TCVN TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 7536: 2005
ISO/TS 17234: 2003

Xuất bản lần 1

DA – PHÉP THỬ HOÁ – XÁC ĐỊNH THUỐC NHUỘM AZO CÓ TRONG DA

Leather - Chemical tests - Determination of certain azo colourants in dyed leathers

HÀ NỘI - 2005

Lời nói đầu

TCVN 7536: 2005 hoàn toàn tương đương ISO/TS 17234: 2003.

TCVN 7536: 2005 do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn TCVN/TC 120 *Sản phẩm Da* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành.

Xuất bản lần 1

Da – Phép thử hoá – Xác định thuốc nhuộm azo có trong da

Leather - Chemical tests – Determination of certain azo colourants in dyed leathers

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định việc sử dụng thuốc nhuộm azo có giải phóng các amin thơm.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 4851: 1989 (ISO 3696: 1987), Nước phân tích dùng trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

TCVN 7117 (ISO 2418), Da – Mẫu phòng thí nghiệm – Vị trí và nhận dạng.

TCVN 7126: 2002 (ISO 4044: 1977), Da - Chuẩn bị mẫu thử hoá.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau:

3.1

thuốc nhuộm azo (certain azo colourants)

thuốc nhuộm azo là thuốc nhuộm mà khi tách một hoặc nhiều nhóm azo của chúng thì tạo nên các amin dưới đây

Theo các hiểu biết về khoa học hiện nay, vẫn có dấu hiệu của việc sử dụng các thuốc nhuộm azo đã bị cấm trong quá trình sản xuất và xử lý da, mà khi tách chiết da theo điều kiện của qui trình nêu trong 8.2 thì sẽ sinh ra một trong các amin sau đây và mức phát hiện được của các amin này vượt quá 30 mg/kg.

1)	4- Aminođiphenyl	(CAS-No.: 92-67-1)
2)	Benziđin	(CAS-No.: 92-87-5)
3)	4-Clotoluiđin	(CAS-No.: 95-69-2)
4)	2-Naphtyamin	(CAS-No.: 91-59-8)
5)	4-Cloanilin	(CAS-No.: 106-47-8)
6)	2,4-Điaminoanisol	(CAS-No.: 615-05-4)
7)	4,4'-Điaminođiphenylmetan	(CAS-No.: 101-77-9)
8)	3,3'-Điclobenziđin	(CAS-No.: 91-94-1)
9)	3,3'-Đimetoxybenziđin	(CAS-No.: 119-90-4)
10)	3,3'-Đimetylbenziđin	(CAS-No.: 119-93-7)
11)	3,3'-Đimetyl-4,4'- điaminođiphenylmetan	(CAS-No.: 838-88-0)
12)	4-Cresiđin	(CAS-No.: 120-71-8)
13)	4,4'-Metylen-bis-(2-cloanilin)	(CAS-No.: 101-14-4)
14)	4,4'-Oxyđianilin	(CAS-No.: 101-80-4)
15)	4,4'-Thiođianilin	(CAS-No.: 139-65-1)
16)	2-Toluiđin	(CAS-No.: 95-53-4)
17)	2,4-Điaminotoluen	(CAS-No.: 95-80-7)
18)	2,4,5-Trimetyl anilin	(CAS-No.: 137-17-7)

CHÚ THÍCH CAS = Số đăng ký hoá chất theo quốc tế.

Theo phương pháp này, thuốc nhuộm azo khi tách các nhóm azo tạo thành amin 2-aminoazotoluen (CAS-No: 97-56-3) và 2-amino-4-nitrotoluen (CAS-No: 99-55-8) được phát hiện qua amin 2-toluiđin và/hoặc amin 2,4-điaminotoluen.

4 Nguyên tắc

Sau khi tẩy dầu mỡ, mẫu da được xử lý với natri đithionit trong dung dịch đệm (pH 6) ở 70 °C trong bình kín. Các amin giải phóng ra trong quá trình tách được chuyển vào pha ete *t*-butyl metyl bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng sử dụng cột kieselgur. Dung dịch chiết ete *t*-butyl metyl sau đó được cô đặc dưới điều kiện từ từ trong máy cô quay chân không, phần cặn được hoà tan trong một dung môi thích hợp, tuỳ theo phương pháp sử dụng để xác định các amin.

Tiến hành xác định các amin bằng thiết bị sắc ký lỏng áp suất cao sử dụng detector điot array (HPLC/DAD), sắc ký lớp mỏng (TLC, HPTLC) và đo mật độ quang, sắc ký khí mao quản với detector

ion hoá ngọn lửa và/hoặc detector khối phổ (GC/FID và/hoặc MSD), hoặc bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector điot array.

Các amin phải được phát hiện bằng ít nhất hai phương pháp sắc phổ khác nhau để tránh bất kỳ sai lệch nào gây ra bởi các chất gây nhiễu (như là phát hiện ra các đồng phân vị trí của các amin) và do đó dẫn đến kết quả sai. Việc định lượng amin tiến hành theo phương pháp HPLC/DAD.

5 Thiết bị và nhà cung cấp

Sử dụng thiết bị phòng thí nghiệm và các thiết bị sau :

5.1 Bình phản ứng bằng thuỷ tinh chịu nhiệt, kín khí.

5.2 Bếp đốt bằng cát (cát biển 0,1 – 0,3 mm) hoặc bếp cách thuỷ có bộ ổn nhiệt.

5.3 Nhiệt kế 70 °C, độ chính xác 0,5 °C .

5.4 Bình định mức với các thể tích khác nhau.

5.5 Cột bằng polypropylen hoặc thuỷ tinh có đường kính trong từ 25 mm đến 30 mm và chiều dài từ 140 mm đến 150 mm, có phễu lọc thuỷ tinh ở đầu ra, được nhồi đầy kieselguhr dạng hạt xốp [ví dụ Extralut NT 20, cột nhồi sẵn (Merck Art.No. 11737)].

5.6 Bơm tiêm bằng polypropylen hoặc polyetylen, 2 ml.

5.7 Máy cô quay chân không

5.8 Pipet, 10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml.

5.9 Bể siêu âm có bộ ổn nhiệt.

5.10 Bình đáy tròn 100 ml có khớp nối tròn chuẩn NS 29132.

5.11 Thiết bị phân tích

- Thiết bị chấm tự động với HPTLC hoặc TLC
- Máy đo mật độ quang
- Điện di mao quản với DAD
- GC mao quản, tiêm chia dòng/không chia dòng, tốt nhất với MS/MSD
- HPLC có điều chỉnh gradient, tốt nhất với DAD, hoặc HPLC-MS.

6 Hoá chất

Trừ khi có các qui định khác, sử dụng hoá chất có cấp độ phân tích:

6.1 Metanol.

6.2 Ete *t*- butyl metyl.

6.3 Natri đithionit, ít nhất 87 % tinh khiết.

6.4 Dung dịch natri đithionit, 200 mg/ml, chuẩn bị hàng ngày.

6.5 n – Hexan.

6.6 Các amin từ 1 đến 18 ở điều 3.1 (mức tinh khiết cao nhất có thể).

6.7 Dung dịch gốc của các amin (6.6): 400 mg/l trong etyl axetat cho phân tích TLC.

6.8 Dung dịch gốc của các amin (6.6) : 200 mg/l trong metanol cho phân tích GC, HPLC, CE.

6.9 Dung dịch đệm citrat, 0,06 M, pH 6 (ví dụ Merck Art. No.1.09437.1 000), đun nóng trước đến 70 °C.

6.10 Dung dịch chuẩn dùng để kiểm tra quá trình amin hoá: 30 µg amin / ml dung môi, được chuẩn bị mới từ dung dịch gốc (6.7) hoặc (6.8) tuỳ thuộc vào phương pháp phân tích.

6.11 Metanolic NaOH 20 % (w/v), 20 g NaOH hoà tan trong 100 ml metanol.

6.12 Nước loại 3 theo TCVN 4851 - 1989 (ISO 3696: 1987).

7 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

Nếu có thể lấy mẫu thử phù hợp với TCVN 7117 (ISO 2418) và nghiền da theo TCVN 7126: 2002 (ISO 4044: 1977). Nếu không thể lấy mẫu theo TCVN 7117 (ISO 2418) (ví dụ da lấy từ sản phẩm đã hoàn tất như giày ủng, quần áo) thì chi tiết của quá trình lấy mẫu phải được ghi trong báo cáo thử nghiệm.

Đối với quá trình phân tích, một mẫu đại diện gồm 1,0 g da đã nghiền được cân chính xác cho vào bình phản ứng (5.1).

Loại bỏ các vết của chất dính kết bằng cơ học, nếu cần thiết.

8 Cách tiến hành

8.1 Khử dầu mỡ

Lấy 1 g mẫu da đã nghiền xử lý trong bình kín 50 ml (5.1) với 20 ml hexan (6.5) trong bể siêu âm (5.9) ở 40 °C trong 20 phút. Lớp hexan sau đó được gạn ra khỏi mẫu da. Ngay sau đó tiến hành xử lý lại lần

nữa như lần trước cùng với 20 ml hexan. Lớp hexan cặn để bay hơi tự nhiên qua đêm trong bình để mở.

8.2 Tách, khử

Cho một lượng 17 ml dung dịch đệm (6.9) đã được đun nóng trước đến 70 °C ± 5 °C vào mẫu thử. Bình phản ứng được đậy kín và sau khí lắc thì để trong tủ thông gió trong bể đốt bằng cát hoặc trong một bể điều nhiệt (5.2) trong (25 ± 5) phút ở 70 °C ± 2 °C. Nhiệt độ phản ứng 70 °C đạt được ở bên trong bình phản ứng. Nhiệt độ này được kiểm tra bằng một nhiệt kế đặt ở bên trong bình.

Sau đó cho thêm 1,5 ml dung dịch natri đithionit (6.4) và syrin (5.6) và giữ bình phản ứng trong 10 phút ở 70 °C. Sau đó cho thêm 1,5 ml dung dịch natri đithionit nữa và tiếp tục giữ bình phản ứng thêm 10 phút nữa và làm nguội đến nhiệt độ phòng bằng nước.

8.3 Chiết lỏng-lỏng

Dùng một chày bằng thuỷ tinh để ép dung dịch phản ứng ra khỏi sợi, gạn vào cột Kieselguhr (5.5) và để hấp thụ trong cột 15 phút.

Cho thêm 5 ml ete *t*-butyl metyl (6.2) và 1 ml metanol NaOH 20 % (6.11) vào cặn sợi da còn trong bình phản ứng. Đậy bình phản ứng và lắc mạnh rồi chuyển vào cột Kieselguhr (5.5).

Tráng bình phản ứng và sợi da còn lại một lần với 15 ml và một lần với 20 ml ete *t*- butyl metyl rồi chuyển vào cột Kieselguhr để bắt đầu giải hấp các amin. Sau cùng phun trực tiếp 40 ml ete *t*-butyl metyl vào cột. Dung dịch giải hấp thu được cho vào bình đáy tròn 100 ml có khớp nối chuẩn (5.10).

Dung dịch chiết ete *t*-butyl metyl được cô đặc đến khoảng 1 ml (không để khô kiệt) trong máy cô quay chân không (5.7) trong điều kiện chân không thấp và không quá 50 °C. Làm bay hơi hoàn toàn phần ete còn lại bằng cách thổi nhẹ khí trơ vào.

Phần cặn được chuyển ngay vào một bình định mức 2 ml (5.4) và làm đầy đến vạch mức với metanol (hoặc etyl axetat đối với phân tích TLC). Dung dịch này sẵn sàng cho phân tích trên thiết bị.

8.4 Kiểm tra hệ thống phân tích

Để kiểm tra quá trình phân tích, cho 1,0 ml dung dịch chuẩn (6.10) vào bình phản ứng (5.1) có chứa 16 ml dung dịch đệm đã đun nóng (6.9). Sau đó quá trình và các bước tiếp theo được tiến hành theo điều 8.2. Tỷ lệ thu hồi đạt được phải ít nhất là 70 % cho các amin 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18 và ít nhất 50 % cho amin 16, 17 và 20 % cho amin 6.

9 Hiệu chuẩn

Dung dịch chuẩn (6.10) với nồng độ 30 µg/ml được dùng để hiệu chuẩn.

10 Phân tích sắc ký

Nếu sử dụng các loại thiết bị khác nhau, không thể thực hiện một qui trình chung. Các thông số sau đã được thử nghiệm thành công và được sử dụng trong các phép phân tích này.

10.1 Phân tích sắc ký phát hiện định lượng và định tính: Sắc ký lỏng hiệu suất cao (HPLC)

Dung môi rửa giải 1:	Metanol;
Dung môi rửa giải 2:	0,575 g Amoni đihydro phosphat + 0,7 g đinatri hydro phosphat trong 1 000 ml nước, pH 6,9;
Pha ổn định:	LiChrospher 60 RP-select B (5 µm) 250 mm × 4,6 mm;
Nhiệt độ cột:	40 °C;
Tốc độ dòng:	0,8 – 1,0 ml/phút;
Gradien:	Bắt đầu 15 % dung dịch rửa giải 1, tăng đến 80 % dung dịch rửa giải 1 trong 45 phút;
Thể tích bơm:	10 µl;
Phát hiện:	DAD ở 240 nm, 280 nm và 305nm.

10.2 Phân tích sắc ký phát hiện định lượng

10.2.1 Sắc ký khí mao quản (GC)

Cột mao quản:	có cực trung bình, ví dụ SE 54 hoặc DB 5, dài: 50 m, đường kính trong: 0,32 mm, chiều dày lớp phim: 0,5 mm
Hệ thống bơm mẫu:	chia dòng /không chia dòng
Nhiệt độ buồng bơm mẫu:	250 °C
Chương trình nhiệt độ	70 °C trong 2 phút, sau đó tăng lên 280 °C với tốc độ 10 °C/ phút, giữ ở 280 °C trong 5 phút;
Detector:	MSD, scan 45-300 amu
Khí mang:	Heli
Bơm:	1 µl, không chia dòng 2 phút

10.2.2 Phương pháp điện di mao quản (HPCE)

250 µl dung dịch mẫu thử được trộn với 50 µl HCl (c = 0,01 mol/l) và cho qua một tấm lọc màng (0,2 µm). Dung dịch này được phân tích bằng thiết bị điện di mao quản.

Mao quản 1: 56 cm, không phủ, đường kính trong: 50 µm, với đường đi của ánh sáng kéo dài;

Mao quản 2: 56 cm, phủ bằng polyvinyl alcohol (PVA), đường kính trong: 50 µm, với đường đi của ánh sáng kéo dài;

Dung dịch đệm: Dung dịch đệm phosphat (c= 50 mmol/l), pH 2,5;

Nhiệt độ cột: 25 °C;

Điện áp: 30 kV;

Thời gian bơm: 4 giây;

Thời gian rửa: 5 giây;

Phát hiện: DAD 214 nm, 240 nm, 280 nm, 305 nm.

10.2.3 Sắc ký khí lớp mỏng (TLC)

10.2.3.1 Tấm phẳng (HPTLC): Silica gel có chất chỉ thị huỳnh quang F 254, 20 × 10 cm;

Thể tích sử dụng: 5 µl được bơm theo dòng với thiết bị chấm tự động;

Dung môi động: clorofọm : axít axetic 90:10 theo thể tích;

10.2.3.2 Tấm phẳng (TLC): Silica gel 60, 20 × 10 cm, buồng bão hoà;

Thể tích sử dụng: 10 µl được áp dụng như một điểm chấm với thiết bị chấm tự động;

Dung môi động 1: Clorofom : etyl axetat : axít axetic = 60:30:10 theo thể tích;

Dung môi động 2: Clorofom : metanol = 95:5 theo thể tích;

Thuốc thử 1: 0,1 % $NaNO_2$ trong KOH (c= 1 mol/l);

Thuốc thử 2: 0,2 % alpha-Naphtol, trong KOH (c= 1 mol/l).

11 Đánh giá

Nồng độ amin được tính toán dựa trên diện tích các pic của các amin thành phần riêng biệt tương đương với nhóm amin hiệu chuẩn 30 µg/ml (6.10). Hàm lượng amin được tính toán là phần khối lượng w tính theo mg của phần riêng biệt/kg da theo công thức sau:

$$w = \frac{A_P . B_K . V}{A_K . E}$$

trong đó

A là diện tích pic của amin tính theo đơn vị diện tích;

B là nồng độ của amin trong dung dịch hiệu chuẩn tính theo µg/ml;

V là thể tích mà mẫu thử được tạo thành theo 8.3 (thể tích cuối của mẫu thử) tính theo ml;

E là phần khối lượng được tính theo mẫu da trong thể tích cuối của mẫu thử tính theo g;

w là phần khối lượng;

Các chỉ số dưới:

P là mẫu thử;

K là dung dịch amin hiệu chuẩn.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

a) viện dẫn tiêu chuẩn này;

b) loại, nguồn gốc và mô tả về mẫu phân tích hoặc một phần của mẫu;

c) bất kỳ sai lệch nào so với qui trình phân tích, các bước tiến hành đặc biệt thêm vào;

d) công bố qui trình tiến hành riêng biệt và các phương pháp sử dụng để phát hiện và xác định (phương pháp thứ hai phải sử dụng để xác nhận kết quả đúng);

e) kết quả phân tích theo mg/kg (xem điều 11) đối với amin (3.1) phải được liệt kê riêng biệt và báo cáo dựa vào các giá trị ngưỡng sau đây:

Trong trường hợp giá trị của một amin < 30 mg/kg:

Theo phân tích đã tiến hành, thuốc nhuộm azo giải phóng các amin thơm đã liệt kê không phát hiện được.

Trong trường hợp giá trị của một amin > 30 mg/kg:

Kết quả phân tích cho thấy mẫu da đưa ra để xem xét đã được sản xuất hoặc xử lý có sử dụng thuốc nhuộm azo có giải phóng một hoặc nhiều loại amin đã liệt kê.

Trong trường hợp mức của 4-aminodiphenyl và/hoặc 2-naphtylamin > 30 mg/kg:

Sử dụng phương pháp phân tích này đã phát hiện ra 4-aminodiphenyl và/hoặc 2-naphtylamin. Theo những hiểu biết hiện nay không thể khẳng định chắc chắn rằng đã sử dụng thuốc nhuộm azo có giải phóng các amin đã liệt kê khi không có thêm thông tin.

13 Độ chính xác của phương pháp

Số liệu cho sau đây thu được từ thí nghiệm liên phòng của các loại da khác nhau. Số liệu thu được qua việc sử dụng HPLC với DAD. Mẫu được nghiền theo TCVN 7126: 2002 (ISO 4044: 1977). Đối với cột chiết lỏng-lỏng của hãng MERCK, đã sử dụng loại EXTRALUT NT20 phần số 11737.

Mẫu da	Amin đã phát hiện	Giá trị theo mg/kg	Độ lặp lại theo mg/kg r	Độ tái lập theo mg/kg R
A	Benzidin	13,5	5,4	8,4
	3, 3' - Đimethoxybenzidin	15,4	4,4	6,4
	3, 3' – Đimetylbenzidin	20,5	7,1	9,5
B	Benzidin	12,9	3,8	8,9
	2-Toluidin	37,5	15,4	38,5
C	3, 3' - Đimetylbenzidin	25,6	8,0	17,0
	2-Toluidin	50,1	20,2	42,1
D	Benzidin	16,5	3,0	7,1