

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

DT1 TCVN ...:2022

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITRAT
VÀ NITRIT BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO MÀU**

*Animal feeding stuffs – Determination of nitrate and nitrite content
by colorimetric method*

HÀ NỘI – 2022

Lời nói đầu

TCVN:2022 được xây dựng dựa theo AOAC 968.07 *Nitrogen (Nitrate and Nitrite) in Animal Feed Colorimetric Method*;

TCVN:2022 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 nitrat và nitrit bằng phương pháp quang phổ

Animal feeding stuffs – Determination of nitrate and nitrite content by colorimetric method

CẢNH BÁO – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này cần thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng nitrat và nitrit trong thức ăn chăn nuôi bằng phương pháp đo màu.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. 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 (nếu có).

TCVN 4326:2001 (ISO 6496:1999) *Thức ăn chăn nuôi – Xác định độ ẩm và hàm lượng chất bay hơi khác*

TCVN 6952 (ISO 9498) *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử.*

3 Nguyên tắc

Nitrat và nitrit được chiết ra khỏi mẫu bằng dung dịch của cadimi và bari clorua. Các protein hòa tan được kết tủa trong dung dịch kiềm và dung dịch này sau đó được làm trong rồi cho qua cột cadimi kim loại, để khử nitrat thành nitrit. Nitrit được đo bằng phương pháp đo màu.

CHÚ Ý: Các muối cadimi rất độc.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và nước được sử dụng là nước cất, nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

4.1 Dung dịch chuẩn nitơ nitrat

4.1.1 Dung dịch gốc, 12 µg nitrat N/mL.

Hòa tan 0,867 g KNO_3 trong 1 L nước. Pha loãng 25 mL bằng nước đến 250 mL.

4.1.2 Dung dịch làm việc, 0,6 µg N/mL, 1,2 µg N/mL, 1,8 µg N/mL, 2,4 µg N/mL và 3,0 µg N/mL.

Pha loãng bằng nước 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL và 25 mL dung dịch gốc đến 100 mL.

4.2 Dung dịch chiết

Hòa tan và pha loãng bằng nước 50 g CdCl_2 và 50 g BaCl_2 đến 1 L. Chỉnh pH đến 1 bằng axit clohydric.

4.3 Dung dịch đệm amoni clorua (NH_4Cl), pH 9,6.

Hòa tan 50 g NH_4Cl trong 500 mL nước và chỉnh pH đến 9,6 bằng NH_4OH . Pha loãng bằng nước đến 1L.

4.4 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), 2,5 M.

Hòa tan 50 g NaOH trong 500 mL nước.

4.5 Dung dịch sulfanilamit, 0,5 %

Hòa tan 1,25 g sulfanilamit trong 250 mL axit clohydric. Dung dịch này ổn định từ 1 đến 2 tháng.

4.6 Thuốc thử tạo cặp

Hòa tan 0,5 g N-(1-naphtyl) etylenglycol-HCl trong 100 mL nước. Bảo quản trong chai thủy tinh sẫm màu có nắp đậy kín để trong tủ lạnh. Dung dịch ổn định trong vài tuần.

4.7 Dung dịch muối natri clorua (NaCl)

Hòa tan 100 g NaCl trong 500 mL nước. Thêm 50 mL dung dịch đệm (4.3) và pha loãng bằng nước đến 1 L.

4.8 Dung dịch cadimi sulfat (CdSO_4), 20 %.

4.9 Dung dịch axit clohydric (HCl), 0,10 M.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Máy đo màu, đo được ở bước sóng 540 nm.

5.2 Ống khử, buret 25 mL hoặc ống sắc ký có đường kính trong tương đương có khóa và bình chứa

5.3 Máy xay trộn tốc độ cao

5.4 Cốc có mỡ, dung tích 30 ml, 2 000 ml.

5.5 Pipet, có dung tích thích hợp.

5.6 Cuvet, 1 cm

5.7 Bình định mức, dung tích 100 ml, 250 ml, 500 ml.

5.8 Giấy Whatman N. 42.

5.9 Bông thủy tinh.

5.10 Đũa thủy tinh.

6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải 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 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị cột

Chuẩn bị nguồn cadimi kim loại bằng cách đặt các thanh kẽm vào 500 mL dung dịch CdSO₄ 20 % (4.8). Sau khi phản ứng xảy ra trong 3 h, loại bỏ dung dịch và cạo phần cadimi bám trên thanh kẽm. Cho cadimi vào máy xay trộn tốc độ cao (4.3), thêm 500 mL nước và trộn trong 2 giây. Rửa các hạt kim loại

TCVN:2022

mịn bằng nước lên sàng, chỉ thu lấy cadimi với cỡ hạt từ 20 mesh đến 40 mesh. Đổ đầy nước vào ống khử và chèn thêm bông thủy tinh (5.9) dày 2 cm. Dùng đĩa thủy tinh (5.10) đẩy không khí bị kẹt ra khỏi bông thủy tinh khi bông được đẩy xuống đáy cột. Cho cadimi vào cột với chiều sâu đến 10 cm, gõ nhẹ cột. Rửa cột bằng 25 mL HCl 0,10 M (4.9), hai lần mỗi lần dùng 25 mL nước, và cuối cùng là 25 mL dung dịch đệm (4.3), pha loãng với tỷ lệ 1 + 9. Bảo quản cột bằng dung dịch muối (4.7), khi không sử dụng.

Thông thường các cột có thể được sử dụng nhiều lần nếu được giữ trong dung dịch muối giữa các lần phân tích. Khi xử lý liên tiếp các mẫu chứa nhiều protein hoặc hữu cơ hòa tan khác, thì tốc độ dòng có thể bị giảm dần. Lặp lại xử lý bằng 25 mL HCl 0,10 M (4.9) có thể khôi phục tốc độ dòng ban đầu; nếu không, cần chuẩn bị cột mới. Tốc độ dòng lặp lại là quan trọng. Tốc độ thực tế có thể là 3 đến 5 mL/min.

8.2 Dụng cụ chuẩn

Chuẩn bị đường chuẩn với nồng độ 3, 6, 9, 12 và 15 µg nitơ nitrat-nitrit bằng cách dùng pipet lấy 5,0 mL các dung dịch chuẩn làm việc cho vào cốc có mỏ 30 mL (5.4). Thêm 5 mL dung dịch đệm (4.3) và 15 mL nước, trộn đều và chuyển định lượng sang cột khử, sử dụng lượng nước nhỏ nhất. Chính tốc độ dòng qua cột đến khoảng từ 3 mL/min đến 5 mL/min. Ngay khi bình chứa vừa cạn, thêm 15 mL dung dịch muối (4.7). Thu lấy dịch rửa giải, bao gồm cả nước rửa muối cho vào bình định mức 50 mL (tổng thể tích dịch rửa giải phải là khoảng 40 mL). Thêm 5 mL dung dịch sulfanilamit (4.5), lắc đều và để yên trong 3 phút. Thêm 2 mL thuốc **thử tạo cặp** (4.7), trộn, pha loãng bằng nước đến vạch, lắc đều và để yên trong 20 phút để phát triển màu tối đa. Màu ổn định sau 2 giờ. Xác định độ hấp thụ (A) trong cuvet 1 cm ở bước sóng 540 nm so với mẫu trắng thuốc thử. Dụng cụ thị của độ hấp thụ A so với số µg nitơ nitrat-nitrit.

8.3 Chiết mẫu

8.3.1 Mẫu nitrat mức thấp (thức ăn từ ngũ cốc, thức ăn dạng bột, thức ăn bổ sung, v.v...)

Rửa 5,0 g phần mẫu thử đã nghiền mịn cho vào bình định mức 250 mL (5.7). Thêm 100 mL dung dịch chiết (4.2), 100 mL nước và trộn. Để yên 1 h thỉnh thoảng xoay bình. Thêm 20 mL NaOH 2,5 M (4.4), pha loãng bằng nước đến vạch, lắc đều và lọc ngay qua giấy lọc (5.8). Dùng pipet lấy 10 mL dung dịch đệm (4.3) cho vào bình định mức 100 mL, thêm dịch lọc đã trong đến vạch và lắc đều.

8.3.2 Sản phẩm khô chứa hàm lượng nitrat cao (thực vật khô, cỏ khô, thức ăn khô, v.v...)

Cân 5,0 g phần mẫu thử đã nghiền mịn cho vào bình định mức 500 mL (5.7). Thêm 100 mL dung dịch chiết (4.3) và 300 mL nước và trộn đều. Để yên trong 1 h thỉnh thoảng xoay bình, thêm 40 mL NaOH 2,5 M (4.4), pha loãng bằng nước đến vạch, lắc đều và lọc ngay qua giấy lọc. Dùng pipet lấy 10 mL dung dịch đệm (4.3) cho vào bình định mức 100 mL, thêm dịch lọc trong đến vạch và lắc đều.

8.3.3 Cỗ, thức ăn ủ chua và các vật liệu tươi khác

Cân 100 g phần mẫu thử cho vào máy trộn tốc độ cao. Thêm 100 mL dung dịch chiết (4.2) và 800 mL nước, bao gồm cả lượng nước có trong mẫu đã được xác định theo TCVN 4326:2001 (ISO 6496:1999). Đồng hóa mẫu trong 1 phút, rót vào cốc 2 L (5.4) và để yên trong 1 h. Thêm 100 mL dung dịch đệm (4.3) (tổng thể tích 1 L), trộn đều và lọc qua giấy Whatman số 42 (5.8), thu lấy phần dịch lọc trong.

8.4 Xác định

8.4.1 Nitrat cộng với nitơ nitrit

Dùng pipet lấy 25 mL dịch chiết trong 8.3.1 hoặc 8.3.2 hoặc 5 mL dịch chiết trong 8.3.3 cho vào cột khử và xử lý như trong 8.2, bắt đầu từ đoạn " Chỉnh tốc độ dòng qua cột đến khoảng ... ". Tráng cột bằng 30 mL nước giữa các dung dịch thử để loại bỏ NaCl. Sử dụng phần dịch chiết với độ pha loãng và pH tương đương làm dung dịch đối chiếu trong việc xác định độ hấp thụ A ở bước sóng 540 nm. Đồng thời xác định nitrat-nitrit trong thuốc thử và hiệu chỉnh cho giá trị trắng này.

Tính tổng hàm lượng nitơ nitrat và nitrit từ đường chuẩn.

8.4.2 Nitơ nitrit

Dùng pipet lấy một lượng nhỏ dịch lọc trong của mẫu (chứa < 15 µg nitrit) cho vào bình định mức 50 mL và pha loãng bằng nước đến khoảng 40 mL. Trộn đều, thêm 5 mL dung dịch sulfanilamit (4.5), lắc đều và để yên trong 3 phút. Thêm 2 mL thuốc thử tạo cặp (4.6) và pha loãng bằng nước đến vạch. Trộn đều và để yên 20 phút để màu phát triển tối đa. Đo độ hấp thụ A trong cuvet 1 cm so với dịch chiết mẫu với độ pha loãng tương đương ở bước sóng 540 nm. Hiệu chỉnh đối với mẫu trắng thuốc thử nitrit.

8.4.3 Nitơ nitrat

Lấy hiệu số của 8.4.1 và 8.4.2 ở trên.

9 Tính kết quả

Hàm lượng nitrat hoặc nitrit, X, trong mẫu được tính bằng µg/kg, theo Công thức sau:

$$X = a \times f / m$$

Trong đó:

a là số microgam nitơ nitrat tìm được;

f là hệ số pha loãng;

m 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 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.
-