

**XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI CÁC CHẤT TẠO NGỌT ACESULFAM KALI,
ASPARTAM VÀ SACCHARIN TRONG NƯỚC GIẢI KHÁT BẰNG PHƯƠNG
PHÁP ĐIỆN DI MAO QUẢN SỬ DỤNG DETECTOR UV-VIS**

Đến tòa soạn 21 - 07 - 2016

Trần Phúc Nghĩa, Đinh Viết Chiến, Vũ Thị Trang, Lê Thị Hồng Hảo

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

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 ACESULFAM KALI, ASPARTAM
AND SACCHARIN IN SOFT DRINKS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS
WITH UV-VIS DETECTION**

The common sweeteners acesulfame K (Ace-K), aspartame (Asp) and saccharin (Sac) were determined by capillary electrophoresis with UV-Vis detection. A 20 mM borate buffer solution pH 9.5 was used as background electrolyte (BGE). The limits of detection (LOD) of Ace-K, Asp, Sac are 1.0 ppm; 1.6 ppm and 0.5 ppm, respectively. This method was applied for the determination of sweeteners in five soft drink samples. These results meet Vietnamese standards for food according to Circular 27/2012/TT-BYT.

Keywords: sweeteners, capillary electrophoresis, UV-Vis detector, food control

1. MỞ ĐẦU

Acesulfam kali (Ace-K), Aspartam (Asp), Saccharin (Sac) là các chất tạo ngọt tổng hợp được sử dụng phổ biến trong nhiều ngành sản xuất, từ dược phẩm, mỹ phẩm và đặc biệt là công nghiệp thực phẩm tại Việt Nam. Các chất này có độ ngọt cao hơn nhiều so với đường saccarozơ, trong khi giá trị dinh dưỡng lại rất thấp nên chúng được bổ sung vào thực phẩm dành cho người ăn kiêng, người bị bệnh tiểu đường, dùng làm tá dược trong thuốc để che vị đắng hay tạo vị ngọt cho bánh kẹo, nước giải khát và nhiều

loại thực phẩm khác. Tuy nhiên, nếu hàm lượng của các chất này trong thực phẩm vượt quá giới hạn cho phép thì chúng lại có khả năng gây ra những ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người. Việc định lượng các chất tạo ngọt trong thực phẩm, mà cụ thể là các loại nước giải khát, là rất cần thiết, góp phần vào công tác kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm và bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

Các chất tạo ngọt có thể được xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau, tập trung chủ yếu vào 3 nhóm phương pháp là phân tích quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis, phương pháp sắc kí và phương pháp điện di mao quản. Phương pháp UV-Vis yêu cầu qui trình xử lý mẫu tương đối phức tạp và trong trường hợp muốn phân tích đồng thời cần phải kết hợp với thuật toán hồi qui đa biến do các chất tạo ngọt có phổ hấp thụ chồng lấn [1]. Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng detector ion hóa ngọn lửa, UV-Vis hay khối phổ được cho là các phương pháp tiêu chuẩn để xác định chất tạo ngọt hiện nay do khả năng tách tốt, độ thu hồi cao và giới hạn phát hiện thấp, tuy nhiên các phương pháp này yêu cầu trang thiết bị hiện đại, vận hành phức tạp và chi phí phân tích cao [2, 3, 4]. Các phương pháp điện di mao quản có ưu điểm là qui trình thao tác đơn giản, nhanh chóng và rẻ tiền nhưng vẫn đảm bảo được độ chính xác cao và giới hạn phát hiện thấp nên cũng được ứng dụng nhiều trong phân tích thực phẩm [5,6]. Chúng tôi đã lựa chọn phương pháp điện di mao quản sử dụng detector UV-Vis để nghiên cứu xác định đồng thời Ace-K, Asp và Sac ở mức hàm lượng ppm trong một số mẫu nước giải khát.

2. THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT

2.1. Thiết bị

- Thiết bị điện di mao quản G1600AX Agilent (Mỹ) có trang bị detector UV-VIS (Hình 1).

- Mao quản silica nung chảy: chiều dài $L = 64$ cm, đường kính trong $50\ \mu\text{m}$ (Agilent, Mỹ).

- Các thiết bị khác: bộ lọc nước siêu tinh khiết ELGASTAT MAXIMA SC (Elga Ltd, Anh); máy rung siêu âm ULTRASONIC LC30 (Elma, Đức); máy đo pH Metrohm (Thụy Sĩ); cân phân tích OHAUS (Mỹ);...



Hình 1. Hệ thống phân tích CE: Máy điện di Agilent

2.2. Hóa chất

- Chất chuẩn: Aspartam (98,54%; Sigma), Saccharin (99,50%; Sigma), Acesulfam kali (99,67%; Sigma).

- Hóa chất: các hóa chất có độ tinh khiết PA của Hãng Merck (CHLB Đức), bao gồm natri tetraborat, kali dihydrophosphat, dikali hydrophosphat, natri hydroxit, axit clohydric, axit photphoric, axit axetic, etanol, metanol.

- Nước siêu tinh khiết: nước cất 2 lần được lọc qua bộ lọc có cột trao đổi ion và màng 0,2 μm .

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

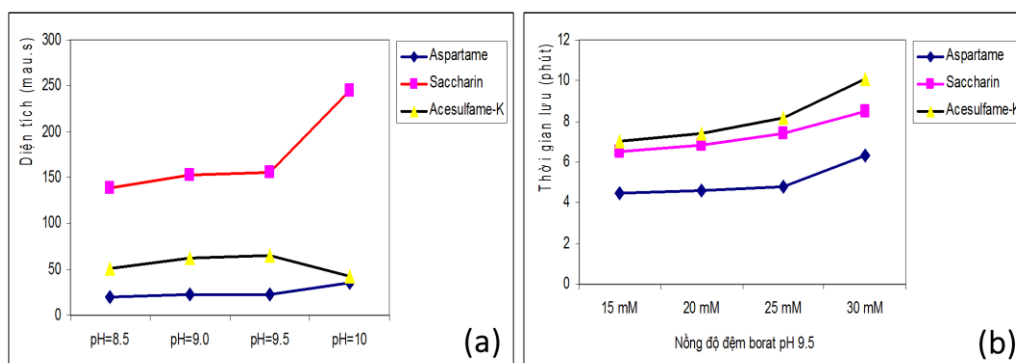
3.1. Khảo sát các điều kiện phân tích

3.1.1. Một số điều kiện chung

- Điều kiện bơm mẫu: áp suất 50 mbar trong thời gian 5s, cường độ dòng điện 50 mA.
- Nhiệt độ: 25⁰C.
- Thế tách: 25 kV.
- Bước sóng định lượng: 215nm

3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của hệ đệm

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát 3 hệ đệm là đệm photphat, đệm axetat và đệm borat với 3 vùng pH tương ứng là 3, 6, 9. Kết quả khảo sát cho thấy khả năng tách của các chất phân tích trong đệm borat pH = 9 là tốt nhất, các pic rõ ràng, cân đối và diện tích pic của các chất là lớn nhất; ở pH = 3 thời gian điện di của các chất dài, đường nền nhiễu và dòng không ổn định, tín hiệu phát hiện kém; ở pH = 6 tuy tín hiệu các pic rõ ràng hơn nhưng không cân đối. Do đó, đệm borat được lựa chọn là nền điện li để tách các chất tạo ngọt và tiếp tục được khảo sát các yếu tố pH và nồng độ đệm. Ảnh hưởng của pH và nồng độ đệm borat đến diện tích pic và thời gian điện di của các chất phân tích được thể hiện trên Hình 2.

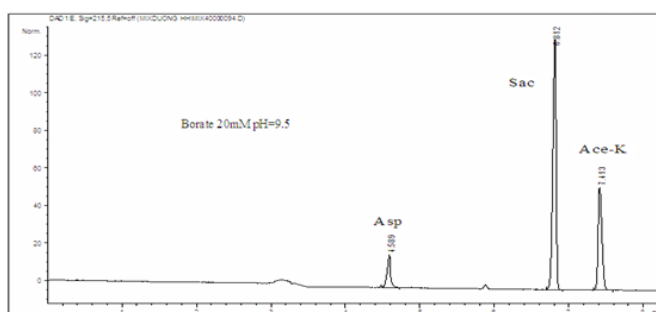


Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến diện tích pic (a) và nồng độ đệm borat (b) đến thời gian điện di của Asp, Sac và Ace-K (nồng độ 40 ppm mỗi chất)

Theo kết quả ở Hình 2 có thể thấy, khi pH đệm tăng từ 8,5 đến 9,5 thì diện tích pic của các chất đều tăng; tại pH = 10 diện tích pic của Ace-K giảm, trong khi diện tích

pic của Asp tăng và của Sac thì tăng mạnh. Ở pH = 9,5 các chất được tách tốt nhất, hình dáng pic cân đối, gọn nhất, đồng thời tín hiệu đường nền ổn định. Do đó, đệm borat pH = 9,5 được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nồng độ đệm borat được khảo sát trong khoảng 15 mM đến 30 mM, với kết quả các chất đều được phát hiện và tách tốt. Trong đó, thời gian điện di của 3 chất khi sử dụng đệm borat 15 mM là ngắn nhất nhưng đường nền không ổn định do độ điện ly thấp; khi sử dụng đệm borat 30 mM với điện thế tách là 25 kV thì cường độ dòng điện lên tới 100 μ A, làm cho đường nền bị nhiễu; khi sử dụng đệm borat 20 mM cho pic của các chất phân tích cân xứng, diện tích pic lớn nhất, đường nền thấp và ổn định, thời gian điện di hợp lý (Hình 3). Từ đó, đệm borat nồng độ 20 mM, pH = 9,5 được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

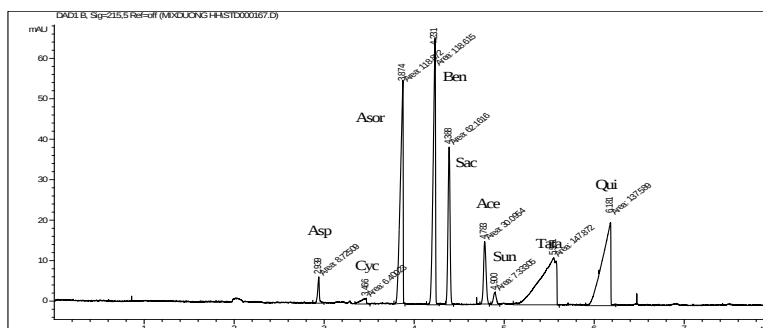


Hình 3. Điện di đồ phân tích hỗn hợp Ace-K, Asp, Sac trong điều kiện tối ưu

($L=65\text{cm}$, $I=50\text{ mA}$, $V=25\text{ kV}$, áp suất 50 mbar, $t=25^\circ\text{C}$, đệm borat 20 mM, pH= 9,5)

3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của các chất cản trở

Trong các mẫu thực tế, ngoài các chất tạo ngọt còn có nhiều thành phần khác nhau như các chất bảo quản, phẩm màu, cacbohydrat có thể ảnh hưởng đến quá trình phân tích các chất tạo ngọt bằng phương pháp CE-UV/Vis. Các chất được lựa chọn để khảo sát ứng với các nhóm có khả năng ảnh hưởng gồm: chất bảo quản (Axit Sorbic, Axit Benzoic), cacbohydrat (Saccarozơ, Cyclamate, Fructozơ, Glucozơ) và phẩm màu (Sunset Yellow, Brilliant Blue, Tartarin, Quilenol). Các chất ảnh hưởng này được thêm với nồng độ từ thấp đến cao (trong khoảng thường sử dụng đối với nước ngọt) vào hỗn hợp Ace-K, Sac và Asp. Trên cơ sở sự thay đổi diện tích pic và thời gian điện di của Ace-K, Sac và Asp sẽ đánh giá được mức độ ảnh hưởng. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng được thể hiện trên Hình 4.



Hình 4. Điện di đồ của Asp, Sac và Ace-K khi có mặt các chất ảnh hưởng

Kết quả ở Hình 4 cho thấy, pic của các chất phân tích đều xuất hiện rõ ràng, cân đối, không có sự chen lấn pic, thời gian điện di của các chất tách biệt nhau hoàn toàn. Đối với các loại đường Glucozơ, Fructozơ, Saccarozơ không cho tín hiệu tại bước sóng định lượng. Sự có mặt của các chất ảnh hưởng còn lại đều có ảnh hưởng đến diện tích pic và thời gian điện di của Sac, Ace-K, Asp có thay đổi, tuy nhiên sai số về diện tích pic và thời gian điện di đều nhỏ hơn 10%, nằm trong giới hạn cho phép của phương pháp. Vì vậy, có thể kết luận, các chất bảo quản, các loại đường và phẩm màu đều không ảnh hưởng đáng kể đến sự phân tách đồng thời Sac, Ace-K và Asp bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector UV-Vis.

3.2. Đánh giá phương pháp phân tích

Với các điều kiện tối ưu đã khảo sát được, đường chuẩn cho ba chất tạo ngọt Ace-K, Asp và Sac được xây dựng bằng cách phân tích các dung dịch chuẩn có nồng độ mỗi chất từ 2,5 đến 200 ppm. Các thông tin về phương trình hồi qui của đường chuẩn, giới hạn phát hiện (LOD) và khoảng tuyến tính của thiết bị đối với các chất phân tích được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Phương trình hồi qui, LOD và khoảng tuyến tính của đường chuẩn xác định Ace-K, Asp và Sac bằng phương pháp CE-UV/Vis

Tên chất	Phương trình đường chuẩn	LOD (ppm)	Khoảng tuyến tính (ppm)
Ace-K	$y = 1,352.x$	1,0	3,0 – 150
Asp	$y = 0,430.x$	1,6	4,8 – 150
Sac	$y = 2,942.x$	0,5	1,5 – 200

Độ thu hồi của phương pháp đối với các chất phân tích tại 3 mức nồng độ 10 ppm, 25ppm, và 50 ppm nằm trong khoảng 83,7 đến 101,8%. Độ lặp lại được đánh giá qua hệ số biến thiên của 05 lần phân tích lặp lại ở nồng độ 10 ppm của Ace-K, Asp và Sac lần lượt là 2,41%; 2,30% và 1,63%; đều nằm trong giới hạn cho phép của phương pháp điện di mao quản ($CV \leq 3\%$) ở mức nồng độ ppm. Như vậy phương pháp có độ thu

hồi trên 80% và độ lặp lại cao, có thể áp dụng để phân tích các chất Asp, Sac, Ace-K trong mẫu thực tế (đồ uống).

3.3. Phân tích một số mẫu đồ uống trên thị trường

3.3.1. Quy trình xử lý mẫu

Các mẫu phân tích được lựa chọn là mẫu đồ uống, do đó quá trình xử lý mẫu tương đối đơn giản và tốn ít thời gian. Các mẫu được rung siêu âm trong khoảng 30 phút để loại bỏ hết bọt khí, sau đó lọc bằng màng lọc 0,2 μ m. Hút chính xác 0,50ml mỗi mẫu cho vào bình định mức 5 ml và pha loãng bằng nước đề ion. Sau khi định mức, các dung dịch được tiến hành phân tích trên hệ thống điện di. Hàm lượng các chất phân tích được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn.

3.3.2. Kết quả phân tích một số mẫu đồ uống bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector UV-Vis

Kết quả phân tích hàm lượng của ba chất tạo ngọt Ace-K, Sac và Asp trong 05 mẫu đồ uống đang được tiêu thụ phổ biến trên thị trường (Tên thương mại của các mẫu: Samurai, Sprite, Coca-Cola, Lemon C2 và Trà xanh O^o) được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích các chất tạo ngọt Ace-K, Sac và Asp trong một số loại đồ uống

Mẫu	Nồng độ của các chất (ppm)		
	Asp	Sac	Ace-K
Samurai	109,5 $\pm$ 10,5	12,1 $\pm$ 0,6	96,1 $\pm$ 10,2
Sprite	77,9 $\pm$ 7,8	18,9 $\pm$ 1,0	51,1 $\pm$ 5,6
Lemon C2	84,9 $\pm$ 12,6	37,8 $\pm$ 3,6	27,7 $\pm$ 6,0
Coca-Cola	49,2 $\pm$ 5,7	17,8 $\pm$ 1,7	22,5 $\pm$ 2,9
Trà xanh O ^o	21,0 $\pm$ 3,5	12,6 $\pm$ 2,8	4,5 $\pm$ 1,1

Nồng độ cho phép của Sac, Asp và Ace-K trong đồ uống có ga và đồ uống có hương vị theo qui định tại Thông tư 27/2012/TT-BYT của Bộ Y tế lần lượt là 300, 600, 600 mg/kg (hay ppm). Hàm lượng của chất tạo ngọt Asp, Sac, Ace-K trong tất cả các mẫu đồ uống được phân tích đều thấp hơn nhiều so với ngưỡng cho phép.

4. KẾT LUẬN

Với quy trình phân tích đơn giản, nhanh chóng và chính xác nhằm xác định đồng thời ba chất tạo ngọt Ace-K, Sac và Asp trong đồ uống, phương pháp điện di mao quản sử dụng detector UV-Vis cho thấy tiềm năng áp dụng phân tích đối với nhóm chất này. Giới hạn phát hiện của Sac, Ace-K và Asp đạt được là 0,5; 1,0 và 1,6 ppm; phù hợp để phát hiện và định lượng các chất tạo ngọt này trong mẫu đồ uống ở mức hàm lượng

ppm. Cả 3 chất tạo ngọt đều được phát hiện và định lượng trong tất cả năm mẫu phân tích, tuy nhiên mức hàm lượng đều nằm trong giới hạn cho phép của Bộ Y tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

6. Miguel A. Cantarelli, Roberto G. Pellerano, Eduardo J. Marchevsky, José M. Camiña (2009), *Simultaneous determination of aspartame and acesulfame-K by molecular absorption spectrophotometry using multivariate calibration and validation by high performance liquid chromatography*, Food Chemistry, Vol. 115 (3), pp. 1128-1132.
7. Yan Zhu, Yingying Guo, Mingli Ye, Frits S. James (2005), *Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography*, Journal of Chromatography A, Vol. 1085 (1), pp. 143-146.
8. Andrzej Wasik, Jonh Mc.Court, Manuela Buchgraber (2007), *Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection - Development and single-laboratory validation*, Journal of Chromatography A, Vol. 1157 (1-2), pp. 187-196.
9. Da-jin Yang and Bo Chen (2009), *Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 57 (8), 3022-3027.
10. Lin Yu H., Chou Shin S., Sheu Fuu, Shyu Yuan (2000), *Simultaneous Determination of Sweeteners and Preservatives in Preserved Fruits by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, Journal of Chromatographic Science, Vol. 38 (8), 345-352.
11. Ana Beatriz Bergamo, Jose Alberto Fracassi da Silva, Dosil Pereira de Jesus (2011), *Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*, Food Chemistry, Vol. 55 (4), pp. 1714-1717.