

**XÁC ĐỊNH SALBUTAMOL VÀ RACTOPAMINE BẰNG PHƯƠNG PHÁP
DIỆN DI MAO QUẢN SỬ DỤNG DETECTOR ĐỘ DẪN
KHÔNG TIẾP XÚC (CE-C⁴D)**

Đến tòa soạn 4 – 8 – 2014

Đoàn Thị Tươi, Nguyễn Thị Hằng, Nguyễn Thị Quỳnh Hoa

Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hoàng

Khoa Hóa học - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

Mai Thanh Đức

Trung tâm nghiên cứu công nghệ môi trường và Phát triển bền vững (CETASD) –

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

Nguyễn Thị Quỳnh Hoa

Khoa Công nghệ Hóa học và Môi trường - Trường Đại học Sư Phạm Kỹ thuật Hưng Yên

Mai Thanh Đức

Laboratory of Proteins and Nanotechnologies in separative science, Faculty of

Pharmacy, Institute Galien, University Paris Sud

SUMMARY

**DETERMINATION OF SALBUTAMOL AND RACTOPAMINE BY
CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH CONTACTLESS CONDUCTIVITY
DETECTION (CE-C⁴D)**

The illegal use of β -agonist in cattle feed to enhance muscle growth and reduces fat in affected animal has raised a big concern to consumers in Vietnam in recent time since their residues in meat can induce serious diseases such as muscle cramps, disturbed vision and eye pain, irregular heartbeat,.. In this article, a simple method for the simultaneous determination of 2 common β -agonist: Salbutamol and Ractopamine by capillary electrophoresis using contactless conductivity detector was developed. The limits of detections were 0.5 and 0.7 $\mu\text{g/mL}$ for Salbutamol và Ractopamine, respectively. This method provides average recoveries for salbutamol and ractopamine of 95,8% - 101,3%. The optimized procedure was applied to determine the Salbutamol and Ractopamine in several pig feed and pig meat samples with high confidence.

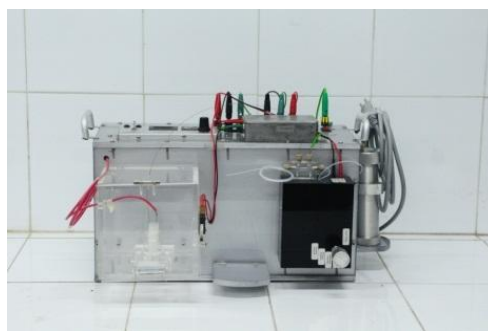
1. MỞ ĐẦU

Salbutamol (Sal) và ractopamine (Rac) là những chất thuộc họ β -agonist, được thêm trái phép vào thức ăn chăn nuôi để làm tăng tỷ lệ nạc/mỡ, làm thịt có màu đỏ tươi [4, 5]. Lợi dụng đặc tính này, một số người đã sử dụng Sal và Rac như chất bổ sung trong thức ăn chăn nuôi để kích thích lợn bùng đù, nở vai, tạo nạc trong thời gian ngắn. Tiêu thụ thức ăn có nguồn gốc từ động vật bị nhiễm β -agonist sẽ gây ra những ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người như: các bệnh liên quan đến tim mạch, hệ thần kinh trung ương... Ở Việt Nam, Sal và Rac thường được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trong các phòng thí nghiệm với trang bị hiện đại, sử dụng một lượng lớn dung môi hữu cơ tinh khiết, giá thành phân tích cao [2]. Phương pháp điện di mao quản tích hợp detector đo độ dẫn không tiếp xúc kết nối kiểu tụ điện (CE- C^4D) là một phương pháp phân tích mới với những ưu điểm như: trang bị nhỏ gọn, có thể tự động hóa và triển khai tại hiện trường, hoạt động tương đối đơn giản, lượng mẫu và hóa chất nhỏ, chi phí phân tích thấp [1, 3], cho thấy tiềm năng ứng dụng kiểm tra nhanh ngay tại các đội quản lý thị trường ở các địa phương. Trong bài báo này, chúng tôi đã nghiên cứu thành công phương pháp xác định hàm lượng Sal và Rac trong các mẫu thức ăn chăn nuôi và mẫu thịt lợn bằng phương pháp CE- C^4D .

2. THIẾT BỊ, HÓA CHẤT

2.1. Thiết bị

Hệ thiết bị điện di mao quản bán tự động sử dụng detector độ dẫn được nhóm nghiên cứu tự thiết kế, chế tạo tại Việt Nam trên cơ sở hợp tác với GS. Peter Hauser và ThS. Bùi Duy Anh (khoa Hóa, trường Đại học Basel, Thụy Sĩ). Hiện nay, hệ thiết bị này đang được triển khai ứng dụng và phát triển nâng cấp tại khoa Hóa học, trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.



Hình 1: Thiết bị điện di mao quản CE- C^4D sử dụng trong nghiên cứu

2.2. Hóa chất

Tất cả các hóa chất sử dụng đều có độ tinh khiết phân tích (p.a). Salbutamol và ractopamine (Sigma), axit phosphoric, axetic, clohydric và natri hydroxit (Merck), L-Histidin và L- Arginine (Fluka), nước deion.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

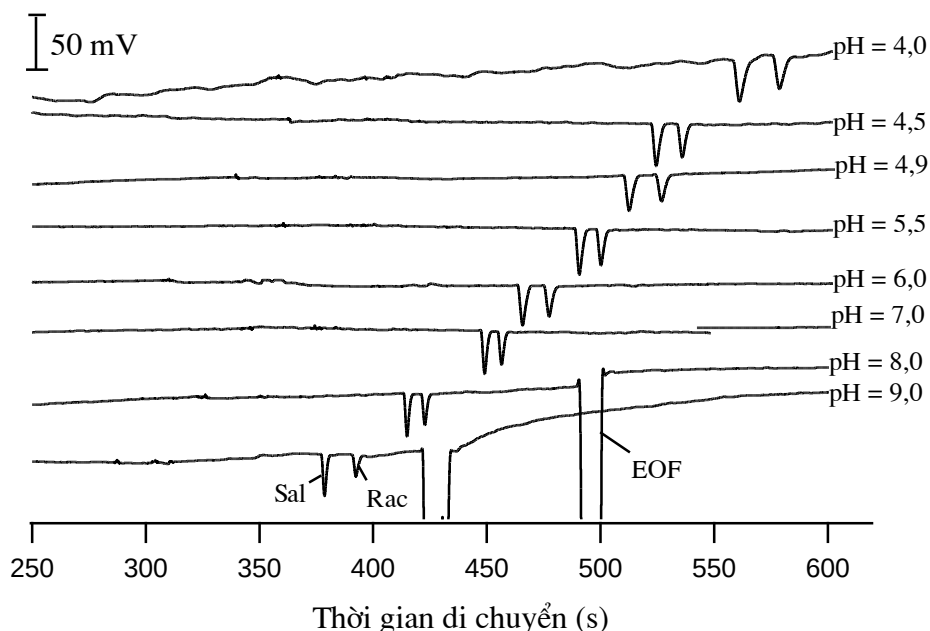
3.1. Khảo sát, tối ưu điều kiện tách và định lượng các chất phân tích

3.1.1. Khảo sát hệ đệm điện di

Thành phần và giá trị pH của dung dịch đệm là yếu tố quyết định trực tiếp đến quá trình tách điện di, các yếu tố này thay đổi sẽ làm thay đổi điện tích, tốc độ của các chất, từ đó làm thay đổi thời

gian di chuyển của các chất phân tích trong mao quản. Vì vậy, cần phải khảo sát lựa chọn thành phần, pH của dung dịch đệm thích hợp và giữ không đổi trong suốt quá trình điện di. Việc khảo sát dung dịch đệm điện di được thực hiện trên cơ sở sử dụng một hợp phần bazơ thường dùng trong phương pháp CE-C⁴D là Arginine (Arg) ($pK_a=9,09$) hoặc Histidine (His) ($pK_a=8,97$) kết hợp với một axit như phosphoric (Phos), ascorbic (Asc) hoặc axetic (Ace). Kết

quả khảo sát cho thấy hệ đệm Arg/Ace cho đường nền ổn định, tín hiệu (diện tích) pic của các chất phân tích cao hơn và độ phân giải tốt hơn so với các hệ đệm khảo sát khác. Do đó, hệ đệm này được sử dụng để khảo sát pH và các yếu tố tiếp theo. Giá trị pH được thực hiện khảo sát trong khoảng rộng từ pH = 4,0 - 9,0 và tập trung nhiều điểm trong vùng pH từ 4,0 - 6,0 theo tham khảo từ các nghiên cứu trước [3]. Các kết quả được thể hiện trong Hình 2.



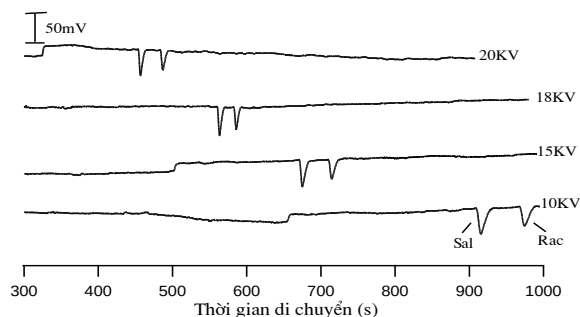
Hình 2: Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự phân tách của Sal, Rac 60 $\mu\text{g/mL}$ trong vùng pH từ 4,0 đến 9,0. Dung dịch đệm điện di: Arg/Ace, thế tách: +18 kV, mao quản silica có tổng chiều dài 60 cm (chiều dài hiệu dụng: 53 cm)

Kết quả ở Hình 2 cho thấy, khi pH tăng, tổng thời gian phân tích giảm nhưng diện tích pic và khả năng tách pic của các chất cũng giảm. Cũng có thể thấy tại giá trị pH = 4,9 cho kết quả tốt nhất về cả diện tích pic, độ phân giải giữa các pic, tín hiệu đường nền ổn định và thời

gian phân tích hợp lý. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đó của các tác giả khác [3]. Do đó, hệ đệm Arg/Ace pH = 4,9 được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

Cùng với pH, thành phần thì nồng độ dung dịch đệm cũng ảnh hưởng nhiều

đến kết quả phân tích điện di. Việc khảo sát nồng độ dung dịch đệm điện di được thực hiện trên cơ sở hệ đệm Arg/Ace pH = 4,9 với các nồng độ: 10 mM, 15 mM, 20 mM. Kết quả cho thấy tại nồng độ đệm 10 mM có nồng độ < 10mM thì đệm này của dung dịch kém thì các chất được tách tương đối tốt, các pic khá cân đối và sắc nét, diện tích pic lớn nhất, thời gian phân tích ngắn hơn so với nồng độ đệm khác. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn hệ đệm Arg/Ace, pH = 4,9, nồng độ 10 mM là điều kiện tối ưu cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3: Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thế tách với Sal, Rac 60 µg/mL. Dung dịch đệm điện di: Arg/Ace 10 mM, pH = 4,9, mao quản silica có tổng chiều dài 60 cm (chiều dài hiệu dụng: 53 cm)

Kết quả thể hiện trên điện di đồ cho thấy khi tăng thế từ +10 kV đến +20 kV, thời gian di chuyển của chất phân tích và độ phân giải giữa các pic giảm. Tại thế tách +18 kV cho kết quả đường nền ổn định, thời gian phân tích và độ phân giải phù hợp. Vì vậy chúng tôi lựa chọn thế +18 kV là thế tách tối ưu.

3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu

Trong quá trình nạp mẫu vào mao quản, lượng mẫu nạp phải đủ lớn để đảm bảo đạt độ nhạy tốt nhưng nếu vùng mẫu nạp

3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thế đặt vào hai đầu mao quản

Quá trình điện di chỉ xảy ra khi có nguồn điện thế một chiều nhất định đặt vào 2 đầu mao quản, điện thế này có vai trò điều khiển và duy trì sự di chuyển của các chất trong mao quản. Để có kết quả tốt và ổn định cần phải chọn thế thích hợp và giữ cho thế này luôn ổn định trong suốt quá trình phân tích. Các thế được lựa chọn khảo sát là: +10 kV, +15 kV, +18 kV và +20 kV. Kết quả khảo sát thế tách được thể hiện trong Hình 3.

vào quá lớn thì sự phân tán sẽ xuất hiện mạnh do hiện tượng khuếch tán làm giảm hiệu suất tách. Do đó, thời gian bơm mẫu hợp lý cũng cần được khảo sát để đảm bảo thu được tín hiệu lớn nhất mà pic không bị giãn rộng. Trên cơ sở khảo sát với các thời gian bơm mẫu 10 s, 20 s, 30 s và 50 s cho thấy khi thời gian bơm mẫu tăng, thời gian di chuyển của cả hai chất phát phân tích hầu như không thay đổi hoặc thay đổi rất ít nhưng tín hiệu (diện tích) pic thì tăng đáng kể. Tuy nhiên, khảo sát sơ bộ trên

nền mẫu thức ăn cho thấy ngoài pic của chất phân tích còn có pic của các cation. Khi thời gian bơm mẫu tăng, pic của các cation cũng tăng và có thể gây ảnh hưởng tới pic của chất phân tích. Do đó, để giảm ảnh hưởng này chúng tôi lựa chọn thời gian bơm mẫu là 20 s cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Xây dựng đường chuẩn xác định

Bảng 1: Đường chuẩn, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) cho Sal và Rac

Tên chất	Phương trình đường chuẩn (y=a+bx)	Hệ số tương quan (R)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Sal	$y = (0,70696 \pm 0,75083) + (1,04549 \pm 0,01054)x$	0,99975	0,5	1,7
Rac	$y = (-1,16947 \pm 0,42542) + (0,90011 \pm 0,00697)x$	0,99969	0,7	2,3

3.3. Kết quả phân tích một số mẫu thức ăn chăn nuôi và mẫu thịt lợn

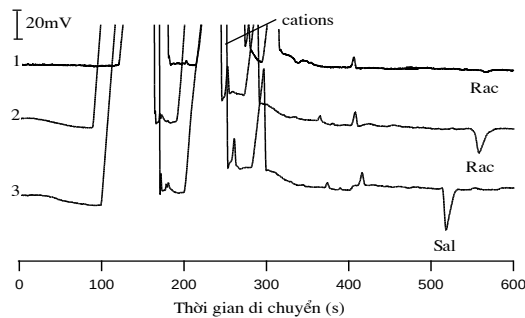
3.3.1. Mẫu thức ăn chăn nuôi

Các mẫu thức ăn chăn nuôi được cung cấp bởi viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia. Đây là mẫu cho kết quả có hàm lượng chất tạo nạc nhưng đã lưu trong những thời gian khác nhau, có thể lên đến vài tháng. Mẫu được xử lý bằng hỗn hợp metanol và nước (4:1), rung siêu âm trong khoảng 2

Sal và Rac

Trước khi tiến hành phân tích với đối tượng mẫu thức ăn chăn nuôi và thịt lợn, chúng tôi đã tiến hành lập đường chuẩn cho Sal và Rac với các điều kiện phân tích tối ưu đã khảo sát ở trên. Kết quả đường chuẩn được trình bày trong Bảng 1:

giờ, lọc qua màng lọc 0,2 µm, rồi tiến hành phân tích bằng phương pháp thêm chuẩn trên thiết bị CE-C⁴D. Hai mẫu có hàm lượng chất tạo nạc đều được phân tích đối chứng với phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector khối phổ (HPLC-MS) do Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc Gia thực hiện. Kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 4.



Hình 4: Điện di đồ xác định Sal, Rac trong mẫu thức ăn chăn nuôi. Dung dịch đệm điện di: Arg/Ace, thế tách: +18 kV, mao quản silica có tổng chiều dài 60 cm (chiều dài hiệu dụng: 53 cm). Các đường số 1, 2, 3 tương ứng với các mẫu TACN 1, 2, 3.

Bảng 2: Kết quả phân tích Sal và Rac trong mẫu thức ăn chăn nuôi (TACN)

Tên mẫu	Hàm lượng chất phân tích (bằng CE - C ⁴ D)	Hàm lượng chất phân tích (bằng HPLC-MS)	Sai số giữa phương pháp (%)
TACN 1 - có Rac	< LOQ (2,3 µg/g)	-	-
TACN 2 - có Rac	36,21 ± 0,15 (µg/g)	31,53 (µg/g)	12,92
TACN 3 - có Sal	71,16 ± 0,21 (µg/g)	83,29 (µg/g)	-14,56

Từ kết quả ở Bảng 2 cho thấy, sai số giữa hai phương pháp dao động dưới 15% chứng tỏ hàm lượng Sal và Rac thu được theo hai phương pháp khá phù hợp với hàm lượng cỡ ppm. Điều này cho thấy phương pháp CE-C⁴D hoàn toàn đáng tin cậy.

3.3.2. Mẫu thịt lợn

Mẫu thịt được mua ngẫu nhiên tại một quầy ở chợ Triều Khúc-Thanh Xuân-Hà Nội. Kết quả phân tích không tìm thấy thành phần của Sal và Rac trong mẫu. Để minh chứng khả năng phân

tích với đối tượng mẫu này, chúng tôi thêm chuẩn một lượng xác định Sal và Rac vào mẫu, tiến hành xử lý mẫu theo quy trình như đối với mẫu thức ăn chăn nuôi và phân tích trên thiết bị CE-C⁴D. Hàm lượng các chất được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn 2 mức. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi của phương pháp được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: Kết quả xác định hiệu suất thu hồi của Sal và Rac trong mẫu thịt lợn

Tên chất	Nồng độ chất chuẩn thêm vào (ppm)		Nồng độ phân tích được (ppm)		Hiệu suất thu hồi (%)		Hiệu suất thu hồi trung bình (%)
	Mức 1	Mức 2	Mức 1	Mức 2	Mức 1	Mức 2	
Sal	40,0	60,0	40,5	59,1	101,3	98,3	99,8
Rac	40,0	60,0	38,3	60,5	95,8	100,8	98,3

Từ bảng 3 có thể thấy độ thu hồi của các chất là khá cao, từ 95,8% - 101,3%, cho thấy phương pháp phân tích xác định Sal và Rac trong mẫu thịt lợn là đáng tin cậy.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã khảo sát điều kiện tối ưu xác định đồng thời Sal và Rac bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc với giới hạn phát hiện (LOD) trong khoảng 0,5 µg/mL đến 0,7 µg/mL và giới hạn định

lượng (LOQ) từ 1,7 µg/mL đến 2,3 µg/mL. Quy trình đã được áp dụng phân tích một số mẫu thức ăn chăn nuôi và đối chứng với phương pháp tiêu chuẩn HPLC-MS cho kết quả đáng tin cậy. Khi áp dụng quy trình vào phân tích một số mẫu thịt lợn thêm chuẩn cho hiệu suất thu hồi cao. Từ đó cho thấy, phương pháp CE-C⁴D là đáng tin cậy và có tiềm năng trong việc ứng dụng phân tích kiểm nghiệm một số chất tạo nạc ngay

tại hiện trường như tại các chợ, cơ sở nuôi, giết mổ lợn, các đội quản lý thị trường địa phương,... góp phần đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm cho người tiêu dùng. Ngoài ra, phương pháp còn có thể mở rộng áp dụng với một số đối tượng mẫu sinh học khác như mẫu nước tiểu, mẫu máu,...

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài TN-14-12. Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hợp tác nghiên cứu chế tạo thiết bị CE-C⁴D của GS. Peter C. Hauser và ThS. Bùi Duy Anh (Trường Đại học Basel, Thụy sĩ), cũng như sự hợp tác phân tích đối chứng và cung cấp mẫu thức ăn chăn nuôi của TS. Lê Thị Hồng Hảo, ThS. Vũ Thị Trang cùng nhóm nghiên cứu về chất tạo nạc tại Viện Kiểm nghiệm An toàn vệ sinh Thực phẩm Quốc gia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Ánh Hường (2010), Nghiên cứu xác định các dạng asen vô cơ trong nước ngầm bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc, *Luận án Tiến sĩ Hóa học*, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQGHN.
2. Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Nhứt Xuân Dung, Phạm Thị Ánh, Chu Phạm Ngọc Sơn (2011), Khảo sát ảnh hưởng của Clenbuterol, Salbutamol trên sự tăng trọng gà, heo và đánh giá sự tồn lưu của chúng trên gà, heo bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS/MS, *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 16, trang 39-44.
3. Fabiana S. Felix, Maria S.M. Quintino, Alexandre Z. Carvalho, Lúcia H.G. Coelho, Claudimir L. do Lago, Lúcio Angnes (2006), Determination of salbutamol in syrups by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C⁴D), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, pp 1288–1292.
4. H.H.D.MEYER, L.RINKE and IDURSCH (1991), Residue screening for the β -agonists clenbuterol, salbutamol and cimaterol in urine using enzyme immunoassay and high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 564, pp 551-556.
5. Weiyu Wang, Yulian Zhang, Jinyan Wang, Xue Shi, Jiannong Ye (2010), Determination of β -agonists in pig feed, pig urine and pig liver using capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Meat Science*, 85, pp 302–305.