

## XÁC ĐỊNH SUDAN III BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VÀ ỨNG DỤNG PHÂN TÍCH MẪU THỰC PHẨM

Phạm Thị Chuyên<sup>1</sup>, Hoàng Hải Long<sup>1</sup>, Đặng Xuân Thu<sup>2</sup>, Nguyễn Bích Ngân<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Tây Bắc

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

**Tóm tắt:** Bài báo đưa ra phương pháp đơn giản và hiệu quả chiết tách Sudan III từ các mẫu thực phẩm. Phương pháp chiết tách được kiểm tra bằng việc đánh giá hiệu suất thu hồi theo AOAC. Sudan III được phân tích bằng phương pháp HPLC cho độ lặp lại tốt, độ chọn lọc cao. Các mẫu thực phẩm được phân tích gồm 3 mẫu tương ớt và 3 mẫu bim bim lấy tại địa bàn thành phố Sơn La. Kết quả phân tích mẫu thực cho thấy có 2 mẫu tương ớt phát hiện chứa Sudan III.

**Từ khóa:** Chất màu tổng hợp, tương ớt, Sudan III, phân tích sắc ký.

### 1. Mở đầu

Chất màu nhân tạo Sudan III là một chất độc hại cấm dùng trong thực phẩm, được Cơ quan nghiên cứu Ung thư quốc tế (IARC) xếp vào chất gây ung thư nhóm 3. Tuy nhiên Sudan III vẫn được tìm thấy trong bột ớt, nước sốt cá, pizza [1],... nên việc định lượng Sudan III là quan trọng. Bài báo trình bày các kết quả nghiên cứu xác định hàm lượng Sudan III trong các mẫu tương ớt và bim bim bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Các điều kiện tối ưu cho phân tích HPLC là: cột ODS C18; nhiệt độ cột 40°C; bước sóng đo 520nm; thành phần pha động: methanol: nước = 95:5 (v/v); tốc độ pha động 0,5mL/phút, thể tích tiêm mẫu 10μL. Đường chuẩn được xây dựng có dạng  $y_{\text{diện tích pic}} = 92375 + 6788342 \cdot C_{\text{SudanIII}}$ . Kết quả phân tích mẫu thực cho thấy 2 mẫu tương ớt lấy tại địa bàn thành phố Sơn La có phát hiện Sudan III.

### 2. Thực nghiệm

#### 2.1. Hóa chất, thiết bị

Máy khuấy từ, máy siêu âm, máy ly tâm, bộ hút chân không, hệ thống máy HPLC đầu dò UV –Vis hãng Jasco (Nhật), cân phân tích.

Sudan III chuẩn tinh khiết phân tích dạng bột (hãng Merk), nước đề ion, methanol, acetonitril dùng cho HPLC.

Pha dung dịch gốc Sudan III 1000ppm (C<sub>0</sub>), từ C<sub>0</sub> pha dung dịch Sudan III 200ppm (C<sub>1</sub>). Từ C<sub>1</sub> pha các dung dịch chuẩn Sudan III 0,01ppm; 0,05ppm; 0,1ppm; 0,3ppm; 0,5ppm; 0,7ppm; 1,0ppm; 2,0ppm; 2,5ppm; 3,0ppm; 3,5ppm; 4,0ppm; 4,5ppm; 5,0ppm; 6,0ppm; 10ppm. Các dung dịch đều được pha trong methanol, sử dụng bình nút nhám, bảo quản kín trong tủ lạnh, tránh ánh sáng.

Ngày nhận bài: 03/11/2018. Ngày nhận đăng: 18/01/2019.

Liên lạc: Phạm Thị Chuyên, e-mail: bonghoabattri@gmail.com

## 2.2. Lấy mẫu và xử lý mẫu phân tích

Các mẫu tương ớt và bim bim được lấy ngẫu nhiên tại 3 địa điểm ở đầu, giữa và cuối thành phố Sơn La và đảm bảo về cảm quan các mẫu tương ớt và bim bim không giống nhau (màu sắc, mùi vị) để tránh không lấy 2 địa điểm cùng một loại. Mẫu lấy được bảo quản trong lọ nhựa, bọc kín bằng giấy bạc. Quá trình xử lý mẫu tiếp theo được thực hiện trong điều kiện hạn chế tối đa ánh sáng.

Kí hiệu mẫu và vị trí lấy mẫu được trình bày trong các bảng 2.1 và bảng 2.2:

**Bảng 2.1: Lấy mẫu tương ớt**

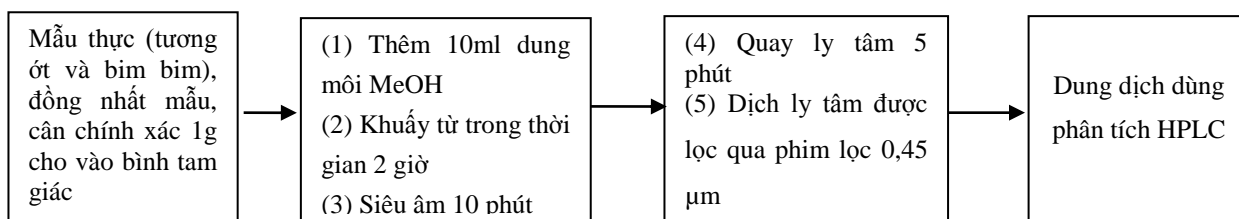
Địa điểm lấy mẫu	Kí hiệu mẫu	Vị trí lấy mẫu
Thành phố Sơn La	MT-01	Quán phở
	MT-02	Không nhãn mác bán theo can tại chợ trung tâm T.P Sơn La
	MT-03	Cửa hàng bánh mì

**Bảng 2.2: Lấy mẫu bim bim**

Địa điểm lấy mẫu	Kí hiệu mẫu	Vị trí lấy mẫu
Thành phố Sơn La	MB-01	Quầy hàng tạp hóa, P. Quyết Tâm
	MB-02	Quầy hàng tạp hóa chợ Chiềng Sinh
	MB-03	Quầy hàng tạp hóa chợ trung tâm T.P Sơn La

Quy trình xử lý mẫu được tham khảo [3,4] và dựa trên tính chất lý hóa của Sudan III, được đưa ra như sơ đồ 2.2.

**Sơ đồ 2.2 : Quy trình chiết tách Sudan III từ mẫu thực**

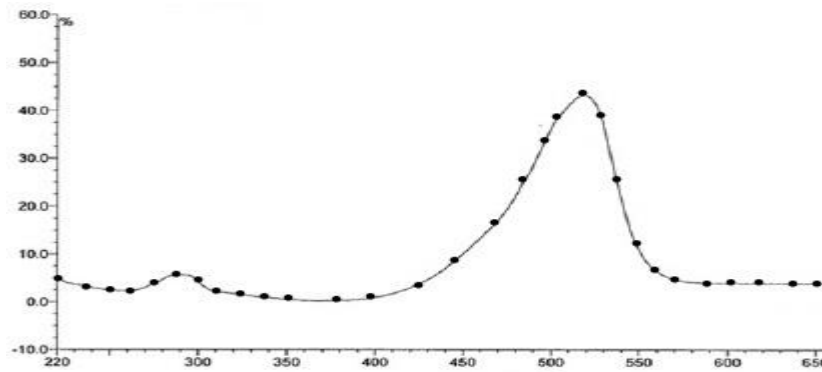


## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Khảo sát các điều kiện tối ưu phân tích Sudan III bằng HPLC

#### 3.1.1. Khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại

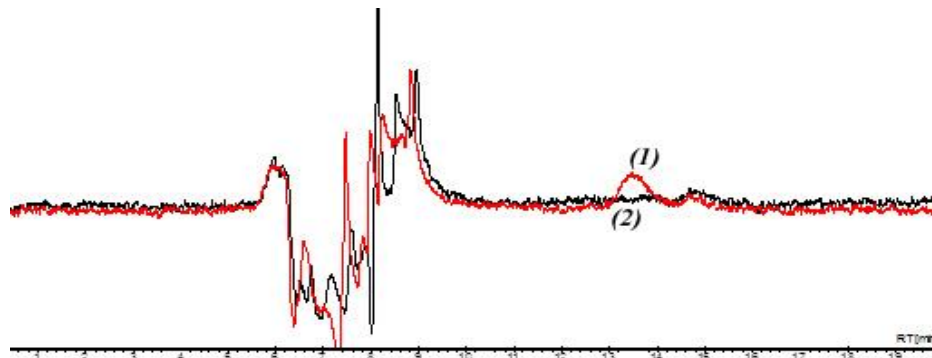
Chúng tôi tiến hành quét phổ UV-VIS của dung dịch chuẩn Sudan III 2,0ppm và đo độ hấp thụ quang trên dải sóng 220 – 650 nm, kết quả theo hình 3.1 cho thấy cực đại hấp thụ tại bước sóng 520nm nên chúng tôi chọn bước sóng này là tối ưu để đo Sudan III trong phương pháp HPLC.



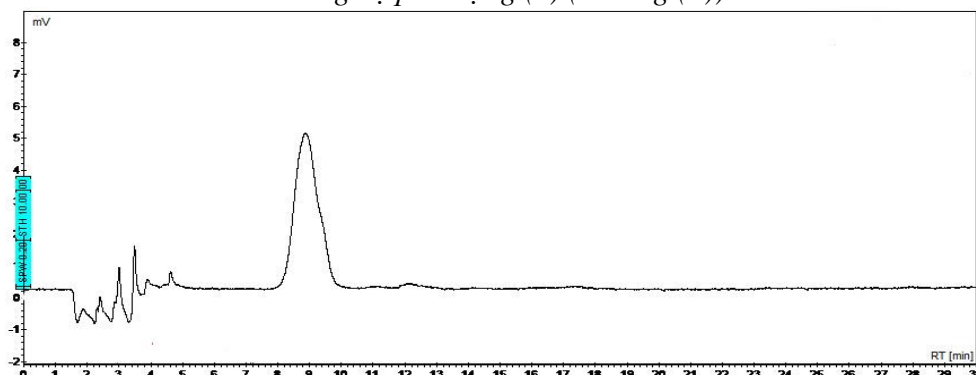
Hình 3.1. Sự phụ thuộc độ hấp thụ quang của dung dịch Sudan III theo bước sóng

### 3.1.2. Khảo sát thành phần pha động

Tiến hành phân tích dung dịch Sudan III 2ppm với các hệ pha động khác nhau: (a) methanol: nước; (b) Acetonitril: nước; (c) methanol: đệm phot phat. Kết quả cho thấy chỉ có pha động (a) cho pic Sudan III cân đối, đỉnh pic nhọn (hình 3.3), 2 hệ pha động (b) có sự xuất hiện pic Sudan III nhưng pic thấp, tù, hệ pha động (c) không thấy sự xuất hiện pic Sudan III (hình 3.2). Chúng tôi chọn hệ pha động methanol: nước và tiến hành khảo sát tỉ lệ pha động thích hợp. Theo đó, khi tăng tỉ lệ methanol thì thời gian lưu giảm dần, đồng thời pic hẹp lại, thời gian lưu của chất cách thời gian chết của cột vừa đủ. Kết quả cho thấy tỉ lệ pha động thích hợp nhất là methanol: nước = 95:5 (v/v).



Hình 3.2. Sắc đồ phân tích Sudan III khi dùng hệ pha động (b) (đường (1)) và khi dùng hệ pha động (c) (đường (2))



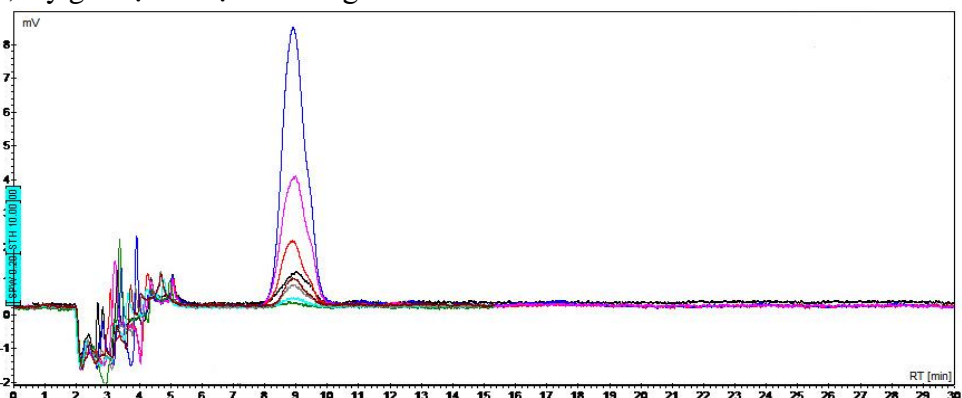
Hình 3.3. Pic Sudan III khi sử dụng hệ pha động (a)

### 3.1.3. Khảo sát tốc độ pha động

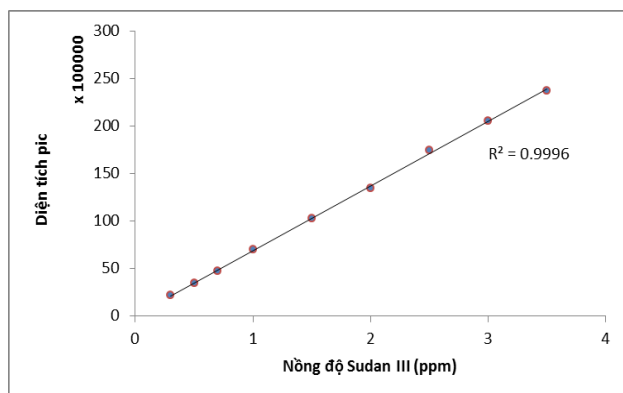
Chúng tôi tiến hành chạy sắc ký của dung dịch mẫu chuẩn Sudan III 1,0 ppm ở các tốc độ pha động khác nhau: 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 mL/phút. Kết quả cho thấy với tốc độ dòng 0,5 mL/phút pic được tách tốt, áp suất cột vừa phải và thời gian lưu phù hợp. Vì vậy chúng tôi chọn tốc độ dòng là 0,5 mL/phút.

### 3.2. Dựng đường chuẩn, tính LOD, LOQ

Khi xây dựng đồ thị sự phụ thuộc diện tích pic theo nồng độ Sudan III trong khoảng nồng độ từ 0,01ppm đến 10ppm, nhận thấy khoảng tuyến tính nồng độ Sudan III từ 0,01ppm đến 4 ppm. Đường chuẩn Sudan III được dựng trong khoảng tuyến tính này. Mỗi điểm của đường chuẩn được đo lặp lại 3 lần, lấy giá trị tín hiệu đo trung bình.



Hình 3.4. Sự xuất hiện pic Sudan III tại các giá trị nồng độ chuẩn



(3)

Phương trình đường chuẩn dạng  $Y=A+B*X$   
Thông số:

Hệ số	Giá trị
A	92375
B	6788342

$R^2$	N
0.9996	9

(4)

Hình 3.5: Đường chuẩn Sudan III (3) và các thông số đường chuẩn (4)

Kết quả đo lặp lại cho thấy, tại các giá trị nồng độ để xây dựng đường chuẩn, RSD đều nhỏ hơn 5%. Phương pháp có độ lặp lại tốt. Chọn giá trị nồng độ Sudan III 2,0ppm ở khoảng giữa đường chuẩn, đo lặp lại 10 lần, thì nồng độ của dung dịch tính theo đường chuẩn cho kết quả có  $RSD = 1,7\%$  và  $t_{thucnghien} < t_{lythuyet}$  do vậy đường chuẩn đạt độ tin cậy thống kê 95%.

Tiến hành đo lặp lại 8 lần mẫu Sudan III 0,1ppm và áp dụng quy tắc  $3\sigma$  để tính giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Kết quả xử lý trình bày trong bảng 3.1.

**Bảng 3.1. Diện tích pic của sudan III nồng độ 0,1ppm qua các lần đo**

Lần	1	2	3	4	5	6	7	8
S <sub>pic</sub>	65339	64435	64647	64566	65335	65646	65668	65565
SD	516							
S <sub>pic TB</sub>	65150							

$$\text{Giới hạn phát hiện: } LOD_{\text{SudanIII}} = \frac{3 \cdot S_y}{S_{\text{pic TB}}} = \frac{3 \cdot 516}{65150} = 0,024\text{ppm}$$

$$\text{Giới hạn định lượng: } LOQ_{\text{SudanIII}} = \frac{10 \cdot S_y}{S_{\text{pic TB}}} = \frac{10 \cdot 516}{65150} = 0,080 \text{ ppm}$$

### 3.3. Đánh giá độ thu hồi

Mẫu tương ớt MT-01 và mẫu bim bim MB-01 được xử lý tương tự sơ đồ 2.2, tuy nhiên ở giai đoạn (1) thêm vào 10ml dung dịch Sudan III 1,0ppm. Mỗi mẫu được phân tích lặp lại 3 lần cho kết quả trong bảng 3.2.

**Bảng 3.2. Kết quả khảo sát hiệu suất thu hồi**

Kí hiệu mẫu	Diện tích pic (mV.min)	Nồng độ tính theo đường chuẩn (ppm)	Hiệu suất thu hồi (%)
MT-01	6465344	0,94	94
	6395738	0,93	93
	6367353	0,93	93
MB-01	6235647	0,92	92
	6268447	0,92	92
	6999432	0,90	90

Chúng tôi cũng đã khảo sát độ thu hồi khi tăng số lần chiết và thời gian chiết, thời gian siêu âm, tuy nhiên vẫn cho độ thu hồi không khác nhau có nghĩa với giá trị độ thu hồi khi chiết 1 lần (độ tin cậy 95%). Theo đó, hiệu suất thu hồi trung bình của phương pháp là 92%, đối chiếu với tiêu chuẩn AOAC 2016 [2], nồng độ chất thêm vào là 1ppm thì độ thu hồi từ 80% đến 110% là đạt yêu cầu, nên kết luận phương pháp trên có thể dùng chiết tách Sudan III trong mẫu thực phẩm. Vì vậy, để tiết kiệm chi phí và thời gian phân tích, chúng tôi chọn phương án chiết Sudan III như sơ đồ 2.2 cho các phân tích về sau.

### 3.4. Phân tích mẫu thực

Các mẫu thực sau chiết, đem phân tích sơ bộ bằng HPLC khi áp dụng tính toán theo phương pháp đường chuẩn, thì thấy rằng có 1 mẫu MT-02 có hàm lượng Sudan III lớn hơn LOQ, kết quả sau 3 lần xử lý chiết và phân tích HPLC đối với mẫu MT-02 trình bày trong bảng 3.3.

**Bảng 3.3. Kết quả phân tích mẫu MT-02**

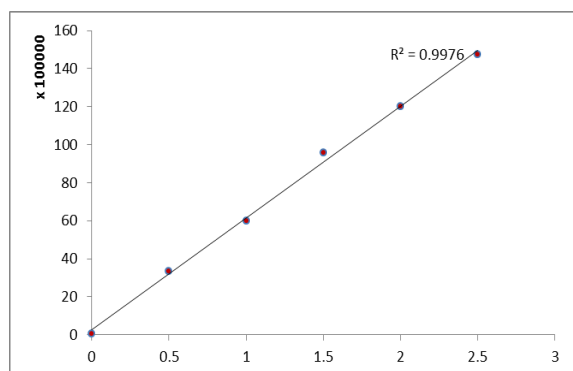
Kí hiệu mẫu	Khối lượng mẫu (mg)	V dịch chiết (mL)	Diện tích pic (mV.min)	Nồng độ Sudan III tính theo đường chuẩn (ppm)	Khối lượng Sudan III trong dịch chiết (µg)	Hàm lượng Sudan III trong mẫu thực (µg/g)
MT-02	1009	10	1963556	0,276	2,76	2,74
MT-02	1046	10	2085434	0,294	2,94	2,81
MT-02	1018	10	2004332	0,282	2,82	2,77
<b>Hàm lượng Sudan III trung bình (µg/g)</b>						<b>2,77</b>

Với 5 mẫu còn lại, sử dụng phương pháp đường thêm chuẩn để xác định tín hiệu Sudan III, dung dịch chuẩn Sudan III 5,0ppm (dung dịch C<sub>0</sub>) được dùng làm dung dịch thêm chuẩn.

Với mẫu MT-01 : lấy 2265mg mẫu, thêm vào 25ml methanol, tách chiết Sudan III theo sơ đồ 2.2 thu được dung dịch chiết A. Các dung dịch thêm chuẩn được pha theo bảng 3.4. Kết quả phân tích và xử lý số liệu trình bày trong bảng 3.4 và hình 3.5.

**Bảng 3.4. Kết quả phân tích mẫu MT-01**

STT	V dung dịch =10(ml)			Diện tích pic (mV.min)	Phương trình đường thêm chuẩn	Nồng độ Sudan III tính theo đường thêm chuẩn (ppm)	m Sudan III trong dịch chiết (µg)	Hàm lượng Sudan III trong mẫu thực (µg/g)
	V dịch chiết (ml)	V dd chuẩn C <sub>0</sub> (ml)	V methanol (ml)					
1	4	0	6	55534	$y = 255047 + 5883728 \cdot C$	0,043	0,173	0,076
2	4	1	5	3344582				
3	4	2	4	5987213				
4	4	3	3	9056252				
5	4	4	2	12005233				
6	4	5	1	15025622				



Phương trình đường thêm chuẩn dạng

$$Y = A + B * X$$

Thông số:

Hệ số	Giá trị
A	255047
B	5883728

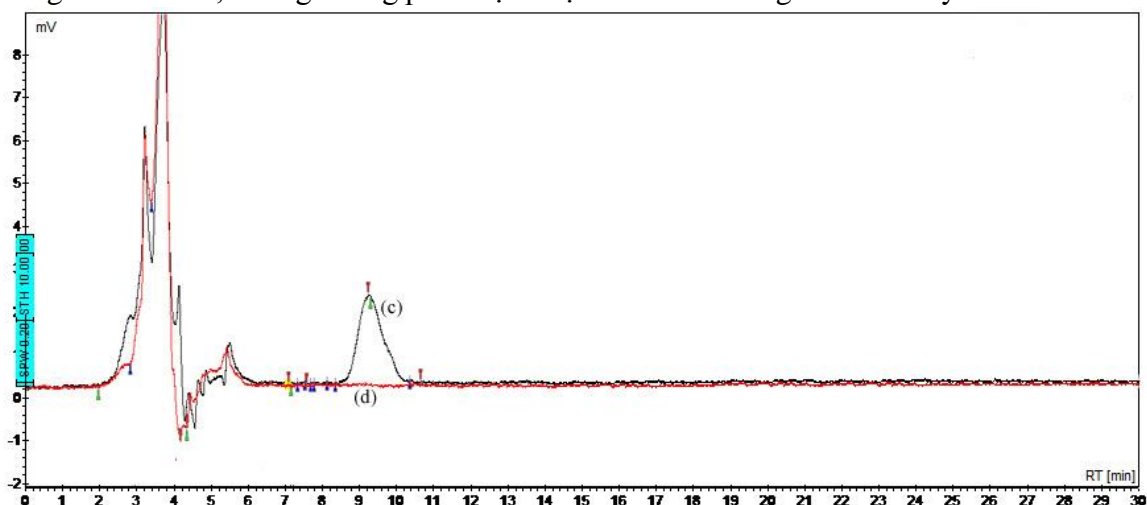
R <sup>2</sup>	N
0.9976	6

(6)

(5)

Hình 3.5. Đường thêm chuẩn Sudan III (5) và các thông số đường thêm chuẩn (6)

Các mẫu còn lại MT-03, MB-01, MB-02, MB-03 cũng được đem xác định Sudan III bằng phương pháp đường thêm chuẩn, nhưng không phát hiện được Sudan III trong các mẫu này.



Hình 3.6. Sắc đồ mẫu MB-01 khi chưa thêm Sudan III (đường (d)) và khi thêm Sudan III 5ppm (đường (c))

### Kết luận và kiến nghị

Chúng tôi đưa ra phương pháp chiết Sudan III trong mẫu thực phẩm cho hiệu suất chiết tốt, phương pháp tiến hành đơn giản, tín hiệu Sudan III phân tích được bằng HPLC là rõ ràng, pic không bị chồng. Phương pháp HPLC phân tích Sudan III có độ chọn lọc, độ phục hồi và độ lặp lại tốt.

Mẫu MT-02 có chứa Sudan III trong khoảng đường chuẩn nên xác định được trực tiếp bằng phương pháp đường chuẩn. Kết quả cho hàm lượng trung bình của Sudan III trong mẫu MT-02 là 2,77 $\mu$ g/g tức trong 1kg tương ớt có chứa 2,77 gam Sudan III, đây là một lượng khá lớn, có thể tác động đến sức khỏe nếu sử dụng thường xuyên loại tương ớt này.

Mẫu MT-01 có chứa Sudan III nhưng hàm lượng nằm dưới giới hạn định lượng, không xác định được theo phương pháp đường chuẩn và giá trị hàm lượng xác định được theo phương pháp đường thêm chuẩn là 0,076  $\mu$ g/g .

Vì Sudan III là chất cấm trong thực phẩm (theo FDA), nên sự có mặt Sudan III trong mẫu MT-01 và MT-02 là đáng báo động. Tình trạng sử dụng gia vị tràn lan không nhãn mác và không được kiểm định ảnh hưởng nhiều đến sức khỏe người tiêu dùng. Chúng tôi kiến nghị các cơ quan chức năng cần có các biện pháp quản lí và kiểm định chất lượng chặt chẽ các thực phẩm có sử dụng phụ gia tạo màu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Orawon Chailapakul, Wanida Wonsawat, Weena Siangproh, Kate Grudpan, Yifang Zhao, Zhiwei Zhu (2008), Analysis of sudan I, sudan II, sudan III, and sudan IV in food by HPLC with electrochemical detection: Comparison of glassy carbon electrode with carbon nanotube-ionic liquid gel modified electrode - Food Chemistry 109 (2008), Issue 4, pp.876–882,
- [2] Guidelines for Standard Method Performance Requirements (2016), AOAC official methods of analysis, Appendix F, p.9.
- [3] Bùi Thị Ngoan, Trần Thắng, Đào Tố Quyên, Phạm Văn Hoan (2009), Xác định Sudan I trong một số loại gia vị bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao – Tạp chí Y học thực hành, trang 641-642, Bộ Y tế xuất bản.
- [4] Nguyễn Văn Yên và cộng sự (2010), Nghiên cứu quy trình xử lý mẫu xác định các chất Sudan trong mỹ phẩm và thực phẩm – Tạp chí Dược học, số 411, Bộ Y tế xuất bản.

## DETERMINATION OF SUDAN III BY HPLC AND APPLICATION FOR FOOD SAMPLE ANALYSIS

**Pham Thi Chuyen<sup>1</sup>, Hoang Hai Long<sup>1</sup>, Dang Xuan Thu<sup>2</sup>, Nguyen Bich Ngan<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Tay Bac Universtiy

<sup>2</sup> Ha Noi University of Pedagogy

**Abstract:** *The article presents a simple and effective method of extracting Sudan III from food samples. The extraction method is checked by evaluating the recovery performance according to AOAC. Sudan III analyzed by HPLC method showed good repeatability and high selectivity. Food samples for analysis include 3 chilli sauce and 3 snack types collected in Son La city. The results revealed that there were 2 samples of chilli sauce containing Sudan III.*

**Keyword:** *Artificial colour, chilli sauce, Sudan III, HPLC analysis*