

**NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT CHIẾT PHA RẮN (SPE)  
NHẪM XÁC ĐỊNH SALBUTAMOL TRONG MẪU NƯỚC TIỂU LỖN  
BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI MAO QUẢN SỬ DỤNG DETECTOR  
ĐỘ DẪN KHÔNG TIẾP XÚC (CE-C<sup>4</sup>D)**

*Đến tòa soạn 23 - 3 - 2016*

**Nguyễn Thị Quỳnh Hoa, Trần Thị Trang**

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

**Dương Thị Nhàn, Nguyễn Thị Liên, Phạm Thị Ngọc Mai,  
Nguyễn Thị Ánh Hoàng**

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

**SUMMARY**

**STUDY ON THE SOLID PHASE EXTRACTION (SPE) FOR SALBUTAMOL  
DETERMINATION IN PIG URINE SAMPLES BY CAPILLARY  
ELECTROPHORESIS METHOD USING CONTACTLESS CONDUCTIVITY  
DETECTOR (CE-C<sup>4</sup>D)**

*Salbutamol belongs to beta-agonist group. It is used in medicine for the treatment of asthma, blocking of lung ducts, ... However if it is used with high dose in castle feed to raise the meat/fat ratio in castle, it can adversely affect human health. Salbutamol in Vietnam has been mainly analyzed in Laboratories by HPLC method using complicated analytical process and having high cost. Capillary electrophoresis method using capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C<sup>4</sup>D) has been known recently as a new analytical method with many advantages and was successfully applied in Salbutamol determination in castle feed samples. However, a limitation of CE-C<sup>4</sup>D method is the low sensitivity that does not allow the determination of Salbutamol in food and in biological samples. In this article, we aim*

*to study on the solid phase extraction of Salbutamol in pig urine matrix, to assist the determination of low concentration of Salbutamol in these samples*

## 1. MỞ ĐẦU

Sử dụng chất tạo nạc trong đó phổ biến nhất là Salbutamol (Sal) trong chăn nuôi hiện nay đang là vấn đề nóng của nước ta. Lợn ăn thức ăn có chứa Sal sẽ tăng trọng nhanh, tỉ lệ nạc cao, thịt có màu đỏ tươi. Tuy nhiên dư lượng Sal trong thịt lợn có thể gây ảnh hưởng xấu tới sức khỏe người tiêu dùng như làm tăng huyết áp, tim đập nhanh, rối loạn tiêu hóa... Để đảm bảo sức khỏe cho người tiêu dùng, lấy lại niềm tin của người dân vào ngành chăn nuôi, tạo công bằng cho những người chăn nuôi chân chính, việc nghiên cứu quy trình phân tích Sal trong thức ăn chăn nuôi và các đối tượng chăn nuôi, thực phẩm... là cần thiết.

Việc xác định Sal ở nước ta chủ yếu được thực hiện tại các phòng thí nghiệm bằng các phương pháp sắc ký với quy trình phức tạp, giá thành cao. Gần đây, phương pháp điện di mao quản sử dụng detector đo độ dẫn không tiếp xúc (CE-C<sup>4</sup>D) với nhiều ưu điểm đã được nghiên cứu, ứng dụng để phân tích Sal trong mẫu thức ăn chăn nuôi [1, 6]. Tuy nhiên, do nền mẫu nước tiểu lợn khá phức tạp và thường có hàm lượng Sal thấp mà giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp CE-C<sup>4</sup>D còn hạn chế nên việc phân tích Sal trong các mẫu này gặp khó khăn. Với

nghiên cứu này, chúng tôi giới thiệu kỹ thuật chiết pha rắn nhằm tách và làm giàu Sal trong mẫu nước tiểu lợn để xác định bằng phương pháp CE-C<sup>4</sup>D.

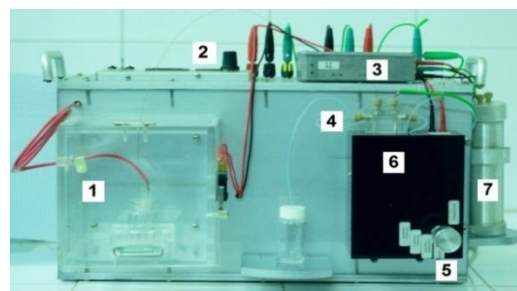
## 2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ THỰC NGHIỆM

### 2.1. Hóa chất

Salbutamol (hàm lượng > 97%) của Sigma Aldrich - Mỹ; L- Arginine (hàm lượng > 99,5%) của Fluka - Thụy sĩ; Axit acetic (PA), dung dịch amoniac đậm đặc (25%) (PA), Methanol (PA), Natri axetat, (PA) của Merck - Đức; Axit photphoric (PA, 85%), 2-propanol (PA, >99,8%), Etyl axetat (PA, >99,9%), của Deajung - Hàn Quốc,... Các dung dịch được pha trong nước deion.

Các loại cột chiết gồm: Cột hấp phụ C<sub>18</sub> (Sep-Park Water - Mỹ, 3 ml), cột trao đổi cation mạnh (Bond Elut SCX, Agilent – Mỹ, 3 ml) và (Bond Elut SCX, Agilent – Mỹ, 6 ml).

### 2.2. Thiết bị



*Hình 1. Hệ thiết bị điện di mao quản CE-C<sup>4</sup>D tự chế, bán tự động*

(1: Hộp thể an toàn, 2: Bộ điều khiển thể, 3: Cảm biến đo độ dẫn không tiếp xúc ( $C^4D$ ), 4: Bộ phận kết nối bán tự động, 5: Núm điều chỉnh, 6: Bộ phận điều khiển, 7: Bình khí nén)

Hệ thiết bị CE- $C^4D$  tự chế, bán tự động (Hình 1) được thiết kế, chế tạo tại Việt Nam trên cơ sở sự phối hợp giữa công ty 3SAnalysis (<http://www.3sanalysis.vn/>) với nhóm nghiên cứu của GS. Peter Hauser (Khoa Hóa, Trường Đại học Basel, Thụy Sĩ). Hiện nay, hệ thiết bị này đang tiếp tục được nghiên cứu hoàn thiện và phát triển ứng dụng tại Bộ môn Hóa Phân tích, Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN. Các thông tin về đặc điểm kỹ thuật của hệ thiết bị có thể tham khảo trong các công bố trước đây của nhóm nghiên cứu [1, 6].

## 2.3. Thục nghiệm

### 2.3.1. Lấy mẫu và bảo quản mẫu

Để có mẫu thực tế, chúng tôi đã phối hợp với Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia tiến hành nuôi thí nghiệm một con lợn choai 3 tháng tuổi, chưa từng được nuôi công nghiệp, chăm sóc trong 21 ngày với thức ăn sạch có nguồn gốc rõ ràng để loại trừ khả năng lợn bị nhiễm Sal. Sau đó cho lợn ăn thức ăn có bổ sung Sal liên tục trong 21 ngày với liều lượng là 15-20 mg/ngày. Tiến hành lấy mẫu nước tiểu vào các buổi sáng từ ngày bắt

đầu cho ăn bổ sung Sal tới ngày giết mổ.

### 2.3.2. Phương pháp phân tích

#### 2.3.2.1. Phương pháp chiết pha rắn để tách và làm giàu Salbutamol

Salbutamol được tách và làm giàu ra khỏi nền mẫu nước tiểu lợn bằng phương pháp chiết pha rắn (SPE) sử dụng cột chiết là cột hấp phụ  $C_{18}$  (Sep-Park Water - Mỹ, 3 ml), cột trao đổi cation mạnh (Bond Elut SCX, Agilent – Mỹ, 3 ml) và (Bond Elut SCX, Agilent – Mỹ, 6 ml). Quá trình chiết pha rắn bao gồm các bước sau:

Bước 1: Hoạt hóa cột chiết

Cột  $C_{18}$  được hoạt hóa bằng 3 ml  $CH_3OH$  + 3 ml  $H_2O$  + 3 ml đệm photphat pH = 6.

Cột SCX được hoạt hóa bằng 10 ml  $CH_3OH$  + 10 ml  $H_2O$  + 10 ml đệm photphat pH = 6.

Bước 2: Nạp mẫu vào cột chiết theo phương pháp chảy bình thường.

Bước 3: Rửa loại tạp chất

Bước 4: Rửa giải chọn lọc Sal ra khỏi cột chiết bằng dung môi thích hợp.

Dịch chiết thu được sẽ cô bằng khí  $N_2$  ở  $45^{\circ}C$ , sau đó hòa tan bằng  $CH_3OH$  và xác định bằng phương pháp CE- $C^4D$ .

Để tối ưu hóa quá trình chiết pha rắn, chúng tôi đã khảo sát 4 quy trình rửa tạp chất là: Quy trình 1: 3ml  $H_2O$   $\rightarrow$  1,5ml  $CH_3OH$ , quy trình 2: 3ml hỗn hợp axeton / $H_2O$  (1/1 v/v), quy trình 3: 3ml  $H_2O$ , quy trình 4: 3ml  $CH_3OONH_4$  và 3

dung dịch rửa giải là: 6ml hỗn hợp  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /2-propanol/ $\text{NH}_3$  (78/20/2 v/v/v), 6ml hỗn hợp  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$  (95/5 v/v), 6ml hỗn hợp  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$  0,1M (90/10 v/v).

Hiệu quả của quá trình chiết pha rắn được đánh giá qua hiệu suất thu hồi (H%) và khả năng loại bỏ các tạp chất trong nền mẫu có thể gây ảnh hưởng đến tín hiệu chất phân tích trên điện di đồ.

#### 2.3.2.2. Phương pháp CE- $\text{C}^4\text{D}$ xác định Salbutamol

Sal được xác định bằng phương pháp CE- $\text{C}^4\text{D}$  với các điều kiện tối ưu sau [1, 6]: Mao quản silica (đường kính trong ID = 50  $\mu\text{m}$ , tổng chiều dài: 60cm), dung dịch đệm điện di: Arginine (10 mM)/Axit axetic pH = 4,9, bơm mẫu thủy động lực học kiểu xiphông ở độ cao 10 cm, thời gian bơm mẫu 20 s, thế tách: 18 kV. Giới hạn phát hiện (LOD) đạt được của Sal là 500 ppb.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Nghiên cứu, tối ưu các điều kiện chiết pha rắn làm giàu Salbutamol trong mẫu nước tiểu lợn

##### 3.1.1 Lựa chọn cột chiết và dung dịch đệm chiết

Kết quả khảo sát trên 2 cột  $\text{C}_{18}$  và cột trao đổi cation mạnh SCX 3 mL và SCX 6 mL cho thấy khi sử dụng cột  $\text{C}_{18}$  tín hiệu của Sal là tương đối nhỏ, chân pic dốc, hiệu suất thu hồi thấp là 27,3 %. Các cột SCX 3 ml và SCX 6

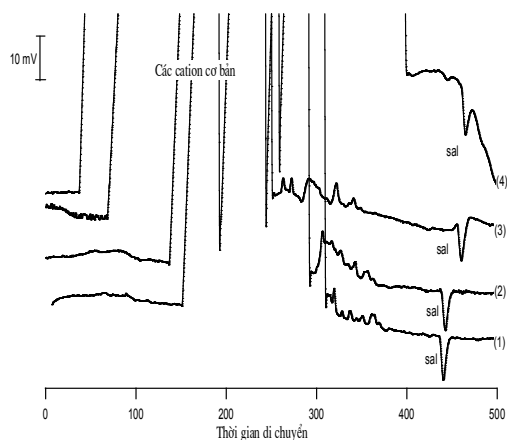
ml cho kết quả tín hiệu các chất phân tích cao hơn nhiều, với hiệu suất thu hồi lần lượt là 64,2 % và 97,5%. Tuy nhiên, với lượng nước tiểu lấy là 10 ml, dung lượng nạp mẫu của cột 3 mL có thể bị quá tải dẫn đến hiệu suất thu hồi thấp. Vì thế, cột SCX 6 ml đã được lựa chọn cho những khảo sát tiếp theo.

Các dung dịch đệm chiết gồm đệm axetat pH = 5,2, nồng độ 50 mM và đệm photphat pH = 6, nồng độ 100 mM cũng đã được khảo sát [2, 4, 5]. Điện di đồ thu được cho thấy khi sử dụng đệm axetat, pic của tạp chất lớn phủ lên cả vị trí pic của Sal nên không thấy xuất hiện pic Sal. Với đệm photphat pH = 6, pic của tạp chất nhỏ hơn và cách xa vị trí pic của Sal, đồng thời pic của Sal thu được là rõ ràng, sắc nét. Do đó, chúng tôi chọn đệm photphat pH = 6, nồng độ 100 mM là đệm tối ưu cho quá trình chiết.

##### 3.1.2. Khảo sát quá trình rửa tạp chất

Do nền mẫu nước tiểu lợn khá phức tạp, chứa nhiều thành phần khác nhau, cần lựa chọn được qui trình rửa tạp chất phù hợp để giảm tối đa ảnh hưởng (có thể có) của các chất này đến kết quả phân tích điện di. Kết quả khảo sát 04 quy trình rửa tạp chất (Quy trình 1: 3ml  $\text{H}_2\text{O}$   $\rightarrow$  1,5ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ ; Quy trình 2: 3ml hỗn hợp axeton/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/1 v/v); Quy trình 3: 3ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; Quy trình 4: 3ml  $\text{CH}_3\text{OONH}_4$ ) được thể hiện trong hình 2. Kết quả thu được từ các điện di đồ

cho thấy, hiệu suất thu hồi của cả 4 qui trình đều tương đối cao, lần lượt là: 95,11%, 97,45%, 86,63% và 98,67%. Tuy nhiên, quy trình 2 (3 ml hỗn hợp axeton /H<sub>2</sub>O (1/1 v/v) cho tín hiệu cation nhỏ hơn, đường nền đẹp và tín hiệu phân tích là tốt nhất nên được chúng tôi lựa chọn cho các thí nghiệm sau.



Hình 2. Điện di đồ khảo sát với các quy trình rửa tạp khác nhau ((1);(2); (3); (4) tương ứng với quy trình rửa tạp 1; 2; 3; 4)

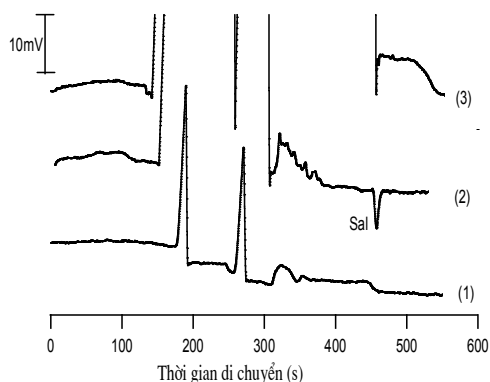
### 3.1.3. Khảo sát dung môi rửa giải

Trong quá trình chiết pha rắn, cần lựa chọn được dung môi với thể tích phù hợp để rửa giải các chất phân tích ra khỏi cột chiết với hiệu suất cao nhất. Theo [5, 7], chúng tôi lựa chọn khảo sát 3 dung dịch rửa giải gồm:

Dung dịch 1: 6ml hỗn hợp CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/2 propanol/NH<sub>3</sub> (78/20/2 v/v/v)

Dung dịch 2: 6ml hỗn hợp CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>3</sub> (95/5 v/v)

Dung dịch 3: 6ml hỗn hợp CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH 0,1M (90/10 v/v)



Hình 3. Điện di đồ khảo sát với các dung dịch rửa giải khác nhau ((1), (2), (3) tương ứng với dung dịch rửa giải 1, 2, 3)

Như có thể thấy trên Hình 3, rửa giải bằng dung dịch 1 (6ml hỗn hợp CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/2 propanol/NH<sub>3</sub> (78/20/2 v/v/v) và dung dịch 3 (6ml hỗn hợp CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH 0,1M (90/10 v/v)) đều không cho thấy sự xuất hiện của pic Sal. Chỉ có dung dịch rửa giải 2 (6ml hỗn hợp CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>3</sub> (95/5 v/v) ) là cho pic tín hiệu của Salbutamol rõ nét, đường nền đẹp và hiệu suất thu hồi cao là 97,4%. Do đó, chúng tôi lựa chọn dung dịch rửa giải tối ưu là 6 ml CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>3</sub> (95/5 v/v).

Như vậy, điều kiện tối ưu cho quá trình chiết pha rắn gồm: Cột chiết pha rắn là cột SCX 6 ml, dung dịch đệm chiết là đệm photphat pH = 6 (100 mM), rửa tạp bằng 3 ml axeton /H<sub>2</sub>O (1/1 v/v), dung môi rửa giải là 6 ml CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>3</sub> (95/5 v/v).

### 3.2. Đánh giá phương pháp

Sau khi thu được các điều kiện tối ưu chiết pha rắn, chúng tôi đã tiến hành đánh giá phương pháp trên nền mẫu nước tiểu lợn (mẫu trắng), thu được giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng

(LOQ) của phương pháp lần lượt là 30 ppb và 100 ppb, giới hạn này phù hợp để phân tích các mẫu nước tiểu lợn thực tế. Hiệu suất thu hồi Sal đạt trên 95 % cho thấy phương pháp có độ đúng cao, đáng tin cậy. Giá trị CV nhỏ hơn 5 % chứng tỏ độ lặp của phương pháp tương đối tốt. Vì vậy, phương pháp chiết pha rắn để tách và làm giàu Sal trong mẫu nước tiểu lợn rồi định lượng bằng phương pháp CE-

C<sup>4</sup>D là hữu hiệu để áp dụng vào phân tích mẫu nước tiểu lợn thực tế.

### 3.3. Phân tích mẫu thực tế

Áp dụng các điều kiện tối ưu chiết pha rắn đã được khảo sát ở trên, chúng tôi tiến hành phân tích một số mẫu nước tiểu lợn của con lợn nuôi thí nghiệm. Từ điện di đồ, hàm lượng Sal trong các mẫu nước tiểu phân tích được tính toán và thể hiện trong bảng 1:

*Bảng 1. Kết quả phân tích hàm lượng Sal trong 08 mẫu nước tiểu lợn được lấy theo ngày nuôi với thức ăn bổ sung Sal*

| Ngày lấy mẫu tính từ khi bổ sung Sal vào thức ăn của lợn (ngày) | 1   | 2   | 3   | 5   | 7   | 9   | 15    | 21    |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|
| Nồng độ (ppb)                                                   | 444 | 325 | 527 | 340 | 375 | 728 | 1.218 | 2.230 |

Kết quả phân tích cho thấy các mẫu đều có Sal với nồng độ từ 325 ÷ 2.230 ppb. Các kết quả thu được có xu hướng tăng nhưng không tuyến tính theo thời gian. Điều này có thể lý giải do khi nuôi lợn chúng tôi cho ăn thức ăn có bổ sung Sal vào các buổi tối và lấy mẫu nước tiểu vào các buổi sáng nhưng không kiểm soát được số lần con lợn đã đào thải Sal qua nước tiểu trong các đêm đó. Mặt khác, chúng tôi cũng không thể đi sâu tìm hiểu cơ chế hấp thụ và đào thải Sal nên không bình luận về các kết quả thu được. Tuy nhiên, có thể khẳng định, dựa trên việc xác định Sal trong mẫu nước tiểu lợn, chúng ta có thể nhận biết được con lợn có ăn thức ăn chứa Sal không. Điều này sẽ giúp các nhà quản lý kiểm soát được việc sử dụng Sal trong thức ăn chăn nuôi và lợn nuôi.

### 3.4. Kết quả phân tích đối chứng với phương pháp tiêu chuẩn GC/MS/MS

Để một lần nữa khẳng định độ chính xác của phương pháp, chúng tôi so sánh kết quả xác định hàm lượng Sal trong 02 mẫu nước tiểu lợn bằng phương pháp CE-C<sup>4</sup>D với kết quả phân tích đối chứng tại Trung tâm Kiểm tra vệ sinh thú y Trung ương I bằng phương pháp LC/MS/MS (xem Bảng 2). Từ Bảng kết quả này cho thấy, độ lệch giữa hai kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C<sup>4</sup>D so với phương pháp tiêu chuẩn LC/MS/MS dao động từ 0,8 ÷ 15,6%, từ đó có thể kết luận phương pháp CE-C<sup>4</sup>D có độ đúng cao, có thể áp dụng để phân tích Sal trong mẫu nước tiểu lợn cho độ chính xác, độ tin cậy cao.

*Bảng 2. Kết quả phân tích đối chứng với phương pháp LC/MS/MS*

| Ngày lấy mẫu sau khi bổ sung Sal vào thức ăn cho lợn | Ngày thứ 5 | Ngày thứ 21 |
|------------------------------------------------------|------------|-------------|
| CE-C <sup>4</sup> D (ppb)                            | 340        | 2230        |
| LC/MS/MS (ppb)                                       | 403        | 2212        |
| Độ sai khác (%)                                      | 15,6       | 0,8         |

#### 4. KẾT LUẬN

Như vậy, chúng tôi đã nghiên cứu, khảo sát, lựa chọn được các điều kiện tối ưu chiết pha rắn làm giàu Salbutamol trong mẫu nước tiểu lợn rồi định lượng bằng thiết bị CE-C<sup>4</sup>D tự chế, bán tự động và áp dụng qui trình đã tối ưu để xác định hàm lượng Sal trong một số mẫu nước tiểu lợn. Kết quả thu được cho thấy có thể kết hợp chiết pha rắn với phương pháp CE-C<sup>4</sup>D để xác định Sal trong mẫu nước tiểu lợn. Từ việc xác định Sal trong mẫu nước tiểu lợn sẽ giúp các nhà quản lý kiểm soát được việc sử dụng Sal trong thức ăn chăn nuôi và lợn nuôi. Điều này đã mở ra hướng nghiên cứu làm giàu kết hợp với phương pháp CE-C<sup>4</sup>D nhằm khắc phục hạn chế của CE-C<sup>4</sup>D, tăng độ nhạy của phương pháp, đáp ứng được nhu cầu phân tích thực tế, không chỉ với Sal mà còn có tiềm năng ứng dụng với những đối tượng phân tích khác như các phụ gia thực phẩm,...

#### Tài liệu tham khảo

1. Đoàn Thị Tươi, Nguyễn Thị Hằng, Nguyễn Thị Quỳnh Hoa, Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hoàng, Mai Thanh Đức (2015), “Xác Định salbutamol và ractapamine bằng

phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C<sup>4</sup>D)”, Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học, Tập 20, Số 2, tr. 44-50.

2. Andy Zhai (2011), “Determination of  $\beta$ 2-Agonists in Pork with SPE Cleanup and LC-MS/MS Detection”, Agilent Technologies Co. Ltd., Application Note.

3. ChangYing Guo, Hong Zheng, Li-Gang Deng, Xiao Lu, Shan-Cang Zhao, Jiang-Sheng Mao, Yu-Tao Wang, Guo-Sheng Yang, Hassan Y.Aboul-Enein (2010), “UPLS-ESI-MS-MS Determination of three  $\beta$ 2-Agonists in Pork” Chromatography, 72, pp.79-84.

4. Chenhao Zhai, Jianzhong Li and Yue Song (2009) “Determination of  $\beta$ 2-Agonists in Pork Using Agilent SampliQ SCX Solid-Phase Extraction Cartridges and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, Agilent Technologies Co. Ltd., Application Note.

(Tiếp theo trang 162)