XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH CHẤT BẢO QUẢN NATRI BENZOAT TRONG CHẢ LỤA BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Lê Thị Nhân Duyên, Nguyễn Thị Ngọc Vân*
Trường Đại học Y Dược Cần Thơ
**Email: nguyenthingocvanct@gmail.com*

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: *Chất bảo quản natri benzoat được sử dụng phổ biến trong ngành công nghiệp thực phẩm với mục đích ức chế sự phát triển nấm mốc và vi sinh vật trong thực phẩm. Tuy nhiên, việc sử dụng natri benzoat với hàm lượng cao có thể gây hại đến các phần quan trọng của DNA đồng thời là nguyên nhân gây hiếu động quá mức ở trẻ em.* ***Mục tiêu:*** *Xây dựng và thẩm định phân tích chất bảo quản natri benzoat trong thực phẩm (chả lụa) bằng phương pháp HPLC đồng thời ứng dụng quy trình để phân tích natri benzoat trong một số mẫu chả lụa thu thập trên thị trường.* ***Đối tượng và phương pháp:*** *Mẫu chả lụa mua ngẫu nhiên trên thị trường được xây dựng và thẩm định quy trình theo hướng dẫn của AOAC.* ***Kết quả:*** *điều kiện sắc ký: cột Agilent C_{18} (250 mm × 4,6 mm; 5 µm); pha động: methanol – acetonitril - acid formic 0,1%/nước (30 : 20 : 50), quy trình được thẩm định với độ thu hồi của phương pháp từ 80–110% và RSD trong khoảng 0,27–0,7%, giá trị LOD và LOQ lần lượt là 0,02 µg/mL và 0,22 µg/mL.* ***Kết luận:*** *Quy trình phân tích chất bảo quản natri benzoat trong chả lụa đã được xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu, phương pháp đã ứng dụng thành công trên 5 mẫu chả lụa trên thị trường.*

Từ khóa: *HPLC-DAD, natri benzoat, SPE.*

ABSTRACT

DETERMINATION SODIUM BENZOATE IN VIETNAMESE PORK SAUSAGE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - ULTRAVIOLET-VISIBLE METHOD

Le Thi Nhan Duyen, Nguyen Thi Ngoc Van
Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: *Preservative substance has widely used in food industry to inhibit the development of mold and microorganism. However, using a high concentration of sodium benzoate can harm DNA and it also causes excessive hyperactivity in children.* ***Objectives:*** *Determination and validation sodium benzoate in food products by liquid chromatography - ultraviolet-visible method and its application in analyzing sodium benzoate in market.* ***Materials and Methods:*** *sodium benzoate in food products in Vietnam, the method was validated under AOAC guidance.* ***Results:*** *Chromatographic condition: Agilent C_{18} column (250 mm × 4.6 mm; 5 µm); mobile phase: methanol – acetonitrile - formic acid 0,1%/water (30 : 20 : 50), the recovery of the method ranged 80 –110% and RSD% is from 0.27–0.7%, the LOD and LOQ of sodium benzoate were 0.02 µg/mL and 0.22–1.0 µg/mL, respectively.* ***Conclusion:*** *The results of the study showed that the proposed RP-HPLC methods precise and accurate. This method was successfully applied to the quantitative analysis of 5 commercial food products in the market.*

Keywords: *HPLC-DAD, sodium benzoate, SPE*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất phụ gia đóng vai trò quan trọng trong công nghệ thực phẩm với nhiều mục đích khác nhau như bảo quản, tạo màu và làm ngọt. Chất bảo quản đã được sử dụng nhằm kéo dài thời hạn sử dụng và chất lượng của thực phẩm. Natri benzoat là chất bảo quản được Cơ

quan Quản lý Dược phẩm và thực phẩm Hoa Kỳ - FDA chấp thuận đưa vào sử dụng để kéo dài tuổi thọ của sản phẩm. Nó có tác dụng ức chế sự phát triển của các loại nấm mốc và các vi sinh vật. Tuy nhiên, một số nghiên cứu chỉ ra rằng natri benzoat có thể gây hại đến các phần quan trọng của DNA và là một nguyên nhân quan trọng cho vấn đề hiếu động quá mức ở trẻ em [3], [6], [7]. Có nhiều kỹ thuật dùng để xác định benzoat đã được báo cáo như phương pháp quang phổ, sắc ký khí, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [4], [5]. Trong đó, HPLC được đánh giá là một phương pháp tiềm năng cho phân tích do giảm thời gian phân tích, độ nhạy và độ chính xác cao. Do đó, nghiên cứu sử dụng phương pháp HPLC để phân tích natri benzoat trong thực phẩm chả lụa nhằm góp phần kiểm soát nồng độ chất bảo quản natri benzoat trong mẫu thực phẩm này.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Methanol, acetonitril, acid formic, nước cất chuẩn HPLC từ Merk (Đức). Thuốc thử Carrez 1, Carrez 2 từ Merck (Đức). Chuẩn natri benzoat của Dr. Ehrenstorfer (Đức).

2.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng HPLC THERMO-DIONEX (Mỹ). Cột Agilent C_{18} (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), cân phân tích Explorer pro (4 số), bể siêu âm Power Sonic 410, bộ chiết pha rắn SPE C_{18} và các thiết bị khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu phân tích

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn natri benzoat trên cân phân tích có độ chính xác ± 0,01 mg, hòa tan vào bình định mức 10 mL bằng methanol, lắc trộn đều thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ khoảng 1000 µg/mL.

Dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 2 g mẫu thử chả lụa (đã được xay nhuyễn) cho vào erlen 250 mL, chiết 2 lần x 20 mL hỗn hợp MeOH - H_2O (20:80), siêu âm 30 phút. Gộp dịch chiết vào bình định mức 50 mL. Lần lượt loại tạp bằng thuốc thử Carrez I và Carrez II. Bổ sung hỗn hợp MeOH - H_2O (20:80) vừa đủ, lắc đều và lọc qua màng lọc 0,45 µm thu được dung dịch sử dụng để phân tích.

Khảo sát điều kiện sắc ký

Thực hiện khảo sát điều kiện sắc ký bao gồm thành phần pha động gồm acetonitril/methanol và nước/nước acid formic 0,1% với các tỷ lệ khác nhau và khảo sát các bước sóng phân tích tại 235 nm, 254 nm và 360 nm.

2.4. Thẩm định quy trình

Tiến hành theo hướng dẫn của AOAC [2] bao gồm các chỉ tiêu: độ đặc hiệu, tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ đúng và độ chính xác.

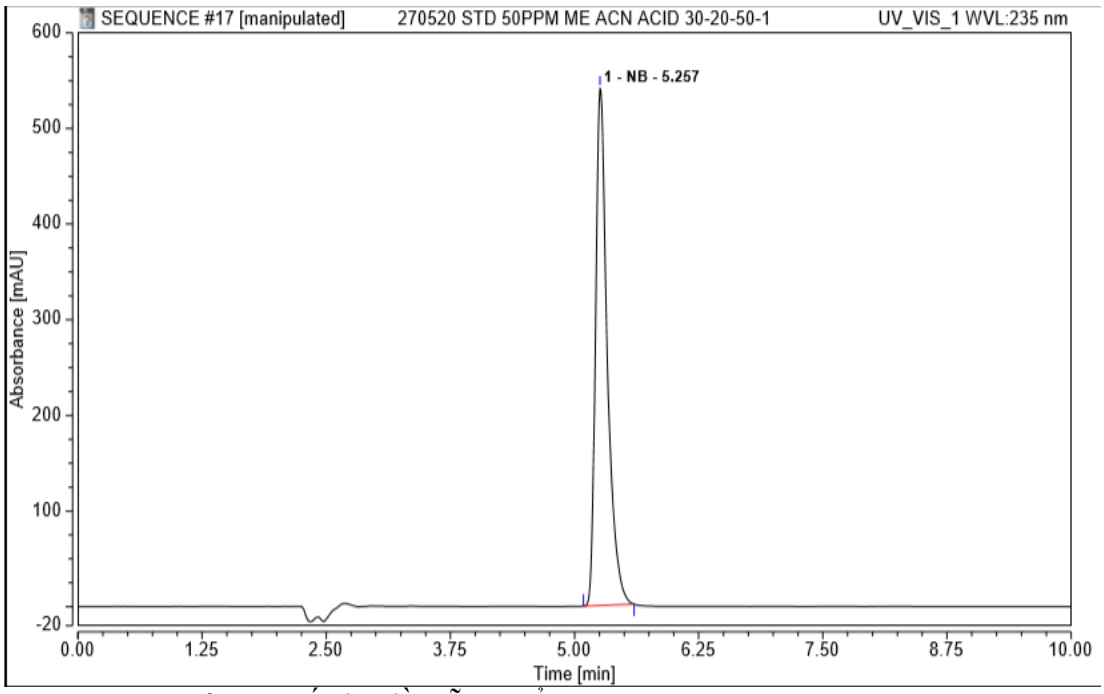
2.5. Ứng dụng

Định lượng natri benzoat trên 5 mẫu chả lụa trên thị trường.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát, lựa chọn điều kiện sắc ký

Từ kết quả khảo sát cho thấy, điều kiện thích hợp được sử dụng để phân tích natri benzoat trên hệ thống máy HPLC THERMO-DIONEX như sau: Cột Agilent C_{18} (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), pha động gồm MeOH – ACN - Acid formic 0,1%/nước (30 : 20 : 50), tốc độ dòng 1 mL/phút; thể tích tiêm 20µL và phát hiện ở bước sóng 235 nm. Sắc ký đồ ở điều kiện sắc ký tối ưu được thể hiện trong hình 1.



Hình 1: Sắc ký đồ mẫu chuẩn của natri benzoat

3.2. Thẩm định quy trình

Tính tương thích hệ thống

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần hỗn hợp chuẩn natri benzoat. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy RSD% thời gian lưu và diện tích đỉnh của natri benzoat <2%, đáp ứng yêu cầu phân tích.

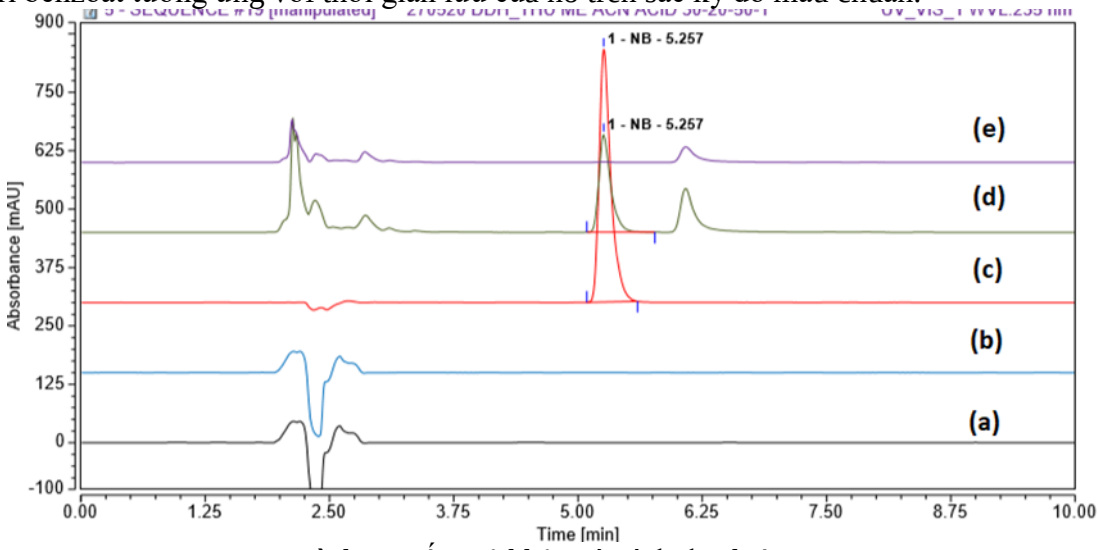
Bảng 1. Kết quả tính tương thích hệ thống trên dung dịch chuẩn natri benzoat

Lần tiêm	Thời gian lưu (t_R)	Diện tích đỉnh (S)	Hệ số bất đối (A_s)	Hệ số dung lượng (k')	Số đĩa lý thuyết (N)
1	5,32	3,38	1,47	4,32	10.917
2	5,31	3,32	1,5	4,31	10.990
3	5,31	3,28	1,43	4,31	11.132
4	5,31	3,35	1,47	4,31	10.970
5	5,3	3,36	1,43	4,3	10.976
6	5,3	3,36	1,44	4,3	11.053
TB	5,31	3,34	1,46	4,31	11.006,33
SD	0,01	0.04	0,03	0,01	75,44
RSD (%)	0,14	1,08	1,93	0,17	0,69

Nhận xét: Độ đặc hiệu

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy quy trình có tính đặc hiệu, cụ thể: Trên sắc ký đồ dung môi pha mẫu và dung môi pha động không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic natri benzoat trên sắc ký đồ mẫu chuẩn; trên sắc ký đồ mẫu thử, do trong mẫu

thử không có natri benzoat nên không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic của natri benzoat trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn, trên sắc ký đồ mẫu thử thêm chuẩn có xuất hiện pic natri benzoat tương ứng với thời gian lưu của nó trên sắc ký đồ mẫu chuẩn.



Hình 2: Kết quả khảo sát tính đặc hiệu

(a) Dung môi pha động (b) Dung môi pha mẫu (c) Chuẩn natri benzoat

(d) Mẫu thử thêm chuẩn natri benzoat (e) Mẫu thử

Tính tuyến tính, LOD, LOQ

Quy trình phân tích đạt tính tuyến tính với phương trình tuyến tính y = 1,7133x – 0,1739 và hệ số tương quan r^2 = 0,9996, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của natri benzoat lần lượt là 0,02 ppm và 0,22 ppm.

Độ chính xác

Đánh giá độ chính xác bằng cách tiến hành phân tích 6 mẫu thử giả lập mỗi ngày, trong 3 ngày liên tiếp. Kết quả độ chính xác được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả độ chính xác

	Diện tích đỉnh		
	TB	**SD**	**RSD%**
Ngày 1	6,716	0,03	0,42
Ngày 2	6,749	0,05	0,79
Ngày 3	7,348	0,02	0,32
TB	6,938	0,03	0,51

Nhận xét: Quy trình đạt độ chính xác với độ lệch chuẩn tương đối RSD diện tích pic của natri benzoat trong ngày và liên ngày đều < 2%.

Độ đúng

Độ đúng được đánh giá bằng cách tiến hành phân tích mẫu thử thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 2 ppm, 4 ppm và 6 ppm, ở mỗi mức nồng độ phân tích lặp lại 3 lần. Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả độ đúng

Lượng thêm vào (ppm)	Lượng tìm thấy (ppm)	Độ thu hồi (%)	TB (%)	RSD (%)
2	2,03	101,7	101,4	0,7
	2,01	100,6		
	2,04	101,9		
4	3,94	98,6	98,3	0,27
	3,93	98,3		
	3,92	98,1		
6	5,6	98,3	97,9	0,4
	5,86	97,7		
	5,86	97,6		

Nhận xét: Quy trình phân tích đạt độ đúng với tỷ lệ hồi phục của các mẫu thử từ 80 – 110%.

3.3. Ứng dụng quy trình phân tích đã thẩm định trên một số mẫu chả lụa trên thị trường

Quy trình phân tích sau khi thẩm định đạt yêu cầu theo quy định được áp dụng phân tích 5 mẫu chả lụa thu thập trên thị trường Thành phố Cần Thơ. Kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích natri benzoate trong một số mẫu chả lụa thu thập trên thị trường Thành phố Cần Thơ

STT	Mã sản phẩm	Hàm lượng chất bảo quản (mg/kg)
1	M1	29,13
2	M2	23,97
3	M3	1898,53
4	M4	1347,26
5	M5	Không phát hiện

Nhận xét: Như vậy, có 4/5 mẫu chả lụa lấy trên thị trường có chứa chất bảo quản natri benzoat. Theo quy định của Bộ Y tế (TT 2012) [1], mức giới hạn cho phép của natri benzoat là 200mg/kg, trong các mẫu kiểm tra phát hiện có 4 mẫu chả lụa có chứa natri benzoat. Mẫu M1 và M2 chứa natri benzoat nằm trong giới hạn cho phép, trong khi mẫu M3 cao gấp gần 9,5 lần và mẫu M4 gấp gần 7 lần mức cho phép.

IV. BÀN LUẬN

4.1. Kết quả khảo sát, lựa chọn điều kiện sắc ký

Kết quả khảo sát thành phần pha động cho thấy khi tăng tỷ lệ dung môi hữu cơ acetonitril trong hệ pha động acetonitril – nước, pic natri benzoat rửa giải ra khỏi cột sớm hơn do hiệu lực rửa giải của hệ dung môi tăng, bên cạnh đó hệ số bất đối tăng có thể do sự kém tan của natri benzoat trong acetonitril. Khi thay nước bằng acid fomic 0,1%, hệ số bất đối giảm do sự lưu giữ thứ cấp bởi các nhóm silanol (Si-O-) pKa 4,5 tự do trên cột giảm và sự kém tan của natri benzoat trong acetonitril. Khi thay acetonitril bằng methanol, kết quả cho thấy pic natri benzoat đạt hệ số bất đối do natri benzoat tan tốt trong methanol. Tuy nhiên, do sự tăng độ nhớt của hệ dung môi methanol – nước làm hạn chế sự chuyển khối và gia tăng sự khuếch tán dọc trong cột làm pic doãn rộng dẫn đến giảm chiều cao tín hiệu – gây bất lợi cho độ nhạy của phương pháp. Do đó, nghiên cứu khảo sát hệ pha động 3 thành

phần acetonitril – methanol – nước 0.1% acid formic (30–20–50) cho kết quả các thông số sắc ký đều đạt yêu cầu.

4.2. Kết quả thẩm định quy trình phân tích

Kết quả thẩm định cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của natri benzoat trong khoảng nồng độ 1–20 ppm với hệ số tương quan lớn hơn 0,99%. LOD và LOQ của natri benzoat lần lượt là 0,02 ppm và 0,22 ppm. Độ thu hồi từ 80–110%. Với RSD% từ 0,27–0,7%. Như vậy, phương pháp đã xây dựng có độ thu hồi và độ lặp lại đạt yêu cầu.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng quy trình định lượng chất bảo quản natri benzoat trong thực phẩm chả lụa sử dụng hệ thống máy HPLC THERMO-DIONEX, đầu dò UV-Vis, pha động gồm MeOH – ACN - Acid formic 0,1%/nước (30: 20: 50) và phát hiện ở 235 nm. Quy trình đã được thẩm định có tính đặc hiệu, đạt tính tuyến tính với hệ số tương quan là 0,9996, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, đạt độ đúng và độ chính xác. Quy trình đã được ứng dụng trên 5 mẫu chả lụa trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2012), Thông tư số 27/2012/TT-BYT: Hướng dẫn việc quản lý phụ gia thực phẩm.
2. AOAC International (2016), Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.
3. Feingold B.F. (1973), *Food additives and child development*, Hospital Practise, 21 (11–12), pp. 17–1.
4. Gagliardi L., DeOrsi D., Manna L., Tonelli D. (1997), *Simultaneous determination of antioxidants and preservatives in cosmetics and pharmaceutical preparations by reversed-phase HPLC*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 20(11), pp. 1797–1808.
5. Tfouni S. A., Toledo M. C. (2002), *Estimates of the mean per capita daily intake of benzoic and sorbic acids in Brazil*, Food Additives & Contaminants, *19(7*), pp. 647–654.
6. Tuormaa T.E. (1994), *The adverse effects of food additives on health: a review of the literature with special emphasis on childhood hyperactivity*, Journal of Orthomolecular Medicine, 9, pp. 225–243.
7. Zengin N., Yüzbas ıog˘lu D., Ünal F., Yılmaz S., Aksoy H. (2011), *The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate*, Food and Chemical Toxicology, 49, pp. 763 – 769.

(Ngày nhận bài: 15/5/2020 - Ngày duyệt đăng: 30/6/2020)