

EWA MAJEWSKA

WALIDACJA MIARECZKOWEJ METODY OZNACZANIA ASPARTAMU Z ZASTOSOWANIEM METANOLANU SODU

Streszczenie

Przedmiotem badań było sprawdzenie możliwości zastosowania w analityce miareczkowej metody oznaczania aspartamu w wybranych produktach spożywczych. Aspartam oznaczano metodą miareczkową, stosując metanolan sodu jako substancję miareczkującą wobec wskaźnika pirokatecholu fioletu. Metoda ta została wstępnie przebadana z zastosowaniem elementów procedury walidacji, która ma na celu potwierdzenie naukowej poprawności metody analitycznej. Stwierdzono, że proponowana metoda może być stosowana w ograniczonym zakresie zawartości aspartamu. Charakteryzuje się ona dobrą selektywnością potwierdzoną w badaniach modelowych. Jest prosta i szybka w wykonaniu, jednak najlepszą precyzję i dokładność oznaczenia odnotowano w przypadku analizy słodzików stołowych.

Słowa kluczowe: aspartam, ilościowe oznaczenie, walidacja.

Wstęp

Postęp w dziedzinie technologii żywności, a także oczekiwania konsumentów poszukujących nowych środków spożywczych sprawiły, że substancje dodatkowe i różnego rodzaju dodatki do żywności odgrywają coraz większą rolę technologiczną i żywieniową. Jednym z aktualnych trendów w produkcji środków spożywczych jest modyfikacja składu recepturowego, prowadząca do otrzymania m.in. żywności niskoenergetycznej (w tym niskocukrowej, bezcukrowej, niskotłuszczowej). Otrzymywanie produktów nisko- i bezcukrowych możliwe jest przez zastosowanie tzw. zamienników cukru, takich jak aspartam. Substancje te charakteryzują się bardzo wysoką słodkością i są stosowane do nadania tego smaku produktom, w których całkowicie lub częściowo wyeliminowano sacharozę. Jednocześnie są one uznawane za dodatki do żywności, a to pociąga za sobą konieczność ich wszechstronnego przebadania przed wprowadze-

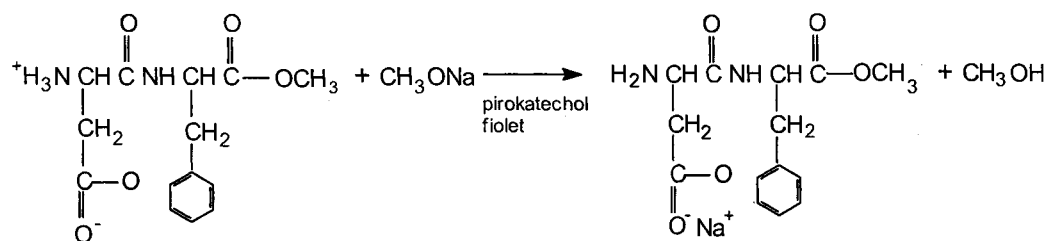
niem do obrotu. Ponadto niezbędne jest dysponowanie metodami analitycznymi, które pozwalałyby na szybkie i precyzyjne określenie ich zawartości w produktach. Jest to ważne z punktu widzenia kontroli jakości, polegającej na sprawdzaniu zgodności zawartości składnika z normą i recepturą, jak również dla technologów, przy określaniu takich parametrów procesu technologicznego, które nie spowodują szkodliwego zwykle rozkładu substancji dodatkowej.

Celem pracy było zastosowanie metody miareczkowej z użyciem metanolanu sodu do oznaczania zawartości syntetycznego środka słodzącego – aspartamu w wybranych produktach spożywczych. Zakres pracy obejmował także poddanie powyższej metody procedurze walidacji, z uwzględnieniem takich parametrów jak: liniowość, selektywność, precyzja i dokładność.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym były wybrane, rynkowe produkty spożywcze, w których zamiennikiem sacharozy był aspartam. Badaniom poddano: słodzik w tabletkach, kisiel typu light oraz czekoladę typu light.

Zawartość aspartamu w badanych produktach oznaczano metodą miareczkową z użyciem metanolanu sodu [3], która polega na reakcji kwasowo-zasadowej, jaka zachodzi pomiędzy grupą karboksylową aspartamu a metanolanem sodu w obecności pirokatecholu fioleto, co przedstawiono poniżej:



Reakcja ta zachodzi w warunkach bezwodnych, co zapewnia trwałość wiązania peptydowego aspartamu, a zastosowanie metanolanu sodu zabezpiecza przed możliwością jego transestryfikacji.

Przygotowanie próbek do analiz

Do kolb stożkowych odważano następujące ilości badanych produktów: kisiel – 40 g, czekolada – 50 g. Następnie w celu ekstrakcji aspartamu dodawano po 20 ml alkoholu metylowego i wytrząsano przez 15 min w temp. $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Alkohol metylowy odparowywano w wyparce próżniowej, a pozostałość po odparowaniu rozpuszczano w mieszaninie benzenu z metanolem (3:1) i uzupełniano do 100 ml.

W przypadku słodziku w tabletkach naważkę (300 mg) rozpuszczano w mieszaninie benzenu z metanolem (3:1) i uzupełniano do 50 ml.

Oznaczanie zawartości aspartamu metodą miareczkową

Odczynniki

1. mieszanina benzen : metanol w stosunku objętościowym 3:1;
2. pirokatechol fiolet firmy SIGMA (nr kat. P-7884) – 0,1% (m/v); 100 mg pirokatecholu fioletu rozpuszczano w 100 ml mieszaniny benzenu z metanolem;
3. metanolan sodu – 0,05 M; 2,5 g metalicznego sodu rozpuszczano w 200 ml metanolu i uzupełniano benzenem do objętości 2000 ml.

Wykonanie oznaczenia

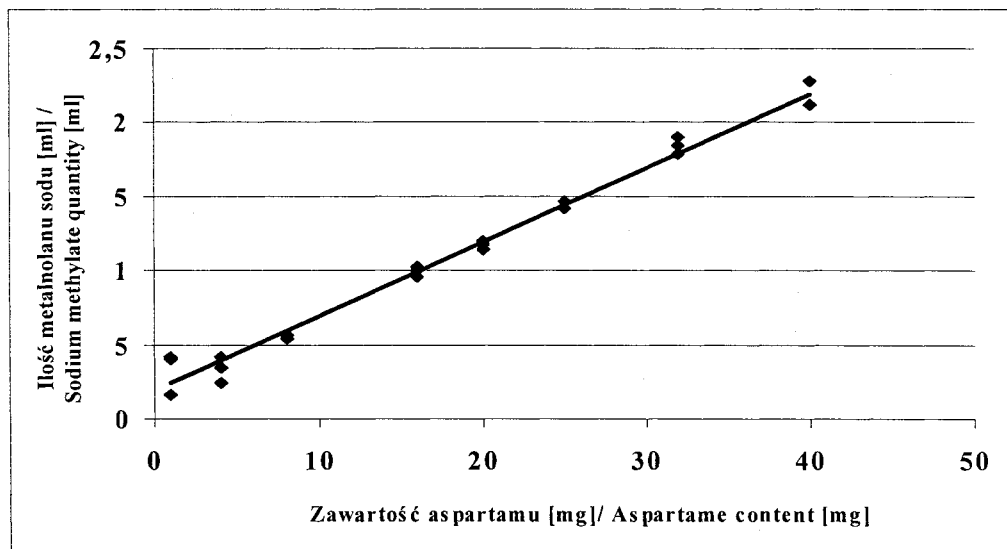
Do suchych kolb stożkowych przenoszono takie objętości roztworów badanych produktów, aby zawartość aspartamu wynosiła od 1 do 40 mg. Następnie dodawano po 20 ml mieszaniny benzenu z metanolem (3:1) i po 0,2 ml roztworu pirokatecholu fioletu. Otrzymaną mieszaninę miareczkowano metanolanem sodu aż do zmiany barwy z żółtej na niebieską.

Obliczanie wyników

Zawartość aspartamu w badanych produktach obliczano na podstawie równania krzywej wzorcowej (rys. 1), sporządzonej jako zależność objętości metanolanu sodu zużytego na zmiareczkowanie od stężenia aspartamu. Wyniki wyrażano w mg/100 mg lub w mg/100 g badanego produktu.

W ramach walidacji metody sprawdzano takie parametry, jak: liniowość, selektywność, precyzja, dokładność i powtarzalność oznaczeń aspartamu w badanych próbkach.

Liniowość metody sprawdzano poprzez analizę zależności objętości metanolanu sodu zużytego na zmiareczkowanie prób od stężenia aspartamu (1 - 40 mg/ml). Natomiast selektywność sprawdzano oznaczając zawartość aspartamu w roztworach modelowych, sporządzanych przez dodanie do standardowego roztworu aspartamu (200 mg/50 ml) takich ilości różnych substancji, aby ich stężenie było zbliżone do przeciętnej zawartości w badanych produktach. Analizowano roztwory z dodatkami następujących substancji: kwas cytrynowy, kwas askorbinowy, maltodekstryna, sacharoza, laktoza, glukoza oraz skrobia.



Rys. 1. Krzywa wzorcowa do oznaczania aspartamu ($y = 0,052x + 0,1416$).

Fig. 1. Calibration curve applied to determine the aspartame content ($y = 0,052x + 0,1416$).

Otrzymane wartości aspartamu porównano z rzeczywistą jego zawartością, równą 200 mg (przyjętą jako 100%).

Precyzję metody szacowano na podstawie współczynnika zmienności (RSD) wyrażonego w procentach. Oprócz RSD za ważny parametr w charakterystyce precyzji metody uznawana jest wartość HORRAT, która jest stosunkiem obliczonego RSD badanych próbek, do RSD obliczonego ze wzoru Horwitza [5]:

$$RSD = 2^{(1-0,5\log C)} \cdot 0,67$$

gdzie: RSD – względne odchylenie standardowe,

C – stężenie analitu.

Oceny dokładności, tzn. zgodności średniej wartości stężenia danego składnika z wartością należną, dokonywano na podstawie pomiaru badanego produktu z domieszką wzorca i określeniu odzysku. Badania prowadzono stosując jeden poziom fortyfikacji. W przypadku kisielu i czekolady dodawano taką ilość aspartamu, aby uzyskać wzbogacenie o 50% ilości aspartamu oznaczonego wcześniej w produktach, natomiast w przypadku słodziku w tabletkach stosowano wzbogacenie o 20%. Odzysk metody określano w stosunku do teoretycznie obliczonej zawartości środka słodzącego, stanowiącej sumę oznaczonego stężenia i poziomu wzbogacenia, przyjmując tę wartość za 100%.

Omówienie wyników

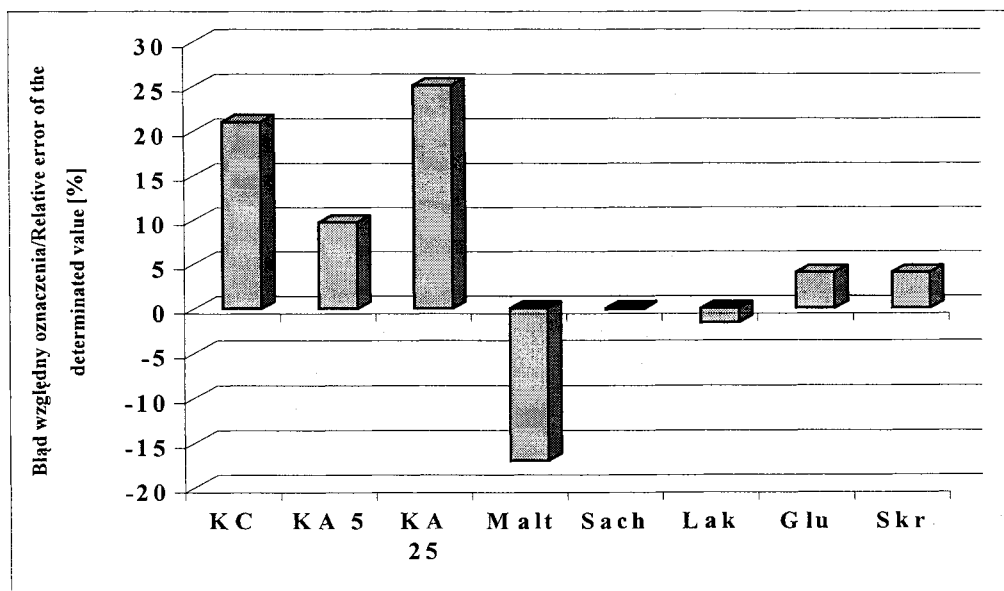
Otrzymana w badaniach wstępnych krzywa wzorcowa charakteryzowała się współczynnikiem korelacji równym 0,992 i miała przebieg prostoliniowy (rys. 1).

Wynik oznaczenia analitycznego ma sens wówczas, gdy sygnał analityczny pochodzący od oznaczanej substancji nie jest zakłócony przez inne składniki występujące w badanych próbkach. Na rys. 2. przedstawiono wielkość zaobserwowanego błędu obliczonego z równania:

$$\text{Błąd oznaczenia} = - [(M_{\text{asp}} - M_{\text{ozn}}) / (M_{\text{asp}})] \cdot 100 [\%]$$

gdzie: M_{asp} – zawartość aspartamu w roztworze standardowym,

M_{ozn} – ilość oznaczonego aspartamu w badanym roztworze modelowym.



Rys. 2. Wpływ różnych dodatków na selektywność metody oznaczania aspartamu.

Objaśnienia: KC – kwas cytrynowy, KA – kwas askorbinowy, Malt – maltodekstryna, Sach – sacharoza, Lak – laktoza, Glu – glukoza, Skr – skrobia.

Fig. 2. The effect of different additives present in the products on the selectivity of the determination method applied, where: KC – citric acid; KA – ascorbic acid; Malt – maltodextrin, Sach – saccharose; Lak – lactose; Glu – glucose; Skr – starch.

Wpływ maltodekstryny, kwasu cytrynowego i kwasu askorbinowego na otrzymany wynik oznaczenia aspartamu był największy. Maltodekstryna wpłynęła zaniżająco na odczyt o około 20%, natomiast dodatek kwasu cytrynowego spowodował zawyżenie wyników o ponad 20%. Dodatek 5 mg kwasu askorbinowego w roztworze modelowym wpłynął na zawyżenie otrzymywanych wyników o około 10%, a w przypadku dodania 10 mg kwasu askorbinowego wynik był zawyżony o około 20%. Zastosowa-

nie dwóch stężeń kwasu askorbinowego umożliwiło sformułowanie wniosku, że większa ilość kwasu obecna w badanych produktach zwiększa błąd oznaczenia. Pozostałe substancje nie wpływały w sposób znaczący na wyniki badań zawartości aspartamu, gdyż odchylenie od rzeczywistej zawartości, przyjmowanej jako 100%, wynosiło $\pm 3,5\%$. W związku z tym można stwierdzić, że metoda ta jest selektywna w stosunku do analitu jakim jest aspartam.

Powtarzalność oznaczeń aspartamu w badanych próbkach przedstawiono w tab. 1. Zawartość aspartamu oznaczona w słodzikach Sweetex i Aspol kształtowała się na identycznym poziomie 16,5 mg/100 mg, zaś w słodziku Sweet Top wynosiła 33,9 mg/100 mg preparatu słodzącego. Według danych producenta aspartamu [2] zawartość substancji słodzącej w jednej tabletkce ważącej 60-90 mg wynosi ok. 18-20 mg, czyli średnio 20-24 mg/100 mg produktu. Natomiast producent słodziku Aspol podaje, że w jednej tabletkce o masie 55 mg jest ok. 20 mg aspartamu, co w przeliczeniu na 100 mg produktu daje wartość 36,4 mg. W źródłach literaturowych autorzy podają [1], że zawartość aspartamu na poziomie 20-25 mg w tabletkce odpowiada słodkości sacharozy, co daje 33-42 mg substancji słodzącej w 100 mg słodziku stołowego. Otrzymana wartość aspartamu w słodziku Sweet Top zawiera się w tym przedziale. W przypadku słodziku Sweetex wartości nieznacznie różnią się od tej podanej przez producenta. Największą rozbieżność wykazuje słodzik Aspol, gdyż oznaczona wartość jest niższa o około 45% od deklarowanej. Wartość średniego odzysku w badanych słodzikach wahała się od 74 do 96%. W kisielu zawartość środka słodzącego – aspartamu kształtowała się na poziomie 1885 mg/100g produktu, natomiast w czekoladzie 258 mg/100g produktu. Średni odzysk uzyskany podczas analizy tych dwóch produktów wynosił odpowiednio: 74% i 139%. Odchylenia standardowe, świadczące o precyzji metody, kształtowały się na poziomie: w słodzikach – odpowiednio 2,25; 2,54 i 1,36 mg/100 mg w kisielu – 18,9 mg/100 g, natomiast w czekoladzie – 43,5 mg/100 g. Rozrzut wyników wahał się w granicach od 3,2% (w przypadku słodzika Aspol) do 114,9% (w przypadku czekolady).

W celu określenia precyzji oznaczeń posłużono się także współczynnikami zmienności (RSD, [%]), zwanymi również względnymi odchyleniami standardowymi. Zwyczajowo, szczególnie w badaniach międzylaboratoryjnych, za satysfakcjonującą przyjmuje się wartość RSD na poziomie 10% [4]. W badanych produktach najniższą wartość tego parametru uzyskano w przypadku kisielu, zarówno bez wzbogacenia (1,0%), jak i z 50% dodatkiem aspartamu (1,9%). Wartości współczynnika zmienności niższe od 10% otrzymano także w przypadku czekolady z 50% wzbogaceniem (3,8%), słodzika Sweet Top w obu wariantach (6,6% i 9,2%), a także słodzika Aspol bez wzbogacenia (8,2%). W pozostałych produktach wartości tego parametru uzyskano na poziomie **przekraczającym** 10%. Oprócz współczynnika zmienności, za ważny parametr w charakterystyce precyzji metody uznaje się wartość HORRAT [5]. Nie jest ona

wymagana jako formalny element charakterystyki precyzji walidowanej metody ani w Unii Europejskiej, ani przez Codex Alimentarius Commission, jednak coraz częściej uwzględniana jest w normach europejskich przy ocenie metody analitycznej.

Tabela 1

Odzysk i precyzja metody miareczkowej (n = 10).

Average recovery and accuracy of a titration method applied (n = 10).

Charakterystyka badanych produktów Characteristic of investigated food products	Dodatek aspartamu [%] Aspartame addition [%]		
	0	20	50
Słodzik Sweet Top / Sweet Top Sweetener Zawartość aspartamu oznaczona /obliczona [mg/100mg] Aspartame content determined/calculated; Średni odzysk / Average recovery [%] SD [mg/100 mg] RSD [%]	33,9/ - - 2,25 6,6	48,7/50,8 96 4,50 9,2	- - - -
Słodzik Sweetex / Sweetex Sweetener Zawartość aspartamu oznaczona /obliczona [mg/100mg] Aspartame content determined /calculated Średni odzysk /Average recovery [%] SD [mg/100 mg] RSD [%]	16,5/ - - 2,54 15,4	19,4/24,8 78 3,20 14,6	- - - -
Słodzik Aspol / Aspol Sweetener Zawartość aspartamu oznaczona /obliczona [mg/100mg] Aspartame content determined /calculated Średni odzysk /Average recovery [%] SD [mg/100 mg] RSD [%]	16,5/ - - 1,36 8,2	18,4/24,8 74 2,25 11,1	- - - -
Kisiel / Starch gelly Zawartość aspartamu oznaczona /obliczona [mg/100mg] Aspartame content determined / calculated Średni odzysk /Average recovery [%] SD [mg/100 mg] RSD [%]	1885/ - - 18,9 1,0	- - - -	2098/2827 74 49,9 1,9
Czekolada / Chocolate Zawartość aspartamu oznaczona / obliczona [mg/100mg] Aspartame content determined / calculated Średni odzysk / average recovery [%] SD [mg/100 mg] RSD [%]	258/ - - 43,5 16,9	- - - -	534/386 139 20,4 3,8

SD – odchylenie standardowe / standard deviation;

RSD – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności) / relative standard deviation.

Tabela 2

Parametry statystyczne dotyczące metody miareczkowej.
Statistical parameters of the titration method.

Parametry statystyczne Statistical parameters	Produkty / Products				
	Słodzik Sweet Top Sweet Top Sweetener	Słodzik Sweetex Sweetex Sweetener	Słodzik Aspol Aspol Swe- etener	Kisiel Starch gelly	Czekolada Chocolate
Liczba powtórzeń Number of repetitions	10	10	10	10	10
Średnia arytmetyczna Average value	33,9	16,5	16,5	1885	258
Wariancja Variance	5,1	6,5	1,8	574	1891
Odchylenie standardowe Standard deviation	2,25	2,54	1,36	18,9	43,5
Mediana Median	33,6	15,9	15,9	1883	265
Wartość minimalna Minimum value	32,0	12,6	15,9	1834	189
Wartość maksymalna Maximum value	38,4	19,1	19,1	1931	304
Rozrzut wyników Scatter of results	6,4	6,5	3,2	96	115
Błąd standardowy Standard error	0,7	0,8	0,4	7,6	16,5
Przedział ufności Confidence interval of the average value	± 1,6	± 1,8	± 1,0	± 17,0	± 31,1

Nowe metody, wcześniej niestosowane, uznaje się za zwalidowane, jeśli obliczone wartości HORRAT są porównywalne z wartością metody normatywnej. Jeśli jednak brak jest metody, z którą można charakteryzowaną metodę porównać, wówczas teoretyczne wartości powtarzalności są obliczane na podstawie równania Horwitza.

Wartość HORRAT jest to stosunek obliczonego RSD badanych próbek do RSD obliczonego ze wzoru Horwitza. Jeśli wartość tego parametru jest niższa bądź równa 2, wówczas powtarzalność metody uważa się za satysfakcjonującą [5]. Obliczone wartości parametru HORRAT (tab. 2) w odniesieniu do badanych produktów zdecydowanie przekroczyły liczbę 2, tylko w przypadku kisielu wartość tego parametru nieznacznie przekroczyła wartość 2.

Niepewność pomiaru jest pojedynczym parametrem (zazwyczaj jest to odchylenie standardowe średniej próbki, czyli błąd standardowy lub przedział ufności), który na podstawie wyniku pomiaru określa zakres możliwych wartości. W badanych produktach spożywczych wartości błędu standardowego kształtowały się na poziomie od 0,4 (słodzik Aspol) do 16,5 (czekolada), natomiast przedziały ufności ($\alpha=0,05$) w tych wyrobach wahały się w granicach od $\pm 1,0$ do $\pm 31,1$ odpowiednio w tych samych produktach.

Wnioski

1. Zależność między stężeniem aspartamu a ilością metanolanu sodu zużytego na jego zmiareczkowanie w badanych próbkach ma charakter liniowy.
2. Metoda miareczkowego oznaczania aspartamu z użyciem metanolanu sodu charakteryzuje się dobrą selektywnością w stosunku do innych substancji.
3. Największą precyzję i dokładność oznaczenia odnotowano w przypadku słodzików stołowych.
4. Metoda jest szybka, prosta w wykonaniu i nie wymaga kosztownego sprzętu, jednak cechuje się ograniczonym zastosowaniem, gdyż jej dokładność zależy od poziomu zawartości aspartatu.

Literatura

- [1] Askar A., Saddik F.: Application with sweeteners. *Fruit Processing*, 1996, **10**, 394-398.
- [2] Nutra Sweet: Informacje techniczne. Materiały firmy NutraSweet AG, Warszawa 1999.
- [3] Prasad U.V., Divakar T.E., Sastry S.P., Rao V.M., Kapur O.P.: New methods for the determination of aspartame. *Food Chem.*, 1988, **28**, 269-278.
- [4] Tyszkiewicz S.: Zasady prowadzenia międzylaboratoryjnych badań precyzji metod analitycznych – organizacja, statystyczna interpretacja danych oraz praktyka na przykładzie oznaczania metali toksycznych. W: Tyszkiewicz S. (red) *Postęp w analizie żywności*. Tom III. Wybrane zagadnienia analizy chemicznej i fizykochemicznej. Wyd. IPMiT, Warszawa 1993, s. 130-168.
- [5] Wood R.: How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, **18**, 624-632.

VALIDATION OF THE TITRATION METHOD APPLIED TO DETERMINE THE ASPARTAME CONTENT USING SODIUM METHYLATE**S u m m a r y**

The objective of this study was to prove whether or not it is possible to apply a titration method in determining the aspartame content in food products. The aspartame content was determined using a sodium methylate as the titrator and a pyrocatechol violet as the indicator. Firstly, this method was tested using elements of the validation procedure, which had to confirm the scientific correctness of the analytical method. It is stated that the method investigated can be used, but only within a limited range of the aspartame content. It shows a good selectivity feature confirmed by some scientific model analyses. Generally, it is a simple and quick method, however, it proved to be the most precise and accurate when applied to analyze some table sweeteners.

Key words: aspartame, quantitative determination, validation. ☒