

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 11285:2016

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI -
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AXIT P-AMINO BENZOIC -
PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG PHỔ**

*Animal feeding stuffs - Determination of p-aminobenzoic acid content -
Spectrophotometric method*

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 11285:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 964.28
p-Aminobenzoic acid in feeds. Spectrophotometric method;

TCVN 11285:2016 do Viện Chăn nuôi 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.

Thức ăn chăn nuôi - Xác định hàm lượng axit p-aminobenzoic - Phương pháp đo quang phổ

*Animal feeding stuffs - Determination of p-aminobenzoic acid content -
Spectrophotometric method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đo quang phổ để xác định hàm lượng axit p-aminobenzoic trong thức ăn chăn nuôi.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau 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 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 6952 (ISO 9498), *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử.*

3 Nguyên tắc

Chiết axit p-aminobenzoic ra khỏi mẫu bằng axit clohydric, tạo dẫn xuất màu với natri nitrit và amoni sulfamat, phát triển màu bằng thuốc thử liên kết rồi đo cường độ màu ở bước sóng 545 nm.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã loại ion, trừ khi có quy định khác.

4.1 Natri hydroxít (NaOH), dung dịch 1 M.

4.2 Axit clohydric (HCl) đặc, dung dịch từ 36,5 % đến 38,0 %.

4.3 Natri nitrit (NaNO₂), dung dịch 0,10 % (khối lượng/thể tích).

Chuẩn bị mới dung dịch trước khi sử dụng.

TCVN 11285:2016

4.4 Thuốc thử liên kết, dung dịch *N*-naphthylethylenediamin dihydroclorua ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl$) 0,1 % (khối lượng/thể tích)

Thuốc thử này chỉ sử dụng trong vòng một tuần sau khi chuẩn bị và bảo quản trong chai tối màu, để trong tủ lạnh.

4.5 Natri cacbonat (Na_2CO_3), dung dịch 1 % (khối lượng/thể tích).

4.6 Dung dịch chuẩn axit *p*-aminobenzoic ($C_7H_7NO_2$)

4.6.1 Dung dịch chuẩn gốc, 1 mg/ml

Chuyển 0,100 g chất chuẩn axit *p*-aminobenzoic (độ tinh khiết lớn hơn 99 %) vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong 5 ml dung dịch natri hydroxit 1 M (4.1) và thêm nước đến vạch và trộn đều.

4.6.2 Dung dịch chuẩn trung gian, 25 µg/ml

Cho 5 ml dung dịch chuẩn gốc (4.6.1) vào bình định mức 200 ml và thêm nước đến vạch và trộn đều.

4.6.3 Dung dịch chuẩn làm việc, 0,5; 1,0 và 1,5 µg/ml

Cho 2 ml, 4 ml và 6 ml dung dịch chuẩn trung gian (4.6.2) vào các bình định mức 100 ml, cho vào mỗi bình 3 ml axit clohydric (4.2), thêm nước đến vạch và trộn đều.

4.7 Amoni sulfamat ($NH_4SO_3NH_2$), dung dịch 0,50 % (khối lượng/thể tích).

Chuẩn bị dung dịch ngay trước khi sử dụng.

4.8 Ete, không chứa peroxit.

4.9 Isoamyl alcol (3-methyl-1-butanol, $C_5H_{12}O$).

4.10 Chất trợ lọc.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm và cụ thể như sau:

5.1 Máy đo quang phổ, có thể đo ở bước sóng 545 nm.

5.2 Bình định mức, dung tích 100 ml, 200 ml, 250 ml.

5.3 Cốc có mỏ, dung tích 50 ml và 250 ml.

5.4 Bể ổn nhiệt bằng hơi nước.

5.5 Giấy lọc Whatman số 2 hoặc loại tương đương.

5.6 Pipet, có thể phân phối được các thể tích thích hợp.

5.7 Bộ chiết.

5.8 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 4325 (ISO 6497) *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu*.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952 (ISO 9498).

8 Phép thử định lượng

8.1 Chuẩn bị đường chuẩn

Dùng pipet chuyển lần lượt 10 ml của ba dung dịch chuẩn axit p-aminobenzoic nồng độ 0,5; 1,0 và 1,5 µg/ml (4.6.3), có chứa tương ứng 5 µg; 10 µg và 15 µg axit p-aminobenzoic, cho vào từng cốc có mỏ 50 ml (5.3). Thêm vào mỗi cốc 5 ml nước và 2 ml dung dịch natri nitrit 0,10 % (4.3) mới chuẩn bị, trộn và để yên 3 min. Thêm 2 ml dung dịch amonisulfamat 0,50 % (4.7), trộn rồi để yên 2 min. Sau đó thêm vào 1 ml thuốc thử liên kết (4.4). Trộn kỹ các dung dịch và đợi 10 min.

Chuẩn bị mẫu trắng tương tự như trên nhưng thay 1 ml thuốc thử liên kết bằng 1 ml nước.

Xác định độ hấp thụ của các dung dịch chuẩn so với nước ở bước sóng 545 nm bằng máy đo quang phổ (5.1). Dụng đường chuẩn (tuyến tính) của độ hấp thụ (đã hiệu chỉnh độ hấp thụ mẫu trắng) theo lượng axit p-aminobenzoic 5 µg, 10 µg và 15 µg.

8.2 Chuẩn bị dung dịch thử

Cân 5 g phần mẫu thử đã chuẩn bị theo Điều 7, chính xác đến 1 mg, cho vào bình định mức 250 ml (5.2), dùng 10 ml nước để làm ướt hoàn toàn mẫu thử, sau đó cho thêm 15 ml axit clohydric (4.2) rồi thêm 125 ml nước. Trộn và để trên bề ổn nhiệt (5.4), thỉnh thoảng xoay bình cho đến khi dung dịch sẫm màu. Làm nguội, pha loãng bằng nước đến 250 ml và để cho các hạt lắng xuống.

Dùng pipet chuyển 50 ml dung dịch trên cho vào bình định mức 100 ml (5.2), thêm nước đến vạch và trộn kỹ. Rót dung dịch này sang cốc có mỏ 250 ml (5.3), thêm chất trợ lọc (4.10) và lọc qua giấy lọc Whatman số 2 (5.5) hoặc loại tương đương, loại bỏ 10 ml đến 15 ml dịch lọc đầu tiên nếu bị đục.

TCVN 11285:2016

8.3 Phép xác định

Dùng pipet lấy hai phần, mỗi phần 10 ml dung dịch đã chuẩn bị (8.2) cho vào 2 cốc có mỏ 50 ml (5.3), thêm vào mỗi cốc 5 ml nước và 2 ml dung dịch natri nitrit 0,10 % (4.3) mới chuẩn bị, trộn và để yên 3 min. Thêm 2 ml dung dịch amoni sulfamat 0,50 % (4.7), trộn rồi để yên 2 min. Sau đó thêm vào một trong hai cốc 1 ml thuốc thử liên kết (4.4) và cho vào cốc còn lại (mẫu trắng) 1 ml nước. Trộn kỹ các dung dịch và đợi 10 min.

Xác định độ hấp thụ của mẫu thử so với nước ở bước sóng 545 nm trong máy đo quang phổ (5.1).

CHÚ THÍCH: Tránh lấy số đọc sai do bọt khí nitơ bám trên thành cuvet.

Lấy số đo độ hấp thụ của mẫu thử trừ đi độ hấp thụ của mẫu trắng và dựa vào đường chuẩn để tính số microgam axit p-aminobenzoic có trong dung dịch thử.

8.4 Tính kết quả

Hàm lượng axit p-aminobenzoic có trong mẫu thử, X_1 , tính bằng milligam trên kilogam (mg/kg) theo công thức sau:

$$X_1 = C \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{V_3}{V_4} \times \frac{1}{w}$$

$$X_1 = C \times 10$$

Trong đó:

C là lượng axit p-aminobenzoic có trong dịch pha loãng cuối cùng (dung dịch thử), xác định từ đường chuẩn (xem 8.3), tính bằng microgam.

V_1 là thể tích dịch chiết thu được (xem 8.2), tính bằng millilit (trong trường hợp này $V_1 = 250$ ml);

V_2 là thể tích dịch chiết đã lấy để pha loãng (xem 8.2), tính bằng millilit (trong trường hợp này $V_2 = 50$ ml);

V_3 là thể tích dịch chiết pha loãng (xem 8.2), tính bằng millilit (trong trường hợp này $V_3 = 100$ ml);

V_4 là thể tích dung dịch thử sử dụng cho phép phân tích (xem 8.3), tính bằng millilit (trong trường hợp này $V_4 = 10$ ml);

w là khối lượng mẫu thử (xem 8.2), tính bằng gam (trong trường hợp này $w = 5$ g).

Hàm lượng p-aminobenzoat có trong mẫu thử, X_2 , tính bằng milligam trên kilogam (mg/kg) theo công thức sau:

$$X_2 = X_1 \times 1,278$$

Trong đó:

1,278 là hệ số chuyển đổi từ axit p-aminobenzoic sang p-aminobenzoat (bằng tỉ lệ giữa khối lượng phân tử axit p-aminobenzoic và p-aminobenzoat).

9 Phép thử định tính

Phép thử định tính nhằm phân biệt axit p-aminobenzoic với axit arsanilic và sulfaquinoxalin.

Cho 10 ml dịch lọc của phần mẫu thử (8.2) vào bộ chiết (5.7). Chiết bằng 10 ml ete không chứa peroxit (4.8) bằng cách lắc mạnh trong 30 s. Để yên cho tách lớp và tháo lớp nước vào bộ chiết thứ hai. Chiết lại bằng 10 ml ete và tháo lớp nước vào bộ chiết thứ ba để chiết lần ba với cùng thể tích ete. Sau lần chiết cuối cùng, tháo lớp nước vào bộ chiết thứ tư, thêm 5 ml nước và trộn, rồi thực hiện theo 8.3. Đợi 10 min, thêm 5 giọt axit clohydric (4.2) và 10 ml isoamyl alcol (4.9) rồi chiết nhẹ nhàng trong 30 s. Để yên cho đến khi tách lớp.

Nếu dung môi có màu đỏ là do axit p-aminobenzoic, còn nếu lớp phía dưới có màu đỏ là do axit arsanilic. Tháo lớp nước càng nhiều càng tốt và chiết lại bằng 10 ml isoamyl alcol (4.9), nếu lớp nước có màu là do axit arsanilic còn giữ lại mà không phải là do không loại được hoàn toàn axit p-aminobenzoic.

Gộp tất cả các dịch chiết bằng ete, rửa bằng 5 ml nước, bỏ nước rửa và chiết lại bằng 10 ml dung dịch natri cacbonat (4.5), axit hóa và cho phản ứng tiếp với thuốc thử liên kết để chứng minh sự có mặt của sulfaquinoxalin.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.