Vietnam Journal of Food Control

A Scientific Journal of National Institute for Food Control

Journal homepage: https://vjfc.nifc.gov.vn

Research Article

Study on reference material of heavy metals (lead, cadmium, arsenicic, and mercury) in mustard greens by natural infection method

Tran Hoang Giang*, Dinh Viet Chien, Nguyen Minh Chau, Le Van Ha, Lu Thi Minh Hien, Pham Thu Giang, Tran Thi Cham

National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

(Received: 24 Jul 2024; Revised: 09 Sep 2024; Accepted: 23 Sep 2024)

Abstract

Vegetables are an essential part of daily meals. Each type contains different nutrients and serves various functions, but all provide essential nutrients for human health. Many metal elements are known to play important roles in living organisms and humans. However, heavy metal contamination can be toxic to the body and impact the health of consumers. To ensure the quality of vegetable products, determining the levels of heavy metals (Pb, Cd, As, Hg) is crucial for food safety control in vegetables. Therefore, using heavy metal standard samples (Pb, Cd, As, and Hg) in vegetables provides reference values and accuracy benchmarks for testing results, aiding in precise and objective evaluation during sample testing. This study aims to develop a process for creating standard samples for analyzing heavy metals Pb, Cd, As, and Hg in vegetables using a natural contamination method. The produced samples demonstrated consistency and stability, with an estimated duration of 627 days from the production date. The measurement uncertainty ranges from 7,94% to 15,7%. The values of the standard samples align with the low contamination levels required for analysis, making them suitable for quality control in laboratories. Additionally, the results of this study lay the groundwork for further research into developing other standard samples with diverse matrices and analytical criteria using natural contamination methods.

Keywords: *CRM, RM, heavy metals, vegetables.*

* *Corresponding author: Tran Hoang Giang (E-mail: thg93pt@gmail.com)*

Doi: https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4376

Nghiên cứu quy trình tạo mẫu chuẩn kim loại nặng (Pb, Cd, As, Hg) trong rau cải xanh theo phương pháp nhiễm tự nhiên

Trần Hoàng Giang*, Đinh Viết Chiến, Nguyễn Minh Châu, Lê Văn Hà,
Lữ Thị Minh Hiền, Phạm Thu Giang, Trần Thị Châm
Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Rau xanh là loại thực phẩm không thể thiếu trong các bữa ăn hàng ngày. Mỗi loại rau đều chứa các chất và có tác dụng khác nhau nhưng chúng đều cung cấp chất dinh dưỡng cho con người. Người ta thấy rằng, nhiều nguyên tố kim loại trong rau có vai trò quan trọng đối với cơ thể sống và con người. Tuy nhiên, nếu rau bị nhiễm kim loại nặng chúng có thể tích lũy, gây độc cho cơ thể và ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Xác định hàm lượng các kim loại nặng (Pb, Cd, As, Hg) trong rau như vậy có ý nghĩa rất quan trọng trong kiểm soát an toàn thực phẩm. Do đó, việc sử dụng mẫu chuẩn kim loại nặng (Pb, Cd, As và Hg) trong rau giúp cung cấp giá trị tham chiếu, thước đo độ chính xác đối với kết quả thử nghiệm, qua đó đánh giá chính xác và khách quan quá trình thử nghiệm mẫu. Nghiên cứu này nhằm đưa ra được quy trình tạo mẫu chuẩn phân tích kim loại nặng Pb, Cd, As và Hg trong rau xanh theo phương pháp nhiễm tự nhiên. Các mẫu chuẩn đã đạt được độ đồng nhất và đánh giá ổn định ước tính trong thời gian 627 ngày kể từ ngày sản xuất. Độ không đảm bảo đo trong khoảng từ 7,94 - 15,7%. Các giá trị của mẫu chuẩn phù hợp với nồng độ cần phân tích của các kim loại nặng ở mức nhiễm nồng độ thấp, có thể sử dụng trong các phòng kiểm nghiệm để kiểm soát chất lượng kết quả thử nghiệm các nguyên tố kim loại trong rau.

Từ khóa: *CRM, RM, kim loại nặng, rau*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc sử dụng mẫu chuẩn là một trong những biện pháp đảm bảo chất lượng kết quả thí nghiệm tốt nhất, cung cấp bằng chứng khách quan và độ tin cậy cao trong các vấn đề liên quan đến phát triển, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp, hiệu chuẩn thiết bị đo lường, nghiên cứu khoa học và giải quyết các vấn đề khiếu nại liên quan đến kết quả thử nghiệm. Hiện nay, ở Việt Nam đã có một số đơn vị được công nhận ISO 17034 về cung cấp các mẫu chuẩn, tuy nhiên chưa có nhiều mẫu chuẩn liên quan và bao phủ được hết các nền mẫu thực phẩm. Các phòng thí nghiệm trong nước vẫn thường phải đặt mua mẫu chuẩn từ các nhà cung cấp dịch vụ thử nghiệm thành thạo uy tín trên thế giới như FAPAS, NIST ... với giá thành tương đối đắt.

Mẫu chuẩn kim loại nặng là một trong những loại mẫu được sử dụng rộng rãi tại nhiều phòng thử nghiệm. Các chỉ tiêu thông thường như chì, cadmi, arsen, thủy ngân được yêu cầu kiểm soát trong thực phẩm theo quy định tại QCVN 8-2:2011/BYT [1]. Việc tạo mẫu kiểm soát chất lượng bằng phương pháp thêm chuẩn trực tiếp các chuẩn của những nguyên tố này vào nền mẫu thường không phản ánh đầy đủ tính liên kết của chất phân tích với nền mẫu,

cũng như có độ đồng nhất và ổn định kém. Trong khi đó, các mẫu chuẩn nhiễm kim loại nặng tự nhiên thường cho độ ổn định lâu dài và khắc phục được các nhược điểm trên.

Các nghiên cứu đã cho thấy rau củ trồng trên vùng đất ô nhiễm kim loại sẽ có khả năng tích lũy cao các nguyên tố này. Kim loại nặng có mặt trong cả phần ăn được và không ăn được của nhiều loại trái cây và rau quả. Cà chua, bắp cải được trồng trên đất bị ô nhiễm kim loại nặng mang hàm lượng kim loại nặng cao hơn so với rau trồng trên đất không bị ô nhiễm [4]. Xà lách cũng là một loại rau ăn lá phổ biến được quan tâm và có khả năng tích lũy nhiều kim loại độc hại với các nồng độ khác nhau [5]. Nhiều loại thực vật do đó còn được sử dụng để xử lí ô nhiễm kim loại nặng trong đất.

Thực vật có nhiều phản ứng khác nhau đối với sự có mặt của ion kim loại trong môi trường, có một số loài thực vật không chỉ sống trong môi trường ô nhiễm kim loại mà chúng còn có khả năng hấp thụ và tích lũy kim loại trong các bộ phận khác nhau của cơ thể. Thực vật lấy chất dinh dưỡng dưới dạng hòa tan và các phân tử ion thông qua bộ rễ. Giữa rễ và keo đất luôn xảy ra quá trình trao đổi ion. Các ion có thể liên kết chặt trong hạt keo đất hoặc ở dạng khó tan nhưng nhờ rễ cây có khả năng chuyển vào đất nhiều loại acid hữu cơ (acid malic, acid citric…) và acid cacbonic biến các chất khó tan thành chất dễ tan để cây dễ hấp thụ [4, 6-7].

Do đó, việc nghiên cứu tạo mẫu chuẩn kim loại nặng theo phương pháp nhiễm tự nhiên có ý nghĩa quan trọng trong việc giải quyết các vấn đề liên quan đến xây dựng quy trình tạo mẫu chuẩn tối ưu nhằm hướng đến kế hoạch mở rộng năng lực của Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia xin công nhận ISO 17304. Đồng thời, nghiên cứu cũng sẽ mở ra hướng dịch vụ mới của Viện thông qua việc cung cấp mẫu chuẩn kim loại nặng cho các phòng thử nghiệm phục vụ công tác đảm bảo chất lượng và xin chỉ định mở rộng lĩnh vực kiểm nghiệm của các cơ quan quản lý.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu chuẩn Pb, Cd, As, Hg trong rau cải xanh (cải bẹ xanh).

2.2. Thiết bị dụng cụ, hóa chất

Các chất chuẩn đơn gồm: chì (Merck, lô HC14813176, code 119776), cadmi (CPA chem, lô 886520, code A010.2NP.L5), arsen (Merck, lô HC16350373, code 119773), thủy ngân (Merck lô HC15161426 code 170226), vàng (Merck, lô HC14718116, code 170216) đều có nồng độ 1000 ppm, nội chuẩn terbium (Merck lô 877873, code 7027.K1.5N.L1) có nồng độ 10 ppm. Các dung môi, hóa chất gồm HNO_3 65%; methanol (MeOH); hydro peoxid H_2O_2 30% đều có nguồn gốc từ Merck (Đức), nước deion có độ dẫn điện18 MΩ/cm (MiliQ).

Thiết bị phổ khối plasma cao tần cảm ứng (ICP-MS) của hãng PerkinElmer NexION 2000, khí Ar tinh khiết (99,999%), khí Heli tinh khiết (99,999%). Thiết bị vi sóng phá mẫu Ethos up của hãng Milestone.

Thiết bị phụ trợ gồm cân phân tích (có độ chính xác 0,1 mg) XS105 (Metter Toledo), máy rung siêu âm S100H (Elma), máy xay, máy trộn và các thiết bị, dụng cụ thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xử lý mẫu

Cân chính xác khoảng 0,3 - 0,4 gam mẫu vào các bình phân hủy được làm bằng Teflon trong lò vi sóng. Thêm lần lượt 0,5 mL chất nội chuẩn Terbium 100 µg/L, 0,5 mL dung dịch vàng (Au) 5 mg/L, 8 mL HNO_3 65% (2.2) và 2 mL H_2O_2 30% (2.2). Đậy nắp bình và đưa vào lò vi sóng để phân hủy mẫu theo chương trình đã cài đặt (Bảng 1). Sau khi phân hủy mẫu xong, mẫu được làm nguội về nhiệt độ phòng và định mức bằng nước deion (2.2) đến vạch 50 mL. Lọc mẫu qua màng lọc 0,45µm rồi phân tích trên thiết bị ICP-MS.

Bảng 1. *Chương trình phá mẫu vô cơ bằng lò vi sóng*

Giai đoạn	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)
1	25	25 - 180
2	15	180
3 (làm mát)	20	25

2.3.2. Điều kiện phân tích trên thiết bị

Trước khi tiến hành phân tích, thực hiện tối ưu thiết bị bằng dung dịch tunning của hãng (PerkinElmer, USA cung cấp). Sau khi tối ưu xong thu được các điều kiện vận hành được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. *Các thông số tối ưu được cài đặt thiết bị ICP-MS NexION 2000*

Thiết bị ICP-MS	PerkinElmer NexION 2000
Công suất cao tần RF	1500 W
Lưu lượng khí Ar plasma	15 L/phút
Lưu lượng dòng khí Ar phụ trợ	1,2 L/phút
Lưu lượng dòng khí Nebulizer	0,98 L/phút
Tốc độ hút mẫu	250 µL/phút
Thời gian phân tích	100-500 ms
Số lần quét lặp lại một mẫu	3 lần
Chế độ phân tích	KED (đo va chạm động học)
Các đồng vị nguyên tố phân tích	^{208}Pb, ^{111}Cd, ^{75}As, ^{202}Hg

2.3.3. Phương pháp phân tích mẫu

Các nguyên tố kim loại nặng (Pb, Cd, As, Hg) trong mẫu rau cải được phân tích bằng phương pháp AOAC 2015.01 đã được thẩm định theo AOAC Official Method 2007.01 và CEN Method 15662. Phương pháp phân tích này được thực hiện tại Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia (NIFC, Việt Nam) đã được công nhận phù hợp theo ISO/IEC 17025:2017.

2.4. Thiết lập mẫu chuẩn kim loại trên nền mẫu rau cải

2.4.1. Chuẩn bị điều kiện trồng

- Lựa chọn loại rau cải xanh (cải bẹ xanh) có những đặc điểm như: thời gian gieo trồng không quá dài có khả năng tích lũy nước cao, ít xơ, dễ xay hoặc nghiền thành dạng bột mịn khi phơi hoặc sấy khô.

- Chuẩn bị các thùng xốp có chứa đất phù sa thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây rau cải.

- Gieo hạt rau cải xanh theo phương thức canh tác thông thường trên đất phù sa có bổ sung các nguyên tố kim loại nặng nghiên cứu trong quá trình tưới tiêu và bón phân nhằm tăng chất dinh dưỡng cũng như các nguyên tố này trong thân, lá của rau.

2.4.2 Bố trí thí nghiệm gieo trồng

- *Bước 1:* Chuẩn bị thùng xốp cao cỡ khoảng 30 cm, độ dầy khoảng 20 cm, chiều dài 40 khoảng 40 cm, chiều rộng khoảng 30 cm. Cho 30-35 kg đất phù sa thịt vào các thùng xốp (chậu thí nghiệm). Bổ sung thêm 2-3 kg phân bón vi sinh cho 1 thùng xốp và trộn đều. Sau đó, tiến hành bổ sung các kim loại nặng chì, cadmi, arsen, thủy ngân dưới dạng dung dịch từ các muối $Pb(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2.4H_2O$, $NaAsO_2$, $Hg_2(NO_3)_2.2H_2O$ có nồng độ 550 ppm (chuẩn bị bằng cách hòa tan các muối trong nước) vào các thùng xốp bằng cách tưới đẫm (tưới khoảng 1 lít dung dịch vừa pha trên một thùng xốp, lượng tưới được chia làm 02 lần, ngày thứ nhất tưới khoảng 500 mL, ngày thứ hai tưới khoảng 500 mL).

- *Bước 2:* Tiến hành gieo hạt rau cải xanh (cải bẹ xanh) trên đất đã nhiễm các kim loại vào chậu thí nghiệm ở bước 1. Sau khi cây con có từ 3-4 lá thật thì lúc này tỉa bớt các cây con, cây giữ lại có thể sinh trưởng và phát triển tốt. Cần phải bổ sung lượng nước tưới cho cây ngay để giúp cây nhanh chóng phát triển, thời gian đầu thì có thể tưới 2 lần/ ngày vào buổi sáng sớm và chiều tốt, tránh tưới quá nhiều nước dẫn đến nấm bệnh và cây bị ngập úng, không phát triển. Thêm lượng phân vô cơ theo hàm lượng sau, tỉ lệ 2 lân: 0,5 đạm: 0,5 kali. Lấy 2 thìa cà phê super lân, 0,5 thìa cà phê đạm và 0,5 thìa cà phê kali trộn lẫn với nhau rồi pha với bình 20 lít nước. Mỗi ngày tưới cho 1 thùng xốp khoảng 300 – 500 mL/lần. Sau từ 10-15 ngày trồng tiến hành bón thúc cho cây lần 1 để giúp cây phát triển tốt hơn.

Khi cây xoè lá thì bón thúc lần thứ hai. Trước khi bón thúc nên xới xáo mặt thùng kết hợp với vun cao gốc cho cải xanh (cải bẹ) để chống đổ và nhặt cỏ dại. Trong suốt quá trình sinh trưởng của rau cải xanh cần bón thúc 5 – 7 lần tuỳ tốc độ sinh trưởng của cây, màu sắc của thân lá cây mà tăng hay giảm lượng phân bón cho phù hợp.

Theo dõi thời gian sinh trưởng và phát triển của rau cải xanh trong vòng 80 - 90 ngày. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây, thường xuyên tưới nước đảm bảo độ ẩm cho cây có thể phát triển và đến lúc rau cải xòe lá thì bón phân cung cấp dinh dưỡng cho cây để cây đủ sức sinh trưởng trên môi trường ô nhiễm kim loại nặng

- *Bước 3:* Sau thời gian trồng, tiến hành lấy cây ra khỏi chậu thí nghiệm. Lấy phần thân và lá của cây rau đem rửa sạch để loại bỏ đất cát bằng nước máy, sau đó rửa lại bằng nước cất, để ráo nước rồi mang đi sấy lạnh ở 35-40°C đến khi khô kiệt nước. Dùng máy xay và máy trộn để đồng nhất và trộn đều toàn bộ mẫu rau đã thu hoạch trên vùng đất nhiễm kim loại.

- *Bước 4*. Mẫu được nghiền nhỏ rồi đựng vào các lọ kín miệng để bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.5. Đánh giá độ đồng nhất, độ ổn định

2.5.1. Đánh giá độ đồng nhất

Chọn ngẫu nhiên 10 mẫu, đo chất phân tích 2 lần lặp (mẫu song song). Đánh giá độ đồng nhất của lô mẫu được tạo ra theo ISO 13528:2015 và ISO Guide 35:2017 [8, 11]. Xử

lý thống kê bằng ANOVA một yếu tố, nếu giá trị P-value > 0,05 thì kết luận sự khác biệt giữa các mẫu không có ý nghĩa thống kê.

2.5.2. Đánh giá độ ổn định

Đánh giá độ ổn định theo thời gian: mẫu được bảo quản ở điều kiện 25 ± 5°C trong phòng lưu mẫu được kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm hàng ngày. Các lọ mẫu chuẩn trong mỗi nhóm đã được kiểm tra nồng độ các kim loại nặng hàng tháng trong 8 tháng. Năm lọ đại diện cho mỗi nhóm được chọn ngẫu nhiên và phân tích lặp. Số liệu được thu thập từ 8 điểm (kể từ ngày sản xuất) [8].

2.6. Giá trị chứng nhận và độ không đảm bảo đo

Giá trị được chứng nhận của 4 kim loại nặng được tính bằng trung bình của 10 lọ mẫu tại thời điểm ban đầu (đánh giá tính đồng nhất). Độ không đảm bảo đo của mẫu chuẩn được chứng nhận là căn bậc hai của tổng bình phương của các thành phần: độ không đảm bảo đo của tính đồng nhất (u_{hom}), độ không đảm bảo đo của độ ổn định lâu dài (u_{stab}), độ không đảm bảo đô vận chuyển (u_{trans}), độ không đảm bảo đo của đặc tính bao gồm độ không đảm bảo đo của dung dịch chuẩn đối chiếu kim loại nặng (u_{std}) và độ không đảm bảo đo của phương pháp phân tích (u_{meth}):

$$u_{CRM} = \sqrt{u_{hom}^2 + u_{stab}^2 + u_{trans}^2 + u_{std}^2 + u_{meth}^2}$$

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả tạo mẫu vật liệu chuẩn

Sau thời gian thực hiện thí nghiệm theo các bước (mục 2.4), nghiên cứu đã tạo được mẫu vật liệu chuẩn rau cải xanh bằng phương pháp nhiễm tự nhiên ở Hình 1. Tổng cộng đã tạo được 200 mẫu, mỗi mẫu có khối lượng 200 gram.

Hình 1. *Mẫu vật liệu chuẩn rau cải xanh*

3.2. Đánh giá độ đồng nhất

Kết quả chọn ngẫu nhiên 10 mẫu, đo các chất phân tích 2 lần lặp (mẫu song song) để đánh giá độ đồng nhất trên thiết bị ICP-MS được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. *Kết quả phân tích đánh giá độ đồng nhất chì, cadmi, arsen, thủy ngân trong mẫu*

TT	Mẫu số	Kết quả phân tích							
		Chì (mg/kg)		Cadmi (µg/kg)		Arsen (µg/kg)		Thủy ngân (µg/kg)	
		Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2
1	2	0,129	0,119	11,5	11,9	21,8	22,0	12,0	12,3
2	12	0,125	0,132	13,5	10,8	20,5	21,0	11,9	11,6
3	11	0,118	0,126	12,9	11,9	22,6	21,2	10,2	12,3
4	37	0,119	0,128	11,3	11,8	20,2	21,3	10,5	10,2
5	56	0,130	0,122	11,2	10,2	20,4	21,3	12,9	10,4
6	69	0,132	0,125	10,0	13,6	23,7	21,5	11,2	11,0
7	73	0,133	0,126	10,6	11,0	21,2	22,0	10,9	11,0
8	99	0,123	0,129	11,1	10,4	21,8	23,4	10,6	10,1
9	138	0,123	0,118	10,7	11,9	23,1	21,6	12,9	11,5
10	152	0,133	0,128	11,5	12,0	22,0	23,0	11,2	11,4

Sử dụng phân tích ANOVA phương sai một yếu tố trong phần mềm R thu được các giá trị P-value > 0,05. Do vậy sự khác biệt giữa các mẫu không có ý nghĩa thống kê. Vậy mẫu đạt độ đồng nhất hàm lượng Pb, Cd, As, Hg.

3.3. Đánh giá độ ổn định ngắn hạn sau khi mở nắp

Mẫu chuẩn có thể được sử dụng làm mẫu thử nghiệm thành thạo hoặc mẫu kiểm soát chất lượng, vì vậy những sản phẩm này thường được đóng gói cẩn thận trong bao bì. Thực tế, các phòng thí nghiệm sẽ sử dụng mẫu chuẩn hoặc vật liệu chuẩn trong phân tích hàng ngày để kiểm soát chất lượng của toàn bộ quá trình thí nghiệm. Trong khi mở mẫu như vậy, tác động của môi trường mẫu có thể bị hút ẩm, theo thời gian mẫu có thể bị biến đổi ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Vì vậy, việc nghiên cứu độ ổn định ngắn hạn sau khi mở nắp mẫu chuẩn ở các ngày khác nhau là rất quan trọng. Mẫu sau mỗi lần mở nắp được để trong bình hút ẩm ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm (25 ± 5°C) (Bảng 4).

Bảng 4. *Kết quả phân tích độ ổn định ngắn hạn sau khi mở nắp mẫu*

Thời gian phân tích	Kết quả phân tích			
	Chì (mg/kg)	Cadmi (µg/kg)	Arsen (µg/kg)	Thủy ngân (µg/kg)
Ban đầu (bắt đầu mở mẫu)	0,123 ± 0,003	11,1 ± 0,28	21,6 ± 0,57	11,6 ± 0,57
6 ngày	0,126 ± 0,003	11,6 ± 0,85	22,1 ± 0,07	11,6 ± 0,49
9 ngày	0,125 ± 0,002	11,4 ± 0,35	22,0 ± 0,78	11,5 ± 0,007
17 ngày	0,122 ± 0,004	11,3 ± 0,49	21,7 ± 0,42	11,4 ± 0,21
23 ngày	0,122 ± 0,003	11,1 ± 0,35	21,3 ± 0,21	11,0 ± 0,21

Ghi chú: Các giá trị được tính trung bình ± SD (n=2)

Sử dụng kiểm định F-test và T-test trong phần mềm Excel thu được các giá trị P-value > 0,05 chứng tỏ sự khác biệt giá trị trung bình giữa hai mẫu phân tích lặp và các lần phân

tích không có ý nghĩa thống kê. Do đó, mẫu đạt độ ổn định ngắn hạn sau khi mở nắp mẫu đối với hàm lượng Pb, Cd, As, Hg.

3.4. Đánh giá độ ổn định lâu dài, ước tính thời hạn sử dụng và độ không đảm bảo

Lựa chọn 5 mẫu ngẫu nhiên trong lô mẫu vừa tạo tiến hành phân tích lặp lại các mẫu. Từ kết quả phân tích lặp 2 lần các mẫu, so sánh với giá trị kiểm tra độ đồng nhất.

+ Sử dụng phân tích F-Test Two-Sample for Variances để so sánh phương sai giữa 2 nhóm mẫu. Nếu giá trị P-value > 0,05 thì kết luận 2 nhóm mẫu có cùng phương sai.

+ Sử dụng t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances hoặc t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances để so sánh sự khác biệt giá trị trung bình giữa 2 nhóm mẫu. Nếu giá trị P-value > 0,05 thì kết luận sự khác biệt giữa các mẫu không có ý nghĩa thống kê.

Kết quả phân tích đánh giá độ ổn định được trình bày trong Bảng 5. Dữ liệu được thu thập để thiết lập đường xu hướng. Trong trường hợp này, sự thay đổi nồng độ là nhỏ nên xu hướng tuyến tính được áp dụng cho tất cả các kim loại nghiên cứu. Sự thay đổi có thể chấp nhận được đối với chất phân tích để đánh giá độ không đảm bảo đo về độ ổn định lâu dài là 10% giá trị được chứng nhận. Thành phần chính gây ra độ không đảm bảo đo của mẫu chuẩn là độ không đảm bảo của phương pháp phân tích là 20% giá trị kết quả phân tích. Giá trị được chứng nhận, thời hạn sử dụng ước tính và độ không đảm bảo đo của 4 kim loại được trình bày trong Bảng 5.

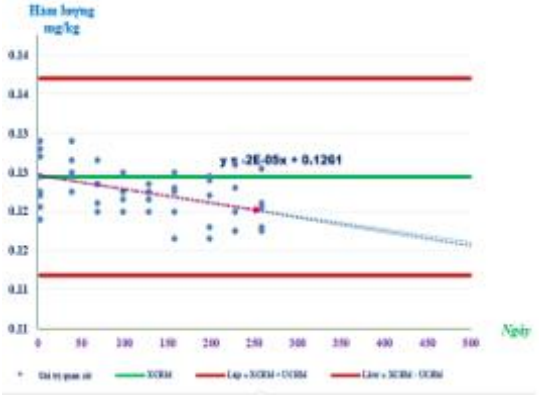
Bảng 5. *Kết quả phân tích đánh giá độ ổn định chì, cadmi, arsen, thủy ngân trong mẫu*

TT	Thời gian (ngày)	Kết quả trung bình			
		Chì (mg/kg)	Cadmi (µg/kg)	Arsen (µg/kg)	Thủy ngân (µg/kg)
1	39	0,127	10,9	21,5	11,8
		0,128	10,9	21,1	11,4
		0,124	12,1	22,1	11,1
		0,126	11,6	21,6	11,6
		0,131	11,5	21,1	11,2
2	69	0,122	11,8	21,6	11,0
		0,128	11,7	20,0	10,8
		0,125	11,1	21,4	11,4
		0,123	11,0	21,9	11,6
		0,125	11,2	21,0	11,4
3	98	0,123	11,6	21,6	11,7
		0,124	11,9	21,5	11,3
		0,127	11,5	20,9	10,7
		0,124	11,0	21,0	11,4
		0,122	10,7	21,0	10,9
4	128	0,124	11,4	20,9	10,9
		0,122	10,8	20,8	11,2
		0,125	11,5	20,9	11,6
		0,123	10,9	21,6	11,3

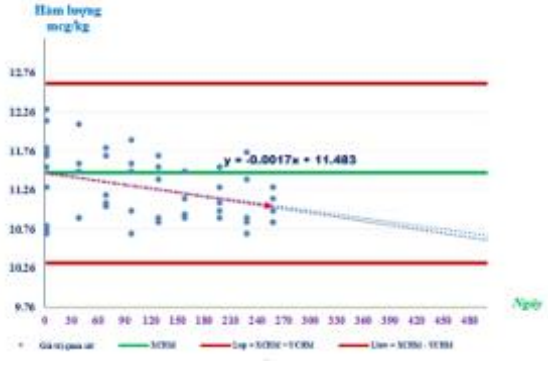
TT	Thời gian (ngày)	Kết quả trung bình			
		Chì (mg/kg)	Cadmi (µg/kg)	Arsen (µg/kg)	Thủy ngân (µg/kg)
		0,123	11,7	21,5	10,6
5	158	0,127	10,9	21,3	10,9
		0,125	10,9	20,8	11,9
		0,124	11,5	21,6	10,7
		0,118	11,5	20,8	10,9
		0,122	11,1	21,1	10,9
6	198	0,124	10,9	21,1	11,8
		0,118	11,0	20,9	10,7
		0,126	11,1	21,8	11,2
		0,126	11,3	21,2	10,4
		0,120	11,5	20,4	11,2
7	228	0,122	11,8	21,0	11,4
		0,119	10,9	20,7	11,0
		0,128	10,7	21,6	10,8
		0,119	11,4	21,0	11,0
		0,125	10,8	20,8	10,8
8	258	0,122	11,3	21,1	11,3
		0,120	10,8	21,5	11,2
		0,127	11,1	20,8	10,8
		0,119	11,0	20,7	11,0
		0,123	10,8	20,8	10,5

Sử dụng kiểm định F-test và T-test trong phần mềm Excel thu được các giá trị P-value > 0,05 do đó sự khác biệt giá trị trung bình giữa hai mẫu phân tích lặp và các lần phân tích không có ý nghĩa thống kê. Các biến đổi này có thể do sai số của phương pháp phân tích.

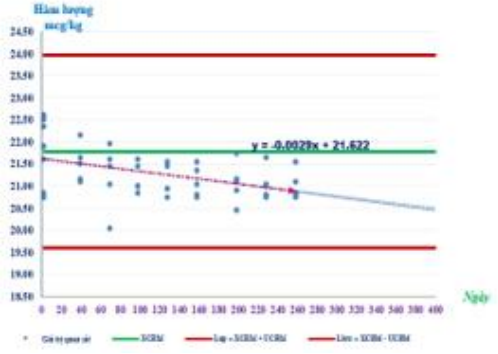
Dựa theo các kết quả nghiên cứu độ ổn định dài hạn tại nhiệt độ bảo quản (25 ± 5°C) và giá trị chứng nhận, đồ thị biểu diễn hạn sử dụng của mẫu rau được đưa ra tại Hình 2 - Hình 5 và Bảng 6.



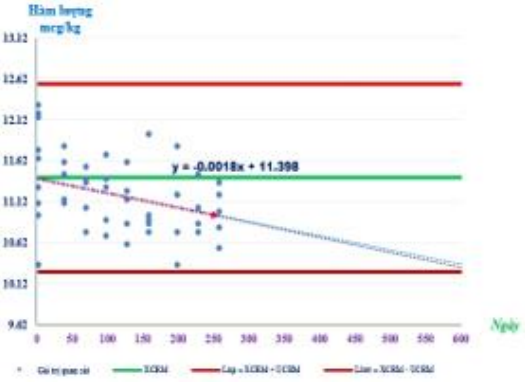
Hình 2. *Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của chì*



Hình 3. *Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của cadmi*



Hình 4. *Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của Arsenic*



Hình 5*. Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của Thủy ngân*

Bảng 6. *Giá trị được chứng nhận, thời hạn sử dụng ước tính và độ không đảm bảo đo mở rộng (k=2) của 4 nguyên tố kim loại*

STT	Chất phân tích	Giá trị được chứng nhận	Hạn sử dụng (ngày)	Độ không đảm bảo đo
1	Chì	0,126 *(mg/kg)*	707	0,010 *(mg/kg)*
2	Cadmi	11,5 *(µg/kg)*	665	*1,80* (*µg/kg)*
3	Arsen	21,8 *(µg/kg)*	682	*2,43* (*µg/kg)*
4	Thủy ngân	11,4 *(µg/kg)*	627	*1,48* (*µg/kg)*

Hàm lượng của các nguyên tố Pb, Cd, As, Hg có xu hướng giảm dần theo thời gian. Biến đổi này có thể do sai số của phương pháp phân tích hoặc do trong thời hạn lâu ngày có thể mẫu bị phân hủy bởi các vi sinh vật ở điều kiện nhiệt độ phòng. Như vậy, mẫu đạt độ ổn định đến thời điểm 627 ngày kể từ ngày sản xuất ở điều kiện nhiệt độ thường (25 ± 5°C).

Hàm lượng các kim loại nặng trong các mẫu vật liệu chuẩn này được chứng nhận như sau: chì 0,126 mg/kg, cadmi 11,5 µg/kg, arsen 21,8 µg/kg, và thủy ngân 11,4 µg/kg. Khi so sánh với các giới hạn ô nhiễm kim loại trong thực phẩm theo quy định QCVN 8-2:2011/BYT, cụ thể là đối với rau họ cải (ngoại trừ cải xoăn), giới hạn cho chì là 0,3 mg/kg và cadmi là 0,05 mg/kg, các mẫu chuẩn này có hàm lượng phù hợp với mức độ tối đa cho phép của quy chuẩn. Điều này cho thấy các mẫu chuẩn này có thể được sử dụng làm thước đo để đảm bảo chất lượng và độ tin cậy, giúp các phòng thí nghiệm kiểm soát chính xác các kết quả phân tích mẫu thực phẩm.

Mặc dù vậy, nghiên cứu này còn hạn chế khi chưa theo dõi, đánh giá được độ ổn định mẫu chuẩn bằng tủ vi khí hậu, chưa tổ chức được chương trình thử nghiệm thành thạo. Khi thiết lập giá trị ấn định của mẫu chuẩn trở nên thách thức hơn vì thiếu đi các dữ liệu đánh giá từ các phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, nhóm nghiên cứu đã tiếp cận dựa trên phương pháp thí nghiệm đã được công nhận ISO 17025, phương pháp phân tích cũng áp dụng phân tích nhiều mẫu thử nghiệm thành thạo quốc tế cho kết quả đạt 100% trong các năm 2021-2022 với z'-score thấp [11], đồng thời các thiết bị phân tích được hiệu chuẩn và bảo trì thường xuyên để đảm bảo kết quả phân tích chính xác và có độ tin cậy cao. Điều này cho thấy, nghiên cứu đã áp dụng kĩ thuật phân tích tiên tiến, phù hợp để giảm thiểu sai số của kết quả

đo. Thí nghiệm phân tích mẫu được thực hiện bởi các kiểm nghiệm viên độc lập trong nhóm nghiên cứu đảm bảo độ chụm của kết quả. Mẫu chuẩn được chuẩn bị và bảo quản trong điều kiện môi trường phù hợp (25 ± 5°C). Từ những điều kiện trên cho thấy mẫu chuẩn được tạo ra đạt được giá trị ấn định chính xác và đáng tin cậy.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phát triển các mẫu vật liệu chuẩn để phân tích các kim loại nặng (Pb, Cd, As, Hg) trong rau cải xanh bằng phương pháp nhiễm tự nhiên. Lô mẫu vật liệu chuẩn có 200 mẫu (20 gam/mẫu) được thiết lập với dự kiến độ ổn định trong 627 ngày, được bảo quản ở nhiệt độ (25 ± 5°C). Các giá trị chuẩn của hàm lượng Pb, Cd, As, Hg và độ không đảm bảo đo lần lượt là: 0,126 ± 0,010 (mg/kg), 11,5 ± 1,80 (µg/kg), 21,8 ± 2,43 (µg/kg), và 11,4 ± 1,48 (µg/kg). Khoảng hàm lượng của các nguyên tố kim loại Pb, Cd, As, Hg trong các mẫu chuẩn rau cải xanh được sản xuất phù hợp với yêu cầu kiểm soát các nguyên tố này theo quy định tại QCVN 8-2:2011/BYT. Nghiên cứu này mở ra cơ hội ứng dụng phương pháp sản xuất mẫu chuẩn cho các kim loại nặng trên các nền mẫu rau củ khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp cơ sở mã số NIFC.ĐTCS.22.04. Nhóm tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ tài chính của Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. QCVN 8-2:2011/BYT, "National Technical Regulation on Limits of Heavy Metal Contamination in Food," *Vietnam Food Administration*, 2011.

[2]. C. Poschenrieder and J. B.i Coll, "Phytoremediation: principles and perspectives," *Contributions to Science, institute d'Edtudis Catalans, Bacelona*, pp 333 – 344, 2003.

[3]. National Risk Management Research Laboratory, "Introduction to Phytoremediation," *Office of Research and Development, U.S, Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio*, 45268, 2000.

[4]. R. K. Sharma, M. Agrawal, and F. Marshall, "Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India," *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(2), 258-266, 2007.

[5]. M.A.G Maobe, E. Gatebe, L. Gitu, and H. Rotich, "Profile of heavy metals in selected medicinal plants used for the treatment of diabetes, malaria and pneumonia in Kisii Region south west Kenya," *Global Journal of Pharmacoloby*, vol. 6, no. 3, pp 245-251, 2012.

[6]. D. E. Salt, R. D. Smith, and I. Raskin, "Phytoremediation," *Annual review of plant biology*, 49(1), 643-668, 1998.

[7]. M. A. Radwan and A. K. Salama, "Market Basket Survey for Some Heavy Metals in Egyptian Fruits and Vegetables," *Food and chemical toxicology, 44*, 1273–1278, 2006.

[8]. S. Trapmann, A. Botha, T. P. Linsinger, S. Mac Curtain, and H. Emons, "The new International Standard ISO 17034: general requirements for the competence of reference material producers," *Accreditation and Quality Assurance*, 22(6), 381-387, 2017.

[9]. ISO guide 35:2017, "Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability".

[10]. ISO 5725-2:2019 (E), "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method".

[11]. Tran Hoang Giang, Dinh Viet Chien, Nguyen Minh Chau, Nguyen Quang Ngoc, and Le Thi Phuong Thao, "Determination performance of ICP-MS heavy metals in food and feed test method through participation of proficiency testing programs," VietNam Journal of Food Control, Vol.6, No. 3, 272-279, 2023.

[12]. K. An, D. Zhao, Z. Wang, et al, "Comparison of different drying methods on Chinese ginger (Zingiber officinale Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure," *Food Chemistry, 197*, 1292–1300, 2016.

[13]. G. Chew, L. P. Sim, S. Y. Ng, et al, "Development of a mushroom powder Certified Reference Material for calcium, arsenic, cadmium and lead measurements," *Food Chemistry*, 190, 293-299, 2016.

[14]. S. Recknagel, M. Koch, R. Köppen, et al, "Development of certified reference materials for the determination of cadmium and acrylamide in cocoa," *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412, 4659-4668, 2020.

[15]. J. Choi, E. Hwang, Y. H. Yim, et al, "Development of a Paste-type Certified Reference Material of Tomato for Elemental Analysis: Certification and Long-term Stability Study," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 38(2), 211-218, 2017.