

QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH SELEN TRONG MẪU SỮA BẰNG QUANG PHỔ HẤP THỤ NGUYÊN TỬ SỬ DỤNG KỸ THUẬT HIDRUA HÓA (HG-AAS)

LÊ BẢO HƯNG, NGUYỄN KIM THÙY, NGUYỄN THỊ THU LÝ, NGUYỄN THỊ THU HẰNG

I. MỞ ĐẦU

Sữa mẹ là nguồn cung cấp Selen (Se) tốt nhất cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Tuy nhiên lượng Se trong sữa mẹ thường không đủ nên các nhà máy sản xuất sữa đóng hộp thường thêm Se vào trong sản phẩm của mình. Liều lượng Se đưa vào cơ thể nhỏ hơn 40 µg/ngày là hợp lý và nếu lớn hơn 400 µg/ngày sẽ gây ngộ độc. Vì lý do này nên việc kiểm soát lượng Se đưa vào cơ thể hết sức quan trọng [6]. Về nguyên tắc, để xác định Se quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng lò graphit có độ nhạy và độ chính xác cao, nhưng kỹ thuật này lại không hạn chế được sự bay hơi Se trong quá trình đốt. Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử ghép nối thiết bị tạo khí hidrua (HG-AAS) là một trong những kỹ thuật hiệu quả nhất để xác định Se. Đây là phương pháp có độ nhạy cao, kết quả phân tích ổn định và loại trừ được nhiễu của nền mẫu [3], [7]. Phương pháp này cho phép xác định hàm lượng Se thấp mà không cần làm giàu, điều này rất quan trọng trong phân tích lượng vết Se trong mẫu sữa.

Nguyên tắc xác định Se bằng HG-AAS: Se(IV) được khử bởi NaBH₄ trong môi trường axit HCl thành hợp chất H₂Se:



Tiếp theo, hợp chất H₂Se được mang vào buồng nguyên tử hóa của máy AAS bằng dòng khí mang (argon); dùng năng lượng điện làm nguồn duy trì đám hơi nguyên tử của Se; chiếu chùm đơn sắc từ đèn catốt rỗng của Se vào đám hơi nguyên tử, khi đó Se sẽ hấp thụ ở bước sóng 196 nm; chọn đo định lượng cường độ vạch phổ của Se [3], [8], [9] nhờ bộ thu và phân tích phổ hấp thụ.

Bài báo này mô tả chi tiết các công đoạn trong quy trình xác định Se trong mẫu sữa bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng kỹ thuật hydrua hóa đã được chúng tôi nghiên cứu. Để đánh giá quy trình xác định Se, chúng tôi tiến hành phân tích mẫu kiểm tra chéo với phòng thí nghiệm phân tích có năng lực.

II. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ VÀ HÓA CHẤT NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị nghiên cứu

- Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử Spectro AA-220FS hãng Varian.
- Hệ thống tạo hydrua VGA 77.
- Thiết bị vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng Milestone Ethos E.
- Bình khí Argon.
- Cân phân tích.

2.2. Hóa chất và dụng cụ

- Hóa chất sử dụng là các loại tinh khiết của Merck: HNO_3 65%, H_2O_2 30%, HCl 37%, H_2SO_4 96%, HClO_4 70%; NaOH , NaBH_4 .
- Dung dịch chuẩn Se(IV) và Se(VI) gốc nồng độ 1000 ppm.
- Bình định mức, bình tam giác, ống đong, pipet.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chọn các điều kiện đo Se trên máy AAS

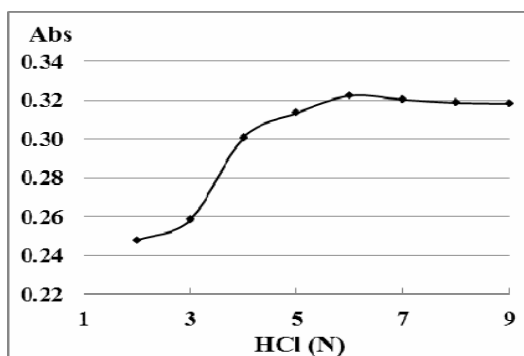
Từ các kết quả nghiên cứu về đo Se trên máy AAS, chọn vạch đo, độ rộng khe đo, cường độ đèn catốt rỗng, nhiệt độ nguyên tử hóa mẫu [1], [3], các điều kiện tối ưu nhất cho phép đo phổ hấp thụ nguyên tử của Se được chọn và chỉ ra trong bảng 1.

Bảng 1. Các điều kiện đo phổ AAS của Se

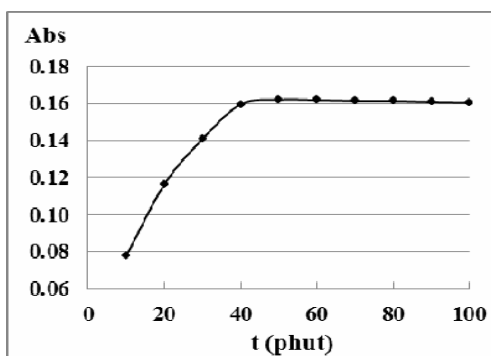
Các điều kiện	Vạch đo (nm)	Độ rộng khe đo (nm)	Cường độ đèn catốt rỗng (mA)	Nhiệt độ nguyên tử hóa ($^{\circ}\text{C}$)
Các giá trị tối ưu	196,0	1,0	10	850

3.2. Khảo sát điều kiện khử Se(VI) về Se(IV)

Quá trình tạo hợp chất H_2Se chỉ tốt và xảy ra hoàn toàn với Se (IV), do đó đầu tiên cần khử Se(VI) về Se(IV) bằng HCl đặc và đun trên bếp điện ở nhiệt độ 90°C [1], [8], [9]. Đã khảo sát nồng độ HCl từ 2N đến 9N và thời gian thực hiện phản ứng khử từ 10 đến 100 phút để tìm được điều kiện thích hợp. Hình 1 và 2 chỉ ra ảnh hưởng của nồng độ HCl và thời gian khử đến độ hấp thụ của sản phẩm Se tạo thành.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ HCl đến độ hấp thụ của Se



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian thực hiện phản ứng khử đến độ hấp thụ của Se

Từ các kết quả thực nghiệm cho thấy: Nồng độ HCl 6N và thời gian thực hiện phản ứng khử là 50 phút đảm bảo khử hoàn toàn Se(VI) về Se(IV) . Kết luận này cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả M. Korenovska [5].

3.3. Khảo sát các điều kiện tạo H_2Se

- Nồng độ HCl môi trường trong phản ứng tạo H_2Se

Muốn tạo được H_2Se tốt, bình phản ứng phải có nồng độ HCl phù hợp để tạo môi trường và đủ để tác dụng với chất khử $NaBH_4$ sinh ra hidro để thực hiện phản ứng tạo H_2Se . Để chọn nồng độ thích hợp, đã tiến hành khảo sát nồng độ HCl từ 1,0N đến 10N (bảng 2, mục N°1). Độ hấp thụ lớn nhất đo được ở nồng độ HCl 8N và nồng độ này được chọn trong phản ứng tạo H_2Se .

- Nồng độ chất khử $NaBH_4$ trong phản ứng tạo H_2Se

Để chọn nồng độ $NaBH_4$ tối ưu, đã khảo sát các mức nồng độ như trong bảng 2 mục N°2. Ở mức nồng độ $NaBH_4$ 0,5% tín hiệu đo tốt nhất. Do đó, trong phản ứng tạo H_2Se nồng độ $NaBH_4$ được chọn là 0,5%.

- Tốc độ bơm axit HCl và chất khử $NaBH_4$

Đã khảo sát tốc độ bơm axit HCl 8N và tốc độ bơm chất khử $NaBH_4$ 0,5% để chọn tốc độ bơm tối ưu nhất. Từ bảng 2 mục N°3 nhận thấy: Tốc độ bơm axit HCl và chất khử $NaBH_4$ là 0,9 ml/phút cho độ hấp thụ tốt nhất. Do đó đã chọn tốc độ bơm axit và chất khử là 0,9 ml/phút.

Bảng 2. Kết quả khảo sát các yếu tố tạo H_2Se

N°1	Ảnh hưởng của nồng độ HCl trong phản ứng tạo H_2Se								
HCl (N)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Abs	0,168	0,258	0,269	0,281	0,306	0,312	0,319	0,318	0,314
N°2	Ảnh hưởng của nồng độ $NaBH_4$ trong phản ứng tạo H_2Se								
$NaBH_4$ (%)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Abs	0,154	0,253	0,258	0,271	0,286	0,282	0,271	0,254	0,240
N°3	Ảnh hưởng của tốc độ bơm HCl và $NaBH_4$								
(ml/phút)		0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	
Abs		0,158	0,173	0,183	0,198	0,213	0,200	0,194	

3.4. Khảo sát điều kiện vô cơ hóa mẫu

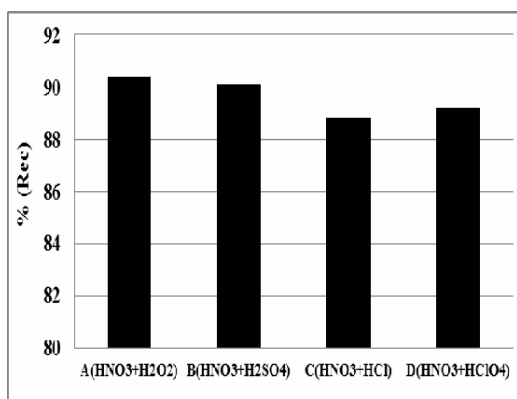
Đã khảo sát hiệu quả của các hỗn hợp axit khác trong giai đoạn vô cơ hóa mẫu sữa với 4 hỗn hợp axit: Hỗn hợp A ($HNO_3 + H_2O_2$); hỗn hợp B ($HNO_3 + H_2SO_4$ 5:2); hỗn hợp C ($HNO_3 + HCl$ 1:3); hỗn hợp D ($HNO_3 + HClO_4$ 5:1) [1], [2]. Cân 1,00 g mẫu sữa vào ống phản ứng, thêm lượng chuẩn của Se đã biết nồng độ vào mẫu, tiếp tục thêm các axit trong các hỗn hợp trên vào mẫu, lắc nhẹ, để phản ứng xảy ra tự nhiên trong 20 phút, đậy nắp ống phản ứng và tiến hành vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng với các thông số đã tối ưu [1] ở bảng 3.

Bảng 3. Các thông số tối ưu áp dụng cho vô cơ hóa mẫu bằng vi sóng

Bước	Năng lượng (W)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
1	500	190	10
2	650	210	10
Làm mát	-	-	20

Mẫu sau vô cơ hóa được lọc và đun để loại HNO_3 dư nhằm giảm thiểu ảnh hưởng của HNO_3 đến quá trình hidrua hóa. Trong quá trình đun mẫu, chất cần phân tích sẽ bị mất do bay hơi nếu đun ở nhiệt độ quá cao hoặc dung dịch bị cạn. Do đó, chỉ đun mẫu tối đa đến nhiệt độ 200°C và thể tích dung dịch mẫu cần được duy trì tối thiểu ở mức 3-5 ml.

Kết quả khảo sát hỗn hợp ôxi hóa và tỷ lệ tối ưu khi vô cơ hoá mẫu được trình bày trong hình 3 và 4.



Hình 3. Hiệu suất thu hồi Se khi vô cơ hóa mẫu bằng các hỗn hợp axit

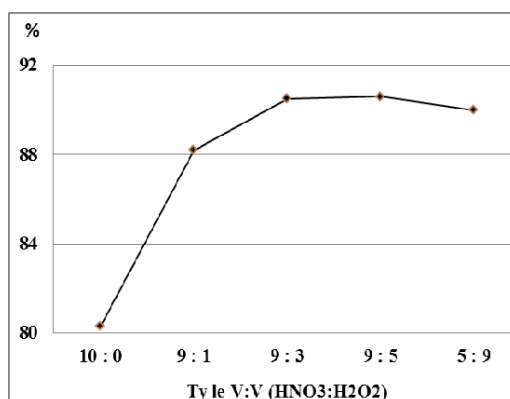
Từ các kết quả thu được nhận thấy:

Hỗn hợp B đạt hiệu suất tương đối cao, nhưng cần hạn chế sử dụng H_2SO_4 do Se có thể có trong nguyên liệu sản xuất H_2SO_4 .

Hỗn hợp C có hiệu suất vô cơ hóa mẫu thấp nhất.

Hỗn hợp D có hiệu suất thu hồi khá. Tuy nhiên do tính độc của HClO_4 nên cần hạn chế sử dụng.

Hỗn hợp A cho hiệu suất cao nhất, có thể do H_2O_2 là tác nhân loại bỏ tương đối tốt HNO_3 dư ra khỏi dung dịch. Đây là một việc rất quan trọng vì HNO_3 dư ảnh hưởng đến quá trình hydrua hóa. Do vậy, việc chọn hỗn hợp $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ để vô cơ hóa mẫu là thích hợp nhất.



Hình 4. Ảnh hưởng tỷ lệ $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ đến hiệu suất vô cơ hóa Se

Đã khảo sát tỷ lệ hỗn hợp $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ để tìm tỷ lệ tối ưu cho hiệu suất vô cơ hóa mẫu cao nhất. Từ kết quả khảo sát trình bày trong hình 4 nhận thấy, tỷ lệ hỗn hợp $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ từ 9:1 đến 9:5 về thể tích cho hiệu suất vô cơ hóa mẫu tốt nhất. Do vậy, đã đề xuất chọn tỷ lệ hỗn hợp $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ là 9:3 cho quy trình vô cơ hóa mẫu phân tích Se.

3.5. Độ đúng, độ lặp, hiệu suất thu hồi của quy trình

Để đánh giá độ đúng, độ lặp, hiệu suất thu hồi của quy trình, đã tiến hành làm thí nghiệm với các mẫu thêm ở 3 mức hàm lượng, mỗi thí nghiệm lặp lại 5 lần. Kết quả thu được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Độ lệch chuẩn tương đối và giá trị thực nghiệm xác định Se

Lượng ban đầu (ng)	Lượng thêm (ng)	Tìm thấy (ng)	Hiệu suất thu hồi (%)	Độ lệch chuẩn (SD)	Độ lệch chuẩn tương đối (%) (n = 5)	Giá trị $t_{\text{tính}}$	Giá trị $t_{\text{bảng}}$
14,5	10	23,3	88,0	2,07	8,9	2,1	2,78
19,7	25	42,3	90,4	4,25	10,1	1,2	2,78
30,0	100	121,8	91,8	12,9	10,6	0,8	2,78

Kết quả ở bảng 4 cho thấy quy trình có hiệu suất thu hồi từ 88,0 đến 91,8%; độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) nhỏ hơn 11%. Như vậy, ở cả 3 mức hàm lượng trên nền mẫu thực phép phân tích đều cho kết quả tốt; các giá trị $t_{\text{tính}}$ đều nhỏ hơn $t_{\text{bảng}}=2,78$ với $P = 0,95$; $n = 4$ (theo chuẩn Student) chứng tỏ không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa giá trị thực và giá trị tìm được hay phương pháp không mắc sai số hệ thống và có thể dùng để xác định Se trong mẫu sữa [4].

3.6. Tính giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Tiến hành thí nghiệm đo dãy dung dịch chuẩn Se có nồng độ: 0, 2, 5, 10, 15, 20 ppb (mỗi mức nồng độ đo lặp lại 7 lần).

Phương trình đường chuẩn thu được của Se:

$$\text{Abs} = 0,00519 + 0,01813 \cdot [\text{Se}]$$

Độ lệch chuẩn mẫu trắng $S_b = 0,0024$.

Giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ được tính theo công thức sau [4]:

$$L O D = \frac{3 \cdot S_b}{b}; \quad L O Q = \frac{10 \cdot S_b}{b}$$

Tính được giới hạn phát hiện là 0,4 ppb, giới hạn định lượng là 1,0 ppb.

3.7. Đánh giá quy trình phân tích

Đã đánh giá quy trình phân tích đã xây dựng bằng cách gửi mẫu kiểm tra chéo với phòng thí nghiệm phân tích có năng lực của khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên Hà Nội. Các mẫu dùng cho phân tích kiểm tra chéo được chia làm 2 phần như nhau; phần mẫu gửi đi được xử lý trên thiết bị vi sóng và tiến hành phân tích trên thiết bị ICP-MS; phần mẫu còn lại được tiến hành phân tích tại phòng thí nghiệm trên thiết bị AAS theo quy trình đã xây dựng và so sánh kết quả phân tích giữa 2 phòng thí nghiệm. Kết quả chỉ ra ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả phân tích mẫu kiểm tra chéo

Mẫu	M1 (mg/g)		M2 (mg/g)		M4 (mg/g)		M5 (mg/g)	
Se	Theo AAS	Theo ICP-MS	Theo AAS	Theo ICP-MS	Theo AAS	Theo ICP-MS	Theo AAS	Theo ICP-MS
	0,2569	0,2512	0,2136	0,2175	0,1003	0,0912	0,1536	0,1501

Từ các kết quả ở bảng 5, tính các giá trị độ lệch giữa 2 phương pháp theo các công thức sau [4]:

$$d_i = C_{pp \text{ so sánh}} - C_{pp \text{ nghiên cứu}}$$

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i ; S_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n - 1}} ; t_{tính} = \frac{|\bar{d}| \sqrt{n}}{S_d}$$

Các kết quả tính toán được trình bày trong bảng 6.

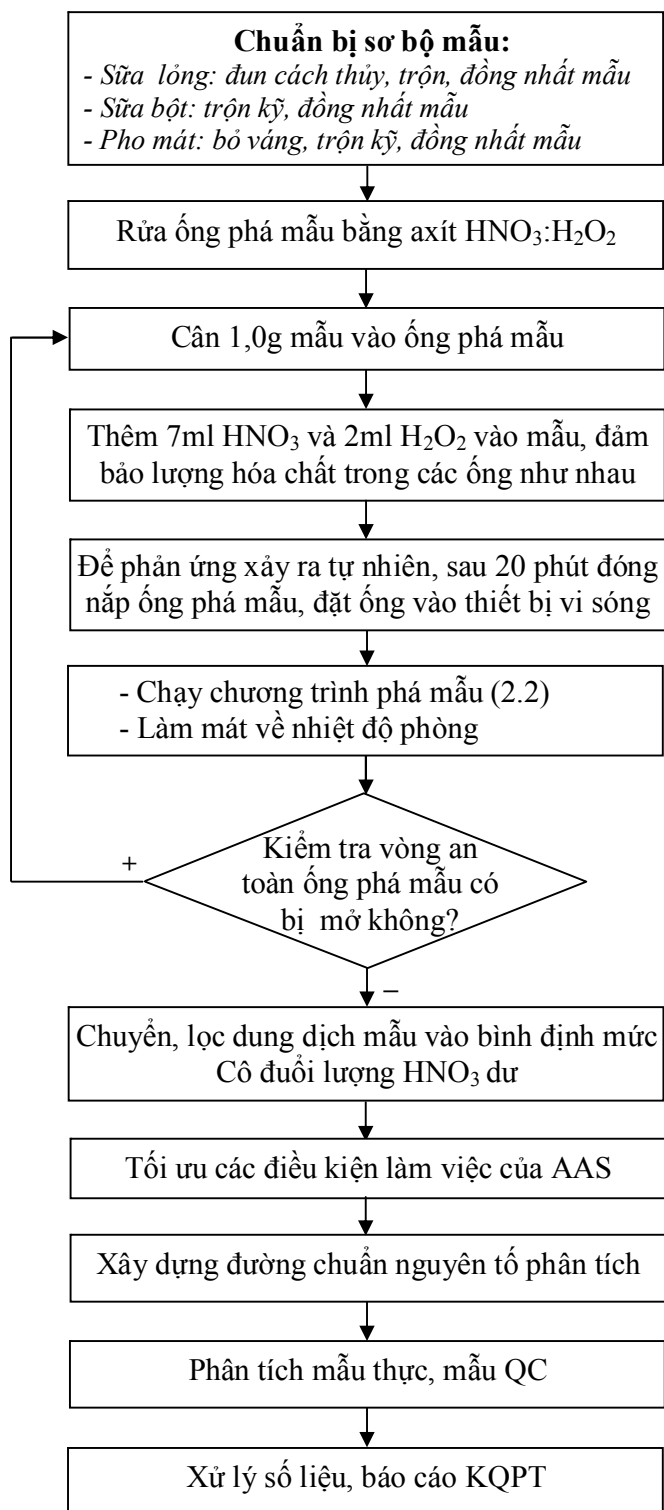
Bảng 6. Giá trị độ lệch, độ lệch trung bình, độ lệch chuẩn và $t_{tính}$

Nguyên tố	d_1	d_2	d_3	d_4	d_{tb}	S_d	$t_{tính}$	$t_{bảng}$ ($P=0,95; n=3$)
Se	- 0,0057	0,0039	- 0,0091	- 0,0035	- 0,0036	0,0055	1,31	3,18

Từ bảng 6 nhận thấy: Giá trị $t_{tính} < t_{bảng}$, như vậy quy trình xây dựng có độ đúng như quy trình chuẩn hay kết quả phân tích theo quy trình xây dựng là tin cậy và hoàn toàn phù hợp [4].

3.8. Quy trình phân tích

Trên cơ sở kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi đề xuất quy trình phân tích Se trong mẫu sữa như sau:



Hình 5. Sơ đồ quy trình phân tích Se trong mẫu sữa

IV. KẾT LUẬN

1. Đã xây dựng được quy trình xác định Se trong mẫu sữa bằng phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng kỹ thuật hydrua hóa, sử dụng hỗn hợp $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ tỷ lệ 9:3 để vô cơ hóa mẫu, thực hiện khử Se(VI) về Se(IV) bằng HCl 6N trong 50 phút, sử dụng nồng độ NaBH_4 và HCl trong phản ứng tạo H_2Se lần lượt là 0,5% và 8N; tốc độ bơm HCl và NaBH_4 vào bình phản ứng là 0,9 ml/phút.

2. Quy trình có độ chính xác cao, độ lặp tốt với độ lệch chuẩn tương đối nhỏ hơn 11%, hiệu suất thu hồi Se đạt từ 88,0 đến 91,8%. Giới hạn phát hiện của Se là 0,4 ppb phù hợp với yêu cầu trong phân tích mẫu thực. Áp dụng quy trình đã xây dựng để phân tích kiểm tra chéo 4 mẫu sữa. Kết quả so sánh với quy trình phân tích bằng ICP-MS cho thấy quy trình phân tích Se trong sữa bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng kỹ thuật hydrua hóa hoàn toàn tin cậy được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Bảo Hưng và cs, *Nghiên cứu xây dựng quy trình xác định hàm lượng Na, Ca, Mg, Zn, P, Fe, Mn, Cu, Pb, Cd và Se trong sữa và sản phẩm sữa bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử*, 2012, Báo cáo tổng kết đề tài cấp TTND Việt - Nga.
2. Phạm Luận, *Giáo trình Những vấn đề cơ sở của các kỹ thuật xử lý mẫu phân tích*, Hà Nội, 2004, Phần 1: Những vấn đề cơ sở lý thuyết.
3. Phạm Luận, *Phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử*. NXB Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội, 2010, tr.55-128.
4. Tạ Thị Thảo, *Giáo trình Chemometrics*, Đại học Khoa Học Tự Nhiên - Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội, 2005, tr.45-94.
5. M. Korenovska, *Optimization of selen determination in vegetables, fruits and dairy products by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry*, 2003, Chem. pap, Vol 57, p.155-157.
6. Mariela Piston and Moise Knochen, *Determination of total selen in infant formulas*, International journal of analytical chemistry, 2012, Vol 2012, p.7.
7. Marijana matek and et al, *Comparison of two methods using atomic absorption spectrometry for determination of selenium in food*, Arh hig tosikol, 1999, Vol 50, p.283-288.
8. US. EPA 7441A: *Selen (Atomic Absorption, Gaseous Hydride)*, US. Environmental Protection Agency, 2002, p.1-5.
9. US. EPA 7442: *Selen (Atomic Absorption, Borohydride Reduction)*, US. Environmental Protection Agency, 2002, p.1-8.

SUMMARY

THE PROCESS OF DETERMINING SELENIUM IN MILK BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY USING HYDRIDE GENERATION TECHNIQUE (HG-AAS)

This article shows the process of quantifying selenium by atomic absorption spectrometry using hydride generation technique (HG-AAS) for milk samples. It was found that in the process, the optimized conditions to form H_2Se are the most important to ensure reliable results. In the method Se (VI) is reduced to Se (IV) with 6N HCl. It also presents the reaction conditions to form H_2Se (0,5% $NaBH_4$ and 8N HCl; the velocity of acid and reductant to gas/liquid separator of 0.9 ml/min) and the most suitable samples digestion mixture ($HNO_3:H_2O_2$ with volume ratio of 9:3). The resulting procedure has high accuracy, sensitivity and repeatability (%RSD < 11%, the recovery of selenium is from 88,0 to 91,8 %, LOD is 0.4 ppb), and being proposed to analyse selenium in real milk samples.

Từ khoá: Hydride generation / Atomic absorption spectrometry (HG-AAS), determination of selen in milk, conditions of reactions to form H_2Se

Nhận bài ngày 23 tháng 4 năm 2013

Hoàn thiện ngày 18 tháng 6 năm 2013

Phân viện Hóa - Môi trường, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga