

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10032:2013

EN 1378:1996

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH ASPARTAME
TRONG CÁC CHẾ PHẨM TẠO NGỌT –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Foodstuffs – Determination of aspartame in table top sweetener preparations –
Method by high performance liquid chromatography*

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 10032:2013 hoàn toàn tương đương với EN 1378:1996;

TCVN 10032:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13
Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn
Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm – Xác định aspartame trong các chế phẩm tạo ngọt – Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

*Foodstuffs – Determination of aspartame in table top sweetener preparations –
Method by high performance liquid chromatography*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định aspartame có trong các chế phẩm tạo ngọt.

Phép thử liên phòng thử nghiệm được tiến hành trên các viên tạo ngọt [1].

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Nguyên tắc

Xác định aspartame trong dung dịch chế phẩm tạo ngọt thích hợp trong nước bằng HPLC, sau đó phát hiện bằng đo quang trong dải UV. Việc nhận biết aspartame dựa vào thời gian lưu và xác định bằng phương pháp ngoại chuẩn sử dụng diện tích pic hoặc chiều cao pic.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các loại thuốc thử tinh khiết phân tích và nước ít nhất là loại 1 theo TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác.

TCVN 10032:2013

4.1 Chất chuẩn aspartame, có hàm lượng tối thiểu 98 % tính theo chất khô và không lớn hơn 102 % (xem 6.2). Hao hụt khối lượng khi sấy không vượt quá 4,5 %. Chất chuẩn này phải tinh khiết dùng cho sắc kí, được bảo quản nơi thoáng mát và khô.

CHÚ THÍCH Để biết thêm thông tin về việc nhận biết và độ tinh khiết, xem [2].

4.2 Dung dịch kali dihydro orthophosphat, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,0125 \text{ mol/l}^{1)}$.

4.3 Metanol, thích hợp dùng cho phân tích HPLC.

4.4 Axit orthophosphoric.

4.5 Pha động dùng cho HPLC

Trộn 70 phần thể tích dung dịch kali dihydro orthophosphat (4.2) với 30 phần thể tích metanol (4.3), rồi chỉnh pH đến 4,5 bằng axit phosphoric (4.4). Loại bỏ phần hạt bằng bộ lọc màng (5.2).

Sau khi tiến hành phương pháp này, cần bơm nước qua thiết bị HPLC để tránh bị ăn mòn do tiếp xúc lâu dài với chất rửa giải có chứa phosphat cũng như tránh hiện tượng tắc nghẽn xảy ra do phosphat kết tủa.

4.6 Dung dịch chuẩn aspartame

Nghiền nhỏ ít nhất khoảng 1,5 g chất chuẩn aspartame (4.1), sau đó cân ngay khoảng 200 mg (m_1) chất chuẩn aspartame đã nghiền chưa sấy, chính xác đến 0,1 mg, rồi hòa tan trong pha động (4.5) trong bình định mức 1 000 ml (V_2), thêm pha động đến vạch.

Bảo quản chất chuẩn aspartame đã nghiền nhỏ còn lại. Tiến hành xác định ngay hao hụt khối lượng khi sấy (L_D) (xem 6.2)

Chuẩn bị dung dịch chất chuẩn trong ngày thử nghiệm.

Có thể sử dụng thêm các dung dịch có nồng độ nằm trong dải tuyến tính để dựng đường chuẩn.

Tính nồng độ khối lượng, ρ , của aspartame dạng khan, bằng miligam trên lít dung dịch chuẩn, theo Công thức (1):

$$\rho = \frac{m_1 \times (100 - L_D)}{100} \quad (1)$$

Trong đó:

m_1 là khối lượng chất chuẩn aspartame chưa sấy dùng cho dung dịch gốc, tính bằng miligam (mg);

L_D là hao hụt khối lượng sau khi sấy, tính bằng phần trăm (%).

¹⁾ c là nồng độ chất chuẩn

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

5.1 Bộ lọc, ví dụ bộ lọc chân không bằng thủy tinh gồm có đế thủy tinh thiêu kết (đường kính 50 mm), bầu chứa phía trên 250 ml và bình nón 1 lít, tất cả các bộ phận trên đều có các khớp nối thủy tinh mài.

5.2 Bộ lọc màng, thích hợp với pha động (4.5), cỡ lỗ $\leq 5 \mu\text{m}$.

5.3 Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao, gồm có bơm, bộ phận bơm mẫu, detector UV được cài đặt ở bước sóng khác nhau và có hệ thống đánh giá dữ liệu, ví dụ bộ ghi đồ thị hoặc bộ tích phân.

5.4 Cột phân tích pha đảo, ví dụ cột pha đảo C18, cỡ hạt 10 μm , đường kính 4 mm, chiều dài 250 mm.

Có thể sử dụng các cỡ hạt khác với quy định trong tiêu chuẩn này. Các thông số tách cần phù hợp với vật liệu sử dụng để đảm bảo các kết quả tương đương.

CHÚ THÍCH Số đĩa lý thuyết tối thiểu tại thể tích lưu của chất phân tích tốt nhất không nhỏ hơn 1 900 trong các điều kiện sắc kí được áp dụng.

6 Cách tiến hành

6.1 Xác định khối lượng trung bình viên tạo ngọt

Xác định khối lượng của ít nhất 20 viên tạo ngọt, chính xác đến 0,1 mg, rồi tính khối lượng trung bình của một viên.

CHÚ THÍCH Để tăng độ chính xác, nên sử dụng 100 viên tạo ngọt.

6.2 Xác định hao hụt khối lượng của chất chuẩn

Cân khoảng 1,0 g chất chuẩn aspartame (4.1) đã nghiền nhỏ còn lại, chính xác đến 0,1 mg. Sấy phần chất chuẩn này đến khối lượng không đổi ở $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ rồi cân để xác định hao hụt khối lượng khi sấy (L_D), tính bằng phần trăm.

6.3 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Hòa tan trong nước một lượng chế phẩm tạo ngọt đã nghiền nhỏ (m_0) tương đương với khoảng 400 mg aspartame (tương ứng với 20 lần khối lượng trung bình của một viên), sau đó chuyển vào bình định mức 200 ml, rồi thêm nước đến vạch. Pha loãng 20,0 ml dung dịch này đến 200,0 ml (V_1) bằng pha động (4.5), rồi lọc qua bộ lọc màng.

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử trong ngày phân tích.

TCVN 10032:2013

6.4 Nhận biết bằng HPLC

Nhận biết chất tạo ngọt cần xác định bằng cách so sánh thời gian lưu của mẫu với thời gian lưu của chất chuẩn hoặc bằng cách so sánh các đặc tính hấp thụ của mẫu với các đặc tính của chất chuẩn sau khi ghi lại đường hấp thụ hoặc thực hiện các phép đo ở các bước sóng khác nhau trong dải bước sóng thích hợp đối với cả mẫu thử và chất chuẩn.

CHÚ THÍCH 1 Nếu sử dụng cột tách (5.4) và pha động (4.5) thì các điều kiện thực nghiệm dưới đây (xem Hình A.1) được cho là thích hợp:

Tốc độ dòng 1,5 ml/min

Detector UV bước sóng 217 nm

Thể tích bơm 20 μ l

CHÚ THÍCH 2 Khi phát hiện ở bước sóng 210 nm, thì có thể đạt được độ nhạy cao hơn. Có thể có mặt các chất gây nhiễu như diketopiperazine hoặc phenylalamine do sự phân hủy aspartame.

6.5 Xác định bằng HPLC

Tiến hành xác định bằng phương pháp ngoại chuẩn, tích phân diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic và so sánh các kết quả với các giá trị tương ứng của chất chuẩn hoặc sử dụng đường chuẩn.

Bơm các thể tích bằng nhau của mẫu thử và dung dịch chuẩn.

CHÚ THÍCH Sắc kí đồ trong Hình A.1 sử dụng cột pha đảo C18, cỡ hạt 10 μ m, đường kính 4,0 mm, chiều dài 250 mm.

7 Biểu thị kết quả

7.1 Đánh giá bằng đồ thị (tùy chọn)

Dùng đường chuẩn các giá trị độ hấp thụ của dung dịch chất chuẩn aspartame (4.6) so với nồng độ aspartame, tính bằng miligam trên lít.

Đường chuẩn phải tuyến tính.

Đọc nồng độ aspartame, x , tương ứng với độ hấp thụ của dung dịch mẫu thử đọc từ đường chuẩn, tính bằng miligam trên lít.

7.2 Tính kết quả đối với phép đánh giá bằng đồ thị

7.2.1 Nếu tính kết quả dựa vào đường chuẩn thì tính phần khối lượng, w_1 , của aspartame dạng khan, bằng miligam trên kilogram chế phẩm tạo ngọt, theo Công thức (2):

$$w_1 = \frac{x \times 10^6 \times 2}{m_0} \quad (2)$$

Trong đó

x là nồng độ aspartame dạng khan trong dung dịch mẫu thử, đọc được từ đường chuẩn, tính bằng miligam trên lít (mg/l);

10^6 là hệ số chuyển đổi từ miligam sang kilogam;

m_0 là khối lượng ban đầu của mẫu, tính bằng miligam (mg).

7.2.2 Tính phần khối lượng, w_2 , của aspartame dạng khan, bằng miligam trên viên, theo Công thức (3):

$$w_2 = \frac{x \times m_2 \times 2}{m_0} \quad (3)$$

Trong đó:

m_2 khối lượng viên trung bình (6.1), tính bằng miligam (mg);

x, m_0 xem Công thức (2).

Có thể dùng cách tính khác sử dụng đường hồi quy.

7.3 Tính kết quả đối với phép phân tích thông dụng

7.3.1 Có thể tính kết quả dựa vào đường chuẩn hoặc dựa vào dải tuyến tính của hệ số đáp ứng đã xác định được đối với dung dịch chuẩn, các phép phân tích thông dụng và phép phân tích lặp lại.

Tính phần khối lượng, w_1 , của aspartame dạng khan, bằng miligam trên kilogam mẫu, theo Công thức (4) (phương pháp ngoại chuẩn):

$$w_1 = \frac{A_1 \times V_1 \times m \times 1000 \times F}{A_2 \times V_2 \times m_0} \quad (4)$$

Trong đó:

A_1 là diện tích pic hoặc chiều cao pic aspartame trong dung dịch mẫu thử, tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị đo chiều dài;

A_2 là diện tích pic hoặc chiều cao pic dung dịch chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị đo chiều dài;

V_1 là tổng thể tích dung dịch mẫu thử (xem 6.2), tính bằng mililit (ml), (trường hợp này là: 200 ml);

TCVN 10032:2013

V_2 là tổng thể tích dung dịch chuẩn (xem 4.6), tính bằng mililit (ml), (trường hợp này là: 1 000 ml);

m là khối lượng aspartame có trong V_2 , đã được hiệu chỉnh đối với hao hụt khối lượng khi sấy, tính bằng miligam (mg);

m_0 là khối lượng mẫu ban đầu của 20 viên, tính bằng gam (g);

F là hệ số pha loãng (trường hợp này là: 10);

Báo cáo kết quả sau khi làm tròn đến một chữ số thập.

7.3.2 Tính phần khối lượng, w_2 , aspartame dạng khan, bằng miligam trên viên, theo công thức:

$$w_2 = \frac{w_1}{2\,000} \times m_0 \quad (5)$$

Trong đó:

w_1, m_0 xem Công thức 4.

8 Độ chụm

Chi tiết phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp phù hợp với ISO 5725:1986 [3]²⁾ được nêu trong Phụ lục B.

Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và nền mẫu khác với các giá trị đã nêu trong Phụ lục B.

8.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ, trên vật liệu thử giống hệt nhau, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r .

Giá trị này là: $r = 0,66$ g/100 g đối với các viên aspartame có bán sẵn.

8.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong hai phòng thử nghiệm khác nhau, do những người phân tích khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R .

Giá trị này là: $R = 1,28$ g/100 g đối với các viên aspartame có bán sẵn.

²⁾ ISO 5725:1986 đã hủy và thay thế bằng bộ tiêu chuẩn ISO 5725 (gồm 06 phần) đã được chấp nhận thành bộ tiêu chuẩn TCVN 6910 (gồm 06 phần).

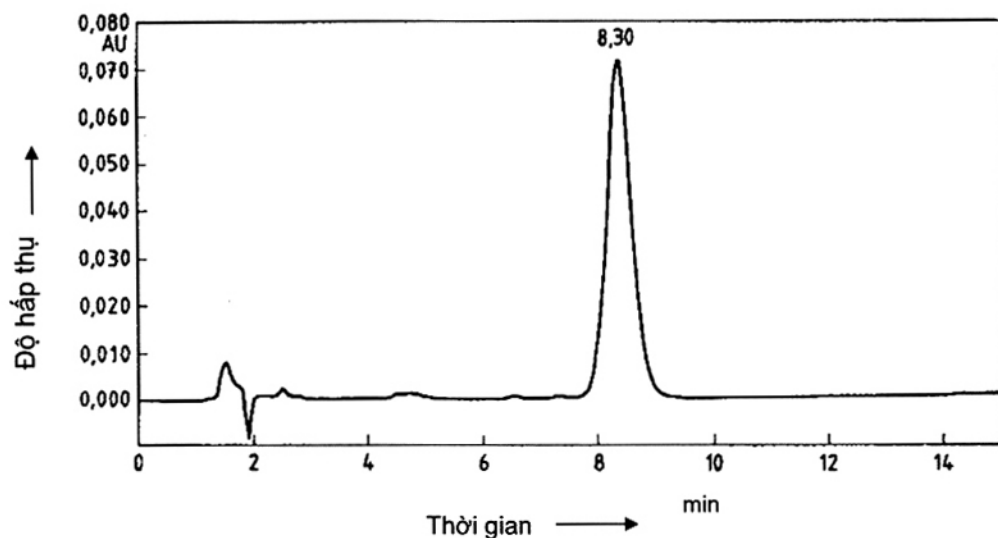
9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp thử đã dùng, cũng như viện dẫn tiêu chuẩn này;
- kết quả và đơn vị tính kết quả;
- kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại;
- mọi điểm bất thường quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Ví dụ về sắc kí đồ HPLC



Cột chiết Nucleosil® 100³⁾ C 18, đường kính 4 mm, chiều dài 250 mm, cỡ hạt 10 µm

Pha động dung dịch kali dihydrophosphat ($c = 0,0125 \text{ mol/l}$)/metanol loại dùng cho HPLC (70:30 thể tích) và axit phosphoric (pH = 4,5)

Tốc độ dòng 1,5 ml/min

Detector UV bước sóng 217 nm

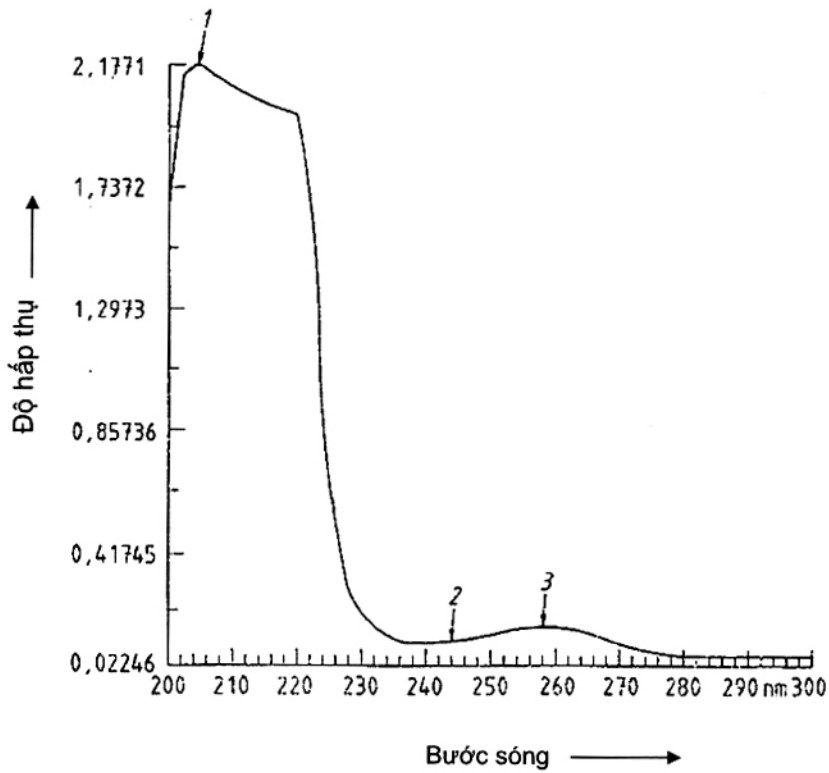
Thể tích bơm 20 µl

Thời gian lưu của aspartame 8,30 min

Hình A.1 – Ví dụ về sắc kí đồ HPLC của dung dịch chuẩn aspartame 200 mg/l

³⁾ Nucleosil® 100 là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp bởi Marcherey-Nagel, Düren. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu chúng đưa ra các kết quả tương đương.

Mẫu	Aspartame
Dung môi	Pha động (4.5)
Nồng độ	200 mg/l
Hàm số	Độ hấp thụ
Dải bước sóng	Từ 200 nm đến 300 nm



Các giá trị tối đa hoặc tối thiểu được công nhận:

1: Bước sóng = 204 nm	Độ hấp thụ = 2,177094
2: Bước sóng = 244 nm	Độ hấp thụ = 0,062973
3: Bước sóng = 258 nm	Độ hấp thụ = 0,124908

Bảng A.2 – Phổ hấp thụ của dung dịch chuẩn aspartame (trong pha động 4.5)

Phụ lục B
(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Các giá trị được xác định trong phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725:1986 [3]. Các phép thử do Viện Max von Pettenkofer thuộc sở Y tế Liên bang, Cục Hóa học Thực phẩm, Berlin, Đức [1] tổ chức thực hiện.

Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chụm

Mẫu	Các viên aspartame
Năm tiến hành phép thử liên phòng thử nghiệm	1988
Số lượng phòng thử nghiệm	8
Số lượng mẫu	1
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	7
Số lượng các phòng thử nghiệm ngoại lệ	1
Số lượng các kết quả chấp nhận được	35
Giá trị trung bình, \bar{x}	19,04 mg/100 mg
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,23 mg/100 mg
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r	1,24 %
Giới hạn lặp lại, r	0,66 mg/100 mg
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,45 mg/100 mg
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R	2,40 %
Giới hạn tái lập, R	1,28 mg/100 mg

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] *Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung des Aspartamegehaltes in Süßstoff-Tabletten L 57.22.99-4*, Dezember 1989, (*Food Analysis: Determination of aspartame content of sweetener tablets L 57.22.99-4, 1989-12*) In: *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Bedarfsegegenständen/Bundesgesundheitsamt (In: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods, Federal Healthy Office)* Loseblattausgabe, Stand Mai 1994. Bd. 1 (Losse-leaf edition of 1994-05 Vol. I.) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH.
- [2] FAO Food and Nutrition Paper 19 of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, April 1981.
- [3] ISO 5725:1986, *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.*
-