

7

Có nhiều lý do để giải thích tại sao endosulfan và fenvalerate gây ra nguy cơ cao cho thức ăn. Trước hết, lượng thuốc trừ sâu được sử dụng thường cao hơn khuyến cáo. Thứ hai, sản phẩm tạo ra thường được thu hoạch trước thời hạn cách ly được khuyến cáo. Trong cuộc khảo sát lần này, mẫu được lấy khi nho đang được thu hoạch, nhưng dư lượng endosulfan rất cao (100% mẫu dương tính, 6% trong số đó có dư lượng cao hơn MRL). Thứ ba, các phương thức canh tác không tương thích với phương pháp quản lý dịch hại tổng hợp (IPM). Thêm vào đó, khoảng cách vùng đệm là không đủ.

Sử dụng mô hình PIRAMS, chúng ta nhận thấy là khi lượng sử dụng giảm xuống mức được khuyến cáo (khoảng một nửa), nguy cơ cho thực phẩm giảm xuống mức trung bình. Chỉ số PIRAMS cũng giảm khi thời gian cách ly được kéo dài ra hay phương thức canh tác trở nên tương thích với IPM. Tóm lại, các chiến lược quản lý theo đề nghị (Bảng 14) đã giúp giảm nguy cơ. Tương tự, nguy cơ gây ra bởi methidathion và methamidophos trong nước có thể được giảm xuống bằng cách áp dụng các chiến lược quản lý tốt (Bảng 15).

8

Bảng 37. Dữ liệu khí tượng trung bình ở Hóc Môn (1998)

Tháng	Nhiệt độ (oC)			Độ ẩm tương đối (%)	Số giờ nắng/ tháng	Lượng mưa (mm)
	TB	Max.	Min.			
1	27.4	33.1	24.2	71	193	6
2	27.7	33.6	24.4	71	192	27
3	28.5	33.9	25.4	72	187	86
4	29.1	34.5	26.5	75	196	187
5	28.7	34.4	25.5	79	182	478
6	27.5	31.2	25.1	80	170	269
7	27.7	32.2	24.8	80	168	317
8	27.9	32.8	25.5	80	139	343
9	27.5	33.3	25.2	74	181	158
10	26.7	31.5	24.8	86	104	426
11	27.4	32.9	24.5	77	165	182
12	27	34.7	20.1	76	137	123

Nguồn : Trung tâm Khí tượng miền Nam

Bảng 38. Tính chất đất trong vùng trồng rau Hóc Môn

Thông số	Giá trị
Cấu trúc đất ^a	Đất sét cát có mùn
Cacbon hữu cơ trung bình ^b	2 %
Hàm lượng sét trung bình ^b	27 %
Hàm lượng cát trung bình	52 %
Hàm lượng thịt trung bình	21 %
Tỷ trọng khối (gcm ⁻³)	1.4
Độ ẩm tương đối	40 %

^a Đất được phân loại dựa trên bản phân loại của USDA (Klute và Page, 1986);

^bPhân tích bằng các phương pháp trong Dane(2002)

8.3 Nhận diện vấn đề và đánh giá rủi ro

Vùng trồng rau Hóc Môn rất gần với khu dân cư. Vùng đệm giữa khu vực canh tác và khu dân cư rất nhỏ. Sản phẩm từ vùng này chiếm phần đáng kể, khoảng một phần ba thị trường rau tiêu thụ tại Tp. Hồ Chí Minh. Do đó, thực hiện đánh giá rủi ro ở khu vực này là rất cần thiết để bảo đảm chất lượng thực phẩm khi tới tay người tiêu thụ.

Mục tiêu của việc đánh giá rủi ro ở đây là nâng cao mức độ quan tâm, xác định hợp phần nào có rủi ro cao nhất, so sánh rủi ro tương đối của các hóa chất khác nhau được sử dụng trên khu vực và đề xuất chiến lược quản lý.

Bảng 39. Danh sách các thuốc trừ sâu chính sử dụng trên vùng nghiên cứu

Hóa chất	Thuộc nhóm	Lượng thuốc a.i (l/ha)	Thời gian cách ly (ngày) (để nhập)	% sử dụng
Cypermethrin	Pyrethroid	0.3-1.5	7	61.82
Fenobucarb	Carbamate	0.6-1.5	7	50.61
Methidathion	Lân hữu cơ	0.3-1.5	7	30.91
Fenvalerate	Pyrethroid	0.3-1.5	14	23.64
Endosulfan	Clo hữu cơ	0.1-0.6	14	12.6

Bảng 40. Dự đoán phân bố thuốc trừ sâu trong từng hợp phần ở mô hình vùng trồng rau (đơn vị: ppm)

	Khí	Đất	Rau cải	Nước	Thủy sinh	Cận lắng
Endosulfan	4.53E-06	1.95E-02	1.42E-01	5.40E-06	5.70E-05	2.48E-04
Cypermethrin	1.02E-09	1.45E-02	9.52E-02	6.74E-11	3.22E-05	1.64E-05
Fenobucarb	5.27E-05	5.62E-02	6.34E-02	1.90E-04	7.54E-05	2.05E-03
Fenvalerate	3.05E-12	9.04E-03	3.97E-02	3.97E-08	1.46E-06	4.17E-05
Methidathion	2.14E-12	4.98E-03	9.92E-03	2.38E-04	3.71E-05	8.30E-04



Vùng trồng cải ngọt ở Hóc Môn



Nhóm thực hiện dự án CARD của Trường Đại học Nông Lâm

8

Bảng 41. Dữ liệu phơi nhiễm của dư lượng cyclodiene [α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sulfate] thu được từ vùng trồng rau (bằng ELISA)

Hợp phần	Khoảng nồng độ (ppb)	Giá trị trung bình (ppb)	Bộ lệch chuẩn	% mẫu dương tính	Tổng số mẫu
Đất (3/2002 & 7/2003)	0-61	8	22.1	43	51
Nước (3/ 2002 & 7/ 2003)	0-13.5	1.5	4.3	68	50
Rau cải (từ đồng) (3/2002 & 7/ 2003)	0-62	13	14.1	34	38
Rau cải (từ chợ) (10/2002)	0-100	18	16.8	35	40

* Thêm vào mẫu nước mặt, 8 mẫu nước ngầm được lấy để phân tích. Tất cả các mẫu đều cho kết quả âm tính

Bảng 42. Dư lượng của fenobucarb và cypermethrin*

Hóa chất	Hợp phần	Khoảng nồng độ (ppb)	Giá trị trung bình (ppb)	% mẫu dương tính	Tổng số mẫu
Fenobucarb	Đất	7.6-13.8	10	100	5
	Nước	6-16	10	100	5
	Rau cải	0-230	31	30	30
Cypermethrin	Đất	9.5-21	14	100	5
	Nước	9-26	16	100	5
	Rau cải	0-560	43	37	30

*) Mẫu được lấy vào năm 2001 và phân tích bằng GC

8.4 Xác định đặc điểm rủi ro

8.4.1 Đặc điểm phơi nhiễm

Tất cả dữ liệu yêu cầu cho mô hình Fugacity được đưa vào bảng tính Excel, việc tính toán được thực hiện cho từng hóa chất (Mackay, 2001). Kết quả được tự động tính, cho thấy nồng độ và tỷ lệ hóa chất được sử dụng trong từng hợp phần (Bảng 40).

Để thu được dữ liệu phơi nhiễm cho dư lượng endosulfan, các mẫu được lấy từ đồng ruộng theo quy trình lấy mẫu chuẩn và đem phân tích bằng ELISA (Bảng 41) và kiểm chứng lại bằng sắc ký khí (AOAC, 2000). Tám mẫu nước ngầm và nước mặt đều cho kết quả âm tính (không được đưa vào bảng 41).

Bảng 43. Dữ liệu hóa học của thuốc trừ sâu sử dụng trên đồng

Hóa chất	Cypermethrin	Endosulfan	Fenvalerate	Fenobucarb	Methidathion
KLPT	416.3 ^a	406.9 ^a	419.9 ^a	207.3 ^a	302.3 ^a
Độ tan	0.004 ^a	1 ^a	<0.01 ^a	420 ^a	200 ^a
H	0.0253313 ^a	1.48 ^a	1.40 x 10 ^{-7a}	na	1.66 x 10 ^{-9a}
logKow	6.6 ^a	4.76 ^a	5.01 ^a	2.79 ^a	2.2 ^a
t1/2S	8 ^c	50 ^b	75 ^a	11 ^c	10.7 ^c
t1/2V	1 ^c	5 ^b	14 ^c	8 ^c	4.4 ^c
t1/2W	0.21 ^c	35 ^b	21 ^c	21 ^c	18 ^a
BCF ^e	6.5	4.9	5.1	3.1	2.6
BCF ^f	191091.44	2740.99	4911.81	29.59	7.61

^aTomlin, 1997; ^bHornsby và nnk.,1996; ^cEXTOXNET

^eBCF=0.607+0.893logK_{ow} (Chiou và nnk, 1997); ^fBCF=0.048K_{ow} (Mackay,1982)

Bảng 44. Dữ liệu độc tính của thuốc trừ sâu sử dụng trên đồng

Loài	Độc tính	Cypermethrin'		Endosulfan'		Fenvalerate'		Methamidophos'		Methidathion'	
		µng/kg hay mg/l	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min
Động vật có vú	LD50 cấp tính	138	4150	70	77	451	na	20	50	25	80
	LD50 qua da	2460	4920	360	2250	1000	5000	130	na	200	1546
	LC50 hô hấp	2.5	na	0.0126	0.0345	101	na	0.2	na	3.6	na
Chim	LD50 cấp tính	2000	10000	220	810	1600	9932	10	29.5	23.6	28
Bò sát	LD50 cấp tính	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Ếch nhái	LC50 cấp tính	na	na	2	12	na	na	na	na	na	na
Cá	LC50 (96h)	0.00069	0.0024	0.3	5085	0.0036	na	40	47.7	0.002	0.01
Giáp xác	EC50 (48h)	0.00015	na	7	7000	na	na	0.27	na	na	na
Thủy sinh	LC50 (96h)	na	na	0.56	na	na	na	178	na	na	na
Tảo	LC50	na		0.006		0.02		0.004		0.001	
ADI (mg/kg)		0.05									

Dữ liệu từ những nguồn khác

Dư lượng của fenobucarb và cypermethrin trong cải được ghi nhận từ cuộc nghiên cứu khác (Bùi Cách Tuyến và nnk., 2002; Phùng Võ Cẩm Hồng, 2002) và được sử dụng để đánh giá rủi ro (Bảng 42).

8.4.2 Dữ liệu về đặc điểm độc tính

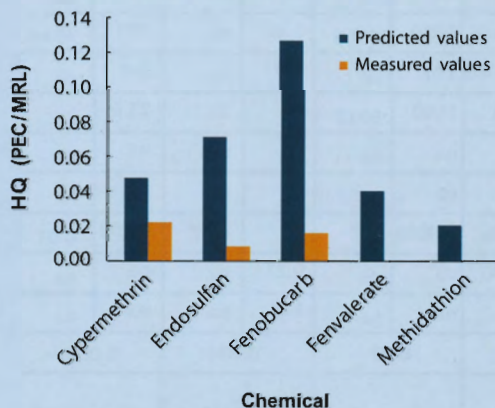
Dữ liệu hóa học và độc tính của thuốc trừ sâu sử dụng trên đồng được trình bày ở Bảng 43 và 44.

8.5 Đánh giá rủi ro

8.5.1 Thương số rủi ro

Giá trị thương số rủi ro thu được từ 5 loại thuốc trừ sâu chính được trình bày trong hình 8-2. Dựa vào nồng độ dự đoán, tất cả

Hình 8-2. Nguy cơ giả định của thuốc trừ sâu dựa vào giá trị thương số rủi ro của sản phẩm



các thuốc trừ sâu trừ fenobucarb được tìm thấy với rủi ro không đáng kể. Nguy cơ liên quan đến fenobucarb có thể giảm bằng cách giảm mức sử dụng. Giá trị HQ dựa vào dữ liệu thực tế thậm chí còn thấp hơn.

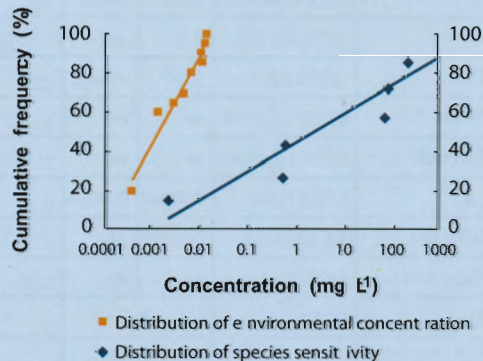
8.5.2 Đánh giá rủi ro theo xác suất

Như đã trình bày trong phần 4, trong giới hạn của các thông tin có sẵn, nghiên cứu này cố gắng áp dụng hướng đánh giá rủi ro theo xác suất cho endosulfan (sử dụng phân tích từ GC).

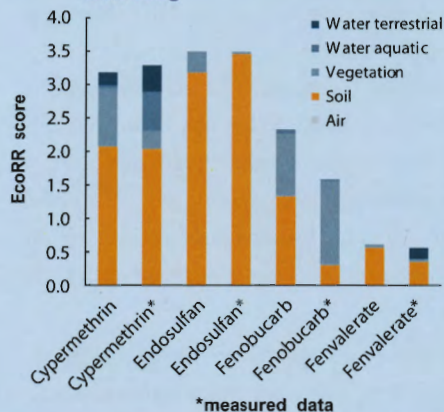
Dữ liệu của dư lượng endosulfan trong nước, nhỏ và độc tính được vẽ lại theo phân bố log-normal (Hình 8-3).

Có thể quan sát thấy từ hình 8 - 2 là nồng độ của dư lượng endosulfan trong nước có thể ảnh hưởng khoảng 14% loài, với giả thiết rằng dữ liệu độc tính bao quát hết các loài trong môi trường.

Hình 8-3. Trình bày dữ liệu phơi nhiễm và độc tính theo đường phân bố xác suất tuyến tính



Hình 8-4. Đánh giá rủi ro sinh thái tương đối trên đồng



8.5.3 Rủi ro sinh thái tương đối (EcoRR)

Chỉ số EcoRR được tính cho năm loại thuốc trừ sâu trong năm hợp phần và được trình bày trong hình 8 - 4.

Cypermethrin, endosulfan và fenobucarb cho thấy rủi ro thấp, trong khi fenvalerate và methidathion có rủi ro không đáng kể. Endosulfan, hóa chất bị hạn chế sử dụng cho rau

có lá cho thấy nguy cơ tổng cộng cao.

Đối với phần lớn hóa chất, nguy cơ cao nhất được xác định trong đất do các hóa chất này khá bền trong đất. Nguy cơ cũng cao trong rau cải nhiễm endosulfan, cypermethrin và fenobucarb. Độ bền của hóa chất trong hợp phần nhất định là yếu tố quan trọng nhất trong đánh giá chỉ số EcoRR. Hóa chất có chỉ số EcoRR cao trong hợp phần nơi chúng có chu kỳ bán hủy dài hơn.

Xác suất phơi nhiễm thấp nhất trong hợp phần không khí. Do đó, phần lớn thuốc trừ sâu có nguy cơ không đáng kể với không khí. Điều này có thể được giải thích là nông dân Việt Nam không sử dụng máy bay để phun thuốc mà phun bằng tay. Cách phun này gây ra nhiều rủi ro cho sức khỏe nông dân nhưng ít nguy cơ cho môi trường.

Có thể nhận thấy chỉ số EcoRR không phải là giá trị rủi ro tuyệt đối. Các chỉ số này chỉ là phép đo tương đối của rủi ro môi trường, có thể được dùng để so sánh rủi ro giữa các hóa chất dùng trên đồng.

Bảng 45. Rủi ro theo PIRAMS đối với vùng trồng rau Hóc Môn

Hóa chất	Rủi ro của các thành phần khác nhau				
	Nông dân	Nước mặt	Lan tỏa	Nước ngầm	Thực phẩm
Cypermethrin	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Trung bình
Endosulfan	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Trung bình
Fenobucarb	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Trung bình
Fenvalerate	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Trung bình
Methidathion	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Trung bình	Thấp

8

8.6 Quản lý rủi ro

Mô hình PIRAMS được sử dụng để xác định rủi ro của từng loại hóa chất ở từng thành phần khác nhau. Dữ liệu đưa vào thu được từ các cuộc điều tra và từ phân tích thực tế. Xếp hạng rủi ro theo PIRAMS được trình bày trong bảng 45.

Sử dụng mô hình PIRAMS, có thể nhận thấy là khi giảm lượng sử dụng hiện tại, tăng diện tích vùng đệm v.v thì xếp hạng rủi ro của nông dân giảm từ trung bình xuống thấp. Chỉ số PIRAMS cũng giảm khi tăng thời gian cách ly hay tăng sự tương hợp của biện pháp canh tác với IPM. Tóm lại, các chiến lược quản lý rủi ro đã trình bày ở phần trên (Bảng 14, 15, 16 và 17) hoàn toàn có thể giúp giảm rủi ro.

8.7 Kết luận

Kết hợp với đánh giá rủi ro bằng mô hình EcoRR, đánh giá xác suất và thương số rủi ro, mô hình PIRAMS chỉ ra những biện pháp canh

tác hiện tại gây ra rủi ro đáng kể cho sản phẩm, sức khỏe con người và môi trường. Rủi ro do endosulfan gây ra đặc biệt không thể chấp nhận. Mặc dù nghiên cứu trước đây từ chợ thành phố cho thấy không có mẫu nào có chứa dư lượng cao hơn MRL, nghiên cứu gần đây đặt ra mối quan tâm về sản phẩm bị nhiễm. Những sản phẩm này được lấy từ lúc thu hoạch có chứa nồng độ cao endosulfan và các sản phẩm chuyển hóa của nó.

Việc đánh giá rủi ro này cho thấy sự quan trắc thường xuyên dư lượng endosulfan và các dẫn xuất của nó trước khi đưa sản phẩm ra thị trường là rất cần thiết. Để có một sự kiểm soát chất lượng tốt, việc sàng lọc một lượng lớn mẫu là điều cần thiết. Điều này có thể đạt được bằng cách sử dụng các test ELISA và sau đó kết quả có thể kiểm chứng lại bằng các phương pháp sắc ký lỏng hoặc khí.

PHẦN C

**Một số phương pháp nhanh phát hiện dư lượng thuốc
bảo vệ thực vật**

9

Phương pháp nhanh để phân tích độc tố nấm mốc và dư lượng thuốc bảo vệ thực vật - Vấn đề hệ thống đảm bảo chất lượng ở Việt Nam.

Con người đã biết về hoá học miễn dịch từ lâu nhưng tiềm năng ứng dụng rộng rãi của nó để đánh giá mức độ ô nhiễm môi trường mới được biết đến gần đây. Cơ sở của phương pháp hoá miễn dịch là dựa vào các kháng thể đặc hiệu. Rất nhiều kháng thể đặc hiệu đã được sản xuất để phục vụ việc đánh giá mức độ ô nhiễm môi trường và sức khỏe con người, kiểm tra dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và các sản phẩm chuyển hóa của nó, vi sinh vật trong thực phẩm, kim loại nặng, độc tố nấm mốc v.v...

Có thể nói phương pháp hóa miễn dịch là một phương pháp mới liên hệ khăng khít với chuyên ngành hoá phân tích. Đối với thuốc bảo vệ thực vật, phương pháp này không những phân tích được rất nhiều loại thuốc mà còn phân tích được những dẫn xuất của chúng.

Những đặc điểm đó đã tạo cho phân tích hoá miễn dịch trở thành công cụ quý giá để đánh

giá môi trường và phân tích thực phẩm v.v... Mặc dầu vậy, mãi đến tháng 6/1992 tại hội nghị ở Las Vegas (Mỹ) thế giới mới thật sự chú ý đến việc sử dụng phương pháp này để phân tích thực phẩm, hóa chất nông nghiệp, sản phẩm hóa học và đề cập đến một số vấn đề nhằm khuyến khích áp dụng rộng rãi phương pháp hóa miễn dịch như sau:

- Thông tin đầy đủ giữa nhà sản xuất các bộ kit để chẩn đoán và người sử dụng.
- Phát triển tiêu chuẩn và quy định hướng dẫn để các bên liên quan thừa nhận kết quả (một số hợp đồng kinh tế vẫn chưa công nhận kết quả khi sử dụng phương pháp phân tích nhanh)
- Chương trình đào tạo cho người điều hành và sử dụng v.v...

Thuốc bảo vệ thực vật là chế phẩm có nguồn gốc từ hoá chất, thực vật, động vật, vi sinh vật... dùng để phòng trừ sinh vật gây hại cho

cây trồng, được sử dụng ngày càng rộng rãi ở nước ta (đặc biệt là các loại thuốc có nguồn gốc từ hoá chất). Mặt tích cực của việc dùng hoá chất bảo vệ thực vật đã được đề cập nhiều, nhưng mối nguy hại, rủi ro khi lạm dụng thuốc làm ảnh hưởng đến môi trường sinh thái, sức khoẻ con người thì cho đến nay vẫn chưa có biện pháp đề phòng hữu hiệu. Để kiểm nghiệm, phân tích dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và độc tố nấm mốc (mycotoxin) có nhiều phương pháp như: phương pháp truyền thống (phương pháp chuẩn) trong phòng thí nghiệm, đòi hỏi đầu tư trang thiết bị đắt tiền khó vận hành (cần cán bộ phân tích hoá học chuyên nghiệp, an tâm yêu nghề, gắn bó với phòng thí nghiệm), không thể trả lời kết quả ngay để kịp xuất hàng hoặc cảnh báo cho người tiêu dùng. Thực tế chỉ một số phòng thí nghiệm ở nước ta mới có thể phân tích được dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và độc tố nấm mốc.

Phương pháp nhanh như đã nói ở trên đã được nhanh chóng phát triển nhằm bổ sung (*bổ sung chứ không thể loại trừ*) cho phương pháp chuẩn, nhằm sàng lọc mẫu để kiểm tra phân tích mẫu kịp thời với số lượng lớn.

Thuốc trừ sâu được chia làm 4 nhóm chính:

Nhóm gốc phospho hữu cơ: dùng khá phổ biến, độc tính cao nhưng phân huỷ nhanh như diazinon, DVP, malathion, chlorpyrifos, fenitrothion, phosalone...

Nhóm gốc carbamate: dùng phổ biến, độc tính cao, phân huỷ nhanh như methomyl, cartap, BPMC, ...

Nhóm gốc clo hữu cơ: độc tính cao và rất bền trong môi trường tự nhiên, trong cơ thể động thực vật và tích lũy lâu trong mô mỡ. Đại diện của nhóm này được đề cập nhiều như DDT, dieldrin, endosulfan, ...

Nhóm cúc tổng hợp: độc tính thấp đối với động vật có vú. Dưới tác động của ánh sáng và các enzyme trong cây, các chất trong nhóm này được chuyển hoá thành hợp chất trung gian ít độc hơn. Đại diện của chúng gồm cypermethrin, fenvalerate, deltamethrin...

Ngoài phương pháp chuẩn và ELISA người ta còn dùng phương pháp RBPR (Rapid Biological test for Pesticide Residue) dựa vào sự ức chế enzyme acetylcholinesterase được giới thiệu ở AOAC năm 1980. Thực chất bộ kit GT của Thái Lan mà một số đơn vị đang áp dụng hiện nay đều dựa trên nguyên tắc ức chế enzyme nói trên. Trước đây Phân viện Công nghệ sau thu hoạch chúng tôi đã cải tiến phương pháp RBPR của Đài Loan thử nghiệm có kết quả đáng tin cậy khi kiểm tra dư lượng thuốc trừ sâu photpho hữu cơ và carbamate ở Tp. HCM và các tỉnh phía Nam. Tuy nhiên phương pháp này chỉ kiểm tra được nhóm photpho và carbamate. Do đó cần phát triển các bộ kit thử để kiểm tra dư lượng thuốc trừ sâu nhóm clo hữu cơ, nhóm cúc và mycotoxin mà trước mắt

9

là aflatoxin và ochratoxin. Tiếc rằng tài liệu đề cập đến phương pháp kiểm tra nhanh nhóm các cò n hạn chế, chúng tôi chưa có dip khảo nghiệm nên trong tập sách này chỉ giới thiệu một số tạp chí trong phần tài liệu tham khảo.

Phương pháp phân tích nhanh và hệ thống đảm bảo chất lượng ở Việt Nam

Mặc dầu dư luận xã hội cũng như các nhà sản xuất đã chú ý đến thực phẩm an toàn, rau sạch ... nhưng thực tế các vụ ngộ độc vẫn luôn xảy ra vì ta chưa có hệ thống đảm bảo chất lượng (QAS). Thực tế Nhà nước không thể quản lý chất lượng và an toàn thực phẩm nếu không áp dụng một hệ thống kiểm soát hoàn chỉnh, từ người sản xuất đến người tiêu dùng. Thành viên tham gia hệ thống này nhiều khi có quyền lợi nhất thời và suy nghĩ khác nhau nhưng vì lợi ích lâu dài, họ phải thống nhất với nhau trong hệ thống để đảm

bảo chất lượng đến tay người tiêu dùng. Ngộ độc thuốc bảo vệ thực vật đã và sẽ tiếp tục xảy ra là điều được báo trước, nhưng khó khắc phục nếu người nông dân không có sổ theo dõi loại thuốc, liều dùng, thời gian thu hoạch dưới sự giám sát của cán bộ bảo vệ thực vật địa phương.

Thông thường có ba rào chắn trong hệ thống đảm bảo chất lượng:

- Rào chắn thứ nhất: người thu mua sản phẩm dùng phương pháp nhanh kết hợp sổ sách theo dõi người trồng để mua và quyết định giá theo chất lượng.
- Rào chắn thứ 2: Siêu thị và cơ sở chế biến dùng phương pháp nhanh hoặc phương pháp chuẩn
- Rào chắn thứ 3: Kiểm tra thành phẩm trước khi xuất xưởng

Phương pháp kiểm tra nhanh ở hiện trường, kiểm tra chuẩn ở phòng thí nghiệm là công cụ hữu hiệu để đảm bảo thực hiện hệ thống nói trên.

ELISA Phương pháp phân tích nhanh dựa trên miễn dịch học

10

Giới thiệu

Phương pháp xét nghiệm thuốc trừ sâu dựa trên miễn dịch học được giới thiệu đầu tiên vào những năm 60 của thế kỷ 20. Nguyên lý của chúng dựa vào phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể- một phản ứng có tính đặc hiệu cao mà trong đó kháng nguyên là chất cần phân tích. Tuy nhiên việc áp dụng các phương pháp miễn dịch học này mới chỉ được phổ biến rộng vào những năm gần đây. Hai nguyên nhân thúc đẩy việc ứng dụng rộng rãi phương pháp trên là việc sản xuất được kháng thể đơn dòng và việc phát triển được phương pháp ELISA (ELISA là viết tắt của Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Trong ELISA, người ta sử dụng một enzyme (gọi là enzyme đánh dấu) giúp định lượng phản ứng miễn dịch một cách dễ dàng. Enzyme này sẽ tạo ra phức chất có màu, bền và không độc, nhờ đó có thể thực hiện phép đo bằng quang

kế. Máy móc phương tiện dùng cho ELISA không quá đắt tiền. Ngoài ra phương pháp này thậm chí còn có thể thực hiện ngay tại hiện trường nhờ thao tác đơn giản và trang bị gọn nhẹ.

Trong quá trình thực hiện các nghiên cứu điển hình đánh giá rủi ro tại các vùng trồng rau Vân Nội (ngoại thành Hà Nội) và Hóc Môn (ngoại thành Tp. Hồ Chí Minh), cũng như vùng trồng nho Ninh Thuận (miền Trung), phương pháp ELISA đã được ứng dụng cho việc phân tích thuốc trừ sâu endosulfan trong mẫu đất, nước và rau. Nhờ có thể phân tích hàng trăm mẫu trong một khoảng thời gian tương đối ngắn và không quá tốn kém, ELISA đã giúp cho việc sàng lọc mẫu được nhanh chóng làm giảm nhẹ được chi phí phân tích do chỉ những mẫu có kết quả dương tính mới phải phân tích lại bằng sắc ký.

10

10.1 Phương pháp ELISA cạnh tranh dùng cho phân tích các thuốc trừ sâu

Có rất nhiều phương thức ELISA cho các ứng dụng khác nhau nhưng đối với những chất có phân tử nhỏ như thuốc trừ sâu, người ta áp dụng dạng ELISA cạnh tranh. Trong đó có thể chia làm 2 kiểu như sau:

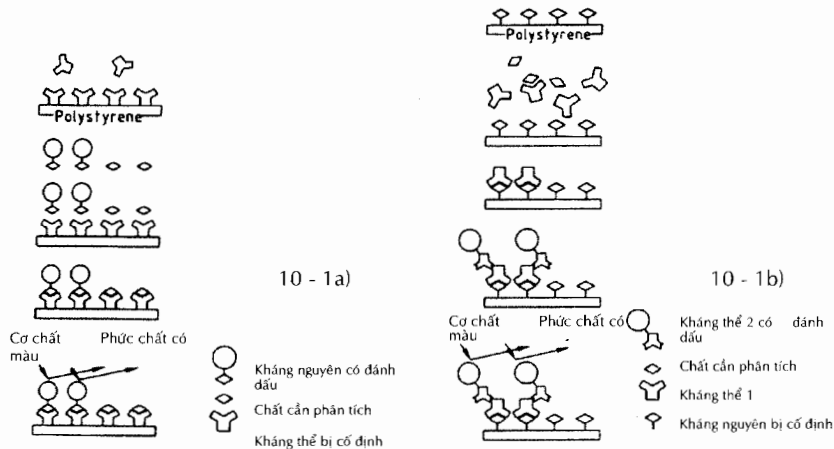
- (1) Cạnh tranh trực tiếp: cố định kháng thể (Hình 10-1a) và
- (2) Cạnh tranh gián tiếp: cố định cộng hợp kháng nguyên (Hình 10-1b).

Trong kiểu (1), kháng thể kháng thuốc trừ sâu được phủ lên những giếng nhựa nhỏ. Một hapten mô phỏng thuốc trừ sâu được gắn với một enzyme (enzyme đánh dấu) tạo nên cộng hợp enzyme có khả năng liên kết với kháng

thể. Khi cho dịch chiết mẫu và cộng hợp enzyme vào trong các giếng, thuốc trừ sâu trong dịch chiết và cộng hợp enzyme sẽ cùng cạnh tranh để liên kết với kháng thể. Sau khi rửa trôi những chất phản ứng còn dư, cơ chất tương ứng với enzyme sẽ được cho vào, dưới sự xúc tác của enzyme các phản ứng tạo màu hay phát huỳnh quang sẽ xuất hiện trong giếng. Nếu thuốc trừ sâu càng nhiều thì cộng hợp enzyme do kém tính cạnh tranh hơn sẽ bị kháng thể giữ lại càng ít, màu sẽ hiện lên yếu và ngược lại. So sánh mật độ quang của mẫu và các giếng chuẩn, ta sẽ định lượng được mức độ nhiễm thuốc trừ sâu trong mẫu.

Trong kiểu (2) cộng hợp giữa kháng nguyên và protein sẽ được cố định trên bề mặt rắn. Thuốc

Hình 10.1. Sơ đồ nguyên lý ELISA cạnh tranh



10-1a) Cạnh tranh trực tiếp: cố định kháng thể

10-1b) Cạnh tranh gián tiếp: cố định cộng hợp kháng nguyên

trừ sâu và một lượng kháng thể cố định được cho vào. Thuốc trừ sâu là một kháng nguyên tự do sẽ cạnh tranh với kháng nguyên cố định để bám vào kháng thể. Lượng kháng nguyên tự do (thuốc trừ sâu) càng nhiều thì lượng kháng thể bị kháng nguyên cố định giữ lại càng ít. Sau khi rửa trôi các chất còn dư, dùng một kháng thể thứ 2 có đánh dấu bằng enzyme để phát hiện lượng kháng thể ban đầu bị giữ lại. Từ đó ta có thể định lượng được thuốc trừ sâu trong mẫu.

10.2 Ưu và nhược điểm của các test ELISA

Ưu điểm

So với các phương pháp phân tích thông thường trong phòng thí nghiệm thì các phương pháp dựa trên miễn dịch có rất nhiều ưu điểm. Các phương pháp này nhanh, cơ động, sử dụng đơn giản, tương đối rẻ tiền và có độ nhạy cao.

Các phương pháp dựa trên miễn dịch không giới hạn cho phân tích một loại chất cụ thể mà

có thể phát triển cho rất nhiều loại chất. Tùy theo yêu cầu mà người ta phát triển phương pháp này cho một chất chuyên biệt hay 1 nhóm chất. Đối với các mẫu nước, phương pháp này đặc biệt hữu ích vì đơn giản và độ nhạy rất cao.

Tất cả các hoá chất cần cho thí nghiệm thường nhỏ gọn, thuận tiện chuyên chở đi xa. Các thí nghiệm khi tiến hành cũng không đòi hỏi không gian rộng lớn. Trừ phi cần đọc bằng máy photometer thì phương pháp này không cần dùng các máy móc khác do đó có thể thực hiện tại hiện trường chứ không cần phải trong phòng thí nghiệm.

Một người mới có thể học thực hành phương pháp này trong vòng 1 ngày hoặc ít hơn, và việc phân tích 30 - 50 mẫu một ngày là hoàn toàn có thể. Công việc chuẩn bị và làm sạch mẫu thường đơn giản và đôi khi không bắt buộc. Chi phí cho 1 mẫu thường thấp và sẽ rẻ nếu phân tích cùng lúc một lượng mẫu lớn.

Bảng 46. Chi phí đầu tư ban đầu cho một phòng thí nghiệm ELISA

STT	Tên dụng cụ	SL	Giá tiền (USD)
1	Máy đọc ELISA	1	5.000 -10.000
2	Pipette 1 kênh	1	200
3	Pipette nhiều kênh	1	500
4	Một số dụng cụ đơn giản khác (đầu tip, chai lọ, máng nhựa ...)		100

10

Nhược điểm

Tuy có nhiều ưu điểm nhưng phương pháp phân tích dựa trên miễn dịch cũng có những điểm hạn chế. Người sử dụng cần hiểu rõ những điều này để lựa chọn phương pháp phù hợp nhất với yêu cầu công việc của mình.

Thường các hoá chất dùng trong phương pháp này cần bảo quản lạnh, có một số khá nhạy cảm với ánh sáng, do đó việc bảo quản cần chú ý để tránh làm mất hoạt tính.

Độ chính xác của các phương pháp dựa trên miễn dịch không cao nên chỉ thích hợp cho các phân tích sàng lọc mà không thích hợp cho phân tích định lượng. Một số trường hợp phương pháp test này chỉ có thể nhận diện được một nhóm gồm nhiều chất có cấu tạo gần giống nhau mà không thể xác định được từng chất nồng độ cụ thể.

10.3 Phát triển các test ELISA cho thuốc trừ sâu

Đa số các phương pháp ELISA đối với thuốc trừ sâu đều là ELISA cạnh tranh trực tiếp trong đó kháng thể được cố định trên bề mặt chất rắn.

Các thành phần chính cho một bộ kit ELISA cạnh tranh trực tiếp thường bao gồm:

Kháng thể đặc hiệu

Cộng hợp enzyme

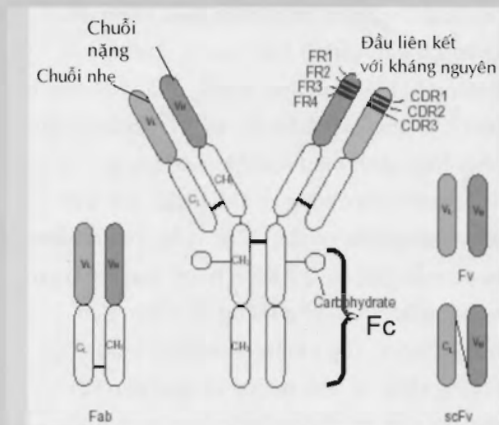
Cơ chất tạo màu

Sản xuất ra kháng thể đặc hiệu và cộng hợp enzyme là những bước quan trọng nhất trong việc phát triển bộ kit. Để đưa vào ứng dụng thực tế các yếu tố ảnh hưởng đều phải được khảo sát. Các đánh giá về tính đặc hiệu, độ nhạy, độ chính xác, tính bền của các thuốc thử, khoảng xác định đối với từng loại mẫu đều phải tiến hành thận trọng trước khi đưa phương pháp áp dụng vào thực tế.

Sản xuất kháng thể

Kháng thể là những protein được tạo thành để kháng lại những chất lạ xuất hiện trong cơ thể (kháng nguyên). Chúng thuộc nhóm immunoglobulin và có trọng lượng phân tử dao động trong khoảng 150.000 đến 95.000. Kháng thể được miêu tả bởi cấu trúc hình chữ Y, phần đuôi của cấu trúc chữ Y được gọi là phần Fc có tính dễ kết tinh (Crystalizable Fragment) và liên quan đến sự điều chỉnh miễn dịch. Phần 2 cánh tay của chữ Y được gọi là Fab (Antigen Binding Fragment) và đảm nhiệm việc gắn kết kháng nguyên.

Kháng thể dùng trong các kỹ thuật phân tích thường là một trong hai loại chính đó là kháng thể đa dòng và đơn dòng. Kháng thể đa dòng là kháng thể thu được từ huyết thanh của các động vật thí nghiệm (thỏ, cừu, dê hoặc ngựa) sau khi gây miễn dịch. Đối với kháng thể đơn dòng người ta thu được chúng từ tế bào sản xuất kháng thể (tế bào lá lách) lấy được từ động vật đã gây miễn dịch. Các

Hình 10-2. Cấu trúc của kháng thể nhóm IgG

V_L là vùng thay đổi của chuỗi nhẹ còn V_H là của chuỗi nặng, C_L là vùng hằng định chuỗi nhẹ còn C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} là của chuỗi nặng. ScFv Kháng thể tái tổ hợp, chỉ chứa vùng thay đổi.

tế bào lá lách này được kết hợp với tế bào myeloma để tạo thành dòng tế bào lai có khả năng sinh ra kháng thể. Những tế bào này được nuôi cấy, lớn lên, phân chia và sản sinh ra nguồn kháng thể ổn định và liên tục trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Trong vòng mười năm trở lại đây nhờ những bước tiến bộ vượt bậc của công nghệ gen, người ta đã tạo ra kháng thể ở thế hệ thứ 3 đó là kháng thể tái tổ hợp. Về cơ bản, kháng thể tái tổ hợp chỉ là đoạn protein chứa vùng liên kết với kháng nguyên. Đó là phần Fab hay Fv và không có phần Fc của một kháng thể nguyên vẹn. Công nghệ kháng thể tái tổ hợp cho phép người ta chọn lựa thay đổi tính

chất kháng thể và dùng vi sinh vật như vi trùng, nấm men, tế bào côn trùng v.v... để sản xuất ra chúng.

Thuốc trừ sâu là những phân tử nhỏ không có khả năng kích thích động vật sinh ra kháng thể. Do đó cần phải gắn chúng hoặc tạo một hapten mô phỏng cấu trúc của chúng để gắn đồng hoá trị lên một protein mang tạo thành một cộng hợp. Cộng hợp này khi tiêm vào động vật mới có khả năng gây miễn dịch và tạo ra kháng thể. Chọn lựa để tổng hợp được một hapten phù hợp là bước quyết định để tạo ra kháng thể mong muốn.

Ái lực tương đối và tính đặc hiệu của giữa kháng thể với kháng nguyên là yếu tố quan trọng nhất trong việc lựa chọn một kháng thể nhất định dùng cho kỹ thuật ELISA. Tính đặc hiệu thể hiện ở khả năng nhận biết được một mẫu có hay không có kháng nguyên và khả năng phân biệt một kháng nguyên nhất định hay một nhóm kháng nguyên. Khả năng tương tác với 1 nhóm kháng nguyên của kháng thể gọi là phản ứng chéo. Phản ứng chéo xảy ra khi kháng thể liên kết được với một hay nhiều điểm quyết định kháng nguyên trên các kháng nguyên khác nhau.

Tạo cộng hợp enzyme

Cộng hợp enzyme được tạo bởi một hapten mô phỏng thuốc trừ sâu cần phân tích gắn đồng hóa trị lên một enzyme gọi là enzyme

10

“đánh dấu”. Hapten dùng cho cộng hợp không bắt buộc nhưng thường là khác với hapten dùng cho gây miễn dịch để tạo ra bộ kit có độ nhạy cao.

Enzyme dùng đánh dấu cần phải bền, có tính đặc hiệu và hoạt tính cao đồng thời phải rẻ tiền và có khả năng xúc tác các phản ứng tạo ra phức chất có thể định lượng dễ dàng. Việc tạo các cộng hợp với các enzyme này cần phải dễ dàng và tương đối bền vững. Hiện nay có 4 enzyme được dùng phổ biến cho mục đích này là: horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, urease và beta-galactosidase. Để nhận biết sự có mặt của các enzyme này, dùng các cơ chất tương ứng để tạo các sản phẩm dễ nhận biết. Sản phẩm cuối cùng của phản ứng thường là : hợp chất có màu (đo rất dễ dàng bằng quang kế), hợp chất phát huỳnh quang (đo bằng huỳnh quang kế, đắt tiền nhưng độ nhạy cao) và hợp chất quang hóa (luminometric).

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng - Thiết kế bộ kit

Hàng loạt yếu tố chất nền có thể ảnh hưởng đến kết quả ELISA ví dụ như : các loại dung môi, nồng độ dung môi, độ pH, nhiệt độ, nồng độ các loại ion và đặc biệt là chất nền của mẫu. Các chất được chiết trong mẫu có thể là những chất ức chế enzyme, những chất biến đổi cấu trúc kháng thể hoặc cũng có thể ảnh hưởng cả hai. Như vậy để áp

dụng một bộ kit vào việc phân tích mẫu rất nhiều thí nghiệm phải được tiến hành để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng. Thông thường ELISA chịu ảnh hưởng của chất nền ít hơn các phương pháp sắc ký nên không cần phải làm sạch mẫu trước khi đo bằng ELISA. Mẫu nước nói chung có thể phân tích trực tiếp không cần cô đặc. Các mẫu thực phẩm hoặc mẫu đất có thể trích bằng dung môi tan trong nước, đem pha loãng rồi phân tích bằng ELISA. Tuy nhiên có một số mẫu chứa những chất có ảnh hưởng rất lớn đến kết quả thì cần có những bước làm sạch trước khi phân tích. Ví dụ như mẫu trà có chứa nhiều tanin là chất ức chế enzyme do đó dung dịch mẫu cần qua cột hấp phụ để loại bớt tanin mới có thể dùng phân tích bằng ELISA được.

Để xác định khoảng định lượng của bộ kit ELISA, các thí nghiệm đo độ thu hồi cần phải được tiến hành. Trên các mẫu, chất cần phân tích sẽ được gây nhiễm nhân tạo ở nồng độ cho biết. Đo độ thu hồi của các mẫu này sau khi tiến hành ELISA sẽ cho ra khoảng định lượng của bộ kit. Ngoài ra bộ kit phải được đánh giá bằng cách so sánh với một phương pháp chuẩn đã được công nhận. Ví dụ tiến hành song song ELISA và sắc ký trên một mẫu để so sánh mức độ tương quan của các kết quả thu được. Sau khi mọi thí nghiệm cần thiết đã được

tiến hành, bộ kit ELISA sẽ được đánh giá để thiết kế cho việc phân tích định tính hay định lượng và một quy trình chuẩn sẽ được đưa ra để có thể ứng dụng bộ kit ELISA trên thực tế.

10.4 Ví dụ về thực hành phân tích thuốc trừ sâu bằng ELISA

Trong dự án, thuốc trừ sâu endosulfan trong các mẫu điều tra đã được định lượng bằng ELISA. Quy trình thực hành dưới đây là sẽ minh họa cho phương pháp ELISA cạnh tranh trực tiếp phân tích thuốc trừ sâu.

Các thành phần bộ kit ELISA cho endosulfan gồm

1. Giếng mini phủ kháng thể kháng endosulfan
2. Cộng hợp enzyme horseradish peroxidase cho endosulfan đậm đặc 10 lần
3. Đệm pha cộng hợp
4. Chuẩn endosulfan 10ppm pha trong methanol
5. Cơ chất A: TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) nồng độ 1% trong DMF (dimethylformamide)
6. Cơ chất B (hydroperoxide/đệm acetate pH 5.0)
7. Dịch hãm: 10% H₂SO₄
8. Dịch rửa đậm đặc 100 lần: Tween20 5%

Chuẩn bị dụng cụ và hoá chất

Dụng cụ

Cân	Để cân mẫu
Photometer	Máy đọc ELISA
Pipette	Pipette 1 kênh : 50-200 l Pipette 8 hoặc 12 kênh: 50-200 l Pipette tip
Máy lắc	Dùng để chiết mẫu
Máy xay	Dùng để xay mẫu
Dụng cụ thuỷ tinh	gồm bình Erlen, ống nghiệm, ống đong, phễu lọc, cốc
Bình tia nhựa	
Máy lắc vortex	
Đồng hồ bấm giây	
Khăn giấy	
Bút đánh dấu	

Hoá chất

Methanol (AR grade): để chiết mẫu
Nước cất

Chuẩn bị các thuốc thử

Pha cộng hợp: Pha loãng 1/10 cộng hợp enzyme trong đệm pha cộng hợp. Lắc đều hỗn hợp một cách nhẹ nhàng, tránh tạo bọt.

Sau khi pha, cộng hợp enzyme bảo quản được 6 tháng tại 4°C.

Pha dịch rửa: Pha loãng Tween 20 trong nước cất để đạt nồng độ 0.05%.