

Xác định rhodamine B trong thực phẩm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC sử dụng detector UV - VIS : \ Luận văn ThS. Hóa học: 60 44 29 \ Trần Thị Thanh Nga ; Nghd. : PGS.TS. Phạm Luận

Khi xã hội ngày càng phát triển thì vấn đề sức khỏe của con người ngày càng được chú trọng, trong đó vấn đề an toàn thực phẩm và vệ sinh môi trường được đặt lên hàng đầu vì nó có ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe của con người, hơn nữa đó cũng là vấn đề đáng quan tâm của các khu chế biến, sản xuất và xuất nhập khẩu thực phẩm. Sự tồn dư của các chất độc hại có trong thực phẩm đang là vấn đề đáng lo ngại đối với người tiêu dùng. Ngày nay cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật, nhiều kỹ thuật phân tích mới, hiện đại đã được áp dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau đặc biệt trong đánh giá, kiểm định các chất gây độc trong thực phẩm.

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. Phẩm màu công nghiệp nói chung, Rhodamine B nói riêng đều độc hại, bị cấm sử dụng trong thực phẩm vì khó phân huỷ. 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 và 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. Vì vậy việc nghiên cứu xác định hàm lượng của các Rhodamine B- một thành phần của phẩm nhuộm trong thực phẩm là vấn đề cần thiết đối với sức khỏe cộng đồng.

Tuy nhiên, ngoài sự có mặt của Rhodamine B còn có các thành phần hoá học khác có trong phẩm nhuộm như Sudan- I, Sudan- IV,...Phương pháp tối ưu nhất để xác định Rhodamine B là sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Đây là một phương pháp được ứng dụng nhiều nhất trong nhiều năm gần đây. Nó được áp dụng để tách nhận dạng và xác định hàng loạt các hợp chất mà một số phương pháp trước đây gặp nhiều khó khăn như các hợp chất không bền với nhiệt, các hợp chất có tính chất hoá học tương tự nhau,...Phương pháp HPLC cũng có nhiều ưu điểm mà các phương pháp khác không có như: xác định đồng thời được nhiều chất, tốn ít mẫu, thao tác đơn giản,...

Trong phân tích bằng phương pháp HPLC có hai loại cột tách thường sử dụng là cột trao đổi ion và cột tách pha đảo. Trong luận văn này, chúng tôi sẽ tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình tách và xác định hàm lượng của Rhodamine B trong một số mẫu thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) ghép nối detector UV- VIS. Phương pháp này có độ chọn lọc cao, độ nhạy tốt và được trang bị ở nhiều cơ sở kiểm nghiệm ở nước ta, có tính khả thi và tính ứng dụng thực tế cao. Phân tích một số mẫu thực phẩm như hạt dưa, bánh xu xê, mít, ...và các mẫu thực phẩm khác nhằm đánh giá hàm lượng Rhodamine B trong các mẫu thực phẩm này. Dựa trên các kết quả nghiên cứu về phân tích hàm lượng Rhodamine B trong các mẫu thực phẩm mà có thể đánh giá vấn đề an toàn thực phẩm của các cơ sở sản xuất.

Chương 1: TỔNG QUAN

1.1. Một vài nét về Rhodamine B

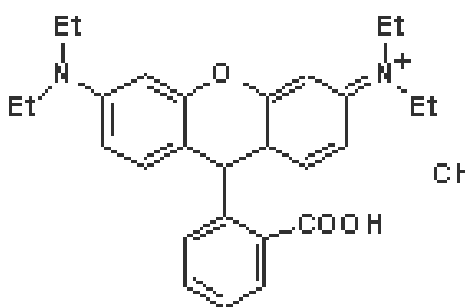
1.1.1. Công thức cấu tạo

Rhodamine B là một hợp chất hóa học, là một thành phần của phẩm màu công nghiệp.

Công thức phân tử là $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$

Phân tử khối là 479,02g/mol.

Công thức cấu tạo của Rhodamine B



[9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenylidene]-diethylammonium chloride

Tính chất vật lý

Rhodamin B là những tinh thể màu tối có ánh xanh hay ở dạng bột màu nâu đỏ.

Nhiệt độ nóng chảy khoảng từ 210⁰ C đến 211⁰C

Rhodamine B là một thuốc nhuộm lưỡng tính, độc hại, tan tốt trong methanol, ethanol, nước (khoảng 50 g/l). Độ hoà tan trong 100 gam dung môi: nước 0,78 gam (26⁰C), rượu etylic 1,74 gam. Dung dịch nước và rượu etylic có màu đỏ ánh xanh nhạt phát huỳnh quang màu đỏ mạnh, đặc biệt rõ trong các dung dịch loãng. Dung dịch nước hấp thụ cực đại với ánh sáng có $\lambda = 526$ và 517 nm

1.1.2. Tính chất sinh học

Rhodamine B gây độc cấp và mãn tính. Qua tiếp xúc, nó gây dị ứng hoặc làm mẩn ngứa da, mắt,... Qua đường hô hấp, nó gây ho, ngứa cổ, khó thở, đau ngực. Qua đường tiêu hóa, nó gây nôn mửa, có hại cho gan và thận. Nếu tích tụ dần trong cơ thể nó gây nhiều tác hại đối với gan, thận, hệ sinh sản, hệ thần kinh cũng như có thể gây ung thư. [19,23]. Thực nghiệm trên chuột cho thấy Rhodamine B gây ung thư với liều lượng 89,5mg/kg qua đường uống hoặc tiêm vào tĩnh mạch [23], khi Rhodamine B đi vào cơ thể có thể chuyển hóa thành amin thơm tương ứng có phần độc hại hơn loại Rhodamine B thường, gây ung thư và phát triển khối u dạ dày, tại đây Rhodamine B và dẫn xuất của nó sẽ tác động mạnh mẽ đến các quá trình sinh hóa của tế bào gây ung thư gan, vì gan là cơ quan tạng đầu tiên lọc chất Rhodamine B [31]. Một số thực nghiệm khác cho thấy Rhodamine B tác động phá vỡ cấu trúc ADN và nhiễm sắc thể khi đưa vào nuôi cấy tế bào [26,21].

1.1.3. Ứng dụng

Rhodamine B thường được sử dụng như một thuốc nhuộm tracer trong nước để xác định tốc độ và hướng của dòng chảy vận chuyển [24].

Được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng công nghệ sinh học như kính hiển vi huỳnh quang, đếm tế bào dòng chảy, quang phổ huỳnh quang [24].

Rhodamine B đang được thử nghiệm để sử dụng như một bio marker trong vacxin bệnh dại cho động vật hoang dã, như gấu trúc, để xác định động vật

hoang dã đã có thuốc phòng ngừa bằng cách cho Rhodamine B vào râu và răng của động vật.[24]

Nó cũng được trộn vào thuốc diệt cỏ. Ngoài ra Rhodamine B còn được sử dụng để tạo màu và nhuộm màu trong công nghiệp sợi, nhuộm màu trong phòng thí nghiệm, để xét nghiệm tế bào do tính bền màu [25].

Rhodamine B được sử dụng trong sinh học như là một thuốc nhuộm huỳnh quang. Tận dụng đặc tính phát quang của Rhodamine B, người ta dùng chúng để giúp kiểm soát lượng thuốc bảo vệ thực vật phun lên cây ớt, cây lấy dầu, Rhodamine B có thể thấm vào ớt nếu dính dầu trong máy ép ớt, phơi ớt trên sàn được sơn cũng có thể gây lây nhiễm chất nhuộm trên. Ủy ban Gia vị còn khuyến cáo không đựng các túi cói nhuộm màu do nghi ngại chất nhuộm có thể thấm lậu vào sản phẩm[25]. Mặt khác con đường thâm nhập hóa chất này vào các sản phẩm cây trồng hầu như không ai để ý đến từ trước đến nay và nhất là chúng lại diễn ra ở nhiều nước đang phát triển. Ngoài ra, không chỉ với ớt bột hay các chất gia vị nói chung, chất tạo màu Rhodamine B có nguy cơ xuất hiện trong hầu hết các sản phẩm lương thực, thực phẩm đi từ cây trồng có dùng phân bón hóa học[25].

1.2. Các phương pháp xác định Rhodamine B

1.2.1. Các phương pháp sắc ký Phương pháp sắc ký cổ điển (phương pháp sắc ký giấy hay sắc ký bản mỏng- TLC)

Phương pháp này khá đơn giản và không yêu cầu thiết bị đặc biệt, dùng để kiểm tra đánh giá sơ bộ các chất phân tích. Phương pháp này có tính ưu việt, tiến hành nhiều mẫu song song trong một lúc rất tiện lợi. Khi TLC được trang bị phát hiện là một máy đo quang có thể phân tích định tính và định lượng [27,28].

Trong phương pháp này, người ta hòa tan Rhodamine B chuẩn trong ethanol tuyệt đối để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 10 μ g/ml. Rồi tiến hành xác định định tính trong điều kiện sắc ký sử dụng bản mỏng silicagel 60F254, hoạt hóa ở 110⁰C trong 30 phút. Pha động được sử dụng gồm hai hệ:

Hệ 1: CHCl₃- MeOH- H₂O (65: 35: 10), lấy lớp dưới;

Hệ 2: EA- MeOH- H₂O (100: 17: 13)

Phát hiện vết bằng cách quan sát vết ở ánh sáng thường hoặc soi dưới đèn tử ngoại, bước sóng 366nm. So sánh vị trí và màu sắc của các vết trên sắc ký đồ của dung dịch thử với vết mẫu của Rhodamine B trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn để đánh giá kết quả [28].

1.2.1.2. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Trong những năm gần đây, phương pháp HPLC đã đóng vai trò vô cùng quan trọng trong việc tách và phân tích các chất trong mọi lĩnh vực khác nhau, nhất là các lĩnh vực của hoá dược, sinh hoá, hoá thực phẩm, nông hoá, hoá dầu, hoá học hợp chất thiên nhiên, các loại chất có tác dụng độc hại, phân tích môi trường,...đặc biệt là tách và phân tích lượng vết các chất.

Trên thế giới, phương pháp HPLC được sử dụng rộng rãi để xác định Rhodamine B trong thực phẩm trong các loại mẫu khác nhau, khá ưu thế so với các phương pháp khác vì có độ chính xác, độ nhạy và độ lặp lại cao...

Detector ghép nối trong máy HPLC cho phép phát hiện sự xuất hiện chất sau rửa giải. Ngày nay có rất nhiều loại detector được sử dụng cho mục đích này đã mở rộng khả năng phát hiện được rất nhiều loại chất bằng phương pháp HPLC Đối với phân tích dư lượng thì người ta hay sử dụng detector khối phổ (MSD) nhất là tách và phân tích chất trong các đối tượng phức tạp. Còn thông dụng người ta dùng detector UV-Vis hay detector huỳnh quang. Dùng detector UV-Vis thì xác định được nhiều loại chất, nhưng detector huỳnh quang thường

nhạy hơn, chọn lọc hơn và ít hơn các tương tác do các hợp chất có trong nền mẫu. Ngoài ra còn dùng một số detector khác như detector diode array (DAD), detector điện hoá,[18]... các detector này cũng thường được ứng dụng để phân tích các chất có trong phẩm nhuộm.

1.2.1.3. Nguyên tắc chung và trang bị của phương pháp HPLC

Sắc ký lỏng là một kỹ thuật tách chất dựa trên sự tổ hợp của nhiều quá trình vừa có tính chất hoá học lại vừa có cả tính chất lý học. Nó là những cân bằng động xảy ra trong cột sắc ký giữa pha tĩnh và pha động, là sự vận chuyển và phân bố lại liên tục của các chất tan (hỗn hợp mẫu phân tích) theo từng lớp chất trong cột (pha tĩnh) từ đầu cột tách đến cuối cột tách. Trong quá trình đó chất tan luôn luôn được phân bố lại giữa hai pha, trong khi pha động chảy liên tục qua cột tách với một thành phần pha động nhất định, hay gradient. Nghĩa là đối với một phân tử chất tan, thì trong quá trình sắc ký, nó luôn chuyển từ pha này sang pha kia nhiều lần từ đầu cột đến cuối cột sắc ký. Mặt khác, cũng vì cấu trúc và tính chất của mỗi phân tử của chất tan là khác nhau nên tốc độ dịch

chuyển trung bình của mỗi chất tan là khác nhau. Khi ở trong pha động, nó chuyển dịch theo tốc độ của dòng pha động, còn khi ở trên pha tĩnh nó lại không dịch chuyển, mà bị pha tĩnh giữ lại. Như vậy là có một khoảng thời gian nhất định chất tan bị giữ lại trong cột tách sắc ký, thời gian này phụ thuộc vào bản chất sắc ký của cột pha tĩnh, cũng như tính chất và cấu trúc của mỗi chất tan khác nhau đồng thời cũng phụ thuộc vào bản chất của thành phần pha động dùng để rửa giải chất tan, có chất tan ít bị lưu giữ, điều đó dẫn đến kết quả là, có quá trình tách của các chất xảy ra trong cột sắc ký [6].

Quá trình tách chất có thể xảy ra theo ba cơ chế chính như sau:

- Tương tác hấp thụ
- Tương tác trao đổi ion

- Tương tác theo cơ chế rây phân tử

Tương ứng với ba cơ chế trên có ba phương pháp tiến hành tách khác nhau.

- Sắc ký hấp phụ (hấp phụ pha thường NP- HPLC và hấp phụ pha ngược RP- HPLC)
- Sắc ký trao đổi ion (EX- HPLC)
- Sắc ký rây phân tử (Gel- HPLC)

Vậy phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là một kỹ thuật tách chất trong đó xảy ra quá trình các chất tan chuyển dịch trong cột tách có chứa các chất nhồi kích thước nhỏ, chất tan chuyển dịch với vận tốc khác nhau phụ thuộc vào hệ số phân bố của nó. Các chất nhồi cột có kích thước đủ nhỏ để đáp ứng hiệu quả tách sắc ký tốt. Thành phần pha động có thể thay đổi để đạt được lực rửa giải phù hợp nhất. Sau khi chất tan chuyển tới cuối cột tách được chuyển tới detector để phát hiện. Tùy thuộc vào bản chất của chất tan mà dùng các loại detector khác nhau [6].

1.2.2. Các kết quả nghiên cứu về Rhodamine B bằng phương pháp HPLC

Trên thế giới có một số công trình nghiên cứu để xác định Rhodamine B. Theo Carcinogen và Pesticide Branch [15], phòng thí nghiệm hóa phân tích OSHA, thành phố Salt Lake, Utah, đã làm thí nghiệm tách Rhodamine B bằng phương pháp HPLC, sử dụng detector huỳnh quang với các điều kiện như sau:

Cột tách: hypersil ODS, 100mm x 2,1mm, 5 μ m.

Nhiệt độ: 40⁰C

Pha động: 85% axetonitrile, 15% nước với 0,005M axit 1- heptansunfonic, được điều chỉnh pH tới 3,5 bằng axit H₃PO₄.

Tốc độ dòng: 0,2ml/phút

Bước sóng: 556nm

Vòng mẫu: 1,0 μ l.

Với các điều kiện như trên mẫu Rhodamine B được phát hiện ở 4,5 phút.

Theo R.W. Mason và L.R. Edwards [22], phân tích Rhodamine B ở trong huyết tương thô và người, sử dụng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu DR-3 với detector huỳnh quang với các điều kiện:

Cột tách: μ Bondapak CN (25mm x 4,6mm)

Pha động: axetonitril và nước (35: 65 hoặc 40: 60) chứa 0,1% axit orthophosphoric.

Tốc độ dòng: 1,8ml/phút.

Nhiệt độ cột: $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Mẫu huyết tương: 0,5ml huyết tương được pha loãng trong 0,5ml của 0,05M Kalidihydrogen photphat, pH= 5,5, được chiết trong 5ml etylaxetat.

Kết quả phân tích: Rhodamine B được phát hiện ở 9,7 phút. Mẫu huyết tương đem phân tích có chứa từ 25 đến 50 ng/ml [27].

Rhodamine B trong mỹ phẩm cũng được phân tích bởi L. Gagliardi, D. De Orsi, G. Multari, D. Tonelli [18]. Các điều kiện phân tích được thực hiện như sau:

Cột tách: C- 18

Pha động: Axetonitril và nước chứa 0,1M natri perclorat với thành phần thay đổi tỷ lệ từ 50: 50 đến 70: 30.

Mẫu phân tích được pha trong metanol và nước với tỷ lệ 8: 2

Kết quả phân tích mẫu thực cho thấy dung dịch chứa 0,3 μ g/ml Rhodamine B, pic xuất hiện ở 9,15 phút [18].

Tác giả J.W. Hofstraat và cộng sự đã ứng dụng kỹ thuật chiết pha rắn và sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector huỳnh quang để xác định Rhodamine B trong nước bề mặt. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 10 pg/l [18].

Tại Việt Nam, viện kiểm nghiệm thuốc trung ương [1] đã tiến hành phân tích Rhodamine B trên các mẫu dược liệu. Các điều kiện sắc ký đã được thực hiện như sau:

Cột tách: RP- C18 (5 μ m, 4,6mm x 250mm)

Pha động: 50% Axetonitril- 50% đệm kalidihidrophotphat 20mM- trietylamin (100: 0,3), điều chỉnh pH tới 3,0 bằng axit photphoric.

Tốc độ dòng: 1,4ml/phút

Detector UV-Vis

Bước sóng 525nm.

Lượng tiêm: 20 μ l.

Kết quả phân tích cho thấy trong dược liệu có chứa Rhodamine B[1].

Tháng 4 năm 2011, Việt Nam cũng đã đề xuất TCVN 8670-2011 về việc xác định Rhodamine B bằng HPLC [11] trên cơ sở của viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia đã xây dựng và thực nghiệm cho một số loại thực phẩm có nhuộm màu.

1.2.3. Phương pháp UV- Vis xác định Rhodamine B

Để xác định Rhodamine B, người ta còn sử dụng phương pháp UV- Vis. Lấy mẫu chất đem hoà tan trong dung môi thích hợp, lắc, rung siêu âm và chiết lấy dung dịch. Đem dung dịch chiết được đo bằng máy UV- Vis, dựa vào cực đại hấp thụ ta có thể xác định trong mẫu chất đó có chứa Rhodamine B hay không [13, 17].

Chương 2:

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, mục tiêu và nhiệm vụ nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng và mục tiêu nghiên cứu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2. Phân tích định lượng bằng HPLC

Trong điều kiện phân tích đã chọn, đại lượng đặc trưng cho một chất là thời gian lưu t_{Ri} của chất đó trên cột tách. Chúng ta có thể dựa vào thời gian lưu này để định tính được chất đó thông qua mẫu chuẩn. Sau đó dựa vào các tín hiệu phân tích thu được (chiều cao pic hoặc diện tích pic) để định lượng các chất. Thông thường trong phương pháp HPLC người ta biểu diễn quan hệ nồng độ chất phụ thuộc vào chiều cao pic hoặc diện tích.

$$H = k.C^b$$

$$S = k.C^b$$

Trong đó:

H là chiều cao pic sắc ký của chất

S là diện tích pic sắc ký của chất

k là hằng số của điều kiện thực nghiệm tách sắc ký

b- là hằng số bản chất, nó nhận giá trị trong vùng: $0 < b \leq 1$

Ở vùng nồng độ nhỏ thì $b = 1$, mối quan hệ giữa H(S) với C là tuyến tính:

$$H = k_1.C = f(C)$$

$$S = k_2.C = f(C)$$

Sử dụng các quan hệ đó có thể xác định nồng độ chất phân tích theo phương pháp đường chuẩn hay phương pháp thêm chuẩn. Dùng phương pháp đường chuẩn thì nhanh, đơn giản. Còn khi thành phần mẫu phức tạp, lượng chất cần xác định nhỏ thì người ta dùng phương pháp thêm chuẩn.

2.3. Giới thiệu chung về phương pháp chiết lỏng- lỏng

2.4. Hoá chất và dụng cụ trong nghiên cứu

2.4.1. Hoá chất

Các loại hoá chất dùng trong phương pháp đều thuộc loại tinh khiết phân tích và HPLC

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát các điều kiện sắc ký

3.1.1 Chọn thể tích vòng mẫu (sample loop)

Hệ bơm mẫu cho sắc ký lỏng sử dụng nguyên lý cơ bản là mẫu ban đầu được nạp vào trong vòng chứa mẫu có thể tích nhất định bằng một xilanh ở áp suất bình thường, sau đó nhờ hệ thống chuyển van mà mẫu được dòng pha động nạp vào cột tách. Độ chính xác, độ đúng và lượng mẫu cần thiết nạp vào cột tách không những phụ thuộc vào thiết kế của van bơm mẫu mà còn phụ thuộc vào kỹ thuật nạp mẫu vào trong cột.

3.1.2. Chọn bước sóng của detector

Việc chọn bước sóng đo phát hiện chất rất quan trọng vì nó quyết định trực tiếp tới độ nhạy của phép phân tích. Vì phương pháp nghiên cứu được lựa chọn là HPLC ghép nối detector UV- Vis, detector cố định bước sóng do vậy phải tiến hành khảo sát điều kiện để chọn ra được bước sóng phù hợp nhất cho phân tích chất.

Tiến hành ghi phổ hấp thụ quang của Rhodamine B trong vùng Vis trên máy UV-Vis 8453 thu được cực đại hấp thụ ở 526 nm và 572 nm.

Chúng tôi cũng tiến hành ghi phổ hấp thụ ánh sáng trong vùng Vis trên máy UV-Vis 8453 với dung dịch chuẩn Rhodamine B được pha trong các thành phần dung môi khác nhau:

- Rhodamine B 1ppm trong 100% nước

3.2. Chọn pha tĩnh

Pha tĩnh là một yếu tố quan trọng quyết định tới hiệu quả tách. Bản chất pha tĩnh quyết định cơ chế tách và khả năng lưu giữ của chất tan. Tùy theo bản chất của chất phân tích mà chọn loại pha tĩnh, kích thước hạt nhồi, chiều dài cột cho phù hợp quá trình sắc ký.

Hệ pha ngược được ứng dụng phổ biến do độ ổn định, độ lặp lại và khả năng tách được nhiều loại chất. Ngoài ra dung môi khi sử dụng cho pha ngược có tính kinh tế hơn. Để nghiên cứu tách và xác định hàm lượng Rhodamine B, là chất có tính phân cực do đó chủ yếu các công trình nghiên cứu được công bố đều sử dụng cột tách chứa chất nhồi pha đảo như RP- C18, RP- C8,...

3.3. Tối ưu hóa pha động

3.3.1. Ảnh hưởng của thành phần pha động tới khả năng tách sắc ký

Tỷ lệ thành phần dung môi tạo ra pha động có ảnh hưởng đến quá trình rửa giải các chất mẫu ra khỏi cột tách. Khi tỷ lệ thành phần pha động thay đổi thì lực rửa giải của pha động thay đổi, tức là làm thay đổi thời gian lưu của chất phân tích, và do đó làm thay đổi hệ số dung lượng của chất phân tích.

Do đó, để có được một thành phần pha động phù hợp thì cần tiến hành khảo sát các tỷ lệ khác nhau với các thành phần pha động đã lựa chọn gồm:

Pha động thứ nhất:

Dung dịch đệm có pH=3 và dung môi hữu cơ methanol (MeOH), thay đổi tỷ lệ pha động: 60%MeOH- 40% H₂O; 65%MeOH- 35% H₂O; 70%MeOH- 30%

H₂O; 75%MeOH- 25% H₂O; 80%MeOH- 20% H₂O; 85%MeOH- 15% H₂O; 90%MeOH- 10% H₂O; 95%MeOH- 5% H₂O; 100%MeOH- 0% H₂O.

3.3.1.1. Pha động thứ nhất

3.3.1.2. Pha động thứ hai

3.3.2.1. Pha động gồm 70% MeOH- 30% đệm

3.3.3. Ảnh hưởng của các chất phụ

3.3.3.1. Ảnh hưởng của triethylamin đối với hệ pha động gồm MeOH và đệm

3.3.4. Khảo sát tốc độ pha động

Cùng với yếu tố thành phần pha động, thì tốc độ pha động khi chạy sắc ký cũng ảnh hưởng không ít đến kết quả tách sắc ký. Tốc độ pha động cũng là một yếu tố quyết định đến quá trình rửa giải các chất trong cột sắc ký vì nó ảnh hưởng đến quá trình thiết lập cân bằng của chất tan giữa hai pha tĩnh và pha động. Tốc độ pha động quá nhỏ sẽ gây ra hiện tượng doãng pic, thời gian rửa giải các chất lớn làm giảm tính kinh tế của phương pháp. Nhưng tốc độ pha động lớn quá có thể làm cho các chất trong mẫu không kịp tách ra khỏi nhau, dẫn đến hiện tượng doãng pic. Vì vậy cần lựa chọn được tốc độ pha phù hợp.

3.4. Đánh giá phương pháp phân tích

3.4.1. Tổng kết các điều kiện đã chọn

3.4.2. Khảo sát lập đường chuẩn trong khoảng nồng độ 0,01- 2,00ppm

Để so sánh, chúng tôi tiến hành khảo sát khoảng tuyến tính của phép đo với các điều kiện như sau

3.4.3. Giới hạn phát hiện (limit of detection- LOD)

Giới hạn phát hiện là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà phương pháp phân tích còn cho tín hiệu phân tích khác có nghĩa với tín hiệu của mẫu trắng hay tín hiệu nền, hay pic sắc ký của chất phân tích phải có chiều cao H thỏa mãn:

$$H \geq 3 \times \delta_n$$

Trong đó:

H là chiều cao pic

δ_n là độ lệch chuẩn của tín hiệu nền.

Từ đó xác định giới hạn phát hiện theo hai phương pháp sau:

3.4.4. Giới hạn định lượng (limit of quantity- LOQ)

Giới hạn định lượng là nồng độ thấp nhất (x_Q) của chất phân tích mà hệ thống phân tích định lượng được với tín hiệu phân tích (y_Q) khác có ý nghĩa định lượng với tín hiệu của mẫu trắng hay tín hiệu nền (blank or background).

$$LOQ = 10 \times S_B/b$$

Trong đó:

b là hệ số góc của phương trình hồi quy

S_B là độ lệch chuẩn của mẫu trắng, cũng được xác định theo phương trình hồi quy.

Như vậy theo phương trình hồi quy ta có:

$$LOQ = 0,0502 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

3.4.5. Độ đúng của phép đo

Độ chính xác của phép đo được đánh giá thông qua phần trăm sai số. Chọn các mẫu phân tích có nồng độ tại điểm đầu, cuối và giữa khoảng tuyến tính đã khảo sát. Chúng tôi tiến hành chuẩn bị 3 mẫu chuẩn có nồng độ lần lượt

là 0,1ppm; 0,5ppm; 1,0ppm rồi tiến hành chạy sắc ký, mỗi mẫu chạy lặp 8 lần. Phần trăm sai số được tính theo công thức sau:

$$\%X = \frac{|S_i - S_t|}{S_t} \times 100$$

Trong đó: S_i là diện tích tính từ đường chuẩn

S_t là diện tích theo sắc đồ

Tiến hành khảo sát các mẫu chuẩn với cùng điều kiện sắc ký với các nồng độ khác nhau

Pha tĩnh: RP- C8 (4,6x150 mm, 5 μ m)

Pha động: 85% ACN- 15% đệm (HCOOH- 0,007M natri heptansunfonat), pH=3

Tốc độ pha động: 0,8 ml/phút

Nhiệt độ cột tách: 30⁰C

Thể tích vòng mẫu: 20 μ l

Detector: UV-Vis 550 nm

Kết quả thu được đối với mẫu chuẩn Rhodamine B 0,1ppm được thể hiện ở bảng 3.13. và hình 3.26.

3.4.6. Độ lặp lại của phép đo

Một phương pháp phân tích tốt ngoài việc có sai số nhỏ còn yêu cầu có độ

3.5. Phân tích mẫu thực phẩm, quy trình xử lý và kết quả phân tích

3.5.1. Khảo sát dung môi chiết lấy Rhodamine B

3.5.1.1. Xử lý sơ bộ mẫu phân tích

Áp dụng các điều kiện tối ưu được để phân tích bốn đối tượng mẫu là hạt dưa, bánh xu xê, nước ngọt và tương ớt.

Tổng số mẫu phân tích là 3 mẫu/đối tượng x 4 đối tượng (hạt dưa, bánh xu xê, nước ngọt và tương ớt). Cứ ba đơn vị mẫu của một đối tượng thu thập được trộn với nhau thành mẫu phức hợp để phân tích.

3.5.1.2. Chọn dung môi chiết

Dung môi chiết là một yếu tố vô cùng quan trọng quyết định hiệu suất của quá trình xử lý mẫu. Các dung môi chiết chúng tôi sử dụng ở đây là ACN-Axeton, Etanol- nước, Nước- KCl, ACN- Axeton- nước, nước, etanol.

Chúng tôi tiến hành xử lý sơ bộ mẫu hạt dưa rồi chiết với các dung môi chiết khác nhau để lựa chọn dung môi chiết tốt nhất.

3.5.2. Phân tích mẫu thực từ dung dịch chiết

3.5.2.1. Mẫu hạt dưa

Sau khi tìm được các điều kiện tối ưu cho quá trình xử lý mẫu, chúng tôi tiến hành phân tích mẫu thực thể trong các đối tượng mẫu: hạt dưa, bánh xu xê, nước ngọt, tương ớt

Đối với mẫu hạt dưa, quy trình chiết như sau: mẫu hạt dưa được cân chính xác lượng $0,5 \pm 0,002$ g trên cân phân tích rồi chuyển vào bình định mức 25ml, thêm 10 ml hỗn hợp etanol và nước theo tỷ lệ 40:60, lắc đều, siêu âm 60 phút. Sau khi chiết, lấy 2,0ml dung dịch chiết chuyển vào bình định mức 10ml và định mức bằng pha động, lắc đều lọc qua giấy lọc thường, rồi lọc qua màng lọc Whatman $0,45\mu\text{m}$, lấy 2ml dịch chiết bơm vào cột sắc ký HPLC với các điều kiện sắc ký như đã chọn

3.5.2.2. Mẫu bánh xu xê

Giống như mẫu hạt dưa ở trên, chúng tôi tiến hành chiết mẫu và phân tích theo quy trình tương tự nhưng không pha loãng.

Đối với mẫu bánh xu xê, quy trình chiết như sau: mẫu bánh xu xê được cân chính xác lượng $0,1030 \pm 0,00054$ g trên cân phân tích rồi chuyển vào bình định mức 25ml, thêm 10 ml hỗn hợp etanol và nước theo tỷ lệ 40:60, lắc đều, siêu âm 60 phút. Sau khi chiết, lấy 2,0ml dung dịch chiết chuyển vào bình định mức 10ml và định mức bằng pha động, lắc đều lọc qua giấy lọc thường, rồi lọc qua

màng lọc Whatman 0,45 μ m, lấy 2ml dịch chiết bơm vào cột sắc ký HPLC với các điều kiện sắc ký như đã chọn (mục 3.4.1).

3.5.2.4. Mẫu siro dâu

Quá trình chiết mẫu và phân tích cũng được tiến hành tương tự mẫu hạt dưa và mẫu bánh xu xê, không pha loãng.

Đối với mẫu siro dâu, quy trình chiết như sau: mẫu siro dâu được lấy chính xác 0,5 $\pm$ 0,001ml bằng pipet men rồi chuyển vào bình định mức 25ml, thêm 10 ml hỗn hợp etanol và nước theo tỷ lệ 40:60, lắc đều, siêu âm 60 phút. Sau khi chiết, lấy 2,0ml dung dịch chiết chuyển vào bình định mức 10ml và định mức bằng pha động, lắc đều lọc qua giấy lọc thường, rồi lọc qua màng lọc Whatman 0,45 μ m, lấy 2ml dịch chiết bơm vào cột sắc ký HPLC với các điều kiện sắc ký như đã chọn (mục 3.4.1).

Kết quả phân tích mẫu Rhodamine B trong mẫu siro dâu được trình bày trong bảng 3.21.

Bảng 3.21. Kết quả phân tích mẫu siro dâu

TT	Lượng mẫu thực (ml)	Lượng Rhodamine B chuẩn thêm vào (ppm)	Diện tích pic (mAu.s)
1	0,5	0,00	28047
2	0,5	0,01	61781
3	0,5	0,02	96730

Kết quả được tính toán theo phần mềm thống kê Origin 7.5 như sau:

(a)

(b)

Hình 3.33. Đường chuẩn (a) và sắc đồ (b) khi thêm chuẩn đối với mẫu siro dâu.

Ta có:

$$C_x = a/b = 0,0081(\text{ppm})$$

Theo công thức tính hàm lượng chất phân tích trong mẫu ban đầu, tính được

$$m_x = 8,1 \cdot 10^{-5}(\text{mg}) \text{ hay } 0,162\text{mg/l}$$

Hiệu suất thu hồi của chất phân tích trong mẫu là

3.5.2.5. Mẫu nước ngọt hương dâu

Quá trình chiết mẫu và phân tích nước ngọt hương dâu cũng được tiến hành tương tự mẫu siro.

Đối với mẫu nước ngọt hương dâu, quy trình chiết như sau: mẫu nước ngọt được đong chính xác $1 \pm 0,001$ ml bằng pipet men rồi chuyển vào bình định mức 25ml, thêm 10 ml hỗn hợp etanol và nước theo tỷ lệ 40:60, lắc đều, siêu âm 60 phút. Sau khi chiết, lấy 2,0ml dung dịch chiết chuyển vào bình định mức 10ml và định mức bằng pha động, lắc đều lọc qua giấy lọc thường, rồi lọc qua màng lọc Whatman 0,45 μm , lấy 2ml dịch chiết bơm vào cột sắc ký HPLC với các điều kiện sắc ký như đã chọn (mục 3.4.1).

Kết quả phân tích cũng cho thấy trong mẫu nước ngọt được phân tích có chứa 0,126ppm (1,26 mg/l) Rhodamine B .

KẾT LUẬN

Trên cơ sở nghiên cứu các điều kiện thực nghiệm, nhằm ứng dụng kỹ thuật phân tích HPLC sử dụng detector UV-Vis để xác định hàm lượng Rhodamine B trong thực phẩm, chúng tôi thu được một số kết quả sau đây:

1. Đã chọn được các điều kiện phù hợp cho việc xác định hàm lượng Rhodamine B có trong các mẫu thực phẩm bằng kỹ thuật HPLC sử dụng detector UV-Vis:

Pha tĩnh: RP- C8 (4,6 x 150 mm, 5 μ m)

Pha động: 85% ACN- 15% đệm (HCOOH- 0,007mM natri heptansunfonat), pH=3

Tốc độ pha động: 0,8 ml/phút

Nhiệt độ cột tách: 30⁰C

Thể tích vòng mẫu: 20 μ l

Detector: UV-Vis 550 nm

2. Đã đánh giá phương pháp phân tích:

Khoảng tuyến tính của Rhodamine B: 0,01- 2ppm

Giới hạn phát hiện:

+ Theo phương pháp phân tích trực tiếp là 1ppb

+ Theo phương pháp đường chuẩn là 15ppb

Giới hạn định lượng:

+ Theo phương pháp phân tích trực tiếp là 3,33ppb

+ Theo phương pháp đường chuẩn là 50,2ppb

3. Khảo sát mẫu thực

- Đã chọn được quy trình phân tích và khảo sát được các dung môi chiết tách đối với các loại thực phẩm là 60% nước- 40% etanol. Trên cơ sở quy trình tối ưu tìm được đã tiến hành xác định được hàm lượng Rhodamine B trong các mẫu thực phẩm gồm mẫu hạt dưa, mẫu bánh xu xê, mẫu siro dâu, mẫu nước ngọt hương dâu với độ lặp lại tốt.
- Kết quả xác định các mẫu thực cho thấy: trong các mẫu thực phẩm đang được lưu hành trên thị trường đã tiến hành phân tích, hàm lượng Rhodamine B xác định được đều nằm trong giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp. Chứng tỏ mặc dù bị cấm sử dụng trong chế biến và bảo quản thực phẩm nhưng Rhodamine B vẫn đang được sử dụng khá phổ biến trong các loại thực phẩm được lưu hành trên thị trường.

Từ kết quả thu được, chúng tôi thấy phương pháp HPLC sử dụng detector UV-Vis có độ nhạy cao, thích hợp cho việc xác định hàm lượng Rhodamine B có trong các loại thực phẩm với cách xử lý mẫu thích hợp.

Chúng tôi hy vọng những nghiên cứu trên sẽ góp phần vào việc ứng dụng kỹ thuật HPLC- UV-Vis nói riêng và các kỹ thuật HPLC nói chung để xác định Rodamine B trong các đối tượng mẫu thực phẩm, nhằm phục vụ đắc lực cho các ngành khoa học và đặc biệt trong lĩnh vực vệ sinh an toàn thực phẩm giúp bảo vệ sức khỏe con người.

