

XÁC ĐỊNH ĐỒNG VỊ KẼM TRONG MẪU SINH HÓA BẰNG PHƯƠNG PHÁP KHỐI PHỔ PLASMA CẢM ỨNG CAO TẦN ICP-MS

Đến tòa soạn 15-09-2022

Nguyễn Thị Dung, Nguyễn Mạnh Hà, Tạ Thị Thảo

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Email: manhhath@gmail.com

SUMMARY

DETERMINATION OF ZINC ISOTOPES IN BIOCHEMICAL SAMPLES BY ICP-MS PLASMA-INDUCED HIGH-FREQUENCY MASS SPECTROMETRY

In this study, a method of determining zinc isotopes (^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn , ^{70}Zn) in biochemical samples by ICPMS inductive plasma mass spectrometry method is mentioned in this study. Analytical samples were treated with a microwave wet inorganic technique for serum samples, urine samples were centrifuged and then using ion-exchange chromatography were cleaned and removed influences. before analysis. Factors affecting zinc isotope analysis were investigated, Plasma high-frequency power 1400W, ion lens potential 9V for 5 individual isotopes, carrier gas flow for 2 isotopes ^{66}Zn and ^{68}Zn is 0, 0. 6L/min and ^{64}Zn , ^{67}Zn and ^{70}Zn are 0.9L/min. Analytical procedures were applied to identify 5 zinc isotopes ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn , ^{70}Zn in the serum and urine samples. The results showed that the ^{70}Zn isotope has a low percentage in nature. Relative error meets the requirement of trace analysis.

Key word: ICP-MS, Zinc isotopes, isotopes analysis.

1. GIỚI THIỆU CHUNG

Kẽm là một chất khoáng vi lượng thiết yếu cho sinh vật và sức khỏe con người [1]. Cơ thể người trưởng thành có khoảng 2–3g kẽm, chiếm khoảng 0,1% nhu cầu hàng ngày thiếu hụt [2]. Thiếu kẽm ảnh hưởng đến khoảng 2 tỷ người ở các nước đang phát triển và liên quan đến nguyên nhân một số bệnh [3]. Ở trẻ em, thiếu kẽm gây ra chứng chậm phát triển, phát dục trễ, dễ nhiễm trùng và tiêu chảy, gây thiệt mạng khoảng 800.000 trẻ em trên toàn thế giới mỗi năm [1]. Ngược lại việc tiêu thụ quá mức kẽm có thể gây ra một số triệu chứng như hôn mê, bất động cơ và thiếu đồng. Kẽm đã được sử dụng theo kinh nghiệm để điều trị nhiều bệnh, kể cả tiêu chảy, trong thế kỷ thứ 19. Bổ sung kẽm được Sachdev và cộng sự đánh giá là can thiệp điều trị đối với bệnh tiêu chảy vào năm 1988, và trong những năm 1990, nhiều nghiên

cứu đã được tiến hành để đánh giá việc bổ sung kẽm đối với bệnh tiêu chảy, viêm phổi, sốt rét, với tăng trưởng và phát triển của trẻ em. Theo nhu cầu dinh dưỡng khuyến nghị cho người Việt Nam cũng như khuyến nghị của FAO/WHO 2002, nhu cầu kẽm hàng ngày cho trẻ 4-6 tuổi là 3,1-10,3mg cho trẻ 7-9 tuổi là 3,3-11,3mg, cho trẻ nam 10-18 tuổi là 5,7-19,2mg và cho trẻ nữ 10-18 tuổi là 4,6-15,5mg tùy theo mức hấp thu tốt (giá trị sinh học kẽm tốt 50%), mức hấp thu vừa (giá trị sinh học kẽm trung bình 30%) và mức hấp thu kẽm kém (giá trị sinh học kẽm thấp 15%) Bệnh lao ở trẻ em là một vấn đề sức khỏe chủ yếu cần quan tâm ở Việt Nam [6]. Ước tính 75% số bệnh nhân lao xảy ra ở trên 22 quốc gia [9]. Việt Nam cũng nằm trong số đó với 5,3% trường hợp bệnh nhân lao là ở trẻ dưới 15 tuổi [5,7]. Biểu hiện bệnh lao có liên quan tới suy giảm nồng độ kẽm huyết thanh ở cả người lớn

và trẻ em [4,13], đồng thời nồng độ này cũng tăng lên ở những trường hợp điều trị có hiệu quả [12]. Kẽm cần thiết về nhiều mặt trong chức năng miễn dịch [2] và người ta đã thấy kẽm làm tăng quá trình sản xuất cytokine trong đại thực bào phế nang ở những bệnh nhân bị lao phổi. Hơn thế nữa, trẻ sau điều trị lao hấp thu kẽm từ khẩu phần ăn tốt hơn so với trẻ khỏe thuộc nhóm biến chứng, điều này gợi ra là nhu cầu kẽm của trẻ bị bệnh lao lớn hơn có thể do nhu cầu kẽm cao hơn của chính hệ miễn dịch. Vì thế bổ sung kẽm có thể cải thiện hiệu quả điều trị lao. Các nghiên cứu về hàm lượng các dạng đồng vị kẽm trong động thực vật còn rất ít, thường mới chỉ tập trung vào mẫu chuẩn [7,12] công bố ^{66}Zn dao động trong khoảng 0 - 0,4% trong não chuột và [10]. cho biết ^{66}Zn chiếm 0,8% trong mô tế bào. Các nghiên cứu về đồng vị kẽm trong cơ thể người mới có thông tin ^{66}Zn chiếm 0,07 - 0,46% trong máu [36]. Trong các đối tượng sinh học, bình thường tỷ lệ các đồng vị bền cũng gần giống với trong tự nhiên. Ví dụ tỷ số hàm lượng các dạng đồng vị kẽm $^{67}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$ trong sữa mẹ là 0,1472, trong máu là 0,1476 và trong huyết tương là 0,1475, gần với tỷ lệ các đồng vị trong tự nhiên của dung dịch chuẩn là 0,1470. Các giá trị trên tương ứng với tỷ số hàm lượng $^{70}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$ lần lượt là 0,0224; 0,0222; 0,0221 còn trong tự nhiên tỷ số này là 0,0222. [8] Sự thay đổi tỷ lệ hàm lượng các đồng vị có liên quan đến các phản ứng bay hơi, ngưng tụ trong quá trình tinh chế kẽm hoặc các chuyển hóa sinh học trong cơ thể sống [11]. Để xác định thành phần đồng vị có thể sử dụng các phương pháp phân tích như kích hoạt neutron, các phương pháp khối phổ dùng nguồn nhiệt. Tuy nhiên, các phương pháp kích hoạt neutron thường không đủ độ nhạy để phát hiện các đồng vị kẽm trong mẫu sinh học và tốn thời gian chiết tách là giàu mẫu. Do vậy, nhiều năm gần đây phổ biến nhất là phương pháp phân tích khối phổ plasma cảm ứng (ICP – MS) [14].

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hoá chất

Dung dịch chuẩn Zn^{2+} có nồng độ 1000 mg/L của hãng Merck. Dung dịch chuẩn để xác định đồng vị : Từ nồng độ dung dịch chuẩn tổng đồng vị của kẽm, dựa trên phần trăm tồn tại các đồng

vị trong tự nhiên lần lượt là ^{64}Zn 48,63% ; ^{66}Zn 27,90% ; ^{67}Zn 4,10% ; ^{68}Zn 18,75% ; ^{70}Zn 0,72% sẽ tính được nồng độ mỗi đồng vị trong dung dịch chuẩn làm việc có chứa tổng nồng độ kẽm.

- Các axit đặc HCL (37%), HNO_3 (65%) pA, Merck.

- Các dung dịch Amoni axetat, NaOH, Nhựa trao đổi ion AG1-X8 (Bio-Rad Cat. No. 140-1441, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), Nhựa Chelex 100 (Cat. No. 142-2832, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

2.2. Thiết bị

- Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử model AA-6800 của hãng Shimadzu Nhật Bản.

- Máy khối phổ cao tần cảm ứng ICP – MS model Elan 9000 – Perkin Elmer của Mỹ.

Các điều kiện phân tích đồng vị kẽm bằng ICPMS được chỉ ra ở bảng 1

Bảng 1. Các tham số tối ưu của máy ICP – MS ELAN 9000

Các tham số	Điều kiện phân tích đồng vị	
	^{66}Zn ^{68}Zn	^{64}Zn ^{67}Zn ^{70}Zn
Tốc độ khí Nebulizer	0,9 L/phút	0,6 L/phút
Công suất plasma	1200W	1400W
Thế thấu kính (LV)	9Volts	
Lưu lượng khí plasma	15,0 L/phút	
Số lần quét khối	10 lần	
Thời gian đo cho 1 lần	5,8 giây	
Số lần đo lặp	3 lần	

2.3. Mẫu phân tích

Các mẫu huyết tương và mẫu nước tiểu được lấy từ trẻ em (9 đến 13 tuổi) bị bệnh lao tại Bệnh viện Phổi Trung ương được điều trị bằng bổ sung viên kẽm 7 mg/viên/ ngày và mẫu đối chứng. Bệnh nhân sau khi uống thuốc 15 phút thì tiến hành lấy mẫu và lấy tất cả các mẫu nước tiểu và phân của bệnh nhân thải ra trong một ngày. Mẫu máu được lấy 1 lần/ngày. Mẫu thu thập xong thì bảo quản ngay trong tủ lạnh sâu – 40°C.

- *Xử lý mẫu huyết tương*; Cân khoảng (1,5-2,5) g mẫu huyết tương trên cân phân tích và chuyển vào các bình Teflon của lò vi sóng. Thêm 4,0 ml HNO₃ đặc. Chương trình phá mẫu, (khoảng 40 phút) với thông số 600W, tăng tới 115 độ C trong 10 phút, giữ ở nhiệt độ này trong 30 phút. Sau khi hoàn tất phá mẫu, để mẫu nguội trong 10 phút. Lấy mẫu ra khỏi lò vi sóng, chuyển mẫu vào bình định mức 50 ml, thêm nước cất đến vạch mức. Tiến hành làm sạch mẫu trước khi phân tích, lấy 10 ml mẫu vừa xử lý trong lò vi sóng đun cho bay hơi mẫu đến gần cạn khoảng 2-3h ở nhiệt độ 150°C để nguội sau đó thêm vào 10 ml HCL 2,5M khuấy đều rồi chuyển mẫu lên cột chiết pha rắn, rửa cột bằng 5 ml HCL 2,5M sau đó rửa tiếp bằng 1 ml HCL 0,5M sau đó tiến hành rửa giải Zn²⁺ ra khỏi cột bằng 10 ml HCL 0,005M dung dịch thu được cho bay hơi phân đoạn tới khô trong cốc Teflon khoảng 2h ở 150°C cho đến khi thu được chất rắn màu vàng nhạt tiến hành thêm 2 ml HNO₃ 1% hòa tan cặn rắn rồi đem đi phân tích ICPMS Công thức tính đồng vị kẽm trong mẫu huyết tương như sau

$$Zn(\mu g / g) = \frac{C_p \times V_1}{a_p} \times n$$

Trong đó: C_p là nồng độ mẫu thực phân tích trên ICP – MS (ppb)

V₁ thể tích mẫu đo ICP-MS (lít)

a_p khối lượng mẫu phân xử lý

n: độ pha loãng trong quá trình xử lý

- *Xử lý mẫu nước tiểu*; Tiến hành giữ đồng hoàn toàn các mẫu nước tiểu. Sau khi giữ đồng xong tiến hành lắc xoáy kĩ. Chuyển 45mL nước tiểu vào 3 ống nghiệm dung tích 15mL. Li tâm mẫu bằng máy li tâm ở 2000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó chuyển từng mẫu nước tiểu trong 3 ống nghiệm 15mL vào chung 1 ống nghiệm 50mL. Thêm 70 µL dung dịch amoni axetat 8M, lắc đều. Điều chỉnh pH đến 5,3 ± 0,1 bằng dung dịch NaOH 3M. Tiến hành tinh chế kẽm trong nước tiểu bằng cách lấy cột chiết đã rửa bằng axit chuyển 2 ml nhựa chelex vào cột thêm 15 ml nước để ion và 7 ml NH₄OH 2M. Tiến hành rửa cột với 30 ml nước để ion rồi chuyển toàn bộ mẫu nước tiểu lên cột cho chảy với tốc độ 2

ml/phút thêm 10 ml dung dịch NH₄AC 1M để loại Ca²⁺ và Mg²⁺, sau đó rửa giải kẽm khỏi cột bằng 15 ml HNO₃ 2,5M vào cốc Teflon làm bay hơi đến khô ở nhiệt độ 150°C khi mẫu khô cho thêm 10 ml HCL 2,5N chuyển lên cột sắc kí trao đổi ion AG1X-8 (đã được cân bằng) rửa cột với 5 ml HCL 2,5M và 1 ml HCL 0,5M cuối cùng rửa giải kẽm ra khỏi cột với 10 ml HCL 0,005M vào cốc Teflon sau đó đem cho bay hơi ở nhiệt độ 150°C cho tới khi có cặn rắn màu vàng nhạt để nguội thêm 2 ml HNO₃ 1% đem đi phân tích bằng ICPMS.

- Công thức tính hàm lượng đồng vị kẽm trong mẫu nước tiểu như sau:

$$Zn(\mu g / ml) = \frac{C_{nt} \times V_2}{V_1} \times n$$

Trong đó: C_{nt} Nồng độ mẫu đo trên máy ICPMS

V₁ Thể tích mẫu nước tiểu ban đầu (ml)

V₂ Thể tích mẫu sau xử lý đo trên ICPMS

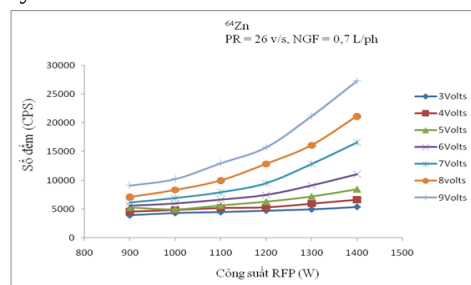
n: Độ pha loãng trong cả quá trình phá mẫu

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

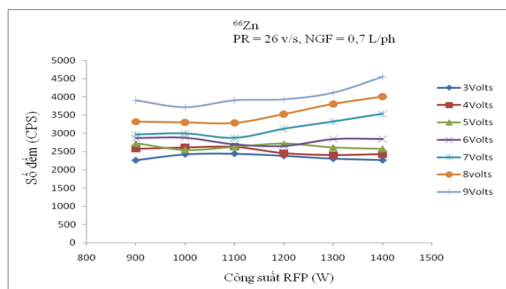
3.1. Tối ưu hóa điều kiện đo đồng vị kẽm bằng ICP-MS

Trong nghiên cứu này, Phép đo các đồng vị kẽm trong mẫu sinh học và đánh giá sự biến đổi hàm lượng của các đồng vị được tiến hành với cả 5 đồng vị ⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn, ⁶⁷Zn, ⁶⁸Zn, ⁷⁰Zn. Vì vậy cần tìm điều kiện tối ưu có thể phân tích đồng thời 5 đồng vị này thông qua việc đánh giá sự phụ thuộc cường độ tín hiệu (CPS) của phép đo vào các tham số hoạt động plasma sao cho đạt được độ nhạy tốt và độ ổn định cao (RSD nhỏ).

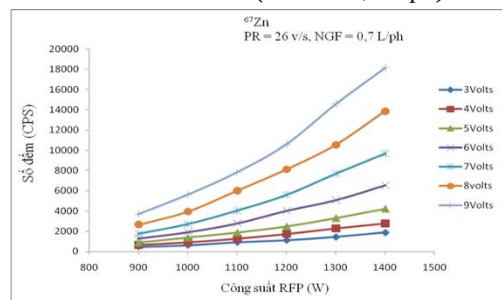
a. *Ảnh hưởng của thể thấu kính*; Kết quả khảo sát sự phụ thuộc của cường độ tín hiệu phép đo hay số đếm (CPS) Zn vào RFP khi xác định các đồng vị ⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn, ⁶⁷Zn, ⁶⁸Zn, ⁷⁰Zn được trình bày từ hình 1.1 đến hình 1.5



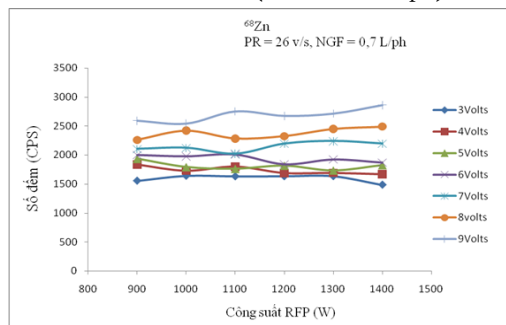
Hình 1.1. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ⁶⁴Zn vào RFD (NGF = 0,7 L/ph)



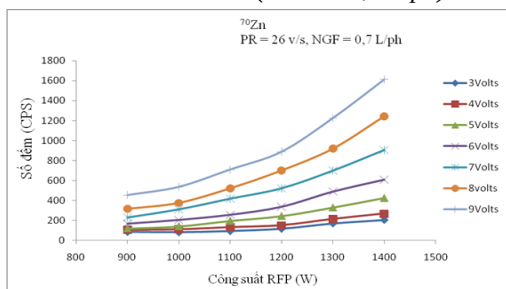
Hình 1.2. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ^{66}Zn vào RFP (NGF = 0,7 L/ph)



Hình 1.3. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ^{67}Zn vào RFP (NGF = 0,7 L/ph)



Hình 1.4. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ^{68}Zn vào RFP (NGF = 0,7 L/ph)



Hình 1.5. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ^{70}Zn vào RFP (NGF = 0,7 L/ph)

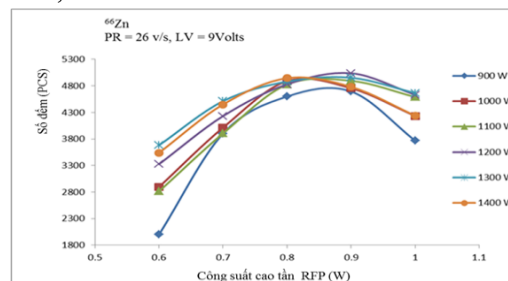
Kết quả biểu diễn sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo các đồng vị kẽm vào công suất cao tần (RFP) khi lưu lượng khí mang (NGF) là 0,7 L/ph từ hình 1.1 đến hình 1.5 cho thấy đối với phép đo các đồng vị ^{64}Zn , ^{67}Zn , ^{70}Zn thì cường độ tín hiệu tăng dần khi RFP tăng từ 900 đến 1400W

(so với giới hạn cho phép của thiết bị đo là 1500W) do khả năng ion hóa mẫu cũng tăng, số lượng ion M^+ hình thành tăng. Thế thấu kính ion càng lớn thì sự tăng tín hiệu khi công suất máy phát cao tần tăng càng nhanh, kèm theo tín hiệu kém ổn định hơn. Tuy nhiên, cường độ tín hiệu các phép đo đồng vị ^{66}Zn , ^{68}Zn lại ít thay đổi. Vì hàm lượng đồng vị ^{70}Zn trong mẫu rất nhỏ nên để tăng độ nhạy của phép đo chúng tôi lựa chọn thế thấu kính ion là 9V (lớn nhất có thể của máy đo) để cường độ tín hiệu phép đo cả 5 đồng vị kèm với các thông số khác nhau đều thu các giá trị là cao nhất.

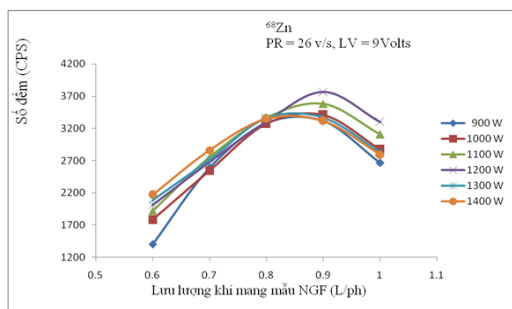
b. Ảnh hưởng của lưu lượng khí mang; Kết quả khảo sát sự phụ thuộc cường độ tín hiệu của phép đo vào NGF khi xác định các đồng vị ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn , ^{70}Zn được trình bày ở các hình từ Hình 2.1 đến Hình 2.5.

Đối với hai đồng vị ^{66}Zn và ^{68}Zn (hình 2.1 và 2.2) khi thay đổi lưu lượng khí mang NGF từ 0,6 – 0,9 L/ph thì cường độ tín hiệu phép đo phổ tăng dần lên, nhưng khi lưu lượng khí mang lớn hơn 0,9 L/ph thì cường độ tín hiệu phổ bắt đầu giảm. Trên đồ thị cho thấy tại NGF = 0,9 L/ph thì cho cường độ tín hiệu phép đo phổ đồng vị ^{66}Zn và ^{68}Zn đạt cực đại. Do vậy chúng tôi chọn lưu lượng khí mang NGF = 0,9 L/ph và vị trí thế thấu kính LV = 9Volts khảo sát để xác định giá trị công suất cao tần RFP tối ưu cho phép đo phổ đồng vị ^{66}Zn và ^{68}Zn .

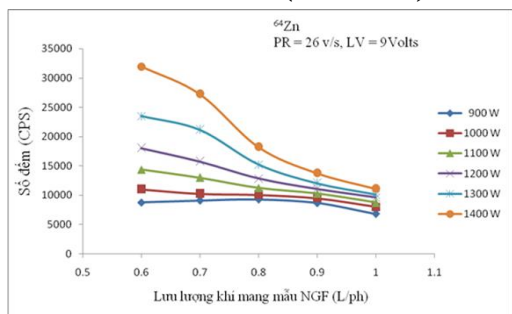
Kết quả khảo sát từ hình P2.3 đến hình P2.5 của các đồng vị ^{64}Zn , ^{67}Zn và ^{70}Zn cho chúng ta thấy khi thay đổi lưu lượng khí mang NGF từ 0,6 – 1,0 L/ph thì cường độ tín hiệu phép đo phổ Zn giảm dần. Với NGF = 0,6 L/ph thì cường độ tín hiệu phép đo phổ các đồng vị ^{64}Zn , ^{67}Zn và ^{70}Zn cho giá trị lớn nhất. Do vậy chúng tôi chọn lưu lượng khí mang NGF = 0,6 L/ph và vị trí thế thấu kính LV = 9V để tiến hành khảo sát công suất cao tần đối với phép phân tích các đồng vị ^{64}Zn , ^{67}Zn và ^{68}Zn .



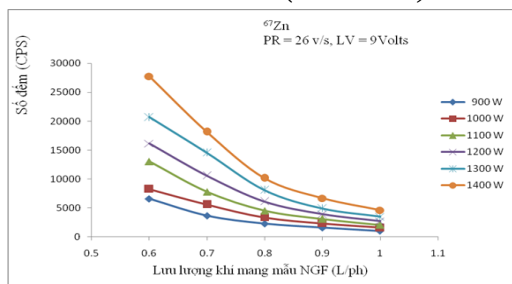
Hình 2.1. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ^{66}Zn vào NGF (LV= 9Volts)



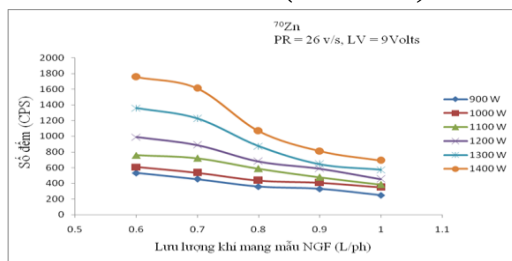
Hình 2.2. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ^{68}Zn vào NGF (LV = 9Volts)



Hình 2.3. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ^{64}Zn vào NGF (LV = 9Volts)

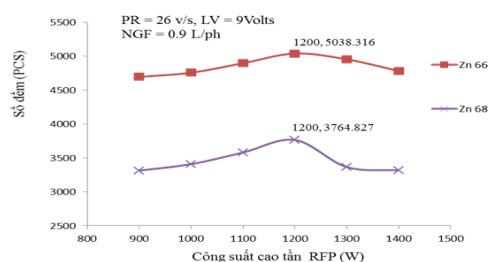


Hình 2.4. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ^{67}Zn vào NGF (LV = 9Volts)

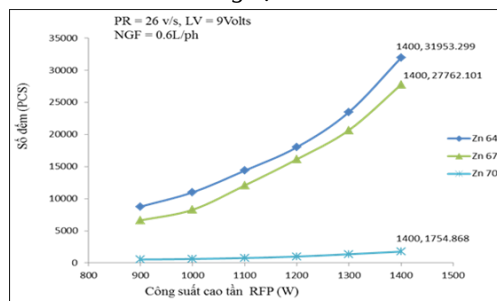


Hình 2.5. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo ^{70}Zn vào NGF (LV = 9Volts)

C Ảnh hưởng công suất cao tần cảm ứng; Để xác định công suất cao tần tối ưu cho các phép đo phổ các đồng vị Zn, trong phần này chúng tôi tiến hành khảo sát sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo phổ vào công suất cao tần RFP cụ thể cho từng đồng vị Zn như sau:



Hình 3.1. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo các đồng vị Zn vào RFP



Hình 3.2. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo các đồng vị Zn vào RFP

Kết quả khảo sát đồ thị hình P3.1 cho thấy khi công suất cao tần tăng từ 900 - 1200 cường độ tín hiệu phép đo tăng điều này có thể giải thích là do khi năng lượng tăng sự hình thành ion của phép đo tăng do đó cường độ tín hiệu phép đo tăng theo. Nhưng khi công suất tăng vượt quá 1200W cường độ tín hiệu phép đo giảm dần nguyên nhân do năng lượng cao dẫn đến sự hình thành nhiều loại ion không mong muốn làm giảm lượng ion của phép đo do vậy cường độ tín hiệu phép đo phổ giảm. Cường độ tín hiệu phép đo đạt cực đại khi RFP = 1200W. Sau khi đã khảo sát các như trên, chúng tôi chọn NGF = 0,9L/ph, RFP = 1200W và LV = 9 Volts cho phép đo phổ xác định 2 đồng vị ^{66}Zn và ^{68}Zn . Biểu diễn sự phụ thuộc cường độ tín hiệu phép đo phổ ^{64}Zn , ^{67}Zn và ^{70}Zn theo công suất cao tần RFP khi NGF = 0,6L/ph (là lưu lượng khí mang tối ưu đã khảo sát ở mục 3.1.1.2) ở hình 3.2 ta thấy, khi tăng công suất cao tần từ 900 – 1400W cường độ tín hiệu phép đo phổ Zn tăng dần. Điều này có thể giải thích khi cố định lưu lượng khí mang và thể thấu kính tăng công suất cao tần làm tăng sự hình thành ion của phép đo do đó cường độ tín hiệu phép đo tăng theo. Cường độ tín hiệu phép đo lớn nhất khi RFP = 1400W. chúng tôi chọn NGF = 0,6L/ph, RFP = 1400W

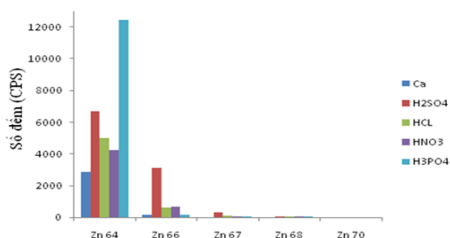
và LV = 9 Volts cho phép đo phổ xác định 2 đồng vị ^{64}Zn , ^{67}Zn và ^{70}Zn .

3.2. Ảnh hưởng của loại axit và nồng độ axit

Trong phương pháp phân tích ICP – MS, có thể dùng môi trường axit HNO_3 hay HCl vì hai loại axit này dễ dàng hóa hơi, còn các axit khác như H_2SO_4 , H_3PO_4 thường không được dung vì axit này hóa hơi rất kém. Các yếu tố của điều kiện môi trường phân tích như nước, khí mang argon và axit có thể tạo thành các mảnh đa nguyên tử, gây nên việc xác định một số đồng vị khi số khối m/z của chúng trùng nhau.

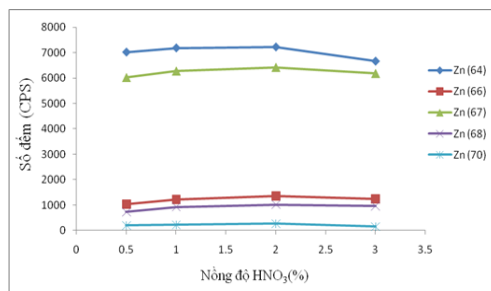
Với phép đo đồng vị kẽm có M/Z⁺ là 64, 66, 67, 68 và 70 thì trong các môi trường khác nhau, ảnh hưởng mảnh ion đa nguyên tử cản trở đến phép đo có thể kể đến là: các mảnh $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$ (nếu đo trong nền H_2SO_4), $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ nếu nền mẫu chứa nhiều thành phần khoáng, $^{31}\text{P}^{18}\text{O}_2\text{H}^+$ (nếu đo trong nền có axit photphoric. Các mảnh ion của đa nguyên tử này trùng với phép đo đồng vị ^{64}Zn . Ngoài ra phép đo đồng vị $^{66}\text{Zn}^+$ sẽ bị ảnh hưởng bởi mảnh $^{31}\text{P}^{18}\text{O}^{16}\text{OH}^+$ [15].

Do vậy cần khảo sát bằng thực nghiệm về ảnh hưởng trực tiếp của nền mẫu đối với phép đo các đồng vị kẽm, đặc biệt và hai đồng vị ^{64}Zn và $^{66}\text{Zn}^+$.



Hình 3.3. Ảnh hưởng trực tiếp của nền mẫu đối với phép đo đồng vị kẽm

Khảo sát ảnh hưởng của nền mẫu vào cường độ tín hiệu của phép đo Kẽm ta thấy được ảnh hưởng của Ca^{2+} nền axit H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4 và HNO_3 ảnh hưởng đến hai đồng vị và ^{66}Zn đặc biệt là ^{64}Zn còn các đồng vị ^{67}Zn , ^{68}Zn , ^{70}Zn hầu như không ảnh hưởng. Mặt khác, hầu hết các dung dịch chuẩn được pha trong môi trường axit HNO_3 . Như vậy HNO_3 được chọn làm môi trường của dung dịch mẫu đo trong tất cả các thí nghiệm.



Hình 3.4. Sự phụ thuộc cường độ tín hiệu của phép đo Zn vào nồng độ axit

Từ kết quả ở hình 3.4. Cho thấy sự ảnh hưởng của nồng độ axit HNO_3 của dung dịch mẫu đến cường độ tín hiệu của phép đo kẽm là không đáng kể trong khoảng từ 0,5% đến 3%. Nhận thấy ở nồng độ axit HNO_3 2% thì tín hiệu của tất cả các đồng vị là cao hơn so với các nồng độ khác và ổn định hơn, do đó môi trường axit của dung dịch mẫu đo được chọn là HNO_3 2%.

3.3. Các đại lượng đặc trưng của phép phân tích

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phép đo được xác định dựa trên tín hiệu mẫu nền là dung dịch HNO_3 2% khi phân tích ở điều kiện đo các đồng vị khác nhau, trong đó LOD được định nghĩa là $3 \cdot S_b/b$ trong khi đó LOQ được tính là $10 \cdot S_b/b$. Các thông số quan trọng khác của phép phân tích như khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác của phép đo được đưa ra trong bảng 2.

Bảng 2. Các đại lượng đặc trưng của phép phân tích đồng vị kẽm bằng phương pháp ICP-MS

TT	Các đồng vị	LOD $\mu\text{g/g}$	LOQ $\mu\text{g/g}$	Khoảng tuyến tính	Độ lặp lại RSD(%)
1	^{64}Zn	3,10	10,3	10-400	0,28
2	^{66}Zn	3,51	11,7	10-400	0,02
3	^{67}Zn	0,97	3,22	10-400	0,01
4	^{68}Zn	4,05	13,5	10-400	0,02
5	^{70}Zn	0,28	0,95	10-400	0,04

3.4. Đánh giá và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Hiệu suất thu hồi (H%) của phương pháp được xác định bằng cách thêm một lượng chuẩn đã biết vào nền mẫu thật không chứa chất phân tích. Chọn một mẫu huyết tương và nước tiểu bất kỳ có nền tương tự mẫu phân tích (mẫu trắng), với điều kiện là không chứa kẽm (xác

thực bằng việc xác định các đồng vị kẽm dựa trên đường chuẩn của từng đồng vị kẽm theo bằng ICP-MS và tổng hàm lượng kẽm bằng AAS sau khi phân hủy mẫu bằng hỗn hợp axit trong lò vi sóng. Kết quả thu được cho thấy tổng hàm lượng 5 đồng vị kẽm xác định theo ICP-MS phù hợp với tổng hàm lượng của kẽm xác định bằng AAS. Hiệu suất thu hồi của từng đồng vị kẽm nằm trong khoảng 90,93% đến 98,54%. Điều này chứng tỏ phương pháp ICP-MS đáng tin cậy để phân tích các đồng vị kẽm trong mẫu sinh hóa.

3.5. Phân tích hàm lượng các đồng vị trong mẫu thực

Với phương pháp phân tích đã được nghiên cứu ở trên, tiến hành phân tích hàm lượng các đồng vị kẽm trong mẫu sinh hóa như mẫu huyết thanh và mẫu nước tiểu.

Mẫu huyết thanh. Tiến hành phân tích 18 mẫu huyết thanh được lấy tại Bệnh viện Phổi Trung ương kết quả được thể hiện ở bảng 3

Bảng 3. Kết quả phân tích đồng vị kẽm trong mẫu huyết thanh

Mẫu	⁶⁶ Zn	⁶⁷ Zn	⁶⁸ Zn	⁷⁰ Zn
HT1	2.25	4.83	6.88	0
HT2	1.55	1.84	3.63	0
HT3	1.97	4.04	2.48	5.86
HT4	1.65	2.47	5.37	0
HT5	1.42	4.7	5.01	0
HT6	1.21	4.34	3.24	0
HT7	1.83	6.99	6.72	0.64
HT8	1.31	2.61	5.63	7.74
HT9	1.42	3.48	6.21	0
HT10	2.03	5.13	7.49	0
HT11	1.65	3.6	5.64	0
HT12	1.46	4.92	3.91	17.61
HT13	1.61	1.8	15.92	3.9
HT14	1.76	5.52	5.97	0
HT15	2.07	3.25	6.94	0
HT16	2.14	2.68	5.43	0
HT17	1.89	2.14	5.32	0
HT18	1.76	2.45	4.89	0

Mẫu nước tiểu. Tiến hành phân tích 18 mẫu nước tiểu được lấy tại Bệnh viện Phổi Trung ương kết quả được thể hiện ở bảng 4

Bảng 4. Kết quả phân tích đồng vị kẽm trong mẫu nước tiểu

Mẫu	⁶⁶ Zn	⁶⁷ Zn	⁶⁸ Zn	⁷⁰ Zn
NT1	2.74	2.54	4.58	0
NT2	1.28	1.47	1.97	0
NT3	1.09	1.02	1.78	0
NT4	1.03	1.15	1.69	0.05
NT5	1.06	1.06	1.52	0.04
NT6	0.68	0.7	1.23	0.14
NT7	0.18	0.21	0.4	0
NT8	0.57	0.58	0.97	0.03
NT9	0.69	0.85	1.35	0
NT10	0.78	0.83	1.57	0.05
NT11	0.43	0.43	0.89	0
NT12	1.29	1.3	2.49	0
NT13	0.57	0.65	1.18	0.03
NT14	0.64	0.66	1.4	0
NT15	0.55	0.57	0.98	0
NT16	0.6	0.62	1.31	0
NT17	0.2	0.62	0.31	0
NT18	0.39	0.46	0.87	0

Từ kết quả thu được khi phân tích hàm lượng các đồng vị kẽm trong mẫu huyết thanh và nước tiểu cho thấy việc bổ sung viên kẽm tăng cường hiệu quả điều trị bệnh lao trên bệnh nhân nhi, việc xác định hàm lượng các đồng vị này rất quan trọng, nó sẽ cho biết mức độ hấp thu và đào thải các đồng vị kẽm có liên quan đến tiến triển trong điều trị bệnh của các bệnh nhân.

4. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu hoá các điều kiện phân tích các đồng vị kẽm trên ICP-MS bao gồm các thông số công suất nguồn plasma, tốc độ khí tạo sol, thế của thấu kính ion. Đã khảo sát sự ảnh hưởng của axit đến phân tích các đồng vị kẽm. Đánh giá các thông số đặc trưng của phương pháp phân tích như khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)... Với kết quả chỉ ra rằng LOD và LOQ của phương pháp phân tích các đồng vị kẽm bằng ICP-MS có thể phân tích trực tiếp các đồng vị này trong các đối tượng mẫu huyết thanh và nước tiểu. Kết quả phân tích thu được là chính xác và đáng tin cậy.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Mã số: **TN.21.09**

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Wolfgang Mareta, Harold H. Sandstead, (2006), Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 20. 3–18

[2] Maggini S, Wintergerst ES, Beveridge S, Hornig DH, (2007), Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br J Nutr*;98 Suppl 1: S29-35

[3] Chloe Nadia Marechal, Philippe Telouk, (2000), Francis Albarede Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology* 156:251–273.

[4] Bogden JD, Lintz DI, Joselow MM, Charles J, Salaki JS, (1977), Effect of pulmonary tuberculosis on blood concentrations of copper and zinc. *Am J Clin Pathol*; 67:251-6

[5] Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC, (1999), Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama*; 282:677-86

[6] Heymsfield SB, McManus C, Smith J, Stevens V, Nixon DW, (1982), Anthropometric measurement of muscle mass: revised equations for calculating bone-free arm muscle area. *Am J Clin Nutr*; 36:680-90

[7] Huong NT, Duong BD, Co NV, et al, (2005), Establishment and development of the National Tuberculosis Control Programme in Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis*; 9:151-6

[8] Krstine Y Patterson and Claude Vellon, (1992), Determination of zinc stable isotopes in biological materials using isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 258: 317-324

[9] Mandalakas AM, Starke JR, (2005), Current Concepts of Childhood Tuberculosis. *Semin Pediatr Infect Dis*; 17:93-104

[10] Marechal CN, Telouk P, Albarede F, (1999), *Chem Geol* 156:251–273

[11] Masaharu Tanimizu, Yoshiki Sohrin, Takafumi Hirata, (2013), Heavy element stable isotope ratios: analytical approaches and applications. *Anal Bioanal Chem* 405:2771–2783

[12] Mohan G, Kulshreshtha S, Sharma P, (2006), Zinc and copper in Indian patients of tuberculosis: impact on antitubercular therapy. *Biol Trace Elem Res*; 111:63-9

[13] Ray M, Kumar L, Prasad R, (1998). Plasma zinc status in Indian childhood tuberculosis: impact of antituberculosis therapy. *Int J Tuberc Lung Dis*;2: 719-25

[14] Lieve I. L. Balcaen, Karel A. C. De Schamphelaere, Colin R. Janssen, Luc Moens, Frank Vanhaecke, (2008), Development of a method for assessing the relative contribution of waterborne and dietary exposure to zinc bioaccumulation in *Daphnia magna* using isotopically enriched tracers and ICP–MS detection. *Anal Bioanal Chem* 390:555–569.

[15] Nancy F. Krebs, Leland V. Miller, Vernon L. Naake, Sian Lei, Jamie E. Westcott, Paul V. Fennessey, and K. Michael Hambidge, (1995), The use of stable isotope techniques to assess zinc metabolism. *J. Nutr. Biochem.* vol.6, 292-301.