

## ỨNG DỤNG AOAC ĐỂ PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG DIOXIT LƯU HUỖNH TRONG HƯƠNG LIỆU, GIA VỊ XUẤT KHẨU

Lê Lan Anh, Vũ Đức Lợi, Nguyễn Thị Quỳnh Anh và CCS  
Phòng KHKT Phân Tích, Viện Hoá học, Viện KH&CN Việt Nam

### Tóm tắt:

Một trong những điều kiện để các sản phẩm xuất khẩu của Việt Nam được các nước đối tác chấp nhận đó là phải đạt tiêu chuẩn về hàm lượng tối thiểu của một số độc tố xác định bằng các phương pháp quy định quốc tế (ISO). Báo cáo này chúng tôi muốn đề cập đến một trong các độc tố đó là  $SO_2$  trong gia vị, hương liệu nói riêng và trong thực phẩm nói chung. Phương pháp chúng tôi xây dựng dựa chủ yếu vào AOAC 2000 và những tài liệu mới nhất thu được trên mạng (Google.com). Nguyên lý của phương pháp là cất hồi lưu trong môi trường axit đưa các dạng sunphua về  $SO_2$ . Dùng một dòng khí Nitơ (Argon) cho vào phía dưới hỗn hợp dung dịch mẫu để vừa đẩy  $SO_2$  lên cuộn  $SO_2$  lên cột ngưng tụ bằng nước lạnh, cột này được nối với một bình bẫy khí có chứa dung dịch  $H_2O_2$  và tại đây  $SO_2$  bị ó xy hoá thành  $H_2SO_4$ . Hàm lượng sulfit trực tiếp tỷ lệ với sunphát thu được và ion sunphát ( $SO_4$ ) định lượng bằng đo quang hoặc bằng chuẩn độ với NaOH tuỳ thuộc vào hàm lượng  $SO_2$  có trong mẫu. Độ nhạy của phương pháp đạt được  $\geq 10 \mu g$  và hiệu suất cất  $\geq 80\%$ .

### Summary:

One condition for Vietnamese foods to be qualified as export products is that the products should pass international regulations of limited toxicities and such limited toxicities should be processed and observed by international standard organization (ISO). Based on this requirement, in this paper we discussed the analysis of  $SO_2$ , one prominent toxic substance, particularly in spice, flavorings and generally in food products. We have developed an analytical procedure based mainly on AOAC 2000 and other updated references collected from various sources. Method measures free sulfite plus reproducible portion of bound sulfites, such as carbonyl addition products, in foods. In this method, the sample is heated with refluxing HCl (ca. 1M) to convert sulfite to  $SO_2$ . Stream of  $N_2$  (Ar) introduced below surface of refluxing solution sweeps  $SO_2$  through water-cooled condenser and, via bubbler attached to condenser, with  $H_2O_2$  solution, where  $SO_2$  is oxidized to  $H_2SO_4$ . The amount of  $SO_4$  is determined by spectrometric equipment or titration with NaOH solution on depending the  $SO_2$  content in the samples. The sensibility of this method is determined as low as 10 ug and distillation productivity is higher than 80%.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một trong những điểm mạnh về xuất khẩu của nước ta đó là sản phẩm nông nghiệp. Ngoài gạo, cà phê, điều vv còn có những hương liệu, gia vị như: hạt tiêu, ớt, gừng, quế vv. Tuy nhiên đây cũng là những sản phẩm chung của vùng châu Á và nhất là Đông Nam Á vì vậy tính cạnh tranh là rất lớn. Để sản phẩm của VN có thể xuất được thì điểm đầu tiên là chất lượng phải đảm bảo theo tiêu chuẩn quốc tế. Để kiểm tra các chỉ tiêu cụ thể đòi hỏi

phải có những phương pháp chuẩn do quốc tế quy định vì vậy việc xây dựng các quy chuẩn là rất cần thiết và quan trọng. Xuất phát từ yêu cầu của thực tế chúng tôi đã nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích dioxit lưu huỳnh ( $SO_2$ ) trong hương liệu, gia vị để có thể trực tiếp kiểm tra hàm lượng  $SO_2$  trong các sản phẩm xuất khẩu của VN cũng như các sản phẩm nhập khẩu.

Trước hết phải đặt vấn đề tại sao những nông sản khô (dry) của Việt Nam khi xuất sang châu Âu hay Mỹ lại đòi hỏi phải kiểm tra chỉ tiêu  $SO_2$ ? Rất đơn giản vì nước ta có khí hậu nhiệt đới và cũng như những nước láng giềng, đặc biệt là Trung Quốc có phương pháp cổ truyền sấy khô có cho thêm lưu huỳnh để phòng chống nấm mốc đối với các đồ mây tre. Vì vậy, họ nghĩ cũng không thể loại trừ dân ta lại áp dụng phương pháp này trong các nông sản khác. Bình thường thì  $SO_2$  dưới dạng sunphit vẫn được dùng làm chất bảo quản cho thực phẩm đồ hộp nói chung. Mặt khác chỉ tiêu  $SO_2$  đối với châu Âu (EU) lại cho phép rất thấp chỉ 10 ppm trong gia vị, hương liệu (spice and flavoring), trong khi phần lớn các sản phẩm khác cho phép đến 20 - 50 ppm [1]. Phân tích chính xác hàm lượng nhỏ cỡ phần triệu đòi hỏi phương pháp áp dụng phải có độ lặp lại cao.

Xuất phát từ những yêu cầu cụ thể trên chúng tôi đã tìm hiểu tham khảo các tài liệu về tiêu chuẩn của Việt Nam và quốc tế tìm được một "quy trình" phù hợp đó là phương pháp Monier - Williams tối ưu [AOAC/ 2000, 2]. Hiện nay các hiệp hội về hương liệu và gia vị của thế giới chỉ công nhận các phương pháp phân tích  $SO_2$  có tên Reith - Williams hoặc Monier - Williams, mặc dù có những phương pháp khác hiện đại hơn như sắc ký ion với đầu dò điện hoá [3] thời gian phân tích nhanh hơn và độ nhạy cao hơn.

## II. QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

Nguyên tắc của phương pháp:

Phương pháp áp dụng để các sulfit tự do và một phần của sulfit liên kết như các sản phẩm có thêm cacbonyl trong thực phẩm. Mẫu phân tích được đun hồi lưu với HCl (nồng độ khoảng 1M) để chuyển sunphua thành  $SO_2$ . Dùng một dòng khí Nitơ (Argon) xuống phía dưới khối mẫu và dung dịch HCl để đảo mẫu đồng thời lôi cuốn  $SO_2$  qua cột làm lạnh bằng nước và nối với đầu ra của cột trùng ngưng là ống vuốt nhọn sao cho chỉ từng một bọt khí thoát ra mà thôi. Ống này sẽ được nhúng vào một bình có chứa dung dịch  $H_2O_2$  loãng, tại đây  $SO_2$  bị ô xy hoá thành  $H_2SO_4$ . Hàm lượng sulfit được chuyển trực tiếp thành  $H_2SO_4$  và được định lượng bằng chuẩn độ với dung dịch chuẩn NaOH. Cũng có thể kiểm tra lại bằng phương pháp khối lượng dưới dạng  $BaSO_4$ . Tuy nhiên trong trường hợp gia vị và hương liệu hàm lượng  $SO_2$  nhỏ nên có thể áp dụng phương pháp đo quang để định lượng ion sunphat.

### 1. Quy trình phân tích:

#### 1.1 Thiết bị:

##### a) Thiết bị cất:

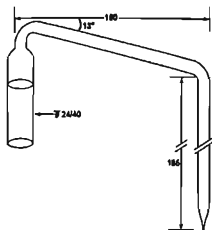
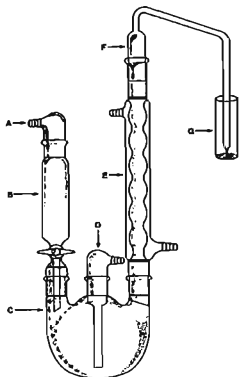
(Chú ý trong phương pháp này, áp suất bên trong phải được hạn chế đến mức tối thiểu do độ cao của dung dịch  $H_2O_2$  ở phía trên của phần bẫy khí. Giữ áp suất thấp nhất có thể để tránh thất thoát khí  $SO_2$  qua khe hở. Sử dụng một màng mỏng mỡ bôi van khí trên bề mặt bít kín của các mối nối ngoại trừ mối nối giữa phễu chiết và bình cầu. Kẹp chặt tất cả các bộ phận để hoàn toàn kín trong quá trình cất mẫu.)

Cả hệ thiết bị như trong hình 1. bao gồm một bộ phận có thể tạo áp suất (A) tiếp hợp đầu vào (I) với ống cao su mềm. Thiết bị này có tác dụng gây ra một sức nén ở phía trên dung dịch. Không nên sử dụng phễu nhỏ giọt cân bằng áp suất vì phần ngưng tụ có thể chứa  $SO_2$  bị lắng lại trong phễu và các nhánh. Phễu chiết (B) có thể tích  $\geq 100$ ml. Bình cầu II (C), 3 có 24/40. Ống sục khí (D) có chiều dài vừa đủ để khí Nitơ (hoặc Argon) sục vào

cách đáy bình cầu 2,5cm. Cột ngưng tụ (E) dài 300mm. Bộ phận bẫy khí (F) có kích thước như hình vẽ (hình 2). Ống (G) đựng dung dịch  $H_2O_2$  đường kính 2,5cm, sâu 18cm.

b) Buret 10ml

c) Hệ nước làm lạnh tuần hoàn



Hình 1: Thiết bị cất  $SO_2$

Hình 2. Bộ phận dẫn khí  $SO_2$  vào bình bẫy khí G (đ/v dài mm)

## I.2. Hóa chất:

a) Dung dịch HCl 4M : chuẩn bị cho mỗi lần thí nghiệm: thêm 30ml HCl vào 60ml nước khử ion.

b) Chỉ thị methyl đỏ : hòa tan 250 mg methyl đỏ trong 100ml ethanol

c) Dung dịch chuẩn 0,010M NaOH

d) Dung dịch  $H_2O_2$  3%: chuẩn bị cho mỗi lần thí nghiệm: pha loãng 3ml  $H_2O_2$  30% thành 30ml dung dịch bằng nước cất ngay trước khi sử dụng thêm 3 giọt methyl đỏ và chuẩn độ bằng NaOH 0,010M cho đến điểm vàng tương đương.

e) Khí  $N_2$  (hoặc Ar): Độ sạch cao có van điều hoà luôn giữ tốc độ khí 200 ml/phút.

f) Dung dịch thuốc thử sunphate:

2,5g gelatin + 600ml nước cất, đun cho tan ở  $40^\circ C$

Thêm 60ml HCl 1N

Thêm 20g  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$

Lọc, định mức bằng nước cất đến 1000ml

g) Dung dịch chuẩn sunphate: Hòa tan 1,479g  $Na_2SO_4$  trong nước cất và định mức đến 100ml.

### 1.3. Chuẩn bị mẫu:

- Mẫu rắn: Cân 50g thực phẩm, hoặc một lượng mẫu chứa 500 – 1500g  $\text{SO}_2$  vào máy chế biến hoặc máy trộn. Thêm 100ml ethanol – nước (5+95 theo thể tích) và nghiền trộn nhanh. Nghiền trộn cho đến khi thực phẩm đã được cắt thành các miếng nhỏ đủ để cho vào bình cầu.
- Mẫu dung dịch : Trộn 50g phần mẫu hoặc một lượng thức ăn chứa 500 – 1500g  $\text{SO}_2$ , với 100ml ethanol – nước (5+95 v/v)

(Chú ý phải chuẩn bị mẫu và làm thí nghiệm nhanh để tránh làm thất thoát lượng sulfite ở dạng không bền)

**1.4. Chuẩn bị hệ cất:** Sử dụng các thiết bị đồng bộ như hình vẽ, đặt bình cầu (C) vào bếp điện có rơ le điều nhiệt, và thêm 400ml nước. Đóng van của phễu chiết và thêm 90ml HCl 4M vào phễu chiết (B). Bắt đầu sục khí  $\text{N}_2$  với tốc độ  $(200 \pm 10)$  ml/phút. Đồng thời cho nước làm lạnh cột ngưng tụ. Cho 30ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  loãng đã chuẩn độ bằng NaOH 0,010M tới điểm tương đương vàng với chỉ thị metyl đỏ vào bình bẫy khí (G). Sau 15 phút, khi toàn bộ hệ và nước đã được đuổi oxy ta có thể đưa mẫu đã chuẩn bị vào hệ cất.

**1.5. Đưa mẫu vào và cất:** Lấy phễu chiết (B) ra và đưa toàn bộ lượng mẫu trong dung dịch ethanol vào bình cầu (C). Lau sạch miệng bình cầu và nhanh chóng bịt mỡ chân không lên đầu ra của phễu chiết và lắp phễu chiết nối vào bình cầu. Khí  $\text{N}_2$  lại tiếp tục chảy qua dung dịch  $\text{H}_2\text{O}_2$  ngay sau khi phễu chiết nối trở lại với bình cầu. Kiểm tra lại các mối nối cho thật kín.

Sử dụng quả bóp cao su gắn với van để cấp sức ép (áp suất) lên trên dung dịch HCl trong phễu chiết. Mở van phễu chiết và để HCl chảy vào bình cầu. Tiếp tục tạo sức ép trên dung dịch axit để đẩy hết dung dịch vào bình cầu. Nếu cần thiết có thể đóng van lại để bơm khí ép lên trên axit, sau đó lại mở ra. Đóng van lại trước khi 2-3 ml cuối cùng ở phễu chiết chảy xuống bình cầu để tránh khí  $\text{SO}_2$  thoát lên phễu chiết.

Cấp nhiệt cho bình cầu. Giữ nhiệt ở mức sao cho 80 - 90 giọt /phút chất ngưng tụ chảy xuống bình cầu từ cột ngưng tụ. Đun sôi trong 1,7h, sau đó lấy bình bẫy khí (G) thu được ra khỏi hệ.

### 2. Xác định:

- Phương pháp chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,010 M

Chuẩn tức khắc lượng sunphat trong bình (G) với NaOH 0,010M đến điểm tương đương màu vàng giữ bền khoảng 20 giây. Tính hàm lượng sulfite, biểu diễn bằng  $\mu\text{g SO}_2/\text{g}$  thực phẩm (ppm) như sau:

$$\text{SO}_2, \mu\text{g/g (ppm)} = 32,02 \times V_B \times M \times 1000 / A_g$$

ở đây 32,02 = mili đương lượng gam của  $\text{SO}_2$ ;  $V_B$  = thể tích (ml) NaOH chuẩn đã dùng đến điểm tương đương; M = nồng độ mol NaOH; 1000 = hệ số chuyển đổi mili đương lượng sang micro đương lượng;  $A_g$  = lượng cân của mẫu cho vào bình cầu cất 1 lít.

- Phương pháp đo quang:

15ml dung dịch mẫu chiết + 5ml dung dịch thuốc thử sunphate, lắc đều

Mẫu trắng : 15ml nước cất + 5ml thuốc thử sunphate, lắc đều

Đo tại bước sóng 490 nm

Lập đường chuẩn : Dùng pipet hút dung dịch sulfate chuẩn theo thứ tự sau : 0, 2, 4, 6, 8, 10 thêm nước cất để có thể tích 15 ml, thêm tiếp vào mỗi bình 5 ml thuốc thử sunphat.

Lắc đều, đo tại bước sóng 490nm

Đường chuẩn phải đảm bảo  $r = 0.998$

### 3. Độ lặp lại của phương pháp:

Trước khi đưa phương pháp vào sử dụng tiêu chuẩn đòi hỏi quy trình xác định hàm lượng sulfite trong thực phẩm phải được thực hiện một cách thông dụng, thuận thực và chính xác. Phép phân tích được tiến hành sao cho không mất một lượng sulfite nào do quá trình oxy hoá hoặc phản ứng kết hợp với thành phần khác trong thực phẩm. Do sulfite rất nhạy với không khí cũng như bản chất tự nhiên trong thực phẩm và không bền, nên những phân tử sunphit thêm vào mẫu phải lấy từ nguồn sulfite bền, ổn định và không phải là sulfite natri hoặc muối tương tự. Muối natri hydroxymethyl sunphonate (HMS), là sản phẩm của phản ứng cộng bisunphit của formaldehyd, có cấu trúc tương tự như một số dạng liên kết của sulfite trong thực phẩm, được sử dụng để gia công vật liệu (mẫu giả) thử bền.

Để phân tích, đem cân 50 gam mẫu thực phẩm có sulfite tự do đã gia công cho vào bình cất Monier – Williams. Thêm dung dịch muối Na của HMS. Phân tích ngay dung dịch cất được. Hàm lượng của HMS thu hồi là  $\geq 80\%$  từ thực phẩm bền (mẫu giả) có hàm lượng sulfite cỡ 10  $\mu\text{g/g}$  cho phép kết luận số liệu phân tích đảm bảo độ chính xác.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

Với mục đích xây dựng một phương pháp tiêu chuẩn cấp viện chuyên ngành, tiến tới đề nghị lên cấp cao hơn nên chúng tôi đã tìm hiểu chủ yếu các tài liệu về phương pháp tiêu chuẩn Việt nam và quốc tế. Việt Nam chúng tôi dựa vào TCVN của Trung tâm Đo lường tiêu chuẩn. Cho đến năm 2001, TCVN cho  $\text{SO}_2$  chỉ mới có tiêu chuẩn xác định sulfite trong đường [TCVN 6329:2001, 3]. Nguyên tắc của phương pháp là so màu Rosanilin. Phương pháp này cũng được chúng tôi áp dụng thử nghiệm, nhưng kết quả không thể thực hiện được vì một yếu tố ảnh hưởng rất cơ bản là màu tự nhiên của các gia vị, hương liệu. Còn quốc tế chúng tôi dựa chủ yếu vào AOAC và yêu cầu của Hiệp hội hương liệu và gia vị Mỹ và EU. Sau một thời gian thử nghiệm nhiều giải pháp khác nhau, chúng tôi đã tìm được một quy trình đó là kết hợp giữa phương pháp chuẩn “Monier – Williams tối ưu” của AOAC 990.28 và phương pháp đo quang hoặc sắc ký ion trong phép xác định để so sánh những kết quả thu được.

Như quy trình đã nêu ở phần trên, cho thấy một khâu hết sức quan trọng là tìm được điều kiện cất hồi lưu sao cho hiệu suất thu hồi tối đa nhất. Theo đúng quy chuẩn của AOAC chúng tôi đã dùng muối natri hydroxyl metyl sunphonat (HMS) thêm vào mẫu que trước khi cất (chỉ tiết như phần 2.7). Những kết quả thu được chúng tôi đã trích dẫn một số trong bảng 1.

Bảng 1. Hiệu suất cất  $\text{SO}_2$  trong các mẫu que

TT	Ký hiệu mẫu	$\text{SO}_2$ thêm	$\text{SO}_2$ đo được	Hiệu suất cất (%)
1	MQ 01	0 ppm	10,50	
2	MQ 01	5 ppm	13,75	65
3	MQ 01	10 ppm	17,45	70
3	MQ 01	15 ppm	24,00	90
4	MQ 01	20 ppm	27,65	85

Sau nhiều thời gian vừa nghiên cứu vừa làm mẫu chúng tôi đã rút ra được một số điều kiện cho các mẫu gia vị: mẫu khô phải được gia công thành bột mịn, lượng mẫu cân tối thiểu 50g, thời gian cất 3h, dung dịch thu mẫu có nồng độ 9%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Còn đối với các mẫu thực phẩm khác ở các dạng tự nhiên khác nhau thì quy trình gia công mẫu trước khi cho vào bình cất sẽ được thực hiện như quy trình mục 1.3.

**Bảng 2. Những kết quả  $SO_4^-$  ( $SO_2$ ) trong mẫu quế xuất khẩu định lượng bằng đo quang và sắc ký ion**

TT	Ký hiệu	$SO_4^-$ /ĐQ	$SO_4^-$ /IC	TT	Ký hiệu	$SO_4^-$ /ĐQ	$SO_4^-$ /IC
1	MS 01	10,20	10,45	8	MS 08	10,47	11,25
2	MS 02	12,30	12,00	9	MS 09	11,25	12,10
3	MS 03	11,42	12,10	10	MS 10	11,94	12,25
4	MS 04	12,24	13,00	11	MS 11	11,43	12,30
5	MS 05	12,30	12,60	12	MS 12	10,23	11,00
6	MS 06	11,10	11,60	13	MS 13	12,45	11,80
7	MS 07	10,20	10,80	14	MS 14	10,80	11,25

Mặc dù hai phương pháp có độ lặp lại tương đối cao, nhưng về thời gian xác định thì nếu áp dụng phương pháp sắc ký ion mỗi mẫu phải cần ít nhất 30 phút. Vì vậy chúng tôi chỉ áp dụng trong trường hợp kiểm tra kết quả, còn để phân tích mẫu chúng tôi định lượng bằng phương pháp đo quang.

Dưới đây là hình ảnh toàn bộ hệ cất  $SO_2$  trong gia vị, hương liệu của chúng tôi đã lắp đặt tại phòng thí nghiệm. Trong trường hợp xây dựng phòng thí nghiệm chuyên dụng ta có thể nhân các đơn nguyên trên thành những hệ 5 – 10 bộ mới có thể đáp ứng kiểm tra nhiều lô hàng một lúc. Trong bảng 3 dưới đây là một số kết quả phân tích  $SO_2$  trong quế “sinh thái” xuất khẩu thực hiện trên hệ thiết bị trong hình 3.

**Bảng 3. Hàm lượng  $SO_2$  trong một số mẫu quế “sinh thái”**

TT	Ký hiệu	$SO_2$ (TB của 3 lần đo) ( $\mu\text{g/g} = \text{ppm}$ )	TT	Ký hiệu	$SO_2$ (TB của 3 lần đo) ( $\mu\text{g/g} = \text{ppm}$ )
1	927	2.32	5	931	1.10
2	928	1.38	6	932	1.36
3	929	1.29	7	933	1.45
4	930	1.47	8	934	1.03

Qua thực tế áp dụng quy trình đã xây dựng cho hai loại gia vị: quế, gừng các kết quả đều được các phòng thí nghiệm của đối tác chấp nhận. Ngoài ra chúng tôi cũng được các chủ hàng thông báo đã kiểm tra chéo với phòng thí nghiệm ở Đức, Nhật và kết quả đều nằm trong sai số cho phép.

#### IV. KẾT LUẬN

Với tinh thần chuẩn bị gia nhập WTO, việc xây dựng các quy chuẩn phù hợp theo yêu cầu của quốc tế là rất cần thiết. Quy trình xác định  $SO_2$  trong hương liệu, gia vị cũng có thể áp dụng cho các sản phẩm rau quả khô như: táo, nho, cũng như các loại nước quả ép, các sản phẩm giàu protein v.v. Các tác giả của báo cáo này hy vọng thông qua Hội nghị Khoa học Kỹ thuật Đo lường Việt Nam lần thứ tư những quy trình phân tích tiêu chuẩn cơ sở của mình sẽ được xét đề nghị xây dựng thành TCVN.

**Tài liệu tham khảo:**

1. Regulation (EC) No. 853/2004 of the European parliament and the Council of 29 April 2004, laying down specific hygiene rules for food of animal origin p. 58/61
2. Dr. William Horwitz, Editor Official Methods of Analysis of AOAC International, 17 th Edition . Vol. II, chapter 47. p. 29 – 30.
3. Một số phương pháp thế giới đã áp dụng để phân tích SO<sub>2</sub> (sunphit) trong thực phẩm
  - Alert for Sulfites Kit (Neogen, 1998)
  - Sulfites in foods, Optimized Monier-Williams method (AOAC, 1995j).
  - EM Quant Sulfitest Strips (Center Laboratories, Port Washington, New York; Nordlee et al., 1988).
  - Ion chromatography (Cooper et al., 1985).
  - Ion chromatography (Cooper et al., 1986).
  - Alkali titration method (Yamagata and Low, 1992a).
  - Colorimetric method (Yamagata and Low, 1992b).
  - Determination of sulphites and borates in imported frozen prawns, frozen shrimps and salted jelly fish (Ogawa et al., 1978).
  - Comparison of sulfite methods (DeWitt and Finne, 1985).
  - DIONEX, Application Note 54 "Determination of Sulfite in Food and Beverages by Ion Exclusion Chromatography with Pulsed Amperometric detection.
4. TCVN 6329:2001
  - Đường trắng – Xác định sunphit bằng phương pháp so màu Rosanilin – Phương pháp chính thức. Hà Nội - 2001
5. TCVN 6328 : 1997, Đường xác định sunphua dioxit, Hà Nội – 1997.