

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.068

## NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH CAO CHIẾT HẠT CỬ ĐẬU (*Pachyrhizus erosus*) CÓ CHỨA ROTENONE VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG SÂU ĂN TẠP (*Spodoptera litura*)

Đặng Huỳnh Giao<sup>1\*</sup>, Nguyễn Khởi Nghĩa<sup>2</sup>, Nguyễn Trọng Danh<sup>1</sup>, Nguyễn Công Hậu<sup>1</sup>, Hồ Ngọc Tri Tân<sup>1</sup> và Nguyễn Quốc Châu Thanh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đặng Huỳnh Giao (email: dhgiao@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/01/2022

Ngày nhận bài sửa: 15/02/2022

Ngày duyệt đăng: 17/02/2022

### Title:

Investigating the extraction process of yam bean seed (*Pachyrhizus erosus*) containing rotenone and the evaluation of biological activity against omnivorous caterpillars (*Spodoptera litura*)

### Từ khóa:

Cao chiết hạt củ đậu, diệt trừ sâu ăn tạp, hạt củ đậu, Rotenone, tách chiết rotenone

### Keywords:

Armyworm eradication, extraction, Rotenone, yam bean

### ABSTRACT

Along with the development of agriculture, biopesticides are increasingly being researched because of their environmental friendliness, safety for users, and limit of pest resistance to drugs. This study was conducted to develop a process for the extraction of yam bean seed (*Pachyrhizus erosus*) containing the active ingredient rotenone, a potential active compound that is effective against omnivorous caterpillars (*Spodoptera litura*). The results showed that the optimal conditions for yam bean seed extraction were successfully extracted by chloroform at 2 extraction times with the sample powder: solvent ratio at 1:5 (g/mL) for 48 hours. The presence of rotenone was assessed by qualitative methods with reagents and thin-layer chromatography. Furthermore, a rotenone content of 0.14% in the extract was recorded by LC/MS/MS. The best killing effect on omnivorous caterpillars was recorded at a concentration of 15 g/L after 4 hours with a spray volume of 25 mL through the toxic taste path. In addition, the probiotics prepared from the extraction of yam bean seed were as effective as commercial biological products.

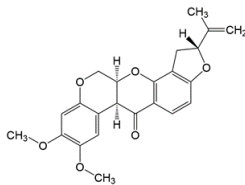
### TÓM TẮT

Cùng với sự phát triển của nông nghiệp, các chế phẩm sinh học được đẩy mạnh nghiên cứu bởi tính thân thiện với môi trường, an toàn với người sử dụng và hạn chế sâu hại kháng thuốc. Nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình chiết tách cao chiết từ hạt củ đậu (*Pachyrhizus erosus*) có chứa hoạt chất rotenone, một hoạt chất tiềm năng có hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp (*Spodoptera litura*). Cao chiết hạt củ đậu được chiết tách thành công bằng phương pháp ngâm chiết trong chloroform ở 2 lần chiết với tỉ lệ bột mẫu: dung môi là 1:5 (g/mL) trong 48 h. Sự hiện diện rotenone được định tính với thuốc thử và phương pháp sắc ký lớp mỏng với 0,14% về hàm lượng được ghi nhận bằng LC/MS/MS. Hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp tốt nhất ở nồng độ cao chiết 15 g/L sau 4 giờ cùng thể tích phun 25 mL thông qua đường vị độc. Hơn nữa, chế phẩm sinh học được phối chế từ cao chiết hạt củ đậu có hiệu quả tương đương với các sản phẩm sinh học thương mại có trên thị trường.

## 1. GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, sản xuất nông nghiệp chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau liên quan đến biến đổi khí hậu và sự phát triển không kiểm soát của các loại sâu hại. Trong đó, sâu ăn tạp được xếp là loài gây nguy hại cao cho nền nông nghiệp khi phá hoại hơn 112 loài cây thuộc 40 họ thực vật (Ahmad et al., 2009). Các đối tượng phá hoại chủ yếu của chúng là thuốc lá, bông, đậu tương, các loại rau cải, khoai tây, sắn (Abbas et al., 2012). Do đặc điểm phân bố và giới hạn thích nghi ở nhiệt độ dao động từ 10 – 37°C nên sâu ăn tạp đặc biệt khó diệt trừ triệt để. Hiện nay, việc phòng trừ sâu ăn tạp thường dựa vào các loại thuốc trừ sâu hóa học có chứa hoạt chất abamectin hoặc spinosad, hoặc sử dụng thiên địch. Tuy nhiên, việc lạm dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật gây ảnh hưởng xấu đến môi trường và sức khỏe của người sử dụng, đặc biệt làm gia tăng các loài sâu hại kháng thuốc dẫn đến mất cân bằng hệ sinh thái nông nghiệp. Vì vậy, việc nghiên cứu các chế phẩm sinh học tiềm năng để phòng trừ sâu ăn tạp mang ý nghĩa cần thiết đối với nền nông nghiệp, góp phần bảo vệ môi trường và an toàn cho người sử dụng.

Cây củ đậu (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urb) hay còn gọi là củ sắn, sắn nước, là một loại cây được trồng nhiều ở đồng bằng sông Cửu Long và miền Đông Nam Bộ. Hạt củ đậu có chứa hoạt chất rotenone (0,56 - 1,01%) với cấu tạo nhiều cấu trúc vòng, đặc biệt là hai nhóm methoxy và một nhóm ketone thể hiện một số hoạt tính sinh học đặc trưng (Lợi, 2004) (Hình 1).



Hình 1. Công thức cấu tạo của Rotenone

Hoạt chất rotenone đã được chứng minh khả năng gây độc với cá và côn trùng nên được ứng dụng làm ngạt cá, khiến cá thiếu oxy ngoi lên mặt nước để dễ đánh bắt (Bích và ctv., 1986). Độc tính cấp của rotenone đối với côn trùng là do ức chế Nicotinamide Adenine Dinucleotide dạng khử (NADH), chất mục tiêu trong chuỗi vận chuyển điện tử, dẫn đến việc chấm dứt vận chuyển oxy. Do đó, quá trình tổng hợp Adenosine Triphosphate (ATP) bị ức chế làm cho hệ thống hô hấp bị ngưng trệ và gây tử vong cho sinh vật (Yoon, 2009). Các nghiên cứu về độc tính của rotenone cho thấy độc tính của

hoạt chất này phụ thuộc trực tiếp vào nhóm chức ketone ( $-C=O$ ) và hai nhóm chức methoxy ( $-OCH_3$ ) (Lợi, 2004). Tuy nhiên, rotenone được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) phân loại là nguy hại vừa phải, chỉ gây độc nhẹ đối với người và các động vật, nhưng gây độc đối với côn trùng và sinh vật sống dưới nước (Davidson, 1930; Ambrose & Haag, 1937). Vì vậy, trong nghiên cứu này, quy trình chiết rotenone từ hạt củ đậu và hoạt tính gây độc đối với sâu ăn tạp được tập trung khảo sát nhằm tạo ra một chế phẩm sinh học tiềm năng có hiệu quả diệt trừ sâu hại trong nông nghiệp, hạn chế ô nhiễm môi trường. Hơn thế nữa, chế phẩm sinh học từ kết quả nghiên cứu cũng được phối chế nhằm đánh giá mức độ tiêu diệt sâu hại tương ứng với sản phẩm sinh học thương mại đang được áp dụng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị

*Nguyên liệu:* hạt củ đậu khô được mua từ công ty TNHH xuất nhập khẩu Ngọc Đình (thành phố Hồ Chí Minh). Sâu ăn tạp nuôi từ trứng bắt ở cánh đồng tại huyện Lập Vò, tỉnh Đồng Tháp, sau đó sâu được nuôi tại phòng thí nghiệm Hóa hữu cơ, Khoa Công nghệ đến 20 ngày tuổi. Rau xà lách trồng ở huyện Phụng Hiệp, tỉnh Hậu Giang.

*Hóa chất:* Chloroform (99,0%), Methanol (99,5%), n-Hexane (99,8%), Ethanol (99,5%), Chemsol (Việt Nam); Carbon tetrachloride (99,5%), Acetone (99,5%, 99,0%), Carbon hoạt tính, acid sulfuric ( $H_2SO_4$ , 98,0%), dung dịch iron (III) chloride hexahydrate ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 99,0%) (Xilong - Trung Quốc); giấy sắc ký silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck (Đức).

*Thiết bị:* hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ - HPLC Agilent 1200 LC (cột sắc ký C18), đầu dò khối phổ Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS/MS.

### 2.2. Quy trình chiết tách cao chiết hạt củ đậu

#### 2.2.1. Quy trình

Hạt củ đậu khô được xay nhuyễn thành bột; 50 g bột mẫu được cho vào erlen 250 mL và thêm vào 1 g than hoạt tính. Sau đó, dung môi được vào thực hiện quá trình ngâm trích, tiến hành lọc và làm khan bằng  $Na_2SO_4$ . Dịch chiết thô được tiến hành cô đuổi dung môi để thu được cao chiết. Cao chiết được trữ ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Quá trình chiết rotenone từ cao chiết sau được thực hiện trong carbon tetrachloride và đun hoàn lưu để tạo thành phức rotenone -  $CCl_4$ . Phức rotenone -  $CCl_4$  được kết tinh lại để thu được tinh thể thô. Sau

đó, tinh thể thô được kết tinh nhiều lần trong ethanol, lọc và sấy, thu được tinh thể tinh khiết.

2.2.2. *Khảo sát quy trình*

Quy trình chiết được tiến hành khảo sát các yếu tố tối ưu ảnh hưởng bao gồm: số lần chiết, dung môi, tỉ lệ nguyên liệu/thể tích dung môi (rắn – lỏng) và thời gian chiết (Zubairi et al., 2014). Số lần chiết được tiến hành khảo sát trên 4 loại dung môi là chloroform, carbon tetrachloride, acetone, methanol. Các giá trị khác được giữ cố định: khối lượng mẫu (50 g), thời gian (24 h), thể tích (125 mL). Kết quả số lần chiết thích hợp được đánh giá bằng phân tích sắc ký bản mỏng.

Dung môi tối ưu cho quá trình chiết được khảo sát với 4 loại dung môi là chloroform, carbon tetrachloride, acetone, và methanol. Các yếu tố tương tự được cố định gồm khối lượng mẫu (50 g), thời gian (48 giờ), tỉ lệ pha rắn – lỏng là 1:5 (g/mL). Sau đó, cố định các yếu tố đã tối ưu và tiến hành khảo sát các yếu tố còn lại. Tỉ lệ nguyên liệu/thể tích dung môi (rắn – lỏng) được tiến hành khảo sát với các tỉ lệ lần lượt là 1:3, 1:4, 1:5 và 1:6. Thời gian chiết tối ưu được khảo sát ở 24, 48, 72 và 96 giờ. Khối lượng cao chiết được phân tích để đánh giá điều kiện tối ưu cho quy trình chiết tách.

2.2.3. *Định tính và định lượng Rotenone*

Rotenone được định tính bằng sulfuric acid 98% dựa vào sự xuất hiện màu đỏ cam do sự chuyển hóa rotenone thành isorotenone. Mặt khác, dung dịch iron (III) chloride 10% được sử dụng để định tính rotenone trong cao chiết hòa tan với acetone xuất hiện màu nâu do tạo thành hỗn hợp phức với Fe<sup>3+</sup>.

Sắc ký lớp mỏng: 1 g cao chiết được cho vào 10 mL dung môi chloroform để tạo thành dung dịch mẫu. Dung dịch mẫu tiến hành sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi là (chloroform : n-hexan = 7 : 3), thuốc thử sulfuric acid 10% (Othman et al., 2015). Sự hiện diện của rotenone được đánh giá với giá trị R<sub>f</sub> = 0,65 ± 0,03. Thí nghiệm được thực hiện tương tự trên sản phẩm kết tinh từ dung môi.

Rotenone thu được trong quá trình chiết tách ở điều kiện tối ưu được tiến hành phân tích hàm lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ 2 lần (LC/MS/MS) tại Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh (CASE) – Chi nhánh Cần Thơ.

2.3. **Khảo sát hoạt tính sinh học**

Cao chiết sau quá trình chiết được hoà tan trong acetone để tạo thành sản phẩm sinh học. Sau đó, sản phẩm sinh học sẽ được pha loãng với nước với tỉ lệ

4:6 và tiến hành thử nghiệm trên sâu ăn tạp. Kết quả thí nghiệm là số lượng sâu chết tại các mốc thời gian định trước (thí nghiệm thức, n = 10).

2.3.1. *Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp*

Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp lần lượt được khảo sát bao gồm: nồng độ và thể tích. Nồng độ thuốc phun được khảo sát là 5, 10, 15, 20 g/L với đối chứng âm 0 g/L trên rau xà lách. Cố định thể tích phun 25 mL, diện tích phun có kích thước 0,25 × 0,15 m. Sau đó, thể tích phun được khảo sát lần lượt là 15, 20, 25 và 30 mL.

Con đường gây độc đối với sâu được tiến hành khảo sát ở điều kiện tối ưu, phun trực tiếp lên cơ thể sâu và rau xà lách rồi cho sâu ăn. Kết quả thí nghiệm được phân tích dựa trên số lượng sâu chết ở các mốc thời gian 1, 2, 3, 4 giờ và được lặp lại 2 lần.

2.3.2. *Đánh giá hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp*

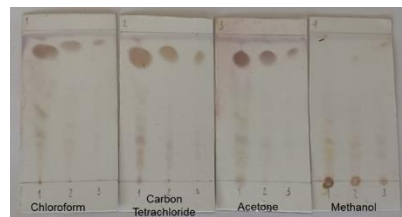
Hoạt tính của cao chiết chứa rotenone và rotenone kết tinh trong dung môi đối với sâu hại được đánh giá ở điều kiện tối ưu, tiến hành phun lên rau xà lách cho sâu ăn. Kết quả số sâu chết ở các mốc thời gian 1, 2, 3, 4 giờ được ghi nhận, so sánh và tiến hành pha chế phẩm sinh học.

Chế phẩm sinh học chứa rotenone từ nghiên cứu được so sánh với sản phẩm sinh học Neem nim thương mại (NeemNim, xoan xanh Green 0,3EC, Công ty Trách nhiệm Hữu hạn Ngân Anh) với cùng cách bố trí thí nghiệm để so sánh hiệu quả.

3. **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

3.1. **Kết quả chiết tách cao chiết hạt củ đậu**

Số lần chiết phù hợp ở 4 loại dung môi khác nhau được đánh giá dựa trên độ đậm, nhạt của các vết sắc ký lớp mỏng trong hệ dung môi chloroform, n-hexan với tỉ lệ 7:3 (Hình 2).



Hình 1. Kết quả sắc ký bản mỏng sau 3 lần trích với 4 loại dung môi khác nhau

Hình 2 cho thấy quá trình chiết lần thứ nhất và thứ hai cho vết rõ, đậm; riêng lần thứ ba, vết mờ dần. Vì vậy, 2 lần chiết là phù hợp để đảm bảo hiệu suất

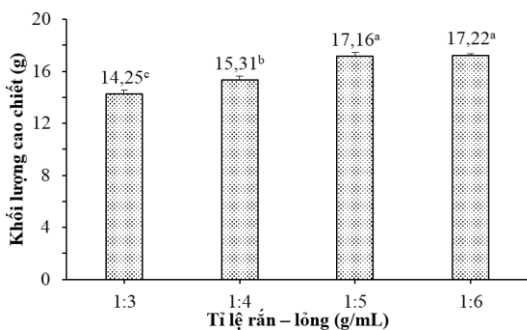
chiết lượng hoạt chất tương đối và tiết kiệm được dung môi.

**Bảng 1. Kết quả khảo sát loại dung môi ngâm trích**

Dung môi	Khối lượng pha rắn (g)	Thời gian ngâm (giờ)	Số lần trích	Tỉ lệ rắn - lỏng (g/mL)	Khối lượng cao chiết trung bình (g)
Chloroform	50	48	2	1:5	17,16 <sup>a</sup>
Carbon Tetrachloride	50	48	2	1:5	13,51 <sup>b</sup>
Acetone	50	48	2	1:5	12,53 <sup>c</sup>
Methanol	50	48	2	1:5	8,68 <sup>d</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết tách cũng như hiệu quả chiết tách, trong đó, dung môi là một trong những yếu tố rất quan trọng cần được xem xét trước tiên. Trong nghiên cứu này, dung môi chiết tối ưu được khảo sát ở các điều kiện cố định với số lần chiết tối ưu được trình bày trong Bảng 1. Kết quả cho thấy quá trình chiết với chloroform cho khối lượng cao chiết lớn nhất 17,16 g và có sự khác biệt đáng kể so với các loại dung môi còn lại. Vì vậy, chloroform là dung môi phù hợp nhất cho quá trình chiết tách cao chiết từ hạt củ đậu.

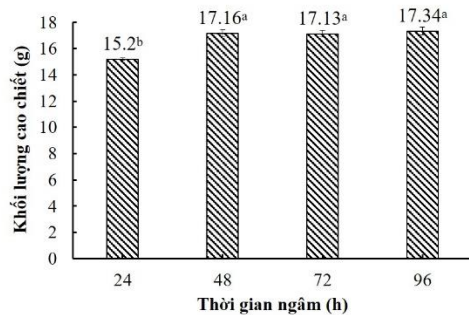


**Hình 2. Ảnh hưởng của tỉ lệ rắn – lỏng đến khối lượng cao chiết**

Ghi chú: các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Bên cạnh dung môi thì tỉ lệ rắn - lỏng cũng ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả chiết tách. Kết quả cho thấy khi tăng tỉ lệ rắn - lỏng thì khối lượng cao chiết thu được tăng lên (Hình 3). Kết quả này được giải thích dựa trên sự chênh lệch nồng độ chất tan giữa mẫu và dung môi trong cùng một khối lượng mẫu làm quá trình truyền khối từ pha rắn vào pha lỏng diễn ra mạnh mẽ đạt được trạng thái cân bằng. Vì

vậy, khối lượng cao chiết thu được sau quá trình ngâm trích được nhiều hơn. Cụ thể, ở tỉ lệ 1:5 (17,16 g) và 1:6 (17,22 g) cho thấy khối lượng cao chiết khác biệt không có ý nghĩa. Mặt khác, với tỉ lệ 1:3 và 1:4 cho khối lượng cao thu được thấp hơn, do đó tỉ lệ 1:5 được chọn là tỉ lệ tối ưu cho khảo sát này.



**Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến khối lượng cao chiết**

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

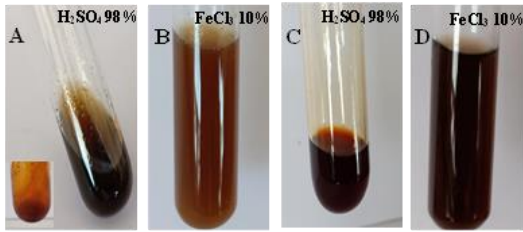
Yếu tố tiếp theo được chọn khảo sát là ảnh hưởng của thời gian chiết đến khối lượng cao chiết. Kết quả cho thấy khối lượng cao chiết thu được tăng khi tăng thời gian chiết từ 24 lên 48 giờ (Hình 4). Điều này có thể là do quá trình chiết xảy ra quá trình truyền khối, chất tan trong pha rắn tan vào pha lỏng để đạt được trạng thái cân bằng. Do đó, thời gian ngâm tăng lên dẫn đến trạng thái cân bằng chất tan của pha rắn và pha lỏng cũng sẽ tăng làm khối lượng cao chiết thu được tăng theo. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy thời gian chiết càng tăng khi hệ đạt trạng thái cân bằng thì sự chênh lệch nồng độ chất tan giữa pha rắn và pha lỏng không thay đổi nhiều, tức khối lượng cao chiết tăng thêm không có ý nghĩa so với mức 48 giờ khi tăng thời gian lên 72 và 96 giờ; do đó 48 giờ được chọn là giá trị tối ưu cho khảo sát thời gian ngâm.

Như vậy, quy trình chiết tách cao chiết hạt củ đậu được tối ưu ở 2 lần chiết trong dung môi chloroform, thời gian chiết là 48 giờ với tỉ lệ nguyên liệu/thể tích dung môi là 1 : 5. Cao chiết thu được từ quy trình chiết tách được tiến hành định tính và định lượng hàm lượng rotenone cùng khảo sát hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp trong các thí nghiệm tiếp theo.

**3.2. Định tính và định lượng rotenone**

Kết quả định tính bằng sulfuric acid 98% và dung dịch iron (III) chloride 10% cho thấy trong cao

chiết có sự hiện diện của rotenone và sản phẩm kết tinh rotenone được thể hiện ở Hình 5 và Bảng 2.



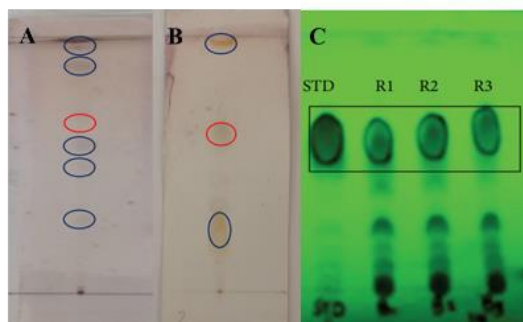
**Hình 4. Kết quả định tính rotenone (A – B: cao chiết, C – D: sản phẩm kết tinh)**

Định tính rotenone cho thấy trong cao chiết có sự hiện diện của rotenone và sản phẩm kết tinh là rotenone. Dung dịch sau phản ứng của sản phẩm kết tinh có màu nâu đậm hơn so với dung dịch được pha từ cao chiết. Từ đó cho thấy hàm lượng rotenone có trong sản phẩm kết tinh lớn hơn trong cao chiết.

**Bảng 2. Kết quả định tính rotenone bằng dung dịch sulfuric acid 98% và dung dịch iron (III) chloride 10%**

Thuốc thử	Cao chiết	Sản phẩm kết tinh
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 98%	Màu đỏ cam	Màu đỏ cam
FeCl <sub>3</sub> 10%	Màu nâu	Màu nâu

Đối với phương pháp định tính bằng sắc ký lớp mỏng trong hệ dung môi chloroform:n-hexane với tỉ lệ 7:3, rotenone trong cao chiết xuất hiện 1 vết sắc ký có giá trị R<sub>f</sub> = 0,66 (Hình 6A), tương ứng với rotenone kết tinh giá trị R<sub>f</sub> = 0,65 (Hình 6B) là các vết được khoanh màu đỏ trên bản sắc ký (phù hợp với giá trị R<sub>f</sub> của rotenone đã được xác định trong nghiên cứu trước (Hình 6C) (Othman et al., 2015).



**Hình 6. Kết quả sắc ký bản mỏng (A. Cao chiết, B. Sản phẩm kết tinh, C. Rotenone chuẩn)**

Ngoài ra, phân tích định lượng rotenone trong dịch chiết bằng LC/MS/MS cho thấy hàm lượng rotenone có trong dịch chiết là 0,14%.

### 3.3. Kết quả khảo sát hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp

#### 3.3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp

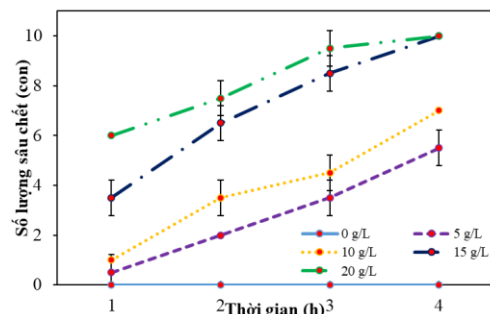
Yếu tố đầu tiên được chọn khảo sát là nồng độ phun thuốc lên sâu và thời gian phun thuốc. Kết quả khảo sát nồng độ phun của thuốc lên sâu và thời gian có hiệu lực tiêu diệt được trình bày trong Bảng 3 và Hình 7. Thí nghiệm được thực hiện với 4 nghiệm thức khảo sát so với đối chứng và 2 lần lặp lại.

**Bảng 3. Kết quả sâu chết theo nồng độ thuốc phun và thời gian chết (n=2)**

Nghiệm thức	Nồng độ (g/L)	Thể tích (mL)	Số sâu (con)	Số sâu chết (con)			
				1h	2h	3h	4h
DC	0	25	10	0	0	0	0 <sup>d</sup>
NT1	5	25	10	0,5	2,0	3,5	5,5 <sup>c</sup>
NT2	10	25	10	1,0	3,5	4,5	7,0 <sup>b</sup>
NT3	15	25	10	3,5	6,5	8,5	10 <sup>a</sup>
NT4	20	25	10	6,0	7,5	9,5	10 <sup>a</sup>
Tổng số sâu chết				11	19,5	26	32,5

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Kết quả cho thấy số lượng sâu chết tăng khi tăng nồng độ của thuốc. Trong đó, mức nồng độ 20 g/L có số lượng sâu chết nhiều nhất so với các nồng độ khác nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với mức nồng độ 15 g/L. Đặc biệt, ở mốc thời gian 4 giờ sau khi phun thì tổng số lượng sâu chết ở các nghiệm thức là nhiều nhất (32,5 con) và có sự khác biệt hoàn toàn so với các mốc thời gian còn lại. Do đó, nồng độ thuốc tối ưu để tiêu diệt sâu ăn tạp là từ 15 g/L tương ứng 0,01% rotenone, cùng thời gian có hiệu lực là 4 giờ sau khi phun để hạn chế hiện tượng giảm hoạt tính của thuốc do tồn tại quá lâu trong điều kiện tự nhiên.



**Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ phun và thời gian đến hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp**

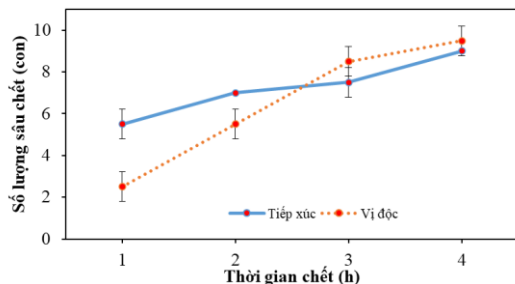
Với nồng độ thuốc 15 g/L và thời gian có hiệu lực tối ưu là 4 giờ, yếu tố tiếp theo được chọn khảo sát là thể tích thuốc phun lên sâu ăn tạp. Kết quả của khảo sát được trình bày ở Bảng 4.

**Bảng 4. Kết quả sâu chết theo thể tích phun (n=2)**

Nghiệm thức	Nồng độ (g/L)	Thể tích (mL)	Số sâu chết (con)	Thời gian chết (h)	Số sâu chết (con)
NT1	15	15	10	4	6,5 <sup>b</sup>
NT2	15	20	10	4	7,5 <sup>b</sup>
NT3	15	25	10	4	10 <sup>a</sup>
NT4	15	30	10	4	9,5 <sup>a</sup>

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Kết quả cho thấy ở các nghiệm thức khảo sát thì mức 25 mL có số lượng sâu chết nhiều nhất (10 con) so với các mức thể tích còn lại nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với mức thể tích 30 mL (9,5 con). Vì vậy, thể tích thuốc phun phù hợp để tiêu diệt sâu ăn tạp là 25 mL. Với cùng thể tích phun này, khả năng tiêu diệt sâu ăn tạp của con đường vị độc và con đường tiếp xúc cũng được khảo sát (Hình 8).



**Hình 8. Khảo sát con đường gây độc đối với sâu ăn tạp (nồng độ: 15 g/L, thể tích: 25 mL)**

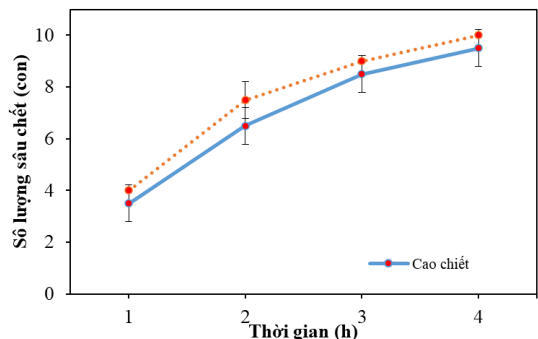
Hình 8 cho thấy mốc thời gian 1 và 2 giờ thì khả năng tiêu diệt sâu ăn tạp qua tiếp xúc cho tốt hơn con đường vị độc. Kết quả này có thể giải thích do thuốc được phun thấm thấu qua lớp biểu bì trên sâu đạt ngưỡng gây độc tiêu diệt sâu. Tuy nhiên, hiệu lực tiêu diệt có phần giảm đi ở mốc thời gian 3 và 4 giờ do thuốc bám trên sâu gần như đã khô cùng các ảnh hưởng của môi trường nên làm giảm hiệu lực tiêu diệt sâu. Mặt khác, ở mốc thời gian 1 và 2 giờ cho thấy hiệu lực tiêu diệt sâu qua con đường vị độc thấp hơn tiếp xúc do lượng độc tố chưa đến ngưỡng gây độc qua đường ăn trực tiếp từ rau đã phun thuốc. Ở mốc thời gian 3 và 4 giờ, hiệu lực tiêu diệt sâu thông qua con đường vị độc lại tăng cao khi lượng độc tố đã tích tụ đạt ngưỡng gây độc. Đặc biệt, ở mức thời gian 4 giờ thì hiệu lực tiêu diệt sâu của cả hai con đường là gần như tương đương nhau nhưng có thể

thấy con đường vị độc có ưu điểm hơn do thuốc sau khi phun sẽ thấm thấu trực tiếp qua đường ăn làm hiệu lực tiêu diệt được kéo dài.

Tóm lại, hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp tốt nhất đã được ghi nhận sau 4 giờ phun thuốc, nồng độ thuốc là 15 g/L tương ứng với hàm lượng rotenone 0,01% với thể tích phun 25 mL ở các nghiệm thức khảo sát trong thí nghiệm. Mặt khác, kết quả khảo sát ảnh hưởng chính đến hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp cũng được ghi nhận qua con đường vị độc bởi tính trực tiếp, hiệu lực kéo dài trong 4 giờ qua số lượng sâu chết ở ngưỡng gây độc.

### 2.3.2. Đánh giá hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp

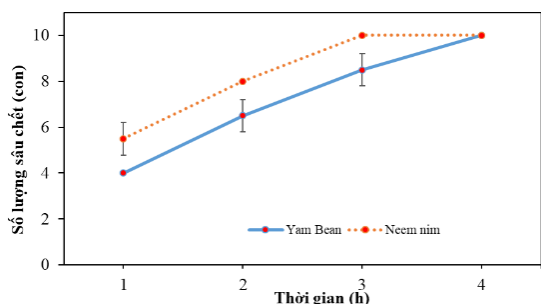
Sau khi thực hiện so sánh hoạt tính sinh học của cao chiết và sản phẩm kết tinh, kết quả của thí nghiệm được trình bày ở Hình 9.



**Hình 9. Kết quả so sánh hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp của cao chiết và rotenone kết tinh (nồng độ: 15g/L, thể tích: 25 mL)**

Kết quả khảo sát cho thấy tại các mốc thời gian từ 1 đến 4 giờ, hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp của cao chiết hạt củ đậu và rotenone kết tinh cho kết quả tương đương nhau. Vì vậy, cao chiết được thử nghiệm phối chế thành chế phẩm sinh học Yam Bean 0,03 EC để đánh giá hiệu lực tiêu diệt sâu ăn tạp so với các sản phẩm cùng loại Neem nim (chứa hoạt chất azadirachtin 0,3%) trên thị trường. Chế phẩm sinh học Yam Bean 0,03 EC được pha chế với nồng độ cao chiết là 37,5 g/L đạt hàm lượng hoạt chất rotenone 0,03% và giới hạn pha loãng vào nước từ nồng độ 0,01 – 0,03%, các hoạt chất sinh học khác chiếm 4,86% về khối lượng, dung môi được sử dụng trong pha chế sản phẩm là acetone với lượng vừa đủ cho 500 mL. Để so sánh hoạt tính sinh học, chế phẩm sinh học Yam Bean và chế phẩm sinh học Neem nim được pha loãng ở nồng độ 0,01% và thể tích sử dụng là 25 mL được phun trên 10 con sâu cho mỗi loại. Kết quả cho thấy ở các mốc thời gian khảo sát từ 1 – 3 giờ thì hiệu lực tiêu diệt sâu của chế phẩm Yam Bean thấp hơn so với sản phẩm

Neem nim thương mại. Tuy nhiên, sau 4 giờ tương ứng với thời gian đạt hiệu lực tiêu diệt tối ưu sau khi phun 2 loại sản phẩm cho hiệu lực tiêu diệt tương đương nhau. Vì vậy, hoạt chất rotenone được phối chế từ cao chiết hạt củ đậu cho chế phẩm sinh học Yam Bean 0,03 EC có tiềm năng sử dụng tương đương với các sản phẩm sinh học đang lưu thông trên thị trường hiện nay.



**Hình 10. Kết quả so sánh khả năng diệt sâu của sản phẩm Yam Bean với sản phẩm thương mại Neem nim**

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbas, N., Shad, S. A., & Razaq, M. (2012). Fitness cost, cross resistance and realized heritability of resistance to imidacloprid in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(3), 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.001>
- Ahmad, M., Saleem, M. A., & Sayyed, A. H. (2009). Efficacy of insecticide mixtures against pyrethroid-and organophosphate-resistant populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(3), 266-274. <https://doi.org/10.1002/ps.1681>
- Ambrose, A. M., & Haag, H. B. (1937). Toxicological Studies of *Derris*. *Industrial & Engineering Chemistry*, 29(4), 429-431. <https://doi.org/10.1021/ie50328a017>
- Baldino, L., Scognamiglio, M., & Reverchon, E. (2018). Extraction of rotenoids from *Derris elliptica* using supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(12), 3656-60. <https://doi.org/10.1002/jctb.5764>
- Bích, Đ. H., Chung, Đ. V., Chương, B. X., Dong, N. T., Đàm, Đ. T., Hiền, P. V., Lộ V. N., Mai, P. D., Mãn, P. K., Thu, Đ. T., Tập, N., & Toàn, T. (1986). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam (Vol. 1)*. Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật Hà Nội. <https://thuvienpdf.com/cay-thuoc-va-dong-vat-lam-thuoc-o-viet-nam-tap-1>
- Davidson, W. M., 1930. Rotenone as a contact insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 23(5), 868-874. <https://doi.org/10.1093/jee/23.5.868>
- Lautié, E., Rasse, C., Rozet, E., Mourgues, C., Vanhelleputte, J. P., & Quetin-Leclercq, J. (2013). Fast microwave-assisted extraction of rotenone for its quantification in seeds of yam bean (*Pachyrhizus* sp.). *Journal of Separation science*, 36(4), 758-63. <http://doi/10.1002/jssc.201200347>
- Lợi, Đ. T. (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam (Vol. 1)*. Nhà xuất bản Y học.
- Ling, N. (2003). Rotenone: a review of its toxicity and use for fisheries management. *Science for Conservation*, 211, 1173-2946. <https://catalogue.nla.gov.au/Record/886498>
- Nollet, L. ML., & Rathore, H. S. (2015). *Biopesticides handbook*. CRC Press. 121.
- Othman, Z. S., Hassan, N. H., Yusop, M. R., & Zubairi, S. I. (2015). Development of a New Binary Solvent System Using Ionic Liquids as Additives to Improve Rotenone Extraction Yield from Malaysia *Derris* sp. *Journal of Chemistry*, 2015, 468917-468923. <https://doi.org/10.1155/2015/468917>
- Zhang, P., Qin, D., Chen, J., Zhang, Z. (2020). Plants in the Genus Tephrosia: Valuable Resources for Botanical Insecticides (Review). *Insects*, 11(10),

- 721-738.  
<https://doi.org/10.3390/insects11100721>
- Phan, P. H., Gortnizka, H., & Kraemer, R. (2003). Rotenone-potential and prospect for sustainable agriculture. *Omonrice Journal*, 11, 83-92.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/ROTENONE-POTENTIAL-AND-PROSPECT-FOR-SUSTAINABLE-Hien-Gortnizka/53b1f164e4b3f884eb028d03b4b1bc77c71dbbe6#extracted>
- Yoon, A. S. (2009). *Extraction and formulation development of Derris elliptica for insect pest control*. Prince of Songkla University.
- <https://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/7072/1/316615.pdf>
- Zubairi, S. I., Sarmidi, M. R., & Aziz, R. A. (2014). A preliminary study of rotenone exhaustive extraction kinetic from *Derris elliptica* dried roots using normal soaking extraction (NSE) method. *Advances in Environmental Biology*, 14, 910-916.  
<https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA376207007&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=19950756&p=AONE&sw=w&userGroupName=anon%7E42da1e52>