

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13263-6:2020

Xuất bản lần 1

**PHÂN BÓN – PHẦN 6: XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
NHÓM GIBBERELLIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Fertilizers – Part 6: Determination of gibberellin group content by high
performance liquid chromatographic method*

HÀ NỘI - 2020

Lời nói đầu

TCVN 13263-6 : 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 6: Xác định hàm lượng nhóm gibberellin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Fertilizer – Part 6: Determination of gibberellin group content by high performance liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng gibberellin (A_3 , A_4 , A_7) trong phân bón bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Thông tin giới thiệu hoạt chất nhóm gibberellin xem Phụ lục A.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây là cần thiết để áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên 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 sửa đổi, bổ sung (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

Gibberellin trong phân bón được chiết bằng metanol. 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 206 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.

TCVN 13263-6 : 2020

4.1 Chất chuẩn gibberellin A₃ (C₁₉H₂₂O₆), đã biết hàm lượng, được chứng nhận.

4.2 Chất chuẩn gibberellin A₄ (C₁₉H₂₄O₅), đã biết hàm lượng, được chứng nhận.

4.3 Chất chuẩn gibberellin A₇ (C₁₉H₂₂O₅), đã biết hàm lượng, được chứng nhận.

4.4 Metanol (CH₃OH), dùng cho sắc ký lỏng.

4.5 Axit phosphoric (H₃PO₄), dùng cho sắc ký lỏng.

4.6 Pha động

Cho 650 ml nước vào cốc có dung tích 1000 ml (5.1) đặt vào máy đo pH (5.9), dùng axit phosphoric (4.5) điều chỉnh về pH = 3, thêm 350ml metanol (4.4) dùng đũa thủy tinh (5.13) khuấy đều, đặt vào bể siêu âm (5.6) siêu âm 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.7 Dung dịch chuẩn

4.7.1 Dung dịch chuẩn gốc gibberellin A₃, nồng độ khoảng 1000 ppm

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn gibberellin A₃ (4.1), chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức dung tích 10 ml (5.2), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.4). Đặt vào bể siêu âm (5.6) siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.7.2 Dung dịch chuẩn gốc gibberellin A₄, nồng độ khoảng 1000 ppm

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn gibberellin A₄ (4.2), chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức dung tích 10 ml (5.2), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.4). Đặt vào bể siêu âm (5.6) siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.7.3 Dung dịch chuẩn gốc gibberellin A₇, nồng độ khoảng 1000 ppm

Dùng cân phân tích (5.7) cân khoảng 0,01 g chất chuẩn gibberellin A₇ (4.3), chính xác đến 0,00001 g vào bình định mức dung tích 10 ml (5.2), hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.4). Đặt vào bể siêu âm (5.6) siêu âm trong 5 min, để nguội đến nhiệt độ phòng.

4.7.4 Dung dịch chuẩn trung gian, nồng độ khoảng 100 ppm

Dùng pipet (5.3) hút chính xác 1ml dung dịch chuẩn gốc gibberellin A₃ (4.7.1); 1ml dung dịch chuẩn gốc gibberellin A₄ (4.7.2) và 1ml dung dịch chuẩn gốc gibberellin A₇ (4.7.3) vào bình định mức dung tích 10ml (5.2) định mức tới vạch bằng metanol (4.4), lắc đều.

4.7.5 Dung dịch chuẩn làm việc, nồng độ khoảng 1; 2; 4; 6; 8 ppm

Dùng pipet hút chính xác 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ml dung dịch chuẩn trung gian (4.7.4) vào bình định mức dung tích 10ml (5.2) định mức đến vạch bằng metanol (4.4), lắc đều.

- 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 20ml; 50ml; 1000 ml.
- 5.2 Bình định mức, dung tích 10 ml; 100 ml.
- 5.3 Pipet chia vạch, dung tích 0,5 ml; 1 ml, 2 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 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.
- 5.9 Máy đo pH, khoảng đo pH: từ 0,0 đến 14,0, độ phân giải: 0,1 pH
- 5.10 Cối nghiền mẫu, bằng sứ hoặc vật liệu tương đương
- 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;
 - Bộ 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;

TCVN 13263-6 : 2020

- Bộ bơm mẫu tự động hoặc bơm mẫu bằng tay.

5.13 Đũa thủy tinh

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 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Dùng cân phân tích (5.7) cân 02 phần mẫu thử mỗi phần khoảng 2 g, chính xác đến 0,0001 g đã được chuẩn bị theo mục (6.2) vào cốc dung tích 50 ml (5.1), thêm 10 ml metanol (4.4). Đặt vào bể siêu âm (5.6) siêu âm khoảng 5 min, chuyển vào bình định mức dung tích 20 ml (5.2), tráng rửa 2 lần mỗi lần 3 ml metanol (4.4), định mức đến vạch bằng metanol (4.4). Để nguội đến nhiệt độ phòng, lọc qua màng lọc xyranh PTFE 0,45 μm (5.5) trước khi bơm vào thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao.

7.2 Điều kiện phân tích

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

Pha động: Theo (4.6)

Bước sóng: 206 nm

Tốc độ dòng: 1,0 mL/min

Thể tích bơm mẫu: 20 μl

Nhiệt độ buồng cột: 40 °C

7.3 Dụng cụ chuẩn

Dụng cụ chuẩn (tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất chuẩn) của gibberellin tại 5 điểm có nồng độ tương ứng dung dịch chuẩn làm việc (4.7.5).

7.4 Xác định

Dùng xyranh (5.4) bơm 1 dung dịch chuẩn có nồng độ thấp nhất trong dãy dung dịch chuẩn làm việc (4.7.5) 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 (4.7.5) nồng độ từ thấp đến cao và dung dịch mẫu thử (7.1). Nếu nồng độ của mẫu thử nằm ngoài đường chuẩn thì điều chỉnh bằng cách pha loãng dung dịch mẫu thử bằng methanol (4.4).

8 Tính kết quả

Hàm lượng của từng loại gibbellerin trong mẫu, X_i , biểu thị bằng miligam trên kilogram (mg/kg), được tính theo công thức 1:

$$X_i = X_{oi} \times \frac{V}{m} \times p_i \quad (1)$$

Hàm lượng hoạt chất gibbellerin trong mẫu là tổng hàm lượng các loại gibbellerin được qui định trong mục 1, X , biểu thị bằng miligam trên kilogram (mg/kg), được tính theo công thức 2:

$$X = \frac{V}{m} (\sum X_{oi} \times p_i) \quad (2)$$

trong đó:

X_{oi} là nồng độ của phần mẫu thử khi bơm vào máy 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

Kết quả thử nghiệm thu được, với 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;

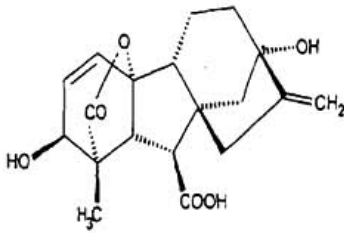
Phụ lục A

(Tham khảo)

Thông tin về hoạt chất gibberellin

A.1 Giới thiệu hoạt chất gibberellin A₃

- Công thức cấu tạo

- Tên hoạt chất: gibberellic acid A₃

- Tên hoá học: IUPAC (3S,3aS,4S,4aS,7S,9aR,9bR,12S)-7,12-Dihydroxy-3-methyl-6-methylene-2-oxoperhydro-4a,7-methano-9b,3-propenoazuleno[1,2-b]furan-4-carboxylic acid.

- Công thức phân tử: C₁₉H₂₂O₆

- Khối lượng phân tử: 346,38 g/mol

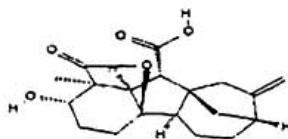
- Nhiệt độ nóng chảy: 233 °C đến 235 °C

- Độ hòa tan trong nước: 5 g/L (20 °C)

TCVN 13263-6 : 2020

A.2 Giới thiệu hoạt chất gibberellin A₄

- Công thức cấu tạo



- Tên hoạt chất: gibberellic acid A₄

- Tên hoá học: IUPAC (1R,2R,5R,8R,9S,10R,11S,12S)-12-hydroxy-11-methyl-6-methylidene-16-oxo-15-oxapentacyclo heptadecane-9-carboxylic acid

- Công thức phân tử: C₁₉H₂₄O₅

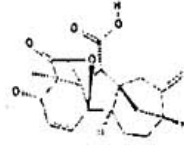
- Khối lượng phân tử: 332,4 g/mol

- Độ hòa tan trong metanol: 50 mg/ml

-Dạng bên ngoài: Bột, màu trắng

A.3 Giới thiệu hoạt chất gibberellic acid A₇

- Công thức cấu tạo:



- Tên hoạt chất: gibberellic acid A₇

- Tên hoá học: IUPAC (1R,2R,5R,8R,9S,10R,11S,12S)-12-hydroxy-11-methyl-6-methylidene-16-oxo-15-oxapentacyclo heptadec-13-ene-9-carboxylic acid

- Công thức phân tử: C₁₉H₂₂O₅

- Khối lượng phân tử: 330,4 g/mol

- Độ hòa tan trong nước: 0,95 g/L

A.4 Hiệu suất thu hồi và giới hạn định lượng

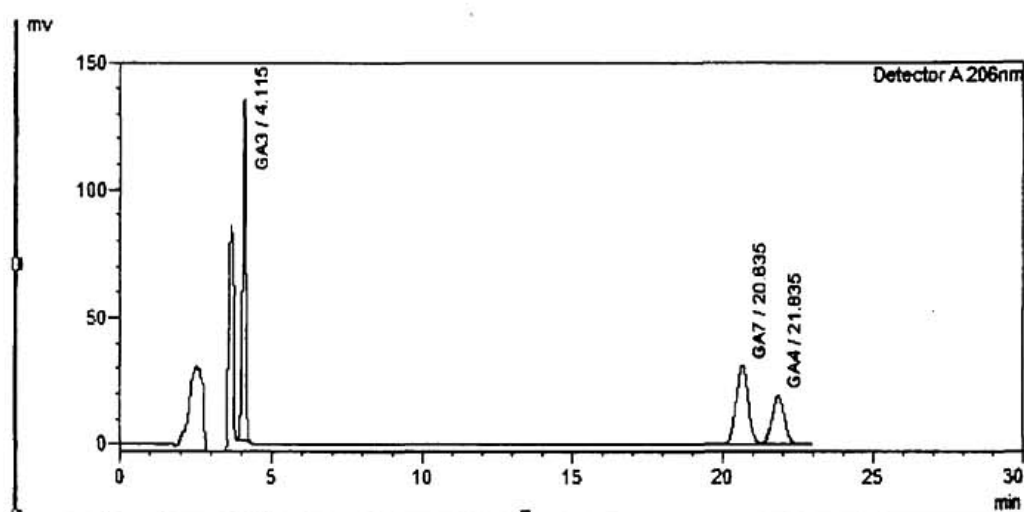
- Hiệu suất thu hồi của phương pháp: từ 80 % đến 110 %.
- Giới hạn định lượng của phương pháp (LOQ):
 - Gibberellic acid A₃: 10 mg/kg
 - Gibberellic acid A₄: 10 mg/kg
 - Gibberellic acid A₇: 10 mg/kg
- Độ lặp lại của phương pháp $\leq 5\%$.

Phụ lục B

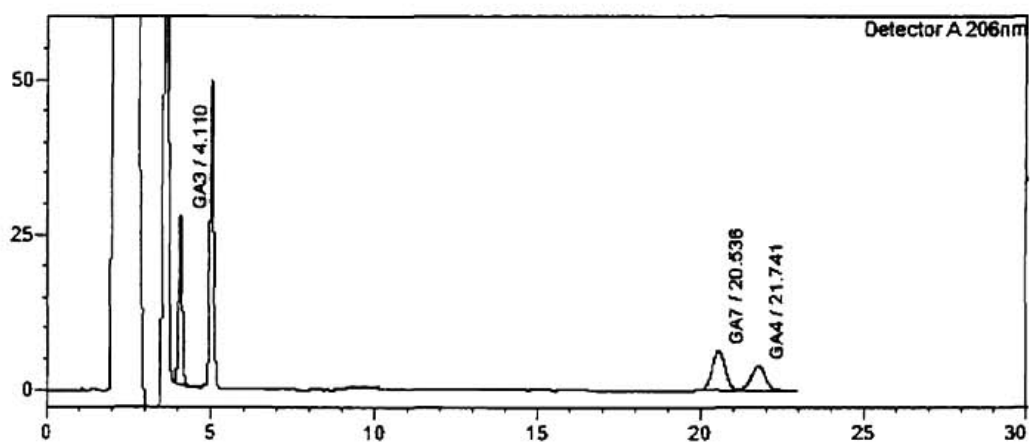
(Tham khảo)

Thông tin về sắc ký đồ điện hình của gibberellin

- Sắc ký đồ điện hình của gibberellin A3, A4, A7



Hình 1: Sắc ký đồ của chất chuẩn gibberellin A₃, A₄, A₇



Hình 2: Sắc ký đồ của mẫu thêm chuẩn gibberellin A₃, A₄, A₇

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] Physical Differences between Gibberellins GA3, GA4 and GA7
 - [4] The stability of express gibberelic acid in combination with liquid urea
 - [5] "Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains", *Environ Monit Assess*, DOI 10.1007/s10661-009-1068-5.
 - [6] "Stable Isotope Dilution Analysis of Gibberellin Residues in Tomato Paste by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *Chem.Res.Chinese universities* 2012, 28(5), 797-801.
-