

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ARSENIC VÔ CƠ VÀ ARSENIC HỮU CƠ TRONG NƯỚC MẮM BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THU NGUYÊN TỬ VỚI KỸ THUẬT TẠO HYDRIDE

ĐỖ THỊ LONG, NGUYỄN ĐÌNH CHIÊU, HỒ LƯƠNG THƯỜNG

Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

dothilong@iuh.edu.vn,

Tóm tắt. Đã thẩm định thành công quy trình phân tích các thành phần arsenic trong nước mắm bằng phương pháp HG-AAS. Hàm lượng arsenic tổng (tAs) được phân tích sau khi phá mẫu bằng phương pháp vô cơ hóa khô và ướt kết hợp trong bình Teflon ở nhiệt độ 450 °C và sau đó khử As (V) về As (III) bằng hỗn hợp chất khử KI/acid ascorbic. Với arsenic vô cơ (iAs), mẫu được thủy phân bằng dung dịch HCl trong 14 giờ, tiếp tục chuyển As (V) về As (III) rồi phản ứng với hydrazine 1,5%. Dùng CHCl₃ để chiết và chiết lại trong HNO₃. Hàm lượng arsenic hữu cơ (oAs) được tính bằng hiệu số hàm lượng tAs và iAs. Đã xác định được khoảng nồng độ tuyến tính 2 - 30 µg/L và phương trình đường chuẩn $y = 0,0128x + 0,0007$ với $R^2 = 0,9996$ trong khoảng nồng độ 2 - 20 µg/L. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp phân tích tAs và iAs đều có giá trị như nhau và lần lượt bằng 0,015 mg/L, 0,05 mg/L. Đối với tAs, hiệu suất thu hồi trên chuẩn arsenic hữu cơ và arsenic vô cơ đều trong khoảng 81– 109%; độ lặp lại và độ tái lập giữa các phòng thí nghiệm lần lượt là $RSD_r < 10\%$ và $RSD_R < 12\%$. Với iAs, hiệu suất thu hồi nằm trong khoảng 83,6 – 110%; $RSD_r < 11\%$, $RSD_R < 14\%$. Đã đánh giá hàm lượng As trong các mẫu nước mắm đại diện, một số mẫu độ đậm cao tuy có hàm tAs vượt mức cho phép của Bộ Y Tế Việt Nam, nhưng chủ yếu là oAs.

Từ khóa. hàm lượng arsenic tổng, hàm lượng arsenic vô cơ, nước mắm, HG-AAS, chiết.

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF INORGANIC AND ORGANIC ARSENIC IN FISH SAUCE BY HYDRIDE GENERATION ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY

Abstract. The validation of an analytical method was carried out for the determination of arsenic components in fish sauce by HG-AAS. The total arsenic content (tAs) was analyzed after digesting the sample by dry and wet combined digestion method in a Teflon flask at 450 °C and then reducing As (V) to As (III) with a mixture of reducing agents KI/ascorbic acid. For inorganic arsenic content (iAs), the sample was hydrolyzed with HCl solution for 14 hours, converted As (V) to As (III), then reacted with hydrazine 1.5%. Extracted in CHCl₃ and re-extracted in HNO₃. The organic arsenic content (oAs) was calculated by the difference tAs and iAs. Determined the linear concentration range 2 - 30 µg/L and the standard curve was $y = 0.0128x + 0.0007$ with $R^2 = 0.9996$ at the concentration range 2 - 20 µg/L. LODs, LOQs for total and inorganic arsenic contents were found and all they were 0.015 mg/L and 0.05 mg/L, respectively. For total arsenic, the recovery efficiencies on the organic arsenic standard and inorganic arsenic standard all ranged from 81 to 109%; repeatability $RSD_r < 10\%$ and reproducibility $RSD_R < 12\%$. For inorganic arsenic, the recovery efficiency ranged from 83.6 to 110%; $RSD_r < 11\%$ and $RSD_R < 14\%$. Determined As content in representative fish sauce samples, some samples of high protein had total As content exceeding the permitted level of the Ministry of Health, but mainly was organic As.

Keywords. total arsenic content, inorganic arsenic content, fish sauce, HG-AAS, extraction.

1 MỞ ĐẦU

Nước mắm là gia vị thường được sử dụng trong hầu hết các món ăn của người Việt Nam nói riêng và các nước Đông Á nói chung. Nước mắm không chỉ giúp tăng hương vị của món ăn mà còn là nguồn cung cấp dinh dưỡng như một số loại axit amin thiết yếu hay tăng cường chất sắt để chống lại tình trạng thiếu sắt ở nhiều quốc gia [1-3]. Nước mắm được chế biến bằng cách ủ hỗn hợp nguyên liệu gồm cá và muối theo tỉ lệ nhất định trong thời gian từ một năm trở lên. Tuy arsenic trong các sinh vật biển chủ yếu ở dưới dạng

hữu cơ (oAs) không độc, nhưng quá trình sản xuất thực phẩm như lên men cá để sản xuất nước mắm có thể làm thay đổi dạng tồn tại của nó. Do đó, tổng nồng độ arsenic (tAs) không phản ánh hết được mức độ nguy hiểm cũng như không cung cấp đầy đủ thông tin về rủi ro liên quan đến việc tiêu thụ nước mắm. Chính vì thế, vấn đề thành phần arsenic trong nước mắm, đặc biệt là nước mắm truyền thống, đã từng gây tranh cãi và khiến dư luận rất quan tâm trong những năm gần đây.

Mối lo ngại về phơi nhiễm iAs trong chế độ ăn uống và các nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe đã được nhấn mạnh trong các đánh giá gần đây của Cơ quan An toàn Thực phẩm Châu Âu (EFSA), Tổ chức lương thực và nông nghiệp Liên hợp quốc/Tổ chức Y tế Thế giới (FAO/WHO) và Ủy ban về phụ gia thực phẩm (JECFA) [4-5]. Việc xác định hàm lượng riêng phần oAs và iAs trong thực phẩm không những giúp kiểm tra mức độ an toàn của sản phẩm mà còn tính toán lượng tiêu thụ để đánh giá mức độ phơi nhiễm nền đối với arsenic và để hiểu các nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe con người [6]. Vì lý do này, việc đưa ra các phương pháp giúp phân tích nhanh, chính xác hàm lượng tAs, oAs, iAs phù hợp điều kiện thực tế của các phòng thí nghiệm, giúp các nhà sản xuất cũng như các cơ quan kiểm định dễ dàng kiểm soát và đánh giá chất lượng sản phẩm đang rất được quan tâm.

Phương pháp phân tích được áp dụng phổ biến nhất hiện nay để xác định các thành phần arsenic đều dựa trên thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao kết nối với đầu dò như HPLC-ICP-MS [7,8] hay HPLC-HG-AAS [9]. Các phương pháp này có thể tách và phân tích từng dạng arsenic với độ chính xác và độ nhạy cao, nhưng lại đòi hỏi hệ thống máy đắt tiền, không sẵn có trong nhiều phòng thí nghiệm. Phương pháp AAS bên cạnh việc dễ dàng áp dụng để phân tích hàm lượng arsenic tổng trong nhiều đối tượng mẫu, hiện nay HG-AAS cũng đã được sử dụng để xác định hàm lượng arsenic vô cơ trong một số đối tượng mẫu nhờ tính linh hoạt và chi phí thấp của thiết bị [10-14]. Tuy nhiên, với nước mắm, hiện nay việc sử dụng phương pháp HG-AAS để phân tích riêng phần oAs, iAs vẫn chưa được nghiên cứu. Do đó, nhiệm vụ của đề tài được đặt ra là dựa vào phương pháp phân tích các thành phần arsenic bằng HG-AAS đã có hiện nay, tối ưu hóa các điều kiện và yếu tố ảnh hưởng để đưa ra phương pháp phân tích các thành phần arsenic trong nước mắm, thẩm định phương pháp và sử dụng phương pháp để đánh giá hàm lượng các thành phần arsenic trong một số mẫu nước mắm đại diện.

2 THỰC NGHIỆM

2.1 Hóa chất và thiết bị

Hóa chất

Các hóa chất có độ tinh khiết phân tích của Merck (Darmstadt, Germany) gồm axit nitric (HNO_3), 65 %; axit clohydric (HCl), 38%; axit bromic (HBr), 48%; hydrazine sulfate ($(\text{N}_2\text{H}_5)\text{HSO}_4$), 99%; chloroform (CHCl_3), 99%; sodium borohydride (NaBH_4), 98%; natri hydroxit (NaOH), 98%; magie nitrate ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 98%; acid ascorbic ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), 99,7%; kali iodua (KI), 99,5%; chuẩn gốc arsenic(III), 1000 mg/L; chuẩn gốc arsenic (V), 1000 mg/L và chuẩn asenobetaine (AB), 98,5% của Sigma.

Dung dịch NaBH_4 1% (w/v) được pha trong dung dịch NaOH 0,5%, có thể sử dụng trong 07 ngày, bảo quản ở 20 °C. Các dung dịch chuẩn thứ cấp As (III) 10 mg/L và As (III) 100 µg/L lần lượt được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc arsenic (III) 1000 mg/L và As (III) 10 mg/L trong dung dịch HCl 0,2 N. Các dung dịch chuẩn thứ cấp As (V) 10 mg/L và As(V) 100 µg/L lần lượt được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc As (V) 1000 mg/L và As (V) 10 mg/L trong HNO_3 0,1N.

Thiết bị

Nghiên cứu được thực hiện trên Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS-ICE 3500_Thermo kết hợp Bộ phân tích hydride VP100_Thermo và Bộ gia nhiệt có kiểm soát EC100_Thermo. Ngoài ra, độ tái lập của phương pháp còn được đánh giá trên Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử 240FS_Agilent kết hợp Bộ phân tích hydride VGA 77 AAS_Agilent.

2.2 Mẫu và chuẩn bị mẫu

Sử dụng 5 mẫu nước mắm đại diện. Ba mẫu được mua từ siêu thị, gồm một mẫu nước mắm công nghiệp có độ đậm < 15 gN/L; hai mẫu nước mắm truyền thống có độ đậm 23 – 27 gN/L và 34 – 42 gN/L. Hai mẫu nước mắm nhà dân tự làm nhằm phục vụ cho nhu cầu của gia đình có độ đậm > 45 gN/L. Các mẫu sau khi mua hoặc nhận về được bảo quản ở nhiệt độ phòng và tránh ánh sáng mặt trời.

2.3 Thẩm định phương pháp

Khoảng tuyến tính được đánh giá bằng cách phân tích trực tiếp các dung dịch chuẩn As (III) trong khoảng nồng độ từ 2 đến 50 $\mu\text{g/L}$. Từ đó xây dựng các đường hồi quy tuyến tính, căn cứ vào hệ số tương quan (R^2) và độ chệch nồng độ Δi để công bố khoảng tuyến tính. Khoảng nồng độ xây dựng đường chuẩn được lựa chọn dựa vào khoảng tuyến tính và nồng độ chất phân tích trong đối tượng mẫu.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được tính dựa vào kết quả phân tích lặp lại 11 mẫu trắng theo công thức (1) và (2). Trong đó X_0 và SD lần lượt là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn từ kết quả phân tích hàm lượng arsenic trong mẫu trắng. Sau khi thu được LOD và LOQ, tiếp tục đánh giá lại hiệu suất thu hồi tại nồng độ LOQ đối với các chuẩn arsenic hữu cơ và vô cơ để khẳng định giá trị LOD, LOQ công bố cho phương pháp là tin cậy.

$$LOD = X_0 + 3.SD \quad (1)$$

$$LOD = \frac{10}{3}.LOD \quad (2)$$

Độ lặp lại của phương pháp được thực hiện đối với 5 mẫu đã chọn, mỗi mẫu thực hiện 7 lần trong cùng một ngày. Từ các kết quả thu được, đối với mỗi mẫu tính \bar{X} , $S_{r(i)}$, và RSD_r để đánh giá độ lặp lại theo công thức (3) và (4):

$$S_{r(i)} = \frac{\sum(X_i - \bar{X})}{n-1} \quad (3)$$

$$SRD_r(\%) = \frac{S_{r(i)}}{\bar{X}}.100 \quad (4)$$

Hiệu suất thu hồi của các phương pháp phân tích được đánh giá dựa vào kết quả phân tích mẫu và mẫu thêm chuẩn. Các thí nghiệm được thực hiện trên các mẫu khác nhau và mỗi mẫu ít nhất 7 lần để lấy giá trị trung bình. Hiệu suất thu hồi được tính theo công thức (5). Trong đó, $C_{mẫu+chuẩn}$ và $C_{mẫu}$ lần lượt là nồng độ mẫu và mẫu thêm chuẩn thu được bằng thực nghiệm và $C_{chuẩn}$ là nồng độ chuẩn thêm vào.

$$H(\%) = \frac{C_{mẫu+chuẩn} - C_{mẫu}}{C_{chuẩn}} \quad (5)$$

Độ tái lập của phương pháp được đánh giá dựa vào kết quả thí nghiệm khi sử dụng cùng một phương pháp đã tối ưu, trên cùng một mẫu, trong hai phòng thí nghiệm khác nhau và do những người thao tác khác nhau. Thực hiện phân tích lặp lại n lần trên mỗi mẫu ($n \geq 7$). Đối với mẫu nước mắm không phát hiện arsenic, chúng tôi sử dụng mẫu thêm chuẩn tại nồng độ LOQ để đánh giá độ tái lập của phương pháp. Từ kết quả phân tích, tính toán độ tái lập (RSD_R) theo các công thức từ (6) – (10).

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum f_i \times S_{ri}^2}{\sum f_i}} \quad (6)$$

Với $f_i = n - 1$

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\sum_{i=1}^p \bar{X}_i}{p} \quad (7)$$

$$S_L^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2}{p-1} - \frac{S_r^2}{n} \quad (8)$$

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2} \quad (9)$$

$$RSD_R(\%) = \frac{S_R}{\bar{\bar{X}}} \times 100 \quad (10)$$

Trong đó, S_{ri} là độ lệch chuẩn đối với mỗi tập số liệu thu được tại một phòng thí nghiệm trên 1 mẫu, tính tương tự theo (4); f_i là bậc tự do đối với mỗi tập số liệu; S_r là độ lệch chuẩn lặp lại; \bar{X}_i và $\bar{\bar{X}}$ lần lượt là giá trị trung bình mỗi tập số liệu và của hai tập số liệu; S_L^2 là phương sai giữa các phòng thí nghiệm; S_R là độ tái lập PTN; RSD_R là độ tái lập PTN tương đối.

Độ tái lập lại được đánh giá dựa vào tỉ số HorRat (R) [15,16] như sau:

$$PRSD_R = 2.C^{-0.15} \quad (11)$$

$$HorRat(R) = \frac{RSD_R}{PRSD_R} \quad (12)$$

Phương pháp đạt yêu cầu khi giá trị tỉ số $HorRat = 0,5 \div 2$. Trong đó C là nồng độ tỉ lệ khối lượng. Nếu $HorRat (R)$ nhỏ hơn giới hạn dưới ($<0,5$) có thể do giá trị trung bình chưa được báo cáo hoặc chứng tỏ kỹ năng và kinh nghiệm xuất sắc của người thực hiện. Ngược lại, giá trị $HorRat (R)$ lớn hơn giới hạn trên (> 2) có thể do các mẫu thử không đồng nhất, cần tối ưu hóa hoặc đào tạo thêm kỹ năng thí nghiệm, phân tích dưới giới hạn định lượng hoặc phương pháp sử dụng không đạt yêu cầu [16].

Ngoài ra, đối với phương pháp phân tích iAs, để kết quả có tính thuyết phục hơn, độ chọn lọc đối với arsenic vô cơ cũng được khảo sát bằng cách tiến hành so sánh hàm lượng iAs trong mẫu thêm chuẩn AB và mẫu thêm cả hai chuẩn AB và As (V). Mẫu đã chứng minh trước đó là không chứa As. Thực hiện phân tích n lần ($n \geq 5$) theo qui trình phân tích mẫu như trên và đánh giá kết quả thu được.

2.4 Quy trình chiết arsenic tổng

Quy trình chiết arsenic tổng sau khi được khảo sát và tối ưu dựa trên phương pháp phân tích thành phần arsenic trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi [17] như sau:

Hút 2 mL mẫu thử cho vào bình Teflon, thêm 5 mL HNO_3 đậm đặc và 1 mL H_2O_2 , để yên 15 phút, đóng chặt bình teflon, đặt trong tủ sấy và điều chỉnh nhiệt độ khoảng $150^\circ C$ trong 2 giờ. Lấy dung dịch sau xử lý cho vào chén nung, thêm 1 mL $Mg(NO_3)_2$ 7,5%, làm khô hoàn toàn trên bếp điện. Sau đó cho vào lò nung, gia nhiệt ở $450^\circ C$ đến khi mẫu được tro trắng (khoảng 1 – 2 h). Lấy cốc ra khỏi lò nung, để nguội. Mẫu sau khi xử lý được làm nguội, hòa tan trong 10 mL nước cất, thêm 2 mL dung dịch HCl 8 M, thêm tiếp 5 mL dung dịch KI 5% và 5 mL acid ascorbic 5%. Làm ấm ở nhiệt độ $40 - 50^\circ C$ trong 30 phút, để nguội, định mức lên 50 mL bằng nước cất. Dung dịch cuối cùng được phân tích trên máy AAS kết nối với bộ hóa hơi hydride VP100.

Hàm lượng As tổng trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$tAs \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{C_{dc} \cdot V_{dm}}{V_m \cdot 1000} \quad (13)$$

Trong đó, tAs là hàm lượng As tổng (mg/L); C_{dc} là nồng độ arsenic tính từ đường chuẩn, $\mu g/L$; V_{dm} là thể tích định mức (mL) và V_m là thể tích mẫu (mL).

2.5 Quy trình chiết arsenic vô cơ

Quy trình chiết arsenic vô cơ sau khi được khảo sát và tối ưu dựa trên phương pháp phân tích thành phần iAs trong ngũ cốc, nấm và thực phẩm có nguồn gốc từ biển [18] như sau:

Hút 2 mL mẫu thử cho vào ống ly tâm, thêm vào 4 mL nước cất, lắc trên máy lắc cơ học trong 5 phút để mẫu và nước trộn đều. Thêm 18 mL axit HCl 38%, tiếp tục lắc trên máy lắc cơ học trong 15 phút. Để yên cho quá trình thủy phân diễn ra, thời gian từ 12 đến 15 giờ. Thêm 2 mL axit HBr 48%, 1 mL Hydrazine 1,5%. Lắc bằng máy lắc cơ học trong 30 giây. Thêm 10 mL $CHCl_3$, lắc 5 phút. Để yên trong 5 phút, nếu vẫn không tách pha thì tiến hành ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2000 rpm. Chiết lớp $CHCl_3$ qua ống ly tâm khác, thực hiện thêm ít nhất 2 lần nữa. Ly tâm pha $CHCl_3$ trong 5 phút ở 2000 rpm, loại bỏ pha axit còn sót lại trên bề mặt pha $CHCl_3$. Lọc dung dịch sau chiết qua màng lọc PTFE $0,45 \mu m$. Thêm 5 mL HNO_3 2% vào dung dịch sau khi lọc. Lắc 5 phút, để yên trong 1 phút. Chiết lấy lớp HNO_3 (lớp trên), thực hiện thao tác này thêm ít nhất 2 lần nữa. Chuyển tất cả dung dịch sau xử lý ở trên cho vào chén nung, thêm 1 mL $Mg(NO_3)_2$ 7,5%, làm khô hoàn toàn trên bếp điện. Sau đó cho vào lò nung, gia nhiệt ở $450^\circ C$ đến khi mẫu được tro trắng. Lấy cốc ra khỏi lò nung, để nguội. Mẫu sau khi xử lý được làm nguội, thêm 10 mL nước cất, 2 mL dung dịch HCl 8 M, thêm tiếp 5 mL dung dịch KI 5% và 5 mL acid ascorbic 5%. Làm ấm ở nhiệt độ $40 - 50^\circ C$ trong 30 phút, định mức lên 50 mL bằng nước cất rồi đem đi phân tích trên máy AAS.

Hàm lượng As vô cơ trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$iAs \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{C_{dc} \cdot V_{dm}}{V_m \cdot 1000} \quad (14)$$

Trong đó, iAs là hàm lượng As vô cơ trong mẫu; C_{dc} là nồng độ arsenic tính từ đường chuẩn, $\mu g/L$; V_{dm} là thể tích định mức (mL) và V_m là thể tích mẫu (mL).

2.6 Các thông số thiết bị và yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo hydride

Các thông số thiết bị và yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo hydride đã được khảo sát và tối ưu dựa trên các số liệu tham khảo [17] được trình bày trong như Bảng 1:

Bảng 1. Các điều kiện thí nghiệm trên AAS kết hợp bộ VP100

188 THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ARSENIC VÔ CƠ VÀ ARSENIC HỮU CƠ TRONG NƯỚC MẮM BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THU NGUYÊN TỬ VỚI KỸ THUẬT TẠO HYDRIDE

STT	Nội dung	Thông số
1	Thiết bị	AAS iCE 3500 kết hợp bộ VP100 và EC100 - Thermo
2	Bước sóng phân tích	193,7 nm
3	Nhiệt độ nguyên tử hóa	900 °C
4	Dòng đèn cathode	85 % Max (10 mA)
5	Chiều cao đầu đốt	17 mm
6	Khe (Slit)	0,5 nm
7	Hiệu chỉnh nền	D2
8	Tốc độ dòng hỗ trợ Ar	200 mL/phút
9	Tốc độ quay bơm nhu động	30 vòng/phút
10	Lưu lượng HCl	0,7 mL/phút
11	Lưu lượng NaBH ₄	1,6 mL/phút
12	Lưu lượng mẫu	7,5 mL/phút
13	Nồng độ HCl	5 M
14	Nồng độ NaBH ₄	0,75 % trong 0,5 % NaOH (m/v)

3 KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1 Kết quả thẩm định phương pháp

Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Dựa trên kết quả đo ít nhất 3 lần đối với mỗi nồng độ arsenic sao cho thỏa mãn yêu cầu độ lệch chuẩn của tất cả các điểm chuẩn đều không quá 2,5%, đã thu được khoảng tuyến tính từ 2 đến 30 µg/L với hệ số hồi quy $R^2 = 0,9995$. Tuy nhiên, dựa vào hàm lượng arsenic thường có trong mẫu nước mắm và cũng để hạn chế sai số do đường chuẩn gây ra, chúng tôi chọn khoảng nồng độ dựng đường chuẩn là 2 - 20 µg/L. Phương trình đường chuẩn và hệ số hồi quy thu được tương ứng là $y = 0,0128x + 0,0007$, $R^2 = 0,9996$.

LOD và LOQ

Bằng cách phân tích 11 lần đối với mẫu không chứa arsenic, đã xác định giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ hàm lượng arsenic tổng và arsenic vô cơ đối với mẫu nước mắm đều như nhau và lần lượt bằng 0,015 và 0,05 mg/L. Tiến hành thêm chuẩn bằng ngưỡng định lượng LOQ trên chính mẫu đã sử dụng và thực hiện phép phân tích lặp lại 5 lần. Hiệu suất thu hồi đối với mỗi thí nghiệm riêng rẽ nằm trong khoảng 84,7 – 99,5%, 83,2 – 91,6% và giá trị trung bình đạt 93,1%, 89,9% lần lượt đối với arsenic tổng và arsenic vô cơ, cho thấy phương pháp hoàn toàn đáp ứng yêu cầu AOAC Appendix F (80 – 110%) [15]. Ngoài ra giới hạn phát hiện của các phương pháp đều thấp hơn nhiều lần so với giới hạn tối đa cho phép trong nước chấm theo qui định của Bộ Y tế Việt Nam [19] là 1,0 mg/L, nên hoàn toàn phù hợp để phân tích hàm lượng arsenic với mục đích kiểm tra vệ sinh an toàn thực phẩm. Hơn nữa, so với kết quả thu được bởi một số tác giả sử dụng phương pháp HG-AAS đối với mẫu gạo (LOQ iAs 15 mg/kg; tAs 23 mg/kg [20]), mẫu ngũ cốc, nấm và thực phẩm có nguồn gốc từ biển (LOQ iAs 10 µg/g [18]); phương pháp SPE HG-AAS đối với mẫu gạo (LOD iAs 0,02 mg/kg [21]) và phương pháp HPLC-ICP-MS đối với mẫu thực phẩm (LOD tAs 0,3-0,4 mg/L [22]) cho thấy mức độ phù hợp của phương pháp phân tích được đề xuất.

Độ lặp lại

Đối với tất cả 5 mẫu nước mắm đại diện đã chọn, với SRD_r (%) nằm trong ngưỡng cho phép theo AOAC Appendix F (<11%) cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt.

Bảng 2. Độ lặp lại của phương pháp phân tích tAs và iAs

Mẫu	tAs		iAs	
	mg/L	SRD_r (%)	mg/L	SRD_r (%)
Mẫu 1	0,63	2,5	KPH	-
Mẫu 2	1,15	6,2	0,080	3,5
Mẫu 3	1,65	2,5	0,066	3,6
Mẫu 4	1,65	3,0	0,066	3,6
Mẫu 5	KPH	-	KPH	-

Hiệu suất thu hồi của phương pháp

Hiệu suất thu hồi thu được khảo sát trên các đối tượng mẫu khác nhau, mỗi mẫu đều được thực hiện 7 lần để lấy kết quả trung bình. Kết quả thu được như Bảng 3 và Bảng 4.

Các kết quả riêng rẽ đều có giá trị nằm trong ngưỡng cho phép theo AOAC Appendix F (80 – 110%). Cụ thể, hiệu suất thu hồi đối với arsenic tổng trên chuẩn hữu cơ AB và chuẩn arsenic vô cơ As (V) lần lượt trong khoảng 81,1 – 108,6 % và 83,6 – 109,1 %. Giá trị này đối với phương pháp phân tích arsenic vô cơ đạt 83,6 – 110%. Điều đáng chú ý, độ thu hồi trên 2 loại chuẩn hữu cơ và vô cơ không khác nhau nhiều. Điều đó có thể khẳng định quy trình phá mẫu và phân tích khá ổn định, có thể áp dụng để xác định hàm lượng arsenic tổng và arsenic vô cơ trong các mẫu nước mắm khác nhau.

Bảng 3. Hiệu suất thu hồi của phương pháp phân tích arsenic tổng trên chuẩn AB và As(V)

$C_{mẫu}^{tAs}$, mg/L	$C_{chuẩn}^{AB}$, mg/L	$C_{mẫu+chuẩn}^{tAs}$, mg/L	$C_{chuẩn,thực\ tế}^{As}$, mg/L	H, %
1,65	1,25	2,822 ± 0,014	1,172 ± 0,014	93,8 ± 1,2
1,15	1,25	2,314 ± 0,022	1,164 ± 0,022	93,2 ± 1,8
$C_{mẫu}^{tAs}$, mg/L	$C_{chuẩn}^{As(V)}$, mg/L	$C_{mẫu+chuẩn}^{tAs}$, mg/L	$C_{chuẩn,thực\ tế}^{As}$, mg/L	H, %
1,65	1,25	2,834 ± 0,022	1,184 ± 0,022	94,7 ± 1,8
0,63	0,50	1,117 ± 0,005	0,487 ± 0,005	97,4 ± 1,1
KPH	0,05	0,045 ± 0,001	0,045 ± 0,001	91,0 ± 1,5

Bảng 4. Hiệu suất thu hồi của phương pháp phân tích arsenic vô cơ

$C_{mẫu}^{iAs}$, mg/L	$C_{chuẩn}^{As(V)}$, mg/L	$C_{mẫu+chuẩn}^{iAs}$, mg/L	$C_{chuẩn,thực\ tế}^{iAs}$, mg/L	H, %
KPH	0,05	0,045 ± 0,001	0,045 ± 0,001	90,3 ± 1,2
0,080	0,07	0,149 ± 0,001	0,069 ± 0,001	99,6 ± 0,5
0,066	0,06	0,126 ± 0,001	0,060 ± 0,001	101,1 ± 0,6
0,066	0,06	0,123 ± 0,001	0,057 ± 0,001	95,7 ± 0,4
KPH	0,05	0,047 ± 0,001	0,047 ± 0,001	94,2 ± 1,4

Độ tái lập của phương pháp

Kết quả khảo sát trên 5 nền mẫu nước mắm tại hai phòng thí nghiệm và người thao tác khác nhau, cho thấy độ tái lập tốt. Với hầu hết các tỉ số HorRat R đều thấp hơn giá trị cận dưới (giá trị < 0,5), điều này chứng tỏ kỹ năng tốt của người thực hiện.

Bảng 5. Độ tái lập của phương pháp phân tích arsenic tổng

STT	1	2	3	4	5*
\bar{X} , mg/L	0,63	1,15	1,65	1,65	0,048
RSD _R (%)	6,8	6	4,8	4,9	12
PRSD _R (%)	17	16	15	15	25
HorRat R	0,40	0,39	0,32	0,33	0,48

Bảng 6. Độ tái lập của phương pháp phân tích arsenic vô cơ

STT	1	2	3	4	5*
\bar{X} , mg/L	0,044	0,080	0,064	0,065	0,045
RSD _R (%)	9,5	8,1	10	10	14
PRSD _R (%)	25	23	24	24	25
HorRat R	0,37	0,35	0,42	0,42	0,55

*Mẫu KPH, đã thực hiện thêm chuẩn bằng ngưỡng LOQ để đánh giá.

Độ chọn lọc của phương pháp phân tích As vô cơ

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ chọn lọc của phương pháp phân tích arsenic vô cơ

$C_{mẫu}^{As}$, mg/L	$C_{chuẩn}^{AB}$, mg/L	$C_{chuẩn}^{As(V)}$, mg/L	iAs (mg/L)	H, %
KPH	1	0	KPH	-
KPH	1	0,05	0,048 ± 0,001	96,7 ± 1,7

Với việc không phát hiện As vô cơ trong nền mẫu thêm chuẩn AB cho thấy phương pháp phân tích có tính chọn lọc tốt. Kết quả một lần nữa chứng minh độ đúng của phương pháp khi hiệu suất thu hồi đạt trên 96%. Điều này có thể khẳng định phương pháp hoàn toàn chọn lọc với arsenic vô cơ ứng với các điều kiện thực nghiệm đã nêu.

3.2 Hàm lượng arsenic trong một số mẫu nước mắm

Bảng 7. Hàm lượng arsenic trong một số mẫu nước mắm và lượng ăn vào hằng tuần tính theo iAs

MSM	tAs, mg/L	iAs, mg/L	oAs, %	iAs, %	Lượng ăn vào hằng tuần tính theo iAs mg/kg
Mẫu 1	0,63 ± 0,01	KPH	100	0	-
Mẫu 2	1,15 ± 0,01	0,080 ± 0,001	93,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1	< 0,0003
Mẫu 3	1,65 ± 0,01	0,066 ± 0,001	96,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1	< 0,0002
Mẫu 4	1,65 ± 0,01	0,066 ± 0,001	96,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1	< 0,0002
Mẫu 5	KPH	KPH	-	-	-

As trong nước mắm bắt nguồn từ cá nguyên liệu, chủ yếu là As hữu cơ không độc, có thể chuyển hóa thành dạng As vô cơ trong quá trình lên men và bảo quản. Kết quả phân tích mẫu đại diện cho thấy một số mẫu nước mắm có hàm lượng As tổng vượt ngưỡng cho phép của Bộ Y Tế Việt Nam, đặc biệt là trong các mẫu nước mắm có hàm lượng đậm cao. Rõ ràng, quá trình pha trộn để thu được sản phẩm có độ đậm khác nhau là một nguyên nhân làm giảm nồng độ As trong thành phẩm. Do đó, những mẫu có độ đậm cao, đặc biệt là nước mắm dân tự làm phục vụ cho nhu cầu gia đình, không qua quá trình pha trộn nên hàm lượng As luôn có giá trị cao hơn. Tuy nhiên, thành phần chính trong As tổng phân tích được chủ yếu là As hữu cơ dễ dàng đào thải ra khỏi cơ thể. Tất cả các mẫu đều có hàm lượng As vô cơ rất thấp, dưới 0,1 mg/L, và chiếm không quá 7% so với hàm lượng As tổng. Kết quả phân tích này có thể khẳng định các mẫu nước mắm an toàn theo yêu cầu vệ sinh an toàn thực phẩm của Bộ Y Tế Việt Nam. Kết quả này cũng phù hợp với công bố về hàm lượng arsenic hữu cơ được phân tích bằng phương pháp HPLC-ICP-MS trong một số mẫu nước mắm tại Việt Nam và Thái Lan nằm trong khoảng 0,69 - 2,75 mg/L, với arsenic hữu cơ chiếm 82 - 94% [8].

Ngoài ra, lượng iAs ăn vào hằng tuần cũng đã được tính toán dựa vào trọng lượng cơ thể trung bình và thể tích tiêu thụ nhằm đánh giá chính xác hơn mức độ phơi nhiễm iAs thông qua việc sử dụng nước mắm. Với trọng lượng trung bình của những người trưởng thành được thăm dò là 50 kg và thể tích tiêu thụ tối đa 150 mL/tuần, kết quả đánh giá lượng ăn vào hằng tuần được trình bày trong Bảng 7. So với lượng ăn vào tối đa cho phép tạm thời (PTWI) tính theo iAs 0,015 mg/kg [19], có thể kết luận việc sử dụng các mẫu nước mắm được khảo sát hoàn toàn an toàn cho sức khỏe.

4 KẾT LUẬN

Đã thẩm định phương pháp phân tích riêng từng thành phần tAs, As vô cơ và As hữu cơ trong nước mắm. Với giới hạn định lượng thấp hơn nhiều lần so với giới hạn tối đa cho phép trong nước chấm của Bộ Y Tế Việt Nam, hiệu suất thu hồi cao (trên 90%), độ tái lập đạt yêu cầu của AOAC và đặc biệt chọn lọc tốt với thành phần As vô cơ, phương pháp hoàn toàn đáp ứng để phục vụ cho việc đánh giá, kiểm tra chất lượng nước mắm. Trong điều kiện chưa có hệ thống sắc ký lỏng ghép nối với hệ ICP để có thể tách hoàn toàn các dạng arsenic, đặc biệt là arsenic vô cơ, phương pháp xác định tổng arsenic vô cơ bằng phương pháp chiết với dung môi hữu cơ đã đáp ứng yêu cầu phân tích. Quy trình phân tích tương đối đơn giản, không yêu cầu thiết bị phá mẫu đắt tiền, sử dụng hệ thống máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS kết nối bộ hydride hoàn toàn phù hợp với nhiều trung tâm phân tích hay phòng thí nghiệm vừa và nhỏ hiện nay tại Việt Nam.

CẢM ƠN

Xin cảm ơn Cty TNHH Phân Tích Kiểm Nghiệm Việt Tín và Cty CP-DV-KHCN Thế Kỷ Mới đã tạo điều kiện về thiết bị và cơ sở vật chất trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Jiang, Q. Zeng, Z. Zhu, and L. Zhang, Chemical and sensory changes associated Yu-lu fermentation process - A traditional Chinese fish sauce, *Food Chemistry*, vol. 104, pp. 1629-1634, 2007.
- [2] V. Mannar and E. B. Gallego, Iron fortification: Country level experiences and lessons learned, *The Journal of Nutrition*, vol. 132, pp. 856-858, 2002.
- [3] P. V. Thuy, J. Berger, L. Davidsson, N. C. Khan, N. T. Lam, J. D. Cook, Regular consumption of NaFeEDTA-fortified fish sauce improves iron status and reduces the prevalence of anemia in anemic Vietnamese women, *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, pp. 284-290, 2003.
- [4] EFSA, Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population, *EFSA Journal*, vol. 13, no. 3, pp. 3597-3665, 2014.
- [5] WHO, Evaluation of certain contaminants in food in Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2011.
- [6] H.N. Lynch, G.I. Greenberg, M.C. Pollock and A.S. Lewis, A comprehensive evaluation of inorganic arsenic in food and considerations for dietary intake analyses, *Science of the Total Environment*, vol 496, pp. 299-313, 2014.
- [7] W. Maher, F. Krikowa, M. Ellwood, S. Foster, R. Jagtap and G. Raber, Overview of hyphenated techniques using an ICP-MS detector with an emphasis on extraction techniques for measurement of metalloids by HPLC-ICPMS. *Microchemical Journal*, vol. 105, pp. 15-31, 2012.
- [8] I. B. Rodriguez, G. Raber and W. Goessler, Arsenic speciation in fish sauce samples determined by HPLC coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Food Chemistry*, vol. 112, pp. 1084-1087, 2009.
- [9] P. Niedzielski, M. Siepak and K. Novotny, Determination of inorganic arsenic species As(III) and As(V) by high performance liquid chromatography with hydride generation atomic absorption spectrometry detection, *CEJC*, vol. 2, no. 1, pp. 82-90, 2004.
- [10] BS EN-16278, Animal feeding stuffs - Determination of inorganic arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS) after microwave extraction and separation by solid phase extraction (SPE), *European committee for standardization*, 2012.
- [11] S. Musil, A.H. Pétursdóttir, A. Raab, H. Gunnlaugsdóttir, E. Krupp, J. Feldmann, Speciation without chromatography using selective hydride generation: Inorganic arsenic in rice and samples of marine origin, *Analytical Chemistry*, vol. 86, no. 2, pp. 993-999, 2014.
- [12] R.R. Rasmussen, Y. Qian, J.J. Sloth, SPE HG-AAS method for the determination of inorganic arsenic in rice - Results from method validation studies and a survey on rice products, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 405, no. 24, pp. 7851-7857, 2013.
- [13] Á.H. Pétursdóttir, H. Gunnlaugsdóttir, E.M. Krupp, J. Feldmann, Inorganic arsenic in seafood: Does the extraction method matter?, *Food Chemistry*, vol. 150, pp. 353-359, 2014.
- [14] J.J. Sloth, F. Cordeiro, R.R. Rasmussen, R.V. Hedegaard, H. Emteborg, I. Verbist, J. Danier, M.B. de la Calle, Determination of inorganic arsenic in animal feed of marine origin. *JRC Scientific and Technical Reports*, 2011.

- [15] AOAC, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.
- [16] W. Horwitz and R. Albert, The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision, *Journal of AOAC international*, vol. 89, no. 4, pp. 1095-1109, 2006.
- [17] AOAC 986.15: Arsenic, cadmium, lead, selenium and zinc in human and pet foods.
- [18] M. B. de la Calle, V. Devesa, Y. Fiamegos and D.Vélez, Determination of Inorganic Arsenic in a Wide Range of Food Matrices using Hydride Generation - Atomic Absorption Spectrometry, *J Vis Exp.*, vol. 127, 2017, doi:10.3791/55953.
- [19] QCVN 8-2:2011/BYT, Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm kim loại nặng trong thực phẩm.
- [20] G.M. dos Santos, D. Pozebon, C. Cerveira and D. P. de Moraes, Inorganic arsenic speciation in rice products using selective hydride generation and atomic absorption spectrometry (AAS), *Microchemical Journal*, vol. 133, pp. 265-271, 2017.
- [21] R. R. Rasmussen, Y. Qian and J. J. Sloth, Anal Bioanal Chem, SPE HG-AAS method for the determination of inorganic arsenic in rice - results from method validation studies and a survey on rice products, *Anal Bioanal Chem*, vol. 405, pp. 7851-7857, 2013.
- [22] A. Terol, M. Marcinkowska, F.Ardini and M. Grotti, Fast Determination of Toxic Arsenic Species in Food Samples Using Narrow-bore High-Performance Liquid-Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analytical Sciences*, vol. 32, no. 8, pp. 911-915, 2016.

Ngày nhận bài: 28/04/2021

Ngày chấp nhận đăng: 03/06/2021