

Xác định quy trình phân tích hoạt chất trừ sâu chlorpyrifos ethyl từ đất

Trương Quốc Tất*, Dương Minh Viễn

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng Dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định quy trình phân tích chlorpyrifos ethyl (CE) trong đất canh tác nông nghiệp đạt hiệu suất cao nhất ở điều kiện phòng thí nghiệm Sinh học đất, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng Dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Thí nghiệm được thực hiện qua các giai đoạn: kiểm tra hiệu suất trích của 2 phương pháp trích Soxhlet và lắc; kiểm tra hiệu suất giữa 2 phương pháp cô mẫu bằng cách cho thổi khí N₂ và để bay hơi tự nhiên; kiểm tra hiệu suất của 2 loại cột làm sạch mẫu Alumina và Florisil; kiểm tra hiệu suất trích mẫu với 5 loại dung môi hữu cơ gồm Acetone, Toluene:Acetone 2:1, cho nước vào đất vortex cho tan đều sau đó cho Toluene:Acetone 2:1, DCM và Diethyl ether; cuối cùng phân tích hàm lượng CE bằng máy sắc ký khí khối phổ GC/MS-QP2010. Kết quả thí nghiệm đã xác định được quy trình trích CE trong đất đạt hiệu suất khoảng 40 - 50% như sau: sử dụng dung môi trích là Diethyl ether, trích mẫu bằng phương pháp lắc, chất làm sạch là Alumina loại cột nhỏ, thu dịch trích ở lần phân tách thứ nhất, cô mẫu bằng cách để bay hơi tự nhiên.

Từ khóa: Chlorpyrifos ethyl, cột lọc, dung môi, sắc ký khí, trích.

1. Mở đầu

Một loại thuốc Bảo vệ Thực vật (BVTV) được xem là có tính bền khi nó vẫn còn tồn tại trong đất ở mức có thể phát hiện ra được sau thời gian sử dụng cho đến mùa vụ tiếp theo [1]. Việc sử dụng phổ biến thuốc BVTV có thể gây ô nhiễm môi trường và trở thành một mối đe dọa đối với sức khỏe của con người bởi những chất này có tiềm năng gây ung thư. Trong đó, Chlorpyrifos ethyl là hoạt chất diệt côn trùng gốc lân hữu cơ, thuộc nhóm độc II, có tính chất gây độc thần kinh ở mức cao. Chlorpyrifos ethyl có DT₅₀ khoảng 60-100 ngày nên phân

giải chậm trong đất [2]. Chlorpyrifos ethyl có khả năng hấp phụ hoàn toàn vào đất do có chỉ số K_{oc} khá cao, dao động từ 652 l/kg đối với đất ít chất hữu cơ (1,35% chất hữu cơ) đến 30.381 l/kg với đất giàu hữu cơ (3,41% carbon hữu cơ) [3]. Khi Chlorpyrifos ethyl vào trong đất sẽ chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố lý, hóa, sinh. Những yếu tố này có thể kết hợp làm ảnh hưởng đến tính bền của thuốc, bao gồm sự phân hủy hóa học và sinh học, hay làm ảnh hưởng đến tính di động của thuốc, bao gồm sự hấp phụ trên tầng mặt, sự hấp thụ từ thực vật, bay hơi, xói mòn do gió, rửa trôi và trực di [4]. Chính vì những đặc tính trên, việc xác định lưu tồn của Chlorpyrifos ethyl ở trong nước, nông sản, cây trồng và các mẫu đất trong môi trường đã là đề tài nghiên cứu chính trong rất nhiều năm. Dựa

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-1228739392.

Email: tqtat83@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4537>

trên cơ sở các quy trình phân tích thuốc BVTV của phòng thí nghiệm Rosenberg, Khoa Môi trường, trường Đại học Rutgers, Hoa Kỳ để xác định được một quy trình phân tích Chlorpyrifos ethyl trong đất cho hiệu suất cao và phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm Sinh học đất, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ nên nghiên cứu này đã được thực hiện. Hiệu quả của việc trích Chlorpyrifos ethyl từ đất khảo sát lưu tồn phụ thuộc vào ba giai đoạn chính của quá trình trích gồm: sử dụng dung môi thích hợp để trích thuốc từ đất sang dung môi, làm sạch dịch trích nhằm loại bỏ các loại tạp chất, qui trình nhiệt phù hợp để phân tích trên GC/MS [5].

2. Phương pháp

Các phương pháp trong nghiên cứu này được thực hiện theo phương pháp phân tích thuốc BVTV của phòng thí nghiệm Rosenberg, Khoa Môi trường, Trường Đại học Rutgers, Hoa Kỳ. Việc thiết lập qui trình phân tích thuốc được bố trí thí nghiệm qua từng bước nhằm xác định hiệu suất trích tối ưu nhất ở từng giai đoạn. Các giai đoạn của quy trình phân tích cụ thể như sau:

2.1. Kiểm tra phương pháp trích mẫu từ đất

Thí nghiệm được thực hiện với mục tiêu kiểm tra hiệu suất trích của 2 phương pháp trích Soxhlet và lắc. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại trên 3 loại dung môi trích (DCM, hỗn hợp Toluene:Acetone với tỷ lệ 2:1 và Acetone). Đây là thí nghiệm định hướng ban đầu nên cũng được bố trí với 2 loại cột Florisil và Alumina - cột lớn và cột nhỏ để làm sạch dịch trích. Đất trước khi sử dụng để bố trí thí nghiệm được phơi khô, nghiền lọc qua rây 2 mm và tiệt trùng trước khi chủng thuốc. Ba gram đất được cho vào mỗi lọ huyệt thanh. Sau khi chủng thuốc mẫu được ủ qua một ngày đêm ở điều kiện nhiệt độ phòng. Với phương pháp lắc, trước khi trích, mẫu được trộn đều, thêm dung môi để cho thuốc được hòa tan vào dung môi. Thao tác này được lặp lại 3 lần để đảm bảo

thuốc được hòa tan vào dung môi với hiệu suất cao nhất. Trong giai đoạn này cần bổ sung thêm chất đi kèm (2,2,5 - PCB) nhằm đo hiệu suất của toàn bộ qui trình trích mẫu. Qui trình chi tiết như sau: Thêm vào lọ huyệt thanh chứa mẫu 3 ml dung môi. Lắc qua đêm ở tốc độ 200 vòng/phút. Trích mẫu lần 1: vortex lọ bi đã lắc thật kỹ trước khi trích, ly tâm ở tốc độ 2.500 vòng/phút trong 2 phút. Dùng pipette hút dịch trong. Thêm 2 ml dung môi vào lọ bi và lắc qua đêm với tốc độ 200 vòng/phút. Trích mẫu lần 2: vortex lọ bi đã lắc thật kỹ trước khi trích, ly tâm ở tốc độ 2.500 vòng/phút trong 2 phút. Dùng pipette hút dịch trong. Dịch trong được cho vào cùng lọ bi đã trích lần 1. Trích mẫu lần 3: thêm 1 ml dung môi, vortex kỹ, ly tâm ở tốc độ 2.500 vòng/phút trong 2 phút. Dùng pipette hút dịch trong. Dịch trong được cho vào cùng lọ bi đã trích lần 1 và 2.

2.2. Kiểm tra phương pháp cô mẫu

Sau khi kiểm tra phương pháp trích, thí nghiệm được thực hiện với mục tiêu nhằm chọn được phương pháp cô mẫu cho hiệu suất thuốc còn lại trong mẫu cao hơn giữa 2 phương pháp làm cô mẫu bằng cách cho thổi khí N₂ trong 30 phút và để bay hơi tự nhiên khoảng 4 giờ trong tủ hút. Hai phương pháp đều cô mẫu còn lại 1 ml. Thời gian thổi khí N₂ và để bay hơi tự nhiên phụ thuộc vào thể tích của dịch trích thu được, dịch trích càng nhiều thì thời gian thổi khí N₂ và để bay hơi tự nhiên càng lâu và ngược lại. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại.

2.3. Kiểm tra loại cột lọc làm sạch dịch trích

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại nhằm kiểm tra hiệu suất của 2 loại cột là Alumina và Florisil trên 1 loại dung môi trích là Acetone. Loại cột được thiết kế trong thí nghiệm này có kích thước: dài 25 cm, đường kính trong 0,5 cm. Làm sạch dịch trích bằng Alumina qua các giai đoạn sau: Trước khi làm sạch, dịch trích được cô xuống còn 1 ml; Trước khi sử dụng, Alumina cần được bất hoạt bằng cách đem nung ở 550°C ít nhất 24 giờ, chuyển qua tủ sấy ở 250°C trong 30 phút rồi chuyển sang bình hút ẩm để nguội. Thêm 3% nước khử

khoảng và lắc trong 30 phút; Nhồi 1 ít gòn thủy tinh vào cột, lắp cột vào giá; Cân 4 g Alumina đã bất hoạt (bằng giấy nhôm) đổ vào cột, thêm khoảng 1- 2 cm Na_2SO_4 lên trên. Gỡ nhẹ cột để Alumina chặt lại; Rửa cột với 5 ml hỗn hợp DCM:Hexane (2:1); Rửa cột lần 2 với 10 ml Hexane; Đặt ống nghiệm dán nhãn F1 dưới cột, dùng pipette chuyển mẫu vào cột, tráng 3 lần với Hexane, mở van để lớp dung môi này thấm xuống cột và sau đó cho từ từ thêm 13 ml Hexane vào cột đến khi dung môi chạm đến mặt trên của lớp Na_2SO_4 ; Đặt ống nghiệm dán nhãn F2 dưới cột, cho từ từ thêm 15 ml DCM:Hexane (2:1) vào cột đến khi dung môi chạm đến mặt trên của lớp Na_2SO_4 ; Đặt ống nghiệm dán nhãn F3 dưới cột, cho thêm từ từ 15 ml Ethyl acetate:Methanol (2:1) vào cột đến khi dung môi trong cột chảy ra hoàn toàn. Mặt khác, làm sạch dịch trích bằng Florisil qua các giai đoạn sau: Trước khi làm sạch, dịch trích được cô xuống còn 1 ml; Trước khi sử dụng, Florisil cần được bất hoạt bằng cách đem nung ở 550°C ít nhất 4 giờ, chuyển qua tủ sấy ở 250°C trong 30 phút rồi chuyển sang bình hút ẩm để nguội. Thêm 2,5% nước khử khoáng và lắc trong 30 phút; Nhồi 1 ít gòn thủy tinh vào cột, lắp cột vào giá; Cân 8 g Florisil đã bất hoạt (bằng giấy nhôm) đổ vào cột, thêm khoảng 1-2 cm Na_2SO_4 lên trên. Gỡ nhẹ cột để Florisil chặt lại; Rửa cột với 25 ml hỗn hợp PE:DCM (1:1); Rửa cột lần 2 với 10 ml PE. (Lưu ý: không để lớp dung môi xuống thấp hơn lớp Na_2SO_4 để tránh không khí lọt vào cột); Đặt ống nghiệm dán nhãn F1 dưới cột, dùng pipette chuyển mẫu vào cột, tráng 3 lần với Hexane, mở van để lớp dung môi này thấm xuống cột và sau cùng cho thêm từ từ 30 ml PE vào cột đến khi dung môi chạm đến mặt trên của lớp Na_2SO_4 ; Đặt ống nghiệm dán nhãn F2 dưới cột, cho thêm từ từ 30 ml PE:DCM (1:1) vào cột đến khi dung môi chảy ra hoàn toàn.

2.4. Kiểm tra dung môi trích mẫu từ đất

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại nhằm kiểm tra hiệu suất trích mẫu của 5 loại dung môi: Acetone, Toluene:Acetone 2:1, cho nước vào đất vortex cho tan đều sau đó cho

Toluene:Acetone 2:1, DCM và Diethyl ether. Trên cơ sở sử dụng phương pháp lắc, làm sạch dịch trích bằng Alumina loại cột nhỏ và thu dịch lọc ở dịch trích phân tách lần thứ nhất, thí nghiệm được bố trí bằng cách chùng một lượng CE nhất định vào đất sau đó trích mẫu bằng các loại dung môi trên. Qui trình trích và làm sạch mẫu được thực hiện theo như mục 2.1 và 2.3.

2.5. Phân tích mẫu

Các dịch trích sau khi làm sạch được cô đặc hoặc thêm dung môi (Hexane) đến thể tích nhất định nhằm đạt nồng độ phù hợp với khoảng nồng độ trong đường chuẩn và đem phân tích trên máy GC/MS. Phân tích hàm lượng CE bằng máy sắc ký khí khối phổ GC/MS-QP2010, sử dụng cột sắc ký HP-50MS dài 30 m x 0,32 mm; film 0,25 μm và nhiệt độ bộ nguồn Ion: 200°C , nhiệt độ Interface giữa bộ GC và bộ nguồn Ion: 250°C , thời gian bắt đầu đo phổ Ion trên lưu đồ: phút thứ 10, nhiệt độ đầu cột: 85°C , nhiệt độ buồng bơm mẫu: 250°C , nhiệt độ đầu dò: 280°C , thể tích mẫu bơm vào buồng bơm mẫu: 1 μl .

2.6. Phương pháp thống kê xử lý số liệu

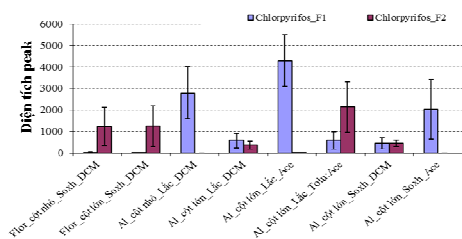
Số liệu thí nghiệm được tính toán trên phần mềm Excel. Thống kê bằng phần mềm Minitab 16 để so sánh trung bình và phân tích ANOVA.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả kiểm tra hiệu suất của hai phương pháp trích: soxhlet và lắc

Kết quả thí nghiệm cho thấy phương pháp lắc đạt hiệu suất trích cao hơn phương pháp soxhlet. Đồng thời kết quả thí nghiệm ban đầu với dung môi trích và loại cột lọc cũng cho thấy hiệu suất trích đạt cao hơn với dung môi trích là Acetone so với DCM và Toluene:Acetone, cột lọc là Alumina dạng cột nhỏ cũng cho thấy đạt hiệu suất trích cao hơn so với cột Florisil (Hình 3.1). Kết quả thí nghiệm này cũng cho thấy CE chủ yếu thuộc dịch trích phân tách thứ nhất trong quá trình lọc qua cột sắc ký. Kết quả của

nghiên cứu này phù hợp với quy trình phân tích thuốc BVTV của phòng thí nghiệm Rosenberg, Khoa Môi trường, trường Đại học Rutgers, Hoa Kỳ. Vì vậy, phương pháp trích bằng cách lắc được chọn và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

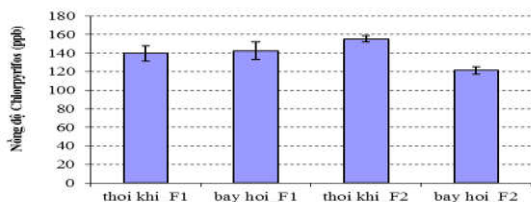


F1: dịch trích lần 1; F2: dịch trích lần 2; Flor: Florisil
Al: Alumina; Soxh: Soxhlet

Hình 3.1. So sánh hiệu suất trích chlorpyrifos ethyl bằng phương pháp soxhlet và lắc.

3.2. Kết quả kiểm tra hiệu suất cô mẫu bằng phương pháp bay hơi tự nhiên và thổi khí Nitơ

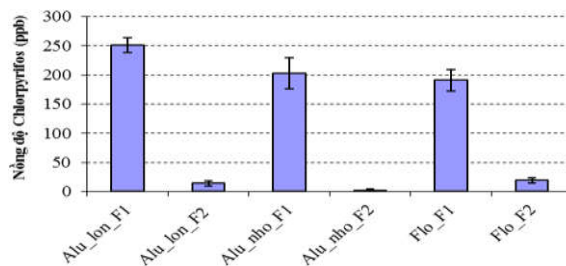
Kết quả thí nghiệm cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về hiệu suất giữa cô mẫu bằng phương pháp thổi khí N₂ và để bay hơi tự nhiên với cả 2 loại dung môi của 2 dịch trích phân tách là Hexane (lần phân tách thứ nhất) và DCM:Hexane với tỷ lệ 2:1 (lần phân tách thứ hai) (Hình 3.2). Từ kết quả trên, phương pháp cô mẫu bằng cách để bay hơi tự nhiên được chọn để cô mẫu. Mặc dù ở phòng thí nghiệm Rosenberg mẫu được cô bằng cách thổi khí N₂. Vì thổi khí N₂ sẽ cô mẫu nhanh hơn, tuy nhiên trong nghiên cứu này chọn phương pháp cô mẫu bằng cách để bay hơi tự nhiên nhằm tiết kiệm chi phí mà hiệu suất vẫn khác biệt không có ý nghĩa thống kê về hiệu suất với cô mẫu bằng phương pháp thổi khí N₂.



Hình 3.2. So sánh hiệu suất hai phương pháp cô mẫu.

3.3. Kết quả kiểm tra hiệu suất của 2 loại cột lọc: Florisil và Alumina

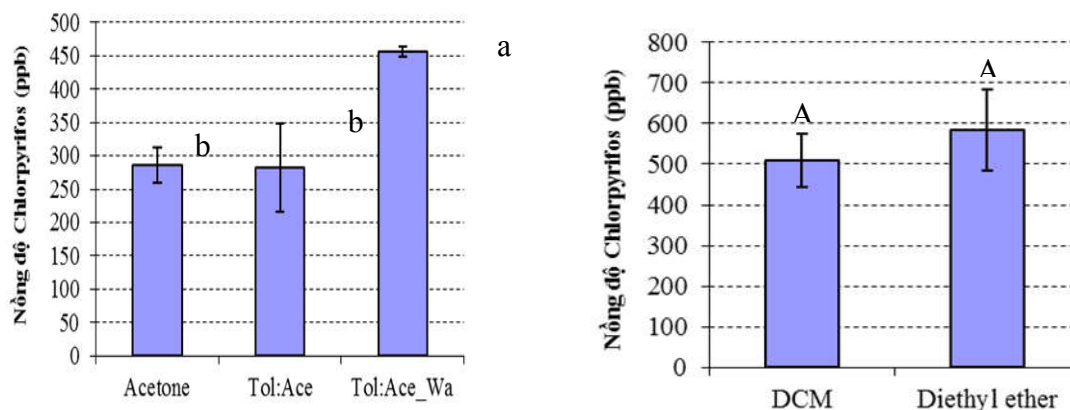
Kết quả thí nghiệm cho thấy khi tiến hành làm sạch dịch trích bằng cách lọc qua cột thì chlorpyrifos ethyl chủ yếu thuộc dịch trích phân tách lần thứ nhất, điều này thể hiện trên cả 2 loại chất lọc. Tuy nhiên với cột lọc Alumina thì cho hiệu suất cao hơn so với cột lọc Florisil, trong khi đó khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi sử dụng cột lọc Alumina là cột nhỏ so với cột lớn (Hình 3.3). Kết quả này phù hợp với quy trình phân tích thuốc BVTV của phòng thí nghiệm Rosenberg, Khoa Môi trường, trường Đại học Rutgers, Hoa Kỳ. Từ kết quả trên, phương pháp lọc sử dụng Alumina loại cột nhỏ được chọn để làm sạch dịch trích. Thí nghiệm tiếp tục kiểm tra một số loại dung môi trích nhằm tìm ra loại dung môi phù hợp.



Hình 3.3. So sánh hiệu suất 2 loại cột lọc làm sạch mẫu.

3.4. Kết quả kiểm tra hiệu suất trích của một số loại dung môi

Ban đầu thí nghiệm được thực hiện với 3 loại dung môi là: Acetone, Toluene:Acetone với tỷ lệ 2:1, cho nước vào đất vortex cho tan đều sau đó cho Toluene:Acetone với tỷ lệ 2:1. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hiệu suất trích đạt cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với Toluene:Acetone với tỷ lệ 2:1 có thêm nước. Tuy nhiên, loại dung môi này không cho kết quả tốt đối với một số loại thuốc khác trong cùng thí nghiệm. Với mục tiêu xác định được qui trình trích phù hợp cho nhiều loại thuốc nên tiếp tục kiểm tra hiệu suất trích trên 2 loại dung môi khác là DCM và Diethyl ether.



Hình 3.4. So sánh hiệu suất các loại dung môi trích mẫu.

Kết quả phân tích khi sử dụng 2 loại dung môi DCM và Diethyl ether cho thấy có thể trích được với nhiều loại thuốc và riêng với chlorpyrifos ethyl 2 loại dung môi này cũng cho hiệu suất cao hơn các loại dung môi đã thử trước đó. Kết quả cũng cho thấy hiệu suất trích bằng Diethyl ether đạt cao hơn so với DCM. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê (Hình 3.4). Từ kết quả trên, dung môi Diethyl ether được chọn sử dụng để trích chlorpyrifos ethyl từ trong đất.

4. Kết luận

Quy trình phân tích CE trong đất được xác định với hiệu suất khoảng 40 - 50% như sau: sử dụng dung môi trích là Diethyl ether qua 3 lần trích với tỷ lệ theo thể tích (mL) là 3:2:1, trích mẫu bằng phương pháp lắc qua đêm 2 lần (tương ứng với 2 lần thêm dung môi theo tỷ lệ 3:2) ở tốc độ 200 vòng/phút, chất làm sạch là Alumina loại cột nhỏ, thu dịch trích ở lần phân tách thứ nhất với dịch trích phân tách là Hexane, cô mẫu bằng cách để bay hơi tự nhiên. Hàm lượng CE được phân tích bằng máy sắc ký khí khối phổ GC/MS-QP2010, sử dụng cột sắc ký HP-50MS dài 30 m x 0,32 mm; film 0,25 μ m và nhiệt độ

bộ nguồn Ion: 200 °C, nhiệt độ Interface giữa bộ GC và bộ nguồn Ion: 250°C, thời gian bắt đầu đo phổ Ion trên lưu đồ: phút thứ 10, nhiệt độ đầu cột: 85°C, nhiệt độ buồng bơm mẫu: 250°C, nhiệt độ đầu dò: 280°C, thể tích mẫu bơm vào buồng bơm mẫu: 1 μ l.

Tài liệu tham khảo

- [1] Al-Wabel, M.I., M.H. El-Saeid, A.M. Al-Turki, and G. Abdel-Nasser. Monitoring of pesticide residues in Saudi Arabia agricultural soils. *Research Journal of Environmental Sciences* 5. 2011, 269-278.
- [2] Trần Quang Hùng. Thuốc Bảo Vệ Thực Vật. NXB Nông Nghiệp Hà Nội. Hà Nội. 1999, 348 trang.
- [3] Gebremariam, S.Y., Mineralization, sorption and desorption of chlorpyrifos in aquatic sediments and soils. Doctor of Philosophy, Washington State University. United States. 2011, 198 pp.
- [4] Gilani, S.T.S., M. Ageen and H.R. Shah, 2010. Chlorpyrifos degradation in soil and its effect on soil microorganisms. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 20(2), 99-102.
- [5] Yamagami, T., F. David, P. Sandra. Multi residue method for determination of 85 pesticide in vegetables, fruits and green tea by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. *Global analytical solutions*. 2004.

To Determine a Analytical Protocol for Chlorpyrifos Insecticide in Soil

Truong Quoc Tat, Duong Minh Vien

College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University

Abstract: The objective of this study was to determine a analytical protocol which get high performance for chlorpyrifos in agricultural soil at laboratory conditions. The experiment was carried out through the steps: testing the performance of two methods extract soxhlet and mix; testing the performance of the two sample condensation methods by nitrogene gas blowing and allowed to evaporate naturally; testing the performance of the two column types (Alumina and Florisil); testing the performance of the five types of solvents (Acetone, Toluene:Acetone with ratio 2:1, add water and mix soil sample before add Toluene:Acetone with ratio 2:1, DCM and Diethyl ether); final content analysis of chlorpyrifos by GC/MS-QP2010. Experimental result determined a analytical protocol for chlorpyrifos get 40-50% performance. This protocol includes extraction sample with shaking method, Diethyl ether has been selected for use to extract chlorpyrifos from soil, filtration of Alumina column (small column) was selected to clean extract solution and sample condensation method by allowed to evaporate naturally.

Keywords: Chlorpyrifos ethyl, extract, filters column, gas chromatography mass spectrometry, solvent.