

Ứng dụng kỹ thuật sắc ký điện di mao quản phân tích Acesulfame-K, Saccharin, Aspartame trong đồ uống

Trần Phúc Nghĩa

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

Khoa Hóa học

Luận văn Thạc sĩ ngành: Hóa phân tích; Mã số: 60 44 29

Người hướng dẫn: TS. Lê Thị Hồng Hảo

Năm bảo vệ: 2011

Abstracts. Tập hợp các tài liệu phân tích định lượng đường hóa học trong nước và quốc tế. Nghiên cứu các điều kiện để xác định đồng thời aspartame, saccharin, acesulfame-K. Áp dụng phương pháp mới xây dựng để phân tích một số mẫu đồ uống, nước giải khát trên địa bàn Hà Nội.

Keywords. Đường hóa học; Kỹ thuật sắc ký; Đồ uống; Hóa phân tích; Điện di mao quản

Content

MỞ ĐẦU

Acesulfame-k, saccharin, và aspartame là những chất ngọt tổng hợp thường được sử dụng trong các ngành sản xuất chế biến dược phẩm, mỹ phẩm, cũng như trong thực phẩm (đặc biệt là các loại đồ uống). Các chất này có thể gây ảnh hưởng tới sức khỏe người dùng ở các mức độ khác nhau tùy thuộc vào liều lượng đưa vào cơ thể. Vì vậy, một vấn đề được đặt ra không chỉ với các cơ quan quản lý chất lượng an toàn vệ sinh thực phẩm, mà còn với những nhà sản xuất là phải xây dựng phương pháp phát hiện, định lượng các chất kể trên

Hiện nay việc phân tích acesulfame-k, saccharin, và aspartame có thể được tiến hành chủ yếu dựa vào kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Ưu điểm của HPLC là độ chính xác và độ lặp lại cao nhưng chi phí tốn kém và độc hại do sử dụng dung môi hữu cơ. Thêm vào đó, các chất được khảo sát là các chất phân cực, nên việc phân tích bằng HPLC trên thực tế gặp khá nhiều khó khăn.

Do đó, trong đề tài nghiên cứu này chúng tôi đã chọn phương pháp điện di mao quản để xác định đồng thời hàm lượng aspartame, acesulfame-k, và saccharin trong các loại đồ uống. Phương pháp này có ưu điểm là thiết bị tương đối đơn giản, chi phí thấp và đặc biệt có thể tích hợp với nhiều loại detector khác nhau

Nghiên cứu được chúng tôi tiến hành nhằm thực hiện 2 mục tiêu:

- Xây dựng, thẩm định phương pháp tách và định lượng đồng thời acesulfame-k, saccharin, và aspartame - một số chất chất ngọt tổng hợp hay dùng trong đồ uống, nước giải khát.

- Ứng dụng phương pháp vừa xây dựng để phân tích các chất khảo sát kể trên trong một số sản phẩm đang lưu hành trên thị trường.

NỘI DUNG LUẬN VĂN

I. Lý do chọn đề tài

Với mục tiêu là xây dựng phương pháp sắc ký điện di mao quản vùng để áp dụng phân tích acesulfame-k, saccharin, aspartame trong đồ uống

II. Mục đích nghiên cứu.

Xây dựng phương pháp sắc ký điện di mao quản để thay thế phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Nhằm giảm chi phí, giá thành, tiết kiệm về mặt kinh tế và không gây ô nhiễm môi trường. Từ đó ứng dụng phương pháp vừa xây dựng để phân tích acesulfame-k, saccharin, aspartame, đánh giá chất lượng các loại đồ uống.

III. Tóm tắt luận văn

TỔNG QUAN

1. Giới thiệu về đường hóa học

Chất ngọt tổng hợp là những chất không có trong tự nhiên, vị ngọt rất cao so với đường sucrose và không có giá trị dinh dưỡng, thường được sử dụng với nhiều mục đích khác nhau

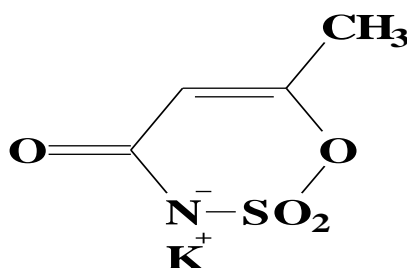
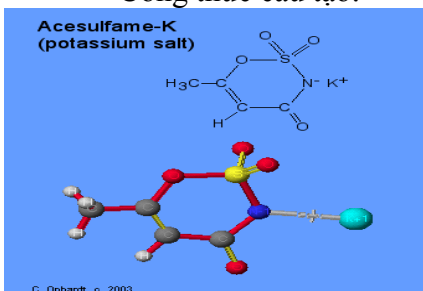
Chất ngọt tổng hợp bao gồm nhiều loại khác nhau, chủ yếu người ta chia thành 2 loại: chất tạo ngọt không sinh năng lượng và chất tạo ngọt có sinh năng lượng.

2. Đại cương về chất phân tích

2.1. Acesulfame-K

➤ Tính chất

- Tên IUPAC: potassium 6 - methyl - 2,2 - dioxo-oxathiazin - 4 - olate
- Công thức hóa học: $C_4H_4KNO_4S$
- Công thức cấu tạo:

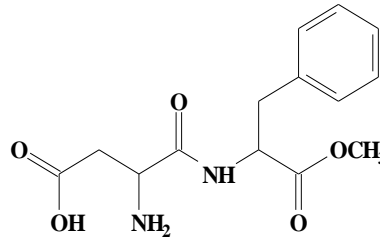
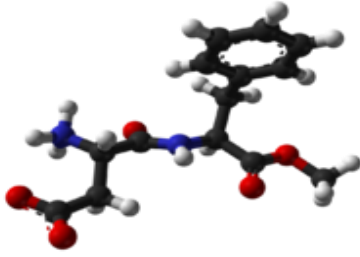


- Độ tan ở 20°C: Ethanol là 1g/1000 ml ; Nước là 1g/3,7 ml.
- Tỷ trọng: 1,81 g.cm⁻³
- Nhiệt độ sôi: 225 °C
- Phân tử gam: 242 g.mol⁻¹
- Vị ngọt gấp 150 – 200 lần đường saccharose.

2.2. Aspartam

➤ Tính chất

- Tên IUPAC: N-(L- α -Aspartyl)-L- phenylalanine, 1-methyl ester
- Công thức hóa học: $C_{14}H_{18}N_2O_5$
- Công thức cấu tạo

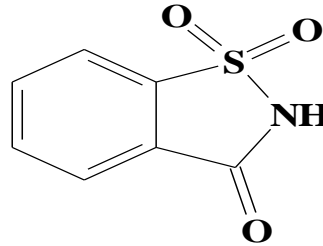
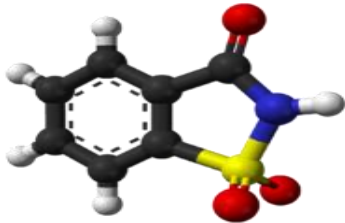


- Độ tan: tan ít trong nước, tan rất ít trong ethanol.
- Dung dịch 1%(KL/TT) ở 20°C có pH 5,2
- Tương kỵ với calci hydrophosphat, magnesi stearat.
- Tỷ trọng: 1,347 g.cm⁻³
- Nhiệt độ sôi: 247 °C
- Phân tử gam: 294,3 g.mol⁻¹

2.3. Saccharin

➤ Tính chất

- Tên IUPAC: 1,1-Dioxo-1,2-benzothiazol-3-one
- Công thức hóa học: $C_7H_5NO_3S$
- Công thức cấu tạo:



- Tinh thể màu trắng trong, không mùi, tan ít trong nước và ete.
- Độ tan : Nước là 1g/290 ml ; Ethanol(95%) là 1g/31ml
- Dung dịch 0,35%(KL/TT) có pH 2,0.
- Tỷ trọng: 0,828 g.cm⁻³
- Nhiệt độ sôi: 229,7 °C

3. Các phương pháp và xu hướng nghiên cứu trong nước

Hiện nay, tùy thuộc vào điều kiện cơ sở vật chất mà các phòng thí nghiệm có thể tiến hành phân tích đối tượng nghiên cứu theo các phương pháp khác nhau. Một số phương pháp phổ biến có thể kể đến như quang phổ hấp phụ phân tử UV-VIS, sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, điện di mao quản vùng CZE

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng và mục tiêu nghiên cứu

Hiện nay nhiều nhà máy, công ty và một số cơ sở sản xuất đồ uống, nước giải khát vì lợi nhuận cao mà không quan tâm đến sức khỏe của người tiêu dùng đã lạm dụng các loại đường hóa học vượt quá giới hạn cho phép để tăng độ ngọt của sản phẩm. Trong đó có đường saccharin, acesulfame-K, aspartame, hàm lượng các loại đường hóa học này trong đồ uống quá cao sẽ gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người, có thể gây ra các biến chứng về

sau. Do đó, mục tiêu của đề tài là nghiên cứu phương pháp xác định đồng thời aspartame, saccharin, acesulfame-K trong đồ uống bằng phương pháp sắc ký điện di mao quản.

2. Nội dung nghiên cứu

Để đạt được mục tiêu đề ra, cần nghiên cứu một cách có hệ thống các vấn đề sau:

- Tập hợp các tài liệu phân tích định lượng đường hóa học trong nước và quốc tế.
- Nghiên cứu các điều kiện để xác định đồng thời aspartame, saccharin, acesulfame-K:
- Áp dụng phương pháp mới xây dựng để phân tích một số mẫu đồ uống, nước giải khát trên địa bàn Hà Nội

3. Điện di mao quản vùng (CZE)

Điện di mao quản vùng là một kiểu được ứng dụng đầu tiên và phổ biến của kỹ thuật CE do tính đơn giản của các hoạt động tách và tính linh hoạt của nó.

Cơ sở tách: Dựa trên sự khác nhau về linh độ điện di của phân tử các chất trong dung dịch. Khi đặt vào hai đầu mao quản một điện thế và dòng EOF đủ lớn thì thứ tự rửa giải: cation, chất trung hòa và sau cùng là anion.

Ứng dụng của CZE: CZE được ứng dụng chủ yếu để tách các chất có cấu tạo ionic (hợp chất có liên kết ion, hợp chất mà khi tan trong pha động điện di chúng có thể phân ly thành các ion âm và dương) trong nhiều lĩnh vực như: sinh hóa, dược phẩm, thực phẩm, môi trường.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tối ưu hóa các điều kiện xác định Ace-K, Sac, Asp bằng kỹ thuật sắc ký điện di mao quản.

- Cột mao quản: chiều dài $L = 65\text{cm}$, đều có đường kính trong $i.d = 50\mu\text{m}$.
- Tiêm mẫu: áp suất 50 mbar trong thời gian 5 s với cường độ dòng điện là 50 mA.
- Bước sóng phát hiện được lựa chọn dựa vào độ hấp phụ của từng chất:
 - + Aspartam: 191nm
 - + Saccharin: 202 nm
 - + Acesulfam - K: 226 nm

1.1. Hệ đệm

❖ Khảo sát loại đệm và pH của đệm

Khảo sát 3 loại đệm ở 3 vùng pH: Đệm photphat 20 mM (pH 3,00), đệm Acetat 20mM (pH 6,0), và đệm borat 20 mM (pH 9,00).

Bảng 1. Kết quả sự phụ thuộc giữa diện tích pic của các chất vào các loại đệm

Chất chuẩn	Nồng độ (ppm)	Diện tích (mau.s)		
		Đệm photphat	Đệm acetat	Đệm borat
Aspartame	40	38,6	24,2	22,5
Saccharin	40	4,5	115,5	152,8
Acesulfame-K	40	1,2	53,5	62,3

Từ kết quả thu được ở bảng 1 ta thấy khả năng tách của các chất phân tích ở đệm borat pH 9,00 là tốt nhất, qua sắc đồ khi chạy điện di ta thấy các pic rõ ràng, cân đối và diện tích pic của các chất là lớn nhất

Các điểm pH khác xung quanh điểm pH 9.00 với đệm borat 20 mM, cụ thể: pH 8,50; pH 9,50; pH 10,0. Kết quả cụ thể:

Bảng 2. Kết quả sự phụ thuộc giữa diện tích pic của các chất vào giá trị pH

Chất chuẩn	Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (mau.s)			
		pH=8.5	pH=9.0	pH=9.5	pH=10
Aspartame	40	19,4	22,5	23,0	35,6
Saccharin	40	138,0	152,8	156,0	245,0
Acesulfame-K	40	51,2	62,3	64,6	42,3

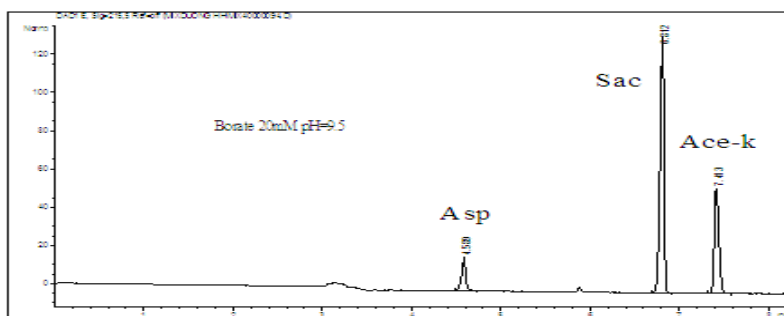
Ở pH 9,5 các chất được tách tốt nhất, hình dáng pic cân đối, gọn nhất, đồng thời tín hiệu đường nền ổn định và diện tích pic của các chất tăng đều. Do vậy đệm borat, pH 9,5 được lựa chọn cho các bước khảo sát tiếp theo.

❖ **Khảo sát nồng độ đệm:**

Sau khi lựa chọn được hệ đệm và pH của đệm chúng tôi tiếp tục khảo sát nồng độ của hệ đệm. Cụ thể nồng độ đệm borat pH 9.5 như sau: 15 mM, 20 mM, 25mM, 30mM.

Bảng 3. Kết quả sự phụ thuộc của thời gian lưu của các chất chuẩn vào nồng độ đệm borat

Chất chuẩn	Nồng độ (ppm)	Thời gian lưu (phút)			
		15 mM	20 mM	25 mM	30 mM
Aspartame	40	4,471	4,589	4,777	6,289
Saccharin	40	6,496	6,812	7,412	8,465
Acesulfame-K	40	7,013	7,413	8,171	10,106



Hình 1. Điện di đồ của hỗn hợp 3 chất trong điều kiện đệm borat 20 mM (pH 9,5 và I=50 mA, V=25kV, L= 65 cm, t =25°C, áp suất 50 mbar)

Trên hình 1 ở nồng độ đệm borat 20 mM cho pic đều cân xứng, thời gian lưu ngắn, hơn nữa diện tích pic các chất là lớn nhất. Vì vậy chúng tôi lựa chọn đệm borat nồng độ 20 mM, pH 9,5 cho các bước tiếp theo.

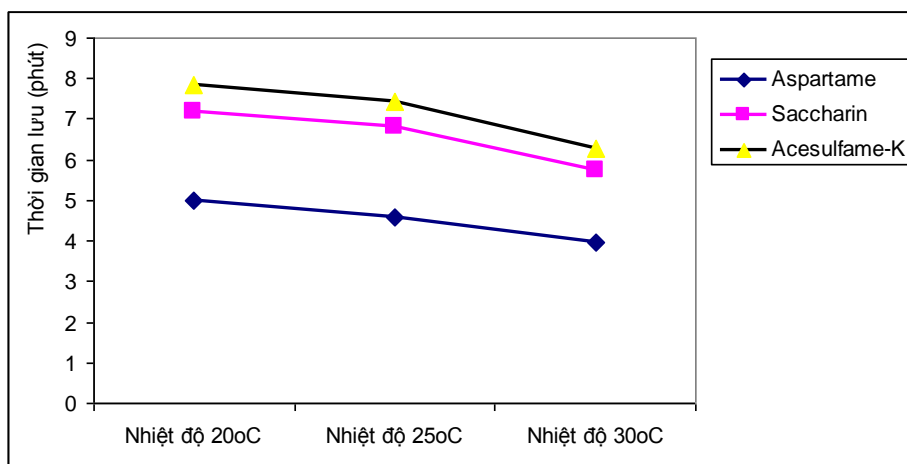
1.2. Xác định điều kiện nhiệt độ

Tiến hành khảo sát ở các nhiệt độ: 20°C, 25°C, và 30°C. Kết quả như sau:

Bảng 4. Kết quả thời gian lưu của asp, sac, ace-k ở các nhiệt độ khác nhau

Chất chuẩn	Nồng độ (ppm)	Thời gian lưu (phút)		
		Nhiệt độ 20°C	Nhiệt độ 25°C	Nhiệt độ 30°C

Aspartame	40	4,987	4,589	3,957
Saccharin	40	7,195	6,812	5,723
Acesulfame-K	40	7,826	7,419	6,255



Hình 2.. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa thời gian lưu của asp, sac, ace-k vào nhiệt độ

Qua sự khảo sát trên ta thấy tại 25°C các chất tách khỏi nhau, pic cân đối và gọn (hình 3.9). Còn ở nhiệt độ 30°C thời gian tách các chất tuy nhanh hơn nhưng đường nền không đẹp và sẽ làm tăng hiệu ứng nhiệt. Điều này cho thấy khi nhiệt độ thay đổi thì độ nhớt cũng thay đổi theo, và qua đó ảnh hưởng đến giá trị độ điện di của chất tan (chất phân tích), chúng sẽ gây ra sự mở rộng pic. Tức là làm giảm hiệu quả tách. Hơn nữa với điều kiện khí hậu nước ta việc duy trì nhiệt độ mao quản ở 25°C là thích hợp. Vì vậy chúng tôi lựa chọn điều kiện nhiệt độ chạy sắc ký là 25°C.

1.3. Xác định thế đặt vào hai đầu

Điện thế được chúng tôi lựa chọn để khảo sát là 20 kV, 25 kV và 30 kV. Qua khảo sát ta thấy Ở điện thế 30 kV thời gian phân tích tốt nhưng dòng điện tạo ra cao (lớn hơn 100 μ A), vì khi dòng điện i lớn sẽ gây ra hiệu ứng nhiệt Jun lớn, làm nóng mao quản, gây ra doãng pic. Tức là làm giảm hiệu quả tách. Ở điện thế 20 kV thời gian phân tích dài do dòng điện tạo ra nhỏ dẫn đến làm giãn rộng vùng mẫu. Tại điện thế 25 kV chúng tôi thấy quá trình phân tích tối ưu nhất, thời gian phân tích phù hợp, hiệu ứng nhiệt nhỏ không làm ảnh hưởng tới quá trình phân tích, các pic tách hoàn toàn và cân đối, đồng thời có thể bảo vệ cột mao quản tốt hơn so với ở điện thế 30 kV.

1.4. Xác định bước sóng định lượng

Để chọn bước sóng định lượng chúng tôi tiến hành đo phổ UV-VIS của saccharin, aspartame, accesufame-k với nồng độ 40 ppm trong hỗn hợp hệ đệm borat đã chọn trong vùng 190 – 600 nm.

Bảng5.. Diện tích pic của asp, sac, ace-k ở các bước sóng khác nhau

Chất chuẩn	Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (mau.s)			
		$\lambda=195,5$ nm	$\lambda=210,5$ nm	$\lambda=215,5$ nm	$\lambda=230,5$ nm
Aspartame	40	68,2	30,5	23,6	4,3
Saccharin	40	172,0	165,5	155,8	98,8
Acesulfame-K	40	18,2	46,4	65,2	88,6

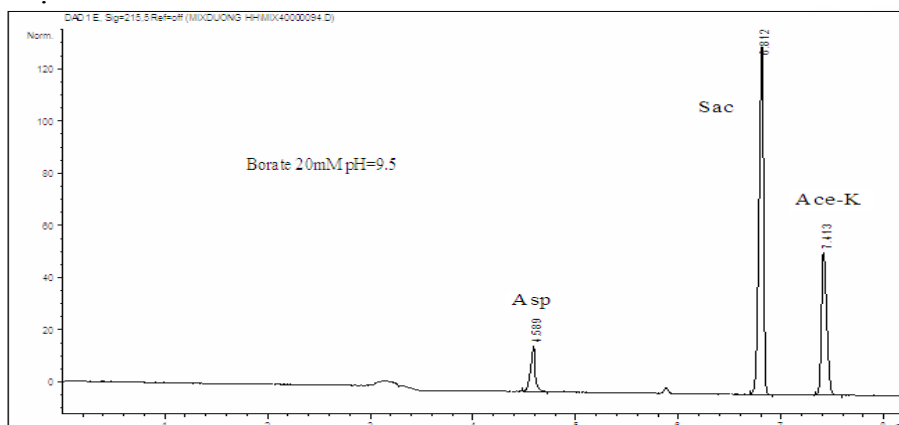
Nhận xét: Từ kết quả ở bảng 5 ta thấy khi bước sóng giảm thì diện tích pic của aspartame và saccharin đều giảm. Ngược lại đối với acesulfame-k thì diện tích lại tăng. Đồng thời qua thực nghiệm ở bước sóng 215,5 nm cho tín hiệu phát hiện các chất rõ ràng, cân đối và đều nhau, đường nền không bị nhiễu. Vì vậy bước sóng 215,5 nm được chúng tôi lựa chọn để phân tích các chất.

1.5. Kết luận

Sau khi khảo sát chúng tôi lựa chọn các điều kiện điện di như sau:

- ✓ Chiều dài cột mao quản L= 65cm, đường kính trong id = 50 μ m
- ✓ Điện thế đặt vào 2 đầu mao quản 25 kV
- ✓ Giới hạn dòng điện trong mao quản 50 μ A
- ✓ Tiêm mẫu với áp suất 50 mbar trong thời gian 5s
- ✓ Bước sóng định lượng các chất $\lambda = 215,5$ nm
- ✓ Nhiệt độ mao quản: 25°C
- ✓ Hệ đệm borat 20 mM, pH 9,5

Hình 3.13 dưới đây thể hiện điện di đồ hỗn hợp 3 chất (asp, sac, ace-k) 40 ppm trong điều kiện đã chọn



Hình 3. Điện di đồ của hỗn hợp 3 chất trong điều kiện điện di lựa chọn ($L=65\text{cm}$, $I=50\text{ mA}$, $V=25\text{ kV}$, áp suất 50 mbar, $t=25^\circ\text{C}$, đệm borat 20 mM, pH= 9,5)

2. Thẩm định phương pháp

2.1. Tính chọn lọc

Để đánh giá tính chọn lọc chúng tôi dựa vào độ phân giải. Đây là một đại lượng đặc trưng (yếu tố) quan trọng của kỹ thuật tách

Bảng 6. Kết quả thể hiện tính chọn lọc của phương pháp

STT Tên chất	t_m ở mẫu đơn thành phần	t_m ở mẫu hỗn hợp	Độ rộng pic	Sai số %	R_s với pic liền kề nhất
Aspartam	4,545	4,556	0,0257	0,24	40,2
Saccharin	6,792	6,801	0,0302	0,13	11,62
Acesulfam - K	7,527	7,575	0,0364	0,64	11,62

Nhận xét: Từ bảng 6 trên ta thấy thời gian lưu của asp, ace-k tách biệt nhau hoàn toàn, sai số về mặt thời gian lưu trong việc chạy các chuẩn đơn so với thời gian chạy chuẩn hỗn

hợp rất nhỏ từ 0,24 %- 0,64 %, . Như vậy với 2 chất gần nhau nhất cũng có $R_s > 10$, độ phân giải của các chất là đều thỏa mãn yêu cầu

2.2. Các chất cản trở gây ảnh hưởng

Quá trình khảo sát được chúng tôi tiến hành chạy điện di bằng cách thêm các chất ảnh hưởng có nồng độ từ thấp đến cao vào hỗn hợp 3 chất chuẩn asp (21,6 ppm), sac (21,52 ppm) và ace-K (24,24 ppm). Dựa vào diện tích pic và thời gian lưu của Asp, Sac, Ace-K để đánh giá sai số

➤ Ảnh hưởng của chất bảo quản

Khi thêm nồng độ các chất bảo quản có nồng độ từ thấp đến cao thì:

- Diện tích pic của asp, ace-k tăng khi thêm axit Benzoic. Sai số đối với asp, sac, ace-k lần lượt tương ứng từ là: $-1,1 \div 3,25\%$; $0,16 \div 1,4\%$; $0,6 \div 3,8 \%$

- Đối với axit sorbic 11,52 ppm khi thêm thì diện tích pic các chất đều giảm nhưng không đáng kể. Tại nồng độ 23,04 ppm và 46,08 ppm, diện tích pic các chất đều tăng. Sai số đối với asp ($-2,03 \div 6,2\%$), sac ($-0,5 \div 2,4\%$), ace-k ($-1,2 \div 2,2\%$)

- Như vậy các chất bảo quản khi thêm vào không làm ảnh hưởng lắm tới diện tích và thời gian lưu của các chất

➤ Ảnh hưởng của các loại đường

- Khi thêm đường Glucose và Fructose vào hỗn hợp chất chuẩn thì diện tích pic asp, sac, ace-k đều giảm. Cụ thể sai số của asp từ ($1,5 \div 5,8\%$), sac ($-1,0 \div -4,5\%$) và ace-k ($0,9 \div 5,0\%$).

- Diện tích asp, sac và ace-k tăng lên khi thêm đường cyclamate. Trong khi đó khi thêm đường saccharose thì diện tích asp, ace-k giảm, còn sac diện tích tăng từ $1,0 \div 2,4\%$.

- Khi thêm 3 đường Glu, Sacch và Fruc từ thấp đến cao, kết quả trên sắc đồ thu được đều không thấy xuất hiện các pic tương ứng. Chỉ có đường Cyclamate cho tín hiệu pic ở nồng độ 50 ppm rất rõ, và tách biệt không chen lẫn nhau với pic của các chất khác.

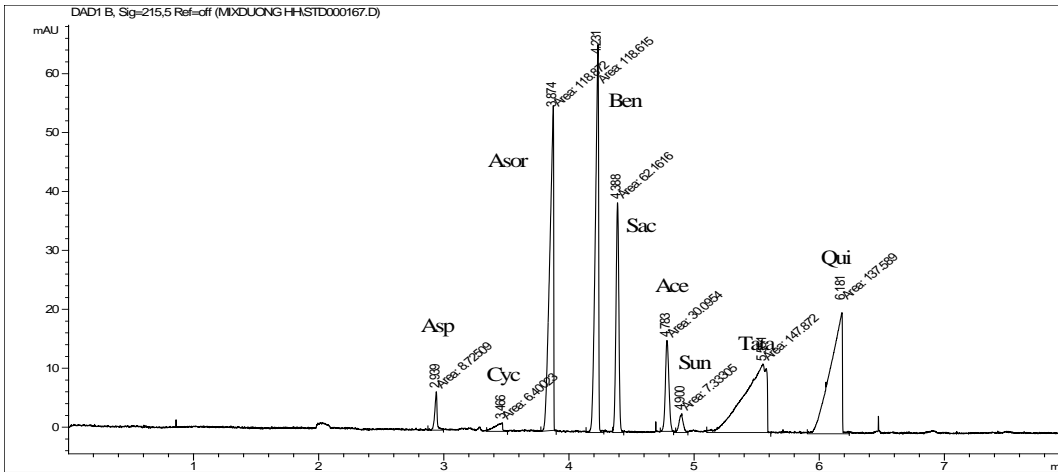
- Như vậy 4 đường trên không ảnh hưởng nhiều tới diện tích và thời gian lưu của các chất. Sai số đó nằm trong giới hạn cho phép của phương pháp.

➤ Ảnh hưởng của phẩm màu

- Khi thêm phẩm màu Sunset Yellow diện tích các pic tăng : asp ($0 \div 2,5\%$), sac ($0,7 \div 6,8\%$), ace-k ($1,3 \div 5,7\%$). Thêm quilenol thì diện tích pic của các đường hóa học này tăng: ($0 \div 5,6\%$) với asp, sac ($1,0 \div 4,7\%$) và ace-k ($2,2 \div 7,3\%$).

- Tarta và Brill thì thêm vào hỗn hợp các chất chuẩn làm diện tích pic các chất khảo sát đều giảm. Trừ diện tích của sac tăng lên khi thêm brilliant, sai số từ ($0 \div 3,5\%$).

- Thời gian lưu của asp, sac, ace-k đều tăng khi thêm Sun và Qui, sai số trong khoảng ($0,27 \div 9,3\%$). Đối với Tarta, Brill thì thời gian lưu của các chất nghiên cứu thay đổi không đáng kể, sai số từ ($-1,64 \div 1,9\%$).

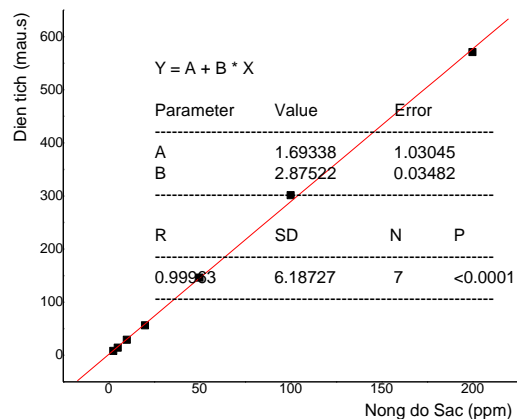
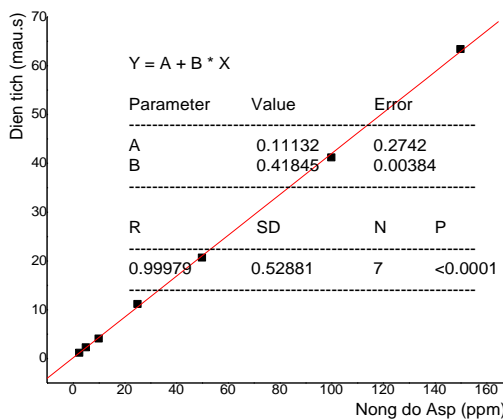


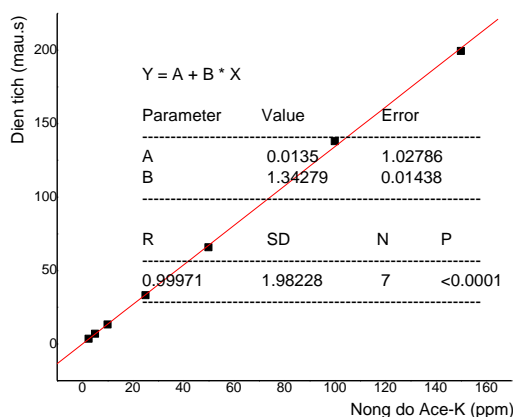
Hình 4. Điện di đồ khi thêm các yếu tố ảnh hưởng (axit benzoic 43,04 ppm, axit sorbic 46,08 ppm, glucose 46,24 ppm, fructose 43,04 ppm, saccharose 41,80 ppm, cyclamate 50 ppm, sunset yellow 67,52 ppm, brilliant 18,6 ppm, quilenol 57,12 ppm, tartarin 48,64 ppm) trong điều kiện ($L=54\text{cm}$, $I=50\text{ mA}$, $V=25\text{ kV}$, áp suất 50 mbar, $t=25^\circ\text{C}$, đệm borat 20 mM, $\text{pH}=9,5$)

Kết luận: Từ kết quả nghiên cứu ta thấy khi chạy điện di đồ thêm các yếu tố ảnh hưởng thì các pic rõ ràng, cân đối, không có sự chùng chéo giữa các phổ, thời gian lưu của các chất tách biệt nhau hoàn toàn. Đối với các loại đường Glucose, Fructose, Saccharose không cho tín hiệu các pic ở trong vùng khả kiến. Khi có mặt của các chất ảnh hưởng khảo sát ở trên thì diện tích và thời gian lưu của Sac, Ace-k, Asp có thay đổi. Sai số về diện tích và thời gian đều nhỏ hơn 10%, nằm trong giới hạn cho phép của phương pháp. Vì vậy các chất bảo quản, các loại đường và phẩm màu

2.3. Khảo sát lập đường chuẩn

Pha một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ từ 5 ppm đến 250 ppm từ dung dịch chuẩn gốc 1000 ppm và chuẩn trung gian 100 ppm. Kết quả khảo sát các thông số biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ của Sac, Ac, As và diện tích pic tương ứng





Hình 5. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic asp, sac, ace-k vào nồng độ

Bảng 7. Giá trị phương sai và $F_{tính}$ của Asp, Sac, Ace-K

Tên chất	Phương trình hồi qui	Phương sai	$F_{tính}$	$F_{bảng}$
AS	$y = 0,419.x + 0,111$	0,3	3,83	5,19
	$y = 0,430.x$	1,2		
SAC	$Y = 2,875.x + 1,693$	38,3	2,28	6,59
	$Y = 2,942.x$	87,4		
AC-K	$Y = 1,343.x + 0,014$	3,98	3,87	5,19
	$Y = 1,352.x$	15,4		

Từ các kết quả tính toán nhận thấy các giá trị $F_{tính} < F_{bảng}$, như vậy sự khác nhau giữa giá trị a và 0 là không có ý nghĩa. Kết luận phương pháp tiến hành phân tích đồng thời 3 chất trên thiết bị điện di mao quản không mắc sai số hệ thống.

2.4. Giới hạn phát hiện LOD

Bảng 8. Giới hạn phát hiện (LOD) theo phương pháp lý thuyết tính theo phương trình đường chuẩn

Chất phân tích	b	S_D	LOD (ppm)
Aspartame	0,419	0,53	3,79
Saccharin	2,875	6,19	6,46
Acesufame_K	1,343	1,98	4,43

2.5. Giới hạn định lượng LOQ

Bảng 9. Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Chất phân tích	Aspartame	Saccharin	Acesufame_K
LOQ (ppm) thực nghiệm	4,8	1,5	3,0
LOQ (ppm) lý thuyết	12,6	21,5	14,8

2.6. Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính hay nồng độ các đường hóa học từ giới hạn định lượng đến giới hạn tuyến tính trong khoảng từ 1,5 ÷ 200,0 ppm

2.7. Đánh giá độ chính xác (độ đúng, độ chụm) của phương pháp

Để đánh giá sai số và độ lặp lại của phép đo chúng tôi pha 3 mẫu có nồng độ ở khoảng tuyến tính 20 ppm, 50 ppm, 150 ppm. Thực hiện đo mỗi mẫu 5 lần

Qua kết quả đánh giá cho thấy sự khác biệt giữa giá trị trung bình và giá trị thực không đáng kể, độ đúng của phương pháp là rất tốt (yêu cầu của điện di là $CV \leq 3\%$). Hàm lượng thu hồi khá lớn từ $99,36 \div 107,52\%$ nằm trong giới hạn cho phép. Vì vậy có thể kết luận rằng phương pháp điện di mao quản có độ lặp đi lặp lại và độ chính xác cao, nằm trong phạm vi tuyến tính.

2.8. Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Chúng tôi tiến hành khảo sát trên nền mẫu trắng. Sử dụng mẫu trắng, thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 10 ppm, 25 ppm, và 50 ppm. Mỗi mức tiến hành làm lặp lại 5 lần

Nhận xét: Độ thu hồi của phương pháp tại 3 mức nồng độ 10 ppm, 25ppm, và 50 ppm đều trên 80 % và nằm trong giới hạn cho phép. Độ lặp lại của Asp, Sac, Ace-K tại nồng độ 10 ppm cao nhất trong 3 mức nồng độ. Tuy nhiên vẫn nằm trong giới hạn cho phép của phương pháp sắc ký điện di mao quản ($CV \leq 3\%$). Như vậy phương pháp có độ thu hồi trên 80% và độ lặp lại cao, có thể áp dụng phương pháp để phân tích asp, sac, ace-k trong đồ uống.

3.3. Phân tích mẫu thực tế

Trong luận văn của tôi, mẫu nghiên cứu là các loại đồ uống và nước giải khát có ga và không có ga hiện đang có mặt trên thị trường, như : Mẫu Sprite 330 mL- công ty Cocacola Việt Nam sản xuất ngày, Coca-Cola 330 mL- Cocacola công ty Việt Nam - ngày sản xuất, Sting Dâu năng lượng 330 mL- công ty Việt Nam Pepsico sản xuất, Lemon C2 trà xanh 360 mL- Hà Nội URC công ty Production, trà xanh O° Hà Nội URC do công ty Production sản xuất.

Các mẫu đồ uống được rung siêu âm trong khoảng 30 phút, và loại bỏ hết khí cacbonate, lọc bằng màng lọc 0.2 μ m. Hút chính xác 0.50 ml mỗi mẫu cho vào bình định mức 5 ml và pha loãng bằng nước cất siêu tinh khiết. Lượng thể tích dung dịch các chất chuẩn thêm vào lần lượt 0,1 ml; 0,2 ml; 0,4 ml với nồng độ tương ứng: asp (10,8 ppm, 21,6 ppm, 43,2 ppm), sac (10,76 ppm, 21,52 ppm, 43,04 ppm), ace-k (12,12 ppm, 24,24 ppm, 48,48 ppm). Sau đó định mức bằng nước cất siêu tinh khiết. Hàm lượng của asp, sac, ace-k được xác định bằng kỹ thuật thêm tiêu chuẩn.

Kết quả phân tích: Dựa vào các phương trình hồi qui của phương pháp thêm tiêu chuẩn đối với các mẫu trên là : $y = a + b x$

Bảng 10. Kết quả phân tích Asp, Sac, Ace trong các mẫu

Mẫu	Nồng độ của các chất (ppm)		
	AS	SAC	AC-K
Samurai	109,5 ± 10,5	12,1 ± 0,6	96,1 ± 10,2
Sprite	77,9 ± 7,8	18,9 ± 1,0	51,1 ± 5,6
Lemon C2	84,9 ± 12,6	37,8 ± 3,6	27,7 ± 6,0
Coca Cola	49,2 ± 5,7	17,8 ± 1,7	22,5 ± 2,9
Trà Trà xanh O°	21,0 ± 3,5	12,6 ± 2,8	4,5 ± 1,1

Nhận xét: Từ kết quả phân tích các mẫu ở bảng 3.18 đối với aspartame, saccharin, acesulfame-K thì nồng độ cho phép trong đồ uống có ga và đồ uống có hương vị thường là trong phạm vi 28-350 ppm, 21-90 ppm và 23-280 ppm, tương ứng. Vì vậy, nồng độ phát hiện của Aspartame, Saccharin, Acesulfame-K trong các mẫu phân tích ở trên phù hợp và nằm trong phạm vi hạn chế không ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng.

3.4. Bàn luận về qui trình rửa giải

❖ **Hàng ngày:**

+ Thời điểm bắt đầu: rửa bằng NaOH 1 N trong 5 phút, sau đó bằng NaOH 0.1N trong 5 phút, rồi đến nước cất siêu tinh khiết đã lọc qua màng lọc 0,2 µm trong 5 phút, cuối cùng là đệm 5 phút (rửa đệm 5 phút này cũng là quá trình đưa đệm làm việc lên mao quản).

+ Thời điểm kết thúc: rửa bằng nước siêu tinh khiết 5 phút, sau đó ngâm 2 đầu mao quản vào 2 ống chứa nước siêu tinh khiết.

❖ **Giữa các lần chạy mẫu:**

+ Đối với các chất chuẩn và các mẫu dạng dung dịch có thành phần đơn giản: chỉ cần rửa bằng NaOH 1N trong 3 phút, NaOH 0,1N trong 5 phút và đệm Borate 5 phút.

+ Đối với các mẫu có thành phần phức tạp, đặc biệt là mẫu thực phẩm, thì phải rửa thêm bằng NaOH và acid H₃PO₄ nếu quan sát thấy thời gian lưu của các chất không lặp lại.

KẾT LUẬN

- Đã xây dựng được phương pháp định lượng Acesulfame-k, Saccharin, Aspartame trong đồ uống, nước giải khát với các điều kiện điện di: Bước sóng phát hiện các chất là 215,5 nm, sử dụng dung dịch đệm borat 20 mM pH = 9,5, điện thế đặt vào hai đầu mao quản là 25kV, nhiệt độ 25°C, với áp suất bơm mẫu 50mbar trong thời gian 5s, dòng điện 100µA.

- Đã xây dựng được đường chuẩn cho mỗi chất. Tìm được giới hạn phát hiện LOD bằng thực nghiệm đối với Asp, Sac, Ace-K lần lượt là 1,6 ppm; 0,5 ppm; 1,0 ppm, theo đường chuẩn giá trị này tìm được là 3,79 ppm; 6,46 ppm; 4,43 ppm. Giá trị LOQ tìm được là 4,8 ppm; 1,5 ppm và 3,0 ppm, còn với lý thuyết giá trị này lần lượt là 12,6 ppm; 21,5 ppm; 14,8 ppm.

- Đánh giá được phương pháp phân tích dựa trên độ đúng và độ chụm với sai số tương đối từ 0,75 – 1,85%, giá trị biến thiên CV < 3%. Độ lặp lại tương đối tốt với độ lệch chuẩn (S_D) từ 0,2 – 1,5% , hiệu suất thu hồi trên mẫu giả là 96,6 - 101,8%. Đồng thời cũng đánh giá phương pháp trực tiếp trên mẫu thực với hiệu suất thu hồi là 95.2 – 107,0%

Từ lý thuyết và quá trình khảo sát, phương pháp điện di mao quản được lựa chọn xác định 3 chất aspartame, saccharin, acesulfame-k trong các loại nước giải khát. Kết quả thu được cho thấy hàm lượng Asp, Sac, và Ace-k đều nằm trong giới hạn cho phép trong khoảng từ 28 – 350 ppm, 21 - 90 ppm, 23 – 280 ppm tương ứng. Vì vậy, nồng độ aspartame, saccharin, acesulfame-k trong các mẫu phân tích ở trên phù hợp và nằm trong phạm vi hạn chế không gây ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng

References

TIẾNG VIỆT

1. Nông Minh Dũng, Nguyễn Văn Ri, Phạm Luận (2002), “ *Tách và xác định các NTDH bằng phương pháp điện di mao quản*”, Tạp chí hoá học phân tích, (23), tr 10-12.
2. Lê Hoàng (2006), “ *Xác định phụ gia thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*”, Luận văn thạc sĩ khoa học, Khoa Hóa học, Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội.
3. Đặng Thu Hiền (2009), “ *Xác định hóa chất bảo vệ thực vật Carbamat trong một số kim loại rau quả bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ*”. Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên.
4. Trần Tứ Hiếu, Từ Vong Nghi, Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Xuân Trung (2007), *Hoá học phân tích- phần 2- Các phương pháp phân tích công cụ*, NXB Đại học quốc gia Hà Nội
5. Trần Tứ Hiếu, (2003), “*Phân tích trắc quang phổ hấp thụ UV-VIS*”, Nhà Xuất Bản Đại Học Quốc Gia Hà Nội.

6. Đỗ Lan Hương (2009), “*Xây dựng phương pháp định lượng Cefixim trong chế phẩm và trong huyết tương bằng điện di mao quản*”, Trường đại học Dược Hà Nội.
7. Phạm Luận (1999), “*Cơ sở lý thuyết về sắc ký điện di mao quản trong hiệu suất cao*”, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội.
8. Trịnh Thị Như Ngọc (2003), “*Tách và xác định lượng nhỏ các NTĐH trong uran bằng phương pháp chiết và điện di mao quản*”, khoá luận tốt nghiệp, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội.
9. Tạ Thị Thảo (2005), “*Bài giảng chuyên đề thống kê trong hóa phân tích*”, Đại học Khoa Học Tự Nhiên – Đại học Quốc Gia Hà Nội.
10. Trần Minh Thuý (2003), “*Tách và xác định lượng nhỏ các NTĐH trong uran bằng phương pháp trao đổi ion và điện di mao quản*”, Khoá luận tốt nghiệp, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội.
11. Thông tin trên internet:
[http://vi.wikipedia.org/wiki/TCVN_\(25/08/2011\)](http://vi.wikipedia.org/wiki/TCVN_(25/08/2011))

<http://thuvienphapluat.vn/Thong-tu-45-2010-TT-BYT-Quy-chuan-ky-thuat-quoc-gia-san-pham-do-uong-co-con-vb116458t23.aspx> (25/08/2011)

TIẾNG ANH

12. Abdolraouf Samadi-Maybodi, S.K. Hassani Nejad Darzi, (2008) “*Simultaneous determination of vitamin B12 and its derivatives using some of multivariate calibration I (MVC1) techniques*”, Spectrochimica Acta Part, A701–1172, Pages 1167- 1172.
13. A. Herrmann, E. Damawandi and M. Wagmann J. (1983), “*Determination of cyclamate by high-performance liquid chromatography with indirect photometry*”, 280(1), Pages 85-90
14. Ana Beatriz Bergamo, Jose Alberto Fracassi da Silva, Dosil Pereira de Jesus (2010). “*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*”. Institute of Chemistry, University of Campinas – UNICAMP, 55: pages 78-88.
15. 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*”. European Commission, Retieseweg 111, 2440 Geel, p 123 – 136
16. B.L.Karger, A.S. Cohen, A.Guttmen, (1989), “*High Performance Electrophoresis in Biological Science*”, J. Chromatogr, 492,585-614.
17. Budavari, Susan, ed (1989). “*Aspartame*”. The Merck Index (11th ed.). Rahway, NJ: Merck & Co.. p. 859.
18. Catherine O. Thompson, V. Craige Trenerry , Bridget Kemmery. “*Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-Joule soft drinks and other foods*”, Australian Government Analytical Laboratories, 338-340 Tapleys Hill Road.
19. Conis, Elena, (2011) “*Saccharin's mostly sweet following*” Los Angeles Times. December 27, 2010, accessed January 14, p 164 -184.

20. Da-jin Yang and Bo Chen. (2009). “ *Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS*” , , Hunan Normal University, Changsha 410081, China, and National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57 (8), pp 3022–3027.
21. David J. Ager, David P. Pantaleone, Scott A. Henderson, Alan R. Katritzky, Indra Prakash, D. Eric Walters, (1998), “*Commercial, Synthetic Nonnutritive Sweeteners*”. *Angewandte Chemie International Edition* 37 (13-24): 1802–17.
22. David N. Heiger, (1992), “ *High Performance Capillary Electrophoresis*”, Hewlett Packard Company Pub.
23. Health Canada: “*Aspartame - Artificial Sweeteners*”. <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/addit/sweeten-edulcor/aspartame-eng.php>.
24. Ji C, Sun Y, Li X, Chu X, Chen Z. (2009) “*Simultaneous determination of artificial sweeteners in beverage by ultra performance liquid chromatography*”. Article in Chinese, *Se Pu*. Jan; 27(1):111-3.
25. Karstadt, Myra.L, “*Testing Needed for Acesulfame Potassium, an Artificial-Sweetener*”. *Food Anal. Methods* 5:105-109.
26. Lin, Yu H. Chou, Shin S. Sheu, Fuu Shyu, Yuan Authors, (2009), “*Simultaneous Determination of Sweeteners and Preservatives in Preserved Fruits by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*”, Source: *Journal of Chromatographic Science*, Volume 38, Number 8, August 2000, pp. 345-352(8)
27. L. F. Capitán-Vallvey^a, M. C. Valencia^a & E. Arana Nicolás (2007). “*Flow-through spectrophotometric sensor for the determination of saccharin in low-calorie products*”, Available online: 20 Feb 2007, Pages 32-41
28. 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*”. Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera, 5700 San Luis, Argentina, p 1664-1778.
29. M.C. Boyce, (1999) ”*Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in foods by mixed micellar electrokinetic chromatography*”, *J. Chromatogr, A*, 847(1-2),369-375.
30. Newton, David E, (2007), “*Food Chemistry (New Chemistry)*”. New York: Facts on File. pp. 69.
31. Natalia E. Llamas & María S. Di Nezio & Miriam E. Palomeque & Beatriz S. Fernández Band, (2008), “*Direct Determination of Saccharin and Acesulfame-K in Sweeteners and Fruit Juices Powders*”, *Food Anal. Methods* 1:43–48
32. Rainer Schuster, Angelika Gratzfeld-Hüsgen “*CZE analysis of artificial sweeteners and preservatives in drinks*”, Agilent Technologies. Waldbronn, Germany.
33. Rowe, Raymond C. (2009). “*Aspartame*”, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. pp. 11–12. ISBN 1582120587
34. Orawan Kritsunankul, Jaroon Jakmune, (2009), “*Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine*”, *Talanta*, vol.79, no.
35. W.G.Kuhr, (1990), “*Capillary Electrophoresis*”, *Anal. Chem*, 64,398R-40R.