

PHÁT TRIỂN QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH LƯỢNG VẾT MỘT SỐ THUỐC GIẢM ĐAU TRONG NƯỚC THẢI BẰNG HỆ THIẾT BỊ ĐIỆN DI MAO QUẢN XÁCH TAY ĐIỀU KHIỂN TỰ ĐỘNG

Lê Minh Đức, Phạm Mạnh Hùng, Dương Hồng Anh, Phạm Hùng Việt*

Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Môi trường và Phát triển Bền vững, Trường ĐHKHTN, ĐHQG Hà Nội
Đến Tòa soạn 8-12-2015; Chấp nhận đăng 21-12-2015

Abstract

In this report, the simultaneous determination of four non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): ibuprofen, bezafibrate, naproxen, diclofenac in waste water was comprehensively developed. The procedure for analysis of these NSAIDs is including two steps: extraction/trace enrichment by solid phase extraction method and quantitative determination by portable automated capillary electrophoresis (CE) equipment equipped with capacitively coupled contactless conductivity detector (C⁴D). The optimal background electrolyte was Tris-(hydroxymethyl aminomethane) 36 mM/lactic acid buffer at pH 8 containing cyclodextrine HP- β -CD in order to increase the separation between naproxen and diclofenac. With the optimized condition, the detection limits of target drugs in the extract were in ranged of 0.2-0.4 mg/L. The relative standard deviation of migration time and peak area were found at 0.3-0.5 % and 3.3-4.5 %, respectively. Recoveries of all drugs in de-ion water, tap water and wastewater matrix were in range of 86.7-98.8 %.

Keywords. Capillary electrophoresis, automated system, portable, drug, waste water.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, với sự phát triển mạnh mẽ của y học, việc sử dụng dược phẩm cho con người và thú y cũng ngày càng phát triển. Dư lượng của các dược phẩm cùng những sản phẩm phân hủy của chúng đã được tìm thấy trong môi trường nước ngày càng nhiều. Vấn đề này đã trở thành một mối lo về môi trường và sức khỏe của con người vì đây là những chất có hoạt tính sinh học nhất định. Sự xuất hiện của chúng có thể ảnh hưởng đến môi trường sống, thay đổi đặc tính của các loại vi sinh, sinh vật trong nước. Dư lượng các loại thuốc giảm đau nhóm non-steroid (NSAIDs) như ibuprofen, diclofenac, naproxen, bezafibrat, acetaminophen, paracetamol ... trong môi trường nước được xác định bằng một số phương pháp tiêu chuẩn như: sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối detector mảng diod hoặc với khối phổ hai lần (HPLC-DAD, LCMSMS), hay sắc ký khí khối phổ, sắc ký khí hai chiều ghép nối khối phổ (GCMS, GCxGC MS)... [1-3]. Những phương pháp này có thể xác định được đồng thời các chất hữu cơ ở lượng vết và có độ chính xác cao, nhưng đòi hỏi chi phí cao và quá trình xử lý mẫu phức tạp. Quan trọng hơn, các hệ thiết bị trên chỉ phù hợp với phân tích phòng thí nghiệm và khó có thể đưa ra hiện trường hay lắp đặt tại các trạm quan trắc.

Những năm gần đây, phương pháp điện di mao quản (CE) sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc

(C⁴D) có khả năng phân tích đồng thời nhiều ion, với cấu tạo thiết bị đơn giản, có thể sử dụng nguồn điện ắc quy cho phân tích hiện trường đang dần trở thành giải pháp hữu hiệu cho mục tiêu phân tích các ion trong môi trường nước. Nhóm nghiên cứu tại Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Môi trường và Phát triển bền vững đã kết hợp với nhóm nghiên cứu tại Đại học Basel (Thụy Sĩ) phát triển các hệ thiết bị điện di mao quản phục vụ những mục đích khác nhau trong phân tích, quan trắc môi trường [4].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn 4 loại thuốc giảm đau NSAIDs là ibuprofen, diclofenac, naproxen và bezafibrate để thử nghiệm khả năng hoạt động của hệ thiết bị điện di mao quản xách tay, điều khiển tự động. Quy trình phân tích bao gồm hai bước, trước hết dư lượng các thuốc giảm đau trong nước được tách chiết, làm sạch và làm giàu bằng kỹ thuật chiết pha rắn với cột chiết C18. Sau đó sử dụng dung môi thích hợp rửa giải các chất đã lưu giữ trên cột C18 và bơm dịch chiết thu được vào cột mao quản để thực hiện quá trình tách bằng điện di và nhận biết bằng detector độ dẫn không tiếp xúc.

2. THÍ NGHIỆM

2.1. Hóa chất

Toàn bộ hóa chất, dung môi được sử dụng đều thuộc loại tinh khiết phân tích, được cung cấp bởi

Merck (Darmstadt, Đức), Sigma-Aldrich (Chemie, Steinheim, Đức) hoặc Fluka (Buchs, Switzerland). Dung dịch 1 mM của naproxen, diclofenac, benzafrilate, ibuprofen được pha từ muối rắn tương ứng. Dung dịch gốc sau đó được sử dụng để pha mẫu chuẩn. Dung dịch đệm điện di được pha trong ngày, siêu âm loại bỏ bọt khí trước khi sử dụng. Tất cả các đệm và mẫu đều được chuẩn bị trong nước deion.

2.2. Thiết bị

Nghiên cứu này được thực hiện trên hệ thiết bị điện di mao quản tự động xách tay loại hai kênh và detector đo độ dẫn không tiếp xúc tự chế tạo như đã mô tả chi tiết trong bài báo trước đây [5]. Với hệ thiết bị này, bơm sẽ hút mẫu vào vòng mẫu. Áp lực khí nén sẽ đẩy dung dịch đệm qua vòng mẫu, nhờ đó mẫu sẽ được đẩy tới đầu vào của giao diện nối đất. Đây là giao diện có một đầu vào là dòng mẫu lỏng, hai đầu ra: một là dòng lỏng đi vào mao quản, hai là dòng lỏng tiếp xúc với đầu điện cực nối đất, qua van chia dòng, rồi thải ra ngoài. Tiếp theo, trong giai đoạn bơm mẫu: một phần mẫu do áp lực khí nén sẽ đi vào mao quản và phần còn lại sẽ đi qua van chia dòng để thải ra. Như vậy, lượng mẫu đi vào mao quản được quyết định bởi các yếu tố là độ mở van chia dòng và thời gian đẩy mẫu qua giao diện nối đất. Lượng mẫu đi vào mao quản sẽ ảnh hưởng tới độ lớn tín hiệu, độ phân giải giữa các pic nên với cấu tạo của hệ thiết bị này, các thông số hoạt động cần khảo sát khi xây dựng quy trình phân tích là thời gian đẩy mẫu, độ mở van chia.

Mao quản silica dài 60 cm với chiều dài hiệu dụng 50 cm, đường kính mao quản 50 μm được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm. Trước khi sử dụng hàng ngày, mao quản được điều kiện hóa với NaOH 1 M trong 10 phút và nước deion trong 10 phút.

2.2. Thực nghiệm

Quá trình tối ưu được thực hiện theo phương pháp tối ưu từng yếu tố, bao gồm: điều kiện chiết pha rắn và điều kiện phân tích điện di mao quản. Với quá trình chiết pha rắn, các yếu tố: thành phần, thể tích dung dịch rửa giải, thể tích mẫu qua cột được lần lượt khảo sát sử dụng thông số đánh giá là hiệu suất thu hồi. Với quá trình phân tích điện di mao quản, các điều kiện tách chất như: thành phần, pH của đệm, điện thế tách, và điều kiện vận hành riêng của hệ thiết bị như thời gian chuyển mẫu, thời gian đẩy mẫu, độ mở van chia được lần lượt khảo sát. Các kết quả điện tích, độ phân giải pic, thời gian lưu để đánh giá và lựa chọn điều kiện tối ưu....

Sau khi tối ưu, quy trình phân tích được đánh giá thông qua giới hạn phát hiện, hệ số tương quan đường chuẩn, độ chính xác.

Để minh họa khả năng sử dụng của quy trình phân tích cho mẫu thực tế. 03 mẫu nước thải đô thị, nước thải bệnh viện và xí nghiệp được phẩm đã được thu thập. Dung dịch thu được sau khi chiết pha rắn được chia thành hai phần: phần 1 phân tích bằng thiết bị CE, phần 2 phân tích bằng thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao LC20AB Shimadzu, Nhật Bản với detector DAD để đối chứng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu điều kiện chiết pha rắn

Cột chiết được sử dụng là cột LiChrolut RP-18 loại 3 ml chứa 500 mg chất hấp phụ (Merck). Bốn thuốc giảm đau nói trên đều có nhóm cacboxyl trong phân tử nên trong môi trường nước có pH trung tính chúng đều tích điện âm. Để các chất này có thể hấp thu hoàn toàn vào cột chiết C18 chúng phải ở trạng thái không tích điện, do vậy cần phải axit hóa mẫu trước khi nạp vào cột.

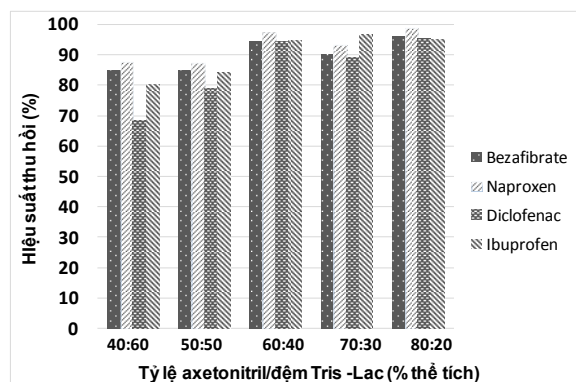
Trước khi sử dụng, cột chiết pha rắn được hoạt hóa bằng 5 ml axetonitril, 5 ml H₂O và 5 ml dung dịch đệm điện di (Tris 9 mM/lactic pH = 8). Mẫu nước hoặc mẫu chuẩn được axit hóa bằng HCl 0,1M tới pH $\leq 3,0$ để tránh các chất phân tích nằm dưới dạng ion, sau đó mẫu nước được lọc qua giấy lọc 0,45 μm . Tiếp theo mẫu được nạp vào cột. Sau khi nạp mẫu, cột được rửa bằng 5 ml dung dịch đệm điện di, hút khô bằng bơm chân không. Cuối cùng là quá trình rửa giải bằng hỗn hợp dung môi axetonitril/đệm.

Bảng 1: Hiệu suất thu hồi các chất cần phân tích qua quá trình chiết pha rắn với các thể tích dung môi rửa giải khác nhau

Mẫu	Hiệu suất thu hồi (%)			
	Ibuprofen	Benzavibrate	Naproxen	Diclofenac
2	60,8	89,8	83,4	58,9
4	87,9	88,2	91,6	86,5
6	92,2	93,4	90,4	91,2
8	93,4	94,0	90,0	92,4
10	93,5	94,8	96,8	90,5

Kết quả sau khi khảo sát đã lựa chọn được điều kiện chiết pha rắn tối ưu là: thể tích mẫu có thể thay đổi từ 200 ml tới 900 ml, dung môi rửa giải là 6 ml

dung dịch axetonitril/đệm (Tris 9 mM/Lactic pH = 8,0) với tỉ lệ thể tích 60/40. Tại điều kiện này, hiệu suất thu hồi các chất đều đạt giá trị trên 90 %.

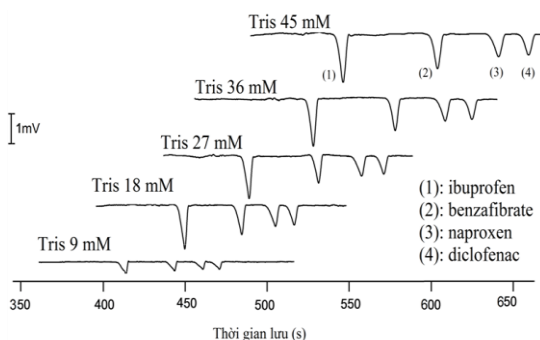


Hình 1: Hiệu suất thu hồi của các chất cần phân tích qua quá trình chiết pha rắn khi thay đổi thành phần dung môi rửa giải

3.2. Nghiên cứu lựa chọn dung dịch đệm điện di

3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng nồng độ dung dịch đệm điện di

Trong nghiên cứu này, hệ đệm được sử dụng là Tris/Lactic. Nồng độ Tris được thay đổi ở các mức độ: 9 mM; 18 mM; 27 mM; 36 mM; 45 mM và điều chỉnh pH bằng axit lactic đến pH = 8,0. Nồng độ Tris tối ưu được lựa chọn là 36mM để đạt được kết quả tốt nhất về điện tích pic và độ phân giải pic như hình 2.



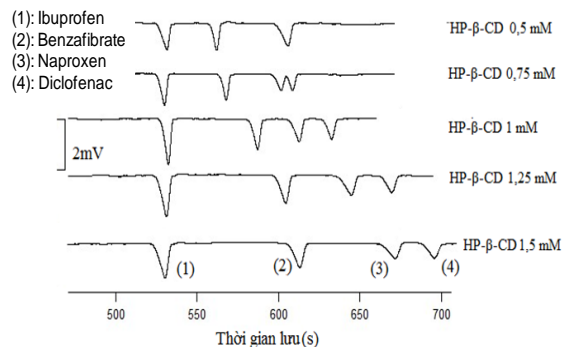
Hình 2: Điện di đồ phân tích các thuốc giảm đau trong dung dịch chuẩn tại các nồng độ đệm khác nhau

3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của pH dung dịch đệm

Dựa trên giá trị pK_a của các axit (ibuprofen: 4,91; benzafibrate: 3,83; diclofenac: 4; naproxen: 4,19), trong nghiên cứu này các giá trị pH từ 7,0 đến 9,0 được lựa chọn để khảo sát. Kết quả khảo sát cho thấy pH = 8,0 là sự lựa chọn tối ưu cho độ phân giải giữa các tín hiệu.

3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ HP- β -CD

Cyclodextrin HP- β -CD được thêm vào dung dịch đệm nên để đóng vai trò thuốc thử tạo phức, làm tăng khả năng phân tách giữa naproxen và diclofenac. Cấu tử này thêm vào dung dịch đệm nên với các nồng độ từ 0,5 mM đến 1,5 mM. Kết quả thu được cho thấy sự phân tách các tín hiệu và hình dạng pic của các chất cần phân tích thu được tốt nhất ở nồng độ HP- β -CD 1 mM. nên giá trị 1 mM được lựa chọn làm nồng độ tối ưu.



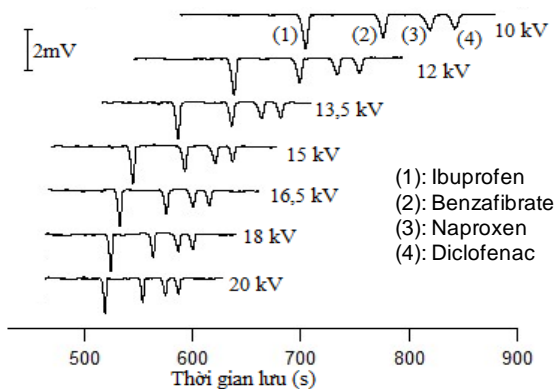
Hình 3: Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ HP- β -CD trong đệm

3.3. Nghiên cứu lựa chọn các điều kiện dẫn lỏng và điện thế tách

Nghiên cứu khảo sát các vị trí chia của van kim lần lượt tương ứng là 12 đến 20 (tương ứng độ mở van tăng dần) với bước nhảy là 2. Khi độ mở van chia càng lớn thì áp suất ngược tạo ra trong quá trình bơm mẫu càng nhỏ, do đó thể tích mẫu vào mao quản sẽ càng nhỏ dẫn đến ảnh hưởng đến điện tích pic, tuy nhiên khi độ mở van chia nhỏ thì độ phân giải các pic lại giảm ảnh hưởng đến khả năng phân tích. Kết quả khảo sát cho thấy tại vị trí van kim 16 là thỏa mãn yêu cầu phân tích. Thời gian đẩy mẫu được khảo sát từ 1-4 giây, thời gian đẩy mẫu tăng làm tăng lượng mẫu vào mao quản, tuy nhiên do tồn tại một áp suất ngược cố định nên với thời gian 2 giây lượng mẫu vào mao quản đạt mức tối đa.

Trong nghiên cứu này, phân tích được thực hiện ở pH cao (8,0), nên dòng điện di thẩm thấu (EOF) đi từ cực + tới - sẽ rất mạnh. Khi đối tượng phân tích là các anion hữu cơ có kích thước công kênh, độ linh động kém nếu chọn điều kiện phân cực dương thông thường với dòng EOF mạnh và ngược chiều như trên, tín hiệu của các anion này sẽ bị chập vào nhau. Do vậy trong trường hợp này điều kiện phân cực âm được lựa chọn với mục đích sử dụng dòng EOF đưa các anion theo cùng hướng di chuyển về phía detector gần phía cực -. Các mức điện thế được khảo

sát lần lượt là: -10 kV; -12 kV; -13,5 kV; -15 kV; -16,5 kV; -18 kV và -20 kV. Các kết quả chỉ ra ở hình 4. Có thể thấy khi tăng dần độ lớn của điện thế tách, thời gian lưu giảm đồng thời diện tích của các pic cũng thu hẹp lại. Tại giá trị thế -15 kV, diện tích pic, độ phân giải giữa các pic đạt giá trị cao, đồng thời thời gian phân tích cũng không quá dài. Do đó, giá trị thế -15 kV được lựa chọn là điều kiện tối ưu.



Hình 4: Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của điện thế tách

3.4. Đánh giá quy trình phân tích

Các thông số đặc trưng của phương pháp phân tích như độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), hệ số tương quan của đường chuẩn được khảo sát trong khoảng nồng độ từ 1,5-20 mg/L với mỗi chất trong dịch chiết. Kết quả thu được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1: Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của các chất trong dịch chiết, phương trình và hệ số tương quan (R²) của các đường chuẩn

Chất	Đường chuẩn	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Ibuprofen	$Y = (0,000228 \pm 0,000012)x - (0,000108 \pm 0,000116)$	0,9991	0,206	0,619
Benzafibrate	$Y = (0,000148 \pm 0,0000077)x - (0,000066 \pm 0,000074)$	0,999	0,362	1,085
Naproxen	$Y = (0,000134 \pm 0,00000801)x - (0,000095 \pm 0,000076)$	0,9987	0,444	1,333
Diclofenac	$Y = (0,000103 \pm 0,0000058)x - (0,000062 \pm 0,000055)$	0,9994	0,345	1,036

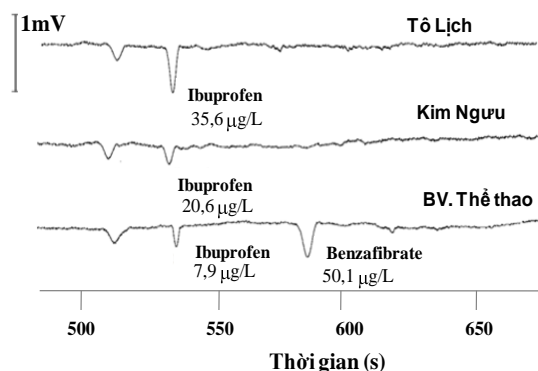
Giá trị hệ số tương quan của đường chuẩn cao chứng tỏ hệ thiết bị cho tín hiệu các chất phân tích quan hệ tuyến tính tốt với nồng độ. Giới hạn phát hiện của các chất phân tích sau khi nhân với hệ số làm giàu (khoảng 100 lần) có thể đạt mức 2,06 µg/L trong mẫu (với chất có giới hạn phát hiện thấp nhất là ibuprofen). Độ lệch chuẩn tương đối được sử dụng

để đánh giá độ lặp lại, độ chụm của phương pháp. Độ lệch chuẩn tương đối với diện tích pic là 1,1 % tới 4,5 %, độ lệch chuẩn tương đối với thời gian lưu là 0,3 % tới 0,5 %. Các giá trị độ lệch chuẩn thấp do quá trình bơm mẫu được thực hiện tự động khiến lượng mẫu bơm vào mao quản được kiểm soát tốt.

Độ đúng của phương pháp được kiểm tra bằng việc phân tích mẫu giả ở nồng độ thêm 40 µg/L trong nền nước deion, nước máy và nước thải. Các mẫu được chiết pha rắn, sau đó lấy dung dịch chiết để phân tích bằng thiết bị CE. Kết quả độ thu hồi được chỉ ra trong bảng 2, các giá trị hiệu suất thu hồi đều lớn hơn 86 % trên cả 3 loại nền mẫu.

Bảng 2: Hiệu suất thu hồi các thuốc giảm đau trên các nền mẫu nước

Mẫu	Hiệu suất thu hồi (%)			
	Ibuprofen	Benzavibrate	Naproxen	Diclofenac
Nền nước deion	97,9	98,6	96,1	98,8
Nền nước máy	95,8	98,0	91,9	93,8
Nền nước thải	92,6	93,3	86,7	91,0



Hình 5: Điện di đồ phân tích các mẫu nước thải lấy từ sông Tô Lịch, Kim Nguru, bệnh viện Thể thao

Quy trình phân tích đã xây dựng được thử nghiệm để phân tích 03 mẫu nước thải đô thị, bệnh viện và đã phát hiện thấy sự có mặt của ibuprofen, benzafibrate trong một số mẫu với nồng độ cỡ µg/L. Các kết quả này đã được khẳng định qua phân tích đối chứng bằng phương pháp HPLC-DAD (không trình bày trong bài này).

4. KẾT LUẬN

Đã phát triển được quy trình phân tích dư lượng một số thuốc giảm đau ibuprofen, diclofenac, naproxen và benzaifibrate trong nước thải bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng hệ đệm Tris/Lactic ở pH = 8,0 kết hợp với kỹ thuật chiết pha rắn. Kết quả đánh giá phương pháp điện di mao quản và so sánh đối chứng với phương pháp HPLC cho thấy quy trình đã phát triển có khả năng ứng dụng để phân tích dư lượng các thuốc giảm đau nói trên trong nước thải, phục vụ quan trắc chất lượng môi trường.

Lời cảm ơn. Các tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ tài chính để thực hiện nghiên cứu này từ đề tài 13/HĐ-ĐT.13.14/CNMT thuộc Chương trình Khoa học công nghệ, ứng dụng và chuyển giao công nghệ phát triển ngành Công nghiệp Môi trường do Bộ Công thương quản lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Petr Lacina, et al. *Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection for the analysis of selected drug residues in wastewater and surface water*, Journal of Environmental Sciences, **25(1)**, 204-212 (2013).
2. Do Vu Hoang Anh et al. *Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (Nsaid) in Surface Water at Ho Chi Minh City*, VNU Journal of Natural Sciences and Technology, **30(1)**, 7-12 (2014).
3. Ngoc Han Tran et al. *A Preliminary Study on the Occurrence of Pharmaceutically Active Compounds in Hospital Wastewater and Surface Water in Hanoi, Vietnam*, Clean-Soil, Air, Water, **42(3)**, 267-275 (2014).
4. Hong Anh Duong et al. *In-house-made capillary electrophoresis instruments coupled with contactless conductivity detection as a simple and inexpensive solution for water analysis: a case study in Vietnam*, Environmental Science: Processes & Impacts, 2015, DOI: 10.1039/C5EM00362H
5. Nguyễn Duy Chiên và cs. *Tối ưu quy trình tách các nhóm anion và cation cơ bản trong mẫu nước nhằm phân tích đồng thời các ion bằng hệ thiết bị điện di mao quản xách tay tự động loại 2 kênh*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, **1(4)**, 23-29 (2015).
1. Petr Lacina, et al. *Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass*

Liên hệ: Phạm Hùng Việt

Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Môi trường và Phát triển Bền vững
 Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội
 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội
 E-mail: phamhungviet@hus.edu.vn; Điện thoại 0913572589.