

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt

[illegible]

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.084 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/10/2017 Trang: 2/7</p>
--	--	---

## A. GIỚI THIỆU

### 1. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng photpho tổng trong TACN. Phương pháp này áp dụng cho mẫu có hàm lượng P nhỏ hơn 50g/kg.

### 2. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: TCVN 1525:2001

### 4. Nguyên tắc

- Mẫu là thức ăn chăn nuôi hữu cơ: mẫu được tro hóa bằng vôi và hòa tan bằng acid.
- Mẫu là thức ăn chăn nuôi dạng lỏng và hỗn hợp khoáng: Mẫu sau khi được đồng nhất sẽ được phân huỷ các hợp chất ở dạng hữu cơ về dạng photpho hoặc photphate bởi  $H_2SO_4$  và  $HNO_3$ .

Dung dịch sau khi trung hoà và lọc sẽ xác định photpho bằng phương pháp quang phổ UV-VIS với thuốc thử molipdovanadat.

## B. THÔNG TIN AN TOÀN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Nhân viên phân tích phải tuân thủ các quy định về an toàn khi làm việc trong phòng thí nghiệm sau:

- Phải mặc bảo hộ lao động khi làm việc trong phòng thí nghiệm: áo Blouse, gang tay, mắt kính và khẩu trang.
- Các hóa chất phải được để đúng nơi quy định.
- Các hóa chất phải được thao tác trong tủ hút.
- Các hóa chất thải phải được thu hồi vào bình thu hồi đúng chủng loại để chuyển giao cho đơn vị có chức năng xử lý.
- Tuân thủ các quy tắc về phòng chống cháy nổ trong công ty.

## C. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ

### 1. Thiết bị

- Thiết bị phân tích UV-VIS của hãng Shimadzu, model UV-2401PC có màn hình LCD tích hợp trên thân máy
- Cuvet 1cm
- Cân phân tích có sai số  $\pm 0.1\text{mg}$
- Cân kỹ thuật có sai số  $\pm 0.01\text{g}$
- Pipet thủy tinh 5mL, 10mL.
- Micro Pipet loại 200 $\mu\text{L}$  và 1000 $\mu\text{L}$
- Các ống nghiệm có nắp, thể tích 15mL, 50mL
- Các bình định mức 50mL; 100mL; 500mL; 1000mL.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.084 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/10/2017 Trang: 3/7
---	----------------------------------	---

- Lò nung, bếp điện.
- Chén sứ, ống kjeldhal.

## D. HÓA CHẤT VÀ DUNG DỊCH THỬ

### 1. Hóa chất

- Nước cất 2 lần khử ion.
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc: Tinh khiết phân tích
- $\text{NaOH}$ : tinh khiết phân tích
- Ammoni heptamolybdate  $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ : Tinh khiết phân tích
- Amoni monovanadat  $(\text{NH}_4\text{VO}_3)$ : Tinh khiết phân tích.
- Phenolphthalein: Tinh khiết phân tích.
- Canxi cacbonat
- $\text{HCl}$  tinh khiết
- $\text{HNO}_3$  tinh khiết

### 2. Dung dịch hóa chất.

Chỉ sử dụng nước deion để pha hoá chất và chất chuẩn. Các hoá chất sử dụng phải đạt độ tinh khiết phân tích.

- Dung dịch  $\text{HCl}$  6M: Hòa tan 500mL dung dịch acid  $\text{HCl}$  đậm đặc vào bình định mức 1000mL có sẵn 300mL nước DI, định mức lên 1000mL bằng nước DI.
- Dung dịch  $\text{HNO}_3$  1M: Hòa tan 71mL dung dịch  $\text{HNO}_3$  đậm đặc vào bình định mức 1000mL có sẵn 500mL nước DI, định mức lên 1000mL bằng nước DI.
- Dung dịch amoni heptamolipdat: Hòa tan 100g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  trong 500mL nước DI nóng, thêm 10ml dung dịch  $\text{NH}_3$  chuyển toàn bộ vào bình định mức 1000mL và định mức lên đến vạch bằng nước DI (dd A).
- Dung dịch amoni monovanadat: Hòa tan 2.35g  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  trong 500mL nước DI nóng, thêm 7ml dung dịch  $\text{HNO}_3$  chuyển toàn bộ vào bình định mức 1000mL và định mức lên đến vạch bằng nước DI (dd B).
- Thuốc thử molipdovanadat: Trộn 200ml dung dịch dung dịch A với 200ml dung dịch B, thêm 135ml acid  $\text{HNO}_3$  đđ vào bình định mức 1L và thêm nước tới vạch (nếu dung dịch có cặn thì phải lọc).

### 3. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

- Pha dung dịch chuẩn làm việc hàng ngày trước khi phân tích. Khi pha dung dịch chuẩn trung gian và chuẩn làm việc phải lấy dung dịch chuẩn gốc ra để ở nhiệt độ phòng rồi mới được tiến hành pha;
- Không được dùng pipét hút thẳng vào dung dịch chuẩn gốc mà phải đổ dung dịch đó ra cốc sạch, khô để hút. Nếu còn thừa không được đổ trở lại mà phải đổ đi.

#### a. Dung dịch chuẩn gốc

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.084 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/10/2017 Trang: 4/7
---	----------------------------------	---

- Sấy  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck) tinh khiết ở  $103^\circ\text{C}$  trong 3 giờ, để nguội trong bình hút ẩm.
- Cân 439mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (đã sấy khô ở  $103^\circ\text{C}$ ) trên cân phân tích HV.023.H, hòa tan và định mức tới 100ml bằng nước deion. Được dung dịch chuẩn P có nồng độ 1000mg/L.
- Dung dịch chuẩn được bảo quản trong chai nhựa.
- Ghi các thông tin về chuẩn bị chất chuẩn vào trong sổ nhật ký pha hóa chất.
- Bảo quản lạnh ở  $4^\circ\text{C}$ .
- Sử dụng được trong vòng 1 năm kể từ ngày pha.

**b. Dung dịch chất chuẩn trung gian 100mg/L**

- Lấy 10mL dung dịch chuẩn 1000mg/L cho vào bình định mức 100mL, định mức lên bằng nước cất DI.

**c. Dung dịch chất chuẩn làm việc:**

No.	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ chuẩn sử dụng	100mg/L						
Thể tích chuẩn sử dụng (mL)	0.5	1.0	2.5	5.0	10	15	20
Định mức 50mL bằng DI	50						
Nồng độ dãy chuẩn (mg/L)	1	2	5	10	20	30	40

## E. Kiểm soát QA/AC

- Trong mỗi đợt phân tích phải thực hiện các mẫu kiểm soát sau:
  - ✓ Blank hóa chất.
  - ✓ Mẫu lặp lại.
  - ✓ Mẫu thêm chuẩn (QC hoặc recovery)

## F. Tiến hành phân tích

### 1. Chuẩn bị mẫu

Chuẩn bị mẫu theo TCVN 6952:2001.

Nếu mẫu ở dạng rắn, nghiền nhỏ và trộn đều mẫu.

### 2. Xử lý mẫu

#### 1. Phá mẫu:

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.084 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/10/2017 Trang: 5/7</p>
--	--	---

Nếu mẫu thử chứa những chất hữu cơ và không có phosphat tạo nên các sản phẩm không tan khi tro hóa, tiến hành theo tro hóa. Còn mẫu thử là hỗn hợp khoáng hoặc mẫu lỏng thì chọn phá mẫu ướt

#### a. Tro hóa

- Cân khoảng 1g mẫu thử cho vào chén nung, trộn đều phần mẫu thử với 0.4g  $\text{CaCO}_3$ . Tro hóa trong lò nung ở nhiệt độ  $550^\circ\text{C}$  đến khi thu được tro có màu trắng hoặc xám (một lượng nhỏ cacbon không ảnh hưởng).
- Hòa tan phần tro bằng 20-50ml nước và cho vào becher 250ml. Thêm từ từ acid  $\text{HCl}$  6M đến khi thấy hết sỏi bọt. Sau đó thêm khoảng 10ml axit nữa.
- Đặt becher trong bể cát và làm bay hơi cho khô để tạo một lớp oxit silic không hòa tan.
- Làm nguội. Thêm 10ml  $\text{HNO}_3$  đđ và đun trên bể cát 5 phút, không làm bay hơi cho đến khô. Để lắng và gạn phần chất lỏng vào bình định mức 250ml.
- Tráng rửa cốc vài lần bằng nước nóng. Để nguội, pha loãng đến vạch bằng nước cất và lắc đều và lọc.

#### b. Phá mẫu ướt

- Cân khoảng 1g mẫu, cho phần mẫu thử vào ống Kjeldahl.
- Thêm 20ml acid  $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{dd}}$ , lắc đều và nhẹ để mẫu ngấm toàn bộ acid và để tránh cho mẫu dính lên thành bình.
- Đun sôi trong 10 phút, sau đó để nguội, thêm tiếp 2ml  $\text{HNO}_3$  đđ, đun nóng nhẹ và để nguội một lúc cho thêm một ít acid  $\text{HNO}_3$  đđ nữa 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 250ml, tráng rửa bình Kjeldahl vài lần bằng nước nóng.
- Để nguội, pha loãng đến vạch bằng nước cất và lắc đều.

### **3. Hiện màu:**

- Pha loãng phần dịch lọc thu được bằng nước để có hàm lượng phospho không vượt quá 40mg/L.
- Dùng pipet hút 10ml dung dịch mẫu và chuẩn cho vào ống ly tâm 50mL.
- Dùng pipet khác hút 10ml dung dịch thuốc thử molidovanadat cho tiếp vào ống ly tâm 50mL ở trên. Lắc đều và để yên ít nhất 10 phút ở  $20^\circ\text{C}$ .
- Đem đo độ hấp thụ trong quang phổ kế ở bước sóng 430nm.

### **4. Mẫu trắng**

Thực hiện mẫu trắng (không chứa chất phân tích) song song tương tự như mục F.2 và F.3.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.084 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/10/2017 Trang: 6/7
---	----------------------------------	---

#### 5.Đo màu:

- Sau khi cho thuốc thử vào và để yên 10 phút. Đường chuẩn và mẫu được đo màu trên thiết bị UV – Vis.
- Đo quang ở bước sóng 430nm.
- Sử dụng Blank nước cất có thêm thuốc thử để cell blank ( hoặc Auto Zero).
- Trình tự đo màu:
- Các điểm chuẩn từ thấp đến cao
- Mẫu blank
- Mẫu, mẫu lặp
- Chuẩn check.

#### G. YÊU CẦU VỀ ĐỘ TIN CẬY CỦA PHÉP PHÂN TÍCH

1. Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (ít nhất là 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính ( $R^2$ ) phải lớn hơn hoặc bằng 0.995.
2. Độ lệch của các dung dịch chuẩn xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá  $\pm 10\%$  giá trị thật.
3. Hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn và RSD của lặp phải thỏa tiêu chí ở bảng dưới:  
(trích từ AOAC Appendix F)

ST T	Hàm lượng	Đơn vị	Độ thu hồi, %	RSD, %
1	100	%	98-102	1.3
2	10	%	98-102	1.8
3	1	%	97-103	2.7
4	0.1	%	95-105	3.7
5	0.01	%	90-107	5.3
6	10	ppm	80-110	7.3
7	1	ppm	80-110	11
8	100	ppb	80-110	15
9	10	ppb	60-115	21
10	1	ppb	40-120	30

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	<b>Mã số: HD.TN.084</b> <b>Lần ban hành: 02</b> <b>Ngày ban hành: 15/10/2017</b> <b>Trang: 7/7</b>
--	--	---

## H. TÍNH KẾT QUẢ

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa độ hấp thu với nồng độ tương ứng. Kết quả chất cần phân tích trong mẫu được tính toán thông qua độ hấp thu tương ứng so với đường chuẩn, theo công thức sau:

$$C = \left( \frac{C_0 \times V \times f}{m} \right)$$

Trong đó:

- C: nồng độ P trong mẫu, ppm
- C<sub>0</sub>: nồng độ P trong dịch chiết tính theo đường chuẩn, mg/L
- V: Thể tích định mức, mL
- f: hệ số pha loãng
- m: khối lượng cân, g

## I. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích, bao gồm:

- Mã số mẫu, ngày phân tích, thiết bị phân tích...
- Khối lượng cân của mẫu thử
- Thể tích định mức và các hệ số pha loãng (nếu có)
- Phương trình đường chuẩn
- Kết quả của mẫu trắng, mẫu thử, mẫu thêm chuẩn
- Giới hạn phát hiện của phương pháp.
- Những ghi nhận hay thay đổi khác (nếu có)