

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH PHÂN TÍCH NGUYÊN DẠNG ARSENIC (As^{III} , As^V , MMA, DMA) TRONG MỘT SỐ LOẠI NÔNG SẢN GIÀU TINH BỘT BẰNG HPLC-ICP MS

● ĐỖ THỊ Tú TRINH - NGUYỄN VĂN ĐÔNG - NGUYỄN HỮU PHÁT

TÓM TẮT:

Các dạng arsen chủ yếu trong nông sản giàu tinh bột (As^{III} , DMA, MMA và As^V) được xác định bằng kỹ thuật HPLC-ICP MS. Nghiên cứu nhằm tìm kiếm quy trình tối ưu trích ly định lượng các dạng arsen từ hạt gạo mà không làm thay đổi dạng tồn tại trong quá trình phân tích. Tác giả tiến hành nghiên cứu 61 mẫu gạo (39 mẫu gạo thường và 22 mẫu gạo hữu cơ) được thu thập từ các siêu thị và trung tâm phân phối thực phẩm dưỡng sinh tại Thành phố Hồ Chí Minh và các nước lân cận trong năm 2019-2020. Mẫu được ly trích trong enzyme α -amylase 2 U, dung dịch HNO_3 2% (v/v) và EtOH 2% (v/v), ở 95°C 90 phút trong bể cách thủy với tốc độ lắc 100 vòng/ phút. Kết quả nghiên cứu cho thấy đã phát triển thành công phương pháp phân tích nguyên dạng arsen bao gồm As^{III} , MMA, DMA và As^V là những dạng tồn tại nhiều nhất trong gạo.

Từ khóa: nguyên dạng arsen, nông sản giàu tinh bột, HPLC-ICP MS.

1. Đặt vấn đề

Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã xếp arsen vào nhóm các kim loại nặng gây độc loại A bao gồm As, Cd, Hg, Pb, Cr [1]. Theo các nghiên cứu trước đây, cây lúa có khả năng hấp thụ arsen cao hơn 30% so với các loại cây nông nghiệp khác [2-4]. Khi cây lúa trồng trên đất nhiễm arsen, arsen có thể được hấp thụ tích lũy ở rễ (80 - 90%), thân (1%), đặc biệt là hạt (0,01%) [5]. Trong cây lúa dạng arsen vô cơ (As^{III} và As^V) cũng như arsen hữu cơ

(DMA và MMA...) được hấp thụ chủ yếu, tuy nhiên arsen vô cơ trong hạt gạo chiếm hơn 20 - 90% tổng lượng arsen [6].

Độc tính của các dạng arsen tỷ lệ nghịch với tốc độ bài tiết khỏi cơ thể: arsine (AsH_3) > As^{III} > As^V > arsen hữu cơ. As^{III} độc hơn As^V do As^{III} có ái lực cao với nhóm sulfhydryl như glutathione (GHS) dẫn đến thời gian tồn tại của As^{III} trong cơ thể khá lâu gây ra nhiều hệ lụy nghiêm trọng với sức khỏe con người [7]. Hai kỹ thuật thường được sử dụng để

tách các dạng arsen là sắc ký ghép cặp ion và sắc ký trao đổi ion. Trong gạo và một số nông sản khác, arsen chủ yếu là As^{III} , As^V , DMA và MMA [8].

Dựa trên hằng số phân ly (pK_a) của từng dạng arsen trong nghiên cứu, phương pháp tối ưu và hiệu quả trong trường hợp này là kỹ thuật sắc ký trao đổi anion. Muối carbonate và muối của các dạng acid hữu cơ có khả năng phân hủy thành các chất dễ bay hơi trong điều kiện plasma nên sẽ không xuất hiện hiện tượng tắc nghẽn vật lý cũng như lắng đọng muối trên skimmer và sample cone của ICP MS trong quá trình phân tích. Các dạng arsen hữu cơ phổ biến như DMA và MMA ổn định trong môi trường trung tính hoặc acid và không bị ảnh hưởng bởi các thành phần trong dung dịch trích ly. Trong hạt gạo, các chất như glutathione (GSH), phytochelatin và metallothionein tạo ra các hợp chất thiolate có ái lực đặc biệt mạnh với As^{III} để tạo thành phức As^{III} -thiolate như As^{III} -diethyldithiocarbamate (DDTC) và As^{III} -pyrrolidine-dithiocarbamate (APDC) [9]. Nghiên cứu hiện tại nhằm tìm kiếm quy trình tối ưu trích ly định lượng các dạng arsen từ hạt gạo mà không làm thay đổi dạng tồn tại trong quá trình phân tích.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

61 mẫu gạo (39 mẫu gạo thường và 22 mẫu gạo hữu cơ) được thu thập từ các siêu thị và trung tâm phân phối thực phẩm dưỡng sinh tại Thành phố Hồ Chí Minh và các nước lân cận trong năm 2019 - 2020. Gạo nội địa có số lượng nhiều nhất (31 mẫu) chiếm khoảng 51% tổng số mẫu, còn lại là gạo Hàn Quốc và Đài Loan. Các loại gạo được lấy mẫu bao gồm Indica (hạt dài), Japonica (hạt ngắn) và Javanica. Mẫu được đưa về phòng thí nghiệm để nghiên cứu bằng máy Cryomill (Retsch, model RET_12020 cho độ mịn cao với kích thước hạt <5 μm), rây qua rây 100 μm và trộn đều. Sau đó, các mẫu này được bảo quản trong lọ nhựa trong suốt ở nhiệt độ 4°C.

2.2. Phương pháp phân tích dạng arsen

Quá trình trích ly được tiến hành qua 3 giai đoạn, cụ thể: Cân 0.50 g (± 0.001 g) mẫu gạo cho vào ống

COD, thêm 50 μL dung dịch enzyme α -amylase 200 U (Merck, Darmstadt, Đức) và 1 mL nước cất. Hỗn hợp được lắc với tốc độ 100 vòng/phút trong bể gia nhiệt 95°C trong vòng 30 phút; tiếp tục thêm 4 mL dung dịch chiết xuất bao gồm tỷ lệ H_2O (Milli-Q Integral water): EtOH 99.9% (Merck) : HNO_3 65% (Merck) = 95:2.5:2.5. Tiếp tục gia nhiệt trong 60 phút và vortex cứ sau 30 phút, ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần cặn được rửa sạch bằng 2 mL nước cất, gộp dịch ly trích thu được sau đó định mức thành 10 mL. Dịch ly trích được ly tâm và lọc qua màng nylon 0.45 μm . Cuối cùng, dịch lọc được đo bằng IC-HPLC (Flexar (Perkin Elmer, USA)) cột PRP-X100 ghép nối ICP-MS (NexION 300x ICP-MS (Perkin Elmer, USA)) để xác định arsen nguyên dạng.

2.3. Tách các dạng arsen bằng kỹ thuật HPLC

Pha động chứa $(NH_4)_2CO_3$ được nghiên cứu để tìm ra các điều kiện tối ưu để tách arsen nguyên dạng trên cột trao đổi anion PRP-X100 (4.6x150 mm, kích thước hạt 5 μm ; Hamilton, NV, USA) trong các mẫu gạo. Nghiên cứu chương trình gradient pha động ở các nồng độ $(NH_4)_2CO_3$ khác nhau từ 20 mM đến 100 mM, 40 mM đến 100 mM và 80 mM đến 100 mM với tốc độ dòng 1 mL phút⁻¹ trên hỗn hợp chuẩn chứa As^{III} , DMA, MMA và As^V (Sigma Aldrich, Singapore) nồng độ 5 ng g⁻¹ (mỗi dạng).

2.4. Thẩm định phương pháp

Phạm vi tuyến tính của từng dạng As được xây dựng với nồng độ thay đổi từ 0.1 đến 2 $\mu g kg^{-1}$ đối với As^{III} , As^V , DMA và MMA. Độ chính xác được đánh giá dựa trên mẫu CRM-7503a (As^{III} , DMA và As^V). Mẫu bột gạo có nồng độ chất phân tích thấp được sử dụng làm mẫu trắng và mẫu thêm chuẩn để xác định MDL và MQL. Các giá trị MDL và MQL tính toán dựa trên dữ liệu thu được từ 11 lần lặp lại toàn bộ quy trình.

3. Kết quả

3.1. Tối ưu điều kiện HPLC-ICP MS

Kết quả của chương trình gradient nồng độ pha động được thể hiện trong Hình 1. Trong 2 phút đầu tiên, pha động có nồng độ nhỏ nhất chứa

(NH₄)₂CO₃ 20 mM đã làm chậm quá trình rửa giải As^{III} (dạng ít được lưu giữ trong cột). Sự gia tăng tỷ lệ phần trăm của (NH₄)₂CO₃ đẩy các dạng arsen bị giữ lại mạnh hơn rửa giải nhanh hơn. Tổng thời gian tách là 12 phút bao gồm 2 phút giữ ở 20% (NH₄)₂CO₃ 100 mM sau đó 7 phút thời gian tăng tốc từ 20% (NH₄)₂CO₃ 100 mM đến 100% (NH₄)₂CO₃ 100 mM và cuối cùng là 3 phút thiết lập lại đến 20% (NH₄)₂CO₃ 100 mM. (Hình 1)

3.2. Tối ưu quá trình chiết xuất nguyên dạng arsen

Đối với chất nền mẫu giàu tinh bột, môi trường acid (HNO₃) cung cấp H⁺ để phá vỡ arsen trong nền gạo do đó giải phóng arsen tự do vào dung dịch. Ngoài ra HNO₃ còn có vai trò bảo vệ As^V bị khử thành As^{III}. Tuy nhiên, ở nồng độ quá cao, HNO₃ thúc đẩy quá trình oxy hóa As^{III} thành As^V cũng như phân hủy các dạng arsen hữu cơ. Thực hiện mẫu không thêm chuẩn và thêm chuẩn As^{III} và As^V 100 ng g⁻¹ đối với hệ dung môi không có sự chuyển dạng arsen. (Bảng 1)

Các thí nghiệm thêm chuẩn As^V 100 ng g⁻¹

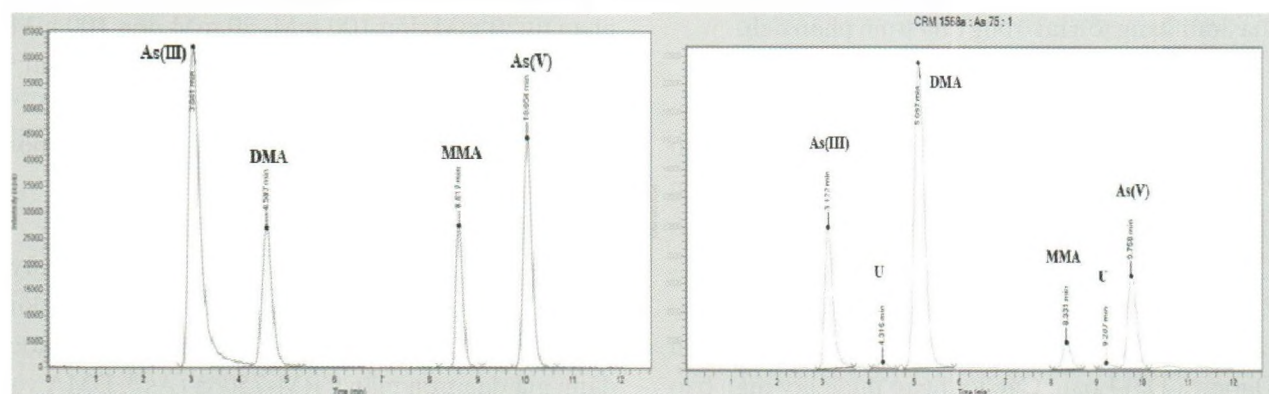
(Bảng 1) cho thấy sự khác biệt về As^{III} nồng độ giữa mẫu được thêm chuẩn (132 ng g⁻¹) và mẫu không thêm (130.9 ng g⁻¹) chênh lệch 0,61% và As^V trong mẫu đã thêm vào (113 ng g⁻¹) và mẫu không thêm (10.7 ng g⁻¹) với hiệu suất thu hồi của phương pháp là 102% đạt từ 80 - 110% theo AOAC, không làm giảm hàm lượng As^V trong quá trình xử lý và phân tích mẫu. Nghiên cứu chứng minh As^V không bị khử thành As^{III} trong môi trường dịch trích ly.

3.3. Ảnh hưởng của enzyme α-amylase

Khi dùng HNO₃ làm dung môi ly trích, dịch sau ly trích có xu hướng tạo keo tủa hồ tinh bột. Theo dõi độ đục của dung dịch (bằng độ hấp thụ ở 750 nm) cho thấy độ hấp thụ của dung dịch đục tăng từ 0.030 - 0.102 Abs sau 24 giờ bảo quản và lên đến 0.245 Abs sau 72 giờ.

Kết quả được trình bày trong Hình 2 cho thấy, phân tích các mẫu được xử lý bằng enzyme, áp suất ngược của hệ thống HPLC trong khoảng 970 - 1035 psi; trong khi các mẫu không được xử lý bằng enzyme cho thấy áp suất ngược lớn hơn dao động (990 - 1230 psi chỉ sau 10 lần phân tích liên tiếp).

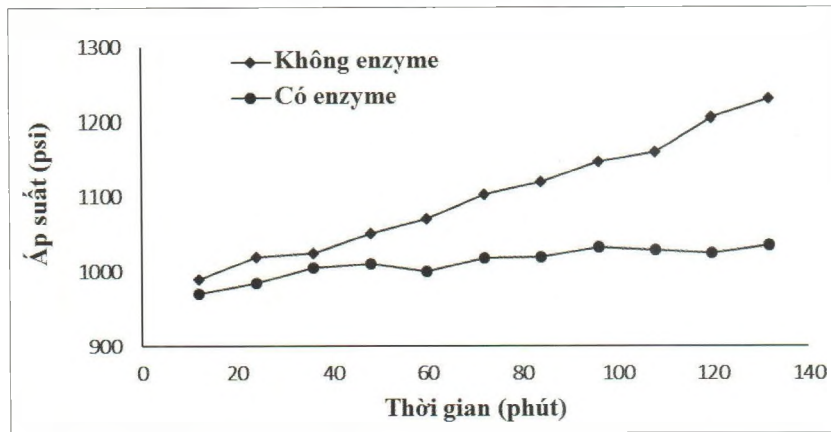
Hình 1: Sắc ký đồ dung dịch chuẩn 5 ngAs g⁻¹ (trái) và mẫu CRM (phải)



Bảng 1. Hàm lượng iAs trong enzyme α-amylase 2 U + EtOH 2% và HNO₃ 2%

Enzyme α-amylase 2 U + EtOH 2% và HNO ₃ 2%	Mẫu không thêm chuẩn		Mẫu thêm chuẩn	
	As ^{III}	As ^V	As ^{III}	As ^V
CAs (ng g ⁻¹) (n=6)				
Ngày 1	130.9 5.2	10.7 1.1	132 20	113 12
Ngày 3	131 12	10.7 1.5	132.9 7.9	113.6 7.9
Ngày 5	133 14	9.9 1.3	136 19	112 11
Hiệu suất thu hồi As ^V (%)	102 6			

Hình 2: Áp suất hệ thống sắc ký theo thời gian



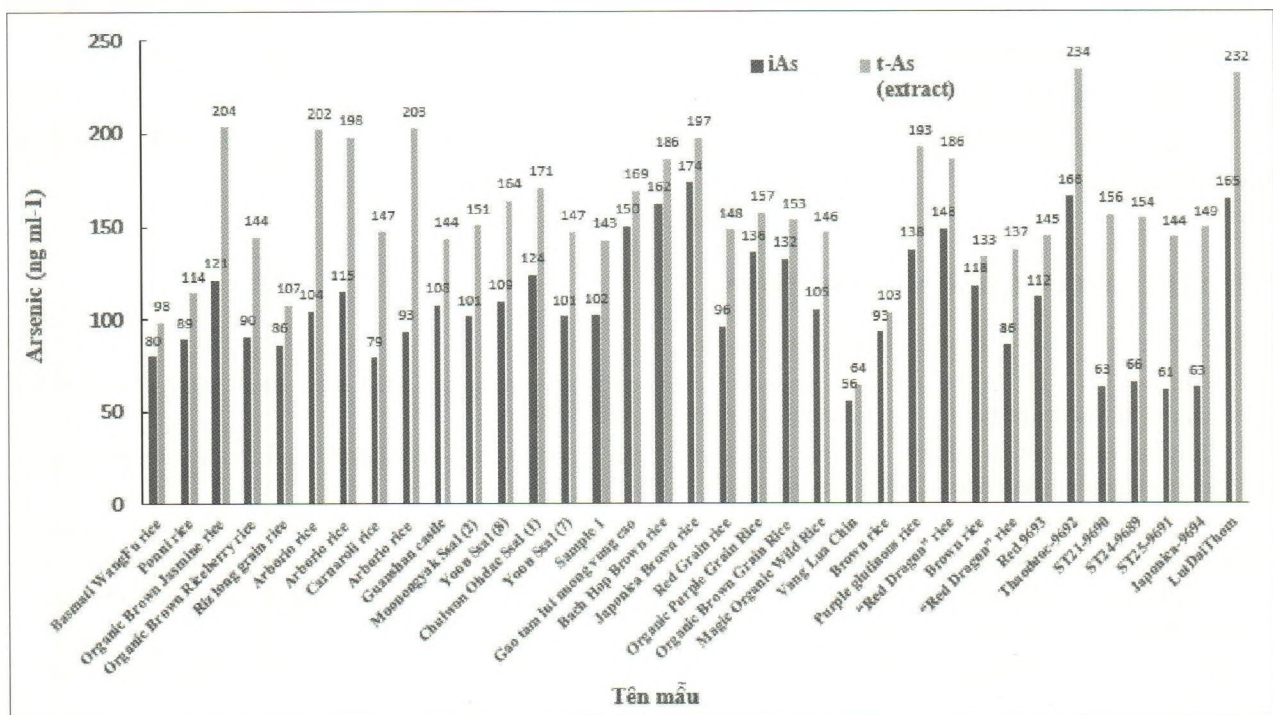
Kết tủa tinh thể tinh bột được tạo ra từ các mẫu không được xử lý bằng enzyme đã hấp thụ một số dạng arsen.

Hàm lượng arsen xác định ngay sau quá trình ly trích không có sự khác biệt đáng kể theo thống kê ($p > 0.05$). Sau 24h bảo quản mẫu, hiện tượng thoái hóa tinh bột bắt đầu xuất hiện và rõ rệt ở mẫu không sử dụng enzyme (Bảng 2). Có enzyme, mẫu bảo

Bảng 2. Hàm lượng As của thí nghiệm ly trích có và không có dùng enzyme giữa các ngày

Thời gian	Đo ngay sau ly trích		24 h		48 h		72 h	
	Có enzyme	Không enzyme	Có enzyme	Không enzyme	Có enzyme	Không enzyme	Có enzyme	Không enzyme
tAs	167.3	164.0	165.7	161.3	165.2	159.8	164.7	158.6
% RSD	2.7	2.4	2.6	2.7	3.1	3.4	3.3	3.6
F _{TN}	0.54	4.71	5.00	11.30				
F _{LT}	4.30							
p-value	0.47	0.041	0.035	0.003				

Hình 3: tAs và iAs trong các mẫu gạo thị trường trong và ngoài nước



quản sau ly trích lâu hơn so với việc không sử dụng enzyme ít nhất 2 ngày theo thống kê.

3.4. Thẩm định phương pháp

Khoảng tuyến tính của từng dạng As có hệ số xác định $R^2 > 0.995$ và đáp ứng các yêu cầu theo hướng dẫn của FDA. Nồng độ tìm thấy của As^{III} , DMA và As^V phù hợp tốt với các giá trị được chứng nhận của CRM-7503a. MMA trong CRM-7503a không được phát hiện, phù hợp với thông tin do nhà sản xuất cung cấp. Các giá trị MDL = 0.03 ng g^{-1} , MQL = 0.10 ng g^{-1} với từng dạng.

3.5. Xác định arsen trong mẫu gạo

Kết quả tAs trong các mẫu thu thập trên thị trường cho thấy mẫu (G8, G19, G10, G11 - mẫu gạo lứt trồng 6 tháng) trong điều kiện thiếu nước có chứa iAs với nồng độ khoảng 65 ng g^{-1} (50% tAs). Trong khi đó, loạt mẫu RI và RL, được trồng trong điều kiện tưới tiêu đầy đủ, chứa hàm lượng tAs cao (236 ng g^{-1}) trong đó iAs chiếm ưu thế (Hình 3).

Phương pháp phân tích có triển vọng ứng dụng trong nghiên cứu các giải pháp tưới tiêu nhằm kiểm soát arsen trong lúa cũng như bảo vệ nguồn nước vốn là chiến lược quan trọng của quốc gia.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phát triển thành công phương pháp phân tích nguyên dạng arsen bao gồm As^{III} , MMA, DMA và As^V là những dạng tồn tại nhiều nhất trong gạo.

Phương pháp phân tích đã được xác nhận trên mẫu chuẩn CRM-7503a với các giá trị MDL và MQL lần lượt là 0.03 ngAs g^{-1} và 0.1 ngAs g^{-1} , các thông số về độ đúng và độ lặp lại của phương pháp cũng đáp ứng yêu cầu của AOAC. Nghiên cứu này là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu và đánh giá thêm về quy trình xử lý mẫu và phân tích mở rộng các nền mẫu giàu cellulose giúp đem đến cái nhìn tổng quát hơn về phương pháp và mở rộng phạm vi áp dụng của phương pháp ■

Lời cảm ơn: Bài viết thuộc đề tài nghiên cứu khoa học mã số - T2021-11 của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. HCM. Nhóm tác giả nghiên cứu trân trọng cảm ơn Trường Đại học Khoa học Tự nhiên đã tài trợ cho đề tài này.

Đóng góp của tác giả:

ĐỖ THỊ TÚ TRINH (Tác giả chính) - Thu thập mẫu tiến hành thử nghiệm, viết bài báo khoa học;

NGUYỄN VĂN ĐÔNG (Thành viên) - Định hướng nghiên cứu;

NGUYỄN HỮU PHÁT (Tác giả liên hệ) - Lên kế hoạch thực hiện nghiên cứu, điều phối công việc, hoàn thiện bài báo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO VÀ TRÍCH DẪN:

1. Website: <https://www.frontiersin.org/articles/full>.
2. Williams, P. N., et al. (2007). Greatly enhanced arsenic shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 6854-6859.
3. Shrivastava, A., et. al. (2019). Arsenic mitigation in rice grain loading via alternative irrigation by proposed water management practices. *Chemosphere*, 238, 124988.
4. Upadhyay, M. K., Yadav, P., Shukla, A., and Srivastava, S. (2018). Utilizing the potential of microorganisms for managing arsenic contamination: A feasible and sustainable approach. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 1-11.
5. S. C. Lin, et. al. (2013). Accumulation of arsenic in rice plant: a study of an arsenic-contaminated site in Taiwan. *Paddy Water Environ*, 13(1), 11-18.
6. M. J. Scott, J. J. Morgan (1995). Reactions at Oxide Surfaces, 1. Oxidation of As^{III} by Synthetic Birnessite. *Environmental Science and Technology*, 1995, 1898-1905.

7. Rubino FM. (2015). Toxicity of Glutathione-Binding Metals: A Review of Targets and Mechanisms. *Toxics*, 3(1), 20-62.
8. H. Chen, Z. Tang, P. Wang, F. J. Zhao (2018). Geographical variations of cadmium and arsenic concentrations and arsenic speciation in Chinese rice. *Environmental Pollution*, 238, 482-490.
9. J. H. Huang, G. Ilgen, P. Fecher (2010). Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25, 800-802.

Ngày nhận bài: 3/7/2023

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 18/7/2023

Ngày chấp nhận đăng bài: 12/8/2023

Thông tin tác giả:

1. ThS. ĐỖ THỊ TÚ TRINH

2. NGUYỄN VĂN ĐÔNG

3. NGUYỄN HỮU PHÁT

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

THE ANALYSIS PROCESS OF INTACT FORMS OF ARSENIC (AS^{III}, AS^V, MMA AND DMA) IN IN SOME STARCH-RICH AGRICULTURAL PRODUCTS BY USING HPLC-ICP MS

- Master. DO THI TU TRINH¹
- NGUYEN VAN DONG¹
- NGUYEN HUU PHAT¹

¹Faculty of Chemistry, University of Natural Sciences,
Vietnam National University - Ho Chi Minh City

ABSTRACT:

In this study, arsenic forms in some starchy agricultural products (As^{III}, As^V, MMA and DMA) is investigated by HPLC-ICP MS. This study is to find the optimal process for quantitative extraction of arsenic forms from rice grains without changing the existing form during the analysis process. This study analyzes 61 rice samples (39 regular rice samples and 22 organic rice samples) collected from supermarkets and nutritional food distribution centers in Ho Chi Minh City and neighboring countries during 2019 - 2020. The arsenic species in samples are digested using 2 U α -amylase enzyme, 2% v/v HNO₃ solution and 2% v/v EtOH solution for 90 minutes at 95°C in the water bath at a speed of 100 rpm. The study successfully develops a method to analyze intact forms of arsenic, including As^{III}, MMA, DMA and As^V, which are the most abundant arsenic forms in rice.

Keywords: intact forms of arsenic, starchy agricultural products, HPLC-ICP MS.