

## TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 12512-3:2018

ISO 14362-3:2017

VẬT LIỆU DỆT - PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH MỘT SỐ AMIN THƠM GIẢI PHÓNG TỪ CHẤT MÀU AZO - PHẦN 3: PHÁT HIỆN VIỆC SỬ DỤNG MỘT SỐ CHẤT MÀU AZO CÓ THỂ GIẢI PHÓNG 4-AMINOAZOBENZEN

*Textiles - Methods for determination of certain aromatic amines derived from azo colorants - Part 3: Detection of the use of certain azo colorants, which may release 4- aminoazobenzene*

### Lời nói đầu

TCVN 12512-3:2018 hoàn toàn tương đương với ISO 14362-3:2017.

TCVN 12512-3:2018 do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 38 *Vật liệu dệt* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 7619, *Vật liệu dệt - Phương pháp xác định một số amin thơm giải phóng từ chất màu azo* gồm các tiêu chuẩn sau:

- TCVN 12512-1:2018 (ISO 14362-1:2017), *Phần 1: Phát hiện việc sử dụng chất màu azo bằng cách chiết và không chiết xơ*
- TCVN 12512-3:2018 (ISO 14362-3:2017), *Phần 3: Phát hiện việc sử dụng một số chất màu azo có thể giải phóng 4-aminoazobanzen*

VẬT LIỆU DỆT - PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH MỘT SỐ AMIN THƠM GIẢI PHÓNG TỪ CHẤT MÀU AZO - PHẦN 3: PHÁT HIỆN VIỆC SỬ DỤNG MỘT SỐ CHẤT MÀU AZO CÓ THỂ GIẢI PHÓNG 4-AMINOAZOBENZEN

*Textiles - Methods for determination of certain aromatic amines derived from azo colorants - Part 3: Detection of the use of certain azo colorants, which may release 4-aminoazobenzene*

### 1 Phạm vi áp dụng

Theo các điều kiện được quy định tại TCVN 12512-1 (ISO 14362-1), các chất màu azo có khả năng tạo thành 4-aminoazobenzen, sẽ tạo ra amin anilin và 1,4-phenylendiamin. Không thể xác định một cách chắc chắn sự có mặt của các chất màu 4-aminoazobenzen này mà không có thông tin bổ sung (ví dụ: cấu trúc hóa học của chất màu sử dụng) hoặc không có quy trình đặc biệt.

Tiêu chuẩn này bổ sung cho TCVN 12512-1 (ISO 14362-1) và mô tả một quy trình đặc biệt để phát hiện việc sử dụng các chất màu azo cụ thể trong hàng hóa, có thể giải phóng ra 4-aminoazobenzen, đó là:

- Có thể phản ứng với tác nhân thử mà không cần chiết, đặc biệt là liên quan đến các vật liệu dệt được làm từ xơ xenlulo và protein (ví dụ: bông, visco, len, tơ tằm), và
- Có thể phản ứng bằng cách chiết xơ (ví dụ: polyeste hoặc da nhân tạo).

Đối với một số hỗn hợp xơ cụ thể, có thể cần áp dụng 9.3 và 9.4 (có chiết và không chiết).

Quy trình này cũng phát hiện 4-aminoazobenzen (Solvent Yellow 1), có sẵn dưới dạng amin tự do có trong hàng hóa mà không cần xử lý khử trước.

Phương pháp này chỉ phù hợp để xác định 4-aminoazobenzen, không thể xác định định lượng việc sử dụng các chất màu azo, bằng cách tách khử (các) nhóm azo, có thể giải phóng một hoặc nhiều amin thơm khác như được liệt kê trong *Quy định (EC) số 1907/2006 của Nghị viện Châu Âu và Hội đồng về Đăng ký, Đánh giá, cấp phép và Hạn chế Hóa chất (REACH)* theo đề cập trong Phụ lục

XVII, bằng quá trình tách khử các nhóm azo của chúng.

## 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 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

TCVN 12512-1 (ISO 14362-1), *Vật liệu dệt - Phương pháp xác định một số amin thơm giải phóng từ chất màu azo - Phần 1: Phát hiện việc sử dụng chất màu azo bằng cách chiết và không chiết xơ*

## 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Không có thuật ngữ, định nghĩa trong tiêu chuẩn này.

## 4 Yêu cầu chung

Một số chất màu azo có thể giải phóng ra 4-aminoazobenzen bằng quá trình tách khử (các) nhóm azo.

**Bảng 1 - 4-aminoazobenzen<sup>a</sup>**

Số	Số CAS	Số chỉ dẫn	Số EC	Chất
22	60-09-3	611-008-00-4	200-453-6	4-aminoazobenzen

\* Amin thơm bị cấm theo Quy định (EC) số 1907/2006 của Nghị viện Châu Âu và Hội đồng ngày 18 tháng 12 năm 2006 có liên quan đến Đăng ký, Đánh giá, cấp phép và Hạn chế Hóa chất (REACH) được thiết lập bởi Cơ quan Hóa chất Châu Âu.

## 5 Nguyên tắc

Sau khi lựa chọn một mẫu thử đã nhuộm màu từ sản phẩm dệt may, mẫu thử được thử theo phương pháp chiết màu đối với thuốc nhuộm phân tán và/hoặc phương pháp khử trực tiếp đối với các loại chất màu khác (pigment và/hoặc thuốc nhuộm) [xem TCVN 12512-1 (ISO 14362-1)].

Mẫu vật liệu dệt hoặc cặn chiết mẫu được xử lý bằng natri dithionit trong dung dịch kiềm ở 40 °C trong một bình kín. 4-aminoazobenzen, giải phóng từ quá trình này, được chuyển sang pha *t*-butyl metyl ete bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng. Sử dụng một phần dịch chiết của pha *t*-butyl metyl ete để phân tích. Có thể phát hiện và xác định 4-aminoazobenzen bằng phương pháp sắc ký (xem Phụ lục A).

Nếu phát hiện 4-aminoazobenzen bằng một phương pháp sắc ký thì sau đó phải xác nhận lại bằng một hoặc nhiều phương pháp khác.

## 6 Cảnh báo an toàn

**CẢNH BÁO** - 4-aminoazobenzen được phân loại là chất được biết đến hoặc nghi ngờ gây ung thư cho người

**Việc xử lý và thải bỏ các chất này phải thực hiện nghiêm ngặt theo các quy định quốc gia về an toàn và vệ sinh.**

Người sử dụng có trách nhiệm áp dụng các kỹ thuật an toàn và phù hợp khi xử lý vật liệu trong phương pháp thử này. Tham khảo ý kiến của các nhà sản xuất để biết các chi tiết cụ thể, ví dụ: phiếu dữ liệu an toàn vật liệu và các khuyến nghị khác.

## 7 Thuốc thử

Nếu không có quy định khác thì các hóa chất sử dụng phải có cấp độ phân tích.

**7.1 Dung dịch nước natri dithionit**,  $\rho = 200$  mg/ml chuẩn bị mới: để yên dung dịch trong một lọ

đậy kín trong  $(55 \pm 1)$  min, chuyển sang một cốc có mở bằng thủy tinh không nắp, để yên trong 5 min (- 0 min, + 5 min) và sau đó sử dụng trong vòng 10 min.

**7.2 Dung dịch nước natri hydroxit,  $\omega = 2 \%$ .** <sup>1)</sup>

**7.3 Metanol**

**7.4 Xylen (hỗn hợp của các chất đồng phân) số CAS 1330-20-7.**

**7.5 *t*-butyl metyl ete**

**7.6 Natriclorua**

**7.7 4-aminoazobenzen**, chất chuẩn có độ tinh khiết cao nhất.

**7.8 Chất chuẩn nội cho sắc ký khí (IS)**, ví dụ: trong trường hợp phân tích GC-MS, có thể sử dụng một trong các chất chuẩn nội sau:

- IS1: naphthalen-d8, số CAS: 1146-65-2;
- IS2: 2,4,5-tricloanilin, số CAS: 636-30-6;
- IS3: antraxen-d10, số CAS: 1719-06-8.

**7.9 Dung dịch chuẩn**

**7.9.1 Dung dịch chuẩn nội**, IS trong *t*-butyl metyl ete,  $\rho = 10,0 \mu\text{g/ml}$ .

**7.9.2 Dung dịch hiệu chuẩn 4-aminoazobenzen** để kiểm tra quy trình thử nghiệm và chuẩn bị các dung dịch hiệu chuẩn.

4-aminoazobenzen trong metanol,  $\rho = 500 \mu\text{g/ml}$ .

**7.10 Nước loại 3**, theo TCVN 4851 (ISO 3696).

## 8 Thiết bị, dụng cụ

**8.1 Thiết bị chiết**, theo Hình 1, gồm có:

- Ống sinh hàn cỡ nhám NS 29/32,
- Móc được làm bằng vật liệu trơ để giữ mẫu thử tại vị trí để các giọt dung môi ngưng tụ nhỏ vào mẫu thử,
- Bình cầu 100 ml NS 29/32, và
- Nguồn nhiệt.



**Hình 1 - Thiết bị**

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng thiết bị tương tự nếu thu được cùng kết quả.

**8.2 Bể siêu âm**

**8.3 Bình phản ứng** (20 ml đến 50 ml) bằng thủy tinh chịu nhiệt, có nắp kín.

**8.4 Nguồn nhiệt** tạo được nhiệt độ  $(40 \pm 2)$  °C.

**8.5 Thiết bị cô quay chân không có kiểm soát chân không và bể cách thủy.**

Có thể sử dụng loại khác của thiết bị bay hơi, ví dụ: bể cách thủy có dòng nitơ được kiểm soát phía trên chất lỏng.

**8.6 Máy ly tâm**, tốc độ lớn hơn 3 000 vòng/phút.

**8.7 Pipet** có kích cỡ yêu cầu hoặc pipet điều chỉnh được

**8.8 Máy lắc**, đảm bảo trộn các pha một cách hiệu quả.

CHÚ THÍCH Máy lắc ngang với tần số tối thiểu  $5 \text{ s}^{-1}$  khoảng lắc từ 2 cm đến 5 cm được cho là phù hợp.

**8.9 Thiết bị sắc ký**, được chọn như sau:

**8.9.1 Sắc ký lớp mỏng (TLC)** hoặc sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC), có bộ phát hiện phù hợp.

**8.9.2 Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)** có rửa giải gradien và detector mảng diot (DAD) hoặc detector khối phổ chọn lọc (MS).

**8.9.3 Sắc ký khí (GC)** có detector ion hóa ngọn lửa (FID) hoặc detector khối phổ chọn lọc (MS).

**8.9.4 Điện di mao quản (CE)** với DAD bao gồm: bộ lọc màng PTFE (polytetrafluetylen), kích thước lỗ  $0,2 \mu\text{m}$ , lắp vào điện di mao quản.

CHÚ THÍCH Phụ lục A mô tả các điều kiện sắc ký.

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Yêu cầu chung

Áp dụng tiêu chuẩn này cho các mẫu thử đã cho kết quả dương tính (không đạt từ trước) đối với anilin và 1,4-phenylenediamin hoặc chỉ anilin khi thử theo TCVN 12512-1 (ISO 14362-1), quy trình 10.1 hoặc 10.2. Chọn quy trình 9.3 nếu có kết quả không đạt từ trước theo TCVN 12512-1 (ISO 14362-1), 10.1 và quy trình 9.4 nếu có kết quả không đạt từ trước theo TCVN 12512-1 (ISO 14362-1), 10.2.

### 9.2 Chuẩn bị mẫu thử

Trong trường hợp vải có hoa văn nhiều màu, các màu phải được lấy càng riêng biệt càng tốt. Đối với hàng hóa có các chất lượng dệt khác nhau, các mẫu thử có chất lượng khác nhau (về loại xơ và/hoặc màu) phải được phân tích riêng.

Chuẩn bị mẫu thử bằng cách cắt để đạt được tổng khối lượng 1 g. Đối với các mẫu thử dùng để chiết chất màu (9.3), cắt thành các dải (nếu sử dụng thiết bị theo mô tả trong 8.1) hoặc cắt thành các mảnh nhỏ nếu sử dụng thiết bị khác hoặc đối với các mẫu thử chỉ phải tách khủ (9.4 và 9.5).

### 9.3 Chiết chất màu đối với thuốc nhuộm phân tán - chuẩn bị có chiết

Nếu có kết quả không đạt từ trước theo TCVN 12512-1 (ISO 14362-1), 10.1, giữ một mẫu thử vật liệu dệt khác có cùng thành phần trong thiết bị chiết (8.1) từ 30 min đến 40 min phía trên 25 ml xylen sôi cho đến khi các giọt dung môi từ mẫu thử không màu. Để nguội dịch chiết xylen đến nhiệt độ phòng trước khi lấy ra khỏi thiết bị chiết. Lấy mẫu thử ra khỏi thiết bị chiết và loại bỏ mẫu thử.

Cô đặc dịch chiết xylen trong thiết bị bay hơi ở nhiệt độ từ  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$  cho đến khi khô. Phần cặn này được chuyển định lượng sang bình phản ứng với tổng cộng 7 ml metanol (7.3), sử dụng bể siêu âm để phân tán chất màu.

Sau đó thực hiện tách khủ (9.5).

Nên thực hiện việc chuyển thành nhiều bước, ví dụ: thêm 4 ml metanol và hòa tan phần cặn từ bình

thủy tinh bằng cách sử dụng bể siêu âm, sau đó dùng pipét chuyển định lượng phần huyền phù vào bình phản ứng, sau đó tráng ba lần bằng 1 ml metanol và chuyển định lượng dung dịch.

Để xác định trực tiếp chất màu phân tán giải phóng ra 4-aminoazobenzen (ví dụ: Disperse Yellow 23), có thể sử dụng ngay lập tức một phần của dung dịch metanol để phân tích bằng LC-DAD-MS.

#### **9.4 Vật liệu dệt nhuộm bằng thuốc nhuộm không phải thuốc nhuộm phân tán - chuẩn bị không chiết**

Nếu có kết quả không đạt từ trước theo TCVN 12512-1 (ISO 14362-1), 10.2, cho trực tiếp mẫu thử đã cắt vào trong bình phản ứng.

#### **9.5 Tách khử**

Thêm một lượng 9 ml dung dịch natri hydroxit (7.2) vào bình phản ứng có chứa mẫu thử (9.4) hoặc dung dịch metanol (9.3). Đậy kín bình phản ứng và lắc mạnh.

Sau đó, thêm 1,0 ml dung dịch nước natri dithionit (7.1) vào để tách khử. Đậy kín bình phản ứng, lắc mạnh hỗn hợp và ngay lập tức giữ mà không lắc ở  $(40 \pm 2)$  °C trong đúng 30 min, sau đó làm mát đến nhiệt độ phòng từ 20 °C đến 25 °C trong vòng 1 min.

#### **9.6 Tách và cô đặc 4-aminoazobenzen**

Thêm 5 ml *t*-butyl methyl ete (7.5) hoặc 5 ml dung dịch chuẩn nội (7.9.1) vào bình phản ứng. Sau đó, thêm 7 g natri clorua (7.6). Đậy kín bình phản ứng và lắc hỗn hợp bằng máy lắc (8.8) trong 45 min, đảm bảo trộn các pha một cách hiệu quả.

Không nên để thời gian trễ từ khi làm mát đến khi lắc vượt quá 5 min. Để tách pha hoàn toàn sau khi lắc, nên ly tâm hỗn hợp.

Để phân tích tiếp, một phần của pha *t*-butyl methyl ete được chuyển ngay lập tức vào một lọ thích hợp được đậy kín. Có thể sử dụng kỹ thuật sắc ký được liệt kê trong 8.9 để phát hiện và xác định 4-aminoazobenzen.

Để tiếp tục phân tích, có thể thay đổi dung môi hoặc cô đặc phần chiết từ 9.5 và chuyển chất chiết vào một dung môi phù hợp khác (ví dụ: metanol). Việc loại bỏ dung môi (cô trong thiết bị cô quay chân không, bay hơi đến khô) có thể dẫn đến thất thoát đáng kể 4-aminoazobenzen nếu không thực hiện trong các điều kiện được kiểm soát

Nếu cần thiết, cô đặc dịch chiết *t*-butyl methyl ete đến khoảng 1 ml (không khô) trong thiết bị cô quay trong chân không nhẹ tại nhiệt độ không quá 50 °C. Sau đó loại bỏ rất cẩn thận phần dung môi còn lại mà không có chân không, bằng cách dùng một dòng nhẹ của khí trơ.

Nếu có thể, tránh thay đổi dung môi, do trong quá trình phân tích có thể xảy ra sự thất thoát nghiêm trọng chất phân tích do ảnh hưởng nền.

Do ảnh hưởng nền, 4-aminoazobenzen có thể kém ổn định. Khi xảy ra chậm trễ trong lộ trình thực hiện, có thể dẫn đến sự thất thoát nghiêm trọng chất phân tích.

Nếu không thể thực hiện toàn bộ quá trình phân tích trong vòng 24 h, dung dịch thử phải được giữ dưới -18 °C.

#### **9.7 Dung dịch hiệu chuẩn**

##### **9.7.1 Dung dịch hiệu chuẩn để chuẩn bị mẫu không chiết**

Lần lượt cho 5 ml *t*-butyl methyl ete (7.5) hoặc 5 ml dung dịch chuẩn nội (7.9.1) vào 100 µl dung dịch hiệu chuẩn 4-aminoazobenzen (7.9.2). Hỗn hợp này dùng để hiệu chuẩn, tỷ lệ thu hồi 4-aminoazobenzen qua phân bố pha theo quy trình này là từ 95 % đến 100 %.

Nếu phát hiện amin lớn hơn 5 mg/kg, thực hiện định lượng bằng đường cong hiệu chuẩn, ví dụ: thực hiện theo TCVN12512-1 (ISO 14362-1).

### **9.7.2 Dung dịch hiệu chuẩn để chuẩn bị mẫu có chiết**

Thêm 100 µl dung dịch hiệu chuẩn 4-aminoazobenzen (7.9.2) vào 6,9 ml metanol (7.3), 9 ml dung dịch natri hydroxit (7.2), 1 ml nước, 7 g natri clorua (7.6) và 5 ml *t*-butyl metyl ete (7.5) hoặc 5 ml dung dịch chuẩn nội (7.9.1).

Bình phản ứng phải được đậy kín và lắc hỗn hợp bằng máy lắc (8.8) trong 45 min, đảm bảo pha trộn các pha một cách hiệu quả. Để phân tích tiếp, lấy một phần của pha *t*-butyl metyl ete. Đậy ngay lọ lại để phân tích.

**CHÚ THÍCH** Do hàm lượng metanol cao trong nền, có thể quan sát được các tỷ lệ thu hồi khác nhau. Trong trường hợp này, cần tạo một đường cong hiệu chuẩn tại ít nhất ba điểm với metanol có chứa chất nền.

### **9.8 Kiểm tra hệ thống phân tích**

#### **9.8.1 Chuẩn bị mẫu không chiết**

Để kiểm tra quy trình, xử lý 100 µl dung dịch hiệu chuẩn 4-aminoazobenzen (7.9.2) theo 9.5.

Tỷ lệ thu hồi 4-aminoazobenzen phải tối thiểu là 60 %.

#### **9.8.2 Chuẩn bị mẫu có chiết**

Để kiểm tra quy trình, thêm 100 µl dung dịch hiệu chuẩn 4-aminoazobenzen (7.9.2) vào 6,9 ml metanol. Hỗn hợp này được xử lý theo 9.5.

Tỷ lệ thu hồi 4-aminoazobenzen phải tối thiểu là 60 %.

### **9.9 Phân tích sắc ký**

Có thể sử dụng các kỹ thuật sắc ký được liệt kê trong 8.9 để phát hiện 4-aminoazobenzen. Có thể sử dụng các phương pháp khác đã được xác nhận. Nếu amin này được phát hiện bằng một phương pháp sắc ký thì sau đó phải xác nhận lại bằng một hoặc nhiều phương pháp khác. Kết quả là dương tính nếu cả hai phương pháp cho kết quả dương tính.

## **10 Đánh giá**

### **10.1 Tính toán**

Thường tính hàm lượng 4-aminoazobenzen bằng một chương trình phần mềm. Cũng có thể thực hiện tính toán thủ công theo mô tả trong Phụ lục B.

### **10.2 Độ tin cậy của phương pháp**

Đối với độ tin cậy của phương pháp, xem Phụ lục C.

## **11 Báo cáo thử nghiệm**

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

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) Loại, nguồn gốc và ký hiệu của mẫu thử (phần mẫu thử, nếu có thể);
- c) Ngày nhận mẫu và ngày phân tích;
- d) Quy trình thực hiện lấy mẫu và quy trình chuẩn bị theo 9.3 hoặc 9.4;
- e) Phương pháp phát hiện và phương pháp định lượng;
- f) Kết quả thử nghiệm bao gồm mức và giới hạn phát hiện 4-aminoazobenzen, tính bằng mg/kg. Phải cẩn thận khi giải thích nồng độ 4-aminoazobenzen nhỏ hơn 30 mg/kg (xem Phụ lục D).

## **Phụ lục A**

(tham khảo)  
**Phân tích sắc ký**

**A.1 Nhận xét ban đầu**

Do thiết bị (8.9) của các phòng thử nghiệm có thể khác nhau, không có hướng dẫn áp dụng chung cho phân tích sắc ký. Các thông số dưới đây đã được thử nghiệm thành công và sử dụng.

**A.2 Sắc ký lớp mỏng (TLC)**

Bản (HPLC):	Silica gel 60 với chất chỉ thị phát huỳnh quang F254 20 cm x 10 cm
Thể tích mẫu chấm:	(2 đến 5) $\mu$ l, dạng điểm
Dung môi pha động 1:	cloroform/axit axetic (90 + 10) phần thể tích
Phát triển:	buồng bão hòa
Phát hiện:	1. Bản TLC với chất chỉ thị phát huỳnh quang F254 2. Đèn UV và/hoặc sau khi xử lý liên tiếp bằng thuốc thử 1 và 2, thời gian phản ứng khoảng 5 min.
Thuốc thử 1:	Đối với sự hình thành NO <sub>x</sub> , đặt trong buồng trống một cốc có mỏ chứa khoảng 1 ml axit sulfuric và thêm một thìa nhỏ natri nitrit rắn. Đóng cửa buồng và để phản ứng xảy ra. Đặt bản khô vào buồng. Sau 5 min, lấy bản ra và làm khô trong dòng không khí lạnh.
Thuốc thử 2:	Sau đó phun lên bản dung dịch $\alpha$ -naphtol 0,2 % được chuẩn bị trong KOH 1 M trong metanol.
Bản (TLC):	Silica gel 60 với chất chỉ thị phát huỳnh quang F254, 20 cm x 10 cm
Thể tích mẫu chấm:	10,0 $\mu$ l, dạng vạch
Dung môi pha động 2:	cloroform/etyl axetat/axit axetic (60 + 30 + 10) phần thể tích
Dung môi pha động 3:	cloroform/metanol (95 + 5) phần thể tích
Dung môi pha động 4:	n-butyl axetat/toluen (30 + 70) phần thể tích
Phát triển:	buồng bão hòa
Dung môi pha động 2 và 3:	liên tiếp mà không làm khô các bản
Phát hiện:	1. Bản TLC với chất chỉ thị phát huỳnh quang F254 2. Đèn UV và/hoặc sau khi xử lý liên tiếp bằng thuốc thử 1 và 2 (A.2), thời gian phản ứng khoảng 5 min.
Bản (TLC):	Silica gel 60, 20 cm x 20 cm
Thể tích mẫu chấm:	10,0 $\mu$ l, dạng vạch
Dung môi pha động 2:	cloroform/etyl axetat/axit axetic (60 + 30 + 10) phần thể tích
Dung môi pha động 3:	cloroform/metanol (95 + 5) phần thể tích
Dung môi pha động 2 và 3:	liên tiếp mà không làm khô các bản
Phát triển:	buồng bão hòa
Phát hiện:	xử lý liên tiếp bằng thuốc thử 1 và 2 (A.2), thời gian phản ứng khoảng 5 min.

### A.3 Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

#### A.3.1 Sắc ký lỏng hiệu năng cao/detector mảng diot (HPLC/DAD)

Dung môi rửa giải 1:	metanol
Dung môi rửa giải 2:	hòa tan 0,68 g kali dihydrogen photphat trong 1 000 ml nước, sau đó thêm 150 ml metanol
Pha tĩnh	Zorbax Eclipse XDB C18® <sup>a)</sup> (3,5 µm): (150 x 4,6) mm
Tốc độ dòng:	0,6 ml/min đến 2,0 ml/min (dòng gradien, xem bên dưới)
Nhiệt độ cột:	32 °C
Thể tích tiêm:	5 µl
Phát hiện:	DAD, ghi quang phổ
Định lượng:	tại 240 nm, 380 nm

Gradien	Thời gian (min)	Dung môi rửa giải 1 (%)	Tốc độ dòng (ml)
	0,00	10,0	0,6
	22,50	55,0	0,6
	27,50	100,0	0,6
	28,50	100,0	0,95
	28,51	100,0	2,0
	29,00	100,0	2,0
	29,01	10,0	2,0
	31,0	10,0	0,6
	35,00	10,0	0,6

<sup>a)</sup> Zorbax Eclipse XDB C18® là một ví dụ của sản phẩm phù hợp có giá trị thương mại. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không phải là chỉ thị của ISO về sản phẩm này.

#### A.3.2 Sắc ký lỏng hiệu năng cao/detector khối phổ chọn lọc (HPLC/MS)

Dung môi rửa giải 1:	axetonitril
Dung môi rửa giải 2:	5 mmol ammoni axetat trong 1 000 ml nước, pH 3,0
Pha tĩnh	Zorbax Eclipse XDB C18® <sup>a)</sup> (3,5 µm); (2,1 x 50) mm
Tốc độ dòng:	300 µl/min
Gradien:	bắt đầu từ 10 % dung môi rửa giải 1, tăng lên 20 % dung môi rửa giải 1 trong vòng 1,5 min, tăng tuyến tính lên 90 % dung môi rửa giải 1 trong vòng 6 min
Nhiệt độ cột:	40 °C
Thể tích tiêm:	2,0 µl
Phát hiện:	detector khối phổ tứ cực và/hoặc bẫy ion, chế độ quét và/hoặc MS ion con MS phát hiện
Khí phun:	nitơ (được đóng chai/máy sinh khí)



Ion hóa: phun điện tử dương API, bộ phân mảnh 120 V

a) Zorbax Eclipse XDB C18® là một ví dụ của sản phẩm phù hợp có giá trị thương mại. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không phải là chỉ thị của ISO về sản phẩm này.

#### **A.4 Sắc ký khí mao quản/detector khối phổ chọn lọc (GC/MS)**

Cột mao quản: DB-35 MS (J và W)®<sup>a)</sup>, dài: 35 m, đường kính trong 0,25 mm, độ dày màng: 0,25 µm.

Hệ thống tiêm: chia dòng hoặc không chia dòng

Nhiệt độ cổng tiêm: 260 °C

Khí mang: Heli

Chương trình nhiệt độ: 100 °C (2 min), 100 °C đến 310 °C (15 °C/min), 310 °C (2 min)

Thể tích tiêm: 1,0 µl, chia dòng 1:15

Phát hiện: MS

a) DB-35 MS (J và W)® là một ví dụ của sản phẩm phù hợp có giá trị thương mại. Thông tin này đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không phải là chỉ thị của ISO về sản phẩm này.

#### **A.5 Điện di mao quản (CE)**

Trộn 200 µl dung dịch mẫu (9.6) với 50 µl HCl ( $c = 0,01$  mol/l) và lọc qua màng lọc (0,2 µm). Dung dịch này được phân tích bằng điện di vùng mao quản.

Mao quản 1: 56 cm, không nhồi, đường kính trong 50 µm, với khe sáng mở rộng (Agilent)

Mao quản 2: 56 cm, nhồi polyvinyl alcohol (PAV), đường kính trong 50 µm, với khe sáng mở rộng (Agilent)

Dung dịch đệm: dung dịch đệm photphat ( $c = 50$  mmol/l), pH = 2,5

Nhiệt độ cột: 25 °C

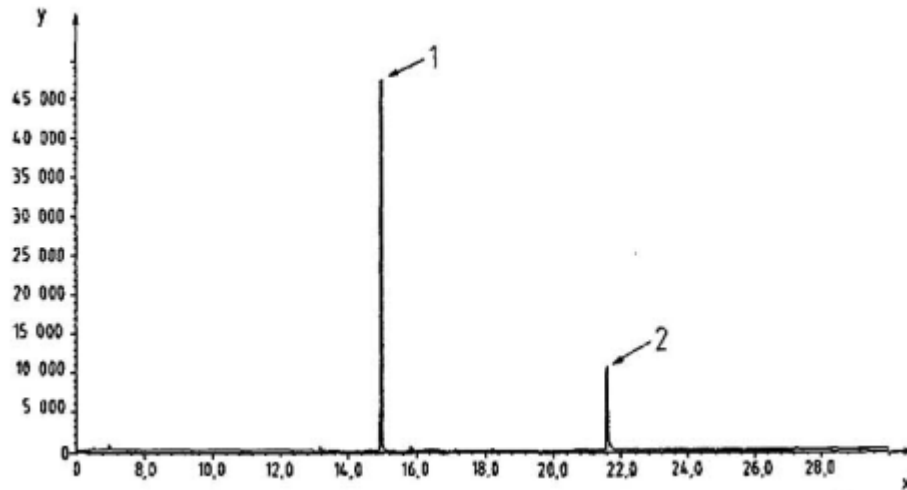
Điện áp: 30 kV

Thời gian tiêm mẫu: 4 s

Thời gian rửa: 5 s

Phát hiện: DAD 214 nm, 254 nm, ghi quang phổ

Định lượng: tại 240 nm và 380 nm



**CHÚ DẪN**

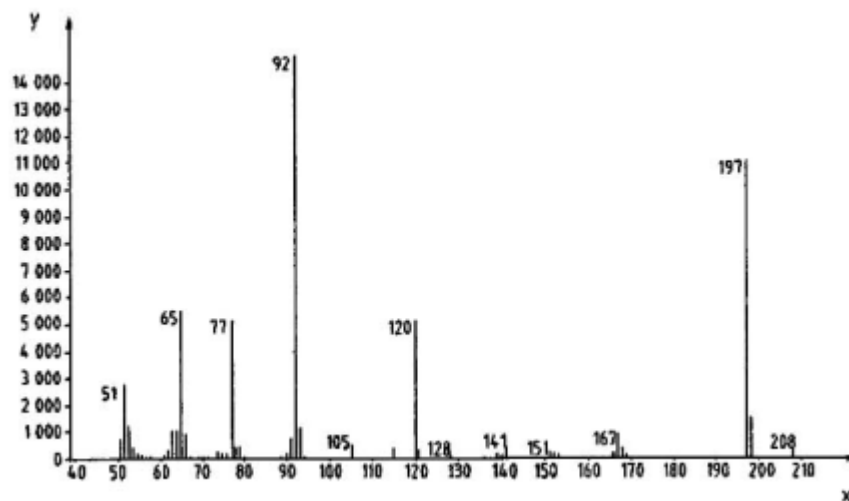
1 chất chuẩn nội

2 4-aminoazobenzen

x thời gian, tính bằng min

y độ nhạy

**Hình A.1 - Sắc đồ dòng ion tổng của 4-aminoazobenzen với GC-MS**

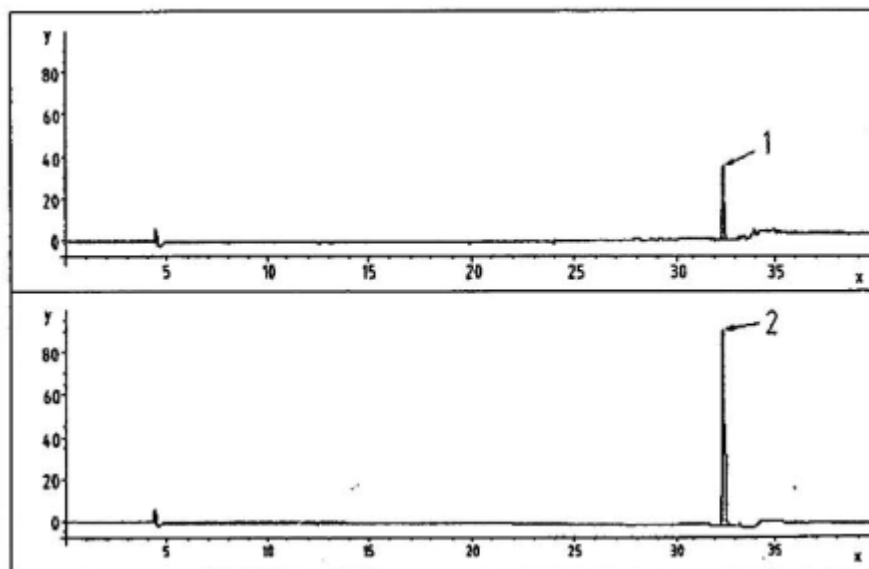


**CHÚ DẪN**

x m/z

y độ nhạy

**Hình A.2 - Phổ GC-MS 70eV của 4-aminoazobenzen**



CHÚ DẪN

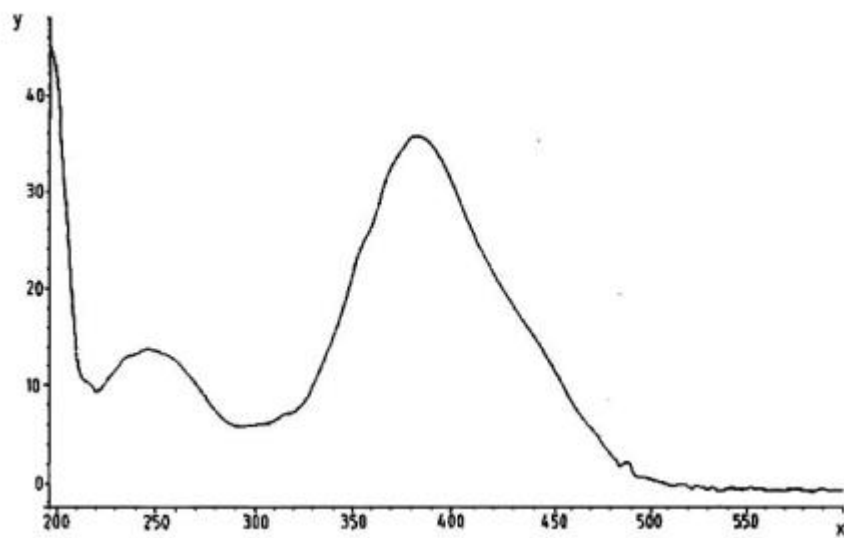
1 240 nm

2 380 nm

x thời gian, tính bằng min

y hấp thụ quang, tính bằng mAU

**Hình A.3 - Sắc đồ của 4-aminoazobenzen với HPLC/DAD**



CHÚ DẪN

x bước sóng, tính bằng nm

y hấp thụ quang, tính bằng mAU

**Hình A.4 - Phổ HPLC/UAD của 4-aminoazobenzen**

## Phụ lục B

(tham khảo)

### Tính toán

#### B.1 Yêu cầu chung

Tính hàm lượng 4-aminoazobenzen từ các diện tích peak. Hàm lượng 4-aminoazobenzen là tỷ lệ khối lượng  $w$ , tính bằng mg/kg, mẫu thử theo một trong các công thức sau:

#### B.2 Hiệu chuẩn có chất chuẩn nội

$$w = \rho_c \times \frac{A_s \times A_{ISC} \times V}{A_c \times A_{ISS} \times m_E}$$

Trong đó

$w$  tỷ lệ khối lượng của 4-aminoazobenzen trong mẫu thử, tính bằng mg/kg;

$\rho_c$  nồng độ của 4-aminoazobenzen trong dung dịch hiệu chuẩn, tính bằng  $\mu\text{g/ml}$ ;

$A_s$  diện tích peak của 4-aminoazobenzen trong dung dịch mẫu thử, tính bằng đơn vị diện tích;

$A_c$  diện tích peak của 4-aminoazobenzen trong dung dịch hiệu chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích;

$A_{ISS}$  diện tích peak của chất chuẩn nội trong dung dịch mẫu thử, tính bằng đơn vị diện tích;

$A_{ISC}$  diện tích peak của chất chuẩn nội trong dung dịch hiệu chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích;

$V$  thể tích mẫu thử cuối cùng được tạo ra theo 9.6, tính bằng ml;

$m_E$  khối lượng mẫu thử đệt, tính bằng g.

#### B.3 Hiệu chuẩn không có chất chuẩn nội

$$w = \rho_c \times \frac{A_s \times V}{A_c \times m_E}$$

Trong đó

$w$  tỷ lệ khối lượng của 4-aminoazobenzen trong mẫu thử, tính bằng mg/kg;

$\rho_c$  nồng độ của 4-aminoazobenzen trong dung dịch hiệu chuẩn, tính bằng  $\mu\text{g/ml}$ ;

$A_s$  diện tích peak của 4-aminoazobenzen trong dung dịch mẫu thử, tính bằng đơn vị diện tích;

$A_c$  diện tích peak của 4-aminoazobenzen trong dung dịch hiệu chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích;

$V$  thể tích mẫu thử cuối cùng được tạo ra theo 9.6, tính bằng ml;

$m_E$  khối lượng mẫu thử đệt, tính bằng g.

## Phụ lục C

(tham khảo)

### Độ tin cậy của phương pháp

Các dữ liệu trong Bảng C.1 thu được trong thử nghiệm liên phòng trên vải tơ tằm và vải polyeste.

**Bảng C.1 - Kết quả từ thử nghiệm liên phòng**

Thông số	Tơ tằm		Polyeste	
	GC-MS	HPLC	GC-MS	HPLC

Số lượng các phòng thử nghiệm tham gia	10	11	10	9
Số giá trị lạc	0	3	0	1
Số lượng các phòng thử nghiệm sau khi loại bỏ các giá trị lạc	10	8	10	8
Giá trị trung bình $\bar{x}$ , mg/kg	77,3	80,7	71,1	52,7
Độ lặp lại $r$ , mg/kg	22,6	11,2	32,6	10,0
Độ lệch chuẩn của độ lặp lại, $s_r$ , mg/kg	8,1	4,0	11,6	3,6
Độ tái lập, $R$ , mg/kg	54,7	52,3	54,3	48,2
Độ lệch chuẩn của độ tái lập, $S_R$ , mg/kg	19,6	18,7	19,4	17,2
<b>CHÚ THÍCH</b> Xác định hàm lượng của 4-aminoazobenzen				

Phương pháp này được phát triển bởi nhóm công tác § 64 LFGB “Phân tích các chất màu azo bị cấm” của Văn phòng Bảo vệ Người tiêu dùng và An toàn thực phẩm Liên bang Đức (BVL) và được đánh giá trong thử nghiệm liên phòng với 11 phòng thử nghiệm tham gia.

a) Để đánh giá độ lặp lại và độ tái lập của các kết quả thử nghiệm liên phòng, phải xem xét các yếu tố sau:

1) Thử nghiệm liên phòng chứng minh rằng tỷ lệ của chất màu với tác nhân khử và sự biến chất của tác nhân khử có thể có ảnh hưởng quyết định đến kết quả định lượng. Vì vậy, cần thực hiện tách khử thật nghiêm ngặt theo các điều kiện theo mô tả trong 9.5 (thời gian, nhiệt độ và các chi tiết về lượng).

2) Một yếu tố quan trọng khác là chiết lỏng-lỏng, ví dụ: tách pha nước và hữu cơ để ngăn chặn phản ứng tiếp theo của liên kết azo của 4-aminoazobenzen. Vì vậy, cần giữ chính xác các điều kiện theo mô tả trong 9.5.

3) Sử dụng các chất chuẩn nội khác một cách phù hợp có thể dẫn đến độ tin cậy của quy trình GC-MS cao hơn. Điều này đã không được xem xét trong khi đánh giá thử nghiệm liên phòng.

b) Mẫu thử tơ tằm và polyeste ở trên được sản xuất đặc biệt cho thử nghiệm liên phòng. Vì mục đích này, quá trình nhuộm được thực hiện riêng bằng chất màu 4-aminoazobenzen, không sử dụng bất kỳ chất màu azo (cho phép) nào khác, tức là: không có thêm chất khác triệt tiêu tác nhân khử. Cách nhuộm này nên tránh các yếu tố ảnh hưởng bổ sung. Tuy nhiên, các phép thử tách đã chứng minh việc bổ sung các chất màu (cho phép) khác không dẫn đến thất thoát 4-aminoazobenzen.

## Phụ lục D

(tham khảo)

### Hướng dẫn đánh giá - Giải thích kết quả phân tích

Do việc giải phóng các amin với lượng rất nhỏ có thể dẫn đến các kết quả dương tính giả, Quy định REACH 1907/2006/Phụ lục XVII xác định giá trị giới hạn là 30 mg/kg vật liệu mẫu. Giá trị này chỉ áp dụng cho vật liệu mẫu đồng nhất về nền và màu sắc, không áp dụng cho mẫu hỗn hợp có thành phần không đồng nhất.

Nếu lượng 4-aminoazobenzen phát hiện lớn hơn 30 mg/kg, giả định rằng đã sử dụng một chất màu azo nào đó. Hiện nay mức dưới 30 mg/kg không thể là công bố tin cậy về việc sử dụng các chất màu azo mà không có thêm thông tin như: loại và/hoặc độ tinh khiết của các chất màu sử dụng hoặc các nguyên liệu khác được sử dụng.

Trong tiêu chuẩn này, nên ghi lại các kết quả phân tích như sau:

- **Trong trường hợp mức xác định 4-aminoazobenzen  $\leq 30$  mg/kg**, theo phân tích đã thực hiện, không phát hiện các chất màu azo có thể giải phóng 4-aminoazobenzen do sự tách khử các nhóm azo trong hàng hóa được thử nghiệm.

- **Trong trường hợp mức xác định 4-aminoazobenzen  $> 30$  mg/kg**, theo phân tích đã thực hiện, hàng hóa được thử nghiệm đã sản xuất và xử lý bằng các chất màu azo giải phóng 4-aminoazobenzen.