

PHÂN TÍCH DƯ LƯỢNG IMIDACLOPRID VÀ AZOXYSTROBIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG: TRƯỜNG HỢP NGHIÊN CỨU TRÊN CÂY ĐÌNH LĂNG (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms)

Nguyễn Phước Định, Lê Hữu Bảo Trân, Võ Thị Tuyết Trâm, Đỗ Văn Mãi
 Khoa Dược – Điều Dưỡng, Trường Đại học Tây Đô
 (Email: dinhanan2007@yahoo.com)

Ngày nhận: 28/3/2018

Ngày phản biện: 29/4/2018

Ngày duyệt đăng: 10/5/2018

TÓM TẮT

Đồng Bằng Sông Cửu Long có nhiều tiềm năng về sản xuất cây trồng và dược liệu. Nhiều loại thuốc bảo vệ thực vật được sử dụng. Hai loại thuốc Imidacloprid và Azoxystrobin là thuốc bảo vệ thực vật thế hệ mới, thời gian bán hủy ngắn, có phổ tác dụng rộng, kiểm soát được nhiều đối tượng bệnh hại trên cây trồng, kể cả trên cây thảo dược. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu về lưu tồn hai nhóm thuốc này trong dược liệu, nếu nông dân có sử dụng thuốc. Vì thế, nếu có được quy trình định lượng nhanh sẽ góp phần kiểm soát dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trên nguyên liệu, xác định thời điểm thu hoạch để được nguồn dược liệu sạch, đáp ứng nhu cầu sản phẩm sạch trong sản xuất thực phẩm chức năng hay dược phẩm. Nghiên cứu quy trình định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đầu dò UV được thực hiện trên lá Đình Lăng. Kết quả đạt các yêu cầu về tính phù hợp hệ thống, tính tuyến tính, độ đặc hiệu, độ đúng, giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện. Kết quả phân tích cũng cho thấy không còn tồn dư thuốc thử nghiệm trên lá Đình lăng sau bảy ngày phun thuốc.

Từ khóa: Dư lượng thuốc, imidacloprid, azoxystrobin, quy trình phân tích, cây Đình Lăng

Trích dẫn: Nguyễn Phước Định, Lê Hữu Bảo Trân, Võ Thị Tuyết Trâm và Đỗ Văn Mãi, 2018. Phân tích dư lượng imidacloprid và azoxystrobin bằng phương pháp sắc ký lỏng: Trường hợp nghiên cứu trên cây Đình lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms). Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế, Trường Đại học Tây Đô. 03: 123-137.

*Thạc sĩ Nguyễn Phước Định, Khoa Dược - Điều dưỡng, Trường Đại học Tây Đô

1. GIỚI THIỆU

Nhu cầu về sản phẩm sạch ngày càng cao, đặc biệt sản phẩm sạch đông được ngày càng được chú trọng. Ngoài việc trồng một lượng nhỏ dược liệu trong nhà kính để hạn chế sâu bệnh thì việc trồng chuyên canh dược liệu ở những khu vực rộng lớn luôn tiềm ẩn nhiều nguy cơ phá hoại của côn trùng và nấm bệnh. Lựa chọn những thuốc bảo vệ thực vật có hoạt tính cao trên nhiều đối tượng côn trùng, nấm bệnh và ít tồn dư cũng như ít độc với người sử dụng là ưu tiên hàng đầu trên những vùng chuyên canh này. Hơn thế nữa, có được quy trình định lượng những thuốc này sẽ giúp xác định thời điểm thu hoạch dược liệu, đảm bảo dược liệu không có tồn dư các thuốc này và đồng nghĩa không tồn dư bất kỳ thuốc bảo vệ thực vật nào. Imidacloprid là thuốc trừ sâu thể hệ mới thuộc nhóm neonicotinoids (Ahmad *et al.*, 2012; Ashorkr *et al.*, 2006), ít độc với người (Sacramento, 2002), có phổ tác dụng rộng, phòng được rầy nâu, rệp sáp, bọ trĩ (Mostafa *et al.*, 2014). Azoxystrobin là thuốc trừ nấm nguồn gốc sinh học, thuộc nhóm strobins (Nageswara Rao *et al.*, 2012), ít độc với người, phổ tác dụng rộng, phòng được nhiều bệnh cháy lá, thối rễ (Vojislava Bursic *et al.*, 2007.). Có một quy trình định lượng đồng thời imidacloprid và azoxystrobin sẽ góp phần giúp chứng minh sản phẩm đạt yêu cầu chất lượng, nếu sử dụng các chất này kiểm soát dịch bệnh. Đối tượng chọn thử nghiệm dư lượng là Đinh lăng lá nhỏ với mục tiêu xây dựng quy trình định lượng và đánh giá dư lượng của hai thuốc này sau bảy ngày phun thuốc.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất nghiên cứu

Imidacloprid và Azoxystrobin chuẩn Sigma Aldrich, dung môi sắc ký đạt tiêu chuẩn HPLC, các hóa chất còn lại đạt tiêu chuẩn phân tích.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Imidacloprid và Azoxystrobin lưu tồn trong thực vật.

Đinh lăng được chọn trong thử nghiệm dư lượng qua phun thuốc Imidacloprid (100mg/L) và Azoxystrobin (250mg/L) theo hướng dẫn sử dụng thuốc trên bao bì.

Mẫu lá được thu lúc sáng sớm của ngày thứ 3 và thứ 7 sau khi phun thuốc, được chứa trong túi nilon sạch và để trong mát, phân tích ngay trong ngày.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thử nghiệm quy trình định lượng đồng thời Imidacloprid và Azoxystrobin bằng HPLC/UV với cột C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m). Chiết Imidacloprid, Azoxystrobin và định lượng các chất này trong mẫu Đinh lăng bằng quy trình đã xây dựng.

2.3.1. Quy trình định lượng (Nguyễn Thị Kim Phụng, 2007)

Pha dung dịch mẫu chuẩn imidacloprid 2 ppm và azoxystrobin 2 ppm

Cân chính xác lượng chất chuẩn imidacloprid tương ứng với 10 mg, cho vào bình định mức 100 ml, bổ sung acetonitril vừa đủ.

Hút chính xác 2 ml dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức dung tích

100 ml, thêm acetonitril tới vạch và lắc kỹ được dung dịch chuẩn 2 ppm. Làm tương tự với azoxystrobin.

Dung dịch mẫu chuẩn hỗn hợp 1 ppm

Hút 5 ml dung dịch chuẩn imidacloprid 2 ppm và hút 5 ml dung dịch chuẩn azoxystrobin 2 ppm vào bình định mức dung tích 10 ml.

Lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi đem chạy sắc ký. Dung dịch thu được là hỗn hợp imidacloprid và azoxystrobin có nồng độ mỗi chất là 1 ppm.

Khảo sát điều kiện phân tích sắc ký

Khảo sát phổ UV của imidacloprid và azoxystrobin để tìm bước sóng chung. Tiến hành quét phổ từ 200-400 nm.

Khảo sát thành phần pha động

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn với sự thay đổi thành phần pha động. Dung dịch chất chuẩn hỗn hợp của imidacloprid và azoxystrobin được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc. Thành phần dung môi pha động được chọn để khảo sát là acetonitril (ACN) và nước với các tỉ lệ thể tích khác nhau.

Khảo sát tốc độ dòng

Ảnh hưởng của tốc độ dòng đến quá trình sắc ký được khảo sát bằng cách tiến hành chạy sắc ký hỗn hợp imidacloprid và azoxystrobin với các tốc độ: 0,5 ml/phút; 0,8 ml/phút; 1 ml /phút; 1,2 ml/phút; 1,5 ml/phút.

2.3.2. Thẩm định quy trình (Theo phương pháp đã công bố của Bộ Y tế, (2009) và ICH (1996))

Tính phù hợp hệ thống

Tính phù hợp hệ thống xác định dựa trên các thông số đặc trưng của sắc ký như: diện tích pic (S), thời gian lưu (t_R), độ phân giải (R_S), hệ số đối xứng (A_S), số đĩa lý thuyết (N) là những thông số thường được dùng để đánh giá độ ổn định của hệ thống khi tiêm lặp lại 6 lần. Yêu cầu:

- Số đĩa lý thuyết ≥ 2000.
- Giá trị RSD của thời gian lưu ≤ 1,0% và của diện tích pic phải ≤ 2,0%
- Hệ số đối xứng của pic phải trong khoảng 0,8 - 1,5.
- Độ phân giải giữa pic chính và pic phụ phải lớn hơn 1,5.

Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu dung môi, mẫu chuẩn imidacloprid, azoxystrobin và mẫu giả định.

Mẫu trắng: dung môi pha động/dung môi hòa tan mẫu hay pha loãng mẫu.

Mẫu chuẩn: dung dịch chứa chất chuẩn imidacloprid, dung dịch chứa chất chuẩn azoxystrobin, dung dịch chứa hỗn hợp hai chất chuẩn.

Mẫu giả định: dịch chiết dược liệu (không có chất cần phân tích) đã được cho thêm chất chuẩn hỗn hợp imidacloprid và azoxystrobin.

Trong đó pic của mẫu trắng, chuẩn imidacloprid, azoxystrobin tách nhau hoàn toàn và mẫu giả định phải có pic có thời gian lưu giống với pic của chất chuẩn và các pic này tách hoàn toàn với các pic còn lại nếu có.

Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn phát hiện (LOD) là giá trị nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà hệ thống phân tích còn cho tín hiệu phân tích có nghĩa so với tín hiệu mẫu trắng hay tín hiệu của đường nền.

Giới hạn định lượng (LOQ) được xem là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà hệ thống phân tích định lượng được với tín hiệu phân tích có nghĩa định lượng so với tín hiệu mẫu trắng hay tín hiệu nền.

Để xác định LOD và LOQ của thiết bị, ta tiến hành như sau: pha loãng từ 5-7 lần mẫu chuẩn chứa hỗn hợp imdacloprid và azoxystrobin nồng độ 1 ppm và chuẩn bị một mẫu trắng (chứa dung môi pha động) sau đó tiêm vào thiết bị HPLC. Đến khi nào chiều cao pic = 3 lần chiều cao đường nền thì lấy đó là LOD.

Tính tuyến tính

Khoảng tuyến tính của imdacloprid và azoxystrobin được khảo sát bằng cách pha một dãy dung dịch chuẩn khoảng từ 0,4-1,6 ppm có nồng độ tăng dần như sau: 0,4 ppm; 0,8 ppm; 1 ppm; 1,2 ppm; 1,6 ppm ứng với 40%, 80%, 100%, 120%, 160%.

Sau đó, tiến hành phân tích với điều kiện tối ưu đã khảo sát.

Các giá trị diện tích pic thu được, xây dựng phương trình hồi quy giữa diện tích pic và nồng độ của mỗi dãy chuẩn.

Độ chính xác

Độ lặp lại của phép đo: Độ lặp lại của

hệ thống sắc ký được khảo sát bằng cách tiêm lặp 6 lần cùng một mẫu chuẩn hỗn hợp imdacloprid và azoxystrobin vào hệ thống HPLC. Kết quả đánh giá thông qua độ lệch chuẩn (SD), độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic và thời gian lưu.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành như độ lặp lại và làm trong 3 ngày khác nhau cùng với điều kiện và người thực hiện.

Độ đúng

Thực hiện ở ba mức nồng độ 80%, 100% và 120% của nồng độ đo. Mỗi mức pha ba dung dịch, mỗi dung dịch tiến hành sắc ký một lần. Tính diện tích pic và dựa vào phương trình hồi quy suy ra nồng độ tìm thấy. So với nồng độ khi pha sẽ tính ra tỷ lệ phục hồi.

Tỷ lệ phục hồi ở mỗi mức nồng độ: 98,0% – 102% cho quy trình phân tích định lượng.

RSD tỷ lệ phục hồi ở mỗi mức nồng độ phải $\leq 2,0\%$ ở mỗi mức nồng độ.

2.3.2. Chiết và định lượng

Khảo sát dung môi chiết mẫu

Cho vào bình nón 5 g lá Đinh lăng đã thêm hai chuẩn, cho tiếp khoảng 20 ml dung môi chiết. Lắc siêu âm khoảng 10 phút. Lọc lấy dịch chiết lần 1. Lặp lại qui trình 3 lần. Gộp dịch chiết 3 lần lại. Tiến hành loại tạp sơ bộ bằng cách lắc với 10 ml H₂O. Loại bỏ lớp nước, lớp còn lại đem đi cô thu hồi dung môi bằng bếp đun cách thủy ở nhiệt độ 50 °C. Hòa lẫn với 10 ml ACN, lắc với khoảng 10 ml PE. Lấy lớp ACN đem cô còn

khoảng 3 ml. Châm dịch chiết lên bản mỏng và tiến hành sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi cloroform – ethylacetat (1:1). Sau đó quan sát dưới đèn UV ở bước sóng 254 nm.

Khảo sát phương pháp loại tạp

- Chiết lỏng – lỏng

Cho vào bình nón 5 g lá Đinh lăng đã thêm hai chuẩn, cho tiếp khoảng 20 ml dung môi tối ưu đã chọn. Lắc siêu âm khoảng 10 phút. Lọc lấy dịch chiết lần 1. Lặp lại qui trình 3 lần. Gộp dịch chiết 3 lần lại. Tiến hành loại tạp sơ bộ bằng cách lắc với 10 ml H₂O. Loại bỏ lớp nước, lớp còn lại đem đi cô thu hồi dung môi bằng bếp đun cách thủy ở nhiệt độ 50 °C. Hòa lẫn với 10 ml ACN, lắc với khoảng 10 ml ether dầu hỏa. Lấy lớp ACN đem cô còn khoảng 3 ml. Tiến hành phân tích bằng HPLC.

- Chiết lỏng – lỏng và than hoạt

Chuẩn bị mẫu tương tự như trên. Sử dụng thêm phương pháp loại tạp bằng than hoạt. Cho khoảng 0,1 g than hoạt vào dịch chiết, sau đó rửa giải 3 phân đoạn. Mỗi phân đoạn sử dụng 10 ml

ACN. Gộp các phân đoạn, đem cô còn 3 ml, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành phân tích trên hệ thống HPLC/UV-Vis.

- Chiết lỏng – lỏng và silicagel

Khả năng loại màu phụ thuộc vào bản chất chất hấp phụ và dung môi rửa giải. Trong phân tích sắc ký, silicagel là chất hay được sử dụng để loại tạp, khử màu do có diện tích bề mặt lớn và có khả năng hấp phụ cũng như lưu giữ các chất màu.

Định lượng mẫu lá đinh lăng

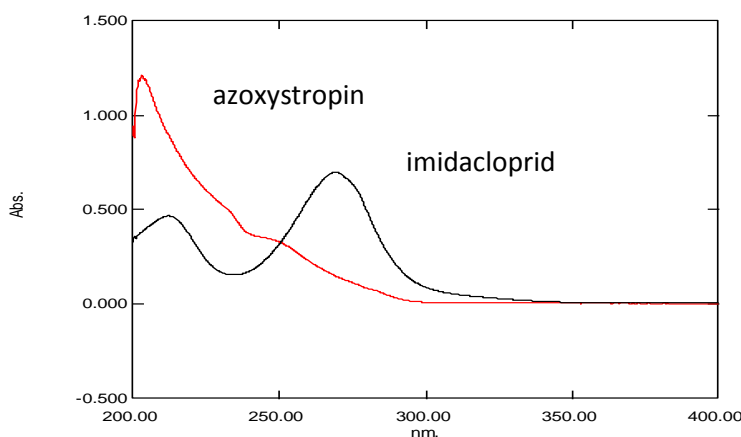
Mẫu lá được thu lúc sáng sớm vào ngày thứ ba và thứ bảy sau khi phun thuốc. Sau đó phân tích ngay theo quy trình đã xây dựng.

3. KẾT QUẢ

3.1. Xây dựng quy trình định lượng

Khảo sát điều kiện phân tích sắc ký

Phổ UV của imidacloprid và azoxystrobin để tìm bước sóng chung. Tiến hành quét phổ từ 200-400 nm.



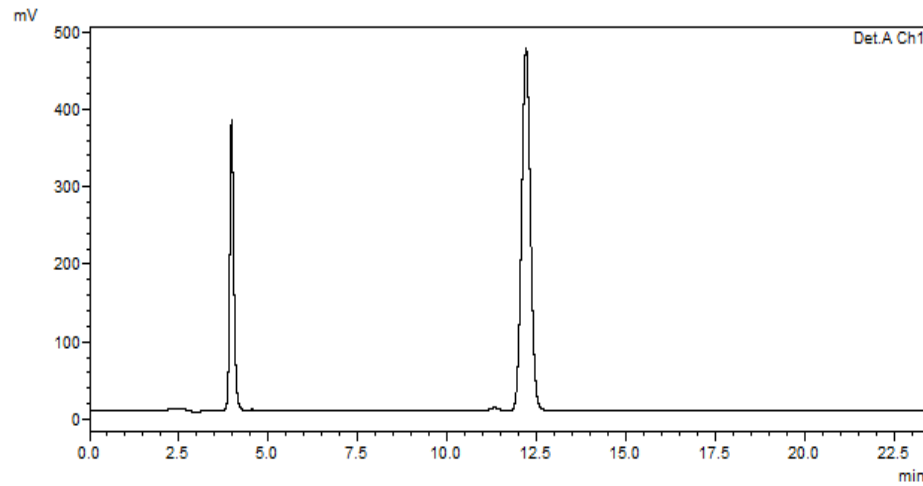
Hình 3.1. Phổ hấp thụ của azoxystrobin và imidacloprid trong acetonitril

Hình 3.1 cho thấy azoxystrobin có độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 207 nm, imidacloprid là 270 nm. Hai phổ này có độ hấp thụ giao nhau tại bước sóng 250 nm. Chọn bước sóng 250 nm để định

lượng đồng thời hai chất này.

Khảo sát thành phần pha động

Hệ dung môi ACN - nước (55:45) cho pic đẹp và tách tốt nhất.



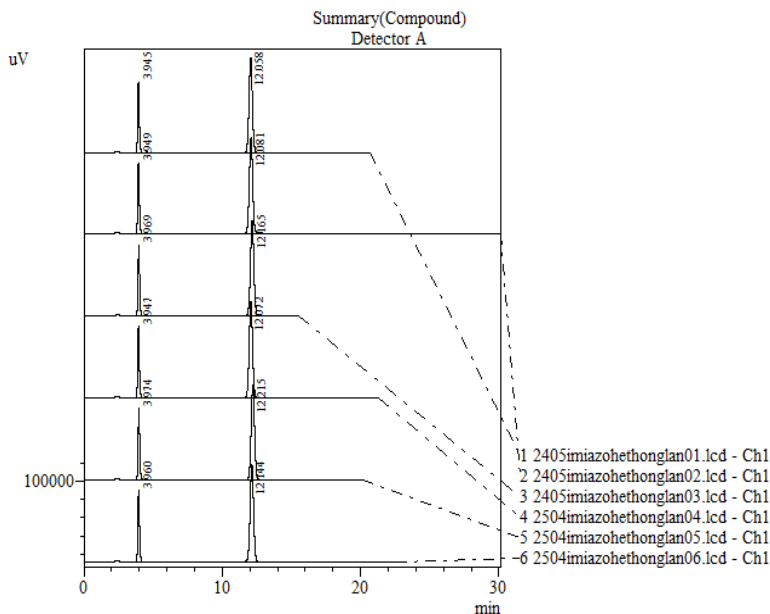
Hình 3.2. Sắc ký đồ ACN/ Nước (55%:45%)

Khảo sát tốc độ dòng

Tốc độ dòng 1 ml/phút cho thấy thời gian lưu giảm dần, pic rõ đẹp, hai pic tách nhau hoàn toàn.

3.2. Thẩm định quy trình

Tính phù hợp hệ thống



Hình 3.3. Kết quả sắc ký đồ khảo sát tính phù hợp hệ thống

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của Imidacloprid

Số lần tiêm mẫu	t _R (phút)	S _{pic} (μAU x giây)	As	Rs imi	N
1	3,954	626144	1,140	0,941	39194,789
2	3,949	634100	1,126	0,955	39100,101
3	3,969	638942	1,138	0,967	39103,700
4	3,947	642210	1,156	0,942	38679,280
5	3,974	643648	1,162	0,951	39004,980
6	3,960	660550	1,128	0,960	38243,829
Trung bình	3,957	640932	1,142	0,953	38887,780
%RSD	0,309	1,797	1,282	0,011	0,933
SD	0,012	11517	0,015	0,0101	362,722

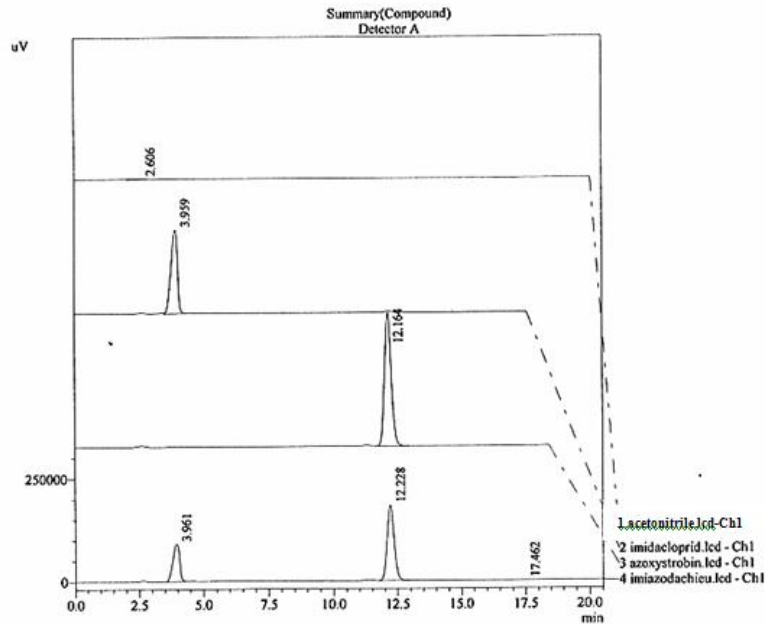
Bảng 3.2. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống Azoxystrobin

Số lần tiêm mẫu	t _R (phút)	S (μAU x giây)	As	Rs azo	N
1	12,058	1805578	1,013	2,012	76407,704
2	12,081	1814130	1,009	2,212	75540,833
3	12,165	1824734	1,007	2,411	75960,530
4	12,072	1832351	1,021	2,254	76049,748
5	12,215	1835474	1,014	2,211	76593,872
6	12,144	1828874	0,999	2,231	73276,171
Trung bình	12,122	1823524	1,010	1,889	75638,143
%RSD	0,513	0,631	0,731	21,12	1,605
SD	0,012	11498	0,007	0,399	1213,992

Bảng 3.1 và 3.2 cho thấy giá trị độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S), số đĩa lý thuyết đều không quá 2%, hệ số đối xứng (As) nằm trong khoảng 0,8-1,5, độ phân giải

(Rs) lớn hơn 1,5 vì vậy hệ thống có tính phù hợp, có thể tiếp tục tiến hành những bước đánh giá tiếp theo với điều kiện sắc kí tương tự.

Tính đặc hiệu



Hình 3.4. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu Imidacloprid và Azoxystrobin

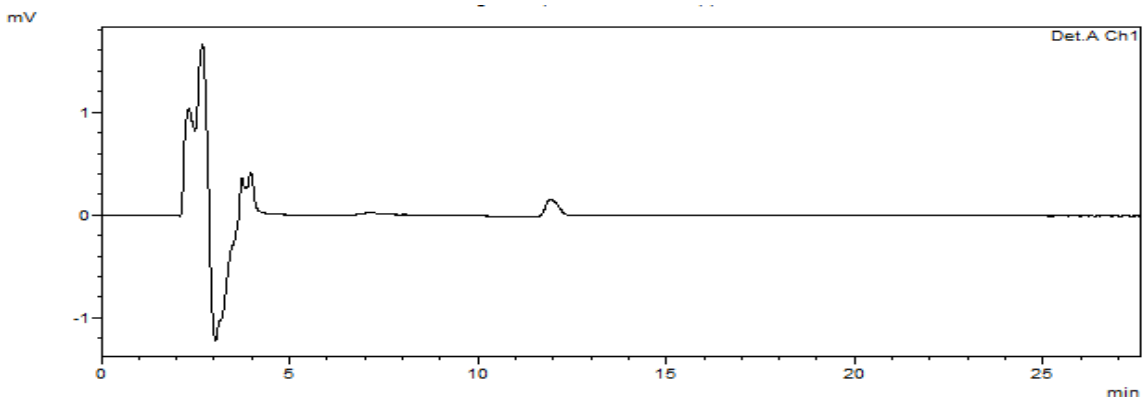
Hình 3.4 cho thấy đối với dung dịch chuẩn, trên sắc ký đồ xuất hiện hai pic Imidacloprid và Azoxystrobin có thời gian lưu 3,959 phút và 12,210 phút.

Đối với sắc ký đồ trên mẫu trắng, trên sắc ký đồ không có pic nào xuất hiện tương ứng tại thời gian lưu của Imidacloprid và Azoxystrobin.

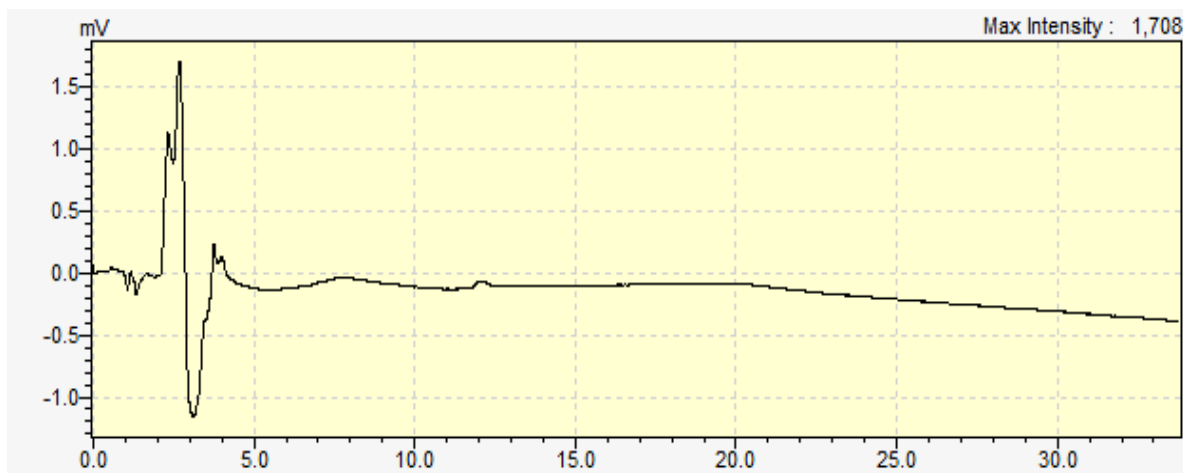
Đối với mẫu giả định, sắc ký đồ cho hai pic tương ứng với pic của Imidacloprid và Azoxystrobin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn về thời gian lưu.

Vì vậy quy trình phân tích có tính đặc hiệu.

Xác định LOD và LOQ của thiết bị



Hình 3.5. Hỗn hợp imidacloprid và azoxystrobin ở nồng độ 0,048 ppm



Hình 3.6. Hỗn hợp imidacloprid và azoxystrobin ở nồng độ 0,0048 ppm

Hình 3.5 và 3.6 cho thấy khi nồng độ Azoxystrobin là 0,048 ppm và imidacloprid là 0,0048 ppm thì chiều cao = 3 lần đường nền. Do đó:

- LOD của Azoxystrobin là 0,048 ppm.

- LOD của Imidacloprid là 0,0048 ppm.

Từ đó suy ra:

$$\begin{aligned} \text{- LOQ của Azoxystrobin} &= \frac{10}{3} \text{LOD} \\ &= \frac{10}{3} \times 0,048 = 0,16 \text{ ppm.} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{- LOQ của Imidacloprid} &= \frac{10}{3} \text{LOD} \\ &= \frac{10}{3} \times 0,0048 = 0,016 \text{ ppm.} \end{aligned}$$

Tính tuyến tính

Bảng 3.3. Phương trình hồi quy của Imidacloprid và Azoxystrobin

Chất phân tích	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan R ²	Khoảng nồng độ tuyến tính (ppm)
imidacloprid	y = 71350x + 10098	R ² =0,998	0,4-1,6
azoxystrobin	y = 168301x + 13071	R ² =0,997	0,4-1,6

Bảng 3.3. cho thấy tỷ lệ diện tích pic sắc ký và nồng độ phụ thuộc tuyến tính với nhau một cách chặt chẽ với hệ số tương quan cao đạt yêu cầu. Khoảng nồng độ tuyến tính rộng đối với cả hai chất Imidacloprid và Azoxystrobin từ 0,4-1,6 ppm. Do đó, ta có thể sử dụng

phương pháp đường Imidacloprid và azoxystrobin trong mẫu thử ở khoảng tuyến tính đã khảo sát.

Độ chính xác

- Độ lặp lại của phép đo

Bảng 3.4. Độ lặp lại của hệ thống HPLC với mẫu Azoxystrobin

TT	Thời gian lưu của Azoxystrobin		Diện tích pic của Azoxystrobin	
	Thời gian lưu	Các thông số thống kê	Diện tích	Các thông số thống kê
1	12,081	Giá trị trung bình	6472807	Giá trị trung bình
2	12,077	$X_{tb}=12,162$	6535964	$X_{tb}=6495348.67$
3	12,132	Độ lệch chuẩn	6475974	Độ lệch chuẩn
4	12,167	$SD=0,088$	6419486	$SD=60348.26$
5	12,205	Độ lệch chuẩn tương đối	6475006	Độ lệch chuẩn tương đối
6	12,311	$RSD(\%)=0,72\%$	6592855	$RSD(\%)=0,92\%$

Bảng 3.5. Độ lặp lại của hệ thống HPLC đối với mẫu Imidaclopid

TT	Thời gian lưu của Imidaclopid		Diện tích pic của Imidaclopid	
	Thời gian lưu	Các thông số thống kê	Diện tích	Các thông số thống kê
1	3,959	Giá trị trung bình	2375675	Giá trị trung bình
2	3,964	$X_{tb}=3,959$	2360311	$X_{tb}=2383429,5$
3	3,971	Độ lệch chuẩn	2339617	Độ lệch chuẩn
4	3,966	$SD=0,0188$	2375992	$SD=34611,11$
5	3,973	Độ lệch chuẩn tương đối	2419586	Độ lệch chuẩn tương đối
6	3,922	$RSD(\%)=0,47\%$	2429396	$RSD(\%)=1,45\%$

Bảng 3.4 và 3.5 cho thấy hệ thống sắc ký lỏng có độ lặp lại tốt. Đối với phép định lượng, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic là 0,92 % và 1,45 % ứng

với Azoxystrobin và Imidaclopid. Quy trình phân tích ổn định và có thể áp dụng để phân tích mẫu thử.

- Độ chính xác trung gian

Bảng 3.6. Độ chính xác trung gian đối với mẫu Imidaclopid

Số lần đo	Diện tích pic ($\mu AU \cdot \text{giây}$)			Kết quả
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	
1	2367836	2341037	2352453	
2	2301897	2401004	2390451	
3	2401211	2390312	2385421	
4	2315012	2352789	2410207	
5	2342202	2321107	2331652	
6	2296789	2321775	2314473	
Trung bình	2337491	2354671	2364109	2352090
RSD	1,75%	1,44%	1,57%	1,59%

Bảng 3.7. Độ chính xác trung gian đối với mẫu Azoxystrobin

Số lần đo	Diện tích pic ($\mu\text{AU} \cdot \text{giây}$)			Kết quả
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	
1	6399178	6417754	6475441	
2	6400153	6438765	6390435	
3	6403347	6443221	6485421	
4	6421182	6432119	6410379	
5	6501122	6421277	6478553	
6	6467781	6456423	6455763	
Trung bình	6432127	6432927	6449332	6438128
RSD	0,66%	0,23%	0,61%	0,5%

Bảng 3.7 và bảng 3.8 cho thấy quy trình phân tích có độ chính xác cao (RSD của diện tích pic $\leq 2\%$). Quy trình định lượng đồng thời hai chất Imidacloprid và Azoxystrobin bằng

phương pháp HPLC có tính đặc hiệu, miền giá trị rộng và độ chính xác cao, do đó quy trình phân tích ổn định và có thể áp dụng để phân tích mẫu thử.

Độ đúng

Bảng 3.8. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp với mẫu Imidacloprid

Mức nồng độ đo (%)	Imidacloprid			
	Diện tích pic ($\mu\text{AU} \cdot \text{x giây}$)	Nồng độ đo ở các mức ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$) tính từ phương trình hồi quy	Tỷ lệ hồi phục %
80%	205027	2	1,99	101,00
	208279	2	2,03	98,29
	205482	2	2,00	99,97
100%	245580	2,5	2,48	101,00
	250561	2,5	2,54	98,12
	250227	2,5	2,54	98,25
120%	292776	3	3,06	98,00
	286531	3	2,98	100,30
	288721	3	3,01	99,60

Bảng 3.9. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp với Azoxystrobin

Mức nồng độ đo (%)	Azoxystrobin		Nồng độ (µg/ml) tính từ phương trình hồi quy	Tỷ lệ hồi phục %
	Diện tích pic (µAU x giây)	Nồng độ đo ở các mức (µg/ml)		
80%	486013	2	2,02	98,98
	478894	2	2,01	99,25
	488829	2	2,03	98,28
100%	580466	2.5	2,50	99,79
	589840	2.5	2,59	98,41
	587042	2.5	2,53	98,46
120%	677931	3	3,00	99,82
	669835	3	2,96	101,22
	670075	3	296	101,48

Bảng 3.8 và 3.9 cho thấy tỷ lệ phục hồi ở 3 mức nồng độ của Imidacloprid và Azoxystrobin nằm trong khoảng 98-102% nên phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng.

Như vậy quy trình định lượng imidacloprid và Azoxystrobin bằng phương pháp HPLC có tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính rộng, độ chính xác và độ đúng đạt yêu cầu.

3.2. Chiết và định lượng

Đánh giá hiệu quả của dung môi chiết

Dung môi diclorometan chiết hiệu quả và dịch chiết sạch nhất. Chọn diclorometan làm dung môi chiết mẫu.

Phương pháp loại tạp, độ thu hồi

Chiết lỏng – lỏng

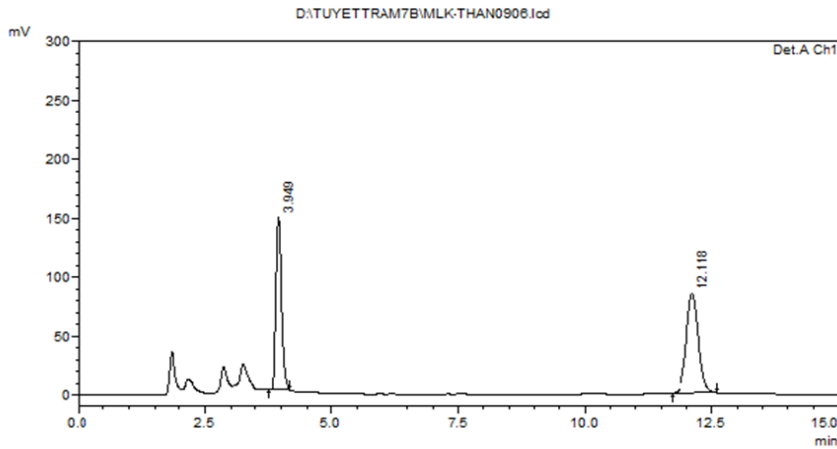
Sau khi phân tích dịch chiết bằng HPLC cùng với chuẩn, kết quả độ thu hồi chiết lỏng – lỏng đạt 90%.

Chiết lỏng – lỏng và than hoạt

Chiết lỏng – lỏng kết hợp than hoạt có ưu điểm than hoạt có khả năng hấp phụ tốt chất màu cho kết quả sắc ký đồ tách tốt nhưng độ thu hồi thấp hơn, chỉ khoảng 80%.

Chiết lỏng – lỏng và silicagel

Silicagel giữ lại chất nhựa và loại bỏ được một số chất màu trong dịch chiết. Tuy nhiên độ thu hồi của phương pháp này khoảng 80%.

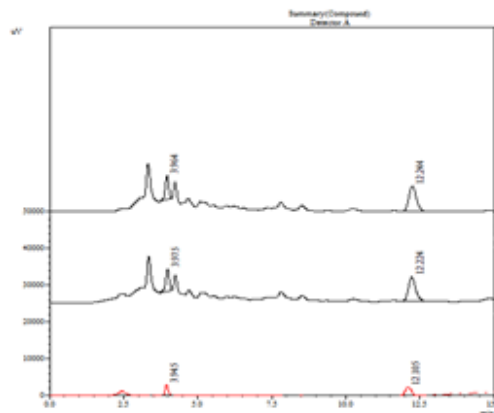


Hình 3.7. Kết quả khảo sát loại tạp bằng than hoạt

Bảng 3.10. Kết quả độ thu hồi của phương pháp chiết và làm sạch Imidacloprid và Azoxystrobin trong lá Đỉnh lăng

	Phương pháp	Hàm lượng chuẩn (ppm)	Hàm lượng thêm được (ppm)	Độ thu hồi (%)
Azoxystrobin	LLE	4	3,6	90
	LLE + than hoạt	4	3,2	80
	LLE + silicagel	4	3,0	75
Imidacloprid	LLE	4	3,7	92,5
	LLE + than hoạt	4	2,9	72,5
	LLE + silicagel	4	3,0	75

Phương pháp chiết bằng diclorometan và làm sạch bằng lắc phân bố cho sắc ký đồ sạch và độ thu hồi khoảng 90%.
Định lượng mẫu lá đỉnh lăng



Hình 3.8. Sắc ký đồ mẫu thử ở ngày thứ ba và thứ bảy và mẫu chuẩn

Bảng 3.14. Kết quả định lượng Imidacloprid và Azoxystrobin trong lá đinh lăng

	Hàm lượng (mg/kg) 3 ngày sau phun	Hàm lượng (mg/kg) 7 ngày sau phun
Imidacloprid	0,1	-
Azoxystrobin	0,2	-

Sau ba ngày phun thuốc theo liều lượng hướng dẫn của nhà sản xuất, hàm lượng của Imidacloprid (0.1 ppm) và Azoxystrobin (0,2 ppm) đều dưới ngưỡng quy định chung của các chất này trong rau quả. Sau bảy ngày phun thuốc, lá Đinh lăng không còn dư lượng của imidacloprid và azoxystrobin.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thử nghiệm quy trình định lượng đồng thời Imidacloprid và azoxystrobin bằng HPLC/UV-VIS với tỷ lệ pha động nước - acetonitril (45:55), tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích mẫu 20 µl, bước sóng 250 nm.

Phương pháp có độ lặp lại với RSD diện tích pic của Imidacloprid là 1,45% và RSD của diện tích pic của Azoxystrobin là 0,92% và có độ chính xác trung gian cao với $RSD \leq 2\%$. Phương pháp có sự phụ thuộc tuyến tính của nồng độ chất phân tích với hệ số tương quan hồi quy $\geq 0,997$ (hay $R^2 \geq 0,995$) đạt yêu cầu định lượng. Độ đúng nằm trong khoảng 98-102% nên quy trình đạt yêu cầu phân tích định lượng.

Qua kết quả phân tích Imidacloprid và Azoxystrobin không còn tồn dư trong lá Đinh lăng sau bảy ngày phun thuốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahmad Baig Sajad. Et al, 2012. Imidacloprid residues in vegetables, soil

and water in the southern Punjab, Pakistan. Journal of Agricultural Technology. 8(3), pp.903-916.

2. Ashorkr. et al, 2006. Persistence and fate of Carbosulfan and Imidacloprid residue in potato plants. Central Agricultural Pesticides Laboratory. Agricultural Research Centre, Egypt.

3. Bộ Y tế, 2009. Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích, Phụ lục 7 –Thông tư 22/2009/TT-BYT Quy định về đăng ký thuốc.

4. ICH Topic Q2B, 1996. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

5. Mostafa A. Abbassy, Mamdouh A. Marzouk, Hoda M.Nasr, Awatef S. Mansy, 2014. Analytical Determination of imidacloprid and tetraconazole residues in Cucumber plant after Whitely and Powdery mildew control, Vol 1, (2), pp. 1-15.

6. Nageswara Rao. Et al, 2012. Development and Validation of HPLC-UV method for Simultaneous determination of Strobilurin fungicide residues in tomato fruits followed by matrix solid phase Disperision (MSPD). Department of Analytical Chemistry International Insituate of Biotechnology and Toxicology. 3(11). pp, 113-118.

7. Nguyễn Thị Kim Phụng, 2007. Phương pháp cô lập các hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh, tr 247.

8. Sacramento C.A, 2002. HPLC Determination of Total Imidacloprid

Vegetation, Center for Analytical Chemistry, California, (916) 262-2080.

9. Vojislava Bursic, Sanja Lazic, Vera Stozsin, Ferenc Bagi, Ferenc Balaz, 2007. Determination of azoxystrobin residues in cucumbers. pp 257-260.

A HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF IMIDACLOPRID AND AZOXYSTROBIN RESIDUES: CASE STUDY IN *POLYSCIAS FRUTICOSA* (L.) HARMS

Nguyen Phuoc Dinh, Le Huu Bao Tran, Vo Thi Tuyet Tram and Do Van Mai
Faculty of Pharmacy and Nursing, Tay Do University
(Email: dinhanan2007@yahoo.com)

ABSTRACT

*The Mekong Delta has great potential for crop and medicinal plants production. Plant protection chemicals are widely used. The new pesticides, Imidacloprid and Azoxystrobin, have broad spectrum, effective control of pests, and pathogens on plants with short half life. Currently, there is no simultaneous quantitative procedures for finding the residue of these substances. Therefore, it is necessary to study a fast quantitative method to determine the residue of pesticides on raw materials for better deciding harvesting time. This activity leads to obtain the good materials which can meet the requirement of clean products for functional foods or medicine. The quantitative liquid chromatography (HPLC) of UV probes was carried out on the leaves of *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. The results reach the requirements for system suitability, linearity, specificity, correctness, quantitative limits and detection limits. Analytical results also showed that there was not detected of these pesticides residue on the leaves after seven days spraying.*

Keywords: Pesticide residue, Imidacloprid, Azoxystrobin, HPLC method, *Polyscias fruticosa* (L.) Harms.