

## Lời nói đầu

**TCVN 8561:2010** được chuyển đổi từ 10 TCN 365- 2004 theo qui định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 6 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 1/8/2007 của Chính phủ qui định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật.

**TCVN 8561:2010** do Viện Thổ nhưỡng Nông hoá 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 – Phương pháp xác định axit humic và axit fulvic

*Fertilizers – Method for determination of humic acid and fulvic acid*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định axit humic và axit fulvic có trong các loại phân bón, chất phế thải có chứa chất hữu cơ như: phân hữu cơ, phân hữu cơ vi sinh, hữu cơ sinh học, phân hữu cơ khoáng, than bùn, phân bón dạng humic- fulvic và phế thải hữu cơ từ các nguồn khác nhau.

## 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây là cần thiết để áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng 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 4851-89 (ISO 3696- 1987), *Nước dùng cho phân tích trong phòng thí nghiệm- Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

## 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Các axit humic là các đại phân tử thơm phức tạp bao gồm nhiều nhóm chức như rượu, amin, cacbonyl, cacboxylic, phenol, quinil...Axit fulvic có khối lượng phân tử nhỏ hơn axit humic, có thể là tiền chất hoặc là các mạch đứt của axit humic.

## 4 Nguyên tắc

4.1 Tiêu chuẩn này dựa theo phương pháp Walkley-Black - Oxy hoá các bon hữu cơ (axit humic và axit fulvic) bằng dung dịch kali bicromat dư trong môi trường axit sunfuric, sử dụng nhiệt do quá trình hoá tan axit sunfuric đậm đặc vào dung dịch bicromat, sau đó chuẩn độ lượng dư bicromat bằng dung dịch sắt hai, từ đó suy ra hàm lượng axit humic và axit fulvic.

4.2 Dựa vào tính chất hoà tan của axit humic và axit fulvic trong môi trường kiềm, xác định được tổng axit humic và axit fulvic; dựa vào tính chất không hoà tan trong môi trường axit của axit humic để tách riêng axit humic và xác định được axit humic, từ đó suy ra hàm lượng axit fulvic.

## 5 Thuốc thử

Hoá chất sử dụng để pha các chất chuẩn đạt loại tinh khiết hoá học, hoá chất sử dụng để phân tích đạt loại tinh khiết phân tích.

5.1 Nước cất, TCVN 4851-89.

5.2 Axit sunfuric ( $H_2SO_4$ )  $d = 1,84$ .

5.3 Axit photphoric ( $H_3PO_4$ ) 85%.

5.4 Natri pyrophotphat ( $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ ).

5.5 Kali bicromat ( $K_2Cr_2O_7$ ).

5.6 Muối Mohr [ $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ ].

5.7 Dung dịch hỗn hợp natrihydroxit-pyrophotphat pH= 13.

Cân 44,6 g  $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$  và 4 g NaOH vào cốc dung tích 1000 ml, thêm 400 ml nước, khuấy tan, chuyển vào bình định mức dung tích 1000 ml, thêm nước đến vạch định mức, lắc đều (Dung dịch có nồng độ 0,1 M cho mỗi loại).

5.8 Dung dịch tiêu chuẩn kali bicromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1 N:

Cân 49,040 g  $K_2Cr_2O_7$  (đã sấy khô ở 105 °C trong 2 h, để nguội trong bình hút ẩm) cho vào cốc dung tích 1000 ml, thêm 400 ml nước, khuấy tan, chuyển vào bình định mức dung tích 1000 ml, thêm nước đến vạch định mức, lắc đều. Bảo quản kín ở 20 °C.

5.9 Dung dịch muối Mohr nồng độ khoảng 0,5 M:

Cân 196 g  $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$  vào cốc dung tích 1000 ml, thêm 50 ml axit  $H_2SO_4$  đặc, thêm 450 ml nước, khuấy tan, chuyển vào bình định mức dung tích 1000 ml, thêm nước đến vạch định mức, lắc đều, để cho lắng trong, nếu đục phải lọc. Bảo quản kín trong lọ màu nâu ở 20 °C, tránh xâm nhập của không khí.

5.10 Dung dịch  $H_2SO_4$  1N:

Lấy 28 ml  $H_2SO_4$   $d = 1,84$  vào cốc đã có sẵn 400 ml nước, khuấy tan, chuyển vào bình định mức dung tích 1000 ml, thêm nước đến vạch định mức, lắc đều.

5.11 Dung dịch  $H_2SO_4$  0,01 N,  $H_2SO_4$  0,05 N, pha từ dung dịch  $H_2SO_4$  1 N.

5.12 Dung dịch NaOH 0,05 N:

Cân 2 g NaOH cho vào cốc, thêm nước, khuấy tan, chuyển vào bình định mức dung tích 1000 ml, thêm nước đến vạch định mức.

#### **5.13 Dung dịch chỉ thị màu ferroin O. phenalthrolin:**

Cân 0,695 g sắt hai sunphat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) và 1,485 g O. phenalthrolin monohydrat ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), hoà tan trong 100 ml nước.

#### **5.14 Dung dịch chỉ thị màu bari diphenylamin sunfonat 0,16%:**

Cân 0,16 g bari diphenylamin sunfonat, hoà tan trong 100 ml nước.

#### **5.15 Dung dịch chỉ thị màu axit N-phenylanthranilic:**

Cân 0,1 g axit N-phenylanthranilic và 0,1 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  trộn đều với một ít nước cất và sau hoà tan thành 100 ml.

## **6 Thiết bị, dụng cụ**

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm và các thiết bị, dụng cụ như sau:

### **6.1 Bếp cách thủy.**

### **6.2 Tủ sấy, nhiệt độ $200^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .**

### **6.3 pH kế.**

### **6.4 Cân phân tích, độ chính xác 0,0002 g.**

### **6.5 Rây, đường kính lỗ 0,2 mm.**

### **6.6 Cốc chịu nhiệt, dung tích 250 ml**

### **6.7 Bình tam giác chịu nhiệt, dung tích 250 ml.**

### **6.8 Phễu lọc, đường kính 8 cm.**

### **6.9 Giấy lọc mịn.**

### **6.10 Buret, dung tích 50 ml, độ chính xác 0,1 ml.**

### **6.11 Tấm cách nhiệt.**

## **7 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu**

7.1 Mẫu đem đến phòng thí nghiệm được đảo trộn đều, trải phẳng trên khay nhựa hoặc tấm nilông. lấy mẫu trung bình theo phương pháp đường chéo góc, trộn đều, lấy hai phần đối diện và loại bỏ dần cho đến khi còn khoảng 500 g.

7.2 Chia mẫu trung bình thành hai phần bằng nhau, cho vào hai túi PE buộc kín, ghi mã số phân tích, ngày, tháng, tên mẫu (và các thông tin cần thiết), một phần làm mẫu lưu, một phần làm mẫu phân tích.

7.3 Nghiền mịn mẫu rồi qua rây 0,2 mm, trộn đều làm mẫu phân tích.

7.4 Các mẫu có độ ẩm cao có thể cân một lượng mẫu xác định, sấy khô ở nhiệt độ 70 °C, xác định độ ẩm, nghiền mịn mẫu khô qua rây 0,2 mm làm mẫu phân tích. Lưu ý khi tính kết quả phải nhân với hệ số chuyển đổi từ khối lượng mẫu khô sang khối lượng mẫu thực tế ban đầu.

7.5 Các mẫu không thể xử lý theo 7.3, 7.4 có thể lấy một lượng mẫu khoảng 20 g, nghiền thật mịn làm mẫu phân tích.

7.6 Các mẫu phân hữu cơ khoáng có trộn phân urê phải rửa hết urê trước khi xác định axit humic, fulvic (Xem phụ lục A).

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Chiết mẫu:

8.1.1 Cân 5 g ± 0,001 g mẫu đã được xử lý theo (7.3) cho vào bình tam giác dung tích 250 ml.

8.1.2 Thêm 100 ml dung dịch hỗn hợp natrihydroxit-pyrophotphat pH = 13.

8.1.3 Lắc đều trong 1 h và để qua đêm.

8.1.4 Lọc qua phễu khô giấy lọc mịn, nếu đục cần lọc lại. Dung dịch lọc dùng để xác định axit humic và axit fulvic (gọi đây là dung dịch A).

8.1.5 Tiến hành đồng thời hai mẫu trắng không có mẫu thử, đồng nhất cùng điều kiện như mẫu thử.

### 8.2 Xác định tổng axit humic và axit fulvic:

8.2.1 Lấy 5,0 ml dung dịch A cho vào bình tam giác chịu nhiệt dung tích 250 ml.

8.2.2 Trung hòa bằng dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N cho đến khi xuất hiện kết tủa.

8.2.3 Cỏ cạn trên bếp cách thủy (hoặc cách cát) đến gần khô, lấy ra khỏi bếp.

8.2.4 Thêm 20,0 ml dung dịch tiêu chuẩn K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1 N.

8.2.5 Thêm nhanh 40 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đặc d= 1,84 bằng ống đong, lắc nhẹ trộn đều.

8.2.6 Đặt bình lên trên tấm cách nhiệt để yên trong thời gian 30 min.

8.2.7 Sau đó thêm 100 ml nước và 10 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> đậm đặc, để nguội ở nhiệt độ phòng.

8.2.8 Tiến hành đồng thời hai mẫu trắng không có mẫu thử, đồng nhất cùng điều kiện như mẫu thử.

8.2.9 Trường hợp mẫu sau khi oxy hoá có màu xanh cần phải làm lại, lấy lượng dung dịch A ít đi hoặc cân lượng mẫu ít hơn.

## 8.2.10 Chuẩn độ:

**8.2.10.1** Thêm 0,5 ml chỉ thị màu và chuẩn độ lượng dư bicromat bằng dung dịch muối Mohr 0,5 M tới màu của dung dịch thay đổi từ tím sang xanh lá cây. Cần chú ý, tại gần điểm kết thúc chuyển màu, phải nhỏ từ từ từng giọt dung dịch chuẩn và lắc đều cho đến khi chuyển màu đột ngột, nếu chuẩn độ quá dư, cho thêm 0,5 ml dung dịch  $K_2Cr_2O_7$  1 N và tiếp tục chuẩn độ một cách thận trọng, cộng thêm thể tích dung dịch  $K_2Cr_2O_7$  thêm vào thể tích dung dịch  $K_2Cr_2O_7$  đã sử dụng.

**8.2.10.2** Phương pháp xác định chỉ có kết quả tốt khi lượng dư bicromat còn trên 40 % lượng đã sử dụng, nghĩa là khi số ml dung dịch muối Mohr chuẩn độ hết ít hơn 16 ml, cần phải làm lại.

CHÚ THÍCH 1: Chuyển màu của chỉ thị

- 1) Chỉ thị màu ferroin O. phenantrolin, chuyển từ xanh sẫm sang đỏ.
- 2) Chỉ thị màu bari diphenylamin sunfonat, chuyển từ xanh tím sang xanh lá cây.
- 3) Chỉ thị màu axit N-phenylanthranilic- chuyển từ tím sang xanh lá cây.

## 8.3 Xác định axit humic:

**8.3.1** Lấy chính xác 5 ml dung dịch A cho vào cốc chịu nhiệt dung tích 250 ml.

**8.3.2** Kết tủa axit humic bằng cách cho từng giọt  $H_2SO_4$  1 N, lắc đều, tới pH= 1 (kiểm tra bằng pH kế)

**8.3.3** Đun nóng dung dịch trên bếp cách thủy 1 h đến 2 h để thúc đẩy thêm quá trình keo tụ axit humic, sau đó để nguội dung dịch.

**8.3.4** Lọc lấy kết tủa trên phễu giấy lọc mịn, loại bỏ dịch lọc.

**8.3.5** Hoà tan hết kết tủa trên giấy lọc bằng NaOH 0,05 N nóng và chuyển dung dịch vào bình tam giác chịu nhiệt dung tích 250 ml.

**8.3.6** Trung hoà bằng  $H_2SO_4$  0,05 N tới khi thấy xuất hiện kết tủa.

**8.3.7** Cô cạn trên bếp cách thủy tới gần khô.

**8.3.8** Thêm 20 ml dung dịch tiêu chuẩn  $K_2Cr_2O_7$  1 N, thêm nhanh 40 ml  $H_2SO_4$  đặc từ ống đong, lắc nhẹ trộn đều.

**8.3.9** Đặt bình lên trên tấm cách nhiệt để yên trong thời gian 30 min, sau đó thêm 100 ml nước và 10 ml  $H_3PO_4$  đậm đặc, để nguội ở nhiệt độ phòng.

**8.3.10** Tiến hành đồng thời hai mẫu trắng không có mẫu thử, đồng nhất cùng điều kiện như mẫu thử.

## 8.3.11 Chuẩn độ:

Thêm 0,5 ml chỉ thị màu và chuẩn độ lượng dư bicromat bằng dung dịch muối Mohr 0,5 M tới chuyển màu. Chuẩn độ tới gần điểm kết thúc chuyển màu, phải nhỏ từng giọt và lắc đều cho đến khi chuyển màu đột ngột, nếu chuẩn độ quá dư, cho thêm 0,5 ml dung dịch  $K_2Cr_2O_7$  1 N và tiếp tục chuẩn độ một cách thận trọng, cộng thêm thể tích dung dịch  $K_2Cr_2O_7$  thêm vào thể tích dung dịch  $K_2Cr_2O_7$  đã sử dụng.

CHÚ THÍCH 2: Sự kết tủa axit humic hoàn toàn khi dung dịch có pH= 1, có thể sử dụng máy khuấy từ và đưa điện cực pH vào kiểm tra thường xuyên.

## 9 Tính kết quả

9.1 Hàm lượng axit humic + axit fulvic quy về các bon theo phần trăm khối lượng (% C<sub>H+F</sub>) được tính theo công thức:

$$\% C_{H+F} = \frac{V \times (a-b) \times 3 \times 100 \times 100}{a \times 75 \times 1000 \times m}$$

Trong đó:

- V Thể tích dung dịch K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> sử dụng tính bằng mililit (ml);
- a Thể tích dung dịch muối Mohr chuẩn độ mẫu trắng tính bằng mililit (ml);
- b Thể tích dung dịch muối Mohr chuẩn độ mẫu thử tính bằng mililit (ml);
- m Khối lượng mẫu tương ứng với số ml dung dịch A lấy phân tích tính bằng gam (g);
- 3 Đương lượng gam của các bon tính bằng gam (g);

100/ 75 Hệ số qui đổi thực nghiệm do axit humic và axit fulvic có các nhóm chức mạch vòng nên khi oxi hóa bằng kali bicromat chỉ oxi hóa được 75 % cacbon trong hợp chất.

CHÚ THÍCH 3: Hàm lượng axit humic + axit fulvic quy về các bon theo phần trăm khối lượng (% C<sub>H+F</sub>) cho thứ tự sử dụng 20 ml K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1 N (ký hiệu % C<sub>H+F</sub>) được tính như sau:

$$\% C_{H+F} = \frac{(a-b) \times 8}{a \times m}$$

Trong đó:

- a Thể tích dung dịch muối Mohr chuẩn độ mẫu trắng tính bằng mililit (ml);
- b Thể tích dung dịch muối Mohr chuẩn độ mẫu thử tính bằng mililit (ml);
- m Khối lượng mẫu tương ứng với số tính bằng ml dung dịch A lấy phân tích tính bằng gam (g).

9.2 Hàm lượng axit humic trong mẫu quy về các bon theo phần trăm khối lượng (% C<sub>H</sub>) được tính tương tự như công thức tính hàm lượng axit humic+ axit fulvic.

9.3 Công thức tính hàm lượng axit fulvic quy về các bon theo phần trăm khối lượng (% C<sub>F</sub>) được tính theo công thức:

$$\% C_F = \% C_{H+F} - \% C_H$$

9.4 Kết quả phép thử là giá trị trung bình các kết quả của ít nhất hai lần thử được tiến hành song song. Nếu sai lệch giữa các lần thử lớn hơn 5 % so với giá trị trung bình của phép thử thì phải tiến hành lại.

## 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm cần bao gồm những thông tin sau:

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) Đặc điểm nhận dạng mẫu;
- c) Kết quả xác định axit humic và axit fulvic;
- d) Những chi tiết không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn và các yếu tố có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm.



## Phụ lục A

(Quy định)

### Rửa urê trong mẫu phân hữu cơ khoáng có trộn urê

**A.1** Các mẫu phân hữu cơ khoáng có trộn phân urê phải rửa hết urê trước khi xác định axit humic và axit fulvic, bởi phân urê có ảnh hưởng lớn tới kết quả xác định axit humic và axit fulvic, cách rửa như sau:

**A.1.1** Cân chính xác 20 g mẫu cho vào cốc dung tích 250 ml.

**A.1.2** Thêm khoáng 100 ml dung dịch HCl 0,01 N, khuấy nhẹ, rửa sạn nhiều lần qua phễu lọc đã biết trọng lượng giấy lọc, rồi dồn tất cả sạn trong cốc sang giấy lọc, gom lấy sạn, loại bỏ nước lọc.

**A.1.3** Sấy khô sạn và giấy lọc ở nhiệt độ 70 °C trong thời gian 4 h.

**A.1.4** Cân khối lượng sạn và giấy lọc khô, tính ra khối lượng sạn khô, tính ra hệ số chuyển đổi từ khối lượng mẫu khô (đã rửa và sấy) sang khối lượng mẫu thực tế ban đầu.

**A.2** Nghiền sạn khô qua rây 0,2 mm, sử dụng làm mẫu phân tích.

**A.3** Kết quả phân tích được nhân với hệ số chuyển đổi từ khối lượng mẫu khô (đã rửa và sấy) sang khối lượng mẫu thực tế ban đầu.

## Phụ lục B

(Tham khảo)

### Xác định axit humic với mẫu có hàm lượng axit humic cao

**B.1** Trong trường hợp mẫu có hàm lượng axit humic cao (lớn hơn 10%) có thể thay đổi thủ tục để tránh phải kết tủa nhiều lần - tránh sai số dễ mắc phải. Cách làm như sau:

**B.1.1** Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch A cho vào cốc chịu nhiệt dung tích 250 ml.

**B.1.2** Kết tủa axit humic bằng  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N ở pH = 1: Thêm từng giọt  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N, lắc đều tới pH = 1 (kiểm tra bằng pH kế).

**B.1.3** Đun nóng dung dịch trên bếp cách thủy 1 h đến 2 h, thúc đẩy keo tụ axit humic, sau đó để nguội dung dịch.

**B.1.4** Lọc lấy kết tủa trên phễu giấy lọc mịn, rửa kết tủa vài lần bằng  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N, loại bỏ dịch lọc.

**B.1.5** Hoà tan hết kết tủa trên giấy lọc bằng NaOH 0,05 N nóng và chuyển dịch lọc vào định mức dung tích 100 ml (dung dịch B), chú ý nhỏ từng giọt NaOH 0,5 N nóng cho tan hết kết tủa, lượng NaOH 0,05 N sử dụng không vượt quá 100 ml, lên định mức bằng nước cất đến 100 ml.

**B.1.6** Lấy chính xác 5 ml đến 10 ml dung dịch B cho vào cốc dung tích 250 ml.

**B.1.7** Trung hoà bằng  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05 N (tới khi thấy xuất hiện kết tủa).

**B.1.8** Cô cạn trên bếp cách thủy tới gần khô.

**B.2** Tiến hành xác định axit humic theo (8.3).

---