

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI ACID FORMIC, ACID ACETIC, ACID PROPIONIC VÀ ACID BUTYRIC BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI MAO QUẢN SỬ DỤNG DETECTOR ĐỘ DẪN KHÔNG TIẾP XÚC (CE-C⁴D)

Đến tòa soạn 21 - 08 - 2016

Nguyễn Thị Quỳnh Hoa

Khoa Công nghệ Hóa học và Môi trường - Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Hưng Yên

Lê Thị Hồng Hảo, Vũ Thị Trang

Viện Kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia - Bộ Y tế

Nguyễn Thị Quỳnh Hoa, Đỗ Thị Trang, Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hoàng

Khoa Hóa học- Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Vũ Quỳnh Chi

Trường Đại học Y Dược Thái Bình - Bộ Y tế

Lê Hoàng

Cục An toàn Thực phẩm - Bộ Y tế

SUMMARY

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FORMIC ACID, ACETIC ACID, PROPIONIC ACID AND BUTYRIC ACID BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH CAPACITIVELY COUPLED CONTACTLESS CONDUCTIVITY DETECTION (CE-C⁴D)

Capillary electrophoresis is an effective and simple method for rapid determination of organic acids in different kind of samples, including food sample. Four organic acids, including Formic acid, Acetic acid, Propionic acid and Butyric acid, were separated using fused-silica capillary of 50 μ m I.D and total length of 50cm. The separation voltage was -18 kV. The separation was performed in less than six minutes with electrolyte solution consisting of 30mM L-histidine and 40mM Mes (2-(N-morpholino) ethanesulfonic) (pH 5.8). Detection limits of 10⁻⁶M and 2.10⁻⁶M were achieved for Formic acid and Acetic acid, Propionic acid, Butyric acid, respectively. The method was applied for the determination of target acids in coffee, red wine and soft drink samples.

Keywords: *Formic acid, Acetic acid, Propionic acid, Butyric acid, capillary electrophoresis (CE), capacitively coupled contactless conductivity detection (C⁴D)*

1. MỞ ĐẦU

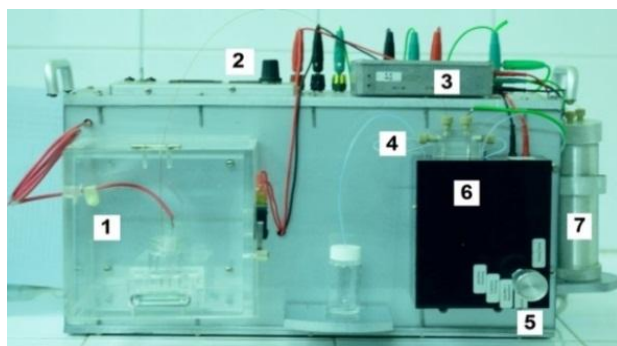
Bốn acid hữu cơ: acid Formic, acid Acetic, acid Propionic, acid Butyric có vai trò quan trọng trong công nghiệp chế biến thực phẩm với các tác dụng như chống nấm mốc, giúp ức chế sự phát triển của vi sinh vật, kéo dài thời gian sử dụng của sản phẩm. Tuy nhiên, khi sử dụng với hàm lượng lớn, chúng không những không bảo quản được thực phẩm mà còn có thể ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng [1, 2]. Do đó, việc phân tích xác định hàm lượng các acid này trong mẫu thực phẩm, đồ uống nhằm đánh giá và kiểm soát chất lượng thực phẩm là cần thiết.

Các phương pháp thường được sử dụng để xác định đồng thời các acid hữu cơ này là sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký khí (GC), sắc ký trao đổi ion,... Trong nghiên cứu này, chúng tôi giới thiệu một phương pháp phân tích nhanh, đơn giản, hiệu quả với chi phí thấp nhằm xác định đồng thời bốn acid hữu cơ này trong mẫu thực phẩm, đó là phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc kết nối kiểu tụ điện (CE- C^4D) trên cơ sở hệ thiết bị tự chế, bán tự động.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các hóa chất tinh khiết phân tích được sử dụng trong nghiên cứu gồm: acid Formic, acid Acetic, acid Propionic và acid Butyric (Merck, Đức), L-Histidine (His) và 2- (N- morpholino) ethanesulfonic (Mes) (Fluka, Thụy sĩ).

Trong nghiên cứu này, bốn acid hữu cơ gồm: acid Formic, acid Acetic, acid Propionic và acid Butyric được xác định đồng thời trong các đối tượng mẫu thực phẩm, đồ uống như: cà phê, rượu vang và nước giải khát,.. bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc kết nối kiểu tụ điện (CE- C^4D).



Hình 1. Hệ thiết bị điện di mao quản CE- C^4D tự chế, bán tự động
(1: Hộp thể an toàn, 2: Bộ điều khiển thế, 3: Cảm biến đo độ dẫn không tiếp xúc (C^4D),
4: Bộ phận kết nối bán tự động, 5: Núm điều chỉnh, 6:
Bộ phận điều khiển, 7: Bình khí nén)

Hệ thiết bị CE- C^4D tự chế, bán tự động (Hình 1) được thiết kế, chế tạo tại Việt Nam bởi Công ty cổ phần 3SANALYSIS (<http://www.3sanalysis.vn/>) trên cơ sở hợp tác với nhóm nghiên cứu của GS. Peter Hauser (Khoa Hóa, Trường Đại học Basel, Thụy

Sĩ). Các thông tin về đặc điểm kỹ thuật của hệ thiết bị có thể tham khảo trong công bố trước đây của nhóm nghiên cứu [3].

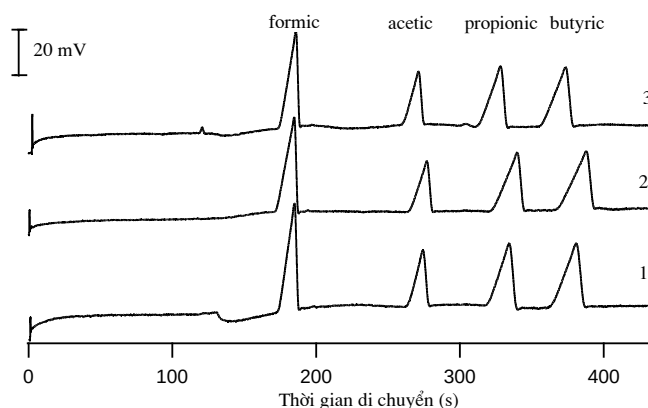
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu, khảo sát các điều kiện tối ưu phân tích đồng thời acid Formic, acid Acetic, acid Propionic và acid Butyric bằng phương pháp CE- C⁴D

Việc khảo sát các điều kiện phân tách đồng thời 4 acid được thực hiện trên thiết bị CE-C⁴D với cột mao quản có chiều dài 50 cm (chiều dài hiệu dụng 43 cm), đường kính trong 50 μ m, bơm mẫu theo phương pháp thủy động lực học kiểu xiphông. Các điều kiện này được giữ nguyên trong tất cả các thí nghiệm. Ngoài ra, các thông số liên quan đến hiệu quả phân tách bằng phương pháp CE-C⁴D như dung dịch đệm điện di (thành phần, pH và nồng độ), thế tách, chiều cao và thời gian bơm mẫu cũng được khảo sát nhằm đạt được kết quả tối ưu nhất.

3.1.1. Khảo sát dung dịch đệm điện di

Trong phương pháp CE-C⁴D thì thành phần, pH và nồng độ của dung dịch đệm điện di ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng tách các chất trong quá trình phân tích. Trên cơ sở tham khảo tài liệu [5] và thực tế khảo sát cho thấy, khi sử dụng hệ đệm điện di His 50 mM/Mes 50 mM (pH = 6,1) cho kết quả phân tách các acid này khá tốt. Do đó, hệ đệm His/Mes được lựa chọn để khảo sát, thay đổi tỷ lệ nồng độ các hợp phần nhằm tối ưu về pH phù hợp với điều kiện thực nghiệm ở Việt Nam. Các tỉ lệ nồng độ đệm tương ứng với pH được khảo sát gồm: His 30 mM/Mes 50 mM (pH = 5,6), His 30 mM/Mes 40 mM (pH = 5,8), và His 50 mM/Mes 40 mM (pH = 6,3). Các điều kiện khảo sát gồm: hỗn hợp mẫu chuẩn có nồng độ của acid Acetic là 6.10^{-5} M, acid Formic, acid Propionic và acid Butyric có cùng nồng độ là 5.10^{-5} M; thế tách là -18 kV, bơm mẫu ở độ cao 10 cm trong 20 s. Kết quả khảo sát được thể hiện trong Hình 2.



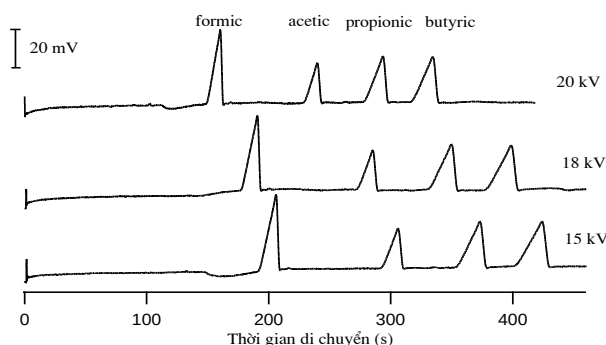
Hình 2. Điện di đồ khảo sát sự ảnh hưởng của dung dịch đệm điện di His/Mes đến sự phân tách acid Formic, acid Acetic, acid Propionic và acid Butyric

1: His 30mM /Mes 50mM, 2: His 30mM /Mes 40mM, 3: His 50mM /Mes 40mM

Kết quả cho thấy ở cả ba tỉ lệ khác nhau về pH và nồng độ của cấu tử đệm đều cho khả năng tách tốt các chất phân tích. Tuy nhiên, hệ đệm His 30 mM/Mes 40 mM (pH = 5,8) cho kết quả diện tích pic của các chất phân tích và đường nền tốt nhất. Do đó, dung dịch đệm điện di His 30 mM/Mes 40 mM (pH = 5,8) được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thể tách

Trong phương pháp CE-C⁴D, thể tách là một trong những yếu tố quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến sự di chuyển của các ion trong mao quản, quyết định đến khả năng phân tách của chúng. Thể tách được khảo sát ở các giá trị -15 kV, -18 kV và -20 kV. Các điều kiện khảo sát như mục 3.1.1 với dung dịch đệm điện di là His 30 mM/Mes 40 mM (pH = 5,8). Kết quả khảo sát thể tách được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Điện di đồ khảo sát sự ảnh hưởng của thể tách

Hình 3 cho thấy, khi áp thế từ -15 đến -20 kV thì diện tích các pic của các chất phân tích hầu như ít thay đổi. Dựa vào tín hiệu pic thu được, tổng thời gian phân tích và tín hiệu nhiễu đường nền, thể tách là -18 kV được chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Ngoài dung dịch đệm điện di, thể tách thì chiều cao và thời gian bơm mẫu cũng được khảo sát. Với các chiều cao bơm mẫu 10 cm, 15 cm, 20 cm và thời gian bơm mẫu là 10 s, 20 s, 25 s đã khảo sát, chúng tôi lựa chọn chiều cao bơm mẫu là 15 cm và thời gian bơm mẫu 20 s là tốt nhất.

Như vậy, điều kiện tối ưu nhằm phân tách đồng thời bốn acid hữu cơ bằng phương pháp CE-C⁴D gồm: mao quản silica có tổng chiều dài 50 cm (chiều dài hiệu dụng 43 cm), đường kính trong 50 μ m, bơm mẫu bằng phương pháp thủy động lực học kiểu xiphông ở độ cao 15 cm trong 20 s, dung dịch đệm điện di His 30 mM/Mes 40 mM (pH = 5,8), thể tách là -18 kV.

3.2. Đánh giá phương pháp phân tích

Đường chuẩn phân tích bốn acid đã được thiết lập sử dụng điều kiện phân tích tối ưu, trong khoảng nồng độ $0,5 \cdot 10^{-5} \div 10^{-4}$ M với acid Formic, $0,6 \cdot 10^{-5} \div 8 \cdot 10^{-5}$ M với Acetic, $0,6 \cdot 10^{-5} \div 10^{-4}$ M với hai acid Propionic và Butyric. Kết quả phương trình đường

chuẩn, hệ số tương quan, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của các acid được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Phương trình đường chuẩn xác định acid Formic, acid Acetic, acid Propionic và acid Butyric

Tên chất	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan R^2	LOD (M)	LOQ (M)
Acid Formic	$y = (10,165 \pm 6,532) + (61,798 \pm 1,1618)x$	0,99912	1.10^{-6}	$3,3.10^{-6}$
Acid Acetic	$y = (-0,525 \pm 2,982) + (31,493 \pm 0,672)x$	0,99909	2.10^{-6}	$6,7.10^{-6}$
Acid Propionic	$y = (-5,079 \pm 6,114) + (61,634 \pm 1,096)x$	0,99921	2.10^{-6}	$6,7.10^{-6}$
Acid Butyric	$y = (6,705 \pm 5,283) + (57,903 \pm 0,991)x$	0,99927	2.10^{-6}	$6,7.10^{-6}$

3.3. Phân tích một số mẫu thực tế

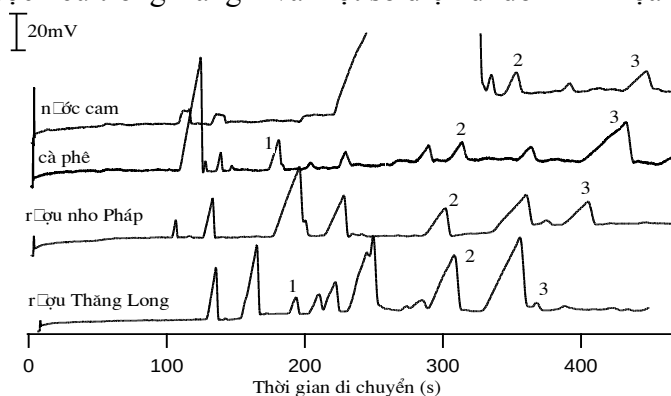
Tiến hành phân tích 7 mẫu thực tế được mua ngẫu nhiên tại các cửa hàng/siêu thị ở Hà Nội gồm nước cam ép, nước C2, Rượu Contre-étiquette, Rượu Soliera Tempranillo, Rượu vang Thăng Long, Cà phê Việt và Cà phê G7. Các mẫu được xử lý như sau:

Mẫu cà phê: Cân chính xác khoảng 1g cà phê trên cân phân tích, cho vào ống falcon cùng 10 ml nước đề-ion, rung cơ học trong 5 phút rồi rung siêu âm trong 20 phút. Dung dịch này được lọc qua màng lọc 0,45 μm và pha loãng với tỉ lệ thích hợp (pha loãng 5 lần) trước khi thực hiện quá trình phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

Mẫu nước giải khát và mẫu rượu được lọc qua màng lọc 0,25 μm , sau đó pha loãng với tỉ lệ thích hợp rồi tiến hành phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

3.3.1. Kết quả phân tích hàm lượng các acid trong mẫu thực tế

Kết quả phân tích hàm lượng bốn acid trong các mẫu thực tế bằng phương pháp thêm tiêu chuẩn được nêu trong Bảng 2 và một số điện di đồ minh họa trong Hình 4.



Hình 4. Điện di đồ xác định các chất phân tích trong mẫu rượu, cà phê và nước giải khát

1. Acid Formic

2. Acid Acetic

3. Acid Propionic

Kết quả phân tích không phát hiện acid Butyric trong tất cả các mẫu, nhưng phát hiện đồng thời 2 hoặc 3 acid còn lại trong hầu hết các mẫu. Hàm lượng acid Formic và acid Propionic đều nằm trong giới hạn cho phép của Bộ Y tế đối với các sản phẩm tương ứng. Hàm lượng acid Acetic trong mẫu nước giải khát (cam ép và nước C2) vượt quá hàm lượng cho phép, đối với các mẫu còn lại thì hàm lượng acid Acetic nằm trong giới hạn cho phép của Bộ Y tế (1500 mg/l đối với nhãn hàng nước giải khát).

3.3.2. Kết quả phân tích đối chứng với phương pháp tiêu chuẩn HPLC

Để kiểm chứng các kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D, 6 trong tổng số 7 mẫu phân tích đã được phân tích tại Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia, sử dụng phương pháp tiêu chuẩn (Phương pháp Sắc kí lỏng Hiệu năng cao - HPLC). Kết quả phân tích đối chứng được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích và kết quả đối chứng với phương pháp HPLC

Mẫu thực	Hàm lượng chất phân tích								% Sai khác giữa 2 phương pháp			
	Phương pháp CE-C ⁴ D				Phương pháp HPLC							
	Formic	Acetic	Propionic	Butyric	Formic	Acetic	Propionic	Butyric	Formic	Acetic	Propionic	Butyric
Cam ép (mg/l)	-	6126	249	-	-	6567	261	-	-	6,72	3,99	-
Nước C2 (mg/l)	-	1992	448	-	-	2387	473	-	-	16,6	5,21	-
Rượu Contre-étiquette (mg/l)	-	83,9	471	-	-	90,8	450	-	-	7,50	-4,7	-
Rượu Soliera Tempranillo (mg/l)	-	1085	851	-	-	1103	875	-	-	1,58	2,72	-
Rượu vang Thăng Long (mg/l)	270	935	41,5	-								
Cà phê Việt (mg/100g)	755	126	405	-	771	132	412	-	16,8	5,22	1,79	-
Cà phê G7 (mg /100g)	744	232	949	-	859	211	992	-	13,5	-9,82	4,23	-

Như vậy, các kết quả phân tích hàm lượng bốn acid trong các mẫu thực tế bằng hai phương pháp CE-C⁴D và HPLC là khá phù hợp (sai số từ 1,58-16,8%), cho thấy phương pháp CE-C⁴D có độ đúng, độ chính xác, độ tin cậy tốt.

4. KẾT LUẬN

Như vậy, chúng tôi đã nghiên cứu, khảo sát được các điều kiện tối ưu xác định đồng thời acid Formic, acid Acetic, acid Propionic và acid Butyric bằng thiết bị điện di mao quản (CE-C⁴D) tự chế, bán tự động và áp dụng quy trình phân tích tối ưu để xác định hàm lượng của các acid đó trong mẫu cà phê, rượu vang và nước giải khát. Từ đó cho thấy, đây là một phương pháp hiệu quả để xác định nhanh hàm lượng các acid này và còn có khả năng, triển vọng mở rộng với các đối tượng chất phân tích khác trong các mẫu thực phẩm, đồ uống nhờ quy trình phân tích đơn giản, thời gian phân tích được giảm thiểu, thiết bị hoạt động đơn giản, chi phí thấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

6. Bộ Y Tế (2012) – Thông tư số 27/2012/TT-BYT ngày 30/11/2012, *Thông tư hướng dẫn việc quản lý phụ gia thực phẩm*.
7. Bộ Y Tế 2002- TCVN 7045:2002 – Quy định kỹ thuật về sản xuất rượu vang.
8. Thi Anh Huong Nguyen et. al. (2014), *Simple semi-automated portable capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection for the determination of β -agonists in pharmaceutical and pig-feed samples*, Journal of Chromatography A, Vol. 1360, pp. 305-311.
9. Ine's Mato, Silvia Sua'zez-Luque, José F. Huidobro (2006), *Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection*, Food Chemistry, Vol. 102 (1), pp. 104-112.
10. Petr Kupán, Pavol Durc, Miroslava Bittová, Frantisek Foret (2013), *Separation of oxalat, formate and glycolate in human body fluit samples by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection*, Journal of Chromatography A, Vol. 1325, pp. 241-2