

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

Nguyễn Mạnh Hà

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH LƯỢNG VẾT CÁC DẠNG ASEN VÀ SELEN BẰNG
PHƯƠNG PHÁP GHÉP NỐI SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO VỚI KHỐI PHỔ
PLASMA CẢM ỨNG (HPLC-ICP-MS)**

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 9440112.03

DỰ THẢO TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội – 2021

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết, mục tiêu và nội dung của luận án

Hiện nay, vấn đề phân tích dạng các nguyên tố đang là nhu cầu rất cấp thiết trong đánh giá ô nhiễm thực phẩm và môi trường, trong nghiên cứu các quá trình chuyển hóa và tích lũy sinh học, trong nghiên cứu các quá trình địa hóa... Tuy nhiên các phép xác định thông thường chỉ cho biết tổng hàm lượng các nguyên tố chứ chưa cho biết hàm lượng các nguyên tố ở các dạng cụ thể, trong khi đó để đánh giá tính độc, các quá trình chuyển hóa chất trong cơ thể sinh vật, các chất tồn tại trong các tầng địa chất, sự tồn tại của nguyên tố trong môi trường lại cần đến thông tin về hàm lượng và số lượng của các dạng nguyên tố.

Có thể đề cập đến một nguyên tố gây ô nhiễm mang độc tính cao như As, nguyên tố này được coi là chất độc bảng A vì nó gây ra bệnh ung thư nguy hiểm cho con người, arsen chủ yếu ở dạng các hợp chất vô cơ (có độc tính cao) được đưa vào cơ thể từ nhiều nguồn khác nhau: thực phẩm, nước uống, không khí. Trong cơ thể, thông qua phản ứng metyl hóa và khử liên tục các hợp chất As này được chuyển thành dạng không độc, sau đó được bài tiết qua nước tiểu, phân, và tích lũy ở da, tóc, móng. Vì vậy, hàm lượng As trong nước tiểu, phân, da, tóc, móng được dùng làm chỉ thị cho sự phơi nhiễm As trong cơ thể. Chính vì vậy hàm lượng As trong nước sinh hoạt theo tiêu chuẩn quy định khá thấp ($\leq 10\mu\text{g/lít}$). Trong tự nhiên As đã được tìm thấy dưới nhiều dạng hợp chất khác nhau như As(III), As(V), MMA, DMA... trong đó dạng As(III) độc hơn dạng As(V); các dạng As vô cơ có độc tính cao hơn các dạng As hữu cơ, các dạng lại có thể chuyển hóa qua lại với nhau nhờ tác động của các yếu tố trong môi trường sống. Mặt khác arsen (As) cũng là nguyên tố vi lượng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của động vật và con người. Ở hàm lượng nhất định As tham gia vào quá trình trao đổi chất, tổng hợp nucleic, protit và hemoglobin. Chính vì vậy mà các chuyên gia về thực phẩm của tổ chức FAO/WHO đã đưa ra mức hấp thụ lượng arsen vô cơ tối đa cho người là $15\mu\text{g As/kg}$ trọng lượng cơ thể/tuần.

Mặc dù As là một nguyên tố không thể thiếu trong hệ thống sinh học, nhưng nếu hấp thụ một hàm lượng vượt quá mức cần thiết, nó lại là một chất cực độc. Độc tính của các As phụ thuộc vào các dạng hợp chất của nó, mức độ độc hại của các hợp chất này giảm dần theo thứ tự sau: arsenites > inorganic arsenites > organic trivalent compounds (arsenooxides) > inorganic arsenates > organic pentavalent compounds > arsonium compounds > elemental arsenic.

Một nguyên tố khác nữa như Se, nguyên tố này vừa có thể đóng vai trò là nguyên tố vi lượng vừa có thể là độc tố khi ở hàm lượng cao, khoảng nồng độ Se được phép có trong cơ thể người mà không gây độc hại là rất hẹp và tùy thuộc vào dạng tồn tại của Se, lượng Se nên đưa vào cơ thể người hàng ngày khoảng $50\text{-}200\mu\text{g/ngày}$. Các dạng hợp chất có độc tính của selen thường gặp là selen dioxyd (SeO_2), acid selenơ (H_2SeO_3), muối selenit (SeO_3^{2-}), acid selenic (H_2SeO_4), muối selenat (SeO_4^{2-}) hoặc dạng selenua (Se^{2-}). Các hợp chất selen đáng chú ý trong dinh dưỡng và sức khỏe là $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}^+$, selenocystein, selenocystin, selenomethionin. Như vậy, mỗi dạng tồn tại của một nguyên tố có những tính chất khác nhau nếu chỉ phân tích tổng hàm lượng các nguyên tố thì chưa chỉ ra được độc tính hoặc ứng dụng của nó, chính vì vậy việc định lượng các dạng của các nguyên tố là cần thiết. Do đó việc xác định nồng độ của từng dạng arsen và selen trong mẫu thực phẩm môi trường sinh học, thuốc và thực phẩm chức năng sẽ đánh giá được mức độ rủi ro đến sức khỏe con người. Vì vậy, một phương pháp xác định phù hợp để có thể tách và định lượng chính xác các dạng khác nhau của arsen và selen trong mẫu là cần thiết

Với những lý do trên, chúng tôi lựa chọn đề tài "***Nghiên cứu xác định lượng vết các dạng Arsen và selen bằng phương pháp ghép nối sắc kí lỏng hiệu năng cao với khối phổ Plasma cảm ứng HPLC-ICP-MS***"

Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Nghiên cứu phát triển phương pháp phân tích xác định 5 dạng As bao gồm AsB, As(III), MMA, DMA, As(V) và bước đầu nghiên cứu phân tích 4 dạng Se bao gồm vô cơ Se(IV), Se(VI), DMDSe, SeMet bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao HPLC ghép nối với khối phổ plasma cảm ứng ICPMS.

Ứng dụng phương pháp phân tích để phân tích các dạng arsen trong các đối tượng mẫu như: Nước, nước

mắm, cá, gạo, nước tiểu, huyết thanh và selen trong mẫu thuốc, thực phẩm chức năng

2. Nội dung nghiên cứu của luận án

Phát triển phương pháp phân tích dạng Asen và Selen bằng hệ liên hợp HPLC ghép nối ICP-MS.

- Tối ưu các điều kiện tách và nhận biết các dạng As và Se bằng HPLC-ICP-MS
- Tối ưu các điều kiện xử lý mẫu
- Thẩm định và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp (Độ đúng, độ chính xác, LOD, LOQ, CRM)

Ứng dụng các phương pháp đã phát triển để phân tích

- Dạng tồn tại của As trong mẫu sinh học, thực phẩm và môi trường
- Dạng tồn tại của Se trong mẫu thuốc và mẫu nấm nem định hướng thực phẩm chức năng

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Khái quát về nguyên tố As

1.1.1. Các dạng tồn tại của Asen trong tự nhiên

1.1.2. Sự phân bố của asen trong môi trường

1.1.3. Sự phân bố của As trong các đối tượng thực phẩm.

1.1.4. Độc tính và cơ chế gây độc của asen

1.2. Các dạng tồn tại và sự chuyển hóa các dạng selen.

1.2.1. Độc tính và ứng dụng ảnh hưởng của selen đến sức khỏe con người

1.3. Các phương pháp phân tích dạng Asen và selen

1.3.1. Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao ghép nối hệ hydrua quang phổ huỳnh quang nguyên tử (HPLC-UV-HG-AFS)

1.3.2. Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao ghép nối với hệ quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng kỹ thuật hydrua hóa (HPLC-HG-AAS)

1.3.3. Phương pháp điện di mao quản CE-UV

1.3.4. Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao ghép nối với cảm ứng cao tần và quang phổ phát xạ nguyên tử (HPLC – ICP – AES)

1.3.5. Phương pháp kết hợp HPLC-ICP-MS

Chương 2 - THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị

2.1.1. Hóa chất

2.1.2. Chuẩn bị hóa chất và dung dịch chuẩn:

2.1.3. Dụng cụ, thiết bị

2.2. Phương pháp lấy mẫu, bảo quản, xử lý mẫu thực phẩm

2.2.1. Các loại mẫu đo

Mẫu chuẩn (CRM) asen trong bột gạo (ERM®-BC211) từ tài liệu tham khảo châu Âu, Viện tài liệu tham khảo và đo lường Bỉ, được chứng nhận cho As (III), As (V) và DMA, cũng như tổng nồng độ asen, được sử dụng để xác nhận phương pháp phân tích tính chất của hợp chất asen trong các mẫu gạo. Mẫu cá (DORM-2) Canada, được chứng nhận cho AsB cũng như hàm lượng asen tổng. Các mẫu chuẩn chứng nhận được bảo quản cẩn thận trong điều kiện kín, ở nhiệt độ -4 °C. Sử dụng các loại mẫu chuẩn có nền mẫu tương tự với mẫu thực tế phân tích, để xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích.

Mẫu thực tế bao gồm (mẫu nước, nước mắm, gạo, nước tiểu, huyết thanh và mẫu thuốc...)

2.2.2. Lấy mẫu

Trong nghiên cứu địa điểm lấy mẫu; Mẫu được lấy tại xã Nhật Tân, huyện Kim Bảng, tỉnh Hà Nam vào tháng 11 năm 2017 bao gồm (mẫu nước, nước mắm, gạo, nước tiểu, huyết thanh...)

Mẫu thuốc; mẫu được mua tại các cửa hàng thuốc ở khu vực Hà Nội

Đối với mẫu nước: Các mẫu nước ngầm được lấy từ các giếng khoan có độ sâu khác nhau. Nước ngầm được

bơm cho chảy tự do khoảng 20 phút sau đó mẫu nước được lấy và bảo quản trong bình kín khi ở nhiệt độ 4°C vận chuyển và lưu mẫu

Mẫu Gạo: Sau khi lấy được chứa trong các túi nhựa và bảo quản trong điều kiện 4 °C.

Mẫu máu: Mẫu máu sau khi lấy từ người dân ở các hộ gia đình được thêm EDTA để tránh hiện tượng đông máu vào ống đựng máu chuyên dụng của ngành y tế được bảo quản - 4°C sau đó vận chuyển về phòng TN bảo quản ở -20°C

Mẫu nước tiểu: được lấy theo dòng, loại bỏ phần đầu và phần cuối dòng do dễ có tạp nhiễm bởi dịch nhày, tế bào bong cũng như vi khuẩn

2.2.3. Tiền xử lý mẫu

Mẫu cá: Sau khi được thu thập tại các địa phương của Việt Nam, được sơ chế bằng cách loại bỏ các phần không sử dụng được làm thực phẩm (đầu, da, nội tạng, xương, vò). Sau đó được tiến hành đông khô ở -50°C và nghiền mịn. Mẫu được bảo quản trong ống Falcon bằng polypropylen ở -20°C cho tới khi tiến hành phân tích. Hàm lượng nước trong mẫu được xác định bằng sự chênh lệch khối lượng trước và sau khi đông khô.

Mẫu gạo: Mẫu gạo được nghiền mịn, và tiến hành đông khô (mất nước) giống như trên và được bảo quản kín, ở -4 °C.

Mẫu huyết thanh: Mẫu máu sau khi lấy được thêm EDTA để tránh hiện tượng đông máu. Huyết thanh thu được bằng cách để máu đông tự nhiên trong khoảng thời gian từ 30 phút đến 1 giờ, ly tâm ở khoảng 3.000 vòng/phút trong 10 phút, phần dịch nổi (supernatant) phía trên là huyết thanh [35]

Mẫu Thuốc: Mẫu thuốc sau khi mua được bảo quản ở -18°C

2.3. Phương pháp nghiên cứu:

2.3.1. Phân tích tổng As và Se

Phân hủy mẫu bằng lò vi sóng

Trong mẫu cá, và thực phẩm arsen được liên kết chặt chẽ với các thành phần protein. Do đó trước khi định lượng, cần phá vỡ nền protein của mẫu để đưa về dạng vô cơ. Đây là phương pháp xử lý mẫu hiện đại làm giảm đáng kể thời gian xử lý mẫu, không làm mất mẫu phân tích và vô cơ hóa mẫu được triệt để, có thể vô cơ hóa cùng lúc nhiều mẫu. Sử dụng axit HNO₃ và tác nhân ôxi hóa H₂O₂. Đối với Se sử dụng axit HNO₃, H₂SO₄ và tác nhân ôxi hóa H₂O₂.

Các bước tiến hành khi phân hủy mẫu bằng lò vi sóng

Cân chính xác khoảng: 50,0 – 200,0 mg mẫu thực phẩm đã được đông khô hoặc sấy khô. Tùy hàm lượng As có trong mẫu chọn lượng cân cho phù hợp. Cho vào bình xử lý mẫu bằng Teflon dung tích 100ml trong lò vi sóng (phá mẫu lặt). Thêm vào bình 5ml HNO₃ đặc; 0,5ml H₂O₂ đặc). Tiến hành phá kèm mẫu trắng.

Tương tự đối với Selen cân chính xác khoảng: 50,00 mg mẫu thuốc đã được sấy khô. Tùy hàm lượng Se có trong mẫu chọn lượng cân cho phù hợp. Cho vào bình xử lý mẫu bằng Teflon dung tích 100ml trong lò vi sóng (phá mẫu lặt). Thêm vào bình 5ml HNO₃ đặc; 1ml H₂O₂ đặc và 0,5ml H₂SO₄ đặc). Tiến hành phá kèm mẫu trắng.

Để đánh giá quy trình phân tích, chúng tôi tiến hành phân tích 2 mẫu chuẩn đối chiếu nền cá là DORM-2 và 1 mẫu gạo BC-211.

2.3.2. Quy trình xử lý mẫu phân tích dạng As và Se

Mẫu Cá: Cân chính xác khoảng 50,00 mg mẫu thực phẩm (cá) chứa As cho vào ống facol 15ml. Dùng 10ml dung môi MeOH:H₂O theo tỉ lệ 50/50 về thể tích (chiết lặt 3 lần tương ứng 3;3;4 ml). Công suất chiết siêu âm 80%, thời gian chiết 2x3 phút, ly tâm 6000xg, thời gian ly tâm 5 phút. Dịch chiết được chuyển sang ống facol mới và được pha loãng 10 lần bằng nước deion và lọc qua màng lọc 0,45µm. Sau đó được bơm vào cột sắc ký, đo 5 dạng hợp chất As trên thiết bị ghép nối HPLC-ICP-MS.

Mẫu Gạo: Cân chính xác 1 gam mẫu gạo chứa As cho vào ống facol 15ml. Dùng 10ml HNO₃ 0.28M đem ủ ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 90 phút, ly tâm 13000xg, thời gian ly tâm 10 phút. Dịch chiết được chuyển sang ống facol mới và được lọc qua màng lọc 0,45µm. Sau đó được bơm vào cột sắc ký, đo 5 dạng hợp chất As trên

thiết bị ghép nối HPLC-ICP-MS.

Mẫu huyết thanh: Hút 0.4 mL huyết thanh cho vào ống nghiệm 2mL thêm 0.5 mL ACN và 0.1 mL H₂O đem vortex 2 phút ly tâm 10000xg, thời gian ly tâm 10 phút. Dịch chiết được lọc qua màng lọc 0,22µm. Sau đó được bơm vào cột sắc ký, đo 5 dạng hợp chất As trên thiết bị ghép nối HPLC-ICP-MS.

Mẫu thuốc và thực phẩm chức năng: Cân 50g mẫu pha loãng trong 5 mL PBS (pH=7.4) ủ trong tủ sấy 95°C trong thời gian 5 phút, lấy ra thêm 4 mL HCl 0.8M tiến hành ly tâm 10000xg, thời gian ly tâm 10 phút thu được dung dịch đồng nhất Sau đó được bơm vào cột sắc ký, đo 4 dạng hợp chất Se trên thiết bị ghép nối HPLC-ICP-MS.

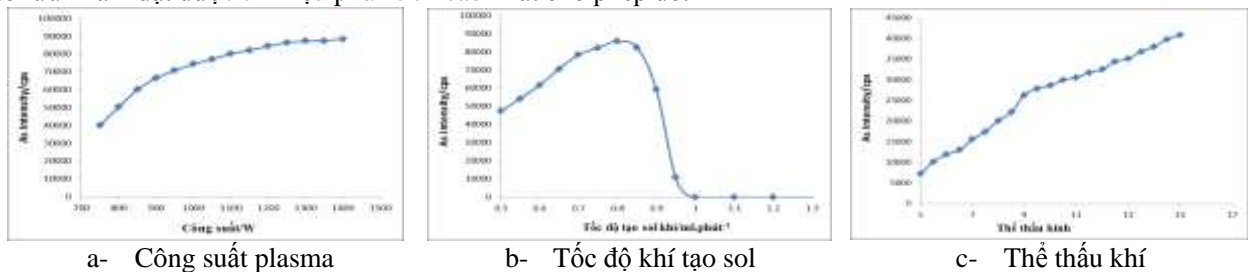
Các mẫu nước giếng khoan, nước mắm và nước tiểu: Tiến hành lọc qua màng 0.45 µm dung dịch đồng nhất Sau đó được bơm vào cột sắc ký, đo 4 dạng hợp chất As trên thiết bị ghép nối HPLC-ICP-MS.

Chương 3 – KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

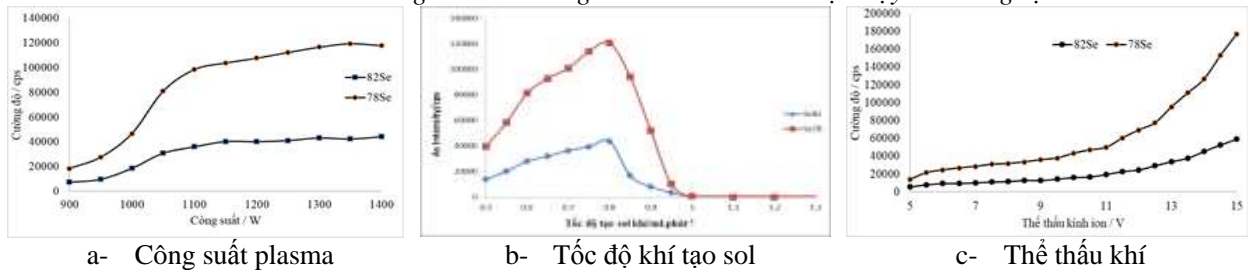
3.1. Tách và xác định các dạng As bằng phương pháp HPLC- ICP-MS

3.1.1. Tối ưu các điều kiện phân tích As và Se trên ICP-MS ELAN 9000

Trong nghiên cứu này, ICP-MS được sử dụng như một detector của hệ HPLC. Do đó, các điều kiện đo, xác định As và Se bằng ICP-MS được tối ưu hóa nhằm mục đích đạt được độ nhạy cao nhất và chọn lọc nhất cho phép đo nói riêng và phép phân tích nói chung. Trong nghiên cứu này các điều kiện làm việc của ICP-MS nói chung được chuẩn hóa bằng cách sử dụng dung dịch chuẩn máy của hãng đi kèm với thiết bị phân tích (Perkin Elmer ELAN9000). ICP-MS được chuẩn và kiểm tra độ nhạy trước khi phân tích. Dung dịch để kiểm tra độ nhạy của thiết bị gồm Be, Co, In và U với nồng độ 10 ppb (Perkin Elmer No N8125031). Bên cạnh đó, các điều kiện đo tối ưu cho nguyên tố cần phân tích, cụ thể trong nghiên cứu này là As và Se được khảo sát và tối ưu. Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng tới tín hiệu phân tích trong phép đo ICP-MS, một trong các điều kiện đo của ICP-MS, 3 thông số quan trọng là công suất nguồn cao tần cảm ứng plasma (RF power), tốc độ khí Ar tạo sol khí (nebulizer gas flow) và thế của thấu kính hội tụ ion (lens voltage). Do đó, ba thông số này được khảo sát, đánh giá và chọn giá trị tối ưu nhằm đạt được tín hiệu phân tích cao nhất cho phép đo.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của các thông số của ICP-MS tới độ nhạy của đồng vị As⁷⁵



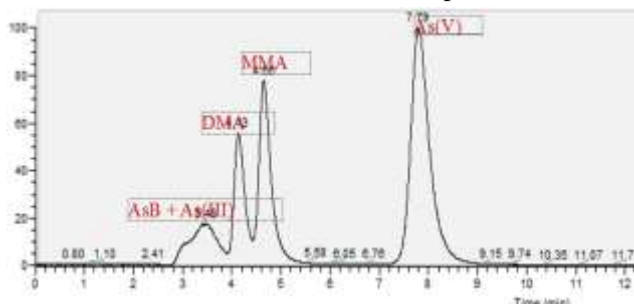
Hình 3.2. Ảnh hưởng của các thông số của ICP-MS tới độ nhạy của hai đồng vị ⁷⁸Se - ⁸²Se

3.2.2. Tối ưu các điều kiện phân tích dạng As trên thiết bị HPLC.

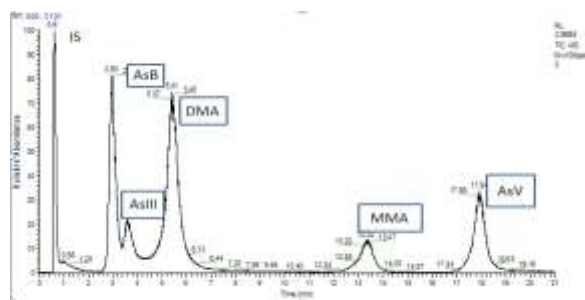
3.2.2.1. Khảo sát lựa chọn pha động

Để khảo sát ảnh hưởng của loại pha động đến khả năng tách các dạng arsen trên cột sắc ký Hamilton PRP-X 100, tiến hành phân tích hỗn hợp năm dạng arsen (AsB, As(III), MMA, DMA và As(V)) với nồng độ mỗi dạng arsen là 100µg/l. Tốc độ pha động 1,2ml/phút; thể tích bơm mẫu là 100 µl; 2% MeOH. Hai loại pha động được chọn để khảo sát là đệm phot phát KH₂PO₄ 20mM, pH 8 và đệm amoni cacbonat (NH₄)₂CO₃ 50mM, pH 9.

Kết quả trên hình 3.3 và 3.4 cho thấy tín hiệu peak khi sử dụng đệm amonicacbonat tốt hơn, đặc biệt là tín hiệu của As(III) và AsB. Hơn nữa, khi sử dụng đệm photphat trong một thời gian dài sẽ làm bề mặt cột của thiết bị ICP-MS bị rỗ, làm giảm tuổi thọ và tín hiệu đo của thiết bị này. Vì vậy chúng tôi chọn pha động là đệm amonicacbonat cho các lần khảo sát tiếp theo.



Hình 3.3. Sắc đồ của 5 dạng As ở nồng độ 100 ng/ml (pha động là đệm KH_2PO_4 20mM, pH 8; 2% MeOH; thể tích mẫu 100 μl ; tốc độ dòng 1,2ml/phút)

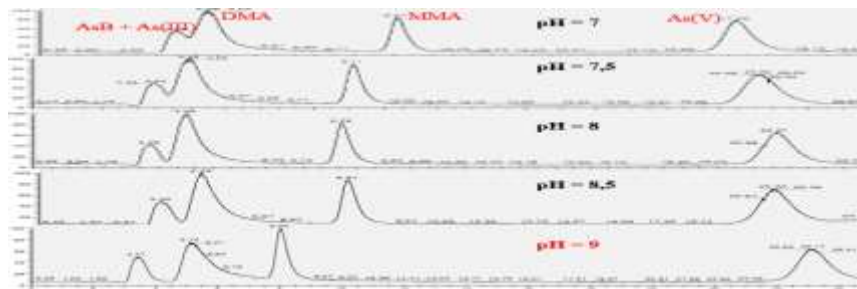


Hình 3.4. Sắc ký đồ tách 5 dạng As nồng độ 100 ng/ml (sử dụng hệ đệm $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ pH 9 làm pha động 2% MeOH; thể tích mẫu 100 μl ; tốc độ dòng 1,2ml/phút)

3.2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của pH.

Các dạng arsen có sự khác nhau lớn về hằng số axit K_a , As^{3+} có $\text{pK}_a = 9,2$; As^{5+} có $\text{pK}_a = 2,3; 6,8$ và $11,6$ trong khi đó MMA có $\text{pK}_a = 3,6$ và $8,2$; DMA có $\text{pK}_a = 1,3$ và $6,2$, chính vì vậy chúng có thể tách tốt bằng phương pháp trao đổi ion. Đây cũng chính là lí do khiến pH quyết định khả năng tách các dạng arsen trên cột sắc kí Hamilton PRP-X 100.

Tiến hành thí nghiệm với năm dạng arsen: AsB, As(III) MMA, DMA và As(v) ở nồng độ 50 $\mu\text{g/l}$ với điều kiện pha động gồm đệm $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50mM; 2% MeOH; thể tích bơm mẫu 500 μl ; tốc độ dòng 1,2 ml/phút và thay đổi pH lần lượt các giá trị từ 7,0 đến 9,0 với bước nhảy là 0,5. Kết quả thực nghiệm cho thấy khi sử dụng phương pháp đẳng dòng thì AsB và As^{3+} không tách được khỏi nhau. Ở các giá trị pH khác nhau thì thời gian lưu của 4 dạng As (AsB , As^{3+} , MMA, DMA) không thay đổi nhiều. Riêng thời gian lưu của As^{5+} tăng khi pH tăng. Tuy nhiên, ở pH 9 thì tín hiệu đo ổn định nhất, vì vậy chúng tôi chọn pH của pha động bằng 9 cho các lần khảo sát tiếp theo.

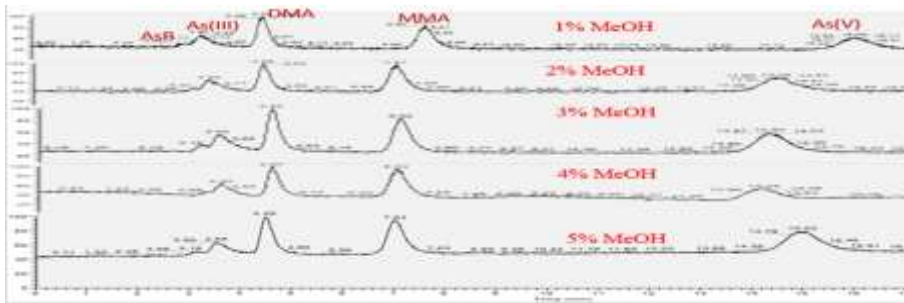


Hình 3.5. Sắc đồ của 5 dạng As ở nồng độ 50 $\mu\text{g/L}$, (pha động là đệm $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50mM; 2% MeOH; thể tích mẫu 100 μl ; tốc độ dòng 1,2 ml/phút)

3.2.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ EDTA, MEOH

Tiến hành sơ bộ cho thấy khi có EDTA trong pha động thì tín hiệu pic tách ra tốt hơn. Do đó trong nghiên cứu sự có mặt của EDTA là rất quan trọng khi nồng độ sắt và kim loại kiềm (canxi, magiê, vv) cao, đặc biệt là trong các mẫu môi trường và sinh học. Trong nghiên cứu này, EDTA 0,01% đã được thêm vào pha động và nồng độ được giữ liên tục cho các thí nghiệm tiếp theo. Ngoài ra các dung môi hữu cơ có khả năng làm tăng tín hiệu ICP-MS khi phân tích các nguyên tố có năng lượng ion hóa trong khoảng 9-11eV và để cải tiến độ nhạy do hiệu ứng carbon thì một tỉ lệ nhỏ methanol đã được thêm vào pha động trong suốt quá trình tối ưu hóa. Để khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ phần trăm methanol đến khả năng tách các dạng arsen trên cột sắc kí Hamilton PRP-X 100, chúng tôi tiến hành phân tích hỗn hợp năm dạng arsen (AsB , As(III) , MMA, DMA và As(V)) với nồng độ mỗi dạng arsen là 50 $\mu\text{g/l}$. Thành phần pha động sử dụng là hỗn hợp đệm 10mM và 50mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (EDTA 0,01%), pH 9,0; tốc độ pha động 1,2 mL/phút và thể tích bơm mẫu là 500 μl nhưng

chúng tôi thay đổi nồng độ của methanol trong pha động theo các tỉ lệ: 1%, 2%, 3%, 4%, 5% về thể tích. Kết quả thu được ở hình 3.6.

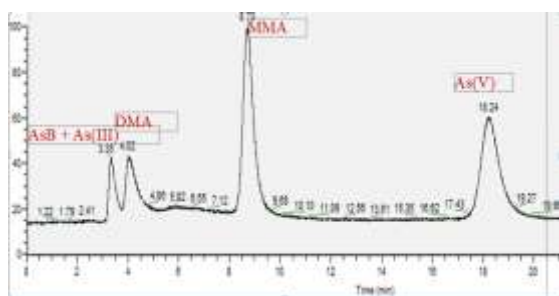


Hình 3.6. Sắc đồ của 5 dạng As ở nồng độ 50 µg/L (pha động là hỗn hợp đệm $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 10, 50mM (EDTA 0,01%); pH 9; thể tích mẫu 100µl; tốc độ dòng 1,2ml/phút)

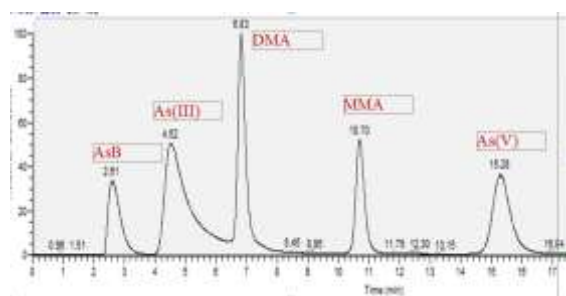
Ở cả 5 nồng độ khác nhau của MeOH, 5 dạng As đều được tách hoàn toàn, tín hiệu của As tăng lên khi tăng nồng độ MeOH nhưng đồng thời tín hiệu của đường nền cũng tăng lên. Tại nồng độ MeOH là 1%, 2%, 3% thì tín hiệu của đường nền thấp hơn ở 4% và 5%. Nhận thấy tại nồng độ 2% MeOH, đỉnh pic cao hơn, đối xứng và tín hiệu tách ổn định hơn. Vì vậy chúng tôi chọn nồng độ methanol 2% cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.2.4. Khảo sát lựa chọn chế độ đo đẳng dòng hoặc gradient pha động.

Để khảo sát ảnh hưởng của hai phương pháp rửa giải đến khả năng tách các dạng arsen trên cột sắc kí Hamilton PRP-X 100, chúng tôi tiến hành phân tích hỗn hợp năm dạng arsen AsB, As(III), MMA, DMA và As(V) với nồng độ mỗi dạng arsen là 50 µg/L. Tốc độ pha động 1,2 mL/phút; thể tích bơm mẫu là 100 µl; 2% MeOH. Đối với phương pháp đẳng dòng, chúng tôi sử dụng pha động là đệm amonicacbonat $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ở một nồng độ duy nhất là 50mM, pH 9. Còn đối với phương pháp gradient chúng tôi cũng tiếp tục sử dụng đệm $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ nhưng nồng độ ở 10mM và 50mM, pH 9. Gradient của pha động dùng để tách 5 dạng As được cài đặt như sau: nồng độ EDTA và MeOH được giữ cố định tương ứng là 0,05 % và 2% (v/v). Nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ được giữ cố định 10 mM trong 1 phút sau đó tăng tuyến tính tới 50 mM trong 14 phút. Sau đó giảm về 10 mM trong 0,1 phút và giữ tại điều kiện này trong 7 phút để cân bằng cột tách cho lần bơm mẫu tiếp theo. Sắc đồ tách các dạng As ở hai điều kiện nêu trên được đưa ra trong Hình 3.7 và Hình 3.8. tương ứng với chương trình rửa giải đẳng dung môi và chương trình rửa giải gradient dung môi.



Hình 3.7. Sắc đồ của 5 dạng As ở nồng độ 50 µg/L sử dụng phương pháp đẳng dòng pha động là đệm $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 50mM; EDTA 0,01%, pH=9; 2% MeOH; thể tích mẫu 500µl; tốc độ dòng 1,2ml/phút.



Hình 3.8. Sắc đồ của 5 dạng As ở nồng độ 50 µg/L sử dụng phương pháp gradient pha động là hỗn hợp đệm $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 50mM; EDTA 0,01%); pH=9; 2% MeOH; thể tích mẫu 500µl; tốc độ dòng 1,2 ml/phút.

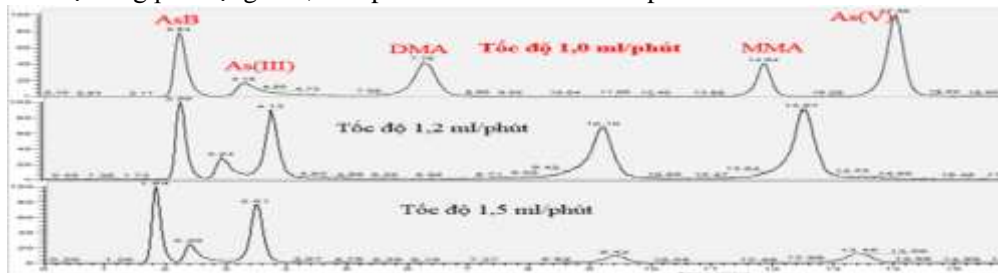
Kết quả cho thấy khi sử dụng phương pháp gradient, 5 dạng As được tách hoàn toàn. Còn khi sử dụng phương pháp đẳng dòng thì AsB và As(III) không tách được khỏi nhau. Vì vậy, chọn phương pháp gradient cho việc tách 5 dạng As trên hệ ghép nối HPLC-ICP-MS.

3.2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ dòng pha động

Tốc độ pha động ảnh hưởng rất nhiều đến khả năng tách của các dạng arsen. Khi tốc độ pha động cao đồng nghĩa với thời gian rửa giải các dạng arsen sẽ ngắn, nhưng nếu tốc độ pha động quá chậm sẽ ảnh hưởng

đến độ phân giải các pic làm giãn rộng vùng mẫu, giảm tín hiệu phân tích. Chính vì vậy một tốc độ pha động hợp lý sẽ cho kết quả tối ưu nhất.

Tiến hành phân tích hỗn hợp năm dạng asen (AsB, As(III), MMA, DMA và As(v)) với nồng độ mỗi dạng asen là 50 µg/l. Thành phần pha động là hỗn hợp đệm 10 mM và 50 mM (NH₄)₂CO₃ (EDTA 0,01%); pH 9,0; thể tích bơm mẫu là 100 µl và tiến hành khảo sát ở 3 tốc độ pha động là 1,0 ml/phút; 1,2 ml/phút và 1,5 ml/phút. Ở tốc độ 1,2 ml/phút 5 dạng As được tách hoàn toàn riêng lẻ, còn ở tốc độ 1,0ml/phút và 1,5ml/phút AsB, As(III) và DMA tách ra gần nhau. Ở tốc độ 1.5ml/phút tín hiệu peak của MMA và As(V) bị thấp, do vậy chúng tôi chọn tốc độ dòng pha động là 1,2 ml/phút cho các khảo sát tiếp theo.

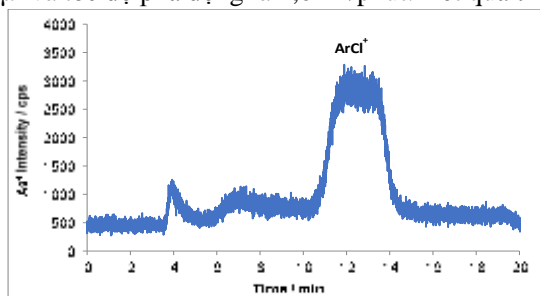


Hình 3.9. Sắc đồ của 5 dạng As ở nồng độ 50 µg/L (pha động hỗn hợp đệm (NH₄)₂CO₃, (EDTA); 2% MEOH pH=9; thể tích mẫu 100µl

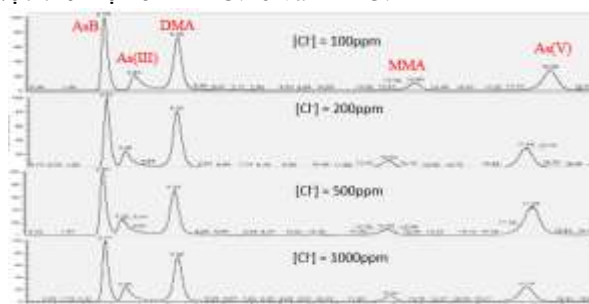
3.2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng ion Clo

Trong phép đo ICP – MS, ion clo có thể kết hợp với khí agon để hình thành ion ArCl⁺ có m/z = 75 trùng với số khối của asen và gây ảnh hưởng dương đến kết quả phân tích. Vì vậy, khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng Cl⁻ trong quá trình xác định asen bằng hệ thiết bị HPLC-ICP-MS là rất cần thiết.

Chuẩn bị các hỗn hợp chứa đồng thời năm dạng asen (AsB, As(III) MMA, DMA và As(V)) ở nồng độ 50µg/l với hàm lượng Cl⁻ được thêm vào ở các mức nồng độ 100mg/l; 200mg/l; 500mg/l và 1000mg/l. Thành phần pha động sử dụng là hỗn hợp đệm 10mM và 50mM (NH₄)₂CO₃ (EDTA); pH 9,0; thể tích bơm mẫu là 500 µl và tốc độ pha động là 1,0 ml/phút. Kết quả thu được thể hiện ở Hình 3.10 và hình 3.11



Hình 3.10. Sắc đồ của 100 µg mL⁻¹ clorua trên cột trao đổi anion mạnh Hamilton PRP X100



Hình 3.11. Sắc đồ của 5 dạng As ở nồng độ 50µg/L pha động là hỗn hợp đệm (NH₄)₂CO₃ 10mM, 50mM (EDTA); pH=9; 2% MeOH; thể tích mẫu 100µl; tốc độ dòng 1,0 ml/phút.

Kết quả chỉ ra rằng khi sử dụng hệ ghép nối HPLC-ICP/MS, ion Cl⁻ bị rửa giải ngay ở những giây đầu tiên trên cột, vì vậy không ảnh hưởng đến kết quả phân tích 5 dạng As. Tuy nhiên, khi hàm lượng ion Cl⁻ ở nồng độ cao hơn có thể sẽ là nguyên nhân gây quá tải cho cột và ảnh hưởng đến độ phân giải của pic cho từng dạng asen vì vậy chúng tôi chỉ khảo sát đến hàm lượng 1g/l. Như vậy nồng độ ion Cl⁻ đến 1000 mg/l không ảnh hưởng nhiều đến kết quả phân tích.

3.2.3. Đánh giá phương pháp phân tích dạng As trên hệ ghép nối HPLC-ICPMS

3.2.3.1. Khoảng tuyến tính và các đại lượng đặc trưng của phương pháp phân tích.

Các thông số quan trọng của phương pháp phân tích là khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại cần được đánh giá. Chuẩn bị năm dung dịch chuẩn có nồng độ tương ứng là: 5; 10; 20; 50; 100 ng/ml bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc trong nước cất. Các dung dịch chuẩn này được

bơm lặp lại 3 lần vào hệ HPLC-ICP-MS. Dung dịch nội chuẩn As(V) 50 ng/ml được bơm vào hệ thống HPLC-ICP-MS qua van bơm mẫu sau cột. Sắc đồ thu được, được chuyển đổi sử dụng phần mềm Xcalibur 2.0. Diện tích pic của 5 dạng As và của nội chuẩn được tính toán trên phần mềm Quanlitative và Quantitative tích hợp trong Xcalibua. Sự phụ thuộc diện tích pic của từng dạng As theo nồng độ thu được trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Diện tích pic của các dạng As

Diện tích Pic trung bình						
STT	Dạng	5 ng/ ml	10 ng/ ml	20 ng/ ml	50 ng/ ml	100 ng/ ml
1	AsB	141569	328163	803905	1667213	4380386
2	As (III)	32545	60972	172548	310677	591608
3	DMA	154826	335113	1249328	2938306	6413054
4	MMA	46875	98803	286640	691129	1487483
5	As (V)	84905	150450	541892	1098297	2887630

Bên cạnh đó khi sử dụng nội chuẩn thì tỷ số diện tích pic được tính bằng diện tích pic của chất phân tích chia cho diện tích pic nội chuẩn. Được trình bày trong Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Tỷ số diện tích của các dạng As so với nội chuẩn

Tỉ số diện tích pic trung bình						
STT	Dạng	5 ng/ ml	10 ng/ ml	20 ng/ ml	50 ng/ ml	100 ng/ ml
1	AsB	0,101	0,183	0,372	0,897	1,917
2	As (III)	0,021	0,044	0,080	0,187	0,359
3	DMA	0,122	0,251	0,579	1,582	3,188
4	MMA	0,033	0,067	0,133	0,372	0,739
5	As (V)	0,056	0,129	0,251	0,591	1,436

Tương quan tuyến tính giữa tỉ số diện tích pic (diện tích pic) phụ thuộc vào nồng độ các dạng As trong dung dịch được dùng để lập đường chuẩn.

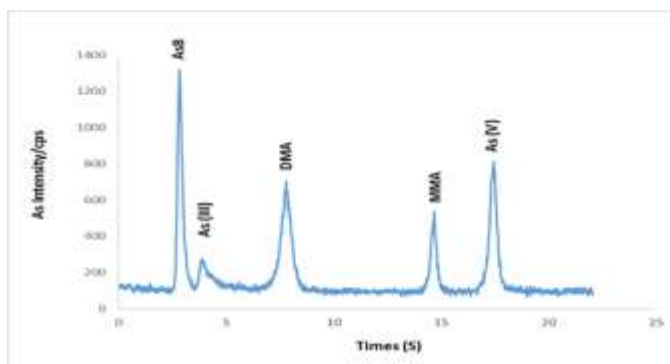
Bảng 3.5. So sánh phương trình hồi quy với hệ số tương quan

Dạng As	Phương trình hồi quy biểu diễn tương quan tín hiệu phân tích của 5 dạng As			
	Có sử dụng nội chuẩn		Không sử dụng nội chuẩn	
	Phương trình hồi quy	R ²	Phương trình hồi quy	R ²
AsB	Y = (0,0191 ± 0,0039)*X - (0,012±0,019)	0,9987	Y = (43783 ± 3066)* X - (155736 ± 156508)	0,9855
AS(III)	Y =(0,0035 ±0,00042)*X + (0,0075±0,0021)	0,9996	Y = (57749 ± 325)* X + (19998 ± 16591)	0,9906
DMA	Y = (0,0325 ± 0,0029) *X - (0,058±0,011)	0,9999	Y = (65854 ± 1742) *X - (218482 ± 88919)	0,9979
MMA	Y = (0,0075 ± 0,00082)*X - (0,0082±0,004)	0,9996	Y = (15155 ± 301)*X - (38535±15371)	0,9988
AS(V)	Y = (0,0143 ± 0,0074)* X - (0,0037±0,038)	0,9919	Y = (29160 ± 2021)* X - (126276 ±103193)	0,9858

Nhận thấy trong Bảng 3.5. Hệ số tương quan R² trong phương trình hồi quy có sử dụng nội chuẩn tốt hơn so với hệ số tương quan R² không sử dụng nội chuẩn. Do đó, cần thiết sử dụng nội chuẩn As (V) và nội chuẩn sẽ được sử dụng để định lượng các dạng arsen trong mẫu thực

TT	Chất phân tích	t_R phút	RSD	LOD ng/ml	LOQ ng/ml	Khoảng
						tuyến tính
1	AsB	2,75	2,7	0,85	2,80	3-100
2	As(III)	4,34	4,2	1,15	3,80	4-50
3	DMA	6,90	4,3	0,56	1,80	2-50
4	MMA	10,73	3,3	1,20	3,96	4-50
5	As(V)	16,30	3,0	1,12	3,80	4-50

Bảng 3.6. Các đại lượng đặc trưng của phép phân tích các dạng As bằng phương pháp HPLC-ICP-MS



Hình 3.12 Sắc đồ thời gian lưu của năm dạng As ở nồng độ 100 µg/L pha động là hỗn hợp đệm $(NH_4)_2CO_3$ 10, 50mM (EDTA 0,01%); pH 9; 2% MeOH; thể tích mẫu 100µl; tốc độ dòng 1,0 ml/phút

3.2.3.2. Độ lặp lại của phương pháp phân tích

Một thông số quan trọng khác của phương pháp phân tích là độ ổn định của phép đo. Nó quyết định độ lặp lại của kết quả phân tích. Để đánh giá độ ổn định của thời gian lưu và tín hiệu phân tích. Năm dung dịch chuẩn chứa đồng thời năm dạng As với nồng độ 50 ppb tính theo As được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc trong nước cất. Dung dịch chuẩn này được bơm vào hệ thống HPLC-ICP-MS có sử dụng bộ bơm mẫu sau cột ở điều kiện tối ưu như trình bày ở phần trên. Dung dịch chuẩn As(V) (Merck) nồng độ 50 ppb trong dung dịch HNO_3 2% được sử dụng làm nội chuẩn vào bơm vào hệ thống qua van bơm mẫu sau cột tách. Chuyển đổi dữ liệu và xử lý số liệu được tiến hành trên phần mềm Xcalibur version 2.0 của Thermo Scientific. Diện tích pic của các dạng As tương ứng và của nội chuẩn được lấy tích phân kể trên phần mềm Quanlitative tích hợp trong Xcalibur. Tỉ số diện tích pic được tính bằng cách lấy diện tích pic của các dạng arsen chia cho diện tích của pic nội chuẩn. Kết quả về diện tích pic và tỉ số diện tích pic được trình bày trong Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Độ lặp lại của tín hiệu phân tích có và không sử dụng nội chuẩn

Tỷ số diện tích pic (sử dụng nội chuẩn)						
Dạng	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	rsd (%)
AsB	0,897	0,883	0,872	0,897	0,838	2,7
As (III)	0,167	0,153	0,155	0,161	0,169	4,2
DMA	1,582	1,461	1,579	1,582	1,462	4,3
MMA	0,372	0,367	0,343	0,362	0,374	3,3
As (V)	0,591	0,582	0,555	0,591	0,554	3,0
Diện tích pic (counts) không sử dụng nội chuẩn						
Dạng	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Rsd (%)
AsB	1867213	1766412	1987456	1845763	1708945	5,7
As (III)	397398	412415	362516	394168	352563	6,5
DMA	2538306	2735475	2687546	2956751	2545623	6,3
MMA	2729129	2735475	2687546	2956751	2545623	5,4
As (V)	1398298	1606854	1432123	1424352	1324513	7,2

Có thể thấy trong Bảng 3.7, phương pháp sử dụng nội chuẩn cho kết quả lặp lại đồng thời cả 5 dạng As là rất tốt. Độ lệch chuẩn tương đối về tỉ số diện tích pic cho thấy khả năng lặp lại tốt về tín hiệu phân tích của các dạng As. Độ lệch chuẩn tương đối nằm trong khoảng từ 2,7 % (AsB) đến 4,3% (DMA). Trong khi đó nếu không sử dụng nội chuẩn thì độ lệch chuẩn tương đối nằm trong khoảng 5,4 đến 7,3. So sánh về độ lệch chuẩn tương đối giữa hai phương pháp có và không sử dụng nội chuẩn nhận thấy rằng nếu không sử dụng nội chuẩn thì RSD cao hơn khoảng 1,5-2,5 lần. Điều này được lý giải do sự không ổn định của nguồn plasma cao tần cảm ứng trong quá trình bơm mẫu vào hệ thống HPLC-ICP-MS. Đây cũng chính là một nhược điểm chính của detector ICP-MS

trong phân tích dạng tồn tại của chất. Tuy nhiên, điều này được khắc phục nếu sử dụng nội chuẩn thích hợp trong quá trình phân tích. Nội chuẩn sẽ bổ chính và bù trừ mọi thay đổi trong quá trình xử lý mẫu, đo tín hiệu phân tích. Thông thường để thực hiện được việc bổ chính và hiệu chỉnh này, các chất nội chuẩn đồng vị của chính chất cần phân tích được sử dụng (species-specific internal standard) thực hiện kỹ thuật phân tích pha loãng đồng vị khối phổ (ID-MS: isotopic dilution mass spectrometry). Nhưng để sử dụng phương pháp nội chuẩn này thì nguyên tố cần phân tích phải có ít nhất hai đồng vị bền. Trong thực tế, arsen chỉ có duy nhất một đồng vị bền. Do đó việc sử dụng kỹ thuật ID-MS là không khả thi. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chất nội chuẩn không đặc trưng chứa chính nguyên tố As trong phân tử (species-unspecific internal standard) được sử dụng kèm theo bộ bơm mẫu sau cột. Mặc dù việc sử dụng chất nội chuẩn không đặc trưng (trong nghiên cứu này là As(V)) chỉ có thể bổ chính và bù trừ ở giai đoạn cuối của qui trình phân tích (trong giai đoạn đo HPLC-ICP-MS) không bao gồm giai đoạn xử lý mẫu. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng việc sử dụng chất nội chuẩn cho độ lặp lại của tín hiệu phân tích cao hơn (Bảng 3.2). Do đó nội chuẩn không đặc trưng được khuyến cáo sử dụng trong phân tích HPLC-ICP-MS, đặc biệt là đối với các nguyên tố chỉ có duy nhất một đồng vị bền. Trong nghiên cứu này, As(V) kết hợp với van bơm mẫu sau cột được sử dụng là nội chuẩn cho phép định lượng các dạng arsen trong các đối tượng mẫu thực phẩm.

Qua các khảo sát đã tiến hành trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chọn điều kiện tối ưu để phân tích 5 dạng arsen AsB, As(III) MMA, DMA và As(V) trên hệ thống HPLC – ICPMS: Trên hệ thống HPLC chúng tôi lựa chọn cột tách Hamilton PRP-X100, L = 250 mm, d = 46 mm, dp= 10µm, nhiệt độ cột tách 25-27⁰C, thành phần pha động là (NH₄)₂CO₃ với nồng độ là 10 mM và 50 mM, pH 9,0, tốc độ dòng là 1,0 mL/ phút, rửa giải theo gradient, thể tích bơm mẫu là 100µL. Trên hệ thống ICPMS khí plasma 16 L/ phút, Khí phụ trợ 1,05 L / phút, Khí tạo sol 0,8 L/ phút, Công suất plasma 1250 W.

3.2.3.3. Hiệu suất thu hồi

Hiệu suất thu hồi của quá trình chiết các dạng As trong mẫu được đánh giá qua mẫu chuẩn nền cá là: (DORM-2), (DORM-3), (DORM-4) và (BCR-627). Mẫu chuẩn nền gạo ERM-BC211. Năm mẫu CRM này được tiến hành chiết và phân tích theo qui trình giống như quy trình chương 2. Hàm lượng dạng As trong mẫu CRM được phân tích bằng HPLC-ICP-MS.

Bảng 3.9. Hiệu suất thu hồi mẫu chuẩn nền cá DORM-2

Mẫu CRM	AsB (mg/Kg)		DMA (mg/Kg)	
	Phân tích được	Chứng chỉ	Phân tích được	Chứng chỉ
	15,5 ± 0,4	16,4 ± 1,1	0,27 ± 0,04	Nd
Hiệu suất thu hồi (%)	95 ± 7			
RSD (%)	5,09		14,81	

Bảng 3.10. Hiệu suất thu hồi mẫu chuẩn nền cá DORM-3

Mẫu CRM	AsB (mg/Kg)		DMA (mg/Kg)	
	Phân tích được	Chứng chỉ	Phân tích được	Chứng chỉ
	5,87±0,06	Nd	0,35±0,01	Nd
Hiệu suất thu hồi (%)	95 ± 7			
RSD (%)	10,22%		2,86%	

Bảng 3.11. Hiệu suất thu hồi mẫu chuẩn nền cá DORM-4

Mẫu CRM	AsB (mg/Kg)		DMA (mg/Kg)	
	Phân tích được	Chứng chỉ	Phân tích được	Chứng chỉ
	3,87 ± 0,16	3,9 5 ± 0,36	0,35±0,01	Nd
Hiệu suất thu hồi (%)	95 ± 7			
RSD (%)	10,22%		2,86%	

Bảng 3.12. Hiệu suất thu hồi mẫu chuẩn nền cá BCR 627

Mẫu CRM	AsB (µmol/Kg)		DMA (µmol/Kg)	
	Phân tích được	Chứng chỉ	Phân tích được	Chứng chỉ
	50 ± 6	52 ± 3	1,90 ± 0,03	2,0 ± 0,3
Hiệu suất thu hồi (%)	46 ± 12		75 ± 11	
RSD (%)	25%		2%	

Bảng 3.13. Hiệu suất thu hồi mẫu chuẩn nền gạo ERM-BC211

Mẫu CRM	DMA (mg/Kg)		As(III) + As(V) (mg/Kg)	
	Phân tích được	Chứng chỉ	Phân tích được	Chứng chỉ
	120 ± 7	119 ± 13	124 ± 6	124 ± 11
Hiệu suất thu hồi (%)	101 ± 12		100 ± 10	
RSD (%)	5,83		4,84	

Độ chính xác của phương pháp được thể hiện ở Bảng 3.9 - Bảng 3.13. Có thể thấy AsB là dạng hợp chất của As chiếm chủ yếu trong mẫu CRM như (DORM-2), (DORM-3) và (DORM-4) tính theo As. Ngoại trừ (BCR-627) tất cả các giá trị thu được đều thấp hơn giá trị được chứng nhận (có lẽ do điều kiện bảo quản mẫu độ ẩm cao). Độ chính xác của các dạng Asen được tìm thấy trong các mẫu chuẩn chứng nhận (DORM-2), (DORM-3) và (DORM-4) cao hơn 90% đối với các dạng asen khác. Duy nhất mẫu DORM3 dạng DMA không có trong chứng nhận, tuy nhiên trong nghiên cứu này 2 dạng AsB và DMA đã được tìm thấy với $5,87 \pm 0,06$ (mg/kg) và $0,35 \pm 0,01$ (mg/kg) tương ứng. Đối với mẫu chuẩn ERM-BC211 nồng độ DMA chứng nhận là (119 ± 13) $\mu\text{mol/kg}$, kết quả thực nghiệm là (120 ± 7) $\mu\text{mol/kg}$. Với độ tin cậy thống kê là 95% - 101%. Kết quả 2 giá trị đo được so với chứng chỉ không khác nhau. Điều này có thể kết luận là phương pháp HPLC-ICP-MS chính xác và đáng tin cậy để phân tích các dạng hợp chất của As trong mẫu cá, gạo nói riêng và mẫu thực phẩm nói chung

3.3. Tối ưu các điều kiện phân tích dạng Se trên thiết bị HPLC

3.3.1 Lựa chọn cột sắc kí

Cột sắc ký có vai trò quan trọng trong việc tách các chất phân tích ra khỏi nhau, nó được ví như trái tim của hệ thống sắc ký. Qua một số bài báo và tài liệu có liên quan, chúng tôi chọn pha tĩnh của quá trình tách là cột sắc ký trao đổi anion PRP-X100 (10 μm ; 2,1x250mm). Bản chất cột PRP-X100 là cột trao đổi anion. Các dạng của Se sau khi bơm vào van sẽ đi vào cột tách, tại đây dựa vào điều kiện của pH và thành phần pha động mà các dạng của Se sẽ tồn tại dưới dạng anion, cation hay dưới dạng các phân tử trung hòa. Vì pH tối ưu được chọn là pH 8, nên tại pH này các dạng Se đều tồn tại dưới dạng anion (dựa theo giá trị pK_a), do đó chúng sẽ trao đổi với các anion trên cột sắc ký. Sau khi bơm pha động chảy qua cột, tùy thuộc vào ái lực của các dạng Se với cột và pha động mà chúng sẽ được rửa giải với thời gian khác nhau, chính vì vậy các dạng Se sẽ được tách khỏi nhau.

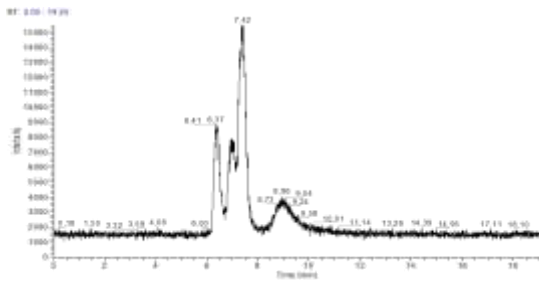
3.3.2. Tối ưu thành phần pha động và pH

Sau pha tĩnh thì pha động là yếu tố thứ hai quyết định đến hiệu quả tách sắc ký. Nhìn chung, pha động với nồng độ và pH của nó có thể ảnh hưởng đến: độ chọn lọc của hệ pha, thời gian lưu trữ của chất tan, hiệu lực của cột tách (đại lượng N_{eff}), độ phân giải của chất trong cột pha tĩnh, độ rộng pic sắc ký.

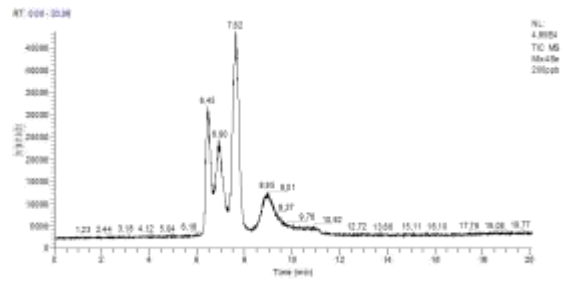
Tiến hành khảo sát phân tích dạng Se trên hệ thống HPLC-ICP-MS trong các điều kiện pha động như sau:

1. Pha động $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 5,0 gồm 2 kênh A= 10mM và B= 100mM
2. Pha động $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 9,0 gồm 2 kênh A= 10mM và B= 100mM
3. Pha động $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5,2 gồm 2 kênh A= 25mM và B= 250mM
4. Pha động gồm $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 8,0 gồm 2 kênh A= 25mM và B= 250mM
5. Pha động Metanol : $\text{CH}_3\text{COONH}_4= 2 : 98$ (v/v) và EDTA 0,01%, pH 8,0 gồm 3 kênh A=MeOH, B= 25mM và C= 250mM ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$).

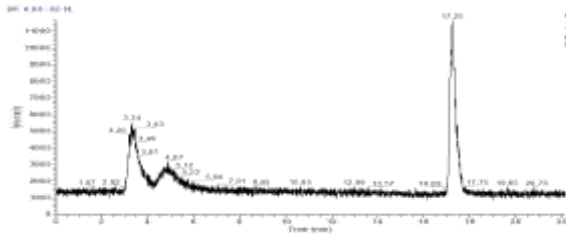
Kết quả phân tích thu được như sau: Dựa vào sắc đồ hình 3.13. ta thấy, pha động với sự thêm vào 2% (theo thể tích) của MeOH là tối ưu hơn cho sự tách các dạng Se. Trong thành phần pha động, với sự có mặt của MeOH sẽ giúp cho dung dịch đậm hòa tan tốt chất cần khảo sát. Ngoài ra, để làm giảm sự tạo hợp chất liên hợp của Se với một số kim loại khác (Fe, Mn, Zn, Ca, ...) có mặt trong thành phần thuốc, ta thêm vào pha động EDTA 0,01% (w/v).



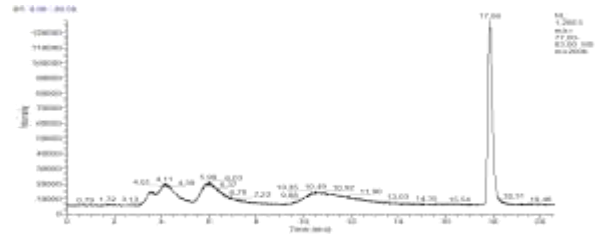
Sắc đồ chuẩn 4 dạng Selen ở nồng độ 300ppb, pha động $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, gồm 2 kênh A= 25mM và B= 250mM



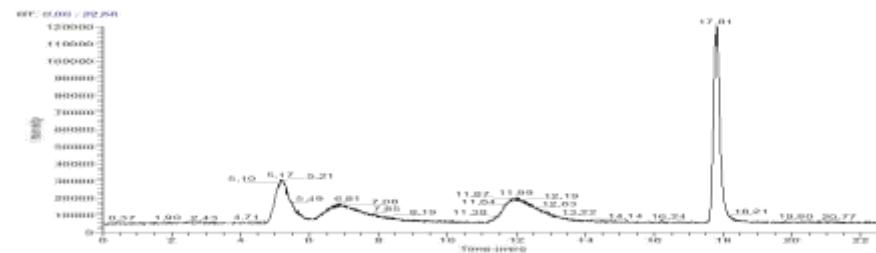
Sắc đồ chuẩn 4 dạng Selen ở nồng độ 200ppb, pha động $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, gồm 2 kênh A= 25mM và B= 250mM



Sắc đồ chuẩn 4 dạng Selen ở nồng độ 300ppb, pha động $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, gồm 2 kênh A= 25mM và B= 250mM



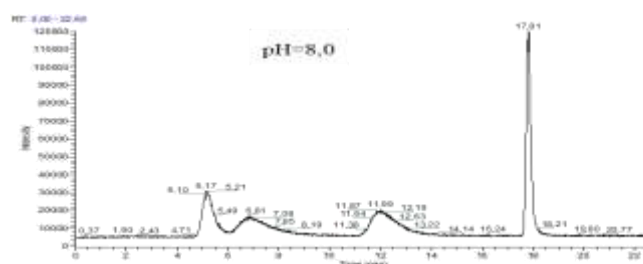
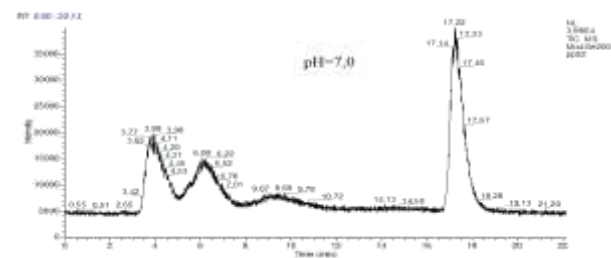
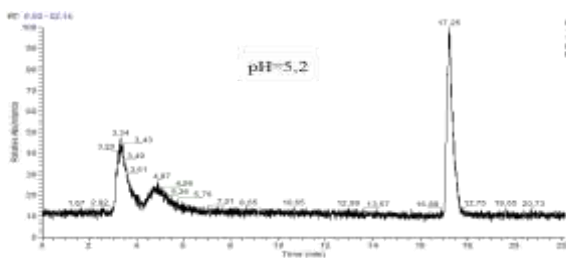
Sắc đồ chuẩn 4 dạng Selen ở nồng độ 200ppb, pha động $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, gồm 2 kênh A= 25mM và B= 250mM



Hình 3.13 Sắc đồ 4 dạng Se Se pha động $\text{MeOH} : \text{CH}_3\text{COONH}_4 = 2 : 98$ (v/v) và EDTA 0,01%, gồm 3 kênh A=MeOH, B= 25mM và C= 250mM ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)

pH của dung dịch đệm:

Chúng tôi tiến hành phân tích với bốn dạng Se là Se (VI), Se (IV), SeMeCys và SeMet với điều kiện pha động gồm $\text{MeOH} : \text{CH}_3\text{COONH}_4 = 2 : 98$ (v/v), sau đó thay đổi pH lần lượt ở các giá trị là pH 5,2, pH 7,0 và pH 8,0. Sắc đồ trình bày trong hình 3.14.

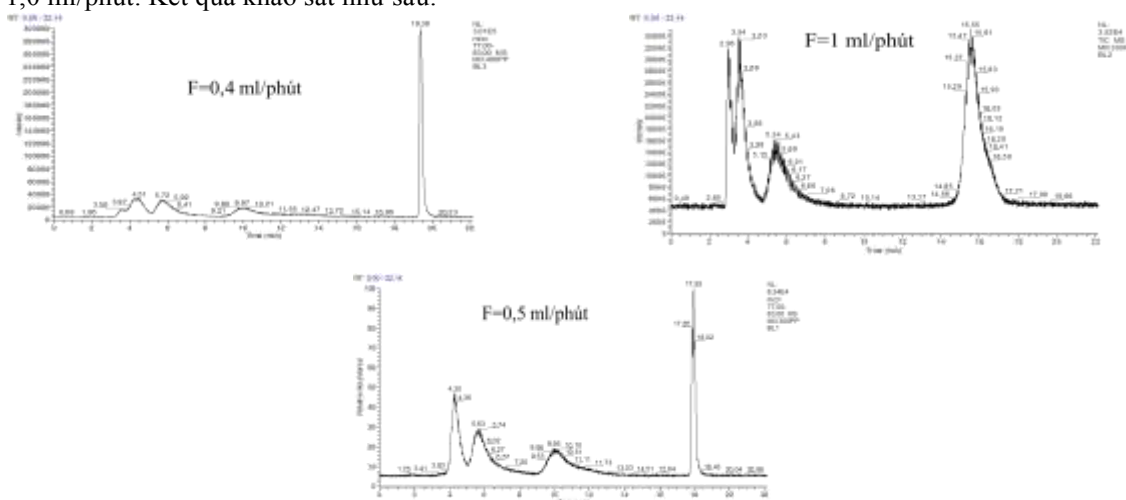


Hình 3.14. Ảnh hưởng của pH đến sự tách sắc ký của 4 dạng Se

Từ các kết quả trên hình 3.14, ta thấy ở các giá trị pH 5,2 và pH 7,0 các dạng Se không được tách ra khỏi nhau hoặc sắc đồ lên thiếu dạng Se, ở pH 8,0 các dạng Se được tách tốt, vì vậy chúng tôi chọn pH 8,0 là giá trị pH tối ưu. Điều này có thể hiểu là đã có sự chuyển dạng Se ở pH 5,2 và pH 7,0 dẫn tới tín hiệu phân tích không đạt yêu cầu tách 4 dạng Se ra khỏi nhau một cách rõ rệt.

3.3.3. Ảnh hưởng tốc độ pha động và chương trình gradient rửa giải pha động

Tốc độ pha động cũng góp phần ảnh hưởng đến hiệu quả tách sắc kí vì nó liên quan đến quá trình thiết lập cân bằng của chất tan trong hai pha tĩnh và pha động. Khi tốc độ pha động nhỏ, chất phân tích ra muộn, gây doãng pic, giảm độ nhạy và tổn dung môi. Khi tốc độ pha động quá lớn có thể làm cho chất phân tích chưa tách ra khỏi nhau đã bị đẩy ra khỏi cột dẫn đến hiện tượng chồng pic. Để lựa chọn được tốc độ pha động tối ưu, chúng tôi tiến hành khảo sát dung dịch chuẩn Mix Se 4 dạng, pha động với các thành phần Metanol : $\text{CH}_3\text{COONH}_4 = 2 : 98$ (v/v) và EDTA 0,01%, pH 8,0 gồm 3 kênh A=MeOH, B= 25mM và C= 250mM ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) ở các tốc độ khác nhau từ 0,4 – 1,0 ml/phút. Kết quả khảo sát như sau:



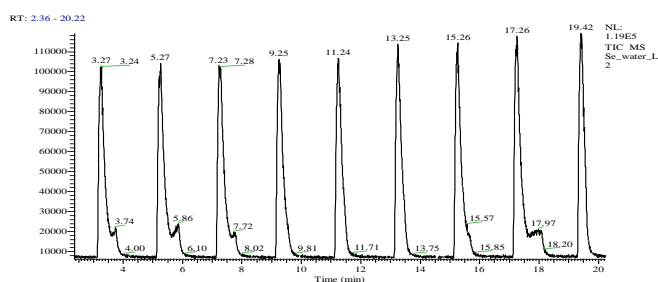
Hình 3.15. Ảnh hưởng của tốc độ dòng đến sự tách sắc ký của 4 dạng Se

Qua các sắc đồ trên Hình 3.15, ta thấy tại tốc độ dòng là 0,5 ml/phút thì các peak sắc ký tách nhau tốt nhất, do đó ta chọn 0,5 ml/phút là tốc độ dòng tối ưu cho quá trình tách các dạng Se. Chương trình dung môi (rửa giải gradient) cho các dạng Se có tính chất hóa lý rất giống nhau, nên ái lực của chúng với pha tĩnh sẽ có sự khác nhau rất nhỏ. Chính vì vậy muốn tách các dạng Se ra khỏi nhau cần thực hiện sự rửa giải theo chương trình gradient nồng độ

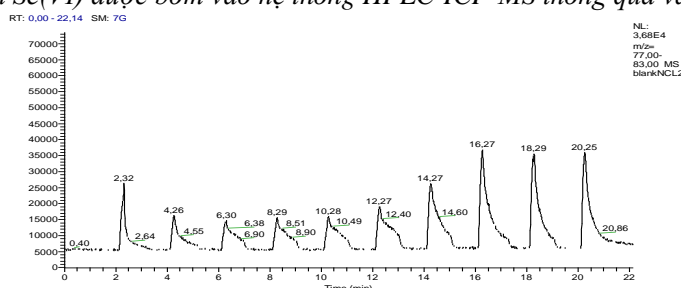
Qua các khảo sát đã tiến hành trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chọn điều kiện tối ưu để phân tích 4 dạng Se (VI), Se (IV), Se-DLMet và SeMeCys trên hệ thống HPLC – ICPMS. Trên hệ thống HPLC chúng tôi lựa chọn cột tách Hamilton PRP-X100, L = 250 mm, d = 46 mm, dp= 10 μ m, nhiệt độ cột tách 25-27 $^{\circ}$ C, thành phần pha động là $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ với nồng độ là 25 mM và 250 mM, 0,1%EDTA, pH 8,0, tốc độ dòng là 0,5 mL/ phút, rửa giải theo gradient, thể tích bơm mẫu là 100 μ L. Trên hệ thống ICPMS khí plasma 16 L/ phút, Khí phụ trợ 1,05 L / phút, Khí tạo sol 0,8 L/ phút, Công suất plasma 1250 W.

3.3.4. Ảnh hưởng của thành phần pha động tới tín hiệu phân tích dạng Se

Để nghiên cứu ảnh hưởng của cacbon đến tín hiệu phân tích của Se. Bộ van bơm mẫu sau cột được sử dụng. Nồng độ Se (VI) 200 μ g/l trong HNO_3 2% làm dung dịch nội chuẩn. Chi tiết về thực nghiệm trình bày trong chương 2. Dung dịch Se (VI) này được bơm vào hệ thống HPLC-ICP-MS qua bộ bơm mẫu sau cột với dòng chất mang là chương trình dung môi pha động. Để đánh giá sự ảnh hưởng của thành phần pha động và chương trình dung môi của nó, một thí nghiệm hoàn toàn tương tự được tiến hành trong dòng chất mang sử dụng nước deion thay thế cho pha động. Tín hiệu của Se phụ thuộc vào chương trình dung môi của pha động và trong nước deion được trình bày trong Hình 3.31 và Hình 3.32 tương ứng.



Hình 3.31. Tín hiệu Se sử dụng chất mang là nước de-ion; 2% MeOH; thể tích mẫu 100 μ l; tốc độ pha động 0,5 ml/phút, dung dịch Se(VI) được bơm vào hệ thống HPLC-ICP-MS thông qua van bơm mẫu sau cột



Hình 3.32. Tín hiệu của Se sử dụng chất mang là gradient pha động sử dụng dung dịch đệm $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 25 và 250mM; pH 8,0; 2% MeOH tương tự như trong HPLC-ICP-MS; thể tích mẫu 100 μ l; tốc độ pha động 0,5 ml/phút, dung dịch Se(VI) được bơm vào hệ thống HPLC-ICP-MS thông qua van bơm mẫu sau cột

Như trên hình 3.32, tín hiệu phân tích (chiều cao, hoặc diện tích pic) của Se phụ thuộc vào gradient của pha động. Cụ thể là phụ thuộc vào nồng độ của $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ trong pha động. Khi nồng độ của $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ trong pha động thấp 25mM thì tín hiệu thu được cao. Khi nồng độ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pha động tăng lên thì tín hiệu giảm. Khi $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ đạt 250mM thì tín hiệu giảm mạnh, đạt cực trị. Điều này được lý giải là khi nồng độ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tăng lên thì lượng cacbon đi vào plasma tăng gây cản trở quá trình ion hóa. Bên cạnh đó nồng độ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tăng thì hiệu quả của quá trình tạo sol khí giảm, do tính chất vật lý của pha động thay đổi (độ nhớt, tỷ trọng, sức căng bề mặt, ...). Cường độ tín hiệu của Se trong nước deion lớn hơn khoảng 4 lần so với sử dụng đệm amoni acetat. Điều này được giải thích là do chất phân tích bị kém ion hoá trong plasma với dòng chất mang là pha động. Nghiên cứu chi tiết về ảnh hưởng của hàm lượng cacbon tới tín hiệu của Se đã được đưa ra trong công trình của W. Goessler [52] và Frank Vanhaecke [65].

3.3.5. Các đại lượng đặc trưng của phân tích dạng Se

3.3.5.1. Khoảng tuyến tính và các đại lượng đặc trưng của phương pháp phân tích

Xây dựng đường chuẩn: Mẫu phân tích là 1 số mẫu thuốc và nấm men đang lưu hành trên thị trường với hàm lượng nhỏ, do đó xây dựng đường chuẩn ở khoảng nồng độ thấp từ 25ppb-500ppb. Đường chuẩn được xây dựng dựa trên hai phương pháp thêm chuẩn và nội chuẩn để so sánh. Dung dịch nội chuẩn Se (VI) 100 ng/ml được bơm vào hệ thống HPLC-ICP-MS qua van bơm mẫu sau cột. Sắc đồ thu được, được chuyển đổi sử dụng phần mềm Xcalibux 2.1. Diện tích pic của 4 dạng Se và của nội chuẩn được tính toán trên phần mềm Quan browser và Qual browser tích hợp trong Xcalibux. Tỷ số diện tích pic được tính bằng diện tích pic của chất phân tích chia cho diện tích pic nội chuẩn. Tỷ số diện tích pic trung bình được trình bày trong Bảng 3.14 và 3.15. Tương quan tuyến tính giữa tỉ số diện tích pic (diện tích pic) phụ thuộc vào nồng độ các dạng Se trong dung dịch được dùng để lập đường chuẩn.

Bảng 3.15. Tỷ số diện tích của các dạng Se so với nội chuẩn

STT	Dạng	Tỉ số diện tích pic						
		25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	200 ng/ml	300 ng/ml	400 ng/ml	500 ng/ml
1	SeMeCys	0,376	0,584	1,108	2,213	3,143	4,150	5,126

2	Se (IV)	0,862	1,683	3,159	6,381	8,782	11,288	13,703
3	Se-DLMet	1,580	3,016	4,855	13,347	18,761	24,918	31,659
4	Se (VI)	2,255	3,621	7,327	17,231	24,642	27,611	-

Diện tích pic trung bình (counts)

STT	Dạng	25	50	100	200	300	400	500
		ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
1	SeMeCys	11474	18469	41309	88837	194617	272163	469080
2	Se (IV)	26300	53244	113714	256162	543807	740336	1253990
3	Se-DLMet	48218	95410	188990	420727	944462	1634232	2897158
4	Se (VI)	68822	114521	263786	543159	1240533	1810851	-

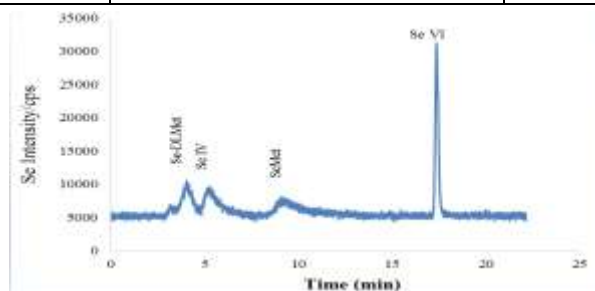
Như chỉ ra trong bảng 3.16, hệ số tương quan R^2 trong phương trình hồi quy có sử dụng nội chuẩn tốt hơn so với không sử dụng nội chuẩn. Do đó, nội chuẩn sẽ được sử dụng để định lượng các dạng selen trong mẫu thực. Dựa vào kết quả của phương trình hồi quy tuyến tính của SeMeCys, Se (IV), Se-DLMet và Se (VI) ta thấy các phương trình đều có hệ số tương quan $R^2 > 0.995$. Như vậy khi xác định được diện tích pic của một dạng Se thì ta sẽ tính ra được nồng độ của nó với độ chính xác lớn hơn 99,5%. Đồ thị biểu diễn sự tương quan tín hiệu phân tích vào nồng độ các dạng Se trong mẫu được đưa ra trong Bảng 3.16.

Bảng 3.16. So sánh phương trình hồi quy với hệ số tương quan

TT	Dạng selen	Phương trình hồi quy biểu diễn tương quan tín hiệu phân tích của 4 dạng Se phụ thuộc vào nồng độ			
		Có sử dụng nội chuẩn		Không sử dụng nội chuẩn	
		Phương trình hồi quy	R^2	Phương trình hồi quy	R^2
1	SeMeCys	$Y=(0,010\pm 9,6.10^{-5})*X+(0,120\pm 0,0269)$	0,9995	$Y=(594\pm 17)*X-(9125\pm 4896)$	0,9957
2	Se (IV)	$Y=(0,027\pm 5,4.10^{-4})*X+(0,420\pm 0,151)$	0,9980	$Y=(1570\pm 75)*X-(48734,4\pm 21147)$	0,9887
3	Se-DLMet	$Y=(0,063\pm 8,98.10^{-4})*X-(0,027\pm 0,252)$	0,9990	$Y=(4304\pm 218)*X-(173297,8\pm 61534)$	0,9872
4	Se (VI)	$Y=(0,067\pm 11,25.10^{-4})*X+(0,392\pm 0,253)$	0,9989	$Y=(4432\pm 197)*X-(117123\pm 55511)$	0,9902

STT	Dạng As	t_R phút	RSD	LOD ng/ml	LOQ ng/ml	Khoảng tuyến tính ng/ml
1	SeMeCys	7,8	5,56	18,75	62,5	50-500
2	Se (IV)	12,80	1,88	75,0	250,0	100-500
3	Se-DLMet	14,51	0,72	15,0	50,0	25-500
4	Se (VI)	18,43	0,26	3,3	10,9	5-400

Bảng 3.17. Các đại lượng đặc trưng của phép phân tích các dạng Se bằng phương pháp HPLC-ICP-MS



Hình 3.16. Kết quả sắc đồ 4 dạng Se đo được khi tối ưu các điều kiện trên hệ thống HPLC-ICP-MS

3.3.5.2. Đánh giá độ lặp lại của thiết bị

Một thông số quan trọng khác của phương pháp phân tích là độ ổn định của phép đo. Nó thể hiện qua độ lặp lại của kết quả phân tích. Để đánh giá độ ổn định của thời gian lưu và tín hiệu phân tích. Năm dung dịch chuẩn chứa đồng thời bốn dạng Se nồng độ 100 ppb tính theo Se được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc trong nước cất. Dung dịch chuẩn này được bơm vào hệ thống HPLC-ICP-MS có sử dụng bộ bơm mẫu sau cột ở điều kiện tối ưu như trình bày ở phần trên. Dung dịch chuẩn Se (VI) (Merck) nồng độ 100 $\mu\text{g/L}$ trong dung dịch HNO_3 2% được sử dụng làm nội chuẩn và bơm vào hệ thống qua van bơm mẫu sau cột tách. Số liệu được xử lý trên phần mềm Xcalibur version 2.1 của Thermo Scientific. Diện tích pic của các dạng Se tương ứng và của nội chuẩn được lấy tích phân kể trên phần mềm Quan Browser tích hợp trong Xcalibur. Tỷ số diện tích pic được tính

bằng cách lấy diện tích pic của các dạng selen chia cho diện tích của pic nội chuẩn. Kết quả về diện tích pic và tỉ số diện tích pic được trình bày trong Bảng 3.18.

Bảng 3.18. Độ lặp lại của tín hiệu phân tích khi có và không sử dụng nội chuẩn

Diện tích pic (không sử dụng nội chuẩn)						
Dạng	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	RSD(%)
SeMeCys	41243	41309	46828	50499	43215	8,95
Se (IV)	113714	117853	142727	147473	121647	11,92
Se-DLMet	188990	160239	212308	197201	187234	10,03
Se (VI)	263786	275504	290605	301274	269076	5,55
Tỷ số diện tích pic (sử dụng nội chuẩn)						
Dạng	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	RSD(%)
SeMeCys	1,146	1,105	1,059	1,108	1,100	2,80
Se (IV)	3,159	3,151	3,229	3,236	3,097	1,83
Se-DLMet	4,855	4,285	4,803	4,327	4,766	6,02
Se (VI)	7,327	7,367	6,575	6,611	6,850	5,49

Như có thể thấy trong Bảng 3.18, phương pháp sử dụng nội chuẩn có độ lặp lại tốt cho đồng thời cả 4 dạng tồn tại của Se. Độ lệch chuẩn tương đối về tỉ số diện tích pic cho thấy khả năng lặp lại tốt về tín hiệu phân tích của các dạng Se. Độ lệch chuẩn tương đối nằm trong khoảng từ 1,83 % (Se IV) đến 6,02% (Se-DLMet). Trong khi đó nếu không sử dụng nội chuẩn thì độ lệch chuẩn tương đối nằm trong khoảng 5,55 đến 11,92%. So sánh về độ lệch chuẩn tương đối giữa hai phương pháp có và không sử dụng nội chuẩn nhận thấy rằng nếu không sử dụng nội chuẩn thì %RSD cao hơn rất nhiều (cao hơn khoảng 1-5 lần). Điều này được lý giải do sự không ổn định của nguồn plasma cao tần cảm ứng trong quá trình bơm mẫu vào hệ thống HPLC-ICP-MS. Đây cũng là một nhược điểm chính của detector ICP-MS trong phân tích dạng tồn tại của chất. Tuy nhiên, điều này được khắc phục nếu sử dụng nội chuẩn thích hợp trong quá trình phân tích. Nội chuẩn sẽ bổ chính và bù trừ mọi thay đổi trong quá trình xử lý mẫu, đo tín hiệu phân tích. Thông thường để thực hiện được việc bổ chính và hiệu chỉnh này, các chất nội chuẩn đồng vị của chính chất cần phân tích được sử dụng (species-specific internal standard) thực hiện kỹ thuật phân tích pha loãng đồng vị khối phổ (ID-MS). Nhưng để sử dụng phương pháp nội chuẩn này thì nguyên tố cần phân tích phải có ít nhất hai đồng vị bền. Trong thực tế, selen chỉ có duy nhất một đồng vị bền. Do đó việc sử dụng kỹ thuật ID-MS là không khả thi. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chất nội chuẩn không đặc trưng chứa chính nguyên tố Se trong phân tử (species-unspecific internal standard) được sử dụng kèm theo bộ bơm mẫu sau cột. Mặc dù việc sử dụng chất nội chuẩn không đặc trưng (trong nghiên cứu này là Se (VI)) chỉ có thể bổ chính và bù trừ ở giai đoạn cuối của qui trình phân tích (trong giai đoạn đo HPLC-ICP-MS) không bao gồm giai đoạn xử lý mẫu. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng việc sử dụng chất nội chuẩn cho độ lặp lại của tín hiệu phân tích cao hơn (Bảng 3.18). Do đó nội chuẩn không đặc trưng được khuyến cáo sử dụng trong phân tích HPLC-ICP-MS, đặc biệt là đối với các nguyên tố chỉ có duy nhất một đồng vị bền. Trong nghiên cứu này, Se (VI) kết hợp với van bom mẫu sau cột được sử dụng là nội chuẩn cho phép định lượng các dạng selen trong các đối tượng mẫu thực phẩm.

3.3.5.3. Độ thu hồi

Hiệu suất thu hồi (H%) của phương pháp được xác định bằng cách thêm một lượng chuẩn đã biết vào nền mẫu thật không chứa chất phân tích. Chọn một mẫu thuốc bất kỳ có dạng tương tự mẫu phân tích (mẫu trắng), với điều kiện là không chứa Se (xác thực bằng việc đo tổng hàm lượng với ICP-MS). Sau đó thêm vào chuẩn Mix Se 4 dạng 100ppb, rồi đi chiết với các điều kiện như đối với mẫu thực. Dem dung dịch chiết đi đo dạng trên hệ thống HPLC-ICP-MS, đo lặp lại 5 lần với nội chuẩn Se (VI) 100ppb. Kết quả thu được trong Bảng 3.19.

Kết quả thu được trên bảng 21 cho thấy sự tách các dạng Se có độ lặp lại tốt và có độ thu hồi nằm trong khoảng 73,5% đến 101,7%. Kết quả này nằm trong khoảng 70% - 120% và là kết quả hoàn toàn chấp nhận

được. Có thể thấy hiệu suất thu hồi của hai dạng Se-DLMet và Se (IV) khá thấp, điều này được giải thích do sự chuyển dạng Se (IV) và Se-DLMet trong thời gian bảo quản dung dịch thêm chuẩn của chúng tôi. Để tìm hiểu kỹ hơn vấn đề này, sẽ phải có những nghiên cứu kỹ hơn để đánh giá mà ở nghiên cứu này do điều kiện thí nghiệm chưa làm được điều đó.

Bảng 3.19. Độ thu hồi của 4 dạng selen

Dạng Se	Thêm chuẩn	Nồng độ trung bình (ppb)	Độ thu hồi (H %)
SeMeCys	100ppb	113,3	113,3
Se (IV)	100ppb	104,7	104,7
Se-DLMet	100ppb	91,5	91,5
Se (VI)	100ppb	93,9	93,9

3.4. Ứng dụng phương pháp phân tích mẫu thực

3.4.1 Kết quả nồng độ các dạng As trong mẫu thực

3.4.1.1 Kết quả các dạng As trong mẫu nước và mẫu gạo

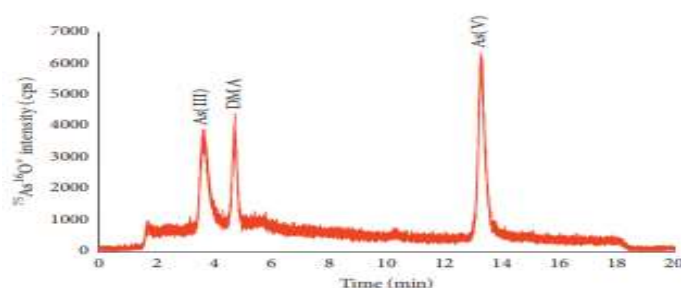
Tiến hành phân tích 20 mẫu nước giếng khoan và 5 mẫu gạo được lấy từ xã Nhật Tân Huyện kim Bảng Tỉnh Hà Nam được thể hiện qua Bảng 3.20 và Bảng 3.21 như sau:

Bảng 3.20. Nồng độ các dạng As trong nước giếng khoan

Mẫu Nước	Hàm lượng các dạng As $\mu\text{g/L}$					Tổng Hàm lượng As $\mu\text{g/L}$
	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	
Nồng độ	< LOD	32 - 670	< LOD	< LOD	< LOD	38-855
Trung Bình	< LOD	425	< LOD	< LOD	< LOD	510
N = 20						

Bảng 3.21. Nồng độ các dạng As trong mẫu gạo

Mẫu gạo	Hàm lượng các dạng As (mg/kg khô)					Tổng Hàm lượng As (mg/kg khô)
	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	
R1	< LOD	84.55 \pm 12.07	21.02 \pm 2.37	< LOD	29.07 \pm 0.76	283.90 \pm 22.23
R2	< LOD	86.69 \pm 12.38	10.88 \pm 1.23	< LOD	43.53 \pm 1.14	176.50 \pm 13.82
R3	< LOD	57.19 \pm 8.16	8.22 \pm 0.93	< LOD	16.70 \pm 0.44	124.60 \pm 9.76
R4	< LOD	64.51 \pm 9.21	21.27 \pm 2.40	< LOD	0.98 \pm 0.03	152.20 \pm 11.92
R5	< LOD	78.20 \pm 11.16	10.92 \pm 1.23	< LOD	1.02 \pm 0.03	150.70 \pm 11.80



Hình 3.17. Sắc đồ HPLC-ICP-MS của mẫu gạo

Từ Bảng 3.20 một dạng As duy nhất được phát hiện và có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của As(III). Tỷ lệ chất này trong mẫu nằm trong khoảng 78-84% so với tổng lượng As. Như vậy có thể thấy nguồn nước đã bị ô nhiễm asen, bên cạnh đó ba dạng asen như là As(III), DMA và As(V) đã được phát hiện trong tất cả các mẫu gạo như Bảng 3.21, điều này có thể lý giải các mẫu gạo trên đã được trồng tại nơi có nguồn nước bị ô nhiễm asen.

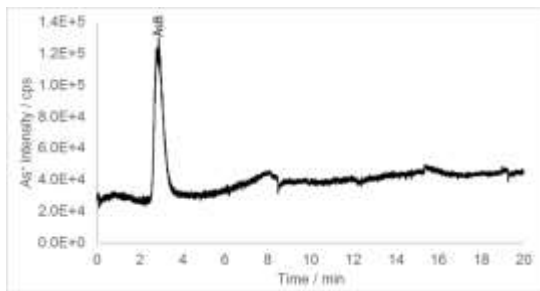
3.4.1.2 Kết quả các dạng As trong mẫu cá và nước mắm

Kết quả sau khi phân tích 5 mẫu cá và 5 mẫu nước mắm được thể hiện qua Bảng 3.22 và Bảng 3.23 như sau. Từ Bảng 3.22, và Hình 3.18 (sắc đồ mẫu cá) ta có thể kết luận As trong mẫu cá tồn tại chủ yếu dưới dạng AsB một dạng không độc và nó có hầu hết trong các loài động vật biển bên cạnh đó từ Bảng 3.23 và Hình 3.19 một dạng hữu cơ duy nhất là AsB cũng được tìm thấy trong các mẫu nước mắm. Điều này chứng tỏ cá là nguyên

liệu dùng để sản xuất nước mắm do vậy hàm lượng AsB từ cá có trong nước mắm là điều hiển nhiên và dạng này không bị chuyển dạng trong quá trình lên men sản xuất nước mắm. Tổng nồng độ As trong 5 loại mẫu nước mắm được xác định bằng phương pháp ICPMS và hàm lượng các dạng arsen trong nước mắm được xác định bằng HPLC_ICPMS kết quả cho thấy hàm lượng các dạng arsen sau khi tách sắc ký thấp hơn so với tổng hàm lượng arsen trong các mẫu nước mắm sau khi phân tích trên ICPMS. Điều này có thể lý giải khi phân tích hàm lượng arsen tổng số trong mẫu nước mắm bằng ICPMS tăng do rất có thể nền muối trong mẫu nước mắm rất lớn dẫn đến hiện tượng trùng khối.

Bảng 3.22. Nồng độ các dạng As trong mẫu cá

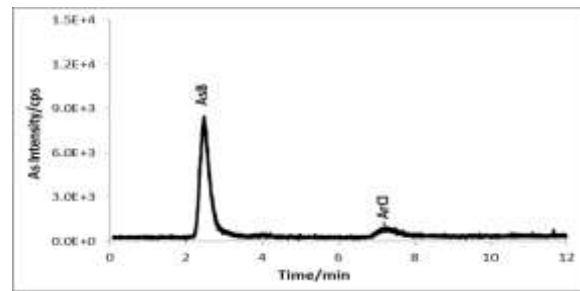
Mẫu Cá	Hàm lượng các dạng As (mg /kg khô)					Tổng Hàm lượng As (mg /kg khô)
	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	
CCF07-1.1	83,7 ± 5,0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	230,2 ± 14,0
CCF18-1.1	108,9 ± 7,6	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	211,1 ± 15,0
CCF19-1.1	602,3 ± 42,2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1182,7 ± 83
QTF9-1.1	73,5 ± 5,9	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	129,6 ± 10,0
QTF6- 1.1	71,5 ± 5,9	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	124,6 ± 10,0



Hình 3.18. Sắc đồ HPLC-ICP-MS của mẫu cá

Bảng 3.23. Nồng độ các dạng As trong mẫu nước mắm

Mẫu nước mắm	Hàm lượng các dạng As ng/mL					Tổng Hàm lượng As ng/mL
	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)	
Cao đạm	3133	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3667
Ông sư	4723	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	5297
Nam ngư	1258	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1348
Phục hưng	6222	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	6452
Cốc cá	1685	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2164



Hình 3.19. Sắc đồ HPLC-ICP-MS của mẫu nước mắm PL 100 lần

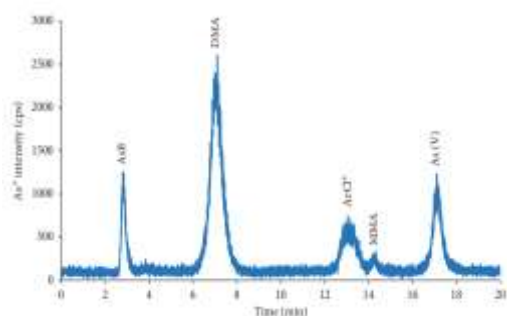
3.4.1.3 Kết quả các dạng As trong mẫu Huyết thanh và nước tiểu

Tiến hành phân tích 17 mẫu nước tiểu và 17 mẫu huyết thanh được lấy tại xã Nhật Tân Huyện kim Bảng Tỉnh Hà Nam nồng độ các dạng As trong mẫu huyết thanh và nước tiểu được thể hiện qua Bảng 3.24.

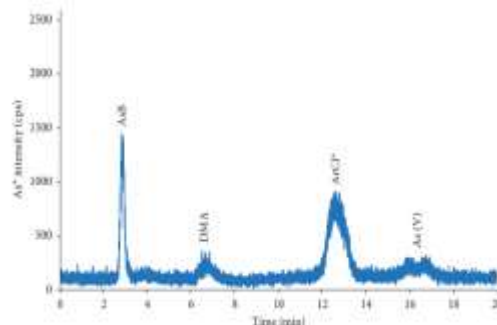
Bảng 3.24. Nồng độ các dạng As trong mẫu Huyết thanh và nước tiểu

Mẫu	Nồng độ các dạng Asen					
	AsB	As(III)	DMA(III)	MMA	As(V)	Total As
Huyết thanh						
Male (n=7)	6.93 (1.63-19.8)	7.31 (1.5-22.0)	6.01 (0.35-11.23)	0.46 (0.4-0.8)	0.27 (0.27-0.27)	20.5 (6.4 - 26.5)
Female (n=10)	6.64 (1.09-17.7)	7.20 (1.5-21.6)	10.0 (0.35-39.6)	1.46 (0.4-0.98)	0.80 (0.27-5.54)	24.9 (13.7 - 40.5)
Nước tiểu						
Male (n=7)	2.26 (0.36-4.28)	1.50 (1.50-1.50)	2.16 (0.47-3.80)	0.97 (0.15-1.52)	0.56 (0.09-1.3)	60.6 (22.7 - 99.6)
Female (n= 10)	1.85 (0.25-5.20)	1.50 (1.50 - 1.50)	1.77 (0.43-3.66)	0.91 (0.36-1.35)	0.34 (0.27- 0.83)	46.0 (9.60 - 106)

Từ Bảng 3.24, Hình 3.20 và Hình 3.21 tất cả các dạng As được tìm thấy trong mẫu huyết thanh và nước tiểu. Tuy nhiên các dạng arsen chính trong mẫu nước tiểu là AsB và DMA, trong khi đó các dạng AsB DMA và As(V) là những dạng có nhiều nhất trong các mẫu huyết thanh. Mặt khác, tổng nồng độ các hợp chất arsen vô cơ trong cả huyết thanh và nước tiểu được tính bằng tổng arsenite và arsenate. nồng độ của các hợp chất arsen vô cơ dao động từ 1,84 đến 8,0 ng·mL⁻¹. Điều này chứng tỏ rằng các nguồn tiếp xúc arsen chính với con người chủ yếu đến từ nước và gạo



Hình 3.20. Sắc đồ HPLC-ICP-MS của mẫu huyết thanh

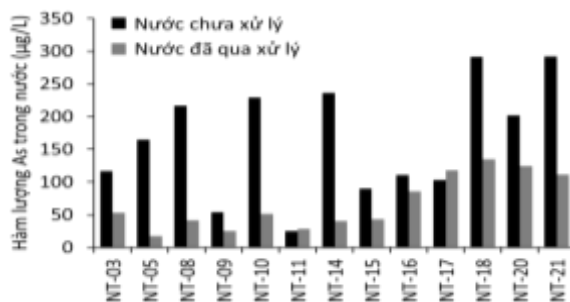


Hình 3.21. Sắc đồ HPLC-ICP-MS của mẫu nước tiểu

3.4.1.4 đánh giá mức độ phơi nhiễm của các dạng As trong một khu vực dân cư sử dụng nước ngầm nhiễm As tại Hà Nam

- Hàm lượng tổng As trong nước ngầm

Nồng độ trung bình của tổng As trong nước giếng khoan là 164 µg/L, dao động trong khoảng 25,2-292 µg/L. Như vậy hầu hết các giếng khoan tại khu vực khảo sát đều có hàm lượng tổng As cao hơn tiêu chuẩn của WHO (10µg/L). Hình 3.40 biểu diễn hàm lượng As trong nước giếng khoan chưa xử lý và nước đã qua xử lý bằng hệ thống lọc cát đơn giản của các gia đình.

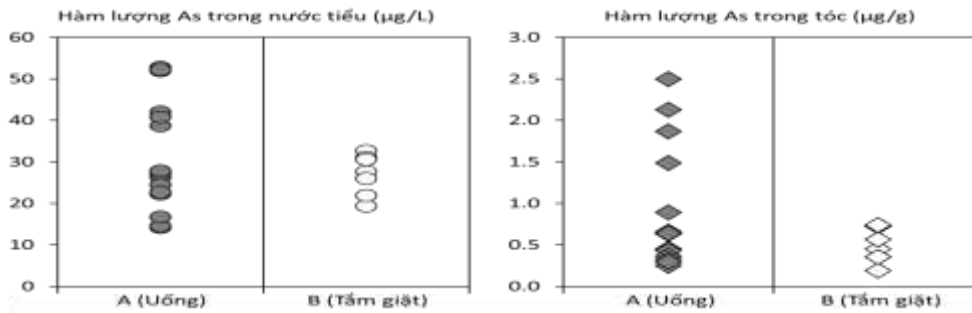


Hình 3.40: Hàm lượng As trong nước giếng khoan chưa xử lý và nước đã qua xử lý bằng hệ thống lọc cát đơn giản của các gia đình

Nồng độ của As sau khi qua hệ thống lọc có giảm từ 2-4 lần, tuy nhiên hầu hết vẫn cao hơn giá trị quy định của WHO và Việt nam. Qua khảo sát phỏng vấn các hộ gia đình, hệ thống lọc cát không được thay thế nâng cấp thường xuyên nên đây có thể là lý do nồng độ As vẫn cao trong nước đã qua xử lý. Các nghiên cứu trước cho thấy có sự giảm đáng kể hàm lượng As khi qua hệ thống lọc, tuy vậy tỷ lệ các mẫu vượt giá trị tiêu chuẩn vẫn cao, chiếm hơn 70 % [98]. Mặt khác, tỷ lệ giữa nồng độ Fe/As đóng vai trò quan trọng trong việc giảm hàm lượng As, do cơ chế đồng kết tủa của Fe và As. Tỷ lệ nồng độ Fe/As trong nước giếng chưa xử lý và đã qua hệ lọc cát lần lượt là 24,4 và 5,3 mg/mg. Nghiên cứu của [100] tại các khu vực đồng bằng sông Hồng cho thấy tỷ lệ Fe/As là > 50 và >250 nếu muốn giảm nồng độ của As xuống dưới giá trị 50 hoặc 10 µg/L. Theo nghiên cứu của [100], tỷ lệ Fe/As cần thiết để giảm hàm lượng As dưới 50 µg/L là trên 40 mg/mg. Tỷ lệ Fe/As thấp trong nghiên cứu này có thể là lý do làm hàm lượng As vẫn cao sau khi qua hệ thống lọc

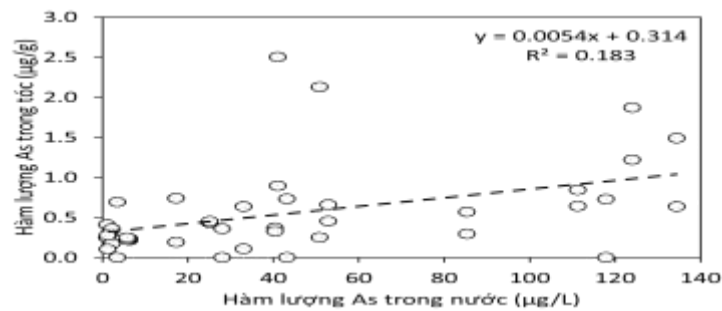
- Hàm lượng tổng As trong tóc và nước tiểu

Mẫu tóc thường được sử dụng để đánh giá sự phơi nhiễm lâu dài còn mẫu nước tiểu thích hợp cho việc đánh giá phơi nhiễm tức thời. Trong nghiên cứu này, hàm lượng As trong các mẫu tóc nằm trong khoảng từ 0,19-2,49 µg/g. Hàm lượng trong tóc và nước tiểu của nhóm người dân sử dụng nước giếng nhiễm As để uống cao hơn so với nhóm người sử dụng nước chủ yếu để tắm giặt (Hình 3.41)



Hình 3.41: Hàm lượng tổng As trong tóc và nước tiểu của 2 nhóm dân cư sd nước ngầm. A: uống; B: tắm giặt

Mặt khác, chúng tôi nhận thấy có mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa hàm lượng As trong tóc và trong nước ngầm (Hình 3.42)

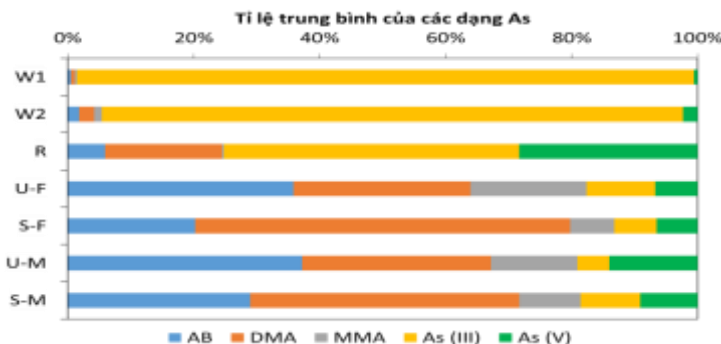


Hình 3.42: Mối tương quan giữa hàm lượng As trong nước ngầm và tóc của dân cư tại Nhật Tân, Hà Nam

Kết quả này cho thấy sự phơi nhiễm As lâu dài của người dân và nguyên nhân chính là do sử dụng nước ngầm bị nhiễm As. Đáng lưu ý có một số mẫu tóc hàm lượng lớn hơn 1 µg/g, là giá trị nồng độ có liên quan đến bệnh về da do phơi nhiễm. Kết quả của nghiên cứu này tương tự như các khảo sát trước đây tại các khu vực đồng bằng sông Hồng trong đó có tỉnh Hà nam, cho thấy có mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa hàm lượng As trong nước ngầm và trong mẫu tóc của người dân sử dụng nguồn nước nhiễm As. Nồng độ As trong mẫu tóc tại Nhật tân tương đương hoặc cao hơn so với các nghiên cứu trước đây tại Hà nam, nhưng nhỏ hơn so với các khu vực nhiễm As nặng ở tỉnh Kandal, Campuchia. Hàm lượng As trong nước tiểu tại Nhật tân dao động trong khoảng 15,9 - 269 µg/g creatinin (trung bình: 82 µg/g creatinin)..

- Hàm lượng và thành phần của các dạng As

Tỷ lệ trung bình của các dạng As trong các loại mẫu nước giếng, gạo, nước tiểu và huyết thanh của các gia đình tại một xã thuộc tỉnh Hà nam được trình bày trong Hình 3.43. Trong mẫu nước, các dạng As vô cơ chiếm phần lớn, chủ yếu là As (III).



Hình 3.43. Thành phần của các dạng As trong mẫu nước, gạo, nước tiểu và huyết thanh của một nhóm các gia đình sử dụng nước ngầm nhiễm As tại tỉnh Hà nam. W1: nước giếng chưa lọc; W2: nước giếng đã qua hệ lọc cát; R: mẫu gạo; U-F: mẫu nước tiểu nữ; S-F: mẫu huyết thanh nữ; U-M: mẫu nước tiểu nam; S-M; mẫu huyết thanh nam.

Trong mẫu gạo, As vô cơ chiếm trên 75 %; còn DMA chiếm một tỷ lệ tương đối lớn trong các dạng hữu cơ. As(III) chiếm phần lớn so với As (V) trong mẫu gạo tại khu vực nghiên cứu. Kết quả này có thể giải thích do điều kiện khử của tầng nước ngầm tại các khu vực thuộc đồng bằng sông Hồng [100]. Một số nghiên cứu trước trên thế giới cũng đã chỉ ra nguyên nhân của thành phần As (III) do môi trường có tính khử của ruộng lúa quyết định. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu trước kia tại các khu vực ô nhiễm As ở khu vực đồng bằng sông Hồng, miền Bắc Việt nam.

Hai dạng As hữu cơ DMA và MMA đều xuất hiện trong mẫu nước tiểu và mẫu máu và điều này có thể giải thích được là do sự tích lũy của As thông qua con đường sử dụng nước và gạo có chứa chủ yếu là As vô cơ (cả trong mẫu gạo và trong mẫu nước) và DMA (trong mẫu gạo). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu trước đây của Stefanos N. Kales và đồng nghiệp. Trong khi đó hàm lượng của AsB cao trong một số mẫu nước tiểu có thể do nguyên nhân ăn hải sản và các thức ăn có nguồn gốc từ hải sản trước khi lấy mẫu phân tích. As vô cơ hấp thụ bởi cơ thể sẽ được chuyển hóa (methyl hóa) thành dạng MMA và sau đó là dạng DMA; và các dạng này cuối cùng sẽ được thải ra nước tiểu. Do vậy việc phân tích các dạng As sẽ giúp việc đánh giá sự tích lũy và chuyển hóa của chúng trong cơ thể người. Tỷ lệ nồng độ DMA/MMA được so sánh giữa 2 nhóm nam và nữ. Trong mẫu nước tiểu, tỷ lệ này ở nhóm nam giới lớn hơn so với nữ giới (Bảng 3.28).

Bảng 3.28. Giá trị tỷ lệ DMA/MMA trong mẫu nước tiểu và huyết thanh tại xã Nhật tân, tỉnh Hà Nam

Loại mẫu	Giá trị trung vị (khoảng nồng độ)	Giá trị trung bình ± SD
Nước tiểu, nam giới	2.21 (0.89 – 13.00)	4.49 ± 3.95
Nước tiểu, nữ giới	1.42 (0.37 – 6.94)	2.11 ± 1.66
Huyết thanh, nam giới	1.70 (0.19 – 16.04)	4.35 ± 5.42
Huyết thanh, nữ giới	8.00 (0.47 – 18.92)	8.48 ± 6.36

Trong mẫu huyết thanh, nồng độ MMA dưới giới hạn phát hiện trong hầu hết các mẫu. Nồng độ DMA trong mẫu huyết thanh lại cho kết quả ngược với mẫu nước tiểu, với hàm lượng lớn hơn ở nhóm nữ giới. Nghiên cứu trước đây của [101] cho thấy hàm lượng MMA và DMA trong nhóm nữ giới lớn hơn nhóm nam giới. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy không có sự sai khác về mặt thống kê giữa nồng độ tổng As vô cơ và hữu cơ trong 2 nhóm nam và nữ. Tỷ lệ DMA/MMA ở nam lớn hơn ở nữ chứng tỏ trong nhóm dân cư nghiên cứu, khả năng methyl hóa thứ cấp của nhóm nam lớn hơn nhóm nữ. Tuy vậy đây chỉ là nghiên cứu bước đầu. Cần có những khảo sát với quy mô và số lượng mẫu lớn hơn để đánh giá chính xác về khả năng tích lũy và chuyển hóa của các dạng As trong cơ thể người dân sống tại khu vực có nguồn nước ngầm bị nhiễm As.

3.4.2 Kết quả nồng độ các dạng Se trong mẫu thực

Tiến hành phân tích dạng Se có trong các mẫu thực kết quả được thể hiện ở Bảng 3.25.

Bảng 3.25. Kết quả tổng hợp các dạng selen có trong mẫu thuốc, TPCN và nấm men

STT	Dạng Se	Nấm men (µg/g)	Sezlan (µg/g)	Colaf (µg/g)	Centrum (µg/g)	TPCN (µg/g)
1	SeMeCys	nd	nd	nd	35,36	nd
2	Se (IV)	108,32	nd	nd	nd	nd
3	Se-DLMet	nd	nd	nd	nd	8,72
4	Se (VI)	nd	nd	nd	nd	8,05
Tổng*		108,32	-	-	35,36	16,77
Hàm lượng đo tổng		231,66	5,73	2,27	35,76	20,16

Trong mẫu nấm men tồn tại dạng Se-DLMet với hàm lượng khá lớn. Trong mẫu thuốc Selazn, có hai dạng Se được phát hiện nhưng không có trong 4 dạng Se đã khảo sát. Trong mẫu thuốc Colaf cũng xác nhận sự có mặt của 1 dạng Selen không thuộc 4 dạng Se trong nghiên cứu này. Trong mẫu thuốc Centrum có dạng Se (VI) với pic sắc ký rõ ràng và hàm lượng tương đối lớn. Trong mẫu thực phẩm chức năng đã xác định và định lượng được hai dạng Se là Se-DLMet và Se (VI). Có thể nói SeMeCys là một dạng của Se có tác dụng chống lão hóa và ngăn ngừa một số bệnh về tim mạch... Cũng chính vì lý do đó, trong các thuốc nghiên cứu hầu như đều chứa SeMeCys. Trong thuốc, Se chiếm một lượng rất nhỏ (trong khoảng từ 16,77 $\mu\text{g/g}$ đến 35,36 $\mu\text{g/g}$), còn trong nấm men thì hàm lượng Se cao hơn (~110 $\mu\text{g/g}$). Mặc dù chỉ chiếm hàm lượng nhỏ, nhưng sự có mặt của Se trong thành phần thuốc cũng góp ích cho sự chống lão hóa tế bào và phòng chống các căn bệnh nguy hiểm dựa trên các đặc tính chống oxy hóa và chống ung thư được cho là của các chất này ức chế các quá trình tế bào cụ thể trong sự phát triển của bệnh ung thư, cho rằng cả Se và vitamin E đều có khả năng ngăn ngừa ung thư tuyến tiền liệt (Klein, Lippman và cộng sự 2003). Vì vậy, con người nên bổ sung lượng Se cần thiết cho cơ thể thông qua việc sử dụng thuốc hoặc vitamin có chứa Se, hoặc thông qua ăn uống dinh dưỡng hàng ngày. So với Se vô cơ, Se hữu cơ được cho là an toàn hơn và khả dụng sinh học hơn khi bổ sung chế độ ăn uống hơn Se vô cơ (Abdulah, Miyazaki et al. 2005). Ngày nay, nguồn Se trong chế độ ăn uống của con người là các loại hạt, ngũ cốc, thịt, trứng và các sản phẩm từ sữa. Một nguồn Se hấp dẫn khác là men selen hóa do chi phí thấp và hàm lượng cao của SeMet (Rampler 2009). Các loài Se khác nhau có những đóng góp khác nhau cho việc ngăn ngừa ung thư

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thành công trong việc tách 5 dạng Asen bao gồm AsB, As (III), DMA, MMA và As (V) và bước đầu nghiên cứu phân tích 4 dạng Selen bao gồm SeMeCys, Se (IV), Se-DLMet, Se (VI) trong mẫu nước, gạo, nước mắm, cá, huyết thanh, nước tiểu, thuốc và thực phẩm chức năng bằng hệ ghép nối HPLC- ICPMS. Kết quả thu được như sau:

1. Đã phát triển phương pháp phân tích HPLC-ICP-MS dùng cho phân tích 5 dạng asen trên. Các thông số đặc trưng của phương pháp phân tích như LOD, LOQ, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, đã được nghiên cứu và đánh giá.
2. Độ lặp lại và độ chính xác của phương pháp phân tích HPLC-ICP-MS đã được cải thiện đáng kể khi sử dụng nội chuẩn thông qua bộ van bơm mẫu sau cột. Độ lặp lại của tín hiệu phân tích tăng lên ít nhất là 1-2 lần.
3. Đã nghiên cứu một cách hệ thống, chi tiết ảnh hưởng của pha động (cụ thể là hàm lượng cacbon trong pha động) tới tín hiệu phân tích. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng tín hiệu phân tích của asen và selen tăng khi có mặt của cacbon trong pha động và tín hiệu của asen phụ thuộc vào gradient của pha động.
4. Đánh giá và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp thông qua 2 mẫu CRM cho phân tích asen tổng, 2 mẫu CRM cho phân tích dạng tồn tại của As. Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng không có sự khác nhau về mặt thống kê giữa kết quả phân tích và giá trị ghi nhận trên chứng chỉ. Điều này có nghĩa là phương pháp phân tích nêu trong nghiên cứu này hoàn toàn có giá trị sử dụng trong phân tích 5 dạng asen trong mẫu thực phẩm cũng như phân tích asen tổng.
5. Đã áp dụng phương pháp nêu trên vào phân tích các dạng asen, selen và asen, selen tổng trong một số loại nền mẫu khác nhau. Kết quả thu được là tin cậy. Bên cạnh 5 dạng asen và 4 dạng selen chính, một số dạng tồn tại khác của asen và selen cũng được phát hiện.

Với kết quả đạt được của luận án sẽ mở ra một hướng nghiên cứu về phân tích dạng tồn tại của asen và selen trong mẫu thực phẩm, môi trường, sinh học và mẫu thuốc, thực phẩm chức năng có chứa selen cũng như tìm hiểu về sự liên quan giữa các dạng asen và selen nguồn gốc ô nhiễm để có phương thức phòng ngừa và nắm bắt độc tính của chúng. Phương pháp phân tích này cũng có thể sử dụng để đánh giá nguồn gốc phơi nhiễm của As cũng như selen tới con người, đặc biệt là phơi nhiễm các dạng asen khác nhau.

Các công trình khoa học liên quan đến luận án

- [1]. **Nguyễn Mạnh Hà**, Trần Quang Thành, Nguyễn Hà Trang, Phạm Tiến Đức, Tạ Thị Thảo, Từ Bình Minh, Lê Văn Chiếu, Chu Đình Bình, (2017), “Phân tích dạng tồn tại của arsen trong mẫu cá biển bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao ghép nối với detector khối phổ kế nguồn plasma cao tần cảm ứng (HPLC-ICPMS)”, *Tạp chí Hóa học*, 55(E1,2), trang 94 – 98.
- [2]. **Nguyễn Mạnh Hà**, Nguyễn Thị Dung, Chu Thị Huệ, Tạ Thị Thảo, Nguyễn Thị Hồng Yến, Từ Bình Minh, Đỗ Hồng Quân, Chu Đình Bình, (2018), “Định lượng các dạng asen trong mẫu nước mắm bằng phương pháp HPLC ghép nối khối phổ plasma cao tần cảm ứng (ICP-MS)”, *tạp chí Hóa lý sinh*, 23(4), trang 80 – 86.
- [3]. **Nguyễn Mạnh Hà**, Vũ Hải Anh, Từ Bình Minh, Chu Đình Bình, Nguyễn Thị Hương Giang, (2018) “Phân tích 5 dạng của asen bằng phương pháp sắc kí lỏng ghép nối khối lượng cao tần cảm ứng plasma sử dụng buồng phản ứng động học: Ứng dụng để phân tích mẫu gạo”, *tạp chí Phân tích Hóa lý sinh học*, 23(5), trang 194 - 203.
- [4]. **Nguyễn Mạnh Hà**, Nguyễn Thị Dung, Ngô Quý Trung, Bùi Thị Lan Anh, Tạ Thị Thảo, Từ Bình Minh, Chu Đình Bình, Nguyễn Thị Hồng Yến, (2018), “Định lượng các dạng Selen trong dược phẩm bằng phương pháp HPLC ghép nối khối phổ plasma cao tần cảm ứng (ICP-MS)”, *Tạp Chí Hóa học*, T56 6E1, trang 5-9.
- [5]. **Nguyễn Mạnh Hà**, Vũ Hải Anh, Ngô Quý Trung, Tạ Thị Thảo, Từ Bình Minh, Trần Quang Thành, Trần Ngọc Thanh, Nguyễn Phương Thúy, Vũ Hồng Ân, Chu Đình Bình, (2019), “Phân tích một số dạng asen trong thực phẩm”, *Tạp Chí phân tích hóa lý và sinh học*, T24 số 4B, trang 22-28.
- [6]. **Nguyễn Mạnh Hà**, Ngô Quý Trung, Nguyễn Thị Kim Thường, Vũ Hải Anh, Từ Bình Minh, Trần Quang Thành, Nguyễn Phương Thúy, Đỗ Hồng Quân, Chu Đình Bình, Nguyễn Tiến Thành, (2019) “xác định một số dạng của selen bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ nguồn plasma cảm ứng cao tần (HPLC-ICP-MS), *tạp chí Phân tích Hóa lý sinh học*, T24(4B), trang 30 - 37.
- [7]. **Manh Ha Nguyen**, Tien Duc Pham, Thi Lien Nguyen, Hai Anh Vu, Thi Thao Ta, Minh Binh Tu, Thi Hong Yen Nguyen and Dinh Binh Chu, (2018), “Speciation Analysis of Arsenic Compounds by HPLC-ICP-MS: Application for Human Serum and Urine”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, <https://www.hindawi.com/journals/jamc/2018/9462019/> <https://doi.org/10.1155/2018/9462019>
- [8]. Hai Anh Vu, **Manh Ha Nguyen**, Hong An Vu Thi, Quan Do Hong, Xuan Hoang Dang, Thi Ngoc Bich Nguyen, Hong Quan Trinh, Thuy Ly Bich, Tien Thanh Nguyen, Dung Le Van, Minh Binh Tu and Dinh Binh Chu (2019), “Speciation analysis of arsenic compounds by high performance liquid chromatography in combination with inductively coupled plasma dynamic reaction cell quadrupole mass spectrometry: Application for Vietnamese rice sample”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, <https://www.hindawi.com/journals/jamc/2019/5924942/> <https://doi.org/10.1155/2019/5924942>
- [9]. Manh Ha Nguyen, Quoc Anh Hoang, Lan Anh Nguyen, Thi Thao Ta, Tien Duc Pham, Minh Binh Tu, and Dinh Binh Chu (2020), “An Exposure Assessment of Arsenic and Other Trace Elements in Ha Nam Province, Northern Vietnam” *International Journal of Analytical Chemistry* Volume 2019, Article ID 5037532, 8 pages <https://doi.org/10.1155/2019/5037532>