

PHÂN TÍCH PHỤ GIA THỰC PHẨM VÀ CÁC CHẤT CÓ LIÊN QUAN TẠI CÔNG TY DỊCH VỤ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ SẮC KÝ HẢI ĐĂNG

Nguyễn Huỳnh Tuấn Anh, Mai Thanh Bình, Đinh thị Hạ Long, Đỗ Vũ Phương Thảo, Vương quang

Huy, Nguyễn vũ Khánh, Phạm Thị Ánh, Diệp Ngọc Sương, Chu Phạm Ngọc Sơn

Công ty cổ phần dịch vụ khoa học công nghệ Sắc Ký Hải Đăng

1. GIỚI THIỆU

1.1. Phụ gia thực phẩm là gì?

Phụ gia thực phẩm (PGTP) là những chất không được coi là thực phẩm hoặc một thành phần của thực phẩm. Phụ gia thực phẩm có ít hoặc không có giá trị dinh dưỡng, được chủ động cho vào với mục đích đáp ứng yêu cầu của công nghệ trong quá trình sản xuất, chế biến, xử lý, bao gói, vận chuyển, bảo quản thực phẩm. PGTP không bao gồm các chất ô nhiễm hoặc các chất bổ sung vào thực phẩm với mục đích tăng thêm giá trị dinh dưỡng của thực phẩm.

1.2. Các loại phụ gia thực phẩm

Dựa theo chức năng, công dụng, tính chất, danh mục các chất phụ gia thực phẩm được phép sử dụng trong thực phẩm. Theo quyết định số 4196/1999/QĐ-BYT ngày 29/12/1999 và 3742/2001/QĐ-BYT ngày 31/8/2001. Phụ gia thực phẩm được xếp vào 22 nhóm theo chức năng được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1: Nhóm phụ gia thực phẩm theo chức năng

TT	Nhóm	Mục đích sử dụng	Số chất trong nhóm và các chất điển hình
1.	Chất điều chỉnh độ acid hay độ chua	Dùng để duy trì hay làm trung hòa độ chua của thực phẩm	41 chất như: kaliacetat, axit citric, acid orthophosphoric...
2.	Các chất điều vị	Dùng để làm tăng hay cải thiện vị của thực phẩm	8 chất như: acid glutamic, mononatri glutamate, acid guanilic, acid inosinic...
3.	Các chất ổn định	Dùng để làm ổn định hệ phân tán, đồng nhất của sản phẩm	13 chất như: polivinylpyrrolidon, Canxi cacbonat, kali clorua...
4.	Các chất bảo quản	Dùng để cản trở sự phát triển của vi khuẩn, làm chậm hay ngừng quá trình lên men, acid hóa hay hư hại của thực phẩm	29 chất như: acid sorbic, Natri sorbAt, sunfuadioxid, kali bisunfit...
5.	Các chất chống đông vón	Dùng để phòng sự chống vón và tạo sự đồng nhất cho sản phẩm thực phẩm	14 chất như: Trimagie Orthophosphate, các muối amoni xitrate...

6.	Các chất chống oxy hóa	Dùng để đề phòng hay cản trở sự oxy hóa trong sản phẩm thực phẩm	15 chất Acid ascorbic, Alpha tocopherol, TBHQ, BHA....
7.	Các chất chống tạo bọt	Dùng để làm mất khả năng tạo bọt trong thực phẩm	4 chất như: Propilen glycol, Polyethylene glycol, polyoxyetylen (20) Sorbitan, monooleat, Polydimetyl siloxan
8.	Các chất độn	Dùng để làm tăng khối lượng cho sản phẩm	3 chất như: Xenluloza vi tinh thể, sáp carnauba, Natri alginate.
9.	Các chất tạo ngọt	Dùng để tạo vị ngọt cho thực phẩm	7 chất gồm: Manitol, acesulfam kali, Sacarin,
10.	Các chế phẩm tinh bột	Dùng để làm tăng độ dày, độ đông đặc, độ ổn định và tăng khối lượng của thực phẩm	19 chất gồm: Dextrin, tinh bột rang trắng vàng, tinh bột đã được xử lý bằng xít...
11.	Các enzym	Dùng để xúc tác quá trình chuyển hóa trong chế biến thực phẩm	6 chất gồm: Amilaza các loại, proteaza, glucoza oxidaza,...
12.	Các chất đẩy khí	Dùng để đẩy không khí trong túi đựng các sản phẩm	2 chất gồm: khí nito và khí nito dioxide
13.	Các chất làm bóng	Dùng để làm bóng bề mặt sản phẩm	6 chất gồm: sáp ong, dầu khoáng dùng cho thực phẩm, sáp dầu,...
14.	Các chất làm dày	Dùng để làm chất độn, làm cho sản phẩm trở nên đặc hơn	20 chất gồm: acid alginic, carragennan,...
15.	Các chất làm ẩm	Dùng để tạo cho sản phẩm có độ ẩm theo ý muốn	2 chất gồm: glyxerol
16.	Các chất làm rắn chắc	Dùng để làm tăng tính rắn chắc, tránh sự vỡ nát của thực phẩm	8 chất gồm: canxi citrate, canxi clorua, canxi sulphat...
17.	Các chất nhũ hóa	Dùng để tạo ra hệ phân tán đồng nhất của sản phẩm	24 chất gồm: Mono và diglycerit của các acid béo, este của glycerol với axit lactic....
18.	Các loại phẩm màu	Dùng để tạo ra hoặc cải thiện màu sắc cho sản phẩm	24 phẩm màu tổng hợp và 11 phẩm màu tự nhiên như: vàng curcumin, vàng tartrazin, vàng quinolin, nâu HT.....

19.	Các chất tạo phức kim loại hòa tan	Dùng để tạo phức hòa tan với các kim loại đa hóa trị, cải thiện chất lượng và tính vững chắc của thực phẩm	14 chất gồm: Isopropyl xitrat, canxi dinatri etylendiamin-tetra-axetat, natri polyphosphate, natri gluconate.....
20.	Các chất tạo xốp	Dùng để tạo xốp cho sản phẩm	Nhóm này gồm 2 chất: amoni cacbonate, natri cacbonate
21.	Chất xử lý bột	Dùng cải thiện chất lượng nướng hoặc màu cho thực phẩm	Nhóm này chỉ có 1 chất: azodicacbonamit
22.	Các chất tạo hương thơm cho thực phẩm	Dùng để tạo mùi thơm cho các sản phẩm thực phẩm	Nhóm này gồm 60 chất bao gồm hương tự nhiên và hương tổng hợp

1.3. Yêu cầu về sử dụng phụ gia thực phẩm

Theo điều 17, Nghị quyết số 51/2001/QH10 của Luật an toàn thực phẩm là:

- Đáp ứng quy chuẩn kỹ thuật tương ứng, tuân thủ theo quy định về phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến thực phẩm
- Có hướng dẫn sử dụng ghi trên nhãn hoặc tài liệu đính kèm trong mỗi đơn vị sản phẩm bằng tiếng việt và ngôn ngữ khác theo xuất xứ sản phẩm
- Thuộc Danh mục phụ gia thực phẩm được phép sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thực phẩm do bộ trưởng bộ y tế quy định
- Đăng ký bản công bố hợp quy với cơ quan nhà nước có thẩm quyền trước khi lưu thông trên thị trường

1.4. Các quy chuẩn xác định

Một số quy chuẩn kỹ thuật được bộ y tế ban hành cho từng loại phụ gia thực phẩm và yêu cầu kỹ thuật cho từng chất phụ gia thực phẩm. Phạm vi áp dụng của các quy chuẩn là các tổ chức, cá nhân nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các phụ gia thực phẩm và cơ quan nhà nước có liên quan. Có thể kể đến các Quy chuẩn Việt Nam sau:

- QCVN 4-1/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất điều vị
- QCVN 4-2/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất làm ẩm
- QCVN 4-3/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất tạo xốp
- QCVN 4-4/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất chống đóng vón
- QCVN 4-5/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất giữ màu
- QCVN 4-6/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất chống oxy hóa
- QCVN 4-7/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất chống tạo bọt

- QCVN 4-8/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất ngọt tổng hợp
 - QCVN 4-9/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất làm rắn
 - QCVN 4-10/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – phẩm màu
 - QCVN 4-11/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất điều chỉnh độ acid
 - QCVN 4-12/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất bảo quản
 - QCVN 4-13/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất ổn định
 - QCVN 4-14/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất tạo phức kim loại
 - QCVN 4-15/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất xử lý bột
 - QCVN 4-16/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất độn
 - QCVN 4-17/2010: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất khí đẩy
 - QCVN 4-18/2011: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chế phẩm tinh bột
 - QCVN 4-19/2011: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – Enzym
 - QCVN 4-20/2011: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất làm bóng
 - QCVN 4-21/2011: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất làm dày
 - QCVN 4-22/2011: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất nhũ hóa
 - QCVN 4-23/2011: Quy chuẩn Quốc Gia về phụ gia thực phẩm – chất tạo bọt
- Các quy chuẩn này đưa ra các yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với từng chất phụ gia cụ thể.

1.5. Mục đích của phân tích phụ gia thực phẩm là:

- Phụ gia thực phẩm có nằm trong danh mục cho phép
- Đánh giá chất lượng phụ gia thực phẩm
- Phát hiện sử dụng phụ gia thực phẩm ngoài danh mục hoặc các loại hóa chất cấm sử dụng trong thực phẩm
- Lượng phụ gia thực phẩm cho phép sử dụng trong thực phẩm

Tuy nhiên khi phân tích phụ gia thực phẩm thì có một số thuận lợi và khó khăn như:

1.5.1. Thuận lợi

- Hầu hết các chất phụ gia thực phẩm đều có các quy chuẩn đã đưa ra các phương pháp phân tích, nên phòng thí nghiệm chỉ cần chứng minh phòng thí nghiệm có đủ năng lực, đủ điều kiện đáp ứng để bảo đảm kết quả phân tích chính xác.

- Bên cạnh đó tiêu chuẩn JECFA monograph 1-Vol. 4: cũng đưa ra các yêu cầu đối với phụ gia thực phẩm, các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm cho các chất phụ gia thực phẩm cũng được sử dụng trong phân tích phụ gia thực phẩm.
- Các phương pháp phân tích phụ gia thực phẩm chủ yếu sử dụng trong các quy chuẩn này hầu hết là: Các kỹ thuật phân tích cổ điển như: kỹ thuật chuẩn độ, kỹ thuật trọng lượng, kỹ thuật so màu và quang phổ hấp thụ nguyên tử nên hầu hết các phòng thí nghiệm có thể tiến hành kiểm tra được.

1.5.2. Khó khăn

- Theo quy chuẩn kỹ thuật yêu cầu cho từng loại phụ gia thực phẩm thì kiểm tra nhiều thông số, do đó một phòng thí nghiệm hầu như chưa đủ hóa chất, thiết bị để đáp ứng phân tích đầy đủ các thông số theo quy chuẩn yêu cầu.
- Phân tích độ tinh khiết của phụ gia là phân tích đa lượng nên yêu cầu độ chính xác cao → yêu cầu người thực hiện phân tích phải thành thạo và kinh nghiệm
- Cùng một nhóm phụ gia có các chất phụ gia rất giống nhau về tính chất, nếu người sử dụng phối trộn hai chất có cùng tính chất vào, khi phân tích theo đúng quy trình trong quy chuẩn yêu cầu thì kết quả có thể bị lạc.

2. MỘT SỐ QUY TRÌNH PHÂN TÍCH PHỤ GIA THỰC PHẨM TẠI PTN CÔNG TY CP DV KHCN SẮC KÝ HẢI ĐĂNG

Các thông số thông thường kiểm tra chất lượng cho một loại phụ gia thực phẩm theo quy chuẩn kỹ thuật:

Ví dụ: Giới thiệu về yêu cầu về kỹ thuật và phương pháp thử cho một loại phụ gia thực phẩm cụ thể theo Quy chuẩn Việt Nam.

PHỤ LỤC 1

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI KALI ACETAT

1. Tên khác, chỉ số	INS 261 ← mã số quốc tế của PGTP (Codex) ADI không giới hạn. ← lượng cho phép mg/kg trọng lượng cơ thể, ngày
2. Định nghĩa	
<i>Tên hóa học</i>	Kali acetat
<i>Mã số C.A.S.</i>	127-08-2
<i>Công thức hóa học</i>	C ₂ H ₃ KO ₂
<i>Công thức cấu tạo</i>	CH ₃ -COOK
<i>Khối lượng phân tử</i>	98,14
3. CẢM QUAN	Tinh thể tan, không màu hoặc bột tinh thể màu trắng, không mùi hoặc hơi có mùi acetic
4. Chức năng	Chất điều chỉnh độ acid, chất đệm, chất bảo quản chống vi sinh vật.

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

<i>Độ tan</i>	Rất dễ tan trong nước, dễ tan trong ethanol.
<i>pH</i>	7,5 – 9,0 (dung dịch 1 trong 20).
<i>Kali</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của kali
<i>Acetat</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của acetat

5.2. ĐỘ TINH KHIẾT

<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 8,0% (Sấy tại 150 °C trong 2h)
<i>Tính kiềm</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử).
<i>Natri</i>	Âm tính.
<i>Chì</i>	Không được quá 2 mg/kg.

5.3. Hàm lượng $\text{CH}_3\text{-COOK}$ Không được thấp hơn 98,0% sau khi sấy khô

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

<i>Tính kiềm</i>	Hoà tan 1 g mẫu thử trong 20 ml nước đun sôi để nguội vừa chuẩn bị, thêm 3 giọt dung dịch phenolphthalein (TS). Nếu dung dịch có màu hồng thì làm mất màu bằng cách cho thêm dung dịch acid hydrocloric 0,1N, lượng acid hydrocloric 0,1 N sử dụng không được quá 0,5 ml.
<i>Chì</i>	Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol. 4. Xác định bằng kỹ thuật hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol. 4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.2. ĐỊNH LƯỢNG

Cân 200mg mẫu thử đã được làm khô trước, chính xác đến mg, hoà tan trong 25 ml dung dịch acid acetic băng. Cho thêm 2 giọt dung dịch tím tinh thể (TS) và chuẩn độ với dung dịch acid percloric 0,1 N trong acid acetic băng. Tiến hành xác định mẫu trắng và hiệu chuẩn kết quả chuẩn độ nếu cần.
Mỗi ml dung dịch acid percloric 0,1N tương đương với 9,814mg $\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$.

2.1. Thực hiện kiểm tra phân tích tại Công ty CPDV KHCN Sắc Ký Hải Đăng

2.1.1. Kiểm tra cảm quan: Để kiểm tra chỉ tiêu cảm quan của các chất phụ gia thực phẩm, Công ty tiến hành thành lập hội đồng cảm quan với các chuyên gia đầu ngành trong lĩnh vực phân tích, hội đồng sẽ đánh giá và đưa ra kết luận

2.1.2. Kiểm tra định tính

Kiểm tra xem sự có mặt của cation hoặc anion vô cơ là thành phần của PGTP theo các phương pháp hóa học cổ điển, so màu, kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử, hoặc kỹ thuật sắc ký hiện đại

2.1.3. Kiểm tra độ tinh khiết

Thường kiểm tra các thông số sau:

- Chất bay hơi khi sấy
- Tổng hàm lượng tro
- As

- Pb
- Kim loại nặng

2.1.4. Định lượng chất phụ gia thực phẩm

2.1.5. XÁC ĐỊNH As, Pb, Hg, Se, KIM LOẠI NẶNG TRONG PGTP BẰNG PP QUANG PHỔ HẤP THU NGUYÊN TỬ

2.1.5.1. Nguyên tắc chung:

Các kim loại trong PGTP được chuyển sang dạng tự do:

- PGTP bản chất vô cơ: hòa tan bằng axit HCl, NH_4OH
- PGTP bản chất hữu cơ: vô cơ hóa bằng PP khô (t° cao) hoặc hỗn hợp axit có tính oxy hóa mạnh

2.1.5.2. Loại trừ các yếu tố ảnh hưởng nền hoặc tính hiệu đo

As, Se được chuyển sang dạng khí AsH_3 và SeH_2 trong hệ tạo hydrua và phân hủy thành hơi nguyên tử As, Se bằng nhiệt độ cao

Hg nguyên tử được khử từ Hg^{2+}

Pb được nguyên tử hóa bằng lò nhiệt điện

2.1.5.3. Nguyên tắc của kỹ thuật AAS

Các nguyên tố xác định được chuyển sang trạng thái hơi nguyên tử. Ở trạng thái này các nguyên tố xác định hấp thụ một cách chọn lọc bức xạ đặc trưng. Độ giảm cường độ của bức xạ đặc trưng tỉ lệ với nồng độ hơi nguyên tử của nguyên tố xác định tại vị trí bức xạ đi qua.



Dựa vào độ hấp thụ của dãy chuẩn ta biết được nồng độ của nguyên tố cần xác định.

Biểu diễn sự phụ thuộc Abs theo C:

Cách xác định:

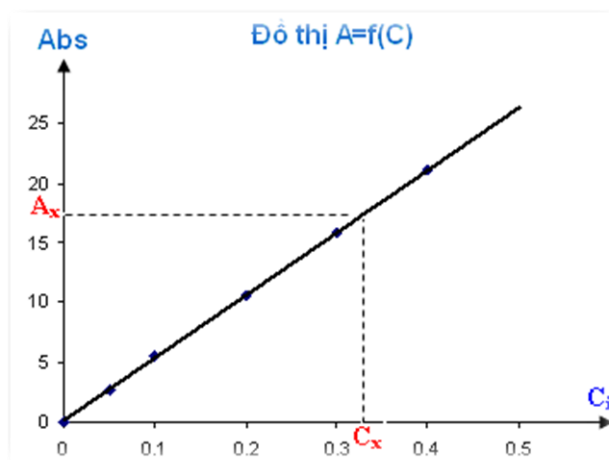
- Đọc trên đồ thị
- Giải theo phương trình hồi quy:

$y = bx + a$ trong đó: $y = \text{Abs}$; $x = C$

Kết quả phân tích:

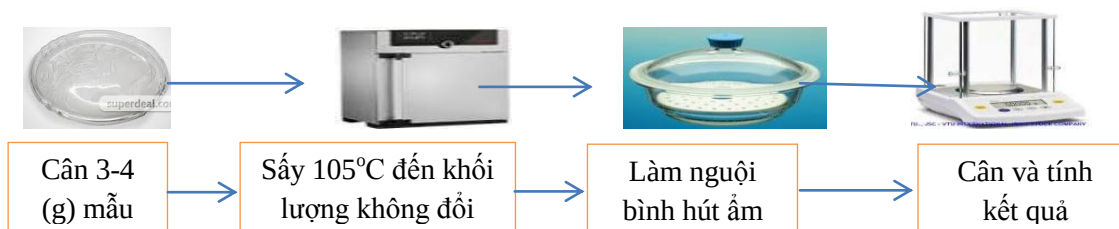
Hàm lượng kim loại (X) có trong mẫu:

$$X(\text{mg/kg}) = \frac{C_o * V}{W_s} * f$$



2.1.6. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẤY Ở 105°C

Quy trình thực hiện: Mẫu cho vào cốc đã biết trước khối lượng, sấy ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi, thành phần hao hụt chính là ẩm.



Ưu điểm nhanh, đơn giản dễ thực hiện nhưng phụ gia thực phẩm chứa các chất có nhiệt độ sôi nhỏ hơn nước sẽ bị bay hơi theo → kết quả sẽ cao hơn thực tế.

2.1.7. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG MỘT SỐ PHỤ GIA THỰC PHẨM LÀ CHẤT BẢO QUẢN VÔ CƠ

2.1.7.1. XÁC ĐỊNH SULPHUR DIOXIDE

- Sulphur dioxide (SO_2) sử dụng dạng khí (SO_2), dung dịch (H_2SO_3) hoặc Na_2SO_3 (K, Ca) → tính kết quả SO_2
- Chức năng: chất bảo quản làm giảm quá trình phát triển nấm men, nấm mốc, vi khuẩn hiếu khí, chống sự chuyển màu nâu của rau quả do các phản ứng enzyme
- Giới hạn sử dụng trong thực phẩm USA 10-20 mg/kg, Việt nam < 50 mg/kg

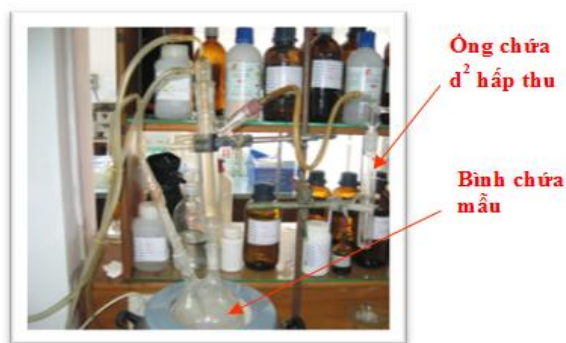
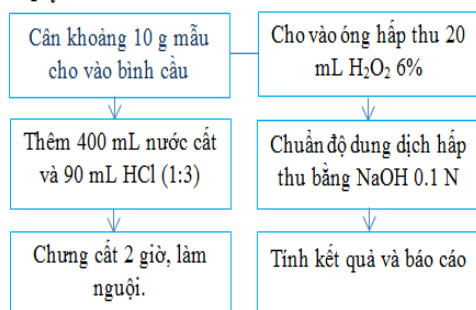
❖ Định tính

- Làm mất màu Malachite green, p-rosaniline
- Zn tác dụng với SO_2 trong môi trường acid tạo thành H_2S (khí) sinh ra kết tủa màu đen với $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

❖ Định lượng

- Nhóm 1: Chuẩn độ, cực phổ, điện hóa, so màu
- Nhóm 2: Chưng cất trong môi trường khí trơ, hấp thu SO_2 trong dung dịch có chất oxy hóa (H_2O_2) sau đó xác định xác định bằng phương pháp chuẩn độ hoặc trọng lượng.

Quy trình tham khảo sau:



2.1.7.2. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG Nitrat và Nitrit (NO_3^- , NO_2^-)

- Hạn chế phát triển vi khuẩn
- Màu và vị
- Chiết tách khỏi mẫu bằng nước nóng

❖ Xác định bằng phương pháp so màu

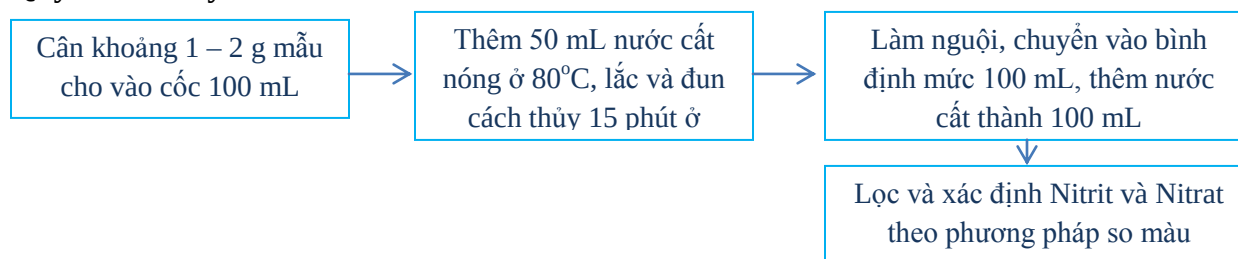
Nitrit + A.Sunfanilic $\rightarrow$ A.Sulfanilic
diazonium + α -naphthylamin $\rightarrow$ α -
naphthylamin azobenzen sunfonic màu hồng
đỏ $\lambda_{\text{max}} 520\text{nm}$

Xác định Nitrat khử về Nitrit bằng Cd rồi
xác định giống Nitrit.



Thiết bị quang phổ hấp thụ phân tử

Quy trình xử lý mẫu tham khảo



2.1.7.3. Định lượng các chất phụ gia bằng phương pháp chuẩn độ với dung môi không nước

Chuẩn độ với acid – bazo là một trong những kỹ thuật cơ bản và quen thuộc đối với tất cả kiểm nghiệm viên trong phòng thí nghiệm, tuy nhiên hầu hết các phép chuẩn độ này đều được thực hiện trong môi trường dung môi là nước. Trong dung môi là nước có ưu điểm là dễ thực hiện, nhưng trong môi trường nước thì không thể chuẩn độ được các acid yếu và bazo yếu (có hằng số phân ly nhỏ hơn 10^{-8}) bởi vì phản ứng xảy ra không hoàn toàn và rất khó xác định điểm cuối. Nhưng có thể chuẩn độ nhiều hợp chất là acid yếu hoặc bazo yếu trong dung môi không nước, bởi vì các dung môi này có thể làm tăng tính acid hoặc tính bazo của các hợp chất cần xác định.

Lĩnh vực phân tích phụ gia thực phẩm thực hiện xác định rất nhiều các hợp chất là acid yếu hoặc bazo yếu bằng phương pháp chuẩn độ acid bazo, để xác định được các hợp chất này thì hầu hết các tiêu chuẩn đều đưa ra quy trình thực hiện chuẩn độ trên một dung môi không phải là nước, trong phần này xin đưa ra ví dụ để minh họa cho kỹ thuật chuẩn độ này.

Quy trình thử xác định hàm lượng KALI ACETAT

Như đã biết Kaliacetat là phụ gia thực phẩm thuộc nhóm chất điều chỉnh độ acid, nó có nhóm CH_3COO^- có tính kiềm, trong môi trường nước thì nhóm này có hằng số phân ly là $\text{pK}_b = 10^{-9.25}$, hằng số phân ly nhỏ nên phản ứng chuẩn độ sẽ xảy ra không hoàn toàn nếu

chuẩn độ bằng acid mạnh trong môi trường nước. Tuy nhiên có thể chuẩn độ trong môi trường acid yếu theo quy trình sau:

Cân 200mg mẫu thử đã được làm khô trước, chính xác đến mg, hoà tan trong 25 ml dung dịch acid acetic băng. Cho thêm 2 giọt dung dịch tím tinh thể (TS) và chuẩn độ với dung dịch acid percloric 0,1 N trong acid acetic băng. Chuẩn độ đến khi dung dịch chuyển từ màu tím sang màu lục lam. Tiến hành xác định mẫu trắng và hiệu chuẩn kết quả chuẩn độ nếu cần.

Mỗi ml dung dịch acid percloric 0,1N tương đương với 9,814mg $C_2H_3KO_2$.



3. MỘT SỐ QUY TRÌNH PHÂN TÍCH PHỤ GIA TRONG MỘT SỐ NỀN MẪU THỰC PHẨM

3.1 ĐỊNH LƯỢNG 2,4-DIAMINOAZOBENZENE VÀ ORANGE II TRONG NỀN MẪU THỊT BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-UV

3.1.1. Hóa chất

Chuẩn tinh khiết: Orange II (độ tinh khiết 99,9 %) của hãng Dr. Ehrenstorfer
Chuẩn 2,4-diaminoazobenzene hydrochloride (độ tinh khiết > 99%) của hãng Sigma-Aldrich

Acetonitrile của hãng J.T.Baker dùng cho HPLC, $MgSO_4$, CH_3COONa , CH_3COOH , $HCOOH$, $HCOONa$ của Merck, hỗn hợp bột PSA (primary secondary amine) và C18 của hãng Agilent để thực hiện giai đoạn clean-up trong kỹ thuật chuẩn bị mẫu theo QuEChERS.

3.1.2. Chuẩn trung gian và dung dịch chuẩn làm việc

Chuẩn gốc đơn của từng chất Orange II, DAB có nồng độ 1000 mg/L trong acetonitrile.

Chuẩn hỗn hợp trung gian của Orange II, DAB có nồng độ 50, 100, 200 mg/L được pha loãng từ chuẩn gốc.

Hỗn hợp chuẩn làm việc được xây dựng với nồng độ 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 mg/L.

3.1.3. Quy trình xử lý mẫu

Phương pháp QuEChERS theo AOAC 2007.01 được tham khảo. Cân khoảng 5 g mẫu đã được đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL. Mẫu được chiết trong giai đoạn một với 15mL dung

dịch 1 % acid acetic trong acetonitrile + hỗn hợp muối (MgSO_4 : 6 g + CH_3COONa : 1,5 g), lắc trong 2 phút, ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. chuyển toàn bộ dung dịch thu được qua ống ly tâm khác có chứa 0,15 g PSA và 0,15 g C18, lắc trong 1 phút, ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 5mL lớp dung dịch phía trên cô quay và định mức lại bằng 1 mL acetonitrile. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , cho vào lọ thủy tinh 1,5 ml và tiêm vào máy HPLC-UV.

3.1.4. Điều kiện HPLC-UV

Thiết bị HPLC-UV 20AD SHIMAZU được sử dụng để phân tích đồng thời DAB và Orange II.

Điều kiện cho HPLC-UV:

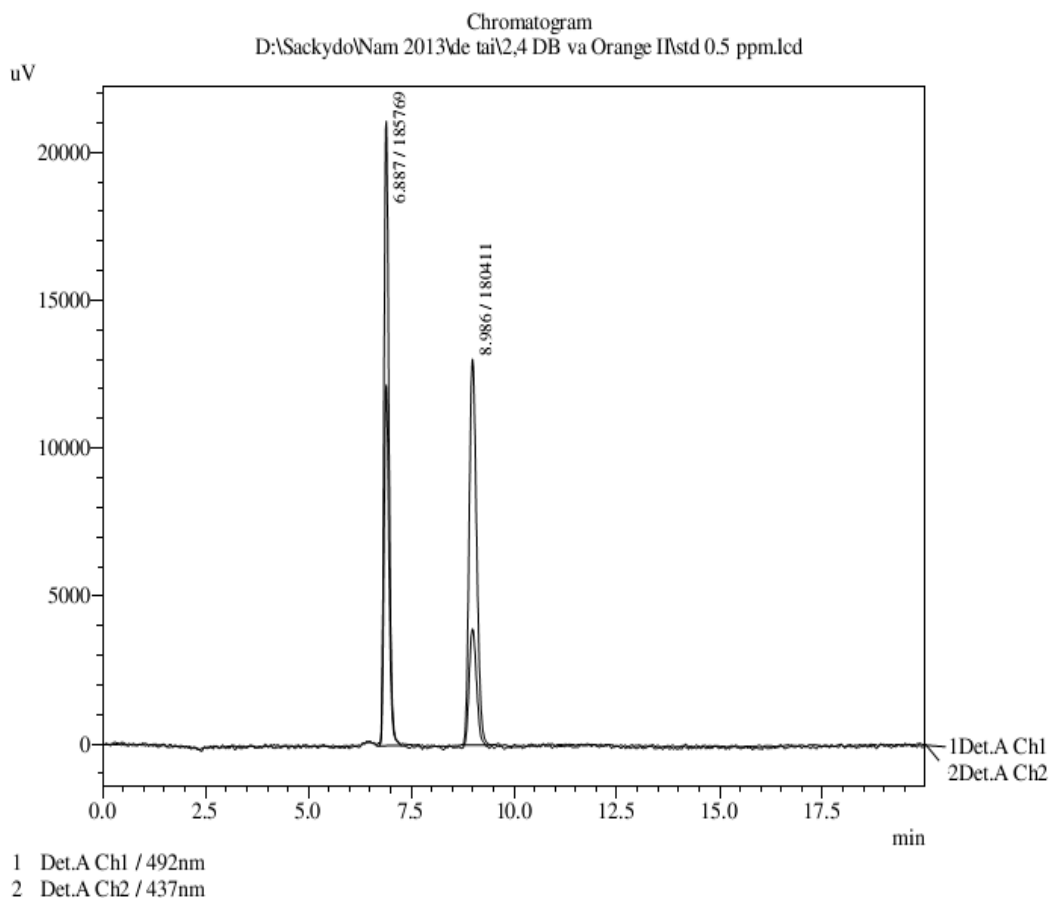
- Cột phân tích: GL Sciences Inc C18 (250 mm $\times$ 2,1 mm, 4,6 μm)
- Pha động : A:B (20:80) (A là Acetonitrile, B là dung dịch đệm sodium acetate pH = 4,8)
- Tốc độ dòng : 0,3 ml/phút; chế độ đẳng dòng
- Thể tích tiêm: 10 μL
- Bước sóng: $\lambda_{\text{Orange II}} = 492 \text{ nm}$ $\lambda_{2,4\text{-diaminoazobenzen}} = 437 \text{ nm}$

3.1.5 Đường chuẩn

Chuẩn dùng xây dựng đường chuẩn có nồng độ 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10, 20 mg/L . Đường chuẩn thể hiện diện tích của tính hiệu phân tích theo nồng độ chuẩn. Kết quả đường chuẩn với hệ số tương quan R^2 từ 0.9991 $\rightarrow$ 1 của Orange II và DAB được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Phương trình đường chuẩn và hệ số tương quan của Orange II và 2,4-diaminoazobenzene

Hợp chất	Khoảng nồng độ làm việc	Đường chuẩn	Hệ số tương quan (R^2)
Orange II	0 $\rightarrow$ 1,0 mg/L	$Y = 406763x - 271.44$	0,9999
2,4-diaminozabenzene	0 $\rightarrow$ 1,0 mg/L	$Y = 4109696x - 1586.8$	1
Orange II	1 $\rightarrow$ 20 mg/L	$y = 413961x - 12529$	1
2,4-diaminozabenzene	1 $\rightarrow$ 20 mg/L	$Y = 437899x - 24054$	1



Hình 1. Chuẩn hỗn hợp Orange II và 2,4-diaminoazobenzene ở nồng độ 0.5 mg/L

Giới hạn phát hiện của DAB, Orange II trên nền mẫu da gà, thịt xá xiu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. LOD của Orange II và 2,4-diaminoazobenzene trên nền mẫu da gà và nền mẫu thịt quay

Nền mẫu	Hợp chất	C (mg/Kg)*	S/N	LOD (mg/Kg)
Da gà	Orange II	0,230	15,5	0,045
	2,4-diaminoazobenzene	0,224	14,5	0,046
Thịt quay	Orange II	0,230	16,3	0,042
	2,4-diaminoazobenzene	0,224	15,2	0,044

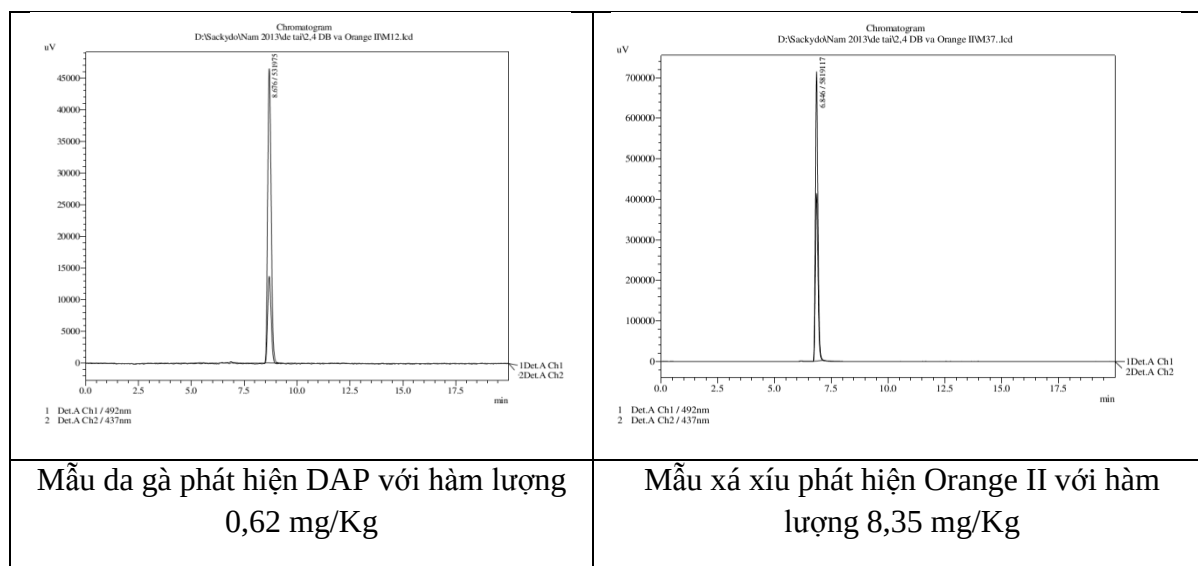
* Đã hiệu chỉnh với độ tinh khiết đã cho và dựa trên khối lượng mẫu đã cân

3.1.6 Một số kết quả phân tích trên các nền mẫu

Kết quả phân tích một số mẫu thịt gà, xá xíu, heo quay, thịt vịt, bột gia vị, thực phẩm đã qua chế biến...được lấy ở các chợ và siêu thị trong thành phố Hồ Chí Minh. Orange II và 2,4-diaminoazobenzene phát hiện với nồng độ được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích Orange II và 2,4-diaminoazobenzene của một số mẫu có phát hiện

Hợp chất	Số mẫu phân tích (mẫu)	Số mẫu phát hiện (mẫu)	% mẫu nhiễm (%)	Khoảng nồng độ mẫu bị nhiễm (mg/kg)
Orange II	99	9 (5 mẫu xá xíu, 4 mẫu thịt quay)	9,09	0,4 - 10
2,4-diaminoazobenzene	101	19 (17 mẫu gà, 2 mẫu vịt)	18,81	0,1 – 3,0



Hình 2: Kết quả phân tích Orange II và 2,4-diaminoazobenzene

3.2. ĐỊNH LƯỢNG CYCLAMAT BẰNG SẮC KÝ ION

3.2.1. Hóa chất

Natri cyclamat của Supelco (độ tinh khiết 99,9%) hoặc tương đương

Acid sulfuric đậm đặc (H_2SO_4) của Merck (Độ tinh khiết 95-97%) hoặc tương đương

Sodium Carbonate (Na_2CO_3) của Merck (độ tinh khiết 99,9%)

Nước cất hai lần

3.2.2. Chuẩn trung gian và dung dịch chuẩn làm việc

Chuẩn cyclamat 1000 mg/l: cân 0,11292 g Natri cyclamat hòa tan trong 100 ml bằng nước cất hai lần.

3.2.2.1. Chuẩn thứ cấp và chuẩn làm việc

Chuẩn thứ cấp 100 mg/l: lấy 10 ml chuẩn gốc vào bình định mức 100 ml và định mức bằng nước cất hai lần.

Chuẩn làm việc 0,5, 1, 2, 5 mg/l: lấy lần lượt 0,5, 1, 2, 5 ml chuẩn thứ cấp vào bình định mức 100 ml và định mức tới vạch bằng nước cất hai lần.

Chuẩn làm việc 10, 20, 50 mg/l: lấy lần lượt 1, 2, 5 ml chuẩn gốc vào bình định mức 100 ml và định mức tới vạch bằng nước cất hai lần.

3.2.2.2. Dung dịch sử dụng cho suppressor

Kênh acid gồm acid sulfuric 0.1 mol/l: lấy 5,6 ml acid sulfuric đậm đặc vào 1 lít nước cất hai lần.

Kênh nước: nước cất hai lần.

3.2.2.3. Pha động

Dung dịch Na_2CO_3 3,6 mmol/l: cân 763 mg Na_2CO_3 định mức thành 2 lít bằng nước cất hai lần.

3.2.3. Xử lý mẫu

Bước 1: Cân 0,5 g mẫu đã được đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml.

Bước 2: Cho tiếp 10 ml dung dịch acetonitrile:nước (2:8) vào ống ly tâm trên. Lắc 1 phút, siêu âm 10 phút.

Bước 3: ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút.

Bước 4: Chiết phần dịch trong bên trên cho vào bình định mức 50 ml.

Tiến hành chiết thêm hai lần như trên (bước 2, bước 3, bước 4) và cho vào bình định mức 50 ml trên. Định mức tới vạch bằng nước cất hai lần.

Cột C18 được hoạt hóa bằng 10 ml acetonitril.

Bước 5: Cho mẫu qua cột đã được hoạt hóa, bỏ 3 ml dịch chiết đầu qua cột. Thu lấy 5 ml dịch chiết tiếp theo. Lọc dịch chiết qua đầu lọc 0,22 μm và tiêm vào máy IC.

2.4.4. Điều kiện IC xác định cyclamat

- Column	Metrosep A Supp 7 250/4,0
- Injection Volume	20 μl
- Flow	0,7 ml/phút
- Detector	conductivity
- Suppression	H_2SO_4 0,1 M
- Eluent	Na_2CO_3 3,6 mM

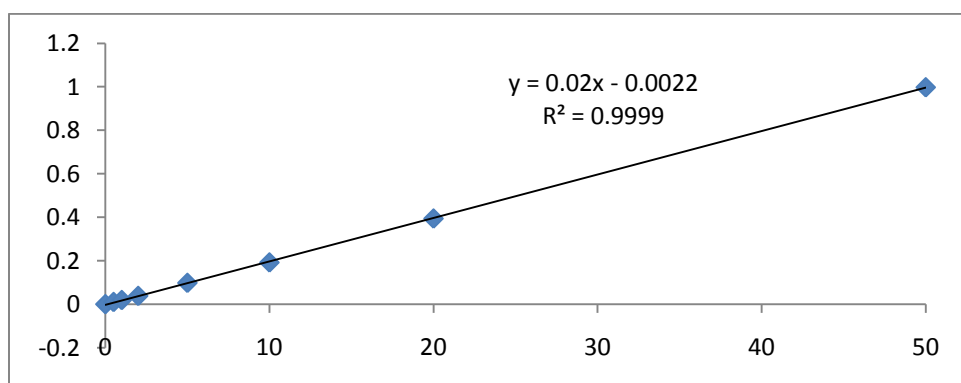
2.4.5. Đường chuẩn

Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa diện tích peak và nồng độ chất chuẩn.

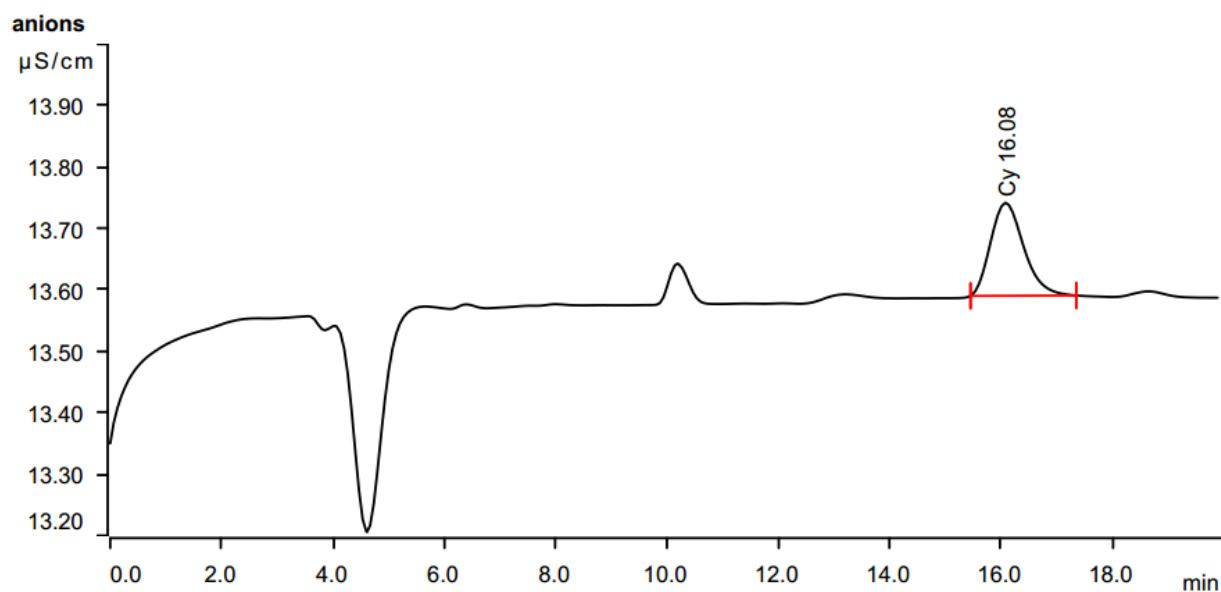
Khoảng tuyến tính của cyclamat tính từ LOD đến 50 mg/l.

Bảng 5: Diện tích dung dịch chuẩn 0,5 – 50mg/L

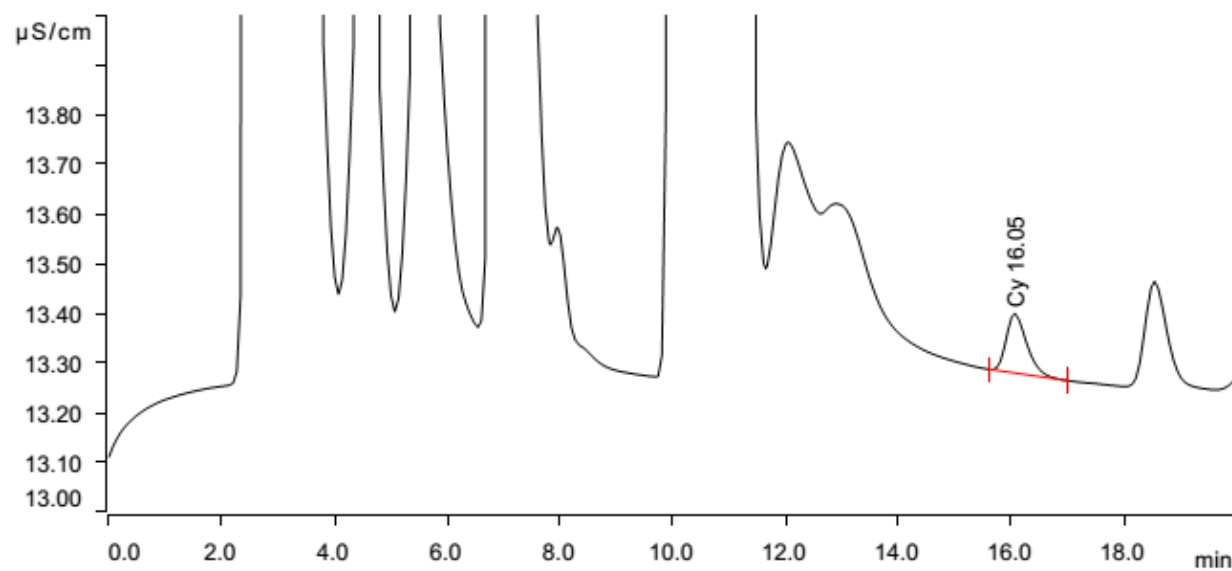
No.	Cyclamat	
	C, mg/L	Diện tích
0	0	0
1	0,50	0,010
2	1,00	0,019
3	2,00	0,038
4	5,00	0,098
5	10,00	0,192
6	20,00	0,394
7	50,00	0,998



Hình 3: Đường chuẩn Cyclamat nồng độ 0,5 – 50 mg/L



Hình 4: Sắc ký đồ chuẩn cyclamat



Peak number	Retention time	Area	Height	Concentration	Component name
	min	($\mu\text{S/cm}$) x min	$\mu\text{S/cm}$	ppm	
1	16.052	0.050	0.119	invalid	Cy

Hình 5: Mẫu cá cơm phát hiện cyclamat

3.3. ĐỊNH LƯỢNG ACESULFAME K VÀ SACCHARIN BẰNG SẮC KÝ LỒNG ĐẦU DÒ UV

3.3.1 Hóa chất

Acesulfame K (Acesulfame potassium 99,0%, Dr.Ehrenstorfer GmbH)

Saccharin (Acesulfame potassium 99,0%, Dr.Ehrenstorfer GmbH)

Muối K_2HPO_4 , $Zn(CH_3COO)_2$, Na_2HPO_4 , H_3PO_4 của Merck.

3.3.2 Chuẩn trung gian, dung dịch chuẩn làm việc và hóa chất xử lý mẫu

Dung dịch chuẩn gốc (1000 mg/l): Cân 10,0 mg chuẩn rắn định mức 10 ml bằng pha động.

Dung dịch chuẩn thứ cấp 1 (250 mg/l): Hút 2,5 ml dung dịch chuẩn gốc (1000 mg/l) vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng pha động.

Dung dịch chuẩn thứ cấp 2 (100 mg/l): Hút 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc (1000 mg/l) vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng pha động.

Dãy chuẩn làm việc có nồng độ 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 mg/l.

- ✓ Hút lần lượt 0,1 ml; 0,2 ml; 0,5 ml; 1ml; 2ml; 5 ml dung dịch chuẩn thứ cấp 2 (100 mg/l) vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng pha động ta được dãy chuẩn có nồng độ 1,0; 2,0; 5,0; 10; 20; 50 mg/l.
- ✓ Hút lần lượt 0,5 ml; 1ml dung dịch chuẩn làm việc (5 mg/l) vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng pha động ta được dãy chuẩn có nồng độ 0,25; 0,5 mg/l.

Muối $Zn(CH_3COO)_2$: Cách pha: cân 200 g muối $Zn(CH_3COO)_2$ cho vào bình thủy tinh, thêm nước cất để được 1000 g dung dịch $Zn(CH_3COO)_2$ 20%.

Dung dịch Na_2HPO_4 bão hòa: Cách pha: Hòa tan muối Na_2HPO_4 trong 1 lít nước cất cho đến khi dung dịch bão hòa.

Đệm phosphate pH= 3,4: Cách pha: cân 64,4 g muối K_2HPO_4 cho vào bình thủy tinh chứa khoảng 300 ml nước cất, hòa tan, cho thêm 26 ml H_3PO_4 và định mức thành 0,5 lít bằng nước cất. Pha loãng 50 lần khi sử dụng, kiểm tra lại pH sau khi pha.

3.3.3. Xử lý mẫu

Bước 1: Cân chính xác khoảng 5,0 g mẫu đã được đồng nhất vào ống 50 ml.

Bước 2: Thêm vào ống chứa các mẫu 30 ml nước cất, lắc đều, đánh siêu âm 10 phút, tiếp tục thêm 5 ml dung dịch $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 20% + 5 ml dung dịch Na_2HPO_4 bão hòa.

Bước 3: Lắc đều hỗn hợp khoảng 5 phút, ly tâm 10 phút, tốc độ 5000 vòng/phút.

Bước 4: Chuyển toàn bộ phần dung dịch vào bình định mức 100 ml.

Bước 5: Tiếp tục lặp lại các bước thí nghiệm trên lần 2.

Bước 6: Cuối cùng, định mức đến vạch 100 ml bằng nước cất.

Bước 7: Lọc mẫu qua màng lọc 0,45 μm thu dịch lọc cho vào vial (pha loãng nếu cần).

Bước 8: Tiến hành đo trên máy HPLC-UV.

3.3.4. Điều kiện HPLC-UV xác định Acesulfame K và Saccharin

Cột sắc ký: Cột sắc ký lỏng pha đảo Eclipse C_{18} (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) và cột bảo vệ hay tương đương.

Bước sóng: 220 nm

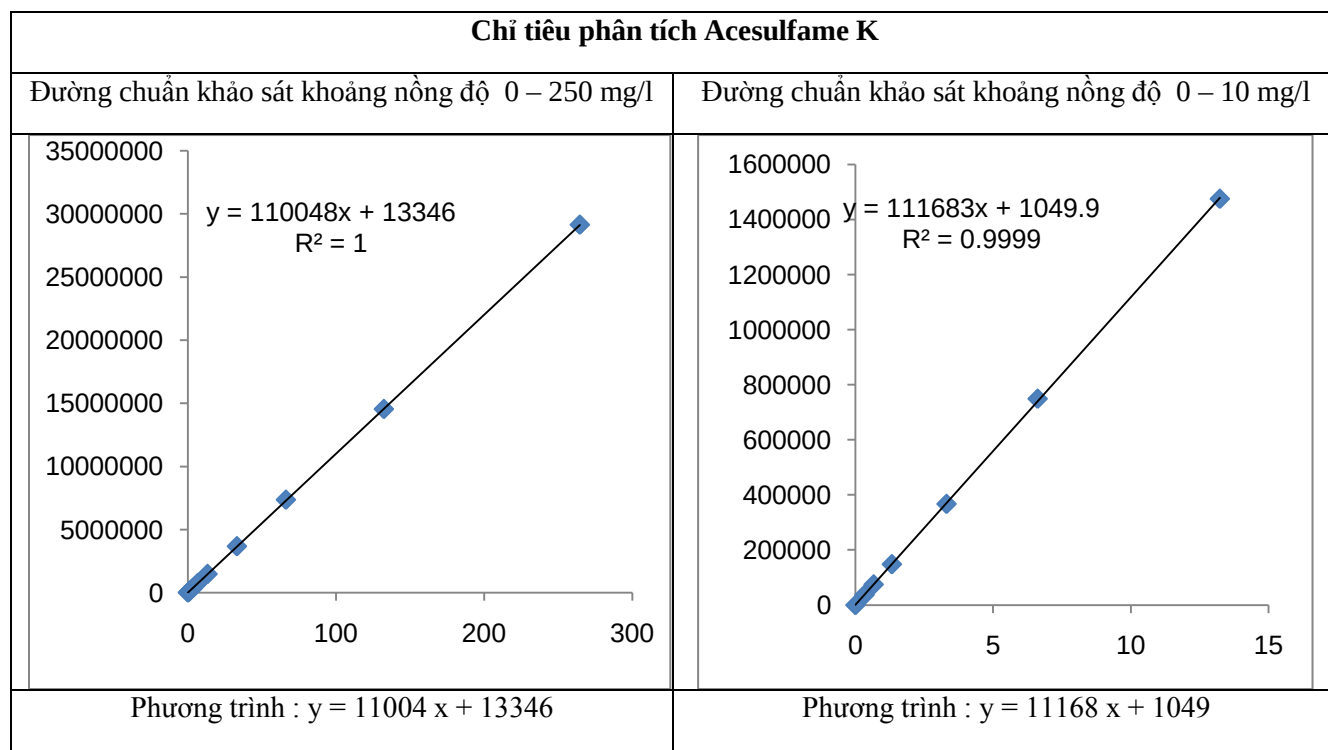
Pha động: ACN: dung dịch đệm phosphate pH = 3,4 (10:90).

Tốc độ dòng : 1,0 ml/min.

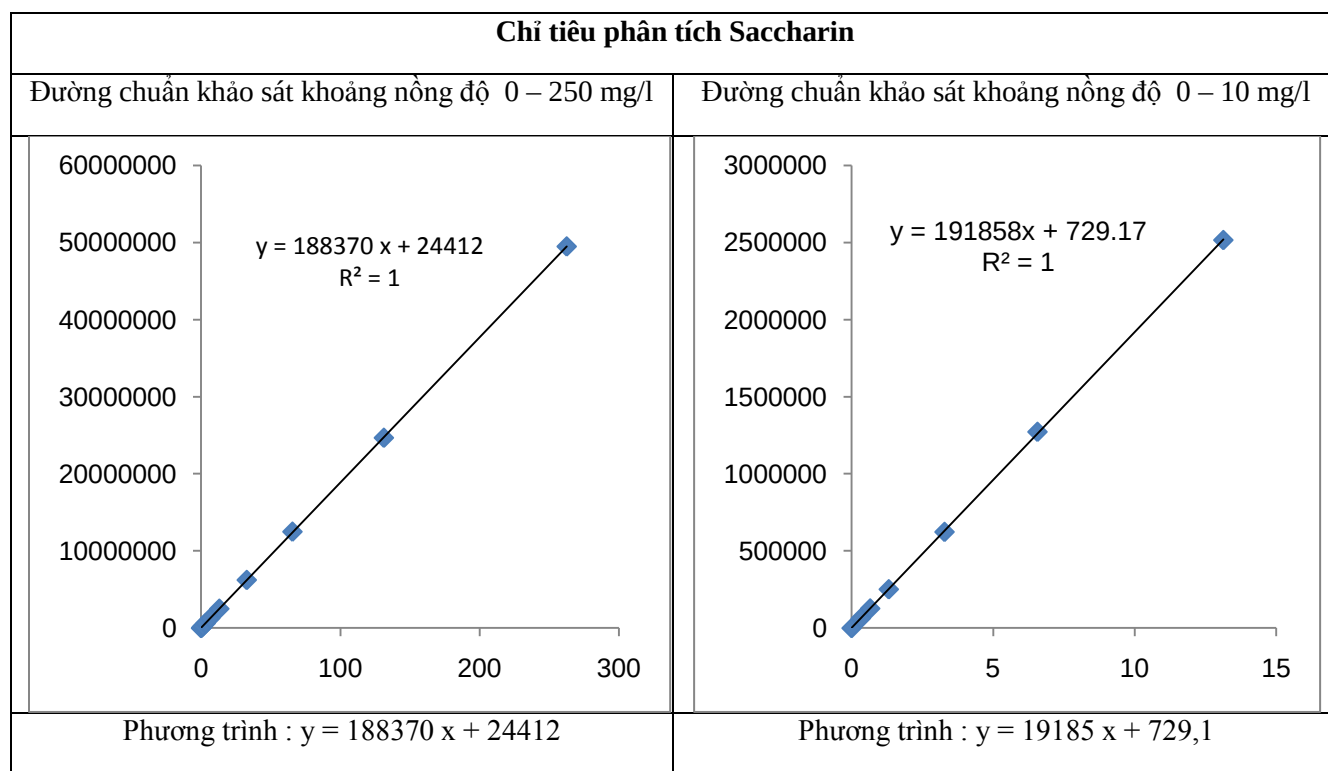
Thể tích tiêm: 10 μl .

3.3.5 Đường chuẩn

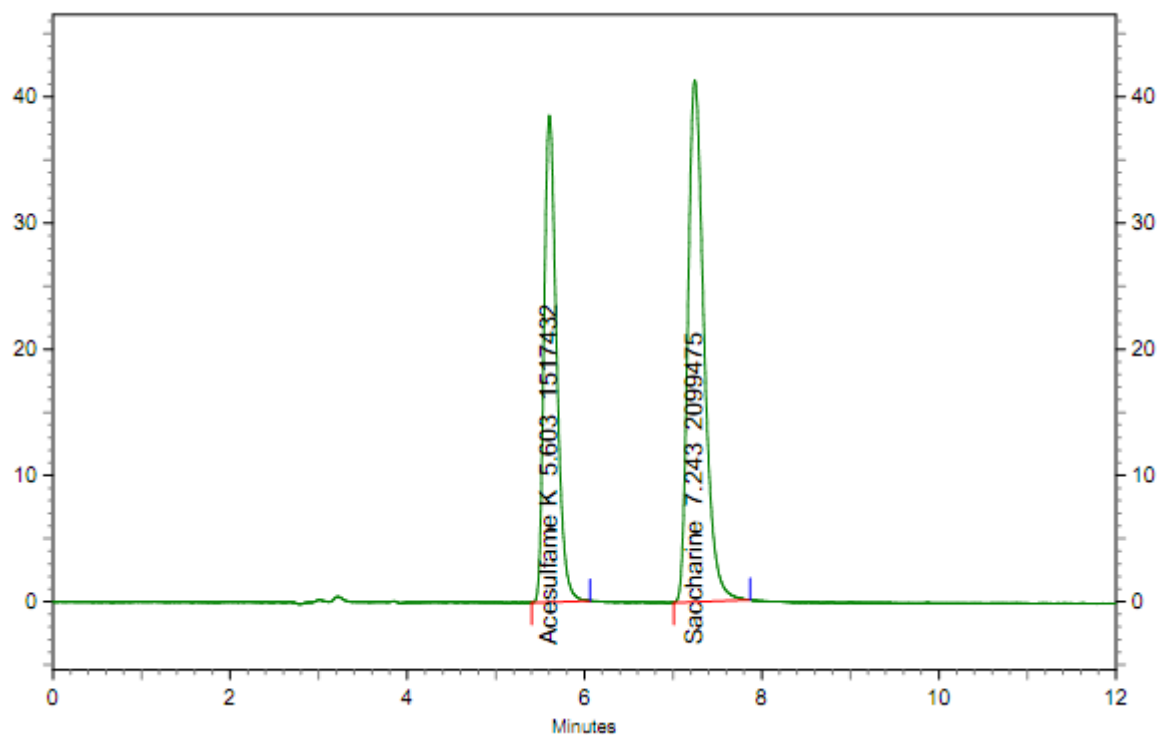
Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa diện tích peak và nồng độ chất chuẩn.



Hình 6: Đường chuẩn phân tích Acesulfame K



Hình 7: Đường chuẩn phân tích Saccharin



Hình 8: Sắc ký đồ Acesulfame K và Saccharine 10 mg/L

3.4. ĐỊNH LƯỢNG NATRI BENZOAT VÀ KALI SORBAT BẰN SẮC KÝ LỎNG ĐẦU DÒ UV

3.4.1. Hóa chất

Natri benzoat (99,5%, Dr.Ehrenstorfer GmbH)

Kali sorbat (99,5%, Dr.Ehrenstorfer GmbH)

Nước cất hai lần khử ion

Acetonitrile

Methanol

Acid Formic

3.4.2. Chuẩn trung gian và dung dịch chuẩn làm việc

Dung dịch chuẩn gốc (500 mg/l): Cân 5,0 mg chuẩn rắn định mức 10 ml bằng H₂O.

Dung dịch chuẩn thứ cấp 1 (100 mg/l): Hút 2 ml dung dịch chuẩn gốc định mức 10 ml bằng H₂O.

Dãy chuẩn làm việc có nồng độ 1,0 ; 2,0 ; 5,0 ; 10 ; 20 mg/l: Hút lần lượt 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1,0; 2,0; 5,0 ml dung dịch chuẩn thứ cấp 1 (100mg/l) cho vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng H₂O ta được dãy chuẩn có nồng độ 1; 2 ; 5 ; 10 ; 20 mg/l

3.4.3. Xử lý mẫu

Bước 1: Cân khoảng 5 g mẫu đã được đồng nhất vào ống 50 mL.

Bước 2: Thêm vào 1 ml HCl (1M) và 10 ml H₂O.

Bước 3: Vortex cho đều mẫu, đánh siêu âm 15 phút ở nhiệt độ phòng

Bước 4: Chiết mẫu bằng dung môi diethyl eter với 20 ml, vortex mẫu trong 5 phút.

Bước 5: Ly tâm 5 phút, 5000 vòng/phút

Bước 6: Tiến hành chiết mẫu thêm 2 lần, tương tự các bước bước 4 và bước 5 .

Bước 7: Toàn bộ dịch chiết sẽ được cô cạn. Lọc mẫu pha loãng qua màng lọc 13 mm, 0,45µm

Bước 8: Thu dịch lọc cho vào vial

Bước 9: Tiến hành đo trên máy HPLC-UV

3.4.4. Điều kiện HPLC-UV xác định natri benzoat và kali sorbat

Cột sắc ký lỏng pha đảo C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm) và cột bảo vệ hay tương đương.

Bước sóng: Natri benzoat (225 nm) Kali sorbat (250 nm).

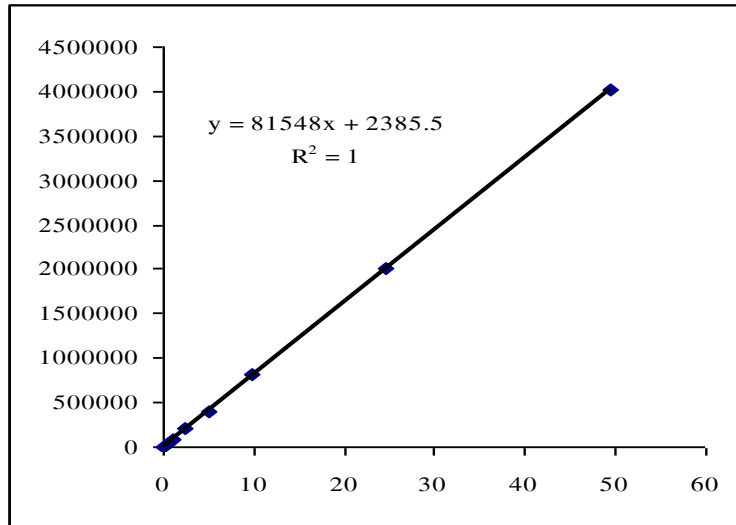
Pha động: 15: 85 (ACN : dung dịch đệm format pH = 4,3)

Tốc độ dòng: 0,8 ml/min

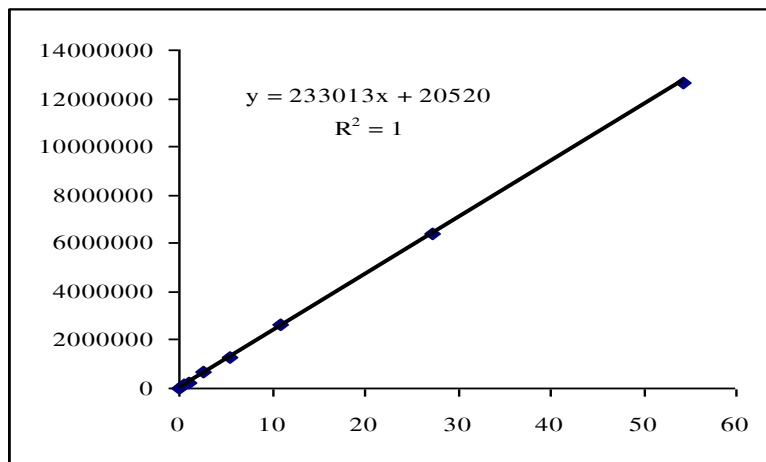
Thể tích tiêm: 20 µl

3.4.5 Đường chuẩn

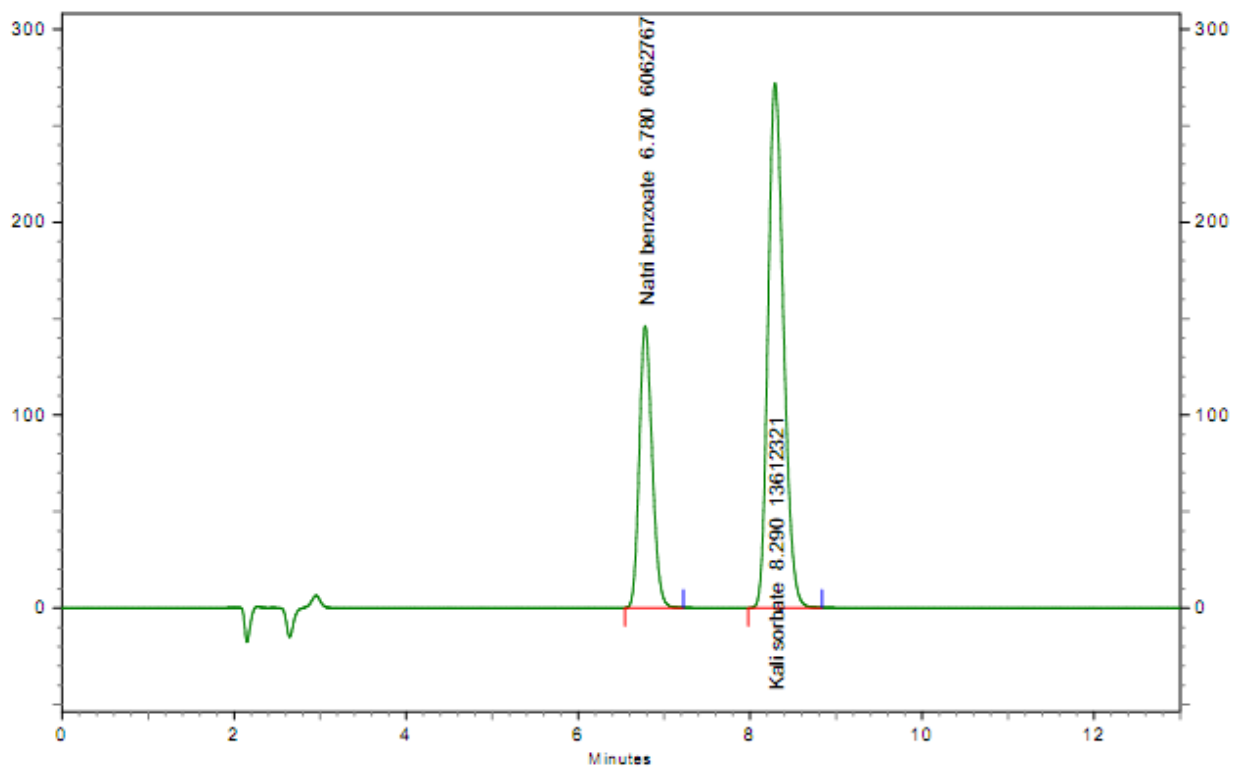
Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa diện tích peak và nồng độ chất chuẩn.



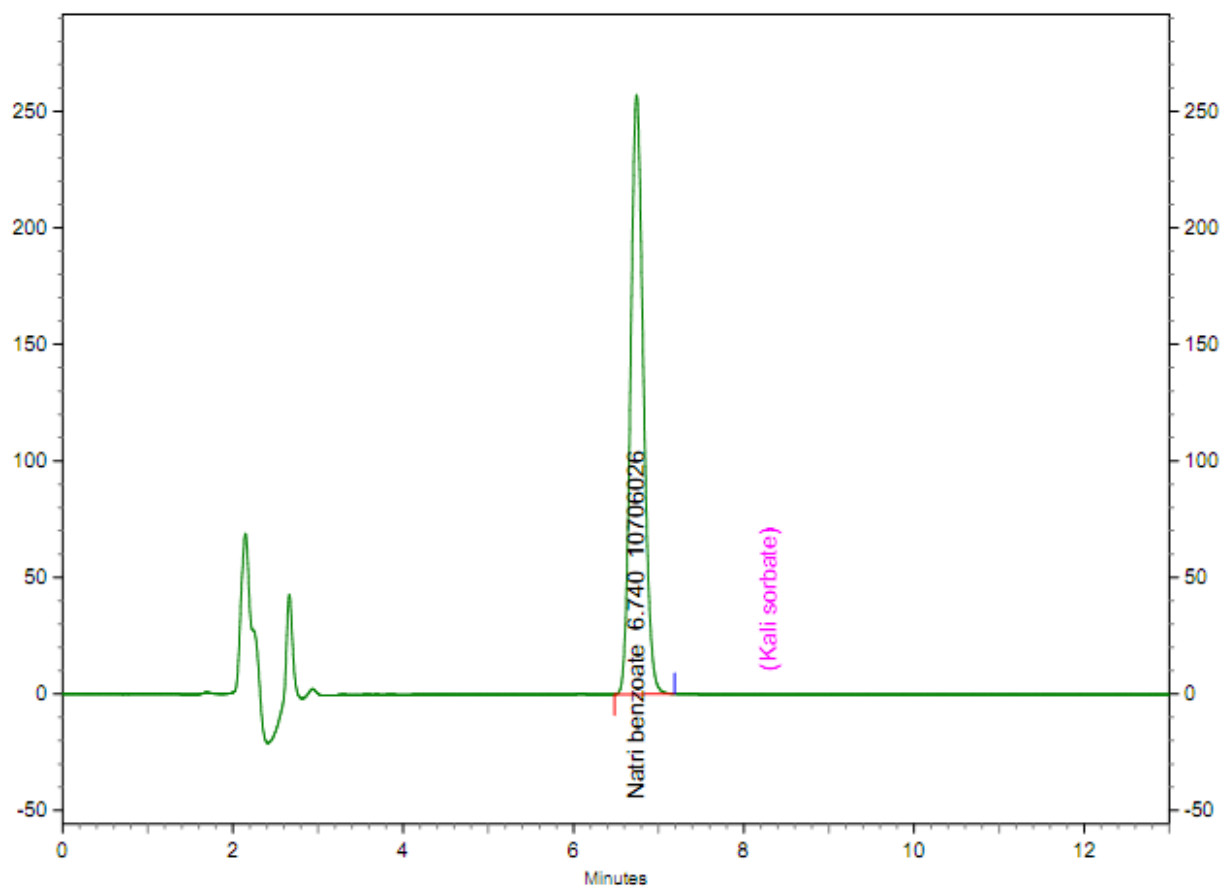
Hình 9: Đường chuẩn Natri benzoat 0,5 – 50 mg/l



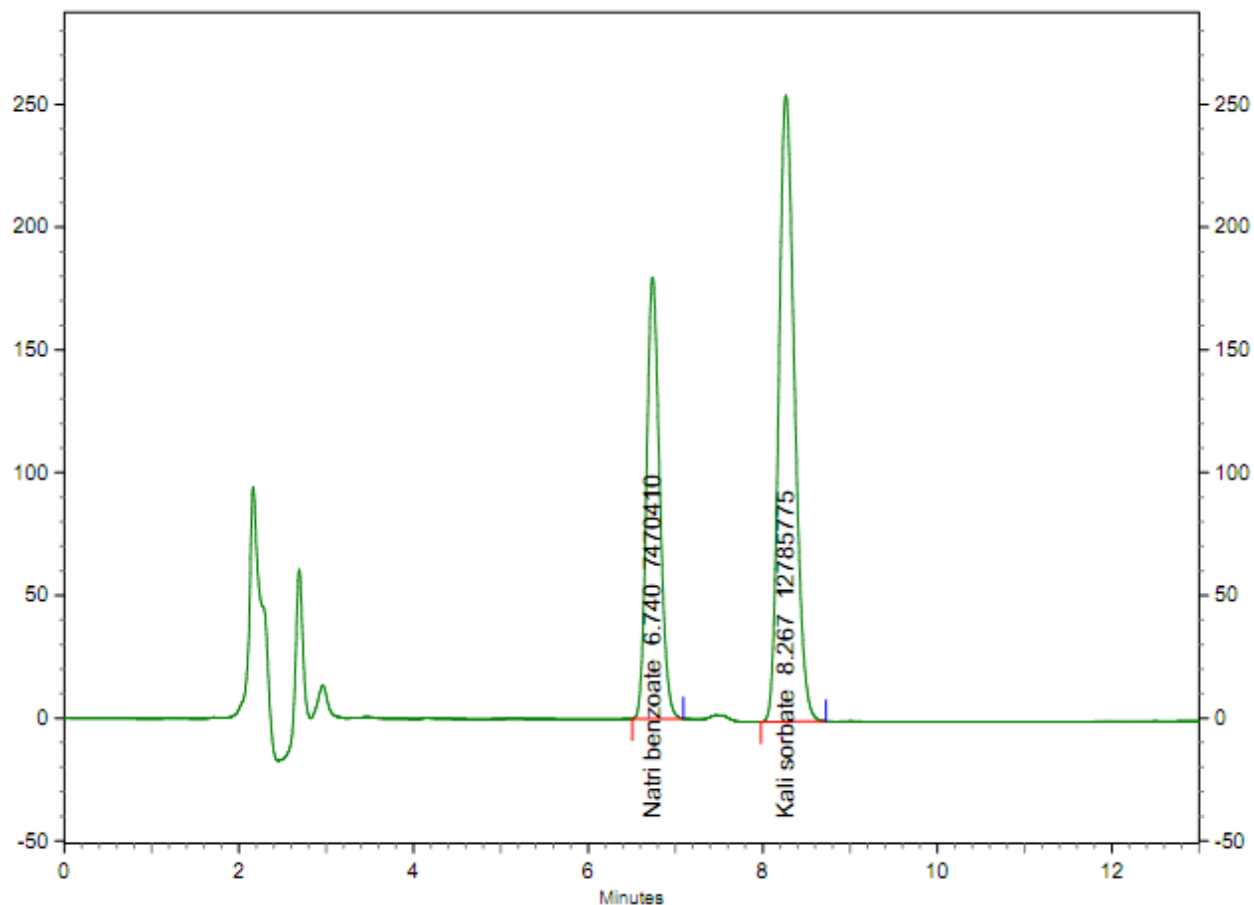
Hình 10: Đường chuẩn Kali sorbat 0,5 – 50 mg/l



Hình 11: Chuẩn Natri benzoat và Kali sorbat



Hình 12. Mẫu bào viên có natri benzoat



Hình 13. Mẫu chả cá có natri benzoat và kali sorbat

4. KẾT LUẬN

Phân tích thành phần của phụ gia thực phẩm là rất quan trọng để đánh giá chất lượng phụ gia thực phẩm. Hiện nay có rất nhiều quy trình phân tích và nhiều kỹ thuật phân tích khác nhau để phân tích đánh giá chất lượng phụ gia thực phẩm. Để đảm bảo kết quả phân tích được chính xác, các phòng thí nghiệm phải đảm bảo phương pháp phân tích chọn là phù hợp cho đối tượng phụ gia thực phẩm.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. QCVN 4 – 12 - Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phụ gia thực phẩm – chất bảo quản, (2010).
- [2]. TCVN 8471 - Thực phẩm – xác định Acesulfame K, Aspartame và Saccharin – phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, (2010).
- [3]. TCVN 8472 - Thực phẩm – xác định cylamate – phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, (2010).
- [4] Nguyễn Thị Xuân Mai, Bài giảng quang phổ hấp thụ phân tử, Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên TP Hồ Chí Minh, lưu hành nội bộ.
- [5] AOAC official method 2007.01 - Pesticide residues in food by acetonitrile extraction and partitioning magnesium sulfate, Gas chromatography/Mass spectrometry and Liquid chromatography/Tandem mass spectrometry.
- [6] Beaty R.D., Kerber J.D. - Concepts, Instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry, The Perkin – Elmer Corporation, (1993).
- [7] QinL., Xiao-Yan Z., Shu-Kun .H et al - Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Determination of Chrysoidine, Auramine O and Safranin T in Food [J]. Food Science **30** (14) 194-196 (2009).
- [8] Wang X., Song G., Wu W., Zhao J., Hu Y - Determination of the Food colorant, Chrysoidine, in Fish by GC/MS, Chromatographia **68** 659-662 (2008).
- [9] Guui W., Xu Y., Shou L., Zhu G., Ren Y - Liquid chromatography- tandem mass spectrometry for the determination of chrysoidine in yellow-fin tuna, Food Chem **122** 1230-1234 (2010).