

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH DẠNG TỒN TẠI CỦA ASEN (As) TRONG ĐẤT, RAU MÁ (*CENTELLA ASIATICA*) VÀ CẢI XANH (*BRASSICA JUNCEA*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THU NGUYÊN TỬ (AAS) KỸ THUẬT HYDRUA HÓA (HG)

Đến Tòa soạn 19-01-2007

NGUYỄN THỊ KIM PHƯỢNG¹, NGUYỄN THỊ DUNG¹, NGÔ KIM LIÊN²

¹Viện Công nghệ Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Cần Thơ

SUMMARY

Due to the high toxicity of arsenic and the poison effects to human being, identification and quantification of individual arsenic forms are important to appropriately measure the arsenic toxicity, environmental impact and health risk related to arsenic exposure. Arsenic species were quantified by HPLC-UV-HG-AAS. The separation was performed on an anion exchange Hamilton PRP-X100 (250 mm x 4,1 mm i.d. x 10 μm) column by using mobile phase A: 12 mmol/l KH₂PO₄-K₂HPO₄; pH = 6.5 and B: 24 mmol/l KH₂PO₄-K₂HPO₄; pH = 6. The detection limits of arsenic species (As³⁺, DMA, MMA, As⁵⁺) with HPLC-UV-HG-AAS system was 5 ppbAs. The results indicated that arsenic presented in soil solution is arsenate As(V) and no methylation of arsenic taken place in the soil. There is a reduction of As(V) to As(III) in the root of Pennywort and Cabbage. Arsenic accumulation in the root of these plants was As(III) and no methylation of arsenic taken place in these plants.

I - MỞ ĐẦU

Ở Việt Nam, vấn đề ô nhiễm asen (As) đang đe dọa sức khỏe hàng triệu người trong những năm qua. Kết quả phân tích mẫu nước giếng khoan khu vực phía Bắc (Hà Nội, Hà Tây, Hà Nam...) cho thấy hơn 90% mẫu nước giếng khoan ô nhiễm asen (As) [1]. Tại đồng bằng sông Cửu Long, cũng phát hiện nước ngầm của các tỉnh như: An Giang, Đồng Tháp, Sóc Trăng... có mức độ ô nhiễm As rất cao [1].

Độc tính và tính linh động của As phụ thuộc rất nhiều vào dạng hóa học của As. Trong khi As vô cơ là chất gây ung thư thì As hữu cơ: monometyl asen (MMA) và dimetyl asen (DMA) là chất kích thích ung thư [6,7], và độc

tính của dạng As(III) vô cơ thì cao hơn nhiều lần so với As(V) cùng loại ở cùng nồng độ [6,7]. Vì vậy, việc xác định từng dạng riêng biệt của As trong mẫu thực phẩm rau là rất quan trọng, góp phần đánh giá một cách khoa học độc tính và nguy cơ gây hại của As cho sức khỏe con người qua nguồn thực phẩm.

Tách xác định trực tiếp dạng As bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) liên hợp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) kết hợp xử lý bằng tia UV là phương pháp phân tích hiện đại có độ chính xác cao và tin cậy cao được sử dụng trong nghiên cứu này.

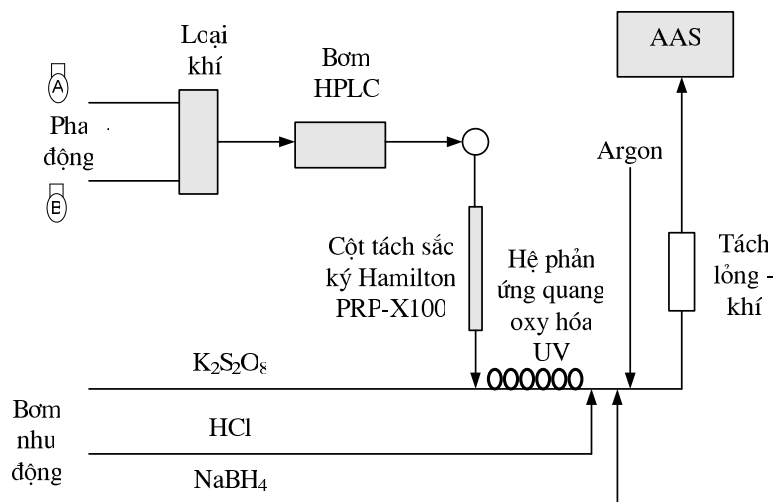
II - THỰC NGHIỆM

1. Hóa chất

- Chất chuẩn As: NaAsO_2 (As^{3+}), $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (As^{5+}), DMA ($\text{C}_2\text{H}_6\text{AsO}_2\text{Na}$) Fluka; MMA ($\text{CH}_3\text{NaHAsO}_3$) Sigma.

- Hóa chất khác: metanol, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ và $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, HCl, NaOH Merck.

2. Thiết bị



Hình 1: Sơ đồ phân tích liên tục trực tiếp các dạng As bằng kỹ thuật ghép HPLC-UV-HG-AAS

3. Chuẩn bị mẫu phân tích

- Rau má và rau cải xanh trồng trên đất ô nhiễm As (35 mg/kg), thu hoạch sau 45 ngày, mẫu được rửa sạch bằng nước cất để loại bỏ đất và bụi bẩn. Dùng dao nhựa tách riêng phần rễ và phần lá, sấy khô 60°C trong 72 giờ. Tương tự như vậy hai loại rau má và cải xanh cũng được trồng trên đất nền khô ô nhiễm As để đối chứng.

- Quy trình xử lý mẫu: (1) Vô cơ hóa mẫu bằng hỗn hợp axit $\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (10:3), ở 165°C trong 5 phút trên thiết bị vi sóng (MarsX 5 plus, CEM, Mỹ). Định lượng hàm lượng As tổng trên thiết bị AAS kỹ thuật hydrua hóa. (2) Tách chiết dạng As dễ tan trong đất và rau [3]:

- Chiết dạng As dễ tan trong đất bằng dung dịch H_3PO_4 0,5 M.

- Chiết dạng As dễ tan trong mẫu rau bằng hỗn hợp dung môi metanol: nước (1:1), ở nhiệt độ 75°C , trên thiết bị vi sóng (MarsX 5 plus, CEM, Mỹ).

- Xác định dạng As dễ tan bằng kỹ thuật ghép HPLC-UV-HG-AAS.

4. Điều kiện phân tích dạng As bằng phương pháp HPLC-UV-HG-AAS [9]

HPLC: Cột tách sắc ký: Hamilton PRP-X100 (250 mm \times 4,1 mm i.d. \times 10 μm)

Pha động A: 12 mmol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$; pH = 6,5. B: 24 mmol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$; pH = 6. Tốc độ dòng pha động: 1 ml/min.

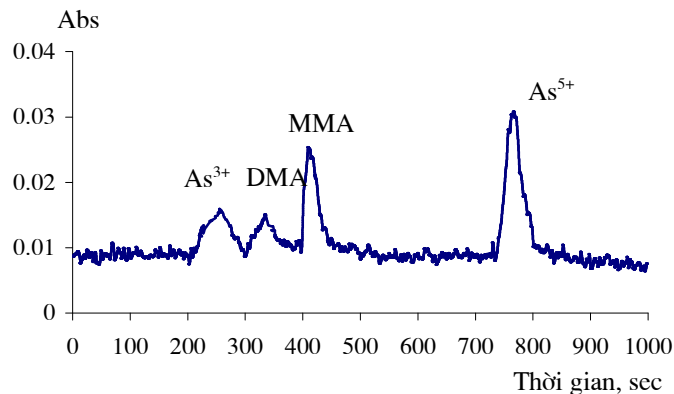
Hóa hơi hidrit HG: Tốc độ NaBH_4 : 2,5 ml/min; Tốc độ HCl 4M: 1,6 ml/min; Tốc độ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: 1 ml/min; Tốc độ khí mang Argon: 50 ml/min.

AAS: Bước sóng 193,7 nm; Khe sáng: 5 nm; Cường độ dòng đen catot rộng: 12 mA.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. HPLC-UV-HG-AAS của các dạng tồn tại của asen

Sau khi phân tích xác định thời gian lưu của từng chất chuẩn riêng biệt, tiến hành tách phân tích hỗn hợp 4 chất chuẩn As(III), As(V), DMA và MMA hình 2. Thứ tự giải hấp khỏi cột tách sắc ký tùy thuộc vào giá trị pK_a và được kiểm soát bởi pH của pha động [4]. Với các điều kiện sắc ký như trên các dạng của As sẽ bị rửa giải ra khỏi cột theo thứ tự As^{3+} , DMA, MMA và As^{5+} .



Hình 2: Sắc ký đồ của các dạng As (5ppb tính theo As cho mỗi dạng)

2. Dạng As trong đất và trong rau

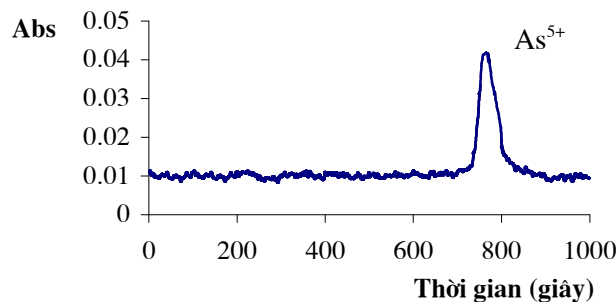
a) Dạng As trong đất ô nhiễm As

Kết quả phân tích định dạng As dễ tan trong đất được trình bày trong bảng 1 và hình 3.

Bảng 1: Dạng As dễ tan trong đất trồng rau

Mẫu	Dạng As (mg/kg)			
	As ³⁺	DMA	MMA	As ⁵⁺
Đất ô nhiễm trước khi trồng rau	KPH	KPH	KPH	6,46

KPH: Không phát hiện.



Hình 3: Dạng As dễ tan trong đất

Trong thí nghiệm này, đất trồng rau được xử lý với muối NaAsO₂ nồng độ 35 ppm As. Kết quả phân tích As sau 30 ngày ổn định cho thấy có khoảng 18 đến 19% As tan vào dung dịch đất và bị oxi hóa thành As(V). Kết quả xác định dạng As dễ tan trong đất được trình bày trong hình 3 đã khẳng định không phát hiện có quá trình metyl hóa As trong thời gian ủ đất. Điều đó cho thấy, đất ô nhiễm As trong điều kiện thoáng khí, bị oxi hóa thành As(V) mặc dù gây

ô nhiễm là dạng As(III). As dễ tan sẽ đi vào dung dịch đất và đây chính là nguồn lan truyền, hấp thu bởi cây trồng.

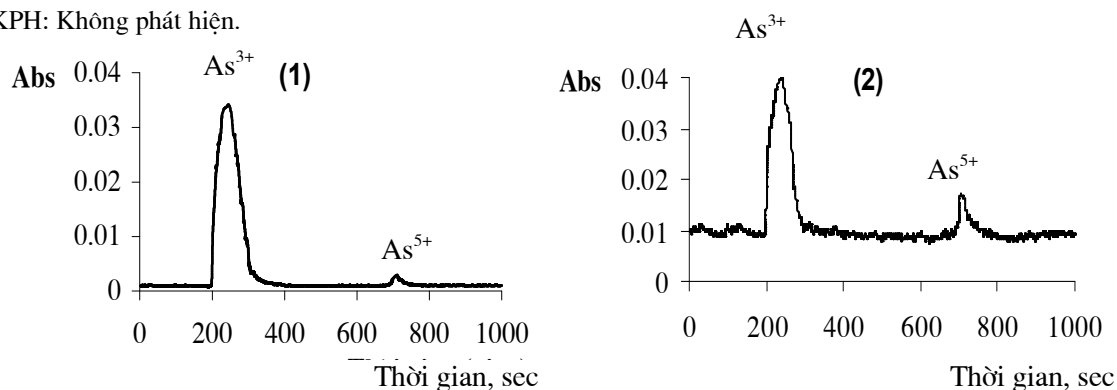
b) Dạng As trong rễ cây rau má và cải xanh

Để trả lời cho câu hỏi As (V) từ đất bị hấp thu bởi cây trồng sẽ chuyển đổi dạng như thế nào? Đã tiến hành xác định dạng As trong rễ, lá rau má và cải xanh. Kết quả phân tích trình bày trong bảng 2 và hình 4.

Bảng 2: Dạng arsen dễ tan trong rễ rau má và cải xanh

Mẫu	Dạng As (mg/kg)			
	As ³⁺	DMA	MMA	As ⁵⁺
Rễ rau má	1,70	KPH	KPH	0,06
Rễ cải xanh	37,00	KPH	KPH	6,64

KPH: Không phát hiện.



Hình 4: Các dạng As trong rễ cây rau mọc trên đất ô nhiễm As
(1) Rễ cải xanh; (2) Rễ rau má

Các thể hiện trên sắc ký đồ ở hình 4 đã khẳng định chỉ có As dạng vô cơ trong rễ cây và đã có sự khử As(V) về As(III) trong rễ cây rau. Kết quả cho thấy hàm lượng As(III) cao hơn As(V). Điều này có thể giải thích như sau: trong đất, As là một oxyanion AsO_4^{3-} đóng giả vai trò của PO_4^{3-} , cạnh tranh với photphat để đi vào trong rễ, nó được vận chuyển ngang qua màng huyết tương theo hệ thống vận chuyển photphat [2]. Tại rễ, đã xảy ra quá trình khử As và sự khử As trong rễ của hai loại rau này rất đáng kể, có đến 92% As trong rễ rau má và 81% As trong rễ rau cải xanh ở dạng As(III) so với tổng lượng As được chiết bằng hỗn hợp dung môi

metanol/nước.

Những kết quả thu được còn cho thấy trong khi trong rễ rau má hàm lượng As(III) cao gấp 28 lần As(V), thì trong rễ cải xanh chỉ cao hơn từ 5 đến 6 lần; cho dù, cải xanh hấp thu và tích lũy As nhiều hơn rau má. Điều đó chứng tỏ mức độ khử As(V) của cây rau cải thấp hơn so với rau má. Tuy có sự khác nhau như vậy nhưng quy luật chung trong rễ của hai loại rau này chủ yếu là As(III) vô cơ.

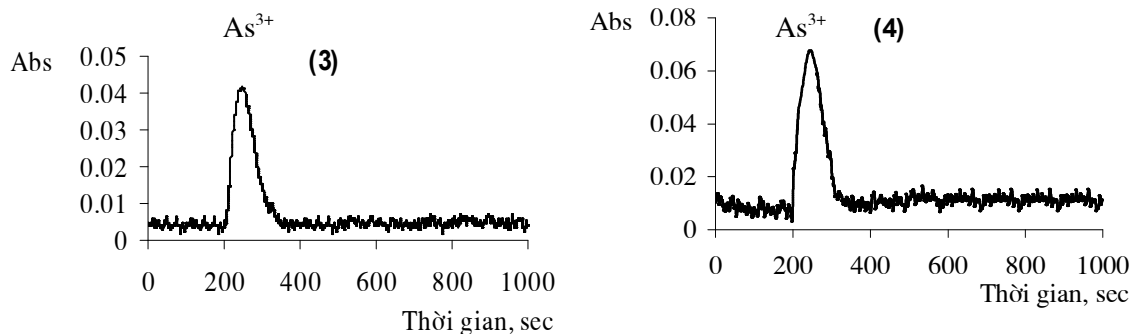
c) Dạng As trong lá rau má và cải xanh

Kết quả xác định dạng As trong lá rau má và cải xanh trình bày trong bảng 3 và hình 5.

Bảng 3: Dạng arsen dễ tan trong lá rau má và cải xanh

Mẫu		Dạng As (mg/kg)			
		As ³⁺	DMA	MMA	As ⁵⁺
Lá rau má	Ô nhiễm	1,12	KPH	KPH	KPH
	Đối chứng	0,16	KPH	KPH	KPH
Lá cải xanh	Ô nhiễm	21,66	KPH	KPH	KPH
	Đối chứng	KPH	KPH	KPH	KPH

KPH: Không phát hiện.



Hình 5: Các dạng As trong lá rau mọc trên đất ô nhiễm As
(3) Lá cải xanh; (4) Lá rau má

Từ kết quả phân tích cho thấy không phát hiện có quá trình metyl hóa As trong lá rau má và cải xanh nhằm làm giảm độc tính của As. Và trên sắc ký đồ chỉ có duy nhất 1 pic đặc trưng cho dạng As (III) vô cơ. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây chứng minh rằng thực vật bậc cao mọc trên đất không có khả năng metyl hóa As giống như thực vật bậc thấp: nấm, địa y, tảo... [5]. Kết quả này cũng giải thích cho hiện tượng hàm lượng As vô cơ trong thực vật bậc cao trồng trên đất ô nhiễm [5, 8]. Dựa vào kết quả phân tích có thể dự đoán: Hoặc đã có sự khử hoàn toàn As(V) thành As(III)

trong quá trình As di chuyển từ rễ lên lá; Hoặc chỉ có As(III) di chuyển lên lá.

Để làm sáng tỏ dự đoán trên đã tiến hành xác định và so sánh lượng As dễ tan và tổng As có trong cây. Kết quả phân tích lượng As dễ tan được trình bày trong bảng 4.

Từ kết quả trên cho thấy, lượng As dễ tan trong cây rau má thấp hơn so với rau cải xanh, có khoảng 79 đến 88% As trong rau cải xanh là ở dạng dễ tan. Trong khi đó, rau má chỉ có từ 62 đến 80%. Lượng As còn lại ở những dạng không dễ tan chiếm từ 12 đến 38% tùy từng loại rau.

Bảng 4: Hàm lượng As trong cây rau má và cải xanh

Mẫu		As dễ tan		Dạng khác ¹		Tổng As (HNO ₃ /HCl)
		ppm	%	ppm	%	ppm
Rau má	Lá	1,12	62	0,69	38	1,81
	Rễ	1,76	80	0,35	20	2,19
Cải xanh	Lá	21,66	79	1,35	21	27,37
	Rễ	43,64	88	1,63	12	49,48

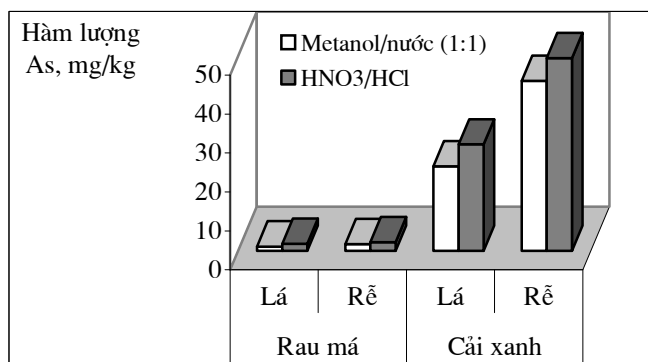
¹Dạng khác=Tổng As(HNO₃/HCl)-As dễ tan.

Câu hỏi đặt ra là lượng As còn lại nằm ở dạng nào? Hữu cơ hay vô cơ?. Theo tài liệu [5] có quá trình khử As(V) thành As(III) và As (III) sẽ kết hợp với nhóm sulhydryl(-SH) trong phytochelatins (PCs) của tế bào. PCs là polypeptid, cấu trúc $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$, là chỉ thị sinh học được tạo thành khi thực vật bị ô nhiễm kim loại nặng và trong thực tế, sự tạo phức là một cơ chế cần thiết để loại bỏ độc tính của kim

loại tự do trong cây [5]. Điều này sẽ được làm rõ trong các nghiên cứu tiếp theo.

IV - KẾT LUẬN

- Kết quả nghiên cứu về quá trình hấp thu As từ đất, sự vận chuyển và biến đổi dạng hóa học As trong cây rau má và cải xanh, một số kết luận được rút ra:



Hình 6: Hấp thu và phân bố As trong cây rau má và rau cải xanh

1. Asen tan trong dung dịch đất ở dạng vô cơ là As(V), chúng lan truyền từ môi trường đất lên rau má và cải xanh trong quá trình sinh trưởng.

2. Đã không phát hiện quá trình metyl hoá As trong đất và trong cây rau. As tích lũy trong rễ và trong lá chủ yếu ở dạng As(III).

3. Đã có sự khử As(V) thành As(III) trong rễ rau má và cải xanh và tùy tong loại rau lượng As(V) chỉ còn lại trong rễ từ 10 đến 22%.

4. Hấp thu và tích lũy As của rau má thấp hơn so với rau cải nói lên đặc điểm sinh học và sự nhạy cảm của mỗi loại thực vật rất khác nhau đối với độc tố kim loại. Tuy vậy, khả năng vận chuyển As từ rễ lên lá ở cây rau má lại cao hơn so với rau cải.

Lời cảm ơn: Tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Công nghệ Hóa học tại Thành phố Hồ Chí Minh, Phân Viện Khoa học Vật liệu tại Nha Trang, Khoa Tài nguyên Thiên nhiên và Khoa học Môi Trường của Trường Đại học Nevada tại Reno, Mỹ đã tạo điều kiện thuận lợi để tác giả thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Hà. Xác định mức độ ô nhiễm thạch tín trên toàn quốc. Vnnet. <http://www.vnm.vn>.

2. A. A. Meharg and J. Hartley-Whitaker. *New Phytologist*, 154, 29 - 43 (2002).

3. F. Simon, M. William, T. Anne, K. Frank, T. Kirsty. *Distribution and speciation of arsenic in temperate Marine saltmarsh ecosystems. Environmental chemistry*, 2, 177 - 189 (2005).

4. M. B. Maria, N. Katic, A. Joseph. *Journal of chromatography A*, 1000, 457 - 476 (2003).

5. Z. Wichua, C. Yong, T. Cong, Q. M. Lena. *The science of the total environment*, 300, 167 - 177 (2002).

6. H. Shizuko, T. Hideki, A. Masato. *Analytical Sciences*, 22, 39 - 43 (2006).

7. M. Ociel, V. Dinoraz, M. Rosa. *The analyst*, 124, 601 - 607 (1999).

8. Z. Rui, Z. Mengxia, W. Hui, T. Yasuhito, Z. Xinrong. A terrestrial plant (Moso Bamboo Shoot) that transforms inorganic arsenic into organic arsenic. <http://www.shimadzu.net.cn/kefu/yuanzixishou/yuanzi.pdf>

9. Bùi Minh Lý. Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu phân tích liên tục dạng Asen và Selen trong một số sinh vật biển bằng kỹ thuật ghép nối sắc ký lỏng phân giải cao-quang phổ hấp thu nguyên tử, 2005.