

XÂY DỰNG VÀ TỐI ƯU QUI TRÌNH PHÂN TÍCH ASENI TRONG MẪU TÓC

**Vi Thị Mai Lan, Phạm Thị Kim
Trang, Nguyễn Thị Minh Huệ,
Phạm Thị Dâu, Trần Thị Hảo**
*Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ
Môi trường và Phát triển Bền vững,
Trường ĐHKHTN, ĐHQGHN*

TÓM TẮT

Khảo sát và tối ưu các điều kiện vô cơ hoá mẫu tóc bằng kỹ thuật lò vi sóng và kỹ thuật bình Kendal với các hỗn hợp ôxy hoá là các axit HCl, HNO₃, H₂SO₄ và hydroperoxit để xác định hàm lượng asen. Độ thu hồi của phương pháp được kiểm tra bằng cách thêm một lượng dung dịch asen chuẩn vào mẫu tóc trước khi xử lý và sử dụng mẫu tóc kiểm chứng CRM (NCS ZC 81002). Xác định nồng độ asen bằng thiết bị HVG/AAS, độ thu hồi đối với kỹ thuật lò vi sóng là $99,1 \pm 5,5 \%$ (n=9), đối với kỹ thuật bình Kendal là $96,6 \pm 4,5 \%$ (n = 4). ảnh hưởng của nitrit tạo thành trong quá trình vô cơ hoá mẫu đến phép đo HVG/AAS được loại trừ bằng cách thêm axit amido sulfonic vào mẫu đo.

1. MỞ ĐẦU

Asen được coi là một trong các tác nhân gây ung thư ở cả người và động vật như ung thư da, phổi, và những bệnh khác như rối loạn sắc tố, sừng hoá, sạm da, Ô nhiễm asen trong nước ngầm đã được phát hiện ở nhiều nơi trên thế giới như Banglades, Tây Bengan - Ấn Độ, Trung Quốc, Chi Lê, Mỹ, Việt Nam, ... [4]. Đã có rất nhiều bằng chứng về sự nhiễm độc asen mãn tính trong những người sử dụng lâu dài nguồn nước ngầm nhiễm bản asen [3, 4]. Ở Việt Nam, theo nghiên cứu

của Phạm Thị Kim Trang và các cộng sự, hàm lượng asen trung bình trong nước ngầm tại một số giếng khoan ở vùng châu thổ sông Hồng là $132\mu\text{g/L}$ và trong khoảng từ 1 đến $357\mu\text{g/L}$ [7] (tiêu chuẩn cho phép về hàm lượng As trong nước ăn theo WHO và Việt Nam hiện nay là $10\mu\text{g/L}$). Do đó, người dân sinh sống ở những vùng này có thể gặp rủi ro cao do sử dụng lâu ngày nguồn nước ô nhiễm asen. Tuy nhiên, các dấu hiệu lâm sàng về nhiễm độc asen ở Việt Nam vẫn chưa được phát hiện rõ ràng, vì vậy vấn đề đặt ra là phải tìm được một chỉ thị thích hợp nhận biết sự nhiễm độc asen mãn tính để có những giải pháp giảm nhẹ trước khi nó trở nên trầm trọng. Khi vào cơ thể, asen (As III) sẽ được lưu giữ và tích lũy dần trong các mô giàu chất sừng như tóc, móng tay và da. Nồng độ asen cũng được tìm thấy trong các mô này cao hơn trong các loại mô khác. Do đó, tóc được coi là một loại chỉ thị sinh học hữu hiệu cho việc nghiên cứu sự nhiễm độc asen mãn tính, không gây khó khăn khi lấy mẫu, có sự ổn định và không đòi hỏi điều kiện bảo quản khắt khe [1].

Phương pháp thường sử dụng để phân tích các asen là kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS), trong đó mẫu đo phải ở dạng dung dịch đồng nhất và nguyên tố phân tích phải ở dạng vô cơ. Do đó cần vô cơ hoá mẫu (phá vỡ nền protein của tóc) để đưa asen từ dạng hữu cơ về dạng vô cơ trước khi tiến hành phép đo AAS. Quá trình xử lý mẫu có thể thực hiện theo kỹ thuật vô cơ hóa ướt trong các hệ kín (lò vi sóng) hoặc mở (bình Kendal). Vô cơ hoá mẫu trong hệ kín dưới điều kiện áp suất cao thường hiệu quả hơn so với hệ mở vì nó cho phép thực hiện quá trình phá mẫu ở nhiệt độ cao hơn điểm sôi của các tác nhân oxy hoá [2]. Hiện nay, hệ thống lò vi sóng đã thay thế các qui trình phân huỷ bằng axit và tro hoá khác do tốn ít thời gian [2]. Tuy nhiên, điều kiện phương tiện tiến hành xử lý mẫu trong hệ kín thường đòi hỏi các thiết bị đắt tiền mà không phải tất cả các phòng thí nghiệm đều đáp ứng được. Do đó, mục tiêu của chúng tôi trong bài báo này là nghiên cứu xây dựng và tối ưu quy trình phân tích hàm lượng asen tổng trong mẫu tóc với cả hai kỹ thuật xử lý mẫu bằng lò vi sóng và bình Kendal.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Dụng cụ, thiết bị

- Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) hãng Shimadzu Model AA-6800 ghép nối thiết bị tạo khí hydrua HVG-1.
- Lò vi sóng hãng National Model NN-C988W (Capacity 900 W) kèm theo bộ ống teflon MPR 600/10M
- Các bình Kendal, bếp đun cách cát, tủ sấy
- Bình định mức, pipet thuỷ tinh, micropipet, các ống nghiệm nhựa P.P 15, 50 mL (Greiner)

2.2. Hoá chất

- Dung dịch chuẩn gốc As (III) 1 g/L, Merck
- Các axit HCl 36%, HNO₃ 65%, H₂SO₄ 98% và dung dịch H₂O₂ 30%, pA, Merck
- Các hoá chất NaI, NaOH, NaBH₄, HSO₃NH₂, axit L (+) ascorbic pA, Merck
- Các dung dịch chuẩn kiểm chứng ICP multi-element (As 100mg/l), As V 1g/l pha từ muối Na₂HAsO₄, Merck.
- Mẫu tóc kiểm chứng CRM (NCS ZC 81002)
- Khí axetylen 99%, argon 99.9%

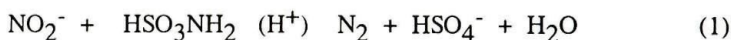
2.3. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

Để xác định hàm lượng arsen trong các mẫu đo (mẫu tóc sau khi xử lý), chúng tôi sử dụng thiết bị HVG/AAS và dựng đường chuẩn với các dung dịch arsen có nồng độ 1; 2,5; 5; 7,5; 10 ppb được pha từ dung dịch gốc As (III) 1g/L. Đường chuẩn sau khi dựng được kiểm tra bằng các dung dịch chuẩn ICP As (III) và As (V) 2,5 ppb.

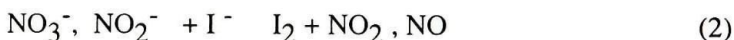
Mẫu tóc nghiên cứu được cắt sát da đầu ở vùng chỏm hoặc vùng sau gáy để giảm bớt khả năng nhiễm bẩn từ bên ngoài [1], sau đó rửa sạch bằng xà phòng trung tính, tráng bằng nước cất 3 lần và sấy khô, cắt ngắn 0,5 - 1 cm, cho vào túi nilon sạch có khoá kín.

Quá trình vô cơ hoá mẫu tóc được thực hiện theo hai kỹ thuật: lò vi sóng (áp suất cao) và bình Kendal (vô cơ hoá bằng nhiệt). Với cả hai kỹ thuật này, việc chọn tác nhân oxy hoá là rất quan trọng sao cho việc xử lý mẫu không quá phức tạp và quá trình vô cơ hoá xảy ra hoàn toàn. Các axit thường dùng là axit clohydric, nitric, sulfuric, pecloric hoặc hỗn hợp của chúng với hydropeoxit. Axit pecloric HClO_4 có khả năng oxy hoá mạnh nhất nhưng dễ gây nguy hiểm [2]. Do đó để đảm bảo tính an toàn, chúng tôi không sử dụng axit này. Với phương pháp vô cơ hoá mẫu trong bình Kendal, hỗn hợp oxy hoá được chọn để nghiên cứu là HCl , HNO_3 , H_2SO_4 và H_2O_2 . Với phương pháp lò vi sóng, chúng tôi không sử dụng axit H_2SO_4 do axit này toả nhiệt mạnh không có lợi khi dùng trong hệ kín có áp suất cao.

Tuy nhiên, các oxit nitơ và nitrosyl clorua tạo thành từ nitrit trong quá trình vô cơ hoá mẫu làm giảm khả năng phát hiện toàn bộ lượng As hoà tan do khả năng oxy hoá mạnh của chúng cản trở sự tạo thành khí asin AsH_3 . Để tránh ảnh hưởng này, cần loại bỏ các nitrit bằng axit amido sulfonic HSO_3NH_2 (ASA) vì nó có khả năng khử chọn lọc đối với nitrit theo phương trình [2]:



Mặt khác lượng nitrat dư và nitrit cũng ảnh hưởng đến phép đo AAS, làm giảm hiệu suất khử As (V) do phản ứng:



Hơn nữa, lượng I_2 sinh ra nhiều sẽ tạo thành kết tủa gây nhiễu khi thực hiện phép đo. Do đó trước khi thực hiện phản ứng khử As (V) về As (III), chúng tôi cho thêm dung dịch ASA vào mẫu.

Vì vậy, các vấn đề cụ thể cần nghiên cứu là:

1. Kỹ thuật vô cơ hoá mẫu trong bình Kendal: khảo sát chọn nồng độ ASA thích hợp
2. Kỹ thuật vô cơ hoá mẫu bằng lò vi sóng:
 - + Hỗn hợp oxy hoá
 - + Nồng độ ASA
 - + Thời gian phản ứng giữa ASA với nitrit
3. Độ lặp lại và độ chính xác của phương pháp

Kỹ thuật vô cơ hoá mẫu trong bình Kendal

Cân chính xác 0,3 g tóc cho vào bình Kendal, thêm 3ml HNO₃ đặc, để 12 tiếng (hoặc qua đêm). Thêm tiếp 2ml HNO₃ 65%, 1ml H₂O₂ 30%, 2ml H₂SO₄ 98% và đun cách cát ở nhiệt độ 250 – 300°C cho đến khi không còn khí màu nâu (NO₂) và xuất hiện khí trắng (SO₂), thu được dung dịch trong. Để nguội, gom mẫu đã xử lý vào lọ nhựa chia vạch, định mức đến 15ml bằng nước cất.

Lấy 5ml dung dịch mẫu sau xử lý, thêm vào các thể tích ASA 200 mg/mL sao cho nồng độ là 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 250, 300, 350, 400 mmol/l, lắc đều, để 10 – 15 phút. Sau đó thêm 0,3ml dung dịch khử NaI 50%, để 30 phút (mỗi mức nghiên cứu làm lặp lại 3 lần). Định mức đến 10ml bằng nước cất và xác định hàm lượng asen bằng phép đo HVG/AAS.

Vô cơ hoá mẫu theo kỹ thuật lò vi sóng

Khảo sát hỗn hợp oxy hoá mẫu:

Cân 0,3 g tóc cho vào ống teflon, thêm vào các hỗn hợp oxy hoá như sau:

A: 5 mL HCl, 1 mL HNO₃, 1mL H₂O₂

B: 4 mL HCl, 2mL HNO₃, 1mL H₂O₂

C: 3 mL HNO₃, 1mL H₂O₂

Sau đó, đậy nắp, lắc nhẹ, vặn chặt và cho vào lò vi sóng, xử lý theo chương trình năng lượng sau:

Các bước	Chế độ	Thời gian (phút)
1	Low Medium	10
2	0	2
3	High Medium	15
4	0	15
5	Medium	10

Để nguội, gom mẫu đã xử lý vào lọ nhựa chia vạch, định mức đến 15ml bằng nước cất.

Lấy 5ml mỗi loại mẫu đã xử lý, thêm 1,2ml ASA 200 mg/ml (nồng độ ASA trong dung dịch phản ứng khoảng 400 mmol/L), để 10-15 phút, thêm tiếp 0,3ml dung dịch NaI 50%, để 30 phút. Định mức đến 10ml và xác định nồng độ asen.

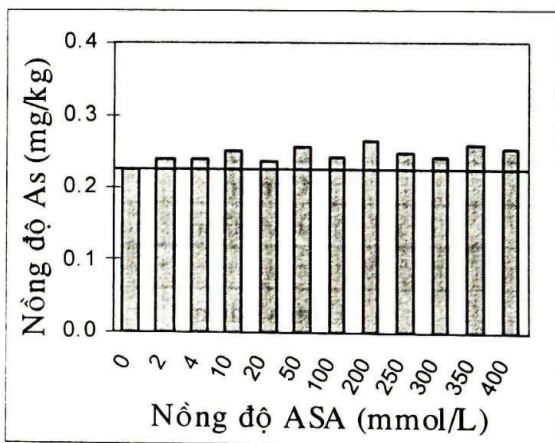
Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ASA đến phép xác định asen: tương tự như trên, chúng tôi thêm vào mẫu các thể tích ASA 200 mg/mL khác nhau (với nồng độ trong dung dịch phản ứng là 10, 20, 30, 40, 100, 200, 270, 340, 410, 590 mmol/L)

Khảo sát chọn thời gian tối ưu cho phản ứng giữa ASA và nitrit: thực hiện phản ứng trong các khoảng thời gian 1, 5, 15 và 30 phút.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Vô cơ hoá mẫu trong bình Kendal

Xử lý mẫu trong bình Kendal ở nhiệt độ cao là một phương pháp truyền thống được nhiều phòng thí nghiệm áp dụng. Việc sử dụng hỗn hợp gồm nhiều tác nhân oxy hoá làm tăng hiệu quả vô cơ hoá mẫu, trong đó axit H_2SO_4 đóng vai trò giữ chất phân tích trong quá trình xử lý mẫu. Khảo sát ảnh hưởng của axit ASA đến phép đo asen chúng tôi thu được kết quả như sau (hình 1):



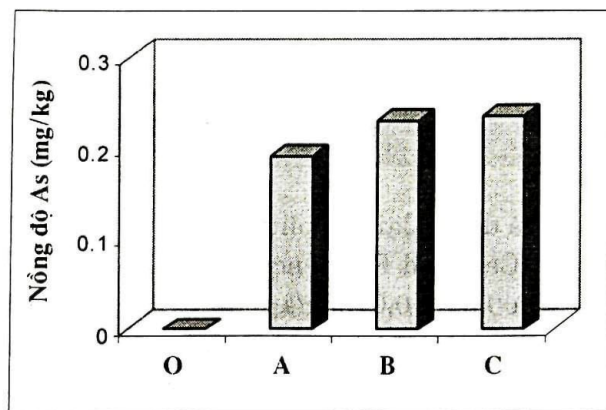
Hình 1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ axit amido sulfonic

Kết quả khảo sát cho thấy việc bổ sung ASA vào mẫu đo làm tăng khả năng phát hiện arsen, tuy nhiên ảnh hưởng này không thể hiện rõ ràng khi khảo sát ở các nồng độ ASA khác nhau. Điều này có thể là do quá trình vô cơ hoá mẫu thực hiện trong hệ mở nên các axit có nhiệt độ sôi thấp bị bay hơi khi đun, do đó lượng axit nitric dư cũng như nitrit tạo thành không đáng kể. Song để tăng độ nhạy của phép đo và tiết kiệm hoá chất, có thể bổ sung axit ASA với nồng độ 10 mmol/l.

Độ lặp lại cũng như độ thu hồi của phương pháp và ảnh hưởng của nền mẫu đến phép đo được xác định bằng cách thêm vào mẫu trước khi xử lý một lượng thích hợp dung dịch arsen chuẩn. Làm lặp lại 4 lần, kết quả phân tích cho độ lặp lại cũng như độ thu hồi lượng As thêm vào khá tốt (96,6 4,5 %).

3.2. Vô cơ hoá mẫu theo kỹ thuật lò vi sóng

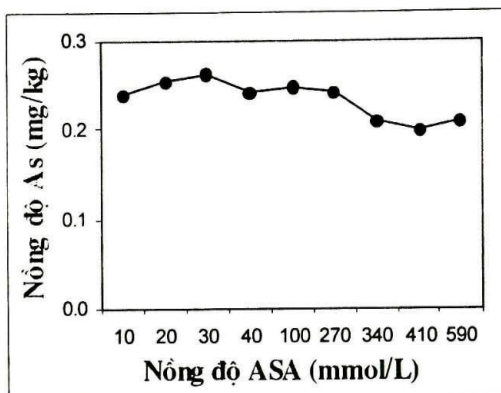
Hình 2 cho thấy hỗn hợp ôxy hoá B và C cho kết quả phân tích arsen trong mẫu tóc cao hơn so với hỗn hợp A, nhưng sự khác nhau khi thực hiện vô cơ hoá mẫu bằng hỗn hợp B và C là không đáng kể. Và khác với phương pháp Kendal, tác dụng của việc thêm axit ASA vào mẫu đo ở phương pháp này được thể hiện rõ ràng. Phép đo hoàn toàn không thực hiện được khi không bổ sung ASA do lượng axit nitric dư và nitrit tạo thành trong mẫu nhiều hơn khi xử lý mẫu bằng phương pháp Kendal. Trong phân tích arsen bằng thiết bị HVG/AAS có sử dụng NaBH_4 làm chất khử, tác dụng khử của nó sẽ giảm đi khi gặp các tác nhân ôxy hoá mạnh như nitrat, nitrit, do đó cản trở quá trình tạo asin dẫn đến khả năng phát hiện As trong mẫu đo kém hiệu quả [5].



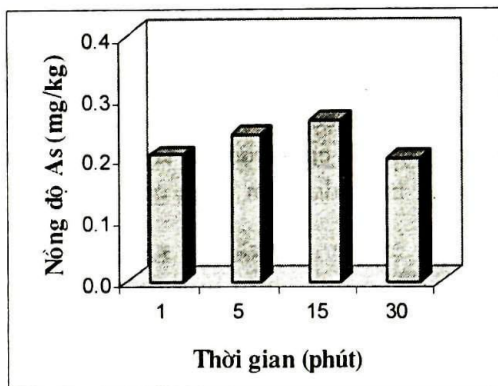
Hình 2. Khảo sát các hỗn hợp ôxy hoá;

O - không thêm ASA;
A, B, C - thêm ASA
400 mmol/l

Lựa chọn nồng độ ASA thích hợp cũng như thời gian phản ứng tối ưu cũng rất quan trọng để loại bỏ hoàn toàn ảnh hưởng của nitrat và nitrit, mặt khác tránh lãng phí hoá chất, tiết kiệm thời gian đồng thời có thể gây những ảnh hưởng không tốt nếu cho quá dư. Dựa vào kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của lượng ASA thêm vào, chúng tôi thấy rằng phép đo đạt kết quả cao nhất khi nồng độ ASA trong dung dịch phản ứng là 30 mmol/l (hình 3) và thời gian phản ứng tốt nhất là 15 phút (hình 4).



Hình 3. Khảo sát nồng độ ASA



Hình 4. Khảo sát thời gian phản ứng loại nitrit

Để xác định độ chính xác và độ lặp lại của phương pháp, chúng tôi sử dụng mẫu tócs kiểm chứng (Certified Reference Material) NCS ZC 81002, trong đó nồng độ asen là $0,59 \pm 0,07$ mg/kg. Xử lý và phân tích mẫu ở các điều kiện đã chọn, làm lặp lại 9 lần, kết quả thu được rất tốt với nồng độ asen xác định được là $0,58 \pm 0,03$ mg/kg ($99,1 \pm 5,5$ %).

4. Kết luận

Có thể sử dụng hai kỹ thuật lò vi sóng và bình Kendal trong những điều kiện đã chọn để vô cơ hoá mầu tóc trong phân tích xác định arsen với độ lặp lại và độ thu hồi cao. Tuy nhiên, xử lý mầu trong bình Kendal không tiện dụng bằng lò vi sóng do tốn thời gian (khoảng 15 - 16 tiếng cho mỗi mẻ), sử dụng nhiều loại hoá chất, trong khi xử lý mầu bằng kỹ thuật lò vi sóng chỉ trong khoảng 1 tiếng, hỗn hợp oxy hoá mầu đơn giản, thích hợp cho yêu cầu phân tích thường xuyên với số lượng mầu lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ann Morgan. Chapter 3: *Exposure and health effects*, p. 32 – 33 (2001)
http://www.who.int/water_sanitation_health/arsenic/arsenicUNReptoc.htm
2. G.Damkroger, M.Grote, E. JanBen. *Comparison of sample digestion procedures for the determination of arsenic in certified marine samples using the FI-HG-AAS- technique*. Fresenius J Anal Chem 357: 817-821 (1997).
3. H.M. Anawar, J. Akai, K.M.G. Mostofa, S. Safiullah, S.M. Tareq. *Arsenic poisoning in groundwater: Health risk and geochemical sources in Bangladesh*. Environment International 27, 597 – 604 (2002).
4. Jack C. Ng, Jianping Wang, Amiad Shraim. *A global health problem caused by arsenic from natural sources*. Chemosphere 52, 1353-1359 (2003).
5. Lê Tự Thành, Nguyễn Văn Đông, Diệp Ngọc Sương. *Xác định arsen tổng số và nghiên cứu xác định riêng lẻ As (III) và As (V) bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng kỹ thuật khí hydrua hoá*. Hội thảo Quốc tế ô nhiễm Asen: Hiện trạng, tác động đến sức khoẻ cộng đồng và các giải pháp phòng ngừa, Hà Nội, tháng 12 (2000).
6. Phạm Luận, Đặng Quang Ngọc, Trần Tứ Hiếu, Lại Văn Hoà. *Nghiên cứu xác định một số kim loại trong tóc công nhân thuộc khu vực nhà máy in*. Tạp chí phân tích Hoá, Lý và Sinh học, Tập 3, số 1, tr. 5 - 8 (1998).
7. Pham Thi Kim Trang, Nguyen Minh Hue, Vi Mai Lan, Bui Hong Nhat, Luu Thanh Binh, Pham Minh Khoi, Pham Hung Viet, Michael Berg, Shinsuke Tanabe. *Arsenic pollution in tube well water at Hanoi suburb villages*. Proceeding of the General Workshop on Environmental Technology and Sustainable Development, Osaka University, Japan, July15-16 (2003).