TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11290:2016

Xuất bản lần 1

THỨC ĂN CHĂN NUÔI – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ETHOPABATE – PHƯƠNG PHÁP ĐO MÀU

Animal feeding stuffs – Determination of ethopabate content – Colorimetric method

HÀ NỘI – 2016

Lời nói đầu

TCVN 11290:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 964.29 *Ethopabate in feeds. Colorimetric method*;

TCVN 11290:2016 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 ethopabate - Phương pháp đo màu

Animal feeding stuffs - Determination of ethopabate content - Colorimetric method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đo màu để xác định hàm lượng ethopabate 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

Ethopabate được chiết ra khỏi mẫu thử bằng metanol 50 % ở nhiệt độ phòng. Dịch lọc trong được axit hóa bằng axit clohydric loãng và chiết bằng cloroform để loại các chất gây nhiễu (amin, axit *p*-aminobenzoic, procaine). Dịch chiết trong cloroform được rửa bằng dung dịch natri cacbonat để loại sulfaquinoxaline, acetyl-(*p*-nitrophenyl) sulfanilamide và chlortetracycline. Ethopabate được chuyển thành dạng amin tự do bằng cách thủy phân axit có kiểm soát sau đó được diazo hóa và tạo liên kết. Phức chất màu được chiết bằng *n*-butanol và đọc ở bước sóng 555 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 Metanol (CH_3OH), tinh khiết phân tích.

4.2 Metanol, 50 % (thể tích)

Trộn metanol (4.1) trong nước với tỉ lệ thể tích 1 : 1.

4.3 Axit clohydric (HCl) **đặc**, 36,5 % đến 38,0 % (khối lượng/thể tích).

4.4 Axit clohydric loãng

Pha loãng 1 thể tích axit clohydric đặc (4.3) trong 9 thể tích nước.

4.5 Axit clohydric, dung dịch 0,3 M

Pha loãng 25 ml axit clohydric đặc (4.3) bằng nước đến 1 lít.

4.6 Cloroform ($CHCl_3$), tinh khiết phân tích.

4.7 Dung dịch natri cacbonat (Na_2CO_3), 4 % (khối lượng/thể tích)

Hòa tan 40 g natri cacbonat khan trong nước đựng trong bình định mức 1 lít và thêm nước đến vạch.

4.8 Dung dịch natri nitrit ($NaNO_3$), 0,2 % (khối lượng/thể tích)

Hòa tan 100 mg natri nitrit trong nước đựng trong bình định mức 50 ml và thêm nước đến vạch. Chuẩn bị dung dịch ngay trước khi sử dụng.

4.9 Dung dịch amoni sulfamat ($NH_4SO_3NH_2$), 1,0 % (khối lượng/thể tích).

Hòa tan 500 mg amoni sulfamat trong nước đựng trong bình định mức 50 ml và thêm nước đến vạch. Chuẩn bị dung dịch ngay trước khi sử dụng.

4.10 Thuốc thử liên kết (NED)

Hòa tan 50 mg *N*-(1-naphthyl)etylendiamin dihydroclorua ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2{\cdot}2HCl$) trong 25 ml nước. Chuẩn bị dung dịch ngay trước khi sử dụng.

4.11 Natri clorua (NaCl), dạng khan.

4.12 ***n*-Butanol** ($C_4H_{10}O$), tinh khiết phân tích.

4.13 Dung dịch chuẩn ethopabate ($C_{12}H_{16}NO_4$)

4.13.1 Dung dịch chuẩn gốc, 0,400 mg/ml

Cân 40,0 mg chất chuẩn ethopabate, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong metanol 50 % (4.2) và thêm metanol đến vạch.

4.13.2 Dung dịch chuẩn trung gian ethopabate, 40 µg/ml

Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch chuẩn gốc (4.13.1) cho vào bình định mức 100 ml, pha loãng đến vạch bằng metanol 50 % (4.2), trộn đều. Bảo quản dung dịch đã pha trong bình có nút đậy kín, dung dịch đã chuẩn bị có thể bền trên 1 tháng.

4.13.3 Dung dịch chuẩn làm việc ethopabate, 0,8 µg/ml

Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch chuẩn trung gian (4.13.2) cho vào bình định mức 250 ml, pha loãng đến vạch bằng metanol 50 % (4.2), trộn đều. Chuẩn bị dung dịch ngay trước khi sử dụng.

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

5.2 Máy trộn tốc độ cao.

5.3 Sàng thí nghiệm số 20.

5.4 Bình định mức, dung tích 100 ml, 250 ml và 1000 ml.

5.5 Bình thủy tinh có nút đậy kín, dung tích 250 ml.

5.6 Cốc có mỏ, dung tích 100 ml.

5.7 Pipet.

5.8 Thanh khuấy từ.

5.9 Máy lắc cơ học.

5.10 Máy ly tâm.

5.11 Ống ly tâm đáy tròn, dung tích 50 ml.

5.12 Giấy lọc nhanh.

5.13 Xyranh, có kim dài.

5.14 Nồi cách thủy.

5.15 Nồi cách thủy đun sôi.

5.16 **Bể nước lạnh.**

5.17 **Máy đo màu,** đo ở bước sóng 555 nm.

5.18 **Cuvet,** chiều dài đường quang 1 cm.

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), nghiền mẫu thử để lọt hết qua sàng số 20 (5.3), trộn đều (nếu dùng máy trộn tốc độ cao thì có thể mất khoảng 3 min).

8 Cách tiến hành

8.1 Chiết

Cân chính xác một lượng mẫu thử có chứa khoảng 80 µg ethopabate (không quá 20 g), chính xác đến 1 mg, chuyển sang bình thủy tinh 250 ml (5.5) có nút thủy tinh đậy kín. Thêm 100,0 ml metanol 50 % (4.2) và khuấy trộn bằng thanh khuấy từ (5.8), đậy chặt nút và khuấy trong 1 h, có thể sử dụng máy lắc cơ học. Ly tâm hoặc lọc dịch chiết qua giấy lọc nhanh (5.12). Thu lấy một lượng dịch lọc đủ cho phép phân tích. Nếu cần, bảo quản dịch chiết qua đêm ở nhiệt độ phòng, để trong bình đậy kín.

8.2 Tinh sạch

Dùng pipet lấy 20 ml dịch chiết trong suốt cho vào ống ly tâm 50 ml (5.11). Thêm 5,0 ml axit clohydric loãng (4.4) và 10 ml cloroform (4.6), đậy bằng nút polyethylen và lắc mạnh 3 min trên máy lắc cơ học (5.9). Ly tâm và dùng xyranh có kim dài (5.13) cẩn thận chuyển lớp cloroform phía dưới sang một ống ly tâm 50 ml sạch. Chiết lại hai lần nữa, mỗi lần dùng 10 ml cloroform. Gộp các phần dịch chiết, thêm 10 ml dung dịch natri cacbonat (4.7), đậy nút và lắc 3 min.

Thực hiện ly tâm và sử dụng xyranh (5.13) hút bỏ phần lớn lớp nước phía trên mà không làm xáo trộn lớp phân cách. Lặp lại việc rửa, dùng 10 ml dung dịch natri cacbonat, loại bỏ nước rửa. Thêm 10 ml nước vào dịch chiết cloroform, đậy nút, lắc mạnh khoảng 1 min và ly tâm. Rút bỏ lớp nước. Lặp lại việc rửa với 10 ml nước.

CHÚ Ý: Để tránh hao hụt chất phân tích và cho kết quả thấp, không làm xáo trộn mặt tiếp giáp trên cloroform, cần chiết và rửa trong thời gian ngắn nhất có thể. Thời gian tiếp xúc kéo dài với axit clohydric và natri cacbonat có thể gây ra quá trình thủy phân một phần ethopabate.

8.3 Chuyển ethopabate về dạng amin tự do

Chuyển định lượng dịch chiết trong cloroform vào cốc có mỏ 100 ml (5.6). Tráng rửa mỗi ống ly tâm hai lần, mỗi lần dùng 3 ml metanol 50 % (4.2), cho nước tráng rửa vào cốc có mỏ. Đặt cốc vào nồi cách thủy (5.14) và cho bay hơi cloroform đến khi còn lại khoảng 2 ml. Thêm 5,0 ml metanol 50 % (4.2) và xoay để hòa tan hoàn toàn lượng chứa trong cốc.

Chuyển định lượng dung dịch sang ống ly tâm đáy tròn (5.11). Rửa cốc bằng các thể tích 10 ml, 10 ml và 5 ml dung dịch axit clohydric 0,3 M (4.5). Ngâm ống ly tâm trong nồi cách thủy đun sôi (5.15) sao cho mức chất lỏng trong ống vừa dưới mức nước trong nồi cách thủy. Đun nóng trong 45 min. Lấy ống ra khỏi nồi cách thủy và làm lạnh đến khoảng từ 10 °C đến 15 °C trong bể nước lạnh (5.16).

8.4 Phát triển màu và đo màu

Lấy ống ra khỏi bể nước lạnh. Thêm vào mỗi ống 1,0 ml dung dịch natri nitrit 0,2 % (4.8) vừa mới chuẩn bị, trộn và để yên trong 2 min. Thêm 1,0 ml dung dịch amoni sulfamat 1,0 % (4.9), trộn và để yên trong 2 min. Thêm tiếp 1,0 ml thuốc thử liên kết (4.10), trộn và để yên trong 10 min. Thêm 5,0 g natri clorua (4.11) và 5,00 ml n-butanol (4.12), đậy nút và lắc mạnh cho đến khi natri clorua hòa tan. Ly tâm và cẩn thận chuyển lớp có màu trong suốt sang cuvet 1 cm (5.18) và đọc giá trị độ hấp thụ của dịch chiết so với n-butanol trong máy đo màu (5.17) tại bước sóng 555 nm. Hiệu chỉnh với mẫu trắng thuốc thử.

8.5 Phép thử trắng (mẫu trắng thuốc thử)

Dùng pipet lấy 20 ml metanol 50 % (4.2) cho vào ống ly tâm 50 ml (5.11), thêm 5,0 ml axit clohydric loãng (4.4) và tiến hành như đối với phần mẫu thử (từ 8.2 đến 8.4).

8.6 Mẫu chuẩn

Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch chuẩn làm việc (4.13.3) (chứa 16,0 µg ethopabate) cho vào ống ly tâm 50 ml (5.11), thêm 5,0 ml axit clohydric loãng (4.4) và tiến hành như đối với phần mẫu thử (từ 8.2 đến 8.4).

9 Tính kết quả

Hàm lượng ethopabate có trong phần mẫu thử, X, tính bằng miligam trên kilogam, tính được bằng công thức sau đây:

$$X = \frac{(A - A_B)}{(A' - A_B)} \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{C}{w}$$

$$X = \frac{(A - A_B)}{(A' - A_B)} \times \frac{80}{w}$$

Trong đó:

A là giá trị độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 555 nm của phần mẫu thử;

A_B là giá trị độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 555 nm của mẫu trắng thuốc thử;

A' là giá trị độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 555 nm của dung dịch chuẩn làm việc (4.13.3);

V_1 là thể tích metanol loãng dùng để chiết phần mẫu thử, tính bằng mililit (V_1 = 100 ml);

V_2 là thể tích dịch chiết đem đi tinh sạch, tính bằng mililit (V_2 = 20 ml);

C là lượng ethopabate có trong 20 ml dung dịch chuẩn làm việc (xem 8.6), tính bằng microgam (C = 16,0 µg);

w là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam (g).

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 tuỳ chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;

e) kết quả thử nghiệm thu được.