

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 13759:2023**

Xuất bản lần 1

**PHÂN BÓN –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG DICYANDIAMID BẰNG  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LÒNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

*Fertilizers – Determination of dicyandiamide content by high performance liquid chromatography (HPLC)*

**HÀ NỘI – 2023**

**Lời nói đầu**

**TCVN 13759:2023** 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.

## **Phân bón – Xác định hàm lượng dicyandiamide bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

*Fertilizers – Determination of dicyandiamide content by high performance liquid chromatography (HPLC)*

### **1 Phạm vi áp dụng**

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

### **2 Tài liệu viện dẫn**

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

Dicyandiamide trong phân bón được chiết bằng metanol, sau đó xác định bằng HPLC với cột tách pha đảo C18, detector UV ở bước sóng 215 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 dùng cho HPLC và nước cất hai lần phù hợp với TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987) hoặc nước có độ tinh khiết tương đương (độ dẫn điện < 10  $\mu$ S), sau đây gọi là nước.

4.1 Metanol (CH<sub>3</sub>OH), dùng cho HPLC.

4.2 Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN), dùng cho HPLC.

4.3 Dicyandiamide (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>), chất chuẩn có chứng nhận kỹ thuật.

4.4 Dung dịch chuẩn dicyandiamide 1 mg/mL

Dùng cân phân tích (5.1) cân 50 mg dicyandiamide (4.3) vào cốc dung tích 50 mL, thêm một lượng nhỏ dung dịch metanol (4.1) để hòa tan. Chuyển vào bình định mức dung tích 50 mL, thêm dung môi đến vạch định mức và lắc đều. Dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh và sử dụng trong 6 tháng.

4.5 Dung dịch chuẩn dicyandiamide 0,1 mg/mL

Dùng pipet hút chính xác 5 mL dung dịch chuẩn dicyandiamide (4.4) vào bình định mức dung tích 50 mL. Thêm dung dịch metanol (4.1) đến vạch định mức và lắc đều.

4.6 Dung dịch chuẩn làm việc dicyandiamide

Pha dãy dung dịch chuẩn làm việc của dicyandiamide trong dung dịch metanol (4.1).

Sử dụng sáu bình định mức dung tích 25 mL, cho vào mỗi bình thứ tự số mililit dung dịch chuẩn dicyandiamide 0,1 mg/mL (4.5) và dung dịch metanol (4.1) vừa đủ 25 mL, thu được dãy dung dịch chuẩn dicyandiamide (xem Bảng 1)

Tùy thuộc vào điều kiện trang thiết bị và hàm lượng nhóm dicyandiamide trong mẫu thử để xây dựng đường chuẩn sao cho phù hợp.

**Bảng 1 – Dãy dung dịch chuẩn dicyandiamide nồng độ từ 10 µg/L đến 50 µg/L**

Số hiệu bình	S0	S1	S2	S3	S4	S5
Thể tích dung dịch chuẩn dicyandiamide 0,1 mg/mL (4.5) lấy vào mỗi bình (mL)	0	2,5	5	7,5	10	12,5
Thể tích metanol (4.1) thêm đến vạch định mức (mL)	25	22,5	20	17,5	15	12,5
Nồng độ dung dịch chuẩn dicyandiamide thu được (µg/L)	0,00	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0

Phải bảo quản dung dịch chuẩn trong bình thủy tinh tối màu, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

**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 Cân phân tích, có độ chính xác đến ± 0,0001 g.

5.2 Bể siêu âm, tần số siêu âm từ 40 kHz đến 100 kHz.

**5.3 Thiết bị HPLC, 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.

**5.4 Pipet, dung tích 1,0; 2,0; 5,0; 10 và 25 mL, có vạch chia đến 0,1 mL.**

**5.5 Giấy lọc, giấy lọc Whatman 0,45  $\mu$ m hoặc tương đương.**

**5.6 Bình định mức, dung tích 25; 50; 100 và 250 mL.**

**6 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu****6.1 Lấy mẫu**

Lấy mẫu theo TCVN 9486.

**6.2 Chuẩn bị mẫu**

**6.2.1 Phân bón dạng rắn:** Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 10683:2015 (ISO 8358:1991).

**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**

**7.1.1 Dùng cân phân tích (5.1) cân khoảng 1,0 g mẫu đã được chuẩn bị (6.2.1 và 6.2.2.2). Đối với mẫu dạng lỏng (6.2.2.1), dùng pipet (5.4) hút khoảng 1,0 mL dung dịch mẫu để xác định khối lượng, cho vào bình định mức dung tích 250 mL.**

**7.1.2 Thêm 100 mL dung dịch metanol (4.1), đặt bình vào bể siêu âm, siêu âm trong thời gian 5 min. Định mức đến vạch bằng nước.**

**7.1.3** Lắc đều dung dịch, lấy khoảng 50 mL dung dịch lọc qua giấy lọc (5.5) vào bình đã được sấy khô. Dung dịch thu được dùng để xác định dicyandiamide (dung dịch A).

**7.2 Điều kiện phân tích**

Pha động : Hỗn hợp của acetonitrile (4.2) và metanol (4.1) theo tỷ lệ (6:1) về thể tích;

Cột tách: Cột C18 (250 mm × 4,6 mm);

Nhiệt độ buồng cột: 30 °C – 40 °C ;

Tốc độ dòng: 1,0 mL/min;

Bước sóng: 215 nm.

**7.3 Xác định dicyandiamide trong mẫu bằng HPLC**

Ôn định hệ thống HPLC theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi hệ thống thiết bị ổn định, dùng bơm một dung dịch chuẩn có nồng độ thấp nhất trong dãy dung dịch chuẩn làm việc (4.6) 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 (4.6) nồng độ từ thấp đến cao (Bảng 1) qua cột tách, dựng đường chuẩn hàm lượng hoạt chất dicyandiamide tương ứng với diện tích pic thu được.

Bơm dung dịch mẫu thử (7.1), lặp lại 2 lần. Xác định hàm lượng hoạt chất dicyandiamide dựa theo đường chuẩn đã được xây dựng. Nếu nồng độ của mẫu thử nằm ngoài đường chuẩn thì điều chỉnh bằng cách pha loãng dung dịch mẫu thử bằng dung dịch metanol (4.1)

**8 Biểu thị kết quả**

Hàm lượng hoạt chất dicyandiamide (X) trong mẫu phân bón, tính bằng mg/kg, theo công thức:

$$X = \frac{a \times f \times V}{m} \times P_i$$

trong đó:

- a      là nồng độ của hoạt chất dicyandiamide trong dung dịch mẫu, tính bằng miligam trên lit (mg/L);
- f      là hệ số pha loãng;
- V      là thể tích dung dịch định mức của mẫu sau khi chiết, tính bằng mililit (mL);
- m      là khối lượng mẫu cân, tính bằng gam (g);
- P<sub>i</sub>    là độ tinh khiết của chất chuẩn, tính bằng phần trăm (%).

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 theo quy định của AOAC (tùy thuộc vào mức nồng độ của chất thử) so với giá trị trung bình.

Kết quả thử nghiệm thu được, lấy hai chữ số sau dấu phẩy.

## **9 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải có ít nhất các thông tin sau:

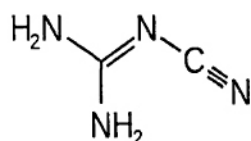
- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) Đặc điểm nhận dạng mẫu;
- c) Kết quả thử nghiệm;
- d) Mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn và các yếu tố có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- e) Ngày thử nghiệm.

## Phụ lục A

(Tham khảo)

### Thông tin về hoạt chất dicyandiamide

- Công thức cấu tạo



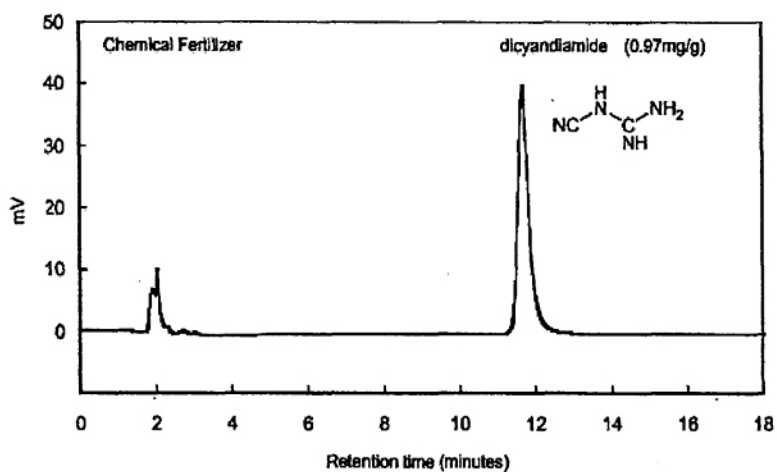
- Tên hoạt chất: Dicyandiamide
- Tên hóa học: IUPAC : 2-Cyanoguanidine
- Công thức phân tử:  $C_2H_4N_4$
- Khối lượng phân tử: 84,08 g/mol
- Nhiệt độ nóng chảy: 209,5 °C
- Độ hòa tan: tan trong nước: 32 g/L (20 °C)
- Dạng bên ngoài: chất rắn, màu trắng



**Phụ lục B**  
(Tham khảo)

**Ví dụ về sắc ký đồ điện hình của hoạt chất dicyandiamide**

Sắc ký đồ điện hình của hoạt chất dicyandiamide trong phân bón.



**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] BS-EN 15360:2007, Fertilizers – Determination of dicyandiamide – method using high performance liquid chromatography (HPLC).
  - [2] Testing Methods For Fertilizers (2019): 6.1.a Testing relating to the other limitations (dicyandiamide nitrogen)
-