

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13761:2023

Xuất bản lần 1

**PHÂN BÓN –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AXIT ALGINIC BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

Fertilizers – Determination of alginic acid content by high performance liquid chromatography (HPLC)

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13761:2023 do Viện Quy hoạch và Thiết kế Nông nghiệp 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.

Phân bón – Xác định hàm lượng axit alginic bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Fertilizers – Determination of alginic acid content by high performance liquid chromatography (HPLC)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng để xác định hàm lượng axit alginic trong mẫu phân bón bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, sử dụng detector tử ngoại.

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987) *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

TCVN 9486:2018 *Phân bón – Lấy mẫu*

TCVN 10683:2015 (ISO 8358:1991) *Phân bón rắn – Phương pháp chuẩn bị mẫu để xác định các chỉ tiêu hóa học và vật lý*

3 Nguyên tắc

Axit alginic trong phân bón được chiết trong hỗn hợp dung dịch KH_2PO_4 0,01 M (pH = 7,0) và metanol với tỷ lệ (65:35) về thể tích. Sau đó được xác định trên thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector tử ngoại (PDA) hoặc tương đương tại bước sóng 210 nm.

4 Thuốc thử

Trừ khi có quy định khác, trong quá trình phân tích chỉ sử dụng các hóa chất, thuốc thử có cấp độ tinh khiết phân tích dùng cho HPLC và nước cất hai lần phù hợp với TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987) hoặc nước có độ tinh khiết tương đương (độ dẫn điện < 10 μS), sau đây gọi là nước.

4.1 Alginate acid ($C_6H_8O_6$)_n.

4.2. Metanol (CH_3OH).

4.3 Acetonitril (C_2H_3N).

4.4 Natri hydroxit ($NaOH$).

4.5 Kali dihydro photphat (KH_2PO_4).

4.6 Dung dịch $NaOH$ 1 mol/L.

Hòa tan 4,0 g $NaOH$ (4.4) với khoảng 50 mL nước trong bình định mức dung tích 100 mL. Thêm nước đến vạch định mức, lắc đều. Dung dịch được bảo quản trong bình nhựa.

4.7 Dung dịch đệm pH = 7

Dùng cân phân tích (5.1) cân 1,36 g KH_2PO_4 (4.5) và bình định mức có dung tích 1000 mL, thêm khoảng 900 mL nước. Điều chỉnh pH của dung dịch về 7,0 bằng dung dịch $NaOH$ 1M (4.6), thêm nước đủ đến vạch. Đặt bình vào máy siêu âm trong thời gian 5 min, sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.8 Dung dịch chiết mẫu

Lấy 80 phần thể tích dung dịch đệm pH = 7 (4.7) với 20 phần thể tích metanol tinh khiết (4.2). Lắc đều.

4.9 Dung dịch chuẩn axit alginate 1000 mg/L

Dùng cân phân tích (5.1) cân 0,01 g axit alginate (4.1) vào bình định mức dung tích 10 mL. Thêm 0,1 mL dung dịch $NaOH$ 1M (4.6) và 9 mL dung dịch chiết (4.8). Đặt bình vào máy siêu âm trong thời gian 30 min, định mức đến vạch bằng dung dịch chiết (4.8), để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.10 Dung dịch chuẩn trung gian 100 mg/L

Dùng pipet (5.5) hút chính xác 5 mL dung dịch chuẩn gốc (4.9) vào bình định mức dung tích 50 mL thêm đến vạch bằng dung dịch chiết (4.8), lắc đều. Dung dịch chuẩn phải được bảo quản trong bình tối màu ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

4.10 Dung dịch chuẩn làm việc

Pha dãy dung dịch chuẩn làm việc của axit alginate trong dung dịch chiết (4.8).

Sử dụng sáu bình định mức dung tích 10 mL, cho vào mỗi bình thứ tự số mililit dung dịch chuẩn axit alginate 100 mg/L (4.9) và dung dịch chiết (4.8) vừa đủ 10 mL, thu được dãy dung dịch chuẩn axit alginate (xem Bảng 1).

Bảng 1 – Dây dung dịch chuẩn axit alginic nồng độ từ 5 mg/L đến 60 mg/L

Số hiệu bình	S0	S1	S2	S3	S4	S5
Thể tích dung dịch chuẩn axit alginic 100 mg/L (4.9) lấy vào mỗi bình (mL)	0	0,5	1	2	4	6
Thể tích dung dịch chiết (4.8) thêm đến vạch định mức (mL)	10	9,5	9	8	6	4
Nồng độ dung dịch chuẩn axit alginic thu được (mg/L)	0,00	5,0	10,0	20,0	40,0	60,0

CHÚ THÍCH: Tùy thuộc vào điều kiện trang thiết bị và hàm lượng axit alginic trong mẫu thử để xây dựng đường chuẩn sao cho phù hợp.

5 Thiết bị và dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm và

5.1 Cân phân tích, có độ chính xác đến $\pm 0,0001$ g.

5.2 Bể siêu âm.

5.3 Máy đo pH.

5.4 Thiết bị HPLC, được trang bị như sau:

- Detector tử ngoại (DAD, MWD, PDA,... hoặc tương đương);
- Hệ thống bơm cao áp;
- Buồng điều nhiệt cột tách;
- Máy tích phân hoặc máy vi tính;
- Cột RP C18, dài 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.

5.5 Pipet, dung tích 1,0; 2,0; 5,0; 10 mL, có vạch chia đến 0,1 mL.

5.6 Giấy lọc, giấy lọc Whatman 0,45 μ m hoặc tương đương.

5.7 Bình định mức, dung tích 10; 25; 50; 100; 1000 mL.

6 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

6.1 Lấy mẫu

Lấy mẫu theo TCVN 9486:2018.

6.2 Chuẩn bị mẫu

6.2.1 Phân bón dạng rắn: Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 10683:2015 (ISO 8358:1991).

6.2.2 Phân bón dạng lỏng

6.2.2.1 Dạng dung dịch: Mẫu lấy ban đầu không ít hơn 50 mL, trước khi lấy mẫu để tiến hành phép thử, mẫu phải được lắc đều.

6.2.2.2 Dạng lỏng sền sệt: Mẫu lấy ban đầu không ít hơn 200 g, trước khi lấy mẫu để tiến hành phép thử, mẫu phải được trộn đều.

7 Cách tiến hành

7.1 Chiết mẫu

Dùng cân phân tích (5.1) cân khoảng 0,5 g đến 5 g mẫu phân bón đã được chuẩn bị (6.2.1 và 6.2.2.2). Đối với mẫu dạng lỏng (6.2.2.1), dùng pipet (5.5) hút khoảng 0,5 mL đến 5 mL dung dịch mẫu và cân để xác định khối lượng, cho vào cốc dung tích 50 mL, hòa tan, chuyển sang bình định mức dung tích 50mL và định mức tới vạch bằng dung dịch chiết (4.8). Đặt bình vào máy siêu âm trong thời gian khoảng 5 min, sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng, lọc qua giấy lọc (5.6). Dung dịch thu được dùng để xác định axit alginic.

7.2 Điều kiện phân tích

Pha động: Gồm pha động A và pha động B;

Pha động A: Hỗn hợp dung dịch đệm pH 7,0 (4.7) và metanol (4.3) theo tỷ lệ (65:35) về thể tích;

Pha động B: Acetonitril;

Cột tách: Cột C18 (250 mm × 4,6 mm), 5µm;

Nhiệt độ cột: 35 °C;

Tốc độ dòng: 1,0 mL/min;

Thời gian phân tích: 20 min;

Bước sóng: 210 nm.

Thời gian (min)	Pha động A	Pha động B
0	100	0
4	100	0
7	50	50
11	50	50
14	100	0
20	100	0

7.3 Xác định axit alginic trong mẫu bằng HPLC

Ổn định hệ thống HPLC theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi hệ thống thiết bị ổn định, dùng bơm một dung dịch chuẩn có nồng độ thấp nhất trong dãy dung dịch chuẩn làm việc (4.10) cho đến khi số đo diện tích của pic chuẩn thay đổi không lớn hơn 3 %. Sau đó, bơm lần lượt các dung dịch chuẩn làm việc (4.10) nồng độ từ thấp đến cao (Bảng 1) qua cột tách, dựng đường chuẩn hàm lượng axit alginic tương ứng với diện tích pic thu được.

Bơm dung dịch mẫu thử (7.1), lặp lại 2 lần. Xác định hàm lượng axit alginic dựa theo đường chuẩn đã được xây dựng. Nếu nồng độ của mẫu thử nằm ngoài đường chuẩn thì điều chỉnh bằng cách pha loãng dung dịch mẫu thử bằng dung dịch chiết (4.8).

8 Biểu thị kết quả

Hàm lượng axit alginic (X) trong mẫu phân bón, tính bằng mg/kg, theo công thức:

$$X = \frac{a \times f \times V}{m} \times P_i$$

trong đó:

- a là nồng độ của axit alginic trong dung dịch mẫu, tính bằng miligam trên lit (mg/L);
- f là hệ số pha loãng;
- V là thể tích dung dịch định mức của mẫu (hoặc mẫu trắng) sau khi chiết (50 mL), tính bằng mililit (mL);
- m là khối lượng mẫu cân, tính bằng gam (g);
- P_i là độ tinh khiết của chất chuẩn, tính bằng phần trăm (%).

Kết quả phép thử là giá trị trung bình các kết quả của ít nhất hai lần thử được tiến hành song song, sai lệch giữa chúng không được vượt quá theo quy định của AOAC (tùy thuộc vào mức nồng độ của chất thử) so với giá trị trung bình

Kết quả thử nghiệm thu được, lấy hai chữ số sau dấu phẩy.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau:

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) Đặc điểm nhận dạng mẫu;
- c) Kết quả thử nghiệm;

TCVN 13761:2023

- d) Mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn và các yếu tố có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- e) Ngày thử nghiệm.

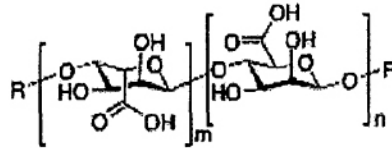
Phụ lục A

(Tham khảo)

Thông tin về axit alginic

A.1 Giới thiệu axit alginic

- Công thức cấu tạo



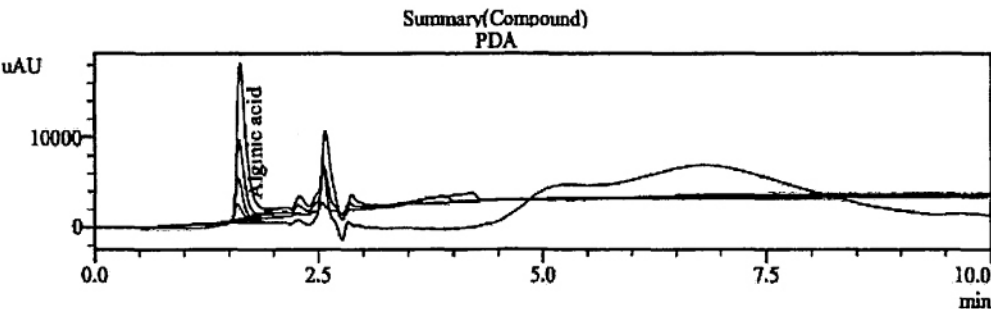
- Tên hoạt chất: Alginic acid
- Tên hóa học: IUPAC : [D-ManA(β 1 $\rightarrow$ 4)L-GulA(α 1 $\rightarrow$ 4)]_n
- Công thức phân tử: (C₆H₈O₆)_n
- Khối lượng phân tử: 10,000 g/mol – 600,000 g/mol (trung bình điển hình)
- Độ hòa tan: Tan chậm trong nước, tạo ra dung dịch nhớt
- Dạng bên ngoài: Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu

Phụ lục B

(Tham khảo)

Ví dụ về sắc ký đồ điển hình của axit alginic

Sắc ký đồ điển hình của axit alginic trong phân bón



Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] A Validated HPLC Assay Method for the Determination of Sodium Alginate in Pharmaceutical Formulations
 - [2] Inhouse method of american vanguard corporation.
-