

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Dương Giang

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI CÁC DẠNG As, Hg
TRONG MẪU SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO GHÉP
NỐI PHỔ KHỐI NGUYÊN TỬ NGUỒN PLASMA CẢM ỨNG
CAO TẦN (HPLC-ICP-MS)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội – 2024

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Dương Giang

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI CÁC DẠNG As, Hg
TRONG MẪU SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO GHÉP
NỐI PHỔ KHỐI NGUYÊN TỬ NGUỒN PLASMA CẢM ỨNG
CAO TẦN (HPLC-ICP-MS)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hoá Phân tích

Mã số: 8440118

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

Hướng dẫn 1: TS. Dương Tuấn Hưng

Hướng dẫn 2: TS. Bùi Văn Hợi

Hà Nội – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài 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 hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 16 tháng 10 năm 2024

Tác giả luận văn



Bùi Dương Giang

LỜI CẢM ƠN

Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất, em xin gửi lời cảm ơn tới TS. Dương Tuấn Hưng và TS. Bùi Văn Hợi – những người thầy tâm huyết đã hướng dẫn khoa học, truyền cho em tri thức cũng như chỉ bảo, động viên, giúp đỡ, khích lệ và tạo mọi điều kiện tốt nhất để em hoàn thành luận văn này.

Em xin chân thành cảm ơn các thầy cô tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã giảng dạy, hướng dẫn em hoàn thành các học phần và các chuyên đề trong chương trình đào tạo; cảm ơn Ban lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ em hoàn thành các thủ tục trong thời gian học tập và thực hiện luận văn.

Em xin chân thành cảm ơn các đên các cô chú, anh chị em, chị Nguyễn Thị Vân – là cán bộ phòng Hóa Phân tích – Viện Hóa học, đã động viên giúp đỡ tạo điều kiện hết sức về trang thiết bị cho em hoàn thành đề tài nghiên cứu.

Cháu xin chân thành cảm ơn chú Tạ Hoàng Long giám đốc Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc thú y TWI - Cục Thú y và cô Hồ Thị Thu Hà lãnh đạo phòng Dược đã quan tâm, động viên cũng như giúp đỡ tạo điều kiện thuận lợi về thời gian, công việc để cháu học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, em xin gửi lời biết ơn sâu sắc đến gia đình, người thân, bạn bè, đồng nghiệp đã luôn đồng hành ủng hộ, chia sẻ và giúp đỡ em về mọi mặt trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày 16 tháng 10 năm 2024

Tác giả luận văn



Bùi Dương Giang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ TỪ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH	viii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN	3
1.1. Tổng quan về Asen	3
1.1.1. Các dạng As và sự chuyển hoá	3
1.1.2. Ảnh hưởng của As tới cơ thể con người	8
1.1.3. Một số phương pháp phân tích As	9
1.1.4. Một số phương pháp phân tích dạng As	11
1.2. Tổng quan về thủy ngân	13
1.2.1. Các dạng của thủy ngân và sự chuyển hoá của chúng	14
1.2.2. Ảnh hưởng của các dạng thủy ngân tới sức khoẻ con người	15
1.2.3. Một số phương pháp phân tích Hg	16
1.2.4. Một số phương pháp phân tích dạng Hg	19
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	21
2.1.1. Phân tích dạng As và Hg	21
2.1.2. Đối tượng nghiên cứu	21
2.2. Hóa chất	21
2.2.1. Dung dịch chuẩn gốc 1000 mg/L	22
2.2.2. Dung dịch chuẩn làm việc	23
2.2.3. Pha động cho sắc ký	23
2.3. Thiết bị, dụng cụ	23
2.4. Phương pháp nghiên cứu	24

2.5. Thực nghiệm	26
2.5.1. Thu thập mẫu	26
2.5.2. Xử lý mẫu phân tích tổng As	26
2.5.3. Xử lý mẫu phân tích tổng Hg.....	26
2.5.4. Tối ưu điều kiện phân tích dạng HPLC-ICP-MS	27
2.5.5. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp	27
2.5.6. Chuẩn bị mẫu phân tích dạng As, Hg	30
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	31
3.1. Tối ưu điều kiện phân tích dạng đa nguyên tố của As, Hg bằng phương pháp HPLC-ICP-MS	31
3.1.1. Tối ưu điều kiện HPLC tách As, Hg.....	31
3.1.2. Xác định thời gian lưu của từng dạng As, Hg	43
3.2. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích dạng As, Hg	43
3.2.1. Xây dựng đường chuẩn.....	43
3.2.2. Giới hạn phát hiện thiết bị (IDL), giới hạn định lượng thiết bị (IQL)	47
3.2.3. Độ chính xác của phương pháp	48
3.3. Phân tích hàm lượng As và Hg tổng số trong mẫu sinh học và môi trường	50
3.3.1. Xây dựng đường chuẩn phân tích hàm lượng As tổng số bằng phương pháp ICP-MS	50
3.3.2. Xây dựng đường chuẩn phân tích hàm lượng Hg tổng số bằng phương pháp CV-AAS	52
3.3.3. Kết quả phân tích hàm lượng As và Hg tổng số.....	53
3.4. Phân tích dạng đồng thời của As và Hg trong các mẫu sinh học và môi trường	54
KẾT LUẬN	58
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	59
PHỤ LỤC	65

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ TỪ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AAS	Atomic Absorption Spectroscopy	Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Hiệp hội các nhà hóa học phân tích
As(III)	Arsenic oxide	
As(V)	Sodium arsenate dibasic heptahydrate	
CV-AAS	Cold Vapor – Atomic Absorption Spectroscopy	Phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử với kỹ thuật hoá hơi lạnh
DIW	Deionized Water	Nước cất khử ion
DMA	Dimethylarsonic Acid	
DRC	Dynamic reaction cell	Buồng phản ứng động học
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	
F-AAS	Flame Atomic Absorption Spectroscopy	Phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa
GF-AAS	Graphite Furnace – Atomic Absorption Spectroscopy	Phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử không ngọn lửa
GC-ECD	Gas Chromatography with Electron Capture Detection	Sắc ký khí detector cộng kết điện tử
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectroscopy	Sắc ký khí khối phổ
HDPE	High-density Polyethylene	
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy	Quang phổ phát xạ plasma nguyên tử nguồn cảm ứng plasma

ICP-MS	Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry	Khối phổ nguồn cảm ứng cao tần plasma
ISO	International Organization for Standardization	Tổ chức tiêu chuẩn hoá quốc tế
Cys	L-Cysteine	
IDL	Instrumental detection limit	Giới hạn phát hiện thiết bị
IQL	Instrumental quantification limits	Giới hạn định lượng thiết bị
MeHg	Methylmercury	Methyl thuỷ ngân
MMA	Mono-methylarsonic	Mono methyl arsonic acid
RSD	Relative Standard Deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
SBS	Sodium 1-butanefulfonate	
SD	Standard Deviation	Độ lệch chuẩn
TBAH	Tetrabutylammonium Hydroxide	
TCVN		Tiêu chuẩn Việt Nam
QCVN		Quy chuẩn Việt Nam

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Chương trình thời gian chạy gradient.....	26
Bảng 2.2. Độ thu hồi được chấp nhận theo AOAC.	30
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ TBAH tới thời gian lưu của 4 dạng As... 32	32
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ TBAH tới thời gian lưu của 2 dạng Hg. . 33	33
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ SBS tới thời gian lưu của 4 dạng As. 34	34
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ SBS tới thời gian lưu của 2 dạng Hg. 34	34
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của nồng độ Cys tới thời gian lưu của 4 dạng As. 37	37
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ Cys tới thời gian lưu của 2 dạng Hg..... 37	37
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của pH tới thời gian lưu của 4 dạng As..... 38	38
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của pH tới thời gian lưu của 2 dạng Hg. 38	38
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới chiều cao peak của 4 dạng As.	41
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới chiều cao peak của 2 dạng Hg.	41
Bảng 3.11. Thông số vận hành hệ thống ghép nối HPLC-ICP-MS áp dụng phân tích dạng As, Hg.....	42
Bảng 3.12. Phương trình đường chuẩn phân tích các dạng As, Hg.....	47
Bảng 3.13. Giới hạn phát hiện (IDL) và giới hạn định lượng (IQL) của thiết bị HPLC-ICP-MS.....	47
Bảng 3.14. Giới hạn định lượng (IQL) của phương pháp phân tích Hg tổng số bằng thiết bị CV-AAS.....	48
Bảng 3.15. Độ chính xác của phương pháp phân tích với nền mẫu niệu.	49
Bảng 3.16. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích với nền mẫu nước.....	49
Bảng 3.17. Điều kiện phân tích As trên thiết bị ICP-MS NexION 200 (PerkinElmer, Hoa Kỳ).	50
Bảng 3.18. Tương quan giữa tín hiệu đo và nồng độ As.	51
Bảng 3.19. Tương quan giữa tín hiệu đo và nồng độ Hg.....	53
Bảng 3.20. Kết quả phân tích tổng As, Hg.	54
Bảng 3.21. Hàm lượng các dạng As trong các mẫu sinh học và môi trường. 56	56
Bảng 3.22. Hàm lượng các dạng Hg trong các mẫu sinh học và môi trường. 57	57

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Các dạng của As và sự chuyển hoá của chúng trong môi trường.....	3
Hình 1.2. Đồ thị pE-pH của hệ As-H ₂ O ở 25°C.	5
Hình 1.3. Quá trình chuyển hoá As trong cơ thể.	7
Hình 1.4. Sự chuyển hoá của các dạng thuỷ ngân.	15
Hình 2.1. Hệ thống thiết bị HPLC-ICP-MS (PerkinElmer, Hoa Kỳ).	25
Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ TBAH tới thời gian lưu của 4 dạng As. ..	32
Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ TBAH tới thời gian lưu của 2 dạng Hg... 32	
Hình 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ SBS tới thời gian lưu của 4 dạng As.....	33
Hình 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ SBS tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.	34
Hình 3.5. Ảnh hưởng của nồng độ Cys tới thời gian lưu của 4 dạng As.....	35
Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ Cys tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.	36
Hình 3.7. Ảnh hưởng của pH tới thời gian lưu của 4 dạng As.	37
Hình 3.8. Ảnh hưởng của pH tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.....	38
Hình 3.9. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới thời gian lưu của 4 dạng As.	39
Hình 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.	40
Hình 3.11. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới chiều cao peak của 4 dạng As.	40
Hình 3.12. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới chiều cao peak của 2 dạng Hg.	41
Hình 3.13. Sắc đồ xác định thời gian lưu của 4 dạng As và 2 dạng Hg.	43
Hình 3.14. Đường chuẩn phân tích dạng As(III).	44
Hình 3.15. Đường chuẩn phân tích dạng DMA.	44
Hình 3.16. Đường chuẩn phân tích dạng MMA.	45
Hình 3.17. Đường chuẩn phân tích dạng As(V).	45
Hình 3.18. Đường chuẩn phân tích dạng Hg(II).	46
Hình 3.19. Đường chuẩn phân tích dạng MeHg.	46
Hình 3.20. Đường chuẩn phân tích As tổng số.	52
Hình 3.21. Đường chuẩn phân tích Hg tổng số.....	53
Hình 3.22. Sắc đồ phân tích mẫu niệu của bệnh nhân BN-01.	55
Hình 3.23. Sắc đồ phân tích mẫu nước MT-L5.	55

MỞ ĐẦU

Phân tích dạng của các nguyên tố là yêu cầu rất quan trọng để đánh giá ô nhiễm sinh học và môi trường, nghiên cứu quá trình trao đổi chất và tích lũy sinh học, nghiên cứu quá trình địa hóa. Phân tích dạng của các nguyên tố không chỉ cung cấp thông tin về hàm lượng cụ thể mà còn giúp đánh giá độc tính, quá trình trao đổi chất của các đối tượng và các chất trong môi trường và sinh vật. Một số nguyên tố gây ô nhiễm mang độc tính cao như Hg và As đem lại một số bệnh trên cơ thể con người. Chúng chuyển hóa qua các dạng do tác động của các yếu tố môi trường.

Thủy ngân (Hg) là một nguyên tố nổi tiếng về độc tính của nó, đặc biệt là chất độc thần kinh. Trong tự nhiên, Hg được giải phóng ra môi trường thông qua núi lửa hoạt động và phong hóa đá. Tuy nhiên, hiện nay, lượng khí thải Hg tự nhiên chỉ là một phần nhỏ so với lượng khí thải liên quan đến các hoạt động của con người. Các nguồn Hg do con người tạo ra bao gồm khai thác mỏ, đốt than, các quy trình công nghiệp khác nhau và xử lý sản phẩm Hg thêm vào [1, 2]. Sau khi được giải phóng, Hg có thể đến môi trường nước thông qua sự lắng đọng trong khí quyển, thải trực tiếp, dòng chảy và xói mòn các lớp bị ô nhiễm [3, 4]. Tại đây, nó được loại bỏ một cách hiệu quả bởi các hạt và lắng xuống các lớp trầm tích dưới đáy, hoạt động như một bể chứa ô nhiễm do con người gây ra [5] và có thể đạt nồng độ Hg cao hơn vài bậc so với nền tự nhiên [6]. Nhờ việc thực hiện Công ước Minamata, việc mô tả đặc điểm của các địa điểm này đang nhận được sự chú ý ngày càng tăng trên toàn thế giới [7] như một công cụ để đánh giá các kiểu phân tán Hg có thể có và nguy cơ phơi nhiễm đối với con người và động vật hoang dã, chủ yếu liên quan đến sự hình thành methyl thủy ngân (CH_3Hg^+) [6].

Các hoạt động khai thác khoáng sản và vàng vẫn là nguồn cung cấp Hg được công nhận rộng rãi đối với trầm tích ở hạ lưu [8, 9], đặc biệt là hoạt động khai thác Hg trong lịch sử [7, 10, 11], trong khi người ta ngày càng quan tâm đến việc đánh giá tác động của nó đối với môi trường xung quanh của việc sử dụng Hg trong khai thác vàng thủ công quy mô nhỏ ở các nước đang phát triển [12-15]. Đối với các hoạt động công nghiệp, các nhà máy hóa chất sử dụng Hg là nguồn gây ô nhiễm đáng chú ý [16, 17], nhưng việc giải phóng kim loại này có thể xảy ra thông qua một loạt các hoạt động của con người, ví dụ như luyện

kim loại [18], lọc dầu [5], đốt than [4], xả nước thải sinh hoạt và công nghiệp [19].

Asen (As) là một á kim độc hại và gây ung thư có nguồn gốc tự nhiên liên quan đến quá trình hòa tan khoáng chất, khí thải núi lửa và hoạt động địa nhiệt [20]. Một lượng lớn As do con người tạo ra cũng đã xâm nhập vào môi trường từ các hoạt động khai thác trước đây, dược phẩm và thủy tinh trong các ngành công nghiệp, luyện kim loại, sản xuất thuốc trừ sâu và thuốc diệt cỏ, sản xuất chất bảo quản da và gỗ cùng với việc sử dụng nhiên liệu hóa thạch [20]. Ô nhiễm đất, trầm tích, nước mặt và nước ngầm [21, 22] chủ yếu là do quá trình lọc As từ tàn dư mỏ là di sản của lịch sử khai thác không chỉ sunfua, chẳng hạn như As nguyên sinh mang các khoáng chất như realgar (AsS), orpiment (As_2S_3) và arsenopyrite (FeAsS), mà còn khai thác vàng. Quá trình rang quặng có thể chuyển đổi nghi thức arsenopy chứa vàng thành oxit Fe chứa vàng, từ đó vàng có thể được chiết xuất bằng cách xyanua hóa. Sự giải phóng khí quyển của As_2O_3 dễ tiếp cận sinh học hơn như một sản phẩm phụ của hoạt động luyện quặng sau đó có thể dẫn đến sự lắng đọng trên không của nó trong môi trường trên cạn và dưới nước [20].

Mỗi dạng tồn tại của As, Hg đều có những đặc tính khác nhau, chỉ xét về phương pháp phân tích tổng hàm lượng thì chưa đưa ra được bằng chứng về độc tính, sinh khả dụng. Chính vì vậy cho nên cần phân tích dạng tồn tại của As và Hg là điều hết sức cần thiết. Với phương pháp phân tích đồng thời các dạng As, Hg sẽ tối ưu được thời gian, chi phí, kết quả của phép đo phân tích.

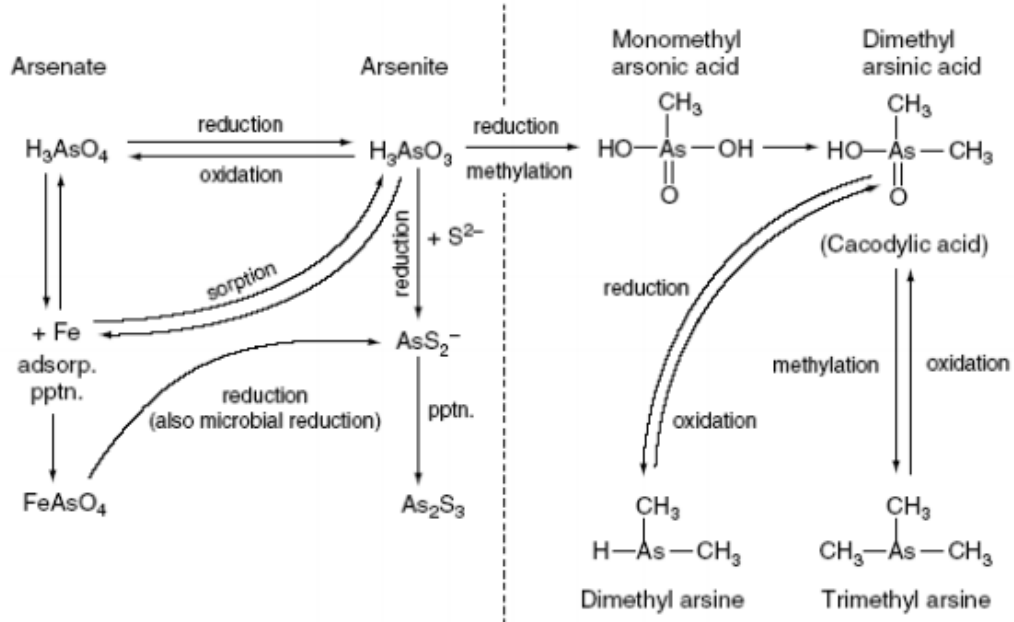
Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về Asen

Asen là một nguyên tố á kim ở ô số 33 có số khối 74,92 và thuộc nhóm 5A chu kỳ 4 trong bảng tuần hoàn các nguyên tố hóa học còn có tên gọi khác là thạch tín. Ngoài ra, trong cuộc sống chúng ta đều tiếp xúc với chúng ở các dạng khác nhau tồn tại trong thực phẩm, nước uống, môi trường đất và không khí. Asen hữu cơ có độc tính thấp hơn asen vô cơ vì vậy các dạng asen sẽ ảnh hưởng mức độ khác nhau lên sức khỏe con người [23-25].

1.1.1. Các dạng As và sự chuyển hoá

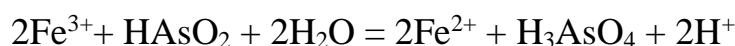
Asen có thể tạo hợp chất hóa trị dạng bán kim loại hoặc dạng anion. Asen tồn tại ở bốn trạng thái oxi hóa: -3, 0, +3 và +5. Asen nguyên tố có hai đồng vị ^{75}As (đồng vị bền) và ^{78}As . Asen có bốn dạng biến thể gồm hai biến thể kết tinh và hai biến thể ẩn tinh, trong đó bền vững nhất là các dạng biến thể kết tinh hay còn gọi là asen xám. Ở dạng hữu cơ thì phát hiện ra hơn 25 loại asen hữu cơ trong các mẫu môi trường [26].



Hình 1.1. Các dạng của As và sự chuyển hoá của chúng trong môi trường.

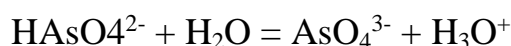
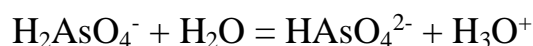
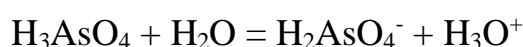
Asen nguyên tố và asen trioxit là thành phần chính được tìm thấy trong trầm tích. Asen trioxit là sản phẩm của quá trình luyện quặng và là nguồn gốc tạo thành các dạng asen khác. Asenat là dạng asen vô cơ ổn định nhất trong đất và nước. Asenat và asenit có thể biến đổi dễ dàng dưới các điều kiện oxy

hóa và khử. Quá trình oxy hóa arsenit thành arsenat trong đất xảy ra dưới tác dụng của vi hoặc được xúc tác bởi Mn(IV) và sắt (III) oxit. As(V) được ổn định bằng cách cộng kết với Fe^{3+} hoặc MnO_2 .

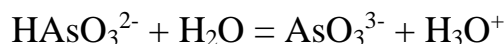
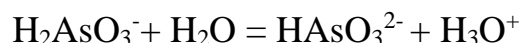
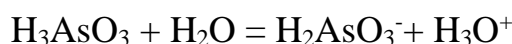


Tính acid và base của arsenic acid và arsenous acid quyết định đến dạng tồn tại và tính chất của nó.

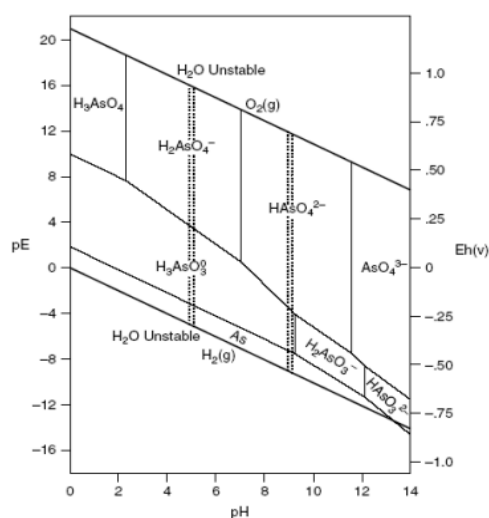
Arsenic acid



Arsenous acid



Trong khoảng pH từ 4 đến 8, dạng arsen ổn định nhất trong đất là H_2AsO_4^- (pH = 2-7), HAsO_4^{2-} (pH > 7) và H_3AsO_3 (pH < 9). Khi hạ thế khử xuống dưới 300mV ở pH = 4 hoặc dưới -100mV ở pH = 8, H_3AsO_3 là dạng arsen ổn định khi vắng mặt tác nhân tạo phức và các sinh vật xúc tác cho sự metyl hóa.

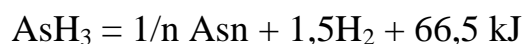


Hình 1.2. Đồ thị pE-pH của hệ As-H₂O ở 25°C.

Sự có mặt của sulfua trong điều kiện khử có thể làm kết tủa asen trong nước sông, hồ và trầm tích biển dưới dạng As₂S₃. Dạng sulfua trong môi trường khử đi kèm theo quá trình khử As(V) thành As(III). Nói một cách khác, nguồn gốc của sulfua là do quá trình oxy hóa với sự giải phóng As vào môi trường xung quanh [27]. Quá trình oxy hóa asenit thành asenat là một trong những cách tự bảo vệ của vi sinh vật. Nhưng cũng có một loại vi khuẩn có thể khử asenat thành asenit trong điều kiện yếm khí. Một lượng đáng kể asenat bị khử thành asin trong đất giàu glucozo và urê. Một số loại đất giải phóng ra asin từ asenit trong điều kiện yếm khí [28].

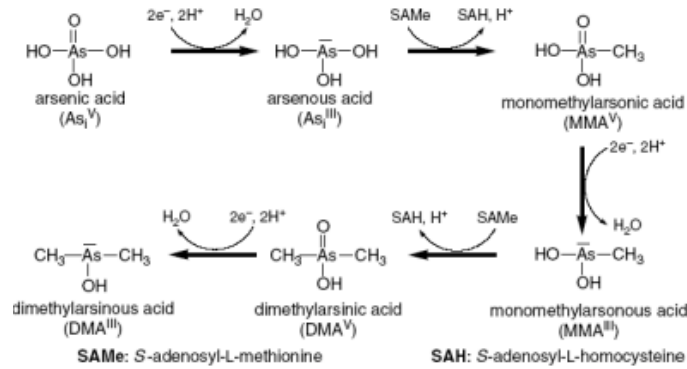
Thông thường, các dạng asen vô cơ được tạo thành từ các sinh vật tự dưỡng như tảo. Sự metyl hóa được coi như là quá trình giải độc của các sinh vật. Sự thoái hóa của các dạng metyl bởi quá trình quang hóa cũng được nghiên cứu. Sự metyl hóa bởi nấm và vi khuẩn tạo thành monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), trimethylarsenic acid hay trimethylarsine [28]. Trimethylarsine được tạo thành do sự phát triển của nấm mốc trên giấy dán tường với chất màu asen dẫn đến một số ảnh hưởng độc hại ở Anh và Đức cũng như là ở Mỹ vào thế kỷ XIX. Challenger đã đưa ra cơ chế quá trình metyl hóa asen bởi nấm mốc và các giả thiết khác trong báo cáo của mình, ông cho biết quá trình metyl hóa asen liên quan đến sự chuyển nhóm metyl từ các hợp chất metyl hoá [29]. Trong báo cáo đầu tiên của mình, Challenger nhận thấy rằng: vi khuẩn không metyl hóa asen.

Nghiên cứu đầu tiên tạo ra asin do vi khuẩn được công bố vào năm 1971 [30]. Ngay sau đó, một số vi khuẩn tạo ra asin đã được nhận dạng. Cullen và Reimer đã đưa ra cơ chế chuyển hóa đầy đủ của các dạng As dưới tác dụng của vi sinh vật [28]. Quá trình metyl hóa asen hữu cơ được nghiên cứu trên vi khuẩn loại methanogenic - loại vi khuẩn tạo ra metan như là sản phẩm cuối cùng của quá trình chuyển hóa trong điều kiện yếm khí. Các phản ứng của vi khuẩn thường tạo ra dimetylasin - một hợp chất ổn định khi thiếu oxy. Asin và metylasin không ổn định và dễ bay hơi trong không khí. Asin là một loại khí độc, có mùi đặc trưng của tỏi. Asin bị phân hủy theo phản ứng:



Một vài nghiên cứu về sự chuyển hóa sinh học của các dạng asen có độc tính cao thành methylarsonic acid và dimethylarsinic acid có độc tính thấp hơn đã được công bố [31]. Các hợp chất của asen trong động vật, thực vật, vi khuẩn và nấm được chuyển hóa thành các dạng asen hữu cơ phức tạp hơn như asenobetain, asenocholin, asenosugar và ion tetrametyl asonium và một số dạng asen khác còn chưa được xác định [32]. Con người có thể bị nhiễm độc asen vô cơ từ không khí, nước và thức ăn tự nhiên. Độc tính của các hợp chất asen vô cơ hấp thu vào cơ thể con người qua hệ hô hấp và hệ tiêu hóa phụ thuộc vào độ tan của nó trong nước: arsenic oxide, sodium arsenite và sodium arsenate chuyển vào trong cơ thể nhanh hơn với mức độ lớn hơn arsenic sulfide và chì arsenate. Với cơ thể con người, khả năng hấp thu các dạng asen vô cơ hóa trị III và V vào hệ tiêu hóa cũng rất nhanh và lớn [33].

Có tài liệu cho thấy rằng sự hấp thụ asen qua da rất thấp (1% vào cơ thể). Các dạng asen hữu cơ như monomethylarsonic acid (MMA) và dimethylarsinic acid (DMA) bị hấp thụ rất lớn (80%) qua đường ăn uống [23, 25]. Khi bị phơi nhiễm từ môi trường, asen phân bố hầu hết trong các cơ quan nội tạng, tuy nhiên ở các tế bào có chứa chất sừng cao như là tóc và móng tay thì nồng độ có thể tăng rõ ràng. Người ta nhận thấy ở những vùng khác nhau, trong những môi trường sống khác nhau thì nồng độ asen cũng khác nhau. Một tài liệu khác cũng đưa ra sự tích lũy asen trong mô phụ thuộc vào tuổi mà không phụ thuộc vào giới tính. Sau khi đào thải, nồng độ asen trong gan và thận tăng cao hơn so với các cơ quan khác [34]. Ở tế bào người bị nhiễm độc cao, tỷ lệ MMA/DMA khoảng 2,5 đến 3 và tỷ lệ MMA chiếm 10 đến 30% tổng hàm lượng asen trong tế bào. Những kiến thức về sự chuyển hóa sinh học của asen trong động vật có vú còn giới hạn trong các dạng vô cơ, các nghiên cứu trên người tình nguyện và các động vật trong phòng thí nghiệm chỉ ra sự hấp thụ này tương tự như quá trình hấp thụ bằng đường tiêu hóa hay tiêm trực tiếp vào tĩnh mạch. Các dữ liệu về sự chuyển hóa sinh học được nghiên cứu chủ yếu từ sự chuyển hóa nước tiểu vì gan là bộ phận đào thải chính của cơ thể động vật. Trong khi đó ở vi sinh vật, arsenate vô cơ trải qua bước khử hóa và oxi hóa đi kèm với quá trình methyl hóa để hình thành các dạng mono-, di- và tri-methyl asen [35], tuy nhiên, ở người và động vật có vú khác, chỉ quan sát thấy hai bước đầu tiên của quá trình chuyển hóa, hình thành nên monomethylarsonic acid (MMA) và dimethylarsinic acid (DMA).



Hình 1.3. Quá trình chuyển hoá As trong cơ thể.

Các hợp chất dạng thiol (cystin, dithiothereitol) có thể khử asen hóa trị V trong tế bào cơ thể sống, glutathion dạng khử là tác nhân quan trọng trong các bước khử hóa, còn S-adenosyl-L-methionin hay Vitamin B12 và các dạng methyl hóa khác cung cấp nhóm methyl để hình thành nên dạng As hữu cơ [23, 25]. Enzym gắn methyl vào asen được tìm thấy ở những tổ chức khác nhau, như cytosol trong gan được biết là một nguồn enzym hoạt động tốt nhất, các enzym chuyển hóa arsenite và methylarsonous acid trong gan thỏ và chuột đã được tinh chế và xác định các tính chất đặc trưng. Hai dạng MMA và DMA được biết đến là hai dạng As hữu cơ chủ yếu trong nước tiểu, nhưng cho đến khi Le và các cộng sự chứng minh được sự tồn tại của MMA và DMA trong nước tiểu người ở Nội Mông Cổ [31]. Sự có mặt của asen methyl hóa trị III trong nước tiểu là do xử lý với tác nhân tạo phức được phát hiện đồng thời với MMA.

Tuy nhiên, cho đến hiện nay, các hợp chất methyl asen không được tìm thấy trong nước tiểu của người đối chứng là người tiếp xúc với nước uống có hàm lượng asen thấp ($< 10\mu\text{g/l}$) [23, 36, 37]. Quá trình methyl hóa asen vô cơ hóa trị III được nghiên cứu trên cơ thể con người đã đóng góp 7,14 $\mu\text{g As/kg}$ trước và sau khi kiểm tra. Sau 24 giờ hấp thụ, 30 và 22% lượng As đã được bài tiết vào nước tiểu trước và sau khi kiểm tra. Sự khác nhau về tỷ lệ các dạng asen đã được chứng minh: dạng không chuyển hóa và dạng chuyển hóa mono và dimethyl hóa chiếm 63, 13, 24 và 38, 23, 39% trong nước tiểu trước và sau khi kiểm tra. Điều này rất quan trọng đối với quá trình bài tiết As qua sự chuyển hóa ở gan và thận. Trong suốt bốn ngày, sau khi một liều lượng (7,14 $\mu\text{g As/kg}$) của NaAsO_2 [38], MMA hoặc DMA thì có 46, 78 và 75% được bài tiết vào nước tiểu, cũng với thời gian như vậy, một nửa lượng asen đã bài tiết ra dưới 4 giờ với trường hợp của MMA, tương đương với 11 giờ với DMA và 28 giờ với

NaAsO₂. Khí asin có thể đi vào cơ thể con người qua con đường hô hấp, sự chuyển hóa của asin bài tiết vào nước tiểu giống như sự chuyển hóa sau khi hấp thụ các dạng asen vô cơ khác. Con người có thể hấp thụ các dạng As hữu cơ sau khi ăn nấm và đồ biển. Chúng sẽ nhanh chóng bị bài tiết vào nước tiểu, một số bỏ qua sự chuyển hóa thành asenobetain và asenocholin, nhưng một số trường hợp khác có thể biến đổi thành DMA và đào thải ra khỏi cơ thể [39].

1.1.2. Ảnh hưởng của As tới cơ thể con người

Trong lịch sử đã từng sử dụng Asen trioxit (As₂O₃) để giết người và tự sát. Asen vô cơ đã bị cấm dùng khi xử lý bệnh nấm ngoài da trong mười năm trở lại đây, nhưng As₂O₃ vẫn được dùng để điều trị bệnh bạch cầu cấp tính và asen hữu cơ được sử dụng để điều trị bệnh ký sinh trùng, mặc dù độc tính của asen đã được công nhận. Trong các cơ thể sống, các dạng tan của asen vô cơ hóa trị V có thể cạnh tranh với photphat và chèn trong công thức 1-asen-3-phosphoglycetate, chất có khả năng tự thủy phân mà không cần sản phẩm ATP, hơn nữa, chúng rất dễ bị khử thành As(III), dễ liên kết với nhóm thiol (-SH) làm mất hoạt tính các enzym quan trọng sản sinh ra ATP bởi phản ứng photpho hóa.

Năng lượng sinh ra không đi kèm với sự ức chế của các enzym thiol mà có thể gây ảnh hưởng đến chức năng của các tế bào. Enzym thiol như là glutathion peroxi và enzym khử hoá thioredoxin khả năng kìm hãm dạng mono, dimethyl asen hóa trị III hơn là dạng asen vô cơ cùng hóa trị, các hợp chất liên quan đến sự chuyển hóa của asen vô cơ có thể cắt và phá vỡ cấu trúc xoắn ốc của ADN X17.

Tính kích ứng mạnh của As(III) lên cơ thể sống và khả năng ức chế mạnh giải thích cho triệu chứng co thắt dạ dày, nhiễu loạn tim mạch, chức năng của hệ thống thần kinh và có thể dẫn đến chết nếu nhiễm độc nặng. Một vài nghiên cứu về bệnh dịch đã chỉ ra rằng nếu tiếp xúc thường xuyên với asen có thể gây ra ung thư. Tiềm năng ung thư phổi tăng lên với công nhân và những người dân sống ở vùng công nghiệp có thải ra asen, nguy cơ này sẽ càng tăng đối với người hút nhiều thuốc lá. Trong các nghiên cứu về nguồn nước nhiễm As, nguy cơ về ung thư da, phổi, bàng quang và thận cũng tăng lên. Bên cạnh các ảnh hưởng nguy hại, các rối loạn xảy ra trong cơ thể cũng liên quan đến độc tính của asen. Khi có mặt trong các bộ phận của cơ thể, asen làm suy yếu nhiều cơ

quan như hệ hô hấp, hệ tim mạch, hệ tiêu hóa, hệ đường huyết, gan, da, hệ thần kinh và hệ di truyền. Trong những năm gần đây, người ta đã chứng minh rằng sử dụng nước sinh hoạt nhiễm asen cao có thể làm tăng khả năng nghẽn mạch máu và bệnh đái tháo đường.

Giới hạn cho phép của asen đối với con người là $1\mu\text{g/g}$ thực phẩm khô. Hiện nay, điều này đã không còn thích hợp đối với con người. Dựa vào các nghiên cứu trên động vật cho thấy lượng asen không gây độc cho động vật nằm trong khoảng 25 đến 50 ng As/g thực phẩm nhưng cũng chưa chỉ ra rõ là đối với dạng asen nào. Chế độ ăn uống này tương đương với khoảng $20\mu\text{g}$ As trong một ngày. Chế độ ăn uống của con người thường chứa khoảng 12 đến $50\mu\text{g}$ As trong một ngày, vì vậy, qui định về asen cho con người từ nguồn thực phẩm và nước uống đã vượt qua giới hạn cho phép đối với sức khỏe. Ngày nay, sự nhiễm độc asen ở một số khu vực đã gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến hệ sinh vật và sức khỏe con người.

Nước uống

Tổ chức y tế thế giới đưa ra giới hạn hàm lượng asen cho phép trong nước uống là $10\mu\text{g/l}$, Cộng đồng chung Châu Âu cho phép hàm lượng asen trong nước uống là $10\mu\text{g/l}$ (tiêu chuẩn của Đức 1996), còn ở Mỹ cho phép là $50\mu\text{g/l}$. Nhưng vào ngày 31 tháng 10 năm 2001, tổ chức bảo vệ môi trường của Mỹ (EPA) đưa ra tiêu chuẩn giới hạn asen cho phép là $10\mu\text{g/l}$.

Thực phẩm

Ở Hà Lan, lượng asen cho phép đưa vào trong cơ thể là $12\mu\text{g/ngày}$. Nriagu cho biết rằng chế độ ăn của người trưởng thành ở Mỹ có chứa khoảng $48\mu\text{g}$ As trong một ngày. Nguồn gốc chính là từ các thực phẩm sử dụng hàng ngày: thịt, cá và gia cầm. Asenical – arsanilic acid và roxarsone - được phép sử dụng như thực phẩm chức năng trong thức ăn để kích thích sinh trưởng cho động vật ở Mỹ.

1.1.3. Một số phương pháp phân tích As

1.1.3.1. Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử

Phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa (F-AAS) xác định asen bị hạn chế của quá trình nguyên tử hóa nên có độ nhạy không cao (1mg/l), và không sử dụng kỹ thuật này để xác định asen trong mẫu môi trường. Bên cạnh

đó, phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử không ngọn lửa (GF-AAS) truyền thống đã được dùng để xác định asen trong các mẫu môi trường. Khi sử dụng các chất cải biến hóa học khác nhau thì độ nhạy của asen cũng khác nhau.

Các muối nitrat của niken, paladi, magie hay hỗn hợp của các chất này thường được sử dụng làm chất cải biến hóa học để loại trừ sự thăng hoa của asen trong quá trình tro hóa và cho tín hiệu ổn định. Ngoài ra, phương pháp F-AAS kết hợp với kỹ thuật hydrua hóa lại là một trong những phương pháp phổ biến nhất được sử dụng để xác định asen trong các mẫu môi trường. Ưu điểm của phương pháp này là khi bộ hydrua hóa kết nối với hệ thống hấp thụ nguyên tử đã làm tăng được giới hạn phát hiện của phương pháp 100 lần. Kỹ thuật hydrua hóa dựa vào phản ứng tạo hơi asin bằng hỗn hợp Zn/HCl hoặc NaBH_4/HCl . Sau đó, hơi asin được khí mang (nitơ hoặc argon) đưa vào hệ thống phát hiện. Nhưng cần phải kiểm soát pH của môi trường khử chặt chẽ vì khả năng tạo hydrua của As(III) và As(V) phụ thuộc vào pH của dung dịch. Ở pH = 5, chỉ có hợp chất As(III) bị khử thành hơi asin. Ở pH < 1, arsenic acid, dimethylarsinic acid và monomethylarsonic acid cũng tạo hơi asin.

1.1.3.2. Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử sử dụng nguồn ICP

Phương pháp ICP-AES sử dụng nguồn plasma ở nhiệt độ khoảng 5800°C đến 7800°C làm nguồn kích thích. Chất phân tích được đưa vào nguồn plasma ở dạng sol khí. Ở vùng nhiệt độ cao của plasma, các dạng phân tử, nguyên tử và ion ở các trạng thái năng lượng khác nhau tạo ra phổ phát xạ của nó. Người ta dựa vào phổ phát xạ để định tính và định lượng chất phân tích. Giới hạn phát hiện asen bằng kỹ thuật này là 30 µg/L.

1.1.3.3. Phương pháp khối phổ nguồn cảm ứng cao tần Plasma (ICP-MS)

Phương pháp ICP-MS là một trong những phương pháp phổ biến nhất để xác định asen do có giới hạn phát hiện cao, khả năng xác định đồng thời nhiều chất phân tích và khoảng tuyến tính rộng. Khi dẫn mẫu phân tích vào ngọn lửa plasma, trong điều kiện nhiệt độ cao của plasma, chất phân tích trong mẫu bị hóa hơi, nguyên tử hóa và ion hóa, tạo ra ion dương có điện tích +1 và các electron tự do. Thu và dẫn dòng ion này vào thiết bị phân giải phổ để phân

chia chúng theo số khối (m/z) sẽ tạo ra phổ khối của nguyên tử chất phân tích. Sau đó, đánh giá định tính và định lượng phổ thu được. Trong trường hợp xác định asen, ở nhiệt độ 7500K, khoảng 50% asen được ion hóa thành $^{75}\text{As}^+$ và định lượng dễ dàng, nhưng nếu hàm lượng Cl trong mẫu phân tích cao sẽ gây ảnh hưởng tín hiệu của asen do tạo ra mảnh ion $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. Muốn loại trừ ảnh hưởng của mảnh ion này, có thể sử dụng phương pháp đo thêm khí phụ trợ oxy đo mảnh $^{75}\text{As}^{16}\text{O}$ thành số khối 91 để loại bỏ sự trùng khối.

1.1.4. Một số phương pháp phân tích dạng As

1.1.4.1. Phương pháp phân tích dạng As bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối với hệ quang phổ phát xạ nguyên tử sử dụng kỹ thuật hydrua hóa (HPLC-HG-AFS)

Các dạng As được tách trên cột sắc ký của HPLC được ghép nối với hệ thống hydrua hóa và detector huỳnh quang nguyên tử. Sau khi tách As trên cột sắc ký, chúng được dẫn vào hệ thống hydrua hóa bằng một bơm nhu động. Các hydro mới sinh khử các dạng asen này thành hơi và được khí Ar cuốn sang ngọn lửa plasma. Hơi As được nguyên tử hóa thành đám hơi nguyên tử tự do. Chúng được kích thích từ năng lượng thấp lên năng lượng cao hơn sau đó trở về trạng thái năng lượng trung gian. Khi trở về mức năng lượng thấp chúng phát quang tạo thành phổ huỳnh quang nguyên tử [67].

Meihua Guo và đồng nghiệp đã tiến hành nghiên cứu “Xác định các loài asen trong huyết tương và tế bào máu của bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (APL)” bằng phương pháp HPLC-HG-AFS [40].

Phương pháp phân tích bốn dạng As gồm As(III), DMA, MMA, As(V) trên cột trao đổi anion trong vòng 6 phút với phương pháp rửa giải đẳng dòng sử dụng pha động chứa 13 mM CH_3COONa , 3 mM NaH_2PO_4 , 4 mM KNO_3 và 0,2mM EDTA-2Na.

Các phương pháp cung cấp phạm vi tuyến tính từ 2,0–50 ng/mL đối với bốn loại asen. Độ thu hồi dao động từ 81,2%-108,6% và hệ số biến thiên cho độ chính xác 9,3% đến 12,5%.

Các mẫu huyết tương được xử lý bằng cách lấy chính xác 450 μL mẫu huyết tương vào ống falcol sau đó thêm 50 μL HClO_4 (20%) để khử protein, sau đó là quá trình lắc xoáy trong 120 giây. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm lạnh

ở tốc độ 15000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C. Lấy dịch phía trên đem thêm 100 mL vào hệ thống HPLC-HG-AFS [40].

1.1.4.2. Phương pháp phân tích dạng As bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối với hệ quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng kỹ thuật hydrua hóa (HPLC-HG-AAS)

Các dạng arsen sau khi được tách trên cột sắc ký của thiết bị HPLC sẽ được dẫn trực tiếp vào bộ hydrua hóa của thiết bị AAS. Sau đó, chúng được dẫn sang bộ nguyên tử hóa mẫu bằng khí Ar, nguyên tử hóa thành đám hơi tự do. Chiều một chùm sáng đơn sắc đi qua đám hơi này, đo cường độ dòng của chùm sáng chiếu qua ta thu được phổ hấp thụ nguyên tử.

Mariella Moldovan và cộng sự đã tiến hành “Phân tích hàm lượng dạng As trong nước tự nhiên và nước tiểu bằng phương pháp HPLC-HG-AAS” [41]. Phương pháp sử dụng cột sắc ký NH₂ chương trình chạy đẳng dòng. Pha động gồm 5 mM NaH₂PO₄ và Na₂HPO₄ ở pH 5,0. Phương pháp có độ phát hiện với các dạng As(III): 1,4 µg/L, DMA: 1,9 µg/L, MMA 2,2 µg/L, As(V) 2,1 µg/L. Độ lặp lại từ 2-7%.

Xử lý mẫu nước tiểu bằng cách lấy 2 ml nước tiểu và thêm 20 ml ethanol tuyệt đối. Tiến hành ly tâm lạnh ở tốc độ 4000 vòng/ phút trong 15 phút ở 15°C. Tách lấy phần ethanol và cô đuổi ethanol ở nhiệt độ 40°C. Hòa phần sau cô đuổi ethanol bằng 10 ml dung dịch pha động sau đó lọc qua màng lọc 0,45 µm đem thêm 100 µl vào hệ thống phân tích.

Với mẫu nước tự nhiên tiến hành lọc qua màng lọc 0,45 µm và thêm trực tiếp vào hệ thống [41].

1.1.4.3. Phương pháp phân tích dạng As bằng ghép nối HPLC-ICP-MS

Các dạng arsen vô cơ và hữu cơ được tách trên các loại cột sắc ký của HPLC tương ứng theo pha động. Sau đó được nguyên tử hóa, ion hóa bằng plasma cảm ứng cao tần ICP và xác định bằng detector khối phổ.

Nhà nghiên cứu Nguyễn Mạnh Hà và cộng sự tiến hành nghiên cứu đề tài “Phân tích thành phần hợp chất arsen bằng HPLC-ICP-MS ứng dụng cho huyết thanh và nước tiểu” [42].

Phương pháp nghiên cứu phân tách 5 dạng gồm AsB, As(III), DMA, MMA, As(V). Phương pháp sử dụng cột sắc ký trao đổi anion mạnh Hamilton PRP-X100 và pha động gồm $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, (Na_2EDTA) và methanol ở pH 9,0. Chương trình rửa giải gradient.

Hiệu suất chiết xuất lớn hơn 91% đối với nền mẫu nước tiêu và độ thu hồi từ các mẫu pha nằm trong khoảng 94-139% đối với các loài arsen trong huyết thanh người. Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp, được tính theo tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu, lần lượt là 0,3-1,5 và 1,0-5,0 ng/L.

Trong nghiên cứu này các mẫu nước tiêu được chuẩn bị bằng cách pha loãng trong hỗn hợp methanol và nước khử ion (1:9). Sự pha loãng các mẫu nước tiêu cũng được thử nghiệm bằng cách sử dụng hỗn hợp pha động (pH 9,0) và methanol.

Với mẫu huyết tương tiến hành loại bỏ protein huyết thanh bằng cách kết tủa với acetonitrile và trichloroacetic acid đã được chọn để phân lập các dạng arsen [65].

1.2. Tổng quan về thủy ngân

Thủy ngân tồn tại trong tự nhiên được sinh ra bởi các quá trình tự nhiên, được biết đến như là sự suy thoái của vỏ trái đất, các hoạt động núi lửa và sự bốc hơi của nước. Tuy nhiên những năm gần đây thủy ngân cũng được tạo thành từ các hoạt động sản xuất của con người. Trước đây, thủy ngân được tạo ra trực tiếp và gián tiếp thông qua các quy trình công nghiệp, chẳng hạn như sản xuất acetaldehyde [43]. Hiện nay, có một số nguồn phát thải thủy ngân gián tiếp, như khai thác, đốt nhiên liệu hóa thạch, đặc biệt là than đá. Mặc dù thủy ngân chỉ chiếm một tỷ lệ rất nhỏ trong số các loại nhiên liệu này, nhưng sự phát thải cũng tạo ra một phần đáng kể thủy ngân nguyên tố vào môi trường. Lượng thủy ngân và các dạng tồn tại đặc biệt của nó không thể ước tính chính xác, bởi vì trong khí quyển và nước vẫn tồn tại thủy ngân nhưng rất thấp, thấp hơn giới hạn của phương pháp phân tích [44].

1.2.1. Các dạng của thủy ngân và sự chuyển hoá của chúng

Thủy ngân tồn tại trong môi trường dưới các dạng khác nhau và có thể chuyển hóa thông qua quá trình sinh hóa tự nhiên [43]. Sự chuyển hóa thủy ngân bao gồm 5 quá trình:

Quá trình 1: Hơi thủy ngân được sinh ra từ đá, đất và nước mặt hoặc khí thải núi lửa, cùng với các hoạt động của con người.

Quá trình 2: Khí quyển: Thủy ngân, khi được giải phóng vào khí quyển, thường tồn tại ở dạng hơi thủy ngân. Hơi thủy ngân tồn tại trong một thời gian rất dài, có thể lên đến một năm, vì vậy nó có khả năng lan rộng thông qua các hoạt động của khí quyển như gió, hiện tượng đối lưu.

Quá trình 3: Sự lắng đọng thủy ngân xuống mặt đất và nước mặt: hơi thủy ngân trong khí quyển trải qua quá trình oxy hóa quang hóa để tạo thành thủy ngân vô cơ kết hợp với hơi nước và trở lại mặt đất nhờ mưa.

Quá trình 4: Chuyển hóa thành sunfua thủy ngân không hòa tan.

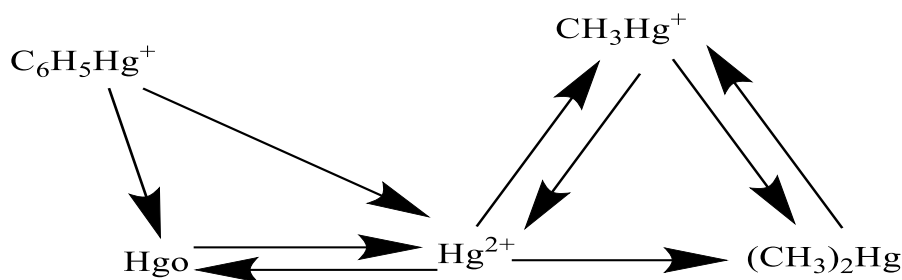
Quá trình 5: Biến đổi hóa học và sinh học thành các dạng dễ bay hơi và hòa tan, bao gồm năm quá trình trao đổi chất chính: methyl hóa thủy ngân, demethyl hóa thủy ngân, khử Hg^{2+} thành Hg vô cơ và oxy hóa ngược, tác dụng của vi sinh vật đối với việc chuyển Hg^{2+} thành các hợp chất hữu cơ khác nhau.

Quay trở lại bầu khí quyển hoặc trở lại tích lũy sinh học trong chuỗi thức ăn [43].

- Môi trường nước: Thủy ngân vào môi trường nước bị các vi sinh vật methyl hóa tạo thành methyl thủy ngân. Hợp chất này tan trong chất béo và có tính gây độc mạnh [44].

- Môi trường đất thì hầu như thủy ngân tồn tại ở dạng Hg^{2+} [45]. Hoạt động của thủy ngân phụ thuộc vào pH và nồng độ Cl^- . Ngoài ra phụ thuộc thêm vào thành phần vi sinh vật mà thủy ngân có thể thay đổi trạng thái. Các dạng hợp chất thường tìm thấy trong đất thường là $HgCl_2$ hay $Hg(OH)_2$.

Trong không khí hơi thủy ngân có thể bốc lên từ các hộp sơn hay khí thải hoặc các đám cháy nhà máy có sử dụng thủy ngân trong sản xuất công nghiệp.



Hình 1.4. Sự chuyển hoá của các dạng thủy ngân.

1.2.2. Ảnh hưởng của các dạng thủy ngân tới sức khỏe con người

Thủy ngân vô cơ và các dạng của nó, đặc biệt Methyl thủy ngân rất nguy hiểm cho phụ nữ mang thai và trẻ nhỏ [46, 47]. Tính năng nguy hiểm nhất là khả năng của RH^+ để vượt qua nhau thai vào mô của thai nhi. Methyl thủy ngân di chuyển giữa các tế bào thần kinh từ lớp màng ngoài đến mục tiêu cuối cùng trong vỏ não, ức chế sự phát triển não bộ của thai nhi dẫn đến thay đổi hành vi và giảm khả năng nhận thức thậm chí gây ra mù, điếc, v.v. đồng thời can thiệp vào tế bào phân chia và tổng hợp protein của các tế bào thần kinh [48].

Điều này dẫn đến việc thiếu năng lượng trong tế bào và rối loạn trong việc truyền phân xạ thần kinh. Đây là cơ sở để giải thích lý do tại sao những đứa trẻ sinh ra từ bà mẹ bị nhiễm methyl thủy ngân sẽ bị phá hủy không thể phục hồi hệ thần kinh trung ương, bao gồm cả bệnh tâm thần phân liệt, sự phát triển trí tuệ và co giật. Cũng có bằng chứng cho thấy con người và động vật tiếp xúc với methyl thủy ngân có thể có tác dụng phụ đối với hệ tim mạch ở trẻ em đang phát triển và trưởng thành, biểu hiện là huyết áp không ổn định, và bệnh tim, chậm phát triển tâm thần.

Ngoài ra, ngộ độc methyl thủy ngân cũng dẫn đến sự phân lập nhiễm sắc thể, phá vỡ nhiễm sắc thể và ngăn chặn sự phân chia tế bào [49]. Các nghiên cứu khác đã chứng minh rằng tác dụng phụ của thủy ngân có thể gây ung thư và tất cả ngộ độc thủy ngân xảy ra khi lượng thủy ngân trong máu là 0,5 ppm CH_3Hg^+ [50].

Đối với người trưởng thành, methyl thủy ngân được đưa vào cơ thể qua đường tiêu hóa và dễ dàng hấp thụ. Nó chủ yếu được tìm thấy kết hợp với cysteine, với protein và peptide acid amin [51]. Phức hợp Methylmercury-cysteine ổn định cùng với sự hình thành các acid amin vận chuyển trong cơ thể như methionine - một loại acid amin thiết yếu. Do đó, nó được vận chuyển tự

do khắp cơ thể đến não và qua nhau thai, cung cấp dinh dưỡng cho sự phát triển của thai nhi. Do sự kết hợp mạnh mẽ của protein này, thủy ngân methyl không dễ dàng bị loại bỏ khỏi cơ thể. Thời gian phân hủy của thủy ngân methyl trong máu là khoảng 50 ngày [52].

Nghiên cứu trên cơ thể nạn nhân bị ngộ độc methyl thủy ngân ở Minamata (Nhật Bản) cho thấy ảnh hưởng của methyl thủy ngân trong cơ thể con người tăng lên khi tiếp xúc với liều lượng vượt ngưỡng cho phép [53]. Ban đầu, nạn nhân mất sự phối hợp giữa các cơ bắp, sức chịu đựng, tê liệt chân tay hoặc run rẩy, suy giảm mùi vị và mùi, ù tai hoặc điếc, mờ mắt, hay quên, cơ thể yếu, mệt mỏi.

Nhiều bệnh nhân đầu tiên ở Minamata bị điên, bất tỉnh và chết sau một tháng bị bệnh. Khám nghiệm tử thi cho thấy: Trong một số trường hợp, tiểu não gần như bị phá hủy hoàn toàn. Ở Iraq, trong những năm 1960 và 1970, methyl thủy ngân đã được sử dụng để lưu trữ lúa mì, là hạt giống làm thức ăn trực tiếp cho con người và động vật [54]. Các triệu chứng thần kinh như dị ứng, khó giao tiếp, vận động, suy giảm thị lực, giảm thính lực, mù và tử vong.

Ngoài ra thủy ngân vô cơ và hữu cơ cũng được xác định liên quan đến tổn thương thận [55]. Khám nghiệm tử thi bệnh nhân mắc treo bằng methyl thủy ngân cho thấy các biểu hiện tiêu cực lên thận và thoái hóa ống thận thậm chí làm hỏng ống thận [56]. Trong thập kỷ qua, các nhà nghiên cứu đã nghiên cứu tác động của methyl thủy ngân lên chức năng miễn dịch và huyết áp. Thực hiện thí nghiệm trên chuột tiếp xúc với thủy ngân methyl, Sorosen và cộng sự (1999) đã tìm thấy mối liên quan với thủy ngân methyl với tăng huyết áp ở chuột khi sinh, tương ứng với sự gia tăng nồng độ thủy ngân trong máu.

1.2.3. Một số phương pháp phân tích Hg

1.2.3.1. Phương pháp sắc ký khí detector cộng kết điện tử (GC-ECD)

Năm 2004 nhóm nghiên cứu Chen Syr-Song và cộng sự đã đưa ra quy trình phân tích methyl thủy ngân và thủy ngân vô cơ trong cá [44]. Tác giả sử dụng dung dịch kiềm (tetramethylammonium hydroxide) dưới tác dụng của lò vi sóng, mẫu được thêm dung dịch Cu^{2+} , tạo dẫn xuất trong pha nước với methyl thủy ngân với sodium tetrapropylborate, sau đó chiết lần lượt *n*-heptane. Dẫn xuất thủy ngân được giải hấp và sau đó được phân tích bằng phép đo khối phổ.

Thời gian phân tích cho mỗi mẫu trên thiết bị GC-MS được tối ưu khoảng 7 phút. Công suất vi sóng 15 – 30, 45 và 60 – 75 W, thời gian gia nhiệt mẫu lần lượt là 3,5, 2,5 và 1,5 phút. Hiệu suất thu hồi của các dạng thủy ngân lần lượt là 92,3; 96,1% và 93,6; 95,5% đối với methyl thủy ngân và vô cơ. Phương pháp được áp dụng để phân tích 3 mẫu chuẩn đối chứng là mẫu cá ngừ BCR CRM 464 (tuna fish), thịt cá nhám NRC DORM-2 (dogfish muscle) và gan cá nhám NRC DOLT-2 (dogfish liver).

1.2.3.2. Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS)

Năm 2012, nhóm nghiên cứu A.Q. Kaziv và cộng sự đã phát triển phương pháp CV-AAS để xác định mức methyl thủy ngân và thủy ngân vô cơ trong 10 loài cá nước ngọt [57]. MeHg và Hg được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử hơi lạnh sau khi qua quá trình xử lý mẫu ướt bằng kiềm. Các mẫu được trong quá trình xử lý đã được thêm clorua và natri tetrahydroborate tương ứng cho MeHg và Hg. Độ chính xác của phương pháp được đánh giá bằng mẫu chuẩn tham chiếu (DORM-2). Giới hạn phát hiện lần lượt là 0,117 và 0,133 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ đối với MeHg và Hg. Nồng độ MeHg và Hg trong thịt của mười loài cá được tìm thấy trong khoảng 28,4 – 56,3 và 3,01 – 8,11 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Nhóm nhà nghiên cứu Tuzen và cộng sự đã phát triển một phương pháp để xác định Hg(II) và methyl thủy ngân trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus* kết hợp chiết pha rắn và phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử kỹ thuật hoá hơi lạnh [58]. Quá trình rửa giải chọn lọc và tuần tự với 0,1 mol.L⁻¹ HCl đối với Methyl thủy ngân và 2 mol.L⁻¹ HCl đối với Hg(II) được thực hiện ở pH trong khoảng 2 – 6. Các điều kiện phân tích tối ưu bao gồm pH, lượng chất hấp thụ sinh học, thể tích mẫu cũng được khảo sát. Giới hạn phát hiện của các chất phân tích là 2,5 ng.L⁻¹ đối với Hg(II) và 1,7 ng.L⁻¹ đối với methyl thủy ngân.

TCVN 8987-2:2012 quy định phương pháp xác định hàm lượng thủy ngân tổng số trong tinh bột và các sản phẩm tinh bột bằng phương pháp đo phổ hấp thụ nguyên tử với kỹ thuật hóa hơi lạnh (CV-AAS). Thủy ngân trong mẫu được chiết bằng phương pháp vô cơ ướt sử dụng acid nitric và hydro peroxyt, khử Hg²⁺ về Hg⁰ bằng hydro mới sinh từ phản ứng của natri bohydrua và acid clohydric. Thủy ngân sau đó được đo ở bước sóng 257,3 nm.

TCVN 7604:2007 quy định phương pháp xác định hàm lượng tổng thủy ngân trong các mẫu thực phẩm bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử không ngọn lửa. Thủy ngân được tách ra khỏi phần mẫu đã phân hủy dưới dạng hơi thủy ngân bằng phương pháp hóa hơi lạnh, sau đó xác định bằng đo phổ hấp thụ nguyên tử không ngọn lửa ở bước sóng 257,3 nm.

1.2.3.3. Phương pháp khối phổ nguồn cảm ứng cao tần Plasma (ICP-MS)

Vào năm 2005 hai nhà khoa học Sang Hak Lee, Jung Ki shu áp dụng một phương pháp pha loãng đồng vị kết hợp phổ khối nguyên tử nguồn plasma cảm ứng cao tần để xác định tổng thủy ngân trong thịt cá ngừ [59]. Phương pháp sử dụng vi sóng phá mẫu trong môi trường HNO₃ và H₂O₂ để hòa tan mẫu. Quy trình xác định chính xác tổng thủy ngân trong mẫu mô cá ngừ bằng ICP-MS như sau: mẫu CRM được thêm chuẩn 202Hg, sau đó phân hủy trong môi trường acid. Phương pháp này được áp dụng để xác định Hg trong mẫu cá ngừ CCQM-P39 do IRMM (Viện nghiên cứu và đo lường, GEEL, Bỉ) cung cấp cho nghiên cứu so sánh quốc tế.

Ramaswami Kalamegham và K. Owen Ash đã đưa ra quy trình đơn giản và nhạy đối với thủy ngân tổng trong máu và nước tiểu bằng phương pháp phổ khối nguyên tử nguồn plasma cao tần cảm ứng (ICP-MS) [60]. Mẫu bệnh phẩm được chuẩn bị bằng cách chiết xuất kết tủa bằng hydrochloric acid 50% (v/v) có chứa EDTA và cysteine. Khoảng tuyến tính của phương pháp này từ 2 và 200 µg/L trong mẫu thử với độ nhạy từ 0,2 µg/L. Nồng độ (µg/L) của thủy ngân như sau: máu toàn phần xét nghiệm (n = 20) - 4,6 ± 0,6 (c.v. 12,3%), 18,3 ± 1,1 (c.v. 6,1%), 56,4 ± 2,8 (c.v. 5,0%); máu toàn xét nghiệm (n = 15) -5,7 ± 1,0 (c.v. 16,8%), 19,7 ± 2,7 (c.v. 13,5%) và 50,1 ± 6,9 (c.v. 13,7%); nước tiểu (n = 20) -9,3 ± 1,2 (c.v. 12,9%), 29,6 ± 2,2 (c.v. 7,4%). Hiệu suất thu hồi thủy ngân hữu cơ và vô cơ từ các mẫu máu dao động từ 91,6% đến 110,2% cho thấy phương pháp phù hợp để phân tích tổng thủy ngân, cả hữu cơ và vô cơ, trong máu và nước tiểu.

Hàm lượng thủy ngân tổng số trong thực phẩm cũng được xác định theo phương pháp AOAC 2015.01 [61]. Mẫu được vô cơ hoá trong lò vi sóng sử dụng dung dịch acid nitric và hydroperoxide. Thủy ngân trong mẫu được ổn định bằng cách thêm 0,1 ml dung dịch Au 50 ppm, sử dụng nội chuẩn rhodium.

Phương pháp cho giới hạn định lượng (LOQ) với các mẫu rắn $\leq 10 \mu\text{g/kg}$, với các mẫu lỏng $\leq 8 \mu\text{g/kg}$.

1.2.4. Một số phương pháp phân tích dạng Hg

1.2.4.1. Phương pháp phân tích dạng Hg bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối với hệ quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng kỹ thuật hydrua hóa (HPLC-HG-AAS)

Các dạng Hg sau khi được tách trên cột sắc ký của thiết bị HPLC sẽ được dẫn trực tiếp vào bộ hydrua hóa của thiết bị AAS. Sau đó, chúng được dẫn sang bộ nguyên tử hóa mẫu bằng khí Ar, nguyên tử hóa thành đám hơi tự do. Chiều một chùm sáng đơn sắc đi qua đám hơi này, đo cường độ dòng của chùm sáng chiếu qua ta thu được phổ hấp thụ nguyên tử.

Rajani Jagtap và cộng sự tiến hành nghiên cứu “Phân tích dạng Hg(II) và MeHg trong cá và trầm tích bằng HPLC-HG-AAS và HPLC-ICP-MS” [62]. Phương pháp HPLC-HG-AAS sử dụng cột sắc ký Phenomenox C18 ($5\mu\text{m} * 4,6\text{mm} * 250 \text{ mm}$). Pha động chứa $0,06 \text{ mM CH}_3\text{COONH}_4$ trong 5% methanol và 0,1% L-Cystine. Nồng độ định lượng phương pháp $2 \mu\text{g/L}$.

Trong nghiên cứu này mẫu cá và trầm tích được tiến hành chiết xuất bằng 2-mercaptoethanol. Mẫu cá và trầm tích được cân khối lượng 2 g vào bình PTPE 55ml và thêm 2,5ml và 5ml dung dịch 2-mercaptoethanol 0,5% cho mẫu cá và trầm tích tương ứng. Đưa vào lò vi sóng ở 120°C trong 15 phút, sau đó ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/ phút trong 20 phút. Tiến hành lấy dịch phía trên đưa vào phân tích [62].

1.2.4.2. Phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ nguồn plasma cảm ứng cao tần (HPLC-ICP-MS)

Phương pháp này có ưu điểm là có thể định lượng các dạng Hg thay vì các dạng tổng như các phương pháp liệt kê ở trên. Phương pháp sử dụng HPLC có nhiệm vụ phân tách các dạng Hg ra khỏi nhau và sử dụng ICP-MS để phát hiện ra các dạng đó. Phương pháp HPLC giúp đơn giản hoá quá trình xử lý mẫu, loại bỏ bước tạo dẫn xuất và có thể áp dụng phân tích nhiều loại chất phân tích có tính chất khác biệt dựa trên các cơ chế tách khác nhau như sắc ký pha đảo, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ghép cặp ion, sắc ký loại cỡ [63-65]. ICP-MS được lựa chọn ghép nối trong phân tích dạng vì có độ nhạy cao, khoảng tuyến

tính rộng và có thể phân tích đồng thời nhiều nguyên tố. Do vậy, phương pháp ghép nối sắc ký lỏng với khối phổ nguồn plasma cảm ứng cao tần (HPLC-ICP-MS) có giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng tốt, phù hợp trong phân tích lượng vết và siêu vết các dạng nguyên tố [66].

Với nghiên cứu Rajani Jagtap và cộng sự tiến hành nghiên cứu “Phân tích dạng Hg(II) và MeHg trong cá và trầm tích bằng HPLC-HG-AAS và HPLC-ICP-MS” [62]. Phương pháp phân tích bằng công cụ HPLC-ICP-MS và sử dụng cột sắc ký C8 PerkinElmer ($3\mu\text{m} * 33\text{ mm} * 3\text{ mm}$). Pha động chứa 0,5 % 2-mercaptoethanol và 5% methanol, tốc độ dòng 1,5 ml/ phút, nhiệt độ cột 25°C. Đường chuẩn cho các chuẩn MeHg và Hg(II) tuyến tính trong phạm vi 0–100 $\mu\text{g/L}$ và cho hệ số tương ứng ($r^2 = 0,9990$ và $r^2 = 0,9995$). Hàm lượng thủy ngân thấp nhất có thể đo được là 0,4 $\mu\text{g/L}$ tương ứng với 0,01 $\mu\text{g/L}$ trong cá và trầm tích.

Trong nghiên cứu này mẫu cá và trầm tích được tiến hành chiết xuất bằng 2-mercaptoethanol. Mẫu cá và trầm tích được cân khối lượng 2 g vào bình PTPE 55ml và thêm 2,5ml và 5ml dung dịch 2-mercaptoethanol 0,5% cho mẫu cá và trầm tích tương ứng. Đưa vào lò vi sóng ở 120°C trong 15 phút, sau đó ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/ phút trong 20 phút. Tiến hành lấy dịch phía trên đưa vào phân tích [62].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

2.1.1. Phân tích dạng As và Hg

Nghiên cứu thực nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Hóa Phân tích, Viện Hóa Học, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam.

Các thiết bị thực hiện nghiên cứu bao gồm:

- Hệ thống thiết bị HPLC Altus™ A-30 UPLC® (Perkin Elmer, Hoa Kỳ).
- Thiết bị ICP-MS NexION 2000 (Perkin Elmer, Hoa Kỳ).

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là các mẫu nước tại khu vực Thái Nguyên, mẫu nước tiêu được thu thập tại trung tâm chống độc bệnh viện Bạch Mai.

Các dạng của As nghiên cứu gồm As vô cơ và hữu cơ:

- As vô cơ nghiên cứu gồm As(III), As(V)
- As hữu cơ nghiên cứu gồm DMA, MMA

Các dạng của thủy ngân vô cơ Hg(II) và thủy ngân hữu cơ MeHg

2.2. Hóa chất

Tất cả các thuốc thử đạt chuẩn phân tích hoặc chuẩn sắc ký lỏng đã được sử dụng:

- Dimethylarsinic acid (DMA, $\geq 98\%$) được mua từ Sigma Aldrich (Singapore).
- Arsenic(III) oxide (As(III), $\geq 99\%$). được mua từ Sigma Aldrich (Singapore).
- Sodium arsenate dibasic heptahydrate (As(V), $\geq 98\%$) được mua từ Sigma Aldrich (Singapore).
- Methylmercury(II) chloride (MeHg) được mua từ Sigma Aldrich (Singapore).
- Disodium methyl arsonate hexahydrate (MMA, $\geq 99\%$) được mua từ Accustandard (Hoa Kỳ).

- Dung dịch chuẩn gốc Hg^{2+} nồng độ 1000 mg/L trong nitric acid 1M được mua từ Fisher Scientific Vương quốc Anh.
- Các dung dịch gốc Asen đơn (1000 mg/L dưới dạng As) được pha trong nước siêu tinh khiết và giữ ở nhiệt độ -20°C trong ống nhựa polypropylene.
- Các dung dịch gốc MeHg^{+} (1000 mg/L đối với Hg) được pha trong methanol.
- Các dung dịch làm việc được pha mới hàng ngày bằng cách pha loãng các dung dịch gốc trong nước siêu tinh khiết hoặc pha động.
- Methanol ($\geq 99,9\%$, cấp HPLC, Sigma Aldrich, Đức),
- Sodium 1-butanefulfonate (SBS, $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Singapore), Tetrabutylammonium hydroxide (TBAH, dung dịch 40 wt.% (1,5M) trong nước, Thermo Scientific Chemicals),
- L-cysteine (Cys, $\geq 98\%$, Cool Chemical Science and Technology, Trung Quốc)
- Acetic acid (bảng 99,5%, Macron Fine Chemicals, Ba Lan) được sử dụng để chuẩn bị pha động.
- Nước siêu tinh khiết được chuẩn bị bằng hệ thống lọc nước UV Direct-Q 5 (Merck Millipore, Hoa Kỳ) và được sử dụng để chuẩn bị dung dịch chuẩn, mẫu pha loãng và pha động.

2.2.1. Dung dịch chuẩn gốc 1000 mg/L

- Cân 2,47 mg DMA vào bình HDPE và thêm 1,0205 g nước cất khử ion có độ dẫn 18,2 $\text{M}\Omega$ cm và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối.
- Cân 5,86 mg MMA vào bình HDPE và thêm 1,0814 g nước cất khử ion có độ dẫn 18,2 $\text{M}\Omega$ cm và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối.
- Cân 3,48 mg As (III) vào bình HDPE và thêm 2,3698 g nước cất khử ion có độ dẫn 18,2 $\text{M}\Omega$ cm và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối.

- Cân 6,24 mg As (V) vào bình HDPE và thêm 2,1273 g nước cất khử ion có độ dẫn 18,2 M Ω cm và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối.
- Dùng micropipet hút cân 0,1007 g Hg(II) vào bình HDPE và thêm 10,0026 mg nước cất khử ion có độ dẫn 18,2 M Ω cm và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối.
- Cân 12,7 mg MeHg vào bình HDPE và thêm 10003,2 mg nước cất khử ion có độ dẫn 18,2 M Ω cm và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối.

2.2.2. Dung dịch chuẩn làm việc

Tất cả các dung dịch chuẩn đơn lẻ trước khi sử dụng đều để ổn định ở ngoài môi trường điều kiện nhiệt độ phòng 25°C trong 30 phút. Các dung dịch làm việc hàng ngày được hút bằng micropipet và cân, pha loãng trên cân phân tích.

2.2.3. Pha động cho sắc ký

Pha động sắc ký gồm 3 pha động:

- Pha động A: 2mM TBAH, 2mM Sodium 1-butanefulfonate (SBS) vừa đủ 1 lít bằng nước cất khử ion có độ dẫn 18,2 M Ω cm được điều chỉnh pH=6 bằng acid acetic
- Pha động B: 2mM TBAH, 2mM Sodium 1-butanefulfonate (SBS), 15mM L-Cysteine (Cys) vừa đủ 1 lít nước cất khử ion có độ dẫn 18,2 M Ω cm được điều chỉnh pH=6 bằng acid acetic.
- Pha động C: Methanol

Trước khi sử dụng, các pha động được lọc qua màng lọc 0,45mm và siêu âm đuổi bọt khí. Mỗi ngày mới pha động sẽ được pha mới để tránh ảnh hưởng biến đổi.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị ICP-MS NexION 2000 plasma khối phổ tứ cực (Hoa Kỳ) dùng để phân tích tổng As.

Thiết bị phân tích CV-AAS model HG-201(Nhật Bản) dùng để phân tích tổng Hg.

Thiết bị phân tích dạng As, Hg gồm 2 thành phần chính cấu thành từ HPLC và ICP-MS:

Thành phần thứ nhất chính là hệ thống thiết bị HPLC Altus™ A-30 UPLC® (Perkin Elmer, Hoa Kỳ) bao gồm bộ trộn dung môi Altus A-30 (bơm bậc bốn) và bộ tiêm mẫu tự động Altus A-30 (bộ lấy mẫu tự động được trang bị bộ bơm 100 µL vòng lặp). Hệ thống khử khí và lò gia nhiệt cột. Hệ thống HPLC được điều khiển bởi phần mềm Empower 3version 7.0.3471.909 từ Water Corporation (Water, MA, US).

Các dạng As, Hg được tách bởi cột sắc ký Osaka Soda (Shiseido) CAPCELL PAK C18 MG 100Å 5µm, 250mm x 4.6mm, Nhà sản xuất: Shiseido. Mô tả cột: Capcell Pak, C18 (RP18, ODS, Octadecyl). Kích thước lỗ: 100Å. Kích thước hạt: 5,0 µm. Đường kính trong: 4,6mm, Chiều dài: 250mm. Loại cột: Cột HPLC pha đảo. Sử dụng chương trình rửa giải gradient với tốc độ rửa giải không đổi: 1ml/ phút.

Thành phần thứ hai đó là thiết bị ICP-MS NexION 2000 plasma khối phổ tứ cực được coi như một detector phát hiện tín hiệu của các dạng As, Hg.

Thiết bị phụ trợ:

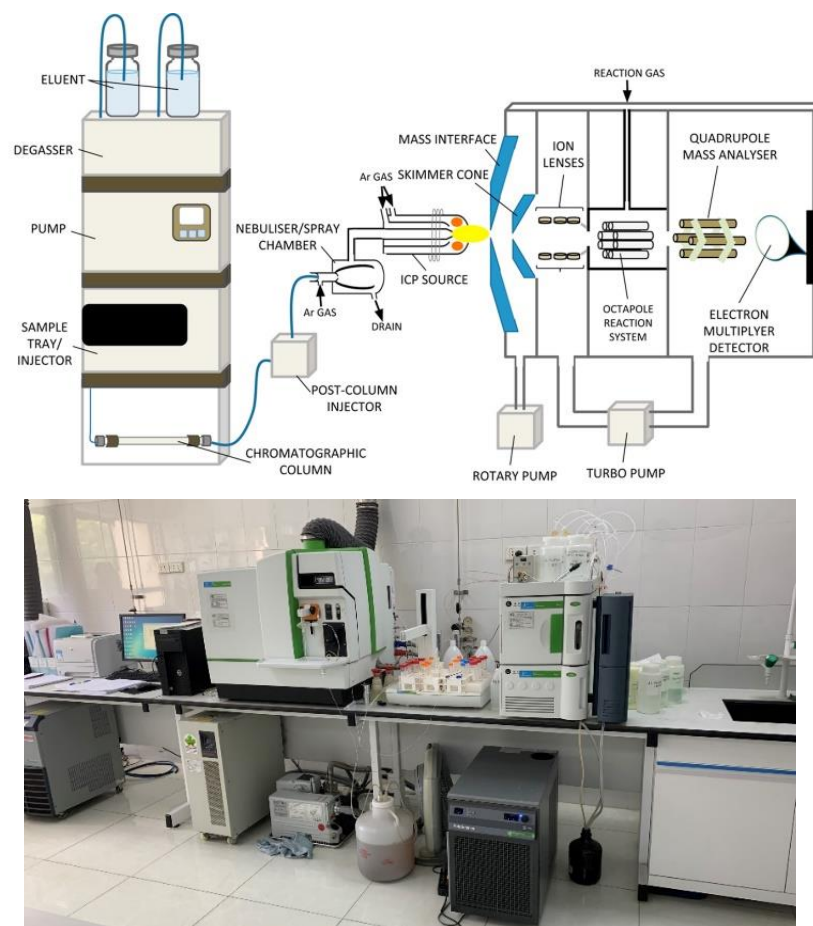
- Cân phân tích 4 số lẻ (220g x 0,0001g) Quintix 224-1S
- Máy đo pH SevenCompact
- Máy siêu âm VORTEX
- Micropipet 50, 100, 1000, 5000 mcL của Eppendorf
- Máy ly tâm, bể gia nhiệt cách thủy v.v.

Dụng cụ thí nghiệm đáp ứng yêu cầu độ chính xác trong phân tích.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Có nhiều phương pháp được sử dụng trong phân tích dạng đơn nguyên tố của As hay của Hg. Tuy nhiên, để phân tích đồng thời các dạng của đa nguyên tố As và Hg, phương pháp ghép nối sắc ký lỏng với khối phổ nguyên tử nguồn ion hóa cao tần cảm ứng plasma (HPLC-ICP-MS) là phương pháp được sử

dụng chủ yếu bởi khả năng phân tích đồng thời nhiều nguyên tố của detector ICP-MS. Trong nghiên cứu này, phương pháp HPLC-ICP-MS được lựa chọn để nghiên cứu phân tích đồng thời 4 dạng As gồm As(III), DMA, MMA, As (V) và 2 dạng thủy ngân gồm Hg(II), MeHg. Các dạng As và Hg được tách trên cột tách và sau đó phát hiện bằng detector ICP-MS.



Hình 2.1. Hệ thống thiết bị HPLC-ICP-MS (PerkinElmer, Hoa Kỳ).

Các dạng hợp chất của As gồm As(III), As(V), DMA, MMA cùng với các dạng thủy ngân là Hg(II), MeHg được tách bằng cột sắc ký pha đảo C18 Osaka Soda (Shiseido) với pha động chứa TBAH, SBS, Cys chỉnh pH= 6 với chương trình gradient có tốc độ 1 ml/phút.

- Pha động A: 2 mM TBAH, 1 mM SBS trong 1 lít DIW được điều chỉnh pH=6 bằng acid acetic.
- Pha động B: 2 mM TBAH, 1 mM SBS, 15 mM L-Cysteine trong 1 lít DIW được điều chỉnh pH=6 bằng acid acetic.
- Pha động C: Methanol

- Tỷ lệ dung môi chương trình Gradient.

Bảng 2.1. Chương trình thời gian chạy gradient.

Thời gian (phút)	% Pha động A	% Pha động B	% Pha động C
0	99	0	2
1	0	99	2
13	0	99	2
14	99	0	2
18	99	0	2

2.5. Thực nghiệm

2.5.1. Thu thập mẫu

Mẫu sinh học là 7 mẫu nước tiểu (mẫu Niệu) đại diện được lấy từ Trung tâm chống độc, Bệnh viện Bạch Mai từ 02/08/2023 đến 20/08/2023. Mẫu Niệu được lấy từ các bệnh nhân từ buổi sáng, bỏ đi đoạn tiểu đầu và được đựng bằng cốc nhựa. Mẫu bảo quản đông lạnh ướp đá khô và vận chuyển về Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, lưu trong tủ mát ở điều kiện 4°C cho đến khi tiến hành phân tích.

Mẫu nước môi trường là 6 mẫu nước mặt, được thu thập tại Thái Nguyên được bảo quản theo tiêu chuẩn TCVN 6663-3:2008 (ISO 5667-3:2003).

2.5.2. Xử lý mẫu phân tích tổng As

Mẫu nước tiểu: Mẫu nước tiểu sau khi đưa ra khỏi tủ bảo quản tiến hành rã đông. Cân 0,5 g nước tiểu vào ống ly tâm 15 mL và thêm vào HNO₃ 1% đến 5,0 g. Trộn đều mẫu bằng máy vortex, sau đó ly tâm lấy phần dịch bên trên đưa vào phân tích tổng.

Mẫu nước môi trường tiến hành đo trực tiếp.

2.5.3. Xử lý mẫu phân tích tổng Hg

Với mẫu niệu, mẫu được tiến xử lý và phân tích hàm lượng Hg theo quy trình sau:

- Bước 1: Để mẫu nước tiểu ổn định ở nhiệt độ phòng, lắc đều mẫu.

- Bước 2: Thêm lần lượt 1 mL acid HClO_4 72%, 1 mL acid HNO_3 65% và 5 mL acid H_2SO_4 98% vào bình phá mẫu 50 mL. Sau đó thêm từ từ 2 – 5 mL mẫu nước tiêu và lắc đều.

- Bước 3: Vô cơ hóa mẫu bằng bếp phá mẫu ở nhiệt độ 200 – 220°C trong vòng 30 phút.

- Bước 4: Mẫu sau khi được làm nguội, định mức 50 mL được đo trên thiết bị phân tích vết thủy ngân HG 201.

Mẫu nước được phân tích trực tiếp trên thiết bị CV-AAS.

2.5.4. Tối ưu điều kiện phân tích dạng HPLC-ICP-MS

Các điều kiện tối ưu được lựa chọn để phân tích dạng đồng thời đa nguyên tố của As và Hg trên hệ thiết bị ghép nối HPLC-ICP-MS. Các thông số quan trọng nhất của phép đo ICP-MS là tốc độ sol khí, công suất plasma và thế thấu kính bằng phương pháp phân tích mẫu trực tiếp. Hệ thống thiết bị được đặt tại phòng thí nghiệm Hóa phân tích - Viện Hoá học đã được chuẩn hóa và khảo sát tối ưu nhằm đảm bảo thông số cũng như độ nhạy, độ chọn lọc tối ưu cho thiết bị.

Sự lựa chọn cột phân tách, pha động và tốc độ dòng, pH cùng với chương trình chạy sẽ ảnh hưởng tới hiệu suất tách của các chất. Các thông số sẽ ảnh hưởng tới hiệu suất tách, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

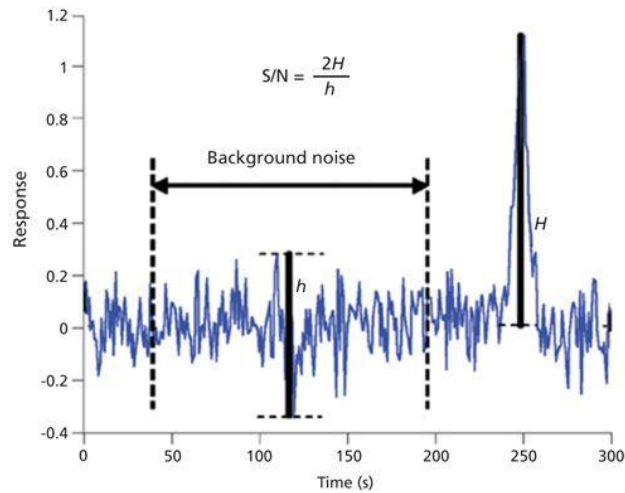
2.5.5. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

2.5.5.1. Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn các dạng As được xây dựng tại 5 điểm nồng độ lần lượt 1, 5, 10, 20, 45 $\mu\text{g/L}$ dựa vào cân hút và pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc. Với dạng thủy ngân tiến hành xây dựng 5 điểm nồng độ chuẩn lần lượt ứng với 1, 5, 10, 20, 45 $\mu\text{g/L}$. Tiến hành ổn định hệ thống tiêm dây chuẩn lần lượt vào hệ thống thông qua bộ tiêm tự động của HPLC-ICP-MS.

2.5.5.2. Xác định giới hạn phát hiện thiết bị (IDL) và giới hạn định lượng thiết bị (IQL)

Giới hạn phát hiện của thiết bị là nồng độ chất phân tích tối thiểu cho tín hiệu có thể phân biệt được với nhiễu nền của thiết bị. Giới hạn định lượng của thiết bị là nồng độ tối thiểu đáp ứng yêu cầu về độ chính xác.



$$S/N = \frac{2H}{h}$$

$$IDL = 3 \times S/N$$

$$IQL = 10 \times S/N$$

Trong đó:

- H: Chiều cao tín hiệu của chất phân tích
- h: Nhiều đường nền
- IDL: Giới hạn phát hiện thiết bị là nồng độ mà tại đó tín hiệu gấp 3 lần nhiễu đường nền.
- IQL: Giới hạn định lượng thiết bị là nồng độ tối thiểu của một chất có thể định lượng và cho kết quả có độ chụm, cũng là nồng độ mà tại đó tín hiệu gấp 10 lần tỉ lệ tín hiệu/nhiều đường nền.

2.5.5.3. Xác định độ chính xác

Theo tiêu chuẩn quốc tế ISO 5725 1-6:1994 và tiêu chuẩn quốc gia (TCVN 6910 1-6:2005) thì độ đúng chỉ mức độ gần nhau giữa giá trị trung bình tái lập của kết quả thử nghiệm. Độ chụm chỉ mức độ dao động của các kết quả thử nghiệm độc lập.

Xác định bằng cách bố trí thí nghiệm tiến hành thêm chất chuẩn ở ba nồng độ lặp lại và tính độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn (RSD%) bằng công thức:

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

$$RSD\% = CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Trong đó:

- SD: Độ lệch chuẩn
- n: số lần thí nghiệm
- x_i : Giá trị của lần thử nghiệm thứ “i”
- \bar{x} : Giá trị trung bình của các lần thử nghiệm
- RSD%: Độ lệch chuẩn tương đối
- CV%: Hệ số biến thiên

2.5.5.4. Xác định độ thu hồi

Đánh giá hiệu suất thu hồi dựa vào việc thêm chuẩn vào mẫu thử, thêm chuẩn vào nền mẫu trắng. Hiệu suất thu hồi được đánh giá trên công thức như sau:

Trong đó:

- H%: Hiệu suất thu hồi
- $C_{(\text{mẫu} + \text{thêm chuẩn})}$: Nồng độ mẫu được thêm lượng chuẩn xác định
- $C_{\text{mẫu}}$: Nồng độ mẫu
- $C_{\text{thêm chuẩn}}$: Nồng độ thêm chuẩn

$$H\% = \frac{C_{(\text{mẫu} + \text{thêm chuẩn})} - C_{\text{mẫu}}}{C_{\text{thêm chuẩn}}} \times 100$$

Phương pháp xác định độ thu hồi thực hiện thêm chuẩn ở 3 nồng độ khác nhau và tiến hành phân tích lặp lại 4 lần.

Bảng 2.2. Độ thu hồi được chấp nhận theo AOAC.

Hàm lượng (%)	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001	0,0000001
Đơn vị	100 ppm	10 ppm	1 ppm	100 ppb	10 ppb	1 ppb
Độ thu hồi (%)	90 – 107	80 – 110	80 – 110	80 – 110	60 – 115	40 – 120

2.5.6. Chuẩn bị mẫu phân tích dạng As, Hg

Mẫu nước tiêu tiến hành cân và pha loãng bằng dung môi pha động A và lọc qua màng lọc 0,45 μm , chuyển vào vial nhựa rồi tiến hành phân tích đồng thời 4 dạng As và 2 dạng Hg trên hệ thiết bị ghép nối HPLC-ICP-MS.

Mẫu nước môi trường tiến hành lọc qua màng lọc 0,45 μm , chuyển vào vial nhựa và tiến hành phân tích đồng thời 4 dạng As và 2 dạng Hg trên hệ thiết bị ghép nối HPLC-ICP-MS.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu điều kiện phân tích dạng đa nguyên tố của As, Hg bằng phương pháp HPLC-ICP-MS

3.1.1. Tối ưu điều kiện HPLC tách As, Hg

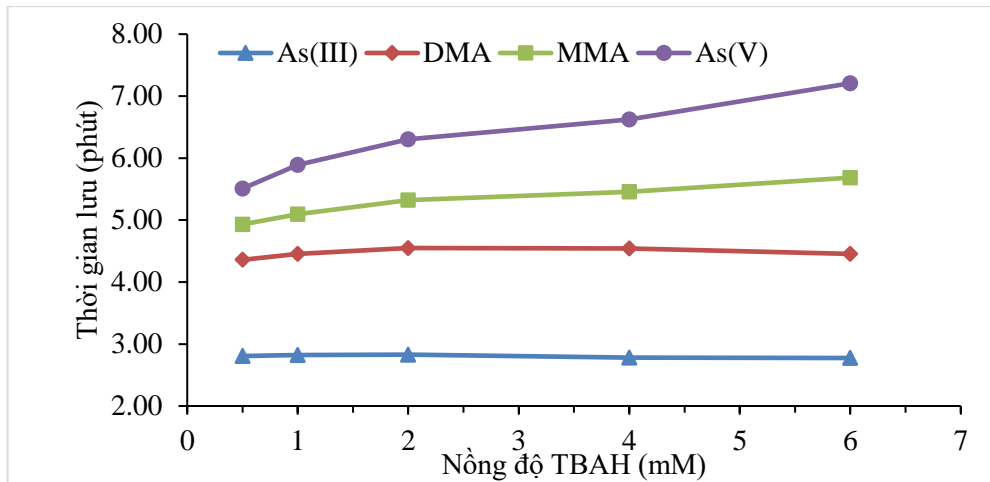
Hầu hết các phương pháp phân tích dạng đơn nguyên tố của As, Hg sử dụng hệ ghép nối HPLC-ICP-MS đều sử dụng kỹ thuật sắc ký pha đảo ghép cặp ion (ion-pairing reverse phase chromatography – RPC) [63, 64, 66, 67]. Các anion của các dạng As trong pha động sẽ tạo cặp ion với các muối hay base của alkyl ammonium như Tetrabutylammonium hydroxide (TBAH) và hexadecyl trimethyl ammonium bromide có ái lực mạnh với các nhóm C₁₈ trên pha tĩnh và được tách khỏi cột. Các dạng vô cơ và hữu cơ của Hg có thể tồn tại ở dạng cation nhưng dễ tạo phức với các hợp chất thiol như L-cysteine (Cys) hay 2-mercaptoethanol (ME) trong pha động; Cys phản ứng với các dạng Hg tạo phức Hg(Cys)₂²⁻ và MeHg(Cys)⁻. Sau đó, các anion phức này được tách trên cột sắc ký pha đảo ghép cặp ion.

Sự kết hợp của hai chất tạo cặp ion TBAH và Sodium 1-butanefulfonate (SBS) được ứng dụng để tách các dạng anion của As. Chính vì vậy, hai pha động A và B trong đó: pha động A bao gồm TBAH và SBS; và pha động B bao gồm TBAH, SBS và Cys được lựa chọn để tách đồng thời 4 dạng As và 2 dạng Hg với chương trình rửa giải gradient. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách các dạng bao gồm thành phần pha động, tác nhân tạo phức, thành phần chất cải biến hữu cơ và pH của pha động được khảo sát và lựa chọn điều kiện tối ưu.

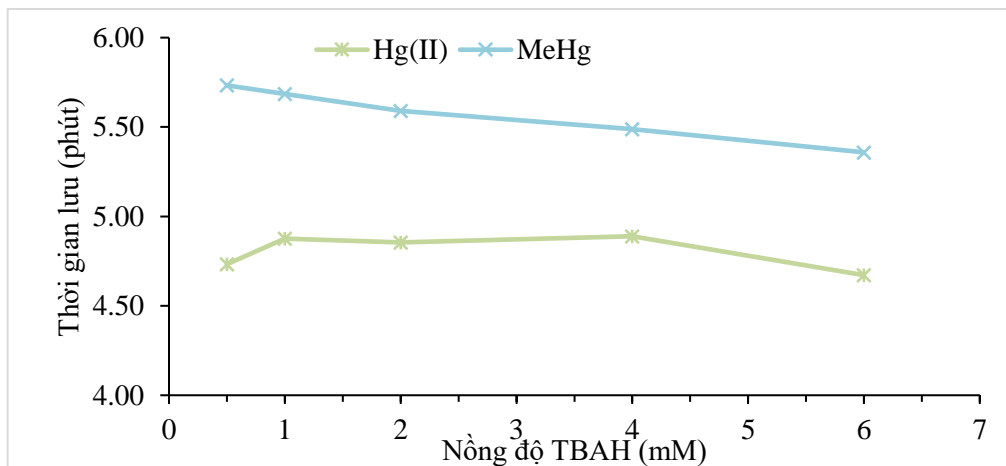
3.1.1.1. Khảo sát thành phần pha động

a. Khảo sát thành phần TBAH

Thành phần pha động TBAH được khảo sát trong khoảng nồng độ 0,5 – 6 mM với các điều kiện khác không đổi: Cys 15 mM; SBS 2 mM; pH = 6; tốc độ pha động 1 ml/phút; thể tích tiêm 50 µL; methanol 2%.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ TBAH tới thời gian lưu của 4 dạng As.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ TBAH tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.

Ảnh hưởng của nồng độ TBAH đối với các dạng As được biểu thị ở Hình 3.1. Sự gia tăng nồng độ TBAH giúp khả năng lưu giữ MMA và As(V) tốt hơn. Hai dạng As(III) và DMA thời gian lưu không thay đổi đáng kể khi tăng nồng độ TBAH trong pha động. Ngược lại, với dạng Hg, khi nồng độ TBAH tăng dẫn đến sự giảm nhẹ thời gian lưu của dạng Hg(II) và MeHg (Xem Hình 3.2).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ TBAH tới thời gian lưu của 4 dạng As.

Nồng độ TBAH (mM)	Thời gian lưu (phút)			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
0,5	2,81	4,36	4,93	5,51
1,0	2,82	4,45	5,09	5,89
2,0	2,83	4,55	5,32	6,30
4,0	2,78	4,54	5,45	6,62
6,0	2,77	4,45	5,68	7,21

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ TBAH tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.

Nồng độ TBAH (mM)	Thời gian lưu (phút)	
	Hg(II)	MeHg
0,5	4,73	5,73
1,0	4,88	5,68
2,0	4,86	5,59
4,0	4,89	5,49
6,0	4,67	5,36

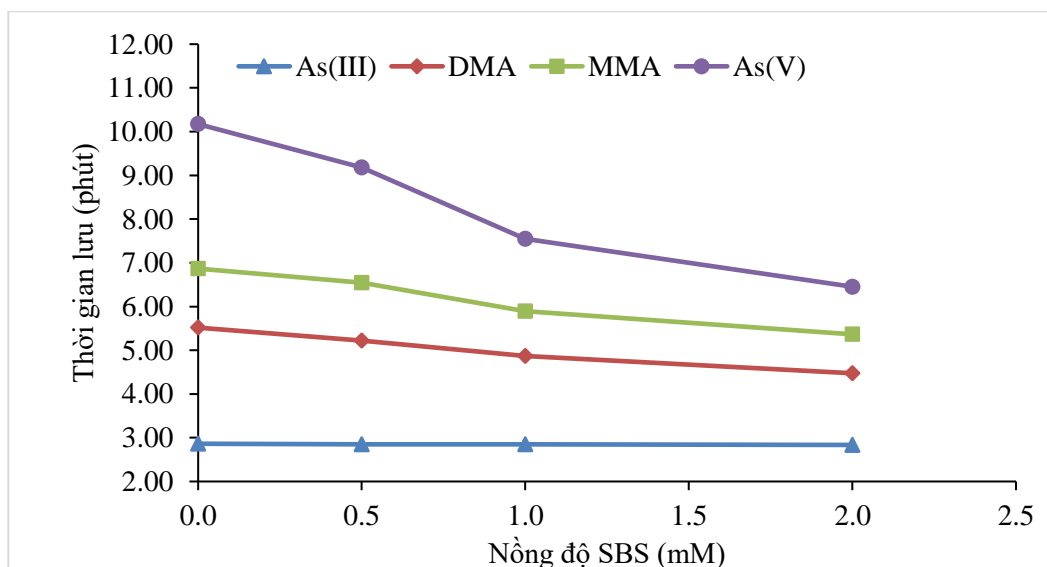
TBAH mang điện tích dương khi càng tăng nồng độ TBAH đồng nghĩa tăng mật độ điện tích dương nhằm lưu giữ quá trình rửa giải các anion As (DMA, MMA, As(V)) trên pha tĩnh. Riêng As(III) mang tính trung tính nên không ảnh hưởng bởi nồng độ TBAH [59].

Nồng độ TBAH tăng dần khiến thời gian lưu Hg(II) và MeHg giảm nhẹ. Các phức Cys-Hg bị các cation TBAH đẩy ra theo phương pháp tĩnh điện tạo ra hiệu ứng giảm dần thời gian lưu [59].

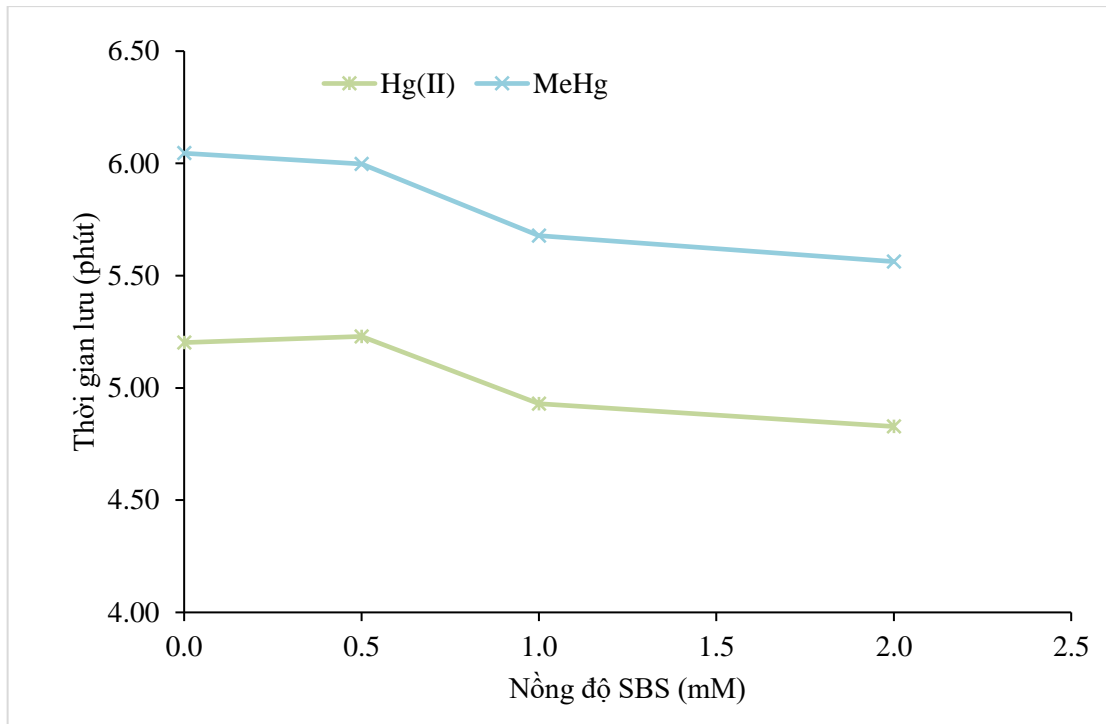
Để đạt được đồng thời hai yếu tố là sự phân giải tốt giữa các peak và thời gian sắc ký nhanh, nồng độ 2 mM được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

b. Khảo sát thành phần Sodium 1-butanefulfonate (SBS)

Ảnh hưởng của nồng độ chất tạo cặp Sodium 1-butanefulfonate (SBS) tới quá trình tách đồng thời các dạng As và Hg cũng được khảo sát và tối ưu trong khoảng nồng độ 0; 0,5; 1 và 2 mM.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ SBS tới thời gian lưu của 4 dạng As.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ SBS tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.

Kết quả ở Hình 3.3 và Hình 3.4 cho thấy khi tăng dần nồng độ SBS thì thời gian lưu của các dạng As(V), DMA, MMA giảm dần. Với dạng As(III) thời gian lưu gần như không thay đổi theo sự biến đổi của nồng độ SBS. Xu hướng giảm tương tự cũng được quan sát thấy ở thời gian lưu của các dạng Hg.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ SBS tới thời gian lưu của 4 dạng As.

Nồng độ SBS (mM)	Thời gian lưu (phút)			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
0,0	2,86	5,52	6,87	10,17
0,5	2,85	5,22	6,55	9,18
1,0	2,85	4,87	5,90	7,55
2,0	2,84	4,47	5,37	6,45

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ SBS tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.

Nồng độ SBS (mM)	Thời gian lưu (phút)	
	Hg(II)	MeHg
0,0	5,20	6,05
0,5	5,23	6,00
1,0	4,93	5,68
2,0	4,83	5,56

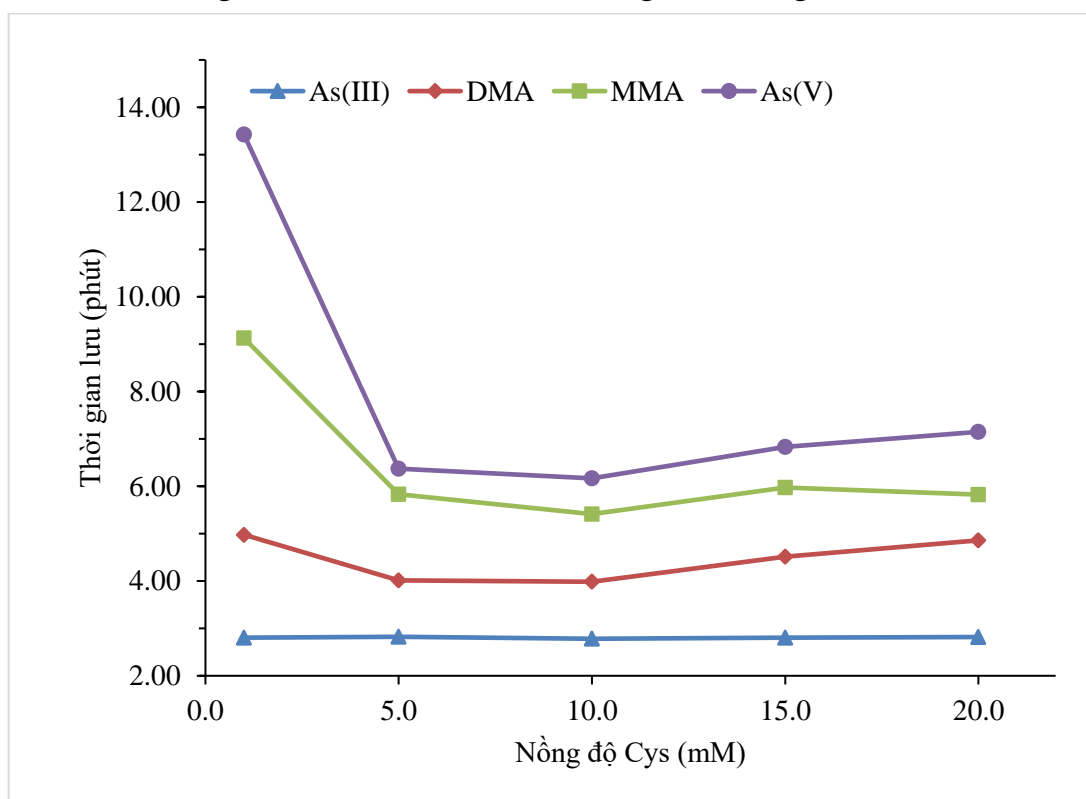
SBS mang điện tích âm khi càng tăng nồng độ SBS đồng nghĩa tăng mật độ điện tích âm nhằm đẩy nhanh quá trình rửa giải các anion As (DMA, MMA, As(V)) trên pha tĩnh. Riêng As(III) mang tính trung tính nên không ảnh hưởng bởi nồng độ SBS [59].

Nồng độ SBS từ 0 – 0,5mM thời gian lưu Hg(II) và MeHg không suy giảm thời gian lưu. Nồng độ SBS 1-2 mM có giảm nhẹ thời gian lưu.

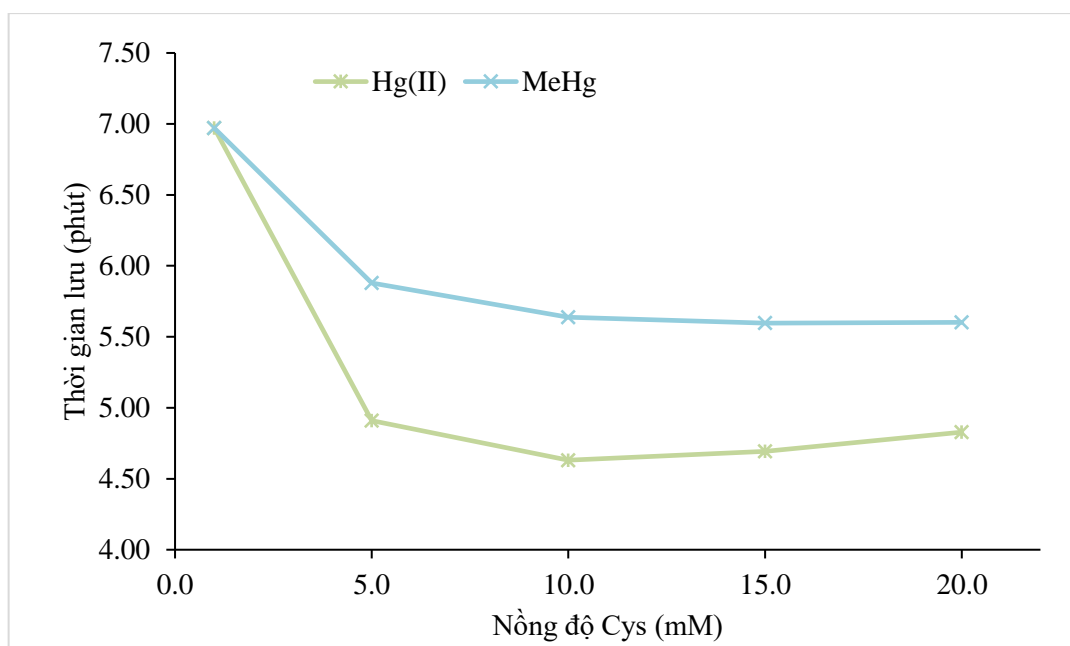
Nồng độ SBS 1 mM được lựa chọn vì thỏa mãn được cả yếu tố độ phân giải của peak sắc ký và giảm thời gian phân tích.

c. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ L-Cysteine (Cys)

L-Cysteine (Cys) được thêm vào pha động B làm tác nhân tạo phức. Khi đó các cation Hg(II) và MeHg⁺ được chuyển thành anion phức Hg(Cys)₂²⁻ và MeHg(Cys)⁻. Do đó, nồng độ Cys sẽ ảnh hưởng tới quá trình tách các dạng As, Hg. Ảnh hưởng của nồng độ Cys tới quá trình tách đồng thời các dạng As và Hg được khảo sát và tối ưu trong khoảng từ 1 đến 20 mM. Kết quả khảo sát được đưa ra trong Hình 3.5, Hình 3.6 và Bảng 3.5, Bảng 3.6.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của nồng độ Cys tới thời gian lưu của 4 dạng As.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ Cys tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.

Như trên Hình 3.5, ban đầu thời gian lưu của các dạng As giảm nhanh cho tới khi nồng độ Cys tăng tới 5 mM thì thời gian lưu của các dạng As có xu hướng giảm với sự tăng nồng độ Cys trong pha động B và ổn định trong khoảng nồng độ 15 – 20 mM. Trong khoảng nồng độ này, độ phân giải của các peak sắc ký của các dạng As tốt hơn so với trong khoảng nồng độ 5 – 10 mM. Đường nền tách 4 dạng As đạt được khi nồng độ Cys lớn hơn 5 mM.

Hình 3.6 cho thấy ở nồng độ Cys là 1 mM, hai dạng Hg và MeHg được rửa giải cùng lúc. Khi nồng độ Cys tăng, thời gian lưu của hai dạng trên có xu hướng giảm và ổn định ở khoảng nồng độ Cys 15 – 20 mM.

Khi pH=6,0 Cys mang điện tích âm. Nồng độ Cys càng tăng khiến mật độ điện tích âm cạnh tranh điện tích dương từ TBAH nhằm đẩy nhanh quá trình rửa giải các anion As (DMA, MMA, As(V)) trên pha tĩnh. Riêng As(III) mang tính trung tính nên không ảnh hưởng bởi nồng độ Cys [59].

Nồng độ Cys càng lớn khiến thời gian lưu của Hg(II) và MeHg càng giảm. Nồng độ Cys được lựa chọn là 15 mM.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của nồng độ Cys tới thời gian lưu của 4 dạng As.

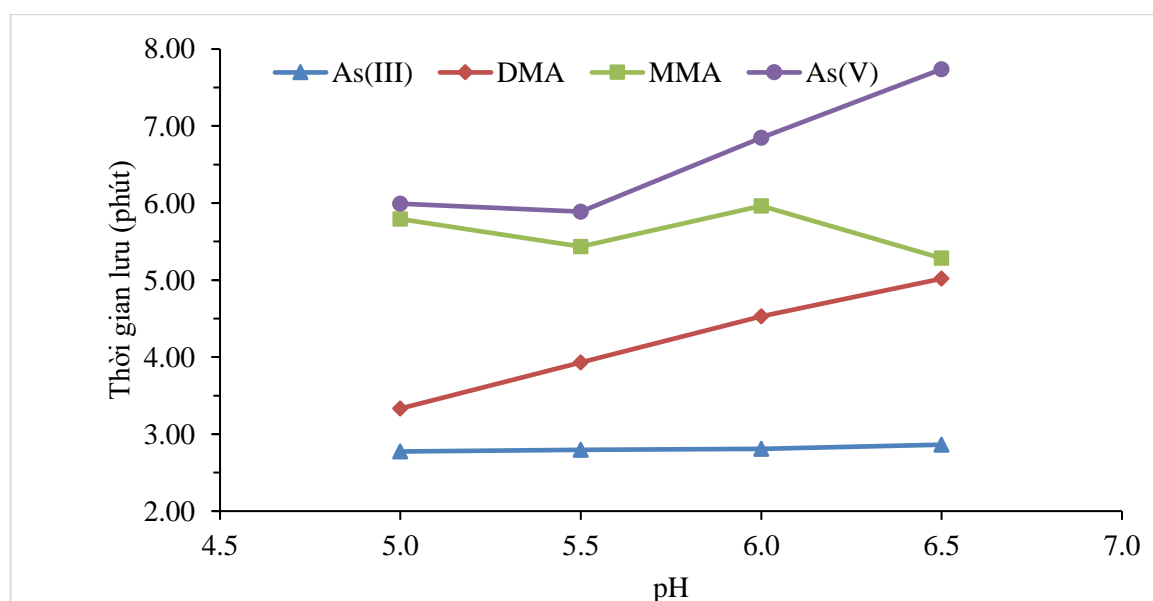
Nồng độ Cys (mM)	Thời gian lưu (phút)			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
1	2,80	4,98	9,13	13,42
5	2,82	4,01	5,83	6,37
10	2,78	3,98	5,41	6,17
15	2,80	4,52	5,97	6,83
20	2,82	4,86	5,83	7,15

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ Cys tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.

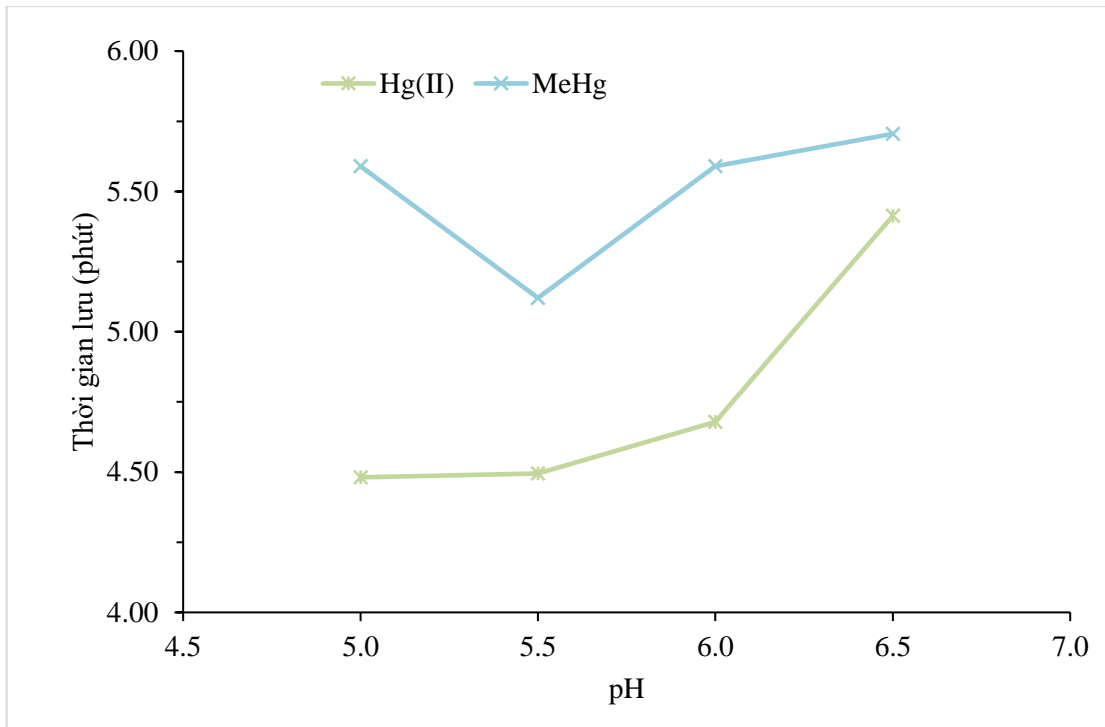
Nồng độ Cys (mM)	Thời gian lưu (phút)	
	Hg(II)	MeHg
1	6,97	6,97
5	4,91	5,88
10	4,63	5,64
15	4,69	5,60
20	4,83	5,60

d. Khảo sát ảnh hưởng của pH

pH là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân tách và thời gian lưu của các dạng As và Hg do các dạng có hằng số pK_a khác nhau. Khoảng pH được khảo sát là 5,0 đến 6,5 và kết quả được thể hiện trong các hình sau.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của pH tới thời gian lưu của 4 dạng As.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của pH tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.

Các kết quả trên cho thấy, dạng Hg(II) và MeHg đều có độ phân giải tốt ở khoảng pH khảo sát. Tuy nhiên, với 4 dạng As, pH=6,0 cho độ phân giải giữa các peak sắc ký tốt nhất.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của pH tới thời gian lưu của 4 dạng As.

pH	Thời gian lưu (phút)			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
5,0	2,77	3,33	5,79	5,99
5,5	2,79	3,93	5,44	5,89
6,0	2,81	4,53	5,96	6,85
6,5	2,86	5,02	5,28	7,74

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của pH tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.

pH	Thời gian lưu (phút)	
	Hg(II)	MeHg
5,0	4,48	5,59
5,5	4,49	5,12
6,0	4,68	5,59
6,5	5,41	5,71

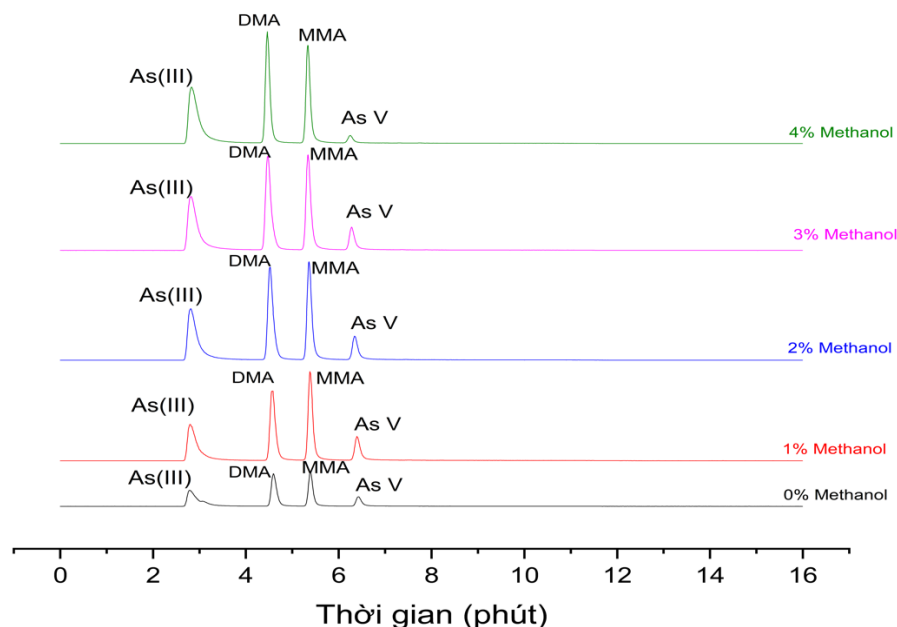
Trong điều kiện trung tính As(V), MMA, DMA bị khử proton tạo thành các anion trong khi As(III) tồn tại dưới dạng trung tính.

As(V) là chất rửa giải chậm nhất do tính chất pK_{a1} (2,19) và pK_{a2} (6,98). As(III) có ít khả năng lưu giữ lại do nó tồn tại ở dạng trung tính do giá trị pK_a cao (9,23). Khi pH càng tăng thì gian lưu càng kéo dài với dạng DMA, MMA, As(V), trong khi As(III) không thay đổi do tính chất tồn tại ở dạng trung tính [59].

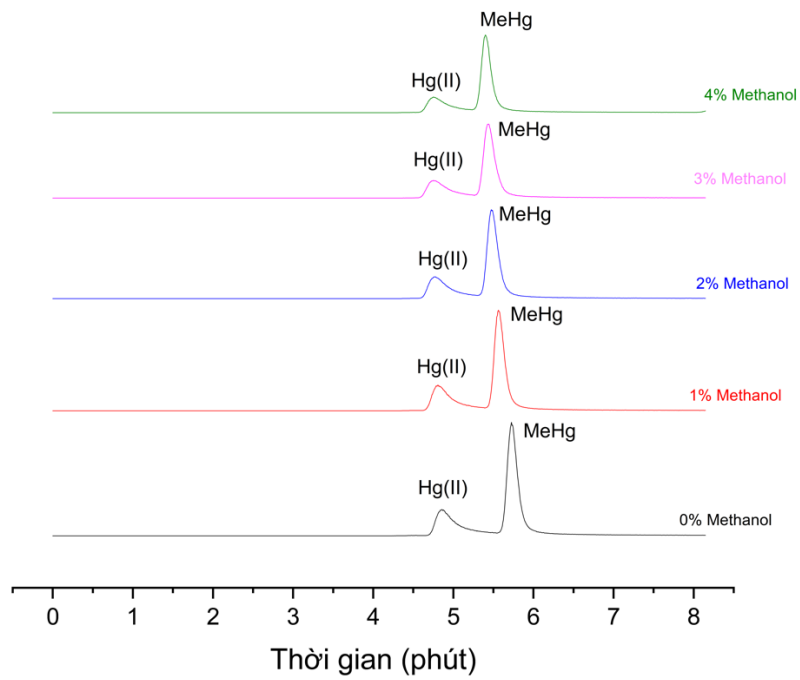
Hg(II) và MeHg có xu hướng tăng nhẹ thời gian lưu nhưng không đáng kể. Do đó, pH=6,0 được lựa chọn là điều kiện tối ưu để phân tích dạng đồng thời hai nguyên tố của As và Hg.

e. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi Methanol

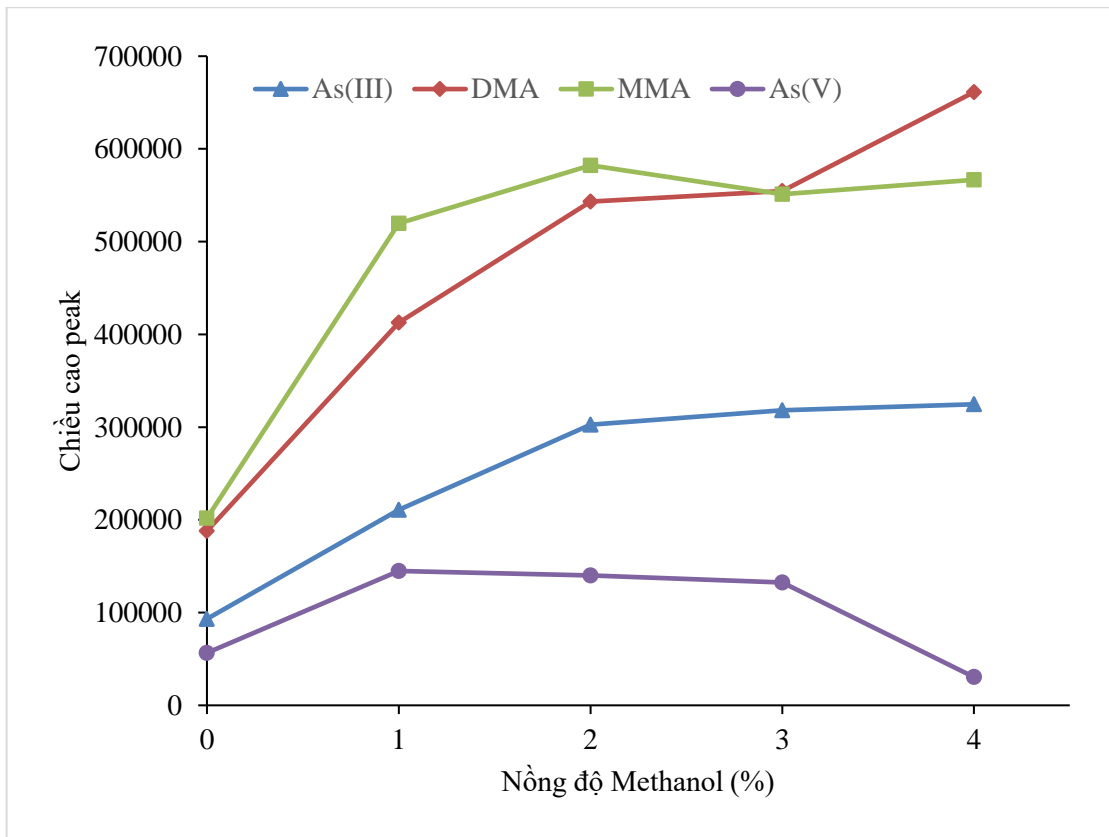
Methanol là một dung môi hữu cơ thường được thêm vào pha động để làm tăng cường độ tín hiệu của ion phân tích. Tuy nhiên, thành phần hữu cơ với nồng độ cao bị chuyển thành cặn carbon đen dưới nhiệt độ của plasma và tích lại trên đường ống dẫn mẫu của plasma torch và trên, xung quanh lỗ của côn mẫu và côn skimmer, dẫn đến sự bám bẩn và giảm hiệu suất của thiết bị. Thông thường, thành phần methanol được thêm vào tối đa là 5%.



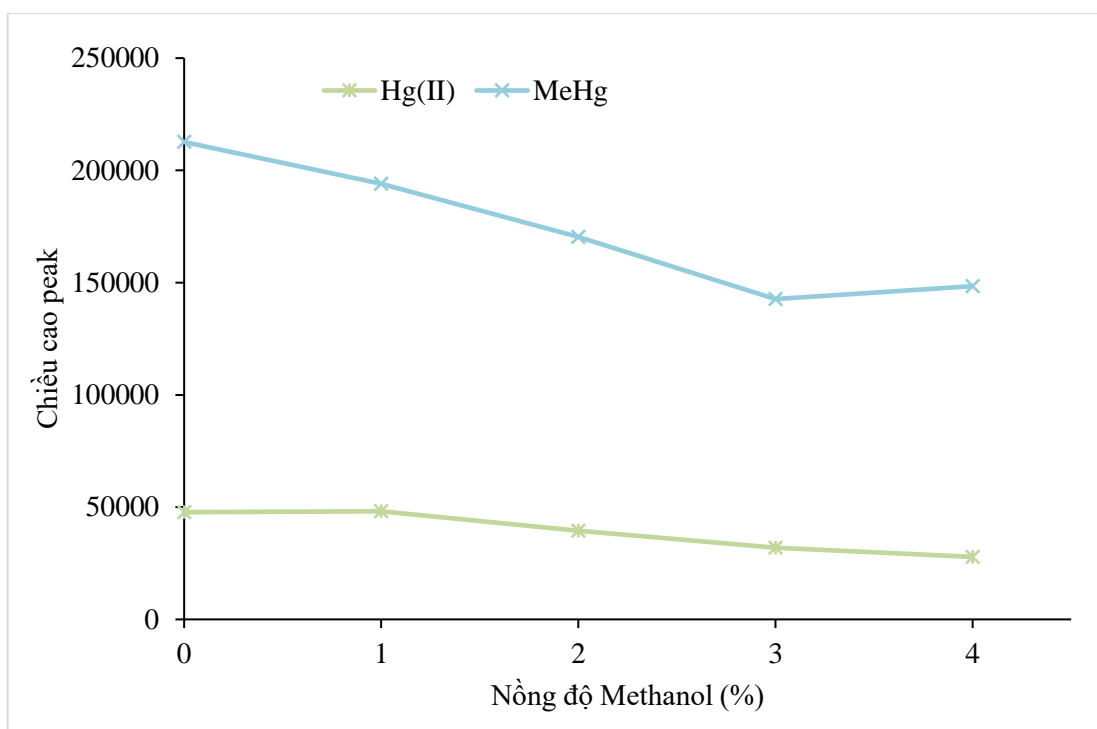
Hình 3.9. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới thời gian lưu của 4 dạng As.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới thời gian lưu của 2 dạng Hg.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới chiều cao peak của 4 dạng As.



Hình 3.12. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới chiều cao peak của 2 dạng Hg.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới chiều cao peak của 4 dạng As.

Nồng độ Methanol (%)	Chiều cao peak			
	As(III)	DMA	MMA	As(V)
0	93188	188035	201820	56632
1	210942	412717	519845	144870
2	302734	543116	582327	140139
3	318250	554496	551285	132472
4	324647	661227	566801	30518

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ methanol tới chiều cao peak của 2 dạng Hg.

Nồng độ Methanol (%)	Chiều cao	
	Hg(II)	MeHg
0	47710	212646
1	48141	194034
2	39540	170319
3	31921	142690
4	27336	148426

Hình 3.11 và Hình 3.12 cho thấy khi tăng nồng độ methanol thì tín hiệu của các dạng As tăng lên rõ rệt. Chiều cao peak của các dạng As ở các nồng độ

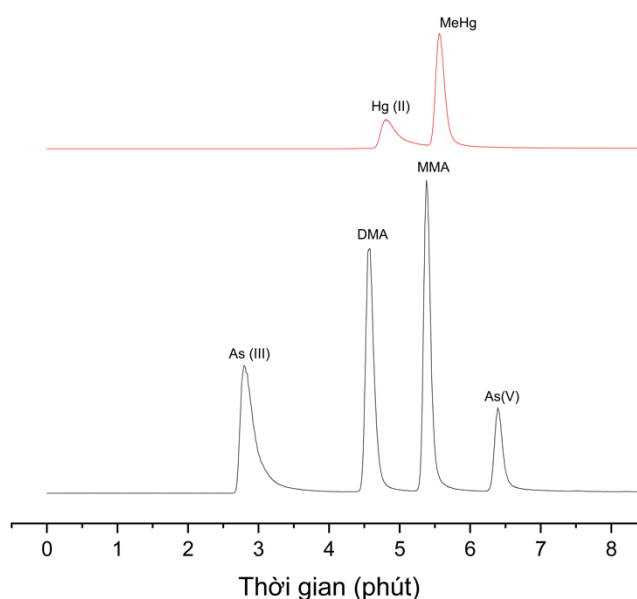
methanol từ 1 đến 4% đều tăng lên gấp 2 đến 3 lần so với khi không có methanol trong pha động (xem Hình 3.12). Ngược lại, các dạng Hg(II) và MeHg có xu hướng doãng rộng chân peak khi nồng độ methanol tăng (xem Hình 3.11). Nồng độ methanol 2% được lựa chọn là điều kiện tối ưu để đảm bảo được độ nhạy của cả các dạng As và Hg. Bảng 3.11 tổng hợp các điều kiện tối ưu để phân tích đồng thời dạng hai nguyên tố của As và Hg trên hệ thiết bị HPLC-ICP-MS.

Bảng 3.11. Thông số vận hành hệ thống ghép nối HPLC-ICP-MS áp dụng phân tích dạng As, Hg.

Điều kiện	Thông số
Hệ thống ICP-MS	
Công suất cao tần RF	1600 W
Lưu lượng khí Plasma	15 L/phút
Lưu lượng khí phụ trợ	1,2 L/phút
Lưu lượng khí phụ trợ tạo sol	1 L/phút
Nebulizer	Glass concentric
Buồng phun sương	Glass cyclonic
Sample cone	Platinum sample cone
Skimmer cone	Platinum hyper skimmer cone
Chế độ đo DRC	- Phản ứng động học với khí Oxy 0,7 mL/phút (DRC)
Monitored ion	$^{91}\text{AsO}^+$, $^{202}\text{Hg}^+$
Chế độ đo phổ	Peak hopping
Dwell time	200 ms
Rpq	0,6
Phương pháp định lượng	Phương pháp ngoại chuẩn
Hệ thống HPLC	
Cột phân tích	Shiseido Capcell PAK, MG, C18 column (5 μm 4.6*250mm)
Pha động	A: 2 mM TBAH; 1 mM SBS; pH 6,0; 2% methanol (v/v) B: 2mM TBAH; 1 mM SBS; 15 mM Cys; pH 6,0; 2% Methanol (v/v)
Chương trình gradient	0-1 phút: 100% A 1,1-8 phút: 100% B 8,1-16 phút: 100% A
Tốc độ pha động	1 mL/phút
Thể tích tiêm	50 μL

3.1.2. Xác định thời gian lưu của từng dạng As, Hg

Xác định thời gian lưu của 4 dạng As As(III), As(V), DMA, MMA và hai dạng Hg gồm: Hg(II), MeHg với điều kiện pha động (2 mM TBAH; 15 mM L-Cystein; 1 mM Sodium 1-butanesulfonate; pH = 6, 2% Methanol). Cột C18, tốc độ 1mL/phút; thể tích tiêm 50 μ l cho thấy với dạng As(III) được rửa giải đầu tiên ở phút 2,76 phút, tiếp tới thứ hai là DMA ở phút 4,63, MMA ở 5,47 phút và cuối cùng là As (V) ở 6,59 phút. Đối với dạng Hg cho thấy Hg(II) rửa giải ở phút 4,69 và MeHg rửa giải ở phút thứ 5,58.

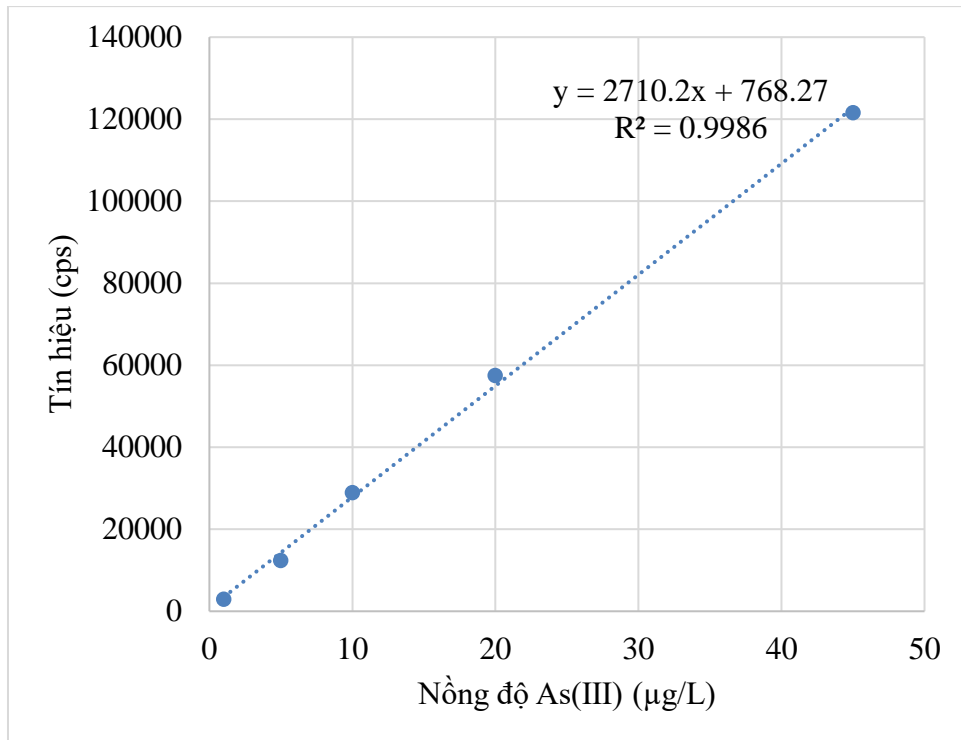


Hình 3.13. Sắc đồ xác định thời gian lưu của 4 dạng As và 2 dạng Hg.

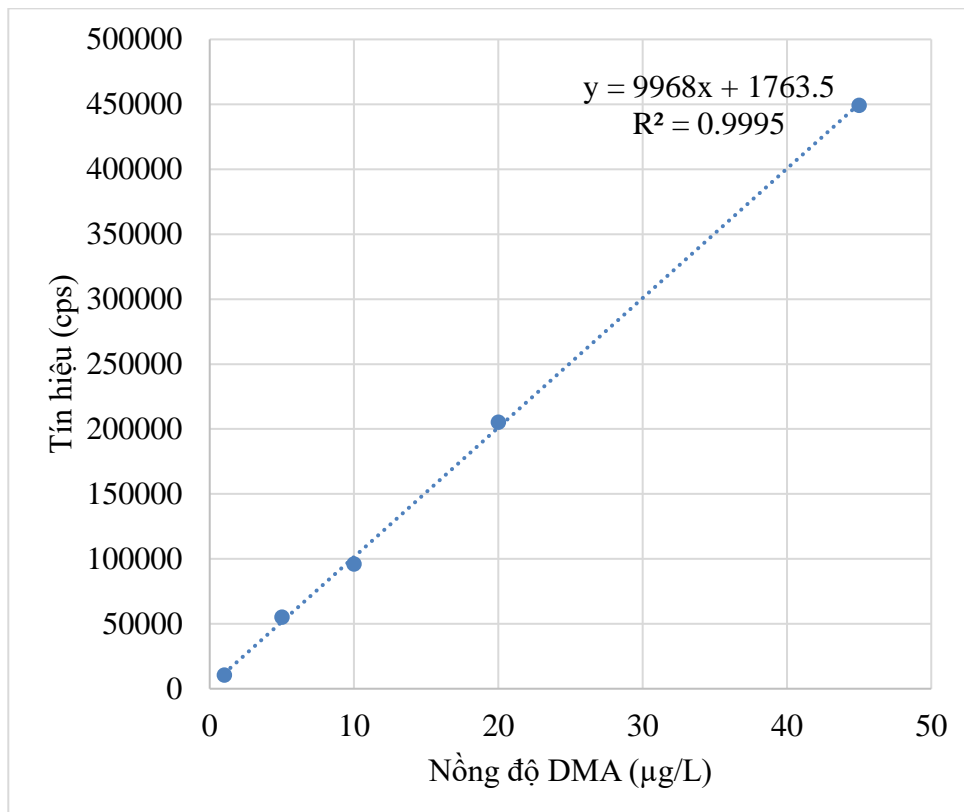
3.2. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích dạng As, Hg

3.2.1. Xây dựng đường chuẩn

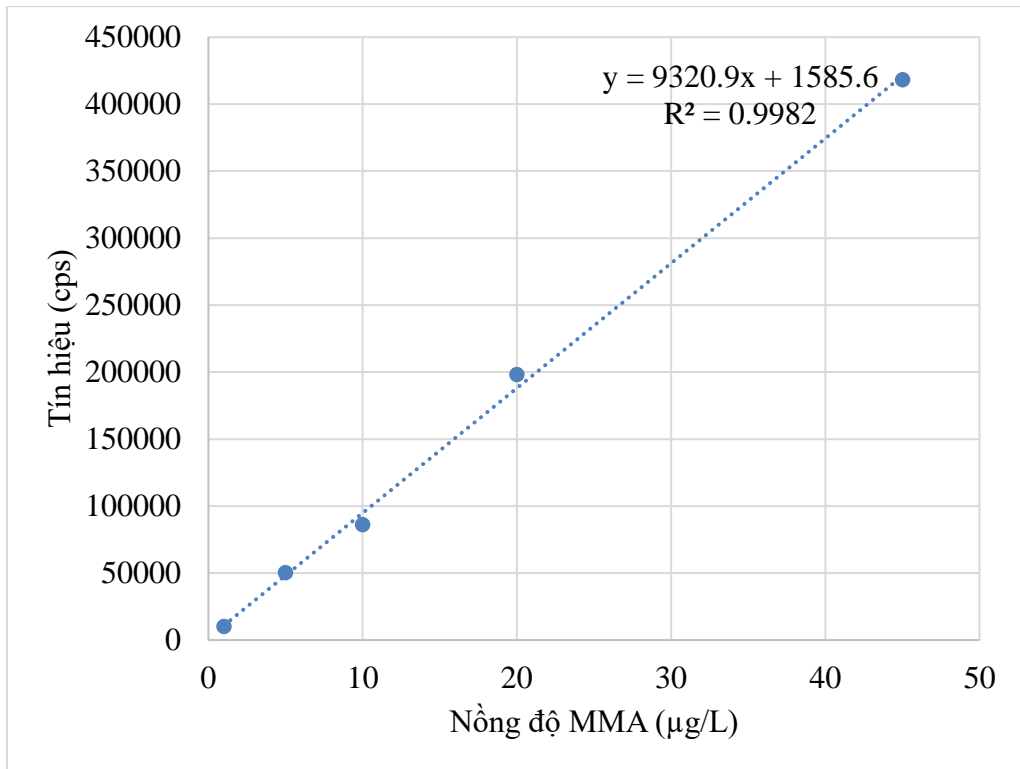
Đường chuẩn của các dạng As và Hg được xây dựng bởi 5 điểm với nồng độ từ 1 – 45 μ g/L. Với điều kiện thông số kỹ thuật tối ưu thiết bị tiến hành đo dãy chuẩn và tính toán thu được kết quả đường chuẩn các dạng As và Hg dưới các hình và bảng sau:



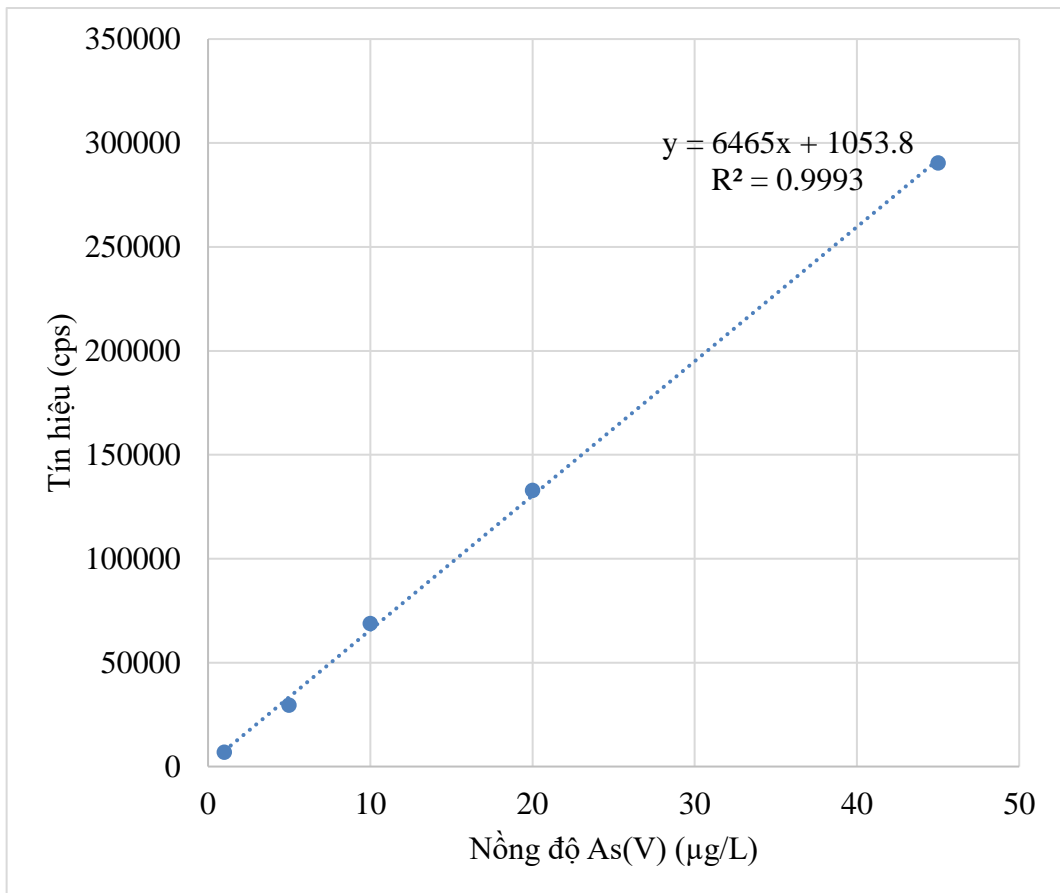
Hình 3.14. Đường chuẩn phân tích dạng As(III).



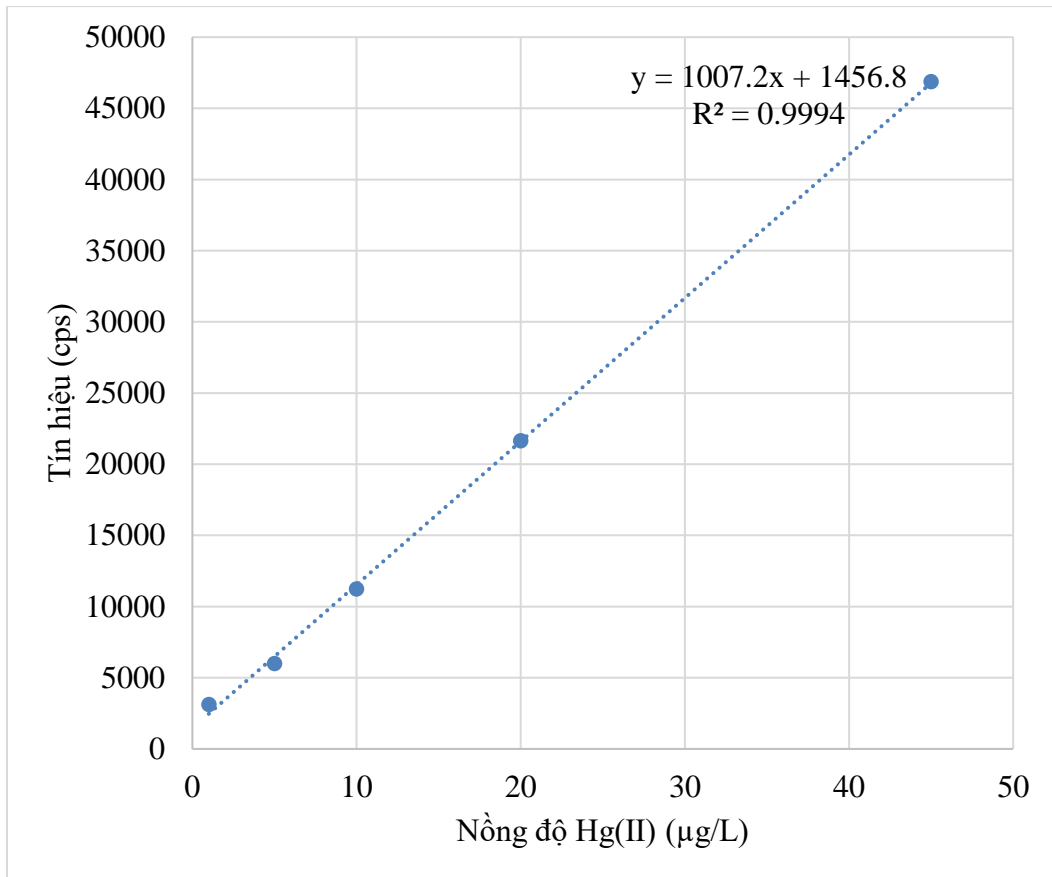
Hình 3.15. Đường chuẩn phân tích dạng DMA.



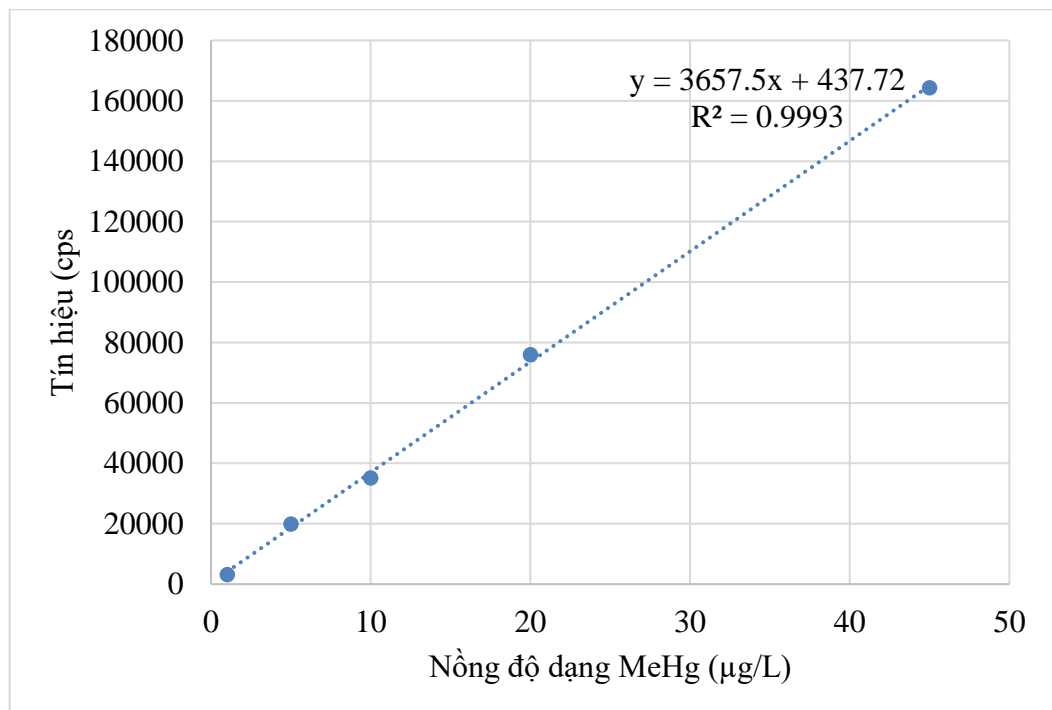
Hình 3.16. Đường chuẩn phân tích dạng MMA.



Hình 3.17. Đường chuẩn phân tích dạng As(V).



Hình 3.18. Đường chuẩn phân tích dạng Hg(II).



Hình 3.19. Đường chuẩn phân tích dạng MeHg.

Bảng 3.12. Phương trình đường chuẩn phân tích các dạng As, Hg.

STT	Dạng chất	Phương trình	Hệ số R ²
1	As(III)	$y = 2710,2x + 768,27$	0,9986
2	DMA	$y = 9968x + 1763,5$	0,9995
3	MMA	$y = 9320,9x + 1585,6$	0,9982
4	As(V)	$y = 6465x + 1053,8$	0,9993
5	Hg(II)	$y = 1007,2x + 1456,8$	0,9994
6	MeHg	$y = 3657,5x + 437,72$	0,9993

Đường chuẩn của 4 dạng As và 2 dạng Hg có hệ số $R^2 \geq 0,99$ chứng tỏ có sự tuyến tính tốt giữa cường độ tín hiệu và nồng độ.

3.2.2. Giới hạn phát hiện thiết bị (IDL), giới hạn định lượng thiết bị (IQL)

Giá trị giới hạn phát hiện của thiết bị (IDL) và giới hạn định lượng của thiết bị (IQL) rất quan trọng trong phân tích. Việc xác định IDL và IQL dựa vào phân tích khảo sát chiều cao peak nồng độ chất có hàm lượng nhỏ so với chiều cao nhiều nên thỏa mãn điều kiện $S/N \geq 3$ phù hợp với IDL và $S/N \geq 10$ phù hợp với IQL. Tiến hành xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của thiết bị bằng cách dựa vào chiều cao tín hiệu thu được và tín hiệu nhiễu nền.

Bảng 3.13. Giới hạn phát hiện (IDL) và giới hạn định lượng (IQL) của thiết bị HPLC-ICP-MS.

Dạng chất	IDL ($\mu\text{g/L}$)	IQL ($\mu\text{g/L}$)
As(III)	0,389	0,934
DMA	0,258	0,621
MMA	0,263	0,631

As(V)	0,390	0,936
Hg(II)	0,385	0,924
MeHg	0,374	0,898

Bảng 3.14. Giới hạn định lượng (IQL) của phương pháp phân tích Hg tổng số bằng thiết bị CV-AAS.

	IQL ($\mu\text{g/L}$)
Hg (Niệu)	0,50
Hg (Nước)	0,04

Bảng 3.13 cho thấy phương pháp phân tích các dạng As và Hg có giới hạn định lượng (IQL) rất thấp trong khoảng 0,621 – 0,936 $\mu\text{g/L}$. Điều đó cho thấy phương pháp và thiết bị có độ nhạy cao, phù hợp để phân tích hàm lượng các dạng As và Hg trong các mẫu sinh hóa và môi trường.

3.2.3. Độ chính xác của phương pháp

3.2.3.1. Độ chính xác của phương pháp với nền mẫu niệu

Độ chính xác của phương pháp phân tích dạng đa nguyên tố của As và Hg trên nền mẫu niệu được đánh giá thông qua các thông số gồm độ lặp lại và độ đúng.

Độ lặp lại được xác định bằng cách phân tích lặp mẫu niệu thêm chuẩn 7 lần và tính toán giá trị độ lệch chuẩn (RSD%).

Do không có mẫu chuẩn chứng nhận CRM phù hợp nên độ đúng được đánh giá qua độ thu hồi trên mẫu thực thêm chuẩn ở 3 khoảng nồng độ 5, 10 và 25 $\mu\text{g/L}$. Các mẫu được phân tích lặp 4 lần và tính toán độ thu hồi (%). Kết quả được đưa ra trong bảng sau.

Kết quả trong Bảng 3.15 cho thấy phương pháp xây dựng được có độ lặp lại tốt với giá trị RSD% của 4 dạng As và 2 dạng Hg tương ứng là 2,7 – 3,4% và 4,0 – 12,9%, nhỏ hơn giá trị RSD cho phép của AOAC là $\leq 15 - 21\%$ trong khoảng nồng độ 10 – 100 $\mu\text{g/L}$. Mẫu niệu thêm chuẩn ở 3 nồng độ 5, 10 và 25 $\mu\text{g/L}$ có độ thu hồi của 4 dạng As trong khoảng 98,5 – 107,3%. Với dạng Hg(II) và MeHg, độ thu hồi là 96,3 – 105,8%. So sánh với giá trị độ thu hồi cho phép theo AOAC là 60 – 115% ở khoảng nồng độ 10 $\mu\text{g/L}$ và 80 – 110% ở nồng độ

100 µg/L cho thấy phương pháp xây dựng được có độ thu hồi tốt trên nền mẫu niêu.

Bảng 3.15. Độ chính xác của phương pháp phân tích với nền mẫu niêu.

Dạng	Độ lặp lại RSD (%)	Độ thu hồi (%)		
		Nồng độ thêm chuẩn 5 (µg/L)	Nồng độ thêm chuẩn 10 (µg/L)	Nồng độ thêm chuẩn 25 (µg/L)
As(III)	2,7	102,9	107,3	100,3
As(V)	3,1	97,0	102,4	101,4
DMA	3,4	99,3	99,0	98,7
MMA	3,2	98,5	100,4	102,1
Hg(II)	12,9	105,8	104,2	96,3
MeHg	4,0	103,0	99,9	100,0

3.2.3.2. Độ chính xác của phương pháp với nền mẫu nước

Tương tự như nền mẫu niêu, độ chính xác của phương pháp với nền mẫu nước cũng được đánh giá qua độ lặp lại và độ thu hồi trên mẫu thực thêm chuẩn.

Độ lặp lại được xác định bằng cách phân tích lặp mẫu nước thêm chuẩn 7 lần và tính toán giá trị độ lệch chuẩn (RSD%).

Với độ đúng thì tiến hành thêm vào nền mẫu 3 nồng độ chuẩn 5, 10, 25 µg/L và phân tích lặp lại 4 lần. Đánh giá độ đúng dựa vào độ thu hồi của các lần thêm chuẩn vào nền mẫu. Kết quả đánh giá được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.16. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích với nền mẫu nước.

Dạng	Độ lặp lại RSD (%)	Độ thu hồi (%)		
		Nồng độ thêm chuẩn 5 (µg/L)	Nồng độ thêm chuẩn 10 (µg/L)	Nồng độ thêm chuẩn 25 (µg/L)
As(III)	3,4	103,8	106,8	101,9
As(V)	3,4	88,6	95,5	99,9
DMA	3,6	104,9	99,5	101,1
MMA	3,6	97,0	97,8	96,3
Hg(II)	12,8	100,6	105,0	97,1
MeHg	4,2	97,3	101,3	99,8

Kết quả tính toán độ lặp lại của các dạng As và Hg trên nền nước cho thấy độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) trong khoảng 3,4 – 12,8%, nhỏ hơn so với quy định của AOAC về độ lệch chuẩn tương đối (< 15%). Độ lặp lại tốt thể hiện sự ổn định của phương pháp trong nền mẫu nước.

Độ thu hồi ở 3 mức nồng độ 5 µg/L, 10 µg/L, 25 µg/L của 4 dạng As và 2 dạng Hg tương ứng là 88,6 – 106,8% và 97,1 – 105,0%, đạt yêu cầu của AOAC là 60 – 115% ở khoảng nồng độ 10 – 100 µ/L. Kết quả trên cho thấy phương pháp xây dựng được có độ thu hồi tốt trên nền mẫu nước.

Từ các kết quả đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi trên nền mẫu niêu và mẫu nước có thể kết luận rằng phương pháp HPLC-ICP-MS xây dựng được có độ chính xác cao, độ lặp lại tốt và đáng tin cậy để phân tích các dạng As và Hg trong mẫu niêu, mẫu nước nói riêng và mẫu sinh hóa, mẫu môi trường nói chung.

3.3. Phân tích hàm lượng As và Hg tổng số trong mẫu sinh học và môi trường

3.3.1. Xây dựng đường chuẩn phân tích hàm lượng As tổng số bằng phương pháp ICP-MS

Hàm lượng As tổng số trong các mẫu sinh học và môi trường được phân tích bằng phương pháp ICP-MS sử dụng chế độ động học phản ứng (DRC) với khí oxy, trên hệ thiết bị ICP-MS NexION 2000, PerkinElmer. Các điều kiện phân tích As bằng phương pháp ICP-MS được đưa ra trong Bảng 3.17 sau.

Bảng 3.17. Điều kiện phân tích As trên thiết bị ICP-MS NexION 200 (PerkinElmer, Hoa Kỳ).

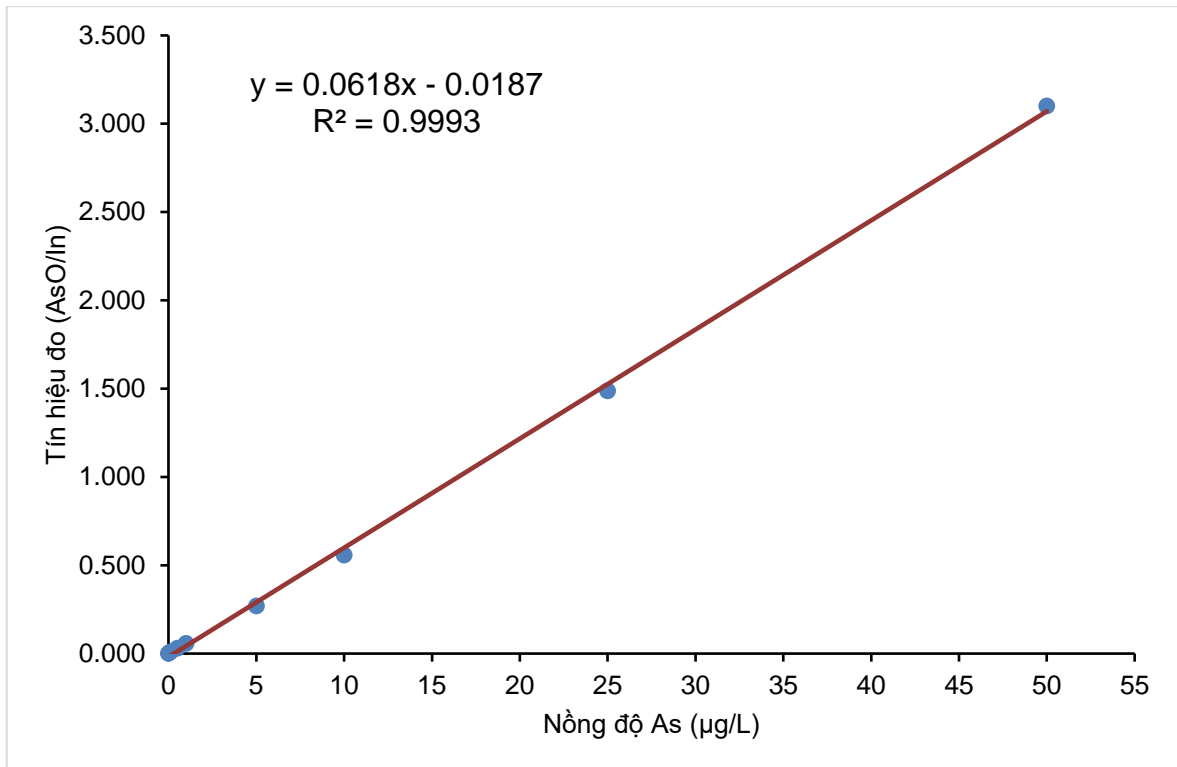
Công suất cao tần RF	1600W
Khí tạo plasma (Plasma gas)	15 L/phút
Khí phụ trợ (Auxiliary gas)	1,2 L/phút
Khí tạo sol (Nebulizer gas)	1,00 L/phút
Nebulizer	Glass concentric
Buồng phun sương	Glass cyclonic
Điện áp vào	-7 V

Điện áp ra	- 7 V
Thời gian hút mẫu	75 giây
Chế độ đo	- Phản ứng động học với khí Oxy 0,7 mL/phút (DRC)
Ion đo	AsO ⁺ (m/z 91), In ⁺ (m/z 115)
Chế độ ghi phổ	Peak hopping
Phương pháp định lượng	Phương pháp nội chuẩn

Đường chuẩn phân tích As được xây dựng bằng cách chuẩn bị dãy các dung dịch chuẩn As(V) có nồng độ 0 µg/L; 0,1 µg/L; 0,5 µg/L; 1 µg/L; 5 µg/L; 10 µg/L; 25 µg/L và 50 µg/L từ dung dịch chuẩn gốc As(V) 10 mg/L, có sử dụng nội chuẩn In 5 µg/L được thêm trực tuyến qua một ống nối chữ T lắp sau bơm nhu động để trộn với dòng mẫu trong quá trình dẫn mẫu vào thiết bị. Đường chuẩn xây dựng được là phương trình hồi quy tuyến tính giữa nồng độ As và tín hiệu đo là tỷ lệ tín hiệu AsO/In.

Bảng 3.18. Tương quan giữa tín hiệu đo và nồng độ As.

Nồng độ As (µg/L)	Tín hiệu đo		
	AsO (cps)	In (cps)	AsO/In
0	44,0	37028,9	0,001
0,1	273,3	35807,5	0,008
0,5	1067,0	35572,5	0,030
1	2035,8	35596,4	0,057
5	9671,6	35909,4	0,269
10	19366,8	34738,1	0,558
25	52170,4	35085,9	1,487
50	103498,2	33391,2	3,100



Hình 3.20. Đường chuẩn phân tích As tổng số.

Đường chuẩn của phép đo phân tích As tổng số có độ tuyến tính tốt với hệ số tương quan $R^2 = 0,9993$ (đạt yêu cầu $0,99 \leq R^2 \leq 1$), chứng tỏ có sự tuyến tính tốt giữa cường độ tín hiệu và nồng độ.

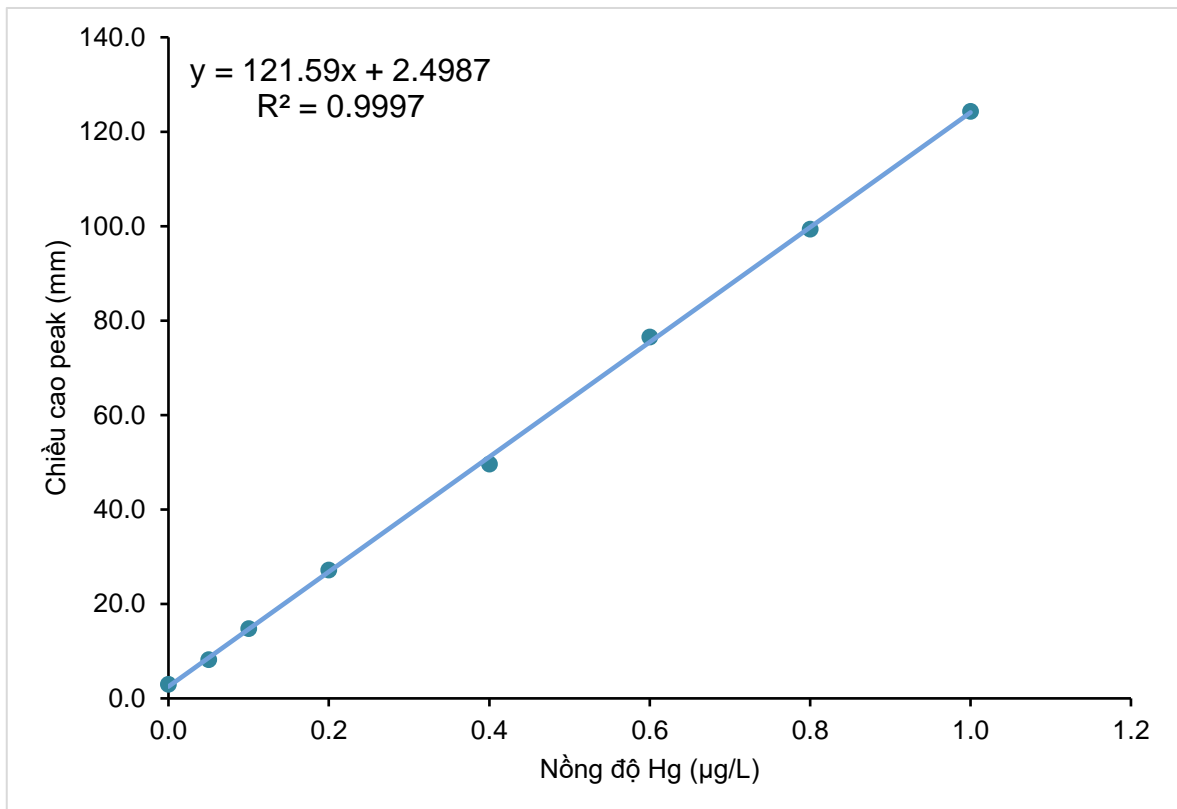
3.3.2. Xây dựng đường chuẩn phân tích hàm lượng Hg tổng số bằng phương pháp CV-AAS

Hàm lượng Hg tổng số trong các mẫu sinh học và môi trường được phân tích bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng kỹ thuật hóa hơi lạnh (CV-AAS) trên hệ thiết bị phân tích vết thủy ngân Model HG-201. Để xây dựng đường chuẩn Hg tổng số, các dung dịch chuẩn Hg(II) có nồng độ 0,05 µg/L; 0,1 µg/L; 0,2 µg/L; 0,4 µg/L; 0,6 µg/L; 0,8 µg/L và 1 µg/L được chuẩn bị từ dung dịch chuẩn gốc Hg(II) 1000 mg/L và tiến hành xử lý mẫu như với mẫu thực, sau đó đo phổ hấp thụ nguyên tử của Hg. Sự tương quan giữa nồng độ Hg và tín hiệu đo (chiều cao peak) được đưa ra trong bảng và hình sau.

Đường chuẩn (xem Hình 3.21) của phép đo phân tích Hg tổng số có phương trình hồi quy $y = 121,59x + 2,4987$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9997$ đạt yêu cầu $0,99 \leq R^2 \leq 1$.

Bảng 3.19. Tương quan giữa tín hiệu đo và nồng độ Hg.

Nồng độ ($\mu\text{g/L}$)	Chiều cao peak (mm)
0	3,0
0,05	8,2
0,1	14,8
0,2	27,2
0,4	49,6
0,6	76,5
0,8	99,4
1,0	124,3



Hình 3.21. Đường chuẩn phân tích Hg tổng số.

3.3.3. Kết quả phân tích hàm lượng As và Hg tổng số

Hàm lượng As và Hg tổng số trong 7 mẫu niêu và 6 mẫu nước được đưa ra trong bảng sau:

Bảng 3.20. Kết quả phân tích tổng As, Hg.

Mẫu/ Dạng phân tích		Kết quả phân tích tổng As ($\mu\text{g/L}$)	Kết quả phân tích tổng Hg ($\mu\text{g/L}$)
Mẫu niệu	BN-01	56,99	<IQL ^(*1)
	BN-02	11,13	5,77
	BN-03	4,00	<IQL ^(*1)
	BN-04	5,77	<IQL ^(*1)
	BN-05	7,92	<IQL ^(*1)
	BN-06	2,77	<IQL ^(*1)
	BN-07	18,25	<IQL ^(*1)
Mẫu nước	MT-L4	33,36	<IQL ^(*2)
	MT-L5	83,91	<IQL ^(*2)
	MT-L6	42,44	<IQL ^(*2)
	MT-M3	1,48	<IQL ^(*2)
	MT-M1	32,00	<IQL ^(*2)
	MT-L1	3,09	<IQL ^(*2)

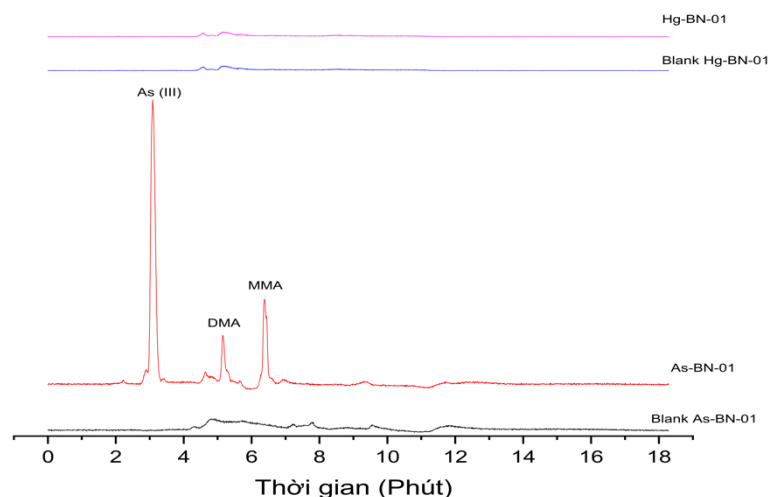
Ghi chú:

- IQL^(*1): Giới hạn định lượng của Hg tổng số trong mẫu niệu bằng phương pháp CV-AAS: 0,5 ($\mu\text{g/L}$).
- IQL^(*2): Giới hạn định lượng của Hg tổng số trong mẫu nước bằng phương pháp CV-AAS: 0,04 ($\mu\text{g/L}$).

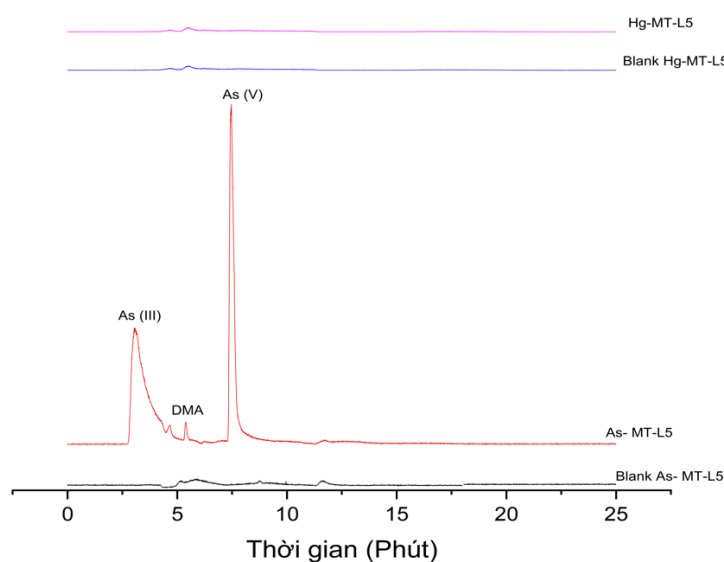
3.4. Phân tích dạng đồng thời của As và Hg trong các mẫu sinh học và môi trường

Kết quả phân tích đồng thời các dạng của As, Hg trong mẫu sinh học và môi trường được trình bày trong các hình (Hình 3.22, Hình 3.23) và Bảng 3.21 dưới đây:

Với mẫu nước, Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước mặt QCVN 08:2023/BTNMT quy định giá trị giới hạn tối đa của As tổng số trong nước mặt có ảnh hưởng tới sức khỏe con người là 0,01 mg/L (10 $\mu\text{g/L}$). Trong 6 mẫu nước, có 4 mẫu MT-L4, MT-L5, MT-L6 và MT-M1 có hàm lượng As tổng số vượt quá giới hạn cho phép với hàm lượng tương ứng là 33,36; 83,91; 42,44 và 32,00 $\mu\text{g/L}$. Hàm lượng tổng các dạng As nhỏ hơn so với hàm lượng As tổng số phân tích bằng ICP-MS. Điều này có thể giải thích là do ngoài 4 dạng As được nghiên cứu, có thể còn có các dạng As khác tồn tại trong mẫu nước.



Hình 3.22. Sắc đồ phân tích mẫu niệu của bệnh nhân BN-01.



Hình 3.23. Sắc đồ phân tích mẫu nước MT-L5.

Kết quả trong Bảng 3.21 cho thấy As vô cơ là dạng tồn tại chính trong các mẫu nước với phần trăm so với hàm lượng As tổng số là 47,8 – 93,8%. Dạng DMA được tìm thấy trong 2 trong số 6 mẫu nước với hàm lượng chiếm 1,4% và 17,4%. Dạng MMA chỉ được tìm thấy trong 1 mẫu với hàm lượng 17,5% so với hàm lượng As tổng số.

Với mẫu niệu, hàm lượng As tổng số trong khoảng 2,77 – 56,99 $\mu\text{g/L}$. Theo thông tư số 15/2016/TT-BYT ngày 15 tháng 5 năm 2016 của Bộ Y tế ban hành về Quy định về Bệnh nghề nghiệp được hưởng Bảo hiểm xã hội, hàm lượng As tối đa cho phép trong mẫu niệu là 80 $\mu\text{g/L}$ (nhiễm độc mạn tính).

Goldfrank's Toxicologic Emergencies đưa ra hàm lượng As cho phép trong mẫu niệu là 50 µg/L (0,67 µmol/L [68]). Kết quả trong Bảng 3.21 cho thấy chỉ có 1 mẫu niệu có hàm lượng lớn hơn giới hạn cho phép của Goldfrank's với hàm lượng là 56,99 µg/L. Tương tự như mẫu nước, tổng 4 dạng As trong các mẫu niệu cũng nhỏ hơn so với hàm lượng As tổng số. Ngoài các dạng As(III), As(V), DMA và MMA, trong mẫu niệu có thể còn tồn tại các dạng As khác như AsB, AsC mà chưa được nghiên cứu trong nghiên cứu này.

Bảng 3.21. Hàm lượng các dạng As trong các mẫu sinh học và môi trường.

Tên mẫu		Hàm lượng các dạng As (µg/L)			Hàm lượng tổng các dạng As (µg/L) (HPLC-ICP-MS)	Hàm lượng As tổng số (µg/L) (ICP-MS)
		InAs (µg/L)	DMA (µg/L)	MMA (µg/L)		
Mẫu niệu	BN-01	33,35	1,59	2,96	37,89	56,99
	BN-02	2,65	1,84	2,66	7,16	11,13
	BN-03	3,19	KPH	KPH	3,19	4,00
	BN-04	<IQL ^(*3)	KPH	KPH	<IQL ^(*3)	5,77
	BN-05	KPH	KPH	<IQL ^(*4)	<IQL ^(*4)	7,92
	BN-06	1,94	KPH	KPH	1,94	2,77
	BN-07	6,28	1,85	3,20	6,28	18,25
Mẫu nước	MT-L4	25,88	KPH	KPH	25,88	33,36
	MT-L5	50,78	1,20	KPH	51,98	83,91
	MT-L6	20,27	7,39	7,44	35,09	42,44
	MT-M3	<IQL ^(*3)	KPH	KPH	<IQL ^(*3)	1,48
	MT-M1	30,00	KPH	KPH	30,00	32,00
	MT-L1	2,68	KPH	KPH	2,68	3,09

Ghi chú:

- IQL^(*3) Giới hạn định lượng thiết bị của dạng As(III), As(V):0,93 (µg/L).
- IQL^(*4) Giới hạn định lượng thiết bị của dạng MMA:0,63 (µg/L).
- InAs: Tổng hàm lượng dạng As(III) và As(V).
- KPH: Không phát hiện.

Dạng As vô cơ (bao gồm As(III) và As(V)) là dạng tồn tại chính, chiếm 69,3 – 80,9% trong hàm lượng As tổng số. Hai dạng khác của As là DMA và MMA được tìm thấy trong tương ứng là 2 mẫu niệu (chiếm 5,2% và 17,55% so với hàm lượng As tổng số) và 1 mẫu niệu (chiếm 27,1% so với hàm lượng As tổng số). Kết quả này và khẳng định rằng các nguồn tiếp xúc As chính với con người chủ yếu đến từ các nguồn như nước, thực phẩm (gạo) và hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Mạnh Hà [42].

Kết quả phân tích dạng Hg trong Bảng 3.22 cho thấy so sánh với As, hàm lượng Hg tổng số trong các mẫu nước và mẫu niệu đều nhỏ. Sáu mẫu nước đều có Hg tổng số nhỏ hơn giới hạn định lượng (IQL) và không phát hiện các dạng Hg(II) và MeHg. Do đó, các mẫu nước trên đều đạt tiêu chuẩn về hàm lượng Hg theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước mặt QCVN 08:2023/BTNMT (Hg < 0,001 mg/L).

Trong số 7 mẫu niệu khảo sát có 6 mẫu niệu có hàm lượng Hg tổng số nhỏ hơn giới hạn định lượng (IQL) và không phát hiện các dạng Hg(II) và MeHg. Mẫu niệu BN-02 phát hiện được Hg tổng số với hàm lượng là 5,77 µg/L và dạng Hg(II) là 0,92 µg/L. Theo Goldfrank's Toxicologic Emergencies [69], hàm lượng Hg trong nước tiểu người bình thường là < 20 µg/L. Như vậy, các mẫu niệu khảo sát đều có hàm lượng Hg trong giới hạn cho phép.

Bảng 3.22. Hàm lượng các dạng Hg trong các mẫu sinh học và môi trường.

Mẫu/ Dạng phân tích Hg	Hg(II) (µg/L)	MeHg (µg/L)	Kết quả tổng hai dạng Hg (HPLC-ICP-MS) (µg/L)	Kết quả phân tích tổng Hg (CV-AAS) (µg/L)	
Mẫu niệu	BN-01	<IQL ^(*5)	KPH	<IQL ^(*5)	<IQL ^(*1)
	BN-02	0,92	KPH	0,92	5,77
	BN-03	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*1)
	BN-04	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*1)
	BN-05	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*1)
	BN-06	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*1)
	BN-07	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*1)
Mẫu nước	MT-L4	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*2)
	MT-L5	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*2)
	MT-L6	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*2)
	MT-M3	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*2)
	MT-M1	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*2)
	MT-L1	KPH	KPH	KPH	<IQL ^(*2)

Ghi chú:

- IQL^(*1): Giới hạn định lượng của Hg tổng số trong mẫu niệu bằng phương pháp CV-AAS: 0,5 (µg/L).
- IQL^(*2): Giới hạn định lượng của Hg tổng số trong mẫu nước bằng phương pháp CV-AAS: 0,04 (µg/L).
- IQL^(*5): Giới hạn định lượng của thiết bị HPLC-ICP-MS: Hg(II): 0,92 (µg/L)
- KPH: Không phát hiện.

KẾT LUẬN

Qua việc nghiên cứu xây dựng phương pháp phân tích dạng đồng thời của hai nguyên tố As và Hg bằng phương pháp HPLC-ICP-MS và áp dụng để phân tích một số mẫu sinh học và môi trường, đề tài luận văn đã thu được các kết quả như sau:

Đã nghiên cứu khảo sát và lựa chọn được các điều kiện tối ưu để phân tích dạng đồng thời của hai nguyên tố As và Hg (As(III), As(V), DMA, MMA, Hg(II), MeHg) bằng hệ ghép nối HPLC-ICP-MS bao gồm: cột C18 Shiseido Capcell PAK, MG (5 μ m, 4,6 x 250 mm); pha động A và B với thành phần 2mM TBAH; 1 mM SBS; 15 mM Cys; pH 6,0; 2% methanol (v/v).

Đường chuẩn của 4 dạng As và 2 dạng Hg có nồng độ từ 1 μ g/L đến 45 μ g/L và cho hệ số tương quan R^2 từ 0,9955 – 0,9999 nằm trong khoảng giới hạn cho phép $0,99 < R^2 < 1$. Giới hạn phát hiện (IDL) và giới hạn định lượng (IQL) của 4 dạng As tương ứng là 0,258 – 0,390 μ g/L và 0,621 – 0,936 μ g/L. Với 2 dạng Hg, IDL là 0,374 – 0,385 và IQL là 0,898 – 0,924 μ g/L. Độ lặp lại của phương pháp đánh giá trên mẫu thực thêm chuẩn cho kết quả độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) của 4 dạng As và 2 dạng Hg là 2,7 – 12,9% đạt yêu cầu của AOAC (≤ 15 -21%). Độ thu hồi trên mẫu thực thêm chuẩn ở 3 khoảng nồng độ cũng cho kết quả độ thu hồi tốt trên cả nền mẫu niệu và mẫu nước (88,6-107,3%). Do đó, phương pháp phân tích dạng đồng thời của hai nguyên tố As và Hg xây dựng được có độ chính xác cao, độ lặp lại tốt và đáng tin cậy để phân tích các dạng As và Hg trong mẫu niệu, mẫu nước nói riêng và mẫu sinh hóa, mẫu môi trường nói chung.

Đã áp dụng phương pháp xây dựng được để phân tích xác định đồng thời hàm lượng 4 dạng As và 2 dạng Hg trong 7 mẫu niệu thu thập tại Trung tâm chống độc Bệnh viện Bạch Mai và 7 mẫu nước ở tỉnh Thái Nguyên. Kết quả cho thấy dạng As vô cơ (As(III) và As(V)) là dạng tồn tại chính trong mẫu nước và mẫu niệu với tỉ lệ tương ứng là 47,8 – 93,8% và 69,3 – 80,9% so với hàm lượng As tổng số. Các dạng As khác bao gồm DMA và MMA được tìm thấy trong một vài mẫu với hàm lượng thấp. Hg tổng số và dạng Hg(II), MeHg trong các mẫu niệu và mẫu nước hầu hết có hàm lượng nhỏ hơn giới hạn định lượng (IQL).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Z. Baumann, S. Jonsson, R.P. Mason, 2019, *Geochemistry of Mercury in the Marine Environment*, in: J.K. Cochran, H.J. Bokuniewicz, P.L. Yager (Eds.), *Encyclopedia of Ocean Sciences* (Third Edition), Academic Press, Oxford.
2. United Nations Environment Programme, 2019, *Global Mercury Assessment 2018, UN Environment Programme, Chemicals and Health Branch*, Geneva, Switzerland.
3. J.O. Dickson, M.A. Mayes, S.C. Brooks, T.L. Mehlhorn, K.A. Lowe, J.K. Earles, L. Goñez-Rodríguez, D.B. Watson, M.J. Peterson, 2019, Source relationships between streambank soils and streambed sediments in a mercury-contaminated stream, *Journal of Soils and Sediments*, 19(4), pp. 2007-2019.
4. T.M. Dellapenna, C. Hoelscher, L. Hill, M.E. Al Mukaimi, A. Knap, 2020, How tropical cyclone flooding caused erosion and dispersal of mercury-contaminated sediment in an urban estuary: The impact of Hurricane Harvey on Buffalo Bayou and the San Jacinto Estuary, Galveston Bay, USA, *Science of The Total Environment*, 748, p 141226.
5. V. Hatje, R.L.B. Andrade, R.M. Jesus, P. Masqué, A.C.R. Albergaria-Barbosa, J.B. de Andrade, A.C.S.S. Santos, 2019, Historical records of mercury deposition in dated sediment cores reveal the impacts of the legacy and present-day human activities in Todos os Santos Bay, Northeast Brazil, *Marine Pollution Bulletin*, 145, pp. 396-406.
6. C.S. Eckley, C.C. Gilmour, S. Janssen, T.P. Luxton, P.M. Randall, L. Whalin, C. Austin, 2020, The assessment and remediation of mercury contaminated sites: A review of current approaches, *Science of The Total Environment*, 707, p 136031.
7. J. Samaniego, C.R. Gibaga, A. Tanciongco, R. Rastrullo, 2020, Total Mercury in Soils and Sediments in the Vicinity of Abandoned Mercury Mine Area in Puerto Princesa City, Philippines, *Applied Sciences*, 10(13), p 4599.
8. L. Liang, X. Xu, J. Han, Z. Xu, P. Wu, J. Guo, G. Qiu, 2019, Characteristics, speciation, and bioavailability of mercury and methylmercury impacted by an abandoned coal gangue in southwestern China, *Environmental Science and Pollution Research*, 26(36), pp. 37001-37011.
9. J. Song, Q. Liu, Y. Sheng, 2019, Distribution and risk assessment of trace metals in riverine surface sediments in gold mining area, *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(3), p 191.
10. A. Colica, M. Benvenuti, L. Chiarantini, P. Costagliola, P. Lattanzi, V. Rimondi, M. Rinaldi, 2019, From point source to diffuse source of contaminants: The example of mercury dispersion in the Paglia River (Central Italy), *CATENA*, 172, pp. 488-500.

11. S. Covelli, E. Petranich, E. Pavoni, S. Signore, 2021, Can Sediments Contaminated by Mining be a Source of Mercury in the Coastal Environment Due to Dredging? Evidence from Thermo-Desorption and Chemical Speciation, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 106(6), pp. 942-948.
12. W. Budianta, F.L. Fahmi, Arifudin, I.W. Warmada, 2019, The distribution and mobility of mercury from artisanal gold mining in river sediments and water, Banyumas, Central Java, Indonesia, *Environmental Earth Sciences*, 78(3), p 90.
13. C.S. Green, P.J. Lewis, J.R. Wozniak, P.E. Drevnick, M.L. Thies, 2019, A comparison of factors affecting the small-scale distribution of mercury from artisanal small-scale gold mining in a Zimbabwean stream system, *Science of The Total Environment*, 647, pp. 400-410.
14. R.P. Mason, Z. Baumann, G. Hansen, K.M. Yao, M. Coulibaly, S. Coulibaly, 2019, An assessment of the impact of artisanal and commercial gold mining on mercury and methylmercury levels in the environment and fish in Cote d'Ivoire, *Science of The Total Environment*, 665, pp. 1158-1167.
15. H. Gutiérrez-Mosquera, J. Marrugo-Negrete, S. Díez, G. Morales-Mira, L.J. Montoya-Jaramillo, M.P. Jonathan, 2020, Distribution of chemical forms of mercury in sediments from abandoned ponds created during former gold mining operations in Colombia, *Chemosphere*, 258, p 127319.
16. M. Hošek, J. Bednárek, J. Popelka, J. Elznicová, Š. Tůmová, J. Rohovec, T. Navrátil, T. Matys Grygar, 2020, Persistent mercury hot spot in Central Europe and Skalka Dam reservoir as a long-term mercury trap, *Environmental Geochemistry and Health*, 42(5), pp. 1273-1290.
17. S.E. Janssen, M.T. Tate, D.P. Krabbenhoft, J.F. DeWild, J.M. Ogorek, C.L. Babiarz, A.D. Sowers, P.L. Tuttle, 2021, The influence of legacy contamination on the transport and bioaccumulation of mercury within the Mobile River Basin, *Journal of Hazardous Materials*, 404, p 124097.
18. Z. Xu, W. Fan, Z. Shi, C. Tan, M. Cui, S. Tang, G. Qiu, X. Feng, 2019, Mercury and methylmercury bioaccumulation in a contaminated bay, *Marine Pollution Bulletin*, 143, pp. 134-139.
19. C.-F. Chen, Y.-R. Ju, Y.C. Lim, C.-W. Chen, C.-H. Wu, Y.-L. Lin, C.-D. Dong, 2020, Dry and wet seasonal variation of total mercury, inorganic mercury, and methylmercury formation in estuary and harbor sediments, *Journal of Environmental Management*, 253, p 109683.
20. C.C. Osuna-Martínez, M.A. Armienta, M.E. Bergés-Tiznado, F. Páez-Osuna, 2021, Arsenic in waters, soils, sediments, and biota from Mexico: An environmental review, *Science of The Total Environment*, 752, p 142062.
21. D.D. Bussan, R.F. Sessums, J.V. Cizdziel, 2016, Activated Carbon and Biochar Reduce Mercury Methylation Potentials in Aquatic Sediments,

- Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(4), pp. 536-539.
22. I.M. Hwang, H.M. Lee, H.-W. Lee, J.-H. Jung, E.W. Moon, N. Khan, S.H. Kim, 2021, Determination of Toxic Elements and Arsenic Species in Salted Foods and Sea Salt by ICP-MS and HPLC-ICP-MS, *ACS Omega*, 6(30), pp. 19427-19434.
 23. J.P. Buchet, 2005, *Arsenic Speciation in Human Tissues*, Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health.
 24. B.A. Fowler, C.H.S.J. Chou, R.L. Jones, M. Costa, C.-J. Chen, 2022, *Chapter 3 - Arsenic*, in: G.F. Nordberg, M. Costa (Eds.), Handbook on the Toxicology of Metals (Fifth Edition), Academic Press.
 25. T. Prohaska, G. Stingeder, 2005, *Speciation of Arsenic*, Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health.
 26. P. A. Gallagher, X. Wei, J. A. Shoemaker, C. A. Brockhoff, J. T. Creed, 1999, Detection of arsenosugars from kelp extracts via IC-electrospray ionization-MS-MS and IC membrane hydride generation ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14(12), pp. 1829-1834.
 27. L.E. Hallacher, E.B. Kho, N.D. Bernard, A.M. Orcutt, J.W.C. Dudley, T.M. Hammond, 1985, Distribution of arsenic in the sediments and biota of Hilo Bay, Hawaii, *Pacific Science*, 3(39), pp. 266-273.
 28. W.R. Cullen, K.J. Reimer, 1989, Arsenic speciation in the environment, *Chemical Reviews*, 89(4), pp. 713-764.
 29. F. Challenger, 1945, Biological Methylation, *Chemical Reviews*, 36(3), pp. 315-361.
 30. B.C. McBride, R.S. Wolfe, 1971, Biosynthesis of dimethylarsine by methanobacterium, *Biochemistry*, 10(23), pp. 4312-4317.
 31. X.-C. Le, W.R. Cullen, K.J. Reimer, 1993, Determination of urinary arsenic and impact of dietary arsenic intake, *Talanta*, 40(2), pp. 185-193.
 32. K.A. Francesconi, D.A. Hunter, B. Bachmann, G. Raber, W. Goessler, 1999, Uptake and transformation of arsenosugars in the shrimp Crangon crangon, *Applied Organometallic Chemistry*, 13(10), pp. 669-679.
 33. B.K. Mandal, Y. Ogra, K. Anzai, K.T. Suzuki, 2004, Speciation of arsenic in biological samples, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3), pp. 307-318.
 34. T.H. Lin, Y.L. Huang, 1995, Chemical speciation of arsenic in urine of patients with blackfoot disease, *Biological Trace Element Research*, 48(3), pp. 251-261.
 35. W.R. Cullen, B.C. McBride, J. Reglinski, 1984, The reaction of methylarsenicals with thiols: Some biological implications, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 21(3), pp. 179-193.

36. J.P. Buchet, R. Lauwerys, 1994, Interpretation of inorganic arsenic metabolism in humans in the light of observations made in vitro and in vivo in the rat, *Applied Organometallic Chemistry*, 8(3), pp. 191-196.
37. J.P. Buchet, R. Lauwerys, H. Roels, 1981, Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 48(2), pp. 111-118.
38. P. Apostoli, L. Alessio, L. Romeo, J.P. Buchet, R. Leone, 1997, METABOLISM OF ARSENIC AFTER ACUTE OCCUPATIONAL ARSINE INTOXICATION, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 52(4), pp. 331-342.
39. X. Chris Le, M. Ma, V. W.-M. Lai, 1999, *Exposure to Arsenosugars from Seafood Ingestion and Speciation of Urinary Arsenic Metabolites*, in: W.R. Chappell, C.O. Abernathy, R.L. Calderon (Eds.), *Arsenic Exposure and Health Effects III*, Elsevier Science Ltd, Oxford.
40. M. Guo, W. Wang, X. Hai, J. Zhou, 2017, HPLC-HG-AFS determination of arsenic species in acute promyelocytic leukemia (APL) plasma and blood cells, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145, pp. 356-363.
41. M. Moldovan, M.M. Gómez, M.A. Palacios, C. Cámara, 1998, Arsenic Speciation in Water and Human Urine by HPLC-ICP-MS and HPLC-MO-HG-AAS, *Microchemical Journal*, 59(1), pp. 89-99.
42. M.H. Nguyen, T.D. Pham, T.L. Nguyen, H.A. Vu, T.T. Ta, M.B. Tu, T.H.Y. Nguyen, D.B. Chu, 2018, Speciation Analysis of Arsenic Compounds by HPLC-ICP-MS: Application for Human Serum and Urine, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018(1), p 9462019.
43. Z. Gao, W. Zheng, Y. Li, Y. Liu, M. Wu, S. Li, P. Li, G. Liu, X. Fu, S. Wang, F. Wang, Y. Cai, X. Feng, B. Gu, H. Zhong, Y. Yin, 2022, Mercury transformation processes in nature: Critical knowledge gaps and perspectives for moving forward, *Journal of Environmental Sciences*, 119, pp. 152-165.
44. S.-S. Chen, S.-S. Chou, D.-F. Hwang, 2004, Determination of methylmercury in fish using focused microwave digestion following by Cu²⁺ addition, sodium tetrapropylborate derivatization, n-heptane extraction, and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1024(1), pp. 209-215.
45. Natasha, M. Shahid, S. Khalid, I. Bibi, J. Bundschuh, N. Khan Niazi, C. Dumat, 2020, A critical review of mercury speciation, bioavailability, toxicity and detoxification in soil-plant environment: Ecotoxicology and health risk assessment, *Science of The Total Environment*, 711, p 134749.
46. M. Weng, N.V. Dolgova, L.I. Vogt, M. Qureshi, D. Sokaras, T. Kroll, H. Saitō, J.L. O'Donoghue, G.E. Watson, G.J. Myers, T. Sekikawa, I.J. Pickering, G.N. George, 2024, Synchrotron speciation of umbilical cord

- mercury and selenium after environmental exposure in Niigata, *NeuroToxicology*, 100, pp. 117-123.
47. N.R. Council, 2000, *Toxicological Effects of Methylmercury*, The National Academies Press, Washington, DC.
 48. M. Aschner, T. Syversen, 2005, Methylmercury: Recent Advances in the Understanding of Its Neurotoxicity, *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(3).
 49. J. Sánchez-Alarcón, M. Milić, L.P. Bustamante-Montes, K. Isaac-Olivé, R. Valencia-Quintana, N. Ramírez-Durán, 2021, Genotoxicity of Mercury and Its Derivatives Demonstrated In Vitro and In Vivo in Human Populations Studies. Systematic Review, *Toxics*, 9(12), p 326.
 50. G. Guzzi, A. Ronchi, P. Pigatto, 2021, Toxic effects of mercury in humans and mammals, *Chemosphere*, 263, p 127990.
 51. S.A. Rupa, M.A.M. Patwary, M.M. Matin, W.E. Ghann, J. Uddin, M. Kazi, 2023, Interaction of mercury species with proteins: towards possible mechanism of mercurial toxicology, *Toxicology Research*, 12(3), pp. 355-368.
 52. Z. Yin, H. Jiang, T. Syversen, J.B.T. Rocha, M. Farina, M. Aschner, 2008, The methylmercury-l-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter, *Journal of Neurochemistry*, 107(4), pp. 1083-1090.
 53. H. Yokoyama, 2018, *Lecture on Methylmercury Poisoning in Minamata (MPM)*, Mercury Pollution in Minamata, Springer Singapore, Singapore.
 54. A.D. Woolf, 2022, *Chapter 1.2 - Three methylmercury poisoning disasters*, in: A.D. Woolf (Ed.) *History of Modern Clinical Toxicology*, Academic Press.
 55. A. Ekawanti, B.D. Krisnayanti, 2015, Effect of Mercury Exposure on Renal Function and Hematological Parameters among Artisanal and Small-scale Gold Miners at Sekotong, West Lombok, Indonesia, *Journal of Health and Pollution*, 5(9), pp. 25-32.
 56. Z. Gao, N. Wu, X. Du, H. Li, X. Mei, Y. Song, 2022, Toxic Nephropathy Secondary to Chronic Mercury Poisoning: Clinical Characteristics and Outcomes, *Kidney International Reports*, 7(6), pp. 1189-1197.
 57. A.Q. Shah, T.G. Kazi, J.A. Baig, H.I. Afridi, M.B. Arain, 2012, Simultaneously determination of methyl and inorganic mercury in fish species by cold vapour generation atomic absorption spectrometry, *Food Chemistry*, 134(4), pp. 2345-2349.
 58. M. Tuzen, I. Karaman, D. Citak, M. Soylak, 2009, Mercury(II) and methyl mercury determinations in water and fish samples by using solid phase extraction and cold vapour atomic absorption spectrometry combination, *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), pp. 1648-1652.
 59. S. Hak Lee, J. Ki Suh, S. Hak Lee, 2005, Determination of mercury in tuna fish tissue using isotope dilution-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchemical Journal*, 80(2), pp. 233-236.

60. R. Kalamegham, K.O. Ash, 1992, A simple ICP-MS procedure for the determination of total mercury in whole blood and urine, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 6(4), pp. 190-193.
61. M. Briscoe, 2015, Determination of Heavy Metals in Food by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry: First Action 2015.01, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 98(4), pp. 1113-1120.
62. R. Jagtap, F. Krikowa, W. Maher, S. Foster, M. Ellwood, 2011, Measurement of methyl mercury (I) and mercury (II) in fish tissues and sediments by HPLC-ICPMS and HPLC-HGAAS, *Talanta*, 85(1), pp. 49-55.
63. D. Zhang, S. Yang, Q. Ma, J. Sun, H. Cheng, Y. Wang, J. Liu, 2020, Simultaneous multi-elemental speciation of As, Hg and Pb by inductively coupled plasma mass spectrometry interfaced with high-performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, 313, p 126119.
64. D. Zhang, S. Yang, H. Cheng, Y. Wang, J. Liu, 2019, Speciation of inorganic and organic species of mercury and arsenic in lotus root using high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in one run, *Talanta*, 199, pp. 620-627.
65. A. Castillo, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo, 2006, Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples, *Analytica Chimica Acta*, 577(1), pp. 18-25.
66. S. Zhu, B. Chen, M. He, T. Huang, B. Hu, 2017, Speciation of mercury in water and fish samples by HPLC-ICP-MS after magnetic solid phase extraction, *Talanta*, 171, pp. 213-219.
67. H. Liu, J. Luo, T. Ding, S. Gu, S. Yang, M. Yang, 2018, Speciation Analysis of Trace Mercury in Sea Cucumber Species of *Apostichopus japonicus* Using High-Performance Liquid Chromatography Conjunction With Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Biological Trace Element Research*, 186(2), pp. 554-561.
68. S.W. Munday, 2019, *Arsenic*, in: L.S. Nelson, M.A. Howland, N.A. Lewin, S.W. Smith, L.R. Goldfrank, R.S. Hoffman (Eds.), *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*, 11e, McGraw-Hill Education, New York, NY.
69. Y.-J. Sue, 2019, *Mercury*, in: L.S. Nelson, M.A. Howland, N.A. Lewin, S.W. Smith, L.R. Goldfrank, R.S. Hoffman (Eds.), *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*, 11e, McGraw-Hill Education, New York, NY.

PHỤ LỤC

Phụ lục A. Sắc đồ các dạng As, Hg

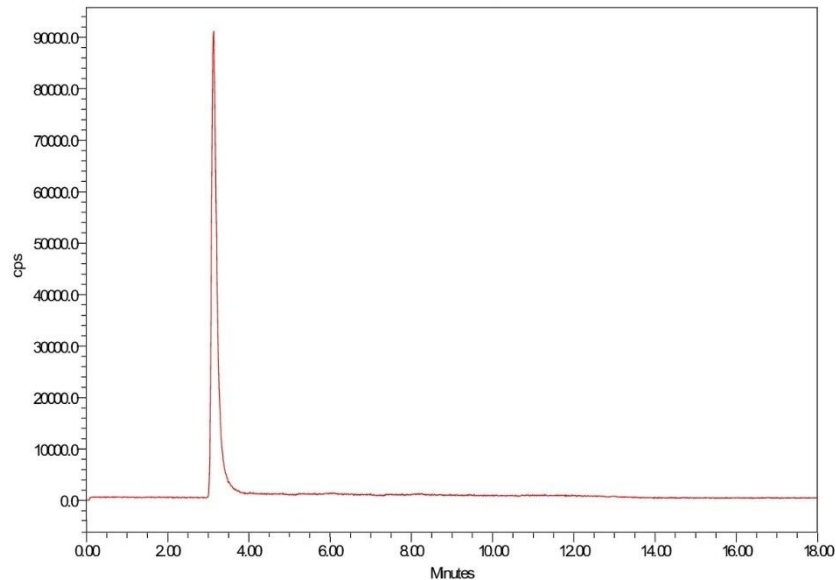
Empower™ 3
SOFTWARE

Chromatogram Labels Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	As(III)	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	20230623 Test BB3 16
Vial:	1:A3	Acq. Method Set:	As and Hg 20230623 BB3 16
Injection#:	1	Processing Method:	****
Injection Volume:	50.00 μ l	Channel Name:	****
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	****
Date Acquired:	6/23/2023 3:55:09 PM ICT		
Date Processed:	****		

Auto-Scaled Chromatogram

Error Log

Peak Labels Table group contains information that doesn't match the data being reported.

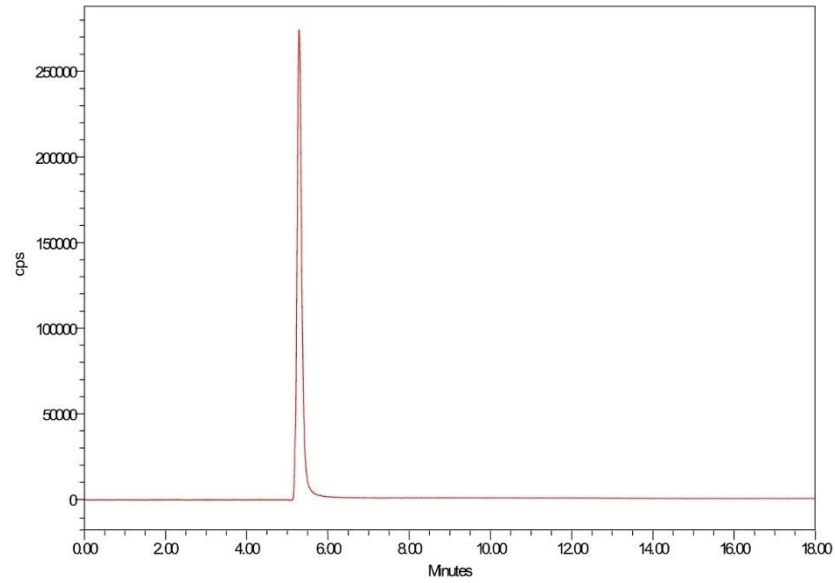
Reported by User: System
 Report Method: Chromatogram Labels Report
 Report Method ID: 1000 1000
 Page: 1 of 1

Project Name: Van
 Date Printed: 8/29/2023
 2:35:58 PM Asia/Hb_Chi_Mrh

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DMA	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	20230623 Test BB3 16
Vial:	1:A4	Acq. Method Set:	As and Hg 20230623 BB3 16
Injection#:	1	Processing Method:	****
Injection Volume:	50.00 u	Channel Name:	****
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	****
Date Acquired:	6/23/2023 4:12:11 PM ICT		
Date Processed:	****		

Auto-Scaled Chromatogram

Error Log

Peak Labels Table group contains information that doesn't match the data being reported.

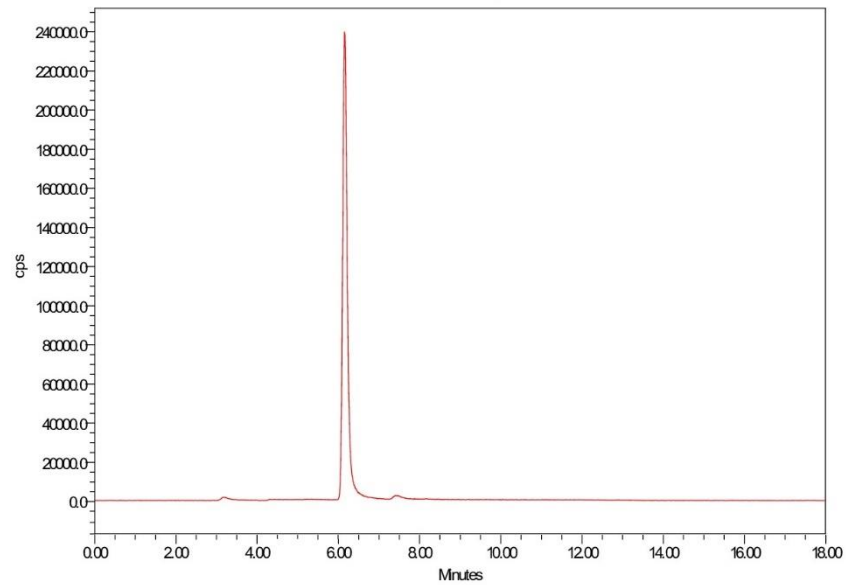
Reported by User: System
 Report Method: ChromatogramLabels Report
 Report Method ID: 1000 1000
 Page: 1 of 1

Project Name: Van
 Date Printed: 8/29/2023
 2:35:29 PM Asia/Hb_Chi_Mrh

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	MVA	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	20230623 Test BB3 16
Vial:	1:A5	Acq. Method Set:	As and Hg 20230623 BB3 16
Injection#:	1	Processing Method:	****
Injection Volume:	50.00 u	Channel Name:	****
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	****
Date Acquired:	6/23/2023 4:29:12 PM ICT		
Date Processed:	****		

Auto-Scaled Chromatogram

Error Log

Peak Labels Table group contains information that doesn't match the data being reported.

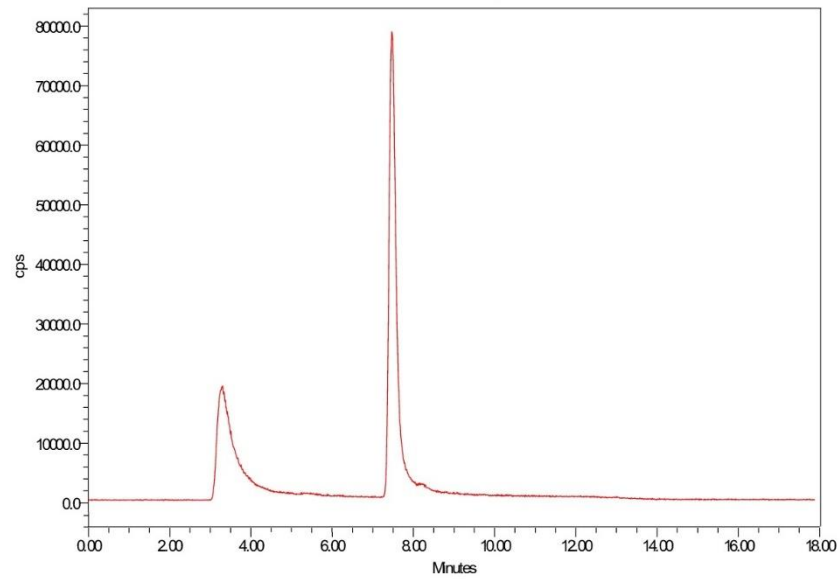
Reported by User: System
 Report Method: Chromatogram Labels Report
 Report Method ID: 1000 1000
 Page: 1 of 1

Project Name: Van
 Date Printed: 8/29/2023
 2:35:06 PM Asia/Hb_Chi_Mrh

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	As(V)	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	20230623 Test BB3 16
Vial:	1:A6	Acq. Method Set:	As and Hg 20230623 BB3 16
Injection#:	1	Processing Method:	****
Injection Volume:	50.00 u	Channel Name:	****
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	****
Date Acquired:	6/23/2023 4:46:12 PM ICT		
Date Processed:	****		

Auto-Scaled Chromatogram

Error Log

Peak Labels Table group contains information that doesn't match the data being reported.

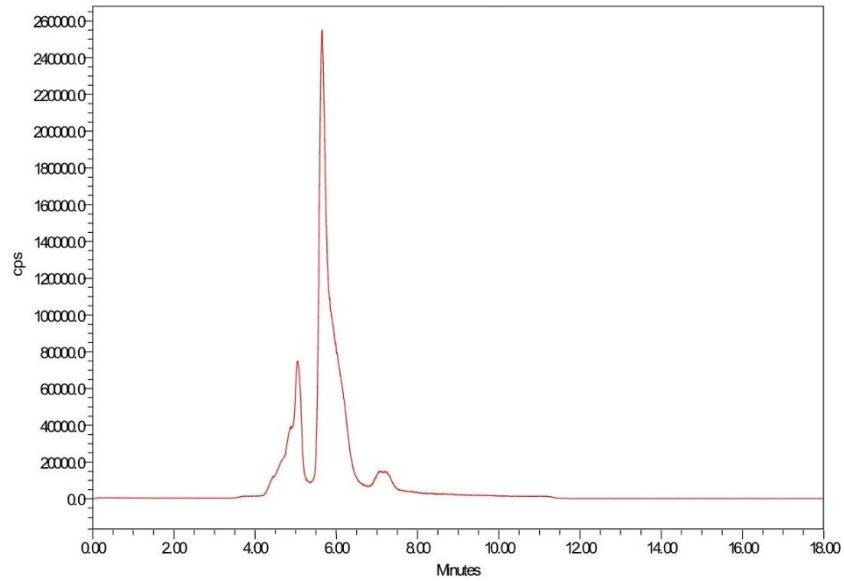
Reported by User: System
 Report Method: Chromatogram Labels Report
 Report Method ID: 1000 1000
 Page: 1 of 1

Project Name: Van
 Date Printed: 8/29/2023
 2:34:13 PM Asia/Hb_Chi_Mrh

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Hg2-100ppb	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	20230807 Calib 18min
Vial:	1.B.4	Acq. Method Set:	As and Hg 20230721 18min
Injection#:	1	Processing Method:	****
Injection Volume:	50.00 u	Channel Name:	****
Run Time:	18.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	****
Date Acquired:	8/7/2023 4:49:28 PM ICT		
Date Processed:	****		

Auto-Scaled Chromatogram

Error Log

Peak Labels Table group contains information that doesn't match the data being reported.

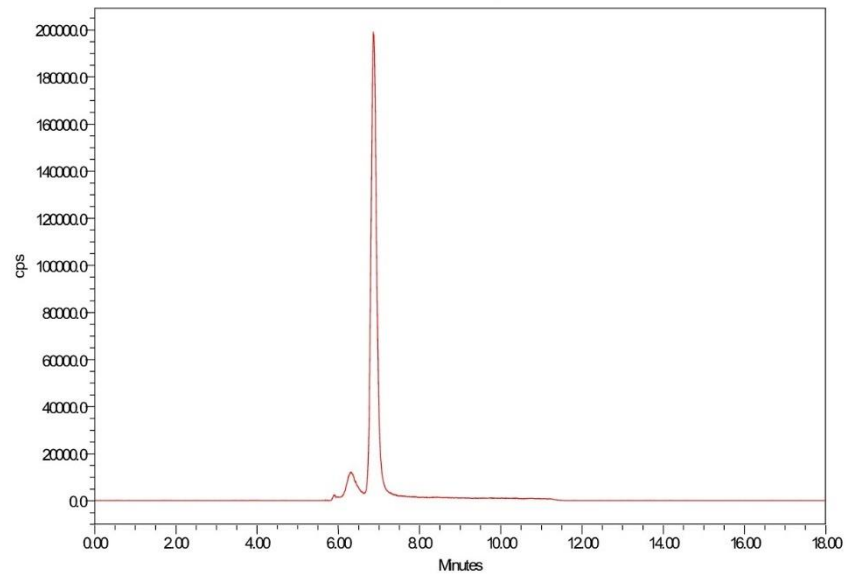
Reported by User: System
 Report Method: ChromatogramLabels Report
 Report Method ID: 1000 1000
 Page: 1 of 1

Project Name: Van
 Date Printed: 8/29/2023
 12:59:59 PM Asia/Hb_Chi_Min

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	MtHg-100ppb	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	20230807 Calib 18min
Vial:	1.B.5	Acq. Method Set:	As and Hg 20230721 18min
Injection#:	1	Processing Method:	****
Injection Volume:	50.00 u	Channel Name:	****
Run Time:	18.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	****
Date Acquired:	8/7/2023 5:08:27 PMICT		
Date Processed:	****		

Auto-Scaled Chromatogram

Error Log

Peak Labels Table group contains information that doesn't match the data being reported.

Reported by User: System
 Report Method: ChromatogramLabels Report
 Report Method ID: 1000 1000
 Page: 1 of 1

Project Name: Van
 Date Printed: 8/29/2023
 12:58:37 PM Asia/Hb_Chi_Mrh

Phụ lục B. Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Phụ lục Bảng B.1. Giá trị sử dụng của phương pháp phân tích nền mẫu Niệu: Độ lặp lại

Độ lặp lại nền mẫu Niệu						
Stt	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Hg(II)	MeHg
1	88617	236456	219934	133048	28467	34374
2	90120	220352	235701	140554	35714	36380
3	89681	228579	236660	132136	31284	36106
4	91656	221812	226923	140660	24102	36665
5	85261	216151	224044	139893	33450	34735
6	88988	214345	223526	132352	30762	32912
7	85276	226687	237758	140789	35131	36557
TB	88514	223483	229221	137062	31273	35390
SD	2419	7686	7314	4274	4060	1419
%RSD	2,7	3,4	3,2	3,1	13,0	4,0

Phụ lục Bảng B.2. Giá trị sử dụng của phương pháp phân tích nền mẫu sinh học (mẫu Niệu): Độ đúng.

Độ đúng As(III)				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	9484	25093	38127	74456
2	9348	19709	42497	77847
3	9198	22746	40367	74944
4	9423	20858	40703	74971
TB	9363	22101	40423	75554
SD		2355	1794	1547
R (%)		102,85	107,31	100,29

Độ đúng As(V)				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	5999	37421	79461	163409
2	5613	30975	74512	169437
3	5749	33393	74318	158618
4	5759	35991	77283	162648
TB	5780	34445	76394	163528
SD		2852	2453	4465
R (%)		96,99	102,44	101,39

Độ đúng MMA				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	26824	79626	106743	264505
2	25115	73449	119360	255933
3	27068	71538	114566	264176
4	24870	77021	109050	260700
SD		3615	5668	3988
R (%)		98,48	100,44	102,13

Độ đúng DMA				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	18714	79611	114466	267693
2	21092	70850	115837	261441
3	19114	72569	119658	269587
4	19949	75327	109135	267827
SD		3822	4354	3569
R (%)		99,31	98,99	98,74

Độ đúng Hg(II)				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	5506	13750	19455	27062
2	5439	11322	16958	31253
3	5560	6868	12996	33337
4	5408	15380	19342	33863
TB	5478	11830	17188	31379
SD	68	3704	3022	3091
R (%)	0	105,82	104,21	96,28

Độ đúng MeHg				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	7222	27266	39856	97259
2	7118	26507	41746	97406
3	7754	27470	41703	97235
4	7246	30069	46390	93612
TB	7335	27828	42424	96378
SD	285	1551	2787	1845
R (%)	0	103,00	99,91	100,02

Phụ lục Bảng B.3. Giá trị sử dụng của phương pháp phân tích nền mẫu môi trường (mẫu) nước: Độ lặp lại

Độ lặp lại nền mẫu Nước						
STT	As (III)	As(V)	DMA	MMA	Hg(II)	MeHg
1	99004	133967	221521	221483	30292	35739
2	93578	134460	228521	228243	26947	36398
3	91559	145190	229967	235493	30460	37357
4	89753	140727	225859	244523	35568	36088
5	91257	144481	236014	233554	35121	34555
6	90720	143586	221423	221310	29267	36198
7	91101	143608	210614	232139	38554	39407
TB	92425	140860	224845	230964	32315	36535
SD	3123	4749	8070	8195	4144	1517
%RSD	3,4	3,4	3,6	3,5	12,8	4,2

Phụ lục Bảng B.4. Giá trị sử dụng của phương pháp phân tích nền mẫu môi trường (mẫu nước): Độ đúng.

Độ đúng As(III)				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	9272	25835	31594	71537
2	9513	18976	36748	69446
3	9408	19233	39139	76919
4	9498	23611	34642	75581
TB	9423	22274	40334	76658
SD		3370	3203	3476
R (%)		103,76	106,79	101,87

Độ đúng As(V)				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	5985	35225	73152	160070
2	6131	32176	68602	160357
3	5965	31996	70577	160220
4	5724	29170	74911	165143
TB	5951	32142	71810	161448
SD		2474	2783	2466
R (%)		88,62	95,54	99,94

Độ đúng DMA				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	24167	70088	120640	275422
2	24033	74311	118234	270439
3	18608	68176	115746	268956
4	22409	76369	101904	266616
TB	20218	78183	115785	272954
SD		3763	8393	3725
R (%)		104,90	99,52	101,07

Độ đúng MMA				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 (µg/L)	Thêm chuẩn 10 (µg/L)	Thêm chuẩn 25 (µg/L)
1	26696	76957	119406	254772
2	29511	73711	109323	251697
3	26254	72076	108324	245693
4	27394	81934	109476	244987
TB	27464	76169	111632	249287
SD		4346	5208	4736
R (%)		97,02	97,78	96,25

Độ đúng Hg(II)				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 ($\mu\text{g/L}$)	Thêm chuẩn 10 ($\mu\text{g/L}$)	Thêm chuẩn 25 ($\mu\text{g/L}$)
	1	5657	13184	15530
	2	5617	14957	20391
	3	5461	9932	19508
	4	5353	8164	13871
	TB	5522	11559	17325
	SD		3074	3126
	R (%)		100,58	105,04

Độ đúng MeHg				
	Mẫu	Thêm chuẩn 5 ($\mu\text{g/L}$)	Thêm chuẩn 10 ($\mu\text{g/L}$)	Thêm chuẩn 25 ($\mu\text{g/L}$)
	1	7387	26750	43033
	2	7501	24680	41128
	3	7066	26837	45035
	4	7360	28464	42466
	TB	7329	26683	42915
	SD		1550	1623
	R (%)		97,28	101,33

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Bùi Dương Giang

Lớp: Hóa phân tích 2021B

Tên đề tài luận văn: Nghiên cứu phân tích đồng thời các dạng As, Hg trong mẫu sinh học và môi trường bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối phổ nghiên tử nguồn Plasma cảm ứng cao tần (HPLC-ICP-MS)

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 8440118

Người hướng dẫn khoa học 1: TS. Dương Tuấn Hưng

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Bùi Văn Hợi

Ngày bảo vệ luận văn: 18/10/2024

Căn cứ biên Bản họp Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:



STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Đã khảo sát tối ưu thành phần pha động tuy nhiên chưa sử dụng chính xác điều kiện tối ưu trong phân tích (trang 37 sử dụng 20mM Cys)	Đã chỉnh sửa (trang 37)
2	Hình 3.13 nhầm lẫn đặt tên trên sắc ký đồ (trang 37)	Đã chỉnh sửa (trang 37)
3	Bảng 3.6 đưa ra phương pháp định lượng là ngoại chuẩn (trang 44-45) nhưng thực tế phương pháp sử dụng là nội chuẩn với nội chuẩn In	Đã chỉnh sửa (trang 45)
4	Đơn vị đánh máy nhầm, sửa lại thành “ $\mu\text{g/L}$ ” (trang 43)	Đã chỉnh sửa (trang 43)
5	Chỉnh sửa lỗi chính tả, thuật ngữ đôi khi chưa chính xác. Cần sử dụng thống nhất tên, thuật ngữ hóa học trong toàn bộ luận văn. Các bảng biểu, hình vẽ đảm bảo Việt hóa.	Đã chỉnh sửa (trang 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 20, 23, 24, 37, 42, 43, 52, 53)
6	Phần tổng quan bổ sung thêm các kỹ	Đã bổ sung (trang 11,12,13, 19,

Lưu ý: Các chữ ký xác nhận cần gắn với nội dung trên cùng một trang giấy. Học viện sẽ không xác nhận nếu phần chữ ký tách rời với nội dung.

	thuật phân tích dạng As và Hg trong các đối tượng sinh học và môi trường, bao gồm kỹ thuật xử lý mẫu.	20)
7	Phân khảo sát thành phần các chất TBAH, SBS, Cys, pH vào thời gian lưu của các dạng. Sau mỗi thí nghiệm cụ thể nên có giải thích về kết quả thu được.	Đã bổ sung (trang 32, 33, 34, 36, 37)
8	Sử dụng độ phân giải để nhận xét và biện luận kết quả khảo sát tuy nhiên không có số liệu tính toán độ phân giải giữa các pic thu được.	Đã bổ sung (trang 32, 33, 34, 36, 37, 38, 41)
9	Bổ sung một số trích dẫn tài liệu tham khảo trong phần tổng quan	Đã bổ sung (trang 11, 12, 13, 19, 20)

Lưu ý: Trong trường hợp Hội đồng yêu cầu xin ý kiến của 02 phản biện sau bảo vệ, học viên cần xin chữ ký của 02 phản biện xác nhận.

Hà Nội, ngày 29 tháng 10 năm 2024

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

HỌC VIÊN






GS.TS. Nguyễn Văn Tuyên

TS. Dương Tuấn Hưng

TS. Bùi Văn Hợi

Bùi Dương Giang

XÁC NHẬN CỦA HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
KT.GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC




Nguyễn Thị Trung

Hà Nội, ngày 18 tháng 10 năm 2024

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 1130/QĐ-HVKHCN ngày 08/10/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Bùi Dương Giang

Tên đề tài: Nghiên cứu phân tích đồng thời dạng As, Hg trong mẫu sinh học và môi trường bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối phổ khối nguyên tử nguồn Plasma cảm ứng cao tần (HPLC-ICP-MS)

Ngành: Hóa phân tích

Mã số: 8 44 01 18

Hôm nay, ngày 18/10/2024 Hội đồng đã họp tại phòng 1513 Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 9h00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

TT	Họ và tên	Chức danh
1.	GS.TS. Nguyễn Văn Tuyến	Chủ tịch
2.	PGS.TS. Từ Bình Minh	Phản biện 1
3.	TS. Hoàng Thị Hương Thảo	Phản biện 2
4.	PGS.TS. Nguyễn Ngọc Tùng	Ủy viên
5.	TS. Nguyễn Lê Anh	Ủy viên- Thư ký

Thành viên vắng mặt:

NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
- Phản biện 1, đọc bản nhận xét luận văn, đặt câu hỏi.

Câu hỏi:

1. Tên cơ sở đào tạo dạy As, Hg bằng HPLC-MS?
2. Giới thiệu thực nghiệm về As, Hg, sử dụng PBA, cystein.
3. Giới thiệu khái niệm sử dụng As, Hg.

bảng phân tích HPLC, ICP-MS

Học viên trả lời

1. Cơ chế tách các thành phần dựa trên độ phân cực
2. T.B.H. này → là một chất lỏng nặng
cysteine này mà ở đây là tá dược → không
có hương
3. Chỉ tăng tỷ lệ 4 dạng phân tử của các loại tủy (các
tỷ lệ khác nhau)

6. Phân biệt 2, đọc bản nhận xét luận văn, đặt câu hỏi

Câu hỏi:

Phân biệt giữa các loại thuốc và các loại thuốc
của phân tích?

Học viên trả lời

$$S/N = \frac{LH}{L}$$

Cơ chế phân biệt và độ nhạy của thuốc

7. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

Câu hỏi:

Học viên trả lời

8. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban:

Ủy viên:

Ủy viên:

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: 5

Số phiếu thu về: 5

Tổng số điểm: 44,6

Điểm trung bình: 8,92

Điểm thưởng công trình công bố: 0

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố:

- Kết luận của Hội đồng: Luận văn Đạt (đạt/không đạt yêu cầu)

- Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công bố:

Không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công bố

8. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

Luận văn có dấu thô sơ, cấp thiết. Các kết quả đạt được có độ tin cậy cao. Định hướng nghiên cứu cấp hạng Thạc sĩ.

Buổi họp đã kết thúc vào 11 giờ 00 phút ngày 18/10/2024

Hà Nội, ngày 18 tháng 10 năm 2024

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

Nguyễn Lê Anh

TS. Nguyễn Lê Anh

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

Nguyễn Văn Tuyên

GS.TS. Nguyễn Văn Tuyên

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung
Nguyễn Thị Trung

