

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13263-11:2021

Xuất bản lần 1

PHÂN BÓN –

**PHẦN 11: XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CHITOSAN BẰNG
PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ**

Fertilizers –

Part 11: Determination of chitosan content by spectrophotometric method

HÀ NỘI - 2021

Lời nói đầu

TCVN 13263-11:2021 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.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 13263 *Phân bón*, bao gồm các tiêu chuẩn sau.

TCVN 13263-1:2020, Phần 1: *Phân bón – Xác định hàm lượng vitamin A bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*

TCVN 13263-2:2020, Phần 2: *Phân bón – Xác định hàm lượng vitamin B bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*

TCVN 13263-3:2020, Phần 3: *Phân bón – Xác định hàm lượng vitamin C bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*

TCVN 13263-4:2020, Phần 4: *Phân bón – Xác định hàm lượng vitamin E bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*

TCVN 13263-5:2020, Phần 5: *Phân bón – Xác định hàm lượng nhóm auxins bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*

TCVN 13263-6:2020, Phần 6: *Phân bón – Xác định hàm lượng nhóm gibberellin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*

TCVN 13263-7:2020, Phần 7: *Phân bón – Xác định hàm lượng bo hòa tan trong nước bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử*

TCVN 13263-8:2020, Phần 8: *Phân bón – Xác định hàm lượng bo hòa tan trong axit bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử*

TCVN 13263-9:2020, Phần 9: *Phân bón – Xác định độ pH*

TCVN 13263-10:2020, Phần 10: *Phân bón – Xác định tỷ trọng*

TCVN 13263-11:2021, Phần 11: *Phân bón – Xác định hàm lượng chitosan bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử*

TCVN 13263-12:2021, Phần 12: *Phân bón – Xác định hàm lượng selen tổng số bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (kỹ thuật hydrua hóa)*

TCVN 13263-13:2021, Phần 13: *Phân bón – Xác định hàm lượng bạc tổng số bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa*

TCVN 13263-14:2021, Phần 14: *Phân bón – Xác định hàm lượng nhôm di động bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa*

TCVN 13263-15:2021, Phần 15: *Phân bón – Xác định hàm lượng natri tổng số bằng phương pháp quang phổ phát xạ ngọn lửa*

Phân bón –

Phần 11: Xác định hàm lượng chitosan bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử

Fertilizers –

Part 11: Determination of chitosan content by spectrophotometric method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng chitosan tổng số của các loại phân bón bằng phép đo quang phổ hấp thụ phân tử.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết khi áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng 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 bản sửa đổi, (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

Chitosan trong phân bón được chiết bằng dung dịch axit axetic 1 %. Chitosan trong dịch chiết được cắt mạch đề polyme hóa bằng natri nitrit tạo ra sản phẩm cuối chứa nhóm andehyde là 2,5-anhydro -D-mannose. Chất này phản ứng với axit thiobarbituric trong môi trường có khoảng pH = 6, tạo phức huỳnh quang màu hồng và được xác định bằng phép đo quang phổ hấp thụ phân tử tại bước sóng 555 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 và nước cất phù hợp với TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987) hoặc nước có độ tinh khiết tương đương (sau đây gọi là nước)

4.1 Chitosan tinh thể.

4.2 Axit axetic (CH_3COOH) đậm đặc ($d = 1,18$).

4.3 Natri nitrit (NaNO_2) tinh thể.

4.4 Natri hydroxit (NaOH) tinh thể.

4.5 Axit thiobarbituric ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) tinh thể.

4.6 Dung dịch axit axetic 1 % (theo thể tích)

Hút 10 mL axit axetic đậm đặc (4.2) hòa tan với khoảng 500 mL nước trong bình định mức dung tích 1000 mL. Thêm nước đến vạch định mức và lắc đều.

4.7 Dung dịch natri nitrit 0,5 mol/L

Hòa tan 3,45 g natri nitrit (4.3) trong 50 mL nước trong bình định mức dung tích 100 mL. Thêm nước đến vạch định mức và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ 0 °C đến 4 °C.

4.8 Dung dịch natri hydroxit 0,5 mol/L

Hòa tan 2,0 g natri hydroxit (4.4) trong 50 mL nước trong bình định mức dung tích 100 mL. Thêm nước đến vạch định mức và lắc đều. Dung dịch sau đó được chuyển sang bình nhựa để bảo quản.

4.9 Dung dịch axit thiobarbituric 0,04 mol/L

Cân 0,576 g axit thiobarbituric (4.5) cho vào bình tam giác dung tích 100 mL với khoảng 50 mL nước, đun nóng khoảng 15 min để tan hoàn toàn. Để nguội, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức dung tích 100 mL, thêm nước đến vạch định mức và lắc đều.

4.10 Dung dịch chuẩn gốc chitosan 1000 mg/L

Hòa tan 100 mg chitosan trong 50 mL dung dịch axit axetic 1 % (4.6) trong bình định mức dung tích 100 mL. Thêm dung dịch axit axetic 1 % (4.6) tới vạch mức, lắc đều, thu được dung dịch chuẩn chitosan 1000 mg/L.

4.11 Dung dịch chuẩn chitosan 500 mg/L

Dùng pipet (5.7) hút chính xác 50 mL dung dịch chuẩn gốc chitosan (4.10) cho vào bình định mức dung tích 100 mL, thêm dung dịch axit axetic 1 % (4.6) tới vạch mức, lắc đều, thu được dung dịch chuẩn chitosan 500 mg/L.

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 Thiết bị quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS), cuvet thủy tinh hoặc thạch anh 10 mm.
- 5.2 Cân phân tích, độ chính xác 0,0001 g.
- 5.3 Máy lắc có điều chỉnh tốc độ lắc.
- 5.4 Thiết bị ổn nhiệt có thể điều chỉnh nhiệt ở $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.5 Rây, đường kính lỗ 0,2 mm.
- 5.6 Giấy lọc, Whatman số 3 hoặc tương đương.
- 5.7 Pipet dung tích 1; 2; 5; 10; 50 mL có vạch chia đến 0,05 mL.
- 5.8 Micropipet dung tích 1,0; 5,0 mL sai số 0,001 mL
- 5.9 Bình định mức dung tích 5; 10; 25; 100; 500; 1000 mL.

6 Chuẩn bị mẫu

6.1 Lấy mẫu

Mẫu được lấy theo TCVN 9486:2018.

6.2 Chuẩn bị mẫu

6.2.1 Phân bón dạng rắn

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 10683:2015.

CHÚ THÍCH: Mẫu được trộn đều, nghiền nhỏ qua rây 0,2 mm, đựng trong chai kín.

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

Cân khoảng 0,1 g đến 5 g mẫu (tùy thuộc hàm lượng chitosan có trong mẫu) đã được chuẩn bị (6.2.1 và 6.2.2.2), chính xác đến 0,0001 g. Đối với mẫu dạng lỏng (6.2.2.1), dùng pipet (5.7) hút từ

TCVN 13263-11:2021

0,5 mL đến 5,0 mL dung dịch mẫu và cân chính xác đến 0,0001 g để xác định khối lượng (g), cho vào bình định mức dung tích 25 mL (V).

Thêm 15 mL dung dịch axit axetic 1 % (4.6), lắc với tốc độ 30 r/min đến 40 r/min trong khoảng 1 h để hòa tan mẫu.

Thêm axit axetic 1 % đến vạch mức, lắc đều. Lọc dung dịch qua giấy lọc (5.6), dung dịch thu được (A) để xác định chitosan.

Kiểm tra pH dung dịch mẫu bằng máy đo pH, nếu pH > 3,5 thì phải thực hiện lại phép thử với lượng cân nhỏ hơn.

7.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Pha loãng dung dịch A (nếu cần) bằng dung dịch axit axetic 1 % (4.6) để thu được dung dịch có nồng độ chitosan < 70 mg/L. Ghi lại hệ số pha loãng (k).

7.3 Chuẩn bị mẫu trắng

Chuẩn bị đồng thời mẫu trắng không có phân bón, tiến hành tương tự như mẫu thử.

7.4 Xác định hàm lượng chitosan bằng phép đo quang phổ hấp thụ phân tử

7.4.1 Đề polyme hóa mẫu

7.4.1.1 Dây dung dịch chuẩn

Dùng micropipet (5.8) hút chính xác 0; 0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 và 17,5 mL dung dịch chuẩn chitosan 500 mg/L (4.10) cho vào các bình định mức dung tích 25 mL.

Thêm theo thứ tự lần lượt 17,5; 17,25; 17,0; 16,25; 14,5; 12,5; 10,0; 7,5; và 5,0 mL dung dịch axit axetic 1 % (4.6).

Thêm tiếp 0,925 mL dung dịch natri nitrit 0,5 mol/L (4.7) lắc đều, sau đó để trong thiết bị ổn nhiệt (5.4) ở 80 °C trong 60 min, thỉnh thoảng lắc đều để phản ứng tốt hơn.

Để nguội đến nhiệt độ phòng, định mức bằng nước tới vạch, lắc đều. Các dung dịch này có nồng độ chitosan tương ứng là 0; 5; 10; 25; 50; 100; 150; 200; 250 và 350 mg/L.

7.4.1.2 Mẫu trắng, mẫu thử

Hút 17,5 mL dung dịch A đã được chuẩn bị theo 7.2, dung dịch mẫu trắng theo 7.3 cho vào bình định mức dung tích 25 mL, dùng micropipet (5.8) thêm 0,925 mL dung dịch natri nitrit 0,5 mol/L (4.7), lắc đều.

Ngâm trong thiết bị ổn nhiệt (5.4) ở 80 °C trong 60 min.

Để nguội, định mức bằng nước tới vạch, lắc đều. Dung dịch thu được (B) để phát triển màu xác định chitosan.

7.4.2 Phát triển màu

7.4.2.1 Dây dung dịch chuẩn

Sử dụng mười bình định mức dung tích 25 mL, dùng pipet (5.7) hút chính xác 5 mL dung dịch chuẩn đã được đề polyme hóa theo 7.4.1.1.

Thêm chính xác 1,1 mL dung dịch natri hydroxit 0,5 mol/L (4.8), lắc đều.

Thêm 18,9 mL dung dịch axit thiobarbituric 0,04 mol/L (4.9), lắc đều và để trong thiết bị ổn nhiệt (5.4) lần thứ hai ở 80 °C trong khoảng 60 min.

Để nguội đến nhiệt độ phòng, định mức bằng nước đến vạch mức, để ổn định phát triển màu trong khoảng 10 min.

Các dung dịch này có nồng độ chitosan tương ứng là 0; 1; 2; 5; 10; 20; 30; 40; 50 và 70 mg/L.

7.4.2.2 Mẫu trắng, mẫu thử

7.4.2.2.1 Mẫu thử

Chuẩn bị hai bình định mức dung tích 25 mL. Dùng pipet hút chính xác 5 mL dung dịch mẫu B (7.4.1.2) cho vào mỗi bình. Đo pH dung dịch trong bình thứ nhất, chỉnh pH dung dịch đến 6.5 bằng dung dịch NaOH 0.5 mol/L (4.8). Ghi lại thể tích V_1 . Loại bỏ bình thứ nhất.

Thêm vào bình thứ hai thể tích V_1 NaOH 0,5 mol/L (4.8) và thể tích V_2 nước ($V_2 = 1,1 - V_1$), lắc đều.

Tiếp tục vừa lắc vừa thêm 18,9 mL dung dịch axit thiobarbituric 0,04 mol/L (4.9), để trong thiết bị ổn nhiệt (5.4) lần thứ hai ở 80 °C trong khoảng 60 min.

Làm nguội đến nhiệt độ phòng, định mức bằng nước đến vạch mức và để ổn định trong 10 min.

7.4.2.2.2 Mẫu trắng

Dùng pipet hút chính xác 5 mL dung dịch mẫu trắng (7.4.1.2) cho vào bình định mức dung tích 25 mL. Thêm 1,1 mL dung dịch natri hydroxit 0,5 mol/L (4.8), lắc đều.

Vừa lắc vừa thêm 18,9 mL dung dịch axit thiobarbituric 0,04 mol/L (4.9), để trong thiết bị ổn nhiệt (5.4) lần thứ hai ở 80 °C trong khoảng 60 min.

Làm nguội đến nhiệt độ phòng, định mức bằng nước đến vạch mức và để ổn định trong 10 min.

7.4.3 Xác định độ hấp thụ quang của dung dịch chuẩn, mẫu thử và mẫu trắng bằng UV – VIS tại bước sóng 555 nm

Kiểm tra và cài đặt các thông số của thiết bị UV-VIS theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khởi động thiết bị trước khi đo ít nhất 15 min cho thiết bị ổn định.

Xây dựng đường chuẩn: Đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 555 nm của dãy dung dịch chuẩn chitosan đã được phát triển màu theo 7.4.2.1.

TCVN 13263-11:2021

Xác định độ hấp thụ quang tại bước sóng 555 nm của dung dịch mẫu thử đã được phát triển màu theo 7.4.2.2.1 và mẫu trắng đã được phát triển màu theo 7.4.2.2.2 từ đường chuẩn thu được.

8 Biểu thị kết quả

Hàm lượng chitosan (X) trong mẫu phân bón, tính bằng mg/kg, theo công thức sau.

$$X(\text{mg / kg}) = \frac{(C_1 - C_0) \times f \times V}{m}$$

trong đó

- C_1 là hàm lượng chitosan đo được trong mẫu thử được tính từ đường chuẩn, tính bằng miligam trên lit (mg/L);
- C_0 là hàm lượng chitosan đo được trong mẫu trắng được tính từ đường chuẩn, tính bằng miligam trên lit (mg/L);
- m là khối lượng mẫu cân, tính bằng gam (g);
- k là hệ số pha loãng;
- V là tổng thể tích mẫu thử, tính bằng mililit (mL).

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 10 % so với giá trị trung bình.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm cần có đầy đủ những 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.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] *A New Rapid and Sensitive Spectrophotometric Method for Determination of a Biopolymer Chitosan, International Journal of Carbohydrate Chemistry Volume 2012, Article ID 139328, 7 pages (Phương pháp quang phổ nhạy và nhanh mới để xác định biopolime chitosan, Tạp chí quốc tế về hóa học cacbonhydrat Vol 2012, số định dạng bài báo 139328, 7 trang)*
-