

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13262-3:2020

Xuất bản lần 1

**THUỐC BẢO VỆ THỰC VẬT –
PHẦN 3: XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG HOẠT CHẤT
NHÓM AUXINS BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Pesticides - Part 3: Determination of auxins group content
by high performance liquid chromatographic method*

HÀ NỘI - 2020

Lời nói đầu

TCVN 13262-3: 2020 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 – Phần 3: Xác định hàm lượng hoạt chất nhóm auxins bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Pesticides – Part 3: Determination of auxins group content by high performance liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định tổng hàm lượng hoạt chất nhóm auxins thực vật gồm ((indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), indole-3-propionic acid (IPA), indole-3-carboxylic acid (ICA)) trong thuốc bảo vệ thực vật bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Thông tin giới thiệu hoạt chất nhóm auxins xem Phụ lục A.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên 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 sửa đổi (nếu có).

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

3 Nguyên tắc

Tổng auxins thực vật gồm (indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), indole-3-propionic acid (IPA), indole-3-carboxylic acid (ICA)) được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, sử dụng cột pha đảo (C18) với detector tử ngoại (DAD, MWD, PDA, ... hoặc tương đương), ở bước sóng 280 nm. Kết quả định danh được xác định dựa trên sự so sánh giữa thời gian lưu của pic mẫu thử và pic chuẩn. Kết quả định lượng được xác định dựa trên đường chuẩn.

4 Thuốc thử

TCVN 13262-3: 2020

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 indole-3-acetic acid (IAA), đã biết hàm lượng, có giấy chứng nhận.

4.2 Chất chuẩn indole-3-butyric acid (IBA), đã biết hàm lượng, có giấy chứng nhận.

4.3 Chất chuẩn indole-3-propionic acid (IPA), đã biết hàm lượng, có giấy chứng nhận.

4.4 Chất chuẩn indole-3-carboxylic acid (ICA), đã biết hàm lượng, có giấy chứng nhận.

4.5 Axetonitril (C_2H_3N), dùng cho sắc ký lỏng.

4.6 Metanol (CH_4O), dùng cho sắc ký lỏng.

4.7 Axit axetic băng ($C_2H_4O_2$), dùng cho sắc ký lỏng.

4.8 Dung dịch axit axetic, nồng độ khoảng 0,8 % theo thể tích

Dùng pipet (5.3) lấy 8 ml axit axetic băng (4.7) cho vào cốc dung tích 1000 ml (5.1) có chứa sẵn 1000 ml nước cất. Siêu âm 10 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.9 Dung dịch chuẩn gốc

4.9.1 Dung dịch chuẩn gốc IAA, nồng độ khoảng 1000 mg/l

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn IAA (4.1), chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức 10 ml (5.2), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.6), siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.9.2 Dung dịch chuẩn gốc IBA, nồng độ khoảng 1000 mg/l

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn IBA (4.2), chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức 10 ml (5.2), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.6), siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.9.3 Dung dịch chuẩn gốc IPA, nồng độ khoảng 1000 mg/l

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn IPA (4.3), chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức 10 ml (5.2), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.6), siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.9.4 Dung dịch chuẩn gốc ICA, nồng độ khoảng 500 mg/l

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn ICA (4.4), chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức 20 ml (5.2), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.6), siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.10 Dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian

Nồng độ IAA, IBA, IPA khoảng 100 mg/l, nồng độ ICA khoảng 50 mg/l

Dùng pipet chia vạch (5.3) hút 2 ml các dung dịch chuẩn gốc IAA (4.9.1), IBA (4.9.2), IPA (4.9.3), ICA (4.9.4) vào bình định mức 20 ml (5.2), định mức đến vạch bằng metanol (4.6), siêu âm trong 1 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.11 Dây dung dịch chuẩn làm việc

Dây dung dịch chuẩn làm việc IAA, IBA, IPA nồng độ khoảng 5; 10; 20; 50; 80 mg/l

Dây dung dịch chuẩn làm việc ICA, nồng độ khoảng 2,5; 5; 10; 25; 40 mg/l

Dùng pipet chia vạch (5.3) lấy chính xác 0,5; 1; 2; 5; 8 ml dung dịch chuẩn trung gian IAA, IBA, IPA, ICA (4.10) vào lần lượt 5 bình định mức 10 ml (5.2), định mức đến vạch bằng metanol (4.6), siêu âm trong 1 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

CHÚ THÍCH 1:

- 1) Chất chuẩn bảo quản trong tủ mát ở $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- 2) Nếu sử dụng cân có cấp chính xác 0,0001 g thì lượng mẫu và chuẩn tăng lên 10 lần;
- 3) Dung dịch chuẩn gốc và dung dịch chuẩn trung gian nên bảo quản ở $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, nên sử dụng trong vòng 1 tháng kể từ ngày pha;
- 4) Dung dịch chuẩn phải kiểm tra chất lượng trước khi sử dụng.
- 5) Dung dịch chuẩn làm việc nên sử dụng ngay sau khi pha từ dung dịch chuẩn trung gian.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Cốc thủy tinh, dung tích 100 ml; 1000 ml.

5.2 Bình định mức, dung tích 10 ml; 20 ml; 50 ml.

5.3 Pipet chia vạch, dung tích 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml.

TCVN 13262-3: 2020

5.4 Xyranh bơm mẫu, dung tích 50 μ l, chia vạch đến 1 μ l. hoặc bơm mẫu tự động

5.5 Màng lọc xyranh PTFE, có kích thước lỗ 0,45 μ m, đường kính 25 mm.

5.6 Bể siêu âm, tần số siêu âm từ 40 kHz đến 100 kHz

5.7 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,00001 g và 0,0001 g.

5.8 **Sàng rây**, đường kính lỗ 0,2 mm.

5.9 Xyranh lọc mẫu, dung tích 1 ml dùng cho màng lọc (5.5)

5.10 Thiết bị lọc

Dùng được cho màng lọc dung môi đường kính 13 mm, kích thước lỗ 0,45 μ m để lọc dung môi pha động của HPLC

CHÚ THÍCH 2: Lọc dung môi pha động qua màng lọc trước khi dùng để kéo dài thời gian sử dụng của cột.

5.11 Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao, 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.

6 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

6.1 Lấy mẫu

Tiêu chuẩn này không qui định việc lấy mẫu.

Nên lấy mẫu theo TCVN 12017 : 2017

6.2 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 ± 2) °C; đối với mẫu dạng bột phải được trộn đều; đối với mẫu dạng hạt thì phải nghiền mịn và rây qua rây có đường kính lỗ 0,2 mm (5.8), trộn đều làm mẫu phân tích.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Dùng cân phân tích (5.7) cân 2 phần mẫu thử mỗi phần khoảng 2 g, chính xác đến 0,0001 g vào cốc dung tích 100 ml (5.1), thêm 10 ml metanol (4.6). Đặt vào bể siêu âm (5.6), siêu âm 30 min, để nguội đến nhiệt độ phòng, chuyển toàn bộ vào bình định mức 20 ml (5.2), tráng rửa 2 lần mỗi lần 3 ml metanol (4.6). Định mức đến vạch bằng metanol (4.6), lọc qua màng lọc xyranh 0,45 μm (5.5) trước khi bơm vào thiết bị.

7.2 Điều kiện phân tích

Các điều kiện vận hành sắc ký sau đây được cho là thích hợp:

Pha động:	Axetonitril (4.5) : dung dịch axit axetic (4.8) =20 : 80 (theo thể tích)
Cột phân tích:	Cột RP C18, dài 250 mm, đường kính 4,6 mm, cỡ hạt pha tĩnh 5 μm hoặc loại tương đương
Bước sóng:	280 nm
Tốc độ dòng:	1 ml/min
Thể tích bơm mẫu:	10 μl
Nhiệt độ buồng cột:	25 °C

7.3 Dụng đường chuẩn

Dụng đường chuẩn (tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất chuẩn) của mỗi hoạt chất tại 5 điểm có nồng độ tương ứng dung dịch chuẩn làm việc (4.11).

7.4 Xác định

Dùng xyranh (5.4) bơm điểm nồng độ thấp nhất trong dãy dung dịch chuẩn làm việc (4.11) cho đến khi số đo diện tích của pic chuẩn thay đổi không lớn hơn 3 %. Sau đó, bơm lần lượt dung dịch chuẩn làm việc từ nồng độ thấp đến cao (4.11) và dung dịch mẫu thử (7.1), lặp lại 2 lần (số đo diện tích của pic chuẩn thay đổi không lớn hơn 3 % so với giá trị ban đầu). 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 Tính kết quả

Hàm lượng hoạt chất auxins trong mẫu là tổng hàm lượng các loại auxins được qui định trong mục 1, X, biểu thị bằng miligam trên kilogam (mg/kg), được tính theo công thức:

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

trong đó:

X_{0i} là nồng độ của auxins thứ i 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 auxins thứ i

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

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

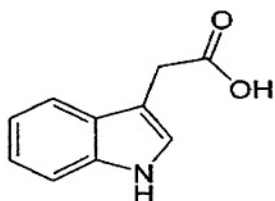
- a) mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng;
- c) phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc những điều được coi là tự chọn, và bất kỳ chi tiết nào có ảnh hưởng tới kết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

Phụ lục A
(Tham khảo)

Thông tin về hoạt chất auxins

A.1 Giới thiệu hoạt chất indole-3-acetic acid

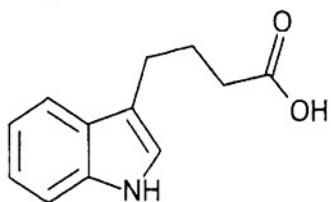
- Công thức cấu tạo:



- Tên hoạt chất: indole-3-acetic acid
- Tên hoá học: IUPAC: 2-(1H-indol-3-yl) axetic acid
- Công thức phân tử: $C_{10}H_9NO_2$
- Khối lượng phân tử: 75,19
- Nhiệt độ nóng chảy: 162 °C đến 165 °C
- Độ hòa tan: Không tan trong nước, tan trong ethanol: 50 mg/ml
- Dạng bên ngoài: Chất rắn, màu trắng

A.2 Giới thiệu hoạt chất indole-3-butyric acid

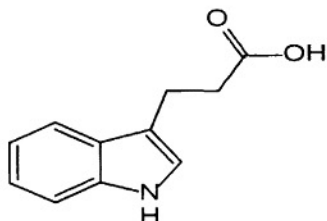
- Công thức cấu tạo:



- Tên hoạt chất: indole-3-butyric acid
- Tên hoá học: IUPAC: 4- (1H-indol-3-yl) butanoic acid
- Công thức phân tử: $C_{12}H_{13}NO_2$
- Khối lượng phân tử: 203,24
- Nhiệt độ nóng chảy: 125 °C
- Dạng bên ngoài: Tinh thể, màu trắng đến vàng.

A.3 Giới thiệu hoạt chất indole-3-propionic acid

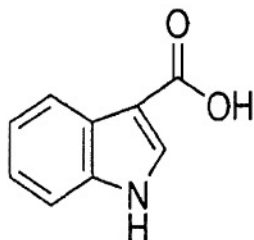
- Công thức cấu tạo:



- Tên hoạt chất: indole-3-propionic acid
- Tên hoá học: IUPAC: 3-(1H-indole-3-yl) propanoic acid
- Công thức phân tử: $C_{11}H_{11}NO_2$
- Khối lượng phân tử: 189,21
- Nhiệt độ nóng chảy: 134 °C đến 135 °C
- Dạng bên ngoài: Tinh thể màu trắng.

A.4 Giới thiệu hoạt chất indole-3-carboxylic acid

- Công thức cấu tạo:



- Tên hoạt chất: indole-3-carboxylic acid
- Tên hoá học: IUPAC: 1H-indole-3-carboxylic acid
- Công thức phân tử: $C_9H_7NO_2$
- Khối lượng phân tử: 161,16
- Nhiệt độ nóng chảy: 205 °C đến 209 °C
- Dạng bên ngoài: Tinh thể màu trắng.

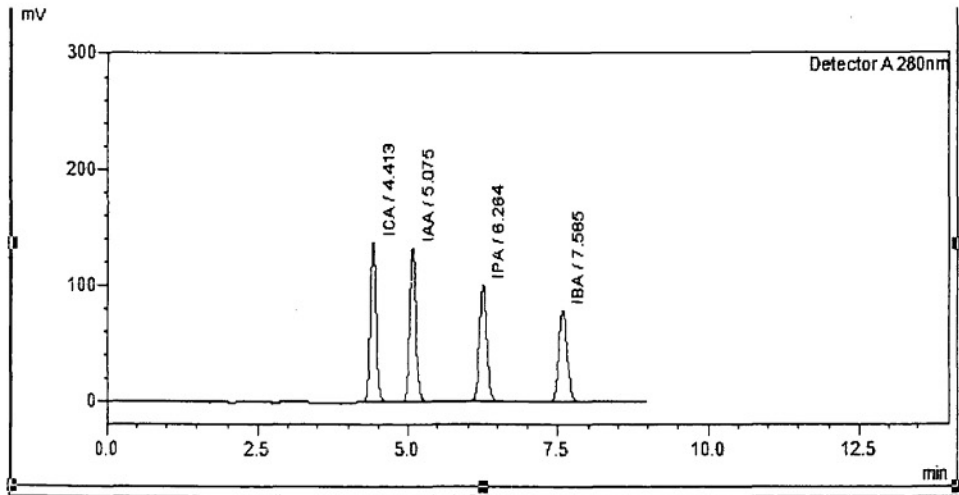
A.5 Hiệu suất thu hồi và giới hạn định lượng

- Hiệu suất thu hồi của phương pháp: từ 80 % đến 110 %.
- Giới hạn định lượng của phương pháp (LOQ):
 - IAA: 50 mg/kg
 - IBA: 20 mg/kg
 - IPA: 50 mg/kg
 - ICA: 50 mg/kg
- Độ lặp lại của phương pháp, $CV \leq 7 \%$.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Thông tin về sắc ký đồ điển hình của nhóm auxins



Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 12017: 2017 *Thuốc bảo vệ thực vật- Lấy mẫu*
- [2] Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng ở Việt Nam
- [3] Manual pesticides
- [4] Determination of plant hormones in fertilizers by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection: Method development and single-laboratory validation
- [5] ."Current analytical methods for plant auxin quantification- a review", *analytica Chimica Acta*, journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca
- [6] ."HPLC-based in quantification of indole-3-axetic acid in the primary root tip of maize", *JNBT*, Vol.3 No1, p.40-45.
-