

Research Article**Determination of some NSAIDs content in meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)**

Phung Cong Ly^{1*}, Tran Trung Thanh¹, Nguyen Thi Hong Ngoc¹,
Tran Vu Duc², Nguyen Thi Thuy Linh²

¹National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

(Received: 28 March 2024; Revised: 13 May 2024; Accepted: 14 May 2024)

Abstract

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the most widely used group of drugs worldwide for pain relief, anti-inflammation, blood clot prevention, and fever reduction, but they can cause some side effects bad for health if used incorrectly. NSAIDs are on the list of drugs that must be monitored according to Council Directive 96/23/EC. The fact that NSAIDs are also used in animals for anti-inflammation, fever reduction, and pain relief raises concerns that animal products such as meat, eggs, and milk may be contaminated with NSAIDs, affecting human health if consumed like eating right. Therefore, developing a method to analyze NSAIDs in meat products is necessary, contributing to assessing the quality of meat products currently circulating on the market. In this study, 4 common substances in the NSAIDs group were studied and identified by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a Symmetry C18 chromatographic column with an ESI (+) positive electron spray ionization source and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The validity of the method was confirmed according to the guidelines of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). The results showed that the method has good specificity, the linearity range from 5.0 to 100 µg/kg, the detection limit of 1.5 µg/kg, the quantification limit of 5.0 µg/kg; precision and accuracy with relative standard deviation (RSD) less than 11% and recoveries ranging from 81.1 to 111%, meeting AOAC requirements. The method was used to analyze the content of NSAIDs in 15 meat samples in Hanoi. The results showed that 7 samples showed tolfenamic acid exceeding the quantitative limit of the method.

Keywords: NSAIDs, LC-MS/MS, meat, diclofenac, flunixin, meloxicam, tolfenamic acid.

* Corresponding author: Phung Cong Ly (E-mail: phungcongly1997@gmail.com)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4348>

Xác định hàm lượng một số chất nhóm NSAIDs trong thịt bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

Phùng Công Lý¹, Trần Trung Thành¹, Nguyễn Thị Hồng Ngọc¹,

Trần Vũ Đức², Nguyễn Thị Thùy Linh²

¹Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Dược Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Thuốc giảm đau, chống viêm không steroid (NSAIDs) là nhóm thuốc được sử dụng rộng rãi nhất trên toàn thế giới để giảm đau, chống viêm, ngăn ngừa cục máu đông và hạ sốt, nhưng chúng có thể gây ra một số tác động xấu đến sức khỏe nếu sử dụng sai cách. NSAIDs nằm trong danh mục các loại thuốc phải được giám sát theo Hội đồng Chỉ thị 96/23/EC. Việc NSAIDs còn được dùng cho động vật để chống viêm, hạ sốt và giảm đau làm dấy lên lo ngại về các sản phẩm từ động vật như thịt, trứng, sữa có thể bị nhiễm NSAIDs, gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người nếu như ăn phải. Vì vậy, việc xây dựng một phương pháp để phân tích NSAIDs trong các sản phẩm thịt là cần thiết, góp phần đánh giá chất lượng các sản phẩm thịt đang được lưu hành trên thị trường. Trong nghiên cứu này, 4 chất phổ biến trong nhóm NSAIDs đã được nghiên cứu xác định bằng sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) sử dụng cột sắc ký Symmetry C18, nguồn ion hóa phun điện tử ion dương ESI (+), chế độ theo dõi ion đa phản ứng (MRM - Multiple reaction monitoring). Giá trị sử dụng của phương pháp được xác nhận theo hướng dẫn của Hiệp hội các nhà hóa học phân tích chính thức (AOAC). Kết quả cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu tốt, đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 5,0 – 100 µg/kg, giới hạn phát hiện là 1,5 µg/kg, giới hạn định lượng là 5,0 µg/kg; độ chụm và độ đúng với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) nhỏ hơn 11% và độ thu hồi dao động từ 81,1 – 111%, đáp ứng yêu cầu theo AOAC. Phương pháp đã được sử dụng để phân tích hàm lượng NSAIDs trong 15 mẫu thịt trên địa bàn Hà Nội. Kết quả cho thấy có 7 mẫu xuất hiện tolfenamic acid vượt qua giới hạn định lượng của phương pháp.

Từ khóa: NSAIDs, LC-MS/MS, thịt, diclofenac, flunixin, meloxicam, tolfenamic acid.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thuốc giảm đau, chống viêm không steroid (NSAIDs) là nhóm thuốc được sử dụng rộng rãi nhất trên toàn thế giới [1], đặc biệt là trong thú y để điều trị bệnh ở động vật chăn nuôi lấy thịt. Thuốc NSAIDs có tác dụng giảm đau, giảm viêm, ngăn ngừa cục máu đông và hạ sốt [2]. Mặc dù có hiệu quả tốt nhưng chúng cũng gây ra nhiều tác dụng phụ, chẳng hạn như buồn nôn, buồn ngủ [3], tổn thương hệ tiêu hóa, thận, gan, sử dụng lâu dài có thể tăng nguy cơ gãy xương, biến cố tim mạch, lệ thuộc vào thuốc và nặng hơn có thể dẫn đến tử vong [4]. Dư lượng NSAIDs trong thịt động vật có thể xảy ra khi nhóm thuốc này bị lạm dụng và sử dụng bừa bãi. Đây là một vấn đề vô cùng quan trọng về an toàn thực phẩm nếu những thực phẩm chứa dư lượng thuốc NSAIDs đi vào chuỗi thức ăn, có thể gây ra phơi

nhiễm cấp tính đối với con người vì chúng có khả năng phân hủy sinh học thấp và có thể tích lũy trong cơ thể.

Để đảm bảo an toàn sức khỏe con người việc giám sát dư lượng thuốc nhóm NSAIDs trong thực phẩm có nguồn gốc động vật là một nhiệm vụ hết sức quan trọng. Liên minh châu Âu (EU) đã quy định mức giới hạn tối đa (MRLs) trong thực phẩm của một số thuốc nhóm NSAIDs như diclofenac, meloxicam, flunixin... theo Quy định số 37/2010 của Ủy ban châu Âu [5]. Các quốc gia phát triển khác như Nhật, Mỹ, Trung Quốc cũng đã đưa thuốc nhóm NSAIDs vào chương trình giám sát dư lượng trong thực phẩm [6]. Vì vậy, việc phát triển phương pháp phân tích thuốc nhóm NSAIDs trong thịt giúp phát hiện chính xác sự có mặt của nhóm thuốc này, từ đó góp phần đánh giá chất lượng thịt và đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm cho người tiêu dùng.

Trên thế giới đã có nhiều phương pháp xác định hàm lượng các chất nhóm NSAIDs trong trong thịt lợn, thịt bò, sữa và thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng nhiều kỹ thuật như sắc ký khí khối phổ GC-MS [7], quang phổ tử ngoại khả kiến [8], quang phổ huỳnh quang [9], quang phổ hồng ngoại [10] và sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS [11-13]. Tuy vậy, trên thế giới hiện nay các nghiên cứu chủ yếu sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS do có thể phân tích đồng thời được nhiều chất với độ nhạy, độ đặc hiệu cao và thời gian phân tích ngắn. Hiện nay, Việt Nam chưa có quy định về mức giới hạn tối đa của các chất nhóm NSAIDs trong thực phẩm cũng như chưa có phương pháp chính thức nhằm xác định đồng thời các chất này. Do đó, việc xây dựng phương pháp xác định dư lượng nhóm NSAIDs trong thực phẩm là rất cần thiết và nghiên cứu này thực hiện nhằm xây dựng phương pháp phân tích để xác định một số chất nhóm NSAIDs trong thịt sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS. Kết quả nghiên cứu được sử dụng để xác định hàm lượng một số chất nhóm NSAIDs trong một số thịt phổ biến trên thị trường Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và mẫu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là bốn chất thuộc nhóm NSAIDs thường được sử dụng cho động vật lấy thịt bao gồm: diclofenac (DIC), flunixin (FLU), meloxicam (MEL) và tolfenamic acid (TOL). Tổng cộng 15 mẫu thịt được thu thập ngẫu nhiên tại các chợ, siêu thị ở Hà Nội. Số lượng và phân loại các mẫu thịt thu thập được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Số lượng và phân loại các mẫu thịt đã thu thập

Địa điểm thu thập	Số lượng mẫu		
	Thịt gà (G)	Thịt lợn (L)	Thịt bò (B)
Chợ (C)	5	4	1
Siêu thị (S)	1	1	3

2.2. Hóa chất và chất chuẩn

Các chất chuẩn nhóm NSAIDs: diclofenac (99,34%, lot G1343992), flunixin (97,22%, lot G1089114), meloxicam (99,22%, lot G1436236) và tolfenamic acid (99,76%, lot G163395) của hãng Dr.Ehrenstorfer. Các dung môi, hóa chất của hãng Merck gồm:

acetonitril, methanol, acid acetic, amoni acetat, β -glucuronidase, natri chlorid, magie sulfat, natri acetat; bột hấp phụ C18 từ hãng Agilent và nước deion.

2.3. Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ ba tứ cực Triple Quad 5500 của AB Sciex, cột sắc ký Symmetry C18 (150 mm x 4,6 mm x 5,0 μ m). Một số thiết bị phụ trợ khác bao gồm cân phân tích (có độ chính xác 0,1 mg) XS105 (Mettler Toledo); máy ly tâm lạnh Mikro 200R (Hettich); máy lắc ngang HS260 (IKA) và các thiết bị, dụng cụ thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Điều kiện sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS để phân tích nhóm NSAIDs

Qua tham khảo tài liệu [11-13], điều kiện phân tích các chất nhóm NSAIDs được lựa chọn như sau: sử dụng nguồn ion hóa phun điện tử ở chế độ ion dương (ESI+), chế độ quét lựa chọn đa phản ứng (MRM), 1 ion mẹ và 2 ion con (1 ion con được sử dụng để định lượng và 1 ion con được sử dụng để định tính), pha động theo chế độ gradient được đặt ở tốc độ dòng 0,5 mL/phút, thể tích tiêm 10 μ L, nhiệt độ cột ở nhiệt độ phòng và tiến hành khảo sát cột sắc ký, thành phần pha động.

2.4.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [11], quy trình xử lý mẫu được lựa chọn như sau: Cân chính xác 2,0 g mẫu thịt đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 4 mL đệm acetat pH 4,5 và 50 μ L β -glucuronidase có hoạt độ 50 U. Mẫu được vortex kỹ trong 1 phút và ủ ở 37°C trong 60 phút. Tiếp theo, thêm 10 mL acetonitril và lắc đều, siêu âm ở 40°C trong 30 phút. Sau đó, thêm 2,0 g MgSO₄ và 0,5 g NaCl, vortex trong 1 phút và ly tâm 5 phút ở 6000 vòng/phút. Lọc dịch chiết phía trên được chuyển vào ống ly tâm 15 mL có chứa 0,5 g chất hấp thụ C18 và 0,5 g NaCl, vortex trong 1 phút. Mẫu được ly tâm trong 3 phút ở tốc độ 6000 vòng/phút. Chuyển dịch phía trên sang một ống ly tâm 15 mL khác và làm bay hơi đến khô bằng bộ thổi khô nitơ, hoà cán trong 1 mL methanol. Lọc dịch qua màng 0,22 μ m rồi chuyển vào lọ đựng mẫu và phân tích trên LC-MS/MS. Sử dụng mẫu thịt đã được xác định là có hàm lượng meloxicam để thực hiện các khảo sát, cụ thể như sau:

- + Khảo sát sử dụng enzyme: có sử dụng và không sử dụng.
- + Khảo sát pH của dung dịch đệm: 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0.
- + Khảo sát nhiệt độ thủy phân mẫu: nhiệt độ phòng (21°C); 37°C; 50°C; 60°C và 80°C
- + Khảo sát muối chiết: 2,5 g MgSO₄; 2,5 g NaCl; 2,0 g MgSO₄ + 0,5 g NaCl.
- + Khảo sát muối làm sạch: hỗn hợp C18 + NaCl; C18 + CH₃COONa; CH₃COONa + NaCl; C18 + CH₃COONa + NaCl.

2.4.3. Thẩm định phương pháp

Các thông số được thẩm định để đánh giá phương pháp bao gồm: độ đặc hiệu (số điểm IP, tỉ lệ ion, phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn), giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng (dựa vào tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu S/N), đường chuẩn (xây dựng đường chuẩn từ 5,0 – 100 μ g/kg), độ lặp lại và độ thu hồi (thực hiện phân tích lặp lại 6 lần ở 3 mức nồng độ 5,0; 20; 100 μ g/kg). Các kết quả được đánh giá, so sánh với các quy định theo AOAC 2016 [14].

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Nồng độ các chất nhóm NSAIDs được tính toán bằng phần mềm Analyst 1.7 trên thiết bị sắc ký lỏng khối phổ.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tối ưu hóa phương pháp phân tích 4 chất nhóm NSAIDs bằng LC-MS/MS

3.1.1. Khảo sát điều kiện về khối phổ

Để khảo sát điều kiện MS/MS, thiết bị khối phổ ba tứ cực với nguồn ion hóa phun điện tử, chế độ ion dương được sử dụng để khảo sát điều kiện ion mẹ, ion con và năng lượng va chạm tối ưu. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 2 (số điểm IP được tính theo tiêu chuẩn của EC 2021/808 [15]).

Bảng 2. Điều kiện MS/MS sử dụng trong phân tích 4 chất nhóm NSAIDs

Chất phân tích	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)	CE (eV)	Ghi chú	Số điểm IP
DIC	296	215	31	Định lượng	5
		250	19	Định tính (84,8%*)	
FLU	297	264	47	Định lượng	5
		210	45	Định tính (20,2%*)	
MEL	352	115	23	Định lượng	5
		141	53	Định tính (15,8%*)	
TOL	262	244	27	Định lượng	5
		209	37	Định tính (51,2%*)	

* Tỷ lệ ion định tính so với ion định lượng

Dựa vào kết quả khảo sát, mỗi chất phân tích lựa chọn một ion định lượng và một ion định tính, số điểm IP = 5 đạt để phân tích trên khối phổ (theo AOAC [14]). Như vậy, điều kiện MS/MS đã đạt được độ đặc hiệu cần thiết để có thể sử dụng khảo sát quy trình xử lý mẫu và phân tích đồng thời 4 chất nhóm NSAIDs.

3.1.2. Khảo sát điều kiện về sắc ký

3.1.2.1. Khảo sát dung môi pha động

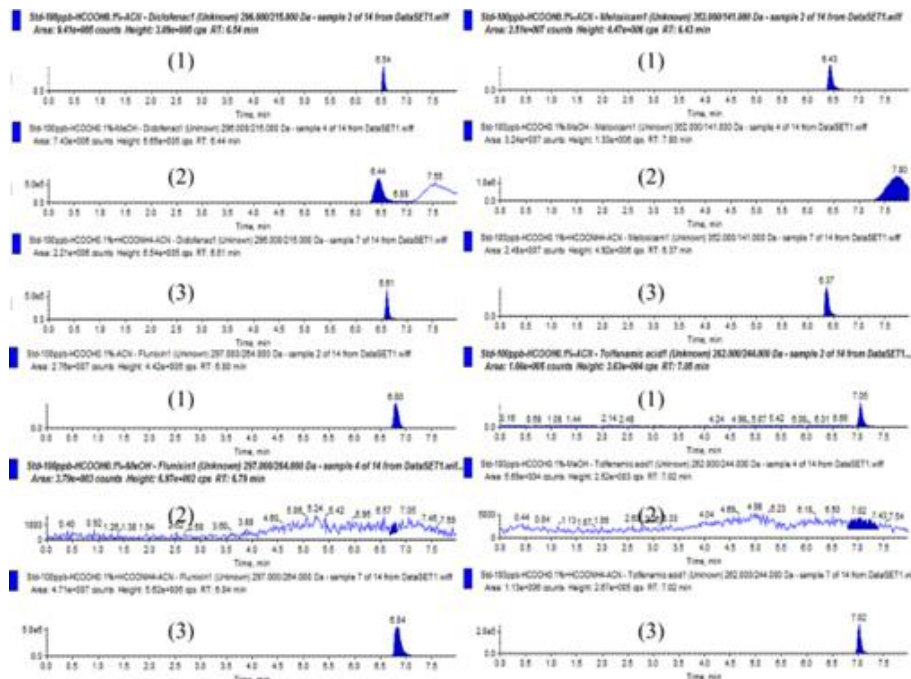
Sau khi lựa chọn được ion phân tử, ion con và các điều kiện tối ưu của khối phổ, tiến hành phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp của 4 chất DIC, FLU, MEL, TOL có nồng độ 100 ng/mL.

Một số điều kiện sắc ký được cố định như sau: sử dụng cột Symmetry C18 (150 mm x 4,6 mm x 5,0 μ m), tốc độ dòng 0,5 mL/phút, thể tích tiêm 10 μ L với chương trình gradient dung môi pha động như Bảng 3.

Bảng 3: Chương trình gradient dung môi pha động

Thời gian (phút)	% dung môi A	% dung môi B
0	90	10
1,5	90	10
3,5	5	95
5,0	5	95
6,5	90	10
8,0	90	10

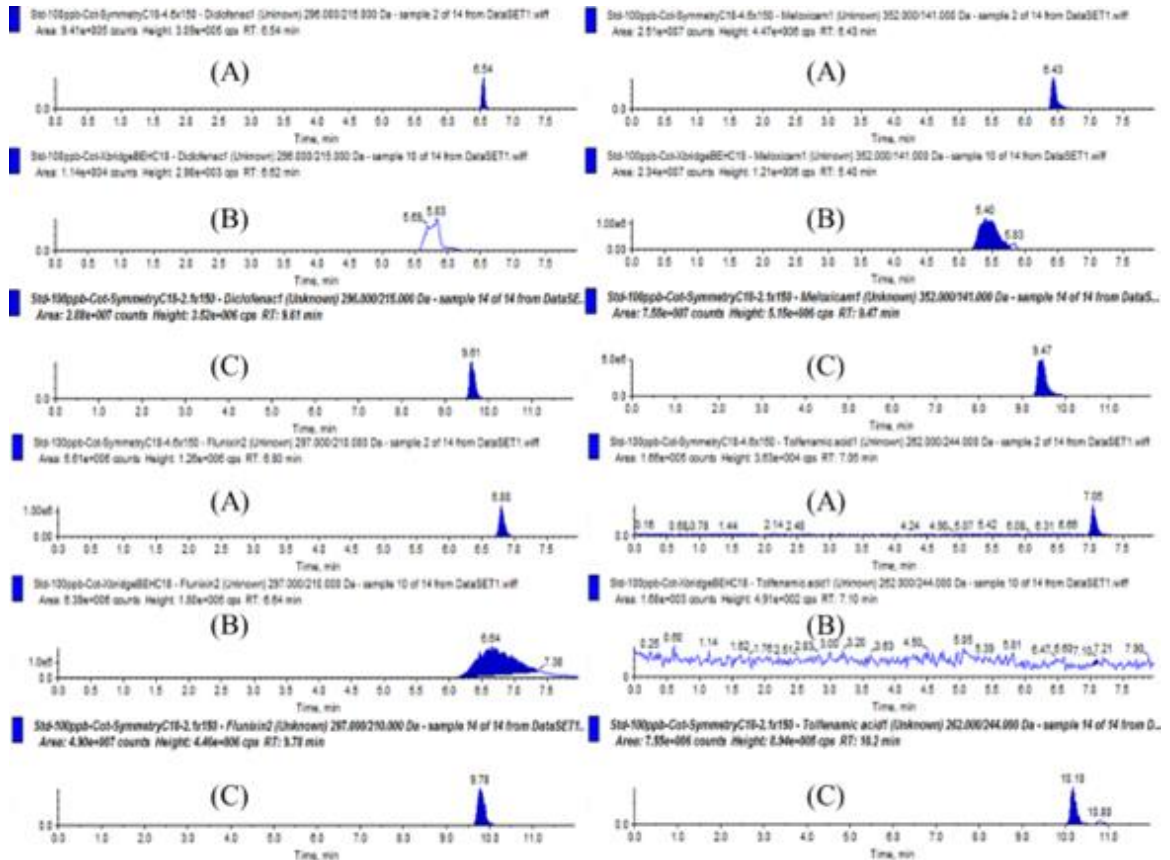
Các dung môi pha động được khảo sát gồm (1) acid formic 0,1% trong nước và acetonitril, (2) acid formic 0,1% trong nước và methanol, (3) acid formic 0,1%, amoni format 10 mM trong nước và acetonitril được đưa ra để khảo sát. Kết quả được thể hiện trong Hình 1.

**Hình 1.** Sắc ký đồ của 4 chất DIC, FLU, MEL, TOL trong các dung môi pha động

Pic của 4 chất DIC, FLU, MEL, TOL thu được khi sử dụng dung môi (1) và (3) gần tương tự nhau, cân đối, nhọn và không có hiện tượng dính pic, trong khi đó dung môi (2) cho pic sắc ký tù, thời gian lưu của chất phân tích dài hơn so với dung môi (1) và (3). Do đó, dung môi acid formic 0,1% trong nước và acetonitril được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2.2. Khảo sát cột sắc ký

Sau khi lựa chọn được dung môi pha động là acid formic 0,1% trong nước và acetonitril, sử dụng dung dịch chuẩn hỗn hợp của 4 chất DIC, FLU, MEL, TOL có nồng độ 100 ng/mL để tiến hành khảo sát cột sắc ký bao gồm (A) Symmetry C18 (150 mm x 4,6 mm x 5,0 μ m), (B) Xbridge BEH C18 (100 mm x 4,6 mm x 2,5 μ m) và (C) Symmetry C18 (150 mm x 2,1 mm x 3,5 μ m). Kết quả được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ của 4 chất DIC, FLU, MEL, TOL trong các cột sắc ký khác nhau

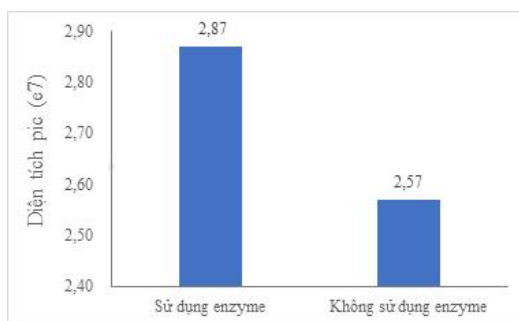
Từ kết quả ở Hình 2 cho thấy, tín hiệu sắc ký thu được khi phân tích bằng cột sắc ký (B) không cân xứng và bị tù, cột sắc ký (C) có hiện tượng chệch pic, trong khi đó cột sắc ký (A) cho pic cân đối, nhọn và không dính pic. Do đó, lựa chọn cột sắc ký Symmetry C18 (150 mm x 4,6 mm x 5,0 μm) cho các nghiên cứu tiếp theo

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Trên cơ sở quy trình xử lý mẫu nêu ở mục 2.4.2, tiến hành phân tích mẫu thực dương tính với chất phân tích MEL và so sánh tín hiệu MEL ở các điều kiện khác nhau.

3.2.1. Khảo sát enzyme

Phân tích mẫu thực có chứa MEL khi sử dụng và không sử dụng enzyme để thủy phân mẫu. Khi sử dụng enzyme để thủy phân mẫu cho tín hiệu cao hơn 12% so với khi không sử dụng enzyme. Điều này có thể được giải thích là do các chất NSAIDs, đặc biệt là meloxicam có một phần tồn tại trong cơ thể động vật ở dạng liên hợp glucuronid. Sử dụng enzyme β-glucuronidase nhằm phân tách các dạng liên hợp này nhằm giải phóng NSAIDs về dạng không liên hợp. Trong nghiên cứu của Jedziniak, P. và các cộng sự [16], hàm lượng flunixin trong các mẫu sữa khi phân tích bằng thủy phân với enzyme β-glucuronidase cũng cao hơn khi thủy phân không sử dụng enzyme (khoảng 54%). Do đó, sử dụng enzyme để thủy phân mẫu được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo. Kết quả thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Kết quả khảo sát sử dụng enzyme để thủy phân mẫu

3.2.2. Khảo sát pH của dung dịch đệm

Trên cơ sở quy trình xử lý mẫu nêu ở mục 2.4.2, pH của dung dịch đệm được khảo sát với các giá trị lần lượt là 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0. Kết quả ở Hình 4D cho thấy, pH của dung dịch đệm là 4,5 cho tín hiệu cao nhất. Hoạt độ của enzyme β -glucuronidase bị ảnh hưởng rất lớn bởi pH của dung dịch đệm, vì ở điều kiện pH thích hợp enzyme mới có khả năng hoạt động tốt nhất, nếu không enzyme sẽ bị bất hoạt. Theo Amin, H. A. [17], enzyme β -glucuronidase hoạt động tốt nhất ở pH từ 4,0 - 5,5, phù hợp với kết quả của nghiên cứu. Vì vậy, dung dịch đệm có pH là 4,5 được sử dụng cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.3. Khảo sát nhiệt độ thủy phân

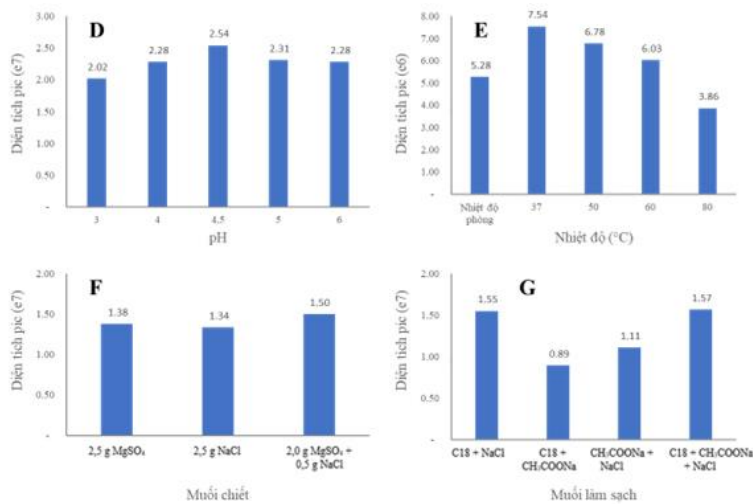
Tương tự như pH, nhiệt độ là một yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến hoạt độ của enzyme. Nhiệt độ thủy phân mẫu được khảo sát lần lượt là nhiệt độ phòng; 37°C; 50°C; 60°C và 80°C. Từ kết quả ở Hình 4E, ở nhiệt độ 37°C cho tín hiệu chất phân tích lớn nhất. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Amin, H. A. [17], enzyme β -glucuronidase hoạt động tốt nhất ở khoảng nhiệt độ 35-40°C. Vì vậy, thủy phân mẫu ở nhiệt độ 37°C được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.4. Khảo sát muối chiết

Nhằm mục đích chiết xuất được lượng meloxicam lớn nhất từ dung dịch mẫu, việc sử dụng muối chiết giúp đảm bảo chất phân tích được chuyển tối đa sang pha hữu cơ. Khảo sát muối chiết lần lượt là 2,5 g $MgSO_4$; 2,5 g NaCl; 2,0 g $MgSO_4$ + 0,5 g NaCl và không thay đổi các yếu tố khác. Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 4F cho thấy, sử dụng hỗn hợp muối $MgSO_4$ và NaCl cho kết quả tốt hơn so với chỉ dùng riêng rẽ từng muối. Điều này có thể được giải thích là do $MgSO_4$ có tác dụng làm cho lớp acetonitril tách ra khỏi pha nước, NaCl tan tốt trong nước nên làm tăng khả năng chuyển pha của chất phân tích từ pha nước sang pha hữu cơ. Do đó, hỗn hợp $MgSO_4$ và NaCl được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

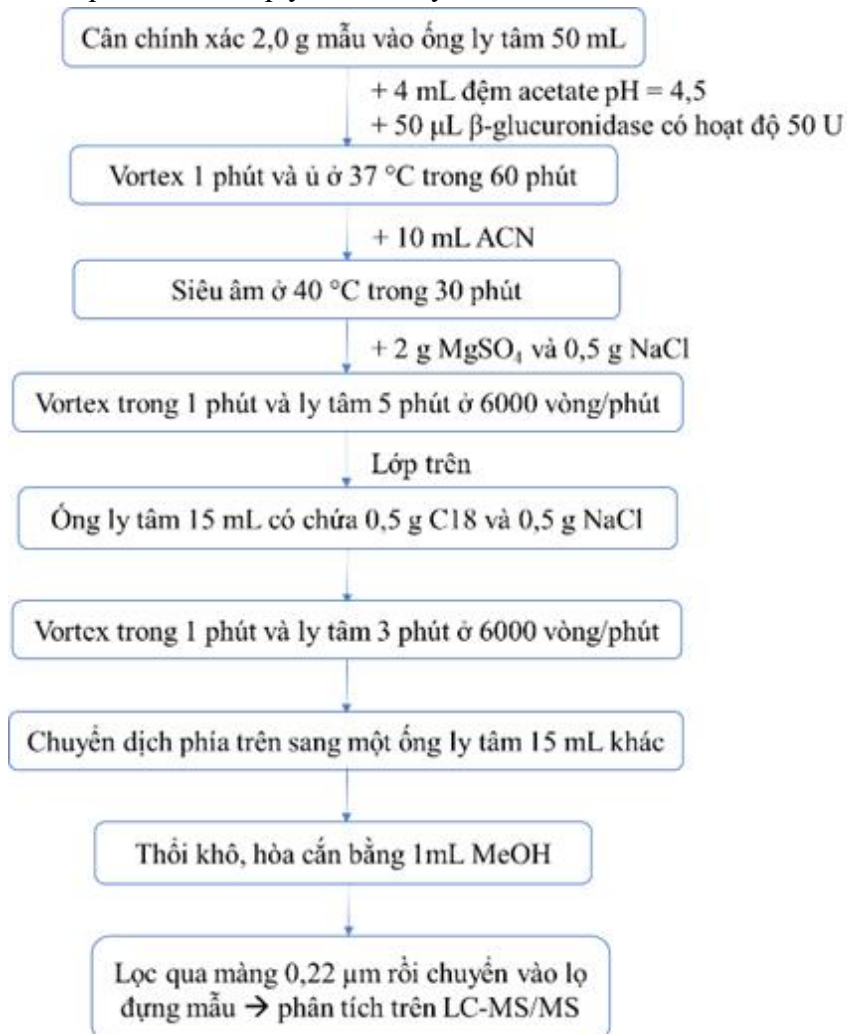
3.2.5. Khảo sát muối làm sạch

Trên cơ sở quy trình xử lý mẫu nêu ở mục 2.4.2, muối làm sạch được khảo sát lần lượt là C18 + NaCl; C18 + CH_3COONa ; CH_3COONa + NaCl; C18 + CH_3COONa + NaCl. Sử dụng hỗn hợp muối C18 + NaCl cho tín hiệu tương đương so với hỗn hợp C18 + CH_3COONa + NaCl, cao hơn so với C18 + CH_3COONa và CH_3COONa + NaCl, do đó hỗn hợp muối C18 + NaCl được lựa chọn trong nghiên cứu này. Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 4G.



Hình 4. Kết quả khảo sát pH của dung dịch đệm (D), nhiệt độ thủy phân mẫu (E), muối chiết (F) và muối làm sạch (G)

Từ các kết quả khảo sát, quy trình xử lý mẫu tối ưu được lựa chọn như sau (Hình 5).



Hình 5. Quy trình xử lý mẫu NSAIDs tối ưu

3.3. Thẩm định phương pháp

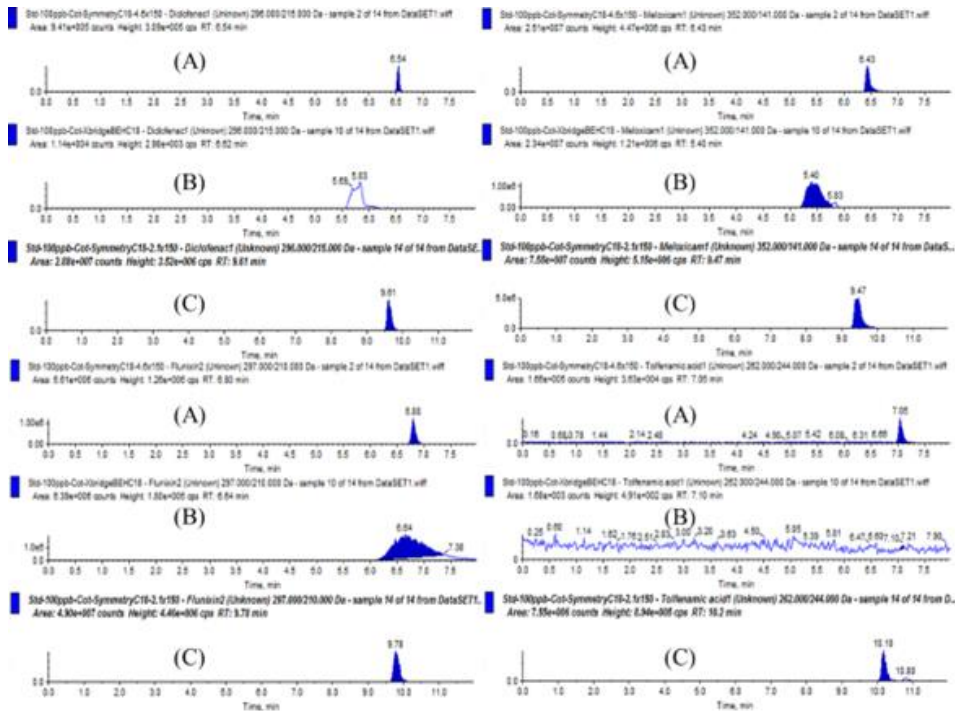
3.3.1. Độ đặc hiệu

Đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp qua các tiêu chí:

+ *Tính số điểm IP*: 4 chất DIC, FLU, MEL, TOL đều có 1 ion mẹ và 2 ion con, số điểm IP = 5 (theo mục 3.1), thỏa mãn yêu cầu phân tích trên khối phổ (EC 2021/808 [15]).

+ Phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn:

Kết quả sắc đồ đánh giá độ đặc hiệu ở Hình 6 cho thấy, mẫu trắng (mẫu thịt được tìm thấy không có các chất phân tích) không xuất hiện tín hiệu của chất phân tích, mẫu thêm chuẩn (mẫu trắng được bổ sung thêm 4 chất DIC, FLU, MEL, TOL đã biết trước nồng độ) và mẫu chuẩn có tín hiệu tại cùng thời gian lưu chênh lệch không quá 2%. Như vậy, phương pháp đáp ứng yêu cầu về thông số thẩm định tính đặc hiệu để phân tích 4 chất DIC, FLU, MEL, TOL (theo AOAC [14]).



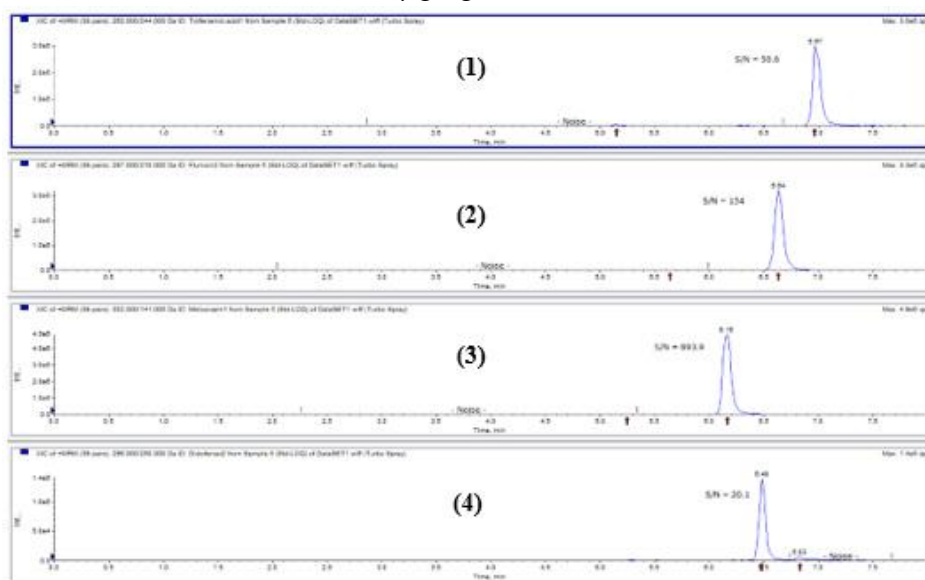
Hình 6. Sắc ký đồ của DIC, MEL, FLU và TOL trong (1) mẫu trắng; (2) mẫu chuẩn; (3) mẫu trắng thêm chuẩn

3.3.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn ở các mức nồng độ thấp dần và còn có thể xuất hiện tín hiệu chất phân tích, lặp lại 6 lần. Tiến hành xác định tỷ lệ S/N dựa trên phần mềm của thiết bị. Giới hạn phát hiện là nồng độ mà tại đó có S/N = 3. Giới hạn định lượng là giới hạn mà tại đó S/N = 10.

Kết quả khảo sát cho thấy, ở mức nồng độ thêm chuẩn là 5 µg/kg, tỷ lệ S/N của cả 4 chất phân tích đều lớn hơn 10 (Hình 7). Theo quy định mức giới hạn tối đa (MRLs) đối với thịt của liên minh châu Âu (EU) [5], mức quy định thấp nhất của 4 chất DIC, MEL, FLU, TOL là DIC trong cơ và gan (5 µg/kg). Dựa vào kết quả tỷ lệ S/N và quy định mức giới hạn

tối đa của liên minh châu Âu, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp đối với nền mẫu thịt lợn lượt là 1,5 và 5 µg/kg.



Hình 7. Sắc đồ mẫu thêm chuẩn NSAIDs tại 5 µg/kg. (1) TOL, (2) FLU, (3) MEL, (4) DIC

3.3.3. Đường chuẩn

Trên cơ sở điều kiện tối ưu lựa chọn, đường chuẩn xác định 4 chất phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS đã được xây dựng ở các mức nồng độ 5; 10; 50; 50; 100 µg/kg. Đường chuẩn được xây dựng dựa trên sự phụ thuộc giữa diện tích pic với nồng độ tương ứng và sử dụng phần mềm Excel. Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát, tín hiệu của cả 4 chất đều có sự tương quan tuyến tính với nồng độ, hệ số tương quan tuyến tính $r^2 > 0,995$ và có độ chệch < 15% với tất cả các giá trị.

3.3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi

Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn vào mẫu thịt đã được xác định không chứa chất phân tích, tiến hành phân tích theo quy trình đã xây dựng. Các mẫu được thêm chuẩn ở các mức nồng độ 5; 20; 50 µg/kg. Các kết quả phân tích được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi của 4 chất phân tích trên nền mẫu thịt

Chất phân tích	Độ thu hồi (R %)	Độ lặp lại (RSD %)
DIC	82,0 – 108	5,92 – 9,30
MEL	94,8 – 110	2,46 – 3,03
FLU	81,1 – 111	1,73 – 10,7
TOL	82,3 – 108	3,24 – 9,38

Từ kết quả Bảng 4 cho thấy, giá trị độ thu hồi của cả 4 chất phân tích nằm trong khoảng từ 81,1 – 111%, độ lệch chuẩn tương đối trong khoảng từ 1,73 – 10,7%. Các kết quả này cho thấy phương pháp có độ chính xác đáp ứng theo yêu cầu của AOAC [15] (độ thu hồi trong khoảng 60 – 115% và độ lệch chuẩn tương đối $\leq 21\%$ tại nồng độ 5 µg/kg).

3.3.5. Ứng dụng phân tích NSAIDs trong thịt

Phương pháp đã được ứng dụng để xác định hàm lượng 4 chất DIC, MEL, FLU, TOL trong 15 mẫu thịt được thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả phân tích hàm lượng 4 chất DIC, MEL, FLU, TOL trong 15 mẫu thịt

Ký hiệu mẫu	Nền mẫu	Thể tích dung môi chiết (mL)	Thể tích cuối (mL)	Khối lượng cân (g)	Hàm lượng ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
CG1	Thịt gà	10	1	2,0452	MEL < LOQ; TOL = 8,51
SB1	Thịt bò	10	1	1,9850	MEL < LOQ
CG2	Thịt gà	10	1	1,9783	TOL < LOQ
SG1	Thịt gà	10	1	2,0672	ND
CG3	Thịt gà	10	1	2,1322	TOL = 7,83
CL1	Thịt lợn	10	1	2,0056	ND
CG4	Thịt gà	10	1	2,0609	TOL = 11,6
CL2	Thịt lợn	10	1	2,1026	TOL = 7,09
SL1	Thịt lợn	10	1	2,0712	TOL = 5,21
CG5	Thịt gà	10	1	2,1033	TOL = 9,18
CL3	Thịt lợn	10	1	2,0745	ND
CB1	Thịt bò	10	1	2,0985	ND
CL4	Thịt lợn	10	1	2,0546	TOL = 15,9
SB2	Thịt bò	10	1	2,0872	ND
SB3	Thịt bò	10	1	1,9783	ND

ND: Không phát hiện (< LOD)

Từ kết quả thu được ở Bảng 5, trong 15 mẫu thịt đã phân tích không có mẫu nào phát hiện DIC và FLU, có 1 mẫu thịt gà mua ở chợ (CG1) và 1 mẫu thịt bò (SB1) ở siêu thị có phát hiện MEL nhưng chưa đạt mức định lượng (hàm lượng < 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), có 1 mẫu thịt gà mua ở chợ (CG2) có phát hiện TOL nhưng chưa đạt mức định lượng (hàm lượng < 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), trong khi đó có tổng cộng 7 mẫu phát hiện TOL với hàm lượng lớn hơn giới hạn định lượng (4 mẫu thịt gà có hàm lượng trong khoảng 7,83 – 11,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và 3 mẫu thịt lợn có hàm lượng trong khoảng 5,21 – 15,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$), không có mẫu thịt bò nào phát hiện TOL. Trong các mẫu phát hiện TOL, có 5 mẫu thịt gà và 2/3 mẫu thịt lợn là được mua ở chợ. Thuốc TOL thường được sử dụng để chống viêm, hạ sốt, giảm đau nhanh cho động vật như trâu, bò, lợn, gà... và trước khi giết mổ thì thuốc này có thể chưa bị đào thải hết, cho nên TOL còn tích lũy trong thịt của chúng. Theo quy định của EU số 37/2010 [15], giới hạn thấp nhất của TOL trong thịt lợn là 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, như vậy các mẫu thịt lợn vẫn nằm trong giới hạn cho phép đối với TOL. Tuy nhiên, chưa có quy định của TOL trong thịt gà. Như vậy, tất cả 15 mẫu thịt phân tích đều đạt yêu cầu theo quy định của Liên minh châu Âu.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS để xác định hàm lượng 4 chất phổ biến nhóm NSAIDs trong thịt. Các điều kiện phân tích gồm: pha động theo chế độ gradient gồm acetonitril và acid formic 0,1% pha trong nước, cột sắc ký Symmetry C18, kết hợp xử lý mẫu bằng enzyme β -glucuronidase... Phương pháp đã được thẩm định và kết quả đáp ứng theo yêu cầu của AOAC [14] (LOQ là 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; giá trị độ thu hồi trong khoảng 81,1 – 111%, độ lệch chuẩn tương đối từ 1,73 – 10,7%). Trong 15 mẫu thịt đã phân tích, phát hiện 7 mẫu chứa dư lượng NSAIDs vượt qua giới hạn định lượng của phương pháp. Nghiên cứu sẽ tiếp tục được mở rộng để phân tích hàm lượng các chất nhóm NSAIDs trong các sản phẩm thịt khác và trên nền mẫu khác như sữa, trứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Z. Varga, M. Kriška, V. Kristová, and M. Petrová, “Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drug use in hospitalized patients and perception of their risk,” *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 6(3), pp. 141–144, 2023.
- [2]. N. H. Parikh, J. Solanki, P. K. Parikh, et al., “Analytical methods for quantification of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical and biological samples: An overview of developments in the last decade,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 17(1), pp. 105446, 2024.
- [3]. J. Avouac, L. Gossec, and M. Dougados, “Efficacy and safety of opioids for osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials,” *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 15(8), pp. 957–965, 2007.
- [4]. D. H. Solomon, J. A. Rassen, R. J. Glynn, J. Lee, R. Levin and S. Schneeweiss, “The Comparative Safety of Analgesics in Older Adults with Arthritis,” *Archives of Internal Medicine*, vol. 170(22), pp. 1968, 2010.
- [5]. European Parliament and the Council commission regulation No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, *Official Journal of the European Union*, 15, 1–80, 2009.
- [6]. T. Hu, T. Peng, X. J. Li, et al., “Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1219, pp. 104–13, 2012.
- [7]. B. M. Haj, A. M. Ainri, M. H. Hassan, R. K. B. Khadem, M. S. Marzouq, “The GC/MS analysis of some commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical dosage forms and in urine,” *Forensic Science International*, vol. 105(3), pp. 141–153, 1999.
- [8]. W. E. Smalley, W. A. Ray, J. R. Daugherty and M. R. Griffin, “Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of hospitalizations for peptic ulcer disease in elderly persons,” *American Journal of Epidemiology*, vol. 141(6), pp. 539–45, 1995.

- [9]. L. A. Al-Khateeb, M. A. Al-zahrani, M. El-Maghrabey, F. A. Dahas, R. El-Shaheny and M. A. El Hamd, “Extra-thermodynamic study of the retention of anti-inflammatory 2-arylpropionic acid derivatives on a heat-resistive stationary phase: Application of HTLC approach for pharmaceutical and biological analysis,” *Microchemical Journal*, vol. 169, pp. 106597, 2021.
- [10]. M. Alexovič, Y. Dotsikas, P. Bober and J. Sabo, “Achievements in robotic automation of solvent extraction and related approaches for bioanalysis of pharmaceuticals,” *Journal of Chromatography B*, vol. 1092, pp. 402–421, 2018.
- [11]. M. Pietruk, P. Jedziniak and M. Olejnik, “LC-MS/MS Determination of 21 Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Residues in Animal Milk and Muscles,” *Molecules*, vol. 26(19), pp. 5892, 2021.
- [12]. P. Jedziniak, T. Szprengier-Juszkiewicz, K. Pietruk, E. Śledzińska and J. Żmudzki, “Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 403(10), pp. 2955–2963, 2012.
- [13]. Q.W. Yu, X. Wang, Q. Ma, B. F. Yuan, H.B. He and Y. Q. Feng, “Automated analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and water samples by in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry based on a poly(4-vinylpyridine-co-ethylene dimethacrylate) monolith,” *Analytical Methods*, vol. 4(6), pp. 1538, 2012.
- [14]. AOAC International, “Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance,” *AOAC Official Methods of Analysis*, 2016.
- [15]. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC, 2021.
- [16]. P. Jedziniak, M. Olejnik, T. Szprengier-Juszkiewicz, et al., “Identification of flunixin glucuronide and depletion of flunixin and its marker residue in bovine milk,” *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 36(6), pp. 571–575, 2013.
- [17]. H. A. Amin, H. A. El-Menoufy, A. A. El-Mehalawy and E. E. Mostafa, “Microbial production of glycyrrhetic acid 3-O-mono- β -D-glucuronide from glycyrrhizin by *Aspergillus terreus*,” *Malaysian Journal of Microbiology*, vol. 6(2), pp. 209-216, 2010.