

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Nguyễn Minh Châu**

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH ĐÁNH GIÁ HÀM LƯỢNG IODIDE  
VÀ IODATE TRONG MỘT SỐ SẢN PHẨM TỪ SỮA BẰNG  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG GHEP NỐI KHÓI PHỔ  
NGUYÊN TỬ NGUỒN PLASMA CẢM ỨNG CAO TẦN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA PHÂN TÍCH**

*Hà Nội – 2023*

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Nguyễn Minh Châu**

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH ĐÁNH GIÁ HÀM LƯỢNG IODIDE  
VÀ IODATE TRONG MỘT SỐ SẢN PHẨM TỪ SỮA BẰNG  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG GHEP NỐI KHỐI PHỔ  
NGUYÊN TỬ NGUỒN PLASMA CẢM ỨNG CAO TẦN**

Chuyên ngành: Hoá phân tích  
Mã số: 8440118

**LUẬN VĂN THẠC SĨ HÓA PHÂN TÍCH**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**  
TS. Dương Tuấn Hưng

*Hà Nội – 2023*

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan kết quả nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm.*

**Tác giả**

**Nguyễn Minh Châu**

## LỜI CẢM ƠN

*Luận văn này được hoàn thành tại Viện Hoá học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc Gia.*

*Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc, sự khâm phục và kính trọng nhất tới TS. Dương Tuấn Hưng - Người đã tận tâm hướng dẫn chỉ dạy cho tôi về mặt chuyên môn, và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn lãnh đạo và các đồng nghiệp khoa Kim loại vi khoáng – Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia về sự ủng hộ to lớn, những lời khuyên bổ ích và những góp ý quý báu trong việc thực hiện và hoàn thiện luận văn.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hóa học và Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc Gia đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học.*

*Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới toàn thể gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.*

*Xin trân trọng cảm ơn!*

## MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	iii
Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt.....	v
Danh mục bảng.....	vi
Danh mục hình.....	vii
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	5
1.1. TỔNG QUAN CHUNG VỀ IODINE, DẠNG IODINE VÀ VAI TRÒ CỦA CHÚNG ĐỐI VỚI SINH HÓA CON NGƯỜI.....	5
1.1.1. Tổng quan chung về iodine và các dạng tồn tại của iodine.....	5
1.1.2. Ảnh hưởng của iodine và các dạng iodine (iodide, iodate) đối với sinh hóa con người.....	9
1.1.3. Hàm lượng, sự phân bố và sự chuyển hóa các dạng iodine (iodide, iodate) trong thực phẩm.....	11
1.2. TỔNG QUAN CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH.....	13
1.2.1. Các phương pháp xác định iodine tổng số.....	14
1.2.2. Các phương pháp xác định dạng iodine.....	17
1.2.2.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	17
1.2.2.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam.....	19
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	23
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23
2.2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất.....	26
2.2.2. Chuẩn bị hóa chất, chất chuẩn.....	28
2.2.3. Tối ưu hóa điều kiện phân tích iodide và iodate trên HPLC-ICP-MS.....	29
2.2.3.1. Điều kiện phân tích trên ICP-MS.....	29
2.2.3.2. Điều kiện phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).....	30
2.2.4. Tối ưu hóa quy trình xử lý mẫu.....	30
2.2.4.1. Xử lý sơ bộ và bảo quản mẫu.....	30
2.2.4.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu sữa.....	30

2.2.5. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp .....	31
2.2.6. Phân tích mẫu, xử lý số liệu, đánh giá kết quả phân tích .....	33
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	<b>34</b>
3.1. TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN PHÂN TÍCH IODINE BẰNG ICP-MS .....	34
3.1.1. Lựa chọn số khối phân tích.....	34
3.1.2. Tối ưu các điều kiện trên ICP-MS .....	34
3.2. TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN PHÂN TÍCH TRÊN HỆ THỐNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC) .....	36
3.2.1. Khảo sát thành phần pha động.....	36
3.2.2. Khảo sát tốc độ dòng .....	37
3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ boric acid trong pha động .....	39
3.2.4. Khảo sát pH pha động.....	40
3.2.5. Điều kiện tối ưu trên hệ thiết bị HPLC-ICP-MS .....	42
3.3. TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN XỬ LÝ MẪU .....	43
3.3.1. Khảo sát dung môi chiết .....	44
3.3.2. Khảo sát tác nhân kết tủa protein.....	46
3.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết mẫu.....	49
3.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết mẫu.....	52
3.4. XÁC NHẬN GIÁ TRỊ SỬ DỤNG CỦA PHƯƠNG PHÁP .....	55
3.4.1. Xây dựng đường chuẩn.....	55
3.4.2. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp.....	57
3.4.3. Độ lặp lại.....	59
3.4.4. Độ thu hồi .....	60
3.4.5. So sánh phương pháp .....	63
3.5. PHÂN TÍCH MẪU THỰC .....	64
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b> .....	<b>71</b>
<b>PHỤ LỤC</b> .....	<b>73</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	<b>74</b>

### Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt

<b>Kí hiệu</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Diễn giải</b>
AAS	Atomic Absorption Spectroscopy	Phổ hấp thụ nguyên tử
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Hiệp hội các nhà hóa học phân tích chính thức
EU	European Union	Ủy ban châu Âu
FDA	Food and Drug Administration	Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ
HPAEC-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection	Sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao với detector xung ampe
HPLC-ICP-MS	High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	Sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ nguyên tử nguồn plasma cảm ứng cao tần
IC-DC	Ion Chromatography with Conductivity Detector	Sắc ký ion với đầu dò độ dẫn
LD <sub>50</sub>	Lethal Dose	Liều lượng gây chết trung bình
LOD	Limit of Detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of Quantification	Giới hạn định lượng
QCVN		Quy chuẩn Việt Nam
SD	Standard Deviation	Độ lệch chuẩn
TCVN		Tiêu chuẩn Việt Nam
UV-Vis	Ultraviolet - Visible Spectroscopy	Phổ hấp thụ quang phân tử tử ngoại khả kiến
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

## Danh mục bảng

Bảng 1.1. Dạng iodine tồn tại trong các đối tượng mẫu (Ref [10]) .....	7
Bảng 1.2. Một số phương pháp phân tích Iodine tổng số và dạng Iodine .....	20
Bảng 2.1. Thông tin các mẫu nghiên cứu .....	23
Bảng 3.1. Các thông số tối ưu tự động của thiết bị ICP-MS .....	34
Bảng 3.2. Các thông số tiêu chuẩn cần đáp ứng của hệ ICP-MS Nexion 350X .....	35
Bảng 3.3. Các điều kiện tối ưu phân tích dạng iodine trên hệ thiết bị HPLC- ICP-MS.....	43
Bảng 3.4. Các thông số đánh giá đường chuẩn phân tích.....	56
Bảng 3.5. Giới hạn phát hiện iodide, iodate trên nền mẫu sữa bột, sữa lỏng .	57
Bảng 3.6. Giới hạn định lượng iodide, iodate trên nền mẫu sữa bột, sữa lỏng .....	57
Bảng 3.7. Kết quả phân tích lặp lại mẫu sữa bột .....	59
Bảng 3.8. Kết quả phân tích lặp lại mẫu sữa lỏng .....	59
Bảng 3.9. Độ thu hồi trên nền mẫu sữa bột.....	61
Bảng 3.10. Độ thu hồi trên mẫu sữa lỏng .....	62
Bảng 3.11. Kết quả phân tích các mẫu trên hai thiết bị ICP-MS và HPLC-ICP- MS .....	63
Bảng 3.12. Kết quả phân tích mẫu thực .....	64
Bảng 3.13. Hàm lượng iodide, iodate, tổng iodine và iodine theo công bố (trên nhãn sản phẩm) của các sản phẩm sữa.....	65



## Danh mục hình

Hình 1.1. Sự chuyển hoá của các dạng iodine trong quá trình xử lý nhiệt.....	12
Hình 1.2. Sơ đồ cấu tạo hệ thống ICP-MS.....	16
Hình 2.1. Sơ đồ khối hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao.....	25
Hình 2.2. Sơ đồ khối hệ thống HPLC-ICP-MS .....	26
Hình 2.3. Hệ thống ICP-MS Nexion 350X (Perkin Elmer, Hoa Kỳ) .....	27
Hình 2.4. Xác định LOD bằng cách tính S/N .....	32
Hình 3.1. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động 1 .....	36
Hình 3.2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động 2.....	37
Hình 3.3. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện tốc độ dòng: 0,65 ml/phút .....	38
Hình 3.4. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện tốc độ dòng: 0,75 ml/phút .....	38
Hình 3.5. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện tốc độ dòng: 0,85 ml/phút .....	38
Hình 3.6. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ boric acid trong pha động.....	39
Hình 3.7. Sắc ký đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ boric acid trong pha động .....	40
Hình 3.8. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 6,0.....	41
Hình 3.9. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 6,5 .....	41
Hình 3.10. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 7,0.....	41
Hình 3.11. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 7,5 .....	42
Hình 3.12. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 8,0.....	42
Hình 3.13. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột khi chiết trong nước deion .....	44
Hình 3.14. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột khi chiết trong dung dịch .....	45

Hình 3.15. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột khi chiết trong dung dịch acetic acid 4% .....	45
Hình 3.16. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột khi chiết trong dung dịch ACN 20%.....	45
Hình 3.17. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với tác nhân kết tủa protein là TCA .....	47
Hình 3.18. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với tác nhân kết tủa protein là Carrez I, Carrez II.....	47
Hình 3.19. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với tác nhân kết tủa protein là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	47
Hình 3.20. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thể tích Carrez I, Carrez II là 1 mL .....	48
Hình 3.21. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết 30 °C .....	49
Hình 3.22. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết 40 °C .....	50
Hình 3.23. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết 50 °C .....	50
Hình 3.24. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết 60 °C .....	50
Hình 3.25. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết 70 °C .....	51
Hình 3.26. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đối với dạng iodide và iodate .....	51
Hình 3.27. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 10 phút .....	52
Hình 3.28. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 20 phút .....	53
Hình 3.29. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 30 phút .....	53
Hình 3.30. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 40 phút .....	53
Hình 3.31. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 50 phút .....	54
Hình 3.32. Ảnh hưởng của thời gian chiết đối với hàm lượng dạng iodide và iodate .....	54
Hình 3.33. Quy trình xử lý mẫu tối ưu.....	55
Hình 3.34. Đường chuẩn xác định Iodate .....	56
Hình 3.35. Đường chuẩn xác định Iodide .....	56
Hình 3.36. Sắc ký đồ của Iodate tại LOD trên nền sữa bột .....	58
Hình 3.37. Sắc ký đồ của Iodide tại LOD trên nền sữa bột .....	58
Hình 3.38. Sắc ký đồ của Iodide tại LOD trên nền sữa lỏng .....	58
Hình 3.39. Sắc ký đồ của Iodate tại LOD trên nền sữa lỏng .....	59

Hình 3.40. Hàm lượng iodide và iodine tổng số trong các sản phẩm sữa bột 67

Hình 3.41. Hàm lượng iodide trong các sản phẩm sữa..... 68

## MỞ ĐẦU

Iodine là một trong những nguyên tố vi lượng cần thiết cho sự sống của nhiều sinh vật, đặc biệt đóng vai trò quan trọng đối với sự phát triển của cơ thể con người. Iodine là vi chất dinh dưỡng giúp tuyến giáp tổng hợp hormone điều chỉnh quá trình phát triển của hệ thần kinh trung ương, hệ sinh dục và các bộ phận khác trong cơ thể như hệ tuần hoàn, hệ tiêu hóa, hệ bài tiết, giúp duy trì năng lượng cho cơ thể hoạt động. Ngoài ra, iodine còn tham gia vào quá trình chuyển hóa beta – caroten thành vitamin A, quá trình tổng hợp protein hay hấp thụ glucit trong ruột non...

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), thiếu iodine là nguyên nhân dinh dưỡng hàng đầu gây chậm phát triển trí tuệ, ảnh hưởng đến hơn 1 tỷ người trên toàn thế giới, hầu hết là trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Đối với phụ nữ mang thai, thiếu iodine gây ra sự chậm phát triển của thai nhi, đôi khi dẫn đến dị tật bẩm sinh, thai lưu [1].

Iodine có thể được cung cấp cho cơ thể qua nhiều nguồn khác nhau. Hai nguồn cung cấp iodine chính hiện nay đang được sử dụng để bổ sung cho cơ thể con người là iodine có nguồn gốc tự nhiên như trong sữa và chế phẩm sữa, trứng, rong biển... hoặc các chế phẩm bổ sung iodine (muối iodine, thực phẩm bảo vệ sức khỏe...). Hiện nay nhiều nghiên cứu y khoa đã chỉ ra ảnh hưởng xấu của việc tiêu thụ nhiều muối đối với sức khỏe con người. Do đó, sữa và các chế phẩm sữa hay phổ biến hơn là các sản phẩm dinh dưỡng công thức ngày càng trở thành nguồn cung cấp iodine chính cho con người thông qua chế độ ăn hàng ngày. Theo dữ liệu về lượng thức ăn tiêu thụ của từng Quốc gia thì sữa và các chế phẩm sữa đóng góp 13 – 64% lượng iodine khuyến nghị hàng ngày [2].

Bên cạnh đó, trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ thường dựa vào sữa công thức để bổ sung các chất dinh dưỡng thiết yếu trong quá trình phát triển ban đầu. Do đó, trên phương diện quản lý đối với các sản phẩm dinh dưỡng công thức cho trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ và phụ nữ mang thai, các quy định thường được đưa ra với các tiêu chuẩn cao về các chỉ tiêu dinh dưỡng và chỉ tiêu an toàn. Hiện nay ở Việt

Nam mới chỉ quy định hàm lượng tối thiểu các nguyên tố khoáng và vi lượng cần thiết trong các sản phẩm sữa công thức, như Thông tư 31/2019/TT-BYT quy định hàm lượng iodine tối thiểu đối với các sản phẩm sữa tươi dùng trong chương trình sữa học đường là 14,3  $\mu\text{g}/100\text{mL}$  [3]. Tuy nhiên việc tiêu thụ quá ít hoặc quá nhiều iodine đều khiến cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ dễ mắc các vấn đề liên quan đến sức khỏe đặc biệt là về tuyến giáp.

Hàm lượng iodine trong sữa và chế phẩm sữa thường không ổn định do giống bò, nguồn thức ăn cho bò có bổ sung các hoạt chất chứa iodine, chế phẩm sát khuẩn núm vú được sử dụng sau mỗi lần vắt cũng như quá trình xử lý nhiệt như sấy, thanh trùng, tiệt trùng. Iodine thường được bổ sung trong chế độ ăn dưới dạng KI hoặc  $\text{KIO}_3$ . Tuy nhiên, trong quá trình chăn nuôi cũng như quá trình sản xuất sữa tại các nhà máy, iodine thường bị chuyển hóa giữa các dạng tồn tại và mất đi do hiện tượng thăng hoa thành  $\text{I}_2$ . Điển hình là năm 2012, Trung tâm an toàn thực phẩm Hồng Kông thông báo hai loại sữa của Nhật Bản là Wakodo 850g và Morinaga 850g có hàm lượng iodine thấp hơn nhiều so với tiêu chuẩn của Ủy ban tiêu chuẩn quốc tế về thực phẩm (Codex) [4].

Bên cạnh đó, khả năng hấp thụ cũng như hoạt tính sinh học của iodine phụ thuộc vào dạng tồn tại và hàm lượng của từng dạng trong thực phẩm. Iodide và iodate là hai dạng tồn tại phổ biến của iodine trong tự nhiên. Iodide được báo cáo là có hoạt tính sinh học cao hơn cũng như khả năng hấp thụ tốt hơn iodate. Iodide tuy kém bền hơn nhưng lại ít thể hiện độc tính hơn iodate, cụ thể khi đánh giá chỉ số  $\text{LD}_{50}$  trên chuột qua đường uống thì iodide là 3320 mg/kg thể trọng [5] trong khi iodate là 500 – 1100 mg/kg thể trọng [5, 6].

Vấn đề hao hụt iodine trong quá trình lấy và sản xuất sữa cũng như chế phẩm sữa có thể là một trong những nguyên nhân chính dẫn đến hiện tượng các sản phẩm từ sữa có hàm lượng iodine không đảm bảo theo quy định. Do đó, để đánh giá chất lượng các sản phẩm từ sữa ngoài xác định hàm lượng iodine tổng số, việc phân tích các dạng tồn tại của iodine (iodide, iodate) là hết sức cần thiết.

Các phương pháp xác định iodine ở dạng iodide và iodate đã được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới quan tâm và phát triển. Một số phương pháp trước

đây thường sử dụng chiết chọn lọc sau đó phân tích bằng hệ thống sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao với detector xung ampe (HPAEC-PAD), sắc ký ion với detector độ dẫn (IC-CD) và detector UV-Vis, hoặc bằng sắc ký loại trừ kích thước (SEC) kết hợp với khối phổ plasma cảm ứng cao tần (ICP-MS). Tuy nhiên các phương pháp này đều có nhiều hạn chế như giới hạn phát hiện lớn, dễ bị ảnh hưởng bởi nền mẫu, quá trình xử lý mẫu phức tạp, tốn nhiều thời gian. Những năm gần đây sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp với phép đo khối phổ plasma cảm ứng cao tần (HPLC-ICP-MS) đã được sử dụng rộng rãi và trở thành một công cụ hiệu quả để xác định các dạng kim loại trong nhiều đối tượng mẫu khác nhau, do giới hạn phát hiện thấp, độ ổn định và chính xác cao, cùng với khả năng xử lý nhiều nền mẫu phức tạp.

Xuất phát từ những luận điểm đó, tôi đã lựa chọn đề tài “*Nghiên cứu phân tích đánh giá hàm lượng iodide và iodate trong một số sản phẩm từ sữa bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ nguyên tử nguồn plasma cảm ứng cao tần*”.

**Mục tiêu của nghiên cứu:**

- Xây dựng quy trình phân tích đồng thời iodide và iodate trong một số sản phẩm từ sữa bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ nguyên tử nguồn plasma cảm ứng cao tần (HPLC-ICP-MS).

- Ứng dụng phân tích và đánh giá chất lượng một số sản phẩm sữa trên thị trường.

**Nội dung nghiên cứu bao gồm:**

1. Nghiên cứu tổng quan về iodine, các dạng tồn tại của iodine (iodide, iodate) và phương pháp xác định iodine cũng như các dạng tồn tại của iodine (iodide, iodate);
2. Nghiên cứu tối ưu điều kiện phân tích đồng thời iodide và iodate trên hệ thống HPLC-ICP-MS;
3. Nghiên cứu tối ưu quy trình xử lý mẫu phân tích đồng thời iodide và iodate trong một số sản phẩm sữa hiện nay trên thị trường ;
4. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích đồng thời iodide và iodate bằng HPLC-ICP-MS;

5. Ứng dụng quy trình phân tích đồng thời iodide và iodate trong sữa và một số sản phẩm từ sữa trên thị trường hiện nay.

**Những đóng góp của luận văn:**

Dạng iodide với hoạt tính sinh học cao hơn, ít thể hiện độc tính và khả năng hấp thụ vào cơ thể con người tốt hơn iodate. Tuy nhiên iodide được cho là kém bền hơn iodate, dễ thất thoát trong quá trình sản xuất như sấy, thanh trùng, tiệt trùng. Chính vì thế nghiên cứu tập trung vào xác định các dạng tồn tại của iodine trong một số sản phẩm sữa như sữa công thức, sữa tươi, sữa chua... có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao. Nghiên cứu cung cấp một quy trình phân tích đồng thời hai dạng iodide và iodate trong các sản phẩm từ sữa bằng phương pháp HPLC-ICP-MS dựa trên trang thiết bị hiện đại và ngày càng trở lên phổ biến tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu không chỉ giúp người tiêu dùng đánh giá được sơ bộ thành phần dinh dưỡng, cụ thể là hàm lượng các dạng iodine trong các sản phẩm sữa, mà còn giúp cho các cơ quan chức năng có cơ sở khoa học để kiểm soát chất lượng các sản phẩm sữa trên thị trường.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. TỔNG QUAN CHUNG VỀ IODINE, DẠNG IODINE VÀ VAI TRÒ CỦA CHÚNG ĐỐI VỚI SINH HÓA CON NGƯỜI

#### 1.1.1. Tổng quan chung về iodine và các dạng tồn tại của iodine

Iodine được phát hiện vào năm 1811 bởi nhà hóa học người Pháp Bernard Courtois (1777-1838) [7, 8]. Iodine là một phi kim thuộc nhóm halogen (VIIA) trong bảng hệ thống tuần hoàn. Ở nhiệt độ thường, iodine có dạng tinh thể màu xám. Khi đun nóng, iodine bị thăng hoa tạo thành chất khí màu tím hồng có mùi khó chịu, có thể gây tổn thương nghiêm trọng cho mắt, mũi và niêm mạc họng. Iodine chỉ tan ít trong nước, nhưng lại hòa tan trong nhiều chất lỏng khác để tạo ra dung dịch màu tím đặc trưng. Iodine có thể nóng chảy ở 113,5 °C (236,3 °F) và sôi ở 184 °C (363 °F) [7].

So với các nguyên tố hóa học khác cùng nhóm thì iodine kém hoạt động hơn. Các hợp chất phổ biến nhất của iodine là hợp chất của các kim loại kiềm như sodium (natri) và potassium (kali). Ngoài ra nó còn tạo hợp chất với một số halogen khác như iodine monobromide (IBr), iodine monochloride (ICl) và iodine pentafluoride (IF<sub>5</sub>) [7].

Thuộc tính quan trọng nhất của iodine là có khả năng tiêu diệt vi trùng. Do đó, iodine được ứng dụng trong sản xuất thuốc sát trùng và một số ứng dụng y tế khác [8].

Iodine có đến 42 đồng vị, tuy nhiên trong đó chỉ có duy nhất đồng vị <sup>127</sup>I là bền, ổn định và được tìm thấy nhiều nhất trong tự nhiên. Các đồng vị còn lại đều là đồng vị phóng xạ. Hầu hết các đồng vị này được ứng dụng vào hai mục đích chính là thương mại và y tế. Trong các ứng dụng y tế, các đồng vị này được đưa vào cơ thể bệnh nhân qua đường miệng. Các đồng vị sau đó đi khắp cơ thể theo máu. Khi di chuyển trong cơ thể con người, chúng phát ra bức xạ. Bức xạ đó có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phim X-quang. Thông qua các mô hình bức xạ đó, các chuyên gia y tế có thể nhận biết cơ thể đó hoạt động thế nào [7].

Mỗi đồng vị iodine được ứng dụng trong y tế theo nhiều cách khác nhau.



Đồng vị  $^{123}\text{I}$  được ứng dụng trong các nghiên cứu về não, thận và tuyến giáp. Đồng vị  $^{125}\text{I}$  được ứng dụng trong các nghiên cứu về tuyến tụy, tuyến giáp, gan, và sự hấp thụ khoáng chất trong xương. Đồng vị  $^{131}\text{I}$  thì được ứng dụng trong các nghiên cứu về gan, thận, phổi, não, tuyến tụy và tuyến giáp [7].

Thông thường iodine được sản xuất từ nước biển hoặc nước muối chiết xuất từ các giếng dầu có chứa tới 150 mg  $\text{I}_2/\text{L}$ . Các tạp chất như đất sét, cát và dầu được loại bỏ bằng cách lọc bỏ, dung dịch sau lọc được đưa qua một luồng sulphur dioxide rồi qua một số thùng chứa các bó dây đồng. Copper diiodide hình thành tiếp tục được loại bỏ bằng cách lọc, rửa bằng nước, sấy khô và nghiền mịn. Sản phẩm sau đó được đun nóng với potassium cacbonate để tạo ra potassium iodide, cuối cùng iodine được tạo thành là sản phẩm của phản ứng oxy hóa với dichromate và sulfuric acid [9].

Bên cạnh đó, iodine còn được điều chế tại các phòng thí nghiệm từ nguồn nguyên liệu tự nhiên như tảo bẹ, rong biển và một số loài cây khác do đặc tính hấp thụ iodine của chúng trong quá trình sinh trưởng. Theo quy trình này, rong biển được sấy khô và đốt cháy ở nhiệt độ cao; tro được hòa tan vào nước; lọc lấy dung dịch, cô dung dịch sau lọc đến khi muối bị kết tinh lại, các muối sau kết tinh như sodium sulfate (natri sulfat) và sodium chloride (natri clorua) được loại bỏ; dung dịch còn lại được cô đặc bằng cách làm bay hơi nước. Gạn lấy phần nước trong là muối của iodine. Dùng khí chlorine ( $\text{Cl}_2$ ) hay  $\text{MnO}_2$  và  $\text{H}_2\text{SO}_4$  để oxy hóa I trong dung dịch thành  $\text{I}_2$ , sau đó cho  $\text{I}_2$  thăng hoa ta sẽ thu được iodine [9].

Trong các hợp chất, iodine tồn tại ở nhiều trạng thái oxy hóa khác nhau: -1, 0, +1, +3, +5, +7 và dễ dàng bị chuyển hóa giữa các dạng oxy hóa trong những điều kiện nhất định. Các dạng của iodine có liên quan đến việc vận chuyển iodine từ không khí, đất, nước vào thực phẩm và từ thực phẩm đến cơ thể con người. Trong nước, hầu hết iodine tồn tại ở dạng iodide và iodate. Trong cơ thể người và động vật có vú khác, iodine được tuyến giáp tổng hợp để sinh tổng hợp hormone triiodothyronine ( $\text{T}_3$ ) và Thyroxine ( $\text{T}_4$ ), ngoài  $\text{T}_3$ ,  $\text{T}_4$  thì iodine cũng tồn tại dưới dạng monoiodotyrosine (MIT), diiodotyrosine (DIT), reverse triiodothyronine ( $\text{rT}_3$ ) giúp liên kết protein trong tuyến giáp với các mô.

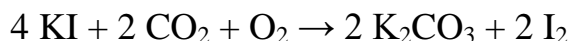
Trong sữa, hầu hết iodine được tìm thấy dưới dạng iodide, ngoài ra có một số hợp chất iodine dạng hữu cơ [10].

*Bảng 1.1. Dạng iodine tồn tại trong các đối tượng mẫu [10]*

<b>Dạng iodine</b>	<b>Công thức hóa học</b>	<b>Nền mẫu</b>
Iodide	$I^-$	Nước, động vật, sữa
Iodate	$IO_3^-$	Nước, sữa
Elemental iodine	$I_2$	Không khí
Periodate	$IO_4^-$	Nước
Hypiodite	$IO^-$	Không khí, nước
Methyl iodide	$CH_3I$	Không khí, nước
Methyl di-iodide	$CH_2I_2$	Không khí, nước
Ethyl iodide	$C_2H_5I$	Không khí, nước
Propyl iodide	$C_3H_7I$	Không khí, nước
Butyl iodide	$C_4H_9I$	Không khí, nước
Methyl iodide bromide	$CH_2BrI$	Không khí, nước
Triiodothyronine	$C_{15}H_{12}I_3NO_4$	Động vật, sữa
Thyroxine	$C_{15}H_{11}I_4NO_4$	Động vật, sữa
Monoiodotyrosine	$C_9H_{10}INO_3$	Động vật, sữa
Diiiodotyrosine	$C_9H_9I_2NO_3$	Động vật, sữa
Reverse triiodothyronine	$C_{15}H_{12}I_3NO_4$	Động vật, sữa

Tuy nhiên trong tự nhiên, iodine tồn tại chủ yếu ở hai dạng là iodide và iodate nên trong nghiên cứu này chỉ tập trung phân tích, đánh giá hàm lượng và ảnh hưởng của hai dạng này đối với cơ thể con người.

Iodide là chất khử mạnh, nó dễ dàng bị oxy hóa bởi các hợp chất oxy hóa mạnh như sulfuric acid đặc, potassium permanganate ( $\text{KMnO}_4$ ), khí chlorine ( $\text{Cl}_2$ ):



Đây chính là căn cứ khoa học trong việc lựa chọn pha động hay dung môi chiết, việc sử dụng các pha động hay dung môi chiết có tính oxy hóa mạnh như  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ... trong phân tích các kim loại và phi kim thông thường sẽ làm chuyển hóa iodide thành iodine. Mặc dù iodide không màu, nhưng trong các dung dịch iodide có thể có màu hơi nâu do quá trình oxy hóa iodide thành iodine bằng oxy trong khí quyển. Các phân tử của iodine ( $\text{I}_2$ ) tạo thành lại kết hợp với iodide để tạo thành polyiodua ( $\text{I}_2 + \text{I}^- \rightarrow \text{I}_3^-$ ) [8].

Iodine thể hiện trạng thái oxy hóa +5 trong iodic acid mạnh ( $\text{HIO}_3$ ), có thể dễ dàng khử nước để tạo ra chất rắn màu trắng iodate pentoxide ( $\text{I}_2\text{O}_5$ ).

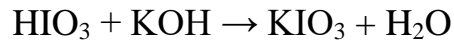
Iodate phổ biến nhất là potassium iodate có công thức hóa học  $\text{KIO}_3$ . Potassium iodate ( $\text{KIO}_3$ ) là một hợp chất gồm các ion  $\text{K}^+$  và  $\text{IO}_3^-$  theo tỷ lệ 1:1, khối lượng mol của nó là 214 g/mol, nhiệt độ nóng chảy là 560 °C. Trái ngược với iodide thì iodate lại có tính oxy hóa nên việc lựa chọn dung môi cũng như pha động hay tác nhân trong quá trình chiết cần tránh sử dụng các chất có tính khử. Potassium iodate là một chất rắn màu trắng không mùi, với các tinh thể mịn và cấu trúc tinh thể của loại đơn hình. Ở nhiệt độ cao hơn, nó trải qua phản ứng phân hủy nhiệt, giải phóng oxy phân tử và potassium iodide:



Trong nước, potassium iodate có độ hòa tan thay đổi từ 4,74 g/100mL tại 0 °C; đến 32,3 g/100mL ở 100 °C, tạo thành dung dịch nước không màu. Ngoài ra, potassium iodate không tan trong ethanol và nitric acid, nhưng hòa tan trong sulfuric acid loãng [11].

Potassium iodate là một chất oxy hóa mạnh nên nó có thể gây ra hỏa

hoạn nếu tiếp xúc với vật liệu dễ cháy hoặc các chất khử. Potassium iodate có thể được điều chế bằng cách cho một base chứa potassium như potassium hydroxide với iodic acid [11]:



### **1.1.2. Ảnh hưởng của iodine và các dạng iodine (iodide, iodate) đối với sinh hóa con người**

Trong cơ thể người, iodine chỉ chiếm một lượng rất nhỏ nhưng nó đóng vai trò quan trọng cho sự phát triển của cơ thể cả về thể chất lẫn trí tuệ. Iodine tham gia vào quá trình điều hòa hoạt động trao đổi chất trong cơ thể con người. Do đó, thiếu hụt iodine có thể ngăn cản sự tăng trưởng và phát triển bình thường, đặc biệt đối với phụ nữ mang thai có thể gây sảy thai, thai lưu, còn đối với trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ gây suy giảm nhận thức, còi cọc, chậm phát triển [9].

Iodine đóng vai trò quan trọng trong việc tổng hợp hormone tuyến giáp thyroxin, là hormone điều chỉnh quá trình phát triển của hệ thần kinh trung ương, hệ sinh dục, tim mạch và một số bộ phận khác trong cơ thể. Cụ thể khi cơ thể hấp thụ, iodine được vận chuyển vào tuyến giáp dưới dạng iodide, liên kết với tyroxine có trong thyroglobulin để tạo thành iodotyrosine. Thông qua cơ chế ghép nối, tiền chất 3-monoiodotyrosine (MIT) và 3,5-diiodotyrosine (DIT) kết hợp để tạo thành hormone tuyến giáp 3,5,3',5'-tetraiodothyronine thường được gọi là thyroxine (T4) và 3,5,3'-triiodothyronine (T3). Những hormone này đóng một vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh hoạt động của tế bào, tăng trưởng và phát triển não bộ [10].

Ngoài ra, iodine còn có vai trò trong việc chuyển hóa beta - caroten thành vitamin A, tổng hợp protein hay hấp thụ đường trong ruột non [11].

Bên cạnh những lợi ích với sức khỏe, việc bổ sung quá nhiều iodine trong khẩu phần ăn cũng tiềm ẩn những ảnh hưởng không tốt với sức khỏe con người. Lượng iodine cao thường được dung nạp tốt ở hầu hết những người khỏe mạnh và không gây ra vấn đề gì về sức khỏe. Điển hình như ở một số quốc gia như Hàn Quốc, Nhật Bản, người dân thường xuyên ăn rong biển là nguồn iodine dồi dào nhưng cũng không có những ảnh hưởng lớn đối với sức khỏe. Tuy

nhiên, ở một số người mắc bệnh tuyến giáp tự miễn hoặc có tiền sử thiếu iodine mãn tính có thể nhạy cảm với việc bổ sung thêm iodine. Dư thừa iodine cũng có thể dẫn đến sản xuất quá nhiều hormone tuyến giáp, gây bệnh cường giáp; dấu hiệu của tình trạng này là sự trao đổi chất gia tăng với các biểu hiện như tăng nhịp tim, chân tay run, khó thở, mệt mỏi [12]. Một số nghiên cứu dịch tễ học đã chỉ ra rằng tiêu thụ nhiều rong biển có liên quan đến việc tăng nguy cơ mắc một số loại ung thư tuyến giáp, đặc biệt là ở phụ nữ sau mãn kinh [13].

Tuy nhiên, độc tính cũng như sinh khả dụng của các dạng iodine là khác nhau. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng sinh khả dụng của iodine dạng vô cơ như iodide là 96,4% ở người bình thường, trong khi của iodine dạng hữu cơ, chẳng hạn như moniodotyrosine là 80%. Mặc dù sinh khả dụng qua đường uống của iodine từ iodate hầu như tương đương với sinh khả dụng từ iodide ở người và chuột, nhưng độc tính của iodide và iodate là khác nhau. Nghiên cứu của Laverock và các cộng sự cho thấy độc tính của iodate cao hơn iodide. Ở liều trên 10 mg/kg khi tiêm qua đường tĩnh mạch, iodate gây độc tính cao đối với võng mạc [14].

Stewart H. Webster và các cộng sự đã nghiên cứu và đánh giá độc tính của iodate thông qua các thí nghiệm gây độc cấp tính dạng đơn liều trên chuột trắng. Kết quả nghiên cứu cho thấy nếu ở liều lượng đủ lớn, iodate có thể gây ngộ độc và tử vong, hầu hết các trường hợp tử vong nguyên nhân đều do tổn thương cấp tính ở thận; ở liều lượng 140-500 mg/kg trọng lượng sẽ làm tăng pH dịch dạ dày, gây thoái hóa, tổn thương thành dạ dày. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy potassium iodate và sodium iodate có độc tính qua đường miệng và trong phúc mạc tương tự nhau [5].

Ngoài ra, ở liều cao, iodate có thể gây kích ứng ở niêm mạc miệng, da, mắt và đường hô hấp. Các thí nghiệm về độc tính của potassium iodate ở động vật đã cho thấy với liều 0,2-0,25 g/kg trọng lượng cơ thể qua đường uống có thể gây buồn nôn, rối loạn đường ruột, khó thở, ngoài ra các xét nghiệm lâm sàng sâu hơn cho thấy có tổn thương ở gan, thận và niêm mạc ruột [11].

Bên cạnh đó, iodate còn có khả năng gây độc gen và là tác nhân gây một số bệnh ung thư như ung thư tuyến giáp [6]. Do đó, việc phân tích và đánh giá

hàm lượng từng dạng iodine cụ thể là iodide và iodate thay vì định lượng iodine tổng số có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong việc đánh giá hàm lượng dinh dưỡng của các sản phẩm sữa, qua đó giúp người tiêu dùng có cái nhìn tổng quan đối với các sản phẩm sữa, cũng như giúp cho các cơ quan chức năng có cơ sở khoa học để kiểm soát và giám sát chất lượng các sản phẩm sữa trên thị trường. Đồng thời nghiên cứu này còn có ý nghĩa đối với các công ty, doanh nghiệp sản xuất chế biến sữa trong việc góp phần lý giải nguyên nhân các sản phẩm dễ bị hao hụt hàm lượng iodine, từ đó có cải tiến trong quy trình sản xuất, chế biến hay bảo quản giúp làm bền vững và ổn định iodine nhằm mang lại sản phẩm có chất lượng tốt nhất cho người tiêu dùng.

### **1.1.3. Hàm lượng, sự phân bố và sự chuyển hóa các dạng iodine (iodide, iodate) trong thực phẩm**

Cơ thể con người có thể hấp thụ iodine qua nhiều nguồn khác nhau. Hiện nay hai nguồn cung cấp iodine chính đang được sử dụng để bổ sung cho cơ thể con người là iodine có nguồn gốc tự nhiên như sữa và chế phẩm sữa, trứng, rong biển... và các chế phẩm bổ sung iodine như muối iodine, thực phẩm bảo vệ sức khỏe....

Tuy nhiên do tính chất hóa học của iodine dễ thăng hoa ở nhiệt độ thường và tính chất oxy hóa mạnh cũng như khử mạnh của hai dạng iodide, iodate nên hàm lượng của iodine tổng số cũng như hàm lượng các dạng iodine trong thực phẩm thường bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như pH môi trường thực phẩm, phản ứng hóa học giữa iodine và các thành phần khác có sẵn trong thực phẩm, quá trình chế biến, xử lý thực phẩm dưới tác động của nhiệt độ, thời gian chế biến...

Liejun Liu và các cộng sự [15] của mình đã nghiên cứu sự chuyển hóa iodate thành iodide và iodine trong muối ăn dưới tác dụng của nhiệt độ. Theo đó 15 mẫu thực phẩm được nấu chín có sử dụng muối iodate, nhiệt độ nấu và pH của mẫu thực phẩm cũng được xác định. Iodine trong mẫu thực phẩm sau khi nấu chín được chiết bằng nước khử ion, sau đó được đem phân tích trên thiết bị HPLC-ICP-MS. Kết quả nghiên cứu cho thấy có  $96,4\% \pm 14,7\%$  iodate chuyển thành iodide và iodine trong đó có  $86,8\% \pm 14,5\%$  iodate được chuyển

đổi thành iodide;  $9,6\% \pm 6,2\%$  chuyển thành iodine và dễ bị thăng hoa ở nhiệt độ thường. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp HPLC-ICP-MS tương ứng lần lượt là  $0,70 \mu\text{g/L}$  đối với iodide ( $0,69 \mu\text{g/L}$  đối với iodate) và  $2,10 \mu\text{g/L}$  đối với iodide ( $2,06 \mu\text{g/L}$  đối với iodate), độ lệch chuẩn là  $2,6\%$  và độ thu hồi là  $101,6\% \pm 2,6\%$ .



Hình 1.1. Sự chuyển hoá của các dạng iodine trong quá trình xử lý nhiệt

Tuy nhiên, do những ảnh hưởng xấu của muối ăn đối với sức khỏe con người nên ngày nay bằng những nỗ lực tuyên truyền của ngành y tế, lượng muối trong khẩu phần ăn ngày càng được cắt giảm, do đó lượng iodine bổ sung cho con người trong muối ăn theo đó cũng giảm dần. Thay vào đó nguồn thực phẩm giàu dinh dưỡng là sữa và chế phẩm sữa ngày càng trở thành nguồn cung cấp iodine chính cho con người. Dữ liệu lượng thực phẩm tiêu thụ ở từng quốc gia cho thấy sữa và các sản phẩm từ sữa cung cấp 13 – 64% lượng iodine được khuyến nghị hàng ngày [2]. Việc tiêu thụ sữa và các sản phẩm sữa ở mỗi quốc gia là khác nhau cũng như hàm lượng iodine trong mỗi sản phẩm sữa là khác nhau, do đó hàm lượng iodine bổ sung cho cơ thể khó định lượng được thông qua khẩu phần ăn.

Hàm lượng iodine trong sữa và chế phẩm sữa bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như giống bò, nguồn thức ăn cho bò, chất kháng iodine như glucosinolates có trong một số loại thức ăn, và cách khử trùng núng vú sau mỗi lần vắt [2].

Bên cạnh những yếu tố về giống và điều kiện chăn nuôi thì quy trình sản xuất sữa và chế phẩm sữa cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng iodine trong sữa. Olivia L. van der Reijden và các cộng sự tại đại học Cambridge đã tiến hành các thí nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của các quá trình sản xuất sữa và chế phẩm sữa đến hàm lượng iodine. Thí nghiệm số 2 trong nghiên cứu của nhóm tác giả cho thấy có đến 75% iodine bị thất thoát trong váng sữa, điều đó có nghĩa hiệu suất thu hồi iodine trong sản phẩm này chỉ đạt 25%. Tuy nhiên sau quá trình làm đông và làm chín thì hàm lượng iodine lại tăng 1,6 – 2,3 lần sau làm đông và 1,6 – 2,6 lần sau khi làm chín. Đối với các sản phẩm phomai việc bổ sung muối iodine trên bề mặt phomai bên cạnh những lợi ích về mặt cảm quan như cải thiện hương vị, tăng khả năng tách whey, thúc đẩy quá trình hình thành vỏ phomai, nó còn mang lại giá trị về mặt dinh dưỡng vì là nguồn bổ sung iodine dồi dào. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy quá trình xử lý nhiệt không có ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng iodine, điều này khác với những giả thuyết trước đây cho rằng iodine bị mất do hiện tượng thăng hoa, tỷ lệ thu hồi iodine ở các sản phẩm sau khi qua thanh trùng, tiệt trùng vẫn đạt đến 81 – 93% [16].

Tuy nhiên quy trình sản xuất sữa và chế phẩm sữa ở mỗi quốc gia có những đặc thù riêng biệt. Vì vậy, để có những phân tích đánh giá chính xác và cụ thể hơn đối với các sản phẩm sữa trong nước, nghiên cứu này còn được thực hiện để đưa ra cái nhìn tổng quan về dạng iodine tồn tại trong các sản phẩm sữa hiện nay trên thị trường, sự thất thoát và hao hụt so với hàm lượng công bố trên nhãn sản phẩm. Qua đó vừa giúp người tiêu dùng lựa chọn được những sản phẩm chất lượng vừa giúp các cơ quan quản lý có căn cứ để kiểm tra đánh giá và giám sát việc tuân thủ quy định về an toàn thực phẩm.

## **1.2. TỔNG QUAN CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH**

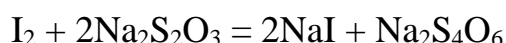
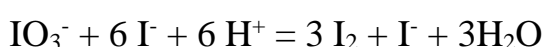
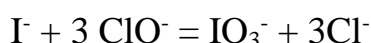
Các phương pháp thường được sử dụng để xác định iodine bao gồm các phương pháp phân tích iodine và các phương pháp phân tích dạng iodine (iodide, iodate).



### 1.2.1. Các phương pháp xác định iodine tổng số

**Phương pháp chuẩn độ:** Theo TCVN 10657: 2014 [19], nguyên tắc của phương pháp chuẩn độ xác định hàm lượng iodine tổng số là oxy hóa iodide thành iodate bằng sodium iodide trong môi trường đậm và loại bỏ chất oxy hóa dư bằng formic acid. Bổ sung hydrochloric acid và potassium iodide để tạo ra iodine tự do tương ứng với lượng iodate có mặt.

Sau đó chuẩn độ lượng  $I_2$  giải phóng bằng dung dịch chuẩn sodium thiosulfate ( $Na_2S_2O_3$ ) với chỉ thị là hồ tinh bột.



Ưu điểm của phương pháp này là dễ thao tác, phân tích nhanh, chi phí phát sinh thấp. Tuy nhiên phương pháp có nhược điểm là độ nhạy thấp, chỉ phân tích mẫu có hàm lượng iodine cỡ ppm và dễ ảnh hưởng bởi nền mẫu.

**Phương pháp đo phổ hấp thụ phân tử UV-VIS:** Gilfedder và các cộng sự đã nghiên cứu phương pháp đơn giản để định lượng iodine trong mẫu đất, trầm tích bằng phương pháp chiết ở nhiệt độ lên đến  $1000^\circ C$  và dịch sau chiết được phân tích trên hệ thống quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Các mẫu được đốt cháy trong dòng oxy và hòa tan trong nước deion, dịch mẫu sau đó được đem lọc trước khi phân tích. Dịch chiết được định lượng bằng phương pháp đo phổ  $As^{3+}$ –  $Ce^{4+}$ , theo đó iodide xúc tác cho quá trình oxy hóa  $As^{3+}$  thành  $As^{5+}$  và khử  $Ce^{4+}$  thành  $Ce^{3+}$ . Ba mẫu vật liệu chuẩn được phân tích với hiệu suất thu hồi tốt (97 – 113%) và độ lệch chuẩn RSD (<5%). Phương pháp cho giới hạn phát hiện là nhỏ hơn 50 ng iodine với độ tin cậy là 95%. Đối với một số mẫu trầm tích giàu hữu cơ (20 –30% carbon hữu cơ) và hàm lượng iodine cao thì phương pháp được cải tiến bằng cách tăng tốc độ dòng oxy và giảm thời gian đốt cháy mẫu [20].

**Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử nguồn plasma cảm ứng cao tần (ICP-OES):** với phương pháp này chất phân tích được kích thích lên mức năng lượng cao bằng nguồn Plasma cảm ứng cao tần từ đó phát xạ ra các bước sóng đặc trưng. Để tránh các yếu tố gây nhiễu từ nền mẫu, cần lựa chọn bước sóng phù hợp. Tín hiệu cường độ của bước sóng đặc trưng tỷ lệ thuận với

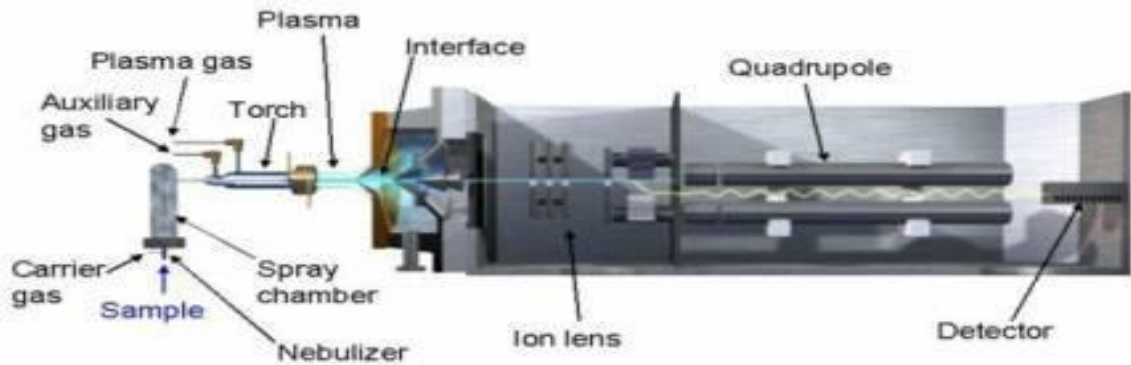
nồng độ chất phân tích. Do hạn chế về độ nhạy cũng như độ chính xác nên phương pháp này ít được lựa chọn để xác định trực tiếp hàm lượng iodine hoặc chỉ sử dụng trong trường hợp các mẫu có hàm lượng iodine cao với các quá trình xử lý mẫu thích hợp.

M. Sager đã đề xuất phương pháp xác định iodine ở mức hàm lượng cao trong mẫu sau khi tách phosphorus (nguyên tố có ảnh hưởng lớn đến phổ của iodine) bằng phương pháp kết tủa. Theo đó để xác định iodine, nhóm nghiên cứu đã hòa tan hoặc oxy hóa các chất nền hữu cơ bằng potassium chlorate ( $\text{KClO}_3$ ) trong nitric acid loãng để chuyển iodine về dạng  $\text{KIO}_3$  bền hơn. Phương pháp đã loại trừ ảnh hưởng của phosphorus bằng cách kết tủa với aluminium hydroxide hoặc iron hydroxide. Sau khi thêm các muối nhôm hoặc sắt ở dạng nitrate, sulfate; ammonia được sử dụng để điều chỉnh pH về 8,8. Hiện tượng kết tủa tốt hơn được quan sát thấy khi sử dụng aluminium hydroxide và có thêm 10 – 30 mg đất sét/5 mL mẫu. Tách kết tủa tạo thành bằng cách ly tâm hoặc gạn dịch vào bình định mức. Lọc dung dịch qua màng lọc và xác định hàm lượng iodine trên ICP-OES [17].

Vtorushina, E.A và các cộng sự đã vận dụng quá trình giải phóng hơi của phản ứng oxy hóa khử để giảm giới hạn phát hiện của iodine trong các mẫu sinh học khi phân tích trên hệ thống ICP-OES. Quy trình được phát triển để phân tích hàm lượng iodine trong các mẫu sữa, nguyên liệu thực vật và các chế phẩm dược phẩm thông qua quá trình tạo hơi oxy hóa sau khi phá mẫu bằng vi sóng trong dòng oxy và tạo hơi khử sau khi phân hủy mẫu trong lò vi sóng sử dụng acid. Giới hạn phát hiện của phương pháp lần lượt là 0,018 – 0,037 mg/kg và 0,058 – 0,072 mg/kg sau quá trình tạo hơi oxy hóa và khử tương ứng tùy thuộc vào loại mẫu thử. Độ chính xác của quy trình được xác nhận bằng kết quả phân tích mẫu vật liệu chuẩn là Powder BCR 150 (mẫu sữa bột gầy) và BCR 279 (mẫu rau diếp biên) [18].

**Phương pháp khối phổ plasma cao tần cảm ứng (ICP-MS):** đây là phương pháp được áp dụng nhiều trong phân tích lượng vết và siêu vết. Khối phổ plasma cao tần cảm ứng (ICP-MS) là một kỹ thuật phân tích có khả năng xác định đồng thời nhiều nguyên tố với độ chính xác cao. Phương pháp sử dụng nguồn cảm ứng cao tần ICP với detector khối phổ để phân tích các ion nguyên

tổ. Ngọn lửa plasma với nhiệt độ cao 6.000 – 10.000 °C, ion hóa nguyên tử của các nguyên tố trước khi tới hệ thống khối phổ. Các ion theo tỷ lệ khối lượng/điện tích của từng nguyên tố được tách trong bộ lọc khối tứ cực, detector khối phổ với độ phân giải cao ghi nhận tín hiệu theo số khối đặc trưng của từng nguyên tố và khuếch đại qua ống nhân quang điện.



Hình 1.2. Sơ đồ cấu tạo hệ thống ICP-MS

ICP-MS có nhiều ưu điểm như khả năng xử lý được mẫu phức tạp như thủy hải sản, máu, huyết thanh, nước tiểu, v.v. bởi năng lượng lớn của nguồn ICP, lượng mẫu ít, thời gian phân tích nhanh, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng thấp, độ ổn định và độ chính xác cao.

Marcia F Mesko và các cộng sự đã phát triển phương pháp xác định iodine trong các mẫu thực phẩm bằng phép đo khối phổ plasma cảm ứng cao tần (ICP-MS) sau khi phân hủy trong lò vi sóng MIC (Microwave induced combustion). Khối lượng mẫu có thể lên đến 500 mg, theo đó các mẫu thực phẩm như gan bò, tinh bột ngô, sữa bột hoặc bột mì được đốt cháy hoàn toàn bằng hệ thống MIC. Sử dụng 50  $\mu$ l ammonium nitrate 6 mol/L làm chất hỗ trợ đánh lửa và các bình được nạp 15 bar  $O_2$ . Việc sử dụng  $H_2O_2$  0,9 mmol/L,  $(NH_4)_2CO_3$  10 đến 50 mmol/L và tetramethylammonium hydroxide 56 mmol/L đã được nghiên cứu làm dung dịch hấp thụ, cũng cho thấy phù hợp cho bước hồi lưu sau quá trình đốt cháy mẫu [19].

Todor I. Todorov và Patrick J. Gray đã báo cáo một phương pháp xác định iodine trong nhiều mẫu thực phẩm và vật liệu bằng phương pháp khối phổ plasma cảm ứng cao tần (ICP-MS) sau quá trình chiết với dung dịch kiềm. Để đánh giá độ đúng của phương pháp, nhóm nghiên cứu đã sử dụng 7 mẫu vật

liệu chuẩn và 21 mẫu thực phẩm bổ sung vi chất dinh dưỡng. Phương pháp cho giới hạn định lượng đối với mẫu thực phẩm dạng rắn là 36 ng/g, độ lệch chuẩn (% RSD) trong khoảng 2 – 7%, độ thu hồi đối với mẫu vật liệu chuẩn và các mẫu thực phẩm bổ sung vi chất lần lượt là 85–105% và 81 – 119% [20].

Iodine tổng số trong thực phẩm có thể chiết ra khỏi nền mẫu trong môi trường kiềm tetramethylammonium hydroxide (TMAH) sau đó xác định bằng phương pháp khối phổ plasma cao tần cảm ứng ICP-MS theo TCVN 9517:2012. Iodine trong sữa và các sản phẩm dinh dưỡng cũng có thể được xử lý bằng nitric acid trong lò vi sóng, sau đó kiềm hóa với dung dịch ammonium trước khi tiến hành phân tích trên ICP-MS theo AOAC 2012.14 [21].

Phương pháp xác định iodine tổng số còn có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật khác như đo quang dựa trên phản ứng xúc tác [22], sắc ký khí [23], chuẩn độ điện cực chọn lọc ion [24], sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao với detector PAD [25] hoặc detector điện hóa [26], hay quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS [27].

## **1.2.2. Các phương pháp xác định dạng iodine**

### ***1.2.2.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới***

Các phương pháp xác định iodine ở dạng iodide và iodate trong thực phẩm nói chung và sản phẩm sữa nói riêng đã được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới quan tâm và phát triển.

Tác giả Lipika Basumallick và Jeffrey Rohrer đã nghiên cứu xác định đồng thời iodide và iodate trong sữa công thức và sữa đậu nành bằng kỹ thuật sắc ký ion với detector xung ampe. Mẫu trước khi phân tích được hoàn nguyên theo công thức pha của nhà sản xuất. Sau đó lấy 10 mL mẫu sau hoàn nguyên vào ống ly tâm 50 mL, thêm 2 mL acetic acid 3%, thêm tiếp 8 mL nước deion và lắc đều, ly tâm mẫu ở 5000 vòng/phút trong 5 phút để tách béo và protein. Tiếp tục cho mẫu qua cột chiết pha rắn Dionex OnGuard II với tốc độ 4 mL/phút, loại 3 mL đầu của dịch mẫu. Thu lấy phần dịch lọc đem phân tích. Khảo sát sâu hơn nhóm nghiên cứu cho thấy chiết mẫu trong môi trường acid có điều nhiệt ở 70 °C trong 1 giờ cho hiệu suất chiết iodine tốt hơn. Phương pháp cho khoảng tuyến tính của iodide trong khoảng 0,005 – 10 mg/L với hệ

số hồi quy tuyến tính là 0,9998; độ chụm RSD < 0,6%, độ thu hồi của iodide trong khoảng 82 – 115% [28].

Tác giả Niemann, R.A và các cộng sự đã xác định iodide và thiocyanate trong sữa bột và sữa công thức bằng kỹ thuật sắc ký ion với detector diode array (PAD) [25]. Phương pháp sử dụng tiền cột với mục đích làm giàu chất phân tích trước khi dẫn mẫu vào cột trao đổi ion. Phương pháp cho giới hạn định lượng iodide trong các mẫu dạng lỏng là 0,04 mg/L, các mẫu dạng bột là 0,2 mg/kg.

Luiza Fernandez Sanchez và Joanna Szpunar phát triển phương pháp xác định các dạng iodine trong sữa và sữa công thức bằng sắc ký rây phân tử (SEC) kết hợp với phổ khối plasma cao tần cảm ứng (ICP-MS). Các dạng khác nhau của iodine được rửa giải khỏi cột thông qua dung dịch đệm Tris nồng độ 30 mM trong 40 phút, sau đó phân tích trên thiết bị ICP-MS với giới hạn phát hiện khoảng 1 µg/L. Việc bổ sung sodium dodecyl sulfonate (SDS) đã cải thiện đáng kể hiệu suất thu hồi iodine trong các mẫu váng sữa. Iodine được tìm thấy có mặt chủ yếu dưới dạng iodide trong tất cả các mẫu trừ sữa công thức cho trẻ sơ sinh (chiếm 15 – 50% iodine tổng số) [29].

Kỹ thuật LC-ICP-MS cũng được Jennifer Nelson, Lawrence Pacquette, và các cộng sự ứng dụng để xác định đồng thời các dạng iodine và dạng bromine trong sữa công thức. Phương pháp xác định 04 chất iodide, iodate, bromate, bromide trong thời gian chưa đến 6,5 phút, với khoảng làm việc của đường chuẩn 0 – 100 ppb, giới hạn phát hiện  $\leq 0,67$  ppb. Độ chính xác của phương pháp được đánh giá qua mẫu SRM 1849a (NIST) cho chỉ tiêu iodine với hiệu suất thu hồi 103%. Các mẫu phân tích không cho thấy sự có mặt của bromate và iodate. Hàm lượng iodide trong khoảng 25,9 – 54,5 µg/100 kcal nằm trong khoảng cho phép theo tiêu chuẩn của Mỹ và Trung Quốc, nhưng nằm ngoài giới hạn của EU (tối đa 29 µg/100 kcal) [30].

Để xác định hàm lượng  $\text{IO}_3^-$  và  $\text{I}^-$  trong nước ngầm nhóm tác giả Liu Wei, Li Bing và các cộng sự [31] đã sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng cột sắc ký ICS-A23 ghép nối khối phổ plasma cảm ứng cao tần (HPLC-ICP-MS). Các dạng iodine lần lượt được rửa giải bằng ammonium carbonate 0,03M. Qua khảo sát, nhóm tác giả nhận thấy tín hiệu của  $\text{IO}_3^-$  và  $\text{I}^-$  ổn định

trong dung dịch KOH 0,05%. Phương pháp được áp dụng xác định  $\text{IO}_3^-$  và  $\text{I}^-$  trong nước ngầm với giới hạn phát hiện của  $\text{IO}_3^-$  và  $\text{I}^-$  lần lượt là 0,035  $\mu\text{g/L}$  và 0,025  $\mu\text{g/L}$ .

Năm 2019, nhóm nghiên cứu gồm Weina Zhang và các cộng sự đã phát triển phương pháp xác định dạng iodide và iodate trong mẫu nước biển có hàm lượng muối cao bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ plasma cảm ứng cao tần. Trong nghiên cứu này, nhóm sử dụng cột trao đổi anion phân tách hiệu suất cao (Ion Pac AG11, Dionex) và pha động là dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  8 mmol/L để tách iodide và iodate. Việc lựa chọn pha động là  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  cho hiệu suất tách tốt. Phương pháp cho khoảng tuyến tính là 0,1 - 100  $\mu\text{g/L}$  đối với cả 2 dạng, giới hạn phát hiện đối với iodate và iodide lần lượt là 0,015  $\mu\text{g/L}$  và 0,081  $\mu\text{g/L}$  [32].

#### ***1.2.2.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam***

Cho đến nay ở Việt Nam những công trình nghiên cứu về xác định hàm lượng iodine cũng như các phương pháp xác định hàm lượng iodide và iodate trong thực phẩm nói chung và sản phẩm sữa nói riêng vẫn còn rất hạn chế.

Năm 2012, Tổng cục tiêu chuẩn đo lường chất lượng ban hành TCVN 9517:2012 về xác định hàm lượng iodine trong thực phẩm bằng phương pháp phổ khối nguyên tử nguồn plasma cảm ứng cao tần (ICP-MS) [33]. Theo đó, các hợp chất iodine được chiết ra khỏi mẫu bằng thuốc thử kiềm mạnh ở nhiệt độ cao. Sau khi loại các thành phần không hòa tan, dung dịch phun sương được nguyên tử hóa và ion hóa trong plasma cảm ứng cao tần. Các ion được tách ra khỏi plasma bằng hệ thống lấy mẫu và bộ tách hình nón, được tách trong máy đo phổ khối lượng dựa theo tỷ lệ khối lượng/điện tích của chúng và được xác định bằng hệ thống detector.

Lê Văn Hà và các cộng sự [34] trong nhóm nghiên cứu của Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia đã tiến hành nghiên cứu phương pháp xác định hàm lượng iodide và iodate trong gia vị mặn bằng phương pháp phổ khối plasma cảm ứng cao tần ghép nối sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-ICP-MS). Trong nghiên cứu này, iodine dưới dạng iodate và iodide trong các loại gia vị mặn được chiết với nước deion bằng bể rung siêu âm có điều nhiệt,

sau đó xác định bằng phương pháp phổ khối plasma cảm ứng cao tần ghép nối sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-ICP-MS).

Theo đó, phương pháp cũng đã được xác nhận giá trị sử dụng với các thông số như đường chuẩn làm việc có hệ số xác định  $R^2 \geq 0,995$ , giới hạn phát hiện (LOD) của iodate và iodide tương ứng là 0,06 mg/kg và 0,079 mg/kg; độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (RSD<sub>r</sub>) trong khoảng 2,57 – 5,22%, độ thu hồi (R%) trong khoảng 83,5 – 108%, đáp ứng tốt các yêu cầu theo quy định của AOAC. Nghiên cứu đã tiến hành phân tích 43 mẫu gia vị mặn khác nhau bao gồm muối ăn, bột canh iod, hạt nêm, dầu hào, nước tương, nước mắm. Kết quả cho thấy một tỉ lệ cao (76,9%) của các mẫu muối ăn và bột canh có hàm lượng tổng số của iodate và iodide thấp hơn so với mức quy định. Trong khi đó, các mẫu gia vị mặn khác có chứa hàm lượng đáng kể của iodine chủ yếu dưới dạng iodide. Kết quả của nghiên cứu này đã góp phần đánh giá sơ bộ thực trạng dạng tồn tại của iodine trong các sản phẩm gia vị mặn thu thập trên địa bàn thành phố Hà Nội [34].

Một số công trình nghiên cứu xác định các dạng iodine trong các nền mẫu khác nhau được tổng hợp trong Bảng 1.2.

*Bảng 1.2. Một số phương pháp phân tích Iodine tổng số và dạng Iodine*

<b>Tác giả/ Tài liệu</b>	<b>Đối tượng mẫu</b>	<b>Chất phân tích</b>	<b>Kỹ thuật sử dụng</b>	<b>Kết quả đạt được</b>
TCVN 6487 – 1999	Bột canh iod	Iodate	Chuẩn độ với natri thiosufate	Giới hạn định lượng $\geq 1,1$ mg/kg
TCVN 9699 : 2013	Muối ăn	Iodate	Chuẩn độ với natri thiosufate	Giới hạn định lượng $\geq 1,1$ mg/kg
TCVN 9517 : 2012	Thực phẩm	Iodine	ICP-MS, thủy phân với dung	Độ lặp lại RSD <sub>r</sub> $\leq 7,8\%$ ; độ tái

			dịch kiềm TMAH	lập $RSD_R \leq$ 19%
AOAC 2012.14	Sữa và sản phẩm dinh dưỡng	Iodine	ICP-MS, thủy phân với nitric acid trong lò vi sóng, sau đó kiềm hòa với ammonia	Giới hạn định lượng 5,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ; hiệu suất thu hồi 90 – 105 %
Lipika Basumallick và Jeffrey Rohrer	Sữa công thức	Iodide và iodate	Sắc ký ion với detector xung ampe, chiết trong acetic acid 3% bằng bể rung siêu âm	Độ chụm RSD < 0,6%; độ thu hồi trong khoảng 82 – 115%
Deanna Hurum and Jeff Rohrer	Nước biển và các dung dịch nước muối khác	Iodide	Sắc ký ion với detector độ dẫn điện	Giới hạn phát hiện 15 $\mu\text{g}/\text{L}$ ; giới hạn định lượng 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ ; hiệu suất thu hồi 77 – 85%
Niemann, R.A và cộng sự	Sữa bột và sữa công thức	Iodide	Sắc ký ion với detector mảng điod	Giới hạn định lượng mẫu lỏng 0,04 $\text{mg}/\text{kg}$ ; mẫu rắn 0,2 $\text{mg}/\text{kg}$



Luiza Fernandez Sanchez và Joanna Szpunar	Sữa và sữa công thức	Iodide và Iodate	Sắc ký loại trừ kích thước kết hợp với ICP-MS	Giới hạn phát hiện 1,0 µg/L
Lawrence Pacquette, Jenny Nelson	Sữa công thức	Iodide và Iodate	LC-ICP-MS, chiết trong nước ở 50 °C trong 1 giờ	Giới hạn phát hiện $\leq 0,67$ µg/L; hiệu suất thu hồi mẫu SRM 103%

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu là các sản phẩm từ sữa như sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, sữa công thức dành cho phụ nữ mang thai và người trưởng thành, hay các sản phẩm sữa phổ biến trên thị trường như sữa tươi (sữa tươi nguyên liệu, sữa tươi thanh trùng, sữa tươi tiệt trùng), sữa chua, sữa đặc váng sữa, phomai, bơ.

Các mẫu sữa (52 mẫu) được thu thập tại các cửa hàng, siêu thị trên địa bàn thành phố Hà Nội. Các mẫu nghiên cứu bao gồm sữa bột cho trẻ em, sữa bột cho người trưởng thành, sữa đặc, sữa chua, váng sữa, sữa tươi, bơ, phomai. Thời gian thu thập mẫu đối với các mẫu sữa bột, sữa đặc, sữa tươi có thời hạn bảo quản lâu là tháng 1/2023 đến tháng 2/2023, đối với các mẫu có thời hạn bảo quản ngắn, dễ phân hủy như sữa chua, váng sữa, bơ, phomai thì được thu thập ngay trước thời điểm phân tích khoảng 1-2 ngày. Thông tin về các mẫu thu thập được tổng hợp trong Bảng 2.1.

*Bảng 2.1. Thông tin các mẫu nghiên cứu*

STT	Loại mẫu	Số lượng mẫu
1	Sữa bột cho trẻ em	14
2	Sữa bột cho người trưởng thành	7
3	Sữa đặc	5
4	Sữa chua	5
5	Váng sữa	5
6	Sữa tươi	6
7	Bơ	5
8	Phomai	5
<b>Tổng</b>		<b>52</b>

### 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các mẫu sữa và sản phẩm sữa là những nền mẫu có thành phần khá phức tạp, hàm lượng protein cao, hơn nữa hàm lượng iodine tổng số cũng như dạng iodide và iodate trong sữa và một số chế phẩm sữa rất thấp nên việc định lượng

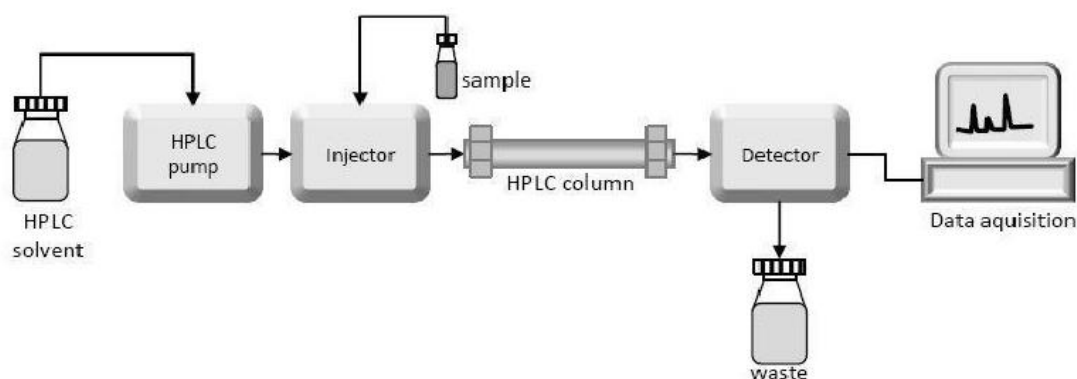
chính xác hàm lượng của iodine tổng số nói chung hay các dạng iodine nói riêng (chủ yếu là dạng muối iodide, iodate của kim loại kiềm và kiềm thổ) đòi hỏi phải sử dụng phương pháp có độ nhạy và độ chọn lọc cao. Dựa trên các tài liệu tham khảo, có thể thấy hướng nghiên cứu xác định iodine trong thực phẩm hiện nay chủ yếu dựa trên kỹ thuật ICP-MS.

Phương pháp ICP-MS ra đời vào đầu những năm 80 của thế kỷ trước và ngày càng chứng tỏ là kỹ thuật phân tích có ưu điểm vượt trội so với các kỹ thuật phân tích khác như quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS), quang phổ phát xạ plasma cảm ứng (ICP-AES hay ICP-OES)...nhờ có độ nhạy, độ lặp lại, độ chính xác cao và xác định đồng thời được hàng loạt các kim loại trong thời gian phân tích ngắn. Hơn nữa, khi ghép nối với sắc ký lỏng hiệu năng cao với hiệu quả tách tốt, sự ổn định và chính xác cao rất phù hợp để ứng dụng phân tích các dạng tồn tại của kim loại nặng nói chung và dạng iodine nói riêng.

HPLC-ICP-MS là hệ thống có sự ghép nối giữa hai hợp phần riêng biệt là hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao và hệ thống khối phổ plasma cao tần cảm ứng.

### **Nguyên lý hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) về cơ bản là một dạng sắc ký cột được cải tiến. Thay vì dung môi đi qua pha tĩnh nhỏ giọt dưới tác dụng của trọng lực, nó bị tác động dưới áp suất cao lên tới 400 atm, điều đó làm cho quá trình tách xảy ra nhanh và hiệu quả hơn nhiều. Tất cả các phương pháp sắc ký, bao gồm HPLC hoạt động theo cùng một nguyên tắc cơ bản; tách hỗn hợp chất thành các thành phần riêng rẽ do sự khác biệt về ái lực tương tác của các phân tử khác nhau đối với pha động và pha tĩnh được sử dụng trong quá trình tách.

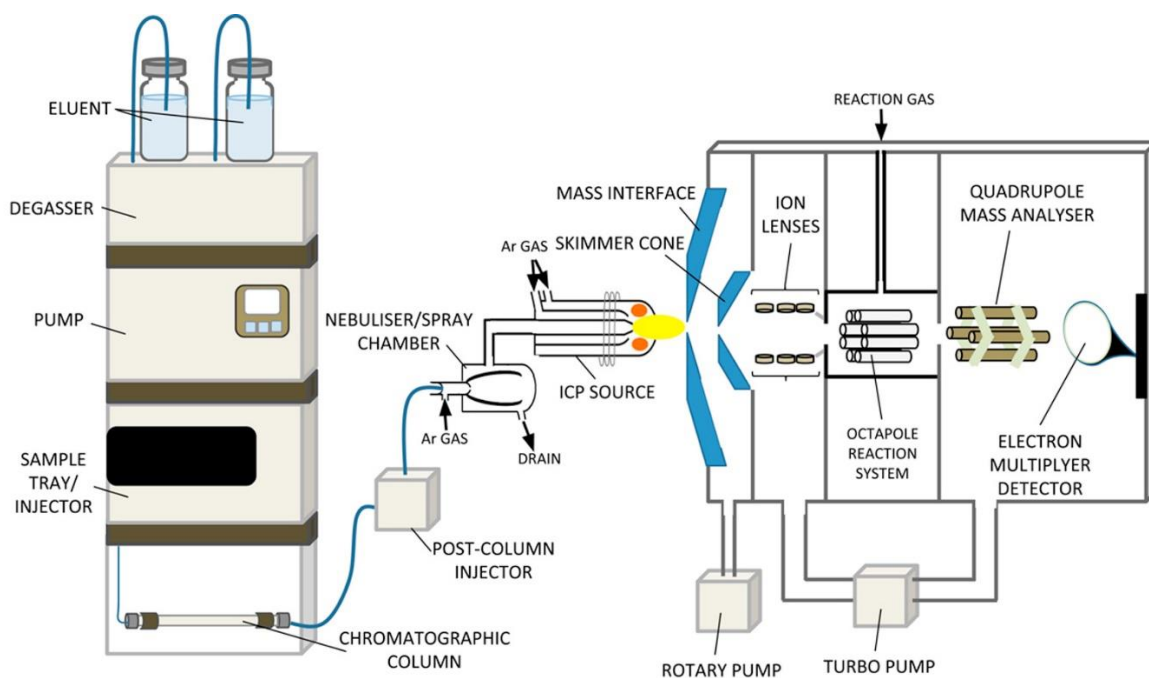


Hình 2.1. Sơ đồ khối hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao

Nguyên lý hoạt động của hệ thiết bị HPLC được thể hiện qua Hình 2.1, bao gồm hệ thống bơm, kim bơm, cột, detector và bộ tích hợp hoặc hệ thống thu nhận và hiển thị. Trung tâm của hệ thống là cột tách nơi quá trình tách chất được diễn ra.

Theo đó, các chất phân tích được tách trên cột sắc ký, trước khi đi vào nguồn ion hóa của hệ thống ICP-MS để định tính và định lượng, các ion được định lượng theo nguyên tắc tỷ lệ khối lượng/điện tích. Hệ thống ICP-MS bao gồm nguồn ICP nhiệt độ cao từ 6.000-10.000 °C với detector khối phổ MS có độ nhạy cao. Nguồn ICP biến đổi các nguyên tử của các nguyên tố trong mẫu thành các ion. Cuối cùng, ion này được tách thông qua hệ tứ cực và định lượng bằng phép đo phổ khối. Tín hiệu của chất phân tích tỷ lệ với nồng độ của chất phân tích [35].

Dưới đây là hình ảnh hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao được ghép nối với phép đo khối phổ plasma cao tần cảm ứng [36].



Hình 2.2. Sơ đồ khối hệ thống HPLC-ICP-MS

Sự ghép nối giữa hai hệ thống HPLC và ICP-MS là giải pháp tuyệt vời cho phân tích nguyên tố do kết hợp giữa độ đặc hiệu dựa trên khả năng tách của sắc ký lỏng hiệu năng cao và độ nhạy cao của detector khối phổ plasma cảm ứng cao tần. Do đó, phương pháp này đã được ứng dụng nhiều trong các nghiên cứu phân tích dạng.

### 2.2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

#### **Thiết bị:**

- Hệ thống HPLC-ICP-MS Nexion 350X (Perkin Elmer, Hoa Kỳ) sử dụng trong nghiên cứu này được trang bị có cả ba chế độ đo chuẩn, va chạm, và phản ứng, tích hợp hệ thống bơm mẫu tự động dùng để đưa mẫu vào bộ phận tạo sol khí. Bộ phận sắc ký lỏng sử dụng cột anion NI-424 ( $5\ \mu\text{m} \times 4,6\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$ , Shodex) (Xem Hình 2.3).



Hình 2.3. Hệ thống ICP-MS Nexion 350X (Perkin Elmer, Hoa Kỳ)

- Bể rung siêu âm (Elmer) được dùng để chiết các dạng iodine từ nền mẫu.

- Máy lắc Vortex hoặc máy lắc ngang

- Máy ly tâm lạnh

- Máy đo pH

- Máy xay Philips để đồng nhất

- Cân phân tích (Mettler Toledo) có độ chính xác đến 0,0001 g.

- Cân kỹ thuật (Mettler Toledo) độ chính xác 0,01 g.

#### **Dụng cụ:**

- Ống ly tâm loại 50 ml (Falcon) để chứa đựng dung dịch mẫu.

- Màng lọc mẫu 0,22  $\mu\text{m}$  (Minisart) được dùng để lọc mẫu trước khi phân tích.

- Các micropipette và đầu tip (Eppendorf) được sử dụng để hút các thể tích hóa chất chính xác và pha chuẩn.

- Các dụng cụ thông thường khác của phòng thí nghiệm như bộ chia hóa chất tự động (Dispenser), bình định mức các loại 25; 50; 100ml (IsoLab), giấy lọc băng xanh, túi đựng mẫu các loại cũng được sử dụng.

#### **Hóa chất:**

- Chất chuẩn, hóa chất: chuẩn đơn  $\text{I}^-$  1000 ppm (Merck), muối  $\text{KIO}_3$  (Merck), muối EDTA (Merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (Merck), boric acid (Merck), Sodium-1-octane sulfonate OSA (Merck),  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Merck).

- Acetic acid (Merck), Methanol (Merck), Acetonitrile (Merck)
- Trichloroacetic acid (Merck), Ammonium sulfate (Merck)
- Potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate (hay Potassium ferrocyanide trihydrate)  $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$  (Merck)
- Zinc acetate  $(CH_3COO)_2Zn$  (Merck)
- Nước deion
- Khí argon có độ tinh khiết 99,999% (Messer)
- Các dung dịch chuẩn hóa thiết bị của hãng Perkin Elmer và dung dịch làm mát (cho Chiller) cũng được sử dụng.

### 2.2.2. Chuẩn bị hóa chất, chất chuẩn

#### *Chuẩn bị pha động:*

- Pha động 1:  $KH_2PO_4$  (5mM) :  $K_2SO_4$  (15mM): EDTA (5mM) pH 7,0  
Cân 0,6805g  $KH_2PO_4$ ; 2,6145g  $K_2SO_4$ ; 1,8602 g EDTA vào cốc thủy tinh 100 ml; hòa tan hỗn hợp bằng nước deion; chuyển vào bình định mức 1000 ml; tráng rửa cốc nhiều lần; lắc đều và chỉnh pH đến 7,0; định mức đến vạch bằng nước deion.

- Pha động 2: Acid boric (20 mM) : Sodium - 1- octane sulfonate OSA (0,9 mM)

Cân 1,236 g acid boric; 0,195 g OSA vào cốc thủy tinh 100 ml, hoà tan hỗn hợp trong cốc bằng nước deion; chuyển vào bình định mức 1000 ml; tráng rửa cốc nhiều lần; lắc đều và định mức đến vạch bằng nước deion.

#### *Chuẩn bị các dung dịch chuẩn trung gian:*

Dung dịch chuẩn gốc  $IO_3^-$  1000 ppm: cân 0,1227 g  $KIO_3$  cốc thủy tinh 100 mL, dùng nước deion hòa tan muối và chuyển vào bình định mức 100 ml, định mức tới vạch bằng nước deion.

Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 10 ppm: hút 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc  $IO_3^-$  1000 ppm và 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc  $I^-$  1000 ppm vào bình định mức 100 ml, định mức tới vạch bằng nước deion.

Dung dịch chuẩn trung gian 1 ppm: hút 2,5 ml dung dịch chuẩn trung gian 10 ppm vào bình định mức 25 ml, định mức tới vạch bằng nước deion.

#### *Chuẩn bị các dung dịch chuẩn làm việc:*

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 2,5; 5; 10; 25 ppb: hút chính xác lần lượt 62,5 µl; 125 µl; 250 µl; 625 µl dung dịch chuẩn trung gian 1 ppm vào các bình định mức 25 ml và định mức tới vạch bằng nước deion, lắc đều. Dãy dung dịch chuẩn được pha mới hằng ngày trước khi sử dụng.

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 50; 100 ppb: hút chính xác lần lượt 125 µl và 250 µl dung dịch chuẩn trung gian 10 ppm vào các bình định mức 25 ml và định mức tới vạch bằng nước deion, lắc đều. Dãy dung dịch chuẩn được pha mới hằng ngày trước khi sử dụng.

***Chuẩn bị hóa chất, thuốc thử:***

- Dung dịch acetic acid 4%: lấy chính xác 4 mL acetic acid vào bình định mức 100 mL. Thêm nước deion tới vạch và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ thường.

- Dung dịch methanol 30%: lấy chính xác 30 mL methanol vào ống đong rồi chuyển vào bình định mức 100 mL. Thêm nước deion tới vạch và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ thường.

- Dung dịch acetonitrile 20%: lấy chính xác 20 mL acetonitrile vào ống đong rồi chuyển vào bình định mức 100 mL. Thêm nước deion tới vạch và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ thường.

- Dung dịch trichloroacetic acid 5%: hòa tan 5 g trichloroacetic acid trong nước deion và định mức đến 100 mL.

- Dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.93M: hòa tan 51,93 g trichloroacetic acid trong nước deion và định mức đến 100 mL.

- Dung dịch Carrez I (Potassium hexacyanoferrate(II)  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6].3\text{H}_2\text{O}$ ): cân 15 g Potassium hexacyanoferrate(II) hòa tan trong 100 mL nước deion. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Dung dịch Carrez II (Zinc sulfate  $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ): cân 30 g zinc sulfate hòa tan trong 100 mL nước deion. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

**2.2.3. Tối ưu hóa điều kiện phân tích iodide và iodate trên HPLC-ICP-MS**

**2.2.3.1. Điều kiện phân tích trên ICP-MS**

Thông số quan trọng nhất trong phân tích ICP-MS là lựa chọn số khối sao cho đồng vị của nó phổ biến và ít bị ảnh hưởng bởi các đa nguyên tố khác. Các yếu tố khác của thiết bị cũng ảnh hưởng đến độ nhạy của phép đo như: lưu



lượng khí mang, công suất tạo plasma, thế thấu kính ion, độ sâu plasma,.. Các thông số được tối ưu hóa tự động sử dụng dung dịch chuẩn hóa thiết bị (Nexion setup solution) theo hướng dẫn vận hành thiết bị của hãng Perkin Elmer.

#### **2.2.3.2. Điều kiện phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

Các dạng iodine trong mẫu sau khi được chiết tách ra khỏi nền mẫu được đưa lên cột sắc ký, tại đây iodide và iodate được tách dựa trên tính chất, kích thước phân tử nhờ ái lực của chúng đối với pha động và pha tĩnh. Những yếu tố quan trọng trong quá trình tách trên HPLC như thời gian lưu, độ phân giải các chất, cường độ tín hiệu chất phân tích phụ thuộc vào nhiều yếu tố sẽ được khảo sát dưới đây như: thành phần pha động, nồng độ các chất trong pha động, pH pha động, tốc độ dòng.

#### **2.2.4. Tối ưu hóa quy trình xử lý mẫu**

##### **2.2.4.1. Xử lý sơ bộ và bảo quản mẫu**

Các mẫu như sữa bột, sữa đặc, sữa chua...sau khi mua về được bảo quản ở điều kiện thích hợp theo khuyến cáo của nhà sản xuất nếu chưa xử lý mẫu luôn.

Đối với các mẫu sữa dạng lỏng như sữa tươi thanh trùng, sữa tươi tiệt trùng...thì lắc kỹ mẫu, chuyển mẫu vào túi zipper có kích thước phù hợp, đồng nhất ít nhất 5 hộp/lọ.

Đối với mẫu sữa dạng sệt hay đặc như sữa chua, sữa đặc, váng sữa thì đồng nhất ít nhất 6 hộp/lọ, sử dụng máy xay để đồng nhất mẫu.

Đối với mẫu sữa bột thì dùng thìa nhựa trộn đều mẫu để đảm bảo được đồng nhất.

Đối với mẫu dạng rắn như bơ, phomai thì đồng nhất tối thiểu 200 gram mẫu, dùng máy xay mẫu để đảm bảo mẫu được đồng nhất kỹ trước khi cân.

Các mẫu sau khi đồng nhất được bảo quản trong các điều kiện thích hợp để tránh hút ẩm và tránh tác nhân vi sinh vật làm biến đổi cấu trúc và đặc tính của mẫu.

##### **2.2.4.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu sữa**

Mẫu được chiết trong dung môi thích hợp đồng thời sử dụng một số tác nhân để kết tủa loại bỏ protein sữa. Một số dung môi chiết được lựa chọn dựa

trên các tài liệu tham khảo, tính chất hóa học đặc trưng của hai dạng iodide và iodate để đảm bảo không có sự chuyển hóa giữa các dạng như nước deion, acid axetic, dung môi hữu cơ như methanol (MeOH), acetonitrile (ACN)...

Một số tác nhân phổ biến thường sử dụng để kết tủa protein trong sữa được khảo sát trong nghiên cứu này là trichloride acetic acid (TCA), ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , hay hỗn hợp Carrez I và Carrez II.

Theo đó, quy trình xử lý mẫu được đề xuất như sau: sau khi cân, mẫu được hòa trong dung môi chiết. Sau đó dịch mẫu được đem đi lắc ngang hoặc lắc vortex để đảm bảo mẫu được hòa tan hết vào dung môi. Sau khi lắc vortex mẫu được đem đi rung siêu âm trong bể rung có điều nhiệt ở nhiệt độ và thời gian xác định để chiết iodide và iodate có trong mẫu. Sau khi chiết bổ sung tác nhân kết tủa vào dịch mẫu, lắc nhẹ dịch mẫu, chuyển dịch mẫu vào bình định mức 50 mL và định mức đến thể tích xác định bằng dung môi chiết, rồi đem đi ly tâm lạnh ( $20\text{ }^\circ\text{C}$ ) ở 6000 vòng/phút trong 5 phút, mẫu sau ly tâm đã tách kết tủa, hút lấy phần dịch trong lọc qua màng  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  trước khi phân tích trên hệ thống HPLC-ICP-MS.

### **2.2.5. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp**

Sau khi khảo sát tối ưu được các thông số về quy trình xử lý mẫu và thông số phân tích trên hệ thống HPLC-ICP-MS, tiến hành xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp gồm các thông số dưới đây nhằm đảm bảo độ chính xác và tin cậy của phép đo.

#### ***Khoảng tuyến tính và đường chuẩn***

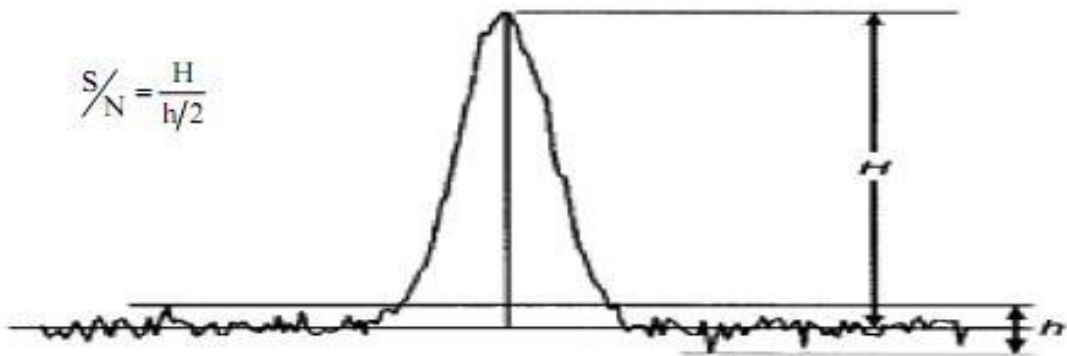
Khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích peak sắc ký vào nồng độ của các chất. Từ dung dịch chuẩn gốc, tiến hành pha loãng thành dung dịch chuẩn trung gian và dãy dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 ppb. Sau đó tiến hành bơm dung dịch chuẩn làm việc vào hệ thống HPLC-ICP-MS và ghi nhận tín hiệu diện tích hoặc chiều cao của hai dạng iodate và iodide. Thiết lập phương trình tương quan giữa nồng độ và diện tích peak của từng chất theo phương trình hồi quy tuyến tính. Đường chuẩn xây dựng được phải có hệ số tương quan  $R^2 \geq 0,995$ , và độ chệch các điểm nồng độ

dùng xây dựng đường chuẩn không được vượt quá  $\pm 15\%$  cho tất cả các nồng độ và  $\leq 20\%$  tại giá trị LOQ theo quy định của AOAC [37].

***Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)***

Lựa chọn mẫu trắng để đánh giá giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp. Mẫu trắng là mẫu không cho tín hiệu tại thời gian lưu của chất phân tích. Qua khảo sát mẫu thực, lựa chọn hai mẫu trắng gồm một mẫu sữa bột và một mẫu sữa nước.

Giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà hệ thống phân tích còn cho tín hiệu phân tích khác với tín hiệu mẫu trắng hoặc tín hiệu nền. Để xác định LOD của phương pháp, tiến hành thêm chuẩn iodide và iodate ở nồng độ thấp hơn giới hạn thấp nhất trong đường chuẩn, phân tích lặp lại 4 lần, xác định nồng độ mà tại đó tỷ lệ tín hiệu/nhiều bằng 3 ( $S/N=3$ )



*Hình 2.4. Xác định LOD bằng cách tính S/N*

Giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ tối thiểu của chất phân tích mà có thể định lượng được một cách đáng tin cậy. LOQ được xác định khi tỷ lệ tín hiệu/nhiều bằng 10 ( $S/N=10$ ).

***Độ lặp lại***

Qua khảo sát nhận thấy nhiều mẫu hàm lượng iodate không có hoặc rất thấp nên trong nghiên cứu này để đánh giá các thông số như độ lặp lại, độ tái lặp, độ thu hồi, mẫu trắng thêm chuẩn được sử dụng để nghiên cứu và phân tích. Theo đó, mẫu trắng thêm chuẩn dạng iodide và iodate sau khi chiết theo quy trình đã được khảo sát sẽ được bơm vào hệ thống LC-ICP-MS ở các điều kiện đã chọn. Thực hiện phân tích lặp 6 lần trong cùng điều kiện. Độ lặp lại của

phương pháp được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn lặp lại ( $SD_r$ ) và độ lệch chuẩn tương đối lặp lại ( $RSD_r$ ).

- Giá trị trung bình :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

Trong đó  $\bar{x}$  là giá trị trung bình số học của tập hợp các giá trị  $x_i$ , còn  $x_i$  là giá trị kết quả của mỗi lần thí nghiệm.

- Độ lệch chuẩn lặp lại:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

- Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại:

$$RSD_r = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100$$

### ***Độ thu hồi***

Độ thu hồi được xác định dựa trên việc thêm một lượng chất chuẩn đã biết của chất phân tích vào trong nền mẫu thực. Lượng chất chuẩn thêm vào mẫu phân tích phải đảm bảo sao cho nồng độ của chất cần nghiên cứu sau khi thêm chuẩn nằm trong khoảng đã khảo sát. Độ thu hồi (R%) được tính như sau:

$$R\% = \frac{(C_{m+c} - C_m)}{C_c} \times 100$$

Trong đó:  $C_{m+c}$  : Nồng độ trong mẫu thêm chuẩn

$C_m$  : Nồng độ trong mẫu

$C_c$  : Nồng độ chuẩn thêm

Tại mỗi nồng độ thêm chuẩn tiến hành làm lặp lại 3 lần. Các thông số về độ thu hồi được tham chiếu với tiêu chuẩn AOAC ở các mức nồng độ tương ứng [37].

### **2.2.6. Phân tích mẫu, xử lý số liệu, đánh giá kết quả phân tích**

Phương pháp sau khi đã xác nhận giá trị sử dụng, được ứng dụng phân tích trong một số sản phẩm từ sữa có bán trên thị trường.

Xử lý kết quả phân tích bằng các thuật toán thống kê sử dụng phần mềm Excel, Minitab.

### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN PHÂN TÍCH IODINE BẰNG ICP-MS

##### 3.1.1. Lựa chọn số khối phân tích

Một trong các nguyên tắc lựa chọn số khối để phân tích các nguyên tố trên ICP-MS là:

- Đồng vị là phổ biến nhất trong tự nhiên
- Đồng vị ít bị ảnh hưởng bởi sự trùng khối

Trong trường hợp của iodine, đồng vị duy nhất tồn tại và ổn định trong tự nhiên là  $^{127}\text{I}$  (100%) [38]. Các đồng vị khác của iodine là các đồng vị phóng xạ được tổng hợp ( $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{129}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{135}\text{I}$ ). Vì vậy đồng vị  $^{127}\text{I}$  được lựa chọn để phân tích iodine cũng như dạng iodide và iodate.

Đồng vị  $^{127}\text{I}$  cũng không bị ảnh hưởng bởi sự trùng khối nên lựa chọn chế độ đo chuẩn (không sử dụng khí va chạm) để có thể đạt được độ nhạy tốt nhất [39].

##### 3.1.2. Tối ưu các điều kiện trên ICP-MS

Các thông số có ảnh hưởng đến độ chính xác, độ nhạy, độ ổn định của phép phân tích như công suất RF, lưu lượng khí mang, lưu lượng khí plasma, độ sâu plasma, ... được tối ưu tự động sử dụng dung dịch chuẩn hóa thiết bị theo hướng dẫn của hãng Perkin Elmer. Kết quả được thể hiện như trong Bảng 3.1.

*Bảng 3.1. Các thông số tối ưu tự động của thiết bị ICP-MS*

Thông số	Giá trị được chọn	Thông số	Giá trị được chọn
Công suất RF	1200 W	Số lần quét khối	20 lần
Lưu lượng khí mang	0,82 L/min	Số lần đo lặp	3 lần
Lưu lượng khí plasma	19,0 L/min	Độ sâu Plasma	Chỉnh ở tối ưu
Thời gian trễ	500 ms	Kiểu đo (Mode)	Chuẩn (standard)
Thế quét phổ trường tứ cực	Auto theo m/Z	Đồng vị	$^{127}\text{I}$

Trong các thông số trên, công suất cao tần RF, độ sâu plasma, và lưu lượng khí mang là quan trọng nhất, quyết định đến độ nhạy, độ ổn định của

phép đo. Công suất cao tần là tần số radio cung cấp cho cuộn cảm tạo plasma. Công suất càng lớn nhiệt độ ngọn lửa plasma càng lớn và ngược lại, quyết định hiệu suất quá trình ion hóa và nguyên tử hóa mẫu.

Trong khi lưu lượng khí mang tỉ lệ thuận với lượng mẫu đưa vào plasma, và độ sâu plasma có ảnh hưởng đến cường độ vạch phổ. Các thông số trên được tối ưu đồng thời sao cho vừa đạt được tín hiệu cao nhất của các nguyên tố, vừa giảm được ảnh hưởng nhiễu nền. Việc tối ưu được thực hiện bằng dung dịch chuẩn hóa thiết bị của hãng có chứa các nguyên tố có số khối từ nhỏ như Be (9), đến số khối trung bình In (115) và số khối lớn như U (238). Sau khi thực hiện tối ưu tự động, yêu cầu kiểm tra các thông số tiêu chuẩn cần phải đạt được như trong Bảng 3.2.

*Bảng 3.2. Các thông số tiêu chuẩn cần đáp ứng của hệ ICP-MS Nexion 350X*

<b>Thông số kiểm tra</b>	<b>Cường độ tiêu chuẩn (cps)</b>	<b>Cường độ thực tế (cps)</b>
Be 9	> 2000	3385
In 115	> 40000	52105
U 238	> 30000	70057
Background 220	$\leq 2$	1,367
CeO 156/ Ce 140	$\leq 0,025$	0,020
Ce <sup>++</sup> 70/ Ce 140	$\leq 0,03$	0,021

Trong đó, độ nhạy của thiết bị chủ yếu dựa trên tính đáp ứng về cường độ của nguyên tố Indium, tỉ lệ CeO/Ce và Ce<sup>++</sup>/Ce. Cường độ thực tế của các thông số trên sau mỗi lần kiểm tra hằng ngày có thể thay đổi, nhưng vẫn phải đạt được theo tiêu chuẩn của hãng để đảm bảo độ ổn định, độ nhạy của thiết bị. Vì vậy, việc vệ sinh thường xuyên các giao diện mẫu (sampler cone, skimmer cone, hyper skimmer cone), torch, cũng như bảo dưỡng thiết bị định kỳ là cần thiết.

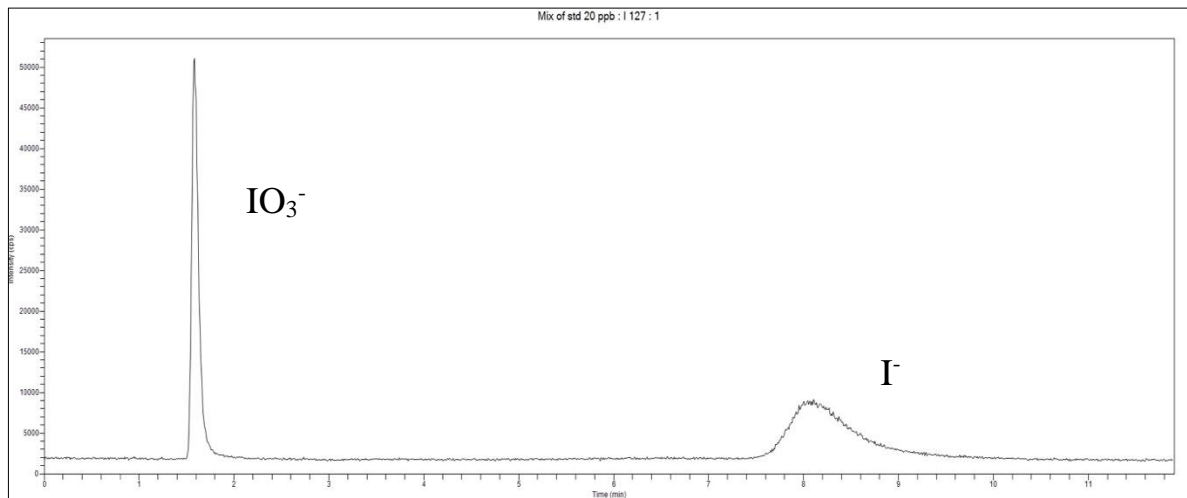
## 3.2. TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN PHÂN TÍCH TRÊN HỆ THỐNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

### 3.2.1. Khảo sát thành phần pha động

Pha động là yếu tố quyết định đến hiệu quả tách sắc ký. Nhìn chung, pha động có thể ảnh hưởng đến: độ chọn lọc của hệ pha, thời gian lưu giữ của chất tan, hiệu lực của cột tách (đại lượng Nef), độ phân giải của các chất, độ rộng của peak sắc ký... Tham khảo một số tài liệu về phân tích dạng iodine và iodide tổng số và khuyến cáo của nhà sản xuất về điều kiện tách dạng iodine, pha động được lựa chọn khảo sát là:

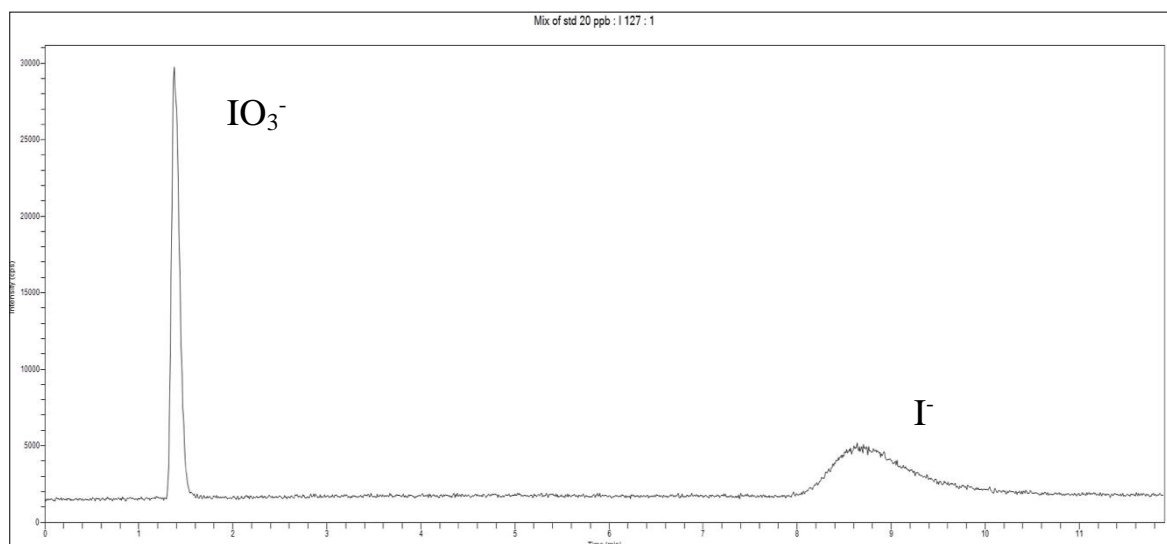
- Pha động 1: 0,9 mM OSA và 20 mM boric acid trong nước deion
- Pha động 2: 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 5 mM EDTA trong nước deion, điều chỉnh ở pH = 7

Phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp 2 chất iodide và iodate có nồng độ 20 ppb sử dụng hai pha động với tốc độ dòng 0,6 ml/phút, kết quả thu được các sắc ký đồ như dưới đây:



Peak #	Thời gian lưu (min)	Tên chất	Số khối	Diện tích	Chiều cao
1	1.584	Iodate	I 127	250,037	48,966
2	8.048	Iodide	I 127	295,908	6,700

Hình 3.1. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động 1



Peak #	Thời gian lưu (min)	Tên chất	Số khối	Diện tích	Chiều cao
1	1.378	Iodate	I 127	174,596	28,161
2	8.634	Iodide	I 127	137,339	2,971

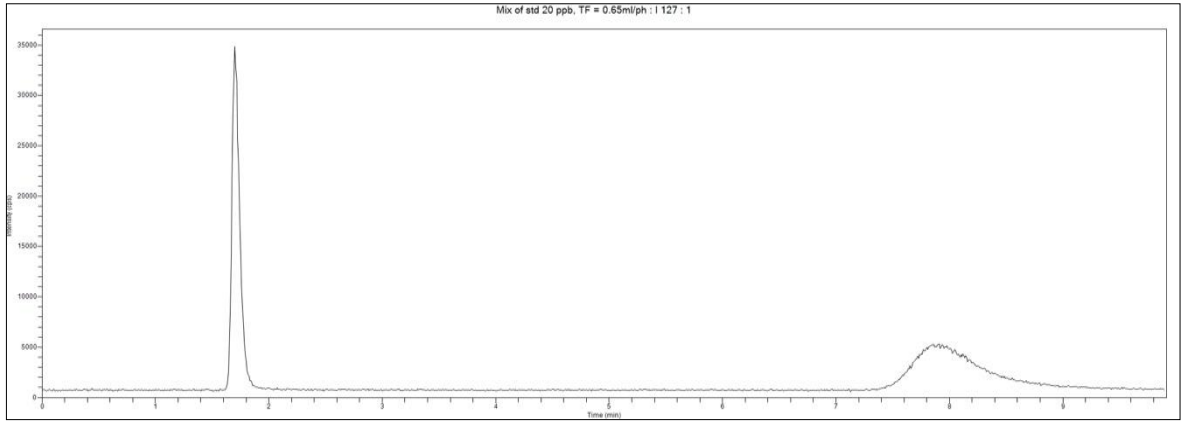
Hình 3.2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động 2

Kết quả trên sắc ký đồ trên 2 pha động cho thấy mặc dù thời gian rửa giải gần tương đương, tín hiệu nhiễu đường nền thấp; nhưng trong điều kiện chạy pha động 1 (0,9 mM OSA và 20 mM boric acid trong nước) tín hiệu diện tích và chiều cao của peak ghi nhận được của cả hai dạng iodide và iodate đều cao hơn đối với pha động 2. Tỷ lệ S/N khi chạy pha động 1 cũng cho kết quả tốt hơn đối với dạng iodide. Do đó pha động 1 gồm: 0,9 mM OSA và 20 mM boric acid trong nước deion được lựa chọn để tiến hành các khảo sát tiếp theo.

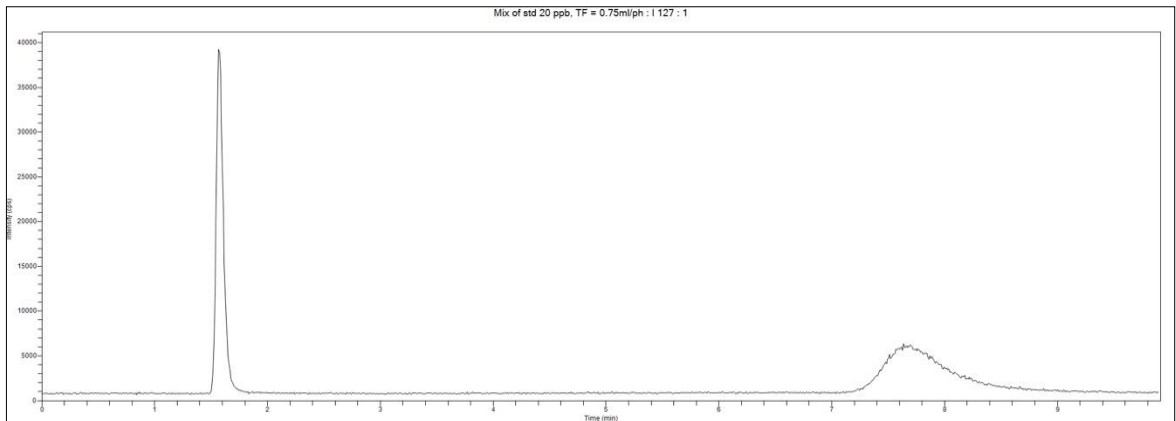
### 3.2.2. Khảo sát tốc độ dòng

Tốc độ dòng pha động là yếu tố liên quan trực tiếp tới thời gian lưu và độ phân giải của các chất phân tích. Tốc độ dòng phải đảm bảo không quá nhỏ để giảm thời gian phân tích nhưng cũng không quá lớn để giữ ổn định áp suất cho cột và hệ thống bơm. Khảo sát tốc độ dòng bơm mẫu ở 3 mức: 0,65; 0,75; 0,85 ml/phút. Kết quả được chỉ ra trên Hình 3.3 – Hình 3.5.

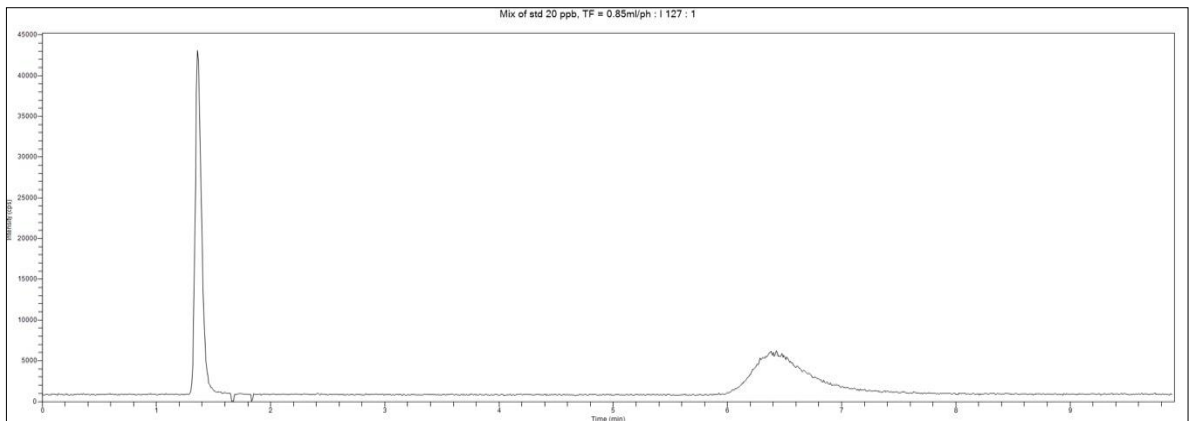




Hình 3.3. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện tốc độ dòng: 0,65 ml/phút



Hình 3.4. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện tốc độ dòng: 0,75 ml/phút



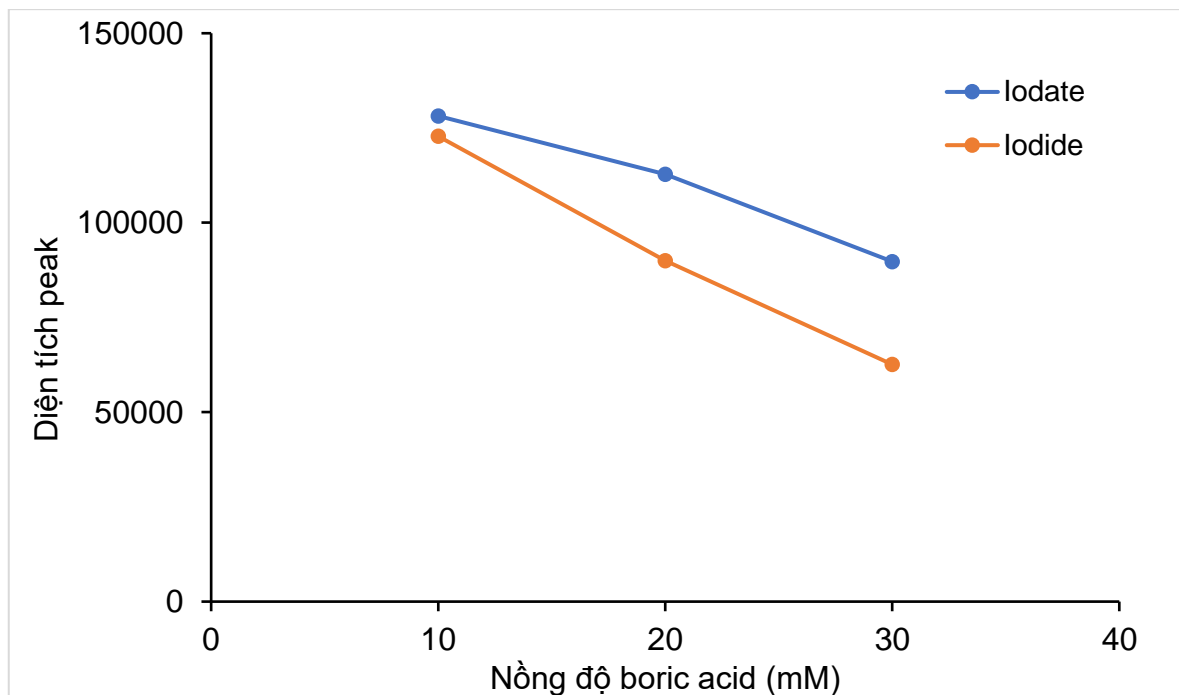
Hình 3.5. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện tốc độ dòng: 0,85 ml/phút

Quan sát các sắc ký đồ thu được cho thấy, khi tăng tốc độ dòng thời gian lưu của các chất phân tích giảm giúp tiết kiệm được thời gian phân tích và dung môi sử dụng. Nghiên cứu không thực hiện các khảo sát ở tốc độ dòng cao hơn

do sự giảm thời gian lưu của các chất phân tích là không đáng kể và để phù hợp với lưu lượng dòng khí mang (0,82 ml/phút, xem Bảng 3.1). Do đó, tốc độ dòng pha động 0,85 ml/phút là điều kiện tối ưu sau khảo sát.

### 3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ boric acid trong pha động

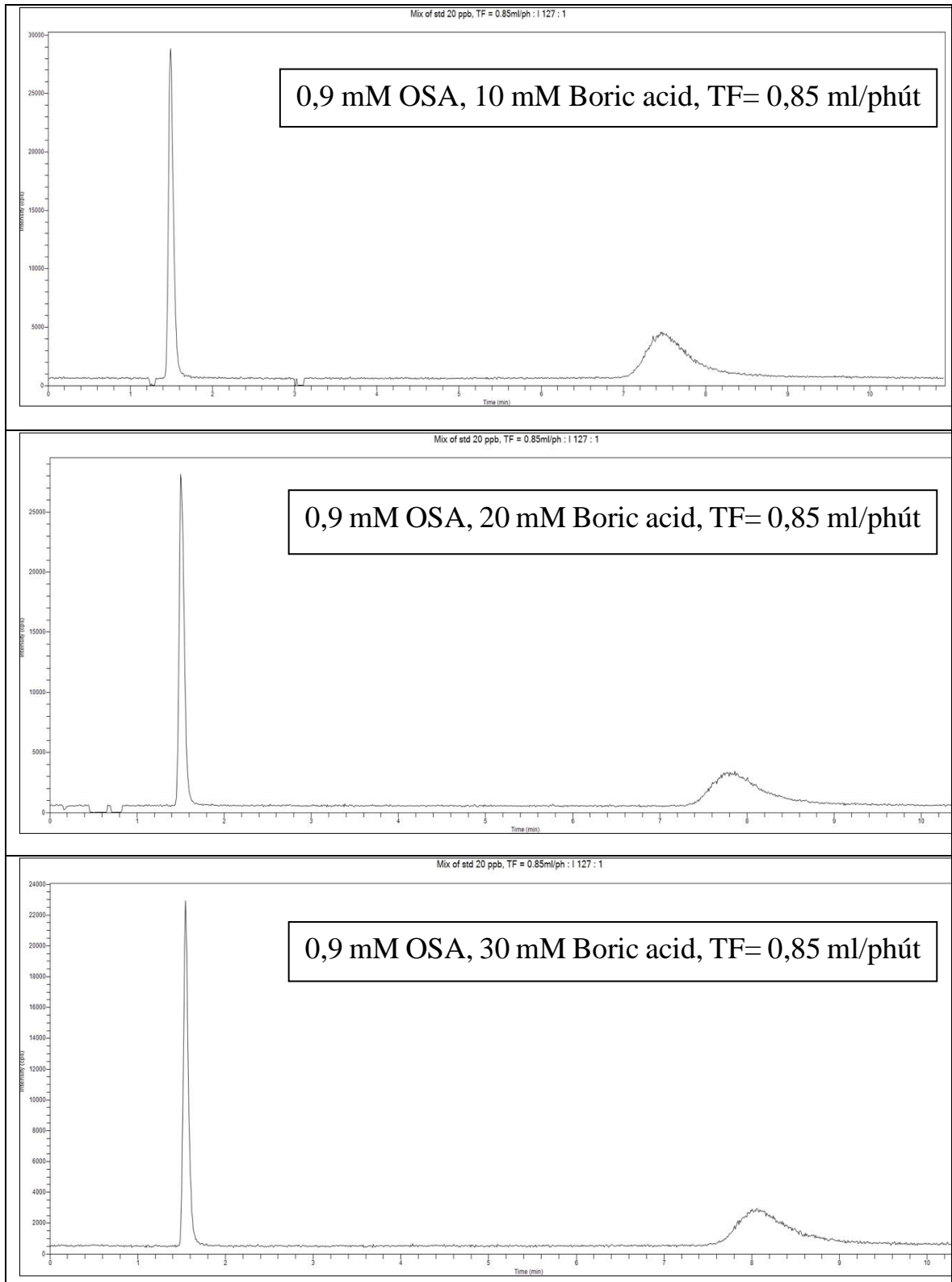
Hàm lượng acid boric trong pha động lại đóng vai trò kiểm soát độ phân cực và là yếu tố quan trọng góp phần rửa giải các chất phân tích ra khỏi cột tách. Do đó, nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng acid boric trong pha động ở các mức nồng độ 10; 20; 30 mM. Khảo sát thực hiện với dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ 20 ppb. Kết quả sự phụ thuộc của tín hiệu phân tích các dạng iodide, iodate với pha động trong điều kiện nồng độ acid boric thay đổi được thể hiện ở Hình 3.6.



Hình 3.6. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ boric acid trong pha động

Từ biểu đồ cho thấy, khi tăng nồng độ boric acid trong pha động từ 10 đến 30 mM, tín hiệu các chất phân tích giảm dần. Mặc dù vậy, không có sự khác biệt đáng kể về thời gian lưu và tín hiệu peak của dạng iodide thu được vẫn bị tù, chên peak doãng, không đáp ứng tốt về độ nhạy so với dạng iodate (Hình 3.7. Sắc ký đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ boric acid trong pha động

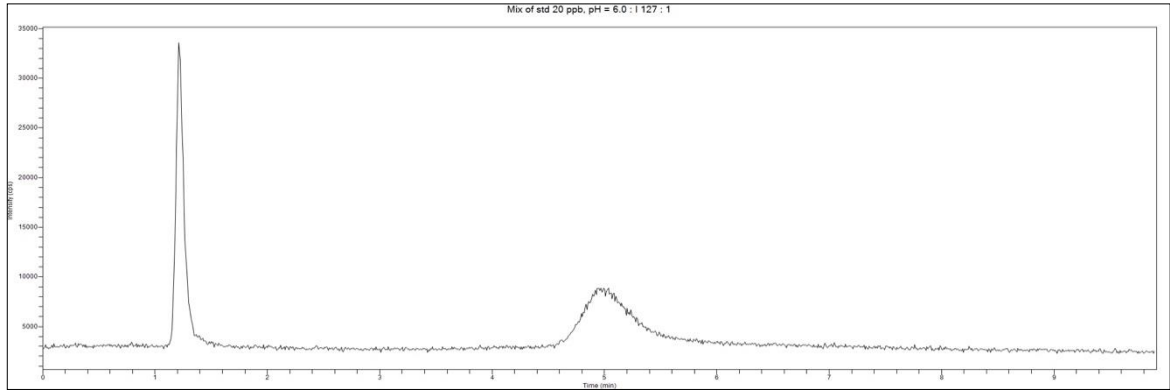
). Do đó, boric acid có nồng độ 10 mM được lựa chọn cho những khảo sát tiếp theo để rửa giải iodide ra sớm hơn nhằm tăng cường độ nhạy và tiết kiệm thời gian phân tích.



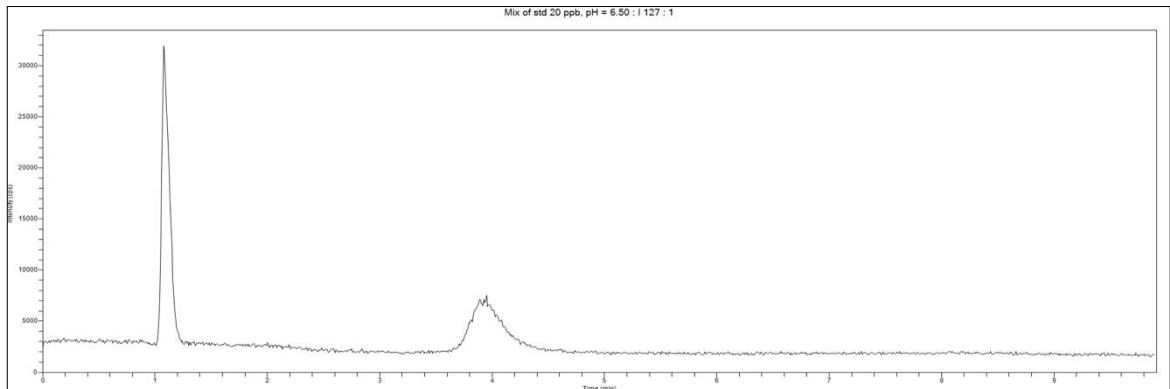
Hình 3.7. Sắc ký đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ boric acid trong pha động

### 3.2.4. Khảo sát pH pha động

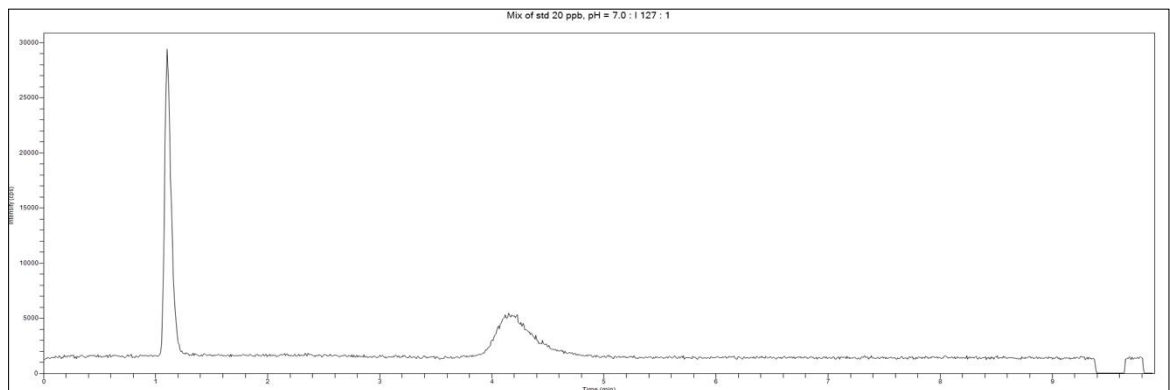
Trong khảo sát pH của pha động, nhóm nghiên cứu thực hiện thí nghiệm dựa trên pha động với những thành phần được lựa chọn trước đó, khoảng pH được lựa chọn để khảo sát từ 6-8 với bước nhảy là 0,5 và được điều chỉnh bằng dung dịch ammonia 10%. Kết quả được chỉ ra trên Hình 3.8 – Hình 3.12.



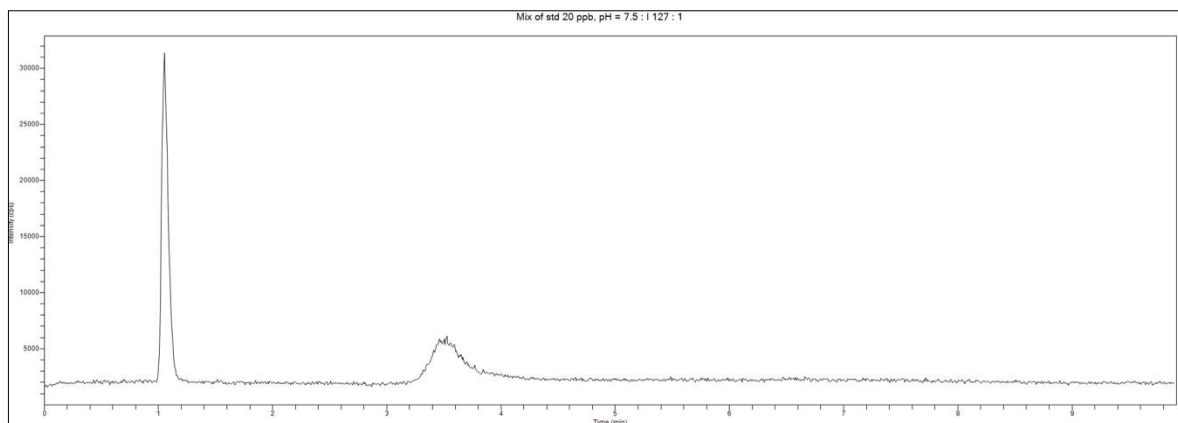
Hình 3.8. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 6,0



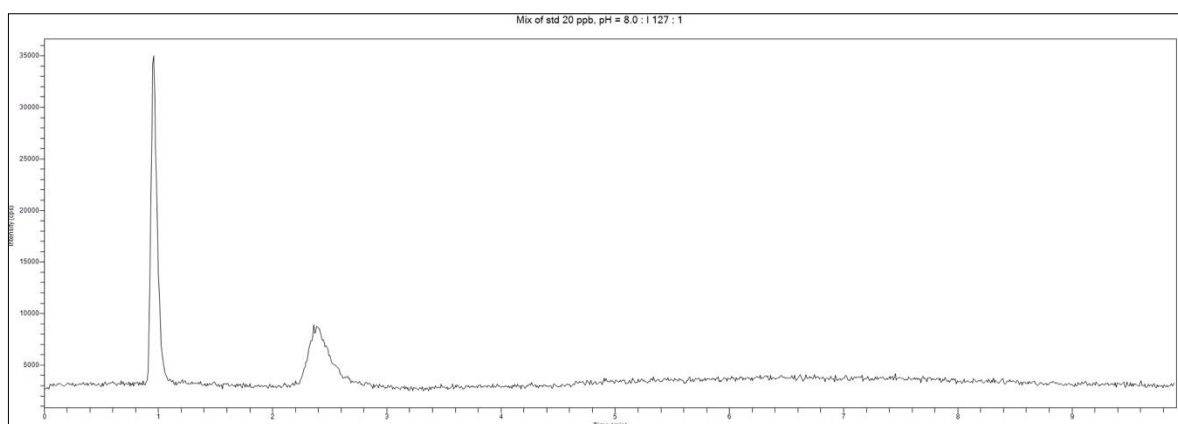
Hình 3.9. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 6,5



Hình 3.10. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 7,0



Hình 3.11. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 7,5



Hình 3.12. Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 ppb trong điều kiện pha động pH 8,0

Kết quả khảo sát cho thấy khi pH tăng thì thời gian lưu của các chất phân tích giảm dần. Trong tất cả các trường hợp khảo sát, sắc ký đồ của hai dạng iodide và iodate đều có độ phân giải tốt; tuy nhiên, trong điều kiện pH = 8,0 chân peak iodide gọn hơn và thời gian lưu ngắn nhất. Nghiên cứu không tiến hành khảo sát ở giá trị pH > 8,0 do khuyến cáo của nhà sản xuất về khoảng pH làm việc của cột tách (pH = 2 – 8 ). Do đó giá trị pH = 8,0 là điều kiện tối ưu được lựa chọn.

### 3.2.5. Điều kiện tối ưu trên hệ thiết bị HPLC-ICP-MS

Qua quá trình khảo sát và tối ưu, các điều kiện phân tích trên thiết bị ghép nối HPLC-ICP-MS Nexion 350X của hãng Perkin Elmer được tổng hợp trong Bảng 3.3.

*Bảng 3.3. Các điều kiện tối ưu phân tích dạng iodine trên hệ thiết bị HPLC-ICP-MS*

<b>HPLC</b>	Cột	Cột anion NI-424 (5 $\mu\text{m}$ $\times$ 4,6 mm $\times$ 100 mm, Shodex)
	Pha động	Acid boric (10 mM) : Sodium-1- octane sulfonate OSA (0,9 mM) pH 8,0
	Thể tích tiêm mẫu	25 $\mu\text{l}$
	Tốc độ pha động	0,85 ml/phút
<b>ICP-MS</b>	Đồng vị	$^{127}\text{I}$
	Công suất RF	1200 W
	Lưu lượng khí mang	0,82 L/min
	Lưu lượng khí Plasma	19,0 L/min
	Số lần quét khối	20
	Thời gian trễ	500 ms

### **3.3. TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN XỬ LÝ MẪU**

Như đề cập đến trong mục 2.2.4.2, điều kiện xử lý mẫu ban đầu được đề xuất như sau: mẫu được chiết trong dung môi thích hợp đồng thời sử dụng một số tác nhân để kết tủa loại bỏ protein sữa. Một số dung môi chiết được lựa chọn dựa trên các tài liệu tham khảo, tính chất hóa học đặc trưng của hai dạng iodide và iodate để đảm bảo không có sự chuyển hóa giữa các dạng như nước deion, acetic acid, dung môi hữu cơ như methanol (MeOH), acetonitrile (ACN)...

Một số tác nhân phổ biến thường sử dụng để kết tủa protein trong sữa được khảo sát trong nghiên cứu này là trichloride acetic acid (TCA), ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , hay hỗn hợp Carrez I và Carrez II.

Theo đó, sau khi cân, mẫu được hòa trong dung môi chiết. Sau đó dịch mẫu được đem đi lắc ngang hoặc lắc vortex để đảm bảo mẫu được hòa tan hết vào dung môi. Sau khi lắc vortex mẫu được đem đi rung siêu âm trong bể rung có điều nhiệt ở nhiệt độ và thời gian xác định. Sau khi chiết bổ sung tác nhân kết tủa vào dịch mẫu, lắc nhẹ dịch mẫu, chuyển dịch mẫu vào bình định mức

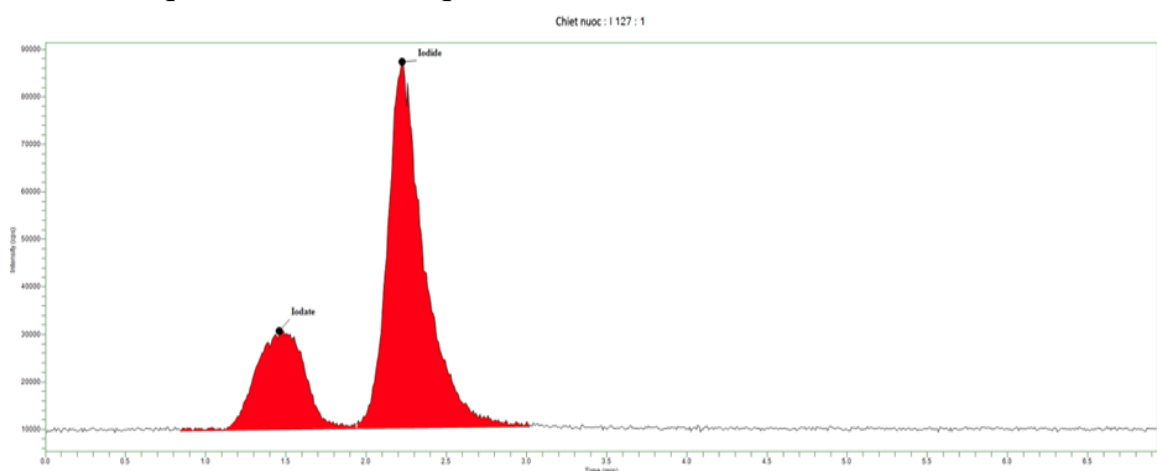
và định mức đến thể tích xác định bằng dung môi chiết, rồi đem đi ly tâm lạnh (20 °C) ở 6000 vòng/phút trong 5 phút, mẫu sau ly tâm đã tách kết tủa, hút lấy phần dịch trong lọc qua màng 0,22  $\mu\text{m}$  trước khi phân tích trên hệ thống HPLC-ICP-MS.

### 3.3.1. Khảo sát dung môi chiết

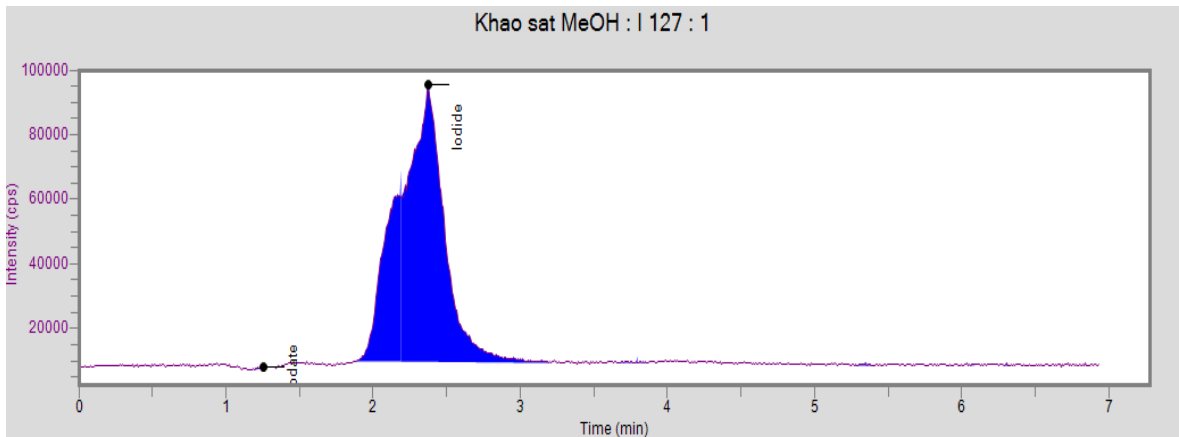
Trong sữa và sản phẩm sữa hàm lượng iodide và iodate thường rất thấp, do đó quy trình phân tích yêu cầu phải chiết được hoàn toàn cả hai dạng và quá trình chiết phải đảm bảo các dạng iodine không bị chuyển hóa. Nghiên cứu tập trung vào một số dung môi chiết khác nhau để khảo sát, mục tiêu để đưa ra quy trình nhanh, chính xác, phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm và quan trọng nhất có khả năng phân tích được với điều kiện cột và pha động đã lựa chọn.

Tham khảo một số tài liệu [26, 30] và tính chất hóa học đặc trưng của hai dạng là iodide có tính khử còn iodate thì có tính oxy hóa mạnh nên một số dung môi chiết được lựa chọn như sau: nước, acid acetic 4%, dung dịch MeOH 30%, dung dịch ACN 20%.

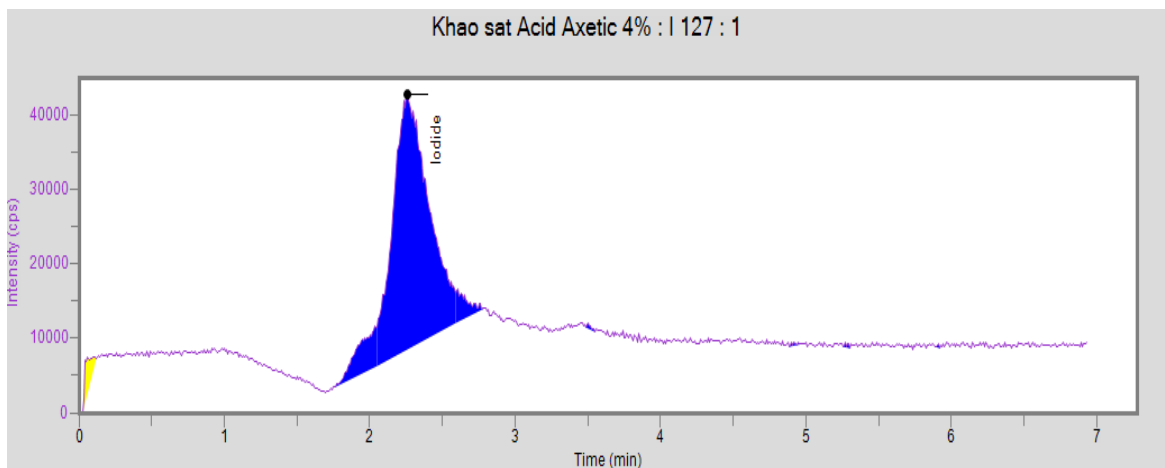
Khảo sát sơ bộ trên nền mẫu sữa bột, theo đó mẫu chỉ chứa dạng iodide, không chứa iodate nên để đánh giá quá trình chiết cũng như sự chuyển dạng giữa iodide và iodate trong quá trình chiết thì iodate được bổ sung dưới dạng dung dịch chuẩn pha từ muối  $\text{KIO}_3$ . Các điều kiện chiết khác được giữ cố định như: thời gian chiết 30 phút, nhiệt độ chiết 50 °C (nhiệt độ hoàn nguyên của sữa). Kết quả được thể hiện qua Hình 3.13 – Hình 3.16.



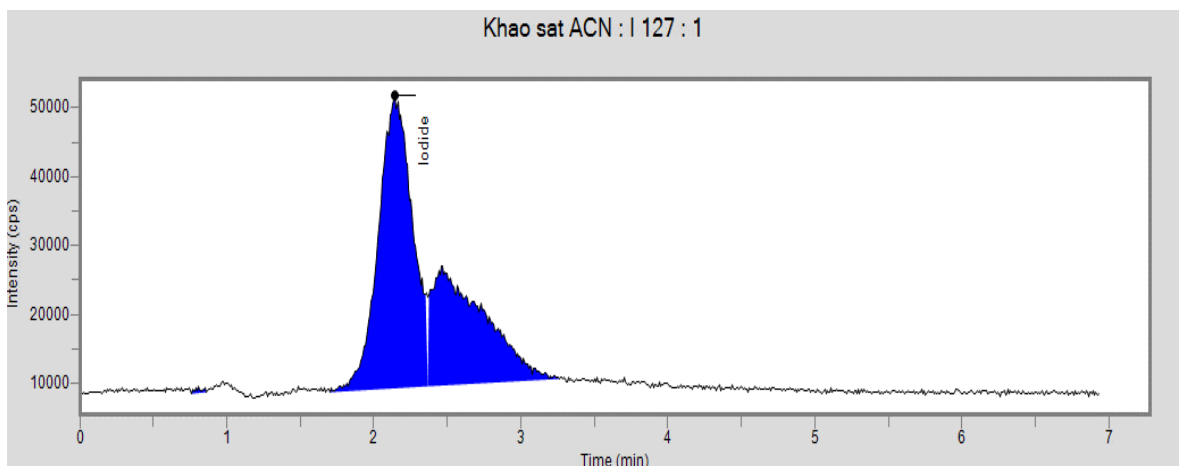
Hình 3.13. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột khi chiết trong nước deion



Hình 3.14. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột khi chiết trong dung dịch  
MeOH 30%



Hình 3.15. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột khi chiết trong dung dịch acetic  
acid 4%



Hình 3.16. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột khi chiết trong dung dịch ACN  
20%



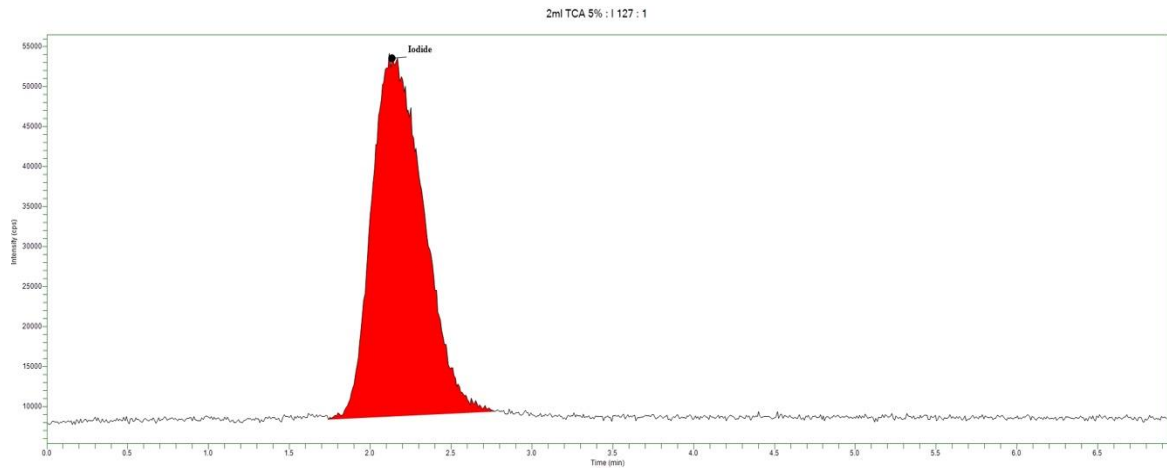
Kết quả sắc ký đồ trong Hình 3.13 – Hình 3.16 cho thấy chỉ khi chiết trong dung môi là nước deion thì mới thu được tín hiệu cao và cân đối của hai chất iodide và iodate. Trong hầu hết các trường hợp chiết trong các dung môi khác chỉ thu được tín hiệu của iodide, chứng tỏ có thể đặt giả thuyết iodate đã bị chuyển hóa thành iodide hoặc mất đi trong quá trình chiết có tương tác với thành phần trong nền mẫu hoặc dung môi chiết. Hiện tượng peak của iodide bị tù, bị chẻ, không đối xứng, chân peak rộng, bị kéo đuôi còn quan sát thấy trong các trường hợp sử dụng dung môi chiết có thành phần hữu cơ như methanol và acetonitrile. Vì vậy, dung môi chiết là nước deion được lựa chọn để khảo sát các điều kiện tiếp theo.

### 3.3.2. Khảo sát tác nhân kết tủa protein

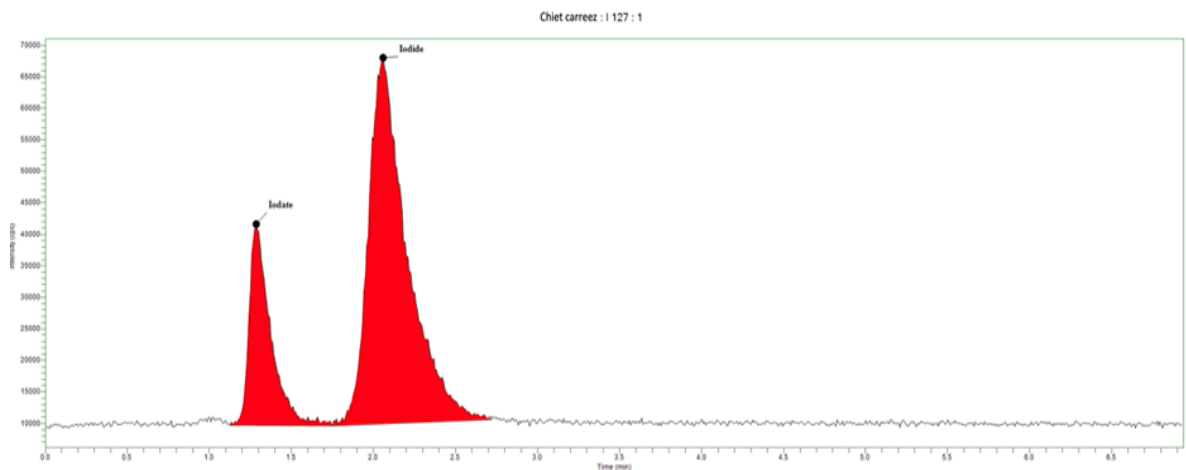
Kết quả sắc ký đồ **Error! Reference source not found.** cho thấy mặc dù chiết trong dung môi là nước deion cho tín hiệu của cả 2 dạng iodide và iodate nhưng peak của iodate bị tù do mẫu chỉ xử lý trong nước deion còn nhiều cặn protein, dịch mẫu còn đục nhiều, gây nhiễu nền ảnh hưởng đến chất phân tích có hàm lượng thấp như iodate. Vì thế mẫu sữa sau chiết phải kết tủa protein để làm sạch mẫu, giảm nhiễu đường nền và giảm ảnh hưởng nền mẫu đến chất phân tích, đảm bảo độ chính xác của kết quả phân tích trên hệ thống sắc ký, vừa giúp nâng cao tuổi thọ của cột sắc ký.

Nguyên tắc của kỹ thuật này là sử dụng tác nhân tạo kết tủa để loại đi phần lớn lượng protein có trong nền mẫu. Tác nhân gây kết tủa protein thường dùng là axit hữu cơ (như acid trichloroacetic, acid perchloric...), dung môi hữu cơ (như methanol, acetonitrile...), muối vô cơ (như  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , hỗn hợp Carrez I và Carrez II, ...).

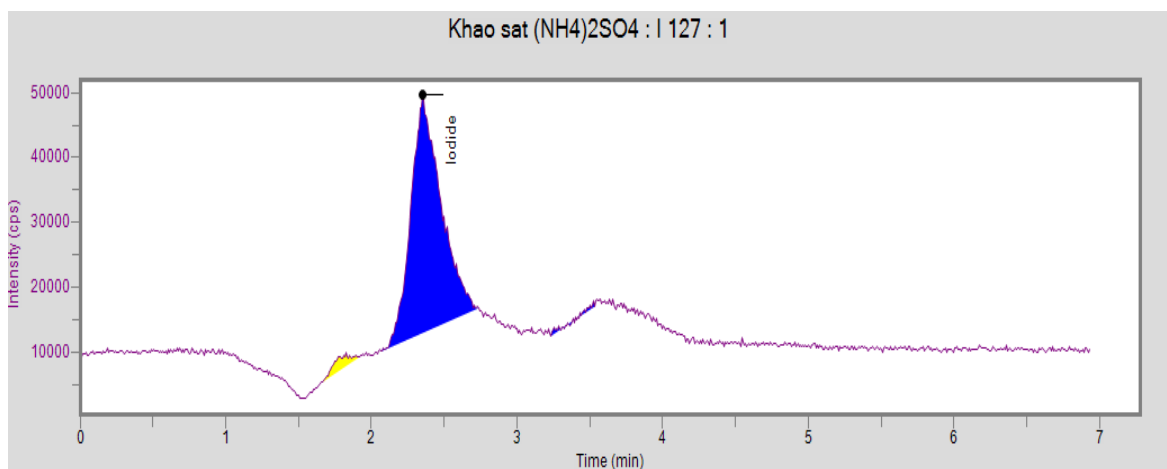
Để kết tủa protein trong mẫu sữa, nghiên cứu tập trung vào khảo sát các tác nhân như muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , hỗn hợp Carrez I và Carrez II, acid trichloroacetic (TCA). Theo đó, mẫu sau khi chiết trong nước deion, rung siêu âm ở nhiệt độ và thời gian xác định, bổ sung tác nhân kết tủa protein, chuyển vào bình định mức 50 mL và định mức đến vạch bằng nước deion, lắc đều dịch mẫu. Dem mẫu ly tâm lạnh ( $20\text{ }^\circ\text{C}$ ) ở 6000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó mẫu được lọc qua màng  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  trước khi phân tích trên hệ thống HPLC-ICP-MS. Kết quả phân tích được thể hiện qua Hình 3.17 – Hình 3.19.



Hình 3.17. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với tác nhân kết tủa protein là TCA



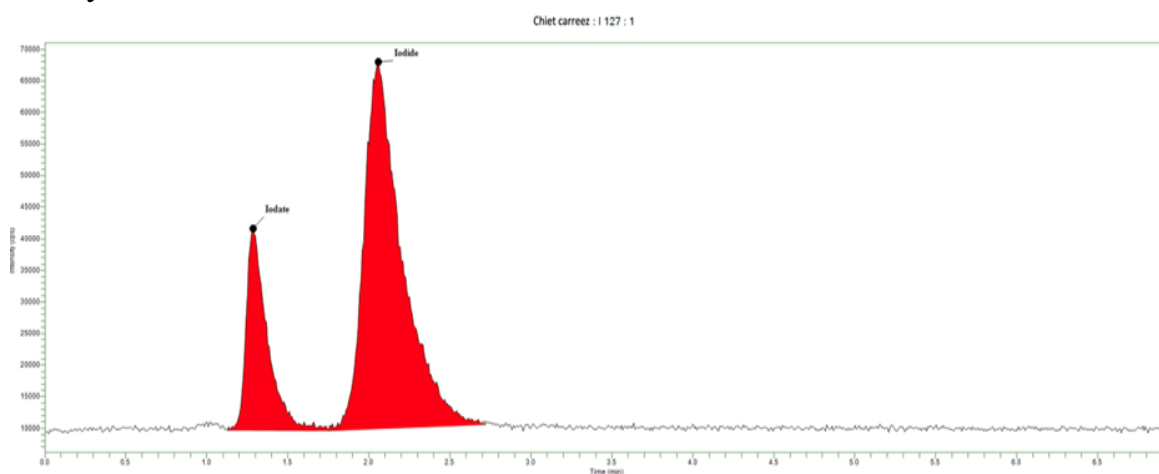
Hình 3.18. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với tác nhân kết tủa protein là Carrez I, Carrez II



Hình 3.19. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với tác nhân kết tủa protein là  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Sắc ký đồ khảo sát các tác nhân kết tủa protein cho thấy đối với tác nhân acid trichloroacetic (TCA) và ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  chỉ xuất hiện peak sắc ký đặc trưng của iodide và không cho thấy sự xuất hiện của dạng iodate. Điều đó có nghĩa khi chiết trong nước deion sử dụng 2 tác nhân này để kết tủa protein thì iodate đã bị chuyển hóa thành dạng iodide hoặc mất đi do hiện tượng thăng hoa trong quá trình chiết. Sử dụng tác nhân Carrez I, Carrez II cho peak sắc ký đặc trưng tại thời gian lưu của cả hai dạng iodide và iodate. Do vậy, tác nhân kết tủa là Carrez I, Carrez II được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

Để đánh giá khả năng ảnh hưởng của tác nhân kết tủa protein Carrez I, Carrez II đối với cả 2 dạng iodide và iodate trong quá trình chiết, tiến hành khảo sát thể tích Carrez I, Carrez II sử dụng. Với thể tích Carrez I, II sử dụng khi lượng mẫu cân khoảng 1 gram thì mẫu sau ly tâm, bằng cảm quan nhận thấy thể tích Carrez sử dụng ở mức 0,5 mL chưa đủ để kết tủa được hết protein trong mẫu, dịch mẫu vẫn còn đục. Với khối lượng mẫu cân khoảng 1 gram nhận thấy bổ sung 1 mL Carrez I và 1 mL Carrez II protein trong mẫu được kết tủa hoàn toàn sau ly tâm, thu được dịch trong suốt. Dịch mẫu đem phân tích cho sắc ký đồ như Hình 3.20.



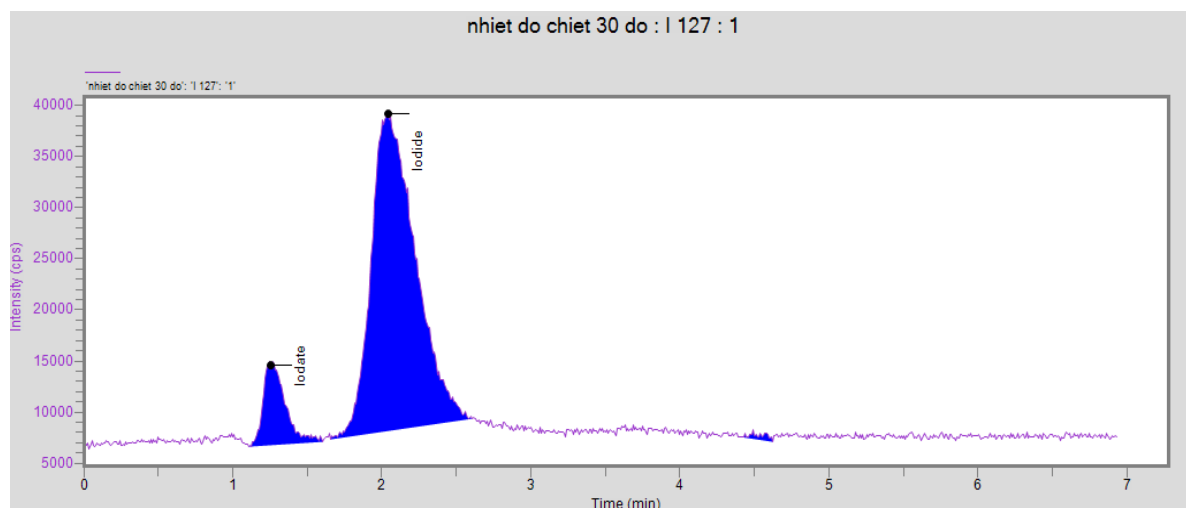
Hình 3.20. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thể tích Carrez I, Carrez II là 1 mL

Kết quả phân tích cho thấy tại thể tích Carrez I, II bổ sung ở mức 1,0 mL cho peak của cả hai dạng đều nhọn, cân đối, hàm lượng iodide và iodate thu hồi tại mức này đạt 90-98%. Do đó, thể tích Carrez I, II tối ưu để có thể chiết được toàn bộ cả 2 dạng iodide, iodate là 1,0 mL.

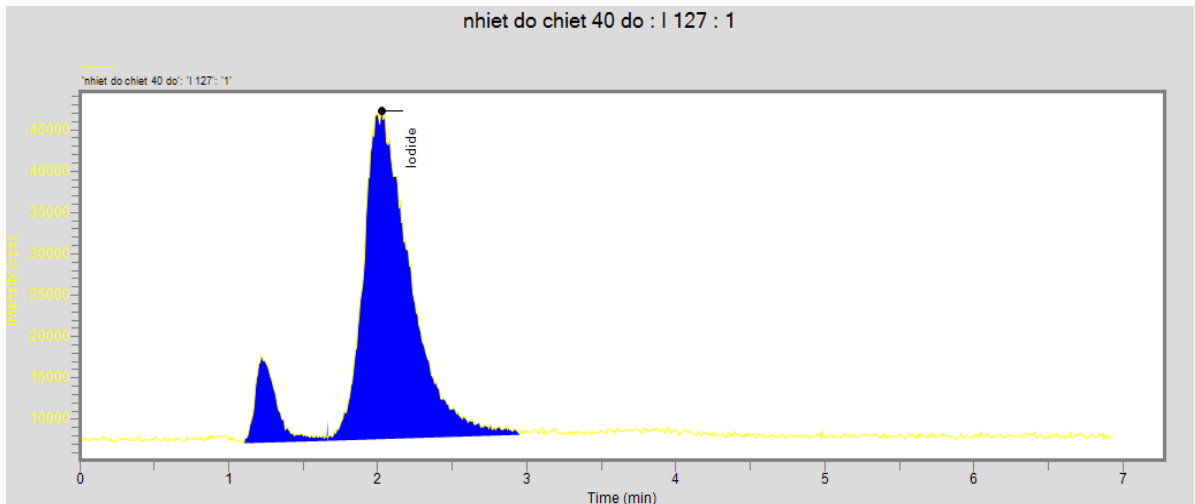
### 3.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết mẫu

Do tính chất hóa học đặc trưng của iodate và iodide là có tính oxy hóa và tính khử, cùng với đó thì sữa là nền mẫu khá phức tạp với nhiều thành phần khác nhau như vitamin, khoáng chất, acid amin... nên ở một điều kiện nhiệt độ thích hợp nào đó có thể dẫn đến các phản ứng hóa học giữa iodide, iodate với các thành phần khác có trong sữa, do đó khảo sát nhiệt độ chiết đóng vai trò quan trọng trong quá trình xử lý mẫu. Liejun Liu và các cộng sự [17] của mình đã nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự chuyển hóa iodate thành iodide và iodine trong muối ăn. Các mẫu thực phẩm được nấu chín có sử dụng muối iodate, nhiệt độ nấu và pH của mẫu thực phẩm cũng được xác định. Iodine trong mẫu thực phẩm sau khi nấu chín được chiết bằng nước khử ion, sau đó được đem phân tích trên thiết bị HPLC-ICP-MS. Kết quả nghiên cứu cho thấy có  $96,4\% \pm 14,7\%$  iodate chuyển thành iodide và iodine trong đó có  $86,8\% \pm 14,5\%$  iodate được chuyển đổi thành iodide và  $9,6\% \pm 6,2\%$  chuyển thành iodine là iodine dạng phân tử và dễ bị thăng hoa ở nhiệt độ thường.

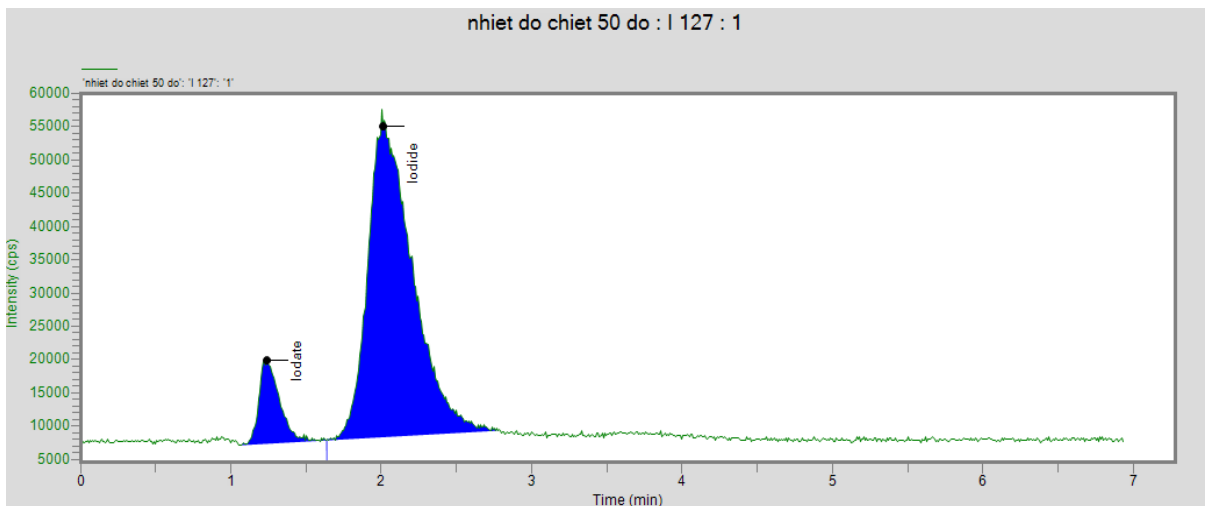
Nghiên cứu tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết mẫu sữa bột ở khoảng nhiệt độ từ  $30 - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$  với bước nhảy là  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  cho mỗi thí nghiệm. Do mẫu sữa bột chỉ chứa iodide nên tiến hành bổ sung iodate ở hàm lượng  $40\text{ }\mu\text{g}/100\text{g}$  mẫu. Kết quả thu được được trình bày trong Hình 3.21 – Hình 3.26.



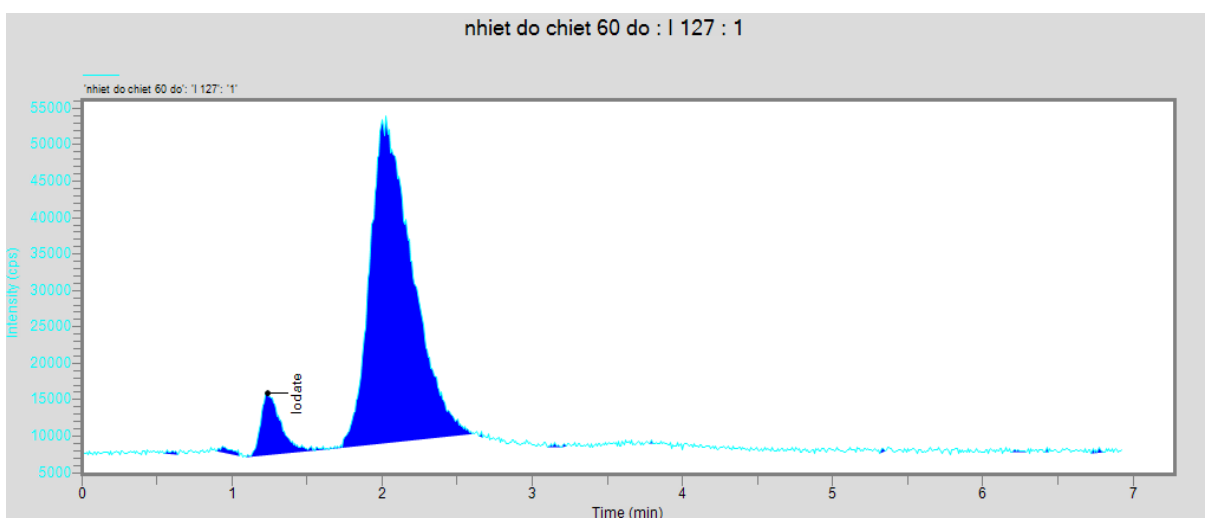
Hình 3.21. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$



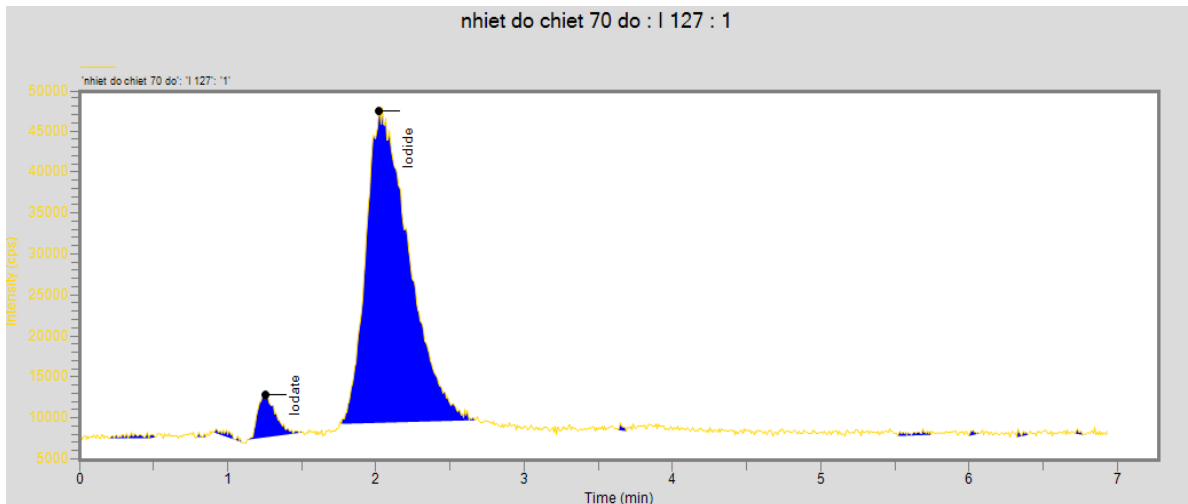
Hình 3.22. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết 40 °C



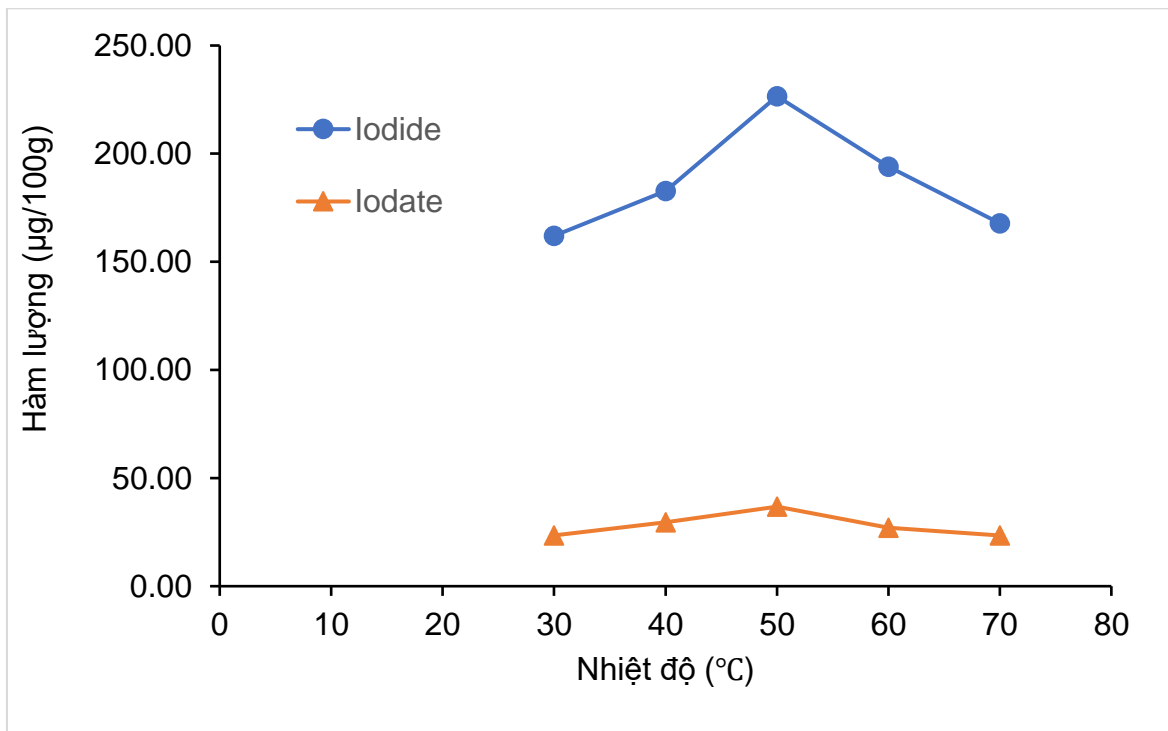
Hình 3.23. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết 50 °C



Hình 3.24. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết 60 °C



Hình 3.25. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với nhiệt độ chiết 70 °C



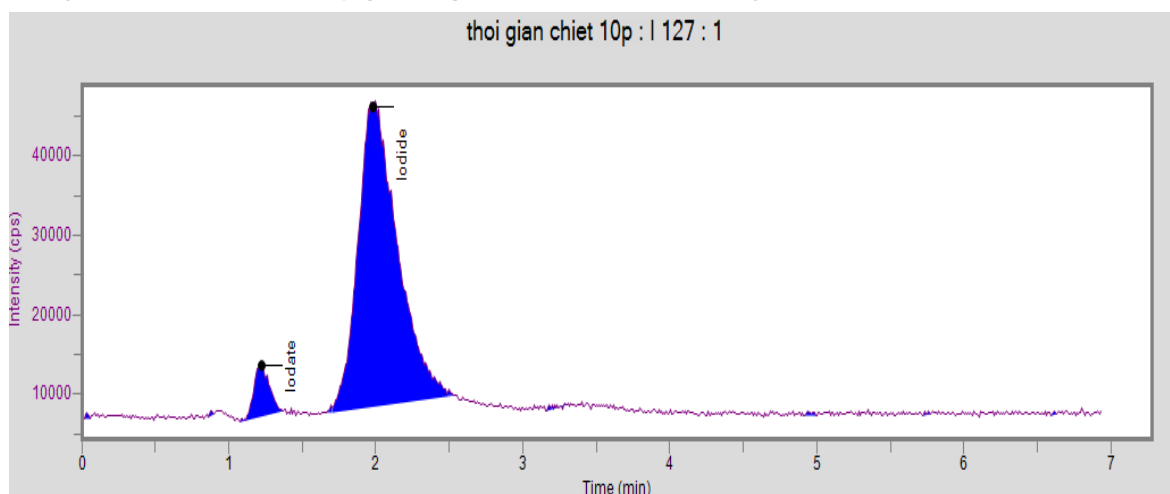
Hình 3.26. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đối với dạng iodide và iodate

Biểu đồ chỉ ra rằng, khi tăng nhiệt độ chiết mẫu từ 30 °C đến 50 °C hàm lượng cả 2 dạng iodide và iodate đều có xu hướng tăng dần, hiệu suất thu hồi đối với iodate tăng từ 58,6% đến 91,9%, iodide tăng từ 54,3% đến 91,8%. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ từ 50 °C đến 70 °C thì hiệu suất thu hồi cả hai dạng lại có xu hướng giảm dần, cụ thể độ thu hồi iodate giảm từ 92% xuống 56,8%, iodide giảm từ 91,5% đến 67,2%. Điều này cho thấy tại nhiệt độ 50 °C là nhiệt độ hoàn nguyên của sữa thì cho hiệu suất chiết cao nhất. Điều này có thể giải thích do ở nhiệt độ thấp chưa đủ để hòa tan cả 2 dạng iodide, iodate, do đó khi kết

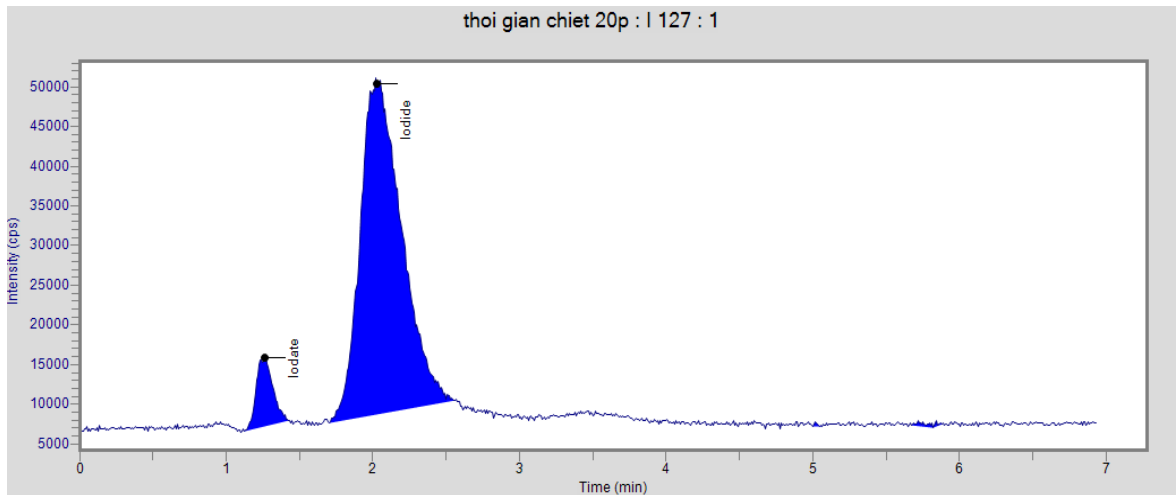
tủa protein thì một phần iodide, iodate bị mất trong quá trình loại kết tủa, tuy nhiên ở nhiệt độ cao lại là yếu tố thúc đẩy cho phản ứng chuyển hóa iodate thành iodide. Ngoài ra, iodide là chất khử mạnh nên có thể phản ứng với một số thành phần có tính oxy hóa trong sữa như ascorbic acid dẫn đến hàm lượng iodide giảm khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết. Vì vậy, nhiệt độ chiết tối ưu để đạt hiệu suất thu hồi tốt nhất cho cả hai dạng iodide và iodate là ở 50 °C cũng chính là nhiệt độ hoàn nguyên của sữa.

### 3.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết mẫu

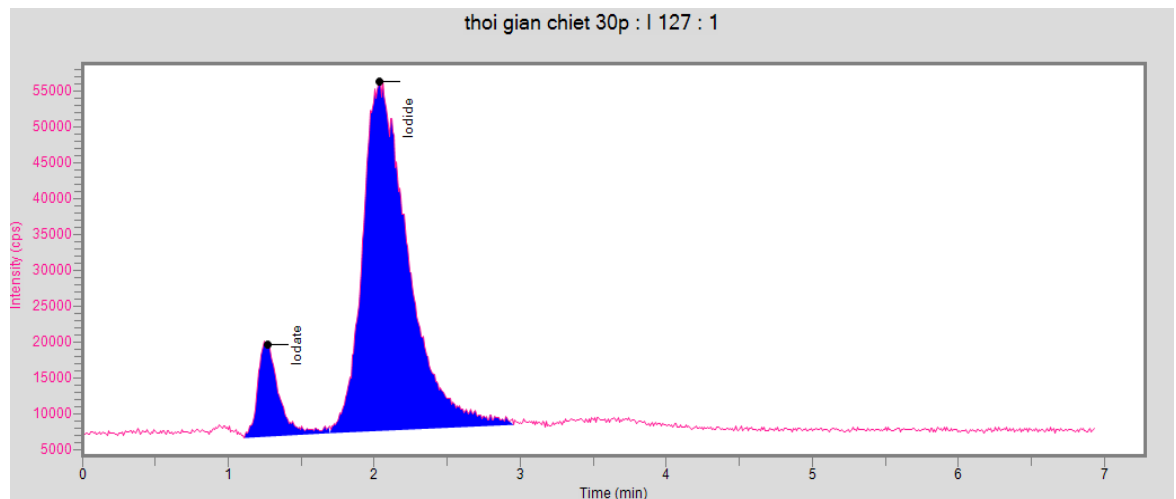
Khảo sát đánh giá ảnh hưởng của thời gian chiết mẫu trong quá trình xử lý đến hàm lượng chất phân tích vừa nhằm mục đích đảm bảo hiệu suất chiết mẫu tối ưu vừa giúp tiết kiệm thời gian xử lý mẫu. Nghiên cứu được khảo sát ở các mức thời gian 10 đến 50 phút với bước nhảy là 5 phút cho mỗi thí nghiệm trong điều kiện nhiệt độ 50 °C. Kết quả đánh giá trên nền mẫu sữa bột có bổ sung iodate ở mức 40 µg/100g được thể hiện trong Hình 3.27 – Hình 3.31.



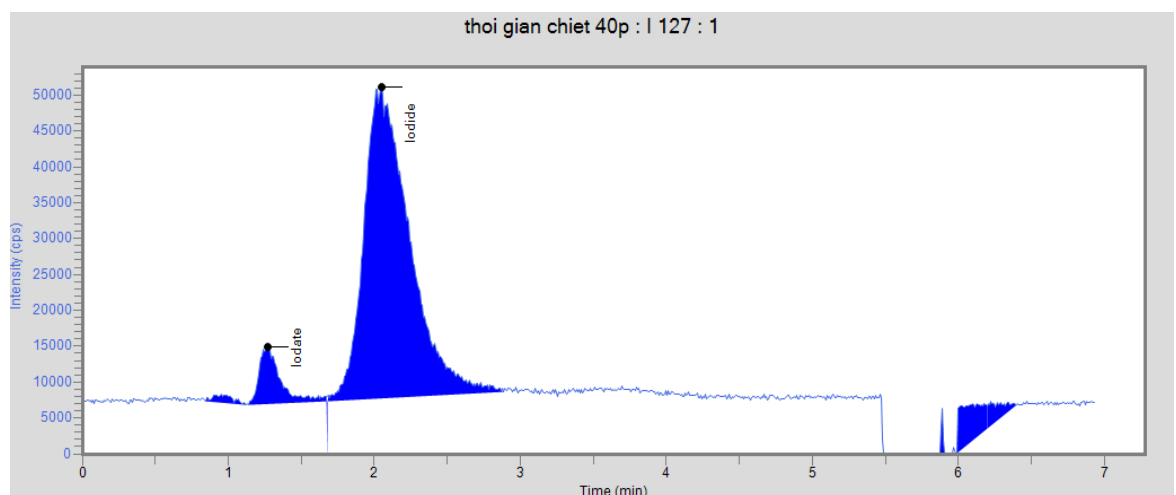
Hình 3.27. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 10 phút



Hình 3.28. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 20 phút

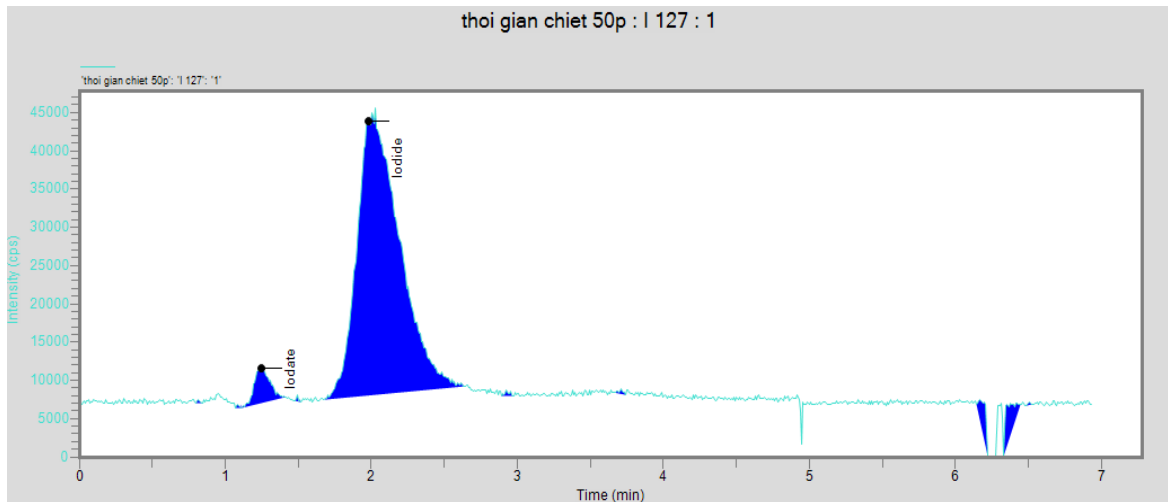


Hình 3.29. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 30 phút

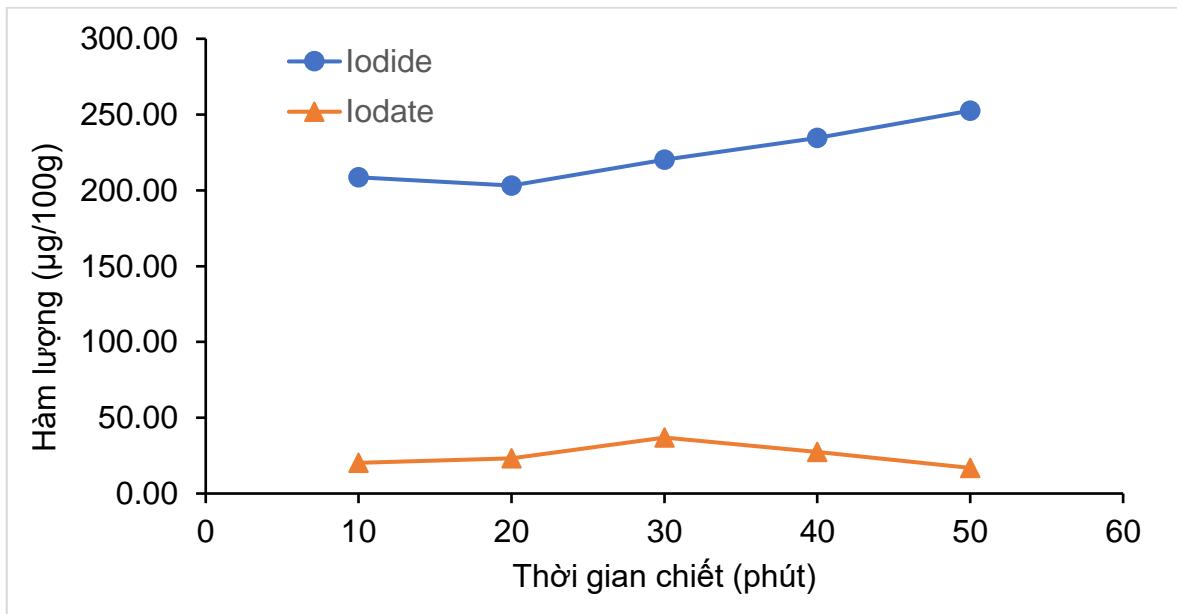


Hình 3.30. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 40 phút





Hình 3.31. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa bột với thời gian chiết 50 phút



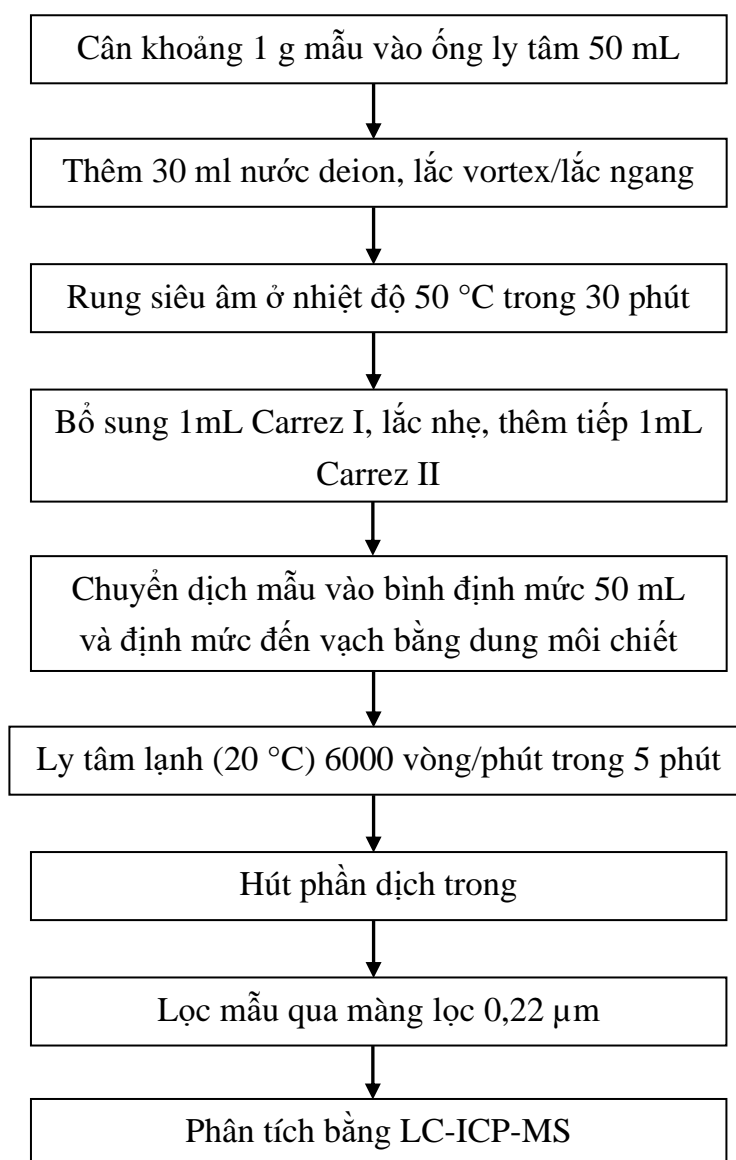
Hình 3.32. Ảnh hưởng của thời gian chiết đối với hàm lượng dạng iodide và iodate

Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng iodate thu được ban đầu có xu hướng tăng khi tăng thời gian chiết và đạt cực đại tại 30 phút. Sau đó, khi tiếp tục tăng thời gian chiết, hàm lượng iodate lại có xu hướng giảm đáng kể (Hình 3.32). Điều này có thể lý giải do một phần iodate đã chuyển hóa thành iodide hoặc mất đi do tạo thành iodine khi tăng thời gian chiết.

Trong khi đó hàm lượng iodide chiết được có xu hướng tăng khi tăng thời gian chiết mẫu từ 10 đến 30 phút và có xu hướng tăng nhẹ khi tiếp tục tăng thời gian chiết. Mặc dù vậy, sự khác biệt về kết quả phân tích sau thời gian chiết mẫu 40 phút và trên 50 phút là không đáng kể (Hình 3.32). Hàm lượng

iodide tăng do một phần iodate chuyển thành iodide. Vì vậy, trong nghiên cứu này, thời gian chiết mẫu tối ưu được lựa chọn là 30 phút.

Như vậy, từ các kết quả khảo sát trên, quy trình xử lý mẫu phân tích dạng iodide và iodate trong sữa và sản phẩm sữa được trình bày theo sơ đồ sau:

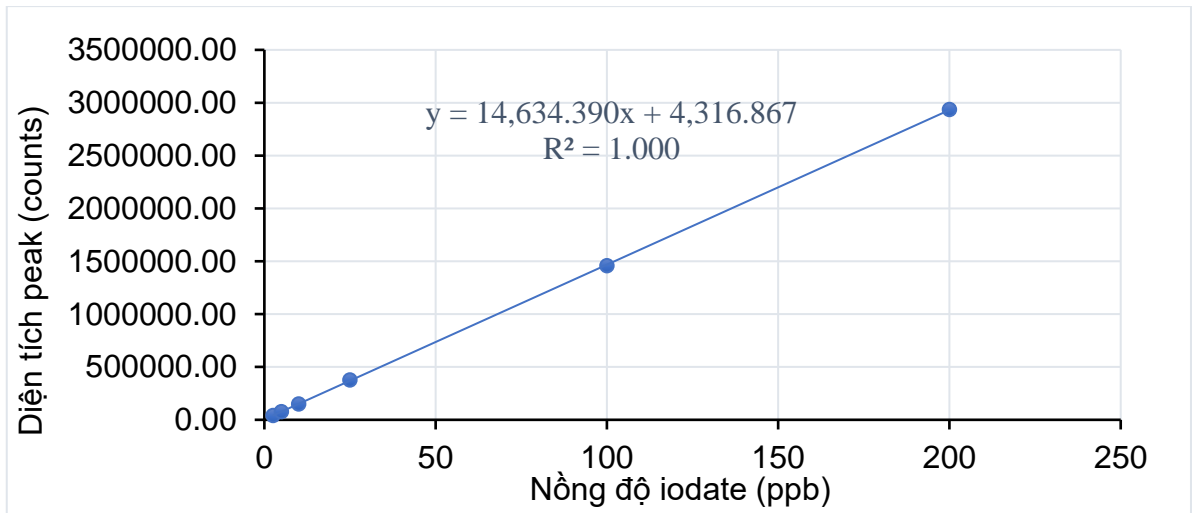


Hình 3.33. Quy trình xử lý mẫu tối ưu

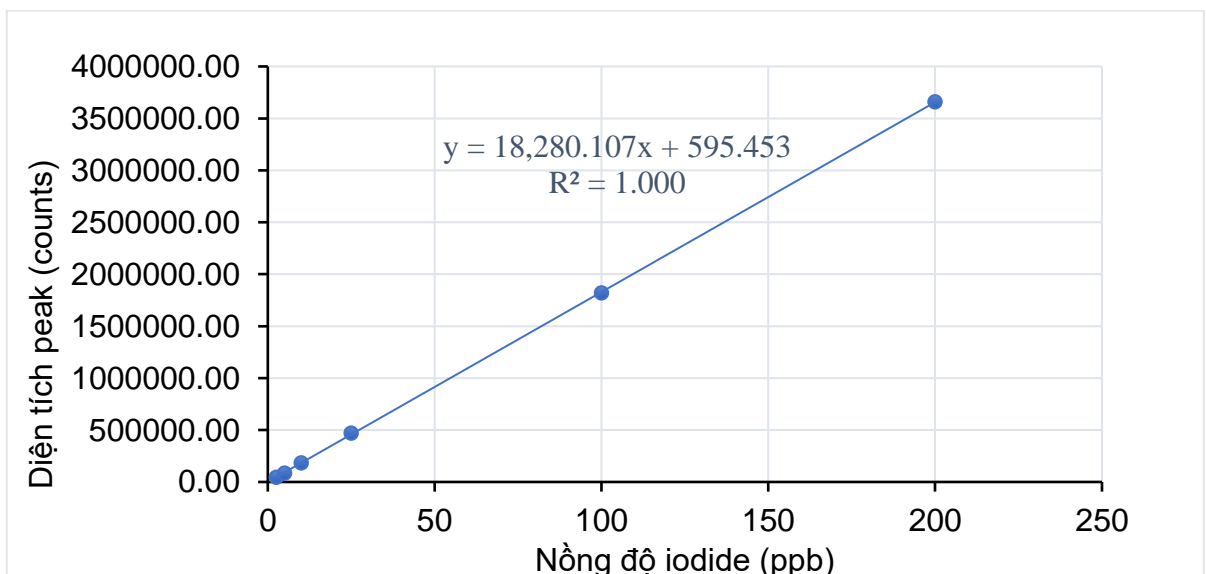
### 3.4. XÁC NHẬN GIÁ TRỊ SỬ DỤNG CỦA PHƯƠNG PHÁP

#### 3.4.1. Xây dựng đường chuẩn

Với các điều kiện đã chọn, tiến hành khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích peak sắc ký vào nồng độ của các chất. Kết quả xây dựng đường chuẩn được thể hiện trên Hình 3.34 và Hình 3.35. Phương trình đường chuẩn và hệ số hồi quy tuyến tính được tính toán và thể hiện trong Bảng 3.4.



Hình 3.34. Đường chuẩn xác định Iodate



Hình 3.35. Đường chuẩn xác định Iodide

Bảng 3.4. Các thông số đánh giá đường chuẩn phân tích

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan	Độ chệch tại nồng độ thấp nhất
Iodate	$y = 14634x + 4317$	1,000	1,54
Iodide	$y = 18280x + 595$	1,000	0,76

Đường chuẩn làm việc xác định các dạng iodide và iodate bằng HPLC-ICP-MS đều cho hệ số tương quan  $R^2 > 0,995$ , và độ chệch  $< 10\%$  tại mức nồng độ chuẩn thấp nhất, đáp ứng tốt yêu cầu về định lượng. Khoảng làm việc với

dãy chuẩn từ 2,5 – 200 ppb đáp ứng được toàn bộ nồng độ dạng iodide và iodate trong các sản phẩm sữa. Đối với một số mẫu có hàm lượng cao và nhiều béo như bơ, phomai, sự pha loãng là cần thiết để thu được tín hiệu đo của iodide và iodate trong khoảng làm việc của đường chuẩn, đồng thời giúp giảm sự nhiễm bẩn hệ thống. Đường chuẩn làm việc được chuẩn bị và xây dựng mới hàng ngày trước khi phân tích.

### 3.4.2. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Nghiên cứu tập trung thăm định các thông số trên hai nhóm đối tượng chính là sữa dạng bột (sữa công thức cho trẻ em) và sữa dạng lỏng (sữa tươi tiệt trùng).

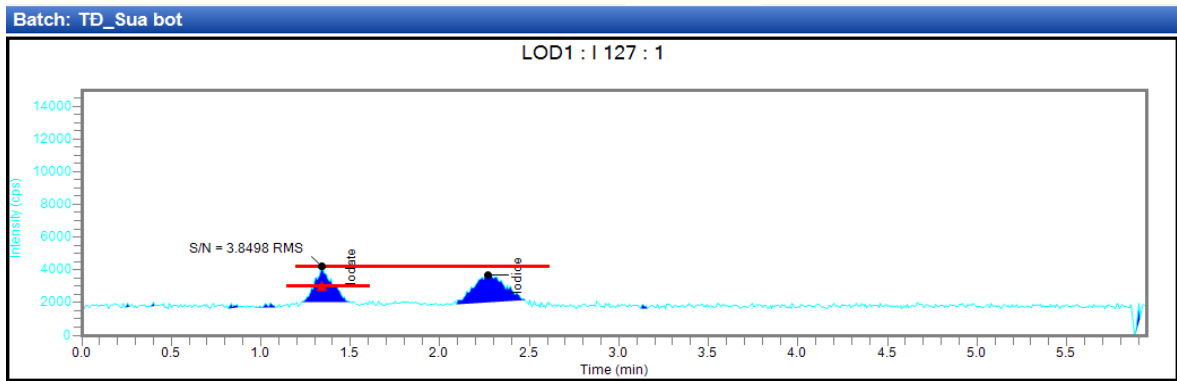
Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp được tính toán dựa vào tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu ( $S/N = \text{Signal to noise ratio}$ ). Qua khảo sát nhận thấy hầu hết các sản phẩm sữa phổ biến trên thị trường đều có hàm lượng iodide ở ngưỡng cao nên để đánh giá giới hạn định lượng, trong nghiên cứu này đối tượng mẫu dùng để khảo sát là mẫu trắng tức mẫu sữa bột không có iodide và iodate (tập trung vào các sản phẩm sữa chưa phổ biến trên thị trường). Phân tích lặp lại 4 lần mẫu trắng có bổ sung chuẩn dạng iodide và iodate ở nồng độ thấp hơn nồng độ thấp nhất của đường chuẩn mà tại đó tỷ lệ tín hiệu/nhiễu bằng 3 ( $S/N = 3$ ).

*Bảng 3.5. Giới hạn phát hiện iodide, iodate trên nền mẫu sữa bột, sữa lỏng*

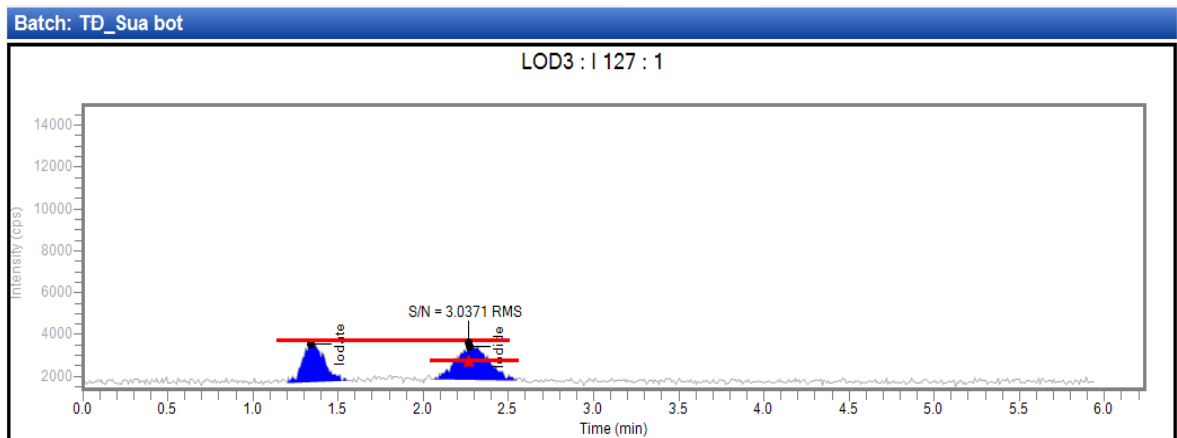
Nền mẫu	Sữa bột	Sữa lỏng
$LOD_{\text{Iodate}}$	0,024 mg/kg	0,010 mg/L
$LOD_{\text{Iodide}}$	0,024 mg/kg	0,010 mg/L

*Bảng 3.6. Giới hạn định lượng iodide, iodate trên nền mẫu sữa bột, sữa lỏng*

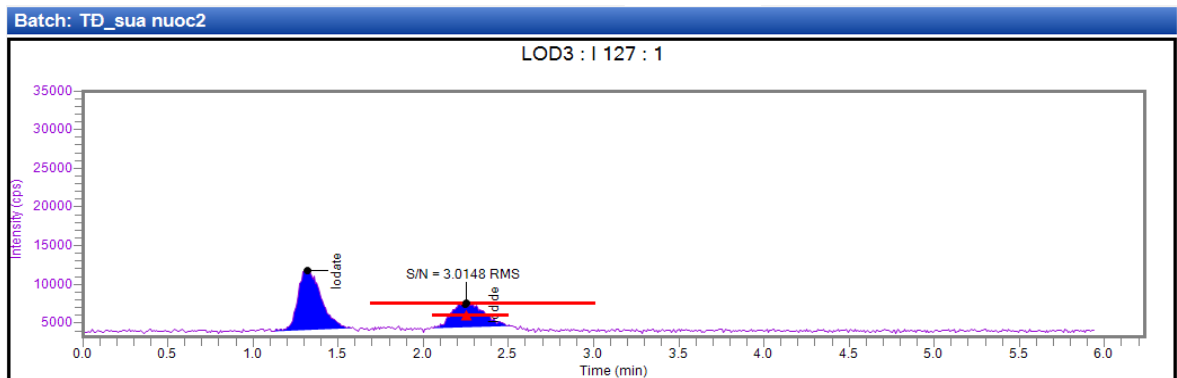
Nền mẫu	Sữa bột	Sữa lỏng
$LOQ_{\text{Iodate}}$	0,079 mg/kg	0,033 mg/L
$LOQ_{\text{Iodide}}$	0,079 mg/kg	0,033 mg/L



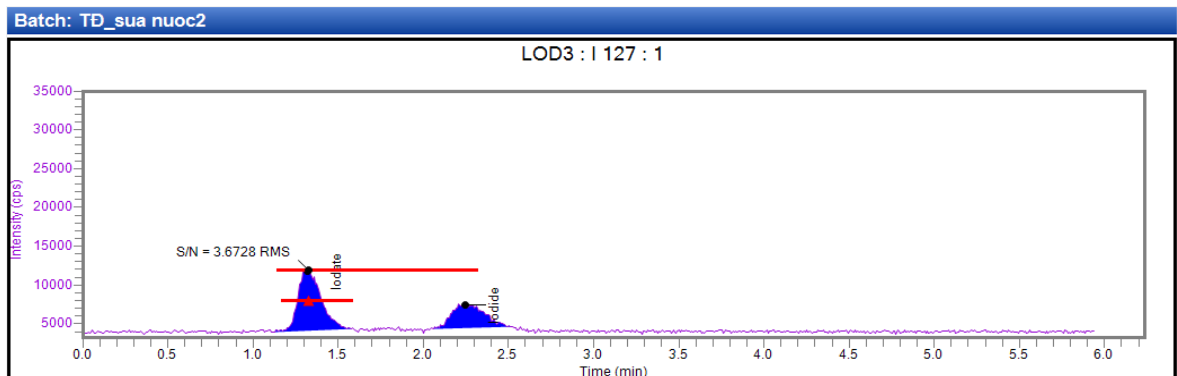
Hình 3.36. Sắc ký đồ của Iodate tại LOD trên nền sữa bột



Hình 3.37. Sắc ký đồ của Iodide tại LOD trên nền sữa bột



Hình 3.38. Sắc ký đồ của Iodide tại LOD trên nền sữa lỏng



*Hình 3.39. Sắc ký đồ của Iodate tại LOD trên nền sữa lỏng*

Trong các phương pháp phân tích công cụ, giới hạn phát hiện của phương pháp phụ thuộc rất nhiều vào độ nhạy của thiết bị. Vì vậy, để duy trì được hiệu năng của phương pháp, việc bảo trì, vệ sinh và thay thế, kiểm tra định kỳ các vật tư tiêu hao như torch, côn mẫu, bộ phận tạo sol khí mẫu là hết sức cần thiết. Giới hạn phát hiện này nhỏ, phù hợp để xác định hàm lượng chất trong mẫu thực tế do đó phương pháp đáp ứng được tốt việc kiểm tra hàm lượng các dạng iodide và iodate trong nền mẫu sữa.

### 3.4.3. Độ lặp lại

Độ lặp lại là một thông số đánh giá độ chính xác của phương pháp cho phép đánh giá độ chụm của các kết quả phân tích.

Đánh giá độ lặp lại của phương pháp trên mẫu trắng thêm chuẩn: làm lặp lại 6 lần trên 2 nền mẫu sữa bột và sữa lỏng qua khảo sát không chứa iodide, iodate. Kết quả được tổng hợp ở bảng dưới đây:

*Bảng 3.7. Kết quả phân tích lặp lại mẫu sữa bột*

STT	Hàm lượng iodide (mg/kg)	Hàm lượng iodate (mg/kg)
1	0,58	0,64
2	0,59	0,63
3	0,61	0,63
4	0,59	0,63
5	0,59	0,64
6	0,58	0,66
<b>Trung bình</b>	<b>0,59</b>	<b>0,64</b>
<b>RSDr</b>	<b>1,84</b>	<b>1,75</b>

*Bảng 3.8. Kết quả phân tích lặp lại mẫu sữa lỏng*

STT	Hàm lượng iodide (mg/L)	Hàm lượng iodate (mg/L)
1	0,22	0,24
2	0,21	0,23
3	0,21	0,23
4	0,19	0,23
5	0,20	0,24

6	0,20	0,23
<b>Trung bình</b>	<b>0,21</b>	<b>0,23</b>
<b>RSDr</b>	<b>3,95</b>	<b>0,84</b>

Kết quả phân tích cho thấy độ lặp lại của phương pháp là tương đối tốt trên các nền mẫu sữa bột, sữa lỏng dao động trong khoảng từ 0,84 – 3,95% đáp ứng tốt yêu cầu của AOAC [37].

#### **3.4.4. Độ thu hồi**

Độ thu hồi hay độ đúng của phương pháp là một trong những thông số để đánh giá độ chính xác. Độ thu hồi của phương pháp được xác định bằng cách thêm chuẩn tại 3 mức 5 µg/L, 25 µg/L, 100 µg/L iodide và iodate (nồng độ dịch mẫu) trên cả 2 nền mẫu sữa bột và sữa nước. Tại mỗi mức thêm chuẩn thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả thu được chỉ ra trong Bảng 3.9. Độ thu hồi trên nền mẫu sữa bột và Bảng 3.10. Độ thu hồi trên mẫu sữa lỏng.

Đối với nền mẫu sữa bột: độ thu hồi iodide trong khoảng 86,4 – 102%, iodate trong khoảng 101 – 107%. Trong khi đó với nền mẫu sữa lỏng thì độ thu hồi của iodide là 81,5 – 92%, còn iodate là 91,3 – 113%. Các giá trị về độ thu hồi với từng nền mẫu đều đáp ứng tốt yêu cầu theo AOAC, phù hợp với yêu cầu phân tích định lượng mẫu thực, điều này cho thấy quy trình hoàn toàn phù hợp để phân tích các nền mẫu sữa như sữa chua, sữa tươi, sữa bột...

Bảng 3.9. Độ thu hồi trên nền mẫu sữa bột

Chất phân tích	Khối lượng cân (g)	Thể tích định mức (ml)	Diện tích peak (counts)	Nồng độ cuối ( $\mu\text{g/L}$ )	Hàm lượng (mg/kg)	Thể tích thêm chuẩn 10 ppm (ml)	Độ thu hồi (%)
<b>Iodate</b>	2,0150	50	82805,74	5,25	0,13	0,025	105
	2,0078	50	83353,44	5,29	0,13	0,025	106
	2,0051	50	84043,71	5,33	0,13	0,025	107
	2,0056	50	396510,93	25,72	0,64	0,125	103
	2,0078	50	388356,20	25,18	0,63	0,125	101
	2,0136	50	389862,28	25,28	0,63	0,125	101
	2,0061	50	1578901,91	102,84	2,56	0,500	103
	2,0816	50	1600581,19	104,25	2,50	0,500	104
	2,0412	50	1595303,35	103,91	2,55	0,500	104
<b>Iodide</b>	2,0150	50	88635,37	4,85	0,12	0,025	97,1
	2,0078	50	93239,59	5,09	0,13	0,025	102
	2,0051	50	78062,53	4,32	0,11	0,025	86,4
	2,0056	50	454365,49	23,32	0,58	0,125	93,3
	2,0078	50	458600,96	23,53	0,59	0,125	94,1
	2,0136	50	476386,35	24,43	0,61	0,125	97,7
	2,0061	50	1892510,89	95,93	2,39	0,500	95,9
	2,0816	50	1866054,52	94,60	2,27	0,500	94,6
	2,0412	50	1741789,84	88,32	2,16	0,500	88,3



Bảng 3.10. Độ thu hồi trên mẫu sữa lỏng

Chất phân tích	Khối lượng cân (g)	Thể tích định mức (ml)	Diện tích peak (counts)	Nồng độ cuối ( $\mu\text{g/L}$ )	Hàm lượng (mg/kg)	Thể tích thêm chuẩn 10 ppm (ml)	Độ thu hồi (%)
<b>Iodate</b>	5,0032	50	218447,15	4,74	0,05	0,025	94,8
	5,0014	50	224434,31	4,88	0,05	0,025	97,7
	5,0132	50	257183,09	5,67	0,06	0,025	113
	5,0120	50	1005398,85	23,57	0,24	0,125	94,3
	5,0044	50	998376,70	23,40	0,23	0,125	93,6
	5,0034	50	999001,16	23,41	0,23	0,125	93,7
	5,0088	50	3871067,67	92,12	0,92	0,500	92,1
	5,0061	50	3837096,70	91,31	0,91	0,500	91,3
	5,0198	50	3963443,22	94,33	0,94	0,500	94,3
<b>Iodide</b>	5,0032	50	234362,05	4,17	0,04	0,025	83,3
	5,0014	50	229650,53	4,08	0,04	0,025	81,5
	5,0132	50	257594,81	4,60	0,05	0,025	92,0
	5,0120	50	1173453,74	21,69	0,22	0,125	86,7
	5,0044	50	1139413,75	21,05	0,21	0,125	84,2
	5,0034	50	1134505,99	20,96	0,21	0,125	83,8
	5,0088	50	4797960,12	89,31	0,89	0,500	89,3
	5,0061	50	4787315,95	89,11	0,89	0,500	89,1
	5,0198	50	4784829,79	89,06	0,89	0,500	89,1

### 3.4.5. So sánh phương pháp

Bố trí thí nghiệm, thực hiện đánh giá trên 6 mẫu, so sánh hàm lượng iodine tổng số phân tích trên ICP-MS với tổng 2 dạng iodide và iodate phân tích trên HPLC-ICP-MS. Kết quả đánh giá được tổng hợp trong Bảng 3.11.

*Bảng 3.11. Kết quả phân tích các mẫu trên hai thiết bị ICP-MS và HPLC-ICP-MS*

Mẫu	Kết quả phân tích trên thiết bị ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	
	ICP-MS	HPLC-ICP-MS
1		
2	130	139
3	227	234
4	128	134
5	61,2	60,9
6	40,2	44,1
7	15,9	14,4

Thực hiện so sánh giá trị trung bình của từng cặp số liệu, ta có:

<b>t-Test: Paired Two Sample for Means</b>		
	Variable 1	Variable 2
Mean	100.3833	104.4
Variance	5993.282	6499.564
Observations	6	6
Pearson Correlation	0.999432	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	5	
t Stat	-2.36209	
P(T<=t) one-tail	0.032292	
t Critical one-tail	2.015048	
P(T<=t) two-tail	0.064584	
t Critical two-tail	2.570582	

Giá trị t tiêu chuẩn (t Critical two-tail) = 2,57 với độ tin cậy 95% và 5 bậc tự do, lớn hơn giá trị t tính được (t Stat) = -2,36 chứng tỏ sự khác nhau về kết quả phân tích iodine khi thực hiện giữa hai phương pháp không có ý nghĩa

thống kê. Kết quả góp phần khẳng định độ chính xác của phương pháp nghiên cứu.

### 3.5. PHÂN TÍCH MẪU THỰC

Quy trình phân tích sau khi xác nhận giá trị sử dụng với các thông số đạt yêu cầu được áp dụng để phân tích 52 mẫu thực tế thu thập tại các cửa hàng, siêu thị trên địa bàn thành phố Hà Nội. Kết quả phân tích được trình bày ở Bảng 3.12 và Bảng 3.13.

*Bảng 3.12. Kết quả phân tích mẫu thực*

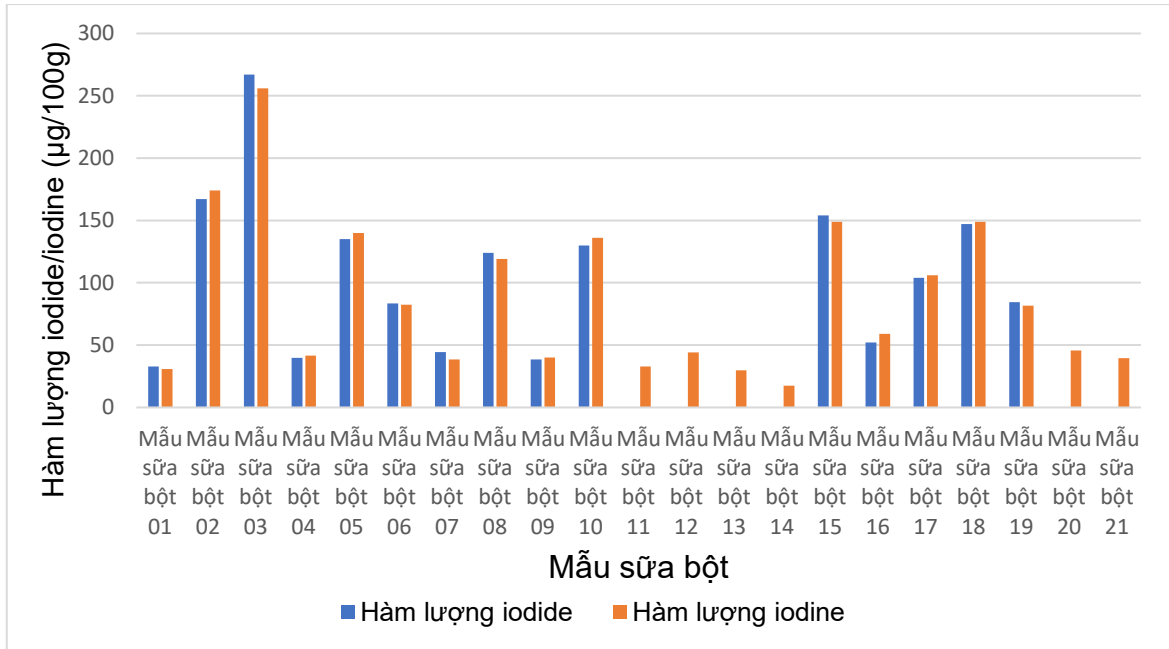
Đối tượng mẫu/số lượng mẫu	Hàm lượng ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	
	Iodide	Iodate
<b>Sữa bột cho trẻ em (n=14)</b>		
Sữa bột cho trẻ em của các hãng lớn trên thị trường (n=10)	32,8 – 267	KPH
Sữa bột cho trẻ em chưa phổ biến trên thị trường (n=4)	KPH	KPH
<b>Sữa bột cho người trưởng thành (n=7)</b>		
Sữa bột cho người trưởng thành ngoại nhập (n=5)	83,3 – 124	KPH
Sữa bột cho người trưởng thành nội địa (n=2)	KPH	KPH
<b>Các loại sữa khác (n=21)</b>		
Sữa đặc (n=5)	12,2 – 14,9	KPH
Sữa chua (n=5)	3,99 – 6,48	KPH
Váng sữa (n=5)	27,7 – 32,5	KPH
Sữa tươi nguyên liệu (n=2)	34,8 – 48,9	KPH
Sữa tươi thanh trùng (n=2)	26,2 – 31,7	KPH
Sữa tươi tiệt trùng (n=2)	13,7 – 16,8	KPH
<b>Sản phẩm khác từ sữa (n=10)</b>		
Bơ (n=5)	KPH	KPH
Phomai (n=5)	20,7 – 42,5	5,6 – 9,2

*KPH: không phát hiện chất phân tích, hàm lượng nhỏ hơn LOD*

Bảng 3.13. Hàm lượng iodide, iodate, tổng iodine và iodine theo công bố (trên nhãn sản phẩm) của các sản phẩm sữa

Mẫu	Hàm lượng ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )			
	Iodate	Iodide	Tổng iodine	Iodine (công bố trên nhãn sản phẩm)
Mẫu sữa bột 01	KPH	30,8	31,3	30,7
Mẫu sữa bột 02	KPH	164	165,9	174
Mẫu sữa bột 03	KPH	264	265,6	256
Mẫu sữa bột 04	KPH	39,8	40,1	41,5
Mẫu sữa bột 05	KPH	135	137,9	140
Mẫu sữa bột 06	KPH	83,3	85,4	82,4
Mẫu sữa bột 07	KPH	44,5	47,4	38,5
Mẫu sữa bột 08	KPH	124	130,0	119
Mẫu sữa bột 09	KPH	38,4	41,8	40,1
Mẫu sữa bột 10	KPH	128	128,0	136
Mẫu sữa bột 11	KPH	KPH	0,2	32,8
Mẫu sữa bột 12	KPH	KPH	0,0	44,1
Mẫu sữa bột 13	KPH	KPH	0,4	29,8
Mẫu sữa bột 14	KPH	KPH	0,3	17,5
Mẫu sữa bột 15	KPH	154	-	149
Mẫu sữa bột 16	KPH	52,1	-	59,1
Mẫu sữa bột 17	KPH	104	-	106
Mẫu sữa bột 18	KPH	147	-	149
Mẫu sữa bột 19	KPH	84,4	-	81,5
Mẫu sữa bột 20	KPH	KPH	0,1	45,6
Mẫu sữa bột 21	KPH	KPH	0,1	39,5
Mẫu sữa đặc 01	KPH	13,1	-	-
Mẫu sữa đặc 02	KPH	14,8	-	-
Mẫu sữa đặc 03	KPH	13,7	-	-
Mẫu sữa đặc 04	KPH	12,2	-	-
Mẫu sữa đặc 05	KPH	12,9	-	-

Mẫu sữa chua 01	KPH	3,99	-	-
Mẫu sữa chua 02	KPH	6,22	-	-
Mẫu sữa chua 03	KPH	4,30	-	-
Mẫu sữa chua 04	KPH	4,77	-	-
Mẫu sữa chua 05	KPH	6,48	-	-
Mẫu váng sữa 01	KPH	27,7	-	-
Mẫu váng sữa 02	KPH	32,0	-	-
Mẫu váng sữa 03	KPH	31,0	-	-
Mẫu váng sữa 04	KPH	32,5	-	-
Mẫu váng sữa 05	KPH	31,2	-	-
Mẫu sữa tươi nguyên liệu 01	KPH	31,8	32,8	-
Mẫu sữa tươi nguyên liệu 02	KPH	43,9	44,9	-
Mẫu sữa tươi thanh trùng 01	KPH	28,7	29,7	-
Mẫu sữa tươi thanh trùng 02	KPH	26,2	-	-
Mẫu sữa tươi tiệt trùng 01	KPH	13,7	-	-
Mẫu sữa tươi tiệt trùng 02	KPH	16,8	-	-
Mẫu bơ 01	KPH	KPH	-	-
Mẫu bơ 02	KPH	KPH	-	-
Mẫu bơ 03	KPH	KPH	-	-
Mẫu bơ 04	KPH	KPH	-	-
Mẫu bơ 05	KPH	KPH	-	-
Mẫu phomai 01	5,60	20,7	-	-
Mẫu phomai 02	5,89	23,6	-	-
Mẫu phomai 03	5,78	25,9	-	-
Mẫu phomai 04	5,75	42,5	-	-
Mẫu phomai 05	6,20	40,6	-	-

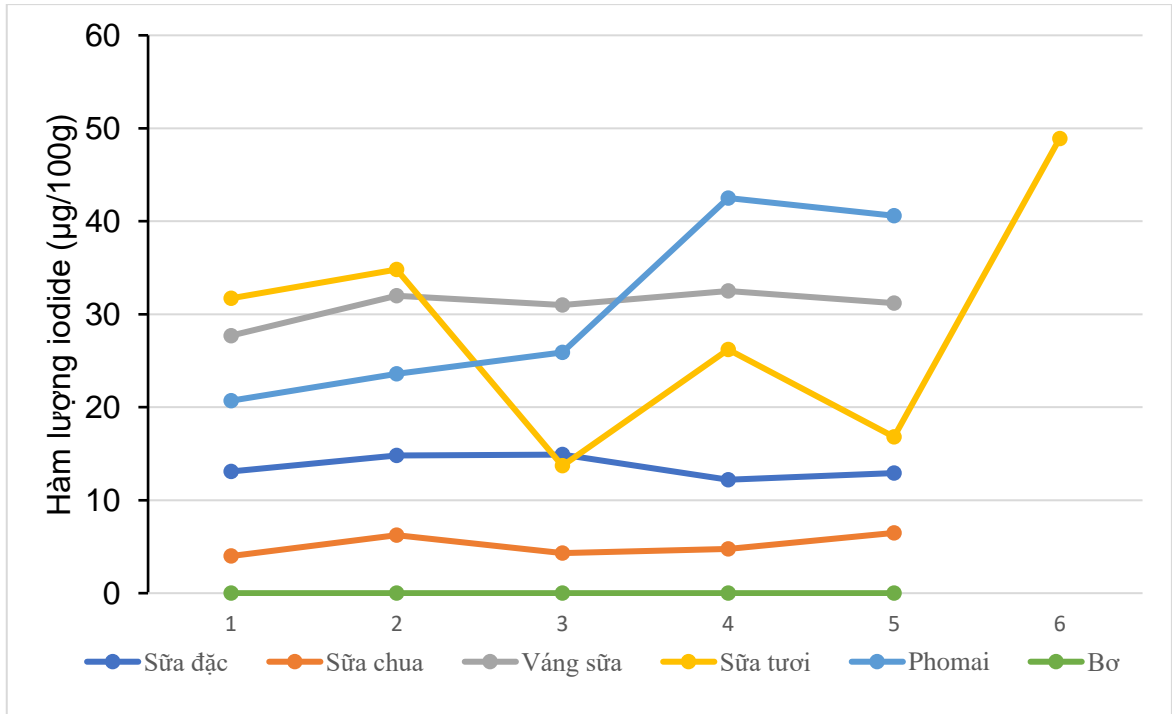


Hình 3.40. Hàm lượng iodide và iodine tổng số trong các sản phẩm sữa bột

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các sản phẩm sữa (trừ phomai) đều không phát hiện iodate. Hàm lượng iodide ở sản phẩm sữa bột cao nhất trong các sản phẩm sữa, hàm lượng này cũng dao động trong khoảng khá lớn (32,8 – 267) do sản phẩm này tập trung vào nhiều đối tượng với các độ tuổi khác nhau, mỗi độ tuổi thì nhu cầu iodine khác nhau.

Các sản phẩm sữa dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ có hàm lượng iodide cao nhất do nhu cầu về iodine ở đối tượng này là lớn nhất vì sữa và các sản phẩm sữa là nguồn thức ăn chính và chủ yếu ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, do đó bên cạnh nguồn iodine có sẵn trong nguyên liệu thì iodine còn được bổ sung trong quá trình sản xuất.

Kết quả nghiên cứu cho thấy có tới 28,6% (4/14) sản phẩm sữa dành cho trẻ em chủ yếu là các sản phẩm của một số hãng nội địa chưa nổi tiếng trên thị trường không phát hiện cả 2 dạng iodide và iodate trong khi trên nhãn sản phẩm vẫn có công bố hàm lượng iodine tổng số khá cao. Đây là một vấn đề khá quan ngại, cũng đặt ra hướng phát triển sâu hơn cho nghiên cứu trong việc tập trung đánh giá nguồn gốc và sự phân bố của các sản phẩm này.



Hình 3.41. Hàm lượng iodide trong các sản phẩm sữa

Đối với các sản phẩm sữa dành cho người trưởng thành hàm lượng iodide thấp hơn do nguồn thực phẩm bổ sung iodine cho đối tượng này khá đa dạng bên cạnh sữa và sản phẩm sữa còn có các loại thực phẩm khác cũng là nguồn iodine dồi dào như trái cây, ngũ cốc, trứng, hải sản và các sản phẩm có nguồn gốc từ rong biển. Các sản phẩm sữa dành cho người trưởng thành tập trung vào các nhóm sản phẩm dinh dưỡng như bổ sung canxi, sản phẩm dinh dưỡng bổ sung cho người già. Kết quả nghiên cứu cho thấy có 2/7 sản phẩm dinh dưỡng cho người trưởng thành không phát hiện cả 2 dạng iodide và iodate trong khi trên nhãn sản phẩm thì có công bố iodine tổng số.

Đối một số sản phẩm sữa bột cho người lớn mặc dù trên nhãn có công bố hàm lượng iodine tổng số nhưng khi phân tích thì không phát hiện cả 2 dạng iodide, iodate. Điều đó cho thấy việc phân tích hàm lượng dạng iodide, iodate trong các sản phẩm sữa cần được phát triển rộng, đánh giá trên nhiều sản phẩm hơn nữa để cung cấp thông tin về chất lượng cho người tiêu dùng, cũng như là công cụ giúp các cơ quan chức năng giám sát chặt chẽ thành phần dinh dưỡng đối với các sản phẩm sữa trên thị trường.

Kết quả phân tích hàm lượng iodide trong các sản phẩm sữa bột không có sự khác biệt lớn với hàm lượng iodine công bố trên nhãn đối với các sản phẩm của các thương hiệu lớn trên thị trường, điều đó cho thấy chất lượng của

các sản phẩm sữa này được kiểm soát tốt trong quy trình sản xuất. Nguồn iodine trong các sản phẩm sữa bột bên cạnh sẵn có trong sữa nguyên liệu thì còn được bổ sung vào sau quá trình sấy nên hàm lượng iodine không bị ảnh hưởng bởi quá trình gia nhiệt, sấy ở nhiệt độ cao.

Đối với các sản phẩm sữa tươi, đối tượng mẫu được phân làm 3 nhóm chính: sữa tươi nguyên liệu, sữa tươi thanh trùng và sữa tươi tiệt trùng. Sữa tươi nguyên liệu là sữa thu được từ một hoặc nhiều lần vắt từ tuyến vú của động vật cho sữa không bổ sung hoặc tách bớt các thành phần của sữa, chưa qua xử lý ở nhiệt độ cao hơn 40°C hoặc các biện pháp xử lý tương đương khác, dùng để tiêu thụ ở dạng sữa lỏng hoặc để chế biến tiếp theo. Sữa tươi thanh trùng, tiệt trùng là sữa tươi nguyên liệu trải qua quá trình xử lý nhiệt.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng iodide trong các sản phẩm sữa tươi nguyên liệu là cao nhất, sau đó đến sữa tươi thanh trùng và cuối cùng là sữa tươi tiệt trùng. Sữa tươi thanh trùng là sữa tươi ngay sau khi vắt được xử lý ở nhiệt độ 72 – 90 °C trong khoảng 15 – 30 giây, để giữ lại những lợi khuẩn trong sữa. Sau đó được làm lạnh đột ngột xuống 4 °C và được đóng gói vào bao bì. Còn sữa tươi tiệt trùng là sữa tươi được xử lý ở nhiệt độ cao từ 138 – 141 °C trong 2 – 4 giây. Sau đó được làm lạnh nhanh và đóng gói trong bao bì tiệt trùng đặc biệt. Điều đó cho thấy quá trình xử lý nhiệt có ảnh hưởng đến hàm lượng iodide trong các sản phẩm sữa, với điều kiện nhiệt độ thấp thì ảnh hưởng đó không đáng kể, tuy nhiên khi xử lý ở nhiệt độ cao thì hàm lượng iodide giảm một nửa so với trong sữa tươi nguyên liệu. Do ở nhiệt độ cao có thể là xúc tác cho một số phản ứng của iodide với các thành phần trong sữa, và iodine cũng bị thăng hoa ở nhiệt độ cao.

Váng sữa hay kem sữa là lớp phân tử chủ yếu là chất béo nổi lên kết thành mảng trên bề mặt sữa khi đun nóng hoặc để yên trong một khoảng thời gian dài và không khuấy. Nó được tách từ lớp trên cùng của sữa tươi nguyên chất thông qua hệ thống lọc ly tâm. Trong quy trình sản xuất váng sữa cũng trải qua quá trình tiệt trùng ở 65 – 90 °C trong 15 – 20 giây. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hàm lượng iodide trong váng sữa tương đương trong sữa tươi thanh trùng, do hai sản phẩm này cùng trải qua quá trình xử lý ở cùng khoảng nhiệt độ trong khoảng thời gian tương đương nhau.

Đối với các sản phẩm sữa chua phải trải qua 2 quá trình xử lý nhiệt đầu tiên là quá trình thanh trùng ở 95 °C trong 1 phút, tiếp theo là quá trình đồng



hóa cũng được thực hiện ở 95 °C và áp suất 200 bar nên hàm lượng iodide trong sản phẩm sữa này bị hao hụt đáng kể so với các sản phẩm sữa tươi thanh trùng và tiệt trùng. Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng iodide trong các sản phẩm sữa chua đều rất thấp, dao động từ 3,99 – 6,48 µg/100g.

Bơ là sản phẩm có hàm lượng béo cao (84%), là lớp chất béo được tách ra từ sữa, trải qua quá trình xử lý nhiệt, cấy vi sinh vật, lên men nên hàm lượng dinh dưỡng nói chung và iodine nói riêng trong sản phẩm này rất thấp, do đó người tiêu dùng nên cân nhắc trong việc lựa chọn sử dụng sản phẩm này như nguồn cung cấp iodine hàng ngày.

Trái ngược với bơ thì phomai lại là sản phẩm sau khi loại béo, bên cạnh đó trước khi ủ chín, phomai còn được bổ sung muối để tăng quá trình tách nước và tạo cảm quan cho mẫu, do đó hàm lượng iodine tổng số hay iodide và iodate trong sản phẩm này khá cao so với các sản phẩm sữa khác. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra phomai là sản phẩm duy nhất có chứa dạng iodate do bổ sung muối dưới dạng  $KIO_3$ . Do những ảnh hưởng bất lợi của iodate đối với cơ thể con người nên việc đánh giá hàm lượng iodate trong sản phẩm này cần được mở rộng trên nhiều đối tượng sản phẩm khác nhau, để đưa ra khuyến cáo cho người tiêu dùng và công ty sản xuất trong việc kiểm soát lượng muối bổ sung.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

Luận văn “*Nghiên cứu phân tích đánh giá hàm lượng iodide và iodate trong một số sản phẩm từ sữa bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ nguyên tử nguồn plasma cảm ứng cao tần*” đã đạt được một số kết quả sau:

- Đã khảo sát các điều kiện tối ưu quy trình phân tích đồng thời các dạng iodate và iodide trong sản phẩm sữa bằng phương pháp HPLC-ICP-MS với dung môi chiết là nước deion, tác nhân loại protein là hỗn hợp carrez I và carrez II, thời gian chiết là 30 phút và nhiệt độ chiết là 50°C.

- Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích với các thông số như: đường chuẩn xác định các nguyên tố có hệ số  $R^2 \geq 0,995$ ; LOD của iodide và iodate đối với sữa lỏng và sữa bột lần lượt là 0,01 mg/L và 0,024 mg/kg; LOQ của iodide và iodate đối với sữa lỏng và sữa bột lần lượt là 0,033 mg/L và 0,079 mg/kg; độ lệch chuẩn lặp lại của iodide và iodate đối với nền sữa lỏng lần lượt là 3,95 % và 0,84 %; độ lệch chuẩn lặp lại của iodide và iodate đối với nền sữa bột lần lượt là 1,84 % và 1,75 %; độ thu hồi của iodide đối với nền mẫu sữa bột trong khoảng 86,4 – 102 %, iodate trong khoảng 101 – 107 %; đối với nền mẫu sữa lỏng thì độ thu hồi của iodide là 81,5 – 92 %, còn iodate là 91,3 – 113 %. Giá trị các thông số trên hoàn toàn đáp ứng được các yêu cầu về phân tích hàm lượng dạng iodide và iodate trong các sản phẩm sữa trên thị trường; độ lặp lại và độ thu hồi nằm trong giới hạn cho phép cho các ngưỡng nồng độ của AOAC. Như vậy, phương pháp cho thấy có độ tin cậy và chính xác tương đối cao, đảm bảo áp dụng phân tích được các chất trong nền mẫu.

- Đã áp dụng quy trình phân tích xây dựng được trên 52 mẫu với 8 đối tượng mẫu sữa khác nhau bao gồm sữa bột cho trẻ em, sữa bột cho người trưởng thành, sữa đặc, sữa chua, váng sữa, sữa tươi, bơ và phomai. Kết quả cho thấy trừ phomai, tất cả các sản phẩm sữa khác đều không chứa iodate. Hàm lượng iodide thì khác nhau giữa các đối tượng mẫu, cao nhất là sữa bột, kế đến là sữa tươi nguyên liệu, pho mai, tiếp đến là sữa tươi tiệt trùng, váng sữa, thấp nhất là sữa chua, trong khi bơ không có sản phẩm nào phát hiện chứa iodide.

Kết quả của đề tài đã góp phần đánh giá sơ bộ thực trạng hàm lượng các dạng iodine trong các sản phẩm sữa. Điều này giúp cho người tiêu dùng có cơ

sở để lựa chọn những sản phẩm đảm bảo chất lượng, đáp ứng nhu cầu sinh hóa cho cơ thể, vì việc sử dụng thiếu hụt hay dư thừa iodine đều gây ra những tác hại nhất định đối với cơ thể. Bên cạnh đó việc đánh giá hàm lượng iodide hay iodine tổng số trong các sản phẩm sữa trên thị trường giúp các cơ quan chức năng có cơ sở khoa học trong việc tăng cường quản lý, giám sát đối với sản phẩm này. Việc đánh giá quá trình sản xuất gây hao hụt iodine tổng số hay các dạng iodide, iodate cũng giúp cho các nhà sản xuất sữa có căn cứ để đánh giá ảnh hưởng của từng công đoạn trong dây chuyền sản xuất đến giá trị dinh dưỡng của sản phẩm, để từ đó có những cải tiến trong quy trình để nâng cao chất lượng sản phẩm. Phương pháp cũng có thể áp dụng để kiểm nghiệm chất lượng iodine trong các sản phẩm sữa đang lưu hành trên thị trường.

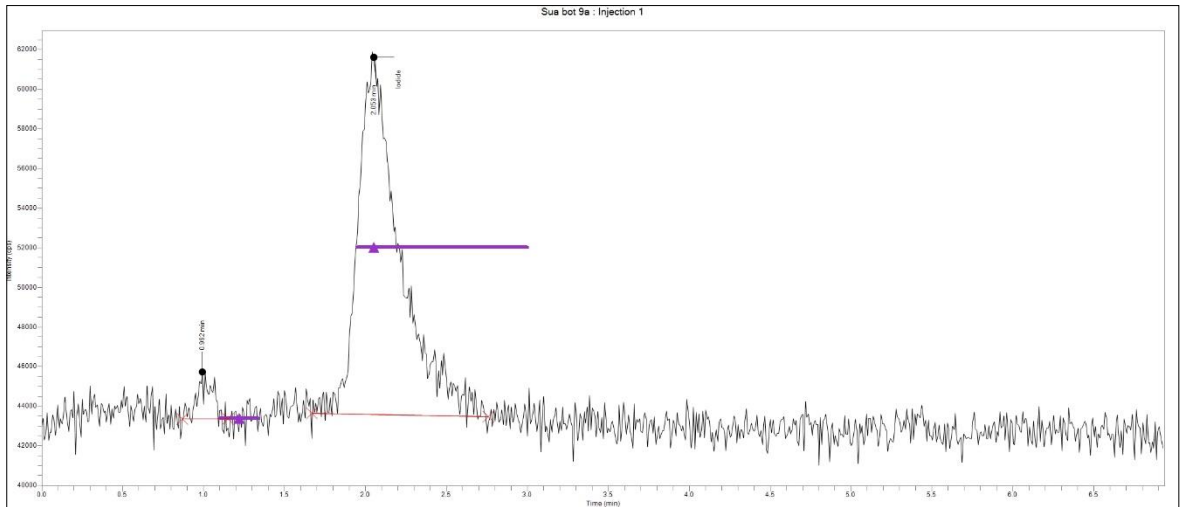
### **KIẾN NGHỊ**

Nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế như cỡ mẫu khảo sát còn thấp, chưa đánh giá được trên nhiều đối tượng sản phẩm. Nghiên cứu cần phải được tiếp tục triển khai và phát triển sâu hơn để đánh giá sự biến thiên hàm lượng của các dạng iodide và iodate theo thời gian bảo quản sản phẩm, nghiên cứu các tương tác của dạng iodide, iodate với thành phần nền mẫu và đề xuất điều kiện sản xuất, biện pháp bảo quản, nhằm góp phần ngăn ngừa nguy cơ thiếu hụt iod trong cộng đồng.

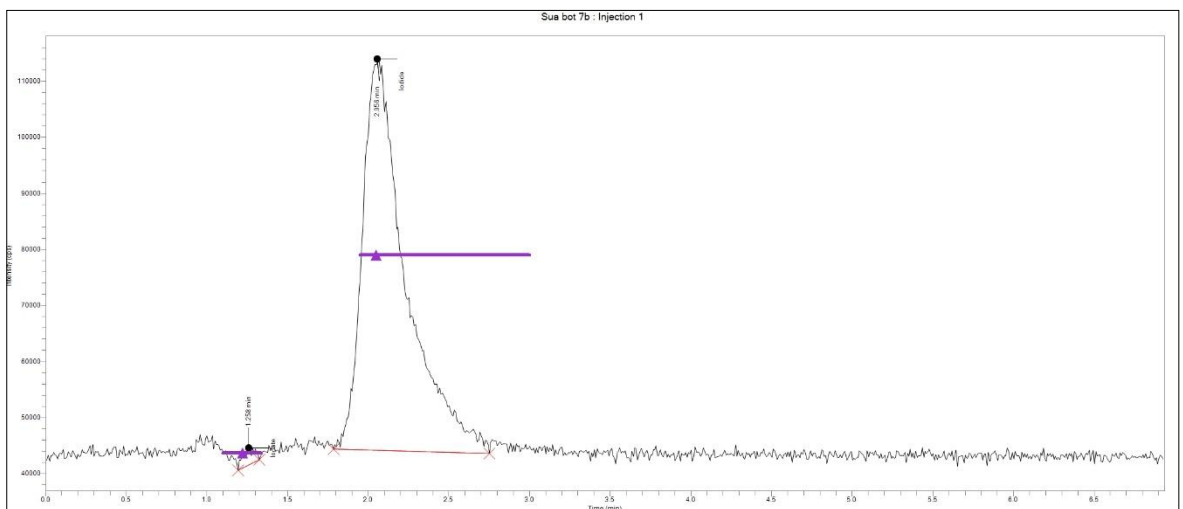
Kỹ thuật HPLC-ICP-MS có những ưu điểm vượt trội về độ nhạy, tính đặc hiệu và chọn lọc. Do vậy, cần tiếp tục mở rộng và ứng dụng kỹ thuật này trong các nghiên cứu phân tích dạng iodine và một số nguyên tố vi lượng khác với mức hàm lượng bổ sung thấp trong thực phẩm, thực phẩm chức năng.

## PHỤ LỤC

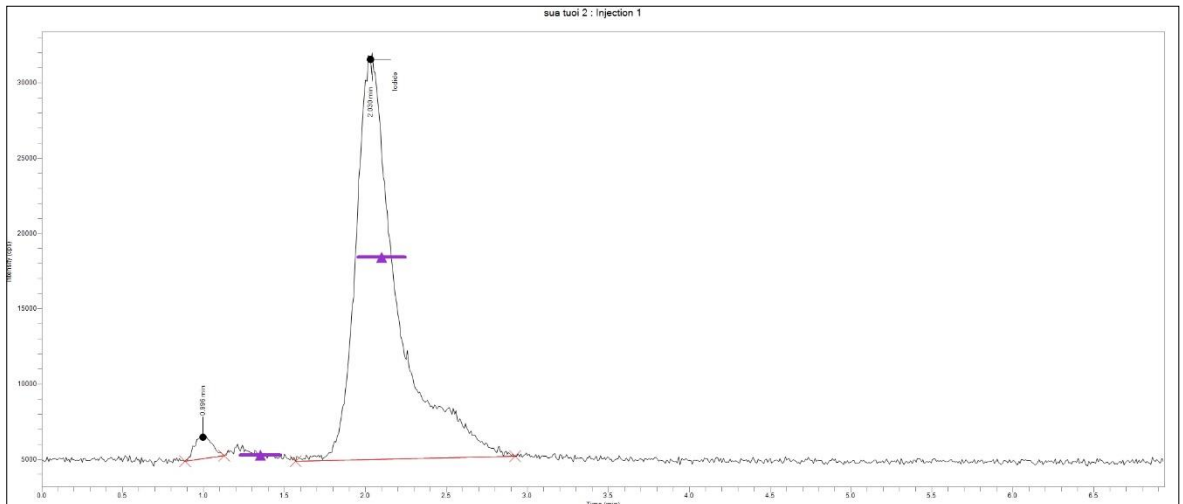
## Sắc ký đồ mẫu sữa bột 02



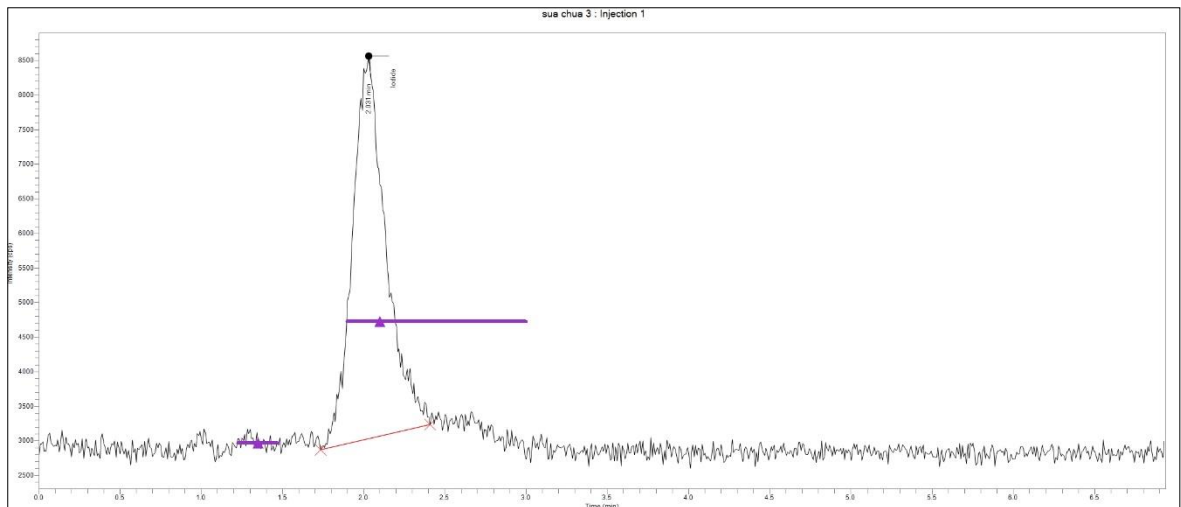
## Sắc ký đồ mẫu sữa bột 07



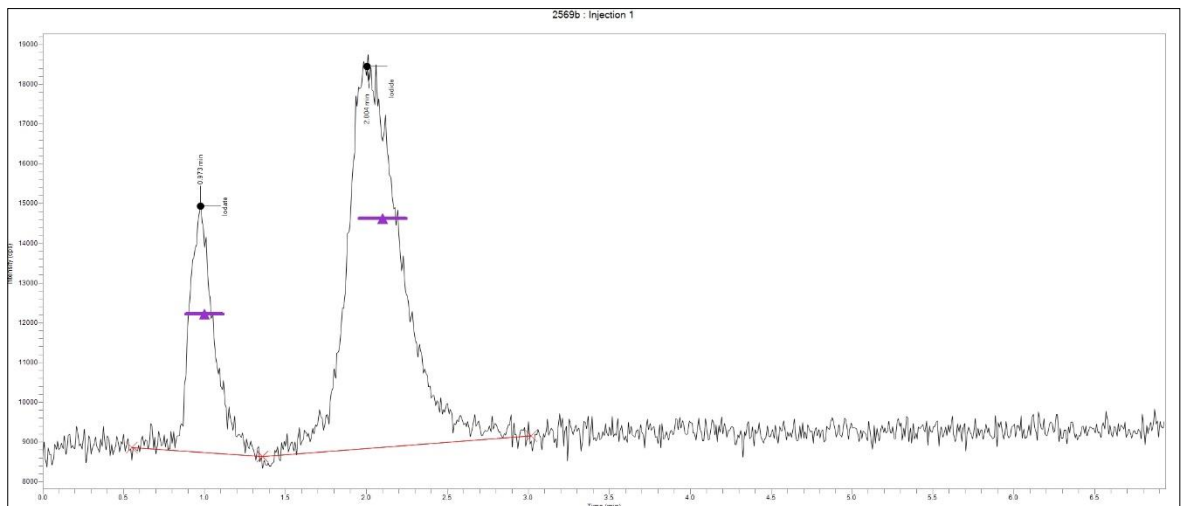
## Sắc ký đồ mẫu sữa tươi nguyên liệu 02



## Sắc ký đồ mẫu sữa chua 02



## Sắc ký đồ mẫu phomai 01



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.T. García Ascaso, P.R. Pérez, E.C. Alcol, A.L. López, C. de Lucas Collantes, I.M. Santos, E. Tessier, S.A. Segura, 2019, Nutritional status of iodine in children: When appropriateness relies on milk consumption and not adequate coverage of iodized salt in households, *Clinical Nutrition ESPEN*, 30, pp. 52-58.
- [2] O.L. van der Reijden, M.B. Zimmermann, V. Galetti, 2017, Iodine in dairy milk: Sources, concentrations and importance to human health, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31(4), pp. 385-395.
- [3] 2019, Thông tư 31/2019/TT-BYT - Quy định yêu cầu đối với các sản phẩm sữa tươi sử dụng trong Chương trình Sữa học đường, Bộ Y tế.

- [4] Kiểm tra hàm lượng i-ốt trong sữa của Nhật, <https://suckhoedoisong.vn/kiem-tra-ham-luong-i-ot-trong-sua-cua-nhat-16952900.htm>, Accessed April 11, 2023.
- [5] H.W. Stewart, E.R. Mary, H. Benjamin, W.F.V. Oettingen, 1957, The toxicology of potassium and sodium iodates: Acute toxicity in mice, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 120(2), p 171.
- [6] H. Bürgi, T. Schaffner, J.P. Seiler, 2009, *Chapter 94 - The Toxicology of Iodate: A Literature Survey in View of Its Use in Iodized Salt*, in: V.R. Preedy, G.N. Burrow, R. Watson (Eds.), *Comprehensive Handbook of Iodine*, Academic Press, San Diego.
- [7] F.C. Küpper, M.C. Feiters, B. Olofsson, T. Kaiho, S. Yanagida, M.B. Zimmermann, L.J. Carpenter, G.W. Luther III, Z. Lu, M. Jonsson, L. Kloo, 2011, Commemorating Two Centuries of Iodine Research: An Interdisciplinary Overview of Current Research, *Angewandte Chemie International Edition*, 50(49), pp. 11598-11620.
- [8] A.N. Espino-Vázquez, F.C. Rojas-Castro, L.M. Fajardo-Yamamoto, 2022, Implications and Practical Applications of the Chemical Speciation of Iodine in the Biological Context, *Future Pharmacology*, 2(4), pp. 377-414.
- [9] W. Liu, J.-D. Hu, H.-X. Yang, 2019, Stabilities of iodide and iodate for iodine speciation analysis in soils, *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*, 19(1), pp. 39-45.
- [10] X. Hou, 2009, *Chapter 15 - Iodine Speciation in Foodstuffs, Tissues, and Environmental Samples: Iodine Species and Analytical Method*, in: V.R. Preedy, G.N. Burrow, R. Watson (Eds.), *Comprehensive Handbook of Iodine*, Academic Press, San Diego.
- [11] R.A. Wilson, E.G. Yanes, R.J. Kemppainen, 2016, Iodine speciation in dog foods and treats by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *Journal of Chromatography B*, 1022, pp. 183-190.
- [12] X. Han, L. Cao, H. Cheng, J. Liu, Z. Xu, 2012, Determination of iodine species in seaweed and seawater samples using ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytical Methods*, 4(10), pp. 3471-3477.
- [13] T. Michikawa, M. Inoue, T. Shimazu, N. Sawada, M. Iwasaki, S. Sasazuki, T. Yamaji, S. Tsugane, f.t.J.P.H.C.-b.P.S. Group, 2012, Seaweed consumption and the risk of thyroid cancer in women: the Japan Public Health Center-based Prospective Study, *European Journal of Cancer Prevention*, 21(3), pp. 254-260.
- [14] M.J. Laverock, M. Stephenson, C.R. Macdonald, 1995, Toxicity of iodine, iodide, and iodate to *Daphnia magna* and rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss), *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(3), pp. 344-350.

[15] L. Liu, X. Li, H. Wang, X. Cao, W. Ma, 2017, Reduction of iodate in iodated salt to iodide during cooking with iodine as measured by an improved HPLC/ICP–MS method, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 42, pp. 95-100.

[16] O.L. van der Reijden, V. Galetti, I. Herter-Aeberli, M.B. Zimmermann, C. Zeder, A. Krzystek, M. Haldimann, A. Barmaz, M. Kreuzer, J. Berard, P. Schlegel, 2019, Effects of feed iodine concentrations and milk processing on iodine concentrations of cows' milk and dairy products, and potential impact on iodine intake in Swiss adults, *British Journal of Nutrition*, 122(2), pp. 172-185.

[17] M. Sager, 2019, Determination of High Iodine Levels by ICP-OES after Separation from Excess Phosphate by Co-precipitation, *Journal of Food Science and Engineering*, 9, pp. 74-80.

[18] E.A. Vtorushina, A.I. Saprykin, G. Knapp, 2009, Use of oxidation and reduction vapor generation for lowering the detection limits of iodine in biological samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Journal of Analytical Chemistry*, 64(2), pp. 129-135.

[19] M.F. Mesko, P.A. Mello, C.A. Bizzi, V.L. Dressler, G. Knapp, É.M.M. Flores, 2010, Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), pp. 1125-1131.

[20] T.I. Todorov, P.J. Gray, 2016, Analysis of iodine in food samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(2), pp. 282-290.

[21] D. Sullivan, 2019, AOAC Expert Review Panel Approves Official MethodsSM for Iodine, Pantothenic Acid, Carnitine, Fatty Acids, Vitamins C and E, and Choline and Additional Methods for Vitamins A and D and Inositol, *Journal of AOAC International*, 96(3), pp. 481-484.

[22] J. Benotti, N. Benotti, 1963, Protein-Bound Iodine, Total Iodine, and Butanol-extractable Iodine by Partial Automation, *Clinical Chemistry*, 9(4), pp. 408-416.

[23] T. Mitsuhashi, Y. Kaneda, 1990, Gas Chromatographic Determination of Total Iodine in Foods, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 73(5), pp. 790-792.

[24] D. Hammer, D. Andrey, 2008, Comparison of Ion-Selective Electrode and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry to Determine Iodine in Milk-Based Nutritional Products, *Journal of AOAC International*, 91(6), pp. 1397-1401.

- [25] R.A. Niemann, D.L. Anderson, 2008, Determination of iodide and thiocyanate in powdered milk and infant formula by on-line enrichment ion chromatography with photodiode array detection, *Journal of Chromatography A*, 1200(2), pp. 193-197.
- [26] R.K. Chadha, J.F. Lawrence, 1990, Determination of iodide in dairy products and table salt by ion chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, 518, pp. 268-272.
- [27] M.C. Yebra, M.H. Bollaín, 2010, A simple indirect automatic method to determine total iodine in milk products by flame atomic absorption spectrometry, *Talanta*, 82(2), pp. 828-833.
- [28] L. Basumallick., J. Rohrer, Determination of Iodide and Iodate in Soy- and Milk-Based Infant Formulas [https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/Application%20&%20Technical%20Notes/AN37\\_70355\\_Final.pdf](https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/Application%20&%20Technical%20Notes/AN37_70355_Final.pdf), Accessed 2023.
- [29] L. Fernandez Sanchez, J. Szpunar, 1999, Speciation analysis for iodine in milk by size-exclusion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP MS), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14(11), pp. 1697-1702.
- [30] J. Nelson, L. Pacquette, S. Dong, M. Yamanaka, 2019, Simultaneous Analysis of Iodine and Bromine Species in Infant Formula using HPLC-ICP-MS, *Journal of AOAC International*, 102(4), pp. 1199-1204.
- [31] L. Wei, Y. Hong-Xia, L. Bing, C. Deng-Yun, Z. Hui-Juan, 2007, Speciation Stabilities of Iodine in underground Water by High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 35(4), pp. 571-573.
- [32] W. Zhang, X. Liu, X. Jia, Y. Han, X. Liu, X. Xie, J. Lu, T. Duan, H. Chen, 2010, Fast Speciation of Iodide and Iodate in Edible Salts and Human Urine by Short Column IC Coupled with Inductively Coupled Plasma MS, *Chromatographia*, 72(9), pp. 1009-1012.
- [33] 2012, TCVN 9517:2012 - Thực phẩm - Xác định các nguyên tố vết - Xác định Iot bằng phương pháp phổ khối lượng plasma cảm ứng cao tần (ICP-MS), Bộ Khoa học và Công nghệ.
- [34] Lê Văn Hà, Lữ Thị Minh Hiền, Nguyễn Minh Châu, Trần Hoàng Giang, Đặng Thị Hiền, Đinh Việt Chiến, 2021, Xác định đồng thời hàm lượng iodide và iodate trong gia vị mặn bằng phương pháp phổ khối plasma cảm ứng cao tần ghép nối sắc ký lỏng (LC-ICP-MS), *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, 4(3), pp. 219-231
- [35] Phạm Luận, 2014, *Phương pháp phân tích phổ nguyên tử*, Nhà xuất bản Bách Khoa Hà Nội.



- [36] J. Delafiori, G. Ring, A. Furey, 2016, Clinical applications of HPLC–ICP-MS element speciation: A review, *Talanta*, 153, pp. 306-331.
- [37] AOAC, 2016, *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*.
- [38] W. M. Haynes, David R. Lide, Thomas J. Bruno, 2016, *Section 4: Properties of the Elements and Inorganic Compounds*, in: W.M. Haynes (Ed.) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [39] L.H. Pacquette, A.M. Levenson, J.J. Thompson, D. Dowell, 2013, Total Iodine in Infant Formula and Nutritional Products by Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry: First Action 2012.14, *Journal of AOAC International*, 96(4), pp. 798-801.