

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG CHÌ MÁU BẰNG QUANG PHỔ HẤP THỤ NGUYÊN TỬ

Nguyễn Thị Minh Hạnh^{1,✉}, Trần Thị Chi Mai^{2,3}, Nguyễn Thị Huệ³, Phạm Thu Hiền³

¹Bệnh viện Châm cứu Trung ương,

²Trường Đại học Y Hà Nội,

³Bệnh viện Nhi Trung ương

Định lượng chì trong máu toàn phần là công cụ đáng tin cậy và đóng vai trò chính trong sàng lọc, chẩn đoán và theo dõi điều trị ngộ độc chì. Đề tài được thực hiện nhằm xây dựng và thẩm định kỹ thuật định lượng trực tiếp chì máu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng lò điện (GFAAS). Quy trình được xây dựng sử dụng dung dịch chuẩn chì pha trong nước, dung dịch cải biến nền mẫu gồm $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,2%; Trion X-100 0,5%, HNO_3 0,2%. Giới hạn trắng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp tương ứng là 0,03 $\mu\text{mol/L}$, 0,036 $\mu\text{mol/L}$ và 0,05 $\mu\text{mol/L}$. Khoảng tuyến tính của phương pháp là 0,1- 5 $\mu\text{mol/L}$. Độ lặp lại ở 3 mức nồng độ 0,27; 0,96 và 1,86 ($\mu\text{mol/L}$) lần lượt là 4,60, 2,94 và 5,86 (%). Độ tái lập ở ba mức nồng độ trên lần lượt là 6,97, 5,86 và 6,35 (%). Độ thu hồi của mẫu QC nằm trong giới hạn cho phép. Độ thu hồi mẫu thật thêm chuẩn là 98,2% và 101,0%, nằm trong khoảng 80- 110%; đạt tiêu chuẩn AOAC 2012. Phương pháp định lượng chì máu toàn phần bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử đảm bảo độ tin cậy, có thể sử dụng trong chẩn đoán và theo dõi ngộ độc chì.

Từ khoá: ngộ độc chì, định lượng chì máu, quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng lò điện

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng rộng rãi chì đã dẫn đến ô nhiễm môi trường, phơi nhiễm chì của con người là các vấn đề sức khỏe cộng đồng quan trọng ở nhiều nơi trên thế giới. Chì có thể gây độc cấp và mạn tính ở tất cả các nhóm tuổi, đặc biệt là sự tác động của chì đến sự phát triển trí tuệ và sự phát triển của thể hệ trẻ – tương lai của xã hội. Theo Viện đánh giá và nghiên cứu y tế (IHME) tại Đại học Washington, trên toàn thế giới năm 2017 phơi nhiễm chì gây tử vong cho 1,06 triệu người và 24,4 triệu năm mất do tàn tật và tử vong do hậu quả lâu dài của ngộ độc chì trên sức khỏe.¹ Tổ chức Y tế thế giới ước tính ngộ độc chì là nguyên nhân bệnh tật cho 13,9 triệu người năm 2012 và gây chậm phát triển tinh thần mức nhẹ đến trung bình cho 0,6

triệu trẻ em hàng năm.^{2,3} Một nghiên cứu gần đây về nồng độ chì máu và các yếu tố nguy cơ phơi nhiễm chì ở trẻ em tại thành phố Hồ Chí Minh cho thấy tỷ lệ trẻ có nồng độ chì máu cao là 7,1%; tương đương với các nước khu vực Đông Nam Á.⁴

Triệu chứng lâm sàng của ngộ độc chì có thể khó phát hiện khi không có bệnh sử rõ ràng phơi nhiễm chì; ngộ độc chì có thể không có triệu chứng; triệu chứng nếu có thường không đặc hiệu. Vì vậy xét nghiệm là thẩm dò tin cậy để chẩn đoán ngộ độc chì và đóng vai trò cốt lõi trong xác định và quản lý ngộ độc chì, trong đánh giá phơi nhiễm nghề nghiệp hay phơi nhiễm môi trường với chì.⁵ Hiện nay, nồng độ chì trong máu toàn phần được chấp nhận rộng rãi như một công cụ hữu ích trong sàng lọc và chẩn đoán ngộ độc chì.^{6,7}

Có nhiều phương pháp định lượng chì trong máu như quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS), đo điện thế (AVS) và phổ khối (ICP-MS). Hiện nay phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên

Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Thị Minh Hạnh,

Bệnh viện Châm cứu Trung ương

Email: nguyennhanhluong139@gmail.com

Ngày nhận: 27/4/2020

Ngày được chấp nhận: 26/05/2020

tử sử dụng lò điện (Graphite furnace atomic absorption spectrometry) là phương pháp hay dùng nhất để định lượng chì trong máu.⁵ Khoa Sinh hóa Bệnh viện Nhi trung ương đang sử dụng quy trình định lượng chì máu sử dụng phương pháp chuẩn pha trên nền mẫu máu toàn phần (matrix-matched standard method) và dung dịch cải biến nền mẫu có muối $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Phương pháp “matrix-matched standard method” được sử dụng để giảm thiểu ảnh hưởng của nền mẫu đến kết quả phân tích do tạo ra mẫu chuẩn, mẫu trắng, mẫu phân tích có sự phù hợp về các thành phần hóa học chính. Tuy nhiên, phương pháp này phức tạp vì đòi hỏi phải chuẩn bị các mẫu máu nồng độ chì bằng 0. Hơn nữa độ lặp lại ở mức nồng độ thấp không được tốt. Một số nghiên cứu cho thấy có thể sử dụng phương pháp chuẩn pha trong nền nước (aqueous standards), chất cải biến nền mẫu là muối $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ hoặc $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ kết hợp với $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Do vậy đề tài này được tiến hành với mục tiêu tối ưu phương pháp định lượng trực tiếp chì máu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng lò điện (GFAAS) và thẩm định phương pháp này.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Sinh hóa- Bệnh viện Nhi Trung Ương, từ tháng 8/2019 - 02/2020.

1. Trang thiết bị và hóa chất

- Máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AA-7000 với lò điện GFA-7000 và bộ hút mẫu tự động ASC-7000 của Shimadzu.

- Dung dịch chuẩn Pb 1g/L, axit nitric đặc 65% của Merck, Triton X, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ của Sigma-Aldrich. Khí Argon 99,999%, nước khử ion.

- Mẫu chứng Whole blood control- ClinCheck 3 mức của Recipe.

- Mẫu máu toàn phần của bệnh nhân có nồng độ chì thấp.

- Máu toàn phần tĩnh mạch chống đông EDTA được hủy bỏ sau khi thực hiện xét nghiệm khác.

Nguyên lý kỹ thuật phương pháp định lượng chì bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng lò điện: Một lượng nhỏ mẫu được hóa hơi và nguyên tử hóa ở nhiệt độ cao trong ống graphit. Các nguyên tử chì tự do sinh ra trong ống graphit hấp thụ tia sáng đơn sắc từ đèn catot rỗng tạo thành phổ hấp thụ nguyên tử và được xác định bởi detector nhân quang điện. Việc định lượng chì trong mẫu được thực hiện với một đường chuẩn xây dựng từ một dãy dung dịch chuẩn được chuẩn bị song song với mỗi mẻ mẫu.

2. Quy trình kỹ thuật

Điều kiện phân tích chì trên thiết bị AA-7000 tham khảo sách hướng dẫn của Shimadzu (Atomic Absorption Cook Book No 4- Electrothermal Atomic Absorption Spectrometer's Parameter for each element AA-7000). Cường độ dòng đèn catot rỗng Pb là 10 mA, độ rộng khe đo là 0,7 nm, chế độ bỏ chính nền là Background correction-deterium (BGC-D2), Pyrolysis graphite tube, thể tích tiêm mẫu là 10 μL .

Chương trình lò điện trình bày trong bảng sau

Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian (giây)	Phương pháp gia nhiệt	Tốc độ dòng khí argon (ml/phút)
1	60	3	RAMP	0,1
2	120	20	RAMP	0,1

Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian (giây)	Phương pháp gia nhiệt	Tốc độ dòng khí argon (ml/phút)
3	250	10	RAMP	0,1
4	700	10	RAMP	1
5	700	10	STEP	1
6	700	3	STEP	0
7	2000	3	STEP	0
8	2500	2	STEP	1

Tối ưu hóa quy trình kỹ thuật

Chuẩn bị dung dịch pha loãng mẫu (cải biến nền mẫu): Sử dụng các muối cải biến nền mẫu là 0,2% (NH₄)₂HPO₄ hoặc 0,2% NH₄H₂PO₄ hoặc 0,2% NH₄H₂PO₄ và 0,05% Mg(NO₃)₂; kết hợp với Triton X-100 và HNO₃.^{8,9} Nồng độ tối ưu của Triton X-100 và HNO₃ được khảo sát để chọn ra mức tối ưu: Sử dụng QC 3 mức, mỗi mẫu chạy lặp lại 3 lần. Đánh giá sự ảnh hưởng của chất cải biến nền mẫu (3 muối trên), Triton X-100, HNO₃ qua các thông số mật độ quang (Abs), tín hiệu nền (BG) và giá trị các mẫu QC thu được.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn và mẫu đo: Mẫu chuẩn, mẫu chứng và máu toàn phần được pha loãng 10 lần trong dung dịch pha loãng mẫu chuẩn bị ở trên. Các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ Pb 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3 μmol/L pha trong axit HNO₃ 1%. Đối với phương pháp chuẩn trong nước, các dung dịch chuẩn dựng đường chuẩn và mẫu đo được chuẩn bị bằng cách trộn 50 μL dung dịch chuẩn làm việc hoặc mẫu với 450 μL dung dịch pha loãng (pha loãng 10 lần). Đối với phương pháp chuẩn trong nền mẫu máu, các dung dịch chuẩn dựng đường chuẩn được chuẩn bị bằng cách trộn 50 μL dung dịch chuẩn làm việc với 50 μL máu toàn phần có nồng độ Chì bằng 0 và 400 μL dung dịch pha loãng.

3. Thẩm định phương pháp:

các thông số thẩm định được áp dụng theo

hướng dẫn của Westgard,¹⁰ AOAC 2012.¹¹

- **Giới hạn trắng (limit of blank - LOB), giới hạn phát hiện (Limit of detection - LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp:**

Sử dụng mẫu trắng, mẫu có nồng độ thấp là 0,05 và 0,1 μmol/L (mẫu trắng thêm dung dịch chuẩn chì), đo lặp lại 20 lần, tính giá trị trung bình, SD và CV. Xác định LOB và LOD: LOB = 1,65*SD (SD = độ lệch chuẩn của mẫu trắng). LOD = LOB + (1,65*SD) (SD = độ lệch chuẩn của mẫu có nồng độ thấp 0,05 μmol/L). LOQ được xác định là mẫu có nồng độ thấp nhất mà CV tính được ≈ 20%.

- **Khoảng tuyến tính của phương pháp:**

Chuẩn bị dung dịch làm việc có nồng độ Pb 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 μmol/L, sau đó pha loãng theo tỉ lệ 1:10 trong dung dịch pha loãng. Tiến hành đo lặp lại mỗi dung dịch 3 lần. Tính giá trị trung bình của mỗi nồng độ. Sử dụng phương pháp phân tích hồi quy đa thức bằng phần mềm Lincheker của Phillipe Marquis để đánh giá xem khoảng giá trị đánh giá có tuyến tính hay không. Phân tích hồi quy bằng phần mềm sẽ cho biết phương trình tương quan giữa nồng độ đo được Y với giá trị mong đợi x. Nếu phương trình tương quan là phương trình hồi quy bậc 1, có độ dốc 0,9 - 1,1 và giao điểm với trục Y là 0 ± 1,0 thì phương pháp là tuyến tính.

- **Đánh giá độ chụm (Precision):**

Tiến hành đánh giá độ lặp lại (repeatability) và độ tái lặp (intermediate repeatability). Sử

dụng mẫu QC 3 mức nồng độ QC1, QC2, QC3. Độ lặp lại: Tiến hành phân tích trong cùng một mẻ 20 lần lặp lại cho mỗi mẫu QC. Độ tái lập: Tiến hành phân tích trong 20 ngày khác nhau, mỗi ngày lặp lại 2 lần cho mỗi mức. Tính TB, SD, độ lệch chuẩn tương đối (RSD hay CV) tại mỗi nồng độ. Độ lệch chuẩn tương đối được so sánh với tiêu chuẩn cho phép của AOAC 2012.

- *Đánh giá độ chính xác (Accuracy):*

Độ chính xác của phương pháp được xác định bằng độ thu hồi của mẫu QC mức 1, 2, 3 và độ thu hồi của mẫu bệnh nhân thêm chuẩn. Mỗi nồng độ chuẩn bị 10 mẫu đo. Độ thu hồi thêm chuẩn được tính theo công thức sau:

$\% \text{ thu hồi} = (C_s - C) \times 100 / C_a$, trong đó: C_s là nồng độ đo được trong mẫu thêm chuẩn, C là nồng độ đo được trong mẫu không thêm chuẩn, C_a là nồng độ chuẩn thêm vào. Độ thu hồi được so sánh với tiêu chuẩn của AOAC 2012.

Bảng 1. So sánh phương pháp sử dụng chuẩn pha trong nước và chuẩn trong nền mẫu máu

	Khoảng cho phép của nhà sản xuất ($\mu\text{mol/L}$)	Phương pháp sử dụng chuẩn pha trong nước			Phương pháp sử dụng chuẩn trong nền mẫu máu		
		Abs.	BG	QC	Abs.	BG	QC
QC1	0,210 – 0,315	0,031	0,174	0,262	0,028	0,19	0,219
QC2	0,847 – 1,27	0,114	0,199	0,965	0,122	0,207	1,075
QC3	1,64 – 2,46	0,224	0,219	1,914	0,258	0,232	2,325

III. KẾT QUẢ

1. Tối ưu hóa phương pháp định lượng trực tiếp chì máu bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng lò điện

Phương pháp sử dụng chuẩn trong nền mẫu máu và chuẩn pha trong nước đều cho giá trị mật độ quang (Abs) và tín hiệu nền (BG) tương đương nhau; kết quả QC 3 mức đều nằm trong giới hạn cho phép. Tuy nhiên, phương pháp chuẩn pha trong nước được lựa chọn vì phương pháp này đơn giản, dễ thực hiện hơn.

2. Thẩm định phương pháp định lượng trực tiếp chì máu bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng lò điện

Bảng 2. Kết quả xác định LOB, LOD và LOQ của phương pháp

	Xác định LOB	Xác định LOD
	Mẫu có nồng độ Chì 0 $\mu\text{mol/L}$	Mẫu có nồng độ Chì 0,05 $\mu\text{mol/L}$
Số lần chạy lặp lại (n)	20	20
Trung bình	-0,046	0,019
SD ($\mu\text{mol/L}$)	0,018	0,003
CV (%)	39,1	19,0
	LOB=1,65*SD= 0,030	LOD=LOB+1,65*0.003=0,036

Phương pháp phân tích chì trong máu có giới hạn trắng (LOB) và giới hạn phát hiện (LOD) tương ứng là 0,030 và 0,036 $\mu\text{mol/L}$. Thực nghiệm phân tích lặp lại dung dịch Chì 0,05 $\mu\text{mol/L}$ có hệ số biến thiên CV=19,0 % ($\approx 20\%$), như vậy giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp là 0,05 $\mu\text{mol/L}$.

Bảng 3. Đánh giá khoảng tuyến tính của phương pháp

Mẫu	Lần chạy 1	Lần chạy 2	Lần chạy 3	Trung bình (y)	Giá trị mong đợi (x)
1	0,0799	0,0843	0,0754	0,0798	0,1
2	0,1802	0,1838	0,1820	0,1820	0,2
3	0,4959	0,4941	0,4982	0,4960	0,5
4	1,0229	1,0272	1,0369	1,0290	1
5	2,0134	2,0188	1,9864	2,0062	2
6	2,9597	2,9785	3,0318	2,9900	3
7	4,0551	4,0277	4,0414	4,0414	4
8	4,9721	4,8922	4,9068	4,9237	5
Độ dốc a					0,9954
Giao điểm b					0,0025
Phương trình tương quan					$Y = 0,9954x + 0,0025$

Khoảng tuyến tính của phương pháp là 0,1- 5 $\mu\text{mol/L}$, phương trình tương quan là $y = 0,9954x + 0,0025$. Hệ số tương quan r là 0,999.

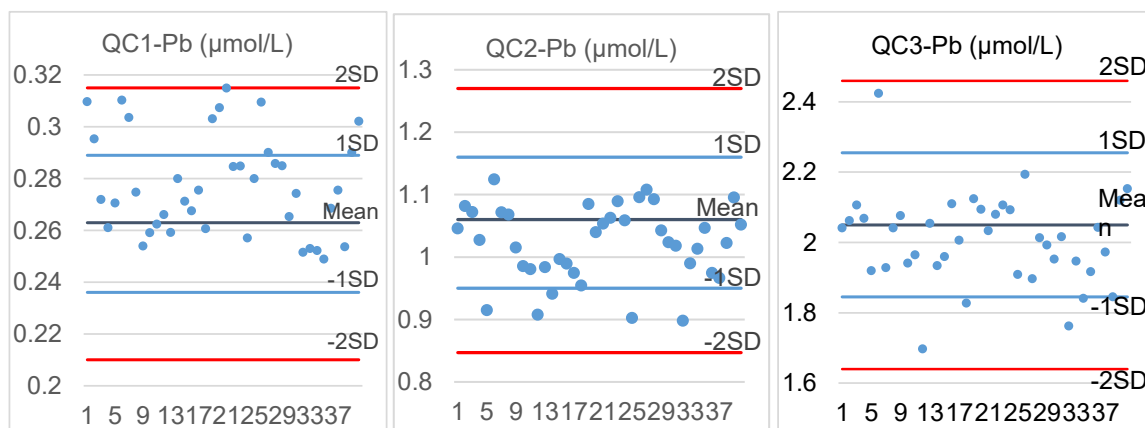
Bảng 4. Đánh giá độ chụm của phương pháp

	Mẫu	QC1	QC2	QC3
Độ lặp lại (n=20)	Trung bình ($\mu\text{mol/L}$)	0,270	0,960	1,860
	SD	0,012	0,028	0,109
	CV (%)	4,60	2,94	5,86
Độ tái lặp (n=40)	Trung bình ($\mu\text{mol/L}$)	0,277	1,020	2,006
	SD	0,019	0,059	0,127
	CV (%)	6,97	5,86	6,35

Theo tiêu chuẩn đánh giá của AOAC, đối với nồng độ chất phân tích trong khoảng 100 – 1000 $\mu\text{g/L}$ thì CV cho phép là 11 – 15%. Ba mẫu phân tích trong thí nghiệm này có nồng độ chì trong khoảng 56 – 415,6 $\mu\text{g/L}$ (0,27-2,00 $\mu\text{mol/L}$), như vậy độ lặp lại và độ tái lặp thu được là chấp nhận được.

Bảng 5. Độ thu hồi mẫu QC

Mẫu QC (n=40)	Nồng độ TB đo được ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)	Nồng độ mẫu QC theo nhà sản xuất	
			Trung bình ($\mu\text{mol/L}$)	Khoảng cho phép ($\mu\text{mol/L}$)
QC 1	0,277	6,97	0,263	0,210 – 0,315
QC 2	1,020	5,86	1,060	0,847 – 1,270
QC 3	2,006	6,35	2,050	1,640 – 2,460



Hình 1. Độ thu hồi mẫu QC

Kết quả phân tích cho thấy nồng độ chì trung bình đo được khá sát với giá trị trung bình công bố của nhà sản xuất (bảng 4), các giá trị đo được đều nằm trong khoảng giới hạn cho phép (hình 1). Độ chụm của các kết quả đo cũng đạt tiêu chuẩn giới hạn chấp nhận theo AOAC.

Bảng 6. Độ thu hồi mẫu thêm chuẩn

Nồng độ chuẩn Pb thêm vào ($\mu\text{mol/L}$)	0,5	1,5
Nồng độ Pb trung bình đo được trong mẫu không thêm chuẩn (n = 10) ($\mu\text{mol/L}$)	0,133	0,133
Nồng độ Pb trung bình đo được trong mẫu thêm chuẩn (n = 10) ($\mu\text{mol/L}$)	0,624	1,648
CV (%)	3,68	1,57
Độ thu hồi trung bình (%)	98,2	101,0
Tiêu chuẩn AOAC (%)	80 – 110	

Độ thu hồi mẫu thêm chuẩn đo được của cả hai mức nồng độ đều nằm trong khoảng cho phép theo tiêu chuẩn AOAC.

IV. BÀN LUẬN

Định lượng chì máu được khuyến cáo là xét nghiệm sàng lọc và chẩn đoán, theo dõi điều trị ngộ độc chì. Hai phương pháp định lượng chì máu hay được sử dụng là quang phổ hấp thụ nguyên tử sử dụng lò điện (GFAAS) và đo điện thế (ASV), trong đó GFAAS là phương pháp hay được sử dụng nhất.⁵ Hiện tại Khoa Sinh hoá Bệnh viện Nhi trung ương định lượng chì máu bằng GFAAS với quy trình sử dụng chuẩn chì pha trong nền mẫu máu có nồng độ chì bằng 0 và dung dịch pha loãng mẫu chứa chất cải biến nền mẫu là $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,2%. Tuy nhiên, phương pháp sử dụng chuẩn trong nền mẫu máu phức tạp hơn sử dụng chuẩn pha trong nước do phải có các mẫu máu có nồng độ chì bằng 0 và quy trình tiến hành cũng phức tạp hơn. Thêm vào đó, giá trị mức QC1 có hệ số biến thiên lớn khi sử dụng $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ là chất cải biến nền mẫu. Chất cải biến nền mẫu được đưa vào lò điện cùng với mẫu để tăng hiệu quả của quá trình phân tách chất phân tích bằng nhiệt trong giai đoạn tro hóa mẫu, ổn định chất phân tích, loại bỏ nền mẫu khi mẫu hóa hơi, giảm thiểu yếu tố nhiễu và cải thiện quá trình nguyên tử hóa. Một trong các bước tiếp cận đầu tiên trong định lượng chì trong các mẫu sinh học là tìm kiếm chất cải biến nền mẫu thích hợp. Để tối ưu hóa quy trình và lựa chọn chất cải biến nền mẫu tốt hơn, các muối $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ kết hợp $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ được lựa chọn để thử nghiệm.^{8,9} Kết quả cho thấy $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ có tác dụng tốt nhất (thể hiện trên mật độ quang, tín hiệu nền và nồng độ các mẫu QC thu được). Muối $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ được chọn sau thử nghiệm kết hợp các mức nồng độ của Triton X-100 (0,1%, 0,5%, 1%) và HNO_3 (0,1%, 0,2%, 0,5%) nhằm tạo dung dịch pha loãng mẫu hiệu quả. Phương pháp chuẩn chì trong nước và chuẩn chì trong nền mẫu máu được thử nghiệm song song, dung dịch cải biến nền mẫu gồm $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,2%, 0,5% Triton X-100, 0,2% HNO_3 cho giá trị mật độ quang và tín hiệu

nền tương đương nhau; kết quả QC 3 mức đều nằm trong giới hạn cho phép với cả hai phương pháp chuẩn. Tuy nhiên, phương pháp chuẩn chì trong nước thực hiện đơn giản hơn, do vậy được lựa chọn để thẩm định. Kết quả thẩm định cho thấy độ chụm của phương pháp đạt tiêu chuẩn của AOAC 2012.¹¹ Khi so sánh với các nghiên cứu định lượng chì máu bằng GFAAS, độ chụm của nghiên cứu này là tương tự.^{12,13,14} Đặc biệt độ lặp lại và độ tái lập trong phương pháp của chúng tôi còn cho thấy tốt hơn các nghiên cứu này ở mức nồng độ chì thấp (0,263 $\mu\text{mol/L}$).

Do không có các vật liệu tham chiếu, trong nghiên cứu này độ chính xác của phương pháp được đánh giá thông qua độ thu hồi của mẫu QC và mẫu thật thêm chuẩn. Độ thu hồi cho thấy phương pháp có độ chính xác cao. Ở cả 3 mức nồng độ thấp, trung gian và cao của đường chuẩn, độ thu hồi đều nằm trong giới hạn cho phép. Kết quả này tương đồng với kết quả đánh giá độ thu hồi của phương pháp định lượng chì trong máu và trong huyết thanh của một số nghiên cứu đã công bố.^{12,15}

Giới hạn định lượng của phương pháp là 0,05 $\mu\text{mol/L}$. Giới hạn này thấp hơn nhiều so với giá trị ngưỡng chẩn đoán ngộ độc chì mà CDC và WHO đưa ra (10 $\mu\text{g/dL}$ =0,483 $\mu\text{mol/L}$).¹⁶ Khoảng tuyến tính của đường chuẩn phương pháp là từ 0,1 đến 5 $\mu\text{mol/L}$. Hơn nữa, việc đo lường chì bằng phương pháp GFAAS được xây dựng và thẩm định ở đây còn cho phép pha loãng mẫu khi nồng độ vượt quá giới hạn khoảng tuyến tính, do vậy khoảng báo cáo kết quả rộng, thích hợp cho việc theo dõi kết quả điều trị ngộ độc chì.

V. KẾT LUẬN

Phương pháp định lượng trực tiếp chì máu với dung dịch cải biến nền mẫu sử dụng $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ trên máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AA-7000 với GFA-7000 của Shimadzu đã được tối ưu và thẩm định. Kết quả cho thấy

phương pháp đảm bảo độ tin cậy, có thể sử dụng trong chẩn đoán và theo dõi ngộ độc chì.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn Khoa Sinh hóa, Bệnh viện Nhi trung ương đã hỗ trợ triển khai các thực nghiệm trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare. Seattle, WA: IHME, University of Washington. <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>. Published November 8, 2018. Accessed August 26, 2019.

2. Landrigan P, Fuller R, Acosta NJ, et al. The lancet commission on pollution and health. *Lancet*. 2017;391(10119):462-512.

3. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety The Public Health Impact of Chemical: Knowns and Unknowns. <https://www.who.int/ipcs/publications/chemicals-public-health-impact/en/>. Published 2016. Accessed March 4, 2020.

4. Havens D, Pham MH, Karr CJ, Daniell WE. Blood Lead Levels and Risk Factors for Lead Exposure in a Pediatric Population in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(1): 93.

5. World Health Organization. *Brief guide to analytical methods for measuring lead in blood*. IOMC;2011.

6. Barbosa F, Eduardo J, Fernanda R, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations and future needs. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113: 1669-1674.

7. Parson PJ, Slavin W. A rapid Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the determination of lead in blood. *Spectrochim Acta*. 1993;48B: 925-939.

8. Sardans J, Montes F, Penuela J. Determination of As, Cd, Cu, Hg và Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. 2010;65: 97-112.

9. Modesto C, Thelma P, Arkaye K et al. Direct determination of Pb in whole blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Shimadzu *Excellence in Science*. 2016.

10. Westgard JO. *Basic method validation*. 3rd edition. Westgard QC, Inc; 2009.

11. Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. Official Methods of Analysis, Appendix D, AOAC INTERNATIONAL. Gaithersburg, MD; 2012.

12. Andrada D, Pinto FG, Magalhaes CG, Nunes BR, Franco MB, Borba da Silva JB. Direct determination of lead in human urine and serum samples by electrothermal atomic absorption spectrometry and permanent modifiers. *J Braz Chem Soc*. 2006;17(2): 328-332.

13. LeadCare® II Blood Lead Test Kit. North Billerica, MA, USA: Magellan Diagnostics, Inc; 2016. Accessed March 4, 2020.

14. Parson PJ. C40-A: Analytical procedures for the determination of lead in blood and urine; approved guideline. *National Committee for Clinical Laboratory Standards document C40-A (ISBN 1-56238-437-6)*. Pennsylvania, USA; 2001.

15. Croteau GA, Beaudet NJ, Bao ND et al. Childhood lead exposure from battery recycling in Vietnam. *BioMed Res Int*. 2015: 193715. doi: 10.1155/2015/193715.

16. Mañay N, Cousillas A, Heller T. Blood Lead Level (BLL, B-Pb) in Human and Animal Populations: B-Pb as a Biological Marker to Environmental Lead Exposure. Dr. Gáspár Bánfalvi. *Cellular Effects of Heavy Metals*. New York, NY: Springer Science+Business Media B.V; 2011:323-325.

Summary

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LEAD MEASUREMENT BY GRAPHITE FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

Whole blood lead measurement has gained wide acceptance as the most useful tool for screening, diagnostic testing and treatment monitoring of lead poisoning. The aim of this study was to develop and validate the blood lead quantitation method by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. Standards and solutions prepared are aqueous lead standards and matrix-modifier solution containing 0.2% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5% Trion X-100, and 0.2% HNO_3 . The LOB, LOD and LOQ of this method were 0.030 $\mu\text{mol/L}$, 0.036 $\mu\text{mol/L}$ and 0.05 $\mu\text{mol/L}$ respectively. The method linearity was from 0.1 to 5 $\mu\text{mol/L}$. The repeatability at the concentrations of 0.27, 0.96 and 1.86 ($\mu\text{mol/L}$) were 4.60, 2.94 và 5.86 (%) respectively. The reproducibility at the three concentrations above were 6.97, 5.86 và 6.35 (%) respectively. The recovery of three QC levels fell into the acceptable ranges. The recovery of spiked samples were within the range of 80-110% at 98.2% and 101.0%, satisfying the AOAC 2012 criteria. The developed method for direct blood lead quantitation by GFAAS was proven to be reliable, and suitable for the diagnosis and treatment monitoring of lead poisoning.

Keywords: Lead poisoning, lead blood measurement, graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS).