

Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng phospho – Phương pháp quang phổ

Animal feeding stuffs – Determination of phosphorus content – Spectrometric method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp quang phổ để xác định hàm lượng phospho trong thức ăn chăn nuôi.

Phương pháp này áp dụng đối với thức ăn chăn nuôi có hàm lượng phospho nhỏ hơn 50 g/kg. Đây là phương pháp đặc biệt thích hợp cho việc phân tích những sản phẩm có hàm lượng phospho thấp. Đối với những sản phẩm có hàm lượng phospho cao hơn, nên áp dụng phương pháp phân tích trọng lượng sử dụng quinolin phosphomolipdat.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4851 - 89 (ISO 3696 : 1987) Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Phương pháp thử và yêu cầu kỹ thuật.

TCVN 6952 : 2001 (ISO 6498 : 1998) Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử.

3 Nguyên tắc

Phần mẫu thử hoặc được tro hóa bằng vôi và làm nóng bằng axit (trường hợp thức ăn chăn nuôi hữu cơ) hoặc được oxi hóa bằng hỗn hợp axit sunfuric và axit nitric (trường hợp thức ăn chăn nuôi ở dạng lỏng và hỗn hợp khoáng).

Phần dung dịch axit được trộn với thuốc thử molipdovanadat và chất hấp thụ của dung dịch mẫu vàng này được đo ở bước sóng 430 nm.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng những thuốc thử được phép sử dụng trong phân tích.

4.1 Nước: ít nhất phải ở mức loại 3 phù hợp với TCVN 4851 : 89 (ISO 3696).

4.2 Canxi cacbonat.

4.3 Axit clohydric: $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$.

4.4 Axit nitric: $c(\text{HNO}_3) = 1 \text{ mol/l}$.

4.5 Axit nitric: $c(\text{HNO}_3) = 14 \text{ mol/l}$, $\rho(\text{HNO}_3) = 1,40 \text{ g/ml}$.

4.6 Axit sunfuric: $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 18 \text{ mol/l}$, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/ml}$.

4.7 Dung dịch Amoni heptamolipdat

Hòa tan bằng nước nóng 100 g amoni heptamolipdat tetrahydrat $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$. Thêm 10 ml dung dịch amoni $[c(\text{NH}_4\text{OH}) = 14 \text{ mol/l}$, $\rho(\text{NH}_4\text{OH}) = 0,91 \text{ g/ml}]$ và pha loãng thành 1 lít bằng nước.

4.8 Dung dịch Amoni monovanadat

Hòa tan 2,35 g amoni monovanadat (NH_4VO_3) trong 400 ml nước nóng. Khuấy đều, thêm từ từ 7 ml axit nitric (4.5) và pha loãng thành 1 lít bằng nước.

4.9 Thuốc thử molipdovanadat

Trộn 200 ml dung dịch amoni heptamolipdat (4.7) với 200 ml dung dịch amoni monovanadat (4.8) và 135 ml axit nitric (4.5) trong bình định mức dung tích 1 lít. Pha loãng bằng nước đến vạch. Nếu dung dịch có cặn thì phải lọc.

4.10 Dung dịch so sánh

Pha loãng 10 ml thuốc thử molipdovanadat (4.9) với 10 ml nước.

4.11 Dung dịch phospho tiêu chuẩn: $\rho(\text{P}) = 1 \text{ mg/ml}$.

Hòa tan 4,394 g kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) bằng nước trong bình định mức dung tích 1 lít, phải làm khô (KH_2PO_4) ở 103°C trong 1 giờ trước khi cân. Pha loãng bằng nước đến vạch.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị dùng trong phòng thí nghiệm, cụ thể là những thiết bị sau:

5.1 Chén nung: bằng silic oxit hoặc bằng sứ.

5.2 Lò mup nung điện: có thể duy trì ở nhiệt độ $550^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$.

5.3 Bình Kjeldahl: dung tích 250 ml.

5.4 Bình định mức: dung tích 500 ml và 1000 ml.

5.5 Quang phổ kế: thích hợp cho việc đo độ hấp thụ ở bước sóng 430 nm, cuvet đo là 10 mm.

5.6 Ống thử nghiệm thủy tinh: dung tích từ 25 ml đến 30 ml, có nút thủy tinh.

5.7 Bể cát.

5.8 Cốc có mỏ: dung tích 250 ml.

5.9 Pipét có chia vạch.

6 Lấy mẫu

Phương pháp lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo ISO 6497.

Mẫu gửi đến phòng thí nghiệm phải là mẫu trung thực và có tính đại diện và không bị hư hại hoặc biến đổi thành phần trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952 : 2001 (ISO 6498).

Nếu mẫu ở dạng rắn, nghiền nhỏ mẫu (thường là 500 g) sao cho mẫu hoàn toàn lọt qua sàng có kích thước lỗ sàng 1 mm. Trộn đều mẫu.

8 Cách tiến hành

8.1 Chọn cách tiến hành

Nếu mẫu thử chứa những chất hữu cơ và không có phosphat tạo nên các sản phẩm không tan khi tro hoá, tiến hành theo 8.2.

Nếu mẫu thử là hỗn hợp khoáng hoặc là thức ăn chăn nuôi dạng lỏng, tiến hành theo 8.3.

8.2 Hóa tro khô

Cân khoảng 2,5 g mẫu thử đã được chuẩn bị, với độ chính xác đến 1 mg, cho vào chén nung (5.1).

TCVN 1525 : 2001

Trộn đều phần mẫu thử với 1 g canxi cacbonat (4.2). Tro hóa trong lò nung (5.2) ở nhiệt độ 550°C đến khi thu được tro có màu trắng hoặc xám (một lượng nhỏ cacbon không ảnh hưởng đến quá trình này).

Chuyển toàn bộ tro vào cốc có mỏ dung tích 250 ml (5.8) cùng 20 ml đến 50 ml nước. Thêm axit clohydric (4.3) đến khi thấy hết sỏi bọt. Sau đó, thêm khoảng 10 ml axit clohydric (4.3).

Đặt cốc trong bể cát (5.7) và để bay hơi cho khô để tạo một lớp oxit silic không hòa tan. Làm nguội.

Thêm 10 ml axit nitric (4.4) và đun trên bể cát 5 phút, không làm bay hơi đến khô.

Để lắng và gạn phần chất lỏng vào bình định mức dung tích 500 ml (5.4), tráng rửa cốc vài lần bằng nước nóng.

Để nguội, pha loãng đến vạch bằng nước, lắc đều và lọc.

Tiếp tục tiến hành theo 8.4.

8.3 Công phá ướt

Cân khoảng 1 g mẫu thử với độ chính xác đến 1 mg.

Cho phần mẫu thử vào bình Kjeldahl (5.3). Thêm 20 ml axit sunfuric (4.6). Lắc đều và nhẹ để mẫu ngấm toàn bộ axit và để tránh hiện tượng mẫu dính lên thành bình. Đun sôi trong 10 phút.

Để nguội một lúc. Thêm 2 ml axit nitric (4.5), đun nóng nhẹ và lại để nguội một lúc. Cho thêm một ít axit nitric nữa (4.5) và lại đem đun sôi.

Lặp lại quá trình này đến khi dung dịch mất màu hoàn toàn.

Làm nguội, thêm một ít nước để lắng và gạn phần chất lỏng vào bình định mức dung tích 500 ml (5.5), tráng rửa bình Kjeldahl vài lần bằng nước nóng.

Để nguội, pha loãng đến vạch bằng nước, lắc đều và lọc.

8.4 Phát triển mẫu và đo độ hấp thụ

Pha loãng phần dịch lọc thu được (8.2 hoặc 8.3) bằng nước, để có hàm lượng phospho không vượt quá 40 µg/ml.

Dùng pipét (5.9) hút 10 ml dung dịch này cho vào ống nghiệm (5.6). Dùng pipét khác hút 10 ml dung dịch thuốc thử molidovanadat (4.9) cho tiếp vào ống nghiệm.

Lắc đều và để yên ít nhất 10 phút ở 20°C.

Chuyển hỗn hợp thu được vào cuvet và đo độ hấp thụ trong quang phổ kế (5.5) ở bước sóng 430 nm theo dung dịch so sánh (4.10).

8.5 Lập đường cong hiệu chuẩn

8.5.1 Dùng pipét chia vạch (5.9) hút dung dịch phospho tiêu chuẩn (4.11) để có các dung dịch chuẩn có hàm lượng phospho là 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml và 40 µg/ml.

8.5.2 Từ các dung dịch chuẩn ở trên, dùng pipét (5.9) hút lần lượt mỗi ống 10 ml cho vào năm ống nghiệm (5.6). Dùng pipét khác thêm vào mỗi ống nghiệm 10 ml thuốc thử molidovanadat (4.9).

Lắc đều và để yên ít nhất 10 phút ở 20°C.

Đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch theo qui định ở 8.4.

8.5.3 Vẽ đường cong hiệu chuẩn bằng các tọa độ hấp thụ dựa theo hàm lượng phospho tương ứng của các dung dịch phospho tiêu chuẩn (µg/ml) (8.5.1).

Với hàm lượng phospho từ 0 µg/ml đến 40 µg/ml, đường cong sẽ đường thẳng.

8.6 Thử mẫu trắng

Tiến hành thử mẫu trắng song song với việc xác định, sử dụng cùng một quy trình và cùng những lượng thuốc thử nhưng chỉ khác là mẫu trắng không chứa phần mẫu thử.

9 Biểu thị kết quả

Hàm lượng phospho, w_p , có trong mẫu thử tính bằng gam trên kilôgam được tính theo công thức :

$$w_p = \frac{50 \times f_1 \times f_2 \times w_{pc} \times V}{m}$$

trong đó

f_1 là hệ số pha loãng thuận nghịch của mẫu thử (xem 8.4);

f_2 là hệ số điều chỉnh đơn vị, ($f_2 = 10^{-3}$ g/mg) tính bằng gam trên miligam;

w_{pc} là hàm lượng phospho, của mẫu thử đã pha loãng từ dung dịch kiểm tra, đọc từ đường cong chuẩn (8.5.3) tính bằng microgam trên mililit;

V là thể tích, của mỗi dung dịch chuẩn ở 8.5.2 ($V = 10$ ml) tính bằng mililit;

m là khối lượng, của phần mẫu thử (8.2 hoặc 8.3), tính bằng gam.

Báo cáo kết quả chính xác đến 0,1 g/kg.

10 Độ chụm

10.1 Thử nghiệm ở liên phòng thí nghiệm

Những chi tiết thực hiện của liên phòng thí nghiệm về độ chụm của phương pháp được tóm tắt trong phụ lục A. Những giá trị này không áp dụng với những dải nồng độ và các thành phần khác với những dải nồng độ và thành phần đã cho.

10.2 Độ lặp lại

Sự chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn độc lặp do cùng một kiểm nghiệm viên thực hiện khi áp dụng cùng một phương pháp, sử dụng cùng một thiết bị kiểm tra, tiến hành trong cùng một phòng thí nghiệm ở một khoảng thời gian ngắn sẽ không có trên 5% các trường hợp mà hàm lượng phospho lớn hơn 1 g/kg.

10.3 Độ tái lập

Sự chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn của các kiểm nghiệm viên khi áp dụng cùng một phương pháp đối với cùng mẫu kiểm tra trên thiết bị khác nhau và ở các phòng thí nghiệm khác nhau sẽ không có trên 5% các trường hợp hàm lượng phospho trên 7 g/kg.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải thể hiện:

- tất cả những thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;
- phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- phương pháp thử đã áp dụng, viện dẫn theo tiêu chuẩn này ;
- các thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tự chọn cùng với các chi tiết của bất kỳ yếu tố nào có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm; hoặc
- nếu đã kiểm tra độ lặp lại, phải đưa ra kết quả nhận xét cuối cùng.

Phụ lục A
(tham khảo)

Kết quả thử nghiệm liên phòng thí nghiệm

ISO/TC 34/SC 10 đã tổ chức một cuộc thử nghiệm liên phòng thí nghiệm về Thức ăn chăn nuôi vào năm 1987 theo ISO 5725 : 1986 *Độ chính xác của các phương pháp thử - Xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp thử tiêu chuẩn bằng các thử nghiệm liên phòng thí nghiệm*. Phân tích thống kê cuối cùng thực hiện theo TCVN 6910-2 : 2001 (ISO 5725-2 : 1994) *Sự chuẩn xác (tính trung thực và độ chụm) của các phương pháp đo và các kết quả - Phần 2: Phương pháp cơ bản để xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo chuẩn*. Cuộc thử nghiệm này có 24 phòng thí nghiệm tham gia. Các mẫu thử nghiệm gồm thức ăn chứa gluten ngô, thức ăn hỗn hợp, bột cá, thức ăn đậm đặc (hai loại), premix và nấm men.

Bảng A.1 - Kết quả thống kê của liên phòng thí nghiệm

Thông số	Mẫu ¹⁾						
	1	2	3	4 ²⁾	5	6	7
Số phòng thí nghiệm được chọn ^{*)}	24	24	24	24	24	24	24
Hàm lượng phospho trung bình, g/kg ³⁾	18	5,4	9,2	80,1	27,4	22,5	11,4
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), g/kg	0,40	0,32	0,11	1,48	0,75	0,30	0,24
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	1,4	5,9	1,2	1,9	2,7	1,3	2,1
Giới hạn lặp lại (r) [$r = 2,8 \times s_r$], g/kg	1,12	0,90	0,31	4,14	2,10	0,84	0,67
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R), g/kg	2,6	3,0	1,9	14,5	4,1	2,0	1,4
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	9,4	55,3	21,1	18,1	14,9	8,7	12,3
Giới hạn tái lập (R) [$R = 2,8 \times s_R$], g/kg	7,28	8,40	5,32	40,60	11,48	5,60	3,92

1) Mẫu 1: bột cá;

Mẫu 2: thức ăn chứa gluten ngô;

Mẫu 3: nấm men;

Mẫu 4: premix

Mẫu 5: thức ăn gia súc đậm đặc;

Mẫu 6: thức ăn gia súc đậm đặc;

Mẫu 7: thức ăn hỗn hợp (cho giai đoạn kết thúc).

2) Do hàm lượng phospho nằm ngoài giới hạn của phương pháp nên các kết quả này không thuộc số liệu chính xác trong điều 10.

3) Dựa trên chất khô.

*) Số phòng thí nghiệm được chọn, không tính phòng thí nghiệm đã bị loại.

Phụ lục B
(tham khảo)

Tài liệu tham khảo

1. ISO 5725 : 1986 *Độ chụm của các phương pháp thử – Xác định độ lặp lại và độ tái lập đối với phương pháp thử tiêu chuẩn bằng các thử nghiệm liên phòng thí nghiệm. (Precision of test method - Determination of repeatability and reproducibility for standard test method by inter - laboratory tests (now withdrawn).*
2. TCVN 6910-1 : 2001 (ISO 5725-1 : 1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo.*

Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.

3. TCVN 6910-2 : 2001 (ISO 5725-2 : 1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo.*

Phần 2: Phương pháp cơ bản để xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.

4. ISO 6497 *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu (Animal feeding stuffs - Sampling).*
-