

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 12473 : 2018

Xuất bản lần 1

**THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT – XÁC ĐỊNH
HÀM LƯỢNG HOẠT CHẤT GLYPHOSATE BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

Pesticides – Determination of glyphosate content by

high performance liquid chromatography

HÀ NỘI – 2018

Lời nói đầu

TCVN 12473 : 2018 được xây dựng theo CIPAC MT 284

TCVN 12473 : 2018 do Cục Bảo vệ thực vật biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thuốc bảo vệ thực vật – Xác định hàm lượng hoạt chất glyphosate bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Pesticides - Determination of glyphosate content by high performance liquid chromatography

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector tử ngoại (UV) để xác định hàm lượng hoạt chất glyphosate trong sản phẩm thuốc bảo vệ thực vật có chứa glyphosate.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây là cần thiết để áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851 (ISO 3696), Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử

TCVN 12017:2017 Thuốc bảo vệ thực vật – Lấy mẫu

3 Nguyên tắc

Hàm lượng glyphosate được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sử dụng cột trao đổi ion với detector tử ngoại (UV) ở bước sóng 210 nm và dùng phương pháp ngoại chuẩn. Kết quả được tính dựa trên sự so sánh giữa số đo diện tích pic mẫu thử và số đo diện tích pic chuẩn.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, nước dùng trong quá trình phân tích đạt loại 3 của TCVN 4851 (ISO 3696) hoặc có độ tinh khiết tương đương.

4.1 Chất chuẩn glyphosate ($C_3H_8NO_5P$), đã biết hàm lượng

4.2 Acetonitrile (C_2H_3N), dùng cho sắc ký lỏng

4.3 Kali dihydro phosphate (KH_2PO_4), dùng cho sắc ký lỏng

4.4 Axit phosphoric (H_3PO_4), 85%, dùng cho sắc ký lỏng

4.5 Dung môi pha động

Cân 1,37 g KH_2PO_4 (4.3) vào cốc thủy tinh 1000 ml (5.1) thêm 800 ml nước cất 2 lần khử ion và điều chỉnh pH tới 2,2 bằng axit phosphoric (4.4), thêm 200 ml acetonitrile (4.2) điều chỉnh pH về 2,2 bằng axit phosphoric (4.4), siêu âm đuổi khí bằng máy siêu âm (5.6) trong 15 min

4.6 Dung dịch chuẩn làm việc

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn glyphosate (4.1), chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức 10 ml (5.2), dùng pipet thêm chính xác 0,1 ml axit phosphoric (4.4), thêm 7 ml nước cất lắc siêu âm cho tan hết, thêm 2 ml Acetonitrile (4.2), siêu âm trong 15 min, để nguội đến nhiệt độ phòng và định mức đến vạch bằng nước.

CHÚ THÍCH: - Chất chuẩn bảo quản trong tủ lạnh phải được đưa về nhiệt độ phòng trước khi cân.

- Nếu sử dụng cân có cấp chính xác 0.0001 g thì lượng mẫu và chuẩn tăng lên 10 lần

5 Dụng cụ, thiết bị

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm cụ thể như sau:

5.1 Cốc thủy tinh, dung tích 1000 ml.

5.2 Bình định mức, dung tích 10 ml.

5.3 Pipet, dung tích 1 ml ; 5 ml; 10 ml.

5.4 Xyranh bơm mẫu, dung tích 50 μl , chia vạch đến 1 μl hoặc bơm mẫu tự động

5.5 Màng lọc PTFE, có kích thước lỗ 0,45 μm .

5.6 Máy siêu âm.

5.7 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,00001 g.

5.8 Máy đo pH

5.9 Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao, được trang bị như sau:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector tử ngoại (UV)

- Hệ thống bơm cao áp
- Máy tích phân hoặc máy vi tính
- Cột trao đổi anion Cronusil –S 80 Sax, 250 mm, đường kính 4,6 mm, cỡ hạt pha tĩnh 5 μ m hoặc loại tương đương
- Bộ bơm mẫu tự động hoặc bơm mẫu bằng tay.

6 Cách tiến hành

6.1 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

6.1.1 Lấy mẫu

Lấy mẫu theo tiêu chuẩn TCVN 12017:2017.

6.1.2 Chuẩn bị mẫu

Mẫu cần được làm đồng nhất trước khi cân: đối với mẫu dạng lỏng phải lắc đều, nếu bị đông đặc do nhiệt độ thấp cần được làm tan chảy ở nhiệt độ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; đối với mẫu dạng bột, hạt phải được trộn đều.

6.1.3 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

6.1.3.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử (đối với thành phẩm dạng lỏng)

Dùng cân phân tích (5.7) cân mẫu thử chứa khoảng 0,01 g hoạt chất glyphosate, chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức 10 ml (5.2), hòa tan hết và định mức đến vạch bằng dung môi pha động (4.5). Siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng, lọc qua màng lọc 0,45 μ m (5.5) trước khi bơm vào máy.

6.1.3.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử (đối với thành phẩm dạng kỹ thuật và rắn)

Dùng cân phân tích (5.7) cân mẫu thử chứa khoảng 0,01 g hoạt chất glyphosate, chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức 10 ml (5.2), dùng pipet thêm chính xác 0,1 ml axit phosphoric (4.4), thêm 7 ml nước cất lắc siêu âm cho tan hết, thêm 2 ml Acetonitrile (4.2) định mức đến vạch bằng nước. Siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng, lọc qua màng lọc 0,45 μ m (5.5) trước khi bơm vào máy.

6.2 Xác định hàm lượng hoạt chất

6.2.1 Điều kiện phân tích

Pha động:	theo 4.5
Bước sóng:	210 nm
Tốc độ dòng:	1,5 ml/min

Thể tích bơm mẫu: 20 μ l

Nhiệt độ buồng cột: 45°C

6.2.2 Xác định

Bơm dung dịch chuẩn làm việc (4.6) cho đến khi số đo diện tích của pic chất chuẩn thay đổi không lớn hơn 1 %. Sau đó, bơm lần lượt dung dịch chuẩn làm việc (4.6) và dung dịch mẫu thử (6.1.3), lặp lại 2 lần (số đo diện tích của pic chuẩn thay đổi không lớn hơn 1 % so với giá trị ban đầu).

7 Tính kết quả

Hàm lượng hoạt chất glyphosate trong mẫu, X , biểu thị bằng phần trăm khối lượng (%) được tính theo công thức 1:

$$X = \frac{S_m \times m_c}{S_c \times m_m} \times P \quad (1)$$

Trong đó:

S_m là số đo diện tích của pic mẫu thử;

S_c là số đo diện tích của pic chuẩn;

m_c là khối lượng chất chuẩn, tính bằng gam (g);

m_m là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g);

P là độ tinh khiết của chất chuẩn, tính bằng phần trăm (%).

Chênh lệch giữa hai kết quả xác định song song không lớn hơn 0.9 %, tại mức 30%.

Hàm lượng hoạt chất glyphosate dạng muối trong mẫu, Y , biểu thị bằng phần trăm khối lượng (%) được tính theo công thức:

$$Y = X \times h$$

Trong đó: h là hệ số muối

- X là hàm lượng hoạt chất glyphosate acid trong mẫu tính được theo công thức 1;
- $h=1,3496$ với glyphosate isopropylamonium (glyphosate IPA);
- $h=1,267$ với glyphosate dimethylamonium (glyphosate dimethylamine);

- h=1,1005 với glyphosate amonium;
- h=1,1301 với glyphosate sodium;
- h=1,2251 với glyphosate potassium;
- h=1,45 với glyphosate trimesium.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

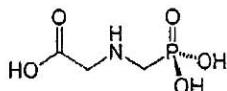
- a) mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng;
- c) phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc những điều được coi là tự chọn, và bất kỳ chi tiết nào có ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Giới thiệu hoạt chất Glyphosate

A.1. Giới thiệu hoạt chất glyphosate

A.1.1 Công thức cấu tạo:



A.1.2 Tên hoạt chất: Glyphosate

A.1.3 Tên hoá học: IUPAC: *N*-(phosphonomethyl)glycine

A.1.4 Công thức phân tử: $C_3H_5NO_5P$

A.1.5 Khối lượng phân tử: 169.07

A.1.6 Nhiệt độ nóng chảy: 184.5 °C

A.1.7 Áp suất hơi bão hoà ở 25 °C: $1,31 \times 10^{-2}$ mPa

A.1.8 Độ hòa tan ở 20 °C trong:

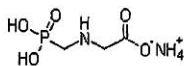
Nước (pH 1,9) 10.5g/l

Không tan trong các dung môi hữu cơ thông thường: acetone, ethanol, xylene

Các muối kim loại kiềm, muối amin của Glyphosate dễ tan trong nước.

A.1.10 Dạng bên ngoài: Tinh thể không màu.

A.1.11 Độ bền: Glyphosate và muối của nó bền ở trong không khí, bị phân huỷ ở nhiệt độ > 200°C, bền không bị thủy phân ở pH=3, 6, 9 (5-35 °C).

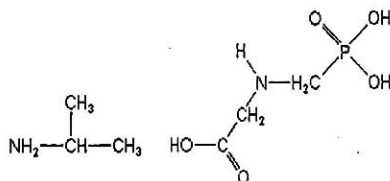
A.2. Giới thiệu hoạt chất glyphosate amonium**A.2.1 Công thức cấu tạo:****A.2.2 Tên hoạt chất: Glyphosate amonium****A.2.3 Tên hoá học (IUPAC): N-(Phosphonomethyl)glycine monoammonium salt****A.2.4 Công thức phân tử:** $C_3H_{11}N_2O_5P$ **A.2.5 Khối lượng phân tử:** 186.1**A.2.6 Nhiệt độ nóng chảy:** 184.5 °C**A.2.7 Áp suất hơi bão hoà ở 25 °C:** 9×10^{-3} mPa**A.2.8 Độ hòa tan ở 25 °C trong:**

Nước (pH=3,2)	144 g/l
Dung môi hữu cơ	ít tan
Phần lớn không tan trong dung môi hữu cơ	

A.2.9 Dạng bên ngoài: Bột màu trắng, không mùi**A.2.10 Độ bền:** Glyphosate amonium bền ở trong không khí, bị phân huỷ ở nhiệt độ > 190 °C, bền hơn 5 ngày trong môi trường pH 4,7,9 ở 50 °C. Không bắt lửa.

A.3. Giới thiệu hoạt chất glyphosate-isopropylammonium

A.3.1 Công thức cấu tạo:



A.3.2 Tên hoạt chất: Glyphosate-isopropylammonium

A.3.3 Tên hoá học (IUPAC): - *N*-(phosphonomethyl)glycine - isopropylamine (1:1) - isopropylammonium *N*-(phosphonomethyl)glycinate

A.3.4 Công thức phân tử: $C_6H_{17}N_2O_5P$

A.3.5 Khối lượng phân tử: 228.2

A.3.6 Nhiệt độ nóng chảy: 143-164°C và 189-223°C

A.3.7 Áp suất hơi bão hoà ở 25 °C: 2.1×10^{-3} mPa

A.3.8 Độ hòa tan ở 25 °C trong:

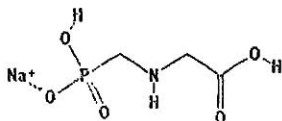
Nước	1050 g/l
Dicloromethane	<0.5
Methanol	19.86

A.3.9 Dạng bên ngoài: Bột màu trắng, không mùi.

A.3.10 Độ bền: Glyphosate-isopropylammonium trong không khí, bị phân huỷ ở nhiệt độ sôi, bền trong khoảng 5 ngày trong môi trường pH=4,5, và 9, ở 50 °C

A.4. Giới thiệu hoạt chất glyphosate sodium

A.4.1 Công thức cấu tạo:



A.4.2 Tên hoạt chất: Glyphosate sodium salt

A.4.3 Tên hoá học: IUPAC: sodium;(carboxymethylamino)methyl-hydroxyphosphinate

A.4.4 Công thức phân tử: $C_3H_7NNaO_5P$

A.4.5 Khối lượng phân tử: 191,1 g/mol

A.4.6 Nhiệt độ nóng chảy:

A.4.7 Áp suất hơi bão hoà ở 25 °C: $7,56 \times 10^{-3}$ mPa

A.4.8 Độ hòa tan ở 20 °C trong:

Nước (pH 1,9)

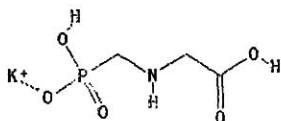
335 g/l

A.4.9 Dạng bên ngoài: Tinh thể màu trắng.

A.4.10 Độ bền: Glyphosate sodium bị phân huỷ ở nhiệt độ > 260°C.

A.5. Giới thiệu hoạt chất glyphosate potassium

A.5.1 Công thức cấu tạo:

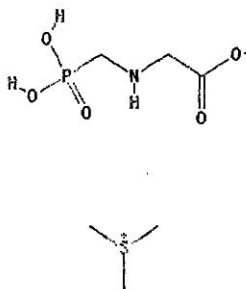


A.5.2 Tên hoạt chất: Glyphosate potassium salt

A.5.3 Tên hoá học: IUPAC: potassium;(carboxymethylamino)methyl-hydroxyphosphinate

A.5.4 Công thức phân tử: $C_3H_7KNO_5P$

A.5.5 Khối lượng phân tử: 207,2 g/mol

A.6. Giới thiệu hoạt chất glyphosate trimesium**A.6.1 Công thức cấu tạo:****A.6.2 Tên hoạt chất:** Glyphosate trimesium salt**A.6.3 Tên hoá học:** IUPAC: 2-(phosphonomethylamino)acetate; trimethylsulfonium**A.6.4 Công thức phân tử:** $C_6H_{16}NO_5PS$ **A.6.5 Khối lượng phân tử:** 245,23 g/mol**A.6.6 Nhiệt độ nóng chảy:** 184,5 °C**A.6.7 Áp suất hơi bão hoà ở 25 °C:** < 0,01 mPa**A.6.8 Độ hòa tan ở 20 °C trong:**

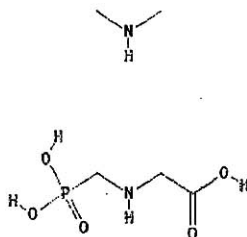
Nước (pH 1,9)

> 1000 g/l

A.6.9 Dạng bên ngoài: Chất rắn màu trắng.**A.6.10 Độ bền:** Glyphosate trimesium bị phân huỷ ở nhiệt độ > 150°C.

A.7. Giới thiệu hoạt chất glyphosate dimethylamine

A.7.1 Công thức cấu tạo:



A.7.2 Tên hoạt chất: Glyphosate dimethylamine salt

A.7.3 Tên hoá học: IUPAC: N-methylmethanamine;2-(phosphonomethylamino)acetic acid

A.7.4 Công thức phân tử: C₅H₁₅N₂O₅P

A.7.5 Khối lượng phân tử: 214,158 g/mol

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] CIPAC HANDBOOK H, MT 284 page 182
 - [2] TCCS 01:2009/BVTV thuốc bảo vệ thực vật chứa hoạt chất glyphosate- Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử
 - [3] CDS Tomlin, The Pesticide Manual, Thirteenth Edition, 2003
-