

EWA MAJEWSKA

## WALIDACJA WYBRANYCH METOD OZNACZANIA ASPARTAMU W SŁODZIKACH

### Streszczenie

Celem pracy była walidacja wybranych metod oznaczania aspartamu, którą przeprowadzono na podstawie parametrów stanowiących elementy walidacji procedur analitycznych. Spośród podstawowych kryteriów walidacji metody analitycznej wykorzystano następujące: selektywność, liniowość, precyzja (powtarzalność), niepewność pomiaru oraz dokładność. Oprócz tych elementów oceny metody zastosowano także wartość HORRAT, która coraz częściej występuje w normach. Uwzględniono sześć metod: HPLC, trzy metody spektrofotometryczne i dwie miareczkowe. Zawartość aspartamu oznaczano spektrofotometrycznie po reakcji z odczynnikami takimi, jak: N-bromoimid kwasu bursztynowego, metol-sulfanilamid, kwas chloranilowy i p-chloranil. Poziom badanej substancji słodzącej w słodzikach w tabletkach był oznaczany metodami miareczkowymi, w których jako titranta używano kwasu nadchlorowego, metanolanu sodu i N-bromoimidu kwasu bursztynowego. Za najbardziej precyzyjne uznano metody HPLC oraz miareczkową z kwasem nadchlorowym. Charakteryzowały się one akceptowalnymi wartościami współczynnika zmienności i wielkości HORRAT.

**Słowa kluczowe:** aspartam, walidacja, metody analityczne

### Wprowadzenie

Stosowanie sztucznych środków słodzących okazało się bardzo efektywne w produkcji żywności o zredukowanej wartości energetycznej. Substancje te zaliczane są do dodatków do żywności. Niezbędne jest opracowanie metod analitycznych pozwalających na szybką i precyzyjną identyfikację syntetycznych środków słodzących oraz określenie ich zawartości w produkcie. Jest to ważne z punktu widzenia kontroli jakości żywności, polegającej na sprawdzaniu zgodności z recepturą, jak również dla technologa projektującego proces produkcyjny, przy określaniu takich parametrów obróbki, które nie spowodują szkodliwego zwykle rozkładu substancji dodatkowej. Szerokie zastosowanie aspartamu do produkcji żywności niskokalorycznej zrodziło potrzebę

opracowania metod analitycznych, umożliwiających jego identyfikację i oznaczanie ilościowe. Metody takie powinny charakteryzować się dużą selektywnością, dokładnością i powtarzalnością, a jednocześnie prostotą wykonania i niskim nakładem kosztów.

Celem niniejszej pracy była walidacja wybranych metod oznaczania aspartamu, którą prowadzono na podstawie parametrów stanowiących elementy walidacji procedur analitycznych. Spośród podstawowych kryteriów walidacji metody analitycznej wykorzystano następujące: selektywność, liniowość, precyzja (powtarzalność), niepewność pomiaru oraz dokładność. Oprócz tych elementów oceny metody zastosowano także wartość HORRAT, która coraz częściej występuje w normach. Analizowano również statystyczną istotność wyników uzyskanych różnymi metodami.

### Material i metody badań

Do badań użyto preparatów do bezpośredniego spożycia, dostępnych w sieci detalicznej, w których jako substancję słodzącą zastosowano aspartam. Preparaty do oznaczeń przygotowywano przez rozpuszczenie stosownej naważki w odpowiednim rozpuszczalniku.

W niniejszej pracy walidacji poddano następujące metody oznaczania aspartamu:

#### 1. Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC [11, 12, 14, 15, 16]

Do oznaczeń zastosowano wysokosprawny chromatograf cieczowy firmy Shimadzu typ LC-6A, stosując detektor UV SPD-6A współpracujący z integratorem C-R6A. Rozdział prowadzono w kolumnie typu RP-C8 (125 x 4 mm, średnica ziaren 5  $\mu\text{m}$ ) wraz z przedkolumną (4 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) z wypełnieniem LiChrospher produkcji firmy Merck. Detekcji aspartamu dokonywano przy długości fali 220 nm. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina buforu fosforanowego (0,0125 mol/dm<sup>3</sup>, pH 3,5) i acetonitrylu w stosunku 90:10. Stosowano przepływ fazy ruchomej 1 ml/min. Na szczyt kolumny наносzono 20  $\mu\text{l}$  próbki rozpuszczonej w wodzie dejonizowanej przesączonej przez sącdek membranowy (typu SFCA) o wielkości porów 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### 2. Spektrofotometryczna metoda z N-bromoimidem kwasu bursztynowego – S-NBS [13]

Naważki preparatów słodzących (1 g/100 cm<sup>3</sup>) rozpuszczano w wodzie destylowanej. Do odpowiednich objętości badanych roztworów dodawano kwas octowy (1 %) oraz roztwór NBS (0,005 mol/dm<sup>3</sup>). Tak przygotowaną mieszaninę przetrzymywano w temperaturze pokojowej przez dwie godziny, a następnie dodawano metol (0,3 %) i sulfanilamid (0,2 %). W metodzie tej nadmiar NBS reaguje z metolem tworząc moniminę *p*-N-metylobenzochinonu, która w środowisku o pH 2,6 tworzy następnie kompleks z przeniesieniem ładunku z sulfanilamidem. Absorbancję czerwono-purpurowego kompleksu mierzono przy długości fali 520 nm.

### 3. Spektrofotometryczna metoda z kwasem chloranilowym – S-KCH [13]

Badane roztwory uzyskiwano przez rozpuszczenie 170 mg preparatów słodzących w 50 cm<sup>3</sup> mieszaniny metanolu z chloroformem (1:1). Do odpowiednich objętości roztworów badanych preparatów dodawano kwas chloranilowy (0,1 %) oraz dimetyloformamid, po czym uzupełniano całość 1,4-dioksanem do objętości 10 cm<sup>3</sup>. Absorbancję roztworów mierzono przy długości fali 520 nm.

### 4. Spektrofotometryczna metoda z *p*-chloranilem – S-CH [13]

170 mg preparatów słodzących do bezpośredniego spożycia rozpuszczano w 50 cm<sup>3</sup> mieszaniny metanol:chloroform (1:1), a następnie do odpowiednich objętości dodawano *p*-chloranil (0,1 %) oraz dimetyloformamid, po czym uzupełniano całość 1,4-dioksanem do objętości 10 cm<sup>3</sup>. Absorbancję roztworów mierzono przy długości fali 520 nm.

### 5. Metoda miareczkowa z N-bromoimidem kwasu bursztynowego – M-NBS [13]

Metoda miareczkowa polegała na miareczkowaniu mieszaniny badanych roztworów (170 mg/50 cm<sup>3</sup>), NBS (0,02 mol/dm<sup>3</sup>) i jodku potasu (15 %) mianowanym roztworem tiosiarczynu sodu (0,04 mol/dm<sup>3</sup>) w obecności skrobi jako wskaźnika. Mieszaninę doprowadzano do pH 2,6 za pomocą kwasu solnego (0,2 mol/dm<sup>3</sup>).

### 6. Metoda miareczkowa z kwasem nadchlorowym – M-KN [13]

Odpowiednie naważki preparatów słodzących (1,4 g) rozpuszczano w 100 cm<sup>3</sup> lodowego kwasu octowego. Do kolb stożkowych przenoszono po 5 cm<sup>3</sup> badanych roztworów, następnie dodawano lodowy kwas octowy i resazurynę (0,1 %). Tak przygotowaną mieszaninę miareczkowano kwasem nadchlorowym (0,05 mol/dm<sup>3</sup>) do momentu zmiany barwy z różowej na pomarańczowoczerwoną.

Walidację metod prowadzono na podstawie następujących parametrów: liniowość, selektywność, precyzja (powtarzalność), niepewność pomiaru i dokładność oraz coraz częściej spotykaną w normach wartość HORRAT. Liniowość metod ustalano na podstawie przebiegu krzywych kalibracyjnych. Selektywność metod określano w układach modelowych, zawierających aspartam oraz substancję występującą w badanych produktach, jaką jest laktoza, a następnie prowadzono oznaczenie aspartamu. Precyzję metod szacowano na podstawie współczynnika zmienności (RSD) wyrażonego w procentach. Oprócz RSD za ważny parametr w charakterystyce precyzji metod uznawana jest wartość HORRAT, która jest stosunkiem RSD obliczonego z wartości parametru badanych próbek do RSD obliczonego ze wzoru Horwitza.

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

gdzie: RSD – względne odchylenie standardowe,  
C – stężenie analitu.

Oceny dokładności metod dokonywano przez określenie odzysku. Badania prowadzono stosując dwa poziomy wzbogacenia. Dodawano taką masę aspartamu, aby stanowił on 50 lub 100 % ilości aspartamu oznaczonego wcześniej w produktach. Za wartość odnośną (100 %) przyjmowano zawartość aspartamu w próbce bez wzbogacenia.

Wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu komputerowego Statgraphics, wersja Plus 2.1. Na skutek dużych rozbieżności w rozrzucie wyników poszczególnych próbek nie można było do oceny różnic pomiędzy nimi zastosować testów parametrycznych, dlatego też analizowano je za pomocą nieparametrycznego testu mediany oraz testu Kruskala-Wallisa, dokonując przeliczeń w programie komputerowym Microsoft Excel 2000.

### **Wyniki i ich analiza**

W dostępnej literaturze brak jest doniesień, w których przeprowadzona byłaby kompleksowa i porównawcza analiza różnych metod oznaczania aspartamu. W związku z tym w niniejszej pracy oceniono kilka metod, które wykorzystano do oznaczania aspartamu w produktach spożywczych, a następnie dokonano ich porównania.

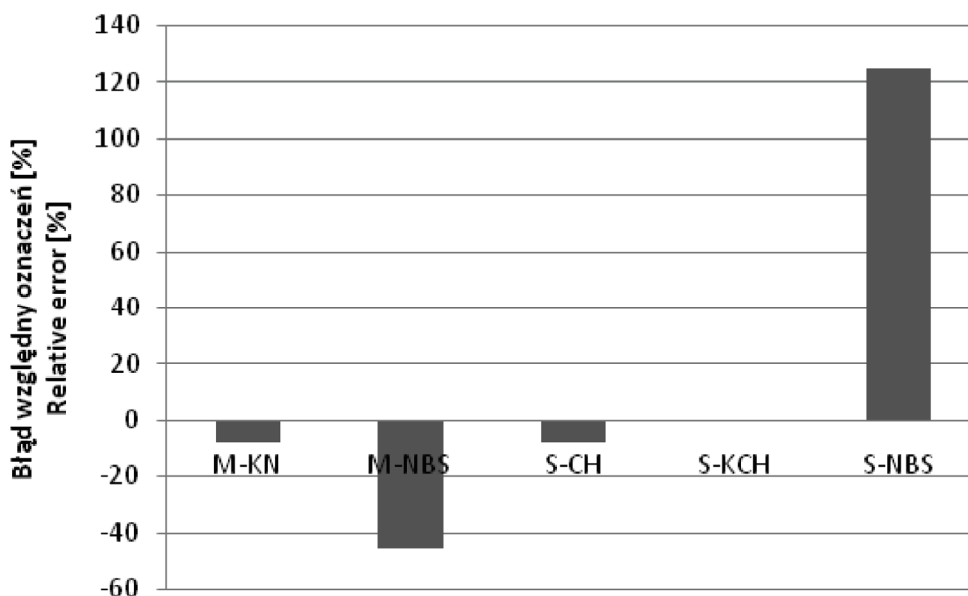
#### *Liniowość krzywych kalibracyjnych*

Liniowość krzywych kalibracyjnych badano w zakresach stężeń aspartamu przewidywanych w procedurze poszczególnych metod. W metodzie HPLC analizowano zależność powierzchni piku od stężenia aspartamu, w metodach spektrofotometrycznych zależność absorbancji, mierzonej przy długości fali 520 nm, od stężenia aspartamu, natomiast w metodach miareczkowych zależność objętości roztworu zużytego na zmiareczkowanie badanych próbek od stężenia aspartamu. Nie wszystkie wykorzystywane w pracy metody charakteryzowała zależność liniowa. Prostoliniowy przebieg krzywych stwierdzono w przypadku metod: HPLC, spektrofotometrycznej z kwasem chloranilowym (S-KCH) oraz miareczkowej z kwasem nadchlorowym (M-KN). W pozostałych metodach krzywe kalibracyjne charakteryzowała zależność logarymiczna.

#### *Selektywność zastosowanych metod*

Na rys. 1. przedstawiono błąd względny uzyskany w badaniach modelowych w poszczególnych metodach. Spośród ocenianych metody S-KCH, S-CH i M-KN można uznać za selektywne, gdyż we wszystkich przypadkach błąd względny przy oznaczaniu aspartamu nie przekraczał wartości  $\pm 8\%$ . Należy więc przypuszczać, że badana substancja, obecna w gotowych wyrobach, nie powinna mieć wpływu na prawidłowe oznaczanie zawartości aspartamu tymi metodami. Pozostałe metody

wykazywały niską zdolność do odróżniania oznaczanego analitu od laktozy obecnej w matrycy.



Rys 1. Wpływ dodatku laktozy na selektywność zastosowanych metod analitycznych.

Fig. 1 The influence of additives lactose on the selectivity of the method.

#### Zastosowanie walidowanych metod do oznaczania aspartamu

Wyniki analizy preparatów do bezpośredniego spożycia podano w tab. 1.

Tabela 1

Średnia zawartość aspartamu w preparatach słodzących, do bezpośredniego spożycia, uzyskana różnymi metodami.

Mean content of aspartame in sweetening preparations used in direct consumption obtained using various methods.

Metody / Methods	Zawartość aspartamu / Content of aspartame [mg/100 mg]	
	Słodzik A / Sweetener A	Słodzik B / Sweetener B
HPLC	17,2 ± 0,6*	37,4 ± 0,6
S-NBS	56,1 ± 7,6	80,0 ± 15,5
S-KCH	33,6 ± 0,9	43,8 ± 1,3
S-CH	32,2 ± 1,4	57,1 ± 6,9
M-NBS	26,8 ± 1,1	54,6 ± 4,4
M-KN	45,8 ± 0,4	22,7 ± 0,5

\*) odchylenie standardowe / standard deviation

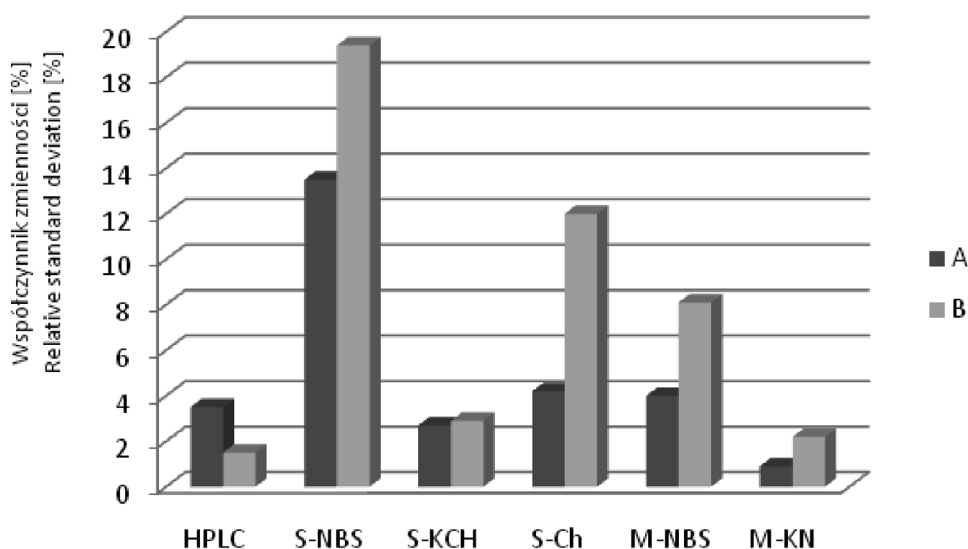
Zawartość aspartamu w dwóch preparatach słodzących w tabletkach, uzyskana metodą HPLC, była zróżnicowana i wynosiła od 17,2 mg/100 mg (preparat A) do 37,4 mg/100 mg (preparat B). W załączniku zamieszczonym w normie [11], dotyczącej oznaczania aspartamu metodą HPLC w preparatach do bezpośredniego spożycia, podano zawartość środka słodzącego na poziomie 19 mg/100 mg. Z wielkością tą porównywalne są wyniki uzyskane metodą referencyjną w słodziku A. Wartości otrzymane pozostałymi metodami przewyższają wyniki otrzymane metodą HPLC (tab. 1). W preparacie B zawartość aspartamu oznaczona metodami spektrofotometrycznymi i metodą miareczkową z NBS przewyższała zawartość otrzymaną metodą HPLC (tab. 1). Wyniki niższe o około 40 % od zawartości uzyskanej metodą referencyjną otrzymano jedynie metodą miareczkową z kwasem nadchlorowym (M-KN). Według danych producenta aspartamu [10] zawartość środka słodzącego w jednej tabletkce, ważącej 60–90 mg, wynosi około 18–20 mg, co odpowiada 20–34 mg/100 mg produktu. Askar i Saddik [1] stwierdzili zawartość aspartamu na poziomie 20–25 mg w jednej tabletkce, jako odpowiadającą słodkością sacharozie, co w przeliczeniu na 100 mg preparatu wynosi 33–42 mg środka słodzącego. Inni badacze otrzymali wartości rzędu: 19 mg/100 mg [4] i 21 mg/100 mg [15]. Verzella i wsp. [22], Prodoliet i Bruehlhart [14] oraz Webb i Beckman [23] otrzymali wyniki odpowiednio: 29 mg/100 mg, 26 mg/100 mg i 35–35,5 mg/100 mg. W przypadku badanego w pracy preparatu A uzyskane wyniki były zgodne z danymi literaturowymi. Wyższą wartość (56,1 mg/100 mg) otrzymano jedynie metodą spektrofotometryczną z NBS (S-NBS). Zawartość aspartamu oznaczona metodami HPLC, S-KCH i M-KN w badanym preparacie B również potwierdziła wyniki podawane w literaturze. Jedynie wyniki uzyskane metodami spektrofotometrycznymi z NBS (S-NBS) i *p*-chloranilem (S-CH) (odpowiednio 80,0 mg/100 mg i 57,1 mg/100 mg) oraz metodą miareczkową z NBS (M-NBS) (54,6 mg/100 mg preparatu) różniły się od danych zamieszczonych w literaturze.

#### *Precyzja metod*

W celu porównania wyników uzyskanych zastosowanymi metodami i określenia precyzji oznaczeń posłużono się współczynnikami zmienności (RSD, %), zwanymi również względnymi odchyleniami standardowymi. Wartości tego parametru, wyrażone w procentach średniej arytmetycznej, przedstawiono na rys. 2. Zwyczajowo, szczególnie w badaniach międzylaboratoryjnych, za satysfakcjonującą przyjmuje się wartość RSD na poziomie 10 % [21].

Powtarzalność metody HPLC, wyrażona współczynnikiem zmienności, w przypadku obydwu badanych produktów nie przekraczała 4 % i wynosiła odpowiednio w preparacie A 3,5 %, a w preparacie B 1,5 %. Wśród metod spektrofotometrycznych największą powtarzalnością odznaczała się metoda z kwasem chloranilowym (S-KCH), w której współczynnik zmienności nie przekraczał 3 %. Metoda spektrofotome-

tryczna z *p*-chloranilem (S-CH) charakteryzowała się współczynnikiem zmienności w granicach od 4,2 do 12,0 %. Metoda spektrofotometryczna z NBS (S-NBS) charakteryzowała się najmniejszą powtarzalnością, gdyż względne odchylenie standardowe w obydwu przypadkach przekraczało 10 %, a jego wartość wahała się od 13,5 do 19,4 %. Trzeba zaznaczyć, że wysoka wartość RSD wskazuje, że wykorzystanie danej metody do oznaczania zawartości aspartamu może prowadzić do powstawania błędów, szczególnie przy wykonaniu małej liczby pomiarów. Metody miareczkowe, w przeciwieństwie do metod spektrofotometrycznych, charakteryzowały się większą precyzją. Wartości RSD wahały się w granicach od 0,4 do 8,1 %, podczas gdy w metodach spektrofotometrycznych RSD przyjmował wartości od 1,2 do 19,4 %. Największą powtarzalnością cechowała się metoda z kwasem nadchlorowym (M-KN), w której współczynnik zmienności nie przekraczał 3 %. Natomiast metoda miareczkowa z NBS (M-NBS) charakteryzowała się mniejszą powtarzalnością, gdyż względne odchylenie standardowe wahało się w granicach od 4,0 do 8,1 %. W literaturze również podawane są zróżnicowane wartości RSD. W badaniach nad słodzikami w tabletkach Chen i wsp. [2] uzyskali współczynnik zmienności na poziomie 1,72 %, a Skrzypek i Okolska [15] – 1,56 %. Dane te znajdują potwierdzenie jedynie w przypadku analizy preparatu A metodą miareczkową z kwasem nadchlorowym (0,9 %) oraz preparatu B metodą HPLC (1,5 %). Parametr ten obliczony na podstawie pozostałych metod osiągał zdecydowanie wyższe wartości (2,2–19,4 %).



Rys. 2. Porównanie współczynników zmienności.

Fig. 2. Comparison of the relative standard deviations.



Tabela 2

Współczynniki zmienności (RSD) uzyskane przy oznaczaniu aspartamu zastosowanymi metodami.  
Relative standard deviations (RSDs) obtained while determining the content of aspartame using various methods.

Produkty Products	Metody / Methods											
	HPLC		S-NBS		S-KCH		S-CH		M-NBS		M-KN	
	RSD <sub>O</sub> <sup>*</sup> [%]	RSD <sub>T</sub> <sup>**</sup> [%]	RSD <sub>O</sub> [%]	RSD <sub>T</sub> [%]	RSD <sub>O</sub> [%]	RSD <sub>T</sub> [%]	RSD <sub>O</sub> [%]	RSD <sub>T</sub> [%]	RSD <sub>O</sub> [%]	RSD <sub>T</sub> [%]	RSD <sub>O</sub> [%]	RSD <sub>T</sub> [%]
Słodzik A	3,5	2	13,5	2	2,7	2	4,2	2	4,0	2	0,9	2
Słodzik B	1,5	2	19,4	2	2,9	2	12,0	2	8,1	2	2,2	2

\*) RSD<sub>O</sub> – współczynnik zmienności obliczony / relative standard deviation calculated;

\*\*\*) RSD<sub>T</sub> – maksymalna wartość współczynnika zmienności wg Nordic Committee on Food Analysis / maximum value of relative standard deviation according to the Nordic Committee on Food Analysis.

Nordic Committee on Food Analysis [9] podaje zalecane akceptowalne wartości względnego odchylenia standardowego w przypadku powtarzalności. Zależnie od stężenia analitu RSD może przyjmować wartości od 2 do 43 %. Aby ocenić powtarzalność, a więc precyzję stosowanych metod, w tab. 2. zestawiono wartości RSD obliczone na podstawie wyników badań przeprowadzonych w niniejszej pracy oraz zalecane przez Nordic Committee on Food Analysis [9]. Z danych tych wynika, że metoda HPLC charakteryzowała się satysfakcjonującymi współczynnikami zmienności w przypadku preparatu B (1,5 %). Spośród metod spektrofotometrycznych wszystkie z wykorzystanych metod odznaczały się niską powtarzalnością, gdyż w żadnym z badanych preparatów nie osiągnięto zadowalających wartości RSD. Należy więc stwierdzić, że metody te nie powinny być stosowane do oznaczeń ilościowych aspartamu obecnego w słodzikach. Metoda miareczkowa z NBS (M-NBS) także charakteryzowała się niską powtarzalnością otrzymywanych wyników, gdyż w żadnym przypadku nie osiągnięto zadowalających wartości RSD. Satysfakcjonujące współczynniki zmienności w metodzie wykorzystującej kwas nadchlorowy (M-KN) uzyskano w przypadku preparatu A (0,9 %), natomiast w przypadku preparatu B wartość RSD wynosiła 2,2 %.

W charakterystyce precyzji metody, oprócz współczynnika zmienności, ważnym parametrem jest wartość HORRAT. Jeśli wartość HORRAT jest niższa bądź równa 2, wówczas powtarzalność metody uważa się za satysfakcjonującą [24]. Obliczone wartości tego parametru w zastosowanych w pracy metodach przedstawiono w tab. 3. Z zestawienia wynika, że metoda HPLC osiągnęła satysfakcjonujący poziom wartości HORRAT w oznaczeniach aspartamu w preparacie B (1,2). W przypadku metod spektrofotometrycznych w żadnym przypadku nie uzyskano wartości HORRAT niższej od 2, co potwierdza nieprzydatność tych metod do analizy zawartości aspartamu. W metodzie miareczkowej z NBS (M-NBS) także w żadnym przypadku wartość HORRAT



nie osiągnęła satysfakcjonującego poziomu, a to potwierdza brak możliwości wykorzystania jej do oznaczeń zawartości aspartamu. Najbardziej precyzyjną metodą z zastosowanych w pracy okazała się metoda miareczkowa z kwasem nadchlorowym (M-KN). Wartości HORRAT uzyskane w tej metodzie wahają się w granicach od 0,7 do 1,9.

Tabela 3

Wartości parametru HORRAT.  
Values of the HORRAT parameter.

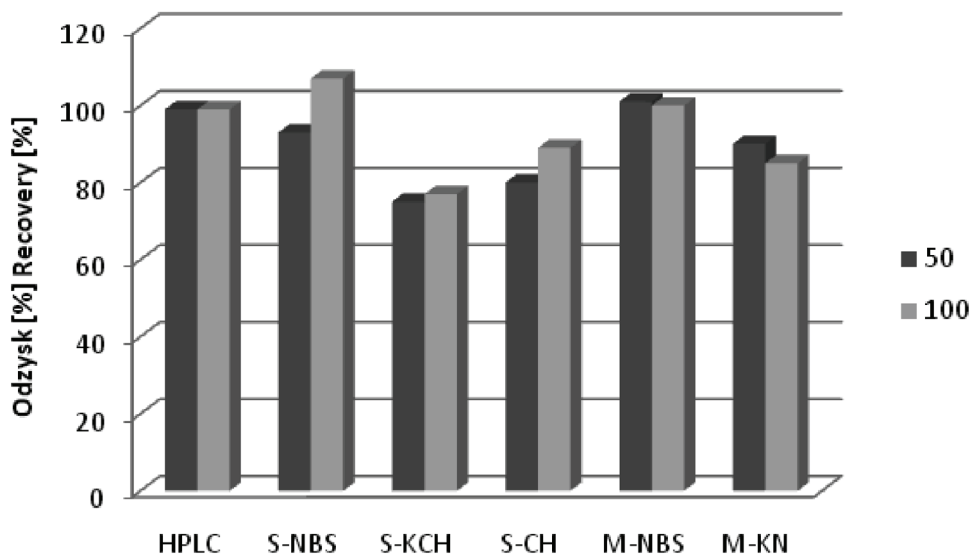
Produkt / Products	Metoda / Method					
	HPLC	S-NBS	S-KCH	S-CH	M-NBS	M-KN
Słodzik A / Sweetener A	3,2	15,2	2,4	4,0	3,7	0,7
Słodzik B / Sweetener B	1,2	22,8	2,6	13,2	8,4	1,9

Biorąc pod uwagę wartość HORRAT za najbardziej precyzyjne, spośród zastosowanych w pracy metod, można uznać metody HPLC i M-KN. Charakteryzowały się one akceptowalnymi wartościami współczynnika zmienności (RSD) i wielkości HORRAT. Najmniej odpowiednie wartości tych dwóch parametrów uzyskano w metodach wykorzystujących N-bromoimid kwasu bursztynowego (S-NBS, M-NBS) oraz kwas chloranilowy (S-KCH) i *p*-chloranil (S-CH), co świadczy o małej precyzji i wynikającej z tego nieprzydatności tych metod do oznaczeń.

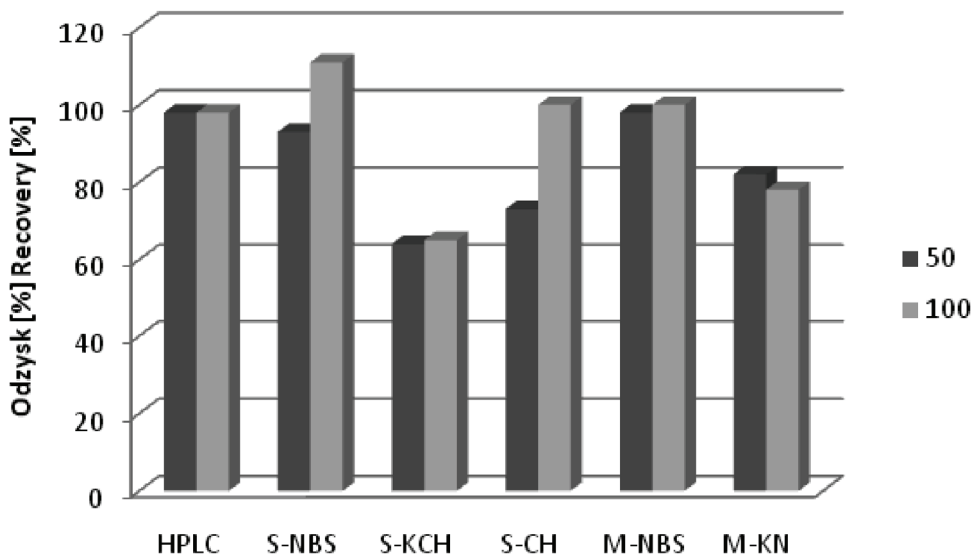
#### *Dokładność metod*

Odzysk aspartamu uzyskany w badaniach dokładności był zróżnicowany, wahał się w szerokich granicach (64–111 %) i zależał zarówno od zastosowanej metody, jak i poziomu wzbogacenia. Wartości najbliższe rzeczywistej ilości aspartamu we wszystkich badanych produktach uzyskano metodami HPLC, S-NBS i M-NBS. Na rys. 3. przedstawiono wielkości błędów względnych poszczególnych metod uzyskanych w preparacie A, natomiast na rys. 4. wielkości błędów względnych poszczególnych metod uzyskanych w preparacie B.

W metodzie HPLC uzyskane wartości odzysku w badanych produktach były bliskie 100 % i kształtowały się w granicach od 98 do 99 %. Uzyskane wartości znajdują potwierdzenie w literaturze. Liczni autorzy, stosujący metodę HPLC, podawali wielkość tego parametru w zakresie od 92 do 111 % [2, 4, 5, 7, 8, 14, 20, 23, 25], chociaż Gibbs i wsp. [6] oraz Thompson i wsp. [19] otrzymywali niższy odzysk - na poziomie 87–88 %. Polscy autorzy uzyskali wartości w zakresie od 96 do 103 % [3, 15, 16, 17, 18].



Rys. 3. Średni odzysk aspartamu w preparacie A, otrzymany zastosowanymi metodami.  
Fig. 3. Average recovery of the sweetener A.



Rys. 4. Średni odzysk aspartamu w preparacie B otrzymany zastosowanymi metodami.  
Fig. 4. Average recovery of aspartame in the B preparations obtained using the methods applied.

Wartości uzyskane w metodzie spektrofotometrycznej z NBS – S-NBS wahają się w szerszym zakresie: od 93 do 111 %. Prasad i wsp. [13], stosując tę metodę (S-NBS), otrzymali odzysk w granicach 98–99 %.

Metodą spektrofotometryczną z kwasem chloranilowym – S-KCH otrzymywano wartości odzysku w zakresie od 64 do 77 %. Prasad i wsp. [13] przy wykorzystaniu tej metody do oznaczania aspartamu w piwie otrzymali odzysk równy 99 %.

W metodzie spektrofotometrycznej z *p*-chloranilem – S-CH wartości odzysku kształtowały się w szerokim przedziale od 73 do 100 %. Najniższe wartości odzysku (73–80 %) uzyskano w preparacie A. Wartości średniego odzysku badanych produktów metodą miareczkową z NBS – M-NBS kształtowały się w granicach od 98 do 101 %. Najbardziej zróżnicowane wartości odzysku uzyskano metodą miareczkową z wykorzystaniem kwasu nadchlorowego – M-KN, co może świadczyć o mniejszej dokładności tej metody. Wartości odzysku uzyskano na poziomie 78–90 %.

Wyniki przedstawione na rys. 3. i 4. potwierdzają zróżnicowanie wartości odzysku w zależności od poziomu wzbogacenia, chociaż nie ma prostej zależności między poziomem wzbogacenia a oznaczoną całkowitą zawartością aspartamu.

Spośród ocenianych w pracy metod najlepszą dokładnością charakteryzowały się metody HPLC, S-NBS i M-NBS, w których uzyskano wielkości odzysku bliskie 100 %. Należy jednak zwrócić uwagę, że przy walidacji metody analitycznej trzeba uwzględnić kilka parametrów. Potwierdzeniem tego stwierdzenia mogą być wyniki uzyskane np. w metodach wykorzystujących NBS (S-NBS i M-NBS). Metody te, mimo że nie są precyzyjne, okazały się metodami dokładnymi.

Przeprowadzone w pracy badania oraz analiza otrzymanych wyników pozwala na stwierdzenie, że tylko metoda HPLC może być stosowana w szerokim zakresie, natomiast użycie pozostałych metod, ze względu na wpływ różnych czynników, musi być ograniczone.

## Wnioski

1. Do oznaczania aspartamu w preparatach słodzących do bezpośredniego stosowania winna być stosowana metoda HPLC ze względu na jej selektywność, wysoką precyzję (powtarzalność) i dokładność.
2. Metody, w których wykorzystuje się N-bromoimid kwasu bursztynowego (S-NBS i M-NBS) należą do metod dokładnych, lecz mało precyzyjnych i nieselektywnych, co przemawia przeciwko ich stosowaniu w analizie żywności.
3. Do najmniej dokładnych i najmniej precyzyjnych metod należą spektrofotometryczne metody wykorzystujące kwas chloranilowy (S-KCH) oraz *p*-chloranil (S-CH), co wyklucza możliwość ich zastosowania w analizie produktów słodzonych aspartamem.

4. Dużą powtarzalnością i małą dokładnością charakteryzuje się metoda miareczkowa z kwasem nadchlorowym (M-KN).
5. Najlepszą selektywnością charakteryzują się metody HPLC, spektrofotometryczna z kwasem chloranilowym (S-KCH) oraz miareczkowa z kwasem nadchlorowym (M-KN).
6. Metoda miareczkowa z kwasem nadchlorowym (M-KN) może być zastosowana do oznaczeń aspartamu w preparatach słodzących do bezpośredniego stosowania w zastępstwie referencyjnej metody HPLC.

### Literatura

- [1] Askar A., Saddik F.: Application with Sweeteners. *Fruit Processing*, 1996, **10**, 394-398.
- [2] Chen Q., Mou S., Liu K., Yang Z., Ni Z.: Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography. *J. Chromatography A*, 1997, **771**, 135-143.
- [3] Czerwiecki L., Delong A.: Metoda oznaczania aspartamu i sacharyny w wybranych przetworach owocowych. *Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 1991, **43**, 7-19.
- [4] Daniels D.H., Joe Jr. F.J., Warner C.R., Fazio T.: Liquid chromatographic determination of aspartame in dry beverage bases and sweetener tablets with confirmation by thin layer chromatography. *J. AOAC*, 1984, **67** (3), 513-515.
- [5] Fox L., Anthony G.D., Lau E.P.K.: High-performance liquid chromatographic determination of L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester in various food products and formulations. *J. AOAC*, 1976, **59** (5), 1048-1050.
- [6] Gibbs B.F., Alli I., Mulligan C.N.: Simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its metabolites in foods. *J. Chromatography A*, 1996, **725**, 372-377.
- [7] Hayakawa K., Schilpp T., Imai K., Higuchi T., Wong O.S.: Determination of aspartic acid, phenylalanine and aspartylphenylalanine in aspartame-containing samples using a precolumn derivatization HPLC method. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38** (5), 1256-1260.
- [8] Lehr M., Schmid W.: Anwendung der festphasenextraktion bei der bestimmung von süßstoffen in lebensmitteln mittels HPLC. *Deutsch. Lebensmittel-Rundsch.*, 1993, **89** (2), 43-45.
- [9] NMKL Procedure: Validation of chemical analytical methods. *Nordic Committee on Food Analysis*, 1996, **4**.
- [10] NutraSweet: Informacje techniczne. Materiały firmy NutraSweet AG., Warszawa 1999.
- [11] PN-EN 1378:1999. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości aspartamu w preparatach słodzących. Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej.
- [12] PN-EN 1379:1999. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie cyklamianów i sacharyny w słodzikach tabletkowych. Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej.
- [13] Prasad U.V., Divakar T.E., Sastry S.P., Rao V.M., Kapur O.P.: New methods for the determination of aspartame. *Food Chemistry (India)*, 1988, **28**, 269-278.
- [14] Prodoliet J., Bruelhart M.: Determination of aspartame and its major decomposition products in foods. *J. AOAC Int.*, 1993, **76** (2), 275-282.
- [15] Skrzypek B., Okolska G.: Oznaczanie aspartamu, acesulfamu K, sacharyny w wybranych produktach spożywczych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. *Żyw. Człow. Metab.*, 1997, **24** (1), 45-62.

- [16] Skrzypek B., Okolska G.: Oznaczanie zawartości aspartamu, acesulfamu K, sacharyny. W: Wybrane metody analitycznej oceny wartości odżywczej żywności - pod red. H. Kunachowicz. Prace IŻŻ, Warszawa 1997, s. 63-73.
- [17] Szymczyk K.: Opracowanie metodyki oznaczania aspartamu w wybranych produktach cukierniczych. Materiały Sesji Analityki Żywności, PTTŻ, Warszawa 1997, s. 27.
- [18] Szymczyk K., Czerwiecki L.: Zastosowanie techniki HPLC do oznaczania aspartamu i acesulfamu-K w przetworach owocowych. Roczniki PZH, 1995, **46 (4)**, 373-381.
- [19] Thompson C.O., Trenerry V.C., Kemmerly B.: Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-joule soft drinks and other foods. J. Chromatography A, 1995, **694**, 507-514.
- [20] Tyler T.A.: Liquid chromatographic determination of sodium saccharin, caffeine, aspartame and sodium benzoate in cola beverages. J. AOAC, 1984, **67 (4)**, 745-747.
- [21] Tyszkiewicz S.: Zasady prowadzenia międzylaboratoryjnych badań precyzji metod analitycznych – organizacja, statystyczna interpretacja danych oraz praktyka na przykładzie oznaczania metali toksycznych. W: Postęp w analizie żywności. Tom III. Wybrane zagadnienia analizy chemicznej i fizykochemicznej – pod red. S. Tyszkiewicza. Wyd. Inst. Przem. Mięś. i Tłuszcz., Warszawa 1993, s. 130-168.
- [22] Verzella G., Bagnasco G., Mangia A.: Ion-pair high-performance liquid chromatographic analysis of aspartame and related products. J. Chromatography A, 1985, **349**, 83-89.
- [23] Webb N.G., Beckman D.D.: Reverse phase liquid chromatographic of aspartame in beverages and beverage mixes. J AOAC, 1984, **67 (3)**, 510-513.
- [24] Wood R.: How to validate analytical methods. Trends in Analytical Chemistry, 1999, **18**, 624-632.
- [25] Wróbel K.: Determination of aspartame and phenylalanine in diet soft drinks by high-performance liquid chromatography with direct spectrofluorimetric detection. J. Chromatography A, 1997, **773**, 163-168.

#### VALIDATION OF THE SELECTED METHODS OF DETERMINING ASPARTAME CONTENT IN SWEETENERS

##### Summary

The objective of this study was the validation of selected methods of determining aspartame content, which was performed based on the parameters constituting elements of the analytical validation procedures. From among the basic criteria of validating the analytical method, the following were applied: selectivity, linearity, precision (repeatability), uncertainty of measurement, and accuracy. In addition to those elements of assessing the method, a HORRAT value was also utilized since it appears more and more frequently in the relevant standards. Six methods were taken into consideration: HPLC, three spectrophotometric methods, and two titration methods. Aspartame was determined spectrophotometrically after the reaction with the colouring agents such as N-bromosuccinimide-metol-sulphanilamide, chloranil acid, and p-chloranil. The level of aspartame in tabletop sweeteners was assessed by titrimetry using acetic perchloric acid, sodium metoxide, and N-bromosuccinimide as titrants. HPLC and titration method with perchloric acid were found to be the most precise methods. They were characterized by acceptable values of a relative standard deviation and a HORRAT value.

**Key words:** aspartame, validation, analytical methods 