

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13263-4:2020

Xuất bản lần 1

PHÂN BÓN –

**PHẦN 4: XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VITAMIN E
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Fertilizers – Part 4: Determination of vitamin E content by high performance liquid
chromatographic method*

HÀ NỘI - 2020

Lời nói đầu

TCVN 13263-4 : 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 4: Xác định hàm lượng vitamin E bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Fertilizers –Part 4: Determination of vitamin E content by high performance liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng vitamin E ở dạng (\pm)- α -Tocopherol trong phân bón bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Thông tin giới thiệu hoạt chất vitamin E 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

(\pm)- α -Tocopherol trong phân bón được xử phòng hóa bằng dung dịch kali hydroxit trong etanol hoặc trong metanol. (\pm)- α -Tocopherol được chiết bằng n-hexan. Sau đó được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sử dụng cột pha đảo với detector tử ngoại (DAD, MWD, PDA,... hoặc tương đương), ở bước sóng 280 nm. 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 Chất chuẩn (\pm)- α -Tocopherol (vitamin E), 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 Natri sulfat khan (Na_2SO_4), tinh khiết phân tích

4.5 Etanol (C_2H_5OH) 96 %, tinh khiết phân tích

4.6 Kali hydroxide (KOH), tinh khiết phân tích

4.7 Dung dịch kali hydroxide, 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.

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

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 (4.8), chính xác đến 0,001 g vào bình định mức dung tích 20 ml (5.2), định mức đến vạch bằng metanol (4.3).

4.10 n-hexan (C_6H_{14}), tinh khiết phân tích

4.11 Dung dịch chuẩn

4.11.1 Dung dịch chuẩn gốc, nồng độ khoảng 1000 ppm

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn vitamin E (4.1), chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức dung tích 10 ml (5.2), thêm 1 ml dung dịch butylat hydroxytoluen (4.9), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol(4.3). Đặt vào bể siêu âm, siêu âm 1 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.11.2 Dung dịch chuẩn trung gian, 100 ppm

Dùng pipet (5.3) hút chính xác 2 ml dung dịch chuẩn gốc (4.11.1) vào bình định mức dung tích 20 ml (5.2), thêm 1 ml dung dịch hydroxytoluen đã butyl hóa (4.9), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol(4.3). Đặt vào bể siêu âm, siêu âm trong 1 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.11.3 Dãy dung dịch chuẩn làm việc, nồng độ khoảng 2; 5; 10; 20; 50; 80 ppm

Dùng pipet (5.3) lấy chính xác lần lượt 0,2; 0,5; 1; 2; 5 ml dung dịch chuẩn trung gian (4.11.2) vào lần lượt bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng metanol. Đặt vào bể siêu âm, siêu âm trong 1 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

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 nên sử dụng trong vòng một tháng kể từ khi pha, dung dịch chuẩn làm việc nên dùng ngay sau khi pha loãng
- 3) Phải kiểm tra đánh giá chuẩn trước khi sử dụng
- 4) Nếu sử dụng cân có độ chính xác 0,0001 gam thì lượng cân của chuẩn và mẫu phải tăng lên 10 lần

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 250 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 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 dung môi 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

TCVN 13263-4 : 2020

5.12 Phễu chiết, dung tích 250 ml, có nắp polytetrafluoetylen

5.13 Cối nghiền mẫu, bằng sứ hoặc vật liệu tương đương

5.14 Xyranh lọc mẫu, dung tích 1 ml dùng cho màng lọc xyranh PTFE (5.5)

5.15 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 µm 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 như mục (6.2) vào bình xà phòng hóa (5.11), thêm 20 ml dung dịch KOH để xà phòng hóa (4.7), 1 ml dung dịch hydroxytoluen đã butyl hóa (4.9) và 50 ml etanol (4.5) lắc đều.

7.1.2 Chưng cất hồi lưu 30 min trên nồi cách thủy (5.11) 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 30 ml nước, 10 ml etanol (4.5) 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 (4.5) và 40 ml n-hexan (4.10), lắc mạnh trong 1 min để hai pha được tách riêng biệt

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

7.2.3 Thêm vào phễu chiết (5.12) thứ 3 hỗn hợp 10 ml etanol (4.5) và 40 ml n-hexan (4.10), lắc mạnh trong 1 min để hai pha được tách riêng biệt

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 (4.4), nếu chưa hết thêm tiếp natri sulfate khan (4.4).

CHÚ THÍCH 3:

Trong quá trình chiết, nếu dung dịch bị tạo nhũ thì thêm 1 ml dung dịch kali hydroxide (4.7) 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 (4.3) và chuyển vào bình định mức dung tích 10 ml (5.2), định mức tới vạch bằng metanol (4.3), lọc qua màng lọc xyranh PTFE 0,45 µm (5.5).

TCVN 13263-4 : 2020

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 (4.3) = 50 : 50 (theo thể tích)

Bước sóng: 280 nm

Tốc độ dòng: 1,5 ml/min

Thể tích bơm mẫu: 20 μ l

Nhiệt độ buồng cột: 25°C

7.6 Dựng đường chuẩn

Dựng đường chuẩn (tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất chuẩn) của vitamin E tại 5 điểm có nồng độ tương ứng dung dịch chuẩn làm việc (4.11.3).

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 (4.11.3) 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 (4.11.3) 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 (4.3).

8 Tính kết quả

Hàm lượng của vitamin E ((\pm)- α -Tocopherol) 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 (\pm)- α -Tocopherol trong mẫu tính theo đường chuẩn, tính bằng miligam trên lit (mg/l);

V là thể tích dung môi pha loãng mẫu millilit (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:

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;

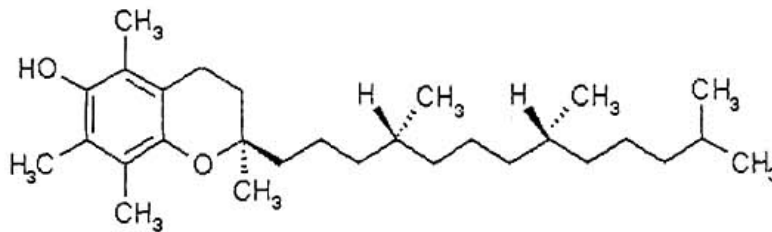
Phụ lục A

(Tham khảo)

Thông tin về hoạt chất vitamin E

A.1 Giới thiệu hoạt chất vitamin E

- Công thức cấu tạo:



- Tên hóa học: (2*R*)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(4*R*,8*R*)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol
- Công thức phân tử: $C_{29}H_{50}O_2$
- Khối lượng phân tử: 430,7 g/mol
- Nhiệt độ nóng chảy: 3 °C
- Độ hòa tan ở 25 °C trong
 - Nước $1,9 \times 10^{-6}$ mg/L
 - Tan tốt trong các dung môi hữu cơ như n-hexan, metanol...
- Hình dạng bên ngoài: Chất lỏng màu cánh gián

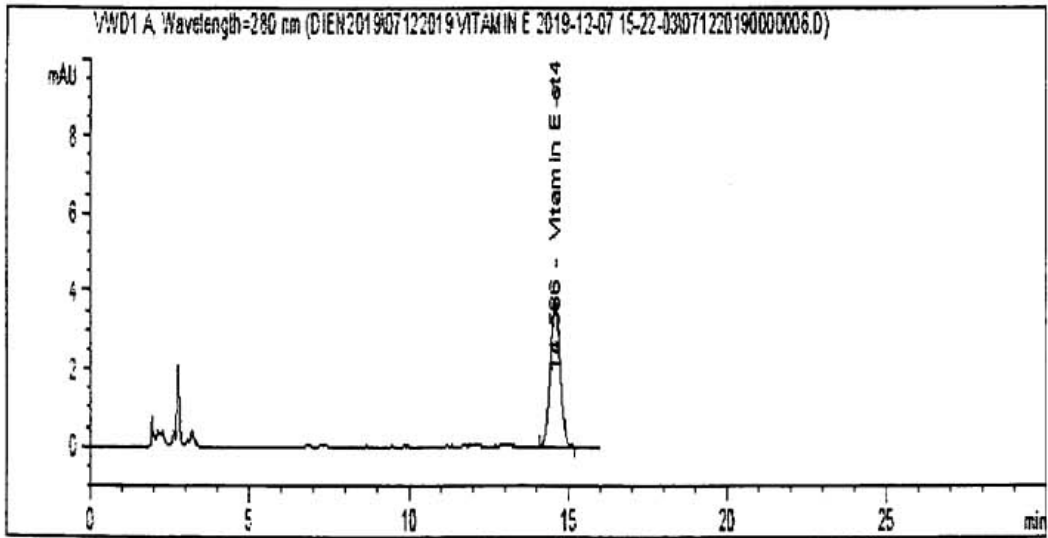
A.2 Hiệu suất thu hồi và giới hạn định lượng

- Hiệu suất thu hồi của phương pháp: từ 80 % đến 110 %.
- Giới hạn định lượng của phương pháp (LOQ):
- Vitamin E: 10 mg/kg
- Độ lặp lại của phương pháp, CV \leq 5%.

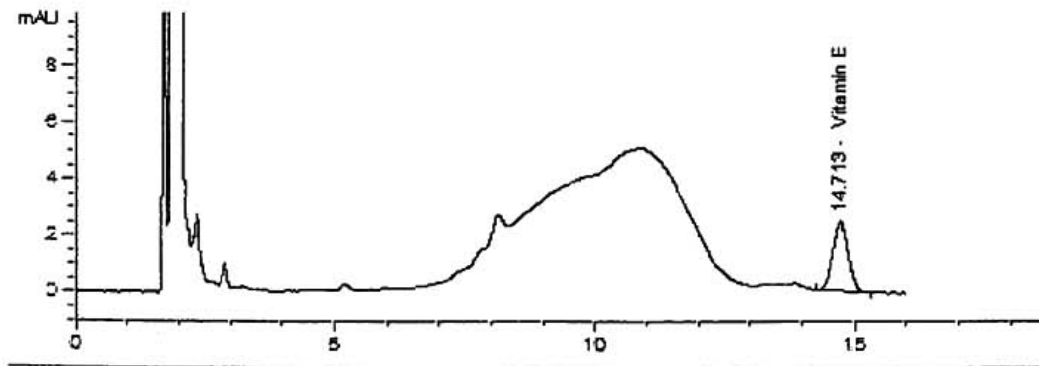
Phụ lục B

(Tham khảo)

Thông tin về sắc ký đồ điển hình của vitamin A



Hình 1: sắc ký đồ của chất chuẩn vitamin E



Hình 2: sắc ký đồ của mẫu có chứa vitamin E

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 8276: 2010, *Thực phẩm – xác định hàm lượng vitamin E bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao*
 - [2] TCVN 9486 : 2018, *Phân bón- Lấy mẫu*
 - [3] TCVN 12105 : 2018, *Phân bón vi sinh vật- Lấy mẫu*
 - [4] CRL evaluation Report on the Analytical Method submitted in connection with the Application for Authorisation as a Feed additive according to Regulation (EC) 1831/2003
-