

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13263-1:2020

Xuất bản lần 1

PHÂN BÓN –

**PHẦN 1: XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VITAMIN A BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Fertilizers – Part 1: Determination of vitamin A content by high performance liquid
chromatographic method*

HÀ NỘI - 2020

Lời nói đầu

TCVN 13263-1 : 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.

Phân bón –Phần 1: Xác định hàm lượng vitamin A bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Fertilizers –Part 1: Determination of vitamin A content by high performance liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng vitamin A tổng số trong phân bón bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Thông tin giới thiệu hoạt chất vitamin A 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*

TCVN 10683 : 2015, *Phân bón rắn - Phương pháp chuẩn bị mẫu để xác định các chỉ tiêu hóa học và vật lý*

3 Nguyên tắc

Vitamin A trong phân bón được xà phòng hóa bằng dung dịch kali hidroxit trong etanol hoặc trong metanol để chuyển về dạng retinol. Retinol được chiết bằng n-hexan. Sau đó được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector tử ngoại (DAD, MWD, PDA,... hoặc tương đương), cột pha đảo. Các chất được nhận biết dựa vào thời gian lưu và được xác định bằng phương pháp đường 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, sau đây gọi là nước.

4.1 Metanol, (CH₃OH) dùng cho sắc ký lỏng

TCVN 13263-1 : 2020

4.2 Axetonilrit, (C_2H_3N) dùng cho sắc ký lỏng

4.3 Chuẩn retinol, ($C_{20}H_{30}O$)= 286,5 g/mol, có độ tinh khiết ít nhất 90 %.

4.4 Etanol, (C_2H_5OH) nồng độ cồn 96 %.

4.5 Natri sulfat khan, (Na_2SO_4) tinh khiết phân tích.

4.6 Kali hidroxit, (KOH) tinh khiết phân tích.

4.7 Hydrotoluen đã butyl hóa (butylated hydrotoluen- BHT), tinh khiết phân tích.

4.8 Dung dịch kali hidroxit, nồng độ khoảng 3%

Dùng cân kỹ thuật (5.8) cân khoảng 3 g KOH (4.6) chính xác đến 0,001 g vào cốc dung tích 250 ml (5.1) có chứa sẵn 97 ml hỗn hợp etanol/nước (1+9) theo thể tích. Đặt vào bể siêu âm, siêu âm 20 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.9 Dung dịch hydrotoluen đã butyl hóa (butylated hydrotoluen- BHT), nồng độ khoảng 20%

Dùng cân kỹ thuật (5.8) cân khoảng 2 g BHT (4.7) chính xác đến 0,001 g vào bình định mức dung tích 20 ml (5.2), hòa tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.1).

4.10 n-Hexan, tinh khiết phân tích.

4.11 Dung dịch chuẩn gốc retinol, nồng độ khoảng 1000 ppm

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn retinol (4.3) chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức dung tích 10 ml (5.2), dùng pipet (5.3) thêm 1 ml dung dịch hydrotoluen đã butyl hóa (4.9), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.1), siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

CHÚ THÍCH 1:

- 1) Có thể sử dụng các chuẩn dạng este hoặc muối của vitamin, khi đó phải chuyển đổi hàm lượng các dạng muối hoặc este về retinol.
- 2) Dung dịch chuẩn được lưu giữ trong bình tối màu và bảo quản mát từ 2 °C đến 4 °C
- 3) Dung dịch chuẩn gốc nên sử dụng trong vòng một tháng kể từ khi pha, dung dịch chuẩn làm việc nên dùng ngay sau khi pha loãng
- 4) Phải kiểm tra đánh giá chuẩn trước khi sử dụng
- 5) Nếu sử dụng cân có độ chính xác 0,0001 gam thì lượng cân của chuẩn và mẫu phải tăng lên 10 lần

4.12 Dung dịch chuẩn trung gian, nồng độ khoảng 20 ppm

Dùng pipet (5.3) hút chính xác 1 ml dung dịch chuẩn gốc retinol (4.11) vào bình định mức dung tích 50 ml (5.2), định mức đến vạch bằng metanol (4.1), siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng và .

4.13 Dãy dung dịch chuẩn làm việc, nồng độ khoảng 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 8 ppm, 16 ppm

Dùng pipet (5.3) lấy chính xác 0,5; 1; 2; 4; 8 ml dung dịch chuẩn trung gian (4.12) vào lần lượt bình định mức dung tích 10 ml (5.2), định mức đến vạch bằng metanol (4.1), siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng và .

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 250ml; 1000 ml.
- 5.2 Bình định mức, dung tích 10 ml; 20 ml; ; 50 ml; 100 ml.
- 5.3 Pipet chia vạch, dung tích 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml.
- 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 đường kính lỗ 0,45 μ m.
- 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 0,0001 g và 0,00001 g.
- 5.8 Cân kỹ thuật, có độ chính xác đến 0,001 g.
- 5.9 Thiết bị cô quay chân không
 - Bình cô quay, dung tích 250 ml;
 - Khoảng tốc độ từ 20 r/min đến 280 r/min;
 - Khoảng gia nhiệt từ 20 °C đến 180 °C.
- 5.10 Thiết bị lọc

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

CHÚ THÍCH 2: Lọc pha động qua màng lọc trước khi dùng để kéo dài thời gian sử dụng của cột.
- 5.11 Bình xà phòng hóa, dung tích khoảng 200 ml được gắn với bộ ngưng hồi lưu
- 5.12 Phễu chiết, dung tích 250 ml, có nắp polytetrafluoetylen
- 5.13 Nồi đun cách thủy
- 5.14 Cối nghiền mẫu, bằng sứ hoặc vật liệu tương đương
- 5.15 Xyranh lọc mẫu, dung tích 1 ml dùng cho màng lọc xyranh PTFE (5.5)
- 5.16 Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao, được trang bị như sau:

TCVN 13263-1 : 2020

- 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

Đối với mẫu phân bón thường, lấy mẫu theo TCVN 9486 : 2018. Đối với mẫu phân bón vi sinh, lấy mẫu theo TCVN 12105 : 2018

6.2 Chuẩn bị mẫu

Đồng hóa mẫu thử:

- Nghiền mẫu bằng cối sứ hoặc vật liệu tương đương và trộn lại. Cần thực hiện các biện pháp như làm lạnh sơ bộ trước khi nghiền mẫu để tránh mẫu bị tiếp xúc với nhiệt độ cao trong thời gian dài.
- Chuẩn bị mẫu trong điều kiện tránh trực tiếp ánh sáng mặt trời

6.2.1 Mẫu dạng rắn

Mẫu dạng rắn được chuẩn bị theo TCVN 10683 : 2015.

6.2.2 Mẫu dạng lỏng, huyền phù

Mẫu dạng lỏng, dạng huyền phù thì phải lắc, trộn đều, đồng nhất trước khi cân.

7 Cách tiến hành

7.1 Xà phòng hóa mẫu

7.1.1 Dùng cân phân tích (5.7) cân 2 phần mẫu thử mỗi phần khoảng 2 g, chính xác đến 0,0001 g đã được chuẩn bị theo mục (6.2) cho vào bình xà phòng hóa (5.11), thêm 20 ml dung dịch KOH (4.8) để xà phòng hóa, 1 ml dung dịch hydroxytoluen đã butyl hóa (4.9) và 50 ml etanol (4.4) lắc đều.

7.1.2 Chưng cất hồi lưu 60 min trên nồi cách thủy và thỉnh thoảng xoay bình. Làm nguội nhanh dưới nước vòi đang chảy.

7.2 Chiết mẫu

7.2.1 Chuyển dung dịch lỏng sang phễu chiết (5.12) thứ nhất, tráng bình 2 lần, mỗi lần dùng 30 ml nước, 10 ml etanol (4.4) và 40 ml n-hexan (4.10). Lắc mạnh trong 30 s và để yên cho đến khi hai pha được tách riêng biệt.

Chuyển pha nước (phía dưới) sang phễu chiết (5.12) thứ hai, pha hữu cơ để yên trong phễu chiết thứ nhất.

7.2.2 Thêm vào phễu chiết (5.12) thứ 2 hỗn hợp 10 ml etanol (4.4) và 40 ml n-hexan (4.10), lắc mạnh trong 1 min để cho tách pha.

Chuyển pha nước sang phễu chiết (5.12) thứ ba và pha hữu cơ sang phễu chiết thứ nhất.

7.2.3 Thêm vào phễu chiết (5.12) thứ 3 hỗn hợp 10 ml etanol (4.4) và 40 ml n-hexan (4.10), lắc mạnh trong 1 min để cho tách pha.

Chuyển pha hữu cơ sang phễu chiết thứ nhất.

7.2.4 Rửa dịch chiết pha hữu cơ ba lần, mỗi lần dùng 40 ml nước, lắc mạnh. Sau đó, rửa tiếp mỗi lần dùng 40 ml nước cho đến khi nước rửa cuối cùng không còn màu hồng với phenolphthalein. Loại bỏ hết nước bằng cách thêm khoảng 1 g natri sulfate khan (4.5), nếu chưa hết thêm tiếp natri sulfate khan (4.5).

CHÚ THÍCH 3:

Trong quá trình chiết, nếu dung dịch bị tạo nhũ thì thêm 1 ml dung dịch kali hydroxide (4.8) để phá nhũ

7.3 Làm bay hơi

Chuyển dịch chiết hữu cơ đã được loại nước (7.2.4) sang bình cô quay, lắp vào thiết bị cô quay, sau đó cô quay cách thủy ở nhiệt độ 50 °C cho đến khi không còn chất lỏng trong bình cô quay để loại hết dung môi n-hexan.

7.4. Pha loãng

Hòa tan cạn bằng metanol (4.1) và chuyển vào bình định mức dung tích 10 ml (5.2), định mức tới vạch bằng metanol (4.1), lọc qua màng lọc xyranh PTFE 0,45 µm (5.5).

7.5 Điều kiện phân tích

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

Tỷ lệ pha động: Axetonitril (4.2) : Metanol (4.1) = 50 : 50 theo thể tích

Bước sóng: 325 nm

Tốc độ dòng: 1 ml/min

Thể tích bơm mẫu: 20 µl

Nhiệt độ buồng cột: 25 °C

7.6 Dụng cụ chuẩn

Dụng cụ chuẩn (tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất chuẩn) của vitamin A tại 5 điểm có nồng độ tương ứng dung dịch chuẩn làm việc (4.13).

7.7 Xác định

Dùng xyranh (5.4) bơm 1 dung dịch chuẩn có nồng độ thấp nhất trong dãy dung dịch chuẩn làm việc (4.13) 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 (4.13) nồng độ từ thấp đến cao và dung dịch mẫu thử (7.4). Nếu nồng độ của mẫu thử nằm ngoài đường chuẩn thì điều chỉnh bằng cách pha loãng dung dịch mẫu thử bằng metanol (4.1).

8 Tính kết quả

Hàm lượng của vitamin A (retinol) trong mẫu, X , biểu thị bằng miligam trên kilogam (mg/kg), được tính theo công thức (1):

$$X = X_0 \times \frac{V}{m} \times P \quad (1)$$

Trong đó:

X_0 là nồng độ của retinol trong mẫu tính theo đường chuẩn, tính bằng miligam trên lít (mg/l);

V là thể tích dung môi pha loãng mẫu mililit (ml);

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

P là độ tinh khiết của chất chuẩn.

Hàm lượng của vitamin A ở các dạng muối hoặc este trong mẫu, Y , biểu thị bằng miligam trên kilogam (mg/kg), được tính theo công thức (2):

$$Y = X \times h \quad (2)$$

Trong đó: h là hệ số chuyển đổi

- $h=1,147$ với retinyl acetate
- $h=1,832$ với retinyl palmitate
- $h=1,196$ với retinyl propionate

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;

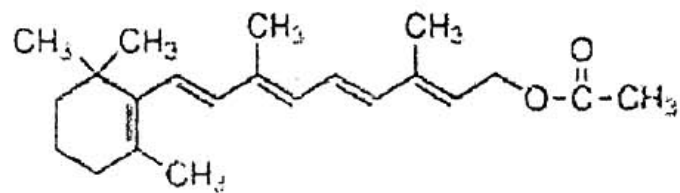
Phụ lục A

(Tham khảo)

Thông tin về hoạt chất vitamin A

A.1 Giới thiệu hoạt chất retinyl acetate

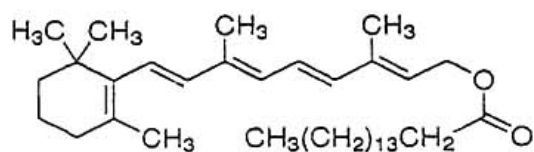
- Công thức cấu tạo:



- Tên hóa học: (2E,4E,6E,8E)-3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-yl acetate
- Công thức phân tử: C₂₂H₃₂O₂
- Khối lượng phân tử: 328,5 g/mol
- Nhiệt độ nóng chảy: 57 °C đến 58 °C
- Nhiệt độ sôi: 406,22 °C
- Độ hòa tan: Tan trong dầu ăn, clorofom, dietyl ete;
Không tan trong nước

A.2 Giới thiệu hoạt chất retinyl palmitate

- Công thức cấu tạo:

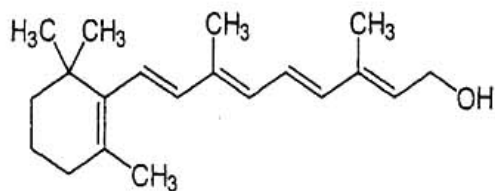


- Tên hóa học: (2E,4E,6E,8E)-3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenyl] hexadecanoate
- Công thức phân tử: $C_{38}H_{60}O_2$
- Khối lượng phân tử: 524,9 g/mol
- Nhiệt độ nóng chảy: 28 °C đến 29 °C
- Nhiệt độ sôi: 546,21 °C
- Độ hòa tan: Tan trong dầu ăn, clorofom, dietyl ete;

Không tan trong nước

A.3 Giới thiệu hoạt chất retinol

- Công thức cấu tạo:

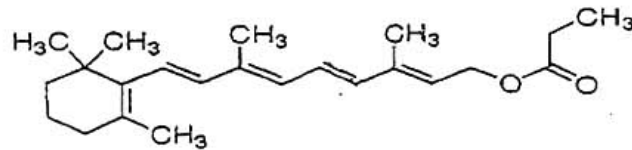


- Tên hóa học: (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol
- Công thức phân tử: $C_{20}H_{30}O$
- Khối lượng phân tử: 286,45 g/mol
- Nhiệt độ nóng chảy: 62 °C đến 64 °C
- Nhiệt độ sôi: 137 °C đến 138 °C
- Độ hòa tan: Tan trong dầu ăn, clorofom, dietyl ete;

Không tan trong nước

A.4 Giới thiệu hoạt chất retinyl propionate

Công thức cấu tạo:



- Tên hóa học: (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenyl] propanoate
- Công thức phân tử: $C_{23}H_{34}O_2$
- Khối lượng phân tử: 342,5 g/mol
- Nhiệt độ nóng chảy: 28 °C đến 29 °C
- Nhiệt độ sôi: 453,7 °C
- Độ hòa tan: Tan trong dầu ăn và chất béo, alcohols, hydrocarbons, clorofom, dietyl ete;

Không tan trong nước

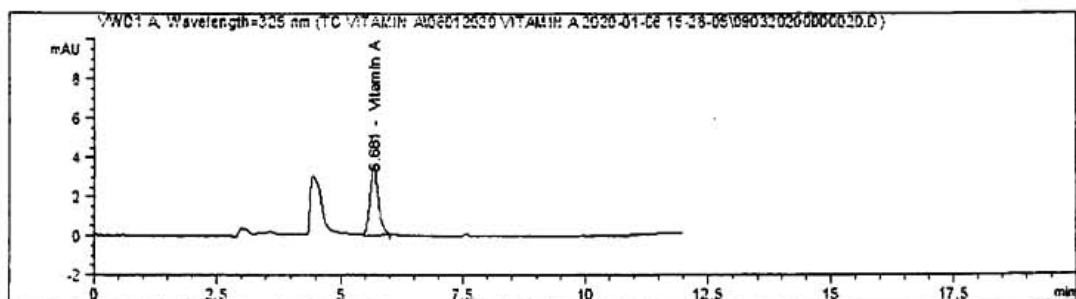
A.5 Hiệu suất thu hồi và giới hạn định lượng

- Hiệu suất thu hồi của phương pháp: từ 80 % đến 110 %.
- Giới hạn định lượng của phương pháp (LOQ):
- Vitamin A: 1mg/kg
- Độ lặp lại của phương pháp, CV \leq 5%.

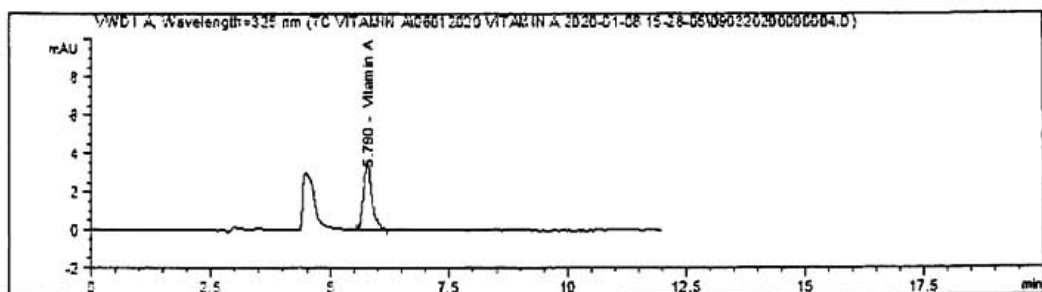
Phụ lục B

(Tham khảo)

Thông tin về sắc ký đồ điển hình của vitamin A



Hình 1: sắc ký đồ của chất chuẩn vitamin A 5 ppm



Hình 2: sắc ký đồ vitamin A trong nền phân bón

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 9486 : 2018, *Phân bón- Lấy mẫu*
 - [2] TCVN 12105 : 2018, *Phân bón vi sinh vật- Lấy mẫu*
 - [3] TCVN 11668: 2016, *Xác định vitamin A và vitamin E bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha thường*
 - [4] TCVN 8972-2: 2011 *Thực phẩm – Xác định vitamin A bằng sắc ký hiệu năng cao - Phần 1 Xác định 13-cis-retinol và tất cả các đồng phân trans-retinol*
 - [5] TCVN 7081-2: 2010, *Sữa bột gầy- Xác định vitamin hàm lượng vitamin A- Phần 2: Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*
-