

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CADIMI VÀ CHÌ TRONG MỘT SỐ BÀI THUỐC Y HỌC CỔ TRUYỀN

Lê Thị Thanh Trân¹

Vũ Thị Bảo Ngọc¹

Nguyễn Đình Trung¹

TÓM TẮT

Sự tồn dư của kim loại nặng trong dược liệu bào chế thuốc y học cổ truyền là một trong những nguyên nhân dẫn đến sự tích lũy các nguyên tố này trong cơ thể. Hiện nay ở Việt Nam vẫn chưa có quy định về giới hạn có mặt của các kim loại này trong dược liệu. Do đó, nghiên cứu này đã khảo sát các điều kiện tối ưu để định lượng cadimi và chì trong một số bài thuốc y học cổ truyền, bao gồm: quy trình xử lý mẫu trong hệ lò vi sóng bằng kỹ thuật vô cơ hóa ướt và định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử với kỹ thuật nguyên tử hóa trong lò graphit (GF-AAS). Kết quả cho thấy phương pháp vô cơ hóa mẫu ướt trong hệ lò vi sóng và phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử trong lò graphit đáp ứng tốt và phù hợp trong định lượng các kim loại Pb, Cd trong mẫu dược liệu và các bài thuốc y học cổ truyền có chứa nhiều thành phần. Nghiên cứu thực hiện trên đối tượng là 4 bài thuốc y học cổ truyền chữa các bệnh tiểu đường, sỏi mật và 3 bài thuốc cam chữa bệnh biếng ăn, viêm lợi cho trẻ em. Kết quả định lượng Cd và Pb trong các bài thuốc y học cổ truyền dao động trong khoảng từ 0,034 đến 0,312 mg/kg (đối với cadimi) và từ 0,246 đến 1,566 mg/kg (đối với chì) với hiệu suất thu hồi đạt trên 93%.

Từ khóa: Chì, cadimi, thuốc y học cổ truyền, GF-AAS, vô cơ hóa ướt bằng lò vi sóng

1. Mở đầu

Nền y học cổ truyền (YHCT) của Việt Nam trải qua hàng ngàn năm lịch sử đã trở thành niềm tự hào của dân tộc và hiệu quả của nó thực sự được kiểm chứng qua thời gian. Các loại thuốc tây y mặc dù mang lại hiệu quả điều trị nhanh chóng, tuy nhiên những loại thuốc này lại tiềm ẩn rất nhiều tác dụng phụ không mong muốn. Chính vì thế, xu hướng lựa chọn các phương pháp chữa bệnh có nguồn gốc tự nhiên ngày càng được phổ biến không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều nước khác trên thế giới. Trong những năm gần đây, thực trạng dược liệu bào chế thuốc YHCT kém chất lượng đang thực sự đáng báo động do sự xuất hiện giả dược, dược

liệu nhiễm chất độc hại, dược liệu nhập lậu, không có nguồn gốc xuất xứ,... Sự tồn dư kim loại nặng trong dược liệu là một trong những nguyên nhân làm suy giảm chất lượng dược liệu và hai trong những kim loại đó là chì và cadimi. Nguyên nhân của sự có mặt các nguyên tố Cd, Pb trong dược liệu có thể do sự hấp thụ qua rễ cây trong quá trình canh tác ở các khu đất có tồn dư hàm lượng kim loại nặng, sử dụng nước tưới tiêu ô nhiễm chất độc hại,... Ngoài ra, một số chất bảo quản cũng là nguồn phơi nhiễm kim loại nặng đối với dược liệu. Vì vậy, công tác kiểm soát chất lượng dược liệu đóng vai trò rất quan trọng trong đảm bảo chất lượng các bài thuốc YHCT và

¹Trường Đại học Đà Lạt
Email: tranltht@dlu.edu.vn

các chế dược phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên [1].

Bài thuốc YHCT là tổ hợp của một vài hoặc rất nhiều vị thuốc để đảm bảo nâng cao hiệu quả điều trị bệnh. Chính vì thế, hàm lượng kim loại nặng tồn tại trong dược liệu không thể đánh giá một cách chủ quan trên bất kỳ vị nào mà phải xem xét dựa trên cấu trúc thành phần tạo nên một bài thuốc. Chì và cadimi được xếp vào nhóm những nguyên tố gây độc nhất cho sức khỏe con người. Việc nhiễm độc những kim loại này đem đến hàng loạt các hậu quả nghiêm trọng cho sức khỏe cơ thể và có thể dẫn đến tử vong.

Năm 1912, căn bệnh itai-itai tại tỉnh Toyama (Nhật Bản) đã gây nên một chấn động lớn trong việc bê bối xả chất thải ra sông Jinzugama của công ty khai thác quặng Mitsui. Tác nhân chính gây ra căn bệnh này là sự nhiễm độc cadimi lên cơ thể. Bất cứ ai uống nước hoặc ăn thức ăn được trồng với nguồn nước sông bị nhiễm kim loại này đều cho thấy những dấu hiệu của bệnh itai-itai. Những triệu chứng ban đầu của ngộ độc cadimi là đau nhức xương sống và chân; khi căn bệnh tiến triển thì xương trở nên giòn, biến dạng và rất dễ gãy cho dù chỉ là ho hay chấn thương nhẹ. Hầu hết các nạn nhân của bệnh itai-itai đều phải nằm ở trên giường vì việc đi lại là vô cùng đau đớn. Ngoài ra, người bị nhiễm độc cadimi cũng bị các triệu chứng thiếu máu, rối loạn hoạt động của thận, suy nhược cơ thể [2].

Năm 2012, 98% mẫu các bài thuốc Cam tại Việt Nam đã phát hiện chứa chì oxit (Pb_3O_4) dưới dạng Hồng đơn,

thành phần này được thêm vào các bài thuốc nhằm tăng tác dụng chữa lở loét, viêm nhiệt miệng. Điều đáng nói là các bài thuốc cam này đa số được sử dụng cho trẻ em nhằm chữa biếng ăn, viêm nhiệt miệng, lở loét, tưa lưỡi. Ngoài ra, các bài thuốc cam lợi, cam phong được sử dụng để chữa hôi miệng, viêm lợi, viêm da,... cho người lớn. Tác động chính của chì khi xâm nhập vào cơ thể phá hủy quá trình tạo hemoglobin do đó giảm thời gian sống của hồng cầu đồng thời ức chế một số chu trình sinh hóa khác trong cơ thể. Khi trẻ em bị ngộ độc chì sẽ gây tác hại nghiêm trọng lên hệ thần kinh, ở nồng độ cao có thể gây hôn mê, co giật và thậm chí tử vong. Tùy thuộc vào hàm lượng xâm nhập mà có thể gây rối loạn tiêu hóa, đau bụng, tiêu chảy, xanh xao, gầy yếu. Trẻ em còn sống sau khi thải độc chì thì cũng bị rối loạn hành vi và chậm phát triển trí tuệ. Đối với người lớn khi bị nhiễm độc chì thì cơ thể sẽ mệt mỏi, tăng huyết áp, gây suy thận, gây độc cho cơ quan sinh sản và đặc biệt nguy hiểm với phụ nữ có thai vì có thể gây sảy thai, sinh non, thai chết lưu,... Những ảnh hưởng của chì lên hệ thần kinh và hành vi được cho là không thể thay đổi [3].

Hậu quả của việc nhiễm độc chì và cadimi dẫn đến những hệ lụy vô cùng nghiêm trọng, đặc biệt khi người bệnh sử dụng lâu dài. Việc xác định và kiểm soát chất lượng dược liệu, thuốc từ dược liệu thường được thực hiện theo Dược điển của nước sở tại [4]. Trong *Dược điển Việt Nam V* (2018) quy định chỉ tiêu giới hạn cho kim loại As đối với phần lớn các chế dược phẩm, tuy nhiên chưa có bất kỳ công bố nào về

giới hạn hàm lượng kim loại nặng (Cd, Pb, Hg,...) cũng như phương pháp kiểm tra chúng [5].

Hiện nay có nhiều phương pháp để xác định hàm lượng chì và cadimi trong đối tượng mẫu là dược liệu như AAS, AES, ICP-MS,... Il Yil-Su và cộng sự (2017) đã sử dụng phương pháp ICP-MS để định lượng kim loại nặng như As, Cd, Pb có trong một số chế dược phẩm dạng thuốc sắc [6]. ABM Helal Uddin và cộng sự (2016) đã nghiên cứu xác định hàm lượng các nguyên tố thuộc nhóm kim loại nặng là As, Cd, Hg, Pb có trong các mẫu dược liệu, đồng thời khảo sát các tỷ lệ axit sử dụng dùng để xử lý mẫu dược liệu được thu thập ở Pahang, Terengganu và Kelantan (Malaysia). Phương pháp xác định hàm lượng các kim loại As, Cd, Pb, Ni, Zn, Fe được sử dụng là phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS (Atomic Absorption Spectrometry) với độ tin cậy và độ chính xác cao đã được kiểm chứng. Nghiên cứu này đồng thời đánh giá hiệu quả của phương pháp xử lý mẫu dược liệu bằng axit theo ba cách khác nhau: phương pháp A (hỗn hợp

$\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ theo tỷ lệ 2: 1), phương pháp B (chỉ axit nitric HNO_3) và phương pháp C (hỗn hợp $\text{HNO}_3 - \text{HCl}$ theo tỷ lệ 1: 3) [7]. Kết quả của các nghiên cứu này cho thấy cần phát triển phương pháp xử lý mẫu tối ưu, nhanh chóng, hiệu suất thu hồi cao. Do đó, trong bài báo này, một quy trình tối ưu hóa kỹ thuật vô cơ hóa mẫu dược liệu bằng phương pháp ướt trong hệ lò vi sóng đã được khảo sát và áp dụng. Đồng thời phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử với kỹ thuật nguyên tử hóa bằng lò graphit (GF-AAS) được sử dụng để định lượng Cd, Pb trong mẫu phân tích vì có độ nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao, phù hợp với đối tượng phân tích.

2. Đối tượng nghiên cứu, hóa chất và thiết bị

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu dược liệu, bài thuốc YHCT chữa tiểu đường, sỏi mật, bài thuốc cam được thu thập tại các nhà thuốc Đông Y ở Hà Nội, TP. Hồ Chí Minh, Đà Lạt từ tháng 12/2018 đến tháng 1/2019 (bảng 1).

Bảng 1: Các bài thuốc thu thập được

STT	Tên mẫu	Ký hiệu	Thời gian lấy mẫu	Địa điểm	Dạng	
1	Bài thuốc sỏi mật 1	SM1	12/2018	Hà Nội	Thuốc thang	
2	Bài thuốc sỏi mật 2	SM2	12/2018	TP. Hồ Chí Minh		
3	Bài thuốc tiểu đường 1	TĐ1	01/2019	Hà Nội		
4	Bài thuốc tiểu đường 2	TĐ2	01/2019	Đà Lạt		
5	Cam lợi	CL	01/2019	Hà Nội		
6	Cam hàng bạc	CHB	01/2019	TP. Hồ Chí Minh		Thuốc tán bột
7	Cam tích	CT	01/2019	Đà Lạt		

2.2. Hóa chất

- Dung dịch chuẩn gốc Cd^{2+} và Pb^{2+} 1000mg/L (Merck).
- Dung dịch HNO_3 65% (Merck).
- Mẫu chuẩn SRM Citrus Leaves 1572 (NIST).

2.3. Thiết bị

- Máy phá mẫu vi sóng MARS6, hãng CEM, Mỹ.
- Hệ thống máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AA-7000, hãng Shimadzu, Nhật.
- Máy cất nước hai lần Aquatron A4000D, hãng Bibby, Anh.
- Máy nghiền mẫu A11, hãng IKA, Cộng hòa Liên bang Đức.
- Cân phân tích có độ nhạy 10^{-2} và 10^{-4} g, hãng Sartorius, Cộng hòa Liên bang Đức.

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Xử lý sơ bộ mẫu phân tích

Các bài thuốc được sấy khô ở $105^{\circ}C$ đến khối lượng không đổi. Để nguội đến nhiệt độ phòng, cắt nhỏ, cho vào máy xay khô và nghiền mịn. Bảo quản mẫu dạng bột ở nơi khô ráo và thoáng mát, tránh để nhiễm bẩn, ẩm mốc làm ảnh hưởng đến kết quả phân tích.

3.2. Vô cơ hóa mẫu - phương pháp vô cơ hóa ướt trong hệ lò vi sóng

Phương pháp xử lý mẫu được khảo sát là vô cơ hóa ướt trong hệ lò vi sóng. Đây là phương pháp xử lý mẫu hiện đại nhất hiện nay, làm giảm đáng kể thời gian xử lý mẫu, không mất mẫu và phân hủy mẫu được triệt để đồng thời có thể vô cơ hóa hàng loạt mẫu cùng một lúc.

Phương pháp này dựa trên cơ sở dùng năng lượng của lò vi sóng để đun

nóng mẫu được đựng trong các ống teflon đi kèm hệ trang thiết bị. Các tác nhân vô cơ hóa mẫu bao gồm: dung dịch axit đặc, năng lượng nhiệt, sự khuếch tán đối lưu, sự va chạm của các hạt mẫu với nhau làm cho chúng bị bào mòn và phân hủy dần. Axit đặc được sử dụng ở đây có thể là HNO_3 , H_2SO_4 , $HClO_4$, HF ,... tùy thuộc vào đối tượng mẫu phân tích, các dung dịch này có vai trò phá hủy cấu trúc liên kết và hòa tan các phân tử mẫu. Động năng của sóng vi sóng rất lớn nên có chuyển động nhiệt rất mạnh, phá vỡ từ trong lòng hạt mẫu ra ngoài (do các phân tử nước hấp thụ 90% lượng động năng này) làm căng và xé các hạt mẫu từ trong ra. Ngoài ra, ống teflon có cấu trúc đặc biệt chịu được áp suất và nhiệt độ cao, đây chính là tác nhân phân hủy mạnh nhất, thúc đẩy quá trình xử lý mẫu diễn ra từ sâu bên trong và tác động nhiệt từ bên ngoài vào. Việc xử lý mẫu trong hệ lò vi sóng chỉ cần mất thời gian rất ngắn (30-70 phút) mà lại triệt để, đồng thời lượng hóa chất sử dụng rất ít (chỉ 10 ml HNO_3 /1 ống Teflon) [8].

Để đạt hiệu quả xử lý mẫu cao nhất, cần khảo sát một số yếu tố để tối ưu hóa quy trình vô cơ hóa mẫu như: nhiệt độ phân hủy, áp suất và thời gian ủ mẫu cho đối tượng được liệu dựa trên chương trình nền do hãng đề xuất để cải biến cho phù hợp.

Chương trình xử lý mẫu được hãng CEM (Mỹ) đề xuất là "Plant Material" với các thông số như sau: thời gian gia nhiệt: 15 phút, áp suất 800 psi, nhiệt độ $220^{\circ}C$, thời gian ủ mẫu là 15 phút [9].

Quá trình tối ưu hóa các thông số tiến hành khảo sát như sau: điều chỉnh nhiệt độ, thời gian ủ mẫu của hệ lò vi sóng áp dụng cho đối tượng dược liệu. Axit dùng làm tác nhân phân hủy mẫu là HNO₃ 65% (Merck). Áp suất theo hãng đề xuất là 800 psi, công suất đặt ở 1200 W.

Cân khoảng 0,5000 g mẫu các bài thuốc YHCT cùng 10,00 ml HNO₃ 65% cho vào các ống teflon, vặn kín nắp bằng dụng cụ đi kèm, tiến hành thiết lập các khoảng thời gian gia nhiệt, công suất lò vi sóng, nhiệt độ phá mẫu và thời gian ủ mẫu ở các khoảng giá trị khác nhau.

Các quá trình diễn ra trong hệ lò vi sóng được theo dõi bởi màn hình hiển thị, giám sát bởi các sensor nhiệt độ và áp suất gắn trong ống teflon kiểm soát (Control Vessel).

Bảng 2: Các thông số khảo sát điều kiện vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng

Các thông số tối ưu hóa	Khoảng giá trị khảo sát
Nhiệt độ (°C)	150 - 250
Thời gian ủ mẫu (phút)	10 - 30

Dung dịch sau khi phá mẫu để nguội đến nhiệt độ phòng và lấy ra khỏi các ống teflon, tiến hành đuổi khí trong tủ hút cho đến khi được dung dịch trong suốt.

Mẫu trắng được chuẩn bị từ 10ml HNO₃ 65% và tiến hành vô cơ hóa trong hệ lò vi sóng với cùng điều kiện khảo sát.

3.3. Xác định hàm lượng cadimi và chì trong các bài thuốc y học cổ truyền - phương pháp quang phổ hấp

thụ nguyên tử với kỹ thuật nguyên tử hóa bằng lò graphit (GF-AAS)

3.3.1. Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử với kỹ thuật nguyên tử hóa bằng lò graphit (GF-AAS)

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) hiện đang được ứng dụng rất phổ biến trong xác định hàm lượng các nguyên tố trong nhiều đối tượng khác nhau như thực phẩm, mẫu sinh học, dược phẩm,... Kỹ thuật nguyên tử hóa trong lò graphit (GF-AAS) tuy ra đời sau kỹ thuật nguyên tử hóa ngọn lửa (F-AAS) nhưng lại có nhiều ưu điểm vượt trội đó là rất nhạy, phân tích được hàm lượng vết (nano ppb) nhiều nguyên tố đồng thời vẫn đảm bảo được độ chính xác của phương pháp nên không cần phải làm giàu mẫu. Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử trong lò graphit (GF-AAS) là một trong những phương pháp hiệu quả dùng để xác định hàm lượng kim loại trong nhiều đối tượng dược liệu bên cạnh ICP-MS, AES, ICP-OES,... [10].

Nguyên tắc của phương pháp này là nguyên tử hóa tức thì các thành phần trong thời gian rất ngắn nhờ năng lượng của dòng điện công suất lớn trong môi trường khí trơ. Dưới tác dụng của các nguồn năng lượng này, cuvet chứa mẫu phân tích sẽ được nung nóng đỏ tức khắc và mẫu sẽ được hóa hơi và nguyên tử hóa để tạo ra các nguyên tử tự do ở trạng thái hơi có khả năng hấp thụ bức xạ đơn sắc, tạo ra phổ hấp thụ nguyên tử của nó. Từ đó, dùng phổ này để định lượng các nguyên tố có trong mẫu phân tích [11].

3.3.2. Xây dựng đường chuẩn Cd, Pb

Tất cả các dung dịch chuẩn làm việc đều được xây dựng trong nền HNO₃ 0,5N tại các vùng nồng độ khác nhau phù hợp với vùng hàm lượng các nguyên tố có trong mẫu sau khi đã khảo sát giới hạn định lượng và cận trên của đường chuẩn.

Đối với Cd, chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn Cd²⁺ tương ứng với dãy nồng độ: 0,05 ppb; 0,10 ppb; 0,20 ppb; 0,50p pb; 1,00 ppb; 2,00 ppb.

Đối với Pb, chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn Pb²⁺ tương ứng với dãy nồng độ: 1,00 ppb; 3,00 ppb; 5,00 ppb; 8,00 ppb; 10,00 ppb; 16,00 ppb; 20,00 ppb; 50,00 ppb.

3.3.3. Định lượng Cd và Pb trong mẫu phân tích

Sử dụng quy trình chuẩn bị mẫu trong hệ lò sóng với những thông số đã khảo sát được và đường chuẩn đã xây dựng ở mục 3.3.2, tiến hành định lượng trên các mẫu bài thuốc YHCT chữa bệnh tiểu đường, sỏi mật và một số mẫu thuốc cam thu thập được.

3.4. Đánh giá độ chính xác của phương pháp

Độ chính xác của phương pháp được đánh giá thông qua các giá trị hiệu suất thu hồi, độ lặp lại, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

Hiệu suất thu hồi được đánh giá bằng kết quả phân tích mẫu chuẩn SRM Citrus Leaves 1572 NBS. Áp dụng quy trình vô cơ hóa ướt trong hệ lò vi sóng với các thông số đã tối ưu hóa mẫu chuẩn và tiến hành định lượng bằng phương pháp GF-AAS. Hiệu suất thu

hồi càng cao phản ánh phương pháp xử lý mẫu càng tốt, kết quả phân tích càng gần với giá trị thực đã được công bố.

Độ lặp lại của các kết quả phân tích được đánh giá thông qua giá trị 3 lần phép đo của các đối tượng mẫu, tính toán các giá trị RSD% và so sánh với tiêu chuẩn của AOAC về độ lặp lại.

Độ nhạy của phương pháp phân tích được phản ánh thông qua giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) theo quy tắc 3σ. Các giá trị này thu được từ thực nghiệm qua việc khảo sát cận trên và cận dưới của đường chuẩn.

3.5. Xử lý kết quả và tính toán

Kết quả độ hấp thụ đo được trên thiết bị AAS được dùng để tính nồng độ Cd và Pb tương ứng theo phương trình đường chuẩn đã xây dựng. Đồng thời hàm lượng Cd và Pb trong các mẫu được liệu và bài thuốc được tính theo công thức sau:

$$m_{(\text{mg/kg})} = \left(\frac{C_{dc} \cdot V_{dm}}{m_m \cdot 1000} \cdot f \right)$$

Trong đó: C_{dc}: nồng độ chì, cadimi tính được từ đường chuẩn (ppb)

m_m: khối lượng mẫu phân tích (g)

V_{dm}: thể tích định mức (ml)

f: hệ số pha loãng (nếu có).

4. Kết quả và thảo luận

4.1. Các thông số tối ưu hóa quá trình vô cơ hóa mẫu ướt trong hệ lò vi sóng

Kết quả khảo sát các thông số tối ưu cho quá trình vô cơ hóa ướt trong hệ lò vi sóng MARS 6 với đối tượng mẫu được liệu được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: Kết quả khảo sát các thông số tối ưu cho quá trình vô cơ hóa mẫu trong lò vi sóng

Thông số tối ưu hóa	Khoảng giá trị khảo sát						
	180	190	200	210	220	230	240
Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	-	-	+	+	+	+	+
Thời gian ủ mẫu (phút)	10	15	20	25	30	35	40
	-	-	-	+	+	+	+

(-): dung dịch sau khi vô cơ hóa vẫn còn vẩn đục, mẫu chưa bị phá hủy triệt để

(+): dung dịch sau khi vô cơ hóa đồng nhất, sau khi đuổi khí ở thu được dung dịch trong suốt, mẫu được phá hủy triệt để

Như vậy, để đạt hiệu quả tối ưu trong quy trình vô cơ hóa mẫu trong hệ lò vi sóng với đối tượng mẫu được liệu thì các thông số được thiết lập ở chế độ “Plant Material”, áp suất là 1200 W, nhiệt độ đặt tại 220°C , thời gian gia nhiệt 15 phút và giữ mẫu 25 phút trong nhiệt độ này.

4.2. Thông số tối ưu để định lượng Cd, Pb bằng phương pháp GF-AAS

Các thông số tối ưu của thiết bị Shimadzu AA-7000 để xác định hàm lượng Cd và Pb [12] được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4: Các thông số thiết bị AA-7000 để đo Cd và Pb

Thông số thiết bị	Cd	Pb
Vạch phổ hấp thụ (nm)	228,8	283,3
Độ rộng khe (nm)	0,7	0,7
Cường độ dòng HCL (mA)	8	10
Lượng mẫu nạp (μL)	20	20
Nhiệt độ tro hóa ($^{\circ}\text{C}$)	300	400
Nhiệt độ nguyên tử hóa ($^{\circ}\text{C}$)	1.800	1.800
Khí môi trường	Argon	
Chiều cao đầu đốt	Auto	

4.3. Khảo sát giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng (LOD và LOQ)

Chuẩn bị các dãy dung dịch Cd^{2+} với các nồng độ: 0,01 ppb; 0,03 ppb; 0,04 ppb; 0,05 ppb; 0,10 ppb; 0,20 ppb;

0,50 ppb; 1,00 ppb; 2,00 ppb; 3,00 ppb. Tiến hành đo GF-AAS nhiều lần cho đến khi nào giá trị trung bình sau 3 lần đo có sai số nhỏ nhất. Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5: Kết quả khảo sát giới hạn định lượng Cd

Nồng độ dung dịch chuẩn Cd ²⁺ (ppb)	Độ hấp thụ			GTTB ± ε	RSD%
	Lần 1	Lần 2	Lần 3		
0,01	0,0002	0,0008	0,0002	0,0004 ± 0,0027	86,6025
0,03	0,0065	0,0044	0,0050	0,0005 ± 0,0009	20,4088
0,04	0,0066	0,0076	0,0059	0,0067 ± 0,0021	12,7522
0,05	0,0255	0,0247	0,0298	0,0267 ± 0,0030	4,5564
0,10	0,0507	0,0499	0,0492	0,0499 ± 0,0041	3,3353
0,20	0,0694	0,0718	0,0694	0,0702 ± 0,0034	1,9738

Kết quả khảo sát cho thấy, khi nồng độ Cd ≥ 0,05 ppb thì sai số < 10%, do đó để đảm bảo cho phép phân tích có độ chính xác cao thì cận dưới của đường chuẩn cadimi khi xác định bằng phương pháp GF - AAS là 0,05ppb.

Tương tự, chuẩn bị dãy dung dịch Pb²⁺ với các nồng độ: 0,2 ppb; 0,5 ppb;

0,8 ppb; 1,0 ppb; 3,0 ppb; 5,0 ppb; 8,0 ppb; 10,0 ppb; 16,0 ppb; 20,0 ppb; 50,0 ppb; 60,0 ppb. Tiến hành đo GF – AAS nhiều lần cho đến khi nào giá trị trung bình sau 3 lần đo có sai số nhỏ nhất. Kết quả được thể hiện ở bảng 6.

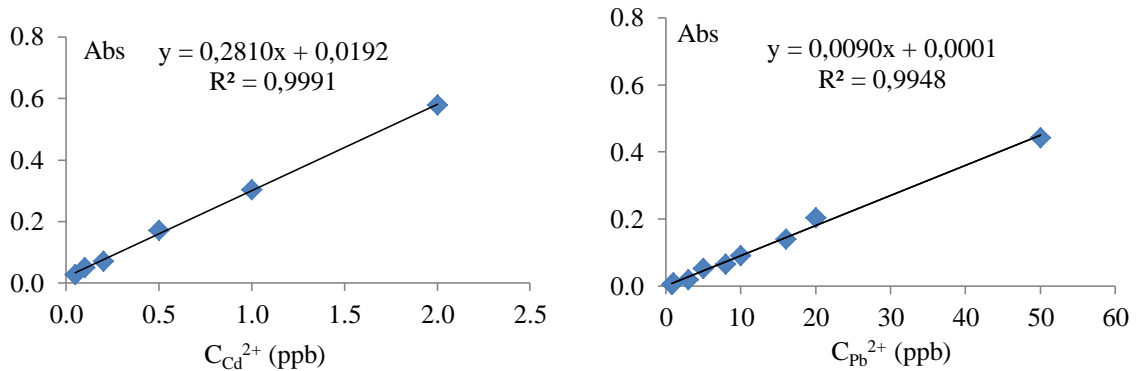
Bảng 6: Kết quả khảo sát giới hạn định lượng Pb

Nồng độ dung dịch chuẩn Pb ²⁺ (ppb)	Độ hấp thụ			GTTB ± ε	RSD%
	Lần 1	Lần 2	Lần 3		
0,20	0,0017	0,0028	0,0012	0,0019 ± 0,0020	43,0808
0,50	0,0018	0,0028	0,0017	0,0021 ± 0,0015	28,9655
0,80	0,0053	0,0047	0,0050	0,0050 ± 0,0007	6,0000
1,00	0,0096	0,0087	0,0093	0,0092 ± 0,0011	4,9811
3,00	0,0190	0,0179	0,0183	0,0184 ± 0,0014	3,0260
0,20	0,0017	0,0028	0,0012	0,0019 ± 0,0020	43,0808

Kết quả khảo sát cho thấy, khi nồng độ Pb ≥ 0,80 ppb thì sai số < 10%, do đó để đảm bảo cho phép phân tích có độ chính xác cao thì cận dưới của đường chuẩn chì khi xác định bằng phương pháp GF - AAS là 0,80 ppb.

4.4. Kết quả xây dựng đường chuẩn Cd, Pb

Kết quả đường chuẩn của Cd và Pb thể hiện trong hình 1.



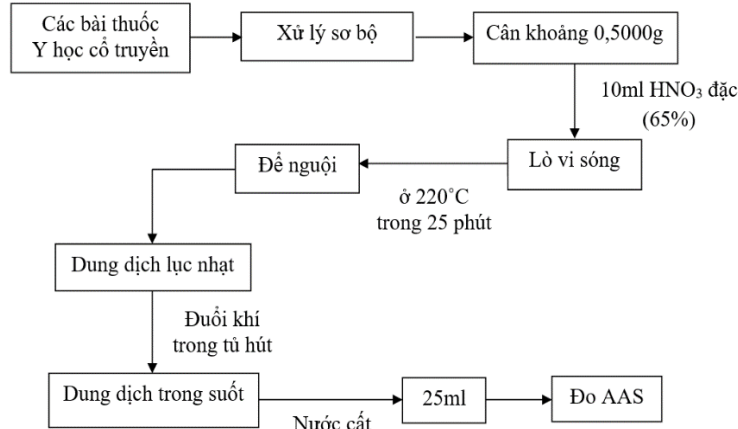
Hình 1: Đường chuẩn của Cd và Pb

Các đường chuẩn xây dựng được đều có hệ số tương quan $R^2 > 0,99$, đối với Cd là 0,9991 và Pb là 0,9948 thể hiện mối quan hệ tuyến tính cao giữa độ hấp thụ (Abs, Y) với nồng độ chất phân tích (C, X), cho thấy rằng các đường chuẩn này đáp ứng được điều kiện định lượng các nguyên tố nghiên cứu.

4.5. Quy trình phân tích hàm lượng Cd và Pb trong các bài thuốc y học cổ truyền

Dựa vào kết quả khảo sát ở trên, chúng tôi tiến hành xác định các nguyên tố Pb, Cd trong các bài thuốc YHCT

theo quy trình sau: Cân khoảng 0,5000g mẫu bài thuốc đã được xử lý sơ bộ vào ống teflon, sau đó tắm ướt bằng 10ml HNO₃ đặc (65%) rồi đóng kín và đưa vào hệ lò vi sóng. Thực hiện xử lý mẫu trong 25 phút ở 220°C, để nguội, mở ra đuổi khí dưới tủ hút đến khi thu được dung dịch trong suốt, chuyển định lượng dung dịch vào bình định mức dung tích 25ml, dùng nước cất định mức đến vạch và tiến hành đo AAS. Quy trình thực hiện được tóm tắt như hình 2.



Hình 2: Quy trình xác định hàm lượng Cd và Pb trong các bài thuốc y học cổ truyền

4.6. Đánh giá độ chính xác của phương pháp

Để đánh giá độ chính xác của phương pháp, chúng tôi áp dụng quy

trình trên để xác định hàm lượng chì và cadimi trong mẫu chuẩn SRM Citrus Leaves 1572 (NIST). Kết quả được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7: Kết quả phân tích mẫu chuẩn

Nguyên tố	Citrus Leaves SRM 1572 NBS	
	Giá trị công bố (mg/kg)	Giá trị phân tích (mg/kg)
Cd	0,03 ± 0,01	0,028 ± 0,001
Pb	13,30 ± 2,40	12,63 ± 1,22

Kết quả đánh giá hiệu suất thu hồi cho thấy so với các giá trị được công nhận trong mẫu chuẩn quốc tế, các hàm lượng Cd và Pb thu hồi được lần lượt là 93,3% và 95,0%. Theo tiêu chuẩn của AOAC về hiệu suất thu hồi cho phép dao động trong khoảng 80-110% cho thấy quy trình phân tích trên đạt hiệu suất thu hồi cao, phù hợp cho phân tích hàm lượng các kim loại này.

Qua kết quả thực nghiệm và tính toán cho thấy các giá trị hiệu suất thu hồi, độ lặp lại, độ chính xác của phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử trong lò graphit (GF-AAS) có độ nhạy cao, đáp ứng việc định lượng các nguyên tố nghiên

cứu trong mẫu dược liệu và các bài thuốc YHCT.

4.7. Định lượng Cd, Pb trong các bài thuốc y học cổ truyền

Mẫu phân tích là các một số bài thuốc YHCT chữa tiểu đường, sỏi mật và một số bài thuốc cam thu thập được sau khi áp dụng quy trình vô cơ hóa ướt trong hệ lò vi sóng với các thông số đã được tối ưu. Dung dịch sau khi vô cơ hóa thì tiến hành đuổi khí trong tủ hút và định mức bằng dung dịch HNO₃ 0,5N, dùng dung dịch này để xác định hàm lượng Cd và Pb bằng phương pháp GF-AAS. Kết quả phân tích và tính toán dựa trên công thức ở mục 2.5 được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8: Kết quả định lượng cadimi và chì trong các bài thuốc y học cổ truyền

STT	Ký hiệu mẫu	Tên bài thuốc	Hàm lượng cadimi (mg/kg)	Hàm lượng chì (mg/kg)
1	TD1	Tiểu đường 1	0,104 ± 0,012	0,328 ± 0,030
2	TD2	Tiểu đường 2	0,089 ± 0,011	1,566 ± 0,177
3	SM1	Sỏi mật 1	0,282 ± 0,030	0,809 ± 0,103
4	SM2	Sỏi mật 2	0,039 ± 0,005	0,246 ± 0,032
5	CL	Cam lợi	0,053 ± 0,007	0,688 ± 0,074
6	CHB	Cam hàng bạc	0,091 ± 0,009	0,306 ± 0,027
7	CT	Cam tích	0,159 ± 0,015	0,451 ± 0,039

Từ bảng 8 cho thấy, hàm lượng cadimi dao động từ 0,034 đến 0,312 mg/kg. Trong đó, bài thuốc sỏi mật 1 có hàm lượng cadimi cao nhất (0,282 ±

0,030 mg/kg), bài thuốc sỏi mật 2 có hàm lượng cadimi nhỏ nhất (0,039 ± 0,005 mg/kg), trung bình hàm lượng cadimi trong 7 mẫu bài thuốc là 0,12 mg/kg.

Thông thường, một thang thuốc có khoảng 100÷200 g dược liệu được sử dụng trong 1 ngày. Nếu dùng bài thuốc sỏi mật 2 thì hàm lượng cadimi đi vào cơ thể người tiêu dùng trong 1 tuần là hơn 0,2815 mg cadimi. Đối với bài thuốc dành cho trẻ em, bột cam tích dùng để chữa chứng bệnh cùn tên ở trẻ có hàm lượng cadimi cao nhất $0,159 \pm 0,016$ mg/kg. Như vậy hàm lượng cadimi đi vào cơ thể trẻ nếu sử dụng bài thuốc này thường xuyên khoảng 0,03mg cadimi trong một tháng, lượng này nằm trong giới hạn cho phép của WHO (0,007 mg/kg/tuần).

Tương tự, đối với kết quả định lượng chì trong các bài thuốc YHCT khác nhau dao động từ 0,214 đến 1,743 mg/kg. Trong đó, bài thuốc sỏi mật 2 có hàm lượng chì thấp nhất $0,246 \pm 0,032$ mg/kg và cao nhất là bài thuốc tiêu đường 2 với hàm lượng $1,566 \pm 0,177$ mg/kg, trung bình trong 7 mẫu thuốc tồn tại 0,63 mg/kg chì.

Như vậy, hàm lượng chì đi vào cơ thể một người trưởng thành trong 1 tuần thông qua bài thuốc tiêu đường 2 hơn 1,56 mg chì nếu sử dụng đều đặn mỗi ngày 1 thang thuốc này. Nhìn chung, các bài thuốc dành cho trẻ có hàm lượng chì thấp, cao nhất là cam lợi với hàm lượng $0,688 \pm 0,074$ mg/kg. Sử dụng thuốc này hơn 1g mỗi ngày, hàm lượng xâm nhập của chì vào cơ thể trẻ khoảng 0,030mg trong vòng 1 tháng, lượng này nằm trong giới hạn cho phép của Tổ chức Y tế thế giới WHO (0,025 mg/kg/tuần).

Để đánh giá được mức độ ô nhiễm các kim loại nặng trong nguồn dược

liệu xây dựng các bài thuốc YHCT nói riêng cũng như các chế dược phẩm từ thiên nhiên nói chung cần thiết phải xác định hàm lượng cadimi, chì cũng như các kim loại nặng độc khác trên nhiều đối tượng mẫu. Bên cạnh đó, cần thiết có quy định về giới hạn của các kim loại nặng độc trong dược liệu.

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này đã tối ưu hóa các thông số để vô cơ hóa mẫu dược liệu trong các bài thuốc YHCT của hệ lò vi sóng MARS 6 với nhiệt độ vô cơ hóa mẫu là 220°C , thời gian gia nhiệt là 15 phút, áp suất là 800 psi, thời gian ủ mẫu là 25 phút ở 220°C thu được dung dịch phá mẫu trong suốt. Axit sử dụng là HNO_3 65% với lượng là 10ml cho mỗi 0,5 g mẫu. Phương pháp GF-AAS cho hiệu suất thu hồi đạt trên 93%, độ lặp lại, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phép đo ở cấp độ ppb, các giá trị RSD% đều nhỏ hơn 10%. Các phương trình đường chuẩn xây dựng được đều có hệ số tương quan $R^2 > 0,99$ ($R^2 = 0,9991$ và $0,9948$ lần lượt cho Cd và Pb) đáp ứng được yêu cầu định lượng các nguyên tố nghiên cứu. Tất cả các thông số trên thể hiện độ tin cậy của các kết quả phân tích và có thể áp dụng cho đa số các mẫu thực vật nói chung và dược liệu nói riêng.

Hàm lượng Cd và Pb trong các mẫu bài thuốc YHCT chữa tiêu đường, sỏi mật và các mẫu thuốc cam chữa bệnh cho trẻ em đã được xác định, dao động từ 0,034 đến 0,312mg/kg (đối với cadmi) và từ 0,246 đến 1,566 mg/kg (đối với chì) nằm trong giới hạn cho phép của Tổ chức Y tế thế giới WHO.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO (2007), “Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations”, *WHO Guidelines for Selecting Marker Substances of Herbal Origin for Quality Control of Herbal Medicines*
2. Robin A. Bernhoft (2013), “Cadmium Toxicity and Treatment”, *The Scientific World Journal*, Volume 2013, Article ID 394652
3. Needleman. H (2004), “Lead poisoning”, *Annual Review of Medicine*, Vol.55, pp. 209-222
4. WHO (2007), *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues*
5. Bộ Y tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*, Nxb Y học, Hà Nội
6. In-Sil Yu¹, Jeong-Sook Lee, Sung-Dan Kim, Yun-Hee Kim, Hae-Won Park, Hoe-Jin Ryu, Jib-Ho Lee, Jeong-Mi Lee, Kweon Jung, Cheol Na, Jin-Yong Joung, Chang-Gue Son (2017), “Monitoring heavy metals, residual agricultural chemicals and sulfites in traditional herbal decoctions”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, pp. 154-162
7. ABM Helal Uddin, Reem Saadi Khalid, Mohamed Alaama, Abdualrahman M. Abdualkader, Abdulrazak Kasmun (2016), “Comparative study of three digestion methods for elemental analysis in traditional medicine products using atomic absorption spectrometry”, *Journal of Analytical Science and Technology*, pp. 6-12
8. Z. Mester, R. Sturgeon (2003), *Sample preparation for trace element analysis*, Wilson & Wilson’s
9. CEM corporation (2016), *Operation Manual MARS 6*, Matthews, North Carolina, United States of America
10. Xudong Yuan, Robert L. Chapman^b, Zhiqian Wua (2011), “Analytical Methods for Heavy Metals in Herbal Medicines”, *Phytochemical Analysis*, vol.22, 189-198
11. Phạm Luận (2008), *Phương pháp phổ phân tích nguyên tử*, Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội
12. Shimadzu corporation (1875), *Atomic Absorption spectrophotometry cookbook*, Kyoto, Japan

**DETERMINATION OF CADMIUM AND LEAD CONTENT
IN SOME TRADITIONAL HERBAL MEDICINES****ABSTRACT**

The residues of heavy metals in herbs are the causes of the accumulation of these elements in human. Currently, in Vietnam, there is no limit of the presence for these

metals in pharmaceutical materials. Therefore, this study investigated the optimal conditions to determine the content of cadmium and lead in some traditional medicines including the process of sample preparation in the microwave system by wet digestion and the quantitative method by the atomic absorption spectroscopy with atomization technique in graphite furnace (GF-AAS). The results of this study showed that the wet sample digestion method in the microwave system and the atomic absorption spectroscopy method in graphite furnaces were suitable to determine the content of Cd and Pb in herbal pharmaceutical and traditional herbal medicines containing many ingredients. The objects of this study included 7 samples of traditional medicine to treat diabetes, gallstones for adults, anorexia and gingivitis for children. This investigation showed that the amount of Cd and Pb in traditional medicines collected range from 0,034 to 0,312mg/kg (for cadmium) and from 0,246 to 1,566 mg/kg (for lead), the recovery efficiency is more than 93%.

Keywords: *Lead, cadmium, traditional herbal medicine, GF-AAS, acid digestion by microwave*

(Received: 2/7/2019, Revised: 2/12/2019, Accepted for publication: 3/12/2019)