

## MỞ ĐẦU

Sử dụng thuốc Bảo vệ thực vật (BVTV) để phòng trừ sâu bệnh là một trong những biện pháp quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Dùng thuốc hợp lý, đúng kỹ thuật sẽ giảm tổn thất, nâng cao năng suất và sản lượng cây trồng, mang lại hiệu quả kinh tế cao. Vì vậy nhu cầu sử dụng các loại thuốc tăng theo hàng năm về số lượng và chủng loại.

Tuy nhiên, do có độc tính nên các thuốc BVTV cũng gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng tới sức khỏe cộng đồng. Ngoài ra, do sử dụng thuốc không hợp lý, không đúng kỹ thuật dẫn đến hiệu lực phòng trừ của thuốc ngày càng giảm, lượng thuốc sử dụng ngày càng tăng, gây ô nhiễm cho môi trường sinh thái, đồng thời gây nên hiện tượng kháng thuốc của côn trùng gây hại như sâu tơ, rầy nâu... Trong số các thuốc BVTV dễ bị kháng là thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* (Bt), thuốc trừ rầy Imidacloprid,...

Nhằm tăng hiệu quả sử dụng của thuốc BVTV, hạn chế khả năng kháng thuốc của côn trùng, các nhà khoa học đã nghiên cứu và đề xuất nhiều biện pháp khắc phục, trong đó sử dụng chất hiệp đồng (synergist) hỗn hợp với thuốc là biện pháp tiên tiến, mang lại hiệu quả kinh tế - xã hội. Trong số các chất hiệp đồng, các hợp chất có nguồn gốc từ acid béo trong dầu thực vật đặc biệt được quan tâm vì rất thân thiện với môi trường (không độc, phân hủy sinh học, không gây hại cho môi trường) và nguồn nguyên liệu tái tạo sẵn có. Các chất hiệp đồng đã được thế giới nghiên cứu và đưa vào sử dụng từ trên 60 năm nay nhưng ở Việt Nam hầu như chưa có công trình nào công bố về hướng nghiên cứu này dù đã có nhiều thuốc trừ sâu bị giảm hiệu lực phòng trừ.

Vì vậy, Luận án hướng đến mục tiêu điều chế một số chất hiệp đồng có nguồn gốc từ dầu thực vật, ứng dụng nhằm nâng cao hiệu quả phòng trừ của thuốc trừ sâu sinh học Bt, thuốc trừ rầy Imidacloprid. Trên cơ sở đó bước đầu xác định cơ chế tác động của chất hiệp đồng đối với một số enzym giải độc và gây kháng thuốc của côn trùng.

Với những đóng góp mới có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, hy vọng kết quả của Luận án sẽ góp phần thúc đẩy việc ứng dụng các chất hiệp đồng trong sản xuất thuốc BVTV nhằm tăng hiệu quả sử dụng và giảm ô nhiễm môi trường.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT, HIỆN TƯỢNG SUY GIẢM HIỆU LỰC VÀ CÁC BIỆN PHÁP KHÁC PHỤC

#### 1.1.1. Vai trò của thuốc BVTV trong sản xuất nông nghiệp

An ninh lương thực là vấn đề được cả thế giới quan tâm do sự gia tăng dân số hàng năm cùng xu hướng đô thị hóa, khiến diện tích canh tác ngày càng bị thu hẹp. Để đảm bảo nhu cầu lương thực cần tăng năng suất cây trồng bằng nhiều biện pháp, trong đó các biện pháp dùng thuốc BVTV làm giảm hậu quả do dịch hại gây ra đối với nông sản là biện pháp quan trọng, hiệu quả, phổ biến nhất và không thể thiếu được trong nền nông nghiệp hiện đại. Các số liệu thống kê cho thấy, tổn thất hàng năm trên thế giới về các sản phẩm nông nghiệp do sâu bệnh và cỏ dại gây ra là đáng kể (15-50% do nấm bệnh, 20-35% do sâu hại, 15-25% do cỏ dại) [1,2].

Trong hơn nửa thế kỷ qua, nhu cầu sử dụng thuốc BVTV trên thế giới tăng nhanh cả về số lượng và chủng loại. Theo Hiệp hội các nhà sản xuất thuốc BVTV thế giới (Gifap), giá trị thuốc BVTV trên thế giới tiêu thụ trong năm 1992 là 22,4 tỷ USD; năm 2000 là 29,2 tỷ USD và năm 2010 khoảng 30 tỷ USD. Trong 10 năm gần đây, lượng thuốc BVTV được nông dân ở 6 nước châu Á trồng lúa sử dụng tăng 200 - 300% [3].

Ở Việt Nam, thuốc BVTV bắt đầu sử dụng từ những năm 50 của thế kỷ trước. Cùng với đẩy mạnh sản xuất nông nghiệp, việc sử dụng hóa chất nông nghiệp đã gia tăng nhanh chóng. Khối lượng và chủng loại thuốc BVTV bắt đầu tăng từ những năm 1970, đặc biệt tăng nhanh từ cuối những năm 1980 đến nay [4]. Nếu như năm 1991 chỉ có 77 loại hoạt chất được cho phép sử dụng, đến năm 2015 đã có 769 thuốc trừ sâu, 607 thuốc trừ nấm và 223 thuốc diệt cỏ được cho phép sử dụng [5]. Số lượng thuốc BVTV nhập khẩu tăng từ 20.300 tấn (năm 2010) lên 103.500 tấn (năm 2013) với giá trị tương ứng khoảng 700 triệu USD và 774 triệu USD [6].

### **1.1.2. Hiện tượng suy giảm hiệu lực của thuốc BVTV**

Hiện tượng suy giảm hiệu lực của thuốc BVTV là khả năng phòng trừ của thuốc bị giảm khi sử dụng đối với loài sâu bệnh xác định. Để tiêu diệt đối tượng phòng trừ cần tăng nồng độ, liều sử dụng hoặc phải thay thế loại thuốc khác. Hiện tượng suy giảm hiệu lực của thuốc BVTV thường xảy ra sau một thời gian sử dụng liên tục một loại thuốc BVTV bởi một trong những nguyên nhân sau:

#### ***1.1.2.1. Ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh***

Do ảnh hưởng điều kiện môi trường (nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, lượng mưa, đặc tính hóa lý, độ pH của đất, hàm lượng chất dinh dưỡng trong đất, ...) làm cho thuốc BVTV không phát huy tối đa hiệu lực của thuốc đối với dịch hại cũng làm suy giảm hiệu lực của thuốc.

#### ***1.1.2.2. Do công nghệ hoặc kỹ thuật gia công sản phẩm không đảm bảo***

Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng thuốc BVTV trong quá trình gia công sản phẩm là: thiết bị gia công lạc hậu hoặc không phù hợp; chất lượng hoạt chất hoặc phụ gia không đảm bảo (hàm lượng thấp, lẫn tạp chất hoặc cỡ hạt, độ ẩm không đạt tiêu chuẩn...); thành phần công thức gia công chưa phù hợp (lựa chọn chất hoạt động bề mặt (HĐBM) hoặc phụ gia chưa phù hợp với tính chất của hoạt chất hoặc dạng gia công, không có chất bảo quản khi hoạt chất không bền trong điều kiện môi trường); kỹ thuật đóng bao không đảm bảo khi vận chuyển hoặc bảo quản... Tất cả những yếu tố kỹ thuật trên đều làm cho sản phẩm bị giảm hiệu lực sau một thời gian nhất định.

#### ***1.1.2.3. Sử dụng thuốc BVTV không đúng kỹ thuật***

An toàn và hiệu quả trong sử dụng thuốc BVTV là vấn đề cần được quan tâm. Ngành BVTV đã đề ra 4 nguyên tắc cơ bản trong sử dụng thuốc BVTV, bao gồm: đúng thuốc, đúng liều lượng và nồng độ, đúng lúc và đúng cách. Tuy nhiên, những năm qua, khảo sát thực tế cho thấy vấn đề sử dụng thuốc BVTV không đúng kỹ thuật diễn ra thường xuyên và trong phạm vi cả nước. Các nguyên nhân chủ yếu gây nên hiện tượng giảm hiệu lực của thuốc BVTV do sử dụng không đúng kỹ thuật bao gồm [3]:

- + Sử dụng thuốc BVTV quá nhiều, quá mức cần thiết;
- + Sử dụng thuốc quá liều lượng khuyến cáo;
- + Không tuân thủ thời gian cách ly;
- + Thiếu hiểu biết về kỹ thuật sử dụng thuốc BVTV;
- + Hỗn hợp các loại thuốc một cách tùy tiện, không phù hợp, thậm chí có tác động đối kháng giữa chúng. Hậu quả là, có thể làm giảm hiệu lực phòng trừ của thuốc hoặc tạo ra những hợp chất gây cháy lá và tác động xấu đến sức khỏe người nông dân.

Hậu quả lớn nhất do sử dụng thuốc BVTV tùy tiện và lạm dụng, không đúng kỹ thuật là gây ra hiện tượng kháng thuốc của đối tượng phòng trừ, dẫn đến hiệu lực của thuốc bị giảm, các ký sinh thiên địch bị tiêu diệt và có thể gây bộc phát các dịch hại cây trồng. Để đối phó với dịch hại cần tăng liều lượng sử dụng thuốc, gây ô nhiễm cho cộng đồng và môi trường. Có thể hiểu, hiện tượng kháng thuốc là nguyên nhân chủ yếu gây nên sự giảm hiệu lực của thuốc BVTV.

#### 1.1.2.4. Hiện tượng kháng thuốc của dịch hại

Theo Tổ chức Y tế thế giới(WHO), *tính kháng thuốc* của dịch hại là sự giảm sút phản ứng của quần thể động, thực vật đối với một thuốc trừ dịch hại sau thời gian dài, quần thể này liên tục tiếp xúc với thuốc đó, khiến chúng chịu được lượng thuốc lớn hơn nhiều, so với các cá thể cùng loài chưa kháng thuốc. Khả năng này được di truyền qua đời sau, dù cá thể đời sau có hay không tiếp xúc với thuốc [8].

Tính kháng thuốc của dịch hại được xác định thông qua *Chỉ số kháng thuốc* (Resistance index- Ri) hay *Hệ số kháng thuốc* (Resistance coefficient- Rc) [7]:

$$Ri (Rc) = \frac{LD50 \text{ của dịch hại nghi là kháng thuốc}}{LD50 \text{ của dịch hại chưa tiếp xúc với thuốc}}$$

- Nếu  $Ri (Rc) \geq 10$ : có thể kết luận nòi kháng thuốc đã hình thành.
- Nếu  $Ri (Rc) < 10$  thì nòi đó mới chỉ ở trạng thái chịu thuốc.

Hiện tượng kháng thuốc được biết từ rất lâu, khi cường độ sử dụng các loại thuốc hóa học ngày càng tăng thì số lượng côn trùng kháng thuốc cũng gia tăng rõ rệt. Năm 1970 mới chỉ có 224 loài kháng thuốc, đến năm 1975 đã có 364 loài

và đến năm 1980 là 428 loài, với 260 loài gây hại trong nông nghiệp và 168 loài ký sinh trên người và động vật [8]. Đầu tiên, nhiều loài côn trùng chỉ kháng thuốc nhóm clo hữu cơ, lân hữu cơ và carbamat, đến nay các nhóm thuốc mới, như nhóm pyrethroid, các nhóm thuốc vi sinh vật như *Bacillus thuringiensis*, cũng bị kháng [9]. Một số thuốc mới đưa vào sử dụng thời gian gần đây cũng đã bị côn trùng kháng như Abamectin; Fipronil, Imidacloprid [10], Spinosad [11], ...

Các kết quả nghiên cứu đã cho thấy, tính kháng thuốc của côn trùng xảy ra với hầu hết các loại thuốc trừ sâu. Nhiều loài không những kháng một loại thuốc mà còn có thể kháng nhiều loại thuốc khác nhau. Hiện tượng dịch hại kháng được nhiều loại thuốc trong một nhóm, hay các nhóm khác nhau, kể cả các loại thuốc mà loài dịch hại chưa hề tiếp xúc gọi là kháng chéo (cross-resistance). Nhưng nguy hiểm hơn là tính đa kháng (multiple resistance) khi côn trùng có thể kháng với nhiều loại thuốc có cơ chế tác động khác nhau. Tính đa kháng hiện nay rất phổ biến trên côn trùng và hiện diện ở ít nhất 44 họ thuộc 10 bộ [13].

Côn trùng kháng thuốc gây những tổn thất to lớn trong nông nghiệp và y tế ở nhiều nước (trong đó có Việt Nam) và ngày càng trở nên nghiêm trọng [14-16]. Nhiều chương trình phòng kháng dịch hại trong nông nghiệp và y tế của các tổ chức quốc tế và khu vực, dựa chủ yếu vào thuốc hóa học đã bị thất bại. Tổ chức Nông lương thế giới (FAO), Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã thành lập một mạng lưới nghiên cứu tính kháng thuốc của dịch hại và biện pháp khắc phục [17].

Ở Việt nam đã xuất hiện nhiều côn trùng kháng thuốc BVTV như sâu tơ hại rau *Plutella xylostella* [18]; rầy nâu hại lúa *Nilaparvata lugens* ở nhiều vùng trên phạm vi cả nước [19]; rầy xanh hai chấm hại bông [20]; một số dòng một *Tribolium castaneum* và *Rhizopertha dominica* kháng cả Phosphin và DDVP [21]...

Trong số các loại thuốc BVTV đã bị kháng bởi các côn trùng trên phải kể đến thuốc trừ sâu vi sinh *Bacillus thuringiensis* (Bt) và thuốc trừ rầy Imidacloprid.

### **1.1.3. Giới thiệu về thuốc trừ sâu Bt và thuốc trừ rầy Imidacloprid**

#### **1.1.3.1. Thuốc trừ sâu Bt**

##### *a. Giới thiệu chung*

Bt là thuốc trừ sâu sinh học chứa vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*, đã được sử dụng tại Việt Nam từ những năm 70 của thế kỷ trước. Tinh thể độc chủ yếu của Bt (nội độc tố  $\delta$ -endotoxin) chiếm 30% trọng lượng khô của tế bào, có độc tính cao với rất nhiều loại côn trùng. Độc tố này là những hợp chất đạm cao phân tử, có trọng lượng phân tử là 5000 đơn vị. Chúng không bền trong môi trường acid mạnh hoặc môi trường kiềm có độ pH  $\geq 10$  và dưới tác động của một số loại enzym. Các độc tố không tan trong nước và trong nhiều dung môi hữu cơ, tan trong dịch ruột của ấu trùng sâu cánh vẩy, bền ở nhiệt độ cao. Trong quá trình bảo quản, tinh thể độc sẽ bị biến dạng hoặc phân huỷ dưới tác dụng của tia tử ngoại làm cho thuốc Bt mất hoạt tính.

Bt là thuốc trừ sâu có tác dụng vị độc, không có hiệu lực tiếp xúc và xông hơi. Trong ruột, các đạm tinh thể với khối lượng phân tử lớn bị bẻ gãy bởi dịch kiềm và các enzym tiêu hóa thành phân tử nhỏ có hoạt tính như tiền độc tố. Chúng bám vào màng vi mao trong ruột, phá hoại các nếp nhăn của ruột giữa, tạo ra các lỗ rò để cho nước chảy vào, làm sâu mọng nước, ngừng ăn và chết. Vi khuẩn Bt còn gây cho côn trùng tính chán ăn hay ngừng ăn. Vì vậy, tuy hiệu lực diệt sâu của thuốc chậm nhưng ngay sau khi phun thuốc, sâu đã ngừng gây hại.

Thuốc trừ sâu Bt ít độc đối với người và động vật máu nóng, không độc với cá và ong (LD<sub>50</sub> > 5000mg/kg với chuột), có khả năng phân hủy sinh học và ít để lại dư lượng trong nông sản. Vì vậy có thể dùng Bt trong các lĩnh vực khác nhau mà không gây ảnh hưởng đến cộng đồng và môi trường. Hiện nay sản phẩm chiếm hơn 90% thị phần thuốc trừ sâu sinh học trên thế giới, được khuyến cáo sử dụng trong các lĩnh vực làm vườn, trồng rau màu, cây ăn quả... Trong lĩnh vực sản xuất rau sạch, thuốc Bt dùng để trừ các loài sâu hại như: sâu tơ, sâu ăn tạp, sâu xanh da láng, sâu khoang,... trên rau cải, cà chua, dưa leo, đậu cô ve, hành; sâu đục hoa, đục quả trên đậu xanh, đậu nành, lạc; sâu đo, sâu loang, sâu hồng... trên thuốc lá, bông vải...

Hiện nay tại Việt Nam, các loại sản phẩm thương mại chứa Bt có trên thị trường khá nhiều như Vi-BT 32000WP, 16000WP; BT Xentary 35WDG, Firibiotox (dạng bột và dịch cô đặc)...Trong danh mục thuốc BVTV được phép lưu hành tại Việt Nam năm 2004 mới có 18 sản phẩm, đến năm năm 2013 đã tăng lên 38 sản phẩm đăng ký liên quan đến thuốc trừ sâu Bt.

Tuy nhiên, do thuốc Bt đã được sử dụng trong thời gian dài nên đã bị giảm hiệu lực trên các đối tượng côn trùng dễ kháng trong thời gian gần đây, trong đó sâu tơ hại rau *Plutella xylostella* là điển hình.

#### *b. Tính kháng thuốc của sâu tơ đối với thuốc trừ sâu Bt*

Sâu tơ(*Plutella xylostella*) là một trong những loài côn trùng gây hại chủ yếu trên rau họ thập tự và có khả năng kháng thuốc mạnh nếu loại thuốc đó được sử dụng liên tục [22].

Trên thế giới, sâu tơ đã kháng thuốc Bt từ những năm 1990 tại Mỹ sau 3 năm sử dụng. Sau đó, sâu tơ kháng Bt được phát hiện tại Nhật Bản, Trung Quốc, Philippines, Malaysia và Thái Lan [23]. Đến nay, đã có 13 loài côn trùng có khả năng kháng thuốc Bt như sâu đục thân bắp cải *Ostrinia nubilalis*, sâu xanh hại rau *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, sâu đục quả hồng *Pectinophora gossypiella* ...[24].

Tại Việt Nam, kết quả nghiên cứu của Viện Bảo vệ thực vật [25] trong giai đoạn 1996 - 2000 cho thấy sâu tơ vùng ngoại thành Hà Nội đã kháng Bt. Chỉ số Ri kháng thuốc Bt có tăng từ 8,5 lên 13,8-18,2 trong giai đoạn 1996 - 2000 và 2005 - 2010 (với chủng sâu tơ Phú Diễn, Từ Liêm, Hà Nội)

#### *c. Cơ chế kháng Bt*

Hầu hết nghiên cứu trên thế giới đều nhận xét: cơ chế kháng các độc tố *Bt* của côn trùng đều liên quan đến phương thức tác động của thuốc Bt [26, 27]. Như đã trình bày, các protoxin *Bt* được kích hoạt bởi protease trong ruột giữa côn trùng, sau đó liên kết với các thụ cảm trên tế bào biểu mô dẫn đến côn trùng chết. Cơ chế tác động này rất phức tạp và đa dạng, phụ thuộc vào loại côn trùng và chủng Bt. Cơ chế kháng thuốc cũng phức tạp không kém. Vì vậy trong thực tế,



chỉ một số côn trùng có số đông quần thể đã kháng thuốc được lựa chọn để nghiên cứu.

Khi nghiên cứu sự phát triển sức đề kháng của loài sâu đo hại bắp cải đối với Bt, Krishna Ramanujan và cộng sự [27] đã phát hiện sự kháng thuốc thông qua một cơ chế di truyền làm thay đổi cơ quan thụ cảm độc tố trong ruột côn trùng. Chúng thuộc loại các enzym tiêu hóa là aminopeptidase N (APN). Bình thường, tinh thể độc của Bt Cry1Ac liên kết với enzym APN1 dọc theo thành ruột của côn trùng, phá hủy niêm mạc ruột. Nhưng khi côn trùng phát triển sức đề kháng, APN1 giảm đáng kể trong khi một enzym khác là APN6 không gắn kết với Bt lại tăng đáng kể, cho phép các côn trùng tiêu hóa thức ăn và Bt mà không gây hại. Để bù đắp cho sự thiếu hụt của enzym APN1, hoạt tính của enzym APN6 tăng cao, cho phép các côn trùng tiêu hóa bình thường mà không bị ảnh hưởng của thuốc Bt.

Trước đó, các nghiên cứu về tính kháng thuốc Bt của sâu xanh da láng hại rau *Spodoptera exigua* và một số loài khác cũng cho thấy tầm quan trọng của các enzym APN trong cơ chế tác động của độc tố Bt [28].

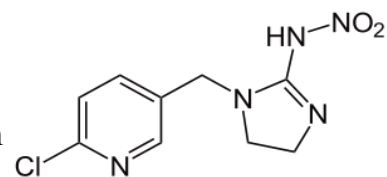
Những kết quả nghiên cứu trên cho thấy việc thiếu vắng các biểu hiện của enzym APN1 đóng vai trò chính trong sự kháng các độc tố có trong thuốc trừ sâu Bt của một số sâu như sâu tơ, sâu keo, sâu xanh hại rau.

### **1.1.3.2. Thuốc trừ rầy Imidacloprid**

#### **a. Giới thiệu chung**

Imidacloprid là tên thương mại của hợp chất

(E)-1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine, là thuốc trừ sâu thế hệ mới thuộc nhóm neonicotinoid, tác động đến côn trùng bằng con đường tiếp xúc và vị độc. Hoạt chất ở dạng rắn có mùi đặc trưng



Imidacloprid

điểm nóng chảy 114 °C, ít bay hơi (áp suất hơi 1,00 x 10<sup>-7</sup> mmHg ở 20°C), tan nhiều trong các dung môi hữu cơ nhưng tan ít trong nước (514 mg/L ở 20°C và pH 7). Imidacloprid có độ độc nhóm II (LD<sub>50</sub> cấp tính qua miệng với chuột 450

mg/kg), ít độc với động vật máu nóng và thủy sinh vì trong cơ thể dễ bị phân hủy thủy phân, sau đó bị thải qua đường bài tiết).

Imidacloprid là thuốc trừ sâu nội hấp (lưu dẫn), tác động lên hệ thần kinh trung ương thông qua gắn kết với các thụ quan nicotinic sau khớp thần kinh, tác động xấu đến các sinap trong hệ thần kinh trung ương, dẫn đến côn trùng bị tê liệt và chết. Imidacloprid có phổ tác động rộng, trừ được nhiều loại côn trùng gây hại trong nông nghiệp và y tế, trong đó đặc trị nhóm trích hút (rầy, bọ trĩ, rệp...). Vì vậy, thuốc được sử dụng nhiều để trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.).

Cũng như thuốc Bt, sau một thời gian sử dụng, Imidacloprid đã giảm đáng kể hiệu lực trừ rầy của thuốc trên phạm vi cả nước [29].

#### *b. Tính kháng thuốc của rầy nâu đối với Imidacloprid*

Rầy nâu được đánh giá là một trong những dịch hại quan trọng nhất trên cây lúa hiện nay không chỉ ở Việt Nam mà còn ở khắp các vùng trồng lúa trên thế giới. Rầy nâu không chỉ gây hại trực tiếp bằng cách chích hút dịch cây lúa làm cản trở quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lúa mà nguy hại hơn, chúng còn là tác nhân môi giới lây truyền các loại virus rất nguy hiểm trên cây lúa, trong đó hiện nay là virus vàng lùn, lùn xoắn lá.

Để phòng trừ rầy nâu hiện nay, biện pháp chính vẫn là sử dụng thuốc trừ sâu hóa học. Tuy nhiên, quá lạm dụng thuốc hóa học đã mang lại những hậu quả không mong muốn, đặc biệt gây hiện tượng kháng thuốc của rầy nâu. Tính kháng thuốc của rầy nâu đã được nhiều nước ở châu Á nghiên cứu, nhiều nhất là Nhật Bản. Đối với các nước nhiệt đới, đến những năm 80 của thế kỷ trước đã có nhiều tài liệu thông báo rầy nâu kháng một số thuốc thuộc nhóm phospho hữu cơ (Monocrotophos, Methamidophos...), carbamat (Carbaryl, Fenobucarb...).

Imidacloprid là thuốc trừ rầy được sử dụng thương mại lần đầu tiên năm 1991 và kể từ đó tới nay được sử dụng rộng rãi để phòng trừ côn trùng nông nghiệp và y tế. Đầu năm 2000, Imidacloprid vẫn được đánh giá tốt về khả năng kiểm soát rầy nâu trên đồng ruộng và chưa có dấu hiệu rõ ràng tạo tính kháng trong quần thể nghiên cứu [29]. Sự suy giảm tính mẫn cảm đối với Imidacloprid

lần đầu tiên được phát hiện ở Thái Lan năm 2003, sau đó nhanh chóng được phát hiện ở các nước châu Á khác như Trung Quốc, Nhật Bản và Việt Nam [30]. Đến năm 2004 các quần thể rầy thu thập trên đồng ruộng ở Trung Quốc đã phát triển tính kháng lên gấp 250 lần sau 37 thế hệ được chọn lọc trong phòng thí nghiệm [30]. Theo nhiều tác giả, từ những năm 1992 đến năm 2003 giá trị  $LD_{50}$  của Imidacloprid với rầy nâu ở một số tỉnh thuộc Việt Nam, Nhật Bản, Trung Quốc chỉ dao động từ 0,09 - 2,0 nhưng cho đến năm 2006 đã tăng trong khoảng 0,43 – 2,42 và cao nhất là Việt Nam với giá trị  $LD_{50}$  ở Tiền Giang là 1,63 – 2,42 [31].

Một số nghiên cứu về tính kháng thuốc của rầy nâu ở Việt Nam:

Theo Nguyễn Thị Me và cộng sự [32] các thuốc trừ sâu trong nhóm lân hữu cơ, carbamat có  $LD_{50}$  của các sản phẩm đều cao hơn so với những năm trước. Thuốc Ethofenprox (nhóm pyrethroid) cũng đã bị giảm hiệu lực với rầy nâu khi chỉ số  $LD_{50}$  biến động từ 1,74 - 9,17 $\mu$ g/g.

Vụ hè thu năm 2005 - 2006, nhận xét về tình hình rầy nâu và các thuốc trừ rầy ở Đồng bằng sông Cửu Long, Lương Minh Châu [33], Nguyễn Thị Lan [31] cho biết, các thuốc trừ rầy như Imidacloprid 10WP và 700WG, Buprofezin 10WP, Fipronil 5SC, Etofenprox 10EC chỉ có hiệu lực khi sử dụng ở liều lượng cao hơn liều lượng đã được khuyến cáo.

Tương tự, Lê Thị Kim Oanh và cộng sự [34] đã tiến hành nghiên cứu tính kháng thuốc trừ rầy nâu tại các tỉnh đồng bằng sông Hồng và Đông Bắc bộ từ 2008 – 2010 cho thấy có 4/7 quần thể rầy nâu đã kháng cao với Imidacloprid (chỉ số kháng 20,00 – 98,52). Các quần thể rầy nâu đều gia tăng mức độ kháng thuốc qua các năm. Mức độ gia tăng tính kháng với Imidacloprid là 4,12 lần [19]. Các báo cáo khảo sát ở vùng đồng bằng sông Hồng và các tỉnh phía Bắc của một số tác giả khác cũng cho thấy các hoạt chất trên đều đã giảm hiệu lực (thông qua giá trị  $LD_{50}$ ) và bị rầy nâu kháng ở các mức độ khác nhau (thông qua chỉ số Ri) [23,35,36].

### *c. Cơ chế kháng thuốc Imidacloprid của rầy nâu*

Cơ chế kháng thuốc của rầy nâu, rầy lưng trắng đối với Imidacloprid đã được nghiên cứu nhiều ở Trung Quốc. Kết quả cho thấy mức độ kháng tăng

11,25 lần qua 12 thế hệ và tỷ lệ kháng đạt 71,83%. Các dòng rầy kháng thuốc biểu hiện rõ rệt tính kháng chéo với các thuốc thử nghiệm có cơ chế tác động đến cơ quan cảm thụ acetylcholine [37].

Rầy nâu có nguy cơ kháng cao với hoạt chất thuốc Imidacloprid, nhưng tính miễn cảm của rầy đối với nhóm thuốc này được phục hồi nhanh chóng khi rầy không tiếp xúc với thuốc một thời gian ngắn. Năm 2003, Zewen L và cộng sự [29] đã nghiên cứu cơ chế kháng rầy *Nilaparvata lugens* Stål trong phòng thí nghiệm với các thuốc trừ rầy khác nhau. Tác giả kết luận enzym esterase và glutathione S-transferase có vai trò yếu trong việc giải độc Imidacloprid. Chính sự gia tăng giải độc của enzym P450-monooxygenases là cơ chế kháng Imidacloprid của rầy nâu. Vì vậy, hạn chế hoặc kìm hãm hoạt động của enzym này có thể giúp loại bỏ hoặc kiềm chế tính kháng thuốc của rầy đối với Imidacloprid [29],[38].

Gần đây nhất, năm 2016, sau khi khảo sát các quần thể rầy nâu kháng Imidacloprid ở Trung Quốc, Thái Lan và Việt Nam, tác giả Haibo Bao và cộng sự [39] đã công bố kết quả nghiên cứu về cơ chế kháng thông qua các thí nghiệm sinh học. Trong đó, kỹ thuật RNAi và sự chuyển hóa của Imidacloprid trong cơ thể rầy được sử dụng để đánh giá tầm quan trọng của các enzym cytochrom P450 trong việc kháng Imidacloprid. Theo tác giả, có 2 gen của P450 là CYP6AY1 và CYP6ER1 đều trên mức biểu hiện trong ba quần thể rầy, trong đó tỷ lệ cao nhất là 13,2 lần của gen CYP6ER1 đối với quần thể ở Thành phố Hồ Chí Minh. Như vậy, cơ chế kháng thuốc chủ yếu của quần thể rầy nâu ở Việt Nam cũng do mức biểu hiện gia tăng của enzym cytochrom P450 monooxygenases trong cơ thể côn trùng.

#### **1.1.4. Các biện pháp nâng cao hiệu lực của thuốc trừ sâu**

Để khắc phục hiện tượng suy giảm hiệu lực của các thuốc trừ sâu nêu trên, cần áp dụng các biện pháp cơ bản nhằm hạn chế tính kháng thuốc của côn trùng gây hại đối với chúng. Một số biện pháp thường được sử dụng như sau:

1) Hạn chế sử dụng các hoạt chất mà quần thể côn trùng đã có biểu hiện kháng thuốc ở các địa phương.

2) Dùng luân phiên các loại thuốc BVTV, không sử dụng đơn lẻ một hoạt chất lặp lại nhiều lần trong một vụ và liên tục trong nhiều năm. Khi luân phiên, nên dùng các loại thuốc thuộc các nhóm có cơ chế tác động khác nhau.

3) Sử dụng thuốc BVTV đúng kỹ thuật: cần sử dụng hợp lý và có chọn lọc các thuốc hóa học (chỉ sử dụng khi cần và phải an toàn với thiên địch); sử dụng theo nguyên tắc 4 đúng (đúng chủng loại; đúng liều lượng và nồng độ; đúng lúc, đúng cách). Muốn sử dụng thuốc BVTV đúng kỹ thuật, cần nắm rõ đặc điểm, tính năng, độ độc, thời gian cách ly v.v...). Ngoài ra có thể điều chỉnh cách sử dụng để nâng cao hiệu quả.

4) Hỗn hợp các thuốc BVTV trong sản xuất hoặc khi sử dụng: Đây là biện pháp được sử dụng nhiều nhất hiện nay vì chỉ cần đầu tư công nghệ gia công hỗn hợp phù hợp hoặc có thể hỗn hợp ngay khi phun. Mục đích của hỗn hợp thuốc chủ yếu là để mở rộng phổ tác dụng, tăng hiệu lực phòng trừ. Việc hỗn hợp thuốc sẽ giảm được số lần phun thuốc mà hiệu quả phòng trừ dịch hại vẫn cao.

Cần lưu ý khả năng tương hợp của các loại thuốc khi hỗn hợp vì nếu không sẽ ảnh hưởng đến lý tính của thuốc hoặc có thể xảy ra phản ứng hoá học giữa chúng với nhau, làm mất hiệu lực của thuốc hoặc gây độc cho cây. Khi hỗn hợp cần đảm bảo các nguyên tắc: Chỉ nên hỗn hợp những loại thuốc có đối tượng phòng trừ hoặc cách tác động khác nhau để mở rộng phổ tác dụng và bổ sung hiệu lực cho nhau. Nếu pha chung 2 loại thuốc để trừ 2 nhóm đối tượng khác nhau (thuốc trừ sâu và thuốc trừ bệnh) thì phải giữ nguyên nồng độ mỗi loại thuốc như khi dùng riêng.

Một số ví dụ hỗn hợp thuốc trừ sâu Bt và thuốc trừ rầy Imidacloprid hay sử dụng nhằm khắc phục sự suy giảm hiệu lực:

- Đối với thuốc trừ sâu Bt:

Thực chất đây là giải pháp ngắt quãng thời gian tiếp xúc với thuốc Bt nhằm giảm tốc độ hình thành nòi sinh học mới có khả năng kháng thuốc của sâu tơ hại rau. Trong Danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng ở Việt Nam năm 2015, có một số sản phẩm hỗn hợp như: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* với Granulosis virus (thuốc có gốc virus); *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* với

Spinosad (thuốc có nguồn gốc vi khuẩn); *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki với Nereistoxin (thuốc hóa học) hay hỗn hợp giữa thuốc vi sinh Bt và thuốc thảo mộc Azadirachtin có trong cây neem Ấn Độ có tác dụng hiệp đồng, làm tăng hiệu quả phòng trừ của sản phẩm so với sử dụng đơn chất ...[5]

Ngoài ra, nên sử dụng luân phiên các chủng Btkhác nhau như: *Bacillus thuringiensis* var. aizawai kiểu serotype (hoạt chất ở dạng bào tử và tinh thể), dùng trừ ấu trùng một hại kho tàng; *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (dạng tinh thể  $\delta$ -endotoxin), *Bacillus thuringiensis* var. Morrisoni (dạng bào tử và tinh thể  $\gamma$ -endotoxin)

- Đối với thuốc trừ rầy Imidacloprid:

Trong Danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng ở Việt Nam năm 2015, đã có nhiều sản phẩm hỗn hợp giữa Imidacloprid với các thuốc khác được đăng ký để phòng trừ rầy nâu hại lúa như: hỗn hợp 2 hoạt chất Imidacloprid với Fipronil; Isoprocarb, Pirimicarb, Profenofos, Pymetrozine, Thiosultap-sodium (Nereistoxin)... hoặc 3 hoạt chất giữa Imidacloprid với Fipronil và Thiamethoxam, hoặc với Buprofezin và Chlorpyrifos Ethyl ...[5].

5) Sử dụng các chất hiệp đồng, chất phá vỡ tính kháng thuốc (resistance breaker), chất phản chống chịu (anti-resistance) hỗn hợp với các thuốc BVTV. Những chất này khi hỗn hợp với các thuốc đã bị dịch hại kháng có thể khôi phục lại hiệu lực của thuốc.

6)Biện pháp thích hợp và lâu dài là xây dựng chiến lược phòng trừ dịch hại tổng hợp(IPM) nhằm giảm sức ép chọn lọc của thuốc BVTV, trên cơ sở hiểu biết đặc điểm sinh vật học, sinh thái học cũng như mối quan hệ của dịch hại với các loài sinh vật khác trong quần thể và bản chất kháng thuốc của dịch hại.

Trong số các biện pháp nêu trên, biện pháp hỗn hợp thuốc trừ sâu với các chất hiệp đồng mang lại hiệu quả cao nhất nên đang được nghiên cứu áp dụng trong canh tác nông nghiệp hiện đại.

## **1.2. CÁC CHẤT HIỆP ĐỒNG VÀ ỨNG DỤNG LÀM TĂNG HIỆU LỰC SINH HỌC CHO THUỐC TRỪ SÂU**

### **1.2.1. Tổng quan về các chất hiệp đồng**

#### ***1.2.1.1. Khái niệm***

Các chất hiệp đồng là những hợp chất hóa học có hoặc không có hoạt tính độc với sâu bệnh, nhưng khi kết hợp với hoạt chất BVTV sẽ làm thay đổi quá trình chuyển hóa trong cơ thể côn trùng nhằm tăng độc tính của thuốc đối với côn trùng đó. Hiện tượng đó gọi là hiện tượng hiệp đồng [1].

Sử dụng các chất hiệp đồng trong gia công hỗn hợp thuốc BVTV là biện pháp mang lại hiệu quả kinh tế - xã hội to lớn. Sự có mặt của các chất hiệp đồng trong thành phần hỗn hợp của thuốc khả năng kháng thuốc của sâu bệnh, thậm chí, tăng độ độc của hoạt chất lên nhiều lần, do vậy liều lượng sử dụng của hoạt chất giảm đáng kể. Kết quả vừa có ý nghĩa về kinh tế, vừa giảm thiểu ô nhiễm môi trường [38].

#### ***1.2.1.2. Cơ chế tác động của các chất hiệp đồng***

Hiện tượng hiệp đồng được khám phá cách đây hơn 60 năm và số lượng các chất được sử dụng như những hiệp đồng cho đến nay đã lên đến hàng nghìn nhưng cơ chế tác động vẫn chưa rõ ràng. Việc nghiên cứu cơ chế tác động còn gặp nhiều khó khăn vì quá trình chuyển hóa trong cơ thể côn trùng rất phức tạp. Gần đây, nhu cầu sử dụng các chất hiệp đồng tăng, nhiều thiết bị nghiên cứu hiện đại, cùng nhiều phương pháp nghiên cứu tiên tiến ra đời, nên có nhiều công trình nghiên cứu cơ chế tác động của các chất hiệp đồng được công bố.

Cơ chế tác động của các chất hiệp đồng có thể được giải thích theo nhiều cách:

a. Cơ chế sinh học hoặc cơ chế chuyển hóa (metabolic mechanism): Các chất hiệp đồng tác động lên hệ thống các enzym giải độc của côn trùng. Chúng tác động thông qua sự hình thành phức chất trung gian với enzym cytochrome P-450 dependent polysubstrate monooxygenases (PSMOs), ngăn chặn liên kết của thuốc trừ sâu với enzym, một bước cần thiết sau đó cho quá trình giải độc. Hệ quả là côn trùng vẫn bị trúng độc, không gây ra sự kháng thuốc.

Trong số các chất hiệp đồng có cơ chế tác động lên hệ enzym giải độc, phần lớn chúng tác động lên enzym PSMOs. Gần đây, các chất kìm hãm enzym hydrolase, esterase và transferase cũng được quan tâm. Bảng 1.1 liệt kê một số chất hiệp đồng có cơ chế kìm hãm enzym giải độc thuốc trừ sâu tương ứng [41].

**Bảng 1.1. Các chất hiệp đồng và cơ chế kìm hãm sự giải độc tương ứng [41]**

<b>Chất hiệp đồng</b>	<b>Enzym giải độc bị kìm hãm</b>	<b>Thuốc trừ sâu</b>
PBO Sesamex Sulfoxide Dillapiol Sesamine	PSMOs I (Polysubstrate monooxygenase)	Carbaryl Methomyl Fenvalerate Permethrin Dimethoate
DEF, TPP IBP, PSCP	Carboxylesterase Hydrolases	Malathion Permethrin
CH <sub>3</sub> I f-Phenylbutenone DEM	Transferase (glutathione S-transferase)	Parathion Malathion Dimethoate

*Chú thích:* DEF: S,S,S-tributyl phosphorotrithioat; DEM: diethylmaleat;

DMC: chlorfenethol; IBP: 5-benzyl-O,O-diisopryl phosphorothioat;

PSCP: phenylsaligenin cyclic phosphat;

TPP: O,O,O-triphenyl-phosphat

- Phương thức tác động của các enzym giải độc: Theo cơ chế chuyển hóa, khi phân tử thuốc trừ sâu xâm nhập vào cơ thể côn trùng, dưới tác dụng của các enzym khác nhau sẽ bị phân giải theo nhiều con đường khác nhau như: oxy hóa, thủy phân, hydro hóa, khử clo, alkyl hóa... trở thành chất không độc [42].

Trong độc học côn trùng, 3 nhóm enzym chính tham gia vào quá trình giải độc các loại thuốc trừ sâu gồm: enzym cytochrome P450 mono-oxygenases; enzym esterases và enzym transferases.

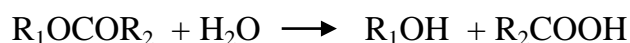
+ *Enzym cytochrome P450 mono-oxygenases (CYP)*: Là nhóm enzym lớn và đa dạng, có chức năng đặc biệt là xúc tác quá trình oxy hóa các hợp chất hữu cơ. Phản ứng giải độc thường gặp nhất được xúc tác bởi enzym CYP là các chất nền hữu cơ (RH) bị oxy hóa thành rượu:





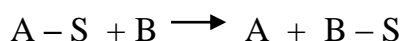
Các sản phẩm rượu thu được dễ dàng bị loại bỏ hoặc bị bài tiết khỏi cơ thể. Các enzyme CYP đóng vai trò quan trọng trong khả năng thích nghi với chất độc của côn trùng. Sự gia tăng biểu hiện của CYP liên quan chặt chẽ với sự kháng thuốc của côn trùng.

+ *Enzym esterases*: Cũng là dãy enzym lớn thuộc nhóm *hydrolases*, có nhiệm vụ thủy phân este thành acid và rượu:



Trong số nhóm các esterases, có nhiều enzym có tác dụng kìm hãm hoặc có khả năng thủy phân, giải độc nhiều loại thuốc trừ sâu chứa liên kết este, đặc biệt đối với dãy phospho hữu cơ và carbamat.

+ *Enzym transferases*: Các enzym *Glutathione S-transferases (GST)* xúc tác cho phản ứng giải độc của các hợp chất ái điện tử (B trong sơ đồ dưới) như chất gây ung thư, các gốc tự do, thuốc BVTV... Phản ứng dựa trên sự dịch chuyển và gắn nguyên tử S của hợp phần glutathion vào chất độc B, tạo thành hợp chất ít độc hoặc không độc:



GST thuộc enzym có thể giải độc chất nội sinh và các chất xenobiotic của thuốc trừ sâu thuộc nhóm pyrethroid, lân hữu cơ, DDT và carbamate [43].

Như vậy, khi côn trùng tiếp xúc với thuốc độc, vai trò của các enzym giải độc có trong cơ thể côn trùng là tham gia vào các phản ứng chuyển hóa các chất độc thành không độc hoặc không ảnh hưởng tới côn trùng. Các chất hiệp đồng có tác dụng kìm hãm hoạt tính của các enzym giải độc, làm cho các thuốc độc không bị mất hoạt tính đối với côn trùng gây hại.

b. Cơ chế hóa học: Cấu trúc hóa học của các chất hiệp đồng dự trữ một năng lượng liên kết dư, có khả năng tham gia vào hiện tượng cộng hưởng năng lượng với cấu trúc hóa học của các thuốc BVTV, làm tăng độc tính của chất độc hoặc làm giảm sự phân hủy của hoạt chất trong cơ thể côn trùng.

c. Cơ chế lý hóa: Các chất hiệp đồng có thể làm tăng quá trình xâm nhập các chất độc vào cơ thể côn trùng hoặc làm giảm quá trình đào thải chất độc khỏi cơ thể chúng.

Trong số các cơ chế nêu trên, cơ chế sinh học là cơ chế chính, giải thích kỹ bản chất của hiện tượng hiệp đồng nên được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu từ nhiều năm nay. Dựa vào các cơ chế trên, chất hiệp đồng khi xâm nhập vào cơ thể côn trùng có tác dụng [40]:

- Ức chế hoạt động của các enzym gây kháng thuốc, hạn chế côn trùng giải độc, thuốc không bị giảm hiệu lực;

- Kìm hãm quá trình chuyển hóa, vận chuyển các chất cần thiết nuôi dưỡng cơ thể côn trùng như oxy, glucose ...;

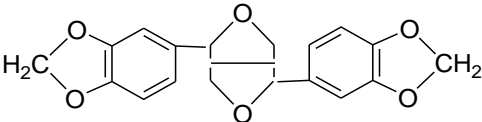
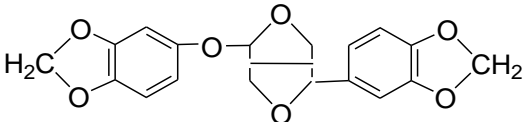
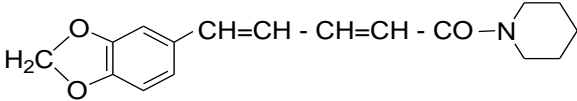
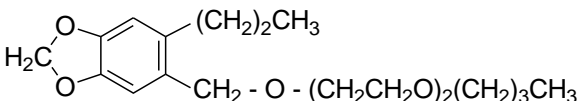
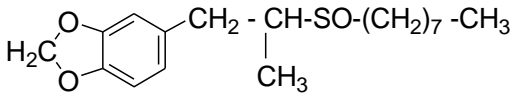
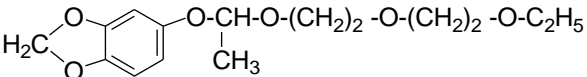
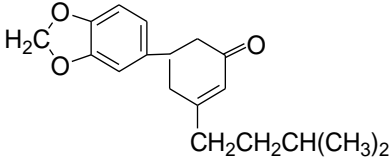
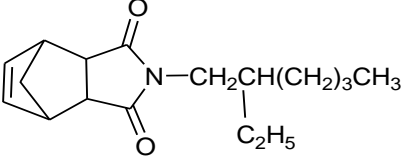
- Xúc tác cho quá trình phản ứng giữa thuốc với enzym (như cholinesterase), ức chế hoạt động của các enzym này, ngăn khả năng cảm thụ của các tế bào thần kinh, làm ngưng trệ hoạt động chức năng của các cơ quan côn trùng. Sự ngộ độc xảy ra nhanh hơn.

### ***1.2.1.3. Phân loại các chất hiệp đồng***

Có nhiều cách phân loại các chất hiệp đồng, trong đó phân loại theo cơ chế tác động lên các enzym giải độc tỏ ra chính xác nhất. Tuy nhiên, phân loại theo nguồn gốc tạo thành chất hiệp đồng là đơn giản nhất.

Các chất hiệp đồng đầu tiên được tách chiết từ dầu thực vật, sau đó, dựa vào cấu trúc hóa học của các chất này, các nhà khoa học tìm cách tổng hợp các chất tương tự. Nhiều chất hiệp đồng tổng hợp được ứng dụng trong thực tế. Một số chất hiệp đồng phổ biến, nhiều ứng dụng được trình bày tại bảng 1.2.

Bảng 1.2. Một số chất hiệp đồng sử dụng phổ biến hiện nay

TT	Tên thương mại	Công thức cấu tạo	Hỗn hợp với thuốc BVTV
<b>A. Các chất hiệp đồng có nguồn gốc tự nhiên</b>			
1	Sesamin (Từ dầu vừng)		Pyrethrin và pyrethroid
2	Sesamolin (Từ dầu vừng)		Pyrethrin và pyrethroid
3	Piperin (Từ dầu hạt tiêu)		Pyrethroid
4	Acid oleic, linoleic và dẫn xuất từ dầu thực vật	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Pyrethroid, carbamates ...
<b>B. Các chất hiệp đồng có nguồn gốc tổng hợp</b>			
5	Piperonyl butoxide (PBO)		Carbamates lân hữu cơ, pyrethroid ...
6	Sulfoxide		Pyrethroid, carbamates
7	Sesamex		Pyrethrin & pyrethroid
8	Piperonyl cyclonene		Thuốc trừ sâu tự nhiên hoặc tổng hợp
9	MGK 264 (Octacide)		Pyrethroid

Hiện nay, do môi trường bị ô nhiễm ngày càng trầm trọng, cùng với xu hướng phát triển nền nông nghiệp bền vững, các chất hiệp đồng có nguồn gốc tự nhiên ngày càng được quan tâm nghiên cứu và sử dụng.

### **1.2.2. Ứng dụng của các chất hiệp đồng làm tăng hiệu lực của thuốc trừ sâu**

Lần đầu tiên, chất hiệp đồng được dùng để ổn định và tăng hiệu quả cho pyrethrum được tách từ hoa cúc *Chrysanthemum* ở Kenya để diệt ruồi, muỗi và các côn trùng gây hại khác. Từ đó đến nay, nhiều chất hiệp đồng được ứng dụng để gia công thuốc BVTV, nhất là các chất hiệp đồng có nguồn gốc tự nhiên như: khoáng vô cơ, các acid béo có trong các dầu động, thực vật chiếm vị trí quan trọng nhất.

Các chất hiệp đồng ít độc hại cho người và môi trường nên được sử dụng nhiều trong phòng trừ côn trùng y tế (ruồi, muỗi, gián, kiến...), sản xuất các sản phẩm nông nghiệp sạch (rau màu, cây ăn quả, xuất khẩu) và bảo quản nông sản.

Ngoài các hợp chất có nguồn gốc từ dầu động, thực vật sẵn có, còn nhiều chất khác có nguồn gốc tự nhiên cũng được sử dụng làm chất hiệp đồng. Hợp chất avidin trong lòng trắng trứng có tác dụng hiệp đồng với Bt hoặc Abamectin diệt sâu tơ hại rau [44]. Acid kojic [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-pyrone], sản phẩm phụ của quá trình lên men lúa mạch, sản xuất rượu sake được sử dụng làm chất hiệp đồng có thể thay thế piperonyl butoxide cho một số thuốc trừ sâu pyrethroid và carbamat [45]...

### **1.2.3. Các chất hiệp đồng trên cơ sở dầu thực vật**

Trong các nguồn nguyên liệu tự nhiên sẵn có thì dầu thực vật được quan tâm nhiều do lượng nguyên liệu lớn, đa dạng về chủng loại và phù hợp với nhiều loại thuốc trừ côn trùng trong nông nghiệp và y tế (ruồi, muỗi, gián...). Do vậy, nhiều dầu thực vật và các chất từ dầu thực vật được sử dụng để sản xuất các chất hiệp đồng. Các dầu thực vật được quan tâm nhiều gồm: dầu đậu nành, dầu thầu dầu, dầu họ cam chanh, hương nhu, dầu quế, dầu vừng, dầu hạt sỏ, dầu hạt tiêu...

Ngay từ năm 1940, Craig Eagleson và Fruidade Tex [46] đã nhận thấy hoạt tính của pyrethrin tăng đáng kể khi thêm dầu vừng (sesame oil). Từ đó, tác giả đã đã tách được sesamin và sesamolin trong dầu vừng. Mặc dù sesamin và

sesamol in đều không có tác dụng trừ sâu, nhưng khi hỗn hợp với pyrethrin, hoạt tính trừ sâu của pyrethrin tăng lên 2 - 5 lần. Sau đó, Beroza [47] xác định sesamex có tác dụng hiệp đồng đối với pyrethrin và pyrethroid. Sản phẩm được điều chế từ phản ứng ngưng tụ sesamol với vinyl ethyl ete của ethylene glycol và được hãng Shulton Inc. đăng ký dưới tên thương mại là *Sesoxane*.

- Năm 2003, David Keen và Stuart, Fl. [48] giới thiệu hỗn hợp dầu cá mòi cùng dầu vừng kết hợp với các thuốc trừ sâu, trừ bệnh khác để trừ dịch hại như nhện đỏ, tuyến trùng đất, rệp,... trên cam rất hiệu quả.

- Puritch, George và cộng sự [49] dùng dung dịch 50% muối kali của 2 acid béo không no C<sub>18</sub> có trong dầu thực vật hỗn hợp với 0,2 - 2% các thuốc trừ sâu pyrethroid như fevalerate, permethrin, cypermethrin để gia công sản phẩm trừ sâu an toàn với môi trường có phổ tác động rộng, phòng trừ các côn trùng bộ cánh đều (Homoptera), cánh cứng (Coleoptera), cánh vảy (Lepidoptera). Hỗn hợp muối của acid oleic và linoleic đóng vai trò như chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu pyrethroid.

- Các dầu thực vật như dầu neem, dầu vừng, dầu thầu dầu và dầu đậu nành đã được M Khalequzaman và Farhana Diba Clowdhury [50] nghiên cứu sử dụng làm chất hiệp đồng, hỗn hợp gia công theo tỷ lệ 1/1 với Pirimiphos-methyl để trừ một gạo *Tribolium castaneum* (Herbst). Kết quả cho thấy các loại dầu này có tác dụng hiệp đồng với tỷ số hiệp đồng cao nhất (synergism ratio) là 1:10. Có thể những dầu thực vật này có dụng làm tăng tốc độ thẩm thấu hoạt chất vào cơ thể côn trùng [51].

- Steven M. Bessette và cộng sự [52] đã dùng tinh dầu và các chất thảo mộc như carvacol, thymol, dầu húng (thyme oil), citronellal, eugenol,  $\alpha$ -terpineol, methyl salicylat, phenetyl propionat, alcol cinamic... trong phòng trừ côn trùng y tế (gián, ruồi, muỗi...).

- Năm 2012, Vasakorn Bullangpoti và cộng sự [53] đã phát hiện dịch chiết ethanol của lá già cây *Jatropha gossypifolia* và *Melia azedarach* có tác dụng hiệp đồng với thuốc trừ sâu cypermethrin trừ loài bướm đêm *Spodoptera frugiperda*, kết quả đã giảm lượng hoạt chất cypermethrin sử dụng.

Gần đây, năm 2013, tác dụng hiệp đồng của 14 dầu thực vật với thuốc trừ sâu carbaryl và permethrin để phòng trừ muỗi *Aedes aegypti* đã được tác giả Fan Tong [54] nghiên cứu và công bố trên tạp chí Medical Entomology. Trong số các dầu đã khảo sát, dầu hạt tiêu đen, dầu cúc bắt tử (*Helichrysum*), dầu gỗ đàn hương (*Sandalwood*), dầu gỗ tuyết tùng (*Cedarwood*), dầu vừng (*Sesame*) và dầu amyris có tác dụng hiệp đồng thông qua cơ chế kìm hãm enzym cytochrome P450 monooxygenases và carboxylesterases.

#### 1.2.4. Các chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt

Trong số các biện pháp làm tăng hiệu lực của thuốc trừ sâu Bt, biện pháp hỗn hợp thuốc với các chất hiệp đồng mang lại hiệu quả cao nên được nghiên cứu áp dụng trong canh tác nông nghiệp hiện nay, đặc biệt với những trường hợp côn trùng đã kháng thuốc như sâu tơ, sâu khoang...hại rau. Một số ví dụ được liệt kê dưới đây:

Các hợp chất vô cơ như muối  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  hoặc natri benzoat được sử dụng như chất hiệp đồng với Bt trong phòng trừ sâu keo (*Spodoptera littoralis*, hoặc với  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  phòng trừ sâu tơ *P. xylostella* và sâu xanh *Heliothis* làm tăng hiệu lực Bt lên 1,69 và 1,59 lần [55]. Một số chất hóa học khác được thêm vào đã làm tăng hoạt tính cho Bt như acid formic (0,5%), acid maleic (0,5%),  $\text{CaCl}_2$  (0,5%), acid citric (1%), ure (0,5%)... [56].

Nhìn chung, hướng nghiên cứu sử dụng các chất hiệp đồng có nguồn gốc tự nhiên với Bt trong những năm qua đã thu được nhiều thành công:

- B. Amiri Besheli đã hỗn hợp dầu khoáng (mineral oil) với Bt để diệt loài sâu đục cành cam *Phyllocnistis citrella* Stainton (*Lepidoptera: Gracillariidae*) đem lại kết quả tốt [57].

- Salama [58] đã hỗn hợp dịch dầu thô chiết xuất từ cây ngải thân đỏ (*Artemisia scoparia*) với Bt để diệt trừ ấu trùng bướm trắng trên cải bắp. Sau 72h, tỷ lệ ấu trùng chết đạt 76,3%.

- Suman Preet Singh Khanuja và cộng sự [59] đã ứng dụng dịch chiết từ cây me dại *Albizia lebeck* làm chất hiệp đồng mới cho độc tố  $\delta$ -endotoxin có trong Bt để phòng trừ côn trùng cánh vảy *Lepidoptera* rất hiệu quả.

- Zhu, Yu Cheng và các cộng sự [44] đã dùng avidin trong lòng trắng trứng với nồng độ 100 ppm hỗn hợp với Bt đã nâng tỷ lệ chết của 3 loài côn trùng bộ cánh phân *Helicoverpa zea* (Boddie), *Spodoptera exigua* (Hübner) và *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) từ 21,6% lên 57%.

- Dẫn xuất của các acid béo có trong dầu thực vật cũng là nguồn nguyên liệu phong phú để điều chế các chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt. Những năm gần đây, nhiều công trình nghiên cứu, sử dụng các hợp chất này làm phụ gia trong gia công thuốc BVTV như chất hoạt động bề mặt, chất hiệp đồng cho kết quả khả quan. Sử dụng các dẫn xuất và muối của acid oleic và acid linoleic (các acid béo không no C<sub>18</sub>) làm chất hiệp đồng cho Bt mang lại hiệu quả phòng trừ cao đối với một số côn trùng nông nghiệp, giảm ô nhiễm môi trường do liều lượng thuốc độc sử dụng giảm.

- Michelle D.Gaut (Canada) và cộng sự [60] đã công bố về kết quả nghiên cứu hoạt tính hiệp đồng của muối của các acid béo không no C<sub>18</sub> đối với thuốc trừ sâu Bactospein chứa 8800 UI *Bacillus thuringiensis*. Hỗn hợp muốikali của acid oleic và acid linoleic theo tỷ lệ 54/43 (% khối lượng) ở nồng độ 0,25% khi hỗn hợp với 0,1% Bactospein 8800 UI có hiệu quả phòng trừ sâu đến 94% so với Bt dùng đơn (69%).

- Kahn, Rodney [61] đã công bố kết quả nghiên cứu hoạt tính hiệp đồng của một số chất đối với độc tố  $\delta$ -endotoxin có trong thuốc trừ sâu Bt để phòng trừ một số côn trùng bộ Lepidoptera, Diptera và Coleoptera. Kết quả cho thấy các chất như: azadirachtin; lipid lưỡng cực (decanoyl-methyl-glucamide, dodecyl trimethyl amonium bromide, digalactosyl diglyceride, dodecyl glucopyranoside, triolein); aesculin, polylysine... đều có tác dụng hiệp đồng với độc tố  $\delta$ -endotoxin làm tăng hoạt lực hoặc giảm liều lượng sử dụng của sản phẩm.

- **Tại Việt Nam**, thuốc trừ sâu Bt được sử dụng rộng rãi hàng chục năm nay trong lĩnh vực sản xuất nông nghiệp sạch. Tuy nhiên, do một số hạn chế của thuốc, đặc biệt một số côn trùng trong nông nghiệp và y tế dễ hình thành tính kháng nên việc sử dụng sản phẩm bị hạn chế. Để khắc phục những hạn chế và nâng cao hiệu quả sử dụng của thuốc, đã có một số nghiên cứu tại Việt Nam

nhưng phần lớn theo hướng hỗn hợp giữa thuốc Bt và một số thuốc trừ sâu khác như Bt với thuốc BVTV có nguồn gốc virus [62] trừ sâu hại su hào hoặc hỗn hợp Bt với dầu neem trừ sâu xanh và sâu tơ [63].

Cho đến nay tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào được công bố về sử dụng các chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt.

### **1.2.5. Các chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid**

Thuốc trừ rầy Imidacloprid thuộc nhóm neonicotinoid mới được đưa vào sử dụng để phòng trừ rầy từ những năm 90 của thế kỷ 20. Tuy nhiên, đến nay hiệu lực trừ rầy nâu *Nilaparvata lugens* của thuốc đã bị giảm. Rầy nâu đã kháng thuốc ở nhiều nơi trên thế giới, như Nhật Bản, Trung Quốc và các nước Đông Nam Á trong đó có Việt Nam. Để nâng cao hiệu quả phòng trừ của Imidacloprid, phương pháp hỗn hợp với các chất hiệp đồng đã được quan tâm từ nhiều năm nay.

Năm 2004, Gang Wu và cộng sự [64] đã kết hợp Imidacloprid với một số chất hiệp đồng như piperonyl butoxide (PBO), triphenyl phosphate (TPP) và diethyl maleate (DEM) để trừ côn trùng cánh mềm (Hymenoptera: Aphidiidae) tại Phúc Châu, Trung Quốc. Kết quả cho thấy PBO có tác dụng hiệp đồng tốt nhất với Imidacloprid trên các loài côn trùng đã kháng. Sau đó, năm 2013 Liu Dekun [65] đã gia công sản phẩm Imidacloprid 70% WG với sự có mặt 1,0% PBO và các phụ gia khác làm thuốc trừ rầy hiệu quả.

Các chất hiệp đồng có nguồn gốc tự nhiên, từ các dầu thực vật đã được tìm kiếm và sử dụng thành công trong những năm gần đây.

Năm 2010, Shen Uni, Zhu Honggang và cộng sự đã sử dụng 2% saponin có trong cây chè làm chất hiệp đồng cho Imidacloprid và gia công dưới dạng nước huyền phù (aqueous suspension) phòng trừ rệp cây cho hiệu quả cao hơn so với không có saponin [66].

Năm 2011, Emma Graham đã nghiên cứu sử dụng sản phẩm Dillapiol (chiết từ cây thì là Ấn Độ (Indian Dill) như một chất hiệp đồng cho Imidacloprid để ức chế enzym CYP450 trong côn trùng cánh cứng (beetle colorado) [67] với hiệu quả tương đương chất hiệp đồng tổng hợp PBO.



Năm 2013, Byron I. Reid và cộng sự [68] đã công bố công trình nghiên cứu một cách tương đối toàn diện về sử dụng các chất hiệp đồng (acid oleic, acid linoleic và dẫn xuất methyl este...) trong gia công thuốc trừ sâu (Imidacloprid, fipronil, permethrin, deltamethrin...) để phòng trừ côn trùng y tế như ruồi, gián, kiến, muỗi.

*Một số nhận xét:*

Các chất hiệp đồng có nguồn gốc tự nhiên, đặc biệt các acid béo từ dầu thực vật có tầm quan trọng đặc biệt trong sản xuất nông nghiệp sạch. Chúng được sử dụng trong gia công thuốc BVTV, tạo các sản phẩm có hiệu lực phòng trừ cao, hạn chế sự kháng thuốc của côn trùng, qua đó có thể giảm lượng thuốc dùng, giảm chi phí cho nông dân, giảm thiểu tác động xấu đến sức khỏe cộng đồng và môi trường sinh thái. Các chất có tác dụng hiệp đồng có nguồn gốc tự nhiên từ dầu thực vật phong phú, sẵn có, ít hay không độc, dễ phân hủy nên rất thân thiện với môi trường.

### **1.3. PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CÁC CHẤT HIỆP ĐỒNG TỪ DẦU THỰC VẬT**

Như đã giới thiệu ở Mục 1.2, xu hướng sử dụng các chất hiệp đồng cho thuốc BVTV có nguồn gốc từ dầu thực vật ngày càng phổ biến vì tạo ra sản phẩm thân thiện với môi trường, phù hợp với phát triển nông nghiệp bền vững. Trong số đó, acid oleic, linoleic và các dẫn xuất của chúng có nhiều ứng dụng quan trọng nên được quan tâm nghiên cứu.

#### **1.3.1. Giới thiệu về acid oleic và linoleic**

##### **1.3.1.1. Acid oleic**

Acid oleic [(9Z)-octadec-9-enoic acid] là một acid béo có một nối đôi omega – 9, được tìm thấy trong nhiều dầu, mỡ động, thực vật, đặc biệt trong dầu oliu, công thức  $C_{18}H_{34}O_2$  hay  $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$ .

**Acid oleic**

Ở điều kiện thường, acid oleic là chất lỏng màu vàng nhạt hoặc hơi nâu, tỷ trọng 0,895, điểm sôi  $286,11^\circ C$ , không tan trong nước lạnh, tan trong ethanol,

ete, acetone benzen...Lượng acid oleic trong tự nhiên thường lớn hơn các acid béo khác. Acid oleic dễ bị oxi hóa bởi ánh sáng nên cần bảo quản cẩn thận. Hàm lượng acid oleic có trong một số dầu thực vật được trình bày trong bảng 1.3.

**Bảng 1.3. Hàm lượng acid oleic có trong một số loại dầu thực vật [69]**

<b>Dầu thực vật</b>	<b>% acid oleic</b>	<b>Dầu thực vật</b>	<b>% acid oleic</b>
Dầu oliu	70,3	Dầu hạt sỏ	78,89
Dầu hạt cải	62	Dầu cám gạo	47
Dầu hạt thì là	70,7	Dầu vừng	43
Dầu hạt rau mùi	78,7	Dầu hạt bồ hòn	54,8
Dầu hạt mùng toi	51,6	Dầu hạt hồng xiêm	55,48

### **1.3.1.2. Acid linoleic**

Acid linoleic [(9Z,12Z)-9,12-octadecadienoic acid] là một acid béo có hai nối đôi thuộc nhóm omega –6, được tìm thấy trong nhiều dầu thực vật (hương dương, đậu nành, vừng, hạt cải, táo biển...)

Acid linoleic

Linoleic có công thức phân tử:  $H_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH(CH_2)_7COOH$  hay  $C_{18}H_{32}O_2$ . Ở điều kiện thường, acid linoleic là chất lỏng màu vàng, tỷ trọng 0,9, điểm sôi 229 - 230°C, không tan trong nước lạnh, tan trong methanol, aceton... Hàm lượng acid linoleic có trong một số dầu thực vật được trình bày trong bảng 1.4.

**Bảng 1.4. Hàm lượng acid linoleic có mặt trong một số loại dầu thực vật [69]**

<b>Dầu thực vật</b>	<b>% acid linoleic</b>	<b>Dầu thực vật</b>	<b>% acid linoleic</b>
Dầu hạt hương dương	66,2	Đậu tương	53,8
Tinh dầu nho	73	Dầu hạt ngô	50,9
Dầu hương dương	64,2	Dầu vừng	45
Dầu hạt bông	53	Dầu cám gạo	39
Tinh dầu bắp	59	Dầu hạt cà pháo	68,95
Dầu hạt bí đỏ	56,19	Dầu hạt rau đay	64,39

### 1.3.2. Hoạt tính sinh học của acid oleic, linoleic và các dẫn xuất

Acid oleic và lionleic là các acid béo không no  $C_{18}$  được tìm thấy rộng rãi trong các chất béo tự nhiên, dầu thực vật nói chung và dầu ăn nói riêng. Chúng đóng vai trò quan trọng như là các chất dinh dưỡng và chất chuyển hóa trong cơ thể sống. Hoạt tính sinh học của acid oleic, linoleic và dẫn xuất rất đa dạng, đã và đang được nghiên cứu áp dụng trong các lĩnh vực công nghiệp thực phẩm, dược phẩm, nông nghiệp, chăn nuôi... Các methyl este còn có đặc tính kháng khuẩn và kháng nấm tiềm năng chống lại các vi sinh vật gây bệnh.

Trong nông nghiệp, acid oleic, linoleic, các muối kim loại kiềm và methyl este của chúng được sử dụng nhiều làm chất hiệp đồng, dung môi trong gia công nhiều loại thuốc BVTV nhằm tăng hiệu quả phòng trừ dịch hại từ nhiều năm nay. Một số ví dụ cụ thể:

- *Hỗn hợp muối kali oleat và linoleat*: Năm 1988, George S. Puritch và cộng sự [70] đã sử dụng hỗn hợp muối K- oleat/K- linoleat: 77/7 %) (SIS) làm chất hiệp đồng với một số thuốc trừ sâu nhóm carmabat và phospho hữu cơ như: SIS với Diazinon trừ ruồi trắng nhà kính *Trialeurodes vaporariorum*; hỗn hợp K- oleat/K-linoleat:54/43% (BIS) với Pirimicarb trừ rệp bắp cải *Brevicoryne brassicae* (L.). Hiệu quả phòng trừ tăng từ tăng từ 64% lên 96%.

- *Các acid oleic và linoleic*: A.E Hatem và cộng sự [71] đã nghiên cứu khả năng hiệp đồng của hàng loạt các acid vô cơ như HCl,  $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ ... và các acid hữu cơ tách từ dầu thực vật với các thuốc BVTV khác nhau. Các kết quả nghiên cứu cho thấy, acid oleic có tác dụng hiệp đồng cao hơn acid linoleic với chỉ số hiệp đồng (SF) là 2,25 so với 1,32, trong khi với acid palmitic chỉ có 0,89 (không có tác dụng hiệp đồng). Cụ thể: acid oleic hỗn hợp với thuốc trừ sâu Esfenvalerate trừ ngài bướm đêm *Spodoptera littoralis* với SF: 2,25, với thuốc trừ bệnh Methomyl có SF:2,65. Acid oleic cũng có tác dụng hiệp đồng với một số thuốc trừ cỏ [72]

- *Hỗn hợp acid oleic + acid linoleic*: Năm 1990, Puritch, George S. đã sử dụng hỗn hợp acid oleic (70%) và linoleic (6%) và muối kim loại kiềm của chúng để gia công hỗn hợp với các thuốc trừ sâu pyrethroid (fenvalerate,

permethrin, cypermethrin) 0,2-2% làm “Xà phòng thân thiện”, trừ nhiều côn trùng gây hại [49].

- *Các methyl oleat và linoleat*: Năm 2002, Rowena Roshanthi Landham [73] đã sử dụng methyl oleat làm chất hiệp đồng cùng với một số phụ gia khác trong gia công dạng gel các loại thuốc BTVT như thuốc trừ cỏ Acetochlor, Fluazifop-P-butyl, thuốc trừ sâu  $\lambda$ -Cyhalotrin... Sự có mặt của methyl oleat như chất hiệp đồng đã làm tăng hiệu quả phòng trừ của sản phẩm khi áp dụng vào thực tế.

### 1.3.3. Các phương pháp chiết, tách dầu thực vật từ hạt có dầu

Có thể thu nhận dầu thực vật từ hạt tương ứng thông qua các phương pháp như ép thủy lực, ép trực, trích ly với dung môi hoặc nước, phương pháp sử dụng enzym. Hiện nay, phương pháp enzym được sử dụng nhiều bởi độ chọn lọc cao, dùng ít dung môi, ít nước thải, sản phẩm có độ sạch cao, hiệu suất thu dầu cao.

Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng enzym để tách dầu từ hạt như sau:

J. Sineiro và các cộng sự [74] đã nghiên cứu sử dụng enzym Celluclast 1,5L (Novo Nordisk A/S) trong chiết xuất dầu hạt hướng dương.

Beatriz P.M. Sant' Anna và cộng sự [75] đã nghiên cứu sử dụng các enzym Celluclast, Termamyl, Viscozyme, Neutrase và Protease để tách dầu dừa. Kết quả cho thấy chủng loại enzym, hàm lượng enzym và giá trị pH ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất thu hồi dầu.

M.C. Kashyap và cộng sự [76] nghiên cứu sử dụng enzym để thủy phân đậu nành trước khi trích ly dầu bằng hexan. Phương pháp này không những làm tăng đáng kể hiệu suất tách chiết dầu mà còn rút ngắn thời gian sản xuất.

Ruchi Gaur và cộng sự [77] kết hợp xử lý enzym với kỹ thuật phân tách ba pha (Three phase partitioning-TPP) để tăng hiệu suất chiết dầu từ đậu nành, cám gạo và nhân xoài. Kết quả nghiên cứu cho hiệu suất chiết rất cao, tương ứng là 98%, 86% và 79%.

Hilaire Macaire Womeni và cộng sự [78] đã nghiên cứu ảnh hưởng của cơ chất đến hiệu suất thu nhận dầu từ nhân hạt *Irvingia gabonensis* bằng phương pháp enzym trong nước.

Barrios và cộng sự [79] nghiên cứu kết hợp các chất hiệp đồng polygalacturonase,  $\alpha$ -amylase và protease trong chiết xuất dầu dừa bằng nước. Kết quả là hiệu suất thu nhận dầu tăng hơn 80% đối với mẫu xử lý enzym pectinase và  $\alpha$ -amylase...

Ở Việt Nam, phương pháp sử dụng enzym để tách dầu từ hạt đã được một số nhà khoa học áp dụng khai thác các loại dầu thực vật từ các nguyên liệu sẵn có trong nước. Ví dụ, tác giả Nguyễn Thị Minh Nguyệt [80] đã sử dụng chế phẩm enzym Cytolase để sản xuất dầu dừa tinh khiết có chất lượng cao; Vũ Thị Đào [81] đã nghiên cứu tách chiết omega-3 và omega-6, ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và sản xuất thực phẩm chức năng...

Khi nghiên cứu tách dầu bằng phương pháp enzym, các tác giả nhận xét rằng chủng loại enzym, hàm lượng enzym, tỷ lệ các loại enzym, các thông số vận hành quá trình trích ly ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất thu hồi dầu.

#### **1.3.4. Các phương pháp thu nhận acid béo từ dầu thực vật**

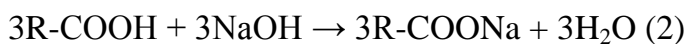
Cho đến nay, thủy phân triglyceride trong dầu thực vật để thu nhận các acid béo vẫn là công nghệ đơn giản và kinh tế nhất. Khi có mặt của xúc tác, phản ứng thủy phân có thể xảy ra ở nhiệt độ thấp hơn (khoảng 160-170°C) [82].

Ngoài phương pháp thủy phân truyền thống, các nghiên cứu sử dụng vi sinh vật để thủy phân dầu mỡ béo hoặc thủy phân với xúc tác enzym đã được nghiên cứu nhưng chưa có công trình nào áp dụng trong thực tế để sản xuất acid béo.

##### **1.3.3.1. Phương pháp thủy phân ở áp suất thấp**

- Thủy phân dầu mỡ bằng kiềm trong nước

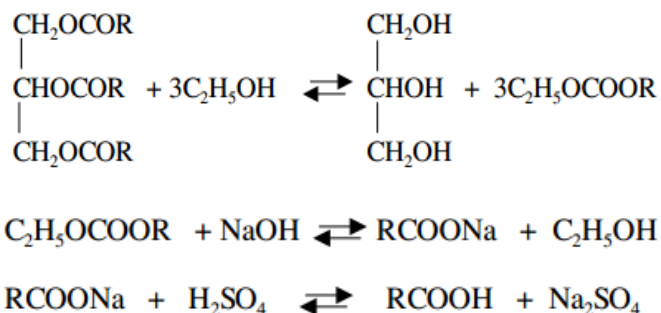
Phản ứng thủy phân dầu mỡ bằng kiềm mạnh NaOH hoặc KOH là phương pháp gián đoạn, được áp dụng phổ biến trong công nghiệp để sản xuất acid béo. Chất béo được khuấy và sục hơi nước trong bình phản ứng đến nhiệt độ 80°C. Dung dịch kiềm đặc được nạp vào thiết bị phản ứng và bổ sung hơi nước liên tục. Phản ứng xảy ra theo hai giai đoạn [83]:



Dung dịch kiềm tan tốt trong nước và trong triglyceride nên tăng khả năng trộn lẫn giữa nước và dầu làm cho tốc độ phản ứng xà phòng hóa tăng lên. Giai đoạn 2 là phản ứng tạo ra muối của acid béo. Để tăng tốc độ phản ứng, phân dịch glycerin và kiềm dư phải được tháo ra đều đặn đồng thời bổ sung thêm dung dịch kiềm cho hỗn hợp phản ứng. Kết thúc phản ứng, acid sulfuric được sử dụng để giải phóng acid béo.

- Thủy phân bằng kiềm trong dung môi ethanol [84]

Quá trình thủy phân trong dung môi ethanol diễn ra theo 3 giai đoạn. Đầu tiên, glyceride được đun nóng với ethanol với sự có mặt của xúc tác kiềm để tạo ra ethanol este của acid béo. Tiếp theo xảy ra phản ứng xà phòng hóa. Cuối cùng, acid hóa bằng acid sulfuric thu được hỗn hợp acid béo.



Sử dụng ethanol thay nước trong phản ứng thủy phân triglyceride bằng kiềm có ưu điểm vì ethanol (kém phân cực hơn nước) sẽ tạo ra ethoxide ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OK}$  hoặc  $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}$ ) có tác dụng như chất xúc tác cho phản ứng xà phòng hóa, trong khi kiềm trong nước chỉ tạo ra ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  và  $\text{OH}^-$ . Muốn phá vỡ liên kết glyceride cần nhiệt độ cao và thời gian phản ứng lâu hơn. Tuy nhiên, do phản ứng lượng dung môi ethanol lớn nên phương pháp thủy phân bằng kiềm trong ethanol được lựa chọn cho qui mô sản xuất nhỏ. Ngoài ra, theo kết quả nghiên cứu của Lê Bình Hoàng [85] và Ngô Xuân Dũng [86], nồng độ ethanol thích hợp để quá trình thủy phân dầu thực vật được xảy ra hoàn toàn là 80%.

Phản ứng thủy phân dầu thực vật trong ethanol có thể sử dụng tác nhân kiềm là KOH hoặc NaOH, nhưng dùng KOH tốt hơn vì muối kali của acid cacboxylic hòa tan tốt và sản phẩm xà phòng hóa thu được mềm hơn nên dễ xử lý ở các công đoạn tiếp theo và cho sản phẩm có chỉ số acid cao hơn [87]. Ngoài

ra khi dùng KOH, sản phẩm phụ có thể làm phân bón, góp phần nâng cao giá trị sử dụng của sản phẩm.

### 1.3.3.2. Phương pháp thủy phân ở áp suất cao

#### - Thủy phân không sử dụng xúc tác

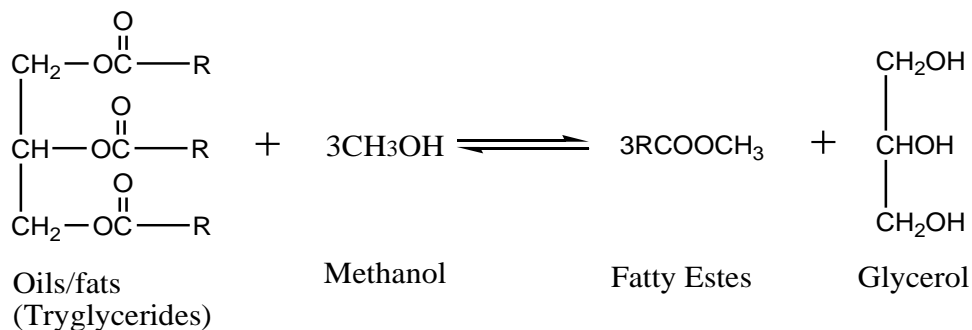
Phương pháp không sử dụng xúc tác được thực hiện ở áp suất cao bằng sự sôi nước với áp lực 30kg/cm<sup>2</sup> vào hỗn hợp phản ứng trong 5-6 giờ. Thông thường, hiệu suất thủy phân đạt 88-92% [83].

#### - Thủy phân có sử dụng xúc tác

Khi sử dụng xúc tác, phản ứng có thể thực hiện ở áp suất thấp hơn. Các xúc tác thường dùng là oxit kim loại như CaO, MgO, ZnO hoặc BaO, hàm lượng 1-2% so với dầu. Nước sử dụng bằng 50% lượng dầu và hiệu suất thủy phân đạt tới 90%.

### 1.3.5. Phương pháp điều chế methyl este của hỗn hợp acid béo (FAME) từ dầu thực vật

Methyl este được điều chế từ dầu thực vật thông qua quá trình este hóa chéo (transesterification) có sử dụng xúc tác. Thông thường, dầu thực vật chứa khoảng 90-99% triglyceride, còn lại là các acid béo tự do, mono và diglyceride, các phospholipid, các tocopherol, các sterol... Triglyceride trong dầu thực vật phản ứng với methanol để tạo thành các methyl este của acid béo. Sơ đồ phản ứng được chỉ ra trong hình 1.1. Chất xúc tác sử dụng để tăng tốc độ và hiệu suất phản ứng. Do phản ứng thuận nghịch nên lượng methanol cần dùng dư để dịch chuyển cân bằng về phía tạo sản phẩm. Sản phẩm phụ của quá trình là glyxerin.



Hình 1.1. Sơ đồ phản ứng este hoá chéo dầu thực vật với methanol

Hiện nay trên thế giới, methyl este được sản xuất theo hai công nghệ: xúc tác đồng thể và xúc tác dị thể. Mỗi công nghệ đều có các ưu điểm và nhược điểm riêng [104].

#### a. Xúc tác đồng thể

Quá trình este hóa chéo có thể được thực hiện bởi xúc tác bazơ, acid hoặc các xúc tác khác, nhưng trên xúc tác bazơ phản ứng diễn ra nhanh hơn trên xúc tác acid.

- Xúc tác bazơ gồm hydroxit, alcoolat hoặc xà phòng của kim loại kiềm hoặc kiềm thổ (Li, Na, K, Ca, Ba, Cs...) và các amin họ guanidin. Xúc tác kiềm, như dung dịch NaOH hoặc KOH trong methanol;  $\text{CH}_3\text{ONa}$  hoặc  $\text{CH}_3\text{OK}$  là các chất xúc tác được sử dụng thông dụng nhất trong quá trình sản xuất methyl este.

- Xúc tác acid gồm acid vô cơ ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), acid sulfonic, nhựa trao đổi ion (acid mạnh), zeolit... Các xúc tác acid ít khi được dùng vì chúng có hoạt tính thấp và ăn mòn thiết bị, nhưng lại thích hợp nếu glyceride có hàm lượng acid béo tự do cao và chứa nhiều nước.

- Xúc tác khác: alcoolat titan, oxit của các kim loại khác nhau như: Sn, Mg, Zn, Ti, Pb..., xúc tác enzym.

Xúc tác enzym cũng sử dụng hiệu quả trong quá trình sản xuất biodiesel nhờ đặc tính pha nền, nhóm chức và đặc tính lập thể trong môi trường nước.

Các quá trình este hóa chéo dầu thực vật sử dụng xúc tác đồng thể có thể vận hành theo phương pháp gián đoạn hoặc liên tục.

#### b. Xúc tác dị thể

Xúc tác dị thể có ưu điểm nổi bật là thân thiện với môi trường, đáp ứng được các tiêu chuẩn liên quan đến khái niệm “hóa học xanh” do các sản phẩm thu được sạch và hiệu suất chuyển hóa cao, loại bỏ gần như hoàn toàn các chất thải gây ô nhiễm môi trường. Chi phí tinh chế sản phẩm cũng giảm do sản phẩm không có muối; đồng thời tăng khả năng ứng dụng của sản phẩm phụ glycerin, ngay cả khi không tinh chế sơ bộ.

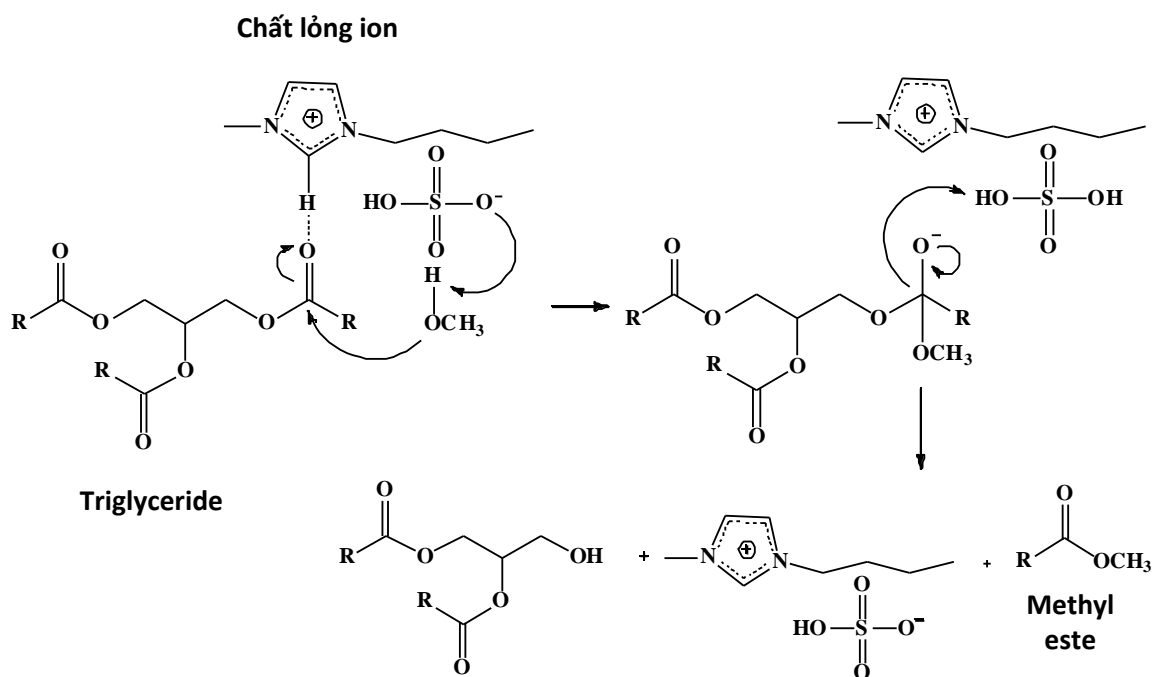


### c. Xúc tác chất lỏng ion (Ionic liquid – IL)

Xúc tác chất lỏng ion có nhiều ưu điểm về kỹ thuật, công nghệ như: hoạt tính cao ở nhiệt độ và áp suất thường; thích hợp với hầu hết nguyên liệu; dễ tách khỏi sản phẩm. Tuy giá IL không rẻ nhưng có thể tái sử dụng nhiều lần, giá thành sản phẩm giảm và giảm thiểu tác hại đối với môi trường [88]. Do vậy, những năm gần đây xúc tác IL được quan tâm nghiên cứu và phát triển ứng dụng:

Đặng Thị Thúy Hạnh và cộng sự [89] đã nghiên cứu điều chế 13 chất lỏng ion làm xúc tác cho quá trình chuyển hóa dầu thực vật thành FAME. Tác giả đã sử dụng xúc tác 1-(4-sulfonic acid) butyl -3- methylimidazolium methanesulfonat ( $\text{minC}_4\text{H}_8\text{SO}_3\text{H} \cdot \text{CH}_3\text{SO}_3$ ) cho quá trình transester hóa dầu jatropha, dầu dừa. Hiệu suất chuyển hóa đạt 87,76 - 88%.

Cho đến nay, cơ chế phản ứng este hóa chéo với sự có mặt của xúc tác chất lỏng ion rất ít được nghiên cứu. Trên hình 1.5 đề xuất cơ chế phản ứng este hóa chéo sử dụng xúc tác butyl-methyl imidazolium hydrogensulfate ( $\text{BMIMHSO}_4$ ) khi đóng vai trò là xúc tác cho quá trình este hóa chéo dầu ăn thải thành biodiesel [90].



Hình 1.2. Sơ đồ cơ chế phản ứng este hóa chéo dầu thực vật trên xúc tác  $\text{BMIMHSO}_4$

### **1.3.6. Các phương pháp tách acid béo và methyl este của acid béo (FAME)**

#### ***1.3.6.1. Phương pháp chưng cất***

Cơ sở phương pháp này dựa trên nhiệt độ sôi khác nhau của các acid béo. Có thể áp dụng chưng cất phân đoạn để tách riêng từng loại acid béo. Phương pháp này chỉ phù hợp để tách các acid béo mạch ngắn với acid béo mạch dài (độ dài mạch cacbon khác biệt lớn) do nhiệt độ sôi của chúng có sự khác biệt lớn.

#### ***1.3.6.2. Phương pháp sắc ký***

Tách acid béo bằng sắc ký được dùng rộng rãi để thu riêng các acid béo có độ tinh khiết cao. Phương pháp này dựa trên khả năng lưu giữ các acid béo trên pha tĩnh khác nhau. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ hiệu quả với các acid béo mạch ngắn  $C_1 - C_{12}$ . Gần đây, phương pháp này cũng được dùng với acid béo mạch dài hơn bằng cách methyl hóa các acid béo trước để tăng độ bay hơi. Việc phát triển các pha tĩnh có thể giúp tách riêng được acid béo no và không no mạch tương đối dài nhưng vẫn phải qua quá trình methyl hóa các acid béo trước.

Nhiều tác giả dùng phương pháp sắc ký để tách acid béo DHA, omega-3 có độ tinh khiết cao.

Như vậy, tách sắc ký là phương pháp tạo ra sản phẩm với độ tinh khiết rất cao. Tuy nhiên, do chi phí lớn nên chúng chỉ phù hợp với quá trình sản xuất các sản phẩm dùng cho công nghiệp thực phẩm, dinh dưỡng và dược phẩm.

#### ***1.3.6.3. Phương pháp kết tinh truyền thống***

Phương pháp kết tinh truyền thống dựa vào độ tan khác nhau của các acid béo có cấu trúc khác nhau. Các acid béo no kém tan hơn so với các acid không no tương ứng và có thể tách ra một phần từ hỗn hợp. Vì vậy, phương pháp kết tinh ở nhiệt độ thấp thường hữu ích để tách các acid béo và các dẫn xuất của chúng.

Theo Stout [84], các acid béo mạch dài kém hòa tan hơn mạch ngắn; các acid no kém hòa tan hơn các acid không no có cùng chiều dài mạch; đồng phân trans hòa tan kém hơn đồng phân cis-; và các acid mạch thẳng hòa tan kém hơn acid có nhánh. Điểm chảy của các acid béo thay đổi đáng kể theo kiểu và mức độ

không bão hòa. Do đó có thể tách hỗn hợp của acid béo no và không no bằng phương pháp kết tinh truyền thống.

#### **1.3.6.4. Phương pháp kết tinh trong dung môi**

Trên cơ sở phát triển phương pháp kết tinh truyền thống, phương pháp kết tinh trong dung môi như methanol, acetone, hexane, methyl formate để tách riêng acid béo no và acid béo 1 nối đôi. Phương pháp này đã tách riêng được các acid stearic (no), oleic (1 nối đôi) và linoleic (2 nối đôi) từ dầu hướng dương, dầu vừng, dầu lạc.

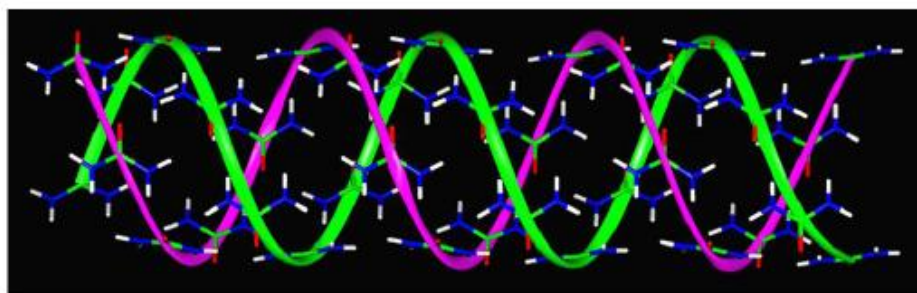
Phương pháp kết tinh trong dung môi là phương pháp có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất do đơn giản, chi phí thấp, hiệu quả tương đối tốt.

#### **1.3.5.5. Phương pháp dựa vào độ hòa tan khác nhau của muối acid béo**

Dựa vào độ hòa tan khác nhau của muối acid béo trong dung môi, hỗn hợp các acid béo được chuyển hóa thành dạng muối, sau đó sử dụng dung môi để hòa tan và tách riêng từng muối. Các dung môi sử dụng để tách muối của acid béo thường là ethanol hoặc diethyl ete. Cation sử dụng để tạo muối thường là kim loại kiềm như Li, Na, K [91].

#### **1.3.6.5. Phương pháp tạo phức với ure**

Ure tinh khiết, kết tinh theo cấu trúc tứ diện (tetragonal) với các kênh có đường kính 5,67Å. Do có cấu trúc mạng tinh thể đặc biệt, trong những điều kiện nhất định, ure có thể tạo phức với những phân tử chứa mạch alkyl. Trong phân tử ure, liên kết hydro có ái lực van der Waal mạnh với các phân tử “khách” khác, tạo nên những lỗ rỗng tròn, dạng xoắn, với đường kính khoảng 0,4-0,6 nm.



**Hình 1.3. Cấu trúc vòng xoắn của một rãnh phức ure [92]**

Thông thường, ure tinh khiết có cấu trúc 4 cạnh (tetragonal), trong đó mỗi nguyên tử oxy liên kết với 4 nguyên tử hydro. Nhưng khi có mặt phân tử “khách”, phân tử ure thay đổi ngay cấu trúc, bao quanh lấy phân tử “khách”, hình thành các liên kết hydro hoặc liên kết dạng O - H...O (giữa cation và anion). Khi đó, cấu trúc của phức ure (urea inclusion complexes) có dạng ống xoắn 6 cạnh (hexagonal), mỗi chuỗi bao gồm 6 phân tử ure, đường kính 8-12Å. Do dạng ống 6 cạnh của phức ure rất hẹp và cứng nhắc, chúng chỉ chứa được các phân tử “khách” có cấu trúc thẳng, không cồng kềnh, ví dụ như các chất thuộc dãy các n-alkan ít phân nhánh [93]. Trường hợp với các acid hữu cơ, ure tạo phức theo 2 phương thức:

1. Nhóm carboxyl của acid hữu cơ có thể hình thành mạng với liên kết hydro.

2. Cấu trúc của nhóm COOH của các acid hữu cơ có thể kết hợp một cách trật tự, vô tận các liên kết O-H...O (giữa cation và anion), tạo ra mạng tinh thể với kích thước xác định.

Trong dãy các acid béo có nguồn gốc dầu thực, động vật, ure tạo phức dễ dàng với các acid béo no, sau đó theo thứ tự đến các acid béo không no 1 nối đôi, đa nối đôi. Các gốc acid có hydrocarbon mạch nhánh, mạch vòng khó tạo phức hơn so với mạch thẳng. Những trường hợp sau ít có khả năng tạo phức với ure:

- Các acid béo với gốc R có số nguyên tử C < 6-8.
- Các acid với gốc R có nhiều nối đôi; các nhóm epoxy hoặc nhóm OH.

Các phức ure sẽ bị phân ly khi tăng nhiệt đến nhiệt độ tới hạn, gần với điểm chảy của tinh thể ure là 135°C.

Phương pháp tạo phức với ure có thể lặp lại nếu muốn hàm lượng acid béo không no thu được cao hơn. Bằng phương pháp này độ tinh khiết của sản phẩm đã cải thiện đáng kể so với phương pháp kết tinh cổ điển. Wille [94] đã sử dụng phương pháp này và đã phân tách được các acid béo rất khó tách như C18:4.

Phương pháp tạo phức với ure còn áp dụng đối với các alkyleste, alcohol của các acid béo chứa trong dầu thực động vật. Cũng như trường hợp tách acid béo, việc tách và tinh chế FAME không no được phát triển mạnh mẽ. Các

phương pháp truyền thống đều có nhược điểm như: phương pháp sử dụng kết tinh trong dung môi ở nhiệt độ thấp đòi hỏi năng lượng lớn [95]; phương pháp dùng nitrat bạc thì chi phí cao [96]; phương pháp chưng cất phân tử và chiết siêu tới hạn đòi hỏi vốn đầu tư lớn. Do vậy hiện nay, phương pháp tạo phức với ure vẫn được sử dụng để tách loại và làm giàu FAME không bão hòa [97].

Khi so sánh, phương pháp tạo phức với ure được lựa chọn vì tính hiệu quả, điều kiện thực hiện đơn giản, các nguyên liệu và các thiết bị sử dụng khá phổ biến.

### 1.3.7. Các phương pháp tổng hợp muối của acid béo

Thông thường các muối kim loại kiềm hoặc kiềm thổ của các acid béo thu được trực tiếp từ phản ứng trung hòa giữa acid tương ứng và kiềm (NaOH hoặc KOH) và thường gọi là phản ứng xà phòng hóa. Tùy thuộc vào nguyên liệu ban đầu sử dụng, có thể có các quá trình khác nhau.

- Từ dầu thực vật:

Xà phòng hóa trực tiếp dầu thực vật sẽ tạo thành muối của acid béo (xà phòng). Phản ứng này cũng là một trong các giai đoạn của quá trình thủy phân dầu thực vật nhằm thu được hỗn hợp các acid béo đã trình bày ở Mục 1.3.3.1 (trang 30).

- Từ acid béo:

Có thể thu trực tiếp các muối của acid béo từ phản ứng trung hòa acid tương ứng với kiềm:

- Từ methyl este của acid béo:

Xà phòng hóa methyl este thu được với kiềm để tạo muối của acid béo:

## 1.4. ĐỊNH HƯỚNG NGHIÊN CỨU

Từ những tổng quan ở trên, có thể rút ra được một số nhận xét sau:

- Trong những năm gần đây, hiện tượng giảm hiệu lực sinh học, hiện tượng kháng thuốc BTVT xảy ra phổ biến ở nhiều đối tượng côn trùng gây hại, đặc biệt là sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*) và rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.).

Trong số các thuốc BVTV bị giảm hiệu lực, thuốc trừ sâu sinh học Bt và thuốc trừ rầy Imidacloprid có biểu hiện rõ rệt nhất.

- Một trong những biện pháp tiên tiến, hiệu quả, thân thiện với môi trường nhằm nâng cao hiệu quả sinh học của thuốc BVTV là hỗn hợp với chất hiệp đồng. Trong số chất có tác dụng hiệp đồng, các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên từ dầu thực vật được quan tâm gần đây vì nguồn nguyên liệu sẵn có, ít độc và không ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng và môi trường.

- Theo các kết quả nghiên cứu trên thế giới cho thấy: chất hiệp đồng phù hợp nhất cho thuốc trừ sâu Bt để phòng trừ sâu tơ hại rau là hỗn hợp muối của acid oleic và linoleic và cho thuốc Imidacloprid trong phòng trừ rầy nâu hại lúa là acid oleic, linoleic và dẫn xuất methyl este tương ứng.

- Tại Việt Nam, hầu như chưa có công trình nghiên cứu nào điều chế chất hiệp đồng từ dầu thực vật để ứng dụng trong sản xuất thuốc BVTV.

Với nhận định trên, Luận án nghiên cứu điều chế một số chất hiệp đồng trên cơ sở dầu thực vật, nhằm nâng cao hiệu lực sinh học của thuốc trừ sâu Bt và Imidacloprid. Để đạt được mục tiêu trên, một số nội dung chính được nghiên cứu như sau:

1. Phân tích, đánh giá lựa chọn các chất hiệp đồng có nguồn gốc từ các acid béo không no C18 trong dầu thực vật cho thuốc trừ sâu Bt và thuốc trừ rầy Imidacloprid.

2. Điều chế chất hiệp đồng bằng các quá trình: chiết tách dầu thực vật, điều chế acid béo từ dầu thực vật, điều chế muối Kali của acid béo và điều chế methyl este.

3. Xây dựng công thức hỗn hợp giữa chất hiệp đồng và các thuốc trừ sâu

4. Nghiên cứu chế tạo các sản phẩm mới là hỗn hợp chất hiệp đồng và thuốc trừ sâu và đánh giá hiệu lực sinh học trên đối tượng phòng trừ tương ứng.

5. Bước đầu luận giải cơ chế tác động của chất hiệp đồng.

## CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM

### 2.1. NGUYÊN LIỆU VÀ HÓA CHẤT

Các nguyên liệu, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu của luận án được liệt kê trong bảng sau:

Bảng 2.1. Danh mục hóa chất cần thiết

Tên hóa chất	Xuất xứ	Độ tinh khiết
Acid sulfuric	Trung Quốc	98%
Ure thí nghiệm	Trung Quốc	99%
Kali hydroxit	Trung Quốc	82%
$\text{mimC}_4\text{H}_8\text{SO}_3\text{H}.\text{CH}_3\text{SO}_3$	Việt Nam	
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Trung Quốc	99%
Methyl oleat	Mỹ	99%
Methyl linoleat	Mỹ	99%
Kali oleat	Mỹ	97%
Kali linoleat	Mỹ	97%
Acid oleic	Trung Quốc	99%
Acid linoleic	Trung Quốc	99%
Methanol	Trung Quốc	99%
Ethanol	Việt Nam	99%

Bảng 2.2. Danh mục các enzym

Tên enzym	Xuất xứ	Nguồn enzym	Hoạt lực	pH
Cellulase	Trung Quốc	<i>Trichoderma reesei</i>	$\geq 2,000$ U/g	4,5
Neutral Protease		<i>Bacillus subtilis</i>	$>60.000$ U/g	7
Amylase		<i>Bacillus substilis</i>	$>9500$ U/ml	6
Pectinase		<i>Asperigillus niger</i>	$\geq 6,000,000$ U/ml	4,5

Các nguyên liệu chứa dầu: sỡ, trám trắng, kê, trám chim, hồi, khô sâm nam, sòi tía, dâu da xoan, đào, muồng truông, xoài... có nguồn gốc Việt Nam.

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.2.1. Phương pháp thu nhận dầu thực vật, acid béo

#### 2.2.1.1. Phương pháp chiết tách dầu từ nguyên liệu hạt

Dầu từ mẫu hạt được chiết tách và xác định hàm lượng theo phương pháp nêu tại tiêu chuẩn ISO/DIS 5509:1997, sử dụng dung môi chiết là n-hexan.

Hàm lượng dầu thực vật trong hạt được xác định thông qua thực nghiệm: 10 gam mẫu hạt được nghiền nhỏ trong máy nghiền bi và được chiết bằng n-hexan trong thiết bị đun nóng có hồi lưu chuyên dụng (Twisselman apparatus) ở  $60^{\circ}\text{C}$  trong 6 giờ. Dịch chiết thu được đem cất loại dung môi trên máy quay cất chân không BUCHI, hệ điều chỉnh tự động, Switzerlan. Hàm lượng dầu béo của hạt thu được sau khi cân trên cân phân tích Sartorius analytic ( $10^{-4}$ ) và được tính toán theo % khối lượng so với mẫu hạt cả vỏ hoặc nhân hạt.

#### 2.2.1.2. Phương pháp phân lập các acid béo

Các phương pháp sử dụng để phân lập acid béo từ dầu thực vật bao gồm:

a. Sắc kí lớp mỏng (TLC): được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 105715), RP18, F254s (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 368nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% được phun đều lên bản mỏng.

b. Sắc kí lớp mỏng điều chế: thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel 60G F254 (Merck, kí hiệu 105875), phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại tại hai



bước sóng 254nm và 368nm, hoặc cắt rìa bản mỏng để phun thuốc thử là dung dịch  $H_2SO_4/MeOH$  10%.

## **2.2.2. Phương pháp xác định thành phần, hàm lượng và cấu trúc hoá học của các acid béo**

### **2.2.2.1. Xác định thành phần, hàm lượng các acid béo bằng sắc kí khí (GC, GC-MS)**

a. Thành phần acid béo được xác định dưới dạng methyl este trên sắc kí khí (GC) theo phương pháp tại tiêu chuẩn ISO/FDIS 5590:1998 như sau:

10 mg dầu béo được hoà tan với 1 ml petroleum benzine trong lọ nhỏ nút kín, bổ sung 25  $\mu$ l dung dịch sodium methanolate trong methanol (2 mol/l) và lắc kỹ trong 1 phút. Thêm 20 mg  $Na_2SO_4$  loại sạch, lắc kỹ và li tâm trong 1 phút ở chế độ 5000 rpm/phút. Dịch trong, sạch ở pha trên được tách riêng và phân tích trên máy sắc kí khí HEWLETT PACKARD 5890 Series II theo chế độ: Capillary column CP - Sil 88, 100m/0,25ID/0,2 $\mu$ m, nhiệt độ: 155°C-220°C (1,5°C /phút), Injector 250°C, detector 250°C, khí mang  $H_2$ .

b. Thành phần acid béo được xác định dưới dạng methyleste trên sắc kí khí –khối phổ (GC-MS)

40  $\mu$ L acid béo được hòa tan trong 2 mL  $H_2SO_4$ -MeOH (1%) và lắc kỹ trong 1 phút. Hỗn hợp được gia nhiệt ở 70°C trong 3 giờ. Sau khi làm lạnh, thêm vào hỗn hợp 3ml n-hexan và 3 ml nước, chiết lấy lớp methyl este ở pha n-hexan. Sản phẩm methyl este được xác định bằng phương pháp GC- MS trên thiết bị Agilent 6890. Cột mao quản DB-WA, nhiệt độ detector 270°C, tốc độ dòng 20ml/phút. Chương trình nhiệt độ: Nhiệt độ lò cột được giữ ở đến 37°C trong 1 phút, rồi nâng tiếp đến 150°C với tốc độ gia nhiệt 10°C/phút. Nâng tiếp đến 270°C và giữ trong 5 phút. Các tín hiệu sẽ được xử lý trên máy tính và đối chiếu với khối phổ chuẩn trong thư viện phổ. Các chất sẽ được xác định thành phần nhờ giá trị thời gian lưu trên sắc ký đồ. Dựa vào phổ thu được ta sẽ xác định được thành phần của các acid béo riêng rẽ.

c. Cấu trúc của acid béo, dầu thực vật được phân tích trên phổ hồng ngoại (FT-IR)

Phổ IR của các mẫu nghiên cứu được ghi trên máy chụp phổ hồng ngoại Nicolet 6700 FT-IR spectrometer tại phòng thí nghiệm Lạc, hóa dầu – Viện kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội. Phổ được ghi trong vùng từ  $400\div 4000\text{cm}^{-1}$ .

### **2.2.3. Phương pháp thử nghiệm hiệu lực sinh học của sản phẩm hỗn hợp giữa chất hiệp đồng và thuốc trừ sâu qui mô PTN.**

- Đối tượng khảo nghiệm: sâu tơ *Plutella xylostella* và rầy nâu *Nilaparvata lugens* Stal, tuổi 2-3

- Nồng độ sử dụng 0,25%. Thuốc đối chứng là Vi-BT 16.000WP. Để trừ rầy nâu, phun theo nồng độ khuyến cáo là 0,1%. Thuốc đối chứng là Vicondor 50EC (Vipesco).

- Số lượng sâu thả và thời gian theo dõi: Mỗi công thức thí nghiệm thả 20 sâu (rầy) non tuổi 2-3. Đánh giá số sâu (rầy) chết đối với từng công thức sau 1, 3, 5, 7 ngày sau phun. Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần (60 sâu (rầy) cho 1 công thức thí nghiệm)

- Hiệu quả của thuốc trong PTN được tính bằng công thức Abbott:

$$H(\%) = \frac{(C_a - T_a) \times 100}{C_a}$$

Trong đó:

- + H (%): là hiệu lực của thuốc tính theo phần trăm;
- + Ca: là số lượng cá thể côn trùng sống ở công thức đối chứng sau xử lý;
- + Ta: là số lượng cá thể côn trùng sống ở công thức thí nghiệm sau xử lý.

### **2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu**

- Sử dụng phần mềm Modde 5.0 để xử lý số liệu theo phương pháp qui hoạch hóa thực nghiệm. Trong phép tính của Modde 5.0, cho phép hai giá trị  $R^2$  và  $Q^2$  phản ánh khả năng dự đoán của mô hình. Các giá trị này càng sát đến 1, mô hình có độ tin cậy càng cao. Khi  $Q^2 > 0,7$  mô hình có khả năng tốt, ít mắc lỗi. Còn  $R^2$  là phần trăm tương thích của mô hình.

- Các số liệu thử nghiệm hiệu lực sinh học được xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 17, phần mềm irristat 4.0 và excel.

## 2.3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

### 2.3.1. Khảo sát, xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và Imidacloprid

#### 2.3.1.1. Khảo sát thành phần các acid béo không no C18 (acid oleic, acid linoleic) có trong dầu thực vật

Sử dụng sắc ký khí (GC), sắc ký khí - khối phổ (GC-MS) để phân tích, xác định hàm lượng dầu và thành phần acid oleic và linoleic có trong dầu thực vật của một số nguyên liệu chứa dầu như: hạt sỏ; trám trắng, kê, trám chim, hòi, khô sâm nam, sòi tía, dâu da xoan, đào, cải, muồng trưởng, chuối rừng, xoài. Căn cứ vào kết quả phân tích trên sẽ lựa chọn loại nguyên liệu phù hợp cho nghiên cứu điều chế các chất hiệp đồng tương ứng.

#### 2.3.1.2. Xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt

Khảo sát các tỷ lệ K-oleat/K-linoleat nhằm tìm ra tỷ lệ thích hợp có tác dụng hiệp đồng tốt nhất để hỗn hợp với thuốc trừ sâu Vi Bt 16.000UI diệt sâu tơ trên họ rau thập tự. Hỗn hợp K-oleat + K-linoleat thay đổi theo các tỷ lệ khác nhau và các công thức khác như hỗn hợp acid oleic/linoleic theo tỉ lệ 54/43; dầu hạt đào, muối của dầu hạt đào được trộn cơ học với thuốc trừ sâu Vi-Bt 16.000UI theo tỷ lệ khối lượng 1/1. Sau đó tiến hành thử hiệu lực sinh học trong phòng thí nghiệm trên đối tượng sâu tơ với nồng độ phun theo khuyến cáo là 2,5g/l. Sản phẩm so sánh là Vi-BT 16.000WP (Vipesco). Từ đó lựa chọn tỉ lệ K-oleat/K-linoleat cho hiệu quả cao nhất là chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt.

#### 2.3.1.3. Xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid

Tiến hành thử hiệu lực sinh học hỗn hợp Imidacloprid với các chất hiệp đồng khác nhau nhằm xác định chất phù hợp trong phòng trừ rầy nâu hại lúa đối với hoạt chất Imidacloprid. Các chất thí nghiệm là methyl oleat; methyl linoleate; acid oleic; acid linoleic, methyl este của dầu hạt sỏ, được trộn với cơ học với Imidacloprid trong dung môi aceton, so sánh với sản phẩm Vicondor 50EC (Vipesco). Nồng độ sử dụng theo khuyến cáo: 1ml/lít nước. Từ đó lựa chọn chất hiệp đồng cho hiệu quả tốt nhất.

### **2.3.2. Chiết tách dầu thực vật bằng phương pháp thủy phân với enzym làm nguyên liệu để tổng hợp chất hiệp đồng**

100g phần nhân hạt thực vật đã được tách vỏ, nghiền mịn bằng máy. Với hạt có saponin (như hạt sỏ), bổ sung dung dịch ethanol 70% (200ml) và cho vào lò vi sóng trong 30s, công suất 500W. Quá trình này lặp lại 2 lần để loại bỏ hoàn toàn saponin. Bột thu được trộn với nước theo tỷ lệ 1/6 (w/v). Điều chỉnh pH từ 4,5 – 7 tùy từng loại enzym (protease, pectinase, cellulase, amylase) ở nhiệt độ 40°C – 70°C. Bổ sung enzym (lượng 0,2 - 1% trọng lượng khô của bột hạt) rồi ủ trong 1h đến 7h (có khuấy). Sau đó, ly tâm hỗn hợp với tốc độ 5000-10.000 vòng/phút. Gạn phần dầu, rồi cân khối lượng thu được.

*Chỉ tiêu đánh giá:*

Hiệu suất thu nhận dầu = (khối lượng dầu được giải phóng dạng tự do/khối lượng dầu có trong nguyên liệu) x 100%

### **2.3.3. Điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và Imidacloprid**

#### **2.3.3.1. Điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt**

Điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt bao gồm 3 bước như sau:

*Bước 1. Chuyển hóa dầu thực vật thành hỗn hợp acid béo bằng phương pháp thủy phân với KOH trong ethanol.*

Hỗn hợp gồm 50g dầu thực vật, 200ml KOH trong ethanol (thay đổi từ 1M đến 2M) được đưa vào bình 3 cổ có lắp sinh hàn, nhiệt kế và khuấy từ. Nhiệt độ phản ứng được giữ cố định bằng nồi dầu glycerol. Gia nhiệt đến nhiệt độ phản ứng (từ 60 đến 78<sup>0</sup>C) trong khoảng 30 đến 240 phút, có khuấy. Kiểm tra tiến trình phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng trên silica gel. Kết thúc phản ứng, thêm dung dịch muối NaCl 3%, để tách sản phẩm thành 2 lớp. Lớp trên được acid hóa bằng dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% đến pH=2-3, rồi rửa sạch bằng nước nóng. Làm khô hỗn hợp bằng muối Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> khan. Sau đó, tách muối Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sấy sản phẩm ở 105<sup>0</sup>C và thu được m (g) sản phẩm.

Khối lượng acid béo (m') được tính thông qua

$$m' = \frac{CSA}{2} xm (g)$$

Hiệu suất quá trình thủy phân dầu TV được tính như sau:

$$H(\%) = \frac{m' \times 100}{M} (\%)$$

Trong đó:

H: Hiệu suất quá trình thủy phân

m: Khối lượng sản phẩm thu được sau quá trình thủy phân (g)

m': Khối lượng acid béo trong sản phẩm

M: Khối lượng dầu thực vật ban đầu (g)

*Bước 2. Tách hỗn hợp acid oleic và linoleic bằng phương pháp kết tinh tạo phức với ure.*

Cho hỗn hợp acid béo (Free fatty acid – FFA) thu được sau khi thủy phân vào hỗn hợp ure và ethanol theo các tỷ lệ khác nhau. Tỷ lệ ure/FFA thay đổi từ 0,5/1 đến 4/1 (w/w); Tỷ lệ ethanol/FFA cố định là 5/1 (v/w). Khuấy và gia nhiệt ở 65°C cho đến khi hỗn hợp tan hoàn toàn. Tiếp tục duy trì ở nhiệt độ này trong 2h. Sau đó, dung dịch được làm lạnh ở -10 đến 10°C trong thời gian từ 2-20 giờ. Phần kết tinh trong ure được lọc bỏ và thu phần dung dịch chứa hỗn hợp acid oleic và linoleic. Hỗn hợp này được cất loại một phần dung môi cho đến khi còn 1/3 thể tích và điều chỉnh pH môi trường đến 2-3 bằng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% thu được hỗn hợp acid oleic và linoleic. Sản phẩm được rửa sạch, sấy khô ở 105°C (cho đến khi khối lượng không đổi) và cân lượng thu được.

Thành phần và hàm lượng acid được xác định bằng sắc ký khí (GC-MS).

Hiệu suất tách được tính theo công thức:

$$H(\%) = \frac{m_1}{m} \times 100\%$$

Trong đó: m: Khối lượng hỗn hợp acid béo không no ban đầu (g)

m<sub>1</sub>: Khối lượng acid béo không no thu được sau khi tách (g)

*Bước 3. Điều chế muối kali của các acid béo*

100g hỗn hợp acid oleic và linoleic với tỉ lệ phù hợp vào 100ml ethanol tạo dung dịch đồng nhất. Tiến hành nhỏ giọt từ từ dung dịch KOH 20% đến khi pH ≤ 8,5. Duy trì phản ứng ở nhiệt độ 70°C, trong thời gian 120 phút. Sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng, lọc và rửa sản phẩm bằng aceton. Sản phẩm có thể được làm

sạch bằng kết tinh lại trong aceton và sấy ở 70 - 80°C đến khối lượng không đổi. Hàm lượng muối được xác định thông qua tính hàm lượng acid còn lại trong sản phẩm (tính chỉ số acid tự do của sản phẩm).

Ngoài ra, hàm lượng của muối của acid béo được xác định thông qua hàm lượng methyl este dựa trên nguyên lý là xử lý muối với một acid mạnh để loại bỏ cation  $K^+$  và tạo ra acid béo. Sau đó methyl hóa với tác nhân tạo sản phẩm methyl hóa để có thể phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp. Ở đây tác nhân  $BF_3$  trong methanol được lựa chọn. Quá trình này được thực hiện bằng cách phản ứng của hỗn hợp muối trong ống nghiệm với sự có mặt của  $BF_3$  trong methanol ở 70°C trong 30 phút. Sau khi làm lạnh hỗn hợp phản ứng được bơm trực tiếp vào máy GC-MS. Kết quả tỷ lệ methyl oleat/methyl linoleat (w/w) chính là tỷ lệ của muối kali oleat/kali linoleat (w/w).

### **2.3.3.2. Điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Imidacloprid**

Điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Imidacloprid bao gồm 3 bước như sau:

*Bước 1. Tổng hợp hỗn hợp methyl este của acid béo (FAME) từ dầu thực vật sử dụng xúc tác chất lỏng ion  $mimC_4H_8SO_3H.CH_3SO_3$*

Hỗn hợp nguyên liệu gồm 10g dầu thực vật và methanol (tỉ lệ mol methanol/dầu thay đổi từ 3/1 đến 18/1) được đưa vào bình 3 cổ có lắp sinh hàn, nhiệt kế và khuấy từ. Nhiệt độ phản ứng được giữ cố định bằng nồi dầu glycerol. Gia nhiệt đến nhiệt độ phản ứng (từ 30-75°C) trong điều kiện khuấy (từ 2-12h) Khi đạt nhiệt độ, đưa dung dịch xúc tác (từ 2-20%) hòa tan trong methanol vào bình phản ứng. Lượng methanol, tính toán sao cho tổng lượng methanol đưa vào ban đầu và lượng methanol dùng để hòa tan xúc tác đúng bằng lượng methanol cần dùng cho phản ứng. Mẫu được lấy định kỳ theo thời gian và xử lý để xác định hàm lượng các methyl este (FAME).

Hỗn hợp sau phản ứng, được làm lạnh nhanh về nhiệt độ phòng và để lắng trong 2 giờ. Sau đó, tách riêng các pha. Rửa pha trên chứa sản phẩm, sau phản ứng este hóa chéo bằng nước cất nóng và bằng nước muối 10% nóng (90°C). Sấy đuổi nước ở 110°C trong 8 giờ.

Thu hồi và tinh chế xúc tác như sau: Pha chứa xúc tác được chưng cất ở 65°C để loại methanol dư, chưng cất ở 100°C dưới chân không để loại nước và ở 200°C dưới chân không để loại glycerol. Phần cặn sau khi chưng cất là pha giàu xúc tác, có thể bổ sung thêm xúc tác cần thiết và quay vòng tái sử dụng.

*Bước 2. Tách loại các FAME bão hòa và nâng cao hàm lượng methyl oleat*

Để thu được methyl oleat có hàm lượng cao, cần loại bỏ các FAME bão hòa. Quá trình này được thực hiện theo 2 giai đoạn:

Giai đoạn 1: Tách loại FAME bão hòa

Làm lạnh hỗn hợp FAME về 10°C để loại bỏ các FAME bão hòa. Cho hỗn hợp FAME vào dung dịch ure và ethanol theo các tỷ lệ khác nhau (tỷ lệ ethanol/FAME thay đổi từ 3/1 (v/w) đến 7/1 (v/w), trong thời gian từ 0 đến 18h). Khuấy và gia nhiệt ở 50°C cho đến khi tan hoàn toàn. Tiếp tục đun ở nhiệt độ 50°C trong 2h. Sau đó làm lạnh ở 10°C và thu phần dịch lỏng chứa methyl este không bão hòa. Hỗn hợp này được cất loại một phần dung môi cho đến khi còn 1/3 thể tích và điều chỉnh pH môi trường đến 2-3 bằng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% thu hỗn hợp FAME không bão hòa. Sản phẩm được rửa sạch, sấy khô ở 105°C (cho đến khi khối lượng không đổi) và cân lượng thu được.

Đánh giá chất lượng qui trình thông qua độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi. Độ tinh khiết là hàm lượng của từng acid béo sau khi xử lý.

Hiệu suất thu hồi được tính như sau:

$$\text{Hiệu suất thu hồi}(\%) = \frac{m_1}{m} \times 100\%$$

Trong đó: m: Khối lượng FAME không bão hòa thu được (g)

m<sub>1</sub>: Khối lượng FAME ban đầu (g)

Giai đoạn 2: Tách loại methyl linoleat

Sau khi loại bỏ gần như hoàn toàn các FAME bão hòa, tiếp tục bổ sung ure với tỷ lệ ure/FAME là 1/1 (w/w), tỷ lệ ethanol/FAME là 5/1 (v/w). Làm lạnh dung dịch từ 10°C đến -20°C để nâng cao hàm lượng methyl oleat. Sản phẩm thu được methyl oleat với hàm lượng cao.

### **2.3.4. Chế tạo hỗn hợp chất hiệp đồng và hoạt chất BVTV**

#### **2.3.4.1. Chế tạo hỗn hợp chất hiệp đồng và Bt**

##### *a. Xây dựng công thức hỗn hợp giữa chất hiệp đồng và thuốc trừ sâu Bt*

Tiến hành hỗn hợp giữa chất hiệp đồng S1 (hỗn hợp K-oleat/K-linoleat) với thuốc trừ sâu Bt theo các tỷ lệ khác nhau (cố định hàm lượng Bt, hàm lượng chất hiệp đồng thay đổi từ 0,5 đến 2 lần hàm lượng Bt). Lựa chọn sản phẩm chứa hoạt chất Bt hiện đang lưu hành để so sánh là Vi-BT 16.000WP. Các sản phẩm hỗn hợp tạo ra được thử hiệu lực sinh học tại Viện Bảo vệ thực vật, Bộ Nông nghiệp và PTNT. Từ kết quả thu được, có thể xác định tỷ lệ hỗn hợp tối ưu giữa chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt.

Các công thức thí nghiệm bao gồm: Hỗn hợp S1/Bt theo các tỷ lệ khối lượng khác nhau: 0,5/1; 1/1; 1,5/1; 2/1. Tất cả các công thức thí nghiệm đều phun với nồng độ 0,25%.

##### *b. Chế tạo sản phẩm hỗn hợp chất hiệp đồng và Bt*

Sau khi xác định tỷ lệ chất hiệp đồng với Bt tối ưu, tiến hành chế tạo hỗn hợp trong máy trộn, cho đến khi sản phẩm đồng nhất. Trong trường hợp sản phẩm ẩm, có thể để khô tự nhiên hoặc để trong phòng hút ẩm.

#### **2.3.4.2. Chế tạo hỗn hợp chất hiệp đồng và Imidacloprid**

##### *a. Xây dựng công thức hỗn hợp giữa chất hiệp đồng và thuốc trừ rầy Imidacloprid*

Chất hiệp đồng sẽ được hỗn hợp với hoạt chất Imidacloprid trừ rầy. Đầu tiên cần nghiên cứu lựa chọn tỷ lệ hỗn hợp tối ưu giữa chất chất hiệp đồng (S2) và Imidacloprid (I) nhằm cho hiệu quả phòng trừ rầy cao nhất. Các tỷ lệ khối lượng S2/I cần khảo sát là: 0,5/1; 1/1; 2/1; 2,5/1; 3/1. Các sản phẩm hỗn hợp tạo ra được thử hiệu lực sinh học tại Viện Bảo vệ thực vật, Bộ Nông nghiệp và PTNT. Từ kết quả thu được, có thể xác định tỷ lệ hỗn hợp tối ưu giữa chất hiệp đồng với thuốc trừ rầy Imidacloprid.



### *b. Chế tạo sản phẩm hỗn hợp chất hiệp đồng và Imidacloprid*

Sau khi xác định tỷ lệ chất hiệp đồng với Imidacloprid tối ưu, tiến hành chế tạo sản phẩm hỗn hợp trong máy trộn. Khuấy hỗn hợp cho đến khi tạo sản phẩm đồng nhất. Cặn cơ học được lọc bỏ. Sản phẩm đựng trong bình thủy tinh kín, lưu giữ ở nhiệt độ phòng.

#### **2.3.5. Khảo nghiệm sơ bộ hiệu lực sinh học của sản phẩm mới**

- *Mục đích khảo nghiệm:*

- Xác định nồng độ sử dụng và đánh giá hiệu quả phòng trừ của sản phẩm mới đối với sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*) và rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.). So sánh với sản phẩm cùng loại.

- Xác định chỉ số hiệp đồng (Synergist Factor) của hỗn hợp K-oleat + K-linoleat, qua đó đánh giá khả năng làm tăng hiệu lực sinh học của chất hiệp đồng đối với thuốc trừ sâu Bt.

- Xác định chỉ số hiệp đồng (Synergist Factor) của Methyl oleat, qua đó đánh giá khả năng làm tăng hiệu lực sinh học của chất hiệp đồng đối với Imidacloprid.

- *Phương pháp và nội dung khảo nghiệm đối với sâu tơ*

- Qui mô, địa điểm và thời gian khảo nghiệm : Khảo nghiệm trên đồng ruộng thuộc vùng trồng rau tại Xã Tiên Phong, Mê Linh, Hà Nội. Thời gian khảo nghiệm: tháng 10 - 11/2014

- Vật liệu: Thuốc trừ sâu mới BT-S 16WP (hỗn hợp giữa chất hiệp đồng và Bt) và sản phẩm so sánh là thuốc trừ sâu Vi-BT 16.000WP (16.000 IU/mg vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*) của VIPESCO, nồng độ sử dụng là 2,5g/L.

- Đối tượng khảo nghiệm: Sâu tơ hại su hào (*Plutella xylostella*), tuổi 2-3.

- *Phương pháp và nội dung khảo nghiệm đối với rầy nâu*

- Địa điểm và thời gian khảo nghiệm: Khảo nghiệm được tiến hành tại ruộng lúa thuộc xã Đại Đồng, Huyện Thạch Thất, ngoại thành Hà Nội. Thời gian: Vụ mùa năm 2015.

- Vật liệu: Thuốc trừ rầy mới Imidacloprid-S 50EC và sản phẩm so sánh là thuốc trừ rầy Vicondor 50EC của VIPESCO. Nồng độ sử dụng theo khuyến cáo là 1ml/L nước (0,1%).

- Đối tượng khảo nghiệm: rầy nâu hại lúa tuổi 2-3.

- *Đánh giá hiệu quả*

Hiệu quả của thuốc trên đồng ruộng được hiệu đính bằng công thức Henderson-Tilton.

$$H (\%) = \left(1 - \frac{Ta \times Cb}{Tb \times Ca}\right) \times 100$$

Trong đó:

+ H(%): là hiệu lực của thuốc tính theo phần trăm

+ Ta: là số cá thể côn trùng sống ở công thức xử lý thuốc sau phun

+ Tb: là số cá thể côn trùng sống ở công thức xử lý thuốc trước phun

+ Ca: là số cá thể côn trùng sống ở công thức đối chứng sau phun

+ Cb: là số cá thể côn trùng sống ở công công thức đối chứng trước phun

- Xác định hiệu quả của sản phẩm mới so với sản phẩm không có chất hiệp đồng

Áp dụng công thức:

$$E \% = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó:

E %: Hiệu quả phòng trừ của sản phẩm mới

A: Hiệu quả phòng trừ của hỗn hợp thuốc trừ sâu với chất hiệp đồng

B: Hiệu quả phòng trừ của thuốc trừ sâu không có chất hiệp đồng.

- Chỉ số hiệp đồng SF:

$$SF = A : B$$

Trong đó:

SF: Chỉ số hiệp đồng

A: Hiệu quả phòng trừ của hỗn hợp thuốc trừ sâu với chất hiệp đồng

B: Hiệu quả phòng trừ của thuốc trừ sâu không có chất hiệp đồng

### **2.3.6. Bước đầu nghiên cứu cơ chế tác động của các chất hiệp đồng**

#### **2.3.6.1. Chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu vi sinh Bt**

*a. Tách chiết protein tinh thể chủng Bt. Kustaki*

Thực nghiệm này được thực hiện tại Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

-Vật liệu : Chủng Bt sử dụng: *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki* TC 1.1 trong bộ sưu tập Bt Việt Nam do Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN cung cấp.

Đặc điểm chủng: được phân lập từ đất tại Thanh Quang (Hà Tây cũ), mang các gen cry1Ab, 1Ac, 1D và vip2; có hoạt tính diệt sâu tơ 90%.

- Phương pháp:

+*Phương pháp thử hoạt tính diệt sâu tơ của vi khuẩn và độc tố* : Thử hoạt tính theo phương pháp của Thiery và Frachon [98].

+ *Phương pháp tách chiết protein tinh thể chủng Bt . kustaki TC1.1* theo Werneck [99]

*b. Nghiên cứu cơ chế tác động của chất hiệp đồng đối với enzymaminopeptidase (APN)*

Thực nghiệm được thực hiện tại phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KHCNVN

- Nguyên lý của phương pháp xác định hoạt tính của enzym APN dựa trên phản ứng phân cắt cơ chất L-leucine p-nitroanilide nhờ tác động của enzym APN, qua đó giải phóng sản phẩm là p -nitroaniline có màu vàng . Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng tại bước sóng 405 nm ở thời điểm 20 phút sau phản ứng phản ánh lượng sản phẩm p-nitroaniline sinh ra, qua đó phản ánh hoạt độ của enzym APN.

-Vật liệu gồm: Tricine - nồng độ 200 mM, methanol nồng độ 0.4% (v/v), L-leucine p-Nitroanilide - nồng độ 1 mM, Bovine serum albumin - nồng độ 0.05% (w/v) và aminopeptidase - nồng độ 30 unit/ml.

*Chú thích:* Tricine, L-leucine p-Nitroanilide, Bovine serum albumin, Aminopeptidase do Công ty Sigma cung ứng.

+ Xác định hoạt tính aminopeptidase được thực hiện trên đĩa 96 giếng bằng phương pháp của Prescott [100]; Spungin [101], Luan [102]

Mẫu thử được pha loãng bằng DMSO 10% đến nồng độ đầu phản ứng là 1- 5 mg/ml. Sau khi enzym được ủ với chất thử trong 18 giờ ở nhiệt độ 4°C, cơ chất bao gồm CDNB và GSH được thêm vào hỗn hợp. Phản ứng enzym với cơ chất xảy ra ở nhiệt độ 25 °C trong 1 phút. Độ hấp thụ của phản ứng được xác

định trên máy Bio-Rad Elisa reader với bước sóng 340 nm (A).

### 2.3.6.2. *Chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid*

#### a. *Nghiên cứu khả năng ức chế enzym Glutathione S-Tranferases*

Thực nghiệm được thực hiện tại phòng sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KHCNVN

- Nguyên lý: Dựa trên phản ứng liên kết của nhóm thiol trong phân tử Glutathione với cơ chất 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) nhờ tác động của enzym GST, tạo ra sản phẩm GS-DNB có phổ hấp thụ tại bước sóng 340nm. Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng phản ánh lượng sản phẩm GS-DNB được sinh ra, qua đó phản ánh hoạt độ của enzym GST.



- Phương pháp

+ Vật liệu bao gồm : Glutathione S -Tranferases – nồng độ 0, 25 mg/ml; trong các mẫu thử ở nồng độ khác nhau ; 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene - nồng độ 63 mM (CDNB), Glutathione - nồng độ 10mM. Imidacloprid 99% (Sigma).

*Chú thích:* Glutathione S-Tranferases, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, Aminopeptidase do Công ty Sigma cung ứng. Imidacloprid 99% (Sigma).

+ Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzym GST được thực hiện trên đĩa 96 giếng [103, 104, 105].

#### b. *Nghiên cứu khả năng ức chế enzym Cytochrome P450 monooxygenase*

Hoạt tính của cytochrome P450 monooxygenase được xác định dựa trên phản ứng O-deethylat hóa 7-ethoxycoumarin thành 7-hydroxycoumarin dưới tác dụng của enzym và cơ chất [106].

*Phương pháp:*

50  $\mu\text{L}$  enzym và 40  $\mu\text{L}$  dung dịch đệm kali phosphat (0,1M, pH 7,6, chứa 0,5  $\mu\text{L}$  7-ethoxycoumarin 100 mM trong aceton) được đưa vào phiến 96 giếng. Phản ứng bắt đầu bằng cách thêm 10  $\mu\text{L}$  dung dịch cơ chất nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH) vào từng giếng sao cho nồng độ cuối cùng của NADPH là 0,1 mM và 7-ethoxycoumarin là 0,5 mM. Các phiến được ủ

30 phút ở 30 °C có lắc. Các NADPH tự phát sáng được thu hồi bằng cách thêm 10 µl glutathione oxy hóa (30 mM trong nước) và 10 µl glutathione khử (0,5 đơn vị). Phản ứng ở nhiệt độ phòng sau 15 phút thì dừng với 120 µl 50% acetonitril trong chất đệm TRIZMA-base (0,05 M, pH 10). Lượng 7-hydroxycoumarin sinh ra được định lượng bằng spectrofluorimeter (TECAN) tại 465 nm, kích thích tại 390 nm.

Vật liệu: Cơ chất nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH); Dibenzylfluorescein, dịch đệm Kali phosphat 0,5M (pH 7.4) – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>–CYP (hoạt tính và bất hoạt), ketoconazole (1,88 M).

### **2.3.6.3. Đánh giá khả năng ức chế enzym của mẫu thử**

Khả năng ức chế enzym APN (GST,CYP) của mẫu thử được xác định bằng công thức:

$$\text{Độ ức chế (\%)} = \frac{A \text{ mẫu thử}}{A \text{ đối chứng dương}} \times 100\%$$

Trong đó:

A mẫu thử: OD của mẫu thử nghiệm ở 465nm

A đối chứng dương: OD của mẫu đối chứng dương ở 465nm

IC<sub>50</sub> là nồng độ chất thử ức chế 50% hoạt động của enzym APN (GST, CYP) được tính bằng phần mềm Table Curve 2D, phiên bản số 4

## **2.4. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG NGUYÊN LIỆU VÀ SẢN PHẨM**

### **2.4.1. Phân tích chất lượng nguyên liệu và sản phẩm chất hiệp đồng**

- Xác định độ ẩm, hàm lượng tro, hàm lượng protein của hạt sỏ và hạt đào theo tiêu chuẩn TCVN 7035:2002; TCVN 8124:2009; TCVN 8125:2009 tại trung tâm chứng nhận phù hợp (Quacert) – Tổng cục đo lường chất lượng.

- Chỉ số acid (TAN) được phân tích theo tiêu chuẩn ASTM D974

- Hàm lượng FAME trong sản phẩm được phân tích theo tiêu chuẩn EN 14103. Khi dùng phương pháp này, các mẫu sau khi lấy khỏi hỗn hợp phản ứng, trước khi phân tích, được chiết với hỗn hợp nước và η-hexan (với tỷ lệ 1:1).

- Tỷ trọng đo theo phương pháp khối lượng riêng của sản phẩm hóa học dạng lỏng ở 20<sup>0</sup>C theo TCVN 3731-82 tại Phòng TNTĐ Công nghệ lọc hóa dầu – Viện HHCN VN.

-Độ nhớt động học ở 40<sup>0</sup>C được phân tích theo tiêu chuẩn TCVN3171/ASTM 445

- Xác định chỉ số Iot và chỉ số xà phòng của dầu thực vật lựa chọn được phân tích theo tiêu chuẩn TCVN 6122-07 và TCVN 6126-96.

#### **2.4.2. Phân tích chất lượng sản phẩm thuốc trừ sâu mới**

- Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm mới chứa Bt theo TCVN 8050:2009 và TCCS 09:2010/BVTV về “Thuốc bảo vệ thực vật chứa vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* – Yêu cầu kỹ thuật và Phương pháp thử nghiệm”. Các chỉ tiêu bao gồm: Độ mịn, độ bọt, tỷ suất lơ lửng, độ bền bảo quản.

- Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm mới chứa Imidacloprid theo qui định tại TCCS 07:2006 về “Thuốc trừ sâu chứa hoạt chất Imidacloprid - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử” và TCCS 135:2014 về “Thuốc BVTV- Yêu cầu kỹ thuật”. Các chỉ tiêu chất lượng cần kiểm tra bao gồm: hàm lượng hoạt chất, độ bền nhũ tương, độ bọt, độ bền bảo quản.

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. KHẢO SÁT VÀ XÁC ĐỊNH CHẤT HIỆP ĐỒNG CHO THUỐC TRỪ SÂU BT VÀ IMIDACLOPRID

Đối tượng côn trùng lựa chọn để nghiên cứu tác dụng của chất hiệp đồng khi hỗn hợp với thuốc trừ sâu Bt là sâu tơ (*Plutella xylostella*) hại rau và rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.) tại Việt Nam. Các chất hiệp đồng được lựa chọn để khảo sát là acid oleic, acid linoleic và các dẫn xuất methyleste và muối kali tương ứng vì chúng có hoạt tính sinh học cao, có nhiều nghiên cứu ứng dụng và có nguồn gốc từ dầu thực vật sẵn có, thân thiện với môi trường.

Nguồn nguyên liệu ban đầu để điều chế các chất hiệp đồng là các acid béo không no C<sub>18</sub> (acid oleic, acid linoleic) có trong các dầu thực vật sẵn có tại Việt Nam. Do vậy đầu tiên cần khảo sát, xác định thành phần các acid béo này trong các dầu thực vật, làm căn cứ để tiến hành nghiên cứu tiếp.

##### 3.1.1. Khảo sát thành phần các acid béo không no C18 (acid oleic, acid linoleic) có trong dầu thực vật

Sử dụng phương pháp phân tích bằng GC-MS (ứng với STT từ 8-20) và tham khảo các tài liệu đã công bố [107-109] (ứng với STT từ 1-7), hàm lượng dầu, thành phần các acid oleic và linoleic trong dầu của một số loại hạt được trình bày tại bảng 3.1.

Bảng 3.1. Hàm lượng dầu và thành phần acid oleic, linoleic trong dầu của một số loại hạt

Số TT	Tên hạt	Tên khoa học	Hàm lượng dầu(%)	Hàm lượng acid oleic (%)	Hàm lượng acid linoleic (%)	Địa điểm thu hái	Ghi chú
1	Cao su	<i>Hevea brasiliensis</i>	40-60	35,07	42,36		
2	Đậu tương	<i>Glycine max</i>	23,1	32,0	53,4		[128]
4	Lạc	<i>Arachis hypogaea</i>	44,5	41,6	34,9		

5	Trôm	<i>Sterculia foetida</i>	52,36	38,88	8,83	Sơn La	
6	Lai	<i>Aleurites moluccana</i> (L)	68,93	24,26	40,17		[129]
7	Vừng	<i>Sesamum indicum</i>	53,32	32,25	40,67	Quảng Trị	[130]
8	Sở	<i>Camellia sasanqua</i> Thunb.)	60,4	79,48	9,29	Quảng Ninh	
9	Trám trắng	<i>Canarium tokinensis</i>	2,48	14,9	81,13	Sơn La	
10	Kê	<i>Setaria italica</i> (L.) Beauv.	3,5	16,39	80,35	Hòa Bình	
11	Trám chim	<i>Canarium tokinensis</i>	5,1	1,23	71,88	Hà Nội	
12	Hồi lá nhẵn	<i>Llicium leiophyllum</i>	10,2	-	72,8	Tam Đảo	
13	Khô sâm nam	<i>Brucea javanica</i> (Bumea) Merr.	5,3	49,7	35,34	Đắk Lắk	
14	Sòi tía	<i>Sapium dicolor</i>	21,32	52,97	30,61	Hà Nội	
15	Dâu da xoan	<i>Allospondias lakonensis</i>	8,7	16,9	68,1	Hà Nội	
16	Hạt đào	<i>Prunus persica</i>	35,2	55 ,0	32,5	Lào Cai	
17	Hạt cải	<i>Brassica napus</i>	43,1	60,0	19,6	Hà Giang	
18	Hạt muồng truông	<i>Zanthoxylum avicennae</i>	17,69	66,73	11,18		
19	Hạt chuối rừng	<i>Musa acuminata</i>	0,58	53,47	25,62		
20	Hạt xoài	<i>Mangifera indica</i> L	4,2	38,36	6,82		

Kết quả nêu tại bảng 3.1 sẽ được sử dụng để lựa chọn các loại dầu thực vật phù hợp cho nghiên cứu điều chế các chất hiệp đồng ở các bước tiếp theo.

### 3.1.2. Xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt

Theocáckết quả đã công bố ở phần Tổng quan, hỗn hợp K-oleat + K-linoleat với tỷ lệ % khối lượng 54+43 có tác dụng hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt để diệt loài bướm đêm vùng Bắc Mỹ *Choristoncura occidentalis* [68] và với thuốc Pirimicarb diệt rệp hại bắp cải *Brevicoryne brassicae* (L.) [70]. Tuy nhiên



chưa có tài liệu nào nghiên cứu ứng dụng vào phòng trừ sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*) tại Việt Nam. Do vậy, nhiệm vụ đầu tiên của Luận án là khảo sát, xác định chất có tác dụng hiệp đồng tốt nhất cho thuốc trừ sâu Bt trong phòng trừ đối tượng côn trùng này.

Trong số các chất tham khảo, các hợp chất sau đây hỗn hợp với thuốc trừ sâu Bt được lựa chọn để thí nghiệm:

- S1: Hỗn hợp K- oleat + K- linoleat theo tỉ lệ % khối lượng: 54+43
- S2: K-oleat 54%
- S3: K-linoleat 43%
- S4: K-oleat / K-linoleat: 54/13
- S5: K-oleat / K-linoleat: 54/33
- S6: K-oleat / K-linoleat: 14/43
- S7: K-oleat / K-linoleat: 34/43
- S8: K-oleat / K-linoleat: 44/43
- S9: Hỗn hợp acid oleic + acid linoleic theo tỷ lệ 54/43
- S10: Dầu thực vật lựa chọn
- S11: Sản phẩm muối kali của dầu thực vật lựa chọn

Từ bảng 3.1 có thể nhận thấy hạt đào (số thứ tự 16) chứa hàm lượng dầu cao và thành phần các acid oleic và linoleic phù hợp làm nguyên liệu để điều chế chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt. Do vậy, dầu thực vật được lựa chọn để nghiên cứu điều chế chất hiệp đồng với thuốc Bt là dầu thu được từ hạt đào.

Sử dụng các công thức hỗn hợp giữa các chất từ S1 đến S11 với thuốc trừ sâu Bt theo tỷ lệ khối lượng: 1/1 (S/Bt:1/1) để khảo sát trong phòng thí nghiệm nhằm đánh giá hiệu quả phòng trừ trên sâu tơ hại rau họ thập tự, qua đó xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt. Sản phẩm so sánh là thuốc trừ sâu Vi-BT 16.000WP (Vi-BT). Để tiện so sánh, nồng độ sử dụng của hỗn hợp S/Bt được lựa

chọn là 0,25%. Hiệu quả phòng trừ sâu tơ qui mô phòng thí nghiệm được trình bày tại bảng 3.2.

Bảng 3.2. **Kết quả trừ sâu tơ trong phòng thí nghiệm của hỗn hợp S/Bt**

Công thức	Chất khảo sát (S)	Tỷ lệ(w/w) K-oleat/K-linoleat	Hiệu quả phòng trừ (%)	
			Sau 5 ngày	Sau 7 ngày
CT01	Vi-BT (so sánh), 0,25%	-	55,6abc	65,3bc
CT02	Vi-BT (so sánh), 0,125%	-	33,6e	35,7d
CT1	S1 + Vi-BT	54/43	66,7a	82,7a
CT2	S2 + Vi-BT	54/0	34,0de	37,6d
CT3	S3 + Vi-BT	0/43	19,6f	23,0e
CT4	S4 + Vi-BT	54/13	45,0cd	61,3c
CT5	S5 + Vi-BT	54/33	50,7bc	72,0abc
CT6	S6 + Vi-BT	14/43	52,0bc	63,3c
CT7	S7 + Vi-BT	34/43	54,0abc	69,9bc
CT8	S8 + Vi-BT	44/43	61,3ab	74,3ab
CT19	S9 + Vi-BT	Acid oleic/acid linoleic: 54/43	17,7f	38,5d
CT10	S10 + Vi-BT	Dầu hạt đào	17,9ef	27,2cd
CT11	S11 + Vi-BT	Muối kali của dầu hạt đào	37,6de	38,0d
CV%			4,1	4,3

*Nhận xét:*

Ở cùng liều lượng sử dụng 0,25%, hiệu quả diệt sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*) của các công thức chứa Bt và hỗn hợp K-oleat + K-linoleat ở các tỷ lệ

khác nhau (CT1 và CT4 đến CT8) đều cao hơn công thức chỉ có Bt (CT01), mặc dù hàm lượng hoạt chất Bt ở công thức này chỉ bằng 1/2 so với CT01. Như vậy, hỗn hợp K-oleat/K-linoleat có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả diệt sâu tơ (*Plutella xylostella*), làm tăng hiệu lực phòng trừ của thuốc trừ sâu Bt sau 7 ngày xử lý.

Trong số các công thức hỗn hợp, CT1 (tỷ lệ K-oleat/K-linoleat = 54/43) cho hiệu quả phòng trừ cao nhất (>82%) và gấp hơn 2 lần so với mẫu so sánh cùng nồng độ Bt CT02, chứng tỏ hỗn hợp K-oleat/K-linoleat theo tỷ lệ 54/43 có tác dụng hiệp đồng với Bt trong phòng trừ sâu tơ hại rau ở Việt Nam. Kết quả này cũng tương đương với các nghiên cứu của Michelle D. Gaudet khi sử dụng K-oleat/K-linoleat với Bt trừ loài bướm đêm vùng Bắc Mỹ *Choristoncra occidentalis* [60] và George S. Puritch và cộng sự khi sử dụng hỗn hợp này với Pirimicarb để diệt rệp bắp cải *Brevicoryne brassicae* (L) [70].

Ngoài ra, kết quả nêu tại bảng 3.2 cũng cho thấy hỗn hợp acid oleic/acid linoleic (tỷ lệ 54/43), dầu hạt đào và sản phẩm muối kali của dầu gân như không có tác dụng hiệp đồng với thuốc Bt trong phòng trừ sâu tơ hại rau. Tuy nhiên, khi hỗn hợp với thuốc, các chất này cũng đã cải thiện một phần hiệu lực phòng trừ của hỗn hợp thuốc, có thể do chúng có tác dụng làm tăng khả năng xâm nhập hoạt chất Bt vào cơ thể côn trùng, khiến chúng dễ bị trúng độc.

### **3.1.3. Xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid**

Cũng như trường hợp khảo sát lựa chọn chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt, đầu tiên cần khảo sát để xác định chất có tác dụng hiệp đồng tốt nhất với thuốc Imidacloprid trong phòng trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.) tại Việt Nam. Các hợp chất sau đây được lựa chọn để khảo sát hỗn hợp với Imidacloprid:

- S1: Methyl oleat
- S2: Methyl linoleat
- S3: Acid oleic
- S4: Acid linoleic

- S5: FAME của dầu thực vật lựa chọn

Căn cứ kết quả phân tích các loại dầu thực vật tại bảng 3.1 có thể nhận thấy dầu thu được từ hạt sỏ (Số thứ tự 8) chứa hàm lượng acid oleic rất cao, phù hợp làm nguyên liệu điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid. Do vậy dầu hạt sỏ được lựa chọn để khảo sát tiếp.

Sử dụng các công thức hỗn hợp giữa các chất từ S1 đến S4 với thuốc Imidacloprid theo tỷ lệ khối lượng:1/1 (S/I: 1/1) để khảo sát trong phòng thí nghiệm nhằm đánh giá hiệu quả phòng trừ rầy nâu hại lúa, qua đó xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid. Sản phẩm so sánh là thuốc trừ rầy chứa Imidacloprid Vicondor 50EC, nồng độ sử dụng theo khuyến cáo là 1,0ml/L (0,1%). Để tiện so sánh, nồng độ sử dụng của hỗn hợp S/I được lựa chọn là 1,0 ml/L (0,5 ml S+ 0,5 ml I). Hiệu quả trừ sâu tơ qui mô phòng thí nghiệm được trình bày tại bảng 3.3.

**Bảng 3.3. Kết quả trừ rầy nâu trong phòng thí nghiệm của hỗn hợp S/I**

CT	Chất khảo sát (S)	Liều lượng sử dụng (mg/L)	Hiệu quả phòng trừ (%)	
			Sau 3 ngày	Sau 5 ngày
CT1	S1 + I	0,5 S1 + 0,5 I	73,19a	84,86a
CT2	S2 + I	0,5 S2 + 0,5 I	55,36b	73,53b
CT3	S3 + I	0,5 S2 + 0,5 I	51,36b	62,31c
CT4	S4 + I	0,5 S2 + 0,5 I	48,24c	62,2c
CT5	S5 + I	0,5 S2 + 0,5 I	52,3b	63,4c
CT5	Vicondor 50EC	1,0	60,72b	69,83bc
CT6	Vicondor 50EC	0,5	41,13d	45,31d
CV%			4,2	4,5

*Nhận xét:*

Ở nồng độ sử dụng, sản phẩm Vicondor 50EC chỉ đạt được khoảng 69,83% hiệu quả phòng trừ, có nghĩa thuốc đã bị suy giảm hiệu lực đối với rầy nâu.

- Các công thức hỗn hợp S với Imidacloprid theo tỷ lệ 1/1 (từ CT1 đến CT5) đều cho hiệu quả trừ rầy cao hơn sản phẩm so sánh Vicondor 50EC khi sử dụng cùng nồng độ hoạt chất bằng 1/2 nồng độ khuyến cáo. Điều này cho thấy các acid oleic và linoleic và dẫn xuất methyleste tương ứng đều có tác dụng làm tăng hiệu lực của thuốc Imidacloprid. Tuy nhiên, hiệu quả tăng dần theo thứ tự:

Acid linoleic > Acid oleic > Methyl linoleat > Methyl oleat

- Ngoài ra, hỗn hợp methyleste của dầu hạt sỏ cũng có tác dụng tốt để nâng cao hiệu quả trừ rầy của Imidacloprid mặc dù hiệu quả chưa cao. Có thể các chất này có tác dụng như những dung môi hữu cơ làm tăng khả năng thẩm thấu hoạt chất vào cơ thể côn trùng nên hiệu quả trừ rầy của hỗn hợp tăng so với sản phẩm Vicondor 50EC dùng đơn.

Trong số các chất hỗn hợp với Imidacloprid, methyl oleat (CT1) cho hiệu quả phòng trừ rầy nâu cao nhất (gần 85%) dù chỉ sử dụng 1/2 nồng độ hoạt chất và gần như khắc phục hoàn toàn hiệu lực sinh học của Imidacloprid sau 7 ngày xử lý. Như vậy, methyl oleat là chất hiệp đồng tốt nhất với thuốc Imidacloprid trong phòng trừ rầy nâu hại lúa.

Dựa vào kết quả khảo sát trên, có thể lựa chọn dầu hạt sỏ (với thành phần acid oleic cao) làm nguyên liệu để điều chế methyl oleat làm chất hiệp đồng với Imidacloprid nhằm nâng cao hiệu quả trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.) tại Việt Nam

## **3.2. TÁCH DẦU THỰC VẬT BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦY PHÂN VỚI ENZYM LÀM NGUYÊN LIỆU ĐỂ TỔNG HỢP CHẤT HIỆP ĐỒNG**

### **3.2.1. Thành phần hóa học của hạt sỏ và hạt đào**

Kết quả phân tích hàm lượng các chất dinh dưỡng có trong hạt sỏ và hạt đào được trình bày trong bảng 3.4.

Theo kết quả phân tích, thành phần chính của hạt là dầu, protein, tinh bột.

**Bảng 3.4. Kết quả phân tích thành phần hóa học của hạt sỏ và hạt đào**

<b>Số TT</b>	<b>Tên chỉ tiêu</b>	<b>Phương pháp thử</b>	<b>Hạt sỏ</b>	<b>Hạt đào</b>
1	Độ ẩm (%)	TCVN 7035:2002	8,22	7,84
2	Hàm lượng protein tổng, tính theo khối lượng (%)	TCVN 8125:2009	6,8	25,44
3	Hàm lượng dầu, tính theo khối lượng (%)	TCVN9611:2013	60,4	35,2
4	Hàm lượng tro tổng, tính theo khối lượng (%)	TCVN 8124:2009	2,56	2,74
5	Hàm lượng tinh bột, tính theo khối lượng (%)	TCVN 4851:1989	9,15	6,93

### **3.2.2. Khảo sát lựa chọn enzym để tách dầu**

Thành phần hạt sỏ và hạt đào gồm cellulose, hemicellulose, pectin hay lignin. Dầu chứa trong các túi nội bào và túi “hạt protein” của tế bào [110]. Muốn tách dầu từ hạt sỏ hoặc hạt đào, có thể dùng các enzym cellulase, hemicellulase hay pectinase để phá vỡ cấu trúc tế bào hoặc enzym protease để thủy phân protein màng tế bào, màng túi dầu và tế bào chất, làm cho túi dầu bị vỡ và dầu được trích ly khỏi tế bào. Như vậy có nhiều loại enzym sử dụng để tách dầu từ hạt và cần khảo sát để lựa chọn enzym thích hợp, cho hiệu suất tách dầu cao nhất.

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của chủng loại enzym đến hiệu suất thu hồi dầu hạt đào và dầu hạt sỏ được trình bày bảng 3.5.

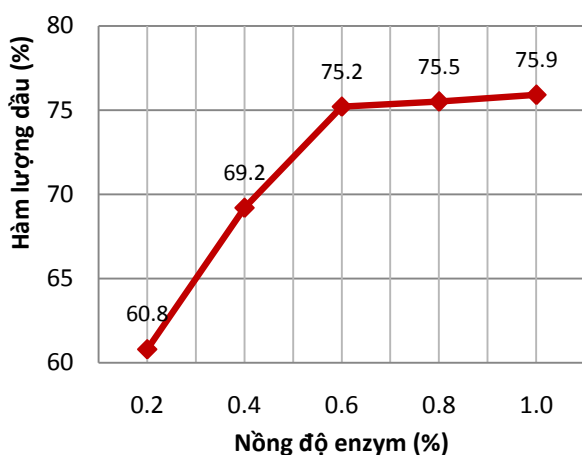
**Bảng 3.5. Ảnh hưởng của chủng loại enzym đến hiệu suất tách dầu hạt sỏ và dầu hạt đào**

<b>Chủng loại enzym</b>	<b>Hiệu suất tách dầu từ hạt sỏ (%)</b>	<b>Hiệu suất tách dầu từ hạt đào (%)</b>
Không có enzym	5	4
Enzym cellulase	45,2	40,6
Enzym protease	73,2	70,2
Enzym amylase	31,9	28,7
Enzym pectinase	50,5	46,5

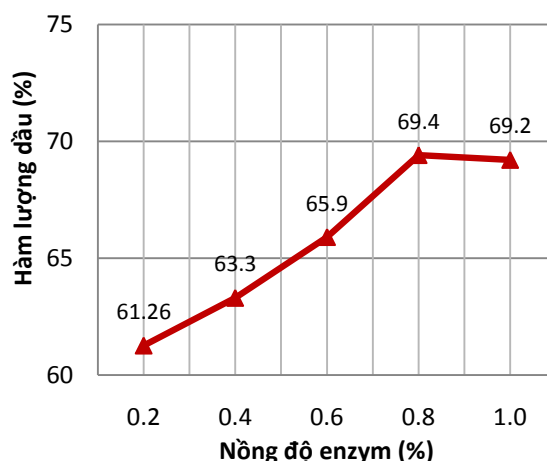
Kết quả cho thấy, khi không dùng enzym, hiệu suất thu nhận dầu hạt sỏ và dầu hạt đào thông qua quá trình thủy phân rất thấp. Bổ sung enzym để thủy phân giúp tăng hiệu suất một cách rõ rệt. Khi thủy phân với cùng loại dung môi, sử dụng enzym protease và pectinase cho hiệu suất tách dầu cao hơn enzym amylase và cellulase. Hiệu suất thu hồi dầu cao nhất thu được khi sử dụng enzym protease (73,2% đối với dầu hạt sỏ và 70,2% đối với dầu hạt đào). Điều này chứng tỏ ngoài khả năng phá vỡ cấu trúc cellulose, hemicellulose của thành tế bào, enzym protease còn có chức năng phá vỡ cấu trúc protein và nhũ hóa dầu trong môi trường. Vì vậy, lượng dầu giải phóng tăng lên. Dựa vào kết quả trên, enzym protease được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

### **3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ enzym đến hiệu suất tách dầu**

Sử dụng enzym protease trong quá trình thủy phân để tách dầu từ hạt sỏ và hạt đào. Ảnh hưởng của nồng độ enzym đến hiệu suất tách được khảo sát trong khoảng 0,1 -1,0%. Kết quả được trình bày trong hình 3.1 và 3.2.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzym đến hiệu suất tách chiết dầu hạt sỏ



Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzym đến hiệu suất tách chiết dầu hạt đào

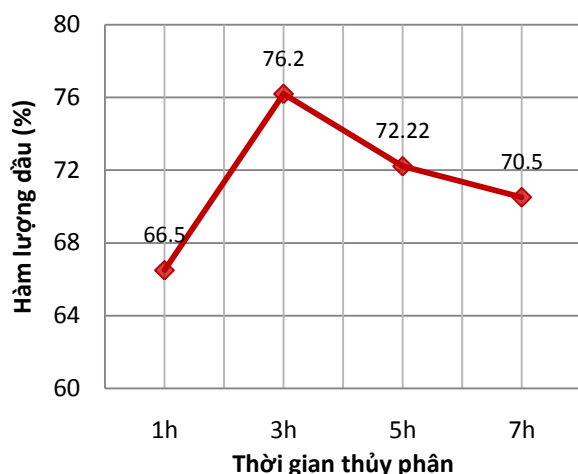
Với cả hai loại hạt, hiệu suất tách dầu tăng khi hàm lượng enzym tăng. Đối với hạt sỏ, khi tăng nồng độ của enzym từ 0,2 - 0,6%, hiệu suất thu dầu tăng lên đáng kể, từ 60,8 đến 75,2%. Sau đó hiệu suất gần như không tăng dù tăng hàm lượng enzym. Kết quả này có thể được giải thích như sau: khi hàm lượng enzym tăng, tương tác giữa enzym và cơ chất tăng, thúc đẩy quá trình phá vỡ liên kết peptide, tạo điều kiện cho dầu từ các “túi” được giải phóng, do đó hàm lượng dầu thu được cao hơn [111]. Tuy nhiên, khi lượng enzym quá nhiều, hiệu suất tăng lên không đáng kể có thể do protein kết hợp với dầu tạo thành dạng nhũ tương bền, dầu bị khó tách ở dạng tự do, dẫn đến hiệu suất thu dầu không tăng, thậm chí còn giảm.

Từ kết quả khảo sát trên, lựa chọn nồng độ enzym protease 0,6% để tách dầu từ hạt sỏ là hợp lý. Đối với hạt đào, nồng độ enzym sử dụng tối ưu là 0,8%, với hiệu suất tách dầu đạt 69,4%.

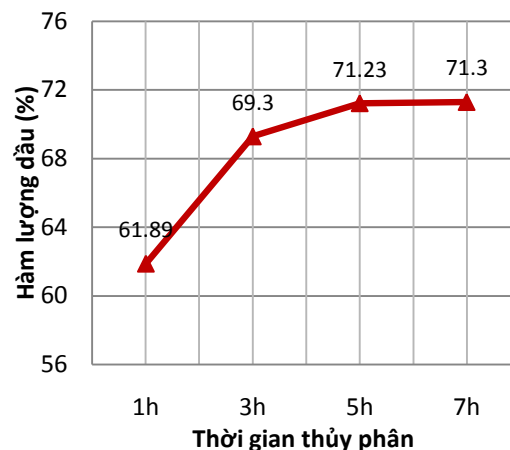
#### 3.2.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất tách dầu

Các thí nghiệm cũng được tiến hành tương tự, nhưng thay đổi thời gian thủy phân từ 1 đến 3 giờ. Kết quả ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất tách dầu từ hạt sỏ và hạt đào được thể hiện trên hình 3.3 và 3.4.





Hình 3.3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất tách dầu hạt sỏ



Hình 3.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất tách dầu hạt đào

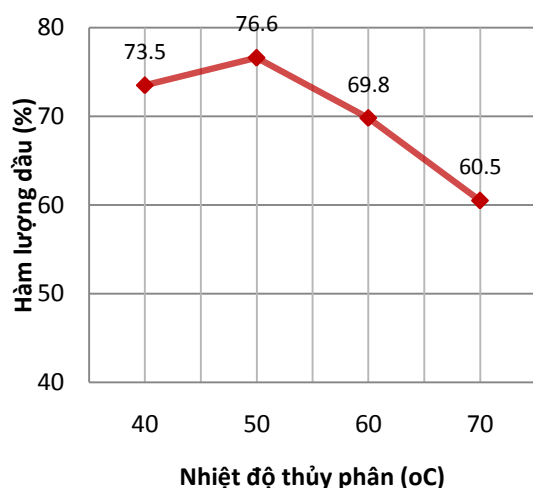
Từ các kết quả khảo sát có thể nhận thấy đối với cả hai loại dầu, hàm lượng dầu tách ra tăng theo thời gian thủy phân trong thời gian đầu. Sau đó hàm lượng dầu không tăng mà có xu hướng giảm. Nguyên nhân có thể trong giai đoạn đầu, số lượng tế bào chứa dầu bị phá vỡ tăng theo thời gian thủy phân, lượng dầu được giải phóng cũng tăng [112]. Tuy nhiên khi thời gian quá dài, hoạt tính của enzyme bị giảm dần làm cho tốc độ phản ứng chậm lại. Hơn nữa, ban đầu phản ứng diễn ra dễ dàng và nhanh do lượng cơ chất đủ lớn để tiếp xúc đối với enzyme. Về cuối phản ứng, lượng cơ chất và enzyme còn lại ít, tốc độ phản ứng diễn ra chậm dần. Vì vậy hiệu suất tách dầu không tăng.

Ngoài ra, do thời gian phản ứng quá dài, dầu thu được có thể bị thủy phân hoặc oxi hóa trong nước, ảnh hưởng đến chất lượng. Trong các nghiên cứu tách dầu từ hạt nho [113] và gấc [114] cho thấy, việc kéo dài thời gian phản ứng quá lâu có thể làm tăng đáng kể hàm lượng các acid béo tự do, ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm.

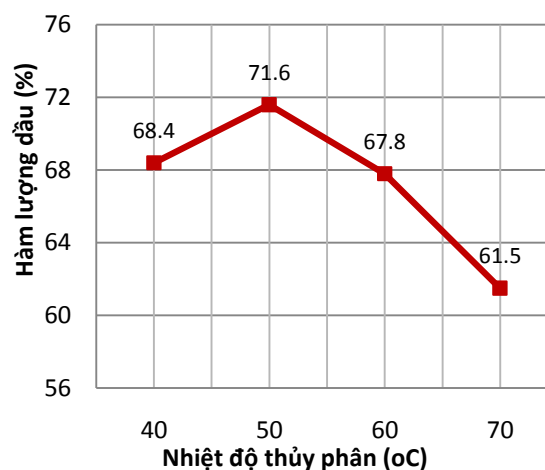
Như vậy, thời gian thích hợp trong phản ứng thủy phân dầu hạt sỏ là 3h, dầu hạt đào là 5h.

### 3.2.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất tách dầu

Để xác định nhiệt độ thủy phân tối ưu, các thực nghiệm được tiến hành trên enzyme protease với nhiệt độ thay đổi từ 40 đến 70°C. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất tách dầu được trình bày ở hình 3.5 và 3.6.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hiệu suất tách dầu hạt sỡ



Hình 3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hiệu suất tách dầu hạt đào

Để dàng nhận thấy, ở cả hai loại hạt, hiệu suất thu nhận dầu cao nhất ở 50°C (76,6% với dầu hạt sỡ và 71,6% với dầu hạt đào). Kết quả này tương tự với kết quả thu được từ các nghiên cứu khác (từ dầu oliu, dầu hạt thanh long) [115-117].

Theo Zu'nigavà cộng sự [118], khi nhiệt độ tăng trên 50°C, hoạt tính của enzyme giảm dần. Mặt khác ở nhiệt độ cao, xảy ra quá trình caramen hóa các đường có trong dung dịch, ảnh hưởng đến sự kết hợp của các túi dầu làm giảm hiệu suất thu nhận dầu. Đây là nguyên nhân hiệu suất thu nhận dầu giảm khi tăng nhiệt độ thủy phân lên cao. Vì vậy, nhiệt độ phản ứng thủy phân thích hợp cho cả hai loại hạt sỡ và đào là 50°C.

### 3.2.6. Ảnh hưởng của chế độ ly tâm đến hiệu suất tách dầu

Chế độ ly tâm trong quá trình tách dầu bằng phương pháp enzyme trong dung môi nước tác động mạnh đến hiệu suất tách dầu. Ly tâm thúc đẩy quá trình

tách pha dầu – nước, làm tăng hiệu suất thu nhận dầu. Vì vậy, lựa chọn chế độ ly tâm thích hợp là cần thiết.

Thực hiện các thí nghiệm tách dầu từ hạt sỏ và hạt đào bằng phương pháp thủy phân với enzym protease trong các điều kiện tối ưu đã được xác định ở các mục trên. Sản phẩm được ly tâm với các chế độ thay đổi như tốc độ và thời gian ly tâm. Kết quả ảnh hưởng của chế độ ly tâm đến hiệu suất thu nhận dầu được thể hiện trong bảng 3.6.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của chế độ ly tâm đến hiệu suất thu nhận dầu

Tốc độ ly tâm (vòng/phút)	Thời gian (phút)	Hiệu suất tách (%)		Mức độ phân tách pha
		Dầu hạt sỏ	Dầu hạt đào	
5.000	10	63,87	60,89	Tách 3 pha. Pha rắn kết dính không chặt, dễ tách khỏi thành ống ly tâm. Pha nước hơi đục, lớp nhũ tương mỏng giữa pha nước và dầu, không kết dính thành khối
	20	68,22	64,4	Tách pha tương đối rõ. Pha nước trong suốt, lớp nhũ tương kết không chặt
	30	71,9	67,1	Tách pha tương đối rõ. Pha nước trong suốt, lớp nhũ tương liên kết thành khối
10.000	10	76,9	71,3	Phân tách 3 pha. Pha rắn kết dính rất chặt lên thành ống. Pha nước trong suốt, lớp nhũ tương dày nhưng kết dính chặt với nhau thành một lớp màng

	15	76,9	71,3	Phân tách 3 pha. Pha rắn kết dính rất chặt lên thành ống. Pha nước trong suốt, lớp nhũ tương dày nhưng kết dính chặt với nhau thành một lớp màng
	20	76,9	71,3	Phân tách 3 pha. Pha rắn kết dính rất chặt lên thành ống. Pha nước trong suốt, lớp nhũ tương dày nhưng kết dính chặt với nhau thành một lớp màng

Có thể dễ dàng nhận thấy sự khác biệt về hiệu suất thu nhận dầu ở các chế độ ly tâm khác nhau. Tốc độ ly tâm càng lớn thì thời gian ly tâm càng ngắn. Điều này có ý nghĩa rất lớn trong thực tế sản xuất vì hạn chế tối đa các ảnh hưởng xấu đến chất lượng dầu. Ở tốc độ 10.000 vòng/phút, thời gian ly tâm tăng nhưng hiệu suất thu dầu không tăng. Vì vậy, chế độ ly tâm thích hợp là 10.000 vòng/phút, trong thời gian 10 phút.

Các thông số của quá trình thu nhận dầu từ hạt sỏ và hạt đào bằng thủy phân enzym được tóm tắt trong bảng 3.7.

**Bảng 3.7. Các thông số của quá trình chiết dầu sử dụng enzym**

<b>Thông số</b>	<b>Hạt sỏ</b>	<b>Hạt đào</b>
Enzym sử dụng	Protease	Protease
Nồng độ enzym (%)	0,6	0,8
Nhiệt độ thủy phân ( $^{\circ}\text{C}$ )	50	50
Thời gian thủy phân (h)	3	5
Chế độ ly tâm (vòng/phút)	10.000	10.000
Hiệu suất tách dầu (%)	76,9	71,3

### 3.2.7. Đánh giá chất lượng dầu hạt sỏ và dầu hạt đào

Kết quả đánh giá chất lượng dầu hạt sỏ và dầu hạt đào, thu được bằng phương pháp enzym được trình bày ở bảng 3.8.

Bảng 3.8. **Đặc tính, thành phần acid béo của mẫu dầu hạt sỏ và dầu hạt đào**

Số TT	Chỉ tiêu	Mẫu dầu hạt sỏ	Mẫu dầu hạt đào
1.	Màu sắc	Màu vàng sáng	Màu vàng sáng
2.	Tỷ trọng	0,915	0,916
3.	Chỉ số acid (mg KOH/g)	0,3	0,7
4.	Chỉ số xà phòng hóa (mg KOH/g)	192	191
5.	Chỉ số Iot (g I <sub>2</sub> /100g)	83	82
6.	Thành phần các acid béo (%)		
	- Acid palmitic (C16:0)	8,36	8,77
	- Acid Stearic (C18:0)	2,4	2,41
	- Acid Oleic (C18:1)	82,36	55,07
	- Acid Linoleic (C18:2)	9,77	32,50

Hai chỉ tiêu quan trọng nhất của dầu thực vật có liên quan đến công nghệ sản xuất là chỉ số acid và màu. Kết quả cho thấy dầu hạt sỏ và dầu hạt đào được tách bằng phương pháp sử dụng enzym protease không qua tinh luyện đạt chất lượng tốt. Do không chịu nhiệt độ cao nên mẫu dầu không biến đổi màu và mùi vị như các sản phẩm chế biến từ phương pháp ép nhiệt truyền thống.

Hàm lượng acid béo không no C<sub>18</sub> (acid oleic và linoleic) quan trọng nhất trong dầu hạt sỏ và dầu hạt đào thu được tương tự các nghiên cứu khác. Tỷ lệ acid oleic/linoleic là 55,07/32,50 trong dầu hạt đào và hàm lượng acid oleic là 82,36% trong dầu hạt sỏ có thể đáp ứng yêu cầu làm nguyên liệu tổng hợp chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và Imidacloprid.

### **3.3. ĐIỀU CHẾCHẤT HIỆP ĐỒNG CHO THUỐC TRỪ SÂU BT TỪ DẦU HẠT ĐÀO**

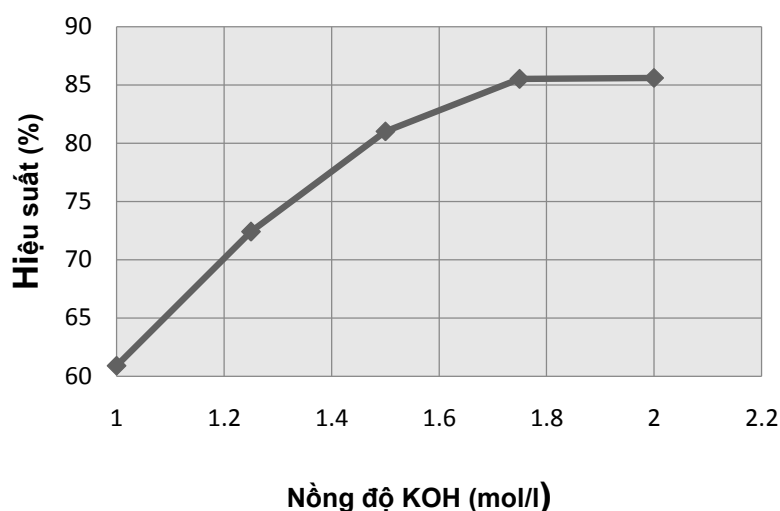
#### **3.3.1. Chuyển hóa dầu hạt đào thành hỗn hợp các acid béo**

Phương pháp chuyển hóa dầu hạt đào thành acid béo thông qua phản ứng thủy phân các glycerid trong dầu bằng KOH trong dung môi ethanol đã được lựa chọn. Quá trình thực hiện theo 2 giai đoạn, trong đó phản ứng giữa glycerid với KOH để tạo muối kali của các acid béo quyết định hiệu suất của cả quá trình. Các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến phản ứng này sẽ được khảo sát cụ thể là: nhiệt độ và thời gian phản ứng, nồng độ KOH trong dung môi ethanol...

##### ***3.3.1.1. Ảnh hưởng của nồng độ KOH trong dung môi ethanol đến hiệu suất thủy phân***

Theo các kết quả nghiên cứu của Jumat Salimon [120], tỷ lệ phản ứng tối ưu cho quá trình thủy phân glyceride với tác nhân KOH/ethanol là 100g glyceride trong 200ml hỗn hợp KOH/ethanol. Tuy nhiên, nồng độ KOH trong dung môi ethanol chưa được xác định. Kế thừa các kết quả này, ảnh hưởng của nồng độ KOH trong ethanol đến hiệu suất của quá trình thủy phân dầu hạt đào tiếp tục được khảo sát.

Các thực nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 70°C, thời gian phản ứng 2,5h, nồng độ KOH trong dung môi ethanol thay đổi từ 1M đến 2M. Kết quả được thể hiện ở hình 3.7.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của nồng độ KOH đến hiệu suất phản ứng

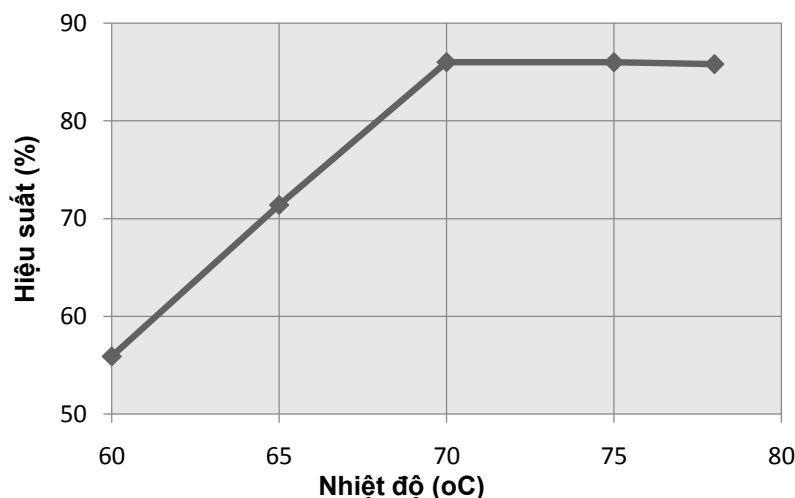
Kết quả trong hình 3.7 cho thấy, hiệu suất phản ứng thủy phân tăng nhanh, từ 60,9% đến 85,5% khi nồng độ KOH trong dung môi ethanol tăng đến 1,75M, sau đó ít thay đổi. Có thể nhận thấy nồng độ KOH trong dung môi ethanol chỉ ảnh hưởng đến hiệu suất thủy phân khi lượng KOH chưa đủ cho phản ứng, hiệu suất tăng theo nồng độ KOH. Khi lượng KOH đã cung cấp đủ, phản ứng diễn ra không phụ thuộc vào lượng KOH dư. Các nghiên cứu trên dầu Jatropha cũng cho kết quả tương tự [119].

Để tiết kiệm nguyên liệu và giảm thiểu ô nhiễm từ nước thải, lựa chọn nồng độ KOH/ethanol là 1,75M là thích hợp nhất. Ở nồng độ này, chỉ số acid của dầu hạt đào đạt 199 mgKOH/g.

### 3.3.1.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất thủy phân

Kết quả các nghiên cứu sơ bộ cho thấy quá trình thủy phân xảy ra rất chậm khi phản ứng thực hiện ở nhiệt độ dưới 50°C. Khi nhiệt độ tăng, quá trình thủy phân diễn ra nhanh. Như vậy, nhiệt độ ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình thủy phân dầu thực vật. Để nghiên cứu kỹ ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến quá trình thủy phân dầu hạt đào, nhiệt độ phản ứng được nghiên cứu khảo sát từ 60°C đến nhiệt độ bay hơi của ethanol (78°C). Các thông số khác được giữ cố định: tỷ

lệ ethanol/dầu: 200ml/100g, nồng độ KOH/ethanol là 1,75M, nồng độ ethanol là 80%, thời gian phản ứng 150 phút. Kết quả được trình bày tại hình 3.8.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất thủy phân dầu hạt đào

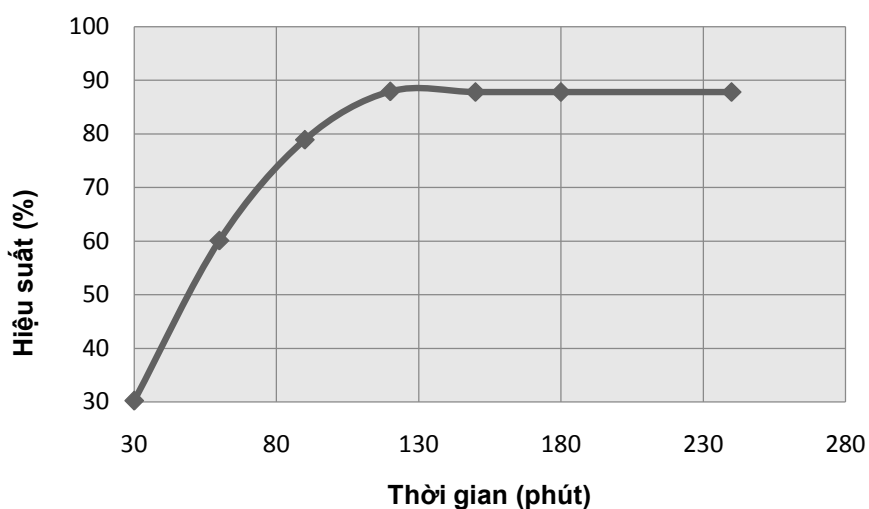
Từ các kết quả trên hình 3.8 cho thấy, trong khoảng nhiệt độ từ 60 đến 70°C, hiệu suất thủy phân dầu hạt đào tăng theo nhiệt độ. Nhưng khi nhiệt độ trên 70°C, hiệu suất phản ứng không tăng, thậm chí giảm nhẹ.

Có thể giải thích như sau: Khi nhiệt độ tăng cao hơn nhiệt độ sôi của dung dịch phản ứng, ethanol bốc hơi gây thiếu dung môi cho phản ứng, khả năng tiếp xúc giữa các tác nhân còn lại bị giảm, tốc độ phản ứng bị chậm lại, hiệu suất không tăng tiếp. Ngoài ra cần biết rằng, phản ứng thủy phân dầu thực vật có xu hướng thuận nghịch nên hiệu suất khó đạt cao nếu không tách ngay sản phẩm tạo thành. Trong trường hợp này, muốn tăng hiệu suất phản ứng > 85% rất khó thực hiện. Vì vậy, nhiệt độ 70°C là thích hợp cho phản ứng thủy phân dầu hạt đào. Ở nhiệt độ này, ethanol hồi lưu tốt, hiệu suất thu được là cao nhất (85,5%).

### 3.3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thủy phân

Thực nghiệm được tiến hành với thời gian phản ứng trong khoảng 30 đến 240 phút với tỷ lệ ethanol/dầu: 200ml/100g; nồng độ KOH/ethanol 1,75M; nồng độ ethanol 80%; nhiệt độ phản ứng 70°C. Kết quả ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thủy phân được trình bày trong hình 3.9.





Hình 3.9. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất thủy phân dầu hạt đào

Có thể thấy, thời gian đầu, từ 30 phút đến 120 phút, hiệu suất phản ứng thủy phân tăng nhanh do lượng các chất tham gia phản ứng còn nhiều, sản phẩm tạo thành ít. Sau đó tốc độ phản ứng dần chậm lại, hiệu suất tăng không đáng kể. Như vậy, 120 phút là thời gian thủy phân thích hợp cho chuyển hóa dầu hạt đào thành hỗn hợp acid béo.

Qua các thí nghiệm khảo sát trên, có thể rút ra điều kiện thích hợp cho phản ứng thủy phân dầu hạt đào để thu được hỗn hợp acid béo như sau:

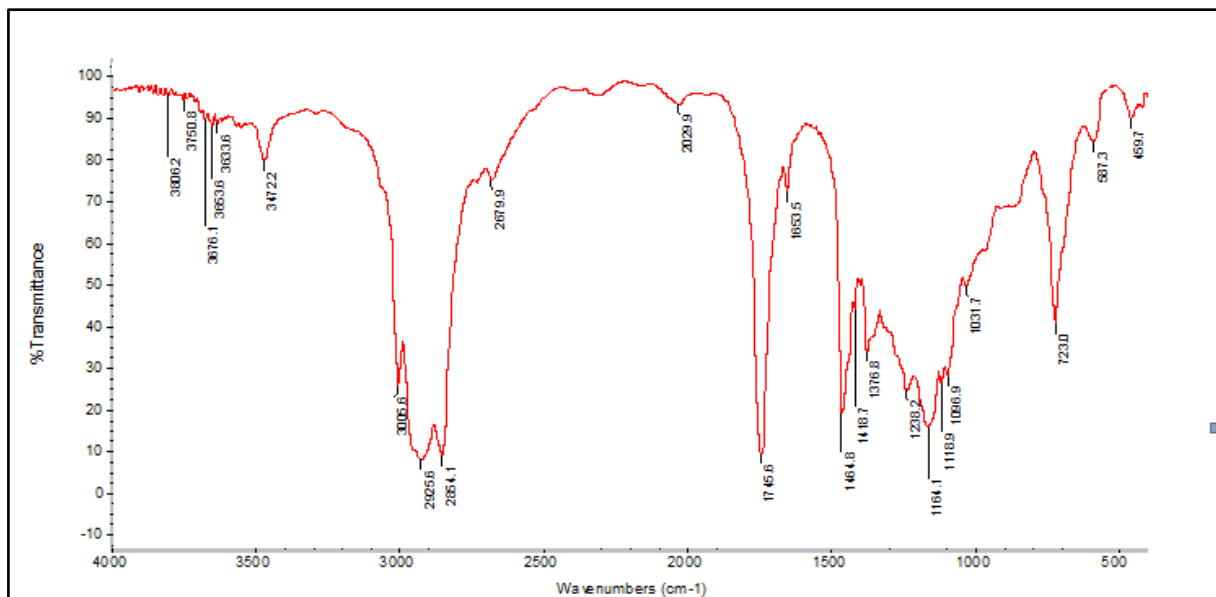
- Thời gian phản ứng: 120 phút
- Nồng độ ethanol : 80%
- Nhiệt độ phản ứng : 70°C
- Nồng độ KOH trong dung môi ethanol: 1,75M
- Tỷ lệ ethanol/dầu = 200ml/100g
- Hiệu suất: 85,5%

Nhận xét: So với phản ứng thủy phân trong dung môi nước (nhiệt độ 95°C, thời gian khuấy 12h, thời gian ủ là 36 giờ [120]) điều kiện thủy phân dầu trong dung môi ethanol (thời gian 2h, nhiệt độ 70°C) diễn ra êm dịu hơn. Điều này

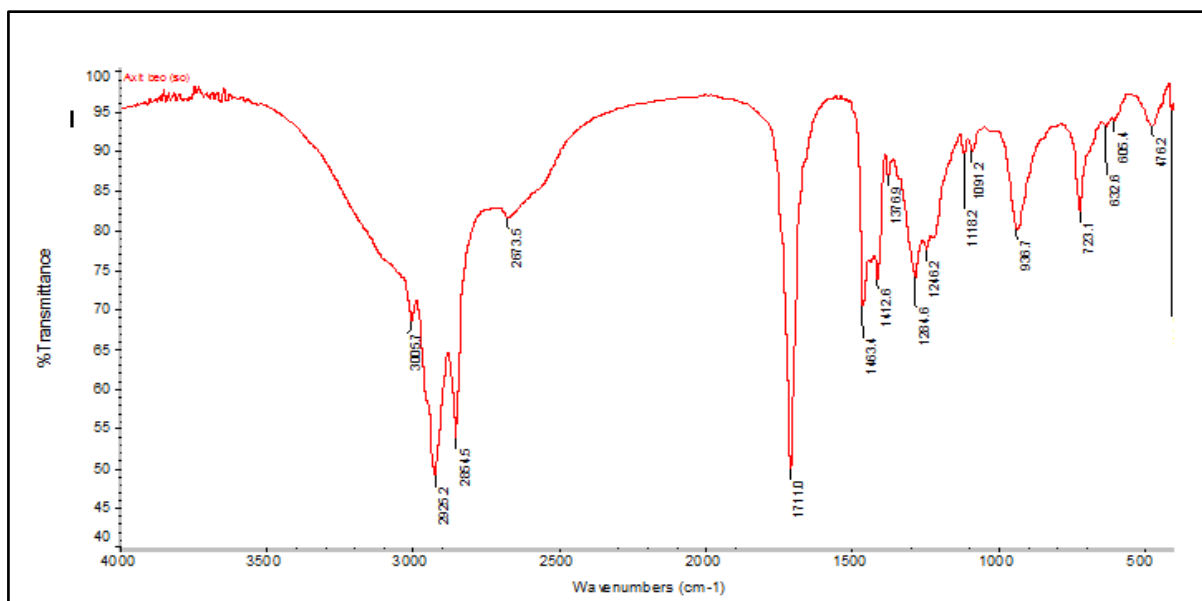
được giải thích là do dung môi ethanol tạo điều kiện làm tăng sự tiếp xúc giữa dầu thực vật và KOH, phản ứng thủy phân diễn ra dễ dàng hơn.

### 3.3.1.5 Phân tích chất lượng sản phẩm

Kết quả đặc trưng cấu trúc của mẫu dầu hạt đào, mẫu acid béo thu được từ dầu hạt đào bằng phổ IR được trình bày trong hình 3.10 và 3.11.



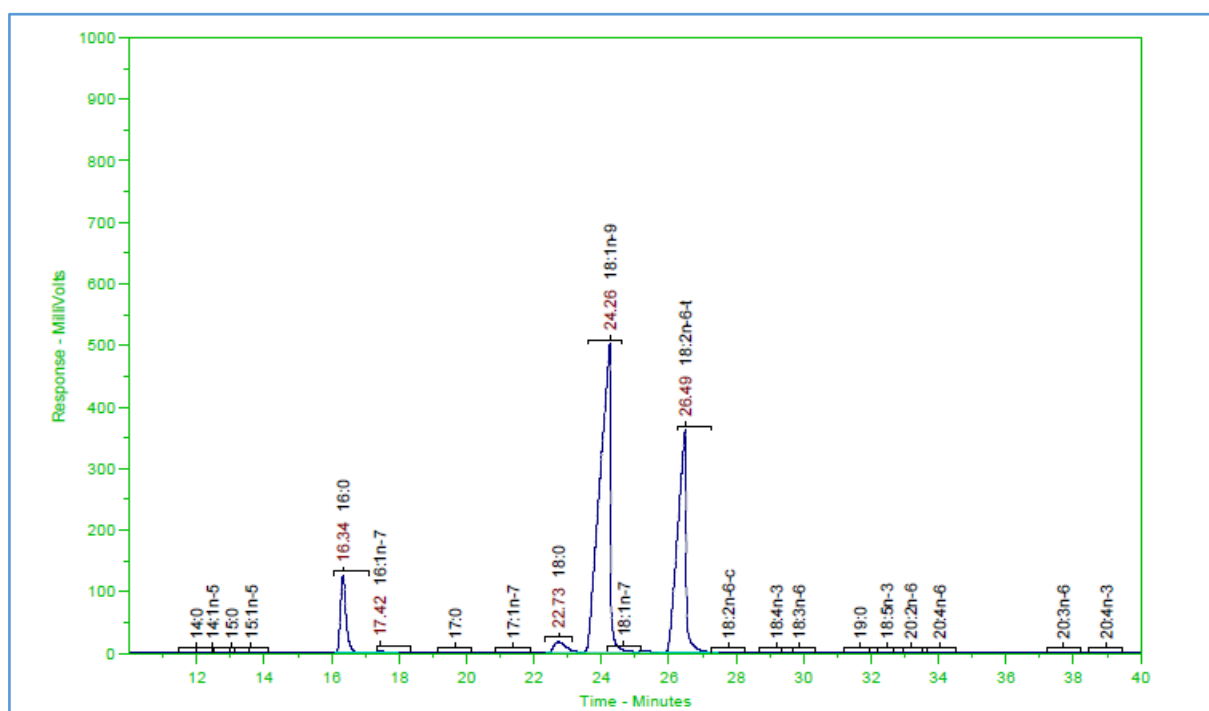
Hình 3.10. Phổ IR của mẫu dầu hạt đào



Hình 3.11. Phổ IR của mẫu acid béo dầu hạt đào

Trong phổ IR của mẫu dầu hạt đào, có nhiều hấp phụ đặc trưng: pic có cường độ mạnh ở  $1745,6\text{ cm}^{-1}$  tương ứng với dao động C=O của liên kết este; pic ở  $1164,1\text{ cm}^{-1}$  tương ứng với dao động kéo dài của C-O của liên kết ester. Đối với mẫu acid dầu hạt đào, có một số pic đặc trưng cho acid carboxylic như dao động kéo dài của C=O ở  $1711,0\text{ cm}^{-1}$ ; dao động C-O ở  $1284,6\text{ cm}^{-1}$ ; dao động O-H ở  $936,7\text{ cm}^{-1}$ . Có thể nhận thấy sự khác biệt giữa bước sóng đặc trưng của cả hai mẫu. Các hấp phụ đặc trưng của nhóm este trong glyceride của dầu hạt đào không còn xuất hiện trên phổ IR của mẫu acid béo. Như vậy các nhóm chức este trong mẫu dầu đã được loại bỏ và chuyển thành các nhóm chức của acid carboxylic hay các phân tử glyceride đã chuyển hóa hoàn toàn thành acid béo.

Thành phần các acid béo trong hỗn hợp thu được từ phản ứng thủy phân dầu hạt đào được xác định bằng sắc ký khối phổ GC-MS, kết quả được trình bày tại bảng 3.9 và hình 3.12.



Hình 3.12. Sắc ký đồ GC của hỗn hợp acid béo dầu hạt đào sau thủy phân

Bảng 3.9. Thành phần hỗn hợp acid béo sau khi thủy phân dầu hạt đào

Sô TT	Acid béo	Tên khoa học	Tên thường	Hàm lượng acid béo %
<b>Acid béo no</b>				
1	16: 0	Hexadecanoic acid	Acid Palmitic	7,3
2	18: 0	Octadecanoic acid	Acid Stearic	2,4
<b>Acid béo không no</b>				
3	16:1(n-7)	Hexadecenoic acid	Acid Palmitoleic	0,2
4	18:1(n-9)	Octadecenoic acid	<b>Acid Oleic</b>	<b>57,5</b>
5	18:2(n-6)	Octadecadienoic acid	<b>Acid Linoleic</b>	<b>32,4</b>

Từ sắc ký đồ GC-MS tại hình 3.12 và bảng 3.9 cho thấy thành phần chủ yếu của hỗn hợp acid béo thu được sau quá trình thủy phân dầu hạt đào gồm acid oleic, linoleic và acid béo no (palmitic, stearic) với tỷ lệ % khối lượng acid oleic/acid linoleic/acid béo no là 57,5/32,4/9,7.

Muốn có nguyên liệu để điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt cần phải loại bỏ các acid béo no khỏi hỗn hợp acid và nâng cao hàm lượng acid linoleic sao cho đạt tỷ lệ oleic/linoleic = 54/43.

### 3.3.2. Tách hỗn hợp acid oleic và linoleic

Acid oleic và linoleic có trong hỗn hợp các acid béo (FFA) thu được từ dầu hạt đào có thể được tách bằng phương pháp tạo phức với ure. Các thông số cần kiểm soát của quá trình bao gồm: tỷ lệ ethanol/FFA, tỷ lệ ure/FFA, nhiệt độ kết tinh.

Theo Jumat và cộng sự [119], tỷ lệ ethanol/FFA tối ưu cho quá trình kết tinh acid béo với ure là 5/1. Tỷ lệ này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp nhằm tìm các thông số khác của quá trình kết tinh.

### 3.3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ure/FFA

Theo cơ chế đã trình bày ở phần tổng quan, trong quá trình tạo phức với ure của hỗn hợp các acid béo, đầu tiên các acid béo no được tách ra, sau đó đến acid béo không no một nối đôi (acid oleic), cuối cùng mới đến acid béo hai nối đôi (acid linoleic). Do vậy, tỷ lệ giữa ure/FFA là yếu tố quan trọng quyết định tới hiệu suất thu hồi và độ sạch của acid oleic và linoleic. Nếu tỷ lệ này quá thấp (ít ure), không đủ lượng ure kết tinh hết với acid béo no để tách ra khỏi hỗn hợp các acid béo. Ngược lại, nếu tỷ lệ này quá lớn, ure dư sẽ tiếp tục tạo phức với cả acid béo không no. Trong cả hai trường hợp, hiệu suất tách acid béo không no (oleic và linoleic) sẽ thấp.

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ khối lượng của ure/FFA được khảo sát trong khoảng 0,5/1 đến 4/1, các điều kiện khác được giữ cố định: tỷ lệ ethanol/FFA: 5/1 (v/w), nhiệt độ kết tinh: 0°C, thời gian kết tinh: 8h. Kết quả được trình bày trong bảng 3.10.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của tỷ lệ ure/FFA đến quá trình tách các acid béo

Số TT	Tỷ lệ ure/FFA (w/w)	Hàm lượng acid béo no còn lại trong sản phẩm (% w/w)	Tỷ lệ Acid oleic/linoleic (% w/w)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	Chưa xử lý	9,9	57,5/32,4	-
2	0,5/1	8,6	56,8/34,6	77,3
3	1/1	6,7	55,4/37,9	76,9
4	2/1	2,9	53,9/43,2	70,6
5	3/1	2,0	41,2/56,7	65,6
6	4/1	1,59	26,7/71,6	57,5

Khi hàm lượng ure thấp (tỷ lệ khối lượng ure/FFA: 0,5/1), chỉ có acid béo no được tách ra khỏi hỗn hợp nên hàm lượng giảm từ 9,9% ban đầu xuống còn 8,6%), trong khi đó, acid oleic và linoleic gần như chưa được tách. Nhưng khi lượng ure quá nhiều, một phần acid oleic cũng kết tinh cùng với các acid béo no, tách ra nên hàm lượng bị giảm (tỷ lệ ure/FFA  $\geq$  3/1).

Từ kết quả khảo sát tại bảng 3.10, tỷ lệ ure/FFA: 2/1(w/w) được lựa chọn nhằm có được hỗn hợp acid oleic/linoleic với tỷ lệ phù hợp (54/43) làm nguyên liệu điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt.

### 3.3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ kết tinh

Nhiệt độ kết tinh là thông số quan trọng để khống chế chủng loại acid béo kết tinh cùng ure. Thông thường, nhiệt độ kết tinh của các acid béo giảm dần theo chiều acid béo no > acid oleic > acid linoleic.

Để tách được gần hết acid béo no và kết tinh một phần acid oleic, làm giàu acid linoleic, điều chỉnh tỷ lệ oleic/linoleic từ 57,5/32,4 về 54/43, cần xác định nhiệt độ kết tinh thích hợp của hỗn hợp ure+FFA. Vì vậy, trong phần này, ảnh hưởng của nhiệt độ trong khoảng từ -10 đến 5°C đến quá trình kết tinh được khảo sát. Kết quả được trình bày trong bảng 3.11.

**Bảng 3.11. Ảnh hưởng của nhiệt độ kết tinh đến quá trình tách các acid béo**

Số TT	Nhiệt độ kết tinh (°C)	Hàm lượng acid béo no (% w/w)	Tỷ lệ acid oleic/acid linoleic (% w/w)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	Chưa xử lý	9,9	57,5/32,4	-
2	10	8,7	56,0/33,9	75,4
3	5	6,9	54,4/38,7	72,6
4	0	2,39	54,3/43,2	70,3
5	-5	2,5	48,2/49,2	68,9
6	-10	2,59	46,7/50,6	66,4

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.11 cho thấy, khi kết tinh ở 10°C, chỉ một phần acid béo no được kết tinh và tách ra khỏi hỗn hợp, các acid béo không no hầu như chưa bị kết tinh. Khi giảm nhiệt độ kết tinh xuống 0°C, hầu như acid béo no đã được kết tinh hết, một phần acid oleic cũng được kết tinh theo, hàm lượng linoleic tăng lên đáng kể và đạt tỷ lệ mong muốn oleic/linoleic:54,3/43,2.

Tiếp tục hạ nhiệt độ kết tinh (-5 đến -10°C), lượng acid béo thu được thấp hơn, tỷ lệ acid oleic/linoleic không còn phù hợp với vai trò làm chất hiệp đồng. Do vậy, 0°C là nhiệt độ kết tinh thích hợp được lựa chọn.

### 3.3.2.3 Khảo sát ảnh hưởng của thời gian kết tinh

Thời gian kết tinh ảnh hưởng đến quá trình tạo phức với ure. Thời gian càng dài thì phức tạo ra càng bền nhưng tốn nhiều năng lượng; thời gian quá ngắn sẽ không đủ để tạo phức bền vững, hiệu suất không cao.

Trong các thí nghiệm này, yếu tố thời gian được khảo sát từ 2h đến 20h, trong điều kiện tỷ lệ (w/w) ure/FFA: 2/1; ethanol/FFA (v/w): 5/1, nhiệt độ kết tinh 0°C. Kết quả ảnh hưởng của thời gian kết tinh đến quá trình tách các acid béo được thể hiện ở bảng 3.12.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng thời gian kết tinh đến quá trình tách acid béo

Số TT	Thời gian (h)	Hàm lượng acid béo no trong sản phẩm (% w/w)	Tỷ lệ acid oleic/acidlinoleic (% w/w)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	2	3,35	52,3/44,3	61,4
2	4	3,22	52,7/44,0	62,5
3	6	2,98	53,0/43,8	65,2
4	8	2,97	53,2/43,7	67,9
5	12	2,92	54,3/43,6	70,8
6	16	2,02	54,3/43,6	70,8
7	20	2,02	54,3/43,6	70,8

Các số liệu thể hiện trong bảng 3.12 cho thấy: Trong khoảng thời gian kết tinh từ 2 đến 12 giờ, tỷ lệ acid oleic/linoleic có sự thay đổi và hiệu suất thu hồi tăng, sau đó thì gần như không thay đổi. Hàm lượng acid béo no còn lại trong hỗn hợp sản phẩm giảm nhẹ khi kéo dài thời gian kết tinh >12 giờ. Ở thời điểm 12 giờ, quá trình kết tinh diễn ra cân bằng. Nếu tiếp tục kéo dài cũng không

mang lại hiệu quả. Như vậy, thời gian kết tinh thích hợp là 12 giờ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

### **3.3.2.4 Tối ưu hóa quá trình tách acid oleic và linoleic bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm**

Quá trình tạo phức với ure của các acid béo phụ thuộc vào nhiều yếu tố quan trọng và giữa chúng có mối quan hệ mật thiết với nhau như tỉ lệ ethanol/FFA, tỉ lệ ure/FFA, nhiệt độ kết tinh...Thay đổi một yếu tố có thể ảnh hưởng đến yếu tố kia. Vì vậy, để tối ưu hóa các kết quả nghiên cứu, cần áp dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm nhằm khảo sát đồng thời các yếu tố và xác định tác động qua lại của các yếu tố này.

Phương pháp qui hoạch thực nghiệm được mô tả quan hệ giữa hàm mục tiêu và các nhân tố khảo sát theo phương trình bậc 2tâm trục giao và kết quả được xử lý trên máy tính bằng phần mềm Modde 5.0.Quan hệ giữa hàm mục tiêu và các nhân tố khảo sát được mô tả theo phương trình bậc 2:

$$y = b_0x_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \sum b_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

Trên cơ sở số liệu khảo sát đối với các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách acid béo, đã xác định được khoảng biến thiên của các yếu tố cho qui hoạch hóa thực nghiệm và tìm điều kiện tối ưu cho quá trình này(bảng 3.13).

**Bảng 3.13. Khoảng biến đổi của các yếu tố ảnh hưởng**

<b>Số TT</b>	<b>Nhân tố</b>	<b>Mức gốc</b>	<b>Khoảng biến thiên</b>	<b>Mã hóa</b>
1.	Tỷ lệ ure/ FFA	2	±1	X1
2.	Nhiệt độ (°C)	0	±5	X2
3.	Thời gian	12	±4	X3

Theo tính toán, số thực nghiệm cần phải tiến hành theo mô hình là 17 (8 ở ma trận gốc, 6 ở điểm sao và 3 ở điểm tâm). Kết quả khảo sát theo ma trận thực nghiệm được trình bày trong bảng 3.14



Bảng 3.14. Ma trận thực nghiệm

Số TT	Giá trị biến			Acid oleic (%)		Acid linoleic (%)	
	X1	X2	X3	Thực nghiệm	Dự đoán	Thực nghiệm	Dự đoán
1.	1	-5	8	50,46	50,099	37,25	36,825
2.	3	-5	8	41,78	41,695	44,42	44,335
3.	1	5	8	54,06	54,001	31,80	31,930
4.	3	5	8	46,27	46,013	39,49	39,590
5.	1	-5	16	50,76	50,762	35,50	35,239
6.	3	-5	16	41,02	40,823	44,72	44,393
7.	1	5	16	53,74	53,569	33,80	33,927
8.	3	5	16	43,94	44,045	42,69	43,232
9.	1	0	12	51,87	52,455	35,86	36,244
10.	3	0	12	43,06	43,492	44,95	44,652
11.	2	-5	12	48,88	49,517	41,79	42,961
12.	2	5	12	52,70	53,079	40,59	39,933
13.	2	0	8	54,10	54,859	42,49	42,568
14.	2	0	16	53,95	54,207	43,67	43,596
15.	2	0	12	53,97	53,089	42,84	43,146
16.	2	0	12	53,45	53,089	43,42	43,146
17.	2	0	12	53,88	53,089	43,16	43,146

- Kiểm tra tính phù hợp của phương trình hồi qui bằng Modde 5.0 cho thấy sai khác giữa lý thuyết và thực nghiệm so với sai số thí nghiệm là đáng tin cậy, phương trình hồi qui mô tả tương thích với thực nghiệm.

- Các hệ số hồi qui b trong phương trình thực nghiệm (1) đối với hàm acid oleic được kiểm định theo tiêu chuẩn Student.

Hệ số hồi qui trong phương trình thực nghiệm đối với hàm acid oleic được trình bày trong bảng 3.15.

Bảng 3.15. Hệ số của phương trình hồi qui đối với hàm acid oleic

Coefficient List - c18:1					
	1	2	3	4	5
1	<b>c18:1</b>	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)
2	Constant	53.089	0.304202	5.35265e-014	0.719333
3	x1	-4.482	0.224812	1.9981e-007	0.531603
4	x2	1.781	0.224812	9.70155e-005	0.531603
5	x3	-0.326002	0.224812	0.190311	0.531603
6	x1*x1	-5.11577	0.434324	7.2036e-006	1.02703
7	x2*x2	-1.79077	0.434324	0.00444213	1.02703
8	x3*x3	1.44423	0.434324	0.0126737	1.02703
9	x1*x2	0.10375	0.251348	0.692122	0.59435
10	x1*x3	-0.383751	0.251348	0.170654	0.59435
11	x2*x3	-0.27375	0.251348	0.312165	0.59435
12					
13	N = 17	Q2 = 0.955		Cond. no. = 4.4382	
14	DF = 7	R2 = 0.990		Y-miss = 0	
15		R2 Adj. = 0.978		RSD = 0.7109	

Loại bỏ khỏi phương trình những hệ số không có ý nghĩa là  $b_3$ ,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$ , từ đó xác định được phương trình hồi quy tương thích có dạng:

$$\hat{y} = 53,089 - 4,482x_1 + 1,781x_2 - 5,11x_1^2 - 1,79x_2^2 + 1,44x_3^2 \quad (2)$$

Trong bảng 3.15, hệ số  $x_1$  âm chứng tỏ yếu tố tỷ lệ ure/FFA có ảnh hưởng tiêu cực đến hàm mục tiêu. Khi tăng  $x_1$  sẽ làm giảm giá trị của hàm mục tiêu. Từ mô hình toán học, có thể rút ra kết luận: muốn tăng hàm lượng acid oleic cần tăng nhiệt độ kết tinh.

- Các hệ số hồi qui b trong phương trình thực nghiệm (1) đối với hàm acid linoleic cũng được tính toán và lập luận tương tự.

Hệ số hồi qui trong phương trình thực nghiệm đối với hàm acid linoleic được trình bày trong bảng 3.16.

Bảng 3.16. Hệ số của phương trình hồi qui đối với hàm acid linoleic

Coefficient List - c18:2					
	1	2	3	4	5
1	<b>c18:2</b>	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)
2	Constant	43.148	0.268687	9.58087e-014	0.635351
3	x1	4.206	0.198565	1.31551e-007	0.469538
4	x2	-1.531	0.198565	0.000115265	0.469539
5	x3	0.492999	0.198565	0.0420372	0.469538
6	x1*x1	-2.64155	0.383617	0.000234279	0.907121
7	x2*x2	-1.85655	0.383617	0.00187864	0.907121
8	x3*x3	0.033452	0.383617	0.932954	0.907121
9	x1*x2	0.0237514	0.222003	0.917801	0.52496
10	x1*x3	0.40625	0.222003	0.109957	0.52496
11	x2*x3	0.831249	0.222003	0.00722175	0.52496
12					
13	N = 17	Q2 =	0.917	Cond. no. =	4.4382
14	DF = 7	R2 =	0.990	Y-miss =	0
15		R2 Adj. =	0.977	RSD =	0.6279

Từ đó xác định được phương trình hồi qui đối với hàm acid linoleic:

$$\hat{y} = 43,148 + 4,2x_1 - 1,51x_2 + 0,49x_3 - 2,64x_1^2 - 1,85x_2^2 \quad (3)$$

Trong bảng 3.16, hệ số của  $x_1$ ,  $x_3$  dương chứng tỏ yếu tố tỷ lệ ure/FFA và thời gian có ảnh hưởng tích cực lên hàm mục tiêu. Khi tăng tỷ lệ ure/FFA và thời gian sẽ làm tăng giá trị của hàm mục tiêu  $y$ . Từ mô hình toán học cho thấy rằng: muốn tăng hàm lượng acid linoleic cần tăng tỷ lệ ure/FFA và thời gian.

Điều kiện tối ưu cho quá trình tách hỗn hợp acid oleic và linoleic theo tỉ lệ mong muốn có thể tìm được thông qua phương trình hồi qui (2), (3) bằng phần mềm modde 5.0 thể hiện qua bảng 3.17.

Bảng 3.17. Kết quả tối ưu hóa các điều kiện phản ứng

	1	2	3	4	5	6	7
	ure/FFA	nhiet do	thoi gian	c18:1	c18:2	iter	log(D)
1	2.0314	0.443	16	54.169	43.7404	281	0.1112
2	2.0698	0.4098	16	53.9545	43.9141	258	0.1111
3	2.0698	0.4098	16	53.9545	43.9141	258	0.1111
4	2.0698	0.4098	16	53.9545	43.9141	258	0.1111
5	2.0698	0.4098	16	53.9545	43.9141	258	0.1111
6	2.0698	0.4098	16	53.9545	43.9141	258	0.1111
7	2.0698	0.4098	16	53.9545	43.9141	258	0.1111
8	2.0698	0.4098	16	53.9545	43.9141	258	0.1111

Kết quả tối ưu hóa các điều kiện phản ứng để thu được hàm lượng kỳ vọng được trình bày trong bảng 3.17. Từ đó xác định được kết quả tối ưu nhằm thu được hàm lượng acid oleic/linoleic gần với tỷ lệ 54/43 là:

- Tỷ lệ ure/FFA: 2/1
- Nhiệt độ : 0°C
- Thời gian : 16h

Muốn kiểm chứng lại bằng thực nghiệm, sử dụng các điều kiện trên để tiến hành 03 qui trình kết tinh với cùng một lượng mẫu nhất định. Kết quả được trình bày trong bảng 3.18.

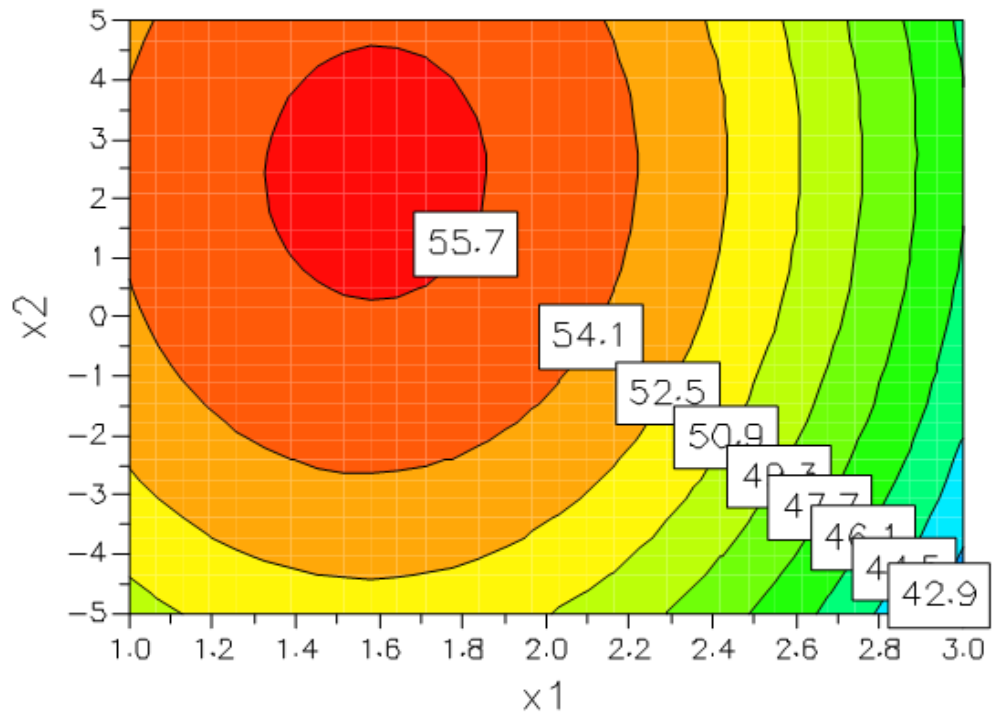
**Bảng 3.18. Kết quả của các thực nghiệm kiểm chứng**

<b>Thí nghiệm</b>	<b>Hàm lượng acid oleic (%)</b>	<b>Hàm lượng acid linoleic (%)</b>
1	53,95	43,9
2	53,87	43,7
3	53,9	43,4

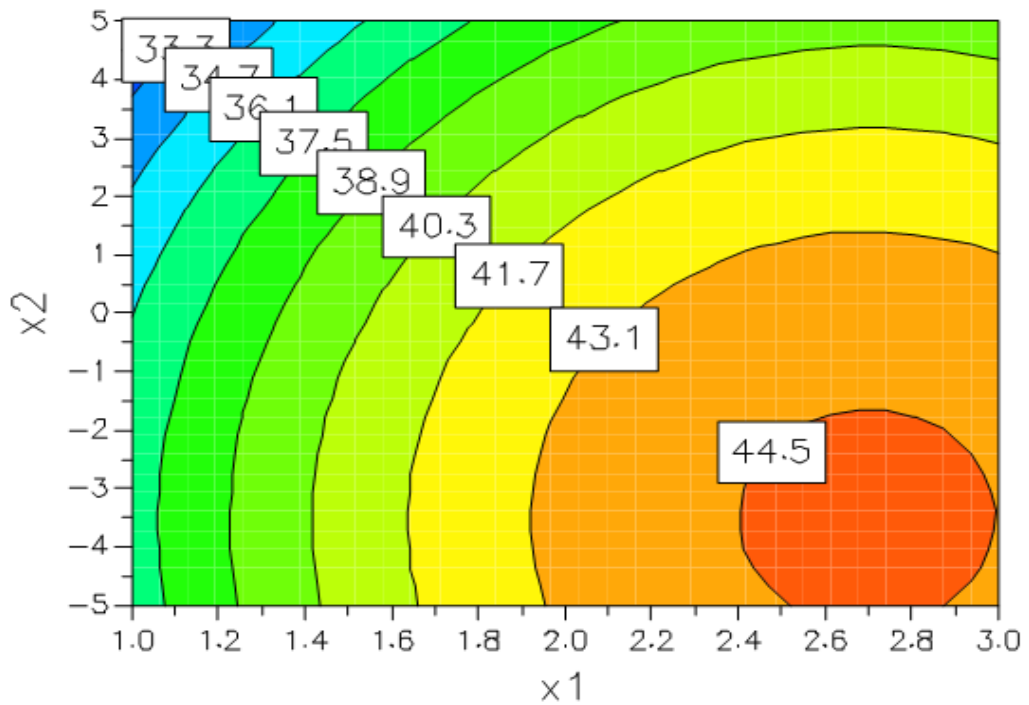
Kết quả thu được phù hợp với kết quả tính toán cho thấy các điều kiện tối ưu thu được là đáng tin cậy, có thể áp dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### *Đồ thị minh họa*

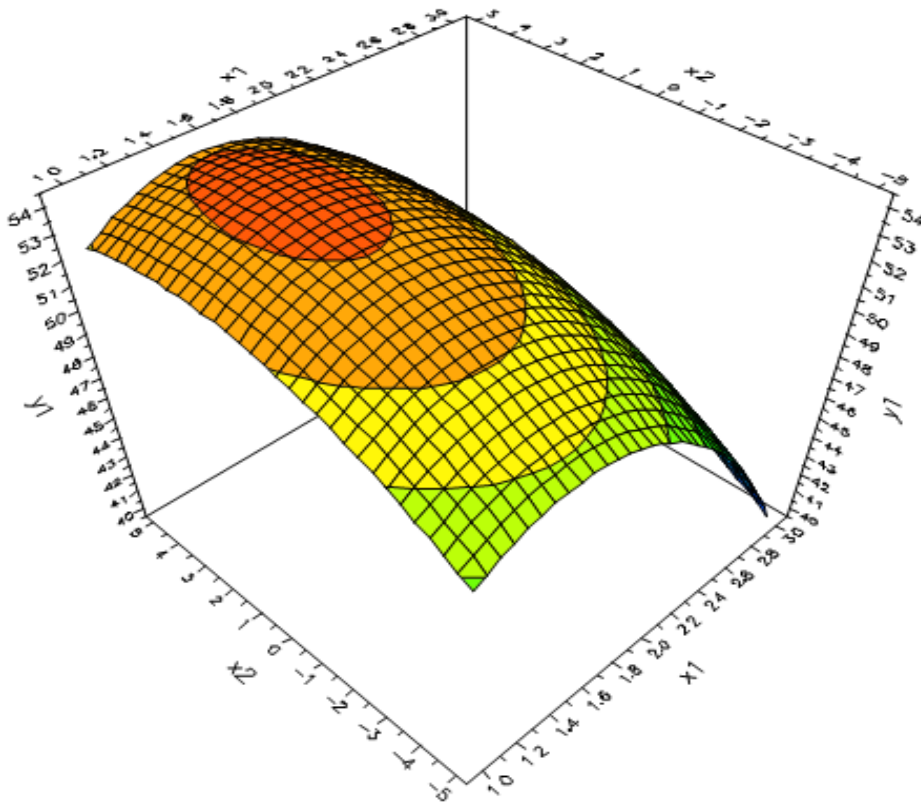
Đồ thị minh họa đường đồng mức và sự phụ thuộc mặt mục tiêu vào các yếu tố được thể hiện dưới hình 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 sau đây:



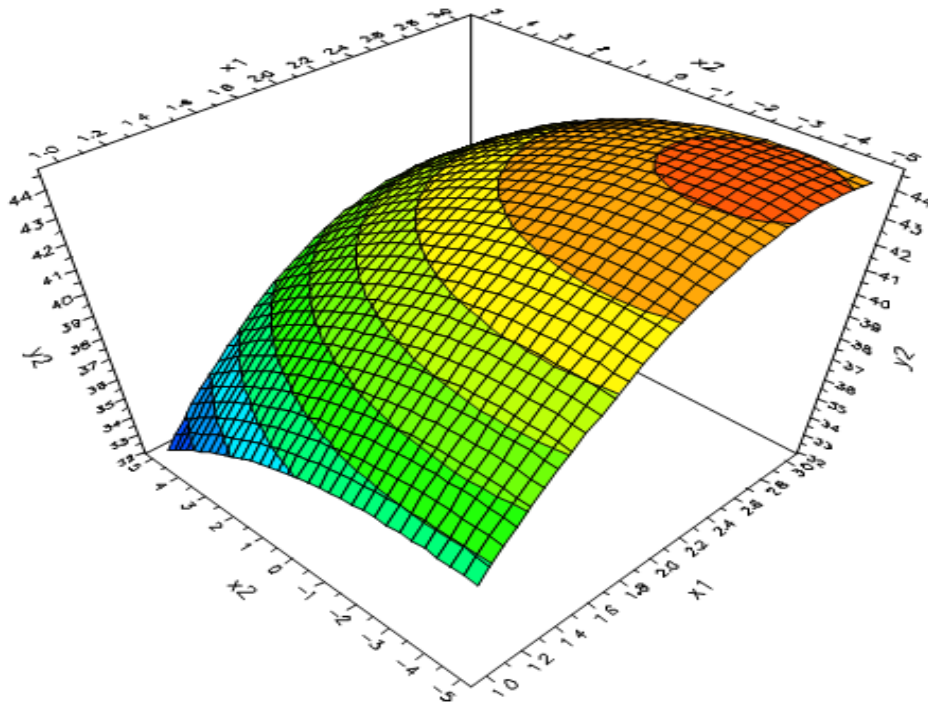
Hình 3.13. Đồ thị minh họa đường đồng mức đối với hàm acid oleic



Hình 3.14. Đồ thị minh họa đường đồng mức đối với hàm acid linoleic



Hình 3.15. Đồ thị minh họa sự phụ thuộc của mặt mục tiêu vào các yếu tố đối với hàm acid oleic

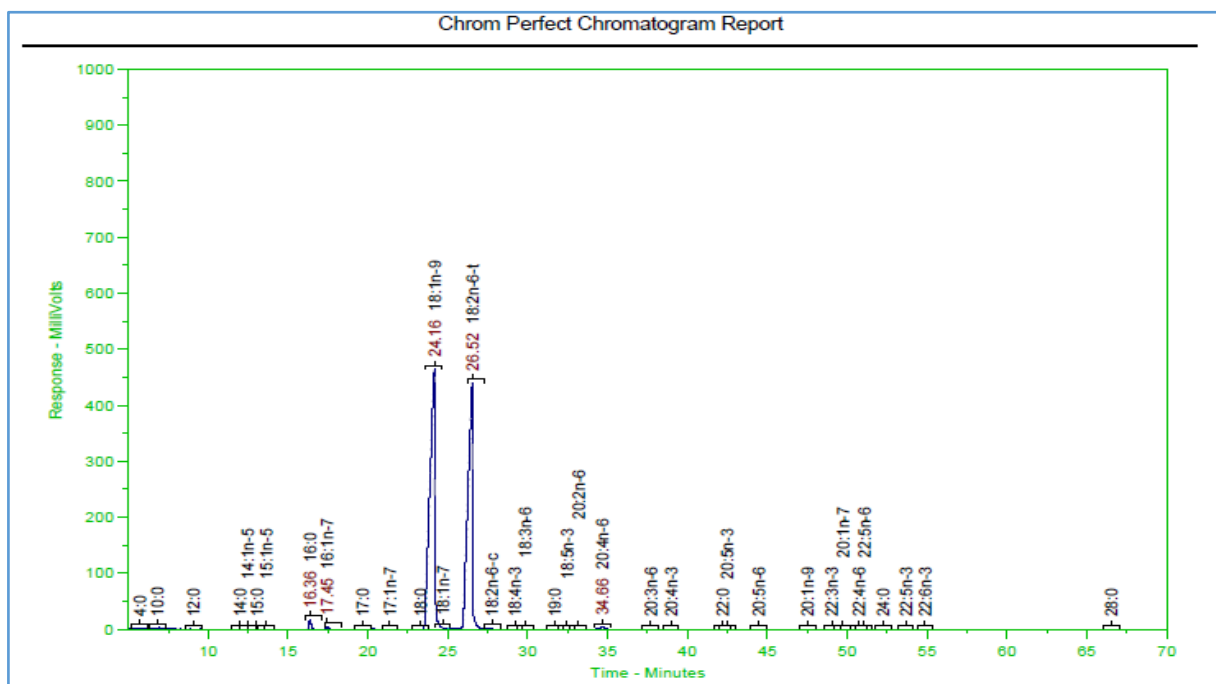


Hình 3.16. Đồ thị minh họa sự phụ thuộc của mặt mục tiêu vào các yếu tố đối với hàm acid linoleic

Hình 3.13, 3.14 mô tả đường đồng mức cho thấy, khi tăng lượng ure và giảm nhiệt độ kết tinh dẫn đến giảm tỷ lệ acid oleic trong pha lỏng (không tạo phức với ure). Ngược lại hàm lượng acid linoleic trong pha lỏng lại tăng lên (hình 3.15, 3.16). Mỗi liên hệ giữa các thông số của điều kiện qui trình đối với hàm lượng các acid béo gần như tuyến tính. Hàm lượng linoleic acid cao có thể thu được bằng cách sử dụng tỷ lệ ure/FFA thấp. Vì vậy cần thực hiện các thí nghiệm cẩn thận để thu được hiệu suất tối đa và hàm lượng cao như mong muốn.

Thông qua phương pháp qui hoạch hóa thực nghiệm, kết quả tách acid oleic và linoleic của một số thí nghiệm trong miền tối ưu cho thấy hiệu suất tách thực tế và hiệu suất tách theo tính toán gần tương đương giống nhau và đạt khoảng 70%.

Hỗn hợp acid béo sau khi tách được phân tích bằng phổ GC, kết quả được trình bày ở hình 3.17 dưới đây:



Hình 3.17. Sắc ký đồ GC của acid béo sau khi tách acid béo no

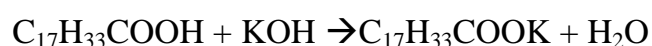
Thành phần acid sau khi tách được trình bày trong bảng 3.19:

Bảng 3.19. Thành phần sản phẩm sau khi tách acid béo no

Số TT	Acid béo	Tên khoa học	Tên thường	Hàm lượng (%)
1.	18:1(n-9)	Octadecenoic acid	<b>Acid Oleic</b>	<b>53,90</b>
2.	18:2(n-6)	Octadecadienoic acid	<b>Acid Linoleic</b>	<b>43,61</b>
3.	16:0	Hexadecanoic acid	Acid Palmitic	0,89
4.	16:1(n-7)	Hexadecenoic acid	Acid Palmitoleic	0,24

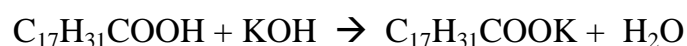
### 3.3.3 Tổng hợp kali oleat và kali linoleat

Quá trình chuyển hóa thành muối kali của các acid béo theo phản ứng:



Acid oleic

K-oleat



Acid linoleic

K-linoleat

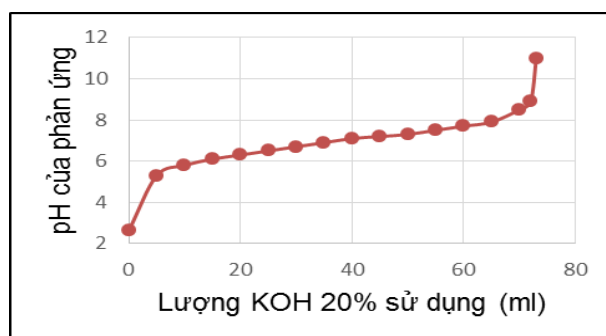
Các điều kiện phản ứng ảnh hưởng đến hiệu suất và chất lượng sản phẩm là: tỷ lệ các chất tham gia phản ứng (KOH và acid béo); nhiệt độ và thời gian phản ứng. Do vi khuẩn Bt không bền trong môi trường kiềm mạnh, nên khi hỗn hợp với chất hiệp đồng (hỗn hợp kali oleat và kali linoleat), dung dịch sản phẩm tạo ra cần có tính kiềm yếu. Tuy nhiên, phản ứng trung hòa giữa bazơ mạnh (KOH) và acid yếu (acid oleic và linoleic) luôn tạo ra sản phẩm muối có  $pH \geq 9$ . Do vậy, quá trình thực hiện phản ứng trung hòa này cần được kiểm soát và không chế lượng dung dịch kiềm đưa vào sao cho sản phẩm có pH mong muốn ( $pH \leq 8,5$ ).

Nhằm không chế pH của dung dịch sản phẩm, dung dịch KOH 20% được lựa chọn là tác nhân trung hòa và sử dụng máy đo pH để theo dõi và xác định thời điểm kết thúc phản ứng. Khảo sát sự thay đổi của lượng dung dịch KOH 20% đến pH phản ứng trung hòa nhằm thu được dung dịch sản phẩm có  $pH = 8,5$ . Kết quả khảo sát được trình bày tại bảng 3.20 và hình 3.18.



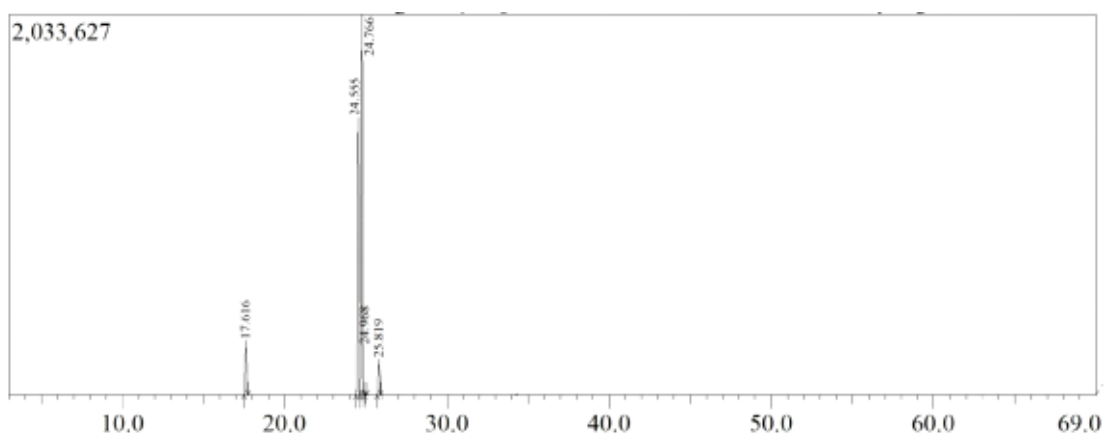
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của lượng dung dịch KOH 20% đến pH phản ứng

<b>pH phản ứng</b>	2,6	5,8	6,3	6,7	7,1	7,3	7,5	7,7	7,9	8,5	8,9	10,3	10,4
<b>V<sub>ddKOH</sub> (ml)</b>	0	10	20	30	40	50	55	60	65	70	72	73	75



Hình 3.18. Ảnh hưởng của lượng dung dịch KOH 20% đến pH phản ứng

Từ bảng 3.20 và hình 3.18 thấy lượng dung dịch KOH 20% cần sử dụng trong phản ứng là 70ml cho 100g acid béo ban đầu. Hiệu suất thu được sau phản ứng đạt 85,8%. Tỷ lệ hàm lượng muối kali oleat/kali linoleat được xác định thông qua tỷ lệ hàm lượng methyl oleat/methyl linoleat được thể hiện ở hình 3.18. Theo kết quả trên sắc ký đồ GC-MS tỷ lệ hàm lượng methyl oleat/methyl linoleat chính là tỷ lệ kali oleat/kali linoleat = 54,1/43,3.



Hình 3.19. Sắc ký đồ GC-MS của các methyl este thu được từ hỗn hợp kali oleat và kali linoleat

### 3.4. ĐIỀU CHẾ CHẤT HIỆP ĐỒNG CHO THUỐC TRỪ SÂU IMIDACLOPRID TỪ DẦU HẠT SỎ

Methyl oleat được sử dụng làm chất hiệp đồng cho Imidacloprid để trừ rầy nâu. Dựa vào kết quả của phân khảo sát, lựa chọn nguyên liệu (Mục 3.1), methyl oleat được điều chế từ dầu hạt sỏ. Tiến hành este hóa chéo dầu hạt sỏ nhằm thu hỗn hợp methyl este của acid béo, sau đó làm giàu methyl oleat để đạt hàm lượng theo yêu cầu.

#### 3.4.1. Điều chế methyl este từ dầu hạt sỏ

Methyl ester của dầu hạt sỏ được điều chế bằng phản ứng este hóa chéo dầu hạt sỏ trong methanol có sử dụng xúc tác chất lỏng ion [1-(4-sulfonic acid) butyl-3-methylimidazolium methanesulfonat ( $mimC_4H_8SO_3H.CH_3SO_3$ )]. Sơ đồ phản ứng như sau:

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phản ứng sẽ được khảo sát bao gồm: nhiệt độ phản ứng, thời gian phản ứng, lượng xúc tác, tỷ lệ methanol/dầu.

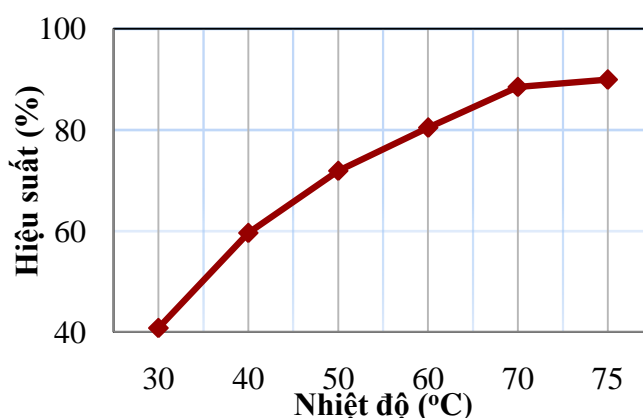
Dầu hạt sỏ sau khi được tách bằng phương pháp enzym có những tính chất, đặc trưng như sau:

Bảng 3.21. Tính chất hóa lý của dầu hạt sỏ

Tính chất	Kết quả	Phương pháp phân tích
Tỷ trọng	0,912	D 1298
Độ nhớt tại 40°C, cSt	39,2	D 445
Chỉ số xà phòng hóa, mg KOH/g	191	D 464
Chỉ số acid, mgKOH/g	0,9	D 664
Chỉ số iot, g I <sub>2</sub> /100g	82	EN 1411

*a. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hiệu suất thu methyl este*

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng để cải thiện tốc độ phản ứng và hiệu suất chuyển hóa các glyceride thành este. Thực nghiệm được tiến hành tại các nhiệt độ phản ứng khác nhau: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 75°C, thời gian phản ứng: 8h, hàm lượng xúc tác: 10% so với khối lượng dầu, tỷ lệ thể tích methanol/dầu: 1/1 (tương đương với tỷ lệ 18-20mol methanol/lít dầu). Kết quả khảo sát được thể hiện tại hình 3.20

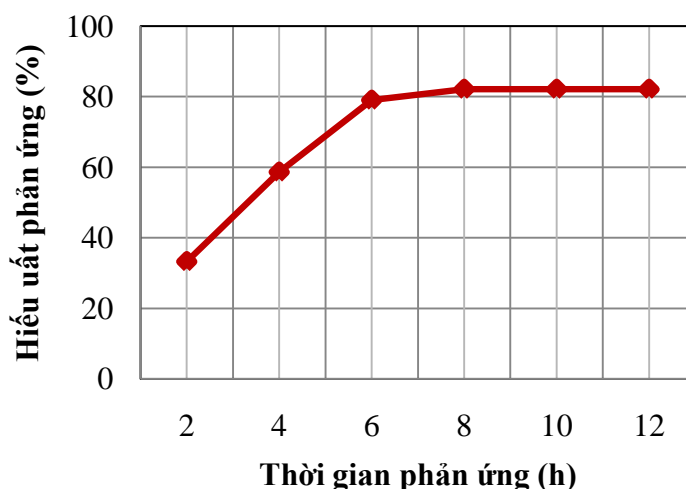


Hình 3.20. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất phản ứng

Khi nhiệt độ tăng từ 30°C đến 70°C thì hiệu suất phản ứng tăng. Hiệu suất phản ứng đạt giá trị cao nhất tại nhiệt độ 75°C (nhiệt độ sôi của hỗn hợp phản ứng). Do vậy, nhiệt độ 75°C được lựa chọn để khảo sát các thông số tiếp theo.

*b. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến hiệu suất thu methyl este*

Để khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng, thực nghiệm được tiến hành tại các điều kiện phản ứng không đổi: nhiệt độ 75°C; hàm lượng xúc tác 10% khối lượng dầu; tỷ lệ thể tích methanol/dầu: 1/1; thời gian phản ứng được thay đổi từ 2 đến 12 giờ. Kết quả ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến hiệu suất phản ứng được trình bày tại hình 3.21.



Hình 3.21. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất phản ứng

Hiệu suất phản ứng tăng nhanh từ thời điểm bắt đầu phản ứng đến 5h. Sau 6giờ, hiệu suất phản ứng hầu như không tăng. Do đó, thời gian thích hợp cho phản ứng là 6h với hiệu suất đạt khoảng 80%.

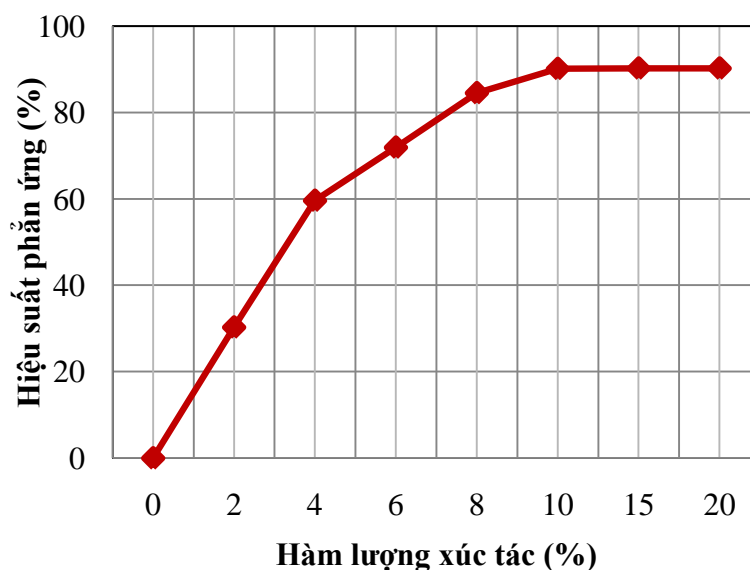
*c. Ảnh hưởng của lượng xúc tác*

Chất lỏng ion  $mimC_4H_8SO_3H.CH_3SO_3$  có khả năng xúc tác cho phản ứng este hóa và este hóa chéo các chất chứa acid béo và glyceride. Cấu trúc của  $mimC_4H_8SO_3H.CH_3SO_3$  như sau:  $^1H$  NMR (500MHz,  $D_2O$ ): 1,772-1,889 (m, 6H); 2,831 (m, 8H); 8,078 (m, 2H); 9,194 (s, 1H).  $^{13}C$  (125 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 21,499$ ; 23,619; 28,586; 36,286; 39,369; 43,313; 122,530; 123,570; 137,056. Đặc trưng của xúc tác như sau: tỉ trọng  $1,29g/cm^3$ ; độ nhớt 24,7cSt ( $50^\circ C$ ).

Xúc tác đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình chuyển hóa dầu hạt sỏ thành hỗn hợp methyl este. Nếu xúc tác quá ít, sự tiếp xúc giữa các chất phản ứng với xúc tác không đồng đều, giảm tần suất va chạm hiệu quả của chúng với các tâm hoạt tính, làm cho tốc độ phản ứng chậm. Do vậy cần khảo sát để xác định lượng xúc tác cần thiết cho phản ứng.

Thực nghiệm được tiến hành với lượng xúc tác thay đổi trong khoảng 2 – 20% khối lượng dầu. Các điều kiện khác được giữ cố định như nhiệt độ

75°C; thời gian 6 giờ, tỷ lệ thể tích methanol/dầu là 1/1. Kết quả thể hiện trong hình 3.22.



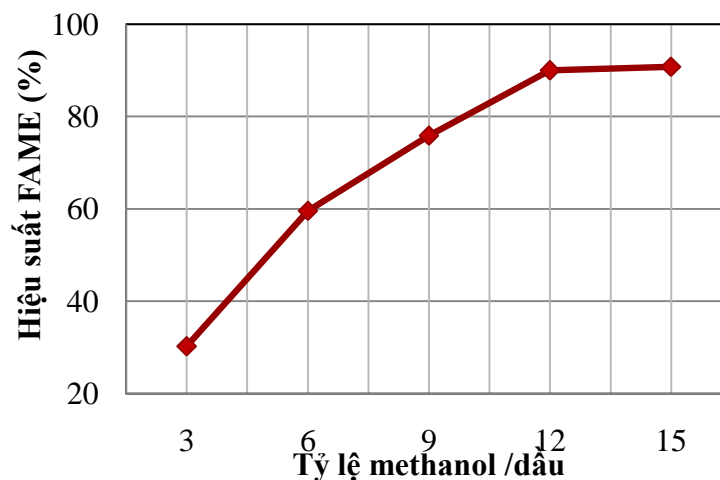
Hình 3.22. Ảnh hưởng của hàm lượng xúc tác đến hiệu suất phản ứng

Kết quả khảo sát cho thấy, hiệu suất phản ứng tăng nhanh khi lượng xúc tác tăng từ 0 – 10% so với khối lượng dầu. Tiếp tục tăng lượng xúc tác nhưng hiệu suất phản ứng gần như không đổi. Như vậy, hàm lượng xúc tác 10% là phù hợp cho phản ứng este hóa chéo dầu hạt sỏ thành methyl este.

#### d. Ảnh hưởng của tỷ lệ methanol/dầu

Tỷ lệ mol theo lý thuyết giữa methanol/dầu trong phản ứng este hóa là 1/1 và este hóa chéo là 3/1. Khi tổng hợp FAME, tỷ lệ này thường cao hơn so với lý thuyết để thúc đẩy cân bằng chuyển dịch về phía tạo ra các methyl este. Theo các tài liệu tham khảo, với xúc tác kiềm, tỷ lệ này chỉ là 6/1 hoặc 8/1, với xúc tác chất lỏng ion tỷ lệ này có thể đến 20/1. Lượng methanol dư sau phản ứng có thể cất thu hồi.

Các thí nghiệm được tiến hành với tỷ lệ mol methanol/dầu thay đổi là 3/1; 6/1; 9/1; 12/1; 15/1; 18/1. Các điều kiện khác không thay đổi: nhiệt độ 75°C, thời gian 8 giờ, hàm lượng xúc tác 10%. Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ methanol/dầu đến hiệu suất phản ứng được thể hiện trong hình 3.23



Hình 3.23. Ảnh hưởng của tỷ lệ methanol/dầu đến hiệu suất phản ứng

Có thể thấy, khi lượng methanol tăng, hiệu suất tạo FAME tăng. Hiệu suất phản ứng tăng nhanh khi tỷ lệ mol methanol/dầu tăng từ 1/1 đến 12/1. Tiếp tục tăng tỉ lệ MeOH/dầu thì hiệu suất không đổi. Như vậy, tỷ lệ mol methanol/dầu hợp lý là 12/1.

*Kết luận thu được từ các khảo sát điều kiện tối ưu cho phản ứng tạo FAME từ dầu hạt sỏ:*

Nhiệt độ phản ứng: 75°C

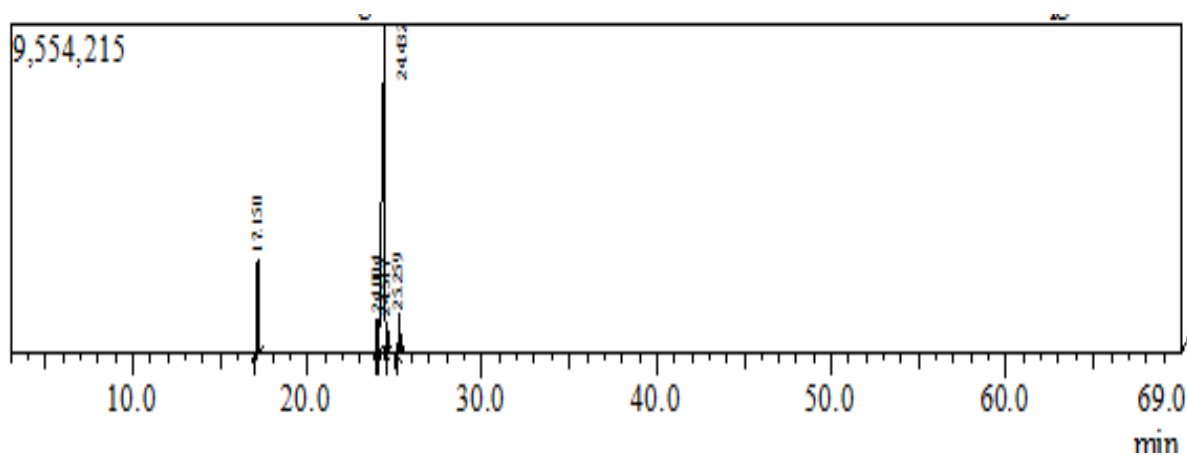
- Thời gian phản ứng: 6h
- Hàm lượng xúc tác IL: 10% khối lượng dầu
- Tỷ lệ mol methanol/dầu : 12/1

Với các điều kiện phản ứng trên, hiệu suất trung bình đạt 90,9%. Các thông số cũng tương đồng với quá trình este hóa chéo dầu dừa của tác giả Vũ Thị Thu Hà [88].

Kết quả phân tích thành phần sản phẩm FAME từ dầu hạt sỏ bằng GC-MS, được thể hiện ở bảng 3.22 và hình 3.24 dưới đây:

Bảng 3.22. Kết quả phân tích thành phần FAME của dầu hạt sỏ

Số TT	Acid béo	Tên methyl este	Hàm lượng (%)
1.	18: 1(n-9)	Methyl oleat	82,36
2.	18: 2(n-6)	Methyl linoleat	9,29
3.	16: 0	Methyl palmitat	6,5
4.	18:0	Methyl stearat	1,86



Hình 3.24. Sắc ký đồ GC-MS của dầu hạt sỏ

Thành phần sản phẩm FAME thu được sau quá trình este hóa chéo dầu hạt sỏ gồm methyl oleat (82,36%), methyl linoleat (9,29%) và methyleste của các acid béo no (8,35%). Như vậy, muốn thu được methyl oleat với hàm lượng cao cần loại bỏ các methyleste của acid béo no (FAME bão hòa) và acid béo đa nối đôi (methyl linoleat) ra khỏi hỗn hợp.

### 3.4.2. Tách và nâng cao hàm lượng methyl oleat bằng phương pháp kết tinh với ure

Phương pháp tạo phức kết tinh với ure nhằm thu methyl oleat hàm lượng cao cần thực hiện theo 2 giai đoạn:

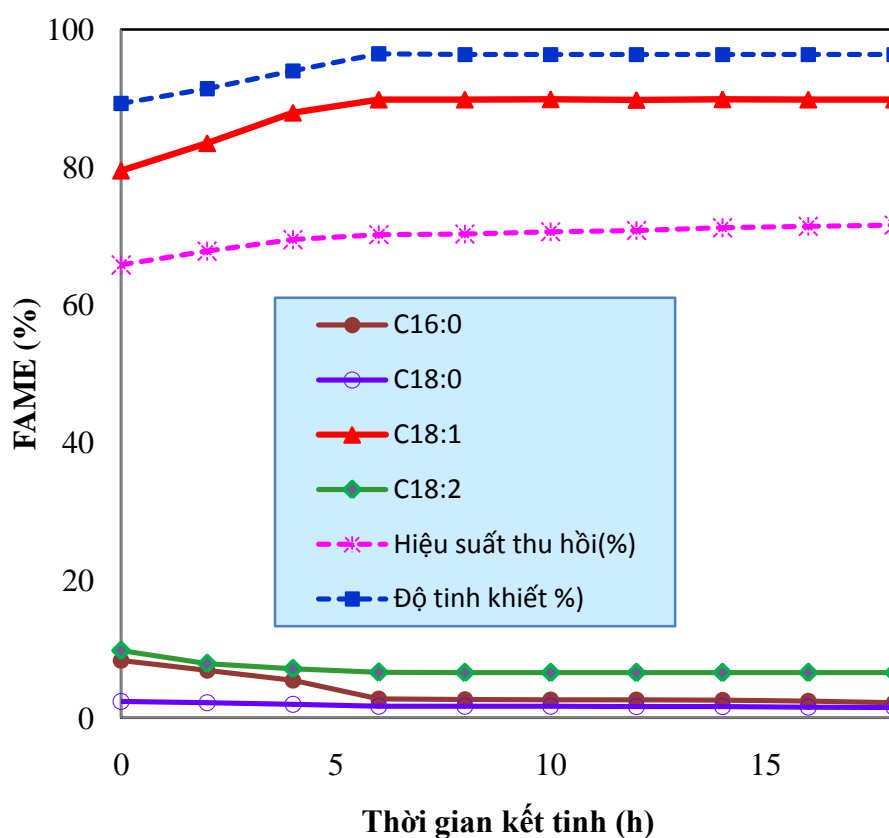
- Giai đoạn 1: Tách loại các FAME bão hòa ;

- Giai đoạn 2: Nâng cao hàm lượng methyl oleat.

### 3.4.2.1. Tách loại các FAME bão hòa

#### a. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian kết tinh

Các thí nghiệm về thời gian kết tinh với ure được khảo sát trong khoảng từ 0h đến 15h, với tỷ lệ (w/w) ure/FAME là 0,5/1; ethanol/FAME là 3,5/1; nhiệt độ kết tinh: 10<sup>0</sup>C. Ảnh hưởng của thời gian kết tinh đến hiệu quả tách loại FAME bão hòa được thể hiện ở hình 3.25.



Hình 3.25. Ảnh hưởng của thời gian kết tinh đến hiệu quả tách FAME bão hòa

Các số liệu thể hiện trong hình 3.25 cho thấy: độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi của hỗn hợp FAME không bão hòa (methyl oleat và methyl linoleat) tăng nhẹ khi tăng thời gian kết tinh từ 0 đến 6h, sau đó không bão hòa ít thay đổi.



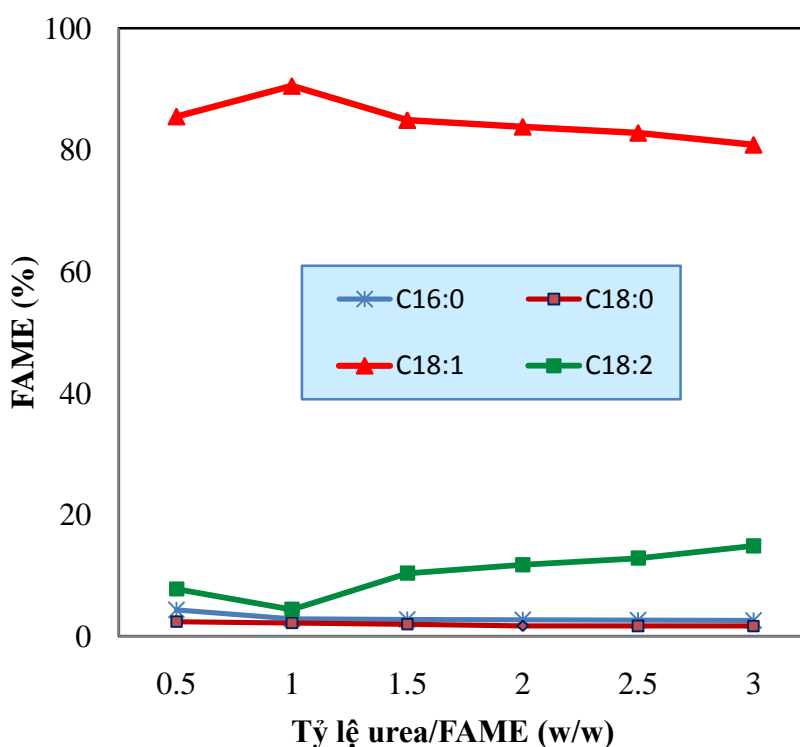
Kết quả này chỉ ra rằng, thời gian kết tinh thích hợp là 6h. Ở thời gian này, quá trình kết tinh đạt trạng thái cân bằng.

*b. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ure/FAME*

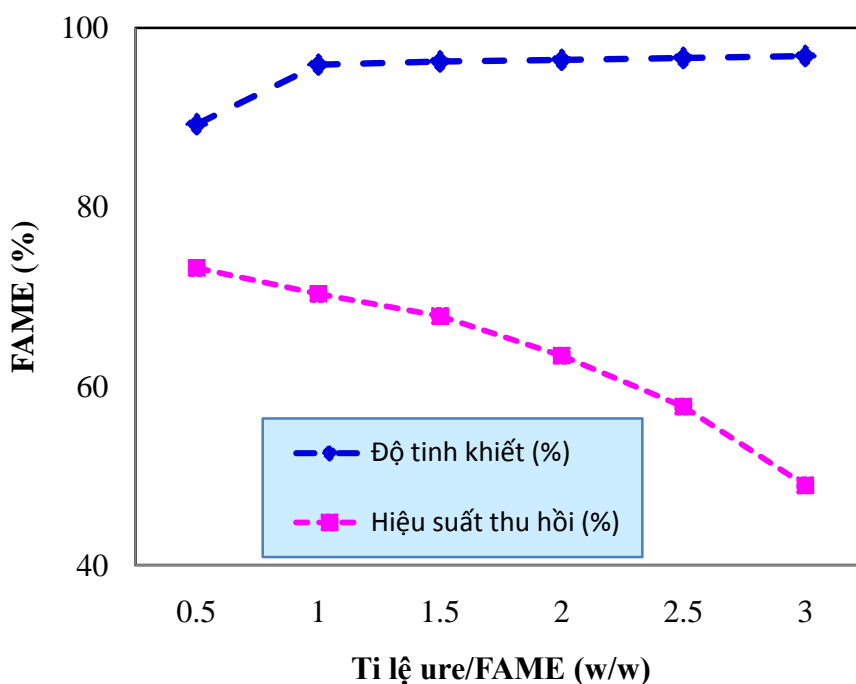
Tương tự như trường hợp tách các acid béo đã khảo sát ở phần trên, trong phương pháp tạo phức với ure của các FAME, tỷ lệ giữa ure/FAME là yếu tố quan trọng quyết định tới độ tinh khiết sản phẩm và hiệu suất thu hồi của methyl oleat. Nếu tỷ lệ này quá nhỏ, ure không đủ để loại bỏ FAME bão hòa khỏi hỗn hợp. Nếu tỷ lệ này quá lớn, ure có khả năng tạo phức với tất cả FAME, dẫn đến hiệu suất thu hồi thấp.

Thực nghiệm được tiến hành với các tỷ lệ ure/FAME thay đổi từ 0,5/1 đến 2/1, tỷ lệ ethanol/FAME 4/1 (v/w); nhiệt độ kết tinh 10°C; thời gian kết tinh 6h.

Ảnh hưởng của tỷ lệ ure/FAME đến thành phần, độ tinh khiết, độ thu hồi của sản phẩm được thể hiện trên hình 3.26 và hình 3.27.



Hình 3.26. Ảnh hưởng của tỷ lệ ure/FAME đến thành phần của hỗn hợp



Hình 3.27. Ảnh hưởng của tỷ lệ ure/FAME đến độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi

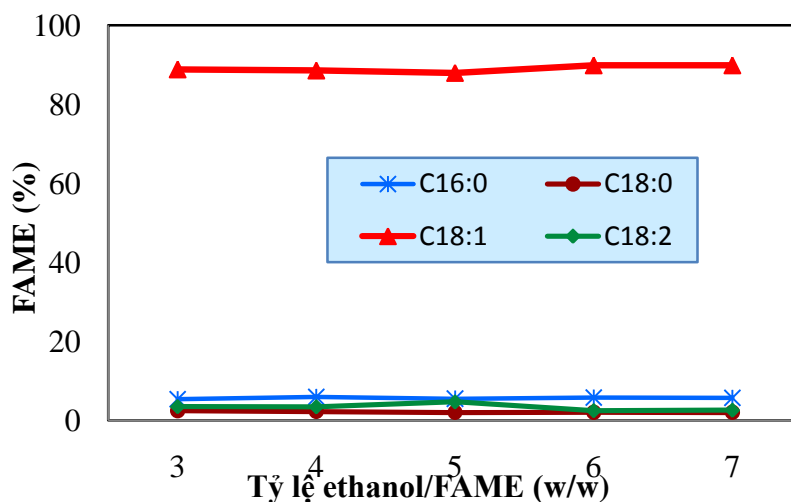
Kết quả ở hình 3.26 cho thấy, khi tăng tỷ lệ khối lượng ure/FAME hàm lượng FAME bão hòa (C16:0 - methyl palmitat) và C18:0 - methyl stearat) giảm dần cho đến khi đạt bão hòa, trong khi hàm lượng methyl linoleat (C18:2) tăng dần. Ngược lại, hàm lượng methyl oleat (C18:1) tăng đến 90,5% khi tỷ lệ ure/FAME là 1/1, sau đó giảm dần. Điều này chứng tỏ khi lượng ure đủ lớn, chúng sẽ tạo phức với cã methyl oleat, làm cho hàm lượng methyl oleat trong sản phẩm giảm dần.

Các số liệu ở hình 3.27 chỉ ra rằng khi tăng tỷ lệ ure/FAME lên 1/1, độ tinh khiết của sản phẩm tăng dần đến 98,36%, chứng tỏ FAME bão hòa (methyl palmitat và methyl stearat) gần như bị loại hoàn toàn khỏi hỗn hợp. Lượng methyl oleat còn lại trong hỗn hợp rất nhỏ nên dù tiếp tục tăng tỷ lệ ure/FAME cũng không còn ý nghĩa. Trong khi đó, hiệu suất thu hồi giảm mạnh từ 73% xuống còn 49% khi tỷ lệ ure/FAME tăng từ 0,5/1 đến 3/1. Điều này có thể giải thích là khả năng kết tinh của ure phụ thuộc vào mức độ bão hòa của FAME. Khi xuất hiện liên kết đôi trong phân tử của FAME, sẽ làm tăng kích thước phân tử,

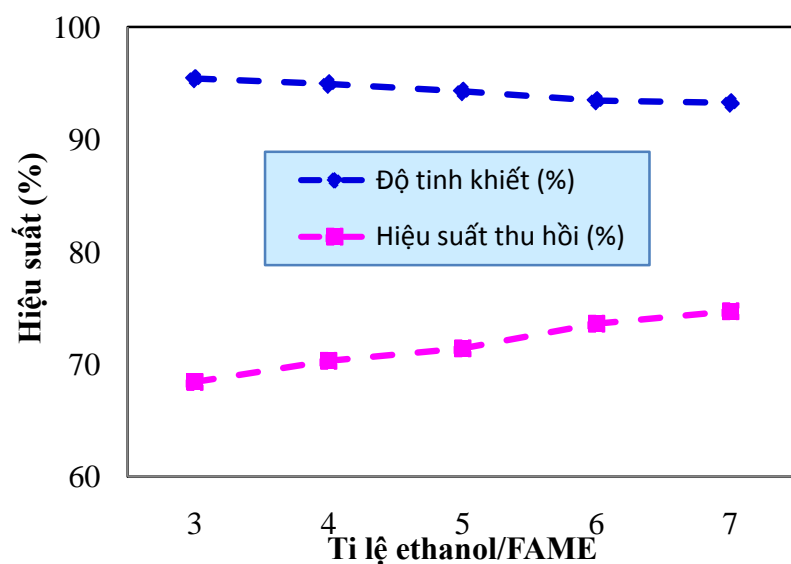
khả năng tạo phức với ure khó hơn. Khi tăng lượng ure/FAME, ure sẽ tạo phức với nhiều FAME bão hòa hơn, vì thế hàm lượng FAME không bão hòa tăng lên và độ thu hồi giảm dần. Như vậy, tỷ lệ ure/FAME thích hợp là 1/1. Ở tỷ lệ này thu được methyl oleat với hàm lượng cao nhất và độ thu hồi chấp nhận được.

*c. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol/FAME*

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol/FAME đến thành phần, độ tinh khiết của sản phẩm được thể hiện ở hình 3.28 và 3.29 dưới đây:



Hình 3.28. Ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol/FAME đến thành phần của hỗn hợp



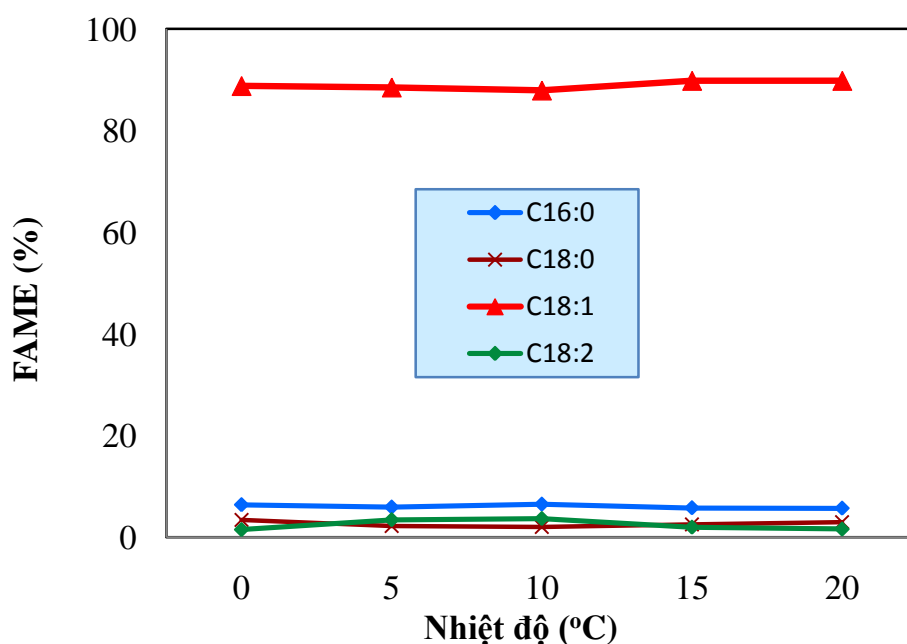
Hình 3.29. Ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol/FAME đến độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi

Từ biểu đồ trên hình 3.28 có thể nhận thấy, thành phần sản phẩm không có sự thay đổi nhiều khi tỷ lệ ethanol/FAME thay đổi từ 3/1 đến 7/1. Trong khi đó, khi tăng lượng ethanol, hiệu suất thu hồi của methyl oleat và methyl linoleat tăng. Lý do khi sử dụng nhiều dung môi, khả năng phân tách pha lỏng (phần không tạo phức với ure) ra khỏi pha rắn (phần tạo phức với ure) tốt hơn. Tuy nhiên, phức tạo thành sẽ kém bền hơn, do đó một phần FAME bão hòa được giải phóng vào dung dịch nên độ tinh khiết của FAME không bão hòa giảm nhẹ.

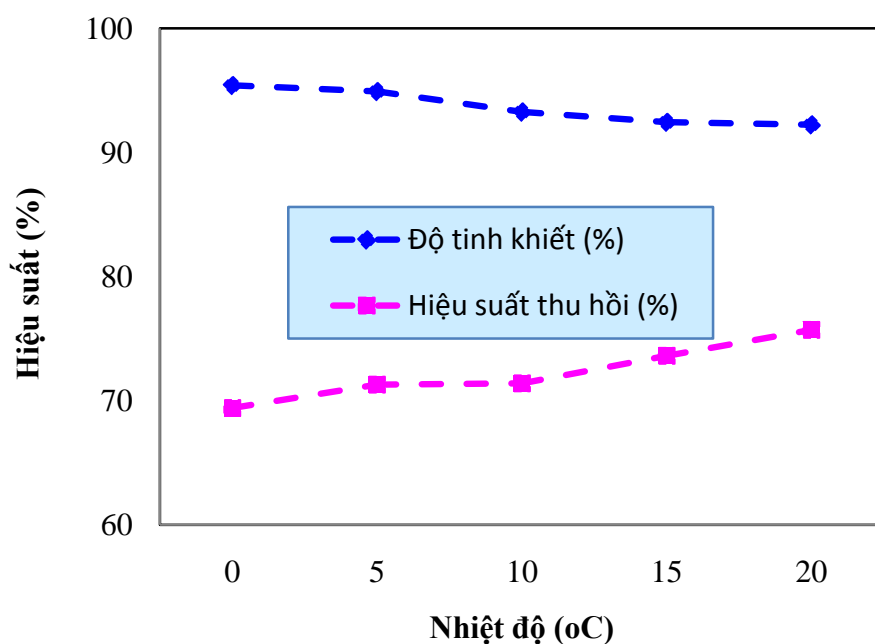
Ngược lại, khi lượng dung môi ít, hiệu quả phân tách kém, dẫn đến hiệu suất thu hồi kém. Do vậy lượng dung môi cần đủ để vừa đảm bảo độ tinh khiết cần thiết, vừa đáp ứng yêu cầu về hiệu suất thu hồi sản phẩm. Tỷ lệ ethanol/FAME là 5/1 thích hợp để sản phẩm có độ tinh khiết cao và hiệu suất thu hồi tối ưu.

#### *d. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ*

Khoảng nhiệt độ khảo sát được lựa chọn từ 0°C đến 20°C, các điều kiện khác không thay đổi. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến thành phần, độ tinh khiết, hiệu suất thu hồi của sản phẩm được thể hiện ở hình 3.30 và 3.31.



Hình 3.30. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến thành phần của hỗn hợp FAME



Hình 3.31. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi

Kết quả cho thấy, khi nhiệt độ tăng lên, độ tinh khiết của FAME không bão hòa (methyl oleat, methyl linoleat) giảm dần trong khi hiệu suất thu hồi sản phẩm tăng dần. Hiện tượng này cho thấy nhiệt độ càng thấp, khả năng tạo phức của FAME với ure càng tốt, càng nhiều phân tử sẽ tạo phức với ure, nên còn lại ít phân tử FAME bão hòa trong dung dịch, hiệu suất thu hồi tăng lên.

Xem xét cả yêu cầu về độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi sản phẩm, lựa chọn nhiệt độ kết tinh khi tạo phức với ure của FAME: 10°C là thích hợp.

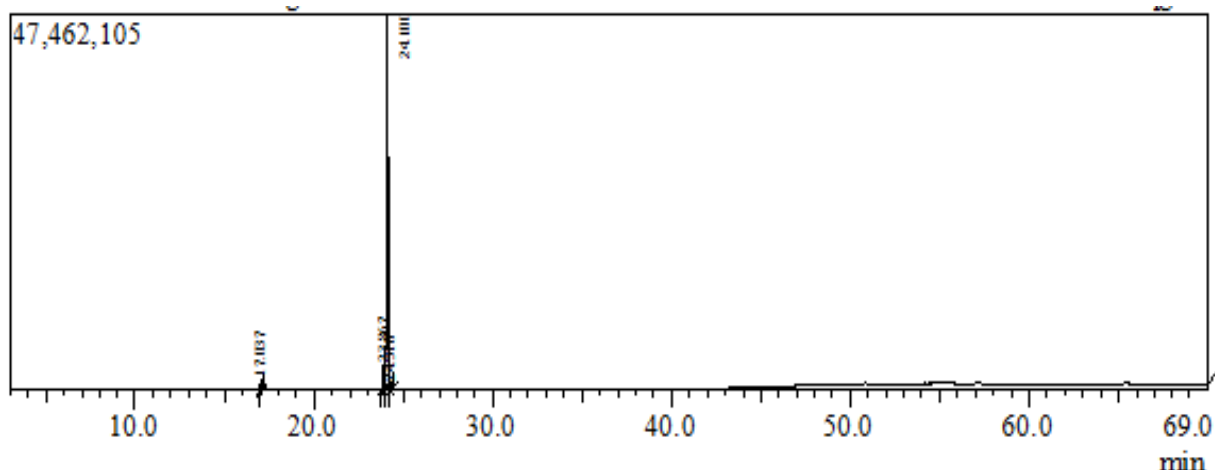
Dựa vào kết quả khảo sát các điều kiện cho quá trình tách methyl oleat từ hỗn hợp FAME thu được từ phản ứng este hóa dầu hạt sỏ bằng phương pháp tạo phức kết tinh với ure, có thể thu được các thông số công nghệ phù hợp cho giai đoạn tách loại các FAME bão hòa như sau:

- + Tỷ lệ ure/FAME: 1/1 (w/w)
- + Tỷ lệ ethanol/FAME: 5/1 (w/w)
- + Nhiệt độ kết tinh: 10°C
- + Thời gian kết tinh: 6 giờ

Kết quả thành phần FAME sau khi tách loại FAME bão hòa phân tích bằng GC-MS được thể hiện ở bảng 3.23 và hình 3.32.

Bảng 3.23. Thành phần FAME sau khi tách FAME bão hòa

Số TT	Acid béo	Tên khoa học	Hàm lượng %
1.	18: 1(n-9)	<b>Methyl oleat</b>	90,53
2.	18: 2(n-6)	<b>Methyl linoleat</b>	5,87
3.	16: 0	Methyl palmitate	2,18
4.	18:1	Methyl stearate	1,42



Hình 3.32. Sắc ký đồ GC-MS của mẫu FAME dầu hạt sỏ sau giai đoạn 1

Sau quá trình kết tinh ở giai đoạn 1, sản phẩm thu được chứa 90,53% methyl oleat, 5,87% methyl linoleat còn lại một lượng nhỏ methyl palmitat và methyl stearat. Vì vậy, trong Giai đoạn 2, cần tiếp tục tách methyl linoleat có trong sản phẩm nhằm nâng cao hàm lượng methyl oleat.

#### 3.4.2.2. Giai đoạn 2: Nâng cao hàm lượng methyl oleat

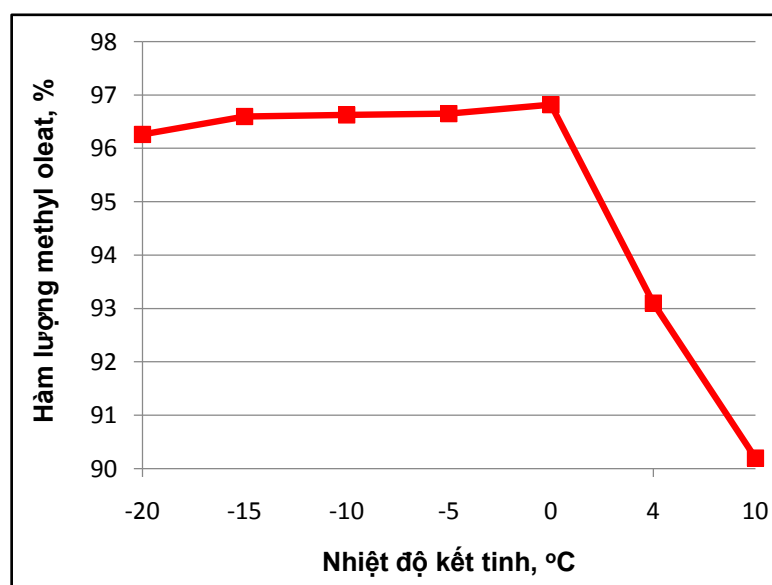
Biện pháp nâng cao hàm lượng methyl oleat trong sản phẩm là sử dụng quá trình tạo phức kết tinh với ure tiếp tục (giai đoạn 2) nhằm tách methyl linoleat (có 2 nối đôi) và một lượng nhỏ FAME bão hòa ra khỏi hỗn hợp.

Ở giai đoạn 2, ure được đưa thêm để tiếp tục tạo phức và kết tinh với hỗn hợp FAME. Trong quá trình này, phần kết tinh chứa chủ yếu là methyl oleat hàm lượng cao; phần dịch lọc chứa methyl linoleat và một phần methyl oleat còn lại. Các yếu tố trong quá trình này phải được lựa chọn kỹ lưỡng để thu được methyl oleat có hàm lượng cao và hiệu suất thu hồi chấp nhận được.

Tương tự các khảo sát ở Giai đoạn 1, các thông số như tỷ lệ ure/FAME, tỷ lệ ethanol/FAME, thời gian và nhiệt độ kết tinh ảnh hưởng đến chất lượng và hiệu suất thu hồi sản phẩm. Tuy nhiên, nhiệt độ kết tinh là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến khả năng hình thành mạng tinh thể chứa ure và methyl oleat, do đó cần khảo sát kỹ. Các thông số khác có thể sử dụng kết quả khảo sát của Giai đoạn 1, cụ thể: tỷ lệ ure/FAME là 1/1; tỷ lệ ethanol/FAME là 5/1; thời gian kết tinh là 6 giờ.

Từ kết quả khảo sát ở Giai đoạn 1 cho thấy, ở nhiệt độ cao, tinh thể không bền dẫn đến hiệu suất thu hồi thấp, nếu nhiệt độ quá thấp, ure sẽ tạo phức tiếp với cả methyl linoleat, làm cho độ tinh khiết giảm.

Thực nghiệm khảo sát nhiệt độ thay đổi từ 10 đến  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng sản phẩm được thể hiện ở hình 3.33.



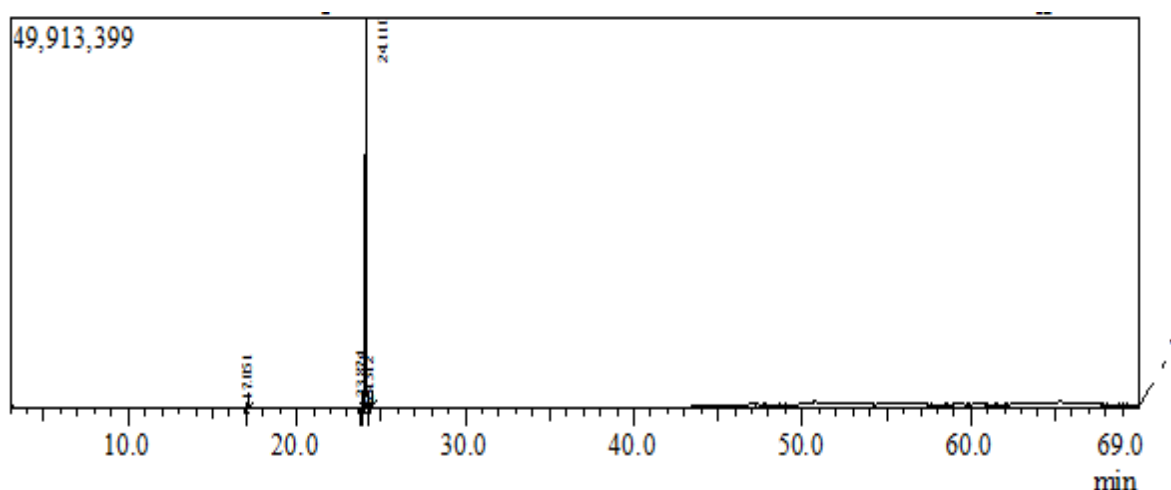
Hình 3.33. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng methyl oleat

Từ kết quả ở hình 3.33 có thể nhận thấy: khi giảm nhiệt độ từ 10°C xuống 0°C thì hàm lượng của sản phẩm tăng nhanh. Ở nhiệt độ 0°C, methyl oleat dễ tạo phức với ure, dễ phân tách giữa phân tạo phức và không tạo phức nên độ tinh khiết của sản phẩm thu được cao, đạt 98,22% hàm lượng methyl oleat. Khi nhiệt độ giảm tiếp xuống dưới 0°C, độ sạch của sản phẩm có chiều hướng giảm nhẹ do một phần methyl linoleat đã kết tinh cùng với methyl oleat. Luận án chọn nhiệt độ kết tinh là 0°C là thích hợp.

Nhận xét: Quá trình tách và nâng cao hàm lượng methyl oleat từ hỗn hợp FAME thu được thông qua phản ứng este hóa dầu hạt sỏ bằng phương pháp tạo phức kết tinh với ure cần thực hiện qua hai giai đoạn, với các thông số kỹ thuật như sau:

- Giai đoạn 1: Tách loại FAME bão hòa:
  - +Tỷ lệ ure/FAME : 1/1 (w/w);      +Tỷ lệ ethanol/FAME : 5/1(w/w);
  - +Nhiệt độ kết tinh 10<sup>0</sup>C;      +Thời gian kết tinh: 6h
- Giai đoạn 2: Nâng cao hàm lượng methyl oleat:
  - +Tỷ lệ ure/FAME: 1/1 (w/w);      +Tỷ lệ ethanol/FAME: 5/1(w/w);
  - +Nhiệt độ kết tinh 0°C;      + Thời gian kết tinh: 6h

Thành phần và hàm lượng của sản phẩm được xác định bằng phổ GC-MS. Kết quả được trình bày trong bảng 3.24 và hình 3.34.



Hình 3.34. Thành phần FAME dầu hạt sỏ sau 2 giai đoạn kết tinh



Bảng 3.24. Thành phần hỗn hợp FAME

Số TT	Acid béo	Tên khoa học	Tên thường	Hàm lượng %
1	18: 1(n-9)	Octadecenoic acid	Acid Oleic	98,36
2	18: 2(n-6)	Octadecadienoic acid	Acid Linoleic	1,64

Hàm lượng methyl oleat trong sản phẩm đạt 98,36% phù hợp để làm chất hiệp đồng cho Imidacloprid.

### 3.5. CHẾ TẠO HỖN HỢP CHẤT HIỆP ĐỒNG VỚI THUỐC TRỪ SÂU

Một trong những mục tiêu của Luận án là chế tạo (gia công) thuốc trừ sâu mới trên cơ sở hỗn hợp chất hiệp đồng với các thuốc trừ sâu nhằm nâng cao hiệu lực sinh học, khắc phục hiện tượng kháng thuốc và suy giảm hiệu quả phòng trừ đối với côn trùng gây hại. Cụ thể tạo ra hai sản phẩm mới: hỗn hợp chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt để phòng trừ sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*) và hỗn hợp chất hiệp đồng với thuốc Imidacloprid để phòng trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.).

#### 3.5.1. Chế tạo hỗn hợp chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt

##### 3.5.1.1. Nghiên cứu công thức hỗn hợp chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt

Trước khi chế tạo sản phẩm mới, cần xác định tỷ lệ hỗn hợp thích hợp giữa chất hiệp đồng (S1) là sản phẩm hỗn hợp K-oleat/K-linoleat theo tỷ lệ 54/43 và thuốc Bt để có công thức hỗn hợp đạt hiệu quả phòng trừ cao nhất. Thuốc trừ sâu Bt lựa chọn để hỗn hợp và so sánh là Vi-BT.

Chế tạo hỗn hợp giữa chất hiệp đồng S1 với Bt theo các tỷ lệ S1/Bt khác nhau: 0,5/1; 1/1; 1,5/1; 2/1. Sản phẩm hỗn hợp tạo ra được thử hiệu lực sinh học trong phòng thí nghiệm trên sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*). Công thức so sánh là CT1: chỉ dùng S1 (không có Bt) và CT2: chỉ dùng Vi-BT (không có S1). Tất cả các công thức thí nghiệm đều phun với nồng độ 0,25%. Kết quả thí nghiệm được trình bày tại bảng 3.25.

**Bảng 3.25. Hiệu quả trừ sâu tơ của hỗn hợp giữa chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt trong phòng thí nghiệm**

<b>Ký hiệu</b>	<b>Công thức thí nghiệm</b>	<b>Tỷ lệ S1/Bt (w/w)</b>	<b>Hiệu quả phòng trừ sau 7 ngày(%)</b>
CT1	S1 (so sánh)	1/0	12,5e
CT2	Vi-Bt (so sánh)	0/1	66,6d
CT3	S1B11	0,5/1	77,0c
CT4	S1B12	1/1	89,5a
CT5	S1B13	1,5/1	85,4ab
CT6	S1B14	2/1	81,2abc
CV			4,2%

*Nhận xét:*

- Ở các công thức thí nghiệm đều có sâu chết, trong đó hiệu quả phòng trừ thấp nhất ở công thức không có thuốc Bt (CT1). Với công thức chỉ sử dụng Bt (CT2), sau 7 ngày xử lý, tỷ lệ sâu chết chỉ đạt 66,6%, chứng tỏ thuốc trừ sâu Bt hiện nay đã bị giảm hiệu lực đối với sâu tơ.

- Các công thức hỗn hợp từ CT3 đến CT6, hiệu quả diệt sâu tơ hại rau đều cao hơn so với công thức chỉ sử dụng Bt dù hàm lượng hoạt chất cao gấp đôi. Như vậy, chất hiệp đồng đã có tác dụng làm tăng hiệu lực sinh học của sản phẩm hỗn hợp. Trong các công thức hỗn hợp, công thức CT4 (tỷ lệ S1/Bt: 1/1) cho hiệu quả cao nhất (> 89% sau 7 ngày phun). Có thể giải thích như sau: với hàm lượng nhỏ S1, tác động hiệp đồng chưa đủ, nên hiệu quả diệt sâu chưa cao. Nhưng nếu hàm lượng chất hiệp đồng quá cao, hỗn hợp K-oleat và K-linoleat có thể tạo môi trường pH cao, ảnh hưởng đến độ bền của hoạt chất Bt có trong hỗn hợp (vi khuẩn *Bt* không bền trong môi trường kiềm mạnh), nên hiệu quả diệt sâu giảm.

Như vậy, tỷ lệ hỗn hợp giữa chất hiệp đồng (K-oleat + K-linoleat) với thuốc trừ sâu Bt S/Bt: 1/1 (w/w) là phù hợp.

### 3.5.1.2. Nghiên cứu chế tạo thuốc trừ sâu mới (hỗn hợp Bt với chất hiệp đồng)

Việc đầu tiên trong nghiên cứu chế tạo sản phẩm thuốc BVTV là lựa chọn, xác định dạng gia công của sản phẩm mới. Theo Danh mục các thuốc BVTV được phép sử dụng tại Việt Nam năm 2015, các thuốc trừ sâu chứa hoạt chất *Bacillus thuringiensis* thường được gia công dạng WP, SC, FS...[5], trong đó dạng WP là thông dụng nhất. Vì vậy, sản phẩm thuốc trừ sâu mới (ký hiệu là BT-S 16WP) chứa hỗn hợp chất hiệp đồng và Bt ở dạng WP (bột thấm nước) được lựa chọn để khảo sát và so sánh với sản phẩm Vi-BT 16.000WP.

Yêu cầu kỹ thuật chung của thuốc BVTV dạng WP là: sản phẩm ở dạng bột, phân tán và tạo huyền phù trong nước. Thành phần bao gồm (tính theo khối lượng sản phẩm): hoạt chất: 25-80%; các chất HDBM gồm chất phân tán (2-5%) và chất thấm ướt (1-3%) và chất độn trợ được bổ sung đến 100%.

Các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm cần kiểm tra khi chế tạo thuốc trừ sâu chứa Bt dạng WP là:

- + Độ mịn: Lượng cặn còn lại trên rây (ướt)  $75 \mu\text{m} \leq 2\%$ .
- + Độ bọt: Thể tích bọt tạo thành sau 1 phút:  $\leq 60 \text{ ml}$ .
- + Tỷ suất lơ lửng (ở  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ): Số lượng CPU của Bt trong dung dịch huyền phù  $\geq 60\%$  số lượng CFU thực tế trong chế phẩm
- + Độ bền bảo quản (theo phương pháp thử gia tốc ở nhiệt độ cao theo qui định): hàm lượng hoạt chất  $\geq 95\%$  hoạt chất ban đầu.

Chất hiệp đồng là hỗn hợp muối K-oleat và K-linoleat tan được trong nước và có tính chất hoạt động bề mặt, đặc biệt có khả năng thấm ướt tốt. Khi hỗn hợp với Vi-BT, chất hiệp đồng sẽ không ảnh hưởng đến chỉ tiêu chất lượng sản phẩm. Do đó, có thể chế tạo sản phẩm mới theo cách trộn trực tiếp chất hiệp với Vi-BT, không cần bổ sung thêm chất HDBM nhằm tạo qui trình gia công đơn giản

Công thức chế tạo sản phẩm mới BT-S 16WP cụ thể như sau:

- Vi-BT 16.000WP: 50% khối lượng.

- Chất hiệp đồng S1 (hỗn hợp K-oleat/K-linoleat: 54/43): 50% khối lượng.

Gia công sản phẩm BT-S 16WP với thành phần nêu trên theo phương pháp nghiền, trộn thông thường. Kiểm tra các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm thu được trước và sau khi thí nghiệm gia tốc, so sánh với sản phẩm Vi-BT 16.000WP. Kết quả được trình bày ở bảng 3.26.

Bảng 3.26. Chỉ tiêu chất lượng sản phẩm BT-S 16WP(hỗn hợp S1 với Vi-BT)

Thứ tự	Tên chỉ tiêu	Vi-BT	Sản phẩm BT-S 16WP	
			Trước gia tốc	Sau gia tốc
1	Nhận dạng	Bột đồng đều, màu trắng ngà	Bột đồng đều, màu vàng nhạt	Bột đồng đều, màu vàng nhạt
2	Hàm lượng hoạt chất <i>Bacillus thuringiensis</i> * (CPU/g)	$6,8 \times 10^{11}$	$3,42 \times 10^{11}$	$3,42 \times 10^{11}$
3	Lượng chất còn lại trên rây $75\mu\text{m}$ (ướt) không lớn hơn, (%)	2	2	2
4	Tỷ suất lơ lửng* (%)	85,1	87,0	86,7
5	Thể tích bột tạo thành sau 1 phút: $\leq 60$ ml.	55	57	54
6	pH dung dịch huyền phù 1%	7,0	7,5 - 8,0	7,5 – 8,0

Ghi chú: Các chỉ tiêu có dấu (\*) được phân tích tại Trung tâm Kiểm định và Khảo nghiệm Thuốc BVTV Phía Bắc, Cục BVTV. Các chỉ tiêu khác phân tích tại Phòng TNTĐ Công nghệ Lọc, hóa dầu

Sản phẩm BT-S 16WP sau khi thí nghiệm độ bền bảo quản ở nhiệt độ cao theo qui định (lưu mẫu ở nhiệt độ  $54^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  trong thời gian 14 ngày). Kết quả phân tích: hàm lượng hoạt chất  $\geq 95\%$ , các chỉ tiêu khác vẫn đạt tiêu chuẩn. Như vậy, có thể gia công sản phẩm theo phương pháp trộn trực tiếp chất hiệp đồng và Vi-BT và không cần bổ sung thêm phụ gia.

### 3.5.2. Chế tạo hỗn hợp chất hiệp đồng với thuốc trừ rầy Imidacloprid

#### 3.5.2.1 Xác định công thức hỗn hợp sản phẩm

Phương pháp nghiên cứu cũng tương tự như với thuốc trừ sâu mới chứa chất hiệp đồng và Bt, trước khi chế tạo thuốc trừ rầy mới, cần xác định tỷ lệ hỗn

hợp giữa Methyl oleat (S2) và Imidacloprid (I) trong công thức gia công nhằm thu được hiệu quả phòng trừ cao nhất, dễ sử dụng nhất.

Để xác định tỷ lệ hỗn hợp tối ưu S2/I, sản phẩm Vicondor 50EC (VIPESCO) chứa 50g Imidacloprid/lít được lựa chọn làm nguyên liệu hỗn hợp và so sánh. Nồng độ sử dụng là 0,1ml/100ml nước (0,1%).

Gia công các công thức thí nghiệm bằng cách cố định lượng hoạt chất Imidacloprid sử dụng và thay đổi lượng Methyl oleat trong hỗn hợp theo các tỷ lệ S2/I: 0,5/1; 1/1; 1,5/1; 2/1, 2,5/1; 3/1. Thử sơ bộ hiệu lực sinh học trong phòng thí nghiệm các công thức trên đối tượng rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.) để xác định công thức hỗn hợp tối ưu. Công thức so sánh gồm CT1: chỉ dùng S2 (không có Imidacloprid) và CT2: chỉ dùng Vicondor 50EC (không có S2). Hiệu quả phòng trừ được xác định sau 7 ngày xử lý với thuốc để đảm bảo độ chính xác số lượng rầy chết. Kết quả được trình bày tại bảng 3.27

**Bảng 3.27. Hiệu quả trừ rầy nâu của các công thức hỗn hợp giữa Methyl oleat và Imidacloprid**

Ký hiệu	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ S2/Imidacloprid (w/w)	Hiệu quả phòng trừ sau 7 ngày (%)
CT1	S2 (So sánh)	1/0	14,17d
CT2	Vicondor 50EC	0/1	59,07c
CT3	S21I	0,5/1	73,92b
CT4	S22I	1,0/1	79,49ab
CT5	S23I	1,5/1	83,30ab
CT6	S24I	2,0/1	87,11a
CT7	S25I	2,5/1	84,1ab
CT8	S26I	3,0/1	75,7b
CV%			4,87

Khi phun thuốc Vicondor 50EC không hỗn hợp với chất hiệp đồng S2, hiệu quả trừ rầy sau 7 ngày chỉ đạt 59,07%. Kết quả cho thấy sản phẩm Vicondor 50EC đã bị giảm hiệu lực đối với rầy nâu.

Sự có mặt của Methyl oleat trong thành phần hỗn hợp với thuốc trừ rầy đã làm tăng hiệu quả phòng trừ rầy nâu từ 14,85% đến 28,04% (các công thức từ CT3 đến CT8). Khi lượng Methyl oleat tăng lên trong hỗn hợp sản phẩm, số lượng rầy chết cũng tăng theo. Điều này chứng minh tác dụng hiệp đồng rõ rệt của Methyl oleat với Imidacloprid trong phòng trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.). Kết quả khảo sát cũng phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới về chất hiệp đồng Methyl oleat trong phòng trừ các côn trùng nông nghiệp và y tế [49], [68].

Hiệu quả diệt rầy nâu đạt giá trị cao nhất là 87,11% ở công thức CT6 cho thấy tỷ lệ hỗn hợp tối ưu giữa Methyl oleat với Imidacloprid S2/I: 2/1. Khi lượng methyl oleat trong hỗn hợp tăng so với Imidacloprid (CT7,CT8) thì hiệu quả diệt rầy giảm, có thể do hàm lượng Imidacloprid trong các công thức này nhỏ, chưa đủ liều lượng gây chết cho rầy nâu.

Như vậy, tỷ lệ hỗn hợp giữa chất hiệp đồng Methyl oleat với Imidacloprid là 2/1 (S/I = 2/1) là tối ưu.

### ***3.5.2.2. Nghiên cứu chế tạo thuốc trừ rầy mới(hỗn hợp chất hiệp đồng với Imidacloprid)***

Thuốc trừ rầy mới là sản phẩm hỗn hợp giữa chất hiệp đồng Methyl oleat và Imidacloprid. Để tiện sử dụng và so sánh hiệu quả, sản phẩm mới được chế tạo dưới dạng nhũ dầu (EC), cùng dạng gia công với sản phẩm Vicondor 50EC.

Thành phần khối lượng trong công thức thuốc Vicondor 50EC gồm Imidacloprid: 5% (50g/l); chất HDBM Sanimal H: 7% và dung môi Solvesso vừa đủ đến 100%. Như vậy, các thành phần trong công thức sản phẩm trừ rầy mới có thêm chất hiệp đồng theo tỷ lệ (%) S2/I=2/1 là:

+ Imidacloprid: 5%

+ Chất hiệp đồng (Methyl oleat): 10%

+ Sanimal H: Đảm bảo độ bền nhũ tương và khả năng bám dính của sản phẩm khi phun lên cây.

+ Dung môi: Vừa đủ đến 100%.

Các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm cần kiểm tra khi gia công dạng EC theo qui định tại TCCS 135:2014/BVTV là: độ tự nhũ ban đầu: hoàn toàn; độ bền nhũ tương sau khi pha mẫu 0,5 giờ, thể tích lớp kem  $\leq 2$  ml; độ bọt (thể tích bọt tạo thành sau 1 phút)  $\leq 60$  ml; độ bền bảo quản: hàm lượng hoạt chất sau bảo quản ở nhiệt độ  $54 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 14 ngày  $\geq 95 \%$  so với trước bảo quản. Như vậy, khi nghiên cứu gia công thuốc trừ rầy mới, cần đảm bảo chất lượng sản phẩm theo qui định.

So sánh với công thức sản phẩm Vicondor 50EC, trong thành phần gia công sản phẩm mới có thêm methyl oleat. Hợp chất này không tan trong nước, chỉ tan trong dung môi hữu cơ nên khi thêm vào có thể ảnh hưởng tới độ bền nhũ tương và độ bọt của sản phẩm mới. Vì vậy, cần khảo sát và xác định hàm lượng chất HDBM là Sanimal H cần thiết cho sản phẩm mới đạt chất lượng.

Căn cứ vào hàm lượng Sanimal H sử dụng trong công thức gia công Vicondor 50EC (7%), cần khảo sát hàm lượng chất HDBM này với 8%, 9% và 10%. Kết quả khảo sát được trình bày tại bảng 3.28

**Bảng 3.28. Ảnh hưởng của lượng Sanimal H tới độ bền nhũ của sản phẩm**

Số TT	Hàm lượng Sanimal H (%)	Độ tự nhũ ban đầu	Độ bền nhũ tương (ml)	Độ bọt (ml)	Nhận xét về sản phẩm
1	7	Không hoàn toàn	2,5	60	Sản phẩm đục
2	8	Hoàn toàn	2,0	60	Sản phẩm hơi đục
3	9	Hoàn toàn	1,9	58	Sản phẩm trong
4	10	Hoàn toàn	1,7	58	Sản phẩm trong

Từ kết quả thí nghiệm trên, hàm lượng chất HDBM Sanimal H cần thiết để gia công sản phẩm hỗn hợp giữa chất hiệp đồng với Imidacloprid 50 EC là 9% (tính theo khối lượng). Công thức gia công sản phẩm hỗn hợp mới (sau đây đặt tên là Imidacloprid-S 50EC) gồm thành phần sau đây:

- Imidacloprid: 5 %
- Methyl oleat: 10 %
- Sanimal H: 9%
- Dung môi Solvesso: Đủ đến 100%

Sản phẩm mới Imidacloprid-S 50EC được gia công theo tỷ lệ trên trong trong thiết bị kín, có cánh khuấy. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng đến khi tạo dung dịch đồng nhất, sau đó ngừng khuấy và để yên 30 phút. Lọc cặn cơ học (nếu có). Sản phẩm đựng trong bình kín, lưu giữ ở nhiệt độ phòng.

Độ bền bảo quản của sản phẩm được xác định thông qua thí nghiệm gia tốc (bảo quản ở nhiệt độ  $54 \pm 2$  °C trong 14 ngày). Kết quả chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm sau khi chạy gia tốc được thể hiện ở bảng 3.29.

**Bảng 3.29. Một số chỉ tiêu chất lượng thuốc trừ rầy mới Imidacloprid-S 50EC**

TT	Tên chỉ tiêu	Imidacloprid-S 50EC	
		<i>Trước khi TN gia tốc</i>	<i>Sau khi TN gia tốc</i>
1	Trạng thái bề ngoài	Dịch trong, đồng nhất, màu vàng	Dịch trong, đồng nhất, màu vàng
2	Hàm lượng hoạt chất (%)	5,034	4,935
3	Độ tụt nhũ ban đầu	Hoàn toàn	Hoàn toàn
4	Độ bền nhũ tương (Thể tích lớp kem sau 0,5 giờ, ml)	$\leq 2$	2
5	Độ bọt (Thể tích bọt tạo thành sau 1 phút $\leq 60$ ml).	55	57

Sau thí nghiệm độ bền bảo quản ở nhiệt độ cao theo tiêu chuẩn (lưu mẫu ở nhiệt độ  $54^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 14 ngày), sản phẩm mới Imidacloprid-S 50EC vẫn đạt tiêu chuẩn theo TCCS 07:2006 và TCCS 135:2014: hàm lượng hoạt



chất đạt > 95%. Các chỉ tiêu khác như độ tự nhũ, độ bền nhũ tương, độ bọt vẫn trong giới hạn cho phép.

### 3.6. KHẢO NGHIỆM SƠ BỘ HIỆU LỰC SINH HỌC CỦA SẢN PHẨM MỚI

#### 3.6.1. Khảo nghiệm sản phẩm mới trừ sâu hại rau (*Plutella xylostella*)

Thuốc trừ sâu BT-S 16WP (hỗn hợp chất hiệp đồng S1 với thuốc Bt) là sản phẩm mới nên cần được khảo nghiệm trên đồng ruộng nhằm đánh giá hiệu quả phòng trừ sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*).

##### 3.6.1.1. Xác định nồng độ sử dụng của thuốc trừ sâu mới (BT-S 16WP) đối với sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*).

- Công thức khảo nghiệm: CT1: Đối chứng phun nước lã, CT2, CT3, CT4, CT5: Sản phẩm trừ sâu mới (BT-S16WP) với nồng độ phun tương ứng lần lượt là: 1,5 g/L; 2,0 g/L; 2,5 g/L và 3,0 g/L.

- Kết quả khảo nghiệm:

Kết quả khảo nghiệm hiệu lực diệt sâu tơ trên su hào sau 1,3,5 ngày đối với các nồng độ của thuốc trừ sâu mới được trình bày tại bảng 3.30

**Bảng 3.30. Hiệu quả trừ sâu tơ hại su hào qua của các công thức thí nghiệm của sản phẩm mới BT-S16WP (10/2014 tại xã Tiên Phong, Mê Linh, Hà Nội)**

Công thức	Nồng độ sử dụng của BT-S16WP (g/L)	Hiệu quả (%)		
		Sau 1 ngày	Sau 3 ngày	Sau 5 ngày
CT1	Nước lã	-	-	-
CT2	1,5	33,3	63,3	73,3
CT3	2,0	60,0	75,3	80,5
CT4	2,5	63,3	80,8	87,1
CT5	3,0	67,0	82,7	90,6

Hiệu quả diệt sâu tơ của thuốc trừ sâu mới khi sử dụng nồng độ  $\leq 2,0$  g/L chỉ đạt cao nhất 80,5% (CT3) cho thấy nồng độ này còn thấp. Khi tăng nồng độ

2,5 g/L, tỷ lệ sâu chết trên 87%. Như vậy, nồng độ sử dụng 2,5 g/L đã đạt theo TCCS 09:2010/BVTV, không cần sử dụng nồng độ cao hơn.

Kết luận: nồng độ sử dụng thuốc trừ sâu mới (hỗn hợp giữa chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt) là 2,5 g/L.

### 3.6.1.2. Hiệu lực sinh học của thuốc trừ sâu mới (BT-S 16WP) trong phòng trừ sâu tơ hại rau.

- Công thức khảo nghiệm gồm: CT1: Phun nước lã (đối chứng); CT2: Vi-BT (so sánh), nồng độ phun: 2,5g/L (20g/bình 8L); CT3: Sản phẩm trừ sâu mới (BT-S), nồng độ phun: 2,5 g/L

- Kết quả được trình bày tại bảng 3.31.

**Bảng 3.31. Hiệu quả phòng trừ của sản phẩm BT-S 16WP đối với sâu tơ hại su hào (Tháng 11/2014 tại xã Tiền Phong, Mê Linh, Hà Nội)**

Công thức	Mật độ sâu trước phun (con/20cây)	Mật độ sâu sau phun (con/20 cây)			Hiệu quả (%)		
		1 ngày	3 ngày	7 ngày	1 ngày	3 ngày	7 ngày
CT1	42,7	38,0	48,3	50,0	-	-	-
CT2	50,3	30,7	23,3	21,7	36,6a	55,2a	62,7a
CT3	53,8	30,7	23,3	12,8	66,4b	77,9b	88,8b
CV (%)					15,2	14,4	13,9
LSD (0,05)					3,7	4,4	4,6

Qua bảng 3.31 cho thấy hiệu quả phòng trừ của thuốc mới BT-S 16WP trên sâu tơ hại su hào sau 7 ngày xử lý đạt 88,8% và cao hơn so với sản phẩm so sánh là thuốc trừ sâu Vi-BT (đạt 62,7%), mặc dù lượng hoạt chất của sản phẩm mới chỉ bằng 1/2.

Kết quả này chứng minh tác dụng làm tăng hiệu lực phòng trừ của chất hiệp đồng (hỗn hợp muối kali oleat và kali linoleat) đối với thuốc trừ sâu Bt trên

đối tượng sâu tơ hại rau màu tại Việt Nam. So sánh với kết quả của nghiên cứu của tác giả Michelle D.Gaut [60], ta thấy có sự trùng hợp về hoạt tính sinh học của hỗn hợp K-oleat/K-linoleat với thuốc trừ sâu Bt. Tuy nhiên đối tượng phòng trừ của tác giả khác với Luận án: côn trùng thí nghiệm của Michelle D.Gaut là loài bướm Địa trung hải (*Choristoncurea occidentalis*) và bướm hổ (*Halisidota argentat*) thuộc bộ cánh vảy (*Lepidoptera*), còn trong Luận án là sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*) tại Việt Nam. Như vậy, hỗn hợp K-oleat/K-linoleat có tác dụng hiệp đồng với Bt trong phòng trừ nhiều loại côn trùng gây hại khác nhau.

### 3.6.2. Khảo nghiệm sản phẩm mới trừ rầy nâu hại lúa

Tương tự như trên, thuốc trừ rầy Imidacloprid-S 50EC (hỗn hợp chất hiệp đồng S2 với Imidacloprid) là sản phẩm mới nên sẽ được khảo nghiệm trên đồng ruộng nhằm đánh giá hiệu quả phòng trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens Stal.*) theo qui định tại QCVN 01-29:2010/BNNPTNT về “Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm trên đồng ruộng hiệu lực của các thuốc trừ rầy hại lúa”

#### 3.5.2.1. Xác định nồng độ sử dụng của sản phẩm mới đối với rầy nâu hại lúa

- Công thức khảo nghiệm:

CT1: Đối chứng phun nước lã; CT2, CT3, CT4, CT5: Sản phẩm trừ rầy mới với nồng độ phun lựa chọn tương ứng là: 0,5ml/L; 0,75ml/L; 1,0 ml/L; 1,5 ml/L.

- Kết quả khảo nghiệm hiệu lực diệt rầy nâu hại lúa sau 3,7 ngày đối với các nồng độ của thuốc trừ rầy mới được trình bày tại bảng 3.32

Bảng 3.32. Hiệu quả trừ rầy nâu của công thức thí nghiệm của sản phẩm mới Imidacloprid-S 50EC (năm 2015 tại xã Đại đồng, Thạch Thất, Hà Nội)

Công thức	Nồng độ sử dụng của Imidacloprid-S 50EC (ml/L)	Hiệu quả (%)	
		Sau 3 ngày	Sau 7 ngày
CT1	Nước lã	-	-
CT2	0,5	56,65	68,05
CT3	0,75	87,75	92,25

CT4	1,0	88,52	93,62
CT5	1,5	90,10	95,05

Với nồng độ sử dụng thấp (0,5 ml/L như công thức CT2), hiệu quả trừ rầy chưa đảm bảo. Khi nồng độ sử dụng tăng từ 0,75 ml/L trở lên, tỷ lệ rầy chết đều cao hơn 90%. Tuy nhiên, lựa chọn nồng độ sử dụng 0,75 ml/L (công thức CT3) là hợp lý vì vừa đảm bảo tỷ lệ rầy chết, vừa giảm lượng thuốc phun và giảm ô nhiễm môi trường.

Như vậy, nồng độ sử dụng của sản phẩm thuốc trừ rầy mới (Imidacloprid-S 50EC) là 0,75 ml/L.

### 3.5.2.2.. Hiệu quả trừ rầy của sản phẩm mới Imidacloprid-S 50EC

- Công thức khảo nghiệm gồm: CT1: Đối chứng phun nước lã; CT2: Sản phẩm so sánh Vicondor 50EC, nồng độ phun 1,0 ml/L nước; CT3: Sản phẩm mới Imidacloprid-S 50EC, nồng độ phun 0,75 ml/L nước.

- Kết quả khảo nghiệm hiệu lực sinh học của trừ rầy mới Imidacloprid-S 50EC, có so sánh với sản phẩm cùng loại ở qui mô đồng ruộng được trình bày ở bảng 3.33.

Bảng 3.33. Hiệu quả phòng trừ của sản phẩm Imidacloprid-S 50EC  
(Vụ mùa 2015, Đại Đồng, Thạch Thất, Hà Nội)

Công thức	Mật độ rầy trước xử lý (con/ khóm)	Mật độ rầy sau khi xử lý (con/khóm)			Hiệu quả (%)		
		1 ngày	3 ngày	7 ngày	1 ngày	3 ngày	7 ngày
CT1	46,6a	40,0c	47,2c	40,0c	-	-	-
CT2	43,5a	22,0b	19,4b	13,3b	41,08	55,97	64,38
CT3	48,2a	13,8a	10,4a	6,7a	66,65	78,7	83,81
CV (%)	10,4	12,6	6,5	14,8	-	-	-

Ở 3 kỳ điều tra 1,3 và 7 ngày sau phun, hiệu lực trừ rầy có diễn biến tăng dần từ đầu đến cuối kỳ, chứng tỏ hiệu lực của thuốc kéo dài.

So sánh với thuốc trừ rầy Vicondor 50EC, hiệu lực trừ rầy của sản phẩm mới Imidacloprid-S 50EC (CT3) cao hơn hẳn ở tất cả các kỳ điều tra. Hiệu quả phòng trừ của sản phẩm mới đạt 83,81% sau 7 ngày phun, mặc dù nồng độ sử dụng thấp hơn (0,75 ml/L so với 1,0 ml/L).

Kết quả khảo nghiệm chứng tỏ thuốc trừ rầy mới (hỗn hợp chất hiệp đồng với Imidacloprid) có hiệu lực tốt hơn so với sản phẩm cùng loại không có chất hiệp đồng. Methyl oleat có tác dụng hiệp đồng rõ rệt với Imidacloprid trong phòng trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata Lugens* Stal) tại Việt Nam.

So sánh kết quả với công trình nghiên cứu của Byron I. Reid và cộng sự [68] có thể nhận thấy sự khác nhau về đối tượng phòng trừ. Nhóm tác giả Byron I. Reid nghiên cứu hoạt tính hiệp đồng của methyl oleat với Imidacloprid trong phòng trừ côn trùng y tế (ruồi, muỗi, kiến, gián), trong khi đó Luận án sử dụng hỗn hợp chất hiệp đồng với Imidacloprid để phòng trừ rầy nâu hại lúa tại Việt Nam. Qua đó có thể nhận thấy, methyl oleat có tác dụng hiệp đồng với Imidacloprid trong phòng trừ nhiều loại côn trùng gây hại khác nhau.

### **3.6.3. Xác định tác dụng của chất hiệp đồng**

Hoạt tính sinh học của các chất hiệp đồng được xác định thông qua khả năng làm tăng hiệu lực phòng trừ của thuốc trừ sâu khi chúng hỗn hợp với chất hiệp đồng. Có nhiều cách biểu thị hoặc tính toán, xác định hiệu quả sinh học của chất hiệp đồng. Trong phạm vi của Luận án, xác định tác dụng làm tăng hiệu lực phòng trừ của chất hiệp đồng theo cách đơn giản và khả thi nhất được lựa chọn.

#### **3.6.3.1. Xác định tác dụng của chất hiệp đồng đối với thuốc Bt trừ sâu tơ hại rau**

a. Tác dụng làm tăng hiệu lực phòng trừ của chất hiệp đồng đối với thuốc trừ sâu Bt

Theo kết quả khảo nghiệm trên đồng ruộng, hiệu quả phòng trừ sâu tơ của sản phẩm có bổ sung chất hiệp đồng BT-S 16WP sau 7 ngày là 88,8 % còn sản

phẩm Vi-BT 16000WP (Bt dùng đơn) là 62,7 %. Hiệu quả phòng trừ của thuốc trừ sâu mới BT-S 16WP tăng so với thuốc Bt là:

$$E \% = \frac{88,8 - 62,7}{88,8} \times 100 = 29,39\%$$

Như vậy khi sử dụng hỗn hợp, chất hiệp đồng (hỗn hợp kali oleat và kali linoleat theo tỷ lệ 54/43) có tác dụng làm tăng hiệu lực sinh học của thuốc trừ sâu Bt trên sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*) tại Việt Nam 29,39%.

#### b. Chỉ số hiệp đồng (SF)

Theo kết quả khảo nghiệm ngoài đồng ruộng, hiệu lực phòng trừ sâu tơ của sản phẩm mới BT-S 16WP (S1 + Bt) sau 7 ngày là 88,8% còn của sản phẩm so sánh chỉ có Bt là 62,7%. Như vậy, chỉ số hiệp đồng là:

$$SF = 88,8 : 62,7 = 1,416$$

### 3.6.3.2. Xác định tác dụng của chất hiệp đồng đối với thuốc trừ rầy *Imidacloprid*

#### a. Tác dụng làm tăng hiệu lực phòng trừ của chất hiệp đồng đối với thuốc trừ rầy Imidacloprid

Theo kết quả khảo nghiệm ngoài đồng ruộng, hiệu lực phòng trừ rầy nâu sau 7 ngày của sản phẩm chứa chất hiệp đồng Imidacloprid-S 50EC là 83,81%; của sản phẩm so sánh Vicondor 50EC (không có chất hiệp đồng) sau 7 ngày là 64,38%. Hiệu quả phòng trừ của sản phẩm Imidacloprid-S 50EC so với Imidacloprid là:

$$\text{Hiệu quả phòng trừ} = \frac{83,81 - 64,38}{83,81} \times 100 = 23,18\%$$

Như vậy khi sử dụng hỗn hợp, chất hiệp đồng (methyl oleat) có tác dụng làm tăng hiệu lực sinh học của thuốc Imidacloprid trên rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.) tại Việt Nam 23,18%.

### b. Chỉ số hiệp đồng (SF)

Theo kết quả khảo nghiệm ngoài đồng ruộng, hiệu lực phòng trừ rầy nâu sau 7 ngày của sản phẩm mới Imidacloprid-S 50EC (S2 + Imidacloprid) là 88,8% còn của sản phẩm so sánh chỉ có Imidacloprid là 62,7%. Như vậy chỉ số hiệp đồng là:

$$SF = 83,81 : 64,38 = 1,30$$

### **3.7. BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ TÁC ĐỘNG CỦA CHẤT HIỆP ĐỒNG**

Như đã trình bày tại phần tổng quan, cơ chế tác động của các chất hiệp đồng được giải thích theo nhiều cách, trong đó cơ chế sinh học hay cơ chế chuyển hóa được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu từ nhiều năm nay. Khi côn trùng tiếp xúc với thuốc, các enzym giải độc có trong cơ thể côn trùng tham gia vào các phản ứng chuyển hóa các chất độc thành không độc hoặc không ảnh hưởng tới côn trùng. Các chất hiệp đồng có tác dụng ức chế hoạt tính của các enzym này, làm cho các thuốc không bị mất hoạt tính đối với côn trùng gây hại.

Tuy nhiên, các quá trình chuyển hóa sinh học trong cơ thể côn trùng diễn ra liên tục và rất phức tạp. Ngoài ra, còn nhiều yếu tố ảnh hưởng khác như tính chất hóa - lý của chất độc, bản chất các enzym có trong cơ thể côn trùng... nên tác động của các chất hiệp đồng lên hệ thống các enzym giải độc trong nhiều trường hợp còn chưa được làm sáng tỏ. Nhìn chung, việc nghiên cứu cơ chế tác động của các chất hiệp đồng lên hệ thống các enzym chuyển hóa của chúng rất khó khăn. Mặc dù vậy, cơ chế tác động của 2 chất hiệp đồng tổng hợp đối với thuốc trừ sâu Bt và Imidacloprid đã bước đầu được nghiên cứu.

Theo các tài liệu đã công bố tại Mục 1.3.2.3, các nhà khoa học đã xác định một số enzym giải độc trong côn trùng như sau: đối với thuốc trừ sâu Bt là enzym tiêu hóa APN, đối với thuốc trừ rầy Imidacloprid là enzym giải độc GST và P450. Như vậy, cần xác định ảnh hưởng của các chất hiệp đồng đến khả năng ức

chế của các enzym này, qua đó bước đầu giải thích cơ chế làm tăng hiệu quả phòng trừ của hỗn hợp thuốc trừ sâu với chất hiệp đồng tương ứng.

### 3.7.1. Tác dụng ức chế enzym APN của hỗn hợp kali oleat và kali linoleat

Vai trò của enzym APN là xúc tác cho quá trình phân tách các nhóm amino acid từ các protein hoặc các chuỗi peptit và góp phần quan trọng trong quá trình hình thành biểu mô trong ruột côn trùng. Các chất có khả năng liên kết hoặc ức chế enzym APN sẽ làm gián đoạn quá trình hình thành biểu mô và xuất hiện những lỗ nhỏ trong thành ruột của côn trùng, dẫn đến côn trùng bị chết. Để đánh giá khả năng ức chế APN của các chất, cần xác định hoạt tính của enzym khi tiếp xúc với chúng.

Các mẫu thí nghiệm bao gồm các công thức sau: CT1: Tinh thể độc chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Bt); CT2: Chất hiệp đồng S1 (hỗn hợp kali oleat và kali linoleat); CT3: Hỗn hợp giữa thuốc Bt và chất hiệp đồng S1 theo tỷ lệ khối lượng là 1/1.

Kết quả đánh giá khả năng ức chế enzym APN của các mẫu thử được thể hiện tại bảng 3.34.

Bảng 3.34. Khả năng ức chế enzym APNs của mẫu thí nghiệm

Công thức	Kí hiệu mẫu	Nồng độ đầu của mẫu (mg/ml)	Ức chế (%)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
CT1	Bt	3	0	> 3
CT2	S1	3	78,3 ± 0,9	1,06
CT3	Bt + S1	3	70,0 ± 0,4	0,55

- Protein tinh thể độc của chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* không có tác dụng ức chế enzym APN, nhưng chất hiệp đồng (S1) ở nồng độ 3 mg/ml biểu hiện khả năng ức chế enzym này là khá cao, đạt 78,3 % với IC<sub>50</sub> = 1,06 mg/ml.



- Khi hỗn hợp thuốc trừ sâu Bt với chất hiệp đồng theo tỷ lệ 1/1, sản phẩm thu được có khả năng ức chế enzym APN gần tương đương với chất hiệp đồng (70,0 %), nhưng nồng độ ức chế chỉ bằng 1/2 ( $IC_{50} = 0,55$  mg/ml).

Như vậy có thể thấy, hỗn hợp kali oleat + kali linoleat có tác dụng ức chế enzym APN tương đối cao. Qua đó có thể kết luận, sự có mặt của chất hiệp đồng S1 đã làm tăng hiệu quả phòng trừ sâu tơ của thuốc trừ sâu Bt.

Ngoài ra, nồng độ ức chế hoạt tính enzym của sản phẩm hỗn hợp Bt với S1 rất nhỏ ( $IC_{50} = 0,55$  mg/ml) cũng chứng minh hiệu quả phòng trừ của sản phẩm hỗn hợp vì có thể sử dụng liều lượng phun trên sâu thấp hơn so với sản phẩm đối chứng. Nhận xét này hoàn toàn phù hợp với kết quả khảo nghiệm thực tế sản phẩm trên đối tượng sâu tơ hại su hào đã trình bày ở Phần khảo nghiệm.

Khả năng ức chế enzym APN của chất hiệp đồng S1 (K-oleat và K-linoleat) có thể được lý giải như sau: Theo Ramírez-Expósito và cộng sự, khi có mặt trong môi trường nuôi cấy, các muối của acid oleic và linoleic có thể tác động đến hoạt tính của các chủng enzym APN thông qua sự điều chỉnh hoạt tính của chuỗi peptide trong quá trình phân tách [121]. Ngoài ra, tính kiềm yếu của dung dịch muối kali của acid oleic và linoleic có thể là môi trường thuận lợi thúc đẩy quá trình hòa tan của tinh thể độc tố trong ruột giữa của côn trùng dẫn đến hoạt tính của Bt tăng lên.

### **3.7.2. Tác dụng ức chế enzym Glutathione S-transferase của methyl oleat**

Glutathione S-transferase (GST) là enzym giải độc quan có trong hầu hết các côn trùng, động vật có vú và được phân bố đa dạng trong tự nhiên. Enzym GST bảo vệ tế bào chống lại các chất độc bằng cách liên kết với nhóm thiol (-SH) của Glutathione tạo ái lực với các chất độc.

Theo Zewen L và cộng sự [29], các enzym esterase và GST có vai trò yếu trong việc giải độc thuốc trừ rầy Imidacloprid. Tuy nhiên, cho đến nay, ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào công bố ảnh hưởng của chất hiệp đồng methyl oleat (S2) lên hoạt tính của enzym GST. Do vậy, Luận án sẽ đánh giá khả năng ức chế enzym GST của chất hiệp đồng S2, từ đó, đưa ra nhận xét sơ bộ về vai trò

của enzym này liên quan đến tính kháng Imidacloprid của rầy nâu *Nilaparvata lugens* Stål và hiệu quả phòng trừ của chất hiệp đồng S2 khi hỗn hợp với Imidacloprid.

Các mẫu thí nghiệm bao gồm các công thức sau: Imidacloprid, chất hiệp đồng S2 (methyl oleat) và hỗn hợp giữa Imidacloprid và S2 theo tỉ lệ S/I = 2/1.

Kết quả thí nghiệm khả năng ức chế enzym GST của các mẫu thử được thể hiện tại bảng 3.35.

**Bảng 3.35. Khả năng ức chế enzym GST của mẫu thí nghiệm**

TT	Mẫu thí nghiệm	Nồng độ đầu của mẫu (mg/ml)	Ức chế (%)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
1	Imidacloprid	5	61,2 ± 7,4	4,28
2	S2 (methyl oleat)	5	29,7 ± 1,1	> 5
3	Imidacloprid + S2	5	76,3 ± 1,2	3,34

*Nhận xét:*

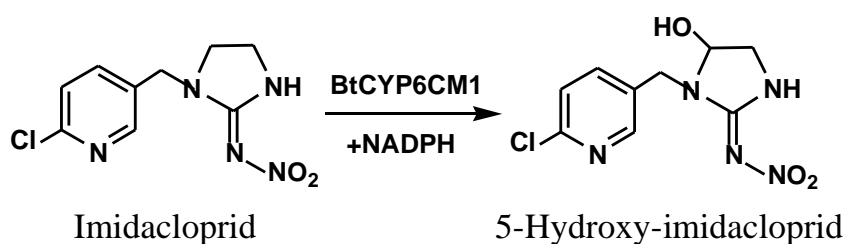
- Hoạt chất Imidacloprid biểu hiện khả năng ức chế enzym GST đạt 61,2 % ở nồng độ đầu 5 mg/ml chứng tỏ enzym GST có tham gia vào các quá trình giải độc nhưng ở mức độ thấp vì hơn 50% đã bị ức chế bởi hoạt chất độc. Qua đó cũng cho nhận xét là hoạt chất Imidacloprid đã bị rầy nâu kháng.

- Khả năng ức chế enzym GST của chất hiệp đồng methyl oleat không cao (gần 30%). Tuy nhiên khi hỗn hợp giữa chất hiệp đồng với hoạt chất Imidacloprid thì biểu hiện khả năng ức chế cao hơn so với mẫu đơn chất (76,3%), với nồng độ ức chế thấp hơn. Như vậy, có thể thấy hợp chất methyl oleat cũng có tác dụng hiệp đồng với Imidacloprid để ức chế enzym giải độc GST, mặc dù biểu hiện không cao.

### 3.7.3. Tác dụng ức chế enzym Cytochrom P450-monoxygenases của methyl oleat

Một số nghiên cứu công bố, cytochrome P450- monoxygenases (CYP) là enzym chính gây nên sự kháng thuốc Imidacloprid của rầy nâu *Nilaparvata lugens* Stål. Đây là nhóm enzym lớn và đa dạng, có chức năng đặc biệt là xúc tác quá trình oxy hóa các hợp chất hữu cơ, trong đó có nhiều chất độc như các thuốc trừ sâu. Các enzym CYP cũng đóng vai trò quan trọng trong khả năng thích nghi với chất độc tác động từ bên ngoài của côn trùng.

Cơ chế kháng thuốc Imidacloprid được giải thích như sau [122]: khi ủ Imidacloprid với cơ chất NADPH oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase) và biến thể sinh học chủng CYP6CM1 của enzym CYP trong 60 phút ở 30 °C, dưới tác dụng của enzym, Imidacloprid chuyển hóa thành dạng 5-hydroxy ít độc hơn 10 lần so với Imidacloprid (LC<sub>50</sub> qua đường tiêu hóa của 5-hydroxy-Imidacloprid là 2.4 mg/l so với 0.24 mg/l của Imidacloprid [123]:



Như vậy, vai trò giải độc của enzym CYP đối với thuốc Imidacloprid là rõ ràng. Hạn chế hoặc kìm hãm hoạt động của enzym này có thể giúp khắc phục tính chống thuốc của rầy nâu đối với Imidacloprid.

Các mẫu thí nghiệm bao gồm các công thức sau: Imidacloprid, chất hiệp đồng S2 (methyl oleat) và hỗn hợp giữa Imidacloprid và S2 theo tỉ lệ S/I = 2/1.

Khả năng ức chế enzym CYP của các mẫu thử được thể hiện tại bảng 3.36.

**Bảng 3.36. Khả năng ức chế enzyme CYP của mẫu thí nghiệm**

<b>TT</b>	<b>Mẫu thí nghiệm</b>	<b>Nồng độ đầu của mẫu (mg/ml)</b>	<b>Ức chế (%)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/ml)</b>
1	Imidacloprid	5	50,2 ± 7,4	2,58
2	S2 (methyl oleat)	5	85,7 ± 1,1	1,02
3	Imidacoprid + S2	5	86,3 ± 1,2	0,95

Từ bảng 3.36, có thể dễ dàng nhận thấy:

- Thuốc trừ sâu Imidacloprid biểu hiện khả năng ức chế enzyme CYP ở nồng độ đầu 5 mg/ml đạt 50,2 %, với giá trị IC<sub>50</sub> = 2,58 mg/ml (~ 10 µM). Kết quả cho thấy Imidacloprid đã bị rầy nâu kháng ở mức độ nhất định.

- Chất hiệp đồng S2 (methyl oleat) có khả năng ức chế tốt enzyme CYP (85,7 %, với IC<sub>50</sub> = 1,02 mg/ml) và tương đương với khả năng ức chế của hỗn hợp chất hiệp đồng với Imidacloprid (86,3 %, IC<sub>50</sub> = 0,95 mg/ml).

Với kết quả khảo sát khả năng ức chế enzyme GST và CYP trong phòng thí nghiệm của các mẫu hoạt chất Imidacloprid, methyl oleat và hỗn hợp của chúng trên có thể sơ bộ kết luận:

- Hoạt chất Imidacloprid đã bị rầy nâu kháng thuốc.
- Liên quan đến sự kháng thuốc của rầy nâu, sự biểu hiện của enzyme CYP đóng vai trò chính, còn enzyme GST có ảnh hưởng yếu.
- Methyl oleat là chất có khả năng ức chế tốt hoạt tính của enzyme CYP, do đó là chất hiệp đồng phù hợp cho Imidacloprid trong phòng trừ rầy nâu hại lúa. Hỗn hợp methyl oleat với Imidacloprid cũng có khả năng ức chế tốt enzyme CYP nên có thể khắc phục hiện tượng rầy kháng thuốc Imidacloprid, qua đó làm tăng hiệu quả phòng trừ của sản phẩm hỗn hợp. Kết luận này cũng đã được chứng minh thông qua kết quả khảo nghiệm trong phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng của sản phẩm trên rầy nâu hại lúa tại vùng lúa đồng bằng Sông Hồng.

## KẾT LUẬN

1. Đã khảo sát và xác định 2 chất hiệp đồng phù hợp cho 2 loại thuốc BVTV đã bị giảm hiệu lực tại Việt Nam: hỗn hợp muối kali của acid oleic và linoleic cho thuốc trừ sâu Bt để phòng trừ sâu tơ hại rau *Plutella xylostella*; methyl oleat cho thuốc trừ rầy Imidacloprid để phòng trừ rầy nâu hại lúa *Nilaparvata lugens* Stal. tại Việt Nam.

2. Lần đầu tiên đã thu thập, khảo sát hàm lượng dầu và hàm lượng một số acid béo không no C<sub>18</sub> của 20 nguyên liệu chứa dầu thực vật tại Việt Nam. Dựa vào số liệu khảo sát, đã lựa chọn dầu hạt đào làm nguyên liệu thích hợp để điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và dầu hạt sỏ để điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid.

3. Đã nghiên cứu phương pháp dùng enzym để tách dầu hạt sỏ và dầu hạt đào với các thông số sau: nhiệt độ 50<sup>0</sup>C; thời gian 3h; tốc độ ly tâm 10.000 vòng/phút; sử dụng enzym protease với nồng độ 0,6% (w/w) cho dầu hạt sỏ và 0,8% (w/w) cho dầu hạt đào. Hiệu suất đạt 76,9% (từ hạt sỏ) và 71,3% (từ hạt đào). Sau khi tách, tỷ lệ khối lượng acid oleic/linoleic của dầu hạt đào là 55/32 (%), của dầu hạt sỏ là 82,3/7,7 (%), phù hợp làm nguyên liệu để điều chế các chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và Imidacloprid.

4. Từ dầu hạt đào, đã điều chế hỗn hợp K-oleat/K-linoleat (54/43) làm chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt, qua các bước: 1) Tách hỗn hợp acid béo bằng phản ứng thủy phân dầu TV với KOH trong ethanol ở nhiệt độ 70<sup>0</sup>C; thời gian 120 phút; tỷ lệ ethanol/dầu: 200ml/100g. 2) Tách acid oleic, acid linoleic từ hỗn hợp acid béo thu được bằng phương pháp tạo phức kết tinh với ure, sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm nhằm thu được các thông số tối ưu: tỷ lệ ure/FFA: 2/1, kết tinh ở 0<sup>0</sup>C, thời gian: 16 giờ. Kết quả thu được hỗn hợp acid béo chứa chủ yếu acid oleic (53,9%), acid linoleic (43, 62%) và lượng nhỏ acid béo no còn lại (hơn 1%). 3) Chuyển hóa hỗn hợp acid béo thu được thành muối kali theo tỷ lệ khối lượng và pH đạt yêu cầu dùng làm chất hiệp đồng.

5. Từ dầu hạt sỏ, đã điều chế methyl oleat làm chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid, qua các bước: 1) Tổng hợp hỗn hợp methyl este của acid béo (FAME) bằng phản ứng este hóa chéo dầu sỏ với methanol ở 75°C, thời gian 8 giờ, sử dụng lượng xúc tác chất lỏng ion  $mimC_4H_8SO_3H.CH_3SO_3$  bằng 10% khối lượng dầu. 2) Tách và nâng cao hàm lượng methyl oleat bằng phương pháp tạo phức với ure qua 2 giai đoạn: kết tinh ở 10°C và 0°C. Sản phẩm thu được có hàm lượng > 98%, đảm bảo chất lượng làm chất hiệp đồng. Thành phần các acid béo và methyl este được xác định bằng phổ GC-MS.

6. Đã chế tạo 2 sản phẩm thuốc BVTV mới, đạt tiêu chuẩn chất lượng của Bộ NN&PTNT: Thuốc trừ sâu BT-S 16WP (hỗn hợp giữa K-oleat/ K-linoleat với thuốc trừ sâu Vi-BT 16.000WP, tỷ lệ 1/1 w/w) và thuốc trừ rầy Imidacloprid-S 50EC (hỗn hợp giữa methyl oleat với Imidacloprid theo tỷ lệ 2/1).

7. Đã khảo nghiệm hiệu lực sinh học 2 sản phẩm thuốc mới theo qui định. Kết quả cho thấy, hiệu lực trừ sâu tơ hại rau của thuốc BT-S 16WP cao hơn 29,9% so với đối chứng, chỉ số hiệp đồng (SF): 1,416; hiệu lực trừ rầy nâu hại lúa của thuốc Imidacloprid-S 50EC cao hơn 23,18% so với đối chứng, SF: 1,30.

8. Lần đầu tiên ở Việt Nam đã nghiên cứu cơ chế tác động của các chất hiệp đồng và có kết luận ban đầu: hỗn hợp muối K-oleat và K-linoleat có tác dụng ức chế mạnh enzym tiêu hóa APN của sâu tơ hại rau *Plutella xylostella* (78,3%, với  $IC_{50} = 1,06$  mg/ml) và Methyl oleat có tác dụng ức chế yếu enzym giải độc GST nhưng ức chế mạnh enzym CYP của rầy nâu *Nilaparvata lugens* Stal. (85,7%, với  $IC_{50} = 1,02$  mg/ml). Nhờ tác dụng ức chế hoạt tính của các enzym này, hiệu quả trừ sâu của thuốc Bt và trừ rầy của thuốc Imidacloprid đã được nâng cao. Kết quả nghiên cứu đã góp phần giải thích và làm rõ cơ chế tác động của các chất hiệp đồng lựa chọn cho một số thuốc trừ sâu đã bị giảm hiệu lực ở Việt Nam.

## ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã khảo sát đầy đủ các chất có tác dụng hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt và thuốc trừ rầy Imidacloprid, từ đó đã lựa chọn các chất hiệp đồng phù hợp trong phòng trừ các đối tượng sâu, rầy đã kháng thuốc tại Việt Nam: Hỗn hợp K-oleat và K-linoleat (tỷ lệ w/w xấp xỉ 54/43) là chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt để phòng trừ sâu tơ hại rau họ thập tự (*Plutella xylostella*) và methyl oleat là chất hiệp đồng với Imidacloprid để phòng trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal).
2. Đã thu thập, khảo sát hàm lượng dầu và hàm lượng một số acid béo không no C<sub>18</sub> của 20 nguyên liệu chứa dầu thực vật tại Việt Nam. Dựa vào số liệu khảo sát, đã lựa chọn dầu hạt đào làm nguyên liệu thích hợp để điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và dầu hạt sỏ để điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid.
3. Dựa trên cơ chế hoạt động và khả năng phá vỡ thành tế bào thực vật chứa dầu của một số enzym, đã nghiên cứu lựa chọn và sử dụng enzym protease để tách dầu từ hạt sỏ và hạt đào. Phương pháp này giảm lượng dung môi độc hại sử dụng so với các phương pháp tách dầu thực vật khác nên góp phần giảm ô nhiễm môi trường.
4. Sử dụng xúc tác chất lỏng ion  $mimC_4H_8SO_3H.CH_3SO_3$  để thực hiện phản ứng este hóa chéo dầu sỏ thành methyl este của acid béo. Quá trình tách, tinh chế sản phẩm đơn giản hơn. Đây là hướng nghiên cứu mới được khuyến cáo áp dụng Hóa học xanh trong tổng hợp hữu cơ.
5. Nghiên cứu cơ chế tác động của chất hiệp đồng đối với một số enzym giải độc của côn trùng gây hại. Kết quả cho thấy, hỗn hợp K-oleat+K-linoleat có tác dụng ức chế mạnh enzyme APN của sâu tơ (*Plutella xylostella*); Methyl oleat có tác động ức chế mạnh enzym CPY và ức chế yếu enzym GST của rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal.). Đây là các kết quả mới, lần đầu tiên được công bố tại Việt Nam, góp phần giải thích cơ chế tác động, phương thức chuyển hóa chất hiệp đồng trong cơ thể côn trùng, từ đó đề xuất biện pháp khắc phục tính kháng thuốc của côn trùng nhằm tăng hiệu lực sinh học cho thuốc BVTV tại Việt Nam.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

1. Hoàng Thân Hoài Thu, Đào Văn Hoàng (2012). Tối ưu hóa quá trình tách các acid béo không no C18 từ dầu thực vật bằng phương pháp qui hoạch hóa thực nghiệm. *Tạp chí Công nghiệp Hóa chất*, 7, 31-36.
2. Dao Van Hoang, Hoang Than Hoai Thu (2015). Synergist efficacy of methyl oleate in mixture with permethrin insecticide against mosquito *Aedes Aegypti*, *VietNam journal of chemistry*, 53(2e1), 126-129.
3. Hoàng Thân Hoài Thu, Đào Văn Hoàng (2014). Tác dụng hợp lực (synergist) giữa muối của các acid béo không no hỗn hợp với thuốc trừ sâu *Bacillus thuringiensis* đối với sâu tơ (*Spodoptera*) và sâu xanh (*Spodoptera exigua*) trên rau, *Tạp chí công nghiệp hóa chất*, 1, 41-45.
4. Hoàng Thân Hoài Thu, Đào Văn Hoàng, Phạm Quốc Long (2012). Nghiên cứu tổng hợp một số chất synergist từ dầu đào nhân, ứng dụng làm tăng hiệu lực sinh học cho thuốc trừ sâu vi sinh *Bacillus thuringiensis*, *Tạp chí hóa học*, 50(4A), 127-130.
5. Hoàng Thân Hoài Thu, Đào Văn Hoàng, Đinh Văn Thành (2016). Tác dụng hợp lực (synergist) giữa muối của các acid béo không no hỗn hợp với thuốc trừ sâu *Bacillus thuringiensis* đối với sâu tơ (*Plutella xylostella*) trên rau họ thập tự, *Tạp chí Khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, 4, 63-67.
6. Hoang Than Hoai Thu, Dao Van Hoang, Doan Lan Phuong, Hoang Thi Bich, Pham Quoc Long (2016). Aqueous enzymatic extraction of camellia seed oil (*Camellia oleifera*) from Viet Nam, *Tạp chí Khoa học – Trường Đại học sư phạm Hà Nội*, Đang chờ đăng vào số 61(9)
7. Hoàng Thân Hoài Thu, Đào Văn Hoàng, Đỗ Thị Nhuận, Đỗ Hữu Nghị (2016). Bước đầu nghiên cứu khả năng ức chế một số enzym giải độc thuốc BVTV của các chất hiệp đồng (synergist) có nguồn gốc các acid béo không no từ dầu thực vật, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ các Trường Đại học kỹ thuật*, Số 114 (2016), 113-117
8. Hoàng Thân Hoài Thu, Vũ Thị Thu Hà, Đào Văn Hoàng, Đoàn Lan Phương, Phạm Quốc Long, Giải pháp hữu ích, *Quy trình sản xuất axit oleic từ hạt cây sỏ (Camellia sasanqua Thub.)*, Số đơn 2-2016-00193 ngày nộp đơn 30/5/2016, quyết định chấp nhận đơn hợp lệ số 45369/QĐ-SHTT ngày 26/07/2016



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đào Văn Hoàng (2005), *Kỹ thuật tổng hợp các hóa chất bảo vệ thực vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Nguyễn Trần Oánh (2011). Thực trạng và xu hướng sử dụng thuốc BVTV ở thế giới và Việt Nam, *Hội thảo “Đánh giá thực trạng và đề xuất định hướng phát triển ngành hóa chất BVTV tại Việt Nam”*, Tập đoàn Hóa chất Việt Nam, năm 2011.
3. Trương Quốc Tùng (2013). Thực trạng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trong nông nghiệp ở Việt Nam. [online]  
<http://www.vusta.vn/vi/news/Thong-tin-Su-kien-Thanh-tuu-KH-CN/Thuc-trang-su-dung-thuoc-bao-ve-thuc-vat-trong-nong-nghiep-o-Viet-Nam-47911.html>
4. Trần Thị Út (2002). Tác động của Cách Mạng Xanh đến sản xuất lúa ở Việt Nam, *Tuyển tập báo cáo tại hội nghị khoa học “Cách mạng xanh ở Châu Á và sự chuyển hướng của nó đến Châu Phi tại Tokyo*, trang 32.
5. Bộ Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn (2015). *Danh mục thuốc được cho phép, hạn chế và cấm sử dụng ở Việt Nam*, Thông tư của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, trang 339.
6. Phạm Văn Toàn (2013), Thực trạng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật và một số giải pháp giảm thiểu việc sử dụng thuốc không hợp lý trong sản xuất lúa ở Đồng bằng sông Cửu long, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Phần A: Khoa học Tự nhiên, Công nghệ và Môi trường, 28, trang 47-53.
7. George P. Georghiou (1990), “Overview of Insecticide Resistance”, *Managing Resistance to Agrochemicals*, Chapter 2, pp 18–41, ACS Symposium Series, Vol. 421.
8. Perry, A.S., Yamamoto, I., Ishaaya, I., R.Y. (1998). Insecticides in Agriculture and Environment, *Applied Agriculture*, pp. 261.
9. Tabashmik, Bruce E. (2000). Frequency of resistance to Bt in field populations of pink bollworm, *Agricultural Sciences*, 97 (24), pp. 12980-12984.
10. Liu N, Yue X (2000). Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae), *J Econ Entomol*, 93 (4), pp. 1269-1275.

11. John K Moulton, David A Pepper and Timothy J Dennehy (2000). Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad, *Pest Management Science*, Vol 56, Issue 10, pp. 842–848.
12. Nguyễn Thị Thu Cúc (2009). *Giáo trình Côn trùng Nông nghiệp*. phần A: Côn trùng đại cương, Đại học Cần Thơ.
13. Raymond A. Cloyd, Richard S. Cowles (2010). Resistance Management: Resistance, *Mode of Action, and Pesticide Rotation*, Kansas State University. [online]  
Available at: <https://www.bookstore.ksre.ksu.edu/pubs/MF2905.pdf>
14. Rex Consortium (2013). Heterogeneity of selection and the evolution of resistance, *Trends in ecology and evolution*, 28 (2), pp. 110–118
15. George P. Georghiou (2012). *Pest Resistance to Pesticides*, Pleum press New York and London, 797 pages.
16. Aneth M Mahande (2012). Knockdown resistance, Rdl alleles, and the annual entomological Inoculation rate of wild mosquito populations from Lower Moshi, Northern Tanzania, *Journal of global infectious diseases*, 4(2),114-119
17. Tolerance Reassessment Advisory Committee (TRAC) (2009). Transition of Insect Pest Management to New Pest Control Technology, *Final Report Agricultural Pilots Project August*, pp. 24.
18. Tào Minh Tuấn và Đặng Hữu Lanh (2003). *Sử dụng giá trị tỷ lệ giữa LC95 và liều khuyến cáo để đánh giá tính kháng thuốc trừ sâu của sâu tơ (Plutella xylostella)*. Những vấn đề cơ bản trong khoa học đời sống, Hội nghị toàn quốc lần thứ hai, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, trang 1053-1056.
19. William T Garrood et al (2016). Field-evolved resistance to imidacloprid and ethiprole in populations of brown planthopper *Nilaparvata lugens* collected from across South and East Asia, *Pest Management Science*, 72 (1), pp. 140–149.
20. Phùng Minh Lộc, Trần Tấn Việt và Mai Văn Hào (2012). Nghiên cứu tính miễn cảm với một số loại thuốc trừ sâu của rầy xanh hai chấm (*Amrasca devastans Distant*) hại bông vải tại Ninh Thuận, *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, 243, trang 35 – 39.

21. Hoàng Trung, Bùi Thị Tuyết Nhung, Bùi Công Hiên (2003). Mức độ kháng thuốc DDVP của 2 loài một gây hại chính trong kho ở 9 tỉnh miền Bắc Việt Nam, *Tạp chí bảo vệ thực vật*, 4 (190), trang 23-26.
22. Kuwahara M.P. and Keinmeesuke (1995). Major insect of some vegetable crops and the present status of chemical resistance of diamondback moth *Plutella xylostella* in Thailand, *Agrochemicals Japan*, 67, pp. 12 – 15.
23. Nguyễn Phạm Hùng (2010). Đánh giá tính miễn cảm của rầy nâu *Nilaparvata lugens* ở một số tỉnh đồng bằng sông Hồng đối với một số loại thuốc trừ sâu hiện đang được sử dụng phổ biến năm 2009, *Luận văn Thạc Sĩ*, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
24. Ferre J, Real MD, Van Rie J, Jansens S, Peferoen M. (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, pp. 5119–5123.
25. Nguyen Thi Me, Nguyen Duy Trang, Vu Lu, Vu Dinh Lu, Nguyen Thi Nhung, Nguyen Hong Van, Nguyen An Hoang and Tran Ngoc Han (2001). Research on insecticide resistance in the Diamond back moth *Plutella xylostella* L. in crucifer and its overcoming measures. Plant Protection Research and extension scientific report of Vietnam Plant Protection Research Institute during 1996-2000, *Agriculture Publishing House*, pp. 86-91.
26. Huarong Li, Brenda Oppert, Randall A. Higgins, Fangneng Huang, Kun Yan Zhu, Lawrent L. Buschman (2004). Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae), *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, pp. 753–762.
27. Krishna Ramanujan (2011). Researchers identify how insects resist Bt pesticides, Cornell Chronicle, *Wisconsin Agriculturist*, Cornell University (USA), 242 (10), p. 52.

28. Salvador Herrero, Tsanko Gechev, Petra L Bakker, William J Moar and Ruud A de Maagd (2005), *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes, *BMC Genomics* 2, 6:96
29. Zewen L, Zhaojun H, Yinchang W, Lingchun Z, Hongwei Z, Chengjun L. (2003). Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms, *Pest Manag Sci.* 2003 Dec., 59(12), pp. 1355-1359.
30. Matsumura M., Takeuchi H., Satoh M., Sanada-Morimura S., Otuka A., Watanabe, T. and Thanh D.V. (2009). Current status of insecticide resistance in rice planthoppers in East and Southeast, *Pest Manag. Sci.* 64, pp. 1115-1121.
31. Nguyễn Thị Lan (2015). Điều tra hiện trạng sử dụng thuốc trừ rầy của nông dân và đánh giá tính kháng thuốc của quần thể rầy nâu *Nilaparvata lugens* Stal. tại Cần Thơ đối với một số nhóm hoạt chất trong vụ đông xuân 2015, *Khóa luận tốt nghiệp*, Đại học Nông nghiệp 1 Hà Nội.
32. Nguyễn Thị Me, Nguyễn Thị Nhung, Nguyễn Thị Hồng Vân, Trần Ngọc Hân (2001), Kết quả xác định tính kháng thuốc của rầy nâu hại lúa của một số tỉnh đồng bằng sông Hồng, *Tuyển tập công trình nghiên cứu BVTV 2000 – 2002, NXB Nông nghiệp*, Hà Nội 2002, trang 86-94.
33. Lương Minh Châu (2007). State of insecticide resistance of brown planthopper in Mekong delta, Viet Nam, *Omonrice*, 15, pp. 185-190.
34. Lê Thị Kim Oanh và cộng sự (2011). Nghiên cứu tính kháng thuốc của rầy nâu *Nilaparvata lugens* Stal. ở một số tỉnh đồng bằng sông Hồng và vùng đông Bắc bộ, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, Số 2, trang 11-18.
35. Hồ Thị Thu Giang và cộng sự (2011). Nghiên cứu về tính kháng rầy nâu, rầy lưng trắng của một số giống lúa và biện pháp phòng chống chúng ở một số tỉnh vùng đồng bằng sông Hồng, *Báo cáo Đề tài nghiên cứu cấp Bộ*, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.
36. Nguyễn Thanh Hải (2011). Đánh giá tính miễn cảm của rầy nâu *Nilaparvata lugens* đối với một số thuốc trừ sâu tại các tỉnh Thái Bình, Hưng Yên, Phú Thọ vụ mùa năm 2010, *Luận văn Thạc Sĩ*, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

37. Liu Z.W., Han Z.J. and Zhang L.C. (2003). The roles of detoxifying enzymes and AchE insensitivity in methamidophos resistance development and decline in *Nilaparvata lugens*, *Entomologia Sinica*, 10, pp. 179-18.
38. Yan Hua Wanget al (2009). Dynamics of imidacloprid resistance and cross-resistance in the *brown planthopper*, *Nilaparvata lugen*, *Etomologia Experimentalis Aplicata*, 131, pp. 20 - 29.
39. Haibo Bao, Hongli Gao, Yixi Zhang, Dongzhe Fan, Jichao Fang, Zewen Liu (2016). The roles of CYP6AY1 and CYP6ER1 in imidacloprid resistance in the brown planthopper: Expression levels and detoxification efficiency, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129, pp. 70–74.
40. Robert L. Metcalf (1967). Mode of Action of Insecticide Synergists, *Annual Review of Entomology*, 12, pp. 229-256.
41. Raffa, K. F., and Priester, T. M. (1985). Synergists as research tools and control agents in agriculture, *J. Agric. Entomol*, 2, pp. 27-45
42. Phan Văn Trương (2014). Nghiên cứu khả năng kháng thuốc của rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal) đối với các hoạt chất thuốc trừ sâu Fenobucarb, Fipronil và Imidacloprid tại đồng bằng sông Cửu Long, *Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp*, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, trang 7-11.
43. G. Nordhus (2005). Molecular method in spices indentification of *Liriomyza* s., and the study of insecticide resistant in *Liriomyza* spp., *Bemisia tabaci* and *Myzus persiace*, pp. 25-28.
44. Zhu, Y., Adamczyk Jr, J.J., West, S.J (2005). Avidin, a potential bio-pesticide and synergist to *bacillus thuringiensis* berliner toxins against field crop insects, *Journal of Economic Entomology*, 98, pp.1566-1571.
45. Patrick F. Dowd, Peoria (1990). Kojic acid and Esters as Insecticide Synergists, *US Patent 4,956,353*.
46. Craig Eagleson, Fruitdale (1990). Tex, oil synergist for pesticide, *US patent 2,202,145*.

47. Beroza, M., and Barthel, W. F. (1957). Chemical structure and activity of pyrethrin and allethrin synergists for the control of the house fly, *J. Agr. Food Chem.*, 5, pp. 855-859.
48. David Keen và Stuart, Fl. (2003). Pesticide composition of plant oils and fish oils, *US 2003/0198695 A1*.
49. Puritch, George, S., Loum Gregory, S. (1990). Environmentally Safe Insecticide, *WO 90/03730*.
50. Khalequzzaman, Chowdhury, 2003, Evaluation of mixtures of plant oils as synergists for pirimiphos-methyl in mixed formulations against *Tribolium castaneum* (Herbst), *Biological sciences*, 3(2), 347-359
51. 51. Benezet HJ, Forgash AJ (1972). Reduction of malathion penetration in house flies pretreated with silicic acid, *J Econ Entomol.*5(3):895-6.
52. Steven M. Bessette, Myron A. Beigler (2005). Pesticidal activity of plant essential oils and their constituents, *US Patent 6,841,577 B2*.
53. Vasakorn Bullangpoti, Eric Wajnberg, Pascaline Audant, Rene Feyereisen (2012). Antifeedant activity of *Jatropha gossypifolia* and *Melia azedarach* senescent leaf extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use as synergists, *Pest. Manag. Sci.* 68, pp. 1255-1264.
54. Fan Tong, Jeffrey R. Bloomquist (2013). Plant Essential Oils Affect the Toxicities of Carbaryl and Permethrin Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Journal of Medical Entomology*, 50(4), pp. 826-832
55. Yang Pei Wen; Shang Hui; Huang Chun Fen; Dong LiYing; Liu Shu Fang; Mu Wei Dong; Li Jia Rui (2009). Application of bio-pesticides synergist to control *Plutella xylostella*, *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 22 (2), pp. 337-342.
56. Rose Monnerat (2014). Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against *Simulium* spp. Larvae, *Journal of invertebrate pathology*, 121, pp 70-73
57. B. Amiri Besheli (2007). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* and Mineral Oil against *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), *International Journal of Agriculture & Biology*, 44 (2), pp. 68–73.

58. Salama, H. S.; Foda, M. S.; Sharaby, A. (1985), Potential of some chemicals to increase the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* Berl. against *Spodoptera littoralis* (Boisd.), *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, 100(5), pp 425-433.
59. Suman Preet Singh Khanuja, Sarita Satapathy, Subhash Chandra Singh (2002). Process of its application against lepidopteran insect using *Albizia Lebbeck* plant extract and *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin, *US Patent 2002/0037330 A1*.
60. Michelle D. Gaudet, George S. Puritch (1989). Fatty acid salt enhancement of bacterial insecticide, *US Patent 4826678*.
61. Kahn, Rodney (1996). Synergists of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin, *WO 96/28023*.
62. Pham Thi Thuy, Nguyen Thuy Ha (2003). Application *Bacillus thuringiensis* biopesticide to control some pests on cabbage in Thai Nguyen, Vietnam in 2002, *5th Pacific rim conference on the biotechnology of Bacillus thuringiensis and its environmental impact*, 17th- 21st November 2003, Hanoi, Vietnam, pp. 67.
63. Vũ Văn Độ, Vũ Đăng Khánh (2005). Hiệu quả gây chết của chế phẩm phối trộn giữa dầu neem và Bt (*Bacillus thuringiensis*) đối với sâu xanh (*Heliothis armigera*) và sâu tơ (*Plutella xylostella*), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 43(4), trang 33-40.
64. Gang Wu, Shuren Jiang, Tadashi Miyata (2004). Effects of Synergists on Toxicity of Six Insecticides in *Parasitoid Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae), *Journal of Economic Entomology*, 97(6), pp. 2057 – 2066.
65. Abdollah Dini Pour, M.Oktay Gurkan (2012). Effects of synthetic pyrethroids and neonicotinoids insecticides and synergists on population of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Journal of Entomological Research*, 5 (3), pp. 1-12.
66. Shen Uni, Zhu Hong gang, Jiangyan Yang, Chen Ying, Liu Songbo (2010). Compound imidacloprid aqueous suspension prepared by using tea saponin as synergist and surface active agent, *CN 101810188 A*.

67. Emma Graham (2011). Novel Synthesis: Imidacloprid CYP450 Pesticide Synergist from Dill Lowers Surface Runoff Toxicity, *Canadian Young Scientist Journal*, 2, pp.21-37.
68. Byron I. Reid, Robert B. Baker, Nong gang N. Bao (2013). Synergist Pesticide Compositions. *US Application 2013/0217574 A1*.
69. Phạm Quốc Long (2003). Nghiên cứu sử dụng các acid béo  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 có hoạt tính sinh học cao trong hỗ trợ phòng chống một số loại bệnh ung thư ở điều kiện Việt Nam, Báo cáo tổng kết đề tài cấp Trung tâm KHTN & CNQG
70. George S. Puritch, Sergi F. Condrashoff (1988). Insecticide mixtures containing fatty acids, *US 4774234 A*
71. A.E Hatem et al (2009). Synergistic activity of several acids in binary mixtures with synthetic insecticides on *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *Bol. San. Veg. Plagas*, 35, pp. 533-542
72. Četkauskaitė, Anolda (2004). Effects of mixtures of oleic acid with chlorinated herbicides on *Vibrio fischeri* bacteria, *Biologija*, Nr. 4., pp. 36-39
73. Rowena Roshanthi Landham, Rupert Heinrich Sohm (2002). Gel formulation, *US 6436439 B1*
74. J. Sineiro, H. Dominguez, M. J. Nunez & J. M. Lema (1998). Optimization of the enzymatic treatment during aqueous oil extraction, *Food Chemistry*, 61 (4), pp. 467-474.
75. Beatriz P.M., Sant'Anna, Suely P. Freitas and Maria A.Z. Coelho (2003). Enzymatic aqueous technology for simultaneous coconut protein and oil extraction, *Grasas y Aceites*, Vol. 54, Fasc. 1, p.77-80 (2003)
76. Kyashyap et al (2007). Oil extraction rates of enzymatically hydrolyzed soybeans, *Journal of food engineering barking*, pp 611-617.
77. Ruchi Gaur, Aparna Sharma, S.K. Khare, Munishwar Nath Gupta (2007). A novel process for extraction of edible oils Enzyme assisted three phase partitioning (EATTP), *Bioresource Technology*, 98, pp. 696-699.
78. Hilaire Macaire Womeni, Robert Ndjouenkeu, Cesar Kapseu, Felicite Tchouanguiep Mbiapo, Michel Parmentier, Jacques Fanni (2008). Aqueous



- enzymatic oil extraction from *Irvingia gabonensis* seed kernels, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 110, pp. 232-238.
79. Barrios, V.A., Olmos, D.A., Noyola, C.A. (1990). Optimization of an enzymatic process for coconut oil extraction, *Oleagineux*, 45, pp. 35-42.
  80. Nguyễn Thị Minh Nguyệt (2005). Nghiên cứu chiết xuất dầu dừa tinh khiết bằng phương pháp enzyme, *Luận án tiến sĩ sinh học*, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
  81. Vũ Thị Đào (2004). Hoàn thiện công nghệ và thiết bị sản xuất acid béo không no bằng enzym lipaza sử dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, *Báo cáo khoa học*, Viện Công nghệ thực phẩm.
  82. Boocock, D.G.B, Mao V.Lee C and Buligan (1998). Fat formation of high purity methyl esters from vegetable oil, *J.Am.Chem.Soc*, 75, pp. 1167-1172.
  83. Emsto Bernardini (1983). *Vegetable oils and fats processing*, B.E. Oil Pub. House. Vol 12 .
  84. V. F. Stout, W. B. Nilsson, J. Krzynowek, and H. Schlenk (1990). *Fractionation of fish oil and their fatty acids*, Stansby ME (ed) Fish oils in nutrition, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 73-119.
  85. Lê Bình Hoàng (2010). Hoàn thiện công nghệ và sản xuất thử nghiệm hỗn hợp omega-3 và omega-6 từ nhân hạt hồ đào, *Báo cáo tổng kết dự án SXTN*, Bộ Công Thương.
  86. Ngô Xuân Dũng (2012). Nghiên cứu tách chiết acid béo giàu omega-3 và omega-6 từ hạt cải dầu, *Luận văn thạc sĩ nông nghiệp*, Đại học nông nghiệp Hà Nội, trang 102.
  87. Ngô Xuân Dũng (2012). Nghiên cứu tách chiết acid béo giàu omega-3 và omega-6 từ hạt cải dầu, *Luận văn thạc sĩ nông nghiệp*, Đại học nông nghiệp Hà Nội, trang 102.
  88. Vũ Thị Thu Hà (2015). Dung môi sinh học Xúc tác tổng hợp và tiến trình ứng dụng, NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ, 2015, trang 263.
  89. Đặng Thị Thúy Hạnh và cộng sự (2015). Nghiên cứu tổng hợp hệ xúc tác trên cơ sở chất lỏng ion (ionic liquid) cho sản xuất diesel sinh học gốc từ các nguồn

- nguyên liệu có trị số acid cao, *Báo cáo tổng hợp*, Đề tài cấp Nhà nước, Bộ Công thương.
90. Zahoor Ullah, Mohamad Azmi Bustam, Zakaria Man (2015). Biodiesel production from waste cooking oil by acidic ionic liquid as a catalyst, *Renewable Energy*, 77 521-526
  91. D. S. Han, H. B. Ahn, and H. K. Shin (1987). Separation of EPA and DHA from fish oil by solubility differences of fatty acid salts in ethanol, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 19, pp. 430–434.
  92. Angela Dee Adams (2011), Synthesis of Guest Molecules for Studies of Urea Inclusion. *A Master of Science Thesis*, Kansas State University, Manhattan, Kansas
  93. D. G. Hayes (2002). Free Fatty Acid Fractionation via Urea Inclusion Compounds. Part 2. Applications and Large-Scale Process Considerations, *Inform*, 13, pp. 832–835.
  94. H. J. Wille, H. Traitler, and M. Kelly (1987). Production of polyphenolic fish oil fatty acids by combined urea fractionation and industrial scale preparative high performance liquid chromatography, *Rev. Fr. Corps Gras*, 34, pp. 69–71.
  95. Guo Chen et al (2011). Preparation of solid acid catalyst from glucose–starch mixture for biodiesel production, *Bio resource Technology*, 102, 2635–2644.
  96. Y. Bi, D. Ding, and D. Wang (2010). Low-melting-point biodiesel derived from corn oil via urea complexation, *Bioresource Technology*, 101(4), pp. 1220-1226.
  97. J. C. López-Martínez, P. Campra-Madrid and J. L. Guil-Guerrero (2004).  $\gamma$ -Linolenic acid enrichment from borago officinalis and echium fastuosum seed oils and fatty acids by low temperature crystallization, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, pp. 294.
  98. Thierry I., Frachon E. (1997). Bacteria: identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. In Lawrence A Lacey, *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Cap. III-1, Biological Techniques Series, Academic Press, London, p. 55-75.

99. Joseilde Oliveira Silva Werneck (2006). *Investigation of a novel Bacillus thuringiensis toxin*. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Cambridge.
100. Prescott, J.M. and Wilkes, S.H. (1976). *Methods in Enzymology*, XLV, Part B, 530-543.
101. Spungin, A. and Blumberg, S. (1989). *European Journal Biochemistry* 183, 471-777.
102. Luan Y.P et al., (2011) LYP3, a new bestatin derivative for Aminopeptidase N inhibition, *Medicinal Chemistry*, 7(1), 32-36.
103. Habig, W.H. et al (1974). Glutathione S-transferase The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139
104. Scott IM, Thaler JS, Scott JG. (2010). Response of a generalist herbivore *Trichoplusia ni* to Jasmonate-mediated induced defense in tomato. *J Chem Ecol.*, 36(5), 490–499
105. Wang, et al. (2014). Inhibition of insect glutathione S-Transferase (GST) by conifer extracts, *Arch Insect Biochem Physiol.*,87(4): 234-249
106. N. Stumpf, R. Nauen (2001), Cross-resistance, inheritance and biochemistry of METI acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), *J. Econ Entomol.* ,94(6), 1577-1583.
107. Võ Thị Việt Dung (2013). Nghiên cứu phương pháp xác định các axit béo trong một số loại dầu mỡ động, thực vật Việt Nam bằng kỹ thuật sắc ký, *Luận án Tiến sỹ*, Đại học Quốc gia Hà Nội.
108. Trần Minh Hợi và cộng sự (2011). Đặc tính sinh học và thành phần hóa học trong dầu hạt của sỏ (*Camellia sansaqua* Thumb.), Trôm (*Sterculia Fortida* L.) và lai (*aleurites moluccana* L), *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4*.
109. Trần Thị Thanh Huyền (2011). Nghiên cứu một số chỉ tiêu sinh lý, hóa sinh liên quan đến tính chịu hạn, năng suất và phẩm chất hạt của một số giống vùng (*Sesamum indicum* L.) trồng ở khu vực Hà Nội, *Luận án tiến sỹ*, Trường Đại học sư phạm Hà Nội.

110. Lưu Thị Lệ Thủy (2008). Nghiên cứu xây dựng qui trình công nghệ sản xuất dầu từ hạt bí đỏ bằng phương pháp enzyme, *Báo cáo khoa học, Viện Công nghệ thực phẩm*.
111. Xuezhi Fang et al, (2016). Aqueous enzymatic extraction and demulsification of camellia seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) and the oil's physicochemical properties, *J. Lipid Sci. Technol*, 118, pp. 244-251.
112. Yang, L., Jiang, L., Sui, X., & Wang, S. (2011). Optimization of the aqueous enzymatic extraction of pie kernel oil by response surface methodology, *Procedia Engineering*, 15, pp. 4641-4652.
113. Passos, C. P., Yilmaz, S., Silva, C. M., & Coimbra, M. A. (2009). Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail, *Food Chemistry*, 115, pp. 48-53.
114. Huynh Cang Mai, Vinh Truong, Fre'de'ric Debaste (2013). Optimisation of enzyme – assisted extraction of oil rich in carotenoids from Gac Fruit (*Momordica cochinchinesis* Spreng.), *Food Technol. Biotechnol.* 51 (4), pp. 488-499.
115. Rui, H., Zhang, L., Li, Z., & Pan, Y. (2009). Extraction and characteristics of seed kernel oil from white pitaya, *Journal of Food Engineering*, 93, 482 - 486.
116. Aliakbarian, B., Faveri, D. D., Converti, A., & Perego, P. (2008). Optimisation of olive oil extraction by means of enzyme processing aids using response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal*, 42, pp. 34 - 40.
117. Garc, A., Brenes, M., Moyano, M. J., Alba, J., (2001). Improvement of phenolic compound content in virgin olive oils by using enzymes during malaxation, *Journal of Food Engineering*, 48, pp.189-194.
118. Zu'niga, M. E., Soto, C., Mora, A., Chamy, R., & Lema, J. M. (2003). Enzymic pre-treatment of Guevina avellana mol oil extraction by pressing, *Process Biochemistry*, 39, pp. 51-57.
119. Jumat Salimon, Bashar Mudhaffar Abdubllah and Nadia Salih (2011). Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acid from *Jatropha curcas* seed oil, *Chemistry central*, 5, pp. 67.

120. Mai Ngọc Chúc (2006). Xây dựng công nghệ sản xuất axit stearic và một số chất hoạt động bề mặt từ dầu mỡ động thực vật phế thải, *Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật đề tài độc lập cấp nhà nước*, Bộ Công thương.
121. Ramírez-Expósito MJ1, García MJ, Mayas MD, Ramírez M, Martínez-Martos JM (2002). Effects of exogenous fatty acids and cholesterol on aminopeptidase activities in rat astroglia, *Cell Biochem Funct*, 20(4), 285-90
122. Iris Karunker, Evangelia Morou, Dimitra Nikou, Ralf Nauen, Rotem Sertchook, Bradley J. Stevenson, Mark J.I. Paine, Shai Morin, John Vontas (2009). Structural model and functional characterization of the Bemisia tabaci CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, pp 697–706
123. Nauen et al (1998). Antifeedant effects of sublethal dosages of imidacloprid on Bemisia tabaci, *Entomol. Exper. Applic.* 88, pp 287-293