

DETERMINATION OF COUMATETRALYL AND BROMADIOLONE IN HUMAN BLOOD BY LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY

PHAM THI THU HA¹, NGUYEN MAI DUNG¹, DANG THI NGOC LAN², PHAM QUOC CHINH^{1,✉}

¹National Institute of Forensic Medicine

²Hanoi University of Pharmacy

✉Corresponding author: pqchinh72@gmail.com

Received January 13th, 2025

Accepted February 12th, 2025

Abstract: In this study, a specific, sensitive and reliable liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been established for the simultaneous quantification of coumatetralyl and bromadiolone in whole blood. The method involves a liquid-liquid extraction with ethyl acetate. Multiple-reaction monitoring (MRM) was used for the monitoring of negative ions for the detection of analysed compounds. Warfarin-d5 was used as an internal standard (IS). Linearity was observed for each analyte in blood ranging from 0.5 to 100 ng/mL, with correlation coefficients over 0.99. The limit of detection (LOD) was 0.04 ng/mL for coumatetralyl and 0.05 ng/mL for bromadiolone. The intra-day and inter-day precision values were < 15 %, and accuracies ranged from 83.4 % to 109.0 %. This method was applied to analyze twenty whole blood samples of twenty people who were suspected of having been poisoned by these compounds.

Keywords: Coumatetralyl, bromadiolone, whole blood, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH COUMATETRALYL VÀ BROMADIOLON TRONG MÁU NGƯỜI BẰNG SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ

PHẠM THỊ THU HÀ¹, NGUYỄN MAI DUNG¹, ĐẶNG THỊ NGỌC LAN², PHẠM QUỐC CHINH^{1,✉}

¹ Viện Pháp y Quốc gia

² Trường Đại học Dược Hà Nội

✉Tác giả liên hệ: pqchinh72@gmail.com

Nhận bài ngày 13 tháng 01 năm 2025
Chấp nhận đăng ngày 12 tháng 2 năm 2025

Tóm tắt: Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS có độ đặc hiệu, độ nhạy và chính xác cao đã được phát triển để định lượng đồng thời coumatetralyl và bromadiolon trong mẫu máu. Mẫu máu sau khi chiết lỏng-lỏng với dung môi ethyl acetat, tiến hành sắc ký theo chế độ ESI ion âm với kỹ thuật MRM nhằm phát hiện các hợp chất được phân tích. Warfarin-d5 được sử dụng làm chất chuẩn nội (IS). Khoảng tuyến tính đối với từng chất phân tích trong máu nằm trong khoảng từ 0,5 đến 100 ng/mL, với hệ số tương quan lớn hơn 0,99. Giới hạn phát hiện (LOD) của coumatetralyl và bromadiolon lần lượt là 0,04 ng/mL và 0,05 ng/mL. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày đều dưới 15 %, với độ đúng dao động từ 83,4 % đến 109,0 %. Phương pháp này đã được áp dụng để phân tích hai mươi mẫu máu nghi ngờ ngộ độc thuốc diệt chuột chống đông máu.

Từ khóa: Coumatetralyl, bromadiolon, máu, sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, các loại thuốc diệt chuột được sử dụng phổ biến ở cả khu vực nông thôn và thành thị, với nhiều mục đích như bảo vệ cây trồng, tiêu diệt chuột trong gia đình và các khu công nghiệp. Trong số đó, nhóm thuốc diệt chuột chống đông máu đối kháng vitamin K được ưa chuộng nhất [1]. Coumatetralyl và bromadiolon, lần lượt là các chất diệt chuột chống đông máu thế hệ 1 và thế hệ 2, hiện đang được sử dụng rộng rãi tại Việt Nam. Các sản phẩm thuốc này thường được bào chế dưới dạng viên nén giống kẹo hoặc dung dịch màu sắc tươi sáng, dẫn đến sự gia tăng các trường hợp ngộ độc trong những năm gần đây, bao gồm cả ngộ độc do nhầm lẫn, cố ý đầu độc, hoặc tự tử [2]. Theo thông kê của Bệnh viện Bạch Mai, từ tháng 6/2020 đến tháng 6/2021, có 37 trường hợp ngộ độc cấp thuốc diệt chuột loại chống đông máu được điều trị tại Trung tâm chống độc Bệnh viện Bạch Mai [3]. Việc xác định chính xác các chất này trong mẫu máu đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán, cấp cứu, điều trị và làm rõ nguyên nhân ngộ độc.

Trên thế giới, phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) được ưu tiên sử dụng trong phân tích lượng vết nhờ vào độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu vượt trội so với các kỹ thuật sắc ký lỏng truyền thống sử dụng đầu dò DAD hoặc FID [4]. Gần đây, LC-MS/MS đã được áp dụng để phân tích các chất chống đông máu trong mẫu dịch sinh học và mô động vật [5], [6]. Tuy nhiên, các nghiên cứu chủ yếu được thực hiện ở nước ngoài, và tại Việt Nam, vẫn chưa có báo cáo nào về việc xác định đồng thời coumatetralyl và bromadiolon trong mẫu máu được công bố.

Nghiên cứu này nhằm xây dựng và thẩm định một phương pháp định lượng đồng thời coumatetralyl và bromadiolon trong mẫu máu bằng LC-MS/MS, kết hợp kỹ thuật xử lý mẫu chiết lỏng-lỏng (LLE). Phương pháp được kỳ vọng sẽ trở thành công cụ phân tích hữu ích trong việc xử lý các trường hợp ngộ độc thuốc diệt chuột chống đông máu, hỗ trợ công tác cấp cứu, điều trị, xác định nguyên nhân ngộ độc, cũng như giám định pháp y tại Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng UPLC 1290 infinity II Agilent, detector khối phổ MS/MS 6470 LC/TQ, máy ly tâm, cân phân tích (có độ chính xác 0,01 mg), máy lắc rung, hệ thống thổi khí nitơ, các micropipette dung tích 20 – 1000 μ L, các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp và các thiết bị, dụng cụ khác trong phòng thí nghiệm.

Thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn

+ Coumatetralyl 10mg, hàm lượng 98 %, Lot: 24690, AccuStandard Inc., USA.

+ Bromadiolon 10mg, hàm lượng 93,6 %, Lot: 24764, AccuStandard Inc., USA.

+ Warfarin-d5 1mg, hàm lượng 97,0 %, Lot: 4-YMK-34-3, Toronto Research Chemicals Inc., Canada: chuẩn đồng vị của Warfarin, chất diệt chuột chống đông máu thế hệ 1, được dùng làm chuẩn nội trong phương pháp phân tích.

- Dung môi, hóa chất: Methanol HPLC, ethyl acetat HPLC, acetonitril HPLC, diethyl ether, n-hexan, cyclohexan, chloroform, acid hydrochloric, acid formic, nước cất... dùng cho phân tích.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng và mẫu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu là coumatetralyl và bromadiolon trong máu.

- Mẫu trắng: Mẫu máu không nhiễm coumatetralyl, bromadiolon của Viện Huyết học Truyền máu Trung ương để khảo sát phương pháp.

- Mẫu nghiên cứu: Mẫu máu của người nghi ngờ bị ngộ độc thuốc diệt chuột chống đông máu được gửi đến giám định tại Viện Pháp y Quốc gia.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Nghiên cứu tài liệu tham khảo [5], [6], [7], tiến hành khảo sát các tỉ lệ pha động trên thiết bị sắc ký lỏng khối phổ nhằm lựa chọn được điều kiện sắc ký phù hợp nhất để định lượng coumatetralyl và bromadiolon như sau:

- Cột sắc ký: Poroshell 120 EC-C18 (2,7 μ m, 4,6 x 100 mm)

- Pha động: Acetonitril - dung dịch amoni formate 10 mM

- Thể tích tiêm mẫu: 1 μ L

- Tốc độ dòng: 0,3 mL/phút

Từ các điều kiện trên, tiến hành khảo sát tỷ lệ pha động để thu được pic gọn đẹp, cân đối.

2.2.2.2. Khảo sát điều kiện khối phổ

Khối phổ hai lần (MS/MS), nguồn ion hóa ESI (-). Sử dụng chế độ khảo sát tự động để bắn phá ion phân tử thành các ion con, lựa chọn ion con có cường độ tín hiệu cao nhất để định lượng và ion con có cường độ thấp hơn để xác nhận. Năng lượng bắn phá (CE) tự động được tối ưu hóa theo phần mềm MassHunter Optimizer của thiết bị.

2.2.2.3. Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

- Các dung dịch chuẩn

+ Dung dịch chuẩn gốc coumatetralyl (nồng độ 1 mg/mL trong methanol): Cân chính xác 5,11 mg chuẩn coumatetralyl vào bình định mức 5 mL, sau đó thêm methanol đến vạch.

+ Dung dịch chuẩn gốc bromadiolon (nồng độ 1 mg/mL trong methanol): Cân chính xác 5,35 mg chuẩn bromadiolon vào bình định mức 5 mL và bổ sung methanol đến vạch.

+ Dung dịch chuẩn nội gốc (nồng độ 97 µg/mL trong methanol): Hòa tan 1 mg chuẩn warfarin-d5 trong bình định mức 10 mL và bổ sung methanol đến vạch.

+ Dung dịch chuẩn và chuẩn nội trung gian (nồng độ 1 µg/mL trong methanol): Được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc bằng methanol.

+ Dây dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc (nồng độ từ 0,5 - 100 ng/mL): Được pha loãng từ dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian (1 µg/mL) bằng methanol hoặc nền mẫu trắng.

- Chuẩn bị mẫu chiết: Cho vào ống ly tâm 10 mL chính xác 1,0 mL mẫu máu, thêm 20 µL dung dịch chuẩn nội nồng độ 1,0 µg/mL và 20 µL HCl 1 M, lắc đều. Thêm 3 mL dung môi chiết, lắc xoay trong 5 phút. Ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó thu lớp dung môi hữu cơ. Chiết mẫu 3 lần, gộp dịch chiết và làm khô bằng khí nitơ đến gần khô. Cân được hòa tan bằng 400 µL dung

môi pha động, lọc qua màng lọc 0,22 µm, tiến hành sắc ký.

- Tiến hành khảo sát phương pháp chiết lỏng-lỏng với 5 dung môi gồm diethyl ether, ethyl acetat, cyclohexan, dichloromethan, hỗn hợp cyclohexan: ethyl acetat (7:1) nhằm lựa chọn dung môi chiết có độ thu hồi cao nhất đối với các chất phân tích.

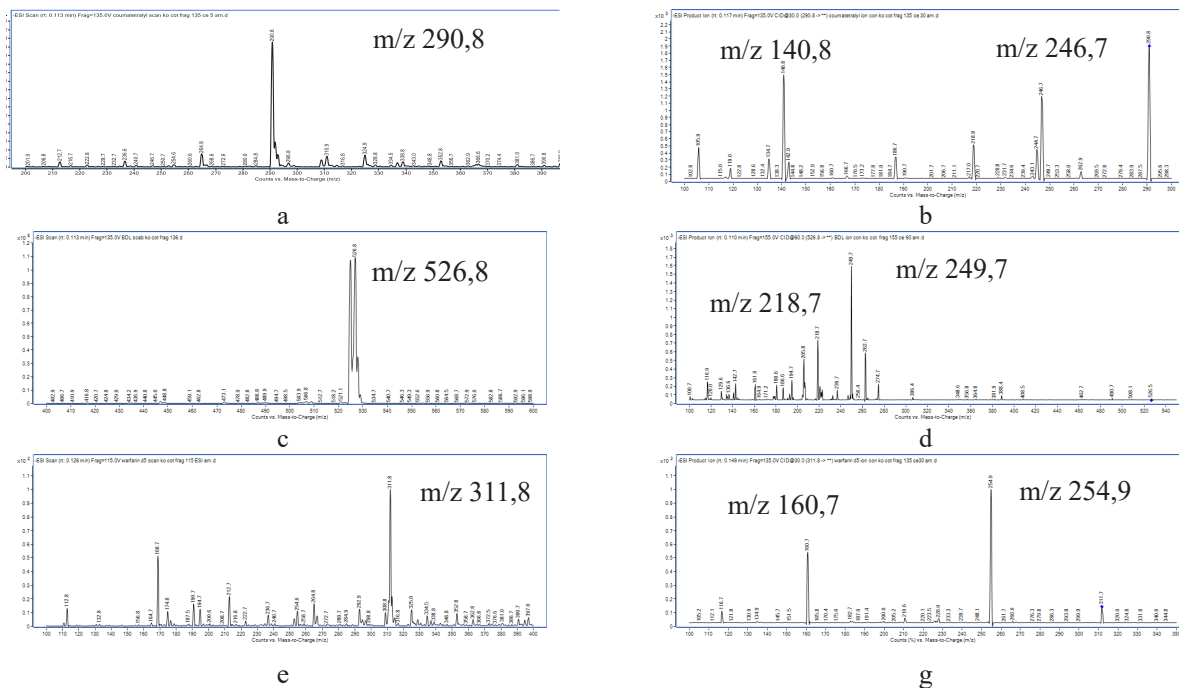
2.2.2.4. Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích được thẩm định dựa trên các hướng dẫn của ANSI/ASB Standard 036 và US-FDA, với các tiêu chí đánh giá bao gồm: độ phù hợp của hệ thống, độ đặc hiệu và tính chọn lọc, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, cũng như độ ổn định [8], [9].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát điều kiện khối phổ của coumatetralyl, bromadiolon và warfarin-d5

Quá trình khảo sát tín hiệu ion trong phổ khối một lần của các chất chuẩn và chuẩn nội đã xác định được một ion mẹ có cường độ cao và ổn định cho mỗi chất. Các ion mẹ này tiếp tục được bắn phá lần hai để tạo ra các ion con, từ đó chọn ra hai ion con có cường độ cao và ổn định nhất để định lượng và định tính. Từ kết quả khảo sát, các ion mẹ và ion con có giá trị m/z được chọn để theo dõi trong kỹ thuật MRM nhằm phát hiện coumatetralyl, bromadiolon trong mẫu. Kết quả thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Phổ khối scan lần 1 và phổ ion con của coumatetralyl, bromadiolon và warfarin-d5
a, c, e. Phổ khối scan lần 1 của coumatetralyl, bromadiolon và warfarin-d5
b, d, g. Phổ ion con của coumatetralyl, bromadiolon và warfarin-d5

Sau khi lựa chọn được ion mẹ và ion con, tiến hành tối ưu hóa các điều kiện khối phổ để tín hiệu thu được cao và ổn định. Kết quả tối ưu khối phổ được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Điều kiện khối phổ phân tích coumatetralyl, bromadiolon và warfarin-d5

Chất phân tích	Coumatetralyl		Bromadiolon		Warfarin-d5	
Thông số						
Chế độ ion hóa	ESI(-)		ESI(-)		ESI(-)	
Điện thế ion hóa (V)	4000		4000		4000	
Khí phun sương (psi)	40		40		40	
Nhiệt độ hóa hơi (°C)	300		300		300	
Ion ban đầu	290,8		526,8		311,8	
Năng lượng phân mảnh (V)	26	30	46	42	24	30
Ion tạo thành	246,7	140,8	218,7	249,7	160,7	254,9
Ghi chú	Định tính	Định lượng	Định tính	Định lượng	Định tính	Định lượng

Kết quả cho thấy, các ion mẹ có số khối $[M-H]^-$ phù hợp với công thức phân tử của các chất phân tích. Mỗi chất đều tạo ra hai ion con, phù hợp với quy định.

Do đó, phổ khối của các chất phân tích đã được thiết lập theo chế độ ion âm với nguồn ESI, đảm bảo phù hợp để xác định coumatetralyl và bromadiolon bằng phương pháp MS/MS.

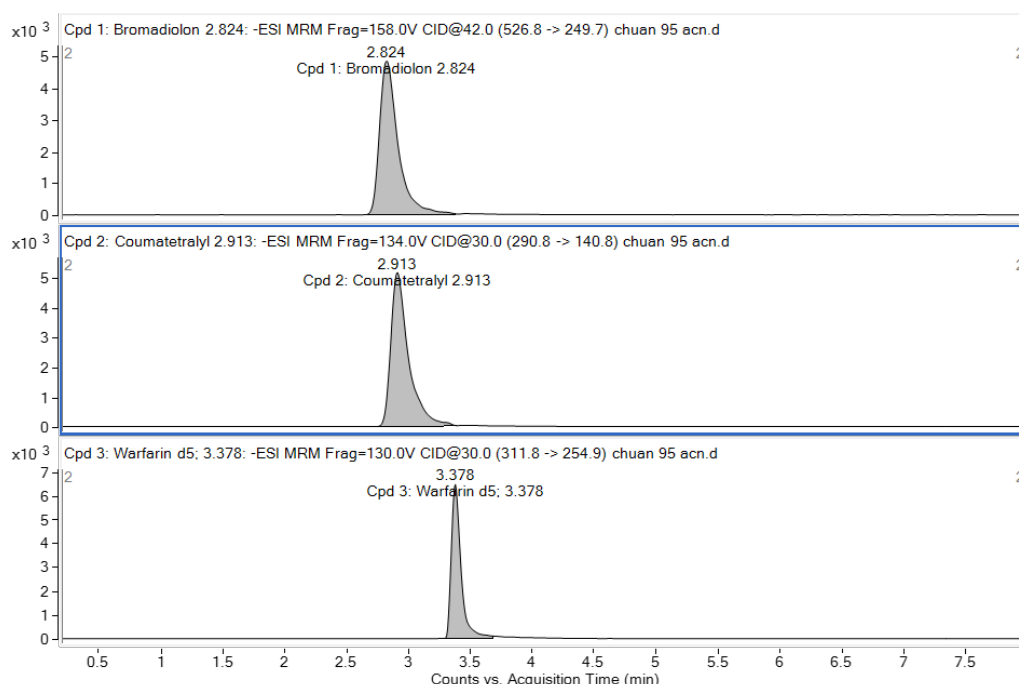
3.2. Khảo sát chương trình pha động

Sau khi lựa chọn được các ion phân tử, ion con và điều

kiện khối phổ tối ưu, dung dịch chuẩn chứa coumatetralyl và bromadiolon ở nồng độ 50 ng/mL, cùng chuẩn nội warfarin-d5 ở nồng độ 20 ng/mL, đã được phân tích.

Pha động gồm hai thành phần chính là acetonitril và dung dịch amoni format 10 mM được khảo sát nhằm tối ưu hóa điều kiện phân tích. Với tốc độ dòng 0,3 mL/phút và thể tích tiêm 1 μ L, tỷ lệ acetonitril - dung dịch amoni format 10 mM tối ưu được xác định là 95:5.

Sắc ký đồ của coumatetralyl và bromadiolon trong điều kiện tối ưu được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ MRM của coumatetralyl, bromadiolon và warfarin-d5

Kết quả cho thấy các pic của coumatetralyl, bromadiolon và warfarin-d5 xuất hiện với thời gian lưu phù hợp, pic cân đối, nhọn, sắc nét. Mỗi chất đều sử dụng hai ion con để định lượng và xác nhận, đảm bảo độ chính xác và tính tin cậy của phương pháp. Do vậy, chương trình pha động Acetonitril - dung dịch amoni formate 10 mM tỉ lệ 95: 5 đã được chọn làm điều kiện pha động để phân tích coumatetralyl và bromadiolon.

3.3. Khảo sát dung môi chiết

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát hiệu quả chiết của các dung môi khác nhau, bao gồm diethyl ether, ethyl acetat, hỗn hợp cyclohexan:ethyl acetat (7:1), cyclohexan và dichloromethan. Mẫu máu trắng được bổ sung hỗn hợp chuẩn với nồng độ 50 ng/mL và chuẩn nội warfarin-d5 nồng độ 20 ng/mL. Quá trình xử lý mẫu tiến hành theo quy trình đã trình bày tại mục 2.2.2.3. Kết quả chi tiết được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Chất phân tích Dung môi	Bromadiolon		Coumatetralyl		Warfarin-d5	
	Độ thu hồi (%)	RSD (%)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)
Diethyl ether	70,52	2,97	78,15	3,74	77,35	2,67
Ethyl acetat	84,00	4,21	82,94	3,37	90,09	3,46
Cyclohexan: EtOAc (7:1)	81,25	4,09	76,07	2,30	81,59	3,69
Cyclohexan	5,46	3,15	6,34	4,07	3,23	2,92
Dichloromethan	61,21	4,22	68,29	2,79	78,38	2,11

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, ethyl acetat cho thấy khả năng chiết tách chất phân tích vượt trội so với các dung môi khác (độ thu hồi của 2 chất phân tích và chuẩn nội đều > 80 %). Ngoài ra, ethyl acetat có tốc độ bay hơi trung bình và ít tạo nhũ trong quá trình chiết, giúp giảm thời gian xử lý mẫu. Vì vậy, ethyl acetate được chọn làm dung môi chiết tối ưu cho phương pháp này.

3.4. Đánh giá phương pháp

3.4.1. Độ phù hợp của hệ thống LC-MS/MS

Để đánh giá độ phù hợp của hệ thống, hỗn hợp dung dịch chuẩn nồng độ 40 ng/mL và chuẩn nội nồng độ 20 ng/mL được tiêm lặp lại 6 lần. Thời gian lưu và diện tích pic của các chất được ghi nhận, với kết quả chi tiết được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Độ phù hợp của hệ thống LC-MS/MS

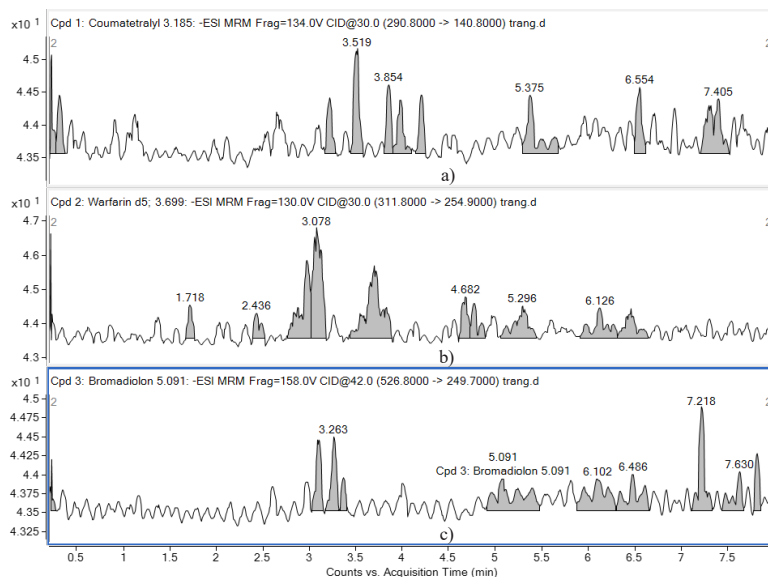
STT	Coumatetralyl		Bromadiolon		Warfarin-d5	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (Abu.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (Abu.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (Abu.s)
1	2,899	36229,09	2,810	52233,84	3,427	55386,14
2	2,899	37074,03	2,817	51765,26	3,420	55439,01
3	2,899	36381,74	2,817	50315,89	3,420	55776,61
4	2,899	38025,21	2,817	50924,83	3,420	55640,91
5	2,899	37487,81	2,817	52152,39	3,420	56938,41
6	2,892	37213,42	2,817	52319,30	3,420	56752,41
TB	2,898	37068,55	2,816	51618,59	3,421	55988,92
RSD (%)	0,10	1,83	0,10	1,59	0,08	1,22

Kết quả cho thấy:

Các giá trị RSD của thời gian lưu của coumatetralyl, bromadiolon, warfarin đều nhỏ hơn 1 %, RSD của diện tích pic của 3 chất trên đều nhỏ hơn 5 %, cho thấy các điều kiện sắc ký lựa chọn và hệ thống LC-MS/MS phù hợp và đảm bảo tính ổn định để phân tích coumatetralyl, bromadiolon.

3.4.2. Độ đặc hiệu, chọn lọc

Để đánh giá độ đặc hiệu và tính chọn lọc, đã chuẩn bị 6 mẫu máu trắng, 6 mẫu chuẩn và 6 mẫu máu trắng được bổ sung chuẩn cùng chuẩn nội ở nồng độ 50 ng/mL. Các mẫu được xử lý và phân tích theo quy trình đã thiết lập. Kết quả sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu máu trắng thêm chuẩn được trình bày trong Hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu trắng (a), mẫu chuẩn (b) và mẫu trắng thêm chuẩn (c)

Trên sắc ký đồ của mẫu máu trắng thêm chuẩn, các pic đặc trưng xuất hiện tại thời gian lưu khoảng 2,87 phút, 2,95 phút và 3,42 phút, tương ứng với thời gian lưu của các chất coumatetralyl, bromadiolon và chuẩn nội warfarin-d5. Ngược lại, sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện bất kỳ pic nào trong các khoảng thời gian lưu này.

Kết quả này chứng minh rằng phương pháp phân tích có tính chọn lọc cao đối với coumatetralyl, bromadiolon và warfarin-d5.

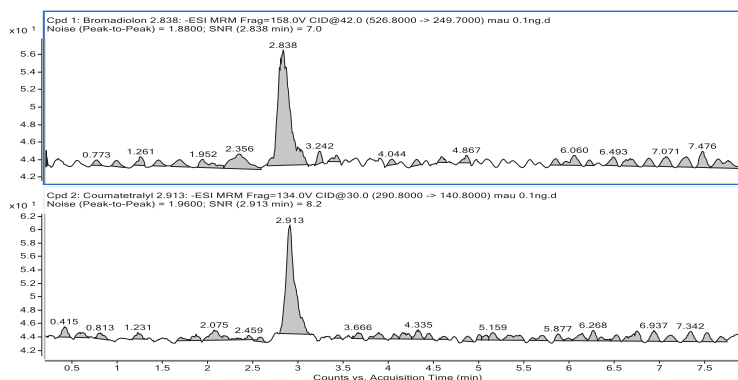
3.4.3. Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định dựa trên tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N). LOD được xác định tại nồng độ có S/N xấp xỉ 3.

Dựa trên kết quả thực nghiệm, giá trị LOD của coumatetralyl và bromadiolon trong máu được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của coumatetralyl và bromadiolon

Chất phân tích	Coumatetralyl (ng/mL)	Bromadiolon (ng/mL)
LOD	0,04	0,05



Hình 4. Sắc ký đồ của mẫu trắng thêm chuẩn 0,1 ng

Giới hạn phát hiện của coumatetralyl và bromadiolon lần lượt là 0,04 ng/mL và 0,05 ng/mL cho thấy phương pháp phân tích có độ nhạy cao, đáp ứng tốt yêu cầu phân tích vết.

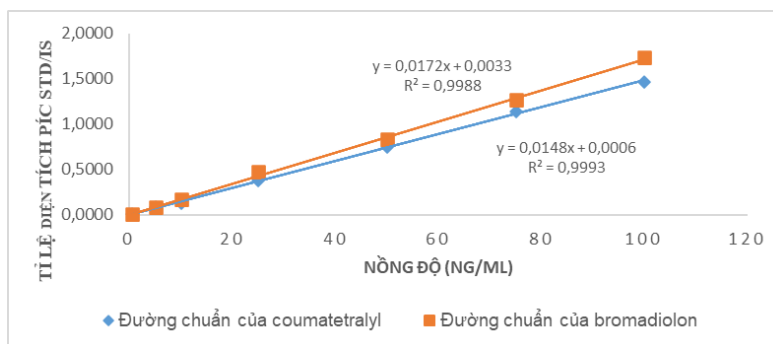
3.4.4. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Đường chuẩn được xây dựng trên nền mẫu máu trắng

để loại trừ các ảnh hưởng của nền mẫu. Các chất chuẩn được bổ sung vào mẫu với nồng độ từ 0,5 đến 100 ng/mL, trong khi nồng độ của chuẩn nội được duy trì cố định ở mức 20 ng/mL. Sau đó, quy trình chiết tách và phân tích được thực hiện theo phương pháp đã thiết lập. Kết quả được trình bày ở Bảng 6 và Hình 4.

Bảng 6. Khoảng tuyến tính, đường chuẩn của coumatetralyl, bromadiolon trong máu

Chất phân tích	Khoảng tuyến tính (ng/mL)	Đường chuẩn	Hệ số r
Coumatetralyl	0,5 – 100	$y = 0,0148x + 0,0006$	0,9996
Bromadiolon	0,5 – 100	$y = 0,0172x + 0,0033$	0,9994



Hình 5. Đường chuẩn phân tích coumatetralyl (a) và bromadiolon (b) trong máu

Kết quả thu được cho thấy mối quan hệ tuyến tính rõ rệt giữa tỷ lệ diện tích pic của chất chuẩn so với chuẩn nội và nồng độ của coumatetralyl và bromadiolon trong khoảng từ 0,5 đến 100 ng/mL, với hệ số tương quan (r) lớn hơn 0,99.

3.4.5. Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

Phương pháp được đánh giá về độ đúng và độ lặp lại thông qua phân tích các mẫu máu trắng được bổ sung chuẩn ở bốn mức nồng độ: LLOQ (0,5 ng/mL), LQC

(1 ng/mL), MQC (20 ng/mL), và HQC (80 ng/mL), mỗi mức được thực hiện với 5 lần lặp lại (n = 5). Nồng độ của coumatetralyl và bromadiolon trong mẫu được xác định bằng phương pháp đường chuẩn. Độ đúng được tính bằng phần trăm giữa nồng độ đo được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của các kết quả phân tích. Kết quả trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng và độ lặp lại của phương pháp

Chất phân tích	Nồng độ (ng/mL)	Mẫu máu					
		Trong ngày			Khác ngày		
		Nồng độ tính được	Độ đúng (%)	RSD (%)	Nồng độ tính được	Độ đúng (%)	RSD (%)
Coumatetralyl	0,5	0,42	83,61	5,51	0,43	85,31	6,40
	1,0	1,09	108,97	6,58	1,01	100,62	9,15
	20,0	19,29	96,43	6,44	18,98	94,88	6,71
	80,0	78,70	98,37	5,73	71,17	88,97	6,28
Bromadiolon	0,5	0,42	84,97	7,41	0,42	83,37	6,40
	1,0	0,89	89,07	6,81	0,87	87,38	4,71
	20,0	18,13	90,64	5,33	18,80	94,01	5,86
	80,0	73,53	91,91	7,16	71,02	88,78	5,93

Kết quả cho thấy cho thấy độ đúng của phương pháp nằm trong khoảng từ 87,38 % đến 108,97 % ở các mức nồng độ 1,0; 20,0 và 80,0 ng/mL, và từ 83,37 % đến 85,31 % ở mức LLOQ (0,5 ng/mL). Độ lặp lại của phương pháp đạt yêu cầu với RSD dao động từ 4,71 % đến 9,15 %. Do đó, phương pháp được xây dựng đã đáp ứng các tiêu chuẩn về độ đúng và độ lặp lại trong phân tích coumatetralyl và bromadiolon trong mẫu máu.

3.4.6. Độ ổn định

Để đánh giá ảnh hưởng của quá trình thực nghiệm đến chất phân tích, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát độ ổn định của chất phân tích trong nền mẫu máu dưới các điều kiện bảo quản nhất định. Trong giám định pháp y, khoảng

thời gian 7 ngày, 21 ngày và 3 chu kỳ rã đông được xem xét vì đây là thời gian chờ thường gặp từ khi nhận mẫu đến khi thực hiện giám định hoặc giám định lại.

Độ ổn định của coumatetralyl và bromadiolon trong nền mẫu máu được đánh giá trên 5 lô mẫu máu trắng được bổ sung chuẩn ở hai mức nồng độ LQC (1 ng/mL) và HQC (80 ng/mL). Một lô được phân tích ngay sau khi chuẩn bị, trong khi các lô còn lại được phân tích sau khi trải qua các điều kiện bảo quản khác nhau: 4 giờ bảo quản sau xử lý trong autosampler ở nhiệt độ phòng, 7 ngày bảo quản trong tủ lạnh âm sâu ở nhiệt độ -20 °C, 21 ngày bảo quản trong tủ lạnh âm sâu ở nhiệt độ -20 °C và sau 3 chu kỳ rã đông. Kết quả khảo sát độ ổn định được trình bày trong Bảng 8.

Bảng 8. Độ ổn định của coumatetralyl, bromadiolon trong máu

Độ ổn định	Mẫu	Coumatetralyl			Bromadiolon		
		Nồng độ ban đầu (ng/ml)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n=6)	% Sai khác	Nồng độ ban đầu (ng/ml)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n=6)	% Sai khác
Sau xử lý 4 giờ trong autosampler ở nhiệt độ phòng	LQC	0,95	0,91	-5,12	1,05	1,00	-4,16
	HQC	81,85	76,80	-4,59	76,80	73,15	-3,53
Sau 7 ngày ở -20 °C	LQC	0,95	0,88	-6,77	1,05	0,97	-6,72
	HQC	81,85	74,57	-8,83	76,80	72,68	-5,51
Sau 21 ngày ở -20 °C	LQC	0,95	0,86	-5,68	1,05	0,94	-9,15
	HQC	81,85	73,24	-10,58	76,80	70,71	-7,83
Sau 3 chu kỳ rã - đông	LQC	0,95	0,87	-8,16	1,05	0,96	-7,80
	HQC	81,85	73,59	-10,09	76,80	72,28	-6,04

Kết quả cho thấy sự khác biệt về nồng độ của coumatetralyl và bromadiolon giữa các mẫu phân tích ngay sau chuẩn bị và các mẫu được bảo quản ở các điều kiện nêu trên nằm trong giới hạn cho phép (< 15 %). Do đó, coumatetralyl và bromadiolon trong mẫu máu được xác định là ổn định sau xử lý 4 giờ trong autosampler ở nhiệt độ phòng, cũng như trong 7 ngày, 21 ngày và qua 3 chu kỳ rã đông khi bảo quản ở nhiệt độ -20 °C.

3.5. Phân tích mẫu máu của những người nghi ngờ bị ngộ độc thuốc diệt chuột chống đông máu

Quy trình phân tích đã được áp dụng để kiểm tra 20 mẫu máu của nạn nhân nghi ngờ bị ngộ độc thuốc diệt chuột thuộc nhóm chống đông máu được gửi đến giám định tại Viện Pháp y Quốc gia. Mỗi mẫu máu được phân tích lặp lại 3 lần, và kết quả trung bình được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả phân tích mẫu thực

Mẫu số	Tuổi	Coumatetralyl (ng/mL)	Bromadiolon (ng/mL)	Mẫu số	Tuổi	Coumatetralyl (ng/mL)	Bromadiolon (ng/mL)
M1	68	(-)	7,09 ± 0,35	M11	20	(-)	49,57 ± 1,96
M2	74	(-)	(-)	M12	77	(-)	21,70 ± 0,96
M3	67	(-)	28,57 ± 1,70	M13	84	(-)	51,38 ± 2,2
M4	75	(-)	19,88 ± 1,23	M14	64	(-)	9,99 ± 0,22
M5	24	(-)	3,70 ± 0,17	M15	63	(-)	114,46 ± 10,74
M6	63	(-)	(-)	M16	47	177,71 ± 11,52	3,38 ± 0,08
M7	60	(-)	28,64 ± 1,15	M17	69	(-)	(-)
M8	23	(-)	70,72 ± 3,73	M18	41	(-)	40,55 ± 1,48
M9	64	(-)	(-)	M19	53	87,71 ± 3,79	218,67 ± 22,09
M10	66	(-)	1,71 ± 0,06	M20	43	23,39 ± 0,08	(-)

Từ kết quả phân tích cho thấy, trong 20 mẫu, có 13 mẫu chỉ dương tính với bromadiolon, 1 mẫu chỉ dương tính với coumatetralyl, 2 mẫu dương tính với coumatetralyl và bromadiolon, 4 mẫu âm tính. Nồng độ coumatetralyl được phát hiện nằm trong khoảng từ 23,39 đến 177,71 ng/mL, trong khi nồng độ bromadiolon dao động từ 1,71 đến 218,67 ng/mL. Đối với các mẫu có nồng độ vượt ngoài khoảng tuyến tính, pha loãng 5 lần với máu trắng đã được thực hiện để đảm bảo kết quả chính xác.

4. BÀN LUẬN

Phương pháp LC-MS/MS có tính đặc hiệu và chọn lọc cao, sự có mặt của các chất phân tích được khẳng định thông qua phổ khối của các ion được bắn phá. Nghiên cứu có sử dụng warfarin-d5, chuẩn nội đồng vị của warfarin là chất cùng nhóm thuốc diệt chuột chống đông máu thế hệ 1, làm chuẩn nội của phương pháp. Warfarin-d5 không có trong tự nhiên, có tính chất lý hóa gần giống với các chất phân tích, có cùng cơ chế ion hóa tại nguồn ESI và hiệu suất thu hồi không quá chênh lệch với các chất phân tích khi áp dụng quy trình phân tích mẫu.

Phân tích coumatetralyl và bromadiolon trong máu thường gặp phải khó khăn do thành phần phức tạp của mẫu, lượng chất phân tích trong máu người ngộ độc có thể rất thấp, lượng mẫu ít do vậy để xác định được các chất này trong máu cần có phương pháp phân tích có độ nhạy cao.

Phương pháp thẩm định có giá trị LOD thấp (0,04 ng/mL với coumatetralyl và 0,05 ng/mL với bromadiolon), khoảng hàm lượng tuyến tính lớn (0,5 ng - 100 ng/mL

máu) với độ đúng, độ lặp lại trong khoảng cho phép, khả năng thu hồi hoạt chất cao. Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp vượt trội hơn một số nghiên cứu trên thế giới trước đây sử dụng phương pháp HPLC-FID [4] hoặc LC-MS/MS với phương pháp tủa protein bằng Acetonitril (LOD = 5 ng/mL) [5] hay chiết pha rắn (LOD = 2-5 ng/mL) [6].

Các kết quả phân tích mẫu thực tế cũng cho thấy các mẫu dương tính với bromadiolon nhiều hơn rất nhiều so với coumatetralyl. Điều này phù hợp với thực tế thuốc diệt chuột chống đông máu thế hệ 2 đang thay thế dần thuốc thế hệ 1 do độ độc cao hơn nhiều và hiệu quả diệt chuột nhanh, tốt hơn cũng như ít bị kháng thuốc hơn thuốc thế hệ 1.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công phương pháp phát hiện và định lượng đồng thời coumatetralyl và bromadiolon trong máu dựa trên kỹ thuật chiết lỏng - lỏng (LLE) kết hợp với sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS). Kết quả thẩm định chứng minh rằng phương pháp này có độ nhạy cao, độ tin cậy tốt và khả năng phát hiện chất phân tích đến mức nồng độ ng/mL. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích 20 mẫu máu nghi ngờ bị ngộ độc thuốc diệt chuột chống đông máu. Kết quả cho thấy quy trình phân tích phù hợp để xác định coumatetralyl và bromadiolon trong máu, đồng thời có tiềm năng ứng dụng trong việc xác định nguyên nhân ngộ độc, hỗ trợ cấp cứu và điều trị lâm sàng, cũng như phục vụ công tác giám định pháp y.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nathan K., Tran M. H. (2015), Long-Acting Anticoagulant Rodenticide (Superwarfarin) Poisoning: A Review of Its Historical Development, Epidemiology, and Clinical Management, *Transfusion Medicine Reviews*, 29(4), pp. 250 - 258.
2. David D. G., James B. M., et al. (2023), 2022 Annual Report of the National Poison Data System® (NPDS) from America's Poison Centers®: 40th Annual Report, *Clinical Toxicology*, 61(10), pp. 717-939.
3. Nguyễn Anh Tuấn, Phạm Thị Vân Anh, Đặng Thị Xuân, Hà Trần Hưng (2021), Đặc điểm lâm sàng và nồng độ độc chất huyết thanh của bệnh nhân ngộ độc cấp hóa chất diệt chuột bromadiolon và flocoumafen, *Tạp Chí Y học Việt Nam*, 529(1), tr. 315-318.
4. Armentano A., Iammarino M., Magro S. L., & Muscarella M. (2012). Validation and application of multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(2), 307-311.
5. Vindenes V., Karinen R., et al. (2008), Bromadiolone poisoning: LC-MS method and pharmacokinetic data, *Journal of Forensic Science*, 53 (4), pp. 993– 996.
6. Schaff J.E., Montgomery M.A. (2013), An HPLC–HR–MS–MS method for identification of anticoagulant rodenticides in blood, *Journal of Analytical Toxicology*, 37 (6), pp. 321–325.
7. Hao G., Junwei W., et al. (2018), Sensitive and simultaneous determination of nine anticoagulant rodenticides in human blood by UPLC–MS–MS with phospholipid removal pretreatment, *Journal of Analytical Toxicology*, 42 (7), pp. 459–466.
8. ANSI/ASB Standard 036 (2019), *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*.
9. The United States - Food and Drug Administration (2018), *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*.