

I. Phạm vi áp dụng

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.279 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 2/7
---	----------------------------------	---

- Phương pháp này được sử dụng để xác định hàm lượng hormone diethylbestrol (DES), estradiol (ES) và testosterone (TES) trong nền mẫu thực phẩm
- Giới hạn phát hiện (LOD) đối với là DES, ES, TES lần lượt là 10; 0.5; 10 µg/L (µg/kg).

II. Tài liệu tham khảo

- Seton Hall University Dissertations and Theses (ETDs): QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) Extraction – Gas Chromatography for the Analysis of Drugs
- Food Analytical Methods: Determination of Hormones Residues in Milk by Gas Chromatography-Mass Spectrometry
- Determination of anabolic steroid hormones in animal muscle tissues by gas chromatography/mass spectrometry

III. Nguyên tắc

- Mẫu được chiết bằng phương pháp QuEChERS. Sau đó được tạo dẫn xuất trimethylsilyl (TMS) và phân tích trên thiết bị GC/MS.

IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

- Đeo khẩu trang, găng tay khi thực hiện phân tích.
- Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động phòng thí nghiệm.
- Sử dụng tủ hút, kính bảo hộ và găng tay khi cần thiết.
- Các dung môi hữu cơ và các chất thải phải được thu hồi vào các thùng chứa có dán nhãn và lưu giữ như các hóa chất thải độc hại.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ phân tích

1. Dụng cụ và thiết bị cơ bản

- Micropipet loại 20 µL, 200 µL.
- Pipet 5 mL
- Bình định mức 10 mL
- Ống Hatch, bếp điện chỉnh nhiệt độ, nhiệt kế

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.279 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 3/7</p>
--	--	---

- Ống ly tâm 50 mL, 15 mL

2. Thiết bị phân tích

- Agilent 6890GC / HP 5972MS hoặc tương đương.
- Cột mao quản ZB-5MS: 30m x 0.25 mm x 0.25 μ m hoặc tương đương

II. Hóa chất và chất chuẩn

1. Hóa chất

- 99% N,O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) và 1% trimethylsilyl chloride (TMS): tinh khiết phân tích
- Acetonitrile: tinh khiết phân tích
- Acid acetic: tinh khiết phân tích
- Pyridine: tinh khiết phân tích
- disodium ascorbyl campestanol phosphate (DACP): tinh khiết phân tích
- Isooctane: tinh khiết phân tích
- Nước cất khử ion
- Hỗn hợp clean-up 3:1:1 (MgSO_4 : C18 : PSA (150mg : 50mg : 50gm)), và hỗn hợp 3:1 (MgSO_4 : C18 (150 mg : 50mg)).

2. Chất chuẩn

a. Chuẩn gốc

- Diethylbestrol– Dr.Ehrentofer hoặc tương đương
- Testosterone– Dr.Ehrentofer hoặc tương đương
- Estradiol– Dr.Ehrentofer hoặc tương đương
- Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch chuẩn được lưu trữ trong tủ mát (4-8⁰C)

b. Dung dịch chuẩn

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.279 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 4/7
--	--	---

- Dung dịch chuẩn DES 2000 mg/L: Cân 20 mg của chuẩn Diethylbestrol 99.5% vào bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng MeOH:ACN (1:1).
- Dung dịch chuẩn TES 5000 mg/L: Cân 50 mg của chuẩn TES 98.5% vào bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng MeOH:ACN (1:1).
- Dung dịch chuẩn ES 1000 mg/L: Cân 10 mg của chuẩn ES 100% vào bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng MeOH:ACN (1:1).
- Dung dịch chuẩn DES 100 mg/L: Rút 500 μ L của chuẩn Diethylbestrol 2000 mg/L vào bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng MeOH:ACN (1:1).
- Dung dịch chuẩn TES 100 mg/L: Rút 200 μ L của chuẩn TES 5000 mg/L vào bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng MeOH:ACN (1:1).
- Dung dịch chuẩn ES 10 mg/L: Rút 100 μ L của chuẩn Estradiol 1000 mg/L vào bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng MeOH:ACN (1:1).
- Dung dịch chuẩn ES 1 mg/L: Rút 1.0 mL của chuẩn Estradiol 10 mg/L vào bình định mức 10 mL, định mức tới vạch bằng MeOH:ACN (1:1).
- Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch chuẩn được lưu trữ trong tủ mát (4-8°C), sử dụng trong thời gian 1 năm.
- Đường chuẩn Es như trong bảng sau:

Nồng độ ES (μ g/L)	2.5	7.5	15	30	50	75
ES 1 mg/L (μ L)	25	75	150	300	500	750
Dung môi Isooctane	Định mức tới vạch 10 mL					

Đường chuẩn TES, DES như trong bảng sau:

Nồng độ DES và TES (μ g/L)	50	150	300	600	1000	1500
DES và TES 100 (mg/L) (μ L)	5	15	30	60	100	150
Dung môi Isooctane	Định mức tới vạch 10 mL					

III. Kiểm soát QA/QC

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.279 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 5/7
---	----------------------------------	---

- Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích.
 - Mẫu Blank matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.
 - Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu blank

IV. Xử lý mẫu

1. Phương pháp tiến hành

a. Chiết QuEChERS:

- Cân 15 g mẫu vào ống ly tâm 50 ml, thêm 15ml nước cất. Lắc mạnh 1 phút. Thêm 15 ml 1%FA/ACN, lắc mạnh trong khoảng 3-5 phút. Cho 6 g hỗn hợp MgSO_4 : C18 (3:1), lắc mạnh và ly tâm 3000 rpm trong 3 phút. Rút toàn bộ dịch chiết clean-up với hỗn hợp MgSO_4 : C18 : PSA (3:1:1), (tỷ lệ 0.25 g tương ứng với 1 ml dịch chiết).

b. Tạo dẫn xuất TMS:

- Rút 5 ml lớp ACN vào ống thủy tinh, thổi khô ở 70°C. Để nguội, thêm 900 μL pyridine, 100 μL (99% BSTFA + 1% TMCS), vortex. Đun cách thủy 70°C trong vòng 45 phút. Lấy ống thủy tinh ra để nguội. Rút vào vial và phân tích trên thiết bị GC/MS.

2. Phân tích

a. Điều kiện GC

- Cột mao quản ZB-5MS: 30m x 0.25 mm x 0.25 μm hoặc tương đương
- Tốc độ dòng: 2 mL/phút.
- Nhiệt độ Inlet: 240 °C; detector: 240 °C; chế độ tiêm chia dòng: 8:1.
- Chương trình nhiệt:
 - 160 °C giữ 0 phút
 - Tăng 10°C/phút đến 220 °C
 - Tăng 10°C/phút đến 300 °C, giữ 3 phút.
- Solvent delay: 4 mins

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.279 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 6/7
---	----------------------------------	---

b. Điều kiện MS

- Kiểu phân tích: SIM
- Chế độ ion hóa: EI (electron ionization)

STT	Hợp chất	T-R (phút)	Ion định lượng	Ion định tính		
1	DES	10.83	412	413	383	
2	ES	13.44	285	232	416	
3	TES	13.60	226	270	360	304

3. Trình tự của quá trình tiêm mẫu trên thiết bị phân tích.

Dung môi trắng → Các chuẩn có nồng độ từ thấp tới cao → Dung môi trắng → Mẫu cần kiểm nghiệm → Mẫu thêm chuẩn → Chuẩn kiểm tra.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ

- Xây dựng các đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỉ lệ diện tích của chuẩn và nồng độ chuẩn.
- Hàm lượng chất phân tích trong mẫu được tính toán theo công thức:

$$C = (C_0 \times f)$$

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/kg
- C₀: nồng độ chất phân tích xác định trên máy, µg/L
- f: hệ số pha loãng

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với R² ≥ 0.99
- Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.
- Độ lệch thời gian lưu không quá 0.5 % cho GC
- Độ lệch của dung dịch chuẩn kiểm tra không quá 15 %
- Tỷ số ion: Cường độ tương đối của ion định tính so với ion định lượng phải nằm trong khoảng cho phép:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.279 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 7/7
---	--	---

Cường độ tương đối (so với ion định lượng)	Sai số cho phép của GC-EI-MS
> 50 %	± 10 %
20 – 50 %	± 15 %
10 – 20 %	± 20 %
< 10 %	± 50 %

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu BM.15.04a, BM.15.06