10

Pha các dung dịch chuẩn endosulfan:

Từ 10 ppm dung dịch gốc pha loãng thành 1ml 10 ppb endosulfan trong methanol 10%

Pha loãng tiếp như sau:

1/3 (0,5 ml + 1 ml methanol 10%)= 3,33 ppb

1/3 (0,5 ml + 1 ml methanol 10%)= 1,11 ppb

1/3 (0,5 ml + 1 ml methanol 10%)= 0,37 ppb

1/3 (0,5 ml + 1 ml methanol 10%)= 0,12 ppb

1/3 (0,5 ml + 1 ml methanol 10%)= 0,04 ppb

Phân tích

Chuẩn bị mẫu:

Kết quả chính xác chỉ được bảo đảm khi việc lấy mẫu tiến hành đúng để có được mẫu đại diện.

Mẫu nước: Để lắng, hút lấy phần nước trong đem phân tích.

Mẫu đất: Đất đem sàng, trộn kỹ, cân 5 g mẫu vào bình tam giác cho vào 20 ml methanol 90%, lắc đều trong vòng 12h (qua đêm), để lắng, hút lấy phần nước trong, pha loãng 1/10 với nước cất để đem phân tích.

Mẫu rau và trái các loại: Cắt nhỏ, trộn đều, xay nhuyễn 100 g mẫu, lấy 5 g mẫu +1 g NaCl + 15 mL methanol cho vào bình Erlen lắc trong 30 phút. Lọc qua bông, dùng methanol tráng rửa và định mức thành 20 ml. Lấy dịch lọc pha loãng 1/10 trong nước cất đem phân tích.

1. Cho dung dịch chuẩn, mẫu vào các giếng đã phủ kháng thể như sau:

   Giếng chuẩn: 5µl dung dịch chuẩn

   Giếng mẫu: 5µl dung dịch mẫu

   Giếng control: 5µl methanol 10%

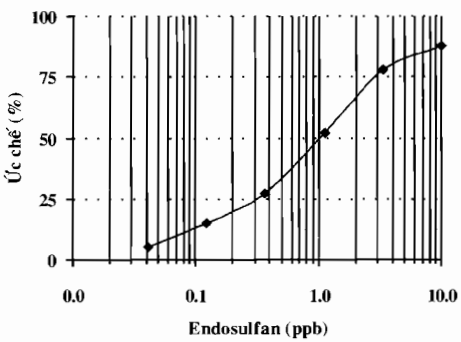
   Giếng blank: 100µl nước cất hoặc 100µl methanol 10%

2. Dùng pipette nhiều kênh cho nhanh 50µl cộng hợp enzyme (đã pha sẵn) vào tất cả các giếng. Để yên trong 30 phút.
3. Sau thời gian ủ, đổ mạnh hỗn hợp ra khỏi giếng, đập lên khăn giấy, sau đó rửa 5 lần bằng dung dịch rửa.
4. Trong vòng 15 phút trước khi sử dụng, pha hỗn hợp cơ chất như sau: trộn cơ chất A và cơ chất B theo tỉ lệ: 0.5ml cơ chất A/15ml cơ chất B. Cho 100µl hỗn hợp vào tất cả các giếng. Màu xanh sẽ từ từ xuất hiện trong giếng.
5. Sau 30 phút cho 50µl dung dịch H_2SO_4 10% để dừng phản ứng, các giếng đổi từ màu xanh sang màu vàng
6. Đưa vào máy đọc ELISA để xác định mật độ quang A tại bước sóng 450/650nm.

Tính toán kết quả:

$$\%\ \text{Ức chế} = \left\{1 - \frac{A_{mẫu} - A_{blank}}{A_{control} - A_{blank}}\right\} \times 100$$

Dựng đường chuẩn trên giấy logarith, đồ thị thường có dạng như sau:



IC_{30} (ppb) - IC_{80} (ppb): là các nồng độ gây ra 30% và 80% ức chế màu, đây là khoảng định lượng chính xác nhất của bộ kit đã sử dụng. Dựa vào đường chuẩn endosdulfan và phần trăm ức chế của mẫu ta có thể tính được nồng độ endosulfan trong mẫu. Trong các trường hợp mẫu có độ ức chế màu dưới 30% thì có thể coi là mẫu âm tính, có nồng độ endosulfan dưới khả năng phát hiện. Tuy nhiên kết quả thu được đối với các mẫu dương tính cũng cần kiểm chứng lại bằng phương pháp sắc ký.

Lưu ý

- Các thuốc thử cần ở nhiệt độ phòng khi tiến hành thí nghiệm, sau đó cần cho trở lại ngay vào tủ lạnh, không nên để bên ngoài quá lâu. Riêng đối với cộng hợp enzyme chỉ nên lấy ra 1 lượng vừa đủ dùng không nên để toàn bộ cộng hợp enzyme ra nhiệt độ phòng.
- Trộn đều cộng hợp một cách nhẹ nhàng, tránh tạo bọt.
- Không để các hoá chất tiếp xúc ánh nắng.
- Không dùng bộ kit khi đã quá hạn.
- Sử dụng pipette đúng sẽ giúp có kết quả đúng.
- Khi cho cộng hợp vào giếng phải cho thật nhanh để thời gian cộng hợp ở trong giếng là gần như bằng nhau giữa các giếng. Nếu không kết quả sẽ bị sai lệch.

11 Phát hiện các thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ và carbamate bằng phương pháp ức chế enzyme Acetylcholinesterase

Giới thiệu

Từ năm 1997 Viện Nghiên cứu Nông nghiệp Đài Loan đã chuyển giao cho Việt Nam phương pháp sinh học phân tích nhanh dư lượng thuốc trừ sâu nhóm lân hữu cơ và carbamate trong rau quả. Tuy nhiên phương pháp gốc của Đài Loan khi áp dụng thử cho thấy độ nhạy chưa đáp ứng được tiêu chuẩn rau quả an toàn của Việt Nam. Do đó Chi cục Bảo vệ thực vật Tp. Hồ Chí Minh đã phối hợp với Phân viện Công nghệ sau thu hoạch cải tiến phương pháp của Đài Loan nhằm nâng cao độ phát hiện. Đề tài này đã được nghiệm thu và được công nhận để áp dụng trên toàn quốc theo Quyết định số 946/QĐ-BVTV ngày 27/10/2003 do Cục trưởng Cục Bảo vệ thực vật ký.

Nguyên tắc của phương pháp sinh học phân tích nhanh dư lượng thuốc trừ sâu nhóm lân hữu cơ và carbamate là dùng khả năng ức chế enzyme Acetylcholinesterase (AChE) của các thuốc trừ sâu này. Khái quát phương pháp này như sau: Cho enzyme AChE này vào trong nước chiết rau quả và cho thêm một số thuốc thử khác, nếu rau quả không có dư lượng thuốc trừ sâu nhóm lân và carbamate thì dung dịch sẽ có màu vàng đặc trưng; nếu trong rau quả có thuốc trừ sâu thuộc nhóm lân hữu cơ hoặc carbamate thì màu vàng sẽ nhạt hơn. Trong mẫu càng có nhiều thuốc trừ sâu hai nhóm trên thì màu vàng càng nhạt. Căn cứ vào mức độ nhạt màu được đo bằng máy so màu mà ta có thể xác nhận là mẫu rau quả có nhiễm dư lượng thuốc trừ sâu trên mức cho phép hay không.

11

11.1 Nguyên lý hoạt động của phương pháp ức chế enzyme Acetylcholinesterase

Giới thiệu về enzyme Acetylcholinesterase

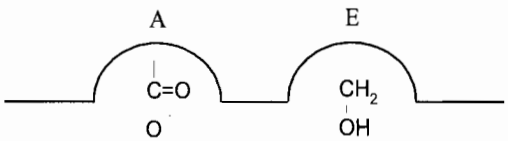
Cấu trúc cơ bản của hệ thần kinh động vật là tế bào thần kinh có chức năng thu nhận, xử lý và dẫn truyền thông tin dưới dạng tín hiệu (xung động thần kinh). Acetylcholine là một chất môi giới tham gia vào quá trình dẫn truyền này (gọi là dẫn truyền kiểu choline). Acetylcholine sau khi tham gia quá trình dẫn truyền thần kinh phải được phân hủy ngay để chuẩn bị cho đợt dẫn truyền sau, nếu không cơ thể sẽ bị ngộ độc. Song song với việc phân hủy, acetylcholine lại luôn luôn được tổng hợp từ choline và acid acetic để cơ thể không bao giờ thiếu nó. Đảm nhiệm việc phân hủy acetylcholine là enzyme Acetylcholinesterase (AChE).

Trung tâm hoạt động của enzyme này gồm 2 đoạn:

Đoạn anionic (A) gồm gốc carbonyl đã được ion hóa của các acid amin: asparaginic và glutamic.

Đoạn esteratic (E) gồm gốc hydroxyl của serine

Hình 11-1. Sơ đồ trung tâm hoạt động của AChE



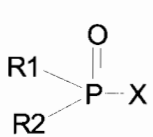
Quá trình thủy phân AChE được phân thành 3 giai đoạn:

1. Hấp thụ acetylcholine vào AChE: phần mang điện của acetylcholine gắn vào đoạn anionic của AChE và phần còn lại gắn vào đoạn esteratic. Do chúng có tính mang điện và cấu trúc không gian phù hợp nên có thể dễ dàng gắn được với nhau, qua đó làm tăng tốc độ thủy phân acetylcholine.
2. AChE bị acetyl hóa và choline được hình thành.
3. Giải phóng phân tử choline, thủy phân AChE đã bị acetyl hóa thành AChE và acid acetic.

Kết quả là AChE được tái sinh và acetylcholine được thủy phân thành choline và acid acetic.

Cơ chế ức chế AChE của các thuốc trừ sâu lân hữu cơ và carbamate

Các thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ là các hợp chất của lân hóa trị 5 có công thức tổng quát như sau:



11

Trong đó X là một gốc acid yếu, cầu nối giữa X và P có tính chất anhydride. Bản thân lân hữu cơ là một tác nhân phosphoryl hóa có thể ức chế hoạt động của AChE.

Còn các thuốc trừ sâu carbamate là ester của acid carbamic NH_2-COOH.

Chúng cũng có khả năng carbamyl hóa AChE và ức chế hoạt động của nó.

Khi các thuốc trừ sâu lân hữu cơ và carbamate tiếp xúc với AChE, chúng bắt chước phần ester của acetylcholine gắn vào đoạn esterase của AChE. Tuy nhiên các thuốc trong hai nhóm này có điện tích cũng như cấu trúc không gian khác nhau nên phản ứng gắn kết vào đoạn esterase của mỗi thuốc sẽ khác nhau. Điều đó giải thích tại sao độ ức chế của các thuốc đối với AChE khác nhau rất xa dẫn đến độ nhạy của phương pháp cũng khác nhau tùy thuộc vào từng thuốc riêng biệt (độ nhạy dao động từ vài ppb đến vài chục ppm).

Nếu AChE sau khi bị acetylcholine acetyl hóa, quá trình phục hồi AChE diễn ra rất nhanh, thì ngược lại AChE khi bị carbamyl hoặc phosphoryl hóa quá trình phục hồi diễn ra chậm hoặc rất chậm, thậm chí không phục hồi được nữa khiến AChE bị ức chế một phần hoặc hoàn toàn.

Cần chú ý là chỉ có các thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ có dạng oxo: P=O mới có tác dụng ức chế enzyme AChE. Còn dạng thio: P=S thì không ức chế. Do đó phải oxy hóa các thuốc trừ sâu lân hữu cơ dạng này (ví dụ như parathion) bằng các chất oxy hóa mạnh ví dụ như brome thì chúng mới có thể ức chế được enzyme.

Toàn bộ cơ chế hoạt động và ức chế của AChE được tóm tắt trong hình 11-2.

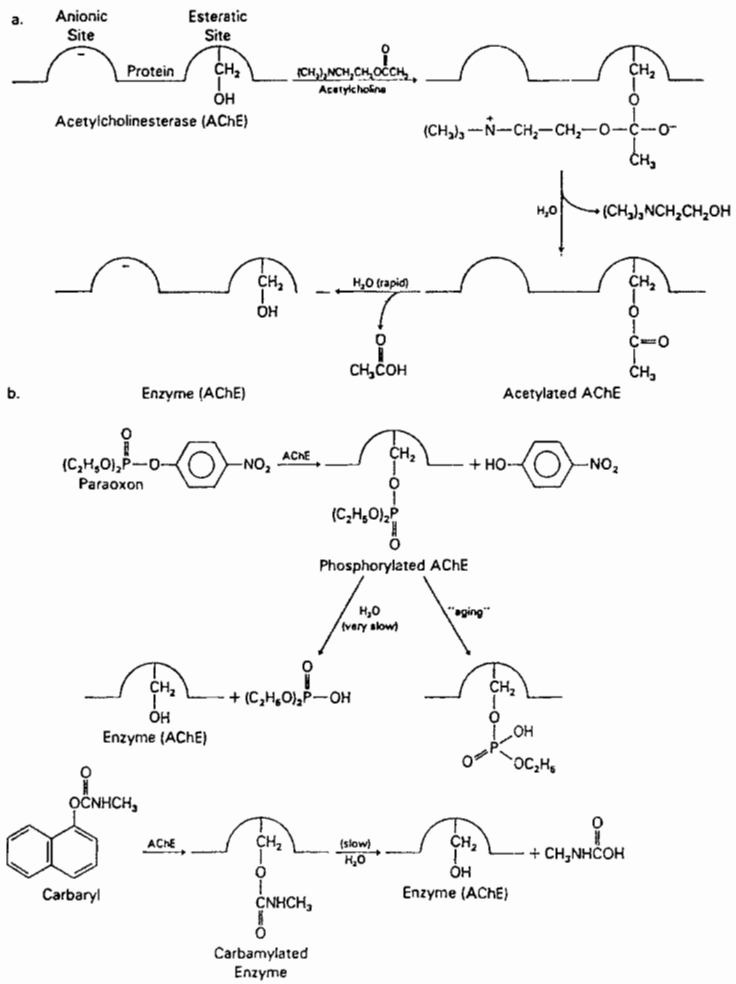
Nguyên lý của phương pháp ức chế enzyme AChE

TTS lân hữu cơ hoặc carbamate + AChE ⟶ AChE bị ức chế + AChE tự do

Acetylthiocholine Iodine (ACTI)+ H_2O + AChE tự do ⟶ Choline + Acid Acetic

Choline + 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) ⟶ 5-mercapto-2-nitrobenzoic (màu vàng)

Hình 11-2. Sơ đồ cơ chế hoạt động của AChE



a)Thủy phân acetylcholine dưới tác dụng acetylcholinesterase (AChE). Nhóm chức -CH_2OH của phân tử serin trong ezyme là trung tâm hoạt tính của enzyme,

b) Phản ứng của paraoxon và carbaryl với AChE (làm ức chế hoạt tính của enzyme). Thủy phân men AChE đã carbamyl hóa xảy ra nhanh hơn men AChE đã phosphorat hóa.

11

Các thuốc trừ sâu lân hoặc carbamate được chiết xuất từ mẫu, sau khi oxy hóa bằng brome sẽ được cho phản ứng với AChE làm ức chế một phần hoặc toàn bộ hoạt tính của enzyme này. Cho Acetylthiocholine Iodine (ACTI) vào, chất này sẽ được phần enzyme AChE chưa bị bất hoạt phân tích thành choline và acid acetic. Sau đó 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) được cho vào sẽ tạo với choline tự do sinh ra từ phản ứng trước một phức chất có màu vàng là 5-mercapto-2-nitrobenzoic. Đem đo ở bước sóng 400 - 450 nm, so sánh màu của mẫu và của mẫu trắng (không có thuốc trừ sâu), nếu màu của mẫu giảm 30% thì coi như mẫu có thuốc trừ sâu gốc lân và carbamate vì có sự giảm hoạt tính của enzyme AChE.

11.2 Tóm tắt quy trình phân tích

Mẫu sẽ được xử lý theo sơ đồ dưới đây. Sau khi đo mật độ quang tại bước sóng 400 - 450 nm độ ức chế màu sẽ được tính theo công thức sau:

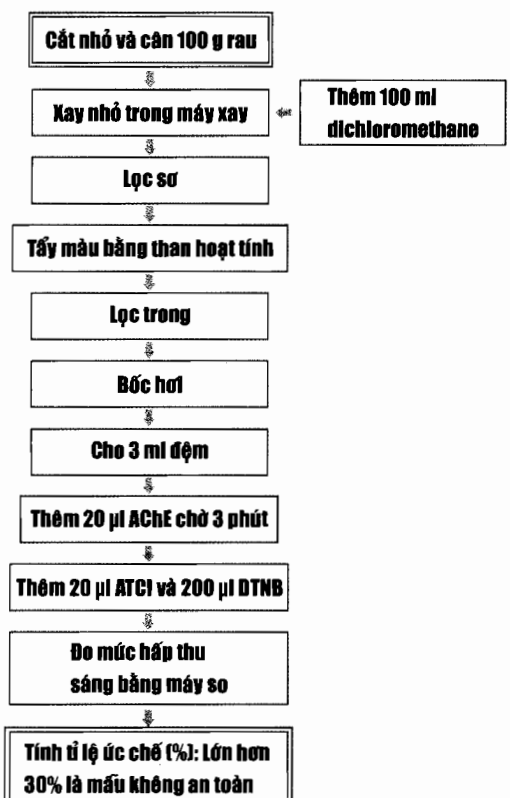
$$\%\ \text{Ức chế} = \frac{\text{Abs (mẫu trắng)} - \text{Abs(mẫu)}}{\text{Abs (mẫu trắng)}} \times 100$$

Abs: mật độ quang

Do độ ức chế enzyme AChE của các thuốc trừ sâu không giống nhau nên mẫu âm tính được chọn theo thuốc trừ sâu có độ nhạy kém nhất và như vậy mẫu âm tính sẽ có nồng độ thuốc trừ sâu < 1ppm.

Nếu độ ức chế trên 30% thì mẫu được coi là dương tính và cần phải kiểm tra lại bằng những phương pháp khác như sắc ký để định lượng chính xác.

Hình 11-3. Sơ đồ quy trình phân tích



11.3 Phạm vi ứng dụng và ưu nhược điểm của phương pháp

Phương pháp trên có thể áp dụng cho rất nhiều loại rau quả như: cải xanh, cải ngọt, mồng tơi, rau muống, đậu đũa, đậu bắp, cà chua, măng tây, dưa leo, khổ qua, rau má, xoài, thanh long, khế, v.v.... Đối với các mẫu rau quả trên có thể dùng đệm PBS pH 8.0 làm mẫu trắng. Tuy nhiên đối với các loại rau có mùi hăng nồng cay như hành, tỏi, ớt và rau thơm các loại thì cần có mẫu rau sạch tương ứng làm mẫu trắng do bản thân chúng có những chất làm ức chế hoạt động của enzyme AchE.

Ưu điểm của phương pháp này là chi phí về trang thiết bị thấp hơn nhiều so với phương pháp sắc ký khí, giá thành phân tích cũng thấp hơn nhiều lần và nhất là thời gian phân tích nhanh, khoảng 2 giờ. Ngoài ra do quy trình phân tích đơn giản nên nhân viên phân tích không cần có trình độ cao như đối với phương pháp sắc ký.

Nhược điểm của phương pháp này là không thể định lượng mà chỉ bán định lượng, nghĩa là khi phát hiện có phản ứng dương tính là biết được dư lượng đã vượt một ngưỡng biết trước. Nói cách khác, nếu phản ứng cho âm

Bảng 47. Độ nhạy đối với một số thuốc trừ sâu thường gặp

STT	Tên thuốc	Nhóm thuốc	Ngưỡng phát hiện (ppm)
1	Benfuracarb	Carbamate	0.03
2	Carbaryl	Carbamate	0.50
3	Fenobucarb	Carbamate	0.04
4	Isoprocarb	Carbamate	0.06
5	Methomyl	Carbamate	0.30
6	Carbofuran	Carbamate	0.06
7	Diazinon	Lân hữu cơ	0.10
8	Dichlorvos	Lân hữu cơ	1.00
9	Mevinphos	Lân hữu cơ	0.14
10	Naled	Lân hữu cơ	0.22
11	Chlorpyripfos	Lân hữu cơ	0.17
12	Pirimiphosmothyl	Lân hữu cơ	0.18
13	Parathion	Lân hữu cơ	0.24
14	Hostathion	Lân hữu cơ	0.43
15	Mephospholan	Lân hữu cơ	0.47
16	Methidathion	Lân hữu cơ	0.57
17	Phenthoate	Lân hữu cơ	0.07
18	Pyridaphention	Lân hữu cơ	0.50
19	Profenophos	Lân hữu cơ	0.20

11

tính thì loại rau quả đó có tổng số dư lượng thuốc trừ sâu nhóm lân hữu cơ và carbamate dưới mức cho phép, nghĩa là mẫu đó đạt mức an toàn về dư lượng thuốc trừ sâu lân hữu cơ và carbamate.

Tuy phương pháp này chỉ phát hiện được 2 nhóm lân và carbamate mà không phát hiện được các nhóm thuốc khác nhưng vì 2 nhóm thuốc này được dùng nhiều trên rau quả nhất, chậm phân hủy, thường được dùng với liều lượng cao hơn nhiều lần so với các nhóm thuốc khác và lại có độ độc rất cao nên thường là nguyên nhân chính gây ô nhiễm các sản phẩm rau quả. Vì vậy mặc dù phương pháp phân tích dư lượng này chỉ phát hiện 2 nhóm thuốc trên nhưng đã có thể giải quyết 90% vấn đề về kiểm soát dư lượng thuốc trừ sâu trên rau quả.

Các phương pháp sinh học phát hiện thuốc bảo vệ thực vật khác

12

12.1 Thử nghiệm sinh học để phát hiện nhanh các thuốc trừ nấm EBDC

Giới thiệu

Tuy độ độc cấp tính của các loại thuốc trừ nấm EBDC tương đối thấp đối với động vật có vú, nhưng tác dụng mãn tính có thể gây ung thư và gây tứ bội của ETU (ethylene thiourea) một chất chuyển hóa của các thuốc trừ nấm EBDC vẫn đáng để chúng ta quan tâm. Các thuốc trừ nấm khác như captan và folpet cũng có thể gây hại cho sức khỏe con người, do đó dư lượng của chúng cũng cần được theo dõi phát hiện.

Dựa trên cơ sở dùng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* Chin H. Kao và Cheng (1991) đã phát triển bộ thuốc thử các thuốc trừ nấm ứng dụng rộng rãi ở Đài Loan. Bộ thuốc thử cho phép phát hiện các thuốc trừ nấm EBDC, captan và folpet trong rau quả.

Nguyên lý

Bacillus thuringiensis (Bt) mẫn cảm cao độ với các thuốc trừ nấm EBDC cũng như captan và folpet. Khi cho các thuốc trừ nấm tiếp xúc với môi trường nuôi cấy Bt thì sự phát triển của chúng bị ức chế. Đo mức độ sinh trưởng bằng thuốc chỉ thị chuyển hóa TTC (2,3,5 Triphenyl tetrazolium chloride): màu đỏ sinh ra do chuyển hóa bình thường sẽ bị nhạt đi. Kết quả có thể xem bằng mắt thường bằng cách so độ khác màu giữa mẫu thử và mẫu trắng hoặc đo bằng máy so màu ở bước sóng 484 nm. Nếu độ ức chế màu trên 50% thì là mẫu dương tính.

Dụng cụ và hóa chất

Dụng cụ

Máy lắc Votex

Máy so màu

Máy lắc cách thủy

Các dụng cụ thủy tinh thông thường

12

Hóa chất

Các hóa chất đều có trong bộ thuốc thử do Viện Nông nghiệp Đài Loan cung cấp, gồm:

- Giống Bt: Trong thạch nghiêng.
- Dịch chiết mẫu: Dung dịch EDTA 1000 ppm trong nước có 2% DMSO.
- Chất chỉ thị chuyển hóa: TTC 2% trong dung dịch nước (w/v).
- Dịch hãm: HCl 0.5N có 5% triton.
- *Chuẩn bị huyễn dịch Bt:* Chuyển giống Bt từ thạch nghiêng sang bình Erlen 50 ml có chứa 20 ml canh thang Salama, lắc qua đêm ở 140 vòng/phút. Dịch nuôi cấy đã có Bt phát triển có thể giữ ở 5°C trong 5 ngày. Lúc dùng, cấy truyền 0.8 ml môi trường Bt này sang 20 ml canh thang mới và nuôi cấy ở 37°C lắc 140 vòng/phút trong 1-5h.

Chuẩn bị mẫu và tiến hành thử nghiệm:

- Lấy 1 g mẫu cắt nhỏ cho vào ống nghiệm nhỏ đã có 2 ml dịch chiết. Lắc bằng máy votex trong 1 phút, ngâm 5 phút, đổ sang bình erlen 50 ml.
- Cho 1 ml canh thang đã có Bt vào, lắc cách thủy 90 phút ở 37°C, 140 vòng/phút trong tối.
- Cho vào bình 100 µl TTC 2% và tiếp tục lắc thêm 30 phút trong tối.
- Đến cuối thời gian ủ cho 1 ml HCl 0.5N trong Triton 5% để hãm phản ứng và làm tan chất kết tủa đỏ.

Đánh giá kết quả:

- Quan sát màu bằng mắt thường: độ khác biệt màu sắc giữa mẫu thử và mẫu trắng rất rõ ràng trong các trường hợp bị nhiễm nặng.
- Chỉ thị màu trung gian giữa đỏ và vàng thì mới phải dùng máy so màu để đo độ

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{\text{Abs (mẫu không có thuốc trừ cỏ)} - \text{Abs (mẫu chưa biết)}}{\text{Abs (mẫu không có thuốc trừ cỏ)}} \times 100$$

Nếu độ ức chế trên 50% thì mẫu là dương tính.

Độ mẫn cảm của *Bacillus thuringiensis* đối với các thuốc trừ nấm:

Tên thuốc	Giới hạn phát hiện của TTC (ppm)
Propineb	0.08
Curzate M	0.16
Ridomil-Mz	0.31
Mitram	0.31
Maneb	0.31
Mancozeb	0.63
Zineb	1.56
Sankel	12.50
Chlorothalonil	1.25
Dinocap	2.50
Captan	2.50
Folpet	6.25

Lưu ý: Phương pháp này chỉ cho biết tổng dư lượng các thuốc trừ nấm trong rau quả chứ không cho phép xác định từng chất riêng rẽ.

12.2 Quy trình ức chế quang hợp để phát hiện nhanh chóng dư lượng thuốc diệt cỏ

Giới thiệu

- Giới thiệu về các thuốc diệt cỏ:

Các loại thuốc để diệt cỏ dại thường được dùng theo 4 cách khác nhau:

Dùng sau khi làm đất, trước khi gieo hạt.

Dùng ngay sau lúc gieo hạt.

Dùng sau lúc gieo hạt và trước khi nảy mầm.

Dùng với mục đích khai quang, diệt tất cả cây cỏ.

Thuốc diệt cỏ rất nhiều loại nhưng các loại sau đây có tác dụng ức chế quá trình quang hợp: Urê, anilide, carbamate và triazine. Do đó người ta dùng phản ứng ức chế quá trình quang hợp (ức chế phản ứng Hill) để phát hiện nhanh dư lượng các loại thuốc diệt cỏ nói trên trong các sản phẩm nông nghiệp.

Nguyên lý

Các thuốc diệt cỏ nói trên ức chế sự vận chuyển điện tử trong quá trình quang hợp. Cường độ của sự ức chế được đo in vitro bằng cách dùng một chất nhận điện tử nhân tạo là chất 2,6 dichloroindophenol. Các lục lạp được cô lập và được trộn với chất nhận điện tử nhân tạo. Khi bị khử, chất này thay đổi độ hấp thụ ánh sáng tối đa. Trong phương pháp này, phản ứng được tiến hành ngay trên bản mỏng. Nếu không có thuốc diệt cỏ, chất 2,6 dichloroindophenol bị các lục lạp chuyển hóa thành sản phẩm không màu. Lúc có mặt của thuốc diệt cỏ, quá trình khử bị ức chế và màu xanh của 2,6 - dichloroindophenol vẫn tồn tại. Chúng tôi xin giới thiệu quy trình thử của Bộ Y tế Canada (1986).

12

Dụng cụ và hóa chất

Dụng cụ

- Máy ly tâm
- Chai thủy tinh thường dùng ở phòng thí nghiệm (chai lọ phải rửa thật sạch và tráng lại bằng aceton và hexane).
- Dụng cụ để làm sắc ký lớp mỏng.
- Đèn ống huỳnh quang = 4 đèn ống huỳnh quang (ánh sáng trắng) 10W gắn vào giá hay trong hộp đèn.

Hóa chất

Dung môi : Aceton, dichloromethane, chloroform, hexane (loại P.A)

Dung dịch sucrose 0.5 M trong nước

Dung dịch NaCl bão hòa trong nước

Na_2SO_4 khan- glycerine

Các chuẩn thuốc diệt cỏ

Chuẩn bảo quản : 10mg/ml trong Aceton.

Chuẩn làm việc - pha chuẩn bảo quản trong dichloromethane nồng độ chấm bản là 0.05 0.2 µg/ml.

1. Phân lập lục lạp

Tất cả các dung dịch dùng phân lập phải để ở 2 - 4°C trước khi dùng

Các ống ly tâm, phễu, bình của máy xay sinh tố phải để trong tủ lạnh 30 phút trước khi dùng.

Chọn cải bó xôi còn tươi, không có thuốc diệt cỏ, cân 30 g rửa sạch, cắt nhỏ.

Xay lá trong 150 ml dung dịch sucrose trong máy xay sinh tố, 1- 2 phút, tốc độ trung bình.

Lọc huyễn dịch qua 4 lớp vải mỏng, cho vào 2 ống ly tâm lạnh.

Ly tâm ở 1500G trong 10 phút.

Gạn bỏ cẩn thận lớp dịch trên. Cặn màu xanh ở đáy được hòa trong 30 ml glycerine lạnh. Bảo quản trong ngăn đá trước lúc dùng.

2. Chuẩn bị dung dịch hiện màu

Pha dung dịch sodium 2,6 dichloroindophenol (DCIP) nồng độ 2 mg/ml trong đệm phosphate 0,05 M. Gia nhiệt nhẹ cho tan giữ ở 2 - 4°C.

Trộn 6 ml dịch lục lạp với 2 ml DCIP. Dịch hiện màu pha xong tốt nhất là dùng ngay. Có thể giữ được 2h trong tủ lạnh.

3. Chuẩn bị mẫu

- Xay 25 g mẫu đại diện đã cắt nhỏ với 100 ml acetone trong 4 phút ở tốc độ trung bình bằng máy xay sinh tố.

- Lọc hỗn hợp qua lọc thủy tinh có lỗ trung bình vào bình Erlen 500 ml.

- Lấy 20 ml dịch lọc (tương đương 5 g mẫu) cho vào phễu chiết 500 ml cho thêm 30 ml nước, 2,5 ml dung dịch NaCl, 40 ml dichloromethane lắc nhẹ trong 1 phút.

- Thu phần dung môi hữu cơ - Lập lại việc chiết xuất 2 lần với 2x40 ml dichloromethane.

- Phối hợp các lớp dung môi hữu cơ - Làm khô .bằng 1 g Na_2SO_4.

- Gạn phần dichloromethane vào bình cầu cổ nhám 500 ml và làm khô trong máy quay chân không ở 30°C đến khi còn 0,5 ml.

- Rửa bình bằng 3 x 1 ml dichloromethan cho vào lọ nhỏ.

- Làm khô bằng khí nitơ đến khi còn 0,5 ml - Dịch này để chấm bản.

4. Chấm bản mỏng

- Dùng bản Silicagel chế sẵn 20x20 (bản không được dùng chất kết dính là polyanilamide vì chất này ức chế quá trình quang hợp).

- Chấm 10 µl mẫu và các chuẩn lên bản, các chấm cách đáy bản 2,5 cm và cách nhau 2,5 cm.

5. Triển khai

Dùng hỗn hợp Chloroform, Hexane (3:7) để triển khai cho đến lúc dung môi lên đến 1cm trên bản kể từ gốc, lấy bản ra để trong tủ hút cho khô.

6. Phun thuốc hiện màu

- Để bản nằm ngang phun thuốc hiện màu chỉ vừa ướt đều bản.

- Chiếu đèn huỳnh quang. Để bản cách đèn 15 - 20 cm.

- Sau 1 phút các chấm màu xanh hiện lên trên nền màu vàng lục nhạt - Đây là bằng chứng có mặt thuốc trừ nấm (ức chế phản ứng Hill).

Các thuốc trừ nấm sau đây ức chế phản ứng Hill DNOC (1 µg), Bentazon (1 µg), Dinosep (1 µg), Propany (1 µg), Terbacil (1 µg), Linuron (0,06 µg), Chloroxuron (0,1 µg), Diuron (0,2 µg), Atrazine (0,4 µg), Metribuzin (1,0 µg), Simazine (1,0 µg), Cyanazine (1 µg), Swep (1 µg), Solan (1 µg).

Chú ý: Tùy yêu cầu phân tích mà chọn chuẩn thuốc diệt cỏ thích hợp. Mẫu dương tính phải là chấm có màu xanh đậm và R_f tương đương chuẩn.

Các tác giả chân thành cám ơn ông Phạm Minh Sang Cục Bảo vệ thực vật - đã đọc và chữa bản dịch (Phần A).

Tài liệu tham khảo

Altieri, M.A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. Agric., Ecosyst. Environ. 60, 81-96.

Ambius (1998). Application of thin layer Chromatography for pesticide resiclue Analysis Seeking Agricultural Produce free of Pesticide Residues. Proccedings of an International workshop held inYogayakasta, Indonesia, February 1998. ACIAR. 199-222.

AOAC (2000) Official methods of analysis of AOAC International. Publisher Arlington, Va.: AOAC Int'l.

Bartell, S.M. (1996). Ecological/environmental risk assessment principles and practices. In: Kolluru R, Bartell S, Pitblado R, et al. (eds), Risk Assessment and Management Handbook, pp 10.3 -10.59. McGraw-Hill, NY, NY, USA

Baskaran, S., Sanchez-Bayo, F., Kennedy, I.R and Mortimer., M.R. (2003) Environmental Concentration of pesticides in cotton production systems: risk assessment by fugacity modeling. Kookana, R. et al (Eds) Environmental protection and risk assessment of organic contaminants. Science Publishers, Inc.

Bui Cach Tuyen (1998a). Monitoring pesticide residues in grapevine (Vitis vinifera L.) in Ninh Thuan and in Ho Chi Minh city market (in Vietnamese with English abstract). J. of Agricultural Sciences and Technology 2, 30-32 . University of Agriculture and Forestry.

Bui Cach Tuyen (1998b). Monitoring Monocrotophos and Cypermethrin residues in apple (Ziziphus mauritiana) in Ho Chi Minh city market and in field (in Vietnamese with English abstract). J. of Agricultural Sciences and Technology 3, 167-172. University of Agriculture and Forestry.

Bui Cach Tuyen (1998c). Monitoring Cypermethrin, Fenvalerate and Dimethoate residues in tea and tea product (Thea sinesis) (in Vietnamese with English abstract). J. of Agricultural Sciences and Technology 3, 3-14. University of Agriculture and Forestry.

Bui Cach Tuyen (1999). Monitoring pesticide residues in Psidium guajava and Eugenis sp. in Ho Chi Minh city market and in field (in Vietnamese with English abstract). J. of Agricultural Sciences and Technology 6, 184-187. University of Agriculture and Forestry.

Bui Cach Tuyen, Le Van To, Pham Hung Viet, Chu Pham Ngoc Son, Ivan R. Kennedy et al. (2002) In the Proceedings of AusAID CARD Workshop 2 " Environmental Risk Assessment, Monitoring and Remedial Action for Pesticide Residues" at University of Agriculture and Forestry, Ho Chi Minh city, July 15-18, 2002.

Bui Cach Tuyen, Nguyen Thi Thu Trang, Le Do Hien and Phung Vo Cam Hong (2004). Monitoring Endosulfan Residue in Produce in City Markets using ELISA. In preparation.

Bui Si Doanh (2002) Status of pesticide and pesticide residue control in Vietnam. In the Proceedings of AusAID CARD Workshop 2 " Environmental Risk Assessment, Monitoring and Remedial Action for Pesticide Residues" at University of Agriculture and Forestry, Ho Chi Minh city, July 15-18, 2002, pp 61-68.

Burns (1990) Exposure analysis modeling system: User's Guide for EXAMS II, Version 2.9.4. Washington, DC:US EPA. Report nr EPA/600/3-89-084.

Cardwell, R.D., Parkhurst, B. R., Warren-Hicks, W. and Volosin, J. S. (1993). Aquatic ecological risk. Water Environment and Technology 5, 71-87.

Chiou, G.T., Peters, L.J and Freed, V. H. (1979). A physical concept for soil water equilibria for nonionic organic compounds. Science 206, 831-832.

Chiou, G.T., Freed, B.H., Schmedding, D.W. and Kohnert, K.L. (1977) Partition coefficients and bioaccumulation of selected organic chemicals. Environmental Science & Technology 11: 475.

Chiu, Kao, Cheng (1991). Rapid Bioassay of Pesticide Residues (RBPR) on Fruit and Vegetables, Journal of Agricultural Research of China. 4-2. 188-200.

Dane, J. H. (2002). Method of Soil Analysis: Part 4, Physical Methods. Soil Science Society of America. Madision Wisconsin.

Dent, D. (1995). Integrated Pest Management. Chapman & Hall, London.

Eames, J. C. and Nguyen Cu (1994) A management feasibility study of Nui Chua Nature Reserves, Vietnam. Hanoi: WWF Vietnam Programme and the Forest Inventory and Planning Institute (in Vietnamese).

ECOFARM (1999). ECOFARM Aquatic and Terrestrial Final Draft Report. US EPA.

EXTOXNET (2004). The Extension Toxicology Network, Pesticide Information Profiles. University of California, Davis.

Hammock, B. D. and Mumma, R. O. (1980) Potential of immunochemical technology for pesticide analysis. In Pesticide Analytical Methodology, Harvey, J. Jr. and Zweig, G. Eds., ACS Symposium Series 136, Washington DC, 321-352.

Howard, P.H and Meylan W.H. (1997) Handbook of Physical Properties of Organic Compounds. CRC Press: Boca Raton, Florida.

Kennedy, I. R., Sanchez-Bayo F., Crossan, A. and Rose, M. (2004). Cotton pesticide in perspective: Risk management for produce and environmental protection. World Cotton Research Conference-3, Cotton Production for the New Millennium, (ed. Swanepoel, A.). Pretoria, South Africa, 1047-1060.

Klaine, S. J., Cobb, G. P., Dickerson, R. L., Dixon, K. R., Kendal, R. J., Smith, E. E. and Solomon, K. R. (1996) An ecological risk assessment for the use of the biocide, dibromonitrilopropionamide (DBNPA) in industrial cooling systems. Environmental Toxicology and Chemistry 15, 21-30.

Klute, A. and Page, A. L. (1982). Methods of soil analysis Part 1 and 2, 2nd ed., American Society of Agronomy. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA.

Knisel, W. (Ed) (1980) CREAMS: A field-scale model for chemicals, runoff, and erosion from agricultural management systems. US Department of agriculture, conservation research report No.26.

Le Quang Quyen (2000). Grape production in Vietnam. In Grape production in Asia-Pacific Region. (Eds. M. K. Papademetriou and F. J. Dent). Food and Agriculture Organization of the United Nations National Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok. Thailand.

Le Van To, Bui Cach Tuyen, Pham Hung Viet, Chu Pham Ngoc Son, Ivan R. Kennedy et al.(2002) In the Proceedings of AusAID CARD Workshop 1 " Environmental Risk Assessment, Monitoring and Remedial Action for Pesticide Residues" at Post Harvest Institute of Technology Ho Chi Minh city, March 2002.

Lee, N.A. and Kennedy, I.R. (2001) Environmental monitoring of pesticides by immunochemical techniques: Validation, current status, and future perspectives. Journal Association Official Analytical Chemistry 84, 1393-1406.

McLeod Graham (1986). TLC of Photosynthesis Inhibiting Herbicides Procedures 5-16 and 9-3. Manual of Pesticicle Residue Analysis in Food. Minister of Health and Welfare Canada. 5/58-59; 9/26-31

Mackay, D. (2001) Multimedia environmental models: The Fugacity Approach. 20nd ed., Lewis Publishers, Michigan.

Mackay, D. and Paterson, S. (1982) Calculating fugacity. Environmental Science & Technology 15 (9): 1006-1014.

Maredia, K. M., Dakouo, D. and Mota-Sanchez, D. 2003. Integrated Pest Management in the Global Arena. CABI Pub. Wallingford.

Mullins, J.A., Casel, R.F, Scarbrough, J.E., Ivery, A.M

(1993) PRZM-2 a model for predicting pesticide rate in the crop root zone and unsaturated soil zones: program and user'manual for release 2.0. Athens, GA.: US environmental protection agency. Report nr EPA/600/R-93/046. Washington D.C.

Norton, S.B., Rodier, D.J., Gentile, J.H., van der Schalie, W.H., Wood, W.P. and Slimak, M.W. (1992) A framework for ecological risk assessment at the EPA. Environmetal Toxicogical Chemistry 11: 1663-1672.

Oanh, Le Thi Kim (2003). Research on influence of insecticides to density of some insect pests and their natural enemies on cruciferous crops at Ha noi and near provinces. Ph.D thesis in Ha noi Agriculture University. 145 pps (in Vietnamese)

Pasha, Vijayashankar (1993). Thin layer chromatographic Detection of Pyrethroid Insecticides Analyst . July 1996. Vol 118. 777 778

Pham Hung Viet, Pham Ngoc Ha, Nguyen Thi Van Hai, Phan Thu Thuy, Nguyen Minh Tue, Nguyen Ngoc Vinh and Kennedy Ivan R. (2005). Employment of ELISA technology for determination of cyclodiene pesticides and for risk assessment (in preparation).

Sánchez-Bayo, F., Baskaran, S. and Kennedy, I.R. (2002) Ecological relative risk (EcoRR): another approach for risk assessment of pesticides in agriculture. Agriculture, Ecosystems and Environment 91: 37-57.

Seller, K. (1999). Fundamentals of Hazardous Waste Site Remediation, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

Skerritt, J. H. (1995) Analytical aspects of immunoassays of agrochemicals. In New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, Kurtz, D. A., Skerritt, J. H. and Stanker, L. H. (eds.), AOAC International, Arlington, VA, 1-16.

Smith, R. F., Apple, J. L. and Bottrell, D. G. (1976). The origins of integrated pest management concepts for agricultural crops. In Integrated Pest Management (eds. J.L. Apple and R.F. Smith). Plenum Press, New York.

Solomon, K. R. (1996). Overview of recent developments in ecotoxicological risk assessment, Risk Analysis 16, 627-633.

Solomon, K., Giesy, J., Jones, P. (2000) Probabilistic risk assessment of agrochemicals in the environment. Crop Protection 19 : 649 655.

Sparks, D. L. (1996). Methods of Soil Analysis. Soil Science Society of America. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA.

Suter II, G.W. (1993) Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

Thanh Nguyen Xuan, (2002). Impact assessment of water, soil environment and fertilizers to safe vegetable cultivation and adaptability of soil in safe vegetable planning regions in Ha Noi. PhD thesis in Ha noi University of Science. 146 pps (in Vietnamese)

Tomlin, C.D.S. (1997) The Pesticide Manual, 11th Edition. The British Crop Protection Council, Surrey, UK.

Urban, D.J., and Cook, N.J. (1986) Ecological risk assessment, Standard evaluation procedure of the Hazard Evaluation Division, Office of Pesticide Programs. EPA-540/9-85-001. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

USEPA (1989). Risk Assessment Guidance for Superfund, Volume I, Human Health Evaluation Manual (Part A), Interim Final. EPA/ 5401/1- 89/002, Office of Emergency and Remedial Response, Washington, DC, USA

USEPA (2004) Toxicity Information Retrieval (AQUIRE), Office of Research and Development, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Mid-Continental Ecology Division, Duluth, MN.

PHỤ LỤC

Thành phần hữu cơ: Phương pháp mất trọng lượng do nung nóng (Loss-on-Ignition: LOI)

Đây là phương pháp được ghi trong "Hội khoa học về đất của Mỹ", phần 3 (Soil Science Society of America) (Sparks, 1989), được sửa đổi từ phương pháp của Ben-Dor và Banin (1989).

Dụng cụ cần thiết:

- Cốc đốt Pyrex hoặc chén sứ (20 ml)
- Lò nung
- Lò sấy (105°C)
- Cân phân tích (± 0.1 mg)

Quy trình

Nung cốc hoặc chén sứ đốt trong lò ở nhiệt độ 400°C trong 2h, làm nguội và cân trọng lượng của chúng (± 0.1mg). Cho vào cốc 1 - 3 g đất nghiền mịn (< 0.4 mm) và đã được làm khô trong không khí và đem sấy ở nhiệt độ 105°C trong 24h. Làm nguội trong bình hút ẩm có $CaCl_2$ và cân trọng lượng cốc với mẫu đã làm khô trong tủ sấy (chính xác đến ±0.1 mg). Trừ trọng lượng cốc để tính trọng lượng mẫu sau khi đã sấy khô. Nung mẫu trong lò nung ở nhiệt độ 400°C trong 16h, làm nguội trong bình hút ẩm và cân trọng lượng cốc với mẫu (chính xác đến ± 0.1 mg). Tính trọng lượng còn lại của mẫu sau khi nung (trừ trọng lượng cốc).

Thành phần hữu cơ mất do nung nóng được tính như sau:

$$\text{LOI (\%)} = \frac{M_{105} - M_{400}}{M_{105}} \times 100$$

M_{105}: trọng lượng mẫu sau khi sấy ở 105°C
M_{400}: trọng lượng mẫu sau khi nung ở 400°C

Thành phần hữu cơ hầu như luôn bằng với giá trị LOI đối với đất bề mặt. Sai số có thể xảy ra khi lượng mẫu lấy quá nhỏ, do đó cần trộn kỹ và cân đủ lượng mẫu. Các khoáng chất ngậm nước hoặc các khoáng carbonate có thể làm giảm độ chính xác của phương pháp. Nếu mẫu được biết là có chứa nhiều khoáng ngậm nước thì phải làm theo các phương pháp SSSA (phần 3) và tuân theo các quy trình loại bỏ các khoáng này bằng HCl hoặc HF. Tuy nhiên để phân tích thông thường và ước lượng thì phương pháp trên đây là phù hợp.

Chịu trách nhiệm xuất bản
NGUYỄN CAO DOANH

Phụ trách bản thảo
PHẠM THANH THỦY

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
6/167, Phương Mai, Đống Đa, Hà Nội
ĐT: 8.521940, 8527008; FAX: (04) 5760748

CHI NHÁNH NXBNN
58 Nguyễn Bỉnh Khiêm, Q.I, TP. Hồ Chí Minh
ĐT: 8297157, 8299521 FAX: (08) 9101036

$\frac{63\text{-}630}{NN\text{-}2005}$ - 363/145 - 05

In 500 bản khổ 20 x 20 cm tại Công ty cổ phần Đầu tư thiết bị và in - Bộ Văn hóa thông tin - 36 Cát Linh - Hà Nội. Giấy chấp nhận KHĐT số 363/145 XB-QLXB Cục xuất bản cấp ngày 3/2/2005. In xong và nộp lưu chiểu quý IV/2005.