

TCVN 8471:2010

EN 12856:1999

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH ACESULFAME-K.
ASPARTAME VÀ SACARIN –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LÒNG HIỆU NĂNG CAO**

*Foodstuffs – Determination of acesulfame-K, aspartame and saccharin –
High performance liquid chromatographic method*

Lời nói đầu

TCVN 8471:2010 hoàn toàn tương đương với EN 12856:1999,

TCVN 8471:2010 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn,
Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định,
Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm – Xác định acesulfame-K, aspartame và sacarin – Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

*Foodstuffs – Determination of acesulfame-K, aspartame and saccharin –
High performance liquid chromatographic method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định acesulfame-K, aspartame và sacarin, xem [1], [2] và [3]. Phương pháp này cũng cho phép xác định hàm lượng caffein, axit sorbic và axit benzoic trong thực phẩm. Các phép thử nghiệm liên phòng đã được tiến hành xác định acesulfame-K trong bánh hạnh nhân, sữa chua, sữa chua trái cây, đồ uống có chứa nước cam, nước cola, cream và mứt; aspartame trong bánh hạnh nhân, sữa chua trái cây, đồ uống có chứa nước cam, đồ uống có bổ sung hương cam, nước cola, mứt và các chế phẩm bánh flan, natri sacarin trong bánh hạnh nhân, sữa chua, sữa chua trái cây, nước cam, đồ uống có chứa nước cam, nước cola, cream và mứt.

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

Mẫu được chiết hoặc được pha loãng với nước. Dung dịch mẫu có nồng độ chất tạo ngọt cao được tinh sạch trên cột chiết pha rắn hoặc bằng thuốc thử Carrez, nếu cần. Các chất tạo ngọt với nồng độ cao có trong dung dịch mẫu thử được tách trên cột sắc kí pha đảo của HPLC và được xác định bằng phép đo phổ tại bước sóng 220 nm.

4 Thuốc thử

Các thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích dùng cho phân tích HPLC và nước được sử dụng phải là loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác. Khi chuẩn bị các dung dịch, phải tính đến độ tinh khiết của các thuốc thử.

4.1 Axetonitril.

4.2 Metanol.

4.3 Kali dihydro orthophosphat (KH_2PO_4).

4.4 Dikali hydro orthophosphat (K_2HPO_4).

4.5 Axit phosphoric, $\rho_{20}(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,71 \text{ g/ml}$, $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 85 \%^{1)}$.

4.6 Axit phosphoric, $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 5 \%.$

Dùng pipet lấy cẩn thận 6 ml axit phosphoric (4.5) cho vào bình định mức 100 ml, có chứa 80 ml nước. Pha loãng bằng nước đến vạch.

4.7 Dung dịch Carrez I

Hòa tan 15 g kali hexaxyanoferrat (II) ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) trong nước và thêm nước đến 100 ml.

4.8 Dung dịch Carrez II

Hòa tan 30 g kẽm sulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) trong nước và thêm nước đến 100 ml.

4.9 Dung dịch đệm phosphat I, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,02 \text{ mol/l}$, $\text{pH} \approx 4,3^{2)}$

Hòa tan 2,72 g kali dihydro orthophosphat (4.3) vào 800 ml nước trong cốc có mỏ dung tích 1 000 ml. Chính pH đến 4,3 bằng axit phosphoric (4.6). Chuyển dung dịch này sang bình định mức 1 000 ml và thêm nước đến vạch.

4.10 Dung dịch đệm phosphat II, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,0125 \text{ mol/l}$, $\text{pH} \approx 3,5$

Hòa tan 1,70 g kali dihydro orthophosphat (4.3) vào 800 ml nước trong cốc có mỏ dung tích 1 000 ml. Chính pH đến 3,5 bằng axit phosphoric (4.6). Chuyển dung dịch này sang bình định mức 1 000 ml và thêm nước đến vạch.

¹⁾ w là phần khối lượng.

²⁾ c là nồng độ thuốc thử.

4.11 Pha động: dung dịch đệm phosphat và axetonitril

Đong cẩn thận lượng dung dịch đệm phosphat đã chọn cho vào axetonitril như trong A.5 và trộn. Lọc qua bộ lọc màng thích hợp, ví dụ: cỡ lỗ 0,45 μm và khử khí, ví dụ: để 5 min trong thiết bị siêu âm. Chuẩn bị pha động trong ngày sử dụng.

4.12 Dung dịch kiểm soát (tùy chọn)

Dung dịch kiểm soát có chứa acesulfame-K, natri sacarin, aspartame, axit axetic 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazine (diketopiperazine), aspartylphenylalanine, phenylalanine, caffein, axit sorbic, axit benzoic, theobromine, hydroxymethylfurfural và vanillin.

Cân 30 mg acesulfame-K, 20 mg natri sacarin, 220 mg aspartame, 60 mg caffeine, 100 mg axit sorbic, 100 mg axit benzoic, 100 mg vanillin, 10 mg diketopiperazine, 10 mg phenylalanine, 10 mg aspartylphenylalanine, 20 mg hydroxymethylfurfural và 70 mg theobromine, cân chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 100 ml. Hòa tan và pha loãng bằng nước đến vạch.

Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch này cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng bằng nước đến vạch.

4.13 Dung dịch gốc

Cân 100 mg acesulfame-K, 100 mg natri sacarin và 100 mg aspartame, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 100 ml. Hòa tan và pha loãng bằng nước đến vạch. Dung dịch này có chứa 1 g/l của từng chất tạo ngọt.

4.14 Dung dịch chuẩn (tùy chọn)

4.14.1 Dung dịch chuẩn I

Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch gốc (4.13) cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Dung dịch này có chứa 100 mg/l của từng chất tạo ngọt.

4.14.2 Dung dịch chuẩn II

Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch gốc (4.13) cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Dung dịch này có chứa 50 mg/l của từng chất tạo ngọt.

4.14.3 Dung dịch chuẩn III

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch gốc (4.13) cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Dung dịch này có chứa 10 mg/l của từng chất tạo ngọt.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Máy trộn tốc độ cao hoặc bộ đồng hóa.

5.2 Bình định mức, có dung tích thích hợp, ví dụ: 1 000 ml, 500 ml và 100 ml.

5.3 Cốc có mỏ, dung tích 1 000 ml.

5.4 Pipet, có dung tích thích hợp, ví dụ: 100 ml, 25 ml, 20 ml, 10 ml, 5 ml và 1 ml.

5.5 Micropipet, dung tích 1 000 μ l.

5.6 Ống đong chia độ, dung tích 1 000 ml.

5.7 Giấy lọc gấp nếp, loại nhanh trung bình.

5.8 Thiết bị siêu âm.

5.9 Máy li tâm, có các ống li tâm với dung tích thích hợp, có khả năng tạo gia tốc li tâm nhỏ nhất tại đáy ống là 1400 g.

5.10 Hệ thống khử khí, cho các dung môi (tùy chọn, thay vì khử khí bằng siêu âm).

5.11 Bộ lọc màng, kích thước lỗ 0,45 μ m hoặc nhỏ hơn.

5.12 Giá đỡ các bộ lọc màng, có các xyranh thích hợp.

5.13 Cột chiết pha rắn, với cột C18 pha đảo (tùy chọn), ví dụ: được nhồi 500 mg.

5.14 Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao, được trang bị một detector cực tím (UV) (khả năng hoạt động ở bước sóng 220 nm, tốt nhất là detector mảng diot) và được gắn một máy ghi và/hoặc máy tích phân cho phép đo chiều cao pic và diện tích pic.

5.15 Cột sắc kí dùng cho HPLC, kiểu pha đảo, ví dụ: có

- pha tĩnh của cột C18 pha đảo từ 3 μ m đến 10 μ m;
- chiều dài từ 100 mm đến 300 mm;
- đường kính trong từ 3 mm đến 4 mm;
- cột bảo vệ, C18 pha đảo (tùy chọn, nhưng thường được khuyến cáo dùng cho các mẫu dạng rắn).

Các tiêu chí tính năng đối với các cột tách thích hợp là độ phân giải nền của chất phân tích tương ứng.

Các ví dụ về các cột thích hợp hoặc các điều kiện sắc kí thích hợp được đưa ra trong Phụ lục A.

Bất cứ khi nào nhận thấy có nhiều bằng detector mảng diot hoặc bằng cách đo tại bước sóng thứ hai, thì cần phải chọn điều kiện sắc kí khác.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

6.1.1 Các sản phẩm chất lỏng trong (ví dụ: nước chanh, nước cola, các loại đồ uống)

Pha loãng 20 ml mẫu với nước đựng trong bình định mức 100 ml. Lọc dung dịch qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 μm trước khi bơm.

6.1.2 Các sản phẩm dạng đục (ví dụ như nước quả, đồ uống từ sữa có hương vị)

Pha loãng 20 ml mẫu đã đồng hóa với 50 ml nước đựng trong bình định mức 100 ml, thêm 2 ml dung dịch Carrez I (4.7), trộn và thêm 2 ml dung dịch Carrez II (4.8). Lắc mạnh rồi để yên dung dịch 10 min ở nhiệt độ phòng. Pha loãng bằng nước đến vạch. Lọc qua giấy lọc gấp nếp, loại bỏ 10 ml dịch lọc đầu tiên. Cho phần dịch lọc qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 μm trước khi bơm.

Để tính đến thể tích chất kết tủa, nếu chất không hòa tan không chứa chất béo có trong mẫu (trường hợp này là 20 ml) vượt quá khoảng 3 g, thì nên li tâm hỗn hợp mẫu đã làm trong 10 min ở gia tốc 1400 g trước khi lọc sang bình định mức 100 ml. Rửa phần chất lắng hai lần với nước và cho li tâm lại, thu lấy từng phần nổi phía trên sang bình định mức 100 ml rồi pha loãng dung dịch bằng nước đến vạch. Nếu lượng chất không hòa tan nhỏ hơn 3 g thì cũng có thể thực hiện quy trình này.

6.1.3 Mứt, mứt quả, mứt cam và các sản phẩm liên quan (trừ các loại quả vón cục)

Cân khoảng 20 g mẫu đồng nhất, chính xác đến 1 mg, cho vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 60 ml nước và đặt bình định mức vào thiết bị siêu âm ở 40 °C trong 20 min. Nhiệt độ không được vượt quá 40 °C vì aspartame có thể bị phân hủy.

Làm nguội dung dịch đến nhiệt độ phòng. Thêm 2 ml dung dịch Carrez I (4.7), trộn rồi thêm 2 ml dung dịch Carrez II (4.8). Lắc mạnh và để yên dung dịch ở nhiệt độ phòng trong 10 min. Pha loãng bằng nước đến vạch. Lọc dung dịch qua giấy lọc gấp nếp, loại bỏ 10 ml dịch lọc đầu tiên. Cho phần dịch lọc qua bộ lọc màng có cỡ lỗ 0,45 μm trước khi bơm.

Để tính đến thể tích chất kết tủa, nếu chất không hòa tan không chứa chất béo có trong khối lượng mẫu ban đầu vượt quá khoảng 3 g, thì nên li tâm hỗn hợp mẫu đã làm trong ở gia tốc 1 400 g khoảng 10 min trước khi lọc sang bình định mức 100 ml. Rửa phần chất lắng hai lần với nước và cho li tâm lại, thu lấy từng phần nổi phía trên sang bình định mức 100 ml rồi pha loãng dung dịch bằng nước đến vạch. Nếu lượng chất không hòa tan nhỏ hơn 3 g thì cũng có thể thực hiện quy trình này.

6.1.4 Sản phẩm rắn và nửa rắn (ví dụ như sản phẩm phomat tráng miệng, các sản phẩm sữa chua, các món salad chế biến sẵn, trừ bột làm bánh trứng sữa)

Cân khoảng từ 10 g đến 20 g phần mẫu đã đồng hóa kỹ, chính xác đến 1 mg, cho vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 50 ml nước và đặt bình này vào thiết bị siêu âm ở 40 °C trong 20 min. Nhiệt độ không được vượt quá 40 °C vì aspartame có thể bị phân hủy.

Làm nguội dung dịch đến nhiệt độ phòng. Thêm 2 ml dung dịch thuốc thử Carrez I (4.7), trộn rồi thêm 2 ml dung dịch Carrez II (4.8). Lắc mạnh và để yên dung dịch ở nhiệt độ phòng trong 10 min. Pha loãng bằng nước đến vạch. Lọc dung dịch qua giấy lọc gấp nếp, loại bỏ 10 ml dịch lọc đầu tiên.

Đối với các chất nền rất phức tạp, thì có thể cần phải tinh sạch thêm bằng cách sử dụng cột chiết pha rắn (5.13) để bảo vệ cột tách, vì các chất màu, chất tạo hương và chất béo không thể tách được bằng cách làm trong với thuốc thử Carrez. Trong trường hợp này, thêm 2 ml dịch lọc đã làm trong vào cột, trước đó đã được hoạt hóa với 3 ml metanol (4.2) và 20 ml nước và rửa giải với khoảng 20 ml pha động (4.11). Cho phần dịch lọc đi qua bộ lọc màng có kích thước lỗ 0,45 µm trước khi bơm.

Để tính đến thể tích chất kết tủa, nếu chất không hòa tan không chứa chất béo có trong mẫu (trường hợp này là 20 ml) vượt quá khoảng 3 g, thì nên li tâm hỗn hợp mẫu đã làm trong ở gia tốc 1400 g khoảng 10 min trước khi lọc sang bình định mức 100 ml. Rửa phần chất lắng hai lần với nước và cho li tâm lại, thu lấy từng phần nổi phía trên sang bình định mức 100 ml rồi pha loãng bằng nước đến vạch. Nếu lượng chất không hòa tan nhỏ hơn 3 g thì cũng có thể thực hiện quy trình này.

6.1.5 Bột làm bánh trứng sữa

Cân khoảng 10 g mẫu, chính xác đến 1 mg, cho vào bình định mức 500 ml. Thêm khoảng 400 ml nước và tiến hành như mô tả ở trên, nghĩa là thêm 6 ml dung dịch Carrez I (4.7), trộn và thêm 6 ml dung dịch Carrez II (4.8) để làm trong.

Để tính đến thể tích chất kết tủa, nếu chất không hòa tan không chứa chất béo có trong khối lượng mẫu ban đầu vượt quá khoảng 3 g, thì nên li tâm hỗn hợp mẫu đã làm trong ở gia tốc 1 400 g khoảng 10 min trước khi lọc sang bình định mức 500 ml. Rửa phần chất lắng hai lần với nước và cho li tâm lại, thu lấy từng phần nổi phía trên sang bình định mức 500 ml rồi pha loãng dung dịch bằng nước đến vạch. Nếu lượng chất không hòa tan nhỏ hơn 3 g thì cũng có thể thực hiện quy trình này.

6.2 Nhận biết

Nhận biết các chất tạo ngọt trong dung dịch mẫu bằng cách so sánh các thời gian lưu của chất phân tích có liên quan trong dung dịch mẫu với các thời gian lưu của chất chuẩn, hoặc bằng cách bơm đồng thời dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử, hoặc bằng cách thêm dung dịch chuẩn vào dung dịch mẫu thử và ghi lại đường hấp thụ trong dải bước sóng.

Bơm các thể tích bằng nhau của dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn. Khoảng thời gian giữa các lần bơm kế tiếp của các dung dịch chuẩn không được nhỏ hơn 15 min. Để giảm thiểu nguy cơ các chất rửa giải từ lần bơm trước đó bị lẫn với các thành phần từ các mẫu bơm tiếp sau, thì việc bơm liên tiếp các dung dịch mẫu thử cần được thực hiện tại các khoảng thời gian đủ dài.

Khi có khả năng bị nhiễu, thì nên rửa các cột. Pha động thích hợp để rửa cần có các thành phần sau đây: 50 phần thể tích pha động (4.11) + 50 phần thể tích axetonitril.

Các điều kiện sắc kí thích hợp cho việc nhận biết được nêu trong Phụ lục A.

Mẫu sắc phổ điển hình dùng để tham khảo được nêu trong Phụ lục B.

6.3 Xác định

Đối với việc xác định theo phương pháp ngoại chuẩn, thì tích phân các diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic và so sánh các kết quả với các giá trị tương ứng của các chất chuẩn có diện tích pic/chiều cao pic gần nhất hoặc sử dụng đường chuẩn.

Để chuẩn bị đường chuẩn, bơm một lượng thích hợp các dung dịch chuẩn có các nồng độ khối lượng thích hợp. Vẽ các chiều cao pic hoặc diện tích pic của các dung dịch chuẩn tương ứng với nồng độ khối lượng tính bằng miligam trên lít. Kiểm tra độ tuyến tính của đường chuẩn.

Ngoài ra, việc hiệu chuẩn cũng có thể được đánh giá bằng hồi quy toán học. Kiểm tra độ tuyến tính của đường hồi quy.

Các điều kiện sắc kí thích hợp cho phép xác định được mô tả trong Phụ lục A.

7 Tính kết quả

7.1 Phương pháp ngoại chuẩn

Tính phần khối lượng của chất tạo ngọt có liên quan, w , bằng miligam trên kilogam, hoặc nồng độ khối lượng, ρ , bằng miligam trên lít, theo công thức (1):

$$w \text{ hoặc } \rho = \frac{A_1 \times V_1 \times m_1 \times F}{A_2 \times V_2 \times m_0} \times 1000 \quad (1)$$

trong đó:

A_1 là diện tích pic của chất tạo ngọt có liên quan thu được bằng dung dịch mẫu thử;

A_2 là diện tích pic của chất tạo ngọt có liên quan thu được bằng dung dịch chuẩn;

V_1 là thể tích của dung dịch mẫu (ở đây là 100 ml hoặc 500 ml), tính bằng mililit (ml);

V_2 là thể tích của dung dịch chuẩn (ở đây là 100 ml), tính bằng mililit (ml);

m_1 là khối lượng của chất tạo ngọt có liên quan trong dung dịch chuẩn (V_2), tính bằng miligam (mg);

m_0 là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g) hoặc mililit (ml);

F là hệ số pha loãng dùng cho phương pháp tinh sạch được sử dụng. (Ví dụ: khi làm sạch cột thì $F = 10$; khi làm trong thuốc thử Carrez thì $F = 1$).

7.2 Đường chuẩn

Tính phần khối lượng của chất tạo ngọt có liên quan, w , bằng miligam trên kilogam, hoặc nồng độ khối lượng, ρ , tính bằng miligam trên lít, theo công thức (2):

$$w \text{ hoặc } \rho = \frac{C \times F \times V_1}{m_0} \quad (2)$$

trong đó:

C là hàm lượng chất tạo ngọt có liên quan có trong dung dịch mẫu thử, đọc được từ đường chuẩn, tính bằng miligam trên lít (mg/l) hoặc miligam trên kilogam (mg/kg);

F, V_1, m_0 xem trong công thức (1).

7.3 Biểu thị kết quả

Báo cáo kết quả đối với natri sacarin hoặc sacarin dạng imit tự do, đối với acesulfame-K và aspartame là không có số thập phân.

CHÚ THÍCH Hệ số chuyển đổi từ natri sacarin sang sacarin dạng imit tự do là 0,759 3.

8 Độ chụm

8.1 Yêu cầu chung

Chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được thống kê trong Phụ lục C. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ chất phân tích và chất nền khác với các giá trị nêu trong Phụ lục C.

8.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ thu được 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 quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r :

Các giá trị đối với acesulfame-K là:

bánh hạnh nhân	$\bar{x} = 256,6 \text{ mg/kg}$	$r = 52,0 \text{ mg/kg}$
sữa chua trái cây	$\bar{x} = 230,8 \text{ mg/kg}$	$r = 21,8 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 172 \text{ mg/l}$	$r = 5,8 \text{ mg/l}$
mứt	$\bar{x} = 60 \text{ mg/kg}$	$r = 8 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 370 \text{ mg/l}$	$r = 30 \text{ mg/l}$
nước cola	$\bar{x} = 351 \text{ mg/l}$	$r = 20 \text{ mg/l}$
cream	$\bar{x} = 316 \text{ mg/kg}$	$r = 15 \text{ mg/kg}$
sữa chua	$\bar{x} = 264 \text{ mg/kg}$	$r = 35 \text{ mg/kg}$
nước cam	$\bar{x} = 24,3 \text{ mg/kg}$	$r = 6 \text{ mg/kg}$

Các giá trị đối với aspartame là:

bánh hạnh nhân	$\bar{x} = 845,2 \text{ mg/kg}$	$r = 41,2 \text{ mg/kg}$
sữa chua trái cây	$\bar{x} = 468 \text{ mg/kg}$	$r = 29,9 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 308 \text{ mg/l}$	$r = 14,2 \text{ mg/l}$
nước cola	$\bar{x} = 270,7 \text{ mg/l}$	$r = 10,7 \text{ mg/l}$
nước cola	$\bar{x} = 185 \text{ mg/l}$	$r = 11 \text{ mg/l}$
đồ uống có bổ sung hương cam	$\bar{x} = 301 \text{ mg/l}$	$r = 25 \text{ mg/l}$
mứt	$\bar{x} = 26 \text{ mg/kg}$	$r = 13 \text{ mg/kg}$
chế phẩm bánh flan	$\bar{x} = 3\,100 \text{ mg/kg}$	$r = 600 \text{ mg/kg}$

Các giá trị đối với natri sacarin là:

bánh hạnh nhân	$\bar{x} = 228 \text{ mg/kg}$	$r = 28,2 \text{ mg/kg}$
sữa chua trái cây	$\bar{x} = 116 \text{ mg/kg}$	$r = 7,7 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 50,8 \text{ mg/l}$	$r = 3,4 \text{ mg/l}$
nước cola	$\bar{x} = 75 \text{ mg/l}$	$r = 4 \text{ mg/l}$
mứt	$\bar{x} = 60 \text{ mg/kg}$	$r = 5 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 82 \text{ mg/l}$	$r = 6 \text{ mg/l}$

nước cola	$\bar{x} = 64,9 \text{ mg/l}$	$r = 5 \text{ mg/l}$
cream	$\bar{x} = 68,4 \text{ mg/kg}$	$r = 15 \text{ mg/kg}$
sữa chua	$\bar{x} = 71,4 \text{ mg/kg}$	$r = 25 \text{ mg/kg}$
nước cam	$\bar{x} = 16,1 \text{ mg/kg}$	$r = 6 \text{ mg/kg}$

8.3 Độ tái lập

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

Các giá trị đối với acesulfame-K là:

bánh hạnh nhân	$\bar{x} = 256,6 \text{ mg/kg}$	$R = 79,6 \text{ mg/kg}$
sữa chua trái cây	$\bar{x} = 230,8 \text{ mg/kg}$	$R = 64,7 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 172 \text{ mg/l}$	$R = 14,3 \text{ mg/l}$
mứt	$\bar{x} = 60 \text{ mg/kg}$	$R = 30 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 370 \text{ mg/l}$	$R = 66 \text{ mg/l}$
nước cola	$\bar{x} = 351 \text{ mg/l}$	$R = 55 \text{ mg/l}$
cream	$\bar{x} = 316 \text{ mg/kg}$	$R = 138 \text{ mg/kg}$
sữa chua	$\bar{x} = 264 \text{ mg/kg}$	$R = 133 \text{ mg/kg}$
nước cam	$\bar{x} = 24,3 \text{ mg/kg}$	$R = 34 \text{ mg/kg}$

Các giá trị đối với aspartame là:

bánh hạnh nhân	$\bar{x} = 845,2 \text{ mg/kg}$	$R = 165,7 \text{ mg/kg}$
sữa chua trái cây	$\bar{x} = 468 \text{ mg/kg}$	$R = 108,6 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 308 \text{ mg/l}$	$R = 104,2 \text{ mg/l}$
nước cola	$\bar{x} = 270,7 \text{ mg/l}$	$R = 41,5 \text{ mg/l}$
nước cola	$\bar{x} = 185 \text{ mg/l}$	$R = 38 \text{ mg/l}$
đồ uống có bổ sung hương cam	$\bar{x} = 301 \text{ mg/l}$	$R = 88 \text{ mg/l}$
mứt	$\bar{x} = 26 \text{ mg/kg}$	$R = 20 \text{ mg/kg}$
chế phẩm bánh flan	$\bar{x} = 3100 \text{ mg/kg}$	$R = 2300 \text{ mg/kg}$

Các giá trị đối với natri sacarin là:

bánh hạnh nhân	$\bar{x} = 228 \text{ mg/kg}$	$R = 37,9 \text{ mg/kg}$
sữa chua trái cây	$\bar{x} = 116 \text{ mg/kg}$	$R = 45,5 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 50,8 \text{ mg/l}$	$R = 23,0 \text{ mg/l}$
nước cola	$\bar{x} = 75 \text{ mg/l}$	$R = 34 \text{ mg/l}$
mứt	$\bar{x} = 60 \text{ mg/kg}$	$R = 47 \text{ mg/kg}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 82 \text{ mg/l}$	$R = 19 \text{ mg/l}$
nước cola	$\bar{x} = 64,9 \text{ mg/l}$	$R = 30 \text{ mg/l}$
cream	$\bar{x} = 68,4 \text{ mg/kg}$	$R = 32 \text{ mg/kg}$
sữa chua	$\bar{x} = 71,4 \text{ mg/kg}$	$R = 44 \text{ mg/kg}$
nước cam	$\bar{x} = 16,1 \text{ mg/kg}$	$R = 19 \text{ mg/kg}$

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- tất cả các thông tin cần thiết để nhận biết về mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp lấy mẫu được sử dụng;
- ngày và thời gian lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- kết quả và đơn vị biểu thị kết quả;
- các điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy ý mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Quy định)

Các ví dụ về điều kiện sắc kí đã được chứng minh cho các kết quả thỏa đáng**A.1 Cột sắc kí**

Kiểu loại:	pha đảo (RP)
Pha tĩnh và chiều dài cột:	hạt hình cầu 3 μm đối với cột dài 100 mm, đến 10 μm đối với cột dài 300 mm (đáp ứng được tiêu chí quy định)
Đường kính trong:	4,0 mm
Cột bảo vệ:	khuyến cáo (tùy chọn)
Các ví dụ:	Lichrospher® 100 RP 18 ³⁾ , Superspher® 60 RP Chọn B ³⁾ , Nucleosil 100-5 C18 AB ³⁾ , μ Bondapak C18 ³⁾ , Partisil ODS 3 ³⁾

A.2 Tốc độ dòng

0,8 ml/min đến 1 ml/min.

A.3 Thể tích bơm10 μl đến 20 μl **A.4 Phát hiện**

Đo quang phổ (UV) ở bước sóng	217 nm đối với aspartame;
	227 nm đối với acesulfame-K;
	265 nm đối với sacarin; hoặc
	220 nm đối với tất cả các chất tạo ngọt, nếu detector không cho phép chuyển đổi bước sóng trong một lần vận hành.

³⁾ Lichrospher® 100 RP 18, Superspher® 60 RP Select B Nucleosil 100-5 C18 AB, μ Bondapak C18, Partisil ODS 3 là ví dụ về các sản phẩm phù hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, còn trong tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

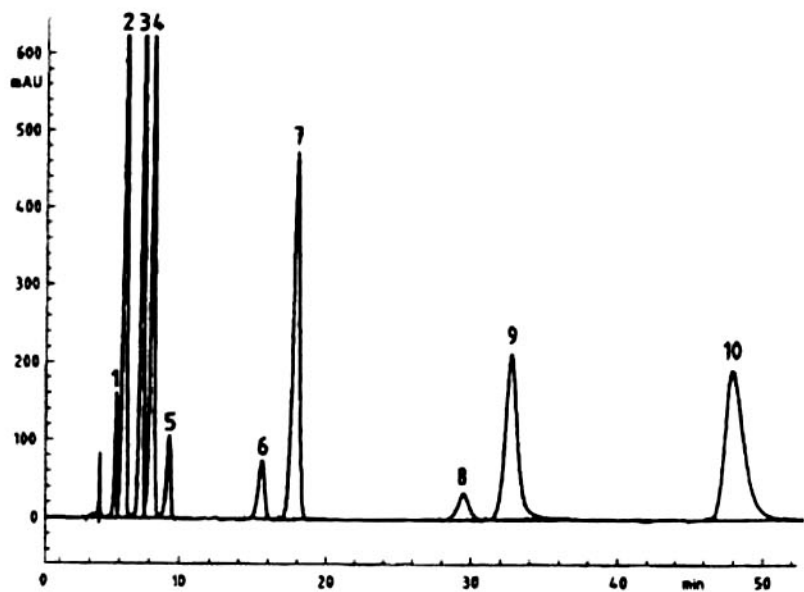
A.5 Pha động

Nhìn chung các tỷ lệ sau đây cho kết quả thỏa mãn:

- a) dung dịch đệm phosphat I (4.9) + axetonitril (4.1) [90 : 10, phần thể tích (V/V)];
- b) dung dịch đệm phosphat II (4.10) + axetonitril (4.1) (80 : 20 V/V);
- c) dung dịch đệm phosphat II (4.10) + axetonitril (4.1) (85 : 15 V/V);
- d) dung dịch đệm phosphat II (4.10) + axetonitril (4.1) (90 : 10 V/V);
- e) dung dịch đệm phosphat II (4.10) + axetonitril (4.1) (95 : 5 V/V);
- f) dung dịch đệm phosphat II (4.10) + axetonitril (4.1) (98 : 2 V/V);
- g) dung dịch đệm phosphat I (4.9) + axit phosphoric (4.6) pH = 2,8.

Phụ lục B
(Tham khảo)

Hình vẽ



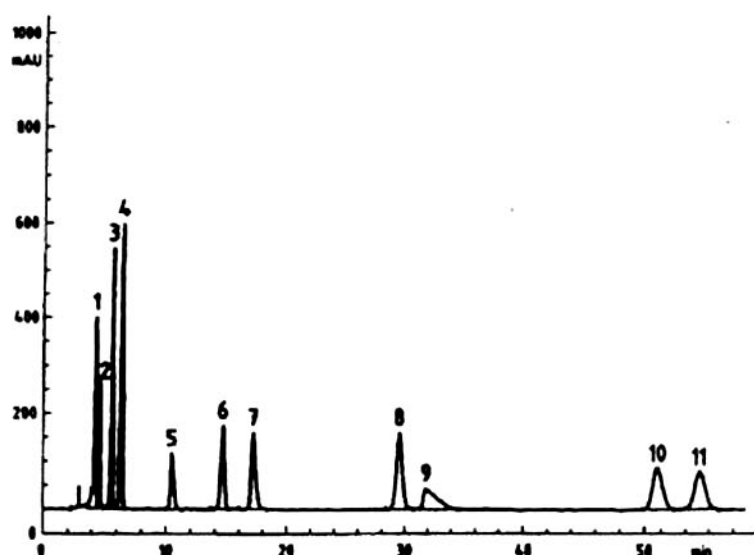
CHÚ DẪN

- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| 1 phenylalanine | 6 diketopiperazine |
| 2 acesulfame-K | 7 caffein |
| 3 theobromine | 8 aspartame |
| 4 sacarin | 9 vanilline |
| 5 aspartylphenylalanine | 10 axit sorbic + axit benzoic |

Dung dịch kiểm soát chứa	Phenylalanine, acesulfame-K, theobromine, sacarin, aspartylphenylalanine, diketopiperazine, caffein, aspartame, vanilline, axit sorbic và axit benzoic
Cột tách	μ Bondapak ⁴⁾ C 18, 10 μ m
Đường kính	3,9 mm
Chiều dài	300 mm
Cột bảo vệ	μ Bondapak C 18, 10 μ m
Pha động	Chất đệm kali dihydro phosphat [c (KH ₂ PO ₄) = 0,012 5 mol/l] + axetonitril (90 phần thể tích + 10 phần thể tích)
Tốc độ dòng	0,8 ml/min
Detector UV	220 nm
Thể tích bơm	10 μ l

Hình B.1 – Tách dung dịch kiểm soát bằng HPLC

⁴⁾ Lichrospher® 100 RP 18, Superspher® 60 RP Select B Nucleosil 100-5 C18 AB, μ Bondapak C18, Partisil ODS 3 là ví dụ về các sản phẩm phù hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, còn trong tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng



CHÚ DẪN

- | | |
|-------------------------|--------------------|
| 1 acesulfame-K | 6 diketopiperazine |
| 2 phenylalanine | 7 caffein |
| 3 theobromine | 8 vanilline |
| 4 sacarin | 9 aspartame |
| 5 aspartylphenylalanine | 10 axit benzoic |
| | 11 axit sorbic |

Dung dịch kiểm soát chứa	acesulfame-K, phenylalanine, theobromine, sacarin, aspartylphenylalanine, diketopiperazine, caffein, vanilline, aspartame, axit sorbic và axit benzoic
Cột tách	Lichrospher ⁵⁾ ® 100 RP 18, 5 µm
Đường kính	4 mm
Chiều dài	250 mm
Cột bảo vệ	Lichrospher ® 100 RP 18, 5 µm
Pha động	Chất đệm kali dihydro phosphat [c (KH ₂ PO ₄) = 0,02 mol/l] + axit orthophosphoric pH = 2,8
Tốc độ dòng	1,0 ml/min
Detector UV	220 nm
Thể tích bơm	20 µl

Hình B.2 – Tách dung dịch kiểm soát bằng HPLC

⁵⁾ Lichrospher® 100 RP 18, Superspher® 60 RP Select B Nucleosil 100-5 C18 AB, µ Bondapak C18, Partisil ODS 3 là ví dụ về các sản phẩm phù hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, còn trong tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

Phụ lục C

(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Các dữ liệu sau đây thu được trong các phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725:1986 [4] do Max von Pettenkofer-Tổ chức Y tế Liên bang, Cục Hóa thực phẩm, Berlin, Đức* thực hiện trên bánh hạnh nhân, sữa chua trái cây, nước cola và đồ uống có chứa nước cam, xem [1]. Các phép thử liên phòng thử nghiệm tiếp theo còn do Viện Nghiên cứu nước giải khát, đồ uống và bia (IFBM)** của Pháp thực hiện trên nước cola, đồ uống có bổ sung hương cam, mứt và chế phẩm bánh flan, xem [3]. Các phép thử liên phòng thử nghiệm cũng do Bộ Nông nghiệp, Thủy sản và Thực phẩm, MAFF***, Norwich Research Park, Mỹ thực hiện trên đồ uống có chứa nước cam, nước cola, cream, sữa chua và nước cam, xem [2].

Bảng C.1

Acesulfame-K	Bánh hạnh nhân * mg/kg	Sữa chua trái cây * mg/kg	Đồ uống có chứa nước cam * mg/l	Mứt ** mg/kg
Năm thử nghiệm liên phòng	1992	1992	1992	1993
Số lượng các phòng thử nghiệm	8	8	13	9
Số lượng mẫu	1	1	1	1
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ ngoại lệ	7	7	10	9
Số ngoại lệ (các phòng thử nghiệm)	1	1	3	0
Số lượng các kết quả được chấp nhận	38	38	53	9
Giá trị trung bình, $\bar{x}$	256,6	230,8	172,0	60
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	18,7	7,7	2,1	2,9
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD _r , %	7,3	3,4	1,2	4,8
Giới hạn lặp lại, r	52,0	21,8	5,8	8
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	28,1	22,9	5,0	10,7
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập RSD _R , %	11,1	10,0	3,0	17,8
Giới hạn tái lập, R	79,6	64,7	14,3	30
Giá trị Horrat	1,6	1,5	0,5	2,2

Bảng C.2

Acesulfame-K	Đồ uống có chứa nước cam *** mg/l	Nước cola *** mg/l	Cream*** mg/kg	Sữa chua *** mg/kg	Nước cam *** mg/kg
Năm thử nghiệm liên phòng	1995	1995	1995	1995	1995
Số lượng các phòng thử nghiệm	12	12	11	11	11
Số lượng mẫu	2	2	2	2	2
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ ngoại lệ	11	11	8	10	7
Số ngoại lệ (các phòng thử nghiệm)	1	1	3	1	4
Số lượng các kết quả được chấp nhận	22	22	16	20	14
Giá trị trung bình, $\bar{x}$	370	351	316	264	24,3
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	10,9	7,3	5,4	12,4	1,9
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD_r , %	3	2	2	5	8
Giới hạn lặp lại, r	30	20	15	35	6
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	23,5	19,7	49,3	47,6	12,2
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập RSD_R , %	6	6	16	18	50
Giới hạn tái lập, R	66	55	138	133	34
Giá trị Horrat	1,0	0,8	2,3	2,6	5,1

Bảng C.3

Aspartame	Bánh hạnh nhân* mg/kg	Sữa chua trái cây* mg/kg	Đồ uống có chứa nước cam* mg/l	Nước cola* mg/l
Năm thử nghiệm liên phòng	1992	1992	1992	1991
Số lượng các phòng thử nghiệm	8	8	13	8
Số lượng mẫu	1	1	1	1
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ ngoại lệ	7	8	13	8
Số ngoại lệ (các phòng thử nghiệm)	1	0	0	0
Số lượng các kết quả được chấp nhận	35	43	68	43
Giá trị trung bình, $\bar{x}$	845,2	468,0	308,0	270,7
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	14,6	10,6	5,0	3,8
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD_r , %	1,7	2,3	1,6	1,4
Giới hạn lặp lại, r	41,2	29,9	14,2	10,7
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	58,6	38,4	36,8	14,7
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập RSD_R , %	7,0	8,3	12,1	5,5
Giới hạn tái lập, R	165,7	108,6	104,2	41,5
Giá trị Horrat	1,2	1,4	1,5	0,8

Bảng C.4

Aspartame	Nước cola ** mg/l	Đồ uống có bổ sung hương cam ** mg/l	Mứt** mg/kg	Chế phẩm bánh flan ** mg/kg
Năm thử nghiệm liên phòng	1993	1993	1993	1993
Số lượng các phòng thử nghiệm	9	9	5	9
Số lượng mẫu	1	1	1	1
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ ngoại lệ	9	9	4	8
Số ngoại lệ (các phòng thử nghiệm)	0	0	1	1
Số lượng các kết quả được chấp nhận	9	9	4	8
Giá trị trung bình, $\bar{x}$	185	301	26	3 100
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	3,9	8,9	4,6	214
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD _r , %	2,1	3,0	17,7	6,9
Giới hạn lặp lại, r	11	25	13	600
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	13,6	31,4	7,1	821
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập RSD _R , %	7,3	10,4	27,5	26,5
Giới hạn tái lập, R	38	88	20	2 300
Giá trị Horrat	1,0	1,4	2,8	5,5

Bảng C.5

Natri sacarin	Bánh hạnh nhân * mg/kg	Sữa chua trái cây * mg/kg	Đồ uống có chứa nước cam * mg/l	Nước cola ** mg/l	Mứt ** mg/kg
Năm thử nghiệm liên phòng	1992	1992	1992	1993	1993
Số lượng các phòng thử nghiệm	8	8	13	9	9
Số lượng mẫu	1	1	1	1	1
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ ngoại lệ	6	8	12	8	8
Số ngoại lệ (các phòng thử nghiệm)	2	0	1	1	1
Số lượng các kết quả được chấp nhận	30	46	63	8	8
Giá trị trung bình, $\bar{x}$	228,0	116,0	50,8	75	60
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	10,0	2,7	1,2	1,4	1,8
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD _r , %	4,4	2,4	2,4	1,9	3,0
Giới hạn lặp lại, r	28,2	7,7	3,4	4	5
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	13,5	16,1	8,1	12,1	16,8
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập RSD _R , %	5,9	14,0	16,2	16,2	28,0
Giới hạn tái lập, R	37,9	45,5	23,0	34	47
Giá trị Horrat	4,1	1,8	2,0	1,7	2,8

Bảng C.6

Natri sacarin	Đồ uống có chứa nước cam*** mg/l	Nước cola *** mg/l	Cream*** mg/kg	Sữa chua *** mg/kg	Nước cam*** mg/kg
Năm thử nghiệm liên phòng	1995	1995	1995	1995	1995
Số lượng các phòng thử nghiệm	12	12	11	11	11
Số lượng mẫu	2	2	2	2	2
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ ngoại lệ	10	11	10	10	8
Số ngoại lệ (các phòng thử nghiệm)	2	1	1	1	3
Số lượng các kết quả được chấp nhận	20	22	20	20	16
Giá trị trung bình, $\bar{x}$	82	64,9	68,4	71,4	16,1
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	2,0	2,0	5,5	8,9	2,3
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD_r , %	2	3	8	12	14
Giới hạn lặp lại, r	6	5	15	25	6
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	6,7	10,6	11,3	15,8	6,9
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập RSD_R , %	8	16	17	22	43
Giới hạn tái lập, R	19	30	32	44	19
Giá trị Horrat	1,0	1,9	1,9	2,6	4,1

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Acesulfam-K, Aspartam und Saccharin-Natrium in Lebensmitteln L 00.00-28, Mai 1994 (Food Analysis: Determination of acesulfame-K, aspartame and sodium saccharin content in foodstuffs L 00.00-28, 1994-05) in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen /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 Health Office) Loseblattausgabe, Stand Februar 1996 Bd. 1 (Loose leaf edition, as of 1996 - 02 Vol. I.) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH
- [2] Willetts, P., Hawkins, S., Brereton, P., and Wood, R.: Determination of intense sweeteners in foodstuffs. Collaborative trial, J Assoc Publ Analysts, 1996, 32, 53-97.
- [3] Determination of Aspartam, Acesulfam-K and Saccharin in Foodstuff, Collaborative study, May 1993, IFBM, France.
- [4] ISO 5725:1986 ⁶⁾, *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.*

⁶⁾ ISO 5725:1986 hiện nay đã hủy.