

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 13263-3:2020**

Xuất bản lần 1

**PHÂN BÓN –**

**PHẦN 3: XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VITAMIN C  
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Fertilizers –*

*Part 3: Determination of vitamin C by high performance liquid chromatographic method*

**HÀ NỘI - 2020**

## Lời nói đầu

TCVN 13263-3 : 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.

## **Phân bón – Phần 3: Xác định hàm lượng vitamin C bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao**

*Fertilizers – Part 3: Determination of vitamin C by high performance liquid chromatographic method*

### **1 Phạm vi áp dụng**

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

Thông tin giới thiệu hoạt chất vitamin C 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 C trong mẫu phân bón được chiết bằng nước khi có mặt hydrazin. Sau đó được xác định bằng 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.

## TCVN 13263-3 : 2020

4.1 **Chất chuẩn axit L-ascorbic** (vitamin C), đã biết hàm lượng, được chứng nhận.

4.2 **Axetonitril** ( $C_2H_3N$ ), dùng cho sắc ký lỏng.

4.3 **Metanol** ( $CH_4O$ ), dùng cho sắc ký lỏng.

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

4.5 **Dung dịch đệm axit axetic**, nồng độ khoảng 1%.

Dùng pipet (5.3) lấy 10 ml axit axetic băng (4.4) cho vào cốc dung tích 2000 ml (5.1) có chứa sẵn 990 ml nước cất. Siêu âm 10 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.6 **Hydrazin** ( $N_2H_4$ ), tinh khiết phân tích

4.7 **Dung dịch hydrazin**, nồng độ khoảng 10 mg/ml

Dùng cân kỹ thuật (5.8) cân khoảng 1,0 g hydrazin (4.6), chính xác đến 0,001 g vào bình định mức dung tích 100 ml (5.2), định mức đến vạch bằng axetonitril (4.2), lắc cho tan hết.

4.8 **Dung dịch chuẩn gốc**, nồng độ khoảng 1000 ppm

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn vitamin C (4.1), 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 hydrazin (4.7), thêm 4 ml axetonitril (4.2) hoà tan và định mức đến vạch bằng nước, lắc cho tan hết.

4.9 **Dung dịch chuẩn trung gian vitamin C**, nồng độ khoảng 100 ppm

Dùng pipet (5.3) hút chính xác 2 ml dung dịch chuẩn gốc vitamin C (4.8) vào bình định mức dung tích 20 ml (5.2), thêm 1 ml dung dịch hydrazin (4.7), thêm 4 ml axetonitril, định mức đến vạch bằng nước, lắc đều.

4.10 **Dãy dung dịch chuẩn làm việc vitamin C**, nồng độ khoảng 5; 10; 20; 50; 80 ppm

Dùng pipet (5.3) hút chính xác lần lượt 0,5; 1; 2; 5; 8 ml dung dịch chuẩn trung gian (4.9) vào lần lượt 5 bình định mức dung tích 10 ml, định mức đến vạch bằng nước, lắc đều.

### CHÚ THÍCH 1:

- 1) Dung dịch chuẩn được lưu giữ trong bình tối màu và bảo quản mát từ 2 °C đến 4 °C
- 2) Dung dịch chuẩn gốc, dung dịch chuẩn làm việc nên dùng ngay sau khi pha loãng

## 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; 2000 ml.
- 5.2 Bình định mức, dung tích 10 ml; 20 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  $\mu$ l, chia vạch đến 1  $\mu$ l. hoặc bơm mẫu tự động
- 5.5 Màng lọc xyranh PTFE, có đường kính lỗ 0,45  $\mu$ 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 Cối nghiền mẫu, bằng sứ hoặc vật liệu tương đương

### 5.10 Thiết bị lọc

Dùng được cho màng lọc dung môi đường kính 13 mm, đường kính lỗ 0,45  $\mu$ 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 Xyranh lọc mẫu, dung tích 1 ml dùng cho màng lọc xyranh PTFE (5.5)

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

## 6 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

## TCVN 13263-3 : 2020

### 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

- Nghiền mẫu bằng cối sứ hoặc 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 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Dùng cân phân tích (5.7) cân 02 lượng cân mẫu thử khoảng 2 g, chính xác đến 0,0001 g vào vào bình định mức 20 ml (5.2), dùng pipet thêm 1 ml dung dịch hydrazin (4.6), thêm 4 ml axetonitril định mức đến vạch bằng nước. Lắc mạnh cho tan hết, lọc qua màng 0,45  $\mu\text{m}$  (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:

Tỷ lệ pha động:

t (min)	Metanol (4.3) (% theo thể tích)	Axit axetic 1% (4.5) (% theo thể tích)
0	3	97
7	3	97
10	70	30
17	3	97

Bước sóng: 270 nm

Tốc độ dòng: 1 mL/min

Thể tích bơm mẫu: 20  $\mu$ l

Nhiệt độ buồng cột: 25°C

### 7.3 Dụng cụ chuẩn

Dụng cụ chuẩn (tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất chuẩn) của vitamin tại 5 điểm có nồng độ tương ứng dung dịch chuẩn làm việc (4.10).

### 7.4 Xác định

Dùng xyranh (5.5) bơm 1 dung dịch chuẩn trong dây dung dịch chuẩn làm việc (4.15) cho đến khi số đo diện tích của pic mẫu chuẩn thay đổi không lớn hơn 1 %. Sau đó, bơm lần lượt dung dịch chuẩn làm việc (4.15) và dung dịch mẫu thử (8.1), lặp lại 2 lần ( số đo diện tích của pic mẫu chuẩn thay đổi không lớn hơn 1 % 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.

## 8 Tính kết quả

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

$$X = X_0 \times \frac{V}{m} \times P$$

trong đó:

$X_0$  là nồng độ của vitamin C trong mẫu tính theo đường chuẩn, tính bằng miligam trên lit (mg/l);

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

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

$P$  là độ tinh khiết của chất chuẩn

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:

- mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng;
- phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;

**TCVN 13263-3 : 2020**

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;



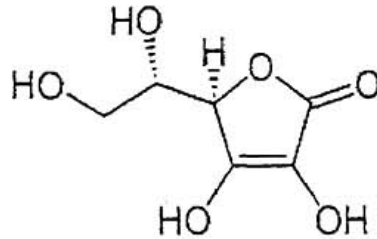
## Phụ lục A

(Tham khảo)

## Thông tin về hoạt chất vitamin C

## A.1 Giới thiệu hoạt chất vitamin C

- Công thức cấu tạo:



- Tên hóa học: *L-threo*-Hex-2-enono-1,4-lactone or (*R*)-3,4-Dihydroxy-5-((*S*)-1,2-dihydroxyethyl)furan-2(*5H*)-one
- Công thức phân tử:  $C_6H_8O_6$
- Khối lượng phân tử: 176,1
- Nhiệt độ nóng chảy: 190 °C đến 192 °C

**TCVN 13263-3 : 2020**

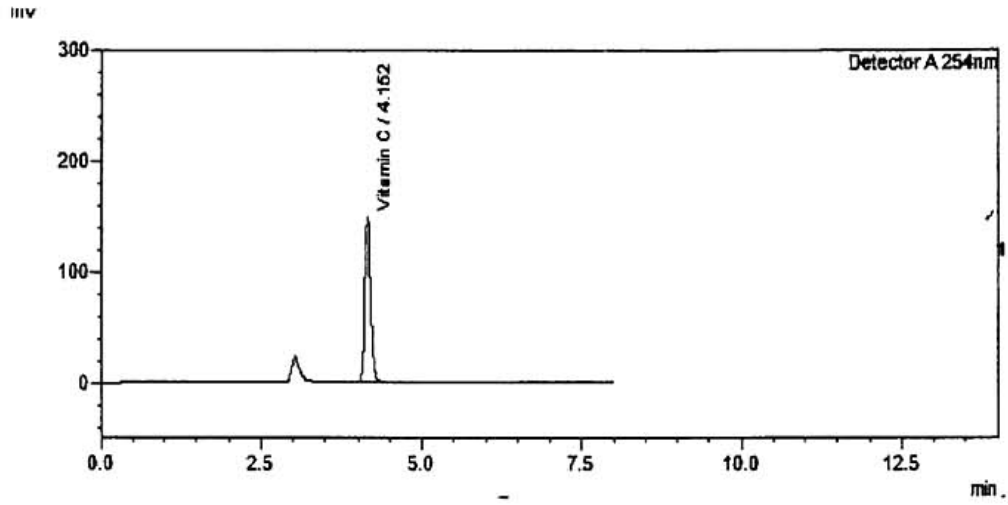
**A.2 Hiệu suất thu hồi và giới hạn định lượng**

- Hiệu suất thu hồi của phương pháp: từ 70 % đến 120 %.
- Giới hạn định lượng của phương pháp (LOQ):
- Vitamin C: 50 mg/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 C



### 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] Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation, Vítor Spínola, *Journal of Chromatography A*, 1369 (2014) 2–17
  - [4] Chromatographic determination of vitamins in foods, Anna Rizzolo, *ournal of Chromatography*, 624 (1992) 103-1 52
-