

XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH CHÍNH XÁC HÀM LƯỢNG CHÌ TRONG MÁU BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THỤ NGUYÊN TỬ

Nguyễn Thị Mỹ Ninh

Trường Đại học Y Dược – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Ngày nay y học đã khẳng định rằng chì là một nguyên tố độc hại đối với con người. Người bị nhiễm độc chì sẽ mắc một số bệnh nguy hiểm như thiếu máu, đau đầu, chóng mặt, sưng khớp. Để có thể đóng góp vào việc nghiên cứu độc học và điều trị bệnh nhiễm độc chì thì việc xác định hàm lượng chì trong các mẫu sinh học là rất cần thiết. Vì vậy bài báo này xác định mục tiêu xây dựng quy trình phân tích chính xác hàm lượng chì trong máu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử. Nghiên cứu sử dụng hệ thống thiết bị máy quang phổ hấp thụ nguyên tử của Perkin Elmer với chất cải biến nền là: Trilon-X 100 10%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 20% HNO_3 đặc để phân tích hàm lượng chì trong máu trên nhóm người bình thường và người phơi nhiễm chì. Kết quả thu được như sau: Xây dựng thành công phương pháp với độ sai lệch lớn nhất khi phân tích mẫu chuẩn quốc tế không vượt quá 5% so với giá trị chứng chỉ, giới hạn phát hiện đạt $0,37 \mu\text{g/l}$. Từ đó tiến hành phân tích hàm lượng chì trong các mẫu máu tổng số của người bình thường và cho kết quả là hàm lượng chì trong máu có giá trị trung bình đối với nam là $15,37 \pm 6,42 \mu\text{g/l}$, đối với nữ là $11,18 \pm 5,69 \mu\text{g/l}$. Kết quả nghiên cứu trên các nhóm phơi nhiễm chì đều cao hơn so với nhóm bình thường có ý nghĩa thống kê. Các kết quả phân tích chì trong máu đều phù hợp với các chỉ số sinh hóa cận lâm sàng của các đối tượng.

Từ khóa: phân tích chì trong máu; bệnh nhiễm độc chì; ô nhiễm chì; GF- AAS; determination of lead

Ngày nhận bài: 12/6/2019; Ngày hoàn thiện: 04/7/2019; Ngày đăng: 07/8/2019

DEVELOPMENT OF AN ACCURATE ANALYSIS PROCEDURE FOR THE BLOOD LEAD LEVEL BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Nguyen Thi My Ninh

University of Medicine and Pharmacy - TNU

ABSTRACT

Modern medicine has confirmed that lead is a toxic element to human beings. People with lead poisoning will suffer from some dangerous diseases such as anemia, headache, dizziness and joint swelling. In order to contribute to the study of toxicology and treatment of lead poisoning, it is necessary to determine lead content in human biological samples. Therefore, this study's objectives is to develop an accurate analysis procedure for the blood lead level by atomic absorption spectrometry. In this study, Perkin Elmer Atomic Absorption Spectrophotometer System with substratum modifiers of 10% Trilon X-100 and 20% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and HNO_3 was used to analyze the blood lead levels in the normal people and the lead exposed people. The obtained results are as following: the method with the largest deviation is successfully developed when analyzing international standards are not exceed 5% compared to the certificate value. The detection limit is $0.37 \mu\text{g/l}$. Thereby, blood lead levels in total blood samples of normal people are analyzed. The results showed that the mean blood lead levels of men and women are $15.37 \pm 6.42 \mu\text{g/l}$ and $11.18 \pm 5.69 \mu\text{g/l}$, respectively. The blood lead levels of the lead exposed group are higher than that of the normal group with statistical significance. The results of blood lead analysis are consistent with the subclinical biochemical indicators of the subjects.

Keywords: Analysis of lead in the blood; lead poisoning, lead contamination, GF- AAS; determination of lead

Received: 12/6/2019; Revised: 04/7/2019; Published: 07/8/2019

Email: ninhmtn@gmail.com

<http://jst.tnu.edu.vn>; Email: jst@tnu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Cùng với sự phát triển của công nghiệp và đô thị hoá hiện nay, môi trường sống của con người đang bị ô nhiễm nghiêm trọng. Các nguồn thải kim loại nặng từ các khu công nghiệp vào không khí, nước, đất, vào thực phẩm rồi xâm nhập vào cơ thể con người qua đường ăn uống, hít thở dẫn đến hàm lượng của chúng vượt quá giới hạn cho phép (sự nhiễm độc) [1],[2]. Do đó việc xác định hàm lượng các kim loại nặng trong môi trường sống, trong thực phẩm và phân tích tác động của chúng tới cơ thể con người nhằm đề ra các biện pháp tối ưu bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cộng đồng là một việc vô cùng cần thiết. Để có thể đóng góp vào việc nghiên cứu độc học và điều trị bệnh nhiễm độc chì thì việc xác định hàm lượng chì trong các mẫu máu là rất cần thiết. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục tiêu xây dựng quy trình phân tích chính xác hàm lượng chì trong máu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.

2. Phương pháp nghiên cứu.

2.1. Phương pháp nghiên cứu

Hiện nay phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử được dùng phổ biến để phân tích chì trong các mẫu máu. Phương pháp này có ưu việt là quy trình xử lý mẫu đơn giản, độ nhạy và độ chọn lọc cao. Các kỹ thuật nguyên tử hóa thường sử dụng là kỹ thuật nguyên tử hóa bằng ngọn lửa và lò graphit.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử với kỹ thuật nguyên tử hóa bằng lò graphit sử dụng chất cải biến nền là: Trilon-X 100 10%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 20%, HNO_3 đặc để phân tích hàm lượng chì trong các mẫu máu [3].

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu sinh học là mẫu máu của người bình thường và người bị phơi nhiễm chì.

- Nhóm người bình thường là 60 người với 36 nam và 24 nữ.

- Nhóm phơi nhiễm chì là 30 với 22 nam và 8 nữ.

2.3. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu các điều kiện đo phổ hấp thụ nguyên tử của chì.

- Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến phép đo phổ hấp thụ nguyên tử của chì.

- Xây dựng quy trình phân tích chính xác hàm lượng chì trong máu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.

- Phân tích và đánh giá hàm lượng chì trong máu của người bình thường

- Phân tích và đánh giá hàm lượng chì trong máu của người bị nhiễm độc chì.

2.4. Lấy mẫu và bảo quản mẫu

Mẫu máu được lấy qua tĩnh mạch vào buổi sáng, cho vào lọ herparin và bảo quản lạnh ở -20°C , mẫu bảo quản ở điều kiện này có thể ổn định trong vòng một tháng.

Các mẫu máu lấy từ tủ lạnh ra được để rã đông ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, sau đó lắc đều [4].

Chuẩn bị mẫu máu đem đo bằng cách pha loãng mẫu máu theo tỷ lệ 1: 9 với dung dịch cải biến nền gồm Trilon-X 100 0,5%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,2%, HNO_3 0,2%.

Dung dịch cải biến nền được chuẩn bị như sau: Lấy 25 ml Trilon-X 100 10%, 5 ml $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 20%, 1 ml HNO_3 đặc cho vào bình 500 ml và định mức bằng nước cất để được 500 ml. Khi đó được dung dịch Trilon-X 100 0,5%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,2%, HNO_3 0,2% được sử dụng để phân tích mẫu máu.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Phân tích phương sai là phân tích tác động của các yếu tố qua tham số phương sai, nó được dùng nhiều trong các trắc nghiệm để đánh giá những nguồn sai số khác nhau liên quan đến dãy kết quả thí nghiệm. Mục đích của sự phân tích phương sai một yếu tố là đánh giá sự ảnh hưởng của một yếu tố nào đó trên các giá trị quan sát Y_i ($i = 1, 2, \dots, k$).

Trong bài toán phân tích phương sai một yếu tố A, k mức thí nghiệm, mỗi mức nghiên cứu làm lặp lại n lần, chuẩn F được dùng để so

sánh sự sai khác giữa phương sai các giá trị nghiên cứu do sự thay đổi các mức nghiên cứu với phương sai của sai số nghiên cứu có khác nhau đáng tin cậy hay ko. Nếu khác nhau không đáng tin cậy, yếu tố A sẽ ảnh hưởng không đáng kể đến kết quả thí nghiệm, ngược lại nếu khác nhau đáng tin cậy chứng tỏ yếu tố A có ảnh hưởng tới kết quả nghiên cứu.

Trong nội dung nghiên cứu đề ra, chúng tôi sử dụng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố để đánh giá ảnh hưởng của một yếu tố nào đó tới kết quả phân tích [5].

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Các điều kiện đo phổ hấp thụ nguyên tử của chì

Những kết quả nghiên cứu, khảo sát và thu thập từ các tài liệu tham khảo cho thấy phép đo phổ hấp thụ nguyên tử của chì trên hệ thống thiết bị máy quang phổ hấp thụ nguyên tử của Perkin Elmer sẽ cho kết quả tốt nhất với các thông số máy thể hiện ở bảng 1.

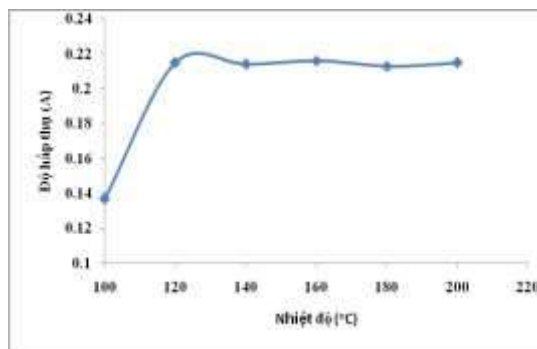
Bảng 1. Các thông số đo phổ của chì

Thông số máy	Nguyên tố chì
Nguồn sáng	Đèn catốt rỗng (HCl)
Bước sóng	283,3 nm
Độ rộng khe đo	0,7 nm
Cường độ dòng đèn catốt rỗng	10 mA
Thời gian đo	5 giây
Thể tích mẫu đo (μl)	20 μl
Kỹ thuật nguyên tử hoá	Lò graphit
Cuvet chứa mẫu	Cuvet graphit

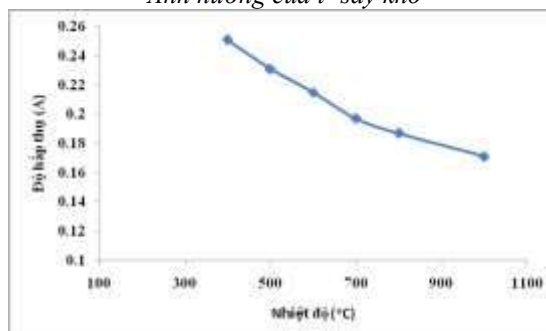
3.2. Khảo sát chương trình nhiệt độ đến phép đo phổ AAS

Để khảo sát nhiệt độ sấy khô, tro hóa luyện mẫu và nguyên tử hóa mẫu cho quá trình đo phổ hấp thụ nguyên tử của chì chúng tôi tiến hành pha nồng độ chì là 20 $\mu\text{g/l}$ để khảo sát, kết quả thu được thể hiện ở hình 1.

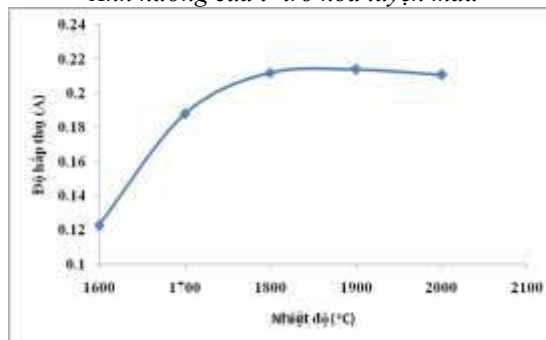
Nhận xét: Tại nhiệt độ sấy khô là 120°C, nhiệt độ tro hóa luyện mẫu là 700°C, nhiệt độ nguyên tử hóa mẫu là 1800°C cho độ hấp thụ của chì cao và độ lặp lại tốt nhất. Do vậy chúng tôi chọn nhiệt độ này để đo phổ hấp thụ của chì.



Ảnh hưởng của t° sấy khô



Ảnh hưởng của t° tro hóa luyện mẫu

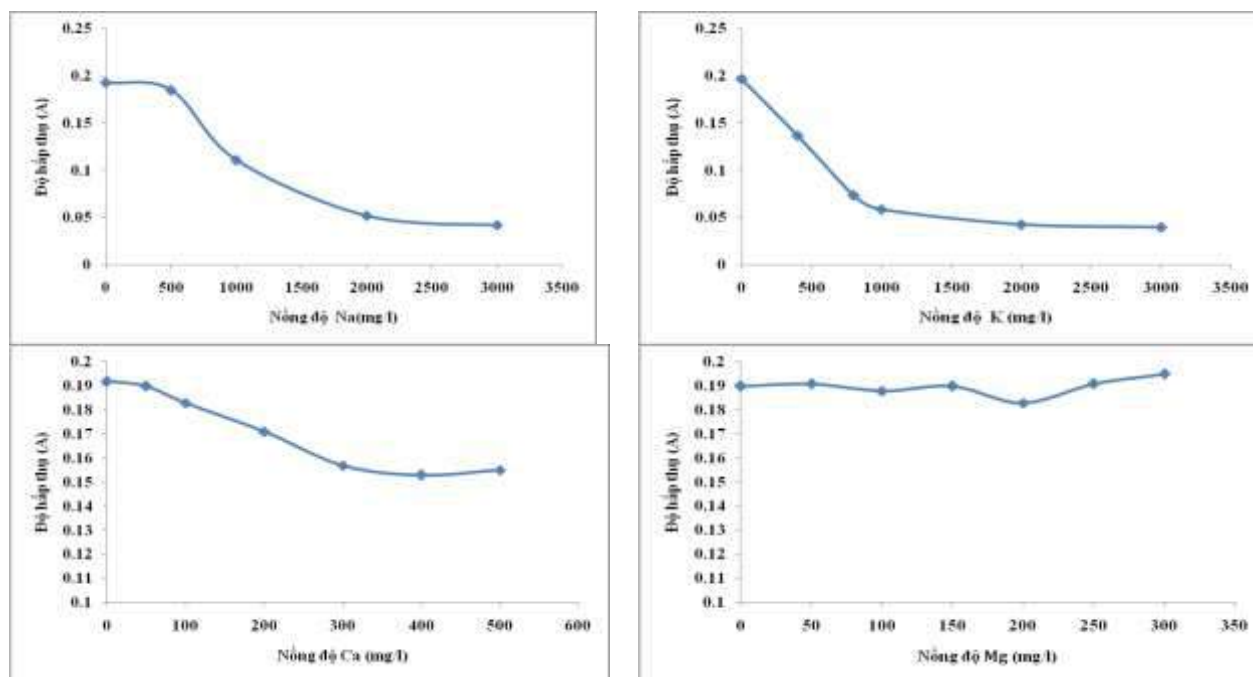


Ảnh hưởng của t° NTH mẫu

Hình 1. khảo sát nhiệt độ sấy khô, tro hóa luyện mẫu và nguyên tử hóa mẫu

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của các nguyên tố đi kèm

Như chúng ta đã biết máu người có thành phần rất phức tạp, vì vậy trước khi xây dựng đường chuẩn để đo hàm lượng của chì trong mẫu máu, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của một số thành phần cơ bản trong máu là các ion: Natri, kali, canxi, magiê đến độ hấp thụ của chì. Kết quả khảo sát thu được ở hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của các nguyên tố đi kèm

Nhận xét: Khi hàm lượng Na, K, Ca thay đổi thì ảnh hưởng đến kết quả đo phổ hấp thụ của chì, khi hàm lượng Mg thay đổi ảnh hưởng không đáng kể đến độ hấp thụ của chì.

3.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tro hóa luyện mẫu khi có cải biến nền

Trong phương pháp hấp thụ nguyên tử nhiều phổ biến nhất là nhiễu hóa học, trong kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử lò graphit chúng xuất hiện là do sự có mặt của một số chất trong dung dịch mẫu có thể tạo ra các hợp chất dễ bay hơi với nguyên tố phân tích ở nhiệt độ thấp nên dễ bị mất trước khi được nguyên tử hóa, dẫn đến giảm độ nhạy. Để giảm bớt các nhiễu hóa học chúng tôi sử dụng các chất cải biến nền (Trilon-X 100 10%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 20%, HNO_3 đặc) với mục đích làm giảm đáng kể sự bay hơi của nguyên tố phân tích, đồng thời làm gia tăng sự bay hơi của nền [6],[7]. Vì vậy chúng tôi khảo sát lại nhiệt độ tro hóa luyện mẫu nhằm tìm ra nhiệt độ tối ưu nhất để loại bỏ bớt thành phần nền, và đồng nhất mẫu phân tích, kết quả khảo sát thu được ở bảng 2.

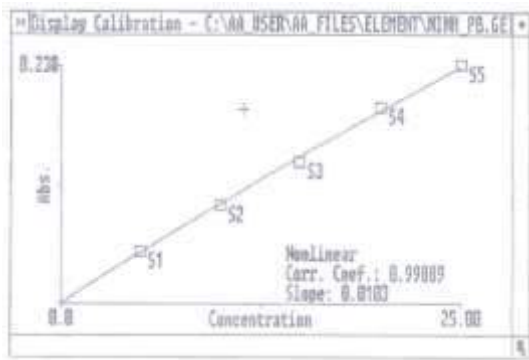
Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tro hóa luyện mẫu khi có cải biến nền

TT	Nhiệt độ tro hóa luyện mẫu (oC)	Độ hấp thụ chì		Độ hấp thụ nền	
		Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 1	Mẫu 2
1	600	0,216	0,219	0,871	0,015
2	700	0,210	0,216	0,334	0,013
3	800	0,217	0,218	0,083	0,011
4	900	0,212	0,208	0,085	0,013
5	1000	0,210	0,212	0,083	0,013

Nhận xét: Tại nhiệt độ 800°C độ hấp thụ của chì là lớn nhất, độ hấp thụ nền là nhỏ nhất, như vậy chọn nhiệt độ 800°C là nhiệt độ tối ưu để đo mẫu chì.

3.5. Xây dựng đường chuẩn để phân tích mẫu máu:

Các kết quả chúng tôi đã khảo sát cho thấy các ion Na, K, Mg, Ca đều ảnh hưởng đến độ hấp thụ của chì. Vì vậy chúng tôi đã lập đường chuẩn trong dung dịch nền là: NaCl (130 mmol/l), KCl (5 mmol/l), CaCl_2 (2,5 mmol/l) và MgCl_2 (0,8 mmol/l) là dung dịch nền tương tự mẫu thật. Đường chuẩn được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Đường chuẩn để phân tích mẫu máu

Đường chuẩn trên có hệ số tương quan 0,99889 và độ dốc là 0,0103. Khoảng tuyến tính của đường chuẩn từ 5 µg/l đến 25 µg/l.

3.6. Giới hạn phát hiện của phương pháp

Để xác định giới hạn phát hiện của phương pháp, chúng tôi tiến hành đo 7 lần mẫu dung dịch chuẩn chì nồng độ 1 µg/l, chấp nhận sự sai khác giữa mẫu chuẩn và mẫu trắng không

Loại mẫu chuẩn	Hàm lượng chì (µg/l)		Độ thu hồi
	Giá trị chứng chỉ (X ± SD)	Kết quả phân tích (X ± SD)	
Whole blood Level Seronorm	2385,5 ± 10,0	376,5 ± 11,0	97,7%

Nhận xét: Phương pháp có độ chính xác cao.

3.8. Kết quả phân tích hàm lượng chì trong mẫu máu trên những người bình thường

Để xác định hàm lượng chì trong máu của người bình thường và đánh giá sự khác biệt theo giới tính, chúng tôi lấy mẫu theo các nhóm đối tượng là cán bộ công tác, đang sống và làm việc tại thái nguyên. Các đối tượng vẫn sinh hoạt và làm việc bình thường, không có bất kỳ biểu hiện của bệnh trong quá trình khám sức khỏe. Kết quả thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Hàm lượng chì trong máu của nhóm đối chứng.

Loại mẫu	Giới tính	Hàm lượng chì
Máu (µg/100ml)	Nam (n=56)	15,37 ± 6,42
	Nữ (n=24)	11,18 ± 5,69

Nhận xét: Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng chì trong máu của cả nam và nữ đều thấp hơn so với tiêu chuẩn đoán phơi nhiễm chì trong môi trường lao động là 50 µg/100ml đối với máu tổng số. Hàm lượng chì trong máu nhóm nam (15,37 µg/100ml) cao hơn nhóm nữ (11,18 µg/100ml) có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

3.9. Kết quả phân tích hàm lượng chì trong mẫu máu trên những đối tượng phơi nhiễm chì

Để xác định hàm lượng chì trong máu của nhóm đối tượng phơi nhiễm chì, chúng tôi tiến hành lấy mẫu máu trên 30 người làm việc tại nhà máy Ac- quy trong phân xưởng chế tạo điện cực chì. Các công nhân có thời gian làm việc trong xưởng sản xuất từ 2-16 năm bao gồm 22 nam và 8 nữ và được điều trị tại trung tâm chống độc bệnh viện bạch mai. Kết quả phân tích được đưa ra ở bảng 5.

đáng kể, các điều kiện đo như khi lập đường chuẩn. Kết quả thể hiện trong bảng 3:

Bảng 3. Kết quả phân tích mẫu chì 1 µg/l

TT	Hàm lượng chì đo được (µg/l)
Đo lần 1	1,09
Đo lần 2	1,11
Đo lần 3	0,97
Đo lần 4	0,96
Đo lần 5	1,07
Đo lần 6	1,11
Đo lần 7	1,07
Trung bình	1,06

Nhận xét: Độ lệch chuẩn (S) : 0,118 Giá trị trung bình: 1,06

Bậc tự do (n-1): 6

Giá trị tra bảng với độ tin cậy 99%: 3,143

GHPH = $t \times S = 3,143 \times 0,118 = 0,37$ (µg/l).

3.7. Đánh giá độ chính xác của phương pháp

Bảng 5. Hàm lượng chì trong mẫu máu trên những đối tượng phơi nhiễm chì

Loại mẫu	Giới tính	Hàm lượng chì
Máu ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Nam (n=22)	$62,15 \pm 13,21$
	Nữ (n=8)	$58,32 \pm 11,22$

Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng chì trong máu của cả hai nhóm đối tượng đều cao hơn so với nhóm đối chứng và vượt tiêu chuẩn chẩn đoán phơi nhiễm chì trong môi trường lao động là $50 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ đối với máu tổng số.

Các kết quả phân tích cũng phù hợp với các kết quả cận lâm sàng của Bệnh viện Bạch mai như chỉ số Delta-ALA niệu đều lớn hơn 10 mg/l , Hồng cầu của các đối tượng đều dưới $3,5 \text{ triệu}/\text{mm}^3$.

4. Kết luận

Qua nghiên cứu chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Xây dựng thành công phương pháp xác định hàm lượng chì trong mẫu máu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử với kỹ thuật nguyên tử hóa bằng lò graphit, sử dụng chất cải biến nền $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,2%, TritonX-100 0,5% và HNO_3 0,2% . Độ sai lệch lớn nhất của phương pháp khi phân tích mẫu chuẩn quốc tế không vượt quá 5% so với giá trị chứng chỉ. Giới hạn phát hiện của phương pháp đạt $0,37 \mu\text{g/l}$.
2. Từ phương pháp xây dựng được đã tiến hành phân tích hàm lượng chì trong các mẫu máu tổng số của người bình thường. Kết quả cho thấy hàm lượng chì trong máu có giá trị trung bình đối với nam là $15,37 \pm 6,42 \mu\text{g/l}$, đối với nữ là $11,18 \pm 5,69 \mu\text{g/l}$. Hàm lượng chì trong máu ở nam cao hơn nữ có ý nghĩa thống kê với $P < 0.01$.

3. Kết quả nghiên cứu trên các nhóm phơi nhiễm với chì đều cao hơn so với nhóm đối chứng có ý nghĩa thống kê và vượt tiêu chuẩn chẩn đoán phơi nhiễm chì trong môi trường lao động. Các kết quả phân tích chì trong máu đều phù hợp với các chỉ số sinh hóa cận lâm sàng của các đối tượng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lê Đức Liêm, *Nghiên cứu xác định hàm lượng và dạng tồn tại vết chì và đồng trong nước biển bằng phương pháp Von – Ampe hòa tan*, Luận án tiến sỹ hóa học, 2004.
- [2]. Đinh Thị Minh Nguyệt, *Nghiên cứu xác định hàm lượng chì trong sữa bằng phương pháp von – ampe hòa tan*, luận văn thạc sỹ khoa học, 2001.
- [3]. Phạm luận, *Phương pháp phân tích phổ nguyên tử*, Nhà xuất bản đại học quốc gia Hà Nội, 2003.
- [4] Các kỹ thuật xét nghiệm sinh hoá, huyết học ứng dụng trong chẩn đoán nhiễm độc nghề nghiệp, Viện Y học lao động và vệ sinh môi trường, 1996.
- [5]. Lê Đức Ngọc, *Xử lý số liệu và kế hoạch hóa thực nghiệm*, Nhà xuất bản đại học quốc gia Hà Nội, 2007.
- [6]. Bùi Minh Lý , *Nghiên cứu nâng cao độ nhạy và độ chính xác của phương pháp đo quang phổ hấp thụ nguyên tử xác định một số nguyên tố có ý nghĩa đối với phân tích môi trường*, Luận án tiến sỹ hoá học.
- [7]. Patricia Grinberg, Reinaldo calixto de Campos, *Iridium as permanent modifier in the determination of lead in whole blood and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B 56,1831-1843, 2001.