



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0042183

(51)^{2020.01} G01N 30/02

(13) B

(21) 1-2021-01735

(22) 31/03/2021

(45) 25/12/2024 441

(43) 25/06/2021 399

(73) Công ty Cổ phần Phân bón Dầu khí Cà Mau (VN)

Lô D, khu công nghiệp Phường 1, đường Ngô Quyền, phường 1, thành phố Cà Mau, tỉnh Cà Mau

(72) Văn Tiến Thanh (VN); Trần Thị Thanh Tuyền (VN); Nguyễn Văn Khán (VN); Danh Sĩ Ra (VN).

(54) QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI N-(N-BUTYL) THIOPHOSPHORIC TRIAMIT (NBPT) VÀ DIXYANDIAMIT (DCD) BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

(57) Sáng chế đề cập quy trình định lượng đồng thời hai hoạt chất ức chế NBPT và DCD trong phân bón bằng kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Theo quy trình, điều kiện chạy sắc ký được thiết lập bao gồm: cột sắc ký RP - C18 (kích thước cột 250 x 4,6 mm, kích thước hạt 5 µm), nhiệt độ cột từ 30°C - 40°C kết hợp với đầu dò UV trong khoảng bước sóng 200 - 240nm, axetonitril và nước (1 : 99) được sử dụng làm pha động và tốc độ dòng của pha động là 1 mL.phút⁻¹. Quy trình định lượng được đồng thời cả hai hoạt chất ức chế NBPT và DCD do đó thời gian phân tích được rút ngắn, giảm lượng hóa chất sử dụng.

LĨNH VỰC KỸ THUẬT ĐƯỢC ĐỀ CẬP

Sáng chế thuộc lĩnh vực phân tích kỹ thuật trong ngành hóa học, cụ thể là quy trình phân tích định lượng đồng thời hoạt chất ức chế sinh học enzym ureaza N-(n-butyl) thiophosphoric triamit (NBPT) và hoạt chất ức chế quá trình nitrat hóa dixyandiamit (DCD) trong phân bón bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao – HPLC.

TÌNH TRẠNG KỸ THUẬT CỦA SÁNG CHẾ

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (tiếng Anh: High-performance liquid chromatography; viết tắt: HPLC; còn được gọi là Sắc ký lỏng áp suất cao) là một kỹ thuật trong hóa phân tích dùng để tách, nhận biết, định lượng thành phần trong hỗn hợp. Kỹ thuật này dựa trên hệ thống bơm đẩy dung môi lỏng dưới áp suất cao, trong dung môi có chứa hỗn hợp mẫu, qua một cột sắc ký. Cột sắc ký được đổ bằng vật liệu hấp phụ rắn. Mỗi thành phần trong mẫu tương tác tương đối khác nhau với vật liệu hấp phụ, nên tốc độ dòng của mỗi thành phần khác nhau là khác nhau, dẫn tới sự phân tách các thành phần khí mà chúng chảy ra khỏi cột.

Sắc ký có thể được mô tả là một quá trình dịch chuyển khối lượng liên quan tới hấp phụ. HPLC dựa trên hệ thống bơm để đẩy chất lỏng đã bị nén và hỗn hợp mẫu qua một cột đổ bằng một chất hấp phụ, dẫn tới sự phân tách của các thành phần trong mẫu. Thành phần hoạt động của cột, chất hấp phụ, tiêu biểu là một vật liệu cấu trúc hạt làm từ những hạt rắn như silicagel hay polyme có kích thước trong khoảng 2 – 50 μm . Những thành phần của hỗn hợp mẫu được tách ra khỏi nhau bởi mức độ tương tác khác nhau với các hạt hấp phụ. Chất lỏng bị nén là hỗn hợp dung môi ví dụ nước, axetonitril hay metanol và được gọi là "pha động". Thành phần và nhiệt độ của pha động đóng vai trò chính trong quá trình phân tách bằng cách tác động lên những tương tác xảy ra giữa những thành phần trong mẫu và chất hấp phụ ở cột. Đây là những tương tác vật lý trong tự nhiên, như hydrophobic, lưỡng cực-lưỡng cực và ion, thông thường nhất là sự kết hợp của các tương tác.

HPLC được phân biệt với sắc ký lỏng truyền thống áp suất thấp bởi vì áp suất hoạt động của nó cao hơn nhiều từ 50 - 350 bar, trong khi sắc ký lỏng thông thường chỉ dựa trên lực hút trái đất để pha động đi qua cột. Do chỉ có một lượng nhỏ mẫu được tách bằng phân tích HPLC, cột có kích thước 2,1 - 4,6 mm cho đường kính và 30 – 250 mm cho chiều dài. Cột HPLC cũng đổ với kích thước hạt hấp phụ nhỏ hơn trung bình kích thước hạt 2 - 50 micro mét. Điều này mang lại HPLC hiệu quả phân giải cao (khả năng tách biệt từng chất) khi mà tách hỗn hợp, làm cho nó trở thành phương pháp sắc ký phổ biến.

Sơ đồ của một thiết bị HPLC đặc thù gồm có cổng lấy mẫu, bơm và một đầu dò. Cổng lấy mẫu đưa hỗn hợp mẫu và dòng pha động để đi qua cột. Hệ thống bơm đảm bảo tốc độ dòng mong muốn và thành phần của pha động qua cột. Đầu dò tạo ra tín hiệu tỷ lệ với lượng mẫu

thành phần đi ra từ cột, do đó cho phép phân tích định lượng của những thành phần trong mẫu. Một bộ vi xử lý số và phần mềm điều khiển thiết bị HPLC và cung cấp dữ liệu phân tích. Một vài mẫu bơm cơ trong thiết bị HPLC có thể trộn nhiều dung môi với nhau theo những tỉ lệ mà có thể thay đổi theo thời gian, tạo ra thành phần gradient trong pha động. Các đầu dò như UV/Vis, PDA hay khối phổ được sử dụng phổ biến. Phần lớn các thiết bị HPLC có lò cột để điều chỉnh nhiệt độ phân tách.

Hai hoạt chất Dixyandiamit và N-(n-butyl) thiophosphoric triamit thường được dùng làm chất ức chế enzym ureaza và chất ức chế quá trình nitrat hóa đều có thể cải thiện chức năng của phân bón bằng cách giảm sự mất nitơ, cả hai loại chất ức chế này đều có những nhược điểm nhất định.

Dixyandiamit còn được gọi là dixyanodiamit (công thức hóa học tổng quát là $C_2H_4N_4$) viết tắt là DCD hoặc DICY, là một dạng bột tinh thể hình lăng trụ màu trắng, một chất dime của xyanamit và cũng là một dẫn xuất xyano của guanidin thực tế khảo sát thấy hoạt chất này hòa tan trong nước, rượu (C_2H_5OH), dimetylformamit, không tan trong ete và benzen, không cháy và ổn định khi làm khô. Hoạt chất thuộc loại hợp chất ức chế hỗ trợ việc ức chế quá trình nitrat hóa của amoni hoặc urê có trong phân bón.

Chất ức chế enzym triamit ureaza là N-(n-butyl) thiophosphoric triamit viết tắt là NBPT, có sẵn trên thị trường để sử dụng trong nông nghiệp và được bán trên thị trường trong các sản phẩm như dòng sản phẩm chất ổn định nitơ. Tuy nhiên, NBPT được sử dụng trong công nghiệp là một hợp chất rắn, sập và bị phân hủy bởi tác dụng của nước, axit và / hoặc nhiệt độ cao. Do đó, sự kết hợp của nó với các chất khác sẽ tạo ra được một vật liệu có khả năng ức chế enzym ureaza, đặc biệt là trên hạt phân urê.

Trong bằng sáng chế của Trung Quốc mang số CN110618227 cũng đã đề cập đến quy trình phân tích hoạt chất dixyandiamit có trong dung dịch cyanamit bằng cách sử dụng hệ máy HPLC đầu dò UV tại khoảng bước sóng 195 – 215 nm, pha động được đề cập là pha động axit tốc độ dòng từ 0,6 - 1 mL/phút, đường chuẩn được xây dựng có nồng độ năm điểm tiêu chuẩn lần lượt là 1,98 ppm; 4,95 ppm; 9,90 ppm; 19,80 ppm và 49,50 ppm, cột sắc ký sử dụng là cột trao đổi ion. Việc sử dụng pha động là axit sẽ làm giảm tuổi thọ của máy và tốn nhiều dung môi để rửa giải.

Theo bài báo khoa học công bố ngày 30 tháng 11 năm 2018 có tựa “*Simultaneous quantification of N-butylthiophosphoric triamide and dicyandiamide in urea formulation by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*” của nhóm tác giả Subbaiah Yogesha, Kumar Arun, Sharankumar G Shetty, Hegde Ravi, và Narayana Ramesh; nội dung nghiên cứu liên quan đến phương pháp phân tích định lượng đồng thời hai hoạt chất NBPT và DCD trong phân bón urê bằng phương pháp sắc ký lỏng – khối phổ Tandem (LC-MS/MS). Phương pháp sử dụng hệ thống máy LC-MS/MS, cột sắc ký Obelisc-R (4,6 x 150 mm, 5 μ m), hệ pha động bao gồm 10 mM amoni axetat pha trong dung dịch axit fomic 0,05% (A) và 0,05% axit fomic pha trong dung dịch axetonitril (B), tốc độ dòng được duy trì ở mức 1mL/phút. Chế độ sắc ký thiết lập là gradient được áp dụng như sau: tại 0 đến 4 phút tỷ lệ của B trong pha động từ 97% đến 90%, từ 4,5 đến 7 phút tỷ lệ của B trong pha động từ 90% đến 60%, từ 7,5 đến 12 phút tỷ lệ của B trong pha động là 97%. Nhiệt độ cột được duy trì ở mức 35°C, thể tích

mẫu mỗi lần tiêm là 5 μ L. Phương pháp có thể phát hiện được hàm lượng NBPT ở mức 5 ppb và DCD ở mức 25 ppb. Việc sử dụng hệ máy LC-MS/MS thu được kết quả chính xác nhưng việc sử dụng hệ pha động có chứa axit ở đây là axit fomic có thể gây nhiễm nền mẫu trong quá trình chạy, dung môi được chạy trong pha động phải phù hợp với từng chương trình chạy máy và quá trình rửa giải tương đối phức tạp tốn nhiều dung môi.

Bài báo khoa học và sáng chế được đề cập trên đều có mức giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng thấp, nhờ đó hỗ trợ việc định lượng hoạt chất NBPT và/hoặc DCD ở mức nồng độ thấp có trong các nền mẫu đặc biệt là mẫu phân bón. Cùng sự phát triển của xã hội, một số loại phân bón đã được tích hợp đồng thời hai hoạt chất ức chế quá trình nitrat hóa và sự hoạt động của enzym ureaza vì thế càng ưu tiên hơn các phương pháp phân tích đồng thời hai hoạt chất trên bằng thiết bị thông dụng, lượng hóa chất tiêu tốn trong mỗi lần phân tích không đáng kể.

Theo các giải pháp kỹ thuật của các sáng chế nêu trên, chỉ có thể định lượng được đơn lẻ từ loại hoạt chất, từ đó dẫn tới việc tốn thời gian, chi phí vì phải thay đổi cột sắc ký, hóa chất do phải dùng tới ba hoặc bốn loại dung môi để làm pha động thích hợp cho từng quá trình phân tích.

Do đó, điều cần thiết là cần có một quy trình phân tích định lượng được đồng thời hỗn hợp hai loại hoạt chất bằng hệ máy sắc ký lỏng hiệu năng cao – HPLC, vẫn sử dụng duy nhất một loại cột sắc ký và một hỗn hợp dung môi pha động là nước và axetonitril. Từ đó việc xử lý mẫu, đến công đoạn chạy mẫu để kiểm tra hàm lượng trong các sản phẩm thành phần diễn ra nhanh hơn, chính xác và tiết kiệm được nguồn chi phí lớn.

Sáng chế này cung cấp các giải pháp đạt được các mục tiêu trên.

BẢN CHẤT KỸ THUẬT CỦA SÁNG CHẾ

Theo đó, mục đích thứ nhất của sáng chế đề cập đến quy trình định lượng đồng thời n-(n-butyl) thiophosphoric triamit (NBPT) và dixyandiamit (DCD) bằng kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột sắc ký RP-C18 có kích thước cột 250 x 4,6 mm và kích thước hạt 5 μ m trong hệ pha động là hỗn hợp hai dung môi axetonitril và nước, bao gồm các bước:

i) chuẩn bị nguyên liệu và thiết lập điều kiện sắc ký cho máy sắc ký lỏng hiệu năng cao, cụ thể là:

nguyên liệu bao gồm chất chuẩn NBPT, chất chuẩn DCD, dung môi axetonitril, nước cất, mẫu phân bón; trong đó, hai chất chuẩn NBPT và DCD phải được sấy khô ở mức nhiệt độ từ 90 – 110°C trong 2 giờ, để nguội về nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm trước khi cân;

lựa chọn điều kiện chạy sắc ký bao gồm pha tĩnh cột sắc ký RP-C18 có kích thước cột 250 x 4,6 mm và kích thước hạt 5 μ m, pha động axetonitril với nước cất tỷ lệ 1 : 99, đầu dò UV, thể tích tiêm mẫu 10 μ L, tốc độ dòng là 1 mL.phút⁻¹, thời gian chạy sắc ký 13 phút, nhiệt độ cột được duy trì ở 30°C ở bước sóng 200 – 240 nm;

trong đó, hai chất chuẩn NBPT và DCD phải được sấy khô ở mức nhiệt độ từ 90 – 110°C trong 2 giờ, để nguội về nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm trước khi cân;

trong đó, dung môi axetonitril và nước cất được lọc qua giấy lọc có kích thước lỗ lọc là 0,2 μm .

ii) pha dung dịch chuẩn gốc NBPT/DCD và dãy dung dịch chuẩn NBPT/DCD có thành phần nguyên liệu được chuẩn bị ở bước (i), cụ thể là:

dung dịch chuẩn gốc NBPT có nồng độ là 200 $\mu\text{g/mL}$ được pha bằng cách hòa tan đồng nhất chất chuẩn NBPT với nước cất trong bình định mức; sau đó thực hiện pha loãng dung dịch chuẩn gốc NBPT bằng nước cất để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ NBPT biến thiên theo thứ tự cụ thể là 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, và 60 $\mu\text{g/mL}$;

dung dịch chuẩn gốc DCD có nồng độ là 500 $\mu\text{g/mL}$ được pha bằng cách hòa tan đồng nhất chất chuẩn DCD với nước cất trong bình định mức; sau đó thực hiện pha loãng dung dịch chuẩn gốc DCD bằng nước cất để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ DCD biến thiên theo thứ tự cụ thể là 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, và 100 $\mu\text{g/mL}$;

iii) tiến hành sắc ký lần lượt dãy dung dịch chuẩn NBPT và DCD thu được ở bước ii) bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao đã thiết lập các điều kiện sắc ký ở bước i); kết quả thu được phương trình hồi quy của dung dịch chuẩn NBPT và DCD;

trong đó, phương trình hồi quy của chuẩn NBPT thu được là $y = 14970x + 489,19$; $R^2 = 0,9999$, với R là hệ số tương quan tuyến tính;

trong đó, phương trình hồi quy của chuẩn DCD thu được là $y = 22,346x + 43,263$; $R^2 = 0,9997$, với R là hệ số tương quan tuyến tính;

iv) tiến hành sắc ký mẫu phân bón đã chuẩn bị ở bước i) bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao đã thiết lập các điều kiện sắc ký ở bước i); kết quả thu được hai diện tích mũ tín hiệu (pic) tách nhau ra hoàn toàn và mỗi pic đều đối xứng qua trục đi qua đỉnh mỗi pic; đồng thời ghi nhận thời gian lưu của DCD là 3,08 phút và của NBPT là 8,15 phút.

Mục đích thứ hai của sáng chế là đề cập một quy trình định lượng đồng thời NBPT và DCD bằng máy HPLC Agilent 1290, bốn kênh dung môi, được lắp đặt hệ thống bơm mẫu tự động và có buồng gia nhiệt cho cột sắc ký, cột RP-C18 và hỗn hợp hai pha động là axetonitril và nước có độ lệch chuẩn tương đối RSD < 2% độ chính xác của quy trình càng cao.

Những ưu điểm này của sáng chế sẽ không còn nghi ngờ gì nữa đối với những người trình độ kỹ năng và kỹ thuật hiểu biết thông thường sau khi đọc phần mô tả chi tiết về các phương án được ưu tiên, và được minh họa trong các hình vẽ khác nhau dưới đây.

MÔ TẢ VẮN TẮT CÁC HÌNH VẼ

Các bản vẽ đi kèm được kết hợp và tạo thành một phần của sáng chế này nhằm minh họa các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập và phụ thuộc cũng như phục vụ cho việc giải thích các nguyên lý hoạt động của toàn bộ giải pháp kỹ thuật.

Hình 1 là lưu đồ minh họa quy trình định lượng đồng thời NBPT và DCD bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng HPLC theo phương án của sáng chế.

Hình 2A là hình vẽ minh họa một ví dụ về đường biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ của DCD theo phương án của sáng chế.

Hình 2B là hình vẽ minh họa một ví dụ về đường biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ của NBPT theo phương án của sáng chế.

Hình 3A là hình vẽ minh họa một ví dụ về sắc ký đồ của NBPT và DCD trong mẫu chuẩn theo phương án của sáng chế.

Hình 3B là hình vẽ minh họa một ví dụ về sắc ký đồ của NBPT và DCD trong mẫu phân bón theo phương án của sáng chế.

MÔ TẢ CHI TIẾT SÁNG CHẾ

Phần sau đây sẽ xem xét chi tiết các phương án được ưu tiên của sáng chế, các ví dụ về chúng được minh họa trên các hình vẽ đi kèm. Mặc dù sáng chế sẽ được mô tả cùng với các phương án được ưu tiên, nhưng sẽ được hiểu rằng sáng chế không có ý định giới hạn đối với các phương án này. Ngược lại, sáng chế nhằm mục đích đảm bảo các lựa chọn thay thế, cải tiến và định lượng, có thể được bao gồm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ được thêm vào. Hơn nữa, trong phần mô tả chi tiết sau đây của sáng chế, nhiều chi tiết cụ thể được đặt ra để cung cấp sự hiểu biết thấu đáo về sáng chế. Tuy nhiên, sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng sáng chế có thể được thực hành mà không có các chi tiết cụ thể này. Trong các trường hợp khác, các phương pháp đã biết, quy trình, thành phần và phạm vi ứng dụng đã không được mô tả chi tiết để không làm mờ đi các khía cạnh không cần thiết của sáng chế.

Cần lưu ý rằng thuật ngữ viết tắt: NBPT (N-(n-butyl) thiophosphoric triamit), DCD (Dixyandiamit), ACN (Axetonitril), độ lệch chuẩn tương đối (RSD), độ lệch chuẩn (SD) giới hạn phát hiện (LOD), cột C18 pha đảo (RP-C18), diện tích mũi tín hiệu (pic), hệ số tương quan tuyến tính (R), lọ đựng mẫu (vial), vị trí rack, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), ống hút (pipet) v. v... những tên gọi thông dụng vừa mang tính học thuật về khoa học kỹ thuật trong chuyên ngành hóa học, vừa rất phổ biến trong nghiên cứu, sản xuất công nghiệp và thương mại hóa.

Cần chú ý đến đơn vị đo nồng độ được liệt kê trong sáng chế là ppm và $\mu\text{g/mL}$ đây đều là những đơn vị đo nồng độ, trong đó $1 \text{ ppm} = 1 \mu\text{g/mL}$ mang ý nghĩa là có $1 \mu\text{g}$ chất trong một mililít tổng khối lượng.

Ngoài ra, các thuật ngữ được đề cập trong sáng chế được sử dụng viết tắt thông dụng bao gồm thời gian lưu (hay còn gọi là thời gian lưu giữ chất trong cột sắc ký), pha tĩnh, pha động, tốc

độ dòng, v. v... đều là những thuật ngữ chuyên ngành hóa học đã được đề cập trong các tài liệu chuyên ngành hóa phân tích.

Cần lưu ý rằng các hóa chất được sử dụng tổng hợp hữu cơ và dung môi theo phương án của sáng chế được mua của hãng Merck (Đức) và Aldrich (Mỹ) có độ tinh khiết đạt tiêu chuẩn.

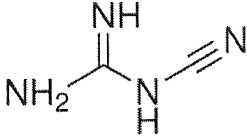
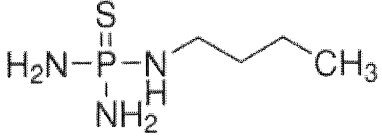
Theo phương án của sáng chế, độ tinh khiết (%) của đơn chất tính theo trọng lượng là trọng lượng của từng thành phần hay đơn chất cần xác định độ tinh khiết so với tổng trọng lượng của các thành phần đã bao gồm đơn chất cần xác định và tạp chất có trong bột rắn. Phần trăm trọng lượng hoặc độ tinh khiết (%) đơn chất tính theo trọng lượng của một thành phần hay đơn chất = (trọng lượng thành phần hay đơn chất ÷ tổng trọng lượng của các thành phần) x 100%; trong đó, các đơn vị thường tính bằng gram (ký hiệu là g) hoặc miligram (ký hiệu là mg).

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây đều có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi một trong những kỹ năng thông thường trong kỹ thuật mà sáng chế này đề cập. Các phương pháp, kỹ thuật, thiết bị và vật liệu phổ biến được mô tả, mặc dù mọi phương pháp, kỹ thuật, thiết bị hoặc vật liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp được mô tả trong tài liệu này có thể được sử dụng trong thực tế hoặc thử nghiệm của sáng chế. Các cấu trúc được mô tả trong tài liệu này cũng được hiểu là để chỉ các chức năng tương đương của các cấu trúc đó. Các tài liệu tham khảo về phương án của một trong những phương án, hiện thực, ví dụ, có thể chỉ ra rằng các phương án của sáng chế được mô tả có thể bao gồm một tính năng, cấu trúc hoặc đặc điểm cụ thể, nhưng không phải mọi phương án nhất thiết phải bao gồm các tính năng, cấu trúc hoặc đặc tính cụ thể. Hơn nữa, việc sử dụng lặp đi lặp lại cụm từ trong một phương án, trực tiếp hoặc trong một phương án mẫu mực, không nhất thiết phải đề cập đến cùng một phương án, mặc dù chúng có thể.

Sáng chế hiện tại sẽ được mô tả chi tiết với tham chiếu đến các phương án của nó như được minh họa trong các bản vẽ kèm theo.

Tham chiếu đến Hình 1, là lưu đồ minh họa quy trình định lượng đồng thời n-(n-butyl) thiophosphoric triamit (NBPT) và dixyandiamit (DCD) bằng kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (“quy trình 100”) theo một phương án của sáng chế. Quy trình 100 được bắt đầu bằng bước 101 chuẩn bị nguyên liệu và thiết lập điều kiện sắc ký. Trong đó, nguyên liệu chuẩn bị bao gồm: chất chuẩn DCD, chất chuẩn NBPT, dung môi axetonitril, nước cất, và mẫu phân bón. Cụ thể là, chất chuẩn NBPT (N-(N-butyl) thiophosphoric triamit) thuộc nhóm phosphoricamit là hoạt chất ức chế sinh học enzym ureaza có trong đất ngăn chặn quá trình hình thành NH₃ và CO₂. Yêu cầu chất chuẩn NBPT được đề cập trong sáng chế là tồn tại ở dạng bột mịn ở điều kiện thường, tinh thể chất rắn màu trắng, độ tinh khiết trên 98% và hàm lượng ion clorua nhỏ hơn 10 ppm, nồng độ các kim loại nặng nhỏ hơn 20 ppm. Theo phương án của sáng chế, chất chuẩn DCD (Dixyandiamit) là hoạt chất ức chế quá trình nitrat hóa bằng việc kiểm soát các hoạt động của các vi khuẩn nitrat có trong đất. Yêu cầu chất chuẩn DCD được đề cập trong sáng chế tồn tại dạng bột trắng ở điều kiện thường, sử dụng hoạt chất có độ tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 99%, kích thước hạt trong khoảng từ 0,01 – 0,1 mm. Tính chất vật lý của hai thành phần DCD và NBPT được thể hiện qua Bảng 1.

Bảng 1. Tính chất vật lý của hoạt chất DCD và NBPT

Tính chất vật lý	DCD	NBPT
Công thức hóa học		
Nhiệt độ nóng chảy	208 – 211°C	58 – 60°C
Tỷ trọng	1,40 g/cm ³	1,171 ± 0,06 g/cm ³
Độ hòa tan trong nước	32g/L ở 20°C	4,3g/L ở 25°C

Cần lưu ý rằng, hai chất chuẩn NBPT và DCD phải được sấy khô ở nhiệt độ từ 90 – 110°C trong 2 giờ, để nguội về nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm trước khi cân.

Cần lưu ý rằng, dung môi axetonitril (CH₃CN) dùng trong phân tích sắc lỏng cần có độ tinh khiết đạt trên 99,9%; trong đó hàm lượng amoniac dưới 0,0002%; axit axetic dưới 0,001%. Dung môi nước cất (H₂O) cần chọn loại đạt được tiêu chuẩn độ tinh khiết dùng trong phân tích máy sắc khí lỏng có hàm lượng ion phải thấp hơn 1mg/kg. Cả hai dung môi đều phải được lọc qua giấy lọc 0,2 µm trước khi tiến hành chạy máy.

Theo một phương án của sáng chế, quy trình chuẩn bị mẫu phân bón bao gồm các bước sau:

- lấy mẫu phân bón chuẩn; Chú ý rằng, mẫu phân bón chuẩn được chuẩn bị dựa trên các bước hướng dẫn trong tiêu chuẩn ISO 14820-1:2016;
- nghiền mịn mẫu phân bón chuẩn;
- sàng mẫu phân bón chuẩn đã được nghiền sử dụng rây hoặc máy lắc sàng; trong đó có kích thước đường kính rây hoặc sàng của máy lắc sàng là 20 cm; mắt sàng 0,1 mm;
- pha 100 mL dung dịch mẫu phân bón chuẩn bằng cách hòa tan đồng nhất 5 g mẫu phân bón chuẩn đã được sàng bằng nước cất trong bình định mức 100 mL; trong đó, các thiết bị sử dụng là cân phân tích có độ chính xác ± 1mg và máy lắc siêu âm hoặc các thiết bị tương tự khác hỗ trợ hòa tan đồng nhất dung dịch mẫu phân bón chuẩn; cần lưu ý rằng thuật ngữ “hòa tan đồng nhất”, có nghĩa là hòa tan hoàn toàn các chất trong mẫu phân bón chuẩn với nước cất;
- lọc dung dịch mẫu phân bón chuẩn thu được ở bước (d) bằng màng lọc có kích thước lỗ ≤ 0,45 µm thu được mẫu phân bón; sử dụng lọ đựng mẫu (vial) để chứa mẫu phân bón thu được ở bước (e);

trong đó, mẫu phân bón chuẩn được đề cập trong sáng chế là mẫu phân bón bất kỳ được sản xuất ngoài cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng còn có tác dụng ức chế quá trình nitrat hóa và

enzym ureaza tồn tại trong đất, nghĩa là trong mẫu phân bón chuẩn có chứa đồng thời hai hoạt chất NBPT và DCD.

Trong một phương án ưu tiên của sáng chế, tiến hành lựa chọn điều kiện sắc ký của hệ máy HPLC Agilent 1290 bao gồm bước sóng của đầu dò tín hiệu UV là từ 190 – 300 nm, thể tích mỗi lần tiêm mẫu là 10 μL /lần, lưu lượng dòng chảy hay còn gọi là tốc độ dòng trong suốt quá trình phân tích là 0,5 – 2 mL.phút⁻¹, tốt nhất là 1 mL.phút⁻¹. Pha động được sử dụng trong quy trình là hỗn hợp hai dung môi nước và axetonitril, tỷ lệ thể tích hai dung môi trong hỗn hợp pha động được thiết lập phù hợp với quy trình định lượng cụ thể là: từ 0 – 4 phút tỷ lệ nước cất là 99%; từ 4,1 – 9 phút tỷ lệ nước cất là 70% và từ 9,1 phút đến khi kết thúc quy trình định lượng tỷ lệ nước cất là 99%. Cột sắc ký được sử dụng là cột RP-C18 có chiều dài là 250 mm, đường kính là 4,6 mm, và kích thước hạt là 5 μm , điều chỉnh buồng gia nhiệt nhằm duy trì nhiệt độ của cột trong khoảng 30 – 40°C.

Cần hiểu rằng, có thể lựa chọn các hệ máy HPLC có đầu dò UV-VIS khác nhưng cần lưu ý thông số về áp suất, nhiệt độ tương ứng với từng hệ. Hơn nữa, các hướng dẫn liên quan đến việc cài đặt các thông số về áp suất và nhiệt độ phù hợp các hệ máy HPLC đã được biết đến rộng rãi với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực hóa phân tích nên sẽ không được nhắc lại trong sáng chế.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, pha động là tỷ lệ hỗn hợp hai dung môi axetonitril và nước khi tỷ lệ thể tích giữa axetonitril và nước là 1 : 99 thì kết quả pic của NBPT và DCD tách được hoàn toàn và không xuất hiện các pic của tạp chất. Điều kiện tối ưu hóa quá trình phân tách đơn chất trong cột là nhiệt độ cột cần đặt ở mức 30°C, nếu nhiệt độ quá cao (lớn hơn 40°C), hai hoạt chất DCD và NBPT sẽ dễ dàng phân hủy. Tại mức nhiệt độ 30°C, khi đưa các mẫu cần phân tích vào cùng hay khác thời điểm thì cũng không ảnh hưởng đến mức độ phân tách của mẫu, hình dạng đỉnh pic, độ đối xứng của từng đơn chất vẫn được đảm bảo.

Tiếp tục bước 101, thực hiện khảo sát phổ hấp thụ UV-VIS của NBPT và DCD trong khoảng bước sóng từ 190 – 800 nm bằng máy đo phổ UV-VIS thu được kết quả khoảng bước sóng hấp thụ lần lượt: NBPT là 205 – 215 nm và DCD là 205 – 235 nm. Từ đó, cài đặt đầu dò UV bên trong hệ máy HPLC trong khoảng bước sóng từ 200 nm đến 240 nm.

Ở bước 102, tiến hành pha dung dịch chuẩn gốc và dãy dung dịch chuẩn NBPT/DCD nhằm xác định tính tuyến tính và miền giá trị từ nguyên liệu đã chuẩn bị ở bước 101. Dung dịch chuẩn sau khi pha phải chứa chính xác nồng độ của chất cần phân tích. Dựa vào độ tinh khiết của từng chất tiến hành quy đổi hàm lượng chính xác của chất cần phân tích. Các thiết bị/dụng cụ trong phòng thí nghiệm được sử dụng ở bước 102 như cân phân tích, máy lắc siêu âm, bình định mức, cốc thủy tinh có mỏ, ống nhỏ giọt thủy tinh, v.v... phải được làm sạch rửa qua cồn và sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 90 – 100°C trong vòng 1 giờ, sau đó để nguội về nhiệt độ phòng; và phải được hiệu chuẩn trước đó để đạt độ chính xác tốt nhất hạn chế sai số do thiết bị/dụng cụ gây ra.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, dung dịch chuẩn gốc NBPT được sử dụng trong quy trình 100 có nồng độ là 200 $\mu\text{g/mL}$ được pha bằng cách cân chính xác một lượng chất chuẩn NBPT đã được chuẩn bị ở bước 101 bằng cân phân tích có độ chính xác $\pm 0,00001$ mg và cho

vào bình định mức, tiếp đó sử dụng nước cất đạt tiêu chuẩn độ tinh khiết phân tích sắc ký lỏng định mức tới vạch, và lắc đều hoặc sử dụng máy lắc siêu âm hoặc các thiết bị tương tự khác thu được dung dịch chuẩn gốc NBPT. Tiếp tục, pha loãng dung dịch chuẩn gốc NBPT vừa thu được bằng nước cất trong các bình định mức thu được dãy dung dịch chuẩn NBPT theo các nồng độ lần lượt là 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, và 60 µg/mL; trong đó, mỗi dung dịch chuẩn NBPT sau khi pha xong được cho vào từng lọ đựng mẫu khác nhau.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, dung dịch chuẩn gốc DCD được sử dụng trong quy trình 100 có nồng độ là 500 µg/mL được pha bằng cách cân chính xác một lượng chất chuẩn DCD đã được chuẩn bị ở bước 101 bằng cân phân tích có độ chính xác $\pm 0,00001$ mg và cho vào bình định mức, tiếp đó sử dụng nước cất đạt tiêu chuẩn độ tinh khiết phân tích sắc ký lỏng định mức tới vạch, và lắc đều hoặc sử dụng máy lắc siêu âm hoặc các thiết bị tương tự khác thu được dung dịch chuẩn gốc DCD. Tiếp tục, pha loãng dung dịch chuẩn gốc DCD vừa thu được bằng nước cất trong các bình định mức thu được dãy dung dịch chuẩn DCD theo các nồng độ lần lượt là 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 80 µg/mL, và 100 µg/mL; trong đó, mỗi dung dịch chuẩn DCD sau khi pha xong được cho vào từng lọ đựng mẫu khác nhau.

Tại bước 103, tiến hành sắc ký lần lượt dãy dung dịch chuẩn NBPT và DCD thu được ở bước 102 theo điều kiện đã thiết lập của máy phân tích HPLC ở bước 101; cụ thể là các lọ vial chứa dung dịch chuẩn NBPT/DCD được sắp xếp vào trong khay đựng mẫu, đưa khay vào vị trí rack bên trong máy sắc ký lỏng HPLC đã được khởi động và cài đặt thông số ở bước 101. Điều khiển quá trình phân tích thông qua hệ thống máy tính được liên kết với hệ máy sắc ký, tiến hành ghi nhận lại tỷ lệ diện tích pic trên sắc ký đồ. Kết quả thu được ở bước 103 là phương trình hồi quy NBPT và DCD được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Phương trình hồi quy của hai chất chuẩn NBPT và DCD.

DCD	Nồng độ (µg/mL)	20	40	60	80	100
	Diện tích pic	479,510	941,310	1394,400	1840,400	2264,600
	Phương trình hồi quy: $y = 22,346 x + 43,263$; $R^2 = 0,9997$					
NBPT	Nồng độ (µg/mL)	5	10	20	40	60
	Diện tích pic	147,960	300,930	449,200	603,340	896,190
	Phương trình hồi quy: $y = 14970 x + 489,19$; $R^2 = 0,9999$					

Theo số liệu Bảng 2, khảo sát sự tương quan giữa y (diện tích pic) và x (nồng độ NBPT) bằng phương pháp bình phương tối thiểu, kết quả cho thấy hệ số $R^2 = 0,9999$ suy ra $R = 0,9999 \geq R = 0,999$; chứng tỏ có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ NBPT và diện tích pic tương ứng.

Theo số liệu Bảng 2, khảo sát sự tương quan giữa y (diện tích pic) và x (nồng độ DCD) bằng phương pháp bình phương tối thiểu, kết quả cho thấy hệ số $R^2 = 0,9997$ suy ra $R = 0,9998 \geq R = 0,998$; chứng tỏ có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ DCD và diện tích pic tương ứng.

Theo phương án của sáng chế, giới hạn phát hiện (LOD) được xác định tại dung dịch chuẩn NBPT có nồng độ là 6,00 µg/mL, và tại dung dịch chuẩn DCD có nồng độ là 1,41 µg/mL cho đáp ứng pic gấp khoảng 3 lần độ nhiễu đường nền. Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) bằng phương pháp thêm chuẩn dựa trên việc chạy lặp 10 lần trên mẫu thử đã pha loãng nhằm để nồng độ thấp hơn 10 lần so với nồng độ thực tế có trong phân bón gọi tắt đây là dung dịch thử. Kết quả tính toán dựa trên công thức sau:

$$LOD = 3 \times SD$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$R = \bar{x}/LOD$$

trong đó, SD là độ lệch chuẩn, n là số lần lặp mẫu, theo sáng chế số lần lặp mẫu đưa ra là 10 lần; giá trị R là tiêu chuẩn đánh giá, nếu $4 < R < 10$ thì nồng độ dung dịch thử phù hợp và LOD được sử dụng cho phương pháp, nếu $R < 4$ thì cần pha dung dịch thử có nồng độ cao hơn để thử nghiệm và nếu $R < 10$ thì cần pha dung dịch thử có nồng độ thấp hơn.

Trong một phương án, dung dịch thử bao gồm: 5 g mẫu phân bón; 0,5 mL DCD 200 ppm; và 2 mL NBPT 200 ppm. Tiến hành pha loãng 10 lần dung dịch thử, sau đó thực hiện sắc ký 10 lần dung dịch thử đã pha loãng ở trên cho kết quả độ lặp lại của diện tích pic của dung dịch có nồng độ ở mức giới hạn phát hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại tạo LOD và LOQ

Lần	m _{mẫu} phân bón	Kết quả lấy mẫu (µg/mL)		Kết quả chạy sắc ký (µg/mL)	
		DCD	NBPT	DCD	NBPT
1	5,0161	0,66	1,86	13,21	36,99
2	5,0296	0,68	1,56	13,46	30,93
3	4,9998	0,74	1,79	14,77	35,90
4	5,0133	0,68	1,79	13,63	35,80
5	5,0392	0,71	1,61	14,13	31,94
6	5,0146	0,69	1,84	13,68	36,70
7	5,0011	0,68	1,77	13,53	35,31
8	5,0181	0,70	1,81	13,88	36,01
9	5,0558	0,67	1,79	13,32	35,44
10	5,0312	0,67	1,80	13,33	35,74
Trung bình				13,69	35,08
Độ lệch chuẩn (SD)				0,47	2,00
LOD				1,41	6,00
LOQ				4,68	20,00
R				9,74	5,84

Kết luận				Đạt	Đạt
----------	--	--	--	-----	-----

Cuối cùng ở bước 104, điều khiển hệ thống sắc ký lỏng thông qua máy tính lấy lượng dung dịch mẫu phân bón đã xử lý ở bước 101, tiến hành tiêm lần lượt dung dịch mẫu phân bón vào cột sắc ký RP-C18. Tại đây, nhiệt độ cột được giữ cố định ở mức 30°C trong suốt 13 phút chạy sắc ký. Kết quả thu được ở bước 104, sắc ký đồ hiện thị trên màn hình thu được hai pic tách nhau ra hoàn toàn và mỗi pic đều đối xứng nhau qua đường thẳng đi qua đỉnh của mỗi pic, ghi nhận lại thời gian lưu (t_R) của DCD là 3,08 phút và của NBPT là 8,15 phút. Theo đó, kết quả diện tích pic của từng hoạt chất khi chạy máy HPLC ở bước 104 được ghi lại và thế vào giá trị y trong phương trình hồi quy tương ứng của từng hoạt chất NBPT/DCD đã tìm được ở bước 103 nhằm mục đích xác định giá trị x chính là hàm lượng hoạt chất NBPT/DCD. Kết quả các định hàm lượng NBPT và DCD của mẫu phân bón bằng HPLC được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định độ chính xác của phương pháp HPLC

STT	Khối lượng (g)	Diện tích pic	Hàm lượng DCD ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic	Hàm lượng NBPT ($\mu\text{g/mL}$)
1	4,9981	1545	1346,91	219,4	282,71
2	5,0088	1546	1344,83	212,2	282,50
3	5,0048	1552	1345,69	212,2	280,33
4	5,0042	1551	1356,66	217,2	285,96
5	4,9978	1546	1347,79	217,1	286,54
6	5,0079	1551	1349,07	217,5	289,51
Trung bình	5,0036	1548,5	1348,492	215,9	284,5917
SD	0,005	3,146	4,273	2,999	3,345
RSD%	0,002	1,285	1,745	1,224	1,365

Dựa vào số liệu Bảng 5, giá trị RSD ($n=6$) $\leq 2\%$ có ý nghĩa là phương pháp có độ chính xác đạt yêu cầu, đáp ứng yêu cầu phân tích.

Theo một phương án khác của sáng chế, nhằm để xác định độ chính xác của quy trình 100, tiến hành chạy máy sắc ký định lượng một mẫu chuẩn thành phần bao gồm DCD nồng độ 60 $\mu\text{g/mL}$ và NBPT nồng độ 30 $\mu\text{g/mL}$ được trộn lại với nhau theo tỷ lệ 1 : 1, điều kiện chạy máy sắc ký lỏng tương tự như trong quá trình chạy mẫu. Kết quả về thời gian lưu và diện tích pic được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thẩm định tính thích hợp của hệ thống sắc ký.

STT	DCD		NBPT	
	t_R (phút)	Diện tích pic	t_R (phút)	Diện tích pic
1	3,087	1390,90	8,153	284,40
2	3,082	1388,60	8,151	285,20
3	3,082	1395,20	8,151	285,40

4	3,080	1396,40	8,149	285,30
5	3,081	1396,20	8,148	285,40
6	3,080	1397,80	8,149	285,30
Trung bình	3,082	1394,18	8,150	285,17
SD	0,003	3,61	0,002	0,38
RSD (%)	0,001	1,47	0,001	0,16

trong đó, ý nghĩa của các giá trị bao gồm SD là độ lệch chuẩn, RSD là độ lệch chuẩn tương đối được tính bằng công thức sau:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}}$$

Dựa vào số liệu trong Bảng 4, $RSD_{\text{thời gian lưu NBPT}} < 1\%$ và $RSD_{\text{diện tích pic NBPT}} < 2\%$; $RSD_{\text{thời gian lưu DCD}} < 1\%$ và $RSD_{\text{diện tích pic DCD}} < 2\%$ đáp ứng đúng yêu cầu độ đặc hiệu cho thấy hệ thống phù hợp để định lượng đồng thời NBPT và DCD trong mẫu phân bón.

Theo phương án khác của sáng chế, quy trình 100 ngoài trừ dùng để xác định hàm lượng NBPT và DCD có trong phân bón bằng HPLC còn có thể xác định hàm lượng NBPT và DCD trong mẫu đất trồng.

Theo phương án của sáng chế, quy trình 100 đáp ứng được các yêu cầu về độ đặc hiệu, độ tuyến tính và khoảng xác định, độ chính xác, độ lặp lại, tính thích hợp để định tính, định lượng NBPT và DCD trong mẫu phân bón. Quy trình 100 sử dụng máy HPLC Agilent 1290 và cột RP-C18 trong thời gian 13 phút, sử dụng pha động bao gồm hai dung môi duy nhất là axetonitril và nước. Do đó thời gian phân tích được rút ngắn, lượng hóa chất sử dụng giảm bớt đáng kể, quá trình rửa giải sau khi kết thúc quy trình định lượng đơn giản và không xảy ra hiện tượng pha động ảnh hưởng đến nền mẫu khi sử dụng pha động có chứa axit. Ngoài ra, quy trình định lượng rất là đơn giản, khả thi, thuận tiện và có độ tin cậy cao.

Đề cập đến Hình 2A, là hình minh họa một ví dụ về biểu đồ đường biểu diễn đường thẳng tương quan giữa diện tích pic và nồng độ của DCD theo một phương án của sáng chế. Biểu đồ đường 200A là kết quả thực hiện của bước 103 của quy trình 100, trong đó trục tung (Oy) biểu thị giá trị diện tích pic và trục hoành (Ox) biểu thị giá trị nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) dung dịch chuẩn DCD.

Đề cập đến Hình 2B, là hình minh họa một ví dụ về biểu đồ đường biểu diễn đường thẳng tương quan giữa diện tích pic và nồng độ của NBPT theo một phương án của sáng chế. Biểu đồ đường 200B là kết quả thực hiện của bước 103 của quy trình 100, trong đó trục tung (Oy) biểu thị giá trị diện tích pic và trục hoành (Ox) biểu thị giá trị nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) dung dịch chuẩn NBPT.

Đề cập đến Hình 3A, là hình minh họa một ví dụ về sắc ký đồ 300A của NBPT và DCD trong mẫu chuẩn theo một phương án của sáng chế. Sắc ký đồ 300A là kết quả của bước chạy sắc ký lỏng hiệu năng cao được thực hiện ở bước 103 của quy trình 100.

Đề cập đến Hình 3B, là hình minh họa một ví dụ về sắc ký đồ 300B minh họa sắc ký đồ của NBPT và DCD trong mẫu phân bón theo một phương án của sáng chế. Sắc ký đồ 300B là kết quả của bước chạy sắc ký lỏng hiệu năng cao được thực hiện ở bước 104 của quy trình 100.

VÍ DỤ THỰC HIỆN SÁNG CHẾ

Mục đích của phần ví dụ sau đây nhằm chứng minh rằng giải pháp lý thuật trong sáng chế này đã được tác giả nghiên cứu và thử nghiệm thành công. Cụ thể, quy trình định lượng đồng thời n-(n-butyl) thiophosphoric triamit (NBPT) và dixyandiamit (DCD) bằng kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được ứng dụng để phân tích hàm lượng DCD và NBPT trong một mẫu phân bón urê được thực hiện cụ thể qua các bước bao gồm:

a) Chuẩn bị nguyên liệu và thiết lập điều kiện sắc ký bao gồm:

chất chuẩn: DCD (99%, Sigma-Aldrich), NBPT (98,4%, Sigma-Aldrich); trong đó hai chất chuẩn NBPT và DCD được sấy khô ở mức nhiệt độ từ 90 – 110°C trong 2 giờ, để nguội về nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm trước khi cân;

dung môi axetonitril đạt tiêu chuẩn HPLC (Merck) được lọc qua giấy lọc 0,2 μm ;

nước cất đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích, và được lọc qua giấy lọc 0,2 μm

mẫu phân bón N46-plus, nghiền mịn, sàng mẫu qua máy lắc sàng có đường kính là 20 cm, mắt sàng 0,1 mm;

chuẩn bị 6 mẫu phân bón N46-plus chạy sắc ký được thực hiện bằng cách cân 5 g mẫu với độ chính xác $\pm 0,1$ mg, hòa tan bằng nước cất trong bình định mức 100mL, dung dịch mẫu sau khi pha loãng với nước cất được đưa vào máy lắc siêu âm trong vòng 20 phút, và được lọc qua đầu lọc có kích thước $\leq 0,45$ μm thu được mẫu phân bón sau lọc được chứa trong lọ đựng mẫu (vial). Tiến hành lặp lại các bước đã nêu 6 lần, kết quả thu được 6 mẫu phân bón chạy sắc ký;

i) Chuẩn bị máy sắc ký hiệu năng cao và dụng cụ phân tích bao gồm:

hệ thống HPLC Agilent 1290 có 4 kênh dung môi, bơm mẫu tự động, có buồng gia nhiệt cột, đầu dò UV, cột sắc ký C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm);

dụng cụ phân tích: cân phân tích Mettler độ chính xác $\pm 0,1$ mg, máy lắc siêu âm, các dụng cụ thủy tinh, bình định mức, ống hút (pipet) có độ chính xác phù hợp.

ii) Lựa chọn điều kiện sắc ký:

cài đặt bước sóng: 190 – 800 nm; trong đó bước sóng hấp thu của DCD là 205 – 235 nm, bước sóng hấp thu của NBPT là 205 – 215 nm;

pha tĩnh: cột C18;

pha động: hỗn hợp axetonitril (C) : nước (A), trong đó, tỷ lệ hai dung môi này thay đổi theo thời gian định lượng trên máy HPLC được thể hiện qua bảng 6:

Bảng 6. Tỷ lệ axetonitril (C) và Nước (A) thay đổi theo thời gian

Thời gian (phút)	A(%)	C(%)
0,0	99,0	1,0
4,0	99,0	1,0
4,1	70,0	30,0
9,0	70,0	30,0
9,1	99,0	1,0
13,0	99,0	1,0

tốc độ dòng: 1 mL.phút⁻¹;

thể tích tiêm: 10 µL;

thời gian lưu DCD 3,08 phút; thời gian lưu NBPT là 8,15 phút;

thời gian phân tích mẫu là 13 phút.

b) Pha dung dịch chuẩn gốc NBPT và DCD:

pha dung dịch chuẩn gốc NBPT có nồng độ 200 µg/mL bằng cách cân 10 mg chất chuẩn NBPT với độ chính xác $\pm 0,1$ mg, sau đó hòa tan bằng nước cất trong bình định mức 50 mL;

pha dung dịch chuẩn gốc DCD có nồng độ 500 µg/mL bằng cách cân 25 mg chất chuẩn DCD với độ chính xác $\pm 0,1$ mg, sau đó hòa tan bằng nước cất trong bình định mức 50 mL;

pha dãy dung dịch chuẩn NBPT/DCD từ dung dịch chuẩn gốc NBPT/DCD được thể hiện qua Bảng 7 và Bảng 8;

Bảng 7. Pha các dung dịch chuẩn DCD

STT	Thể tích dung dịch chuẩn gốc DCD (mL)	Thể tích bình định mức (mL)	Nồng độ hoạt chất DCD (µg/mL)
1	1	50	10
2	2	50	20
3	5	50	50
4	8	50	80
5	10	50	100

Bảng 8. Pha các dung dịch chuẩn NBPT

STT	Thể tích dung dịch chuẩn gốc NBPT (mL)	Thể tích bình định mức (mL)	Nồng độ hoạt chất NBPT ($\mu\text{g/mL}$)
1	1,25	50	5
2	2,5	50	10
3	5	50	20
4	10	50	40
5	15	50	60

c) chạy lần lượt hai dãy dung dịch chuẩn NBPT và DCD trong hệ máy sắc ký đã được thiết lập ở bước a) kết quả sắc ký đồ dung dịch chuẩn của NBPT và DCD được minh họa như trong Hình 3A. Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ NBPT/DCD trong khoảng khảo sát với hệ số tương quan $R^2 \sim 1$ tham chiếu Hình 2, cụ thể là Hình 2A là phương trình hồi quy của chất chuẩn DCD là $y = 22,346x + 43,263$; $R^2 = 0,9997$ và Hình 2B là phương trình của chất chuẩn NBPT là $y = 14970x + 489,19$; $R^2 = 0,9999$.

d) chạy sắc ký mẫu phân bón thu được ở bước i) bằng máy HPLC đã thiết lập ở bước a) thu được hai pic tách nhau ra hoàn toàn, mỗi pic đối xứng qua trục đi qua đỉnh mỗi mũi tham chiếu Hình 3 có độ lệch chuẩn tương đối $RSD < 2\%$ chứng tỏ phương pháp có độ chính xác đáp ứng được yêu cầu phân tích; cụ thể là Hình 3A là sắc ký đồ của mẫu chuẩn NBPT và DCD, và Hình 3B là sắc ký đồ của mẫu phân bón N46-plus.

Do đó, sáng chế bao gồm tất cả các sửa đổi, tương đương và các lựa chọn thay thế nằm trong tinh thần và phạm vi của các yêu cầu bảo hộ sau đây. Cần phải hiểu thêm rằng không phải tất cả các phương án được tiết lộ trong đặc tả đã nêu ở trên sẽ nhất thiết phải thỏa mãn hoặc đạt được từng đối tượng, ưu điểm hoặc cải tiến được mô tả trong đặc tả đã nêu ở trên.

Yêu cầu các yếu tố và các bước trong tài liệu này có thể đã được đánh số và/hoặc ký tự chỉ như một sự trợ giúp cho khả năng đọc và hiểu. Bất kỳ việc đánh số và ký tự nào như vậy không nhằm mục đích và không nên được thực hiện để chỉ ra thứ tự của các yếu tố và/hoặc các bước trong yêu cầu bảo hộ.

Tóm tắt sáng chế được cung cấp sẽ cho phép người đọc xác định bản chất và ý chính của công bố kỹ thuật. Nó được trình bày với sự hiểu biết rằng nó sẽ không được sử dụng để giới hạn hoặc giải thích phạm vi hoặc ý nghĩa của các yêu cầu bảo hộ. Các yêu cầu bảo hộ sau đây đã được đưa vào mô tả chi tiết, với mỗi yêu cầu bảo hộ đứng riêng như một phương án độc lập.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình định lượng đồng thời N-(n-butyl) thiophosphoric triamit (NBPT) và dixyandiamit (DCD) bằng kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) bao gồm các bước:

i) chuẩn bị nguyên liệu và thiết lập điều kiện sắc ký cho máy sắc ký hiệu năng cao, cụ thể là:

nguyên liệu bao gồm chất chuẩn NBPT, chất chuẩn DCD, dung môi axetonitril, nước cất, mẫu phân bón; trong đó, hai chất chuẩn NBPT và DCD phải được sấy khô ở mức nhiệt độ từ 90 – 110°C trong 2 giờ, để nguội về nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm trước khi cân;

lựa chọn điều kiện chạy sắc ký bao gồm pha tĩnh cột sắc ký RP-C18 có kích thước cột 250 x 4,6 mm và kích thước hạt 5 µm, pha động axetonitril với nước cất tỷ lệ 1 : 99, đầu dò UV, thể tích tiêm mẫu 10 µL, tốc độ dòng là 1 mL.phút⁻¹, thời gian chạy sắc ký 13 phút, nhiệt độ cột được duy trì ở 30°C ở bước sóng 200 – 240 nm;

trong đó, hai chất chuẩn NBPT và DCD phải được sấy khô ở mức nhiệt độ từ 90 – 110°C trong 2 giờ, để nguội về nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm trước khi cân;

trong đó, dung môi axetonitril và nước cất được lọc qua giấy lọc có kích thước lỗ lọc là 0,2 µm;

ii) pha dung dịch chuẩn gốc NBPT/DCD và dãy dung dịch chuẩn NBPT/DCD có thành phần nguyên liệu được chuẩn bị ở bước (i), cụ thể là:

dung dịch chuẩn gốc NBPT có nồng độ là 200 µg/mL được pha bằng cách hòa tan đồng nhất chất chuẩn NBPT với nước cất trong bình định mức; sau đó thực hiện pha loãng dung dịch chuẩn gốc NBPT bằng nước cất để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ NBPT biến thiên theo thứ tự cụ thể là 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, và 60 µg/mL;

dung dịch chuẩn gốc DCD có nồng độ là 500 µg/mL được pha bằng cách hòa tan đồng nhất chất chuẩn DCD với nước cất trong bình định mức; sau đó thực hiện pha loãng dung dịch chuẩn gốc DCD bằng nước cất để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ DCD biến thiên theo thứ tự cụ thể là 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 80 µg/mL, và 100 µg/mL;

iii) tiến hành sắc ký lần lượt dãy dung dịch chuẩn NBPT và DCD thu được ở bước ii) bằng máy sắc ký hiệu năng cao đã thiết lập các điều kiện sắc ký ở bước i); kết quả thu được phương trình hồi quy của dung dịch chuẩn NBPT và DCD;

trong đó, phương trình hồi quy của chuẩn NBPT thu được là $y = 14970x + 489,19$; $R^2 = 0,9999$, với R là hệ số tương quan tuyến tính, x là nồng độ NBPT, y là diện tích pic;

trong đó, phương trình hồi quy của chuẩn DCD thu được là $y = 22,346x + 43,263$; $R^2 = 0,9997$, với R là hệ số tương quan tuyến tính, x là nồng độ DCD, y là diện tích pic;

iv) tiến hành sắc ký mẫu phân bón đã chuẩn bị ở bước i) bằng máy sắc ký hiệu năng cao đã thiết lập các điều kiện sắc ký ở bước i); kết quả thu được hai điện tích mũi tín hiệu (pic) tách nhau ra hoàn toàn và mỗi pic đều đối xứng qua trục đi qua đỉnh mỗi pic; đồng thời ghi nhận thời gian lưu của DCD là 3,08 phút và của NBPT là 8,15 phút.

2. Quy trình định lượng đồng thời NBPT và DCD bằng kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo điểm 1, trong đó mẫu phân bón ở bước i) được chuẩn bị bao gồm các bước:

(a) lấy mẫu phân bón chuẩn; trong đó, mẫu phân bón chuẩn là mẫu phân bón bất kỳ được sản xuất ngoài cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng còn có tác dụng ức chế quá trình nitrat hóa và enzym ureaza tồn tại trong đất, nghĩa là trong mẫu phân bón chuẩn có chứa đồng thời hai hoạt chất NBPT và DCD.

(b) nghiền mịn mẫu phân bón chuẩn ở bước a) thu được mẫu phân bón chuẩn đã được nghiền;

(c) sàng mẫu phân bón chuẩn đã được nghiền thu được ở bước b) sử dụng rây hoặc sử dụng máy lắc sàng; trong đó kích thước mắt sàng 0,1 mm; kết quả thu được mẫu phân bón chuẩn đã được sàng;

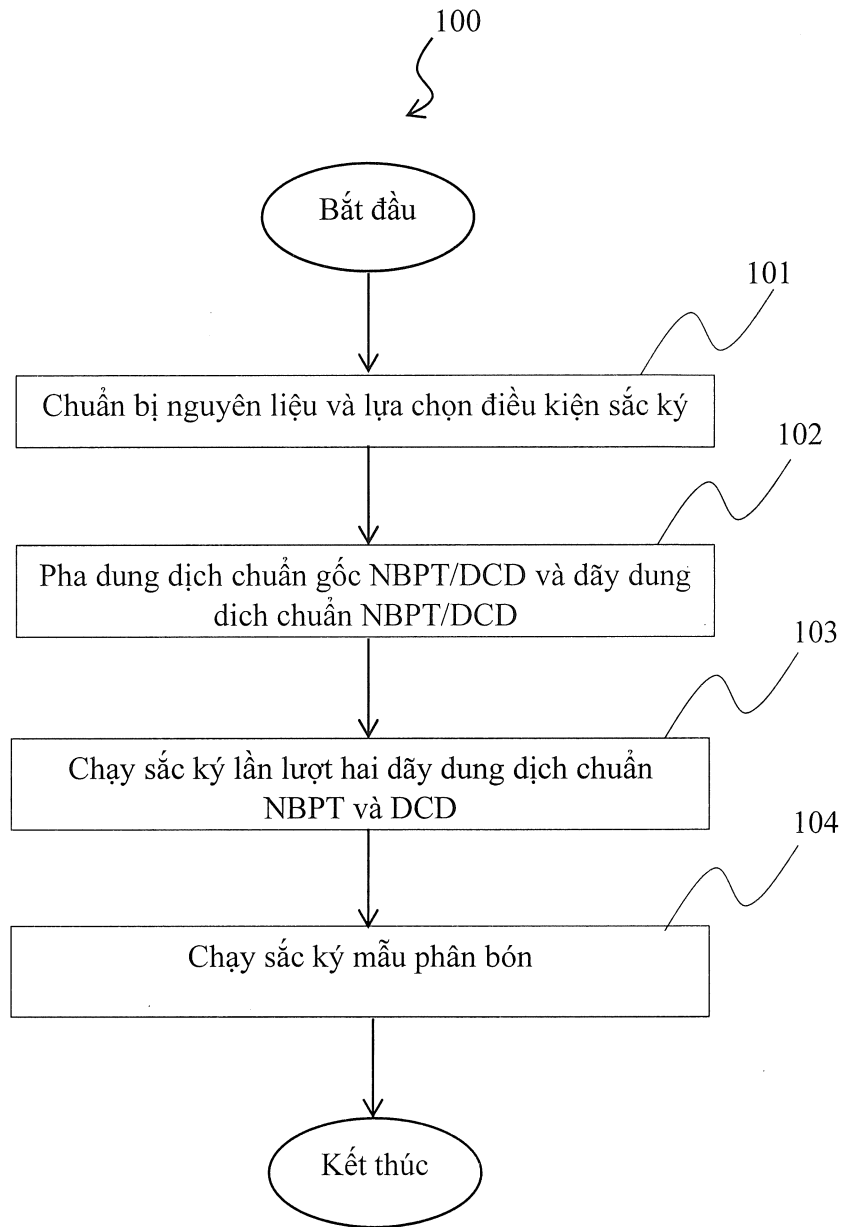
(d) pha 100 mL dung dịch mẫu phân bón chuẩn bằng cách hòa tan đồng nhất 5 g mẫu phân bón chuẩn đã được sàng thu được ở bước c) bằng nước cất trong bình định mức 100 mL; trong đó, thiết bị sử dụng ở bước d) là cân phân tích có độ chính xác ± 1 mg và máy lắc siêu âm;

(e) lọc dung dịch mẫu phân bón chuẩn thu được ở bước d) bằng màng lọc có kích thước lỗ $\leq 0,45 \mu\text{m}$ thu được mẫu phân bón; sử dụng lọ đựng mẫu (vial) để chứa mẫu phân bón thu được ở bước e).

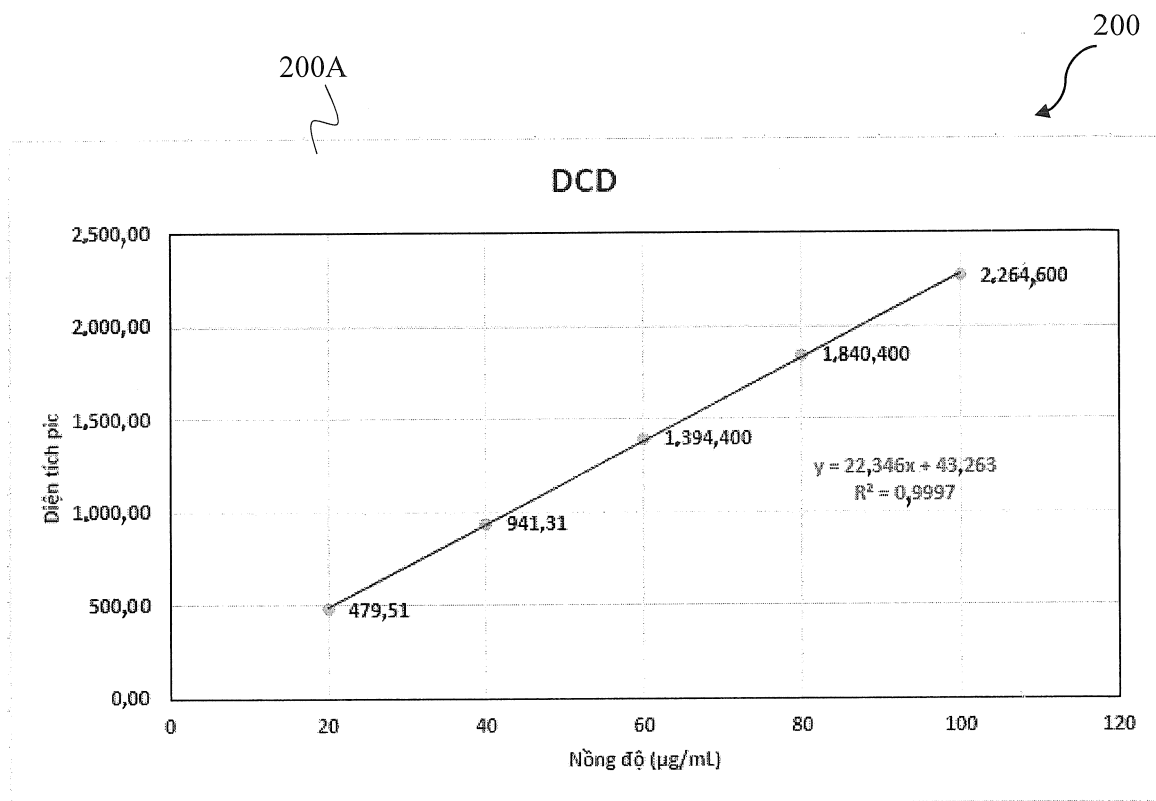
3. Quy trình định lượng đồng thời NBPT và DCD bằng kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo điểm 1, máy sắc ký lỏng hiệu năng cao, tốt nhất là dòng máy HPLC Agilent 1290, bốn kênh dung môi, được lắp đặt hệ thống bơm mẫu tự động và có buồng gia nhiệt cho cột sắc ký.

4. Quy trình định lượng đồng thời NBPT và DCD bằng kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo điểm 1, đầu dò UV được cài đặt khoảng bước sóng từ 190 đến 800 nm; tốt nhất từ 200 đến 240 nm; trong đó, khoảng bước sóng hấp thụ của NBPT là 205 – 215 nm và của DCD là 205 – 235nm.

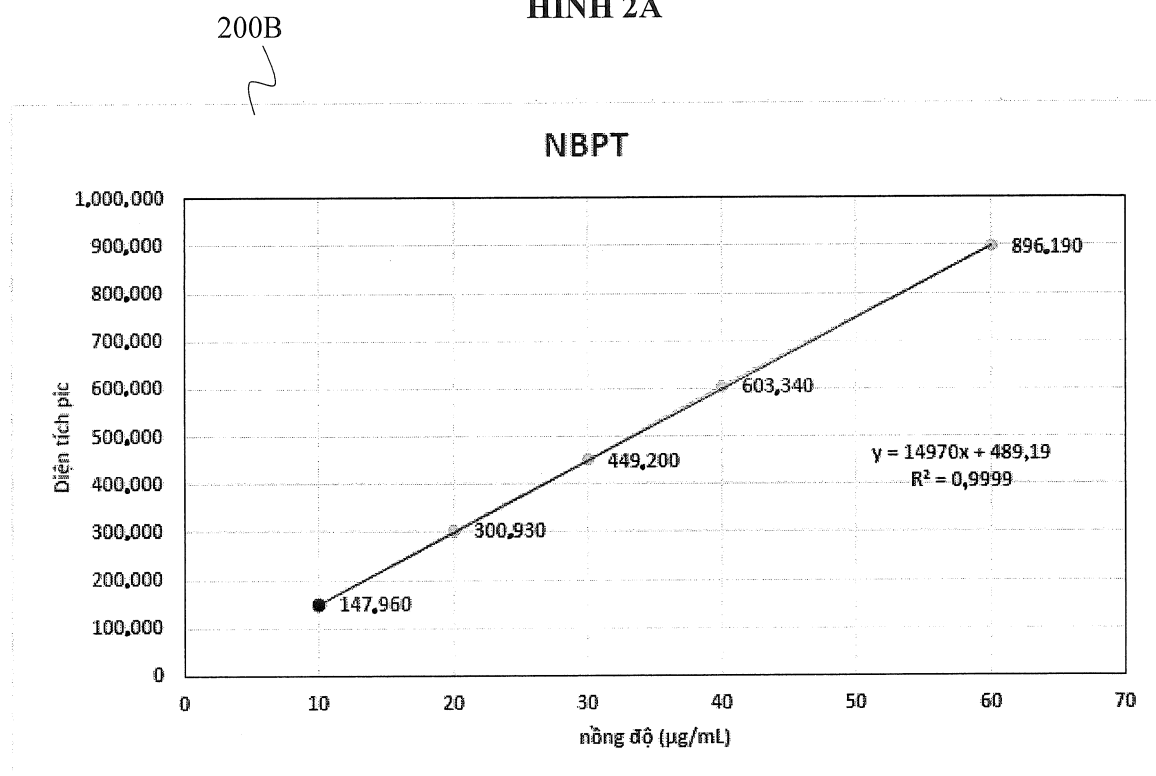
5. Quy trình định lượng đồng thời NBPT và DCD bằng HPLC bằng kỹ thuật phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo điểm 1, khi chạy mẫu chuẩn thành phần bao gồm DCD 60 $\mu\text{g/mL}$ và NBPT 30 $\mu\text{g/mL}$ thu được độ lệch chuẩn tương đối RSD $< 2\%$.



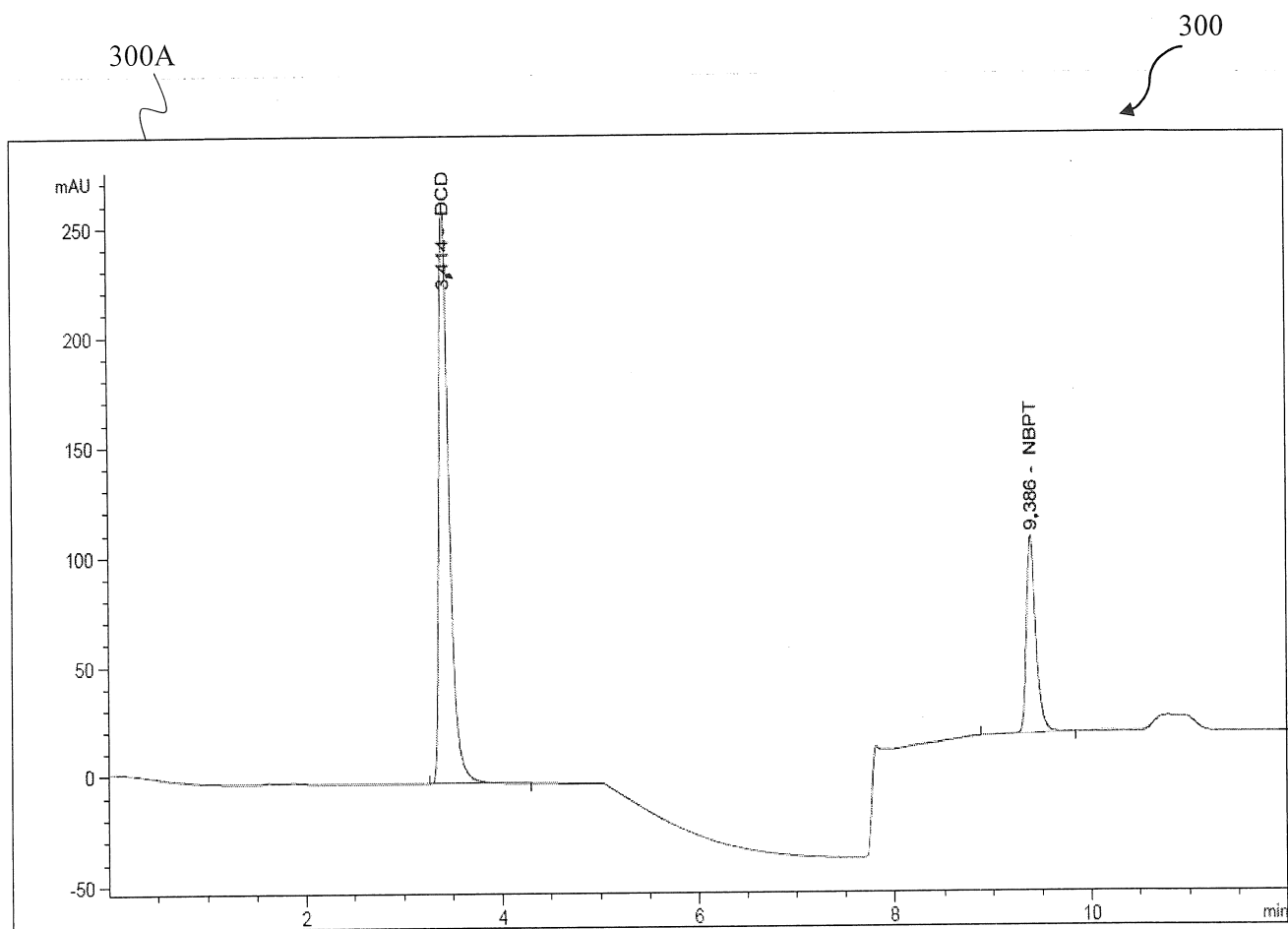
HÌNH 1



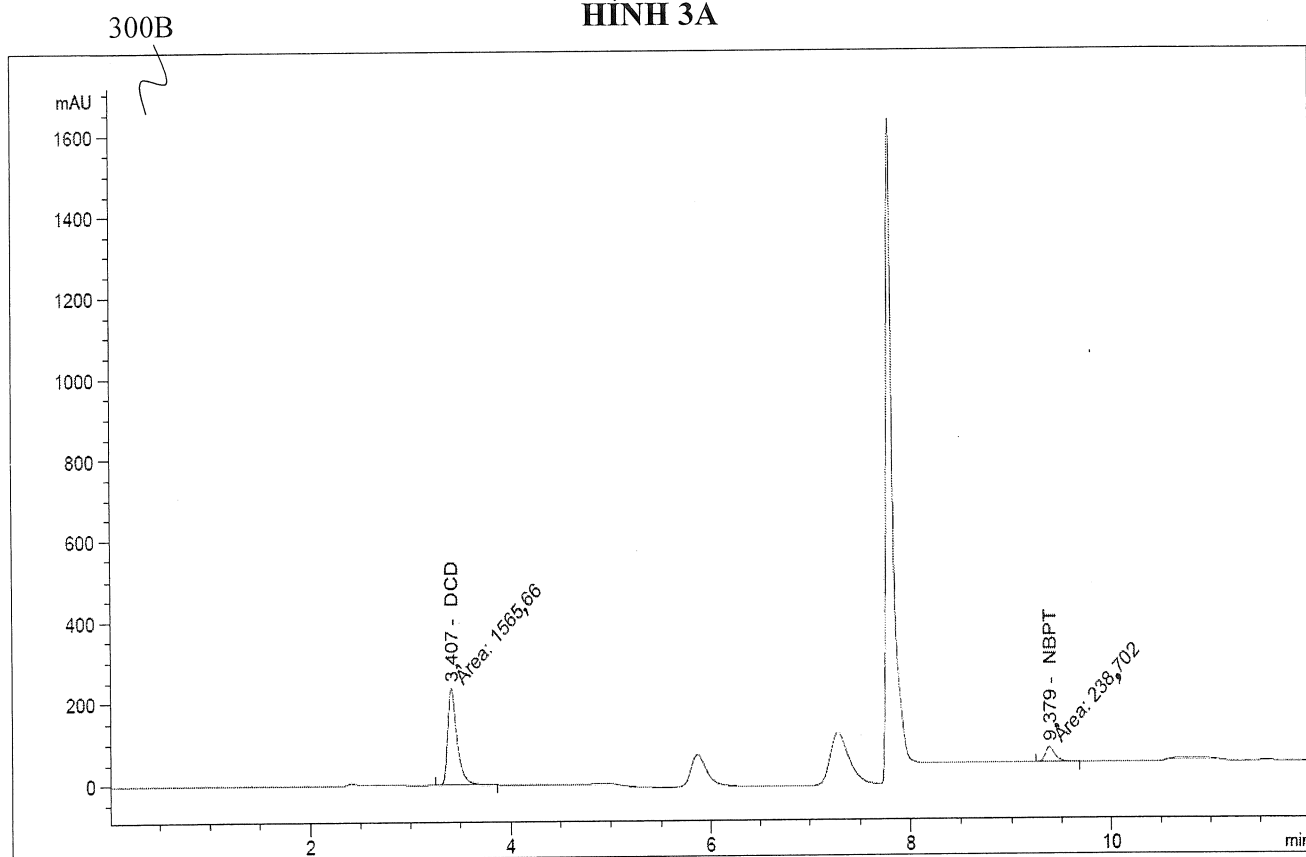
HÌNH 2A



HÌNH 2B



HÌNH 3A



HÌNH 3B