

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH ĐIỆN HÓA VÀ XÁC ĐỊNH PONCEAU 4R TRONG MẪU NƯỚC GIẢI KHÁT BẰNG PHƯƠNG PHÁP VON-AMPE HÒA TAN ANOT HẤP PHỤ XUNG VI PHÂN

Đến tòa soạn 19-04-2023

Lê Thị Hương Giang, Nguyễn Ngọc Ánh, Hoàng Thi Hoa, Nguyễn Mùa Xuân, Đặng Minh Hương Giang, Nguyễn Thị Sơn, Bùi Xuân Thành, Tạ Thị Thảo, Nguyễn Thị Kim Thường*

Khoa Hóa học, Trường Đại Học Khoa học Tự Nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

* Email: kimthuongbibi@gmail.com

SUMMARY

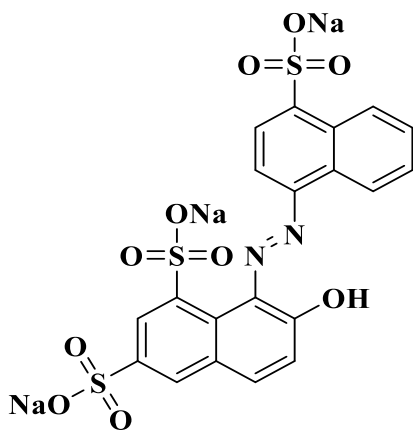
ELECTROCHEMICAL STUDY OF PONCEAU 4R AND ITS DETERMINATION IN SOFT DRINK BY DIFFERENTIAL PULSE ADSORPTIVE ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRY

The electrochemical behavior of ponceau 4R on the gold electrode modified with silver and reduced graphene oxide (Ag/rGO/AuE) has been investigated by cyclic and differential pulse adsorptive anodic stripping voltammetry. The electrochemical reaction was reversible and adsorptive on the surface of Ag/rGO/AuE. The optimal conditions to determine ponceau 4R were pH = 2, adsorption potential 0.3 V, adsorption time 30 s, scan rate 0.025 V/s, linear range from 5.0×10^{-8} M to 2.5×10^{-7} M. The limits of detection and quantification were 1.5×10^{-8} M and 5×10^{-8} M, respectively. The developed method was successfully applied for determination of ponceau 4R in soft drinks samples.

Keyword: Voltammetry, Ag-ErGO/GCE, reduced graphene oxide, Ponceau 4R.

1. MỞ ĐẦU

Ponceau 4R là thuốc nhuộm azo màu đỏ được sử dụng để tạo màu thực phẩm có tên thương mại là E124. Ponceau 4R có công thức phân tử $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ và công thức cấu tạo như hình 1.



Hình 1: Công thức cấu tạo của ponceau 4R

Ponceau 4R có màu đỏ, là màu thực phẩm khá phổ biến thường được thêm vào nhiều loại đồ uống và thực phẩm như kẹo, thạch, các loại đồ hộp, bánh ngọt, nước giải khát... Tuy nhiên, nếu sử dụng ponceau 4R không rõ nguồn gốc, lạm dụng, quá liều lượng cho phép sẽ ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người như dị ứng, tăng động và giảm khả năng tập trung ở trẻ em, hen suyễn, ung thư... Vì vậy, năm 2009, hiệp hội an toàn thực phẩm Châu Âu đã giảm lượng Ponceau 4R thêm vào từ 4,0 xuống 0,7 mg/kg tỷ trọng cơ thể trong một ngày [1]. Một số nước như Na Uy, Thụy Điển, Phần Lan cấm sử dụng ponceau 4R trong thực phẩm.

Tại Việt Nam, theo thông tư số 24/2019/TT-BYT đã quy định mức sử dụng tối đa ponceau 4R trong thực phẩm là 50 đến 300 mg/kg tùy từng sản phẩm [2]. Vì vậy, việc nghiên cứu phát triển phương pháp xác định hàm lượng ponceau 4R trong thực phẩm là cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Hiện nay, có một số phương pháp đã được

nghiên cứu để xác định ponceau 4R như phương pháp quang phổ [3], phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao [4,5], phương pháp Von-ampe hòa tan [6,7,8]. Trong đó, phương pháp Von-ampe hòa tan cho kết quả phân tích với độ nhạy, độ lặp lại và độ chọn lọc cao, quy trình phân tích đơn giản, nhanh và chi phí thấp. Vì vậy, chúng tôi đã lựa chọn phương pháp von-ampe để xác định ponceau 4R trong nước giải khát.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị

Các kết quả nghiên cứu được đo trên thiết bị phân tích điện hóa Metrohn 663 VA stand Autolab có ghép nối với máy tính và phần mềm điều khiển. Hệ đo gồm 3 điện cực: Điện cực so sánh là điện cực bạc clorua Ag/AgCl/KCl 3M; Điện cực phụ trợ là thanh cacbon; Điện cực làm việc là điện cực vàng biến tính bạc và graphene oxit dạng khử.

2.2. Hoá chất

Tất cả các hóa chất sử dụng trong quá trình phân tích là tinh khiết phân tích (p.A, Merck). Chất chuẩn ponceau 4R 85%.

Dung dịch chuẩn ponceau 4R 10^{-3} mol.L $^{-1}$: Hòa tan 35,6 mg ponceau 4R 85 % vào bình định mức 50,0 mL, thêm nước cất 2 lần, lắc đều cho đến tan hết và định mức đến vạch được dung dịch có nồng độ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$. Dung dịch chuẩn được bảo quản trong lọ màu nâu ở 5°C. Các dung dịch chuẩn có nồng độ nhỏ hơn được pha hàng ngày.

Dung dịch đệm Britton-Robinson được pha từ hỗn hợp axit H₃PO₄, H₃BO₃, CH₃COOH và NaOH.

2.3. Quy trình tổng hợp graphene oxide

Cho 0,500 g bột graphite vào 60 mL dung dịch H₂SO₄ 98% và H₃PO₄ 85% (9:1), khuấy đều hỗn hợp trong dung dịch nước đá muối ở nhiệt độ dưới 10°C. Thêm 0,010 g H₃BO₃ để ổn định môi trường để phản ứng xảy ra êm dịu.

Thêm từ từ 3,0 g KMnO₄ vào hỗn hợp phản ứng, sau đó gia nhiệt lên 35°C duy trì phản ứng trong 3 giờ. Sau đó thêm từ từ 30 mL H₂O, gia nhiệt lên 98°C trong 15 phút để phản ứng oxi hóa xảy ra hoàn toàn, rồi để nguội ở nhiệt độ phòng. Thêm từ từ H₂O₂ để xử lý KMnO₄ dư. Sau đó li tâm và sấy ở nhiệt độ 60°C trong 6 giờ.

2.4. Quy trình biến tính điện cực

Graphite oxide (1 mg/1mL) được phân tán trong nước cất hai lần chứa AgNO₃ 0,01 M, rung siêu âm 60 phút được dung dịch Ag⁺-GO.

Điện cực than gương được biến tính bằng phương pháp khử điện hóa với các điều kiện: Hệ đo được đặt trong dung dịch chứa ion bạc và graphene oxide, thế điện phân -1,5 V, thời gian điện phân 60 s, ghi 15 đường von-ampe vòng từ -1,5 V đến 0 V với tốc độ quét 0,03 V/s. Sau đó, tráng cẩn thận hệ điện cực bằng nước cất, được điện cực làm việc là Ag-ErGO/AuE và sử dụng để xác định ponceau 4R trong mẫu thực phẩm.

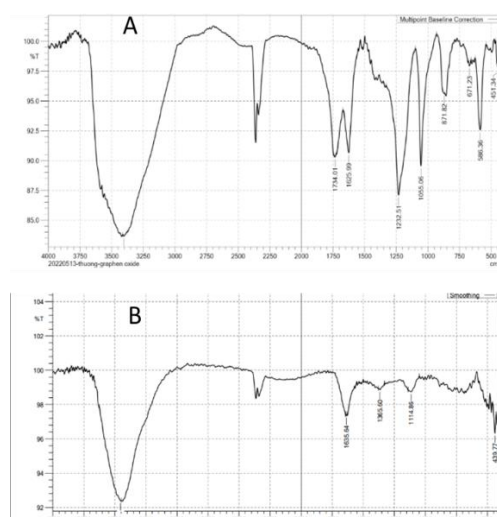
2.5. Quy trình xác định ponceau 4R trong mẫu nước giải khát.

Hút 5,0 mL mẫu vào cốc, thêm 15,0 mL nước cất đem rung siêu âm trong 10 phút rồi định mức vào bình 50,0 mL thu được dung dịch A. Hút V mL dung dịch A cho vào bình định mức 50,0 mL, thêm 10,0 mL dung dịch đệm Britton - Robinson pH = 2,0 và định mức đến vạch. Cho mẫu vào bình điện hóa và tiến hành đo với các điều kiện đã được tối ưu. Hàm lượng ponceau 4R trong dung dịch đo được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phổ hồng ngoại của vật liệu graphene oxide và graphene oxide dạng khử.

Graphene oxide sau khi tổng hợp được theo quy trình 2.3 và graphene oxide dạng khử theo quy trình 2.4 được đo phổ FT-IR để nghiên cứu cấu trúc của vật liệu. Kết quả đo phổ FT -IR được biểu diễn hình 2.



Hình 2. Phổ FT-IR của graphene oxide (A) và graphene oxide dạng khử (B)

Qua quá trình oxi hóa, các nhóm chức epoxy, -OH, -COOH, được gắn vào cấu trúc của graphite tạo thành graphene oxide. Kết quả phổ FT-IR ở

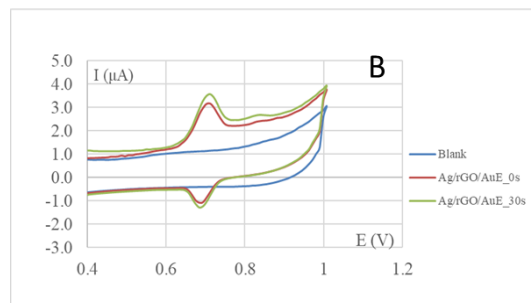
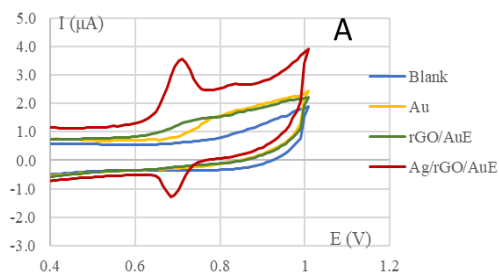
hình 2A cho thấy peak tại 3420 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của nhóm -OH trong -COOH hoặc C-OH phenol. Peak tại 1734 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm cacbonyl (C=O) hoặc cacboxyl. Peak tại 1625 cm^{-1} có thể là C=C của khung sườn cacbon. Các peak sóng từ $1000 - 1300\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với dao động C-OH của nhóm hydroxyl và C-O của epoxy. Trong khi đó phổ FT-IR của graphene oxide dạng khử thì các peak của nhóm chức có chứa oxi đã biến mất (hình 2B), chứng tỏ phương pháp khử điện hóa đã khử được oxi của graphite oxide trên bề mặt điện cực vàng. Điện cực vàng được biến tính bằng graphene oxide dạng khử đã tăng được khả năng dẫn điện, tăng khả năng trao đổi điện tích trên bề mặt điện cực nên cường độ dòng đo được tăng.

3.2. Nghiên cứu đặc tính điện hóa ponceau 4R

Đặc tính điện hóa của ponceau 4R được nghiên cứu bằng phương pháp von-ampe vòng (CV) sử dụng điện cực vàng (Au), điện cực vàng biến tính graphene oxide dạng khử (rGO/AuE), điện cực vàng biến tính graphene oxide dạng khử và bạc (Ag/rGO/AuE) với các điều kiện: Nồng độ ponceau 4R $5.10^{-5}\text{ mol/L}^{-1}$, dung dịch đệm Britton - Robinson pH = 2, khoảng thế từ 0,4 V đến 1,2 V, thế hấp phụ 0 V, thời gian hấp phụ 30 s, tốc độ quét 0,03 V/s. Kết quả đo đường von-ampe vòng của ponceau 4R được biểu diễn hình 3A.

Hình 3A cho thấy, trên đường phân cực anot từ 0 V đến 1,2 V có peak oxi hóa xuất hiện tại thế 0,711 V, cường độ dòng 1,58 μA và trên đường phân cực catot từ 1,2 V đến 0 V có peak khử xuất hiện tại khoảng thế 0,684 V, cường độ dòng là 0,976 μA . Hiệu số thế đỉnh peak anot và catot là $\Delta E = E_{pa} - E_{pc} = 0,027 = 0,059/n$, tức là số electron trao đổi $n = 2$ là phù hợp. Như vậy, có thể kết luận rằng quá trình điện hóa ponceau 4R trên điện cực Ag-ErGO/AuE là quá trình thuận nghịch.

Mặt khác, đặc tính hấp phụ của ponceau 4R cũng được chứng minh khi đo đường von-ampe vòng với thời gian hấp phụ 30 s tại thế 0 V thì cường độ dòng peak oxi hóa tăng so với trường hợp đo không có thời gian hấp phụ (hình 3B). Đồng thời nhận thấy, cường độ dòng peak oxi hóa cao hơn cường độ dòng peak khử nên pic oxi hóa được chọn để nghiên cứu quy trình định lượng ponceau 4R trong mẫu nước giải khát.

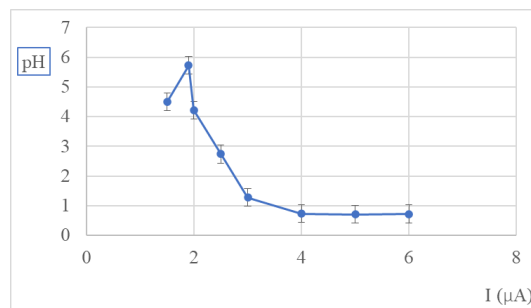


Hình 3: Đường CV của ponceau 4R $5 \times 10^{-5}\text{ M}$ với các điện cực khác nhau (A); điện cực Ag/rGO/AuE, thời gian hấp phụ 0 s và 30 s (B). Mẫu blank được ghi với điện cực Ag/rGO/AuE, thời gian hấp phụ 30 s.

3.3. Tối ưu hóa các điều kiện phân tích

3.3.1. Khảo sát ảnh hưởng của pH

Theo phương trình phản ứng điện hóa xảy ra trên bề mặt điện cực thì nồng độ H^+ có tham gia vào phản ứng điện hóa nên sẽ ảnh hưởng đến tín hiệu cường độ dòng và thế đỉnh peak, vì vậy cần khảo sát pH để tìm ra giá trị pH phù hợp cho tín hiệu cường độ dòng cao nhất. Kết quả đo cường độ dòng peak phụ thuộc vào pH được biểu diễn trên hình 4.

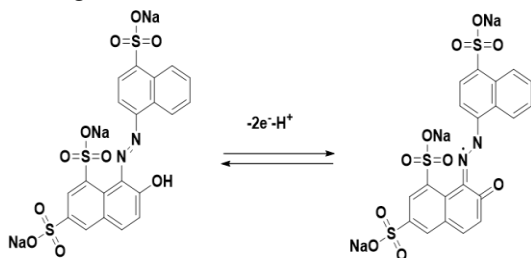


Hình 4. Sự phụ thuộc cường độ dòng vào pH (Điều kiện đo: Nồng độ ponceau 4R: 10^{-7} M . Khoảng thế 0 V-1 V, thế hấp phụ 0,3 V, thời gian hấp phụ 0 s, tốc độ quét 0,03 V/s).

Hình 4 cho thấy, tại pH = 2,0 thì cường độ dòng peak oxi hóa cao nhất. Khi pH > 2 thì cường độ

đồng peak bắt đầu giảm. Vì vậy, pH = 2,0 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Mặt khác, quan sát thể đỉnh peak cho thấy khi pH tăng thể dịch chuyển tuyến tính về thể âm hơn (vùng thể catot) theo phương trình $E_p = -0,029 \text{ pH} + 0,746$, chứng tỏ có sự tham gia 1 proton H^+ và trao đổi 2 electron vào phản ứng điện hóa. Phương trình phản ứng điện hóa trên điện cực vàng biến tính Ag/rGO/AuE như sau:



3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng thể hấp phụ và thời gian hấp phụ

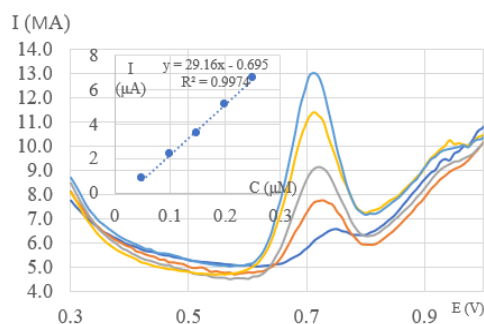
Độ nhạy và độ chọn lọc của phương pháp von-ampe hòa tan phụ thuộc vào thời gian làm giàu và thể làm giàu. Thời gian làm giàu phụ thuộc vào nồng độ chất trong dung dịch mẫu, loại điện cực và kiểu hấp phụ. Qua kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể hấp phụ trong khoảng từ 0 V đến 0,6 V thì tại thể hấp phụ 0,3 V cường độ dòng peak cao nhất, pic cân đối. Khi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian hấp phụ đến tín hiệu cường độ dòng kết quả cho thấy, với dung dịch mẫu có nồng độ ponceau 4R $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ thì khi tăng thời gian hấp phụ từ 0 đến 60 s thì cường độ dòng tăng tuyến tính, cường độ dòng đạt cực đại tại 60 s, khi thời gian hấp phụ lớn hơn 60 s thì tín hiệu cường độ dòng bắt đầu giảm. Điều này có thể giải thích khi thời gian hấp phụ lớn hơn 60 s thì hiện tượng hấp phụ đa lớp đã hình thành trên bề mặt điện cực gây khó khăn cho quá trình hòa tan chất nên tín hiệu cường độ dòng giảm. Vì thế, thời gian hấp phụ 30 s được lựa chọn để xác định ponceau 4R.

3.4. Đánh giá phương pháp phân tích

3.4.1. Khoảng tuyến tính

Đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ từ $5,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ đến $2,5 \times 10^{-7} \text{ M}$ với các điều kiện đo phù hợp: dung dịch đệm Britton – Robinson pH = 2,0; thể hấp phụ + 0,3 V; thời gian hấp phụ 30 s, tốc độ quét 50 mV/s, khoảng quét thể từ 0,3 V đến 1,0 V. Sự phụ thuộc cường độ dòng peak vào nồng độ ponceau 4R theo phương trình (hình

5): $I (\mu\text{A}) = 29,16 \times C_x \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1} - 0,695$, hệ số tương quan $R^2 = 0,9974$.



Hình 5. Sự phụ thuộc cường độ dòng vào nồng độ ponceau 4R từ $5,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ đến $2,5 \times 10^{-7} \text{ M}$

3.4.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Dựa vào đường chuẩn sự phụ thuộc của tín hiệu cường độ dòng vào ponceau 4R, giới hạn phát hiện (LOD) là $1,5 \times 10^{-8} \text{ M}$ và giới hạn định lượng (LOQ) là $5,0 \times 10^{-8} \text{ M}$.

3.4.3. Độ lặp lại

Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá thông qua việc đo lặp lại 10 lần dung dịch 10^{-7} M với các điều kiện đã được tối ưu. Độ lệch chuẩn của phương pháp (RSD) là 1,75 % (n = 10), chứng tỏ phương pháp phát triển có độ lặp lại tốt, có thể ứng dụng để phân tích mẫu thực tế.

3.4.4. Độ thu hồi

Độ đúng của phương pháp được đánh giá qua độ thu hồi. Để xác định độ thu hồi của phương pháp ta tiến hành thêm chuẩn trên nền mẫu trắng có thành phần gần giống mẫu thực (nước giải khát 7 up), không chứa ponceau 4R. Chất chuẩn được thêm vào mẫu nước giải khát, tiến hành theo quy trình mục 2.5. Độ thu hồi tại các mức nồng độ $6 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, $10 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, $14 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, $18 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ dao động trong khoảng từ 90,0 % đến 100,2 % chứng tỏ phương pháp có độ thu hồi tốt, có thể áp dụng cho phân tích mẫu thực với độ chính xác cao.

3.5. Áp dụng phân tích mẫu nước giải khát

Quy trình xử lý mẫu theo mục 2.5 đã được khảo sát. Hàm lượng ponceau 4R trong mẫu được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn và mẫu được đem đo đối chứng với phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), kết quả được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: Kết quả phân tích hàm lượng ponceau 4R trong mẫu nước giải khát

TT	Tên mẫu*	Hàm lượng ponceau 4R (mg/kg)	
		AdSV	HPLC
1	RB	1,57	1,83
2	LVD	1,62	1,51
3	ST	<0,01	<0,30
4	ORF	<0,01	<0,30

* Tên mẫu đã được mã hóa

Như vậy, qua kết quả phân tích mẫu thực tế cho thấy trong các mẫu nước giải khát có ghi thành phần ponceau 4R trên nhãn đều có xuất hiện peak của ponceau 4R. Hàm lượng ponceau 4R trong mẫu đều nhỏ hơn tiêu chuẩn cho phép của Bộ Y tế (thông tư số 24/2019/TT-BYT đã quy định mức sử dụng tối đa ponceau 4R trong đồ uống, bánh “thể thao”, “năng lượng” hoặc “điện giải” là 50 mg/kg) [2]. Đối chiếu với quy định cho phép, mẫu RB và LVD có phát hiện hàm lượng ponceau 4R trong mẫu nhưng nhỏ giới hạn cho phép. Kết quả phân tích hàm lượng ponceau 4R là phù hợp, không khác nhau có ý nghĩa thống kê với phương pháp HPLC.

KẾT LUẬN

Ponceau 4R có đặc tính oxi hóa thuận nghịch trên điện cực vàng biến tính bằng bạc và graphene oxide dạng khử. Đặc tính của vật liệu graphene oxide và graphene oxide dạng khử đã được chứng minh bằng phổ FT-IR.

Đã tối ưu hóa được các điều kiện xác định ponceau 4R trong mẫu nước giải khát bằng phương pháp von-ampe hòa tan hấp phụ xung vi phân. Phương pháp được đánh giá có độ nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao, có thể áp dụng để phân tích hàm lượng ponceau 4R trong các mẫu thực phẩm.

CẢM ƠN TÀI TRỢ:

“Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài QG 22.16. của ĐHQGHN”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Abbey, B. Fields, M. O'Mullane, and L. D. Tomaska, (2014). Food Additives: Colorants. *Encycl. Food Saf.*, **2**, 459-465.
- [2] Bộ Y tế, Thông tư số 24/2019/TT-BYT ngày 30 tháng 8 năm 2019 thông tư Quy định về quản lý và sử dụng phụ gia thực phẩm, Hà Nội, 2019.
- [3] S. Altinöz and S. Toptan, (2003). Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry. *J. Food Compos. Anal.* **16(4)**, 517-530.
- [4] M. Iammarino, A. Mentana, D. Centonze, C. Palermo, M. Mangiacotti, and A. E. Chiaravalle, (2019). Simultaneous determination of twelve dyes in meat products: Development and validation of an analytical method based on HPLC-UV-diode array detection. *Food Chem.* **285(1)**, 1-9.
- [5] F. Martin, J. M. Oberson, M. Meschiari, and C. Munari, (2016). Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS in selected matrices. *Food Chem.* **197**, 1249-1255.
- [6] S. Chanlon, L. Joly-Pottuz, M. Chatelut, O. Vittori, and J. L. Cretier, (2005). Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography. *J. Food Compos. Anal.*, **18(6)**, 503-515.
- [7] J. Zhang, M. Wang, C. Shentu, W. Wang, and Z. Chen, (2014). Simultaneous determination of the isomers of Ponceau 4R and Amaranth using an expanded graphite paste electrode. *Food Chem.*, **160**, 11-15.
- [8] X. Yang, H. Qin, M. Gao, and H. Zhang, (2011). Simultaneous detection of Ponceau 4R and tartrazine in food using adsorptive stripping voltammetry on an acetylene black nanoparticle-modified electrode. *J. Sci. Food Agric.*, **91(15)**, 2821-2825.