

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU VÀ CHUYỂN GIAO CÔNG NGHỆ

ISBN: 978-604-913-586-6

KỸ YẾU HỘI THẢO KHOA HỌC

PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VÀ NHẬN DẠNG
CHẤT ĐỘC TRONG THỰC PHẨM



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ

MỤC LỤC

	trang
1 Dang Thuan Tran, Thi Cam Van Do, Quang Trung Nguyen, Truong Giang Le, Quang Tung Nguyen² - Advanced methodologies for detection and determination of heavy metals in food	1
2 Ly T. Kiet, Hoang N. Vinh, Nguyen T. Duy, Ho T. Dat, Le T. Hoa, Vu H. Thai, Vu H. Giang, Nguyen Q. Hung, Chu V. Hai - Structural identification and quantitation of auramine in food	14
3 Chris Cheah - Orbitrap-based HRAM Workflows for Next Generation Contaminants Screening	22
4 Phạm Thị Phương Thảo, Nguyễn Quang Trung, Vũ Đức Nam, Nguyễn Thị Xuyên, Nguyễn Ngọc Tùng, Phạm Thị Trà, Etsuko Kawasaki - Xác định một số chất bay hơi trong rượu bằng kỹ thuật không gian hơi tĩnh kết hợp GC/MS	38
5 Tran Cao Son, Nguyen Thi Ha Binh, Le Thi Hong Hao, Do Huu Tuan, Nguyen Thi Minh Hoa, Nguyen Thi Anh Huong - Simultaneous determination of six Trichothecenes in cereals and related products by liquid chromatography tandem mass spectrometry	47
6 Lê Thế Tâm, Lê Thị Mỹ Châu - Định lượng một số phẩm màu công nghiệp Sudan 1, Rhodamin B, Orange G trong thực phẩm bằng phương pháp Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)	56
7 Vũ Thu Trang, Nguyễn Thị Thảo, Tomoko Shimamura - Nghiên cứu sự tạo thành Aminoreductone trong phản ứng Maillard và ứng dụng kiểm soát quá trình gia nhiệt trong công nghệ chế biến sữa	66
8 Phạm Hoài Thu, Javier Santos-Aberturas Andrew Truman, Lê Trường Giang - Nghiên cứu một vài hợp chất thiên nhiên từ vi khuẩn Streptomyces scabies trên vỏ khoai tây bị nhiễm bệnh vẩy nến	72
9 Redefining ICP-MS tackle your Challenging Food Matrices - ThermoFisher Scientific	80
10 Lê Văn Trọng, Lê Ngọc Sơn - Nghiên cứu xác định Acrylamide trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký khối phổ GC-MS	98
11 Cao Văn Hoàng, Phạm Quốc Trung, Nguyễn Ngọc Tùng, Bùi Hương Mỹ - Nghiên cứu quy trình phân tích đồng thời Pyrophosphate, Triphosphate trong chè và xúc xích bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng Detector đo độ dẫn không tiếp xúc (CE-C ⁴ D)	107
12 Nguyen Thi Minh Tu, Dang Thuy Linh, Le Thi Ha My, Ta Thi Thuy Chi, Le Tran Ngoan - Review heterocyclic amines in food processing and its food safety issues	118
13 Nguyễn Văn Lợi - Xác định ảnh hưởng của màng bảo quản Chitosan đến sự biến đổi chất lượng của củ khoai tây sau thu hoạch	128

**ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ PHẨM MÀU CÔNG NGHIỆP SUDAN I,
RHODAMIN B, ORANGE G TRONG THỰC PHẨM BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

**QUANTITATIVE SOME INDUSTRIAL COLORING (SUDAN I, RHODAMIN
B, ORANGE G) IN FOOD BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD**

Lê Thế Tâm*, Lê Thị Mỹ Châu*

Viện Công nghệ Hóa sinh – Môi trường, Trường Đại học Vinh, 182 - Lê Duẩn, Vinh, Nghệ An

*Email: tamlt@vinhuni.edu.vn; lemychau83@gmail.com

ABSTRACT

Sudan I, Orange G and Rhodamine B are industrial coloring, they negative impact human health and they prohibited to use in food technology. Residue of Sudan I, Orange G and Rhodamine B extracted and determined by HPLC-UV with ZORBAX Eclipse XDB-C18 column. This method retrieved about 96-97%. Sudan I concentration 0.032 mg/g in melon seeds; 1.8047 mg/g in cashews; 1.2882 mg/g in cashews power; 0.0154 mg/g in chilis power and 0.0148 mg/g in satay. Rhodamine B concentration in cashews 0.0017 mg/g and in melon seeds 0.0082 mg/g. Non Orange G in these are samples.

Keywords: Food, rhodamine B, orange G, sudan I, HPLC.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong quá trình chế biến thực phẩm, để tạo cho thực phẩm màu sắc đẹp, bắt mắt, người ta sử dụng phẩm màu công nghiệp [1]. Phẩm màu công nghiệp nói chung, rhodamine B, sudan I, orange G nói riêng đều độc hại, bị cấm sử dụng trong thực phẩm vì khó phân hủy. Tùy từng cơ thể mà ảnh hưởng đến gan, thận hoặc tồn dư lâu ngày gây độc hại đến cơ thể con người, đặc biệt có thể gây ung thư. Phẩm màu thực phẩm tự nhiên có độ bền kém hơn, lại đắt hơn phẩm màu công nghiệp. Do vậy nhiều người kinh doanh đã lạm dụng phẩm màu công nghiệp dù chất này từ lâu đã bị cấm sử dụng [2]. Vì vậy việc nghiên cứu xác định hàm lượng của các phẩm màu rhodamine B, sudan I, orange G, một thành phần của phẩm nhuộm trong thực phẩm là vấn đề cần thiết đối với sức khỏe cộng đồng. Những thực phẩm có chứa rhodamine B, sudan I, orange G là hạt dưa, ớt bột, sa tế, thịt bò khô, bột điều, hạt điều đỏ,... với hàm lượng rhodamine B, sudan I, orange G thường chiếm tỷ lệ rất nhỏ tùy theo từng loại sản phẩm [3,4]. Do đó trong bài này chúng tôi đã tiến hành phân tích "Định lượng rhodamine B, sudan I, orange G trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)". Để biết chính xác hơn hàm lượng rhodamine B, sudan I, orange G trong một số loại thực phẩm như thế nào?

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Cột sắc ký: cột ZORBAX Eclipse XDB-C18(4,6x150mm, 5 μ m), cân phân tích chính xác 0.0001g, máy siêu âm, máy nghiền mẫu thực phẩm, máy ly tâm, các dụng cụ thủy tinh cần thiết khác. Màng lọc dung môi 0.45 μ m, các hóa chất là các sản phẩm thương mại của hãng Merck loại tinh khiết dùng trong phân tích đạt tiêu chuẩn cho HPLC: Acetonitrile, nước cất đề ion, chất chuẩn rhodamine B, sudan I, orange G (HPLC) (hãng Sigma-Aldrich).

2.2. Phương pháp lấy mẫu

Các mẫu thực phẩm: hạt dưa, ớt bột, sa tế, thịt bò khô, bột điều, hạt điều đỏ được lấy từ các cửa hàng tạp hóa và các chợ ở thành phố Vinh, tỉnh Nghệ An. Mỗi mẫu được lấy tối thiểu là 5 gam, đựng vào túi polyetylen sạch, bảo quản lạnh trong hộp xốp, đưa về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm, mẫu được tiến hành xử lý sơ bộ bằng máy nghiền mẫu sau đó được xử lý tiếp bằng phương pháp chiết chọn lọc với các dung môi thích hợp để thu được chất phân tích, mẫu còn lại được lưu giữ trong hộp nhựa kín có nắp và được bảo quản ở nhiệt độ 1 $^{\circ}$ C – 5 $^{\circ}$ C.

2.3. Kỹ thuật thực nghiệm

2.3.1. Điều kiện sắc ký

- Đối với phân tích Rhodamin B:

Cột sắc ký: cột ZORBAX Eclipse XDB - C18 (4,6x150 mm, 5 μ m)(Agilent); pha động H₂O (0,05% H₃PO₄) : acetonitril = 3 : 7; nhiệt độ lò cột 45 $^{\circ}$ C; tốc độ dòng 1ml/phút; detector UV bước sóng đầu dò 556 nm.

- Đối với phân tích Sudan I:

Cột sắc ký: cột ZORBAX Eclipse XDB - C18 (4,6 x 150mm, 5 μ m) (Agilent); nhiệt độ lò cột: 3 $^{\circ}$ C, pha động: H₂O (0,05% H₃PO₄) : ACN = 20 : 80; Detector UV bước sóng đầu dò: 480nm; tốc độ dòng: 1ml/ phút; thể tích bơm : 20 μ l.

- Đối với phân tích Orange G:

Cột sắc ký: cột ZORBAX Eclipse XDB - C18 (4,6 x 150mm, 5 μ m) (Agilent); nhiệt độ lò cột: 30 $^{\circ}$ C; pha động: H₂O : ACN = 60 : 40; Detector UV bước sóng đầu dò: 476nm; tốc độ dòng: 1ml/ phút; thể tích bơm: 20 μ l

2.3.2. Xác định khoảng tuyến tính và đường chuẩn

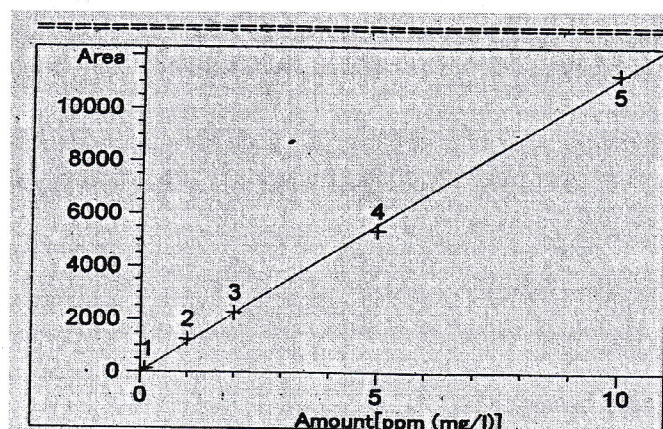
- Đối với rhodamin B

Dãy chuẩn rhodamin B được khảo sát có nồng độ như sau: 0,1; 1; 2; 5; 10 (ppm). Tiến hành chạy trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) từ kết quả thu được chúng tôi đã xây dựng phương trình hồi quy của đường chuẩn rhodamin B theo diện tích peak có dạng như sau:

$$y = 1118,331x + 5,6311 \quad R^2 = 0,99995$$

Bảng 1: Diện tích peak của rhodamin B tương ứng với từng nồng độ chuẩn

Nồng độ chuẩn (µg/ml)	Diện tích peak	a	b	R ²
0,1	113,4	1118,331	5,631	0,99995
1,0	1248,2			
2,0	2257,5			
5,0	5368,6			
10	11297,9			



Hình 1: Đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích peak và nồng độ chuẩn rhodamin B

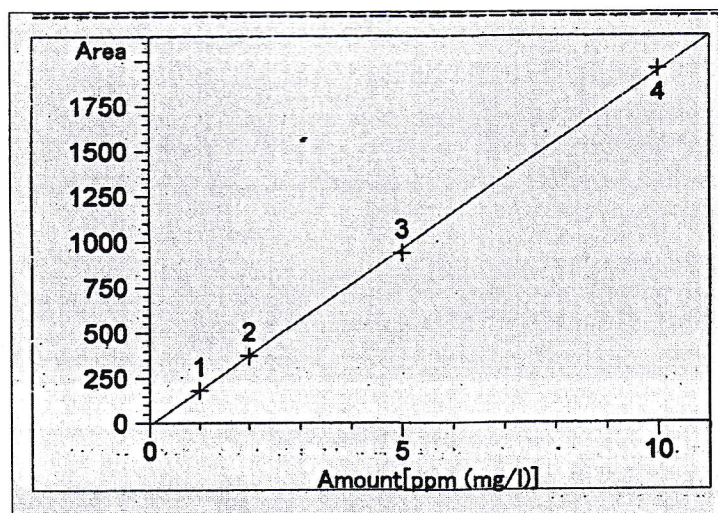
• Đối với sudan I

Dãy chuẩn sudan I được khảo sát có nồng độ như sau: 1; 2; 5; 10 (ppm). Tiến hành chạy trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) từ kết quả thu được chúng tôi đã xây dựng phương trình hồi quy của đường chuẩn sudan I theo diện tích peak có dạng như sau:

$$y = 195,54568 - 14,82349 \quad R^2 = 0,99981$$

Bảng 2: Diện tích peak của sudan I tương ứng với từng nồng độ chuẩn

Nồng độ chuẩn	Diện tích pic	m	b	R ²
1 ppm	180,1	195,5457	-14,8235	0.99981
2 ppm	373,2			
5 ppm	939,5			
10 ppm	1953,2			



Hình 2: Đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích peak và nồng độ chuẩn sudan I

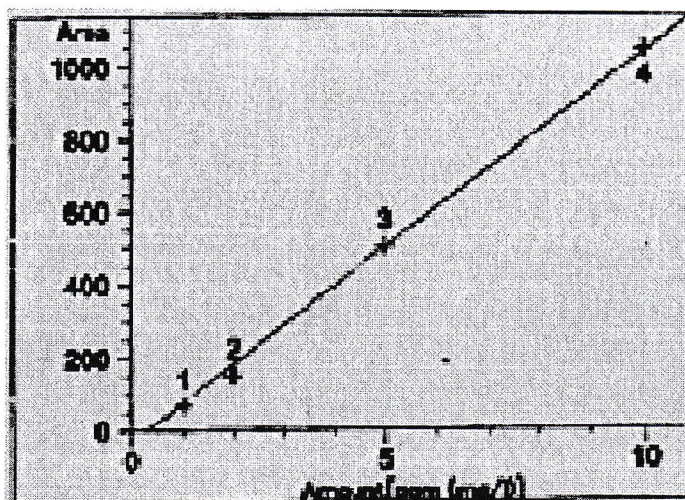
- Đối với orange G

Dãy chuẩn orange G được khảo sát có nồng độ như sau: 0.1; 1; 2; 5; 10(ppm). Tiến hành chạy trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) từ kết quả thu được chúng tôi đã xây dựng phương trình hồi quy của đường chuẩn orange G theo diện tích peak có dạng như sau:

$$y = 106,439x - 29,888 R^2 = 0,9987$$

Bảng 3: Diện tích peak của orange G tương ứng với từng nồng độ chuẩn

Nồng độ chuẩn	Diện tích peak	m	b	R ²
1 ppm	74,3	106,439	-29,888	0,9987
2 ppm	152,3			
5ppm	502,8			
10 ppm	1041			



Hình 3: Đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích peak và nồng độ chuẩn orange G

2.3.3. Chuẩn bị mẫu [4-6]

- Đối với mẫu hạt dưa đã tách lấy vỏ và ớt bột, thịt bò khô, bột điều, hạt điều đỏ cân 5g mẫu thử chính xác đến 1mg cho vào ống ly tâm 50ml và chiết bằng 40ml ACN:H₂O (0,05% H₃PO₄) = 70:30, vortex trong 3 phút, siêu âm trong 15 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút, lọc dịch thu được qua màng lọc 0,45μm và cho vào vial 1,5ml. Tiến hành phân tích trên máy HPLC.

- Đối với mẫu sa tế, cân 5g mẫu thử chính xác đến 1mg, cho vào ống ly tâm 50ml và chiết bằng 40ml ACN:H₂O (0,05% H₃PO₄) = 70:30, vortex trong 3 phút, siêu âm trong 15 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút, lọc dịch thu được qua màng lọc 0,45μm và cho vào vial 1,5ml. Tiến hành phân tích trên máy HPLC.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định hàm lượng chuẩn rhodamin B trong mẫu các mẫu thực phẩm

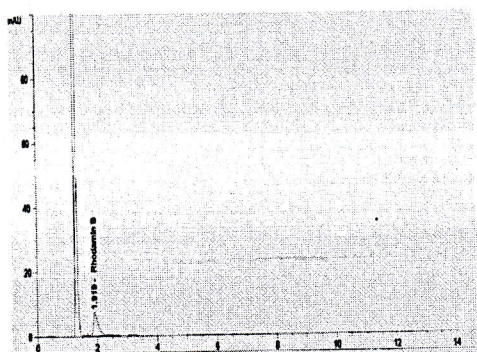
Sau khi tiến hành phân tích các mẫu thực phẩm hạt dưa, ớt bột, sa tế, thịt bò khô, bột điều, hạt điều đỏ trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), chúng tôi thu được kết quả ở bảng 4 và hình 4, 5.

Bảng 4. Kết quả phân tích hàm lượng rhodamin B trong mẫu

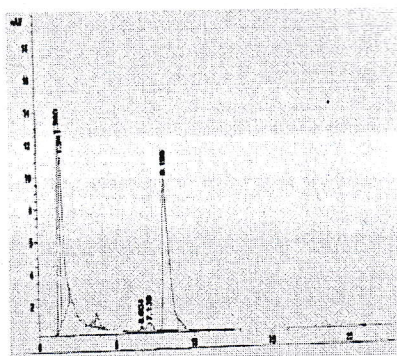
Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	C ₀ (ppm)	Diện tích pic	C (mg/g)
Hạt điều	5,0002	0,2151	23,4063	0,0017
Hạt dưa	5,0002	1.0209	89,9922	0,0082
Ớt bột	5,0004	KPH	KPH	KPH
Thịt bò khô	5,0003	KPH	KPH	KPH

Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao công nghệ
<http://www.foodsafety.gov.vn>

Sa tế	5,0003	KPH	KPH	KPH
Bột điều	5,0002	KPH	KPH	KPH
Hạt điều thêm chuẩn	5,0002	0,4922	46,3056	0,0039



Hình 4. Sắc đồ mẫu hạt dứa



Hình 5. Sắc đồ mẫu hạt điều

Độ thu hồi của phương pháp cũng được xác định bằng cách tiến hành phân tích 3 lần lặp lại đối với mẫu hạt điều đã được tiến hành tách chiết theo quy trình xử lý và phân tích mẫu với nồng độ thêm chuẩn là 0,1ppm. Kết quả thu được ghi ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi của phương pháp

Mẫu	Số lần	M (g)	C _{mẫu}	C _{spike}	H%
Hạt điều	1	5,0002	0,4922	0	
Hạt điều thêm chuẩn	1	5,0005	0,5886	0,1	96,38
	2	5,0003	0,5886	0,1	96,33
	3	5,0002	0,5885	0,1	96,29

Qua kết quả phân tích cho thấy, hiệu suất thu hồi cao, tỷ lệ % tìm lại chất phân tích Htb (%) = 96,33% đáp ứng yêu cầu phân tích.

Đánh giá độ lặp của phương pháp

Theo lý thuyết thống kê, các đại lượng đặc trưng cho độ lặp lại là độ lệch chuẩn SD và hệ số biến thiên CV% (RSD).

Thực hiện phân tích 1g mẫu, lặp lại 3 lần trong cùng một điều kiện. Kết quả phân tích 3 lần lặp lại và độ lặp lại của phương pháp được ghi ở bảng 6:

Bảng 6: Kết quả xác định độ lặp của phương pháp

TT	Khối lượng (g)	Hàm lượng rhodamin B (µg/ml)
1	1,0012	85.27244
2	1,0018	85.36052
3	1,0009	85.13503

Độ lệch chuẩn: $s = 0,062$

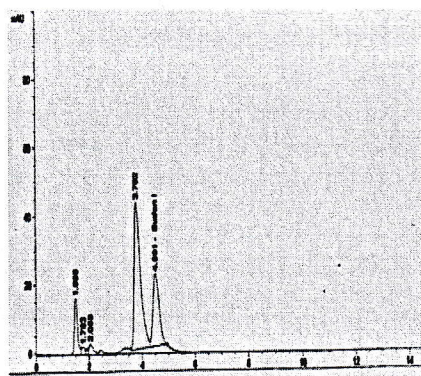
Độ lệch chuẩn tương đối: $RSD(\%) = 0,158\%$

3.2. Xác định hàm lượng chuẩn sudan I trong mẫu các mẫu thực phẩm

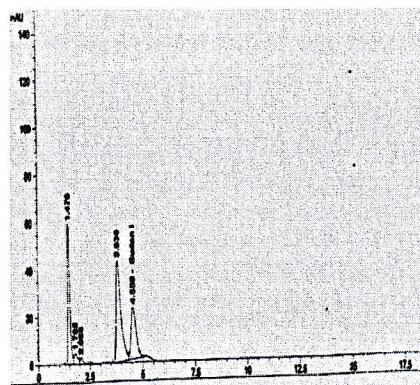
Sau khi tiến hành phân tích các mẫu thực phẩm hạt dưa, ớt bột, sa tế, thịt bò khô, bột điều, hạt điều đỏ trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), chúng tôi thu được kết quả ở bảng 7 và hình 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13.

Bảng 7: Kết quả phân tích hàm lượng sudan I có trong các mẫu:

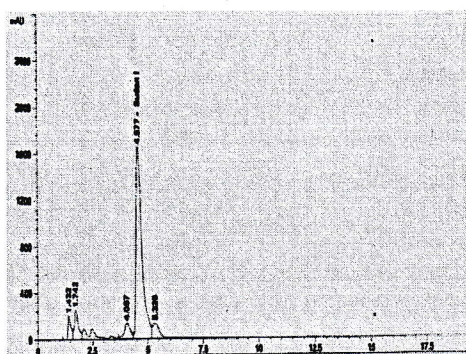
Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	C ₀ (ppm)	Diện tích peak	C (mg/g)
Hạt dưa	5,0002	0,3970	6,2800	0,0032
Ớt bột	5,0004	1,9239	87,4412	0,0154
Bò khô	5,0005	0,3953	6,1902	0,0032
Sa tế	5,0003	1,8477	368,1049	0,0148
Bột điều	5,000	161,0223	3,8163	1,2882
Hạt điều	5,000	225,5817	4,4097	1,8047
Sa tế thêm chuẩn	5,0001	1,9446	368,1158	0,0156
Bột điều thêm chuẩn	5,0002	170,7243	3,8179	1,3657



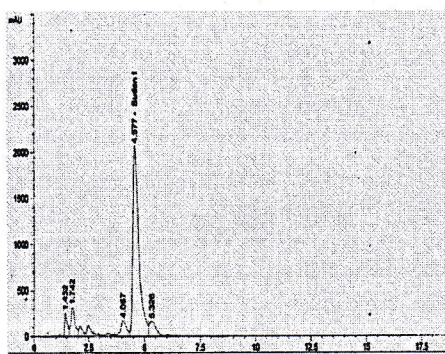
Hình 6 : Sắc đồ mẫu sate



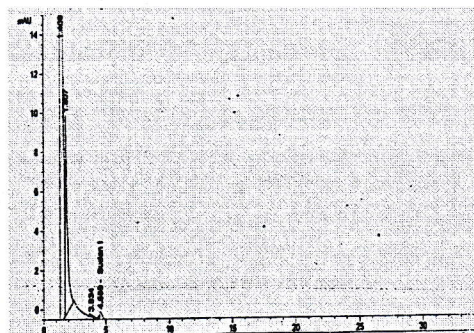
Hình 7: Sắc đồ sa tế thêm chuẩn



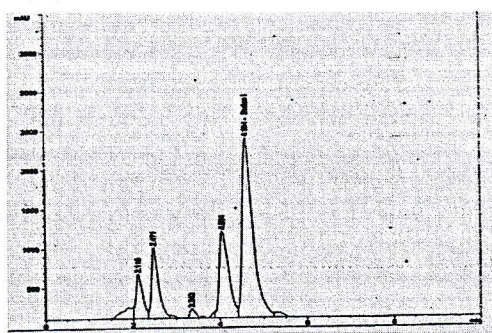
Hình 8: Sắc đồ mẫu bột điều



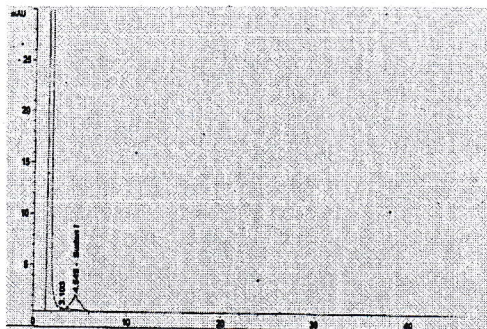
Hình. 9: Sắc đồ mẫu bột điều thêm chuẩn



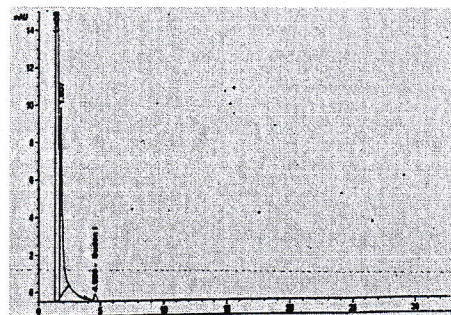
Hình 10: Sắc đồ mẫu thịt bò khô



Hình 11: Sắc đồ mẫu hạt điều



Hình 12: Sắc đồ mẫu ớt bột



Hình 13: Sắc đồ mẫu hạt dưa

Độ thu hồi của phương pháp cũng được xác định bằng cách tiến hành phân tích 3 lần lặp lại đối với mẫu hạt dưa đã được tiến hành tách chiết theo quy trình xử lý và phân tích mẫu với nồng độ thêm chuẩn là 10ppm. Kết quả thu được ghi ở bảng 8.

Bảng 8: Kết quả xác định hiệu suất thu hồi của phương pháp

Mẫu	Tên mẫu	Số lần	M (g)	C _{mẫu}	C _{spike}	H%
1	Bột điều	1	5,0003	161,0223	0	
2	Bột điều thêm chuẩn	1	5,0002	170,7243	10	97,02
		2	5,0007	170,7203	10	96,98
		3	5,0005	170,7233	10	97,01
3	Sa tế	1	5,0003	1,8477	0	
4	Sa tế thêm chuẩn	1	5,0001	1,9446	0,1	96,89
		2	5,0002	1,9445	0,1	96,78
		3	5,0005	1,9448	0,1	97,03

Đánh giá độ lặp của phương pháp

Theo lý thuyết thống kê, các đại lượng đặc trưng cho độ lặp lại là độ lệch chuẩn SD và hệ số biến thiên CV% (RSD).

Thực hiện phân tích 1g mẫu, lặp lại 3 lần trong cùng một điều kiện. Kết quả phân tích 3 lần lặp lại và độ lặp lại của phương pháp được ghi ở bảng 9

Bảng 9: Kết quả trung bình, độ lệch chuẩn, hệ số biến thiên của các mẫu.

TT	Hạt dưa		Ớt bột		Bò khô	
	m	Nồng Độ	m	Nồng Độ	m	Nồng Độ
1	5,0002	0,0032	5,0004	0,0154	5,0005	0,0032
2	5,0003	0,0031	5,0002	0,016	5,0005	0,00318
3	5,0001	0,0034	5,0001	0,017	5,0002	0,00315
X_b	0,0032		0,016		0,003	
S	$5,29 \times 10^{-6}$		0,001		$1,53 \times 10^{-5}$	
CV%	0,1667		6,25		0,483	

3.3. Xác định hàm lượng chuẩn orange G trong mẫu các mẫu thực phẩm

Sau khi tiến hành phân tích các mẫu thực phẩm hạt dưa, ớt bột, sa tế, thịt bò khô, bột điều, hạt điều đỏ trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), chúng tôi thu được kết quả không phát hiện ở tất cả các mẫu tiến hành.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp định lượng rhodamin B, sudan I, orange G bằng phương pháp HPLC với các điều kiện sắc ký như ở trên.

Đã tiến hành đánh giá phương pháp định lượng và cho thấy phương pháp thỏa mãn tính thích hợp của hệ thống sắc ký, tính chính xác, tính tuyến tính, tính đúng, tính đặc hiệu.

Đã định lượng được rhodamin B, sudan I, orange G trong một số thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Đức Thụy. (2005) “Thực trạng sử dụng hàn the và phẩm màu trong một số sản phẩm thức ăn truyền thống tại tỉnh Hà Tây”, Tạp chí Y học thực hành, pp.1219-1223.
- [2] Sumita Dixit, S.K. Purshottam, S.K. Khanna and Mukul Das. (2010) “ Usage pattern and exposure assessment of food colours in different age groups of consumed in the State of Uttar Pradesh, India”. Food Additives and Contaminant, 27(2), pp. 181.
- [3] Nadia Ashfaq, Tariq Masud. (2002) “Surveillance on artificial colours in different ready to eat foods”, Pakistan J.Nutrition, 1(5), pp. 223-225.
- [4] R.W. Mason, L.R.Edwards. (1989) “High-performance liquid chromatographic determination of rhodamine B in rabbit and human ”, J. Chromatography, 491, pp. 468-472.
- [5] Petr Botek, Jan PouStka and Jana HaJšloVá.(2007)“Determination of Banned Dyes in Spices by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry”, Czech J. Food Sci, Vol 25, pp. 17-24.
- [6] T.L. Chiang, Y.C. Wang and W.H. Ding.W.H. (2011) “Trace Determination of Rhodamine B and Rhodamine 6G Dyes in Aqueous”, J. Chin. Chem. Soc, 59, pp. 1-5.