



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003433

(51) **G01N 1/40; G01N 21/65**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00256

(22) 25/06/2021

(45) 25/12/2023 429

(43) 27/09/2021 402

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
Số 334 Nguyễn Trãi - quận Thanh Xuân - thành phố Hà Nội

(72) Lê Văn Vũ (VN); Nguyễn Duy Thiện (VN); Nguyễn Anh Đức (VN).

(54) QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT VÀ LÀM GIÀU DƯ LƯỢNG THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT
CARBENDAZIM TRONG BƯỞI DỪNG TRONG PHÂN TÍCH DƯ LƯỢNG BẰNG
PHƯƠNG PHÁP TÁN XẠ RAMAN TĂNG CƯỜNG BỀ MẶT

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tách chiết và làm giàu dư lượng thuốc bảo vệ thực vật carbendazim trên bưởi cho phân tích dư lượng bằng phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt bao gồm các bước: bước 1 nghiền nát ruột bưởi trong dung môi để hòa tan dư lượng thuốc BVTV carbendazim; bước 2 quay ly tâm dịch bưởi để loại bỏ phần bã và lấy phần dung dịch chứa dư lượng thuốc BVTV carbendazim; bước 3 trộn dung dịch thu được với di-clo-metan để tách thành pha dung dịch chứa carbendazim sau đó bay hơi chúng và quay ly tâm để làm giàu dư lượng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực kỹ thuật phân tích, cụ thể là đề cập đến quy trình tách chiết và làm giàu dư lượng thuốc bảo vệ thực vật carbendazim trong bưởi cho phân tích dư lượng thuốc bảo vệ thực vật này bằng phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) trong mẫu trái cây thường là khá nhỏ so với trọng lượng của các mẫu, do đó, việc phân tích dư lượng thuốc BVTV trong trái cây bằng bất cứ phương pháp nào cũng đòi hỏi việc tách chiết và làm giàu dư lượng thuốc BVTV trước khi phân tích mẫu. Quá trình tách chiết và làm giàu dư lượng thuốc BVTV trong trái cây thường bao gồm một số nguyên tắc sau: thứ nhất là loại bỏ các chất gây ô nhiễm bề mặt bằng rửa mẫu trong nước cất, sau đó sấy khô ở nhiệt độ cao hoặc để khô tự nhiên; thứ hai là mẫu sẽ được nghiền nát, bằng máy hoặc thủ công, sau đó mẫu được đồng nhất và tách chiết; cuối cùng là làm giàu dư lượng trong mẫu. Quá trình tách chiết và làm giàu dư lượng thuốc BVTV sẽ ảnh hưởng đến độ nhạy của phép phân tích, các hoạt động trong quá trình tách chiết và làm giàu dư lượng thuốc BVTV có thể dẫn đến mất chất cần phân tích hoặc gây ô nhiễm bổ sung vào mẫu. Đối với phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) yêu cầu này cũng là cần thiết.

Phân tích dư lượng thuốc BVTV carbendazim trong trái cây bằng phương pháp sắc ký người ta sử dụng phương pháp tách chiết và làm giàu dư lượng bằng kỹ thuật chiết pha rắn (SPE), cụ thể, theo tiêu chuẩn ngành 10TCN 706:2006, quy trình tách chiết và làm giàu carbendazim trong mẫu được thực hiện như sau: Cân 50 g (chính xác tới 0,1 g) mẫu vào cốc xay, rồi thêm 200 ml axeton và xay nhuyễn trong thời gian 5 phút. Toàn bộ dịch xay được lọc qua phễu lọc buchner, tráng sạch cốc xay và phễu với 100 ml axeton. Toàn bộ dịch xay, dịch tráng cốc xay và phễu được cho vào bình cầu 500 ml rồi cô ở 60 °C bằng hệ thống chung cất quay chân không đến khi axeton bay hơi

hoàn toàn. Chuyển dịch còn lại vào phễu chiết 1000 ml sau đó tráng bình cầu bằng 100 ml HCl 1M và đổ dịch tráng vào phễu chiết, tiếp tục tráng bình cầu bằng 20 ml di-clo-metan (CH_2Cl_2) và đổ vào phễu chiết, sau đó lại tráng bình cầu bằng 50 ml HCl 1M và đổ vào phễu chiết. Dịch trong phễu chiết được chiết loại bỏ di-clo-metan, sau đó tiếp tục bổ sung 20 ml di-clo-metan và chiết loại bỏ di-clo-metan. Tiếp theo, điều chỉnh pH dung dịch còn lại trong phễu chiết đến pH 7 bằng NaOH 2,5M. Tiếp tục chiết hai lần, mỗi lần 50 ml di-clo-metan. Lấy di-clo-metan vào bình cầu 250ml. Cô cạn ở 40°C bằng hệ thống chung cất quay chân không. Hoà tan dịch chiết còn lại bằng 3ml dung dịch acid phosphoric 0,1%. Lọc dịch chiết qua màng lọc 0,45mm. Thu được dung dịch mẫu thử.

Để chuẩn bị mẫu cho phân tích SERS, người ta phát triển phương pháp QuEChERS để tách chiết dư lượng thuốc BVTV trong rau quả. Trong phương pháp này, đầu tiên, mẫu rau quả được nghiền nhỏ bằng máy xay ở tốc độ cao, hỗn hợp mẫu sau đó được trộn với dung môi (thường là axetonitril) và bổ sung muối natri axetat và magie sunphat bằng máy trộn, sau đó, hỗn hợp được quay ly tâm ở tốc độ cao, huyền phù thu được sau bước này lại được trộn với chất hấp phụ, cuối cùng toàn bộ dịch mẫu được quay ly tâm để loại bỏ pectin, protein, pigments và phenol, dung dịch phía trên sau khi quay ly tâm sẽ được sử dụng để đo SERS. Phương pháp này tuy chưa được sử dụng để tách chiết carbendazim, nhưng cũng đã được sử dụng để tách chiết và làm giàu thuốc BVTV defenolconazon trong các mẫu nho để phân tích SERS (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.005>), cụ thể như sau: các mẫu nho được bổ sung difenoconazole ở các nồng độ khác nhau (0,4, 1,0, 2,0, 4,0, 10, 20 và 40 mg/kg) và xay nhuyễn. Lấy 5 g mẫu trên trộn với 5 ml axetonitril (CH_3CN) chứa axit axetic 1%, 0,5 g natri axetat tri-hydrat ($\text{C}_2\text{H}_9\text{NaO}_5$) khan và 2 g magie sunphat khan (MgSO_4) bằng máy trộn xoáy trong 2 phút. Tiếp theo, hỗn hợp được quay ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ kết tủa. Để loại bỏ bớt các phân tử hữu cơ như pectin, protein, pigments và phenol nhằm giảm nhiễu của phép đo SERS, dung dịch sau ly tâm được chuyển sang ống ly tâm 50 ml và trộn với 0,45 g chất hấp thụ PSA (primary secondary amine - $(\text{CH}_3)_3\text{Si-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) và 0,45 g chất hấp thụ C18 và 1,5 g magie sunphat (MgSO_4) khan bằng máy trộn xoáy trong 2 phút. Sau đó, hỗn hợp lại được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút và phần dung dịch phía trên được sử dụng để đo SERS.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tách chiết và làm giàu dư lượng thuốc BVTV carbendazim trong bưởi cho phân tích dư lượng carbendazim bằng phương pháp SERS có thể được thực hiện bằng hai phương pháp tách chiết và làm giàu dư lượng nêu trên, tuy nhiên các phương pháp này còn có nhiều điểm hạn chế sau: Phương pháp tách chiết và làm giàu dư lượng bằng chiết pha rắn (SPE) cần một lượng mẫu lớn, đòi hỏi một thời gian chuẩn bị mẫu dài, quy trình phức tạp gồm nhiều bước và tiêu hao vật tư hóa chất nhiều; Phương pháp tách chiết và làm giàu dư lượng bằng QuEChERS, mặc dù đơn giản hơn phương pháp SPE và đã dùng cho phân tích Raman nhưng quy trình vẫn phức tạp với nhiều bước thực hiện và tiêu hao vật tư hóa chất nhiều. Cả hai phương pháp đều sử dụng nhiều hóa chất trung gian trong quá trình tách chiết như axit axetic 1%, natri axetat tri-hydrat, magie sunphat, chất hấp thụ PSA và chất hấp thụ C18.v.v...

Trong quy trình tách chiết và làm giàu dư lượng việc sử dụng nhiều hóa chất và nhiều bước thực hiện sẽ làm mất mát dư lượng, kéo dài thời gian phân tích một mẫu. v.v... Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích là sự kết hợp các mặt tích cực của hai phương pháp tách chiết và làm giàu kể trên để tạo ra một phương pháp chiết và làm giàu dư lượng carbendazim mới trong bưởi, thỏa mãn tiêu chí đơn giản hơn mà vẫn mang lại hiệu quả trong phân tích SERS. Quy trình trong giải pháp hữu ích không sử dụng các hóa chất trung gian (liệt kê ở trên) như trong phương pháp QuEChERS và PSE mà chỉ sử dụng di-clo-metan để phân tách các pha chứa carbendazim và pha chứa hữu cơ khác rồi bay hơi để làm giàu vì vậy đã rút ngắn thời gian chuẩn bị mẫu, giảm số bước thực hiện, giảm tiêu hao vật tư hóa chất và cách thực hiện đơn giản từ đó giúp thời gian phân tích mẫu nhanh hơn.

Sự chính xác của phép phân tích được xác nhận thông qua sự tồn tại các đỉnh tán xạ Raman của carbendazim trong các mẫu tách chiết và làm giàu, các đỉnh xuất hiện tại các vị trí 628, 1006, 1227, 1274, 1462 cm^{-1} .

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Phổ SERS của mẫu bưởi tồn dư carbendazim nồng độ 100 ppm sau khi được tách chiết và làm giàu theo quy trình của giải pháp hữu ích.

Hình 2: Phổ SERS của mẫu bưởi tồn dư carbendazim nồng độ 1 ppm sau khi được tách chiết và làm giàu theo quy trình của giải pháp hữu ích.

Hình 3: Phổ SERS của mẫu bưởi không tồn dư carbendazim sau khi được tách chiết và làm giàu theo quy trình của giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình tách chiết và làm giàu carbendazim trên bưởi được thực hiện theo các công đoạn sau: Nghiền nát ruột bưởi trong axetonitril hoặc axeton để hòa tan dư lượng thuốc BVTV carbendazim, sau đó dịch bưởi được quay ly tâm để loại bỏ phần bã chỉ lấy phần dung dịch chứa dư lượng thuốc BVTV carbendazim; Trộn dung dịch thu được với di-clo-metan để tách thành pha dung dịch phía trên chứa carbendazim và pha dung dịch phía dưới không chứa carbendazim; Bay hơi pha phía trên để làm giàu dư lượng và quay ly tâm dung dịch sau khi bay để loại bỏ các đại phân tử. Cụ thể quy trình tách chiết và làm giàu carbendazim trong bưởi được thực hiện theo các bước như sau:

Bước 1: Bưởi được gọt phần vỏ và cùi bưởi. Lấy 10-20 g múi bưởi và xay nhuyễn với axetonitril (CH_3CN) hoặc axeton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) theo tỷ lệ khối lượng bưởi/thể tích axetonitril hoặc axeton là 1 g/5 ml, thời gian xay 5 phút. Sau đó rót toàn bộ dung dịch bưởi xay được vào các ống ly tâm. Lưu ý, quá trình xay dịch có đường nên dịch sẽ bám vào thành cối, cần lấy pipet hút phần nước bưởi vừa xay phun tráng lại thành cối xay nhiều lần để thu được tối đa mẫu.

Bước 2: Quay ly tâm mẫu ở tốc độ 5000-9000 vòng/phút, thời gian từ 5-10 phút, sau quay ly tâm rót phần nước bưởi phía trên ra một cốc 100 ml; Còn lại phần bã bưởi được bổ sung axetonitril hoặc axeton tương ứng theo tỷ lệ khối lượng bưởi ban đầu/thể tích axetonitril là 1 g/2 ml, đồng nhất bã bưởi với axetonitril hoặc axeton bằng máy rung trong thời gian 5 phút, sau đó quay ly tâm ở tốc độ 5000-9000 vòng/phút thời gian từ 5-10 phút, rót phần nước bưởi phía trên vào cốc 100 ml ở trên.

Bước 3: Toàn bộ phần nước bưởi thu được ở cốc 100 ml được lọc bằng giấy lọc 0,45 μm , dung dịch sau khi lọc được trộn với di-clo-metan theo tỷ lệ 2/1 về thể tích và rung xoáy trong thời gian 5 phút, sau khi rung để dung dịch này tách thành hai pha, một pha phía trên và một pha phía dưới trong 30 phút. Lấy pha phía trên, cho bay hơi 20-80 % thể tích, dung dịch còn lại sau quá trình bay hơi được quay ly tâm ở 15.000-18.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút, sau ly tâm lấy 10% phần dung dịch phía trên, đây chính là dung dịch đã tách chiết và làm giàu dùng để phân tích Raman cho xác định dư lượng carbendazim.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Tách chiết mẫu bưởi tồn dư carbendazim 100 ppm

Bước 1: Lấy 10 g múi bưởi, bổ sung carbendazim để được mẫu nồng độ 100 mg/kg và xay nhuyễn với 50 ml axetonitril (CH_3CN), thời gian xay 5 phút. Sau đó rót toàn bộ dung dịch bưởi xay được vào các ống ly tâm. Lưu ý, quá trình xay dịch có đường nên dịch sẽ bám vào thành cối, cần lấy pipet hút phần nước bưởi vừa xay phun tráng lại thành cối xay nhiều lần để thu được tối đa mẫu.

Bước 2: Quay ly tâm dung dịch bưởi xay được ở tốc độ 8.000 vòng/phút, thời gian quay ly tâm 10 phút, sau ly tâm, rót phần nước bưởi phía trên ra một cốc 100 ml; Còn lại phần bã bưởi được bổ xung 20 ml axetonitril, đồng nhất bã bưởi với axetonitril bằng máy rung trong thời gian 5 phút, sau đó quay ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút thời gian 10 phút, rót phần nước bưởi phía trên vào cốc 100 ml ở trên.

Bước 3: Toàn bộ phần nước bưởi thu được ở cốc 100 ml được lọc bằng giấy lọc 0,45 μm , dung dịch sau khi lọc được trộn với di-clo-metan theo tỷ lệ 2/1 về thể tích và rung xoáy trong thời gian 10 phút, sau khi rung để dung dịch này tách thành hai pha, một pha phía trên và một pha phía dưới. Lấy pha phía trên cho bay hơi 75 % thể tích, dung dịch còn lại sau quá trình bay hơi được quay ly tâm ở tốc độ 18.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút, sau ly tâm lấy 10% phần dung dịch phía trên, đây chính là dung dịch đã tách chiết và làm giàu dùng để đo Raman để xác định dư lượng carbendazim.

Kết quả phân tích dư lượng carbendazim của mẫu bằng phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt được chỉ ra trong Hình 1.

Ví dụ 2: Tách chiết mẫu bưởi tồn dư carbendazim 1 ppm

Bước 1: Lấy 10 g múi bưởi, bổ sung carbendazim để được mẫu nồng độ 1 mg/kg và xay nhuyễn với 50 ml axetonitril (CH_3CN), thời gian xay 5 phút. Sau đó rót toàn bộ dung dịch bưởi xay được vào các ống ly tâm. Lưu ý, quá trình xay dịch có đường nên dịch sẽ bám vào thành cối, cần lấy pipet hút phần nước bưởi vừa xay phun tráng lại thành cối xay nhiều lần để thu được tối đa mẫu.

Bước 2: Quay ly tâm dung dịch buri xay được ở tốc độ 8.000 vòng/phút, thời gian quay ly tâm 10 phút, sau ly tâm, rót phần nước buri phía trên ra một cốc 100 ml; Còn lại phần bã buri được bổ xung 20 ml axetonitril, đồng nhất bã buri với axetonitril bằng máy rung trong thời gian 5 phút, sau đó quay ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút thời gian 10 phút, rót phần nước buri phía trên vào cốc 100 ml ở trên.

Bước 3: Toàn bộ phần nước buri thu được ở cốc 100 ml được lọc bằng giấy lọc 0,45 μm , dung dịch sau khi lọc được trộn với di-clo-metan theo tỷ lệ 2/1 về thể tích và rung xoáy trong thời gian 10 phút, sau khi rung để dung dịch này tách thành hai pha, một pha phía trên và một pha phía dưới. Lấy pha phía trên cho bay hơi 75 % thể tích, dung dịch còn lại sau quá trình bay hơi được quay ly tâm ở tốc độ 18.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút, sau ly tâm lấy 10% phần dung dịch phía trên, đây chính là dung dịch đã tách chiết và làm giàu dùng để đo Raman để xác định dư lượng carbendazim.

Kết quả phân tích dư lượng carbendazim của mẫu bằng phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt được chỉ ra trong Hình 2.

Ví dụ 3: Tách chiết mẫu buri không tồn dư carbendazim

Bước 1: Lấy 10 g múi buri và xay nhuyễn với 50 ml axetonitril (CH_3CN), thời gian xay 5 phút. Sau đó rót toàn bộ dung dịch buri xay được vào các ống ly tâm. Lưu ý, quá trình xay dịch có đường nên dịch sẽ bám vào thành cối, cần lấy pipet hút phần nước buri vừa xay phun tráng lại thành cối xay nhiều lần để thu được tối đa mẫu.

Bước 2: Quay ly tâm dung dịch buri xay được ở tốc độ 8.000 vòng/phút, thời gian quay ly tâm 10 phút, sau ly tâm, rót phần nước buri phía trên ra một cốc 100 ml; Còn lại phần bã buri được bổ xung 20 ml axetonitril, đồng nhất bã buri với axetonitril bằng máy rung trong thời gian 5 phút, sau đó quay ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút thời gian 10 phút, rót phần nước buri phía trên vào cốc 100 ml ở trên.

Bước 3: Toàn bộ phần nước buri thu được ở cốc 100 ml được lọc bằng giấy lọc 0,45 μm , dung dịch sau khi lọc được trộn với di-clo-metan theo tỷ lệ 2/1 về thể tích và rung xoáy trong thời gian 10 phút, sau khi rung để dung dịch này tách thành hai pha, một pha phía trên và một pha phía dưới. Lấy pha phía trên cho bay hơi 75 % thể tích, dung dịch còn lại sau quá trình bay hơi được quay ly tâm ở tốc độ 18.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút, sau ly tâm lấy 10% phần dung dịch phía trên, đây chính là dung dịch đã tách chiết và làm giàu dùng để đo Raman để xác định dư lượng carbendazim.

Kết quả phân tích dư lượng carbendazim của mẫu bằng phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt được chỉ ra trong Hình 3.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đã phát triển một phương pháp tách chiết và làm giàu carbendazim trong bưởi cho phân tích dư lượng thuốc BVTV carbendazim bằng phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt. Phương pháp tách chiết và làm giàu này đơn giản với ít bước thực hiện, tiêu hao ít vật tư và hóa chất, thời gian thực hiện nhanh và thao tác đơn giản, qua đó giúp giảm thời gian phân tích mẫu. Sử dụng mẫu được tách chiết và làm giàu theo quy trình của giải pháp hữu ích để phân tích tán xạ Raman tăng cường bề mặt đã phát hiện được mẫu bưởi tồn dư carbendazim nồng độ 1 ppm với các đỉnh SERS rất rõ ràng. Phương pháp tách chiết và làm giàu này giúp phát triển kỹ thuật phân tích dư lượng mới trên mẫu trái cây bằng phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình tách chiết và làm giàu dư lượng thuốc bảo vệ thực vật carbendazim trong bưởi dùng trong phân tích dư lượng bằng phương pháp tán xạ Raman tăng cường bề mặt, bao gồm các bước sau:

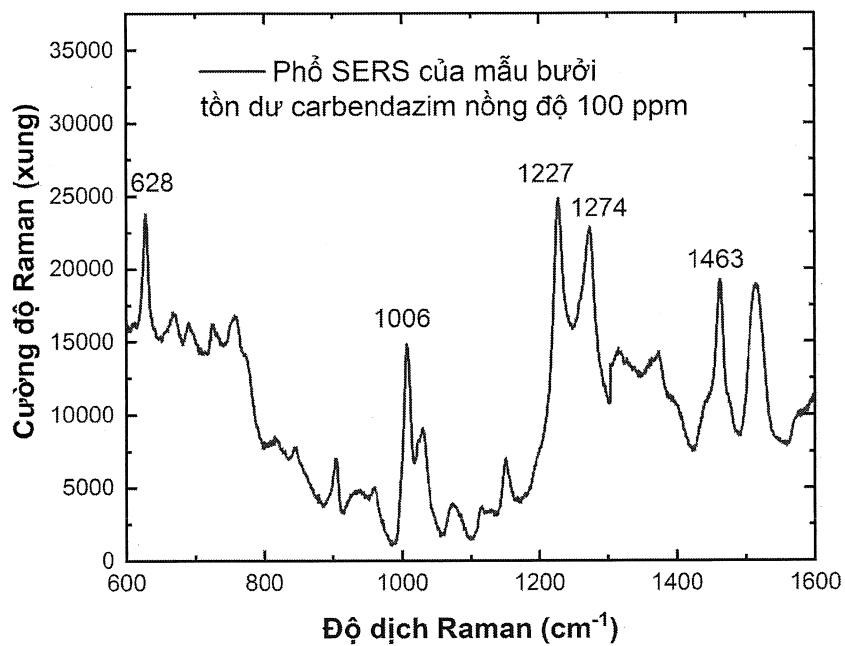
i) xay nhuyễn 10-20g múi bưởi (bưởi đã gọt bỏ phần vỏ và cùi) với axetonitril (CH_3CN) hoặc axeton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) theo tỷ lệ khối lượng bưởi/thể tích axetonitril hoặc axeton là 1 g/5 ml trong thời gian 5 phút;

ii) toàn bộ mẫu thu được ở bước i) cho vào máy ly tâm và quay ở tốc độ 5.000-9.000 vòng/phút trong thời gian từ 5-10 phút để tách phần nước và phần bã bưởi;

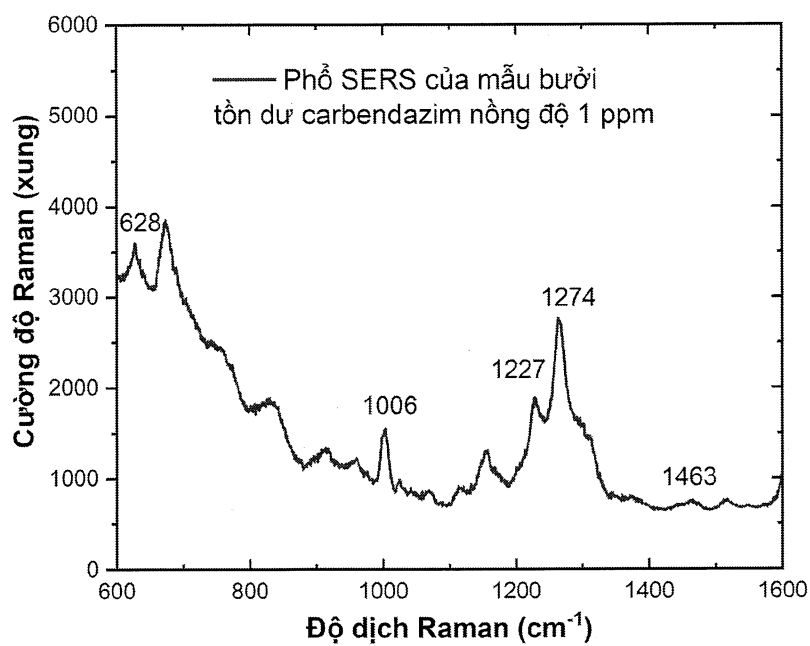
iii) phần bã bưởi từ bước ii) tiếp tục bổ sung axetonitril hoặc axeton tương ứng theo tỷ lệ khối lượng bưởi ban đầu/thể tích axetonitril hoặc axeton là 1 g/2 ml, đồng nhất bã bưởi với axetonitril hoặc axeton bằng máy rung trong thời gian 5 phút, sau đó quay ly tâm ở tốc độ 5.000-9.000 vòng/phút trong thời gian từ 5-10 phút để thu nước bưởi;

iv) toàn bộ phần nước bưởi thu được ở bước ii) và iii) được lọc bằng giấy lọc 0,45 μm , dung dịch sau khi lọc được trộn với di-clo-metan theo tỷ lệ 2/1 về thể tích và rung xoáy trong thời gian 5 phút, sau khi rung để dung dịch này tách thành hai pha, một pha phía trên và một pha phía dưới trong 30 phút, loại bỏ pha dung dịch phía dưới, lấy pha dung dịch phía trên cho bay hơi 20-80 % thể tích và

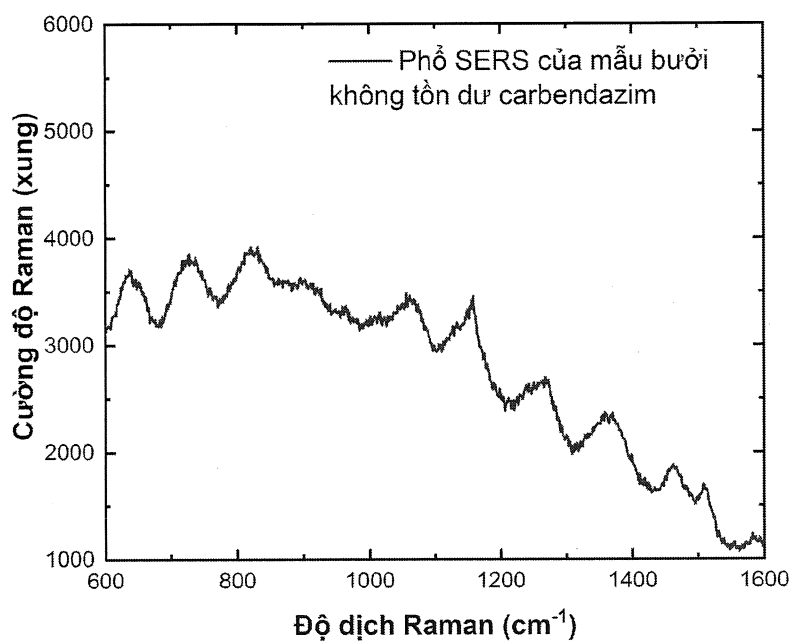
v) dung dịch thu được từ bước iv) được quay ly tâm ở 15.000-18.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút, sau ly tâm lấy 10% phần dung dịch phía trên, đây chính là dung dịch đã tách chiết dùng để phân tích tán xạ Raman cho xác định dư lượng carbendazim.



Hình 1.



Hình 2.



Hình 3.