

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 13764:2023**

Xuất bản lần 1

**PHÂN BÓN –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NHÓM HOẠT CHẤT CYTOKININ  
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO  
(HPLC)**

*Fertilizers – Determination of cytokinins content by high performance liquid chromatography (HPLC)*

**HÀ NỘI – 2023**

**Lời nói đầu**

**TCVN 13764:2023** 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 nhóm hoạt chất cytokinin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

*Fertilizers – Determination of cytokinins content by high performance liquid chromatography (HPLC)*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng nhóm hoạt chất cytokinin trong phân bón bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các cytokinin sau: zeatin, zeatin riboside, kinetin và benzylaminopurine.

### 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

Hoạt chất cytokinin trong phân bón được hòa tan bằng hỗn hợp dung dịch kali hydroxit 0,05 M và dung dịch metanol với tỷ lệ (1:9) về thể tích và được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector tử ngoại (PDA) hoặc tương đương tại bước sóng 270 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  $< 10 \mu\text{S}$ ), sau đây gọi là nước

**4.1 Zeatin** ( $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}$ ) hoặc dung dịch chuẩn có nồng độ pha sẵn.

**4.2 Zeatin riboside** ( $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$ ) hoặc dung dịch chuẩn có nồng độ pha sẵn.

**4.3 Kinetin** ( $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$ ) hoặc dung dịch chuẩn có nồng độ pha sẵn.

**4.4 Benzylaminopurine** ( $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$ ) hoặc dung dịch chuẩn có nồng độ pha sẵn.

**4.5 Kali hydroxit** (KOH).

**4.6 Metanol** ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

**4.7 Axit axetic băng** ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ).

**4.8 Dung dịch kali hydroxit 0,05 M**

Dùng cân phân tích (5.1) cân 0,28 g kali hydroxit (4.5) cho vào bình định mức dung tích 100 mL có khoảng 60 mL nước. Lắc đều, thêm nước đến vạch định mức. Dung dịch được bảo quản trong bình nhựa.

**4.9 Dung dịch axit axetic 0,1 % theo thể tích**

Dùng pipet hút chính xác 1,0 mL dung dịch axit axetic băng (4.7) vào cốc dung tích 1000 mL có chứa sẵn 1000 mL nước cất. Đặt trong bể siêu âm trong thời gian 10 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

**4.10 Dung dịch chuẩn gốc cytokinin 1000 mg/L**

Dùng cân phân tích (5.1) cân 0,01 g từng hoạt chất trong nhóm cytokinin (4.1 đến 4.4) cho vào bình định mức dung tích 10 mL. Thêm 5 mL dung dịch KOH 0,05 M (4.8) và định mức đến vạch bằng dung dịch metanol (4.6). Đặt bình vào bể siêu âm trong thời gian 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

**4.11 Dung dịch chuẩn trung gian cytokinin 100 mg/L**

Dùng pipet hút chính xác 5 mL dung dịch chuẩn gốc (4.10) vào bình định mức dung tích 50 mL. Hòa tan và định mức đến vạch bằng dung dịch metanol (4.6), đặt bình vào bể siêu âm trong thời gian 1 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

**4.12 Dung dịch chuẩn làm việc cytokinin**

Pha dãy dung dịch chuẩn làm việc của hoạt chất cytokinin trong dung dịch metanol (4.6).

Sử dụng sáu bình định mức dung tích 10 mL, cho vào mỗi bình thứ tự số mililit dung dịch chuẩn hoạt chất cytokinin trung gian 100 mg/L (4.11), 1 mL dung dịch KOH 0,05 M (4.8) và

dung dịch metanol (4.6) vừa đủ 10 mL, thu được dãy dung dịch chuẩn hoạt chất cytokinin (xem Bảng 1).

**Bảng 1 – Dãy dung dịch chuẩn hoạt chất cytokinin nồng độ từ 10 mg/L đến 80 mg/L**

Số hiệu bình	S0	S1	S2	S3	S4	S5
Thể tích dung dịch chuẩn trung gian hoạt chất cytokinin 100 mg/L (4.12) lấy vào mỗi bình (mL)	0	1	2	4	6	8
Thể tích dung dịch KOH 0,05 M (4.9)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Thể tích dung dịch metanol (4.6) thêm đến vạch định mức (mL)	9,0	8,0	7,0	5,0	3,0	1,0
Nồng độ dung dịch chuẩn cytokinin thu được (mg/L)	0,00	10,0	20,0	40,0	60,0	80,0

Dung dịch chuẩn phải được bảo quản trong bình tối màu ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Tùy thuộc vào điều kiện trang thiết bị và hoạt chất cytokinin 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 các thiết bị, dụng cụ sau.

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

**5.2 Bể siêu âm.**

**5.3 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  $\mu$ m hoặc loại tương đương;
- Bộ bơm mẫu tự động hoặc bơm mẫu bằng tay.

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

**5.5 Giấy lọc**, giấy lọc Whatman 0,45  $\mu$ m hoặc tương đương.

**5.6 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 2 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 (5.4) hút khoảng 2 mL đến 5 mL dung dịch mẫu, cân để xác định khối lượng, cho vào cốc dung tích 25 mL, thêm 2,5 mL dung dịch KOH 0,05 M (4.9) và 10 mL dung dịch metanol (4.6). Lắc đều, chuyển vào bình định mức dung tích 25 mL, thêm dung dịch metanol (4.6) đến vạch định mức. Đặt bình vào bể siêu âm trong thời gian khoảng 5 min, sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng, lọc qua giấy lọc (5.5). Dung dịch thu được dùng để xác định hoạt chất cytokinin;

### 7.2 Điều kiện phân tích

**Pha động:** Hỗn hợp dung dịch axit axetic 0,1 % (4.9) và dung dịch metanol (4.6) theo tỷ lệ (65:35) về thể tích;

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

**Nhiệt độ cột:** 25 °C;

**Tốc độ dòng:** 1,0 mL/min;

**Thời gian phân tích:** 20 min;

**Bước sóng:** 270 nm.

Thời gian (phút)	Metanol (4.6) (% theo thể tích)	Dung dịch axit axetic 0,1.% (4.9) (% theo thể tích)
0	35	65
15	55	45
16	35	65

### 7.3 Xác định hoạt chất cytokinin 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 (4.12) 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 (4.12) nồng độ từ thấp đến cao (Bảng 1) qua cột tách, dựng đường chuẩn hàm lượng hoạt chất cytokinin tương ứng với diện tích pic thu được.

Bơm dung dịch mẫu thử (7.1), lặp lại 2 lần. Xác định hàm lượng hoạt chất cytokinin 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 metanol (4.6)

## 8 Biểu thị kết quả

Hàm lượng của từng loại cytokinin trong mẫu,  $X_i$ , biểu thị bằng miligam trên kilogam (mg/kg), được tính theo công thức (1).

$$X_i = X_{0i} \times \frac{V}{m} \times p_i \quad (1)$$

Hàm lượng cytokinin tổng số trong mẫu là tổng hàm lượng các loại cytokinin được quy định trong Điều 1,  $X$ , biểu thị bằng miligam trên kilogam (mg/kg), được tính theo công thức (2).

$$X = \frac{V}{m} \left( \sum X_{0i} \times P_i \right) \quad (2)$$

trong đó:

$X_{0i}$  là nồng độ của các chất cytokinin trong mẫu tính theo đường chuẩn, tính bằng miligam trên lít (mg/L);

$V$  là thể tích dung môi chiết mẫu mililit (ml);

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

$P_i$  là độ tinh khiết của chất chuẩn.

## **TCVN 13764:2023**

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 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;
- 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.



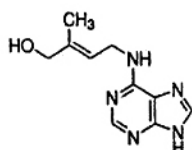
## Phụ lục A

(Tham khảo)

## Thông tin về nhóm cytokinin

## A.1 Giới thiệu hoạt chất zeatin

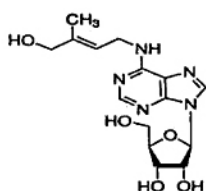
- Công thức cấu tạo



- Tên hoạt chất: zeatin
- Tên hóa học: IUPAC: (E)-2-methyl-4-(7H-purin-6-ylamino)but-2-en-1-ol
- Công thức phân tử:  $C_{10}H_{13}N_5O$
- Khối lượng phân tử: 219,24 g/mol
- Nhiệt độ sôi: 208 °C - 210 °C
- Độ hòa tan: tan trong nước
- Dạng bên ngoài: rắn, màu trắng.

## A.2 Giới thiệu hoạt chất zeatin riboside

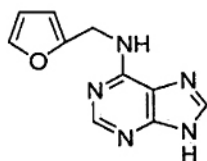
- Công thức cấu tạo



- Tên hoạt chất: zeatin riboside
- Tên hóa học: IUPAC : 9-(β-D-Ribofuranosyl)-trans-zeatin, N6-(trans-4-Hydroxy-3-methyl-2-buten-1-yl)adenosine
- Công thức phân tử:  $C_{15}H_{21}N_5O_5$
- Khối lượng phân tử: 351,36 g/mol
- Nhiệt độ nóng chảy: 226 °C ~ 235 °C
- Độ hòa tan: tan trong nước
- Dạng bên ngoài: rắn, màu trắng

### A.3 Giới thiệu hoạt chất kinetin

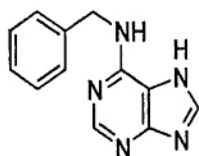
- Công thức cấu tạo



- Tên hoạt chất: kinetin
- Tên hóa học: IUPAC: N<sup>6</sup>-furfuryladenine
- Công thức phân tử: C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O
- Khối lượng phân tử: 215,21 g/mol
- Nhiệt độ sôi: 269 °C – 271 °C
- Độ hòa tan: tan trong nước
- Dạng bên ngoài: rắn, màu trắng

### A.4 Giới thiệu hoạt chất benzylaminopurine

- Công thức cấu tạo

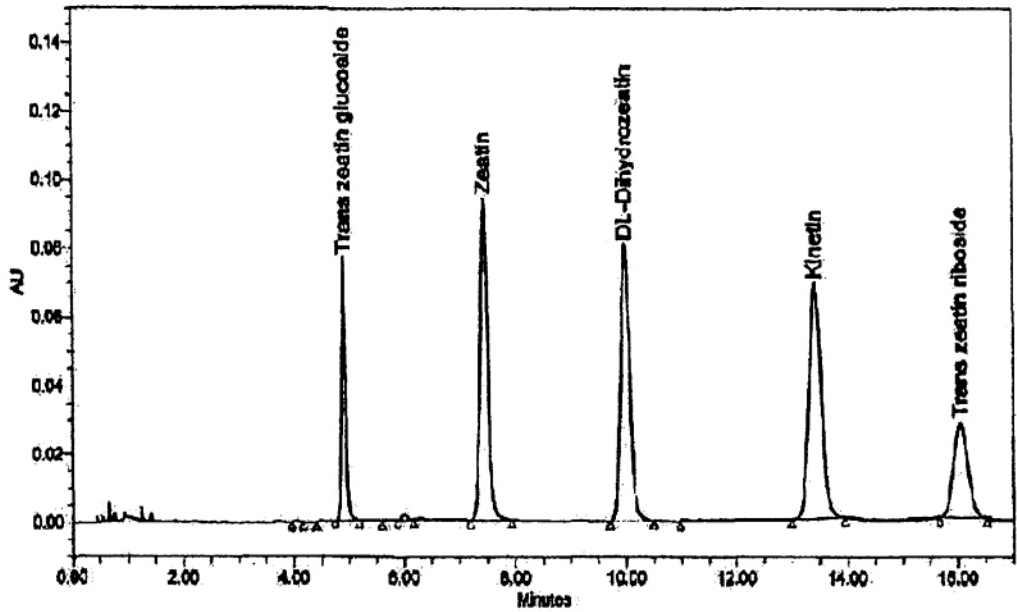


- Tên hoạt chất: benzylaminopurine
- Tên hóa học: IUPAC: N-(Phenylmethyl)-7H-purin-6-amine
- Công thức phân tử: C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>
- Khối lượng phân tử: 225.255 g/mol
- Nhiệt độ nóng chảy: 230 °C – 233 °C
- Độ hòa tan: Khó tan trong nước (0,44 g/L ở 15 °C), tan ít trong ethyl alcohol; ổn định trong dung dịch axit, kiềm.
- Dạng bên ngoài: rắn, màu trắng

**Phụ lục B**  
(Tham khảo)

**Ví dụ về sắc ký đồ điển hình của hoạt chất nhóm cytokinin**

Sắc ký đồ điển hình của hoạt chất nhóm cytokinin trong phân bón



**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] METHOD OF HPLC ANALYSIS - Cytokinin 6BA 98 % TC - fertilizers -agrochemical
  - [2] Analytical methods for cytokinins, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 3, 2009
-