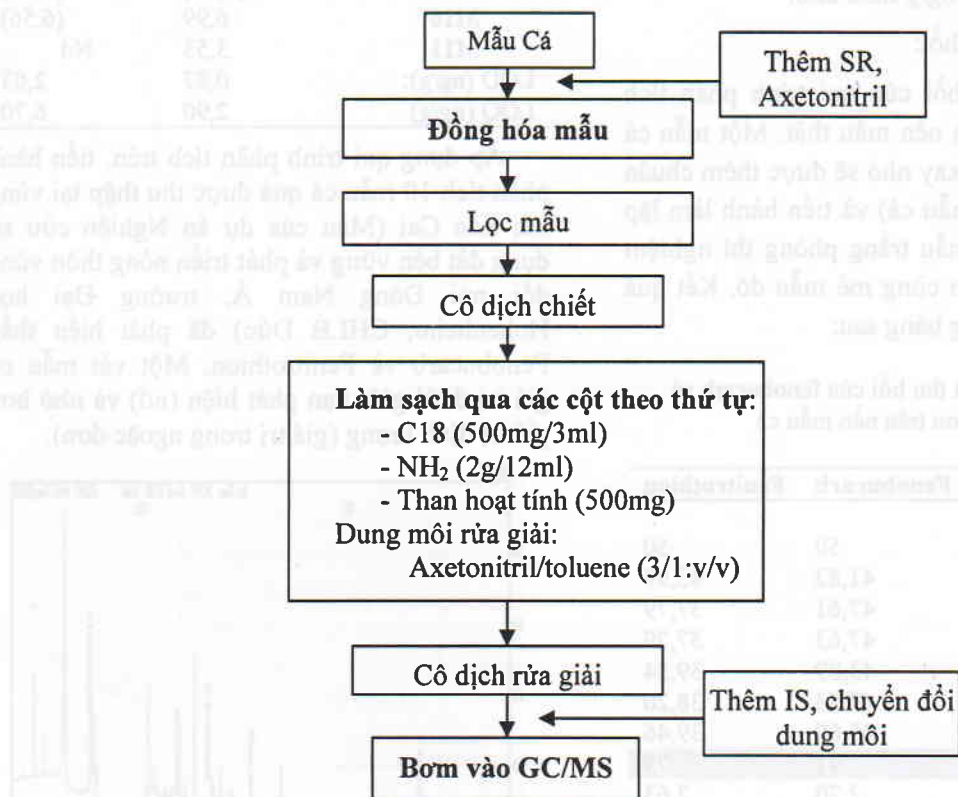
Hình 3. Đường chuẩn Fenitrothion.

3.2. Quy trình xử lý mẫu

Thịt cá đã được đông khô đem xay nghiền mịn thành dạng bột bằng máy xay sinh tố. Cân 2 g mẫu cho vào lọ thủy tinh, thêm chất đồng

hành diazinon-d10, đồng hóa mẫu đã xay trong thời gian 5 phút với dung môi axetonitril. Lọc mẫu qua lớp muối Na_2SO_4 khan.

Dịch mẫu trong dung môi chiết axetonitril được cô cất chân không về 1ml và sau đó được làm sạch qua cột C18 (5mg/3ml, RP-18-Merck K91203423), cột NH_2 (2g/12ml, OROCHEM - SY NH_2 2000-12) và cột than (0,5g/thủy tinh 20cm x d.0,5cm). Thứ tự rửa giải các thuốc trừ sâu trên các cột như sau 8, 30 và 30 ml bằng hỗn hợp dung môi axetonitril và toluen (tỷ lệ 3/1:v/v). Dịch rửa giải được cô về 1ml, thêm 10ml hỗn hợp dung môi hexan/axeton (tỷ lệ 1/1: v/v) và chất nội chuẩn chrysen-d12, cô về 1ml bằng khí N_2 . Bơm 2 μl mẫu vào thiết bị GC 2010, Shimadzu.



Hình 4. Tóm tắt quy trình xử lý mẫu cá.

3.3. Giới hạn phát hiện (MDL), hiệu suất thu hồi

* Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL):

Dung dịch chuẩn fenobucarb nồng độ 26 ng/ml và fenitrothion nồng độ 18 ng/ml được thêm vào nền mẫu cá sạch 2g. Nền mẫu cá sạch là mẫu thịt cá đã được chiết bằng dung môi axetonitril nhiều lần. Sau khi chiết xong, thịt cá được sấy để bay hết dung môi ở 60°C qua đêm. Tiến hành làm 5 mẫu lặp thêm chuẩn, một mẫu trắng (mẫu nền cá) thực hiện toàn bộ qui trình phân tích từ khâu xử lý mẫu đến khi phân tích trên máy. Kết quả MDL nhận được sẽ được tính bằng 3 lần độ lệch chuẩn (SD) của các kết quả sau khi đã trừ đi mẫu trắng. MDL của Fenobucarb là 0,87 ng/g mẫu khô và fenitrothion là 2,03 ng/g mẫu khô.

* Hiệu suất thu hồi:

Hiệu suất thu hồi của qui trình phân tích được thực hiện trên nền mẫu thật. Một mẫu cá đã được đông khô, xay nhỏ sẽ được thêm chuẩn (nồng độ 50 ng/g mẫu cá) và tiến hành làm lặp 5 lần. Mẫu cá và mẫu trắng phòng thí nghiệm cũng phải được làm cùng mẻ mẫu đó. Kết quả được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3. Hiệu suất thu hồi của fenobucarb và fenitrothion trên nền mẫu cá

Tên chất	Fenobucarb	Fenitrothion
Nồng độ thêm (ng/g mẫu)	50	50
M1	41,82	43,99
M2	47,61	37,79
M3	47,63	37,79
M4	43,89	39,54
M5	47,53	38,20
Trung bình (ng/g)	45,69	39,46
H (%)	91	79
SD	2,70	2,63
CV(%)	5,90	6,67

M1 đến M5: ký hiệu mẫu lặp; H: hiệu suất thu hồi; SD: độ lệch chuẩn; CV: phần trăm độ lệch chuẩn.

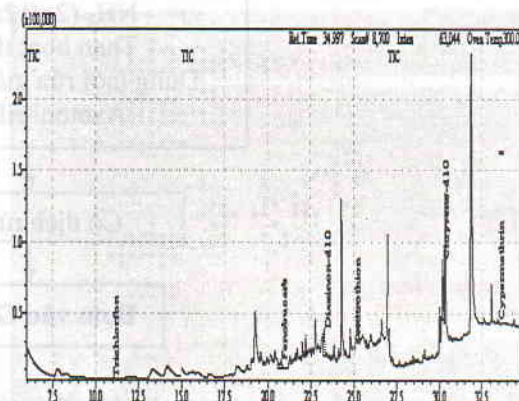
Hiệu suất thu hồi của qui trình phân tích mẫu cá sử dụng phương pháp phân tích sắc ký khí khối phổ đạt được 91% đối với fenobucarb với phần trăm độ lệch chuẩn (CV%) là 5,9 và 79% đối với fenitrothion với CV% là 6,7.

3.4. Phân tích trong mẫu thật

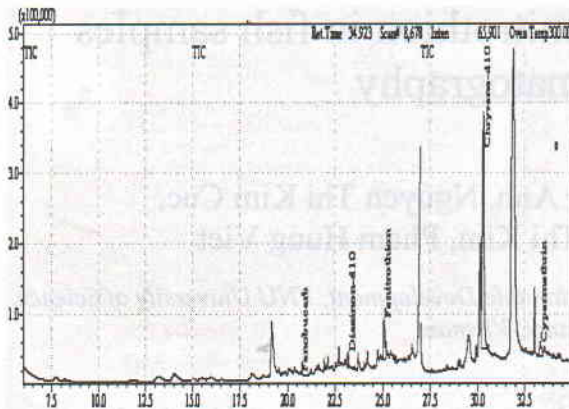
Bảng 4. Nồng độ của fenobucarb và fenitrothion trong mẫu cá (ng/g mẫu khô)

Ký hiệu mẫu	Fenobucarb	Fenitrothion
M1	12,46	16,80
M2	7,09	168,73
M3	9,88	96,60
M4	15,38	137,55
M5	9,14	165,48
M6	4,71	68,25
M7	15,72	11,81
M8	12,27	(6,09)
M9	(1,55)	(3,44)
M10	6,99	(6,56)
M11	3,53	Nd
LOD (ng/g):	0,87	2,03
LOQ (ng/g)	2,90	6,70

Áp dụng qui trình phân tích trên, tiến hành phân tích 10 mẫu cá quả được thu thập tại vùng núi Lào Cai (Mẫu của dự án Nghiên cứu sử dụng đất bền vững và phát triển nông thôn vùng đồi núi Đông Nam Á, trường Đại học Hohenheim, CHLB Đức) đã phát hiện thấy Fenobucarb và Fenitrothion. Một vài mẫu có giá trị dưới giới hạn phát hiện (nd) và nhỏ hơn giá trị định lượng (giá trị trong ngoặc đơn).



Hình 5. Sắc đồ mẫu M1.



Hình 6. Sắc đồ mẫu M5.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát qui trình phân tích hai dư lượng HC BTV fenobucarb và fenitrothion trong mẫu cá bằng phương pháp sắc ký khí với detector khối phổ. Qui trình xử lý mẫu cá bao gồm chiết lỏng rắn sử dụng kỹ thuật đồng hóa mẫu với dung môi axetonitril, sau đó dịch chiết được làm sạch qua 3 cột: C18 loại chất hydrocarbon mạch dài, protein; NH₂ để loại chất béo và than hoạt tính để loại chất màu và giữ các chất hữu cơ khác. Dung môi rửa giải là hỗn hợp axetonitril và toluen tỷ lệ 3/1:v/v. Dịch chiết cuối cùng được bơm lên sắc ký khí khối phổ GC/MS để định tính và định lượng fenobucarb và fenitrothion. Hiệu suất thu hồi của qui trình phân tích đạt được đối với fenobucarb là 91% (với CV là 5,9%) và với fenitrothion là 79% (với CV là 6,7%). Giới hạn phát hiện (MDL) của fenobucarb là 0,87 ng/g và fenitrothion là 2,03 ng/g mẫu khô. Áp dụng phương pháp phân tích này vào phân tích một

số mẫu cá môi trường và đã phát hiện thấy hai HC BTV fenobucarb và fenitrothion.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ một phần tài chính từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường (TN-12-45), trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Các tác giả cũng xin cảm ơn Dự án Nghiên cứu sử dụng đất bền vững và phát triển nông thôn vùng đồi núi Đông Nam Á, trường Đại học Hohenheim, CHLB Đức đã cung cấp mẫu cá cho nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Satoshi Takatori, Masahiro Okihashi, Yoko Kitagawa, Naoki Fukui, You kakimoto-Okamoto and Hiroataka Obana "Rapid and Easy Multiresidue method for determination of Pesticide Residues in Foods Using Gas or Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *Pesticides-Strategies for Pesticides Analysis*, Osaka Prefectural Institute of Public Health Japan, 197-214.
- [2] Research Center for Environment Technology and Sustainable Development (CETASD) and The United Nation University - Assessment of contamination and potential toxic impacts of pesticides in Northern Vietnam. Interim report. Ha noi, December, 2007.
- [3] Thông tư 10/2012/TT-BNN&PTNT về việc ban hành Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng, hạn chế sử dụng, cấm sử dụng ở Việt Nam, ngày 22/2/2012.
- [4] Fei Sun, Sue-sunwong, Gwo-chenli and Shiu-nanchen, "Multiresidue determination of Pesticides in fishery products by atandem solid-phase extraction technique", *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol.13, No.2, 2005, pages 151-158.

Analysis of fenobucarb and fenitrothion in fish samples using gas chromatography

Nguyen Thuy Ngoc, Duong Hong Anh, Nguyen Thi Kim Cuc,
Nguyen Hoang Tung, Truong Thi Kim, Pham Hung Viet

*Research Centre for Environmental Technology and Sustainable Development, VNU University of Science,
334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

Fenobucarb and fenitrothion are two of the phosphorous and carbamat pesticides that have been using widespeed and are in the List of Using Aceptable Pesticides in VietNam, (No. 10 /2012/TT-BNNPTNT). In general, the residues of all pesticides must be mornitored and controlled regularly in environment and specially in the food samples. Fish is one kind of food which is used in a huge amount for family meal. Fish is considered is one bio-indicator for control of pesticides residue in the environment. In this study, the analytical method of fenobucarb and fenitrothion in fish is carried out using the sample extraction with acetonitril by homogenization, clean-up with 3 columns contain adsorbants such as C18, NH₂ and active carbon; qualitation and quantification by gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS). Recoveries of fenobucarb and fenitrothion are 91% and 79% with relative standard deviation values (CV) are 5.9% and 6.7%, respectively. Method detection limits (MDL) are reached 0.87 ng/g dried sample with fenobucarb and 2.03ng/g dried sample with fenitrothion. This analytical method can be applicable to determine the residues of fenobucarb and fenitrothion in fish with high recoveries and low relative standard deviation values (CV<10%).The analytical method was applied to fish samples which were collected in fresh water environment and fenobucarb and fenitrothion in fish were found.