



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

DƯ LƯỢNG THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT TRONG THÓC GẠO VÀ ĐẬU TƯƠNG

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG THUỐC γ - BHC
VÀ METHYL PARATHION

TCVN 4718 - 89 ÷ TCVN 4719 - 89

Cơ quan biên soạn :

Cục Bảo vệ thực vật — Bộ nông nghiệp
và Công nghiệp thực phẩm

Thủ trưởng cơ quan : Phó tiến sĩ Bùi Văn Ích — Cục trưởng

Cán bộ biên soạn : Kỹ sư Phan Mai

Cơ quan đề nghị ban hành :

Bộ nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm
Bộ trưởng Nguyễn Công Tạn

Cơ quan trình duyệt :

Tổng cục Tiêu chuẩn — Đo lường — Chất lượng

Tổng cục Phó : Hoàng Mạnh Tuấn

Cơ quan xét duyệt và ban hành :

Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước

Phó chủ nhiệm : Phó tiến sĩ Đoàn Phương

Quyết định ban hành số 259/QĐ ngày 20 tháng 5 năm 1989.

**THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT TRONG
THÓC GẠO VÀ ĐẬU TƯƠNG**

**Phương pháp xác định dư lượng
Methylparathion**

**TCVN
4719 - 89**

Остаток пестицидов
Метод определения
остатка метилпаратрион
в рисовых и соевых

Residue of pesticides
Method for determina-
tion of methylparathion
residue in rice and
soybean

**Có hiệu lực
từ 1-1-1990**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định dư lượng Methylparathion trong hạt thóc gạo và hạt đậu tương bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM).

1. Lấy mẫu: Theo TCVN 1700 - 86;
2. Dụng cụ và hóa chất:
 - 2.1. Dụng cụ:
 - Cân phân tích;
 - Máy lắc;
 - Máy chưng cất quay;
 - Bơm hút chân không;
 - Bình cầu 250, 500 ml;
 - Bình định mức 100 ml;
 - Bình lắng gạn 300, 500, 1000 ml;
 - Bình quả lê 25 ml;
 - Bình sắc ký;
 - Bình hút âm;
 - Ống đong 10, 50, 100 ml;
 - Phễu con;
 - Phễu Buchner
 - Dụng cụ phun
 - Dụng cụ tráng lớp mỏng;
 - Kính lớp mỏng 20 × 20 cm;

- Microsoranh 5, 10, 50 μ l;
- Cốc thủy tinh 100, 250 ml;
- Cột sắc ký 400 \times 20 mm;
- Đũa thủy tinh;
- Bông thấm nước;
- Pipet 0,5, 1 ml;
- Công tơ hút;
- Tủ sấy;

2.3. Hóa chất:

- Chuẩn Metyl Parathion;
- Axetonitril TKPT;
- N-hexan TKPT;
- Dietyl êter TKPT;
- Axeton TKPT;
- Ête dầu hỏa TKPT; (Petro - benzin);
- Natri sunfat khan PT;
- Florisil (sắc ký cột) hoạt hóa 8 giờ với 130°C;
- Brôm lỏng PT;
- Silicagel G 60 (sắc ký lớp mỏng);
- Công ô đố;
- Hyflo - supercel;
- Natri clorua TKPT;
- Cồn êtylic 96°;

3. Phương pháp xác định:

3.1. Chuẩn bị mẫu:

3.1.1. Hạt thóc gạo:

3.1.1.1. Xử lý mẫu và chiết xuất:

Cân 50 g mẫu đã nghiền nhỏ và rây qua cỡ rây 1,25 mm rồi cho vào bình tam giác dung tích 500 ml, cho tiếp vào 100 ml axetonitril, đặt vào máy lắc 1 giờ, sau đó để yên 5 giờ cho dư lượng thuốc trừ sâu tan hết vào dung môi. Lọc bằng phễu Buchner có lót giấy lọc qua hút chân không. Tráng bình và phễu với 50ml

axetonitril. Dịch lọc đem chưng cất bằng máy chưng cất quay trên cách thủy 40 - 50°C cho tới khi còn 5 - 10 ml.

3.1.1.2. Tinh chế:

Dùng một cột thủy tinh 400 × 20mm, phía dưới có khóa đóng mở. Sau khi rửa sạch bằng xà phòng, tráng nước cất, sấy khô. Dùng kẹp lắp lên giá cho cột thẳng đứng, khóa ở phía dưới đóng lại, lót một nhúm bông (loại thấm nước) ở đáy rồi nhồi vào cột 10g Florisil. Rửa cột với 50 ml ête dầu hỏa. Mở khóa loại bỏ 30 ml rồi phủ một Natri sunphát khan 2 cm lên trên. Hòa tan cặn chiết với 10 ml ête dầu hỏa và đổ vào cột, tráng thêm với vài ml để lấy hết cặn. Rửa giải bằng 150 ml hỗn hợp dung môi (ête dầu hỏa chứa 15 % ête êtylic). Mở khóa tốc độ chảy khoảng 3-4 ml, phút. Dịch thu được đem cất bằng máy cất quay đến khi còn 1 - 2 ml thì chuyển sang bình quả lê, tráng lấy hết cặn bằng vài ml hỗn hợp dung môi rửa giải. Đặt bình quả lê trong buồng hút khí hoặc bốc hơi như bằng máy cất quay đến hết dung môi. Cặn thu được để xác định dư lượng thuốc trừ sâu bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM). Nếu chưa phân tích ngay cần nút kín bảo quản nơi mát mẻ.

3.1.2. Hạt đậu tương:

3.1.2.1. Xử lý mẫu và chiết xuất:

Cân 50g mẫu đã nghiền nhỏ và rây qua cỡ rây 1,25 mm rồi cho vào bình tam giác dung tích 500 ml, cho tiếp vào 100 ml axeton đặt vào máy lắc một giờ, sau đó để yên 5 giờ cho thuốc trừ sâu tan hết vào dung môi. Lọc bằng phễu Buchner có lót giấy lọc phủ một lớp mỏng khoảng 2 - 3 mm Hyflo - supercel qua hút chân không. Tráng bình và phễu với 50 ml axeton. Chuyển toàn bộ dịch lọc sang bình lắng gạn 1000 ml tráng với 20 ml axeton và gộp vào bình lắng gạn. Sau đó cho lần lượt vào bình lắng gạn 100 ml n-hexan, 20 ml dung dịch bão hòa Natriclorua và 250 ml nước cất. Đậy nút lắc mạnh 2 phút rồi để yên 20 phút cho tạo lớp. Chuyển lớp nằm dưới sang bình lắng gạn thứ 2 và chiết thêm 2 lần nữa, mỗi lần với 100 ml n-hexan Tập trung dịch ở bình thứ nhất với dịch n-hexan của 2 lần chiết sau vào bình lắng gạn rồi loại nước qua phễu con có lót giấy lọc và khoảng 10 gam Natri sunfat khan vào một bình của máy chưng cất quay. Sau đó đem chưng cất cho tới khi còn 5 - 10 ml.

3.1.2.2. Tinh chế:

Dịch cô trong bình chưng cất quay được chuyển sang bình lắng gan dung tích 300 ml, tráng bằng 30 ml Axetonitril để lấy hết cặn sang bình lắng gan, thêm 90 ml n-hexan và lắc mạnh 1 phút. Để yên 20 phút cho tạo lớp rồi chuyển lớp Axetonitril sang bình lắng gan thứ 2. Dịch còn lại ở bình thứ nhất được chiết thêm 2 lần, mỗi lần với 30 ml Axetonitril và tập trung axetonitril vào bình thứ 2. Lắc rửa axetonitril với 90 ml n-hexan, khi đã phân lớp thì loại bỏ lớp n-hexan đi. Dịch Axetonitril được cho vào bình cất quay và cô cho tới khi còn 3-4 ml thì chuyển sang tinh chế qua cột.

Dùng 1 cột thủy tinh 400×20 mm phía dưới có khóa đóng mở. Sau khi rửa sạch bằng xà phòng, tráng 2 lần nước cất, sấy khô, lắp vào giá cho cột thẳng đứng, đóng khóa và nhồi 15 g Florisil như trên. Rửa cột bằng 50 ml n-hexan, mở khóa cho chảy và loại bỏ 30 ml. Hòa tan dịch cô Axetonitril với 10 ml n-hexan và đổ vào cột, tráng với vài ml n-hexan để lấy hết cặn vào cột. Dùng bình 250 ml của máy cất quay hứng ở dưới. Mở khóa và đổ dần 100 ml hỗn hợp (ête êtylic và n-hexan, tỷ lệ 15/85) để rửa giải. Tốc độ chảy 3 - 4 ml/phút.

Khi dung dịch chảy hết, cô trên máy cất quay tới khi còn 1 - 2ml thì chuyển sang bình quả lê. Tráng với vài ml dung môi đang dùng để lấy hết cặn. Bốc hơi ở trong buồng hút hoặc trên máy cất quay tới hết dung môi. Cặn thu được để xác định dư lượng metyl parathion bằng SKLM. Nếu chưa phân tích ngay cần nút kín, để nơi mát.

3.2. Chuẩn bị bản mỏng:

Dùng các tấm kính 20×20 cm rửa sạch bằng xà phòng, tráng 2 lần bằng nước cất, đặt lên giá cho khô.

Cân 30 g Silicagel G 60 cho vào bình tam giác cỡ 300 ml, thêm 70 ml nước cất, lắc đều trong 2 phút rồi đổ vào bề chứa của dụng cụ tráng lớp mỏng đã điều chỉnh để khi tráng lên 5 miếng kính 20×20 cm sẽ đạt bề dày của lớp silicagel 0,25 mm. Sau khi trải xong, đặt các bản mỏng ở vị trí thật thẳng bằng ở nhiệt độ thường cho đến khô mới cho vào tủ sấy. Khi tủ sấy đạt đến 110°C thì

sấy tiếp 1 giờ ở nhiệt độ đó. Khi các bản mỏng vừa nguội thì được xếp vào giá trong bình hút ẩm để dùng dần.

3.3. Chuẩn bị các dung dịch:

3.3.1. Dung dịch khai triển sắc ký:

Đó là hỗn hợp dung dịch n-hexan và axeton theo tỷ lệ 4/1. Đong 40 ml n-hexan trộn đều với 10 ml axeton rồi đổ vào bình sắc ký, đậy nắp kín.

3.3.2. Dung dịch phát hiện:

Trộn 50 ml cồn êtylic 96° với 50 ml nước cất để hòa tan 0,5 g đồ công gô. Lọc qua giấy lọc vào chai 100 ml đậy kín.

3.3.3. Dung dịch chuẩn:

Cân chính xác 20 mg chất chuẩn methyl parathion và hòa tan với vài chục ml axeton trong bình định mức 100 ml. Sau đó bổ sung axeton cho đến gần 100 ml. Đậy nút kín lắc đều. Bảo quản trong tủ lạnh, giá trị sử dụng một tháng.

3.4. Tiến hành sắc ký:

Lấy một bản mỏng đã chuẩn bị ở trên, cạo bỏ lớp silicagel ở hai mép bên cạnh sâu vào 1 mm. Dùng thước đo đánh dấu các vị trí sẽ chấm mẫu thử và mẫu chuẩn lên lớp mỏng (các chấm cách nhau từ 2,5—3 cm, cách mép dưới 1,5 cm và cách hai mép bên từ 1,2—1,5 cm). Một bản mỏng như vậy có thể chấm được từ 6—8 vết.

Lấy chính xác 0,5 ml axeton cho vào cặn mẫu thử (3.1.2.2) hoặc (3.1.1.2) đậy nút kín, lắc đều cho tan cặn và tập trung xuống đáy bình quả lê. Dùng ống mao dẫn chính xác hoặc microseranh hút mẫu thử và chấm lên lớp mỏng ở hai vị trí đã định; Vết thứ nhất chấm 30 microlit (μl), vết thứ hai chấm 50 μl . Các vị trí khác chấm dung dịch chuẩn với thể tích tăng dần từ 10—15—20—25—30—35 μl (tương ứng với 2—3—4—5—6—7 microgam « μg » chất trừ sâu methylparathion/vết). Khi chấm phải khống chế đường kính của vết không quá 3 mm. Khi chấm xong, đặt mép dưới của bản mỏng nhúng vào dung môi trong bình sắc ký, đậy nắp có bôi sẵn vaselin để đảm bảo thật kín.

Khi dung môi ngấm lên còn cách mép trên khoảng 2 cm thì lấy bản mỏng ra, đánh dấu đỉnh dung môi rồi đặt tủ hút 30 phút cho bay hết dung môi. Đặt bản mỏng vào một bình kín có chứa

một cốc brom, sau 10 phút lấy ra đặt ở tủ hút 10 phút rồi phun dung dịch phát hiện (3.3.2) đều trên mặt lớp mỏng. Chất trừ sâu methyl parathion cho vết màu xanh trên nền đỏ.

Bằng cách so sánh trực tiếp giữa các vết của mẫu thử và mẫu chuẩn ta rút ra lượng metyl parathion là bao nhiêu microgam/l vết và từ đó tính toán dư lượng thuốc trừ sâu trong sản phẩm.

Chú thích: Nếu vết của mẫu nằm trong khoảng thang chuẩn thì ta rút ra được kết quả ngay. Nếu vết nhỏ nhất của mẫu thử có giá trị lớn hơn vết lớn nhất của chuẩn thì phải ước lượng để rút bớt lượng mẫu thử khi làm sắc ký lần sau. Nếu vết lớn nhất của mẫu thử có giá trị nhỏ hơn vết nhỏ nhất của chuẩn thì phải tăng lượng mẫu thử chấm lên lớp mỏng. Có nghĩa là ta phải tạo được các vết của mẫu thử có hàm lượng nằm trong khoảng giới hạn của thang chuẩn.

4. Tính kết quả:

Dư lượng thuốc trừ sâu (nếu có) trong sản phẩm được tính theo công thức sau đây:

$$\text{Lượng thuốc trừ sâu tính theo ppm} = \frac{A}{B}$$

Trong đó: A - Chất trừ sâu tìm thấy trên vết SKLM tính theo microgam (μg).

B - Số gam nông sản tương ứng với thể tích dịch chiết đã chấm lên 1 vết SKLM được chọn để rút ra kết quả.

Trị số RF: 0,45;

Giới hạn phát hiện: 2 microgam (μg);