

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11590:2016

Xuất bản lần 1

PHỤ GIA THỰC PHẨM - ASPARTAM

Food additives - Aspartame

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 11590:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo JECFA Monograph 1 (2006);

TCVN 11590:2016 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F4 *Gia vị và phụ gia thực phẩm* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Phụ gia thực phẩm - Aspartam

Food additives - Aspartame

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng đối với aspartam được sử dụng làm phụ gia thực phẩm.

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 6469: 2010, *Phụ gia thực phẩm – Phương pháp đánh giá ngoại quan và xác định các chỉ tiêu vật lý*

TCVN 8900-2:2012, *Phụ gia thực phẩm – Xác định các thành phần vô cơ – Phần 2: Hao hụt khối lượng khi sấy, hàm lượng tro, chất không tan trong nước và chất không tan trong axit*

TCVN 8900-6:2012, *Phụ gia thực phẩm – Xác định các thành phần vô cơ – Phần 6: Định lượng antimon, bari, cadimi, crom, đồng, chì và kẽm bằng đo phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa*

TCVN 8900-8:2012, *Phụ gia thực phẩm – Xác định các thành phần vô cơ – Phần 8: Định lượng chì và cadimi bằng đo phổ hấp thụ nguyên tử dùng lò graphit*

3 Mô tả

3.1 Tên gọi

Tên hóa học: Axit 3-amino-N-(alpha-carbomethoxy-phenetyl)-succinamic;
N-L-alpha-aspartyl-L-phenylalanin-1-metyl este

Tên khác: Aspartyl phenylalanin metyl este (APM)

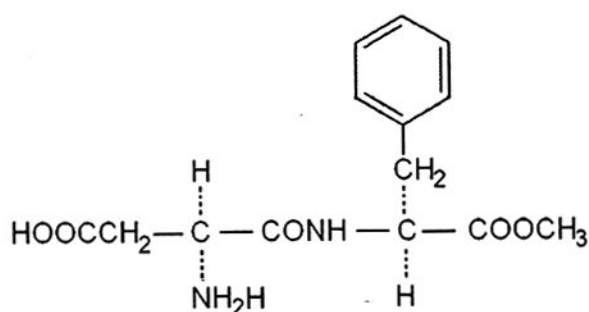
3.2 Kí hiệu

INS (mã số quốc tế về phụ gia thực phẩm): 951

C.A.S (mã số hóa chất): 22839-47-0

3.3 Công thức hoá học: $C_{14}H_{18}N_2O_5$

3.4 Công thức cấu tạo (xem Hình 1)



Hình 1 – Công thức cấu tạo của aspartam

3.5 Khối lượng phân tử: 294,31

3.6 Chức năng sử dụng: Chất tạo ngọt

4 Các yêu cầu

4.1 Nhận biết

4.1.1 Cảm quan

Bột tinh thể màu trắng, không mùi, vị ngọt mạnh.

4.1.2 Độ hòa tan

Rất ít tan trong nước và trong etanol.

CHÚ THÍCH: Theo TCVN 6469:2010, một chất được coi là "rất ít tan" nếu cần từ 100 đến dưới 1 000 phần dung môi để hòa tan 1 phần chất tan.

4.1.3 Phép thử nhóm amin

Đạt yêu cầu của phép thử trong 5.2.

4.1.4 Phép thử nhóm este

Đạt yêu cầu của phép thử trong 5.3.

4.2 Các chỉ tiêu lý - hóa

Các chỉ tiêu lý - hóa của aspartam theo quy định trong Bảng 1.

Bảng 1 – Chỉ tiêu lý - hóa của aspartam

Tên chỉ tiêu	Mức yêu cầu
1. Hàm lượng aspartam, % khối lượng chất khô	từ 98 đến 102
2. Hao hụt khối lượng sau khi sấy, % khối lượng, không lớn hơn	4,5
3. Trị số pH (dung dịch pha loãng 1 : 125 phần thể tích)	từ 4,5 đến 6,0
4. Góc quay cực riêng, $[\alpha]_{20}^D$	từ + 14,5° đến + 16,5°
5. Độ hấp thụ ở bước sóng 430 nm, không lớn hơn ^{a)}	0,022
6. Hàm lượng tro sulfat, % khối lượng, không lớn hơn	0,2
7. Hàm lượng axit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin axetic, % khối lượng, không lớn hơn	1,5
8. Hàm lượng các đồng phân quang học khác	Đạt yêu cầu của phép thử trong 5.10
9. Hàm lượng chì, mg/kg, không lớn hơn	1

^{a)} Tương đương với tỷ lệ độ truyền quang của hỗn hợp dung dịch mẫu thử trong dung dịch axit clohydric 2 N với tỉ lệ 1 : 100, được xác định bằng cuvet 1 cm ở 430 nm với máy đo quang phổ thích hợp, so với độ truyền quang của dung dịch axit clohydric 2 N, là không nhỏ hơn 0,95.

5 Phương pháp thử

5.1 Xác định độ hòa tan, theo 3.7 của TCVN 6469:2010.

5.2 Phép thử nhóm amin

Hòa tan 2 g ninhydrin trong 75 ml dimetylsulfoxid, thêm 62 mg hydrindantin, pha loãng đến 100 ml bằng dung dịch đệm lithi axetat 4 M (pH 9) và lọc.

Chuyển khoảng 10 mg mẫu thử vào ống nghiệm và thêm 2 ml dung dịch thuốc thử đã chuẩn bị ở trên rồi đun, xuất hiện màu đỏ tía đậm.

5.3 Phép thử nhóm este

Hòa tan khoảng 20 mg mẫu thử trong 1 ml metanol, thêm 0,5 ml metanol đã bão hòa bằng hydroxylamin hydroclorua, trộn rồi thêm 0,3 ml dung dịch kali hydroxit 5 N trong metanol. Đun hỗn hợp đến sôi rồi làm nguội, chỉnh pH về khoảng 1 đến 1,5 bằng dung dịch axit clohydric 10 % (khối lượng/thể tích) và thêm 0,1 ml dung dịch sắt (III) clorua 1 N, xuất hiện màu đỏ tía.

5.4 Xác định hàm lượng aspartam

5.4.1 Thuốc thử

5.4.1.1 Dimetylformamid.

5.4.1.2 Dung dịch thymol xanh

Hòa tan 0,1 g thymol xanh trong 100 ml etanol, lọc nếu cần.

5.4.1.3 Dung dịch lithi methoxid, 0,1 N.

5.4.2 Thiết bị, dụng cụ

5.4.2.1 Tủ sấy, có khả năng vận hành ở 105 °C.

5.4.2.2 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

5.4.2.3 Pipet.

5.4.2.4 Microburet.

5.4.3 Cách tiến hành

Cân khoảng 150 mg mẫu thử đã được làm khô trước ở 105 °C trong 4 h, chính xác đến 0,1 mg, hòa tan trong 35 ml dimetylformamid (5.4.1.1), thêm 5 giọt dung dịch thymol xanh (5.4.1.2) và chuẩn độ bằng dung dịch lithi methoxid 0,1 N (5.4.1.3), sử dụng microburet (5.4.2.4) đến điểm kết thúc chuẩn độ màu xanh lam đậm.

LƯU Ý: Tránh để dung dịch thử hấp thụ cacbon dioxit và hấp thụ ẩm bằng cách đậy bình chuẩn độ bằng lá nhôm trong khi hòa tan mẫu thử và trong quá trình chuẩn độ.

Thực hiện với một phép thử trắng và hiệu chỉnh nếu cần.

5.4.4 Tính kết quả

Hàm lượng aspartam trong mẫu thử, X, biểu thị bằng phần trăm khối lượng chất khô, tính theo Công thức (1):

$$X = \frac{V \times 29,43}{w} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó:

V là thể tích dung dịch lithi methoxid 0,1 N đã dùng để chuẩn độ, tính bằng mililit (ml);

29,43 là số miligam aspartam tương đương với 1 ml dung dịch lithi methoxid 0,1 N;

w là khối lượng mẫu thử tính theo chất khô, tính bằng miligam (mg).

5.5 Xác định hao hụt khối lượng sau khi sấy, theo 5.1 của TCVN 8900-2:2012.

Thực hiện ở nhiệt độ 105 °C trong 4 h.

5.6 Xác định pH, theo 3.8 của TCVN 6469:2010.

5.7 Xác định góc quay cực riêng, theo 3.6 của TCVN 6469:2010.

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử 4 % trong axit formic 15 N; xác định góc quay cực riêng trong vòng 30 min sau khi chuẩn bị dung dịch mẫu thử.

5.8 Xác định hàm lượng tro sulfat, theo 5.3.3 (Phương pháp I) của TCVN 8900-2:2012, sử dụng 1 g mẫu thử.

5.9 Xác định hàm lượng axit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin axetic

5.9.1 Thuốc thử

5.9.1.1 Metanol.

5.9.1.2 N,O-bis-(trimetylsilyl) acetamid.

5.9.1.3 Dimetylformamid.

5.9.1.4 Thuốc thử silyl hóa

Ngay trước khi sử dụng, pha loãng 3 phần thể tích N,O-bis-(trimetylsilyl) acetamid (5.9.1.2) bằng 2 phần thể tích dimetylformamid (5.9.1.3).

5.9.1.5 Dung dịch chuẩn axit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin axetic

Cân khoảng 25 mg chất chuẩn axit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin axetic¹⁾, chính xác đến 0,01 mg,

¹⁾ Có sẵn từ Food Chemicals Codex, NAS/NRC, 2101 Constitution Avenue, N.W., Washington, D.C. 20418, USA. Thông tin này được đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

chuyển vào bình định mức 50 ml (5.9.2.4), hòa tan trong metanol (5.9.1.1), thêm metanol đến vạch và trộn. Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch này cho vào bình định mức 100 ml (5.9.2.4), thêm metanol đến vạch và trộn.

Dùng pipet lấy 3 ml dung dịch thứ hai cho vào lọ nhỏ 7,5 ml (5.9.2.5) và cho bay hơi đến khô trên bề hơi nước (5.9.2.7). Thêm 1 ml thuốc thử silyl hóa (5.9.1.4) vào phần còn lại, nút kín lọ, lắc và gia nhiệt trong tủ sấy (5.9.2.6) ở 80 °C trong 30 min. Lấy lọ ra khỏi tủ sấy, lắc trong 15 s và để nguội đến nhiệt độ phòng.

5.9.2 Thiết bị, dụng cụ

5.9.2.1 Thiết bị sắc kí khí, được trang bị detector ion hóa ngọn lửa hydro và được lắp cột thủy tinh với cổng bơm trên cột (ví dụ: Micro-Tex 220²⁾), cột thủy tinh dài 1,83 m, đường kính trong 4 mm được nhồi vật liệu Supelcoport³⁾ chứa 3 % OV-1 cỡ 80/100 mesh. Ổn định cột qua đêm ở 250 °C để đạt được sự cân bằng ở điều kiện vận hành. Để ngăn ngừa tích tụ silic dioxit, cần làm sạch thường xuyên detector bằng axeton.

5.9.2.2 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 mg.

5.9.2.3 Pipet.

5.9.2.4 Bình định mức, dung tích 50 ml, 100 ml.

5.9.2.5 Lọ nhỏ, dung tích 7,5 ml, có nút với lớp lót teflon.

5.9.2.6 Tủ sấy, có thể vận hành ở nhiệt độ 80 °C.

5.9.2.7 Bể hơi nước.

5.9.3 Chuẩn bị mẫu thử

Cân khoảng 10 mg mẫu thử, chính xác đến 0,01 mg, cho vào lọ 7,5 ml (5.9.2.5), thêm 1 ml thuốc thử silyl hóa (5.9.1.4), đậy nút kín, lắc và gia nhiệt trong tủ sấy (5.9.2.6) ở 80 °C trong 30 min. Lấy lọ ra khỏi tủ sấy, lắc trong 15 s và để nguội đến nhiệt độ phòng.

5.9.4 Cách tiến hành

Các thông số vận hành có thể thay đổi phụ thuộc vào thiết bị cụ thể được sử dụng, nhưng sắc kí đồ thích hợp có thể thu được khi sử dụng các điều kiện sau đây:

²⁾ Micro-Tex 220 là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này được đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

³⁾ Supelcoport là sản phẩm của Supelco, Inc.. Đây là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này được đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

Nhiệt độ cột:	200 °C
Nhiệt độ đầu vào:	200 °C
Nhiệt độ detector:	275 °C
Khí mang:	heli, tốc độ dòng 75 ml/min
Khí đốt:	hỗn hợp hydro và không khí, tốc độ được tối ưu để thu độ nhạy tốt nhất
Thiết bị ghi:	1 mV trên toàn thang đo

CHÚ THÍCH: Đối với cột Micro-Tex, độ tắt là 16 x 10.

Bơm 3 µl dung dịch chuẩn (5.9.1.5) vào hệ thống sắc ký khí (5.9.2.1) để thu được sắc ký đồ, đo chiều cao của pic axit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin axetic và kí hiệu là *P*. Trong điều kiện đã quy định, thời gian rửa giải là khoảng 7 min đến 9 min.

Tương tự, bơm 3 µl phần mẫu thử đã chuẩn bị (5.9.3) vào hệ thống sắc ký khí (5.9.2.1) để thu được sắc ký đồ, đo chiều cao pic axit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin axetic có trong mẫu và kí hiệu là *p*.

5.9.5 Tính kết quả

Hàm lượng axit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin axetic trong mẫu thử, X_1 , biểu thị bằng phần trăm khối lượng, tính theo Công thức (2):

$$X_1 = \frac{3 \times W \times p}{500 \times w \times P} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

W là khối lượng chính xác đã lấy của chất chuẩn, tính bằng miligam (mg);

w là khối lượng mẫu thử, tính bằng miligam (mg);

P là chiều cao của pic axit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin axetic trên sắc ký đồ chuẩn;

p là chiều cao của pic axit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazin axetic trên sắc ký đồ mẫu thử.

5.10 Xác định hàm lượng các đồng phân quang học khác

5.10.1 Thuốc thử

5.10.1.1 Dung dịch đệm xitrat, pH 5,28

Hòa tan 34,3 g natri xitrat ngậm hai phân tử nước ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) trong khoảng 400 ml nước, thêm 7,5 ml axit clohydric đặc (35 %), 5 ml benzyl alcohol và thêm nước đến 1 000 ml.

5.10.1.2 Dung dịch đệm xitrat, pH 2,2

Hòa tan 1,4 g natri xitrat ngậm hai phân tử nước ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), 13,0 g axit xitric ngậm một phân tử nước ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) và 10,9 g natri clorua trong khoảng 400 ml nước, thêm nước đến 1 000 ml.

5.10.1.3 Dung dịch natri hydroxit, 0,2 N.

5.10.1.4 Dung dịch ninhydrin

Rót 140 ml nước vào cốc có mỏ 500 ml, thêm 82,0 g natri axetat ($C_2H_3NaO_2$), khuấy để hòa tan hoàn toàn, thêm 25 ml axit axetic băng (30 % khối lượng/thể tích) và thêm nước đến 250 ml. Chính pH của dung dịch đến $5,51 \pm 0,03$ bằng axit axetic băng hoặc bằng dung dịch natri axetat 1 N, thu được dung dịch đệm axetat.

Rót 750 ml metyl-cellosolve vào chai thủy tinh tối màu dung tích 1 000 ml và thêm 250 ml dung dịch đệm axetat. Cho khí nitơ đi qua dung dịch, trong khi trộn, hòa tan 20 g ninhydrin và sau đó là 0,38 g thiếc (II) clorua ngậm hai phân tử nước ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) vào dung dịch. Để yên dung dịch trong ít nhất 24 h trước khi sử dụng.

5.10.1.5 Dung dịch chuẩn

Chuyển 2,50 mg chất chuẩn L-alpha-aspartyl-D-phenylalanin metyl este ⁴⁾ vào bình định mức 100 ml, hòa tan và thêm nước đến vạch, thu được dung dịch A.

Chuyển 250 mg chất chuẩn L-alpha-aspartyl-L-phenylalanin metyl este vào bình định mức 100 ml khác, hòa tan trong dung dịch đệm xitrat pH 2,2 (5.10.1.2), thêm 10,0 ml dung dịch A và thêm dung dịch đệm xitrat pH 2,2 đến vạch. Bảo quản dung dịch đã chuẩn bị ở nhiệt độ dưới 5 °C.

5.10.2 Thiết bị, dụng cụ

5.10.2.1 Thiết bị phân tích axit amin, ví dụ Hitachi KLA-5 ⁵⁾, được trang bị cột có chiều dài 550 mm, đường kính trong 9 mm, được nhồi bằng khoảng 50 g nhựa trao đổi cation loại mạnh (ví dụ: Hitachi Custom Ion-Exchange Resin No. 2613 ⁶⁾), vòng phản ứng dài 29 m, đường kính trong 0,5 mm, bộ phận cấp ninhydrin, máy đo quang với bộ lọc nhiễu ở bước sóng 570 nm và detector cuvet quang học selen.

⁴⁾ Có sẵn từ Ajinomoto Co. Inc., 1-5-8 Kyobashi, Chuo-ku, Tokyo 104, Nhật Bản. Thông tin này được đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

⁵⁾ Ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này được đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

⁶⁾ Ví dụ về vật liệu thích hợp có bán sẵn. Thông tin này được đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

5.10.3 Chuẩn bị mẫu thử

Chuyển 250 mg mẫu thử vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng bằng dung dịch đệm xitrat pH 2,2 (5.10.1.2) đến vạch.

5.10.4 Cách tiến hành

Các thông số vận hành có thể thay đổi phụ thuộc vào thiết bị cụ thể được sử dụng, nhưng sắc ký đồ thích hợp có thể thu được khi sử dụng các điều kiện sau:

Nhiệt độ cột:	55 °C
Nhiệt độ vòng phản ứng:	100 °C
Chất rửa giải:	dung dịch đệm xitrat pH 5,28 (5.10.1.1)
Áp suất rửa giải:	từ 8 kg/cm ² (784,532 kPa) đến 10 kg/cm ² (980,665 kPa)
Tốc độ rửa giải:	60 ml/h
Áp suất dung dịch ninhydrin:	từ 2 kg/cm ² (196,133 kPa) đến 5 kg/cm ² (490,3325 kPa)
Tốc độ dung dịch ninhydrin:	30 ml/h
Detector đo quang:	bước sóng 570 nm
Máy ghi toàn thang:	độ hấp thụ từ 0 đến 0,1

Phục hồi cột bằng dung dịch natri hydroxit 0,2 N (5.10.1.3), sau đó đệm bằng dung dịch đệm xitrat pH 5,28 (5.10.1.1). Sau khi đưa dung dịch ninhydrin (5.10.1.4) vào hệ thống, bơm 500 µl dung dịch chuẩn (5.10.1.5) vào thiết bị phân tích axit amin và thu được sắc ký đồ. Trong các điều kiện quy định, thời gian lưu tương ứng vào khoảng 100 min đối với L-alpha-aspartyl-D-phenylalanin metyl este và khoảng 115 min đối với L-alpha-aspartyl-L-phenylalanin metyl este.

Tương tự, bơm 500 µl dung dịch mẫu thử vào thiết bị phân tích axit amin (5.10.2.1) và thu được sắc ký đồ. So sánh sắc ký đồ này với sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và nhận diện thành phần bằng cách so sánh thời gian lưu. Không quan sát được pic tương ứng với L-alpha-aspartyl-D-phenylalanin metyl este.

Tiến hành tương tự đối với D-alpha-aspartyl-L-phenylalanin metyl este.

Giới hạn phát hiện đối với tổng L-alpha-aspartyl-D-phenylalanin metyl este và D-alpha-aspartyl-L-phenylalanin metyl este trong phương pháp này là khoảng 1 µg/ml.

5.11 Xác định hàm lượng chì, theo TCVN 8900-6:2012 hoặc TCVN 8900-8:2012.