

XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG CARBAMATE TRONG MẪU RAU, MẪU GỪNG VÀ MẪU NƯỚC

Nguyễn Văn Liêm, Nguyễn Văn Đông, Tô Thị Hiền

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

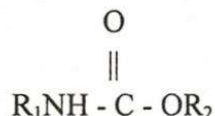
(Bài nhận ngày 08 tháng 01 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 30 tháng 06 năm 2009)

TÓM TẮT: Quy trình xác định 10 hợp chất thuốc trừ sâu thông dụng họ carbamate: Aldicard Sulfoxide, Aldicarb sulfone, Oxamyl, Methomyl, 3-Hydroxycarbofuran, Aldicarb; Propoxur, Carbofuran, Carbaryl và Methiocarb trong nước, rau và gừng đã được xây dựng dựa trên phương pháp tách bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, phát hiện bằng đầu dò huỳnh quang sau khi đã tạo dẫn xuất sau cột. Mẫu rắn được nghiền mịn trong methanol (MeOH), sau đó lọc. Dịch trích hay mẫu nước được làm sạch bằng chiết lỏng-lỏng/SPE silicagel hay bằng SPE C₁₈. Các carbamate được tách qua cột HPLC C₁₈ với pha động là MeOH/nước theo chế độ gradient nồng độ và được tạo dẫn xuất với O - phthalaldehyde (OPA) và 2 - mercaptoethanol. Hợp chất huỳnh quang 1 - hydroxytylthio - 2 - metylisoindol tạo thành được phát hiện bằng đầu dò huỳnh quang với $\lambda_{\text{kích thích}}$ ở 340 nm và $\lambda_{\text{phát xạ}}$ ở 445 nm. Giới hạn phát hiện cho các carbamate trong khoảng từ 0.51 - 5.0 ppb, giới hạn định lượng từ 1.69 - 9.09 ppb và hiệu suất thu hồi từ 73 - 95%. Nồng độ carbamate trong một số mẫu rau, mẫu gừng và mẫu nước tại một số vị trí khảo sát thu được khá nhỏ.

Từ khóa: thuốc bảo vệ thực vật, thuốc trừ sâu, carbamate,...

1. GIỚI THIỆU

Tình trạng thực phẩm nhiễm dư lượng thuốc bảo vệ thực vật quá mức cho phép vẫn diễn ra hết sức nghiêm trọng. Nhiều vụ ngộ độc thực phẩm hàng loạt xảy ra, được xác định có liên quan đến dư lượng thuốc bảo vệ thực vật có trong rau, củ, quả. Carbamate (CBM) là nhóm thuốc bảo vệ thực vật rất phổ biến có công thức chung :



Trong đó R₁ và R₂ là aryl hoặc ankyl^[1].

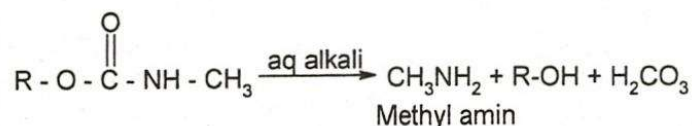
CBM được dùng nhiều trong nông nghiệp như là thuốc trừ sâu, trừ cỏ, trừ nấm,... Có hơn 50 loại CBM được biết tới phần lớn là từ tổng hợp, được sử dụng khá phổ biến trong nông nghiệp trong vòng 40 năm trở lại đây. CBM không bền, dễ bị phân hủy dưới tác động của môi trường. CBM đa số là những chất độc đối với con người được xếp vào nhóm độc I hoặc II là những chất độc và cực độc theo tiêu chuẩn Việt Nam.^[2]

Các nghiên cứu trước đây đã công bố nhiều phương pháp phân tích dư lượng CBM trong nước, thực phẩm như: Phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC/MS), phương pháp sắc ký khí đầu dò bắt giữ điện tử (GC/ECD). Tuy nhiên, cho đến nay những phương pháp này không được thông dụng do gặp một số trở ngại, đó là tính khó bay hơi và không bền nhiệt của CBM^[3].

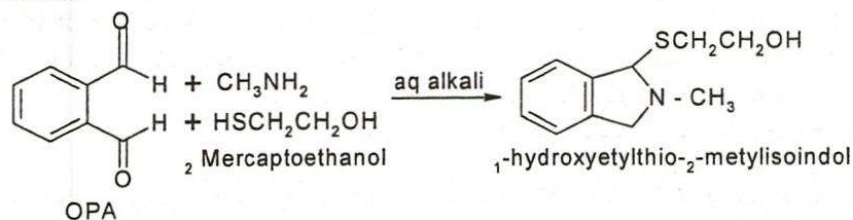
Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát quy trình xác định 10 loại carbamate phổ biến thường dùng làm thuốc bảo vệ thực vật: Aldicard Sulfoxide; Aldicarb sulfone; Oxamyl; Methomyl; 3-Hydroxycarbofuran; Aldicarb; Propoxur; Carbofuran; Carbaryl; Methiocarb bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) đầu dò huỳnh quang (FD) có tạo dẫn xuất sau

cột. Nguyên tắc của phương pháp HPLC tạo dẫn xuất sau cột là dựa vào đặc tính không bền của nhóm CBM trong môi trường kiềm. Sau khi từng loại CBM tách trên cột sắc ký pha đảo, được thủy phân trong môi trường bazơ sinh ra methyl amin, sau đó methyl amin phản ứng với thuốc thử O – phthalaldehyde (OPA) và 2 – mercaptoethanol tạo ra dẫn xuất huỳnh quang 1 – hydroxyethylthio – 2 – methylisoindol^[4].

Phản ứng phân hủy CBM trong môi trường bazơ (phản ứng xảy ra nhanh hơn dưới tác dụng của nhiệt độ).



Phản ứng của methyl amin với thuốc thử sinh ra hợp chất huỳnh quang 1 – hydroxyethylthio – 2 – methylisoindol. Chất này có cực đại hấp thụ khoảng 340 nm và cực đại phát xạ 440-460 nm.



Phương này được công nhận là phương pháp rất nhạy và khá chọn lọc với CBM và trở thành phương pháp tiêu chuẩn của tổ chức môi trường thế giới phân tích CBM trong đất, nước, thực phẩm...

2. THỰC NGHIỆM

Tiến hành khảo sát hệ thống HPLC và ứng dụng phân tích dư lượng CBM trong một số mẫu rau, mẫu gừng, mẫu nước tại một số chợ, siêu thị và khu công nghiệp trên địa bàn Thành Phố Hồ Chí Minh và các tỉnh lân cận.

2.1. Hóa chất thiết bị

Hỗn hợp chuẩn 10 loại CBM 100 ppm được pha trong methanol do Supelco cung cấp. Tất cả các dung môi và nước đều đạt tiêu chuẩn sử dụng cho HPLC và được lọc qua màng lọc 0.45 μm.

Hệ thống HPLC Shimadzu với hệ phản ứng sau cột, đầu dò huỳnh quang (FD), cột phân tích C₁₈, máy lọc nước và trao đổi ion millipore.

Hệ thống tiêm mẫu tự động SIL – 20A Shimadzu, đầu dò huỳnh quang RF - 10 Axl có tạo dẫn xuất sau cột.

Cột phân tích HRC - ODS AS0678 Kích thước 20 cm x 4.6 mm x 5 μm

Cột bảo vệ GHRC - ODS FU3445

Injector tiêm tự động SIL - 20A

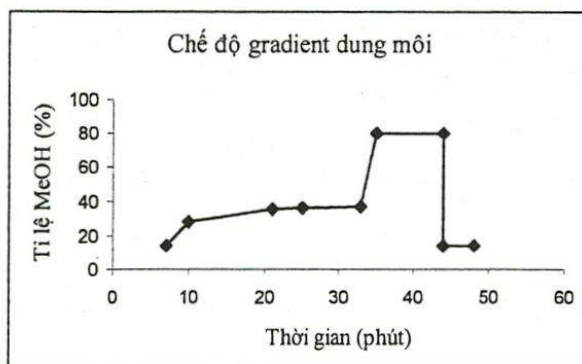
Bộ điều nhiệt CRB - 6A

Một số thiết bị khác

2.2. Các thông số của hệ HPLC

Qua quá trình khảo sát và tối ưu hoá các thông số của hệ HPLC, chúng tôi đã xác định được các thông số tối ưu của hệ thống như sau.

Tiêm 10 μl mẫu, pha động MeOH và nước, tốc độ 1.000 ml/phút, chế độ đẳng dòng không thể phân tích 10 loại CBM vì thế phải dùng chế độ gradient dòng như sau:



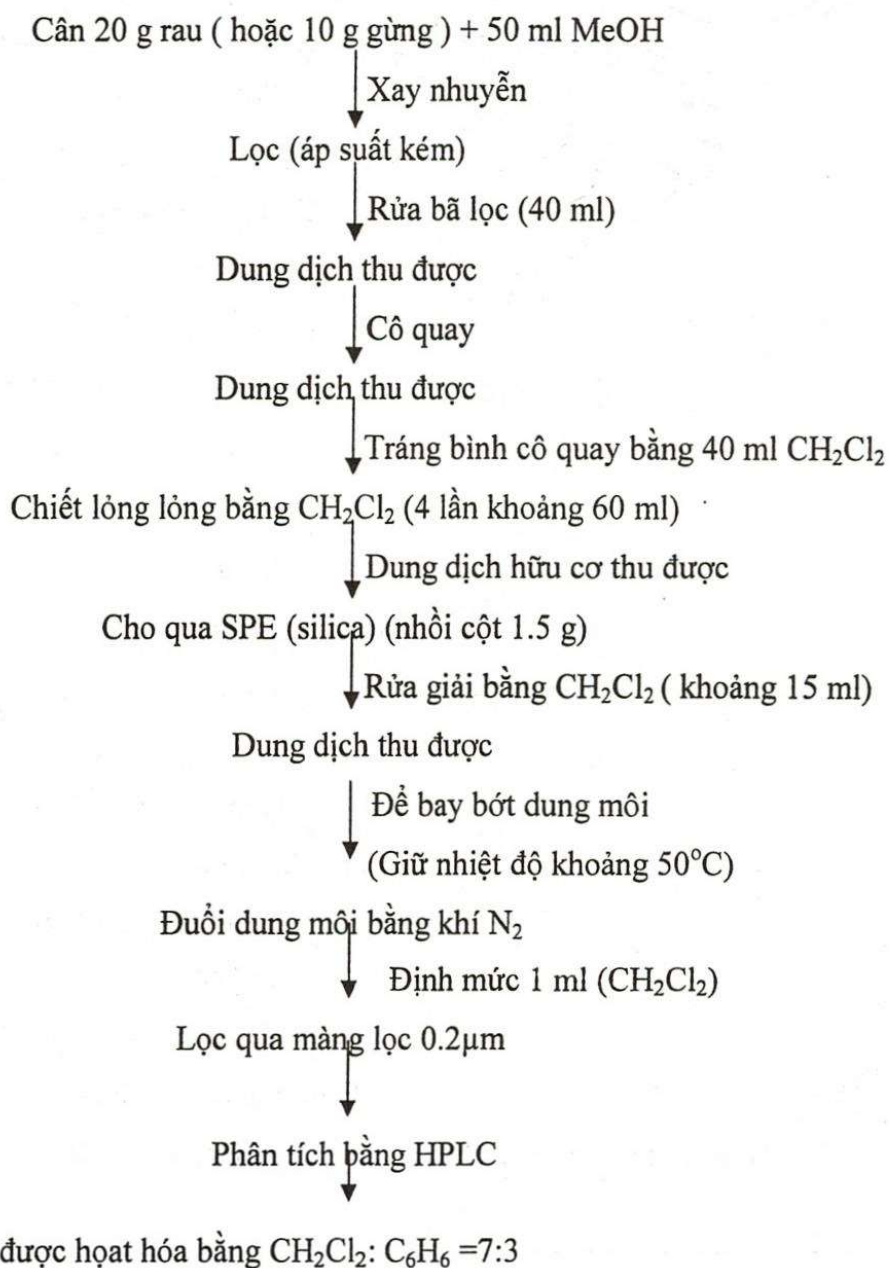
Hình 1. Chế độ gradient dòng

Bước sóng kích thích: 340 nm; Bước sóng phát xạ: 445 nm; Nhiệt độ lò phản ứng: 95 – 102°C; V_{OPA} : 0.15 ml/phút; V_{NaOH} : 0.2 ml/phút; Nồng độ OPA: 0.25 mM; Nồng độ β – mercaptopionic: 125 ppm; Nồng độ NaOH : 50 mM; Nồng độ đệm 80 – 100 mM.

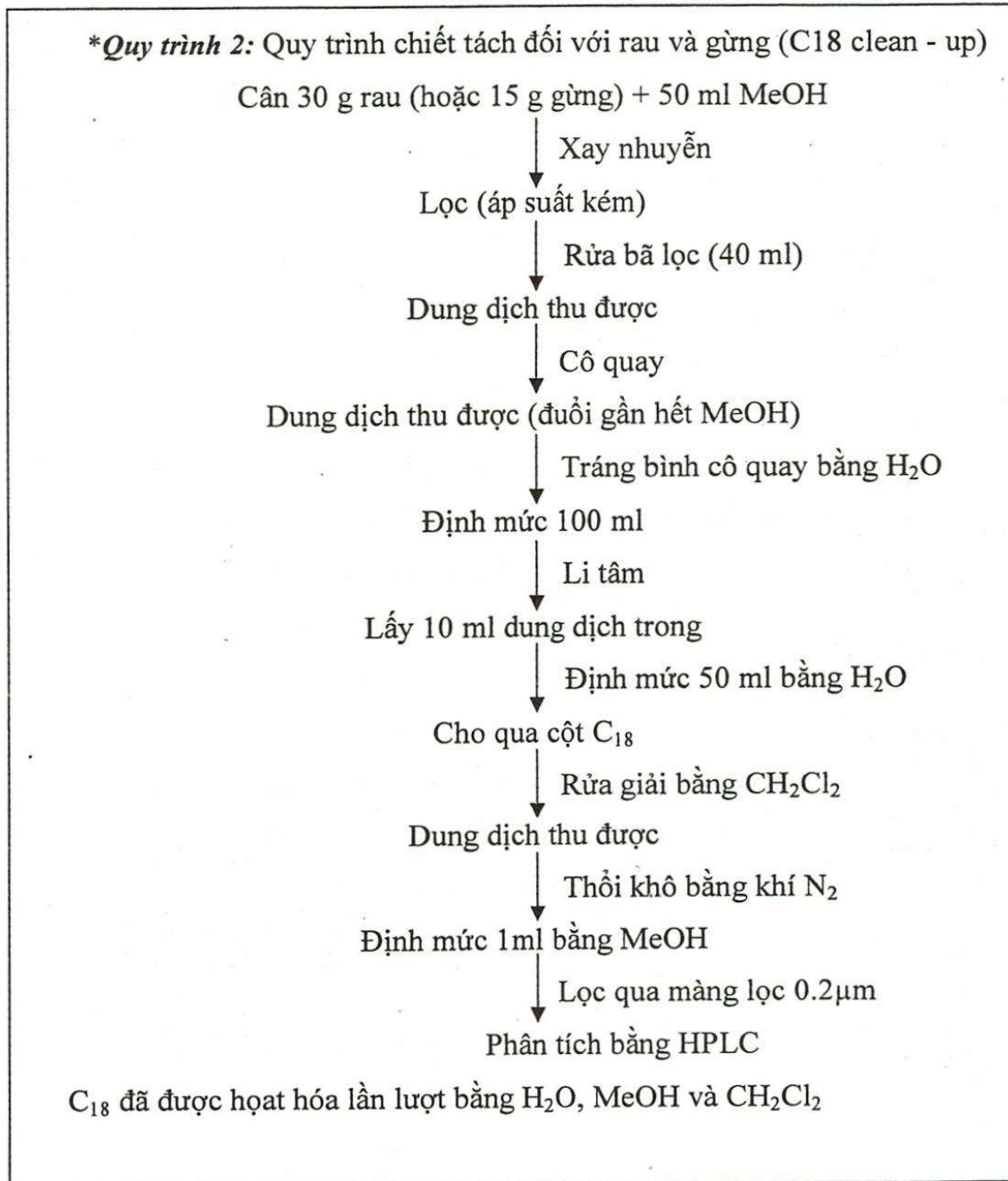
Tổng thời gian chạy là 60 phút để làm sạch cột.

2.3. Chuẩn bị mẫu

Mẫu rau và mẫu gừng được lấy tại chợ và siêu thị, bảo quản trong tủ lạnh. Nhặt bỏ hết lá rau vàng úa và gọt bỏ vỏ gừng sau đó tiến hành chiết tách và làm giàu mẫu bằng hai phương pháp chiết pha rắn (SPE) và chiết lỏng lỏng (LLS) như quy trình 1 và quy trình 2. Cột SPE C_{18} 500 mg của Varian. Dung môi dùng cho chiết lỏng lỏng là dichloromethane (CH_2Cl_2) (b.p 40°C). Tiến hành chiết 3 lần làm sạch bằng silica. Đuổi dung môi bằng khí N_2 khan tinh khiết 99.99% sau đó lọc qua màng lọc 0.2 μm trước khi phân tích. Thêm chuẩn lần lượt 100 ppb, 500 ppb, 1500 ppb để đánh giá độ đúng và độ tin cậy của phương pháp.

Quy trình 1: Quy trình chiết tách đối với rau và gừng (Silica clean - up)**Hình 2.** Quy trình chiết tách đối với rau và gừng (Silica clean – up)

Khi cô quay MeOH bay hơi, dung dịch bị đục là do một số chất ít phân cực tan tốt trong MeOH hơn trong nước. Dung dịch sau khi cô quay đối với mẫu rau còn khoảng 30 ml, đối với mẫu gừng khoảng 15 ml để đảm bảo tỉ lệ MeOH: H₂O khoảng 1: 2. Ứng với tỉ lệ MeOH: H₂O khoảng 1 : 2 thì hiệu suất của quá trình chiết lỏng-lỏng đạt cao nhất.



Hình 3. Quy trình chiết tách đối với rau và gừng (C₁₈ clean - up)

Đối với quy trình này thì dung dịch sau khi cô quay phải đuổi được gần như hoàn toàn MeOH. Nếu lượng MeOH còn lại nhiều thì sẽ làm tăng khả năng rửa giải của dung dịch, khi cho qua cột C₁₈ thì một số CBM tương đối phân cực sẽ bị rửa giải ra khỏi cột gây mất mẫu là cho hiệu suất thu hồi thấp.

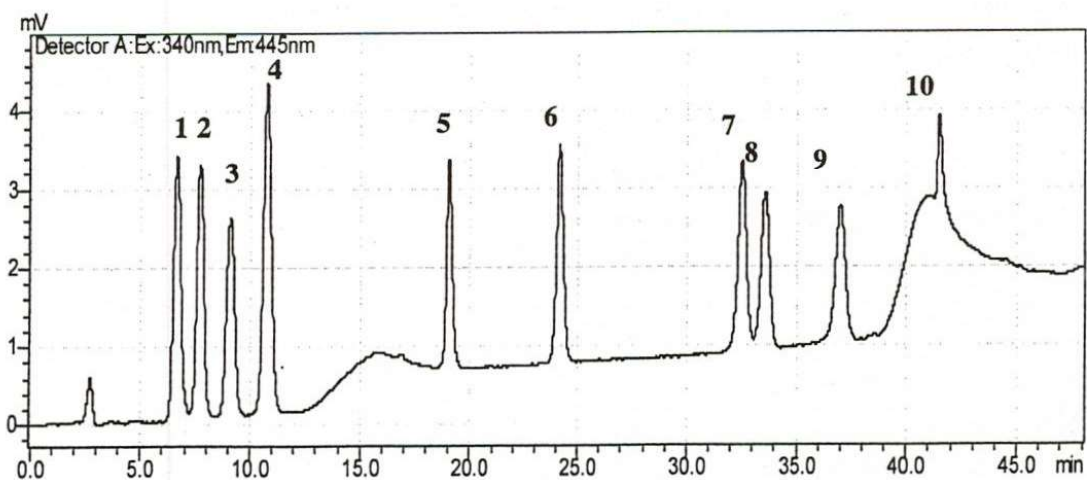
3.KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1.Đánh giá độ nhạy và độ tin cậy của phương pháp

Đầu dò FD chọn lọc với CBM, độ nhạy cao, giới hạn định lượng chỉ vài ppb. Độ tuyến tính 0.9980 – 0.9995.

Bảng 1. Giới hạn phát hiện của phương pháp

Chất phân tích	S	N	S/N	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Aldicard Sulfoxide	413	7	59	0.51	1.69
Adicarb sulfone	337	16	21	1.43	4.76
Oxamyl	255	17	15	2.00	6.67
Methomyl	419	10	42	0.71	2.38
3-Hydroxy carbofuran	284	18	16	1.88	6.25
Aldicarb	267	10	27	1.43	3.70
Popoxur	247	12	21	1.43	4.76
Carbofuran	208	14	15	2.00	6.67
Sevin (carbaryl)	186	17	11	2.73	9.09
Methiocarb	109	19	6	5	-



Hình 4: Sắc kí đồ chuẩn 100 ppb

1: Aldicard Sulfoxide; 2: Aldicarb sulfone; 3: Oxamyl; 4: Methomyl;
5: 3 – Hydroxycarbofuran; 6: Aldicarb; 7: Propoxur; 8: Carbofuran; 9: Carbaryl; 10: Methiocarb

3.2. Đánh giá hiệu suất thu hồi

Hiệu suất thu hồi tương đối cao từ 75 – 95%.

Bảng 2. Hiệu suất thu hồi mẫu rau, mẫu gừng và mẫu nước thêm chuẩn 100 ppb.

Chất phân tích	Hiệu suất thu hồi TB (%)± RSD (n = 3)		
	Mẫu rau ± RSD	Mẫu gừng ± RSD	Mẫu nước ± RSD
Aldicarb Sulfoxide	72.8 ± 1.7	77.6 ± 3.1	83.6 ± 1.7
Aldicarb sulfone	91.5 ± 1.0	91.7 ± 1.2	90.5 ± 1.8
Oxamyl	92.1 ± 0.6	93.4 ± 1.8	91.8 ± 1.9
Methomyl	108.6 ± 1.7	93.5 ± 1.1	92.5 ± 3.4
3-Hydroxycarbofuran	93.2 ± 0.8	89.8 ± 2.4	89.0 ± 3.4
Aldicarb	91.8 ± 1.1	93.4 ± 2.2	91.2 ± 3.6
Propoxur	89.6 ± 1.2	92.4 ± 1.1	94.7 ± 5.4
Carbofuran	92.7 ± 1.3	94.5 ± 1.1	92.1 ± 7.5
Sevin (carbaryl)	93.7 ± 1.2	110.7 ± 1.5	89.5 ± 3.8
Methiocarb	96.6 ± 1.9	95.9 ± 3.1	96.9 ± 4.0

Hiệu suất thu hồi của các chất khá cao, hầu hết trên 80%. Riêng hiệu suất thu hồi của Aldicarb Sulfoxide khá thấp vì nó có độ tan trong nước tương đối lớn khoảng 10 g L⁻¹ nên nó phân bố trong nước tương đối nhiều làm cho hiệu suất của quá trình chiết thấp.

3.3. Kết quả phân tích một số mẫu thực

Tiến hành khảo sát một số mẫu thực tế kết quả thu được như sau:

3.3.1. Mẫu rau

Bảng 3. Kết quả phân tích trên mẫu rau

Nơi lấy mẫu	Thời gian	Phát hiện	Nồng độ (ppb)
Chợ An Dương vương	10/6/2008	aldicarb sulfoxide	54.3
Chợ An Lạc	14/6/2008	-	-
Chợ Bình Chánh	14/6/2008	-	-
Siêu thị Coop Mark	10/6/2008	-	-

Kết quả phân tích đa số các mẫu rau đều không phát hiện dư lượng CBM, nếu có nồng độ cũng khá thấp dưới giới hạn cho phép.

3.3.2. Mẫu gừng

Bảng 4. Kết quả phân tích trên mẫu gừng

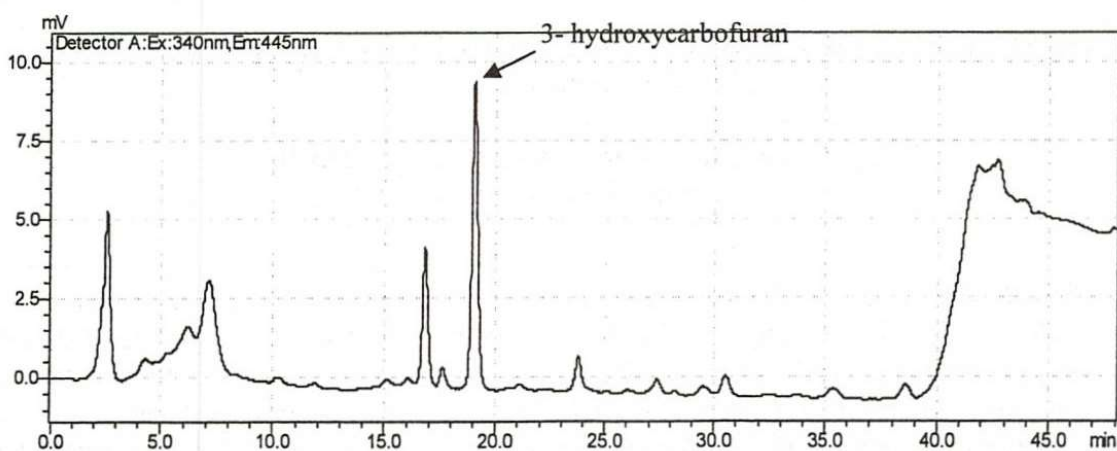
Nơi lấy mẫu	Thời gian	Phát hiện	Nồng độ (ppb)
Chợ An Dương vương	10/6/2008	-	-
Chợ An Lạc	14/6/2008	Sevin	90.8
Chợ Bình Chánh	14/6/2008	-	-
Siêu thị Coop Mark	10/6/2008	-	-

Mẫu gừng lấy tại chợ An Lạc phát hiện Sevin tuy nhiên nồng độ nhỏ dưới mức cho phép và hầu như không phát hiện dư lượng CBM trong các mẫu phân tích.

3.3.3. Mẫu nước

Bảng 5. Kết quả phân tích trên mẫu nước

Loại mẫu	Nơi lấy mẫu	Thời gian	Phát hiện	Nồng độ (ppb)
Nước rửa rau	Thủ Đức	7/6/2008	-	-
Nước ao rau muống	Thủ Đức	7/6/2008	3 - Hydroxycarbofuran	10.1
Nước thải nơi trồng rau	Biên Hòa	5/6/2008	-	-
Nước giếng nơi trồng rau	Biên Hòa	5/6/2008	-	-
Nước thải khu công nghiệp	Biên Hòa	25/6/2008	3 - Hydroxycarbofuran	7.3



Hình 5. Mẫu nước thải khu công nghiệp 2 thành phố Biên Hòa- Đồng Nai phát hiện 3-hydroxycarbofuran nồng độ 7.63 ppb

Quá trình khảo sát cho thấy rằng phần lớn không phát hiện dư lượng CBM trên mẫu rau và gừng.

Kết quả phân tích cho thấy rau tại chợ An Dương Vương Quận Bình Tân phát hiện dư lượng Aldicarb Sulfoxide và chợ An Lạc Huyện Bình Chánh phát hiện dư lượng Sevin. Tuy nhiên, nồng độ nhỏ hơn mức cho phép. Phần lớn mẫu rau và gừng không phát hiện dư lượng CBM có thể là do nông dân sử dụng đúng liều lượng và thu hoạch đúng thời vụ để CBM phân hủy hết. Đây là một tín hiệu đáng mừng cho người tiêu dùng.

Quá trình khảo sát mẫu nước ở một số khu vực cho thấy mẫu nước ao rau muống tại Tam Bình Quận Thủ Đức và nước thải Khu Công Nghiệp Biên Hòa phát hiện dư lượng 3-Hydroxycarbofuran tuy nhiên hàm lượng cũng tương đối nhỏ. Nước thải tại Khu Công nghiệp Biên Hòa là nước chưa qua xử lý. Nếu được xử lý đúng cách thì dư lượng CBM có trong nước có thể sẽ phân hủy hết.

3.4. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng thành công phương pháp phân tích dư lượng CBM. Phương pháp HPLC đầu dò huỳnh quang để phân tích dư lượng CBM và ứng dụng tốt đối với một số mẫu thực tế. Giới hạn phát hiện với mỗi chất khác nhau khoảng vài chục ppb trên mẫu thật Aldicarb Sulfoxide 19.7 ppb; Adicarb sulfone 17.4 ppb; Oxamyl 23.5 ppb; Methomyl 29.8 ppb; 3-Hydroxy carbofuran 35.8 ppb; Aldicarb 24.0 ppb; Propoxur 23.1 ppb; Carbofuran 31.3 ppb; Sevin (carbaryl) 42.0 ppb; Methiocarb 46.9 ppb.

Ứng với quy trình làm giàu mẫu, ta có thể phân tích mẫu ở hàm lượng vài ppb. Tất cả các chất trên đều có giới hạn định lượng thấp hơn quy định cho phép của Việt Nam, Nhật, Mỹ.

Cả 2 quy trình trên đều áp dụng tốt để phân tích dư lượng CBM. Quy trình clean-up bằng silica có nhiều nền lớn hơn C₁₈ và thao tác lean-up bằng C₁₈ ít tốn công sức hơn khi dùng silica. Đối với mẫu rau quả, thực phẩm do mẫu rất đa dạng và thành phần nền mẫu khá phức tạp, vì vậy nên chọn quy trình xử lý mẫu dùng C₁₈ để clean-up và làm giàu.

Đầu dò huỳnh quang rất nhạy đối với CBM giới hạn phát hiện một số CBM có thể đạt tới hàm lượng ppt trong mẫu nước tương ứng với phương pháp làm giàu phù hợp. Chính vì chọn lọc cho CBM nên phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò huỳnh quang được các tổ chức trên thế giới công nhận là phương pháp tiêu chuẩn phân tích dư lượng CBM trong đất, nước, thực phẩm.

DETERMINATION OF CARBAMATE RESIDUES IN VEGATABLES, BULBS AND WATER

Nguyen Van Liem, Nguyen Van Dong, To Thi Hien
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: A method for the determination of residues of 10 carbamates including Aldicarb Sulfoxide, Aldicarb sulfone, Oxamyl, Methomyl, 3-Hydroxycarbofuran, Aldicarb; Propoxur, Carbofuran, Carbaryl and Methiocarb in vegetables, bulbs and water was established based on High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection after derived post column. Solid samples were grinded in MeOH, clarify. Extraction liquid or water samples were cleaned by liquid-liquid extraction or SPE C₁₈. Carbamates were extracted in HPLC C₁₈ with mobile phase gradient MeOH/H₂O and derived with O -

phthalaldehyde (OPA) and 2 – mercaptoethanol. A fluorescent compound 1 – hydroxyethylthio – 2 – methylisindol was produced and detected by fluorescence detection with λ_{ex} 340 nm and λ_{em} 445 nm. Limit of detection and limit of quantitation for the carbamates were 0.51 - 5.0 ppb and 1.69 – 9.09 ppb, respectively. The recoveries of the carbamates were from 73 to 95%. The concentrations of the carbamate in vegetables, bulbs and water at some investigated sites were low.

Key words: Carbamate, pesticides,...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1].<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc64.htm>; (2008).
- [2].http://www.vinachem.com.vn/TIEU_CHUAN/TCVN/61-93.htm; (2008).
- [3].Kawasaki. S.; Nagumo. F.; Veda. H.; Tajma.Y; Samo.M and.; Tadano. J , *Simple, rapid and simultaneous measurement of eight different types of carbamate pesticides in serum using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, J. Chromatogr A, 620, 61-71 (1993).
- [4].Moye.H. A.; Scheres. S. J.; S. John. P A, *Determination some carbamate pesticides in vegetables*, Anal. Lett, 4, 1049-1054, (1977).