

Research Article

Study on the characteristics of sweetener reference material (aspartame, acesulfame potassium, sodium saccharin) in orange juice

Bach Thuy Anh*, Doan Van Kien, Dang Huu Cuong, Nguyen Thi Hang,
Tran Thanh Son, Do Tat Thanh, Do Truc Quynh, Le Thi Phuong Thao

National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

(Received: 20 May 2024; Revised: 12 Aug 2024; Accepted: 17 Aug 2024)

Abstract

To conduct the validity of test results, various measures such as proficiency testing, inter-laboratory comparisons, or the use of standard samples and quality control samples, etc. may be chosen. Participation in proficiency testing or inter-laboratory comparisons is sometimes not feasible for laboratories due to objective conditions such as funding sources, lack of suppliers, or absence of a suitable program for the sample matrix and criteria needed. Therefore, the use of standard samples or quality control samples is a good option. However, most standard samples are not readily available in Vietnam and often have to be imported, which is costly, and many specific types of samples are not yet produced. In this study, sweetener standards (aspartame, acesulfame potassium, sodium saccharin) in natural orange juice and flavored orange juice were created to investigate the characteristics of these two types of reference material. The samples achieved homogeneity and stability over 360 days for natural orange juice and 530 days for flavored orange juice from the production date. The certified values of aspartame, acesulfame potassium, sodium saccharin, and the measurement uncertainty in natural orange juice were 430 ± 24.2 mg/L, 270 ± 12.0 mg/L, 258 ± 16.2 mg/L, respectively, and in flavored orange juice were 588 ± 28.4 mg/L, 711 ± 31.2 mg/L, 355 ± 20.8 mg/L, respectively, which are consistent with the concentrations of sweeteners (aspartame, acesulfame potassium, sodium saccharin) in beverages according to Circular No. 24/2019/TT-BYT of the Ministry of Health.

Keywords: Reference material, aspartame, acesulfame potassium, sodium saccharine, orange juice.

* Corresponding author: Bach Thuy Anh (E-mail: thuyanh.8392@gmail.com)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4358>

Nghiên cứu các đặc tính của mẫu chuẩn chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) trong nước cam

Bạch Thúy Anh, Doãn Văn Kiên, Đặng Hữu Cường, Nguyễn Thị Hằng, Trần Thanh Sơn, Đỗ Tất Thành, Đỗ Trúc Quỳnh, Lê Thị Phương Thảo

Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Để đảm bảo giá trị sử dụng của kết quả thử nghiệm, phòng thí nghiệm có thể lựa chọn nhiều biện pháp như tham gia thử nghiệm thành thạo, so sánh liên phòng, sử dụng mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm soát chất lượng... Việc tham gia thử nghiệm thành thạo hay so sánh liên phòng đôi khi không khả thi với các phòng thí nghiệm do các điều kiện khách quan như: nguồn kinh phí tham gia, không có nhà cung cấp hoặc không có chương trình phù hợp với nền mẫu và chỉ tiêu cần tham gia. Vì vậy, sử dụng mẫu chuẩn hoặc mẫu kiểm soát chất lượng là một trong những lựa chọn tốt cho các phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, đa số các loại mẫu chuẩn không sẵn có ở Việt Nam nên thường phải nhập khẩu, giá thành cao và nhiều loại mẫu đặc thù chưa được sản xuất. Trong nghiên cứu này, mẫu chuẩn chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) trong nước cam tự nhiên và nước cam hương liệu đã được tạo ra để nghiên cứu các đặc tính của hai loại mẫu chuẩn này. Các mẫu đã đạt được độ đồng nhất và độ ổn định trong thời gian 360 ngày đối với nước cam tự nhiên và 530 ngày đối với nước cam hương liệu kể từ ngày sản xuất. Các giá trị chứng nhận của aspartam, acesulfam kali, natri saccharin và độ không đảm bảo đo trong nước cam tự nhiên lần lượt là $430 \pm 24,2$ mg/L, $270 \pm 12,0$ mg/L, $258 \pm 16,2$ mg/L, trong nước cam hương liệu lần lượt là $588 \pm 28,4$ mg/L, $711 \pm 31,2$ mg/L, $355 \pm 20,8$ mg/L, phù hợp với nồng độ của các chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) trong đồ uống theo Thông tư số 24/2019/TT-BYT của Bộ Y tế.

Từ khóa: *Mẫu chuẩn, aspartam, acesulfam kali, natri saccharin, nước cam*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là quốc gia có khí hậu nhiệt đới gió mùa nên sẵn có các loại trái cây, cũng như khí hậu nóng ẩm làm tăng nhu cầu sử dụng các loại đồ uống với mục đích giải khát. Bên cạnh đó, Việt Nam có dân số trẻ, nhóm độ tuổi 15-54 tuổi chiếm hơn 62,2%, được đánh giá là có nhu cầu cao nhất về các loại đồ uống không cồn. Do đó, thị trường nước giải khát ngày càng phát triển và có sản lượng cao. Trong số đó, nước cam là sản phẩm được rất nhiều người ưa chuộng và tiêu thụ quanh năm. Các nhà cung cấp đã sản xuất khoảng 1,6 tỷ tấn nước cam mỗi năm [1]. Nước cam có chứa rất nhiều chất dinh dưỡng có lợi cho sức khỏe như vitamin C, vitamin E, vitamin A, chất chống oxy hóa, chất xơ, folat...

Để phát triển và cạnh tranh trên thị trường đồ uống, các nhà sản xuất muốn hướng tới đồ uống tốt cho sức khỏe, giảm hàm lượng đường mà vẫn duy trì được hương vị hài hòa của sản phẩm nên các chất tạo ngọt đã được thay thế một phần hoặc toàn bộ trong sản phẩm đồ

uống không còn nói chung và nước cam nói riêng. Acesulfam kali, aspartam, natri saccharin là các chất tạo ngọt được sử dụng phổ biến trong đồ uống. Tuy nhiên, việc sử dụng các chất tạo ngọt này ở nồng độ cao có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe của người tiêu dùng. Theo quy định tại Thông tư số 24/2019/TT-BYT của Bộ Y tế ngày 30/08/2019, giới hạn tối đa hàm lượng aspartam trong đồ uống hương liệu và nước ép quả là 600 mg/kg; Acesulfam kali là 600 mg/kg trong đồ uống hương liệu và 350 mg/kg trong nước ép quả; Saccharin là 300 mg/kg trong đồ uống hương liệu và 80 mg/kg trong nước ép quả [2]. Hàm lượng các chất tạo ngọt này trong đồ uống là một trong những yêu cầu kiểm soát chất lượng trong sản xuất, tiêu thụ nhằm bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng. Để đảm bảo chất lượng kết quả kiểm nghiệm, việc sử dụng mẫu chuẩn là cần thiết. Do đó, các chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) trên nền nước cam được lựa chọn là đối tượng nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, các đặc tính của mẫu chuẩn các chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) trên nền nước cam đã được đánh giá nhằm ứng dụng kết quả cho các lô sản xuất mẫu chuẩn, phục vụ cho nhu cầu kiểm nghiệm ở trong và ngoài nước.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng/vật liệu nghiên cứu

Đối tượng của nghiên cứu là mẫu chuẩn chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) trong nước cam tự nhiên và nước cam hương liệu.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Chất chuẩn aspartam, natri saccharin được mua từ LGC, có độ tinh khiết và độ không đảm bảo đo lần lượt là $91,27\% \pm 1,1\%$ (số lô: G1390684) và $87,6\% \pm 0,4\%$ (số lô: G1105539). Chất chuẩn acesulfam kali được mua từ Supelco, có độ tinh khiết và độ không đảm bảo đo là $100\% \pm 0,2\%$ (số lô: LRAC8043). Acetonitril, methanol (loại tinh khiết cho sắc ký lỏng) có nguồn gốc từ Merck; Nước tinh khiết được lấy từ thiết bị Milli-Q Integral 3; Millipore, Billerica, MA. Ngoài ra, các hóa chất thông thường của phòng thí nghiệm được mua từ các hãng có uy tín và đạt độ tinh khiết cần thiết cho nghiên cứu.

2.3. Thiết bị

Các thiết bị sử dụng trong sản xuất mẫu bao gồm: Hệ thống máy khuấy trộn và đóng mẫu dạng lỏng tự động, Máy hàn nhiệt và đóng nắp (LX 6000A), Nồi hấp tiệt trùng. Các thiết bị sử dụng trong quá trình theo dõi độ ổn định: Tủ vi khí hậu (Memmert HPP260), Tủ lạnh (Sharp hybrid). Phân tích các chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) được thực hiện bằng thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC Water), detector PAD bước sóng từ 190-800 nm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Sản xuất mẫu chuẩn

Qua tham khảo tài liệu [3], [4] và căn cứ mức giới hạn tối đa cho phép của các chất tạo ngọt quy định tại Thông tư 24/2019/TT-BYT [2], mẫu chuẩn chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) trong nước cam tự nhiên và nước cam hương liệu đã được sản xuất với lô mẫu gồm: 112 chai x 50 mL/chai đối với mỗi loại (Hình 1)



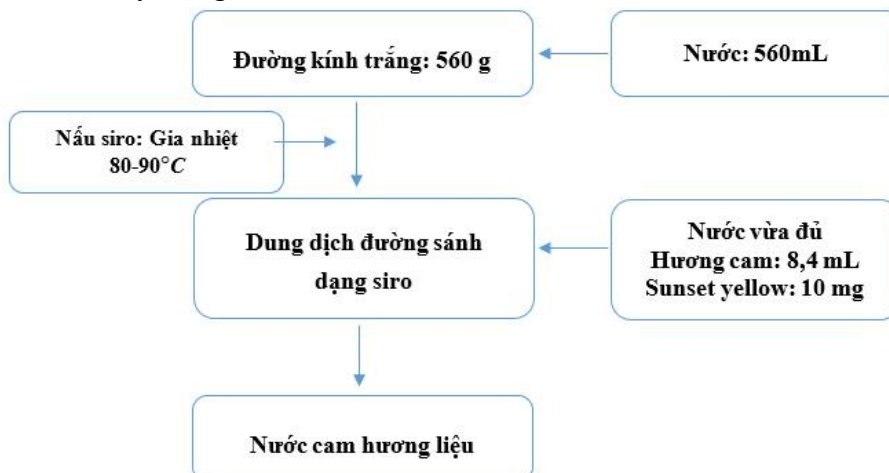
Hình 1. Mẫu chuẩn nước cam tự nhiên và nước cam hương liệu

Acesulfam kali và Natri saccharin là hai chất bền dưới tác dụng của nhiệt độ và môi trường acid. Aspartam là chất kém bền hơn acesulfam kali và natri saccharin, trong điều kiện pH 4,3 và nhiệt độ thấp, aspartam cho độ ổn định một cách hợp lý [5]. Do đó, điều kiện tạo mẫu được lựa chọn là pH 4,0 – 4,5 và nhiệt độ bảo quản mẫu là 5°C.

Quá trình chuẩn bị nước cam hương liệu: Sau khi tham khảo tài liệu [4] và các thành phần nguyên liệu sử dụng trong sản phẩm nước cam trên thị trường, Natri benzoat, Kali sorbat được lựa chọn là chất bảo quản, sunset yellow là phẩm màu tạo nên màu sắc giống nước cam và hương liệu nước cam.

Đường kính trắng (nồng độ 10% trong sản phẩm) và nước (tỉ lệ 1:1 W/V) được gia nhiệt ở nhiệt độ 80-90°C để đảm bảo đường tan nhanh tan và hoàn toàn, khuấy đều khoảng 20 – 30 phút đến khi thu được dung dịch đường sánh dạng siro, để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm nước trong thùng khuấy. Sau đó, thêm hương cam (nồng độ 0,15% theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất hương liệu) và nước định mức đến lượng thể tích cần sản xuất. Thêm phẩm màu sunset yellow để tạo màu giống nước cam, khuấy đều đến khi đạt được màu sắc mong muốn.

Quá trình chuẩn bị nước cam hương liệu với thể tích cần pha 112 chai x 50 mL/chai (5,6 L) được trình bày trong Hình 2.

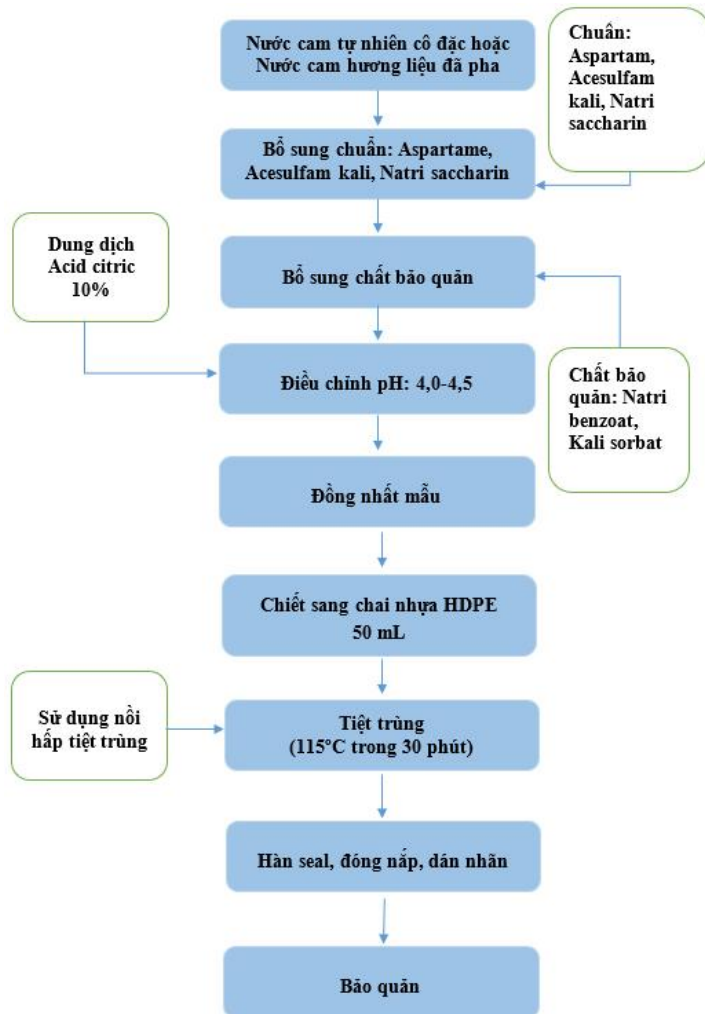


Hình 2. Sơ đồ chuẩn bị nước cam hương liệu

Trên cơ sở ngưỡng giới hạn tối đa cho phép theo Thông tư 24/2019/TT-BYT [2] đối với 2 nền mẫu, mức hàm lượng dự kiến của các chất bổ sung vào mẫu chuẩn được thể hiện trong Bảng 1 và sơ đồ sản xuất mẫu chuẩn nước cam tự nhiên và hương liệu được trình bày trong Hình 3.

Bảng 1. Công thức tạo mẫu chuẩn

Tên chuẩn bổ sung	Thể tích pha (112 chai x 50mL/chai)	Nước cam tự nhiên		Nước cam hương liệu	
		Nồng độ dự kiến (mg/L)	Lượng chuẩn bổ sung	Nồng độ dự kiến (mg/L)	Lượng chuẩn bổ sung
Aspartam	5,6 L	600	4,00 g	600	4,00 g
Acesulfam kali		200	1,35 g	600	4,00 g
Natri Saccharin		200	1,35 g	300	2,00 g
Natri benzoat		1000	6,72 g	250	1,68 g
Kali sorbat		1000	6,72 g	500	3,36 g



Hình 3. Sơ đồ sản xuất mẫu chuẩn nước cam tự nhiên và hương liệu

2.4.2. Phương pháp phân tích

Aspartam, acesulfam kali, natri saccharin được phân tích bằng phương pháp nội bộ của Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia (NIFC, Việt Nam) với mã số NIFC.02.M.25, đã được công nhận phù hợp theo ISO/IEC 17025:2017. Phương pháp phân tích này được tham khảo theo TCVN 8471:2010 [6], sử dụng thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với các điều kiện phân tích gồm cột anion (4,6mm×150mm, 10 μm); pha động: đệm NaH₂PO₄ 5mM: acetonitril = 80:20; Detector PDA tại bước sóng phát hiện 215 nm đối với aspartam và 223 nm đối với acesulfam kali và natri saccharin; Tốc độ dòng: 1,2 mL/phút.

2.4.3. Đánh giá độ đồng nhất

Độ đồng nhất từng đặc tính của mẫu chuẩn được đánh giá dựa trên kết quả phân tích lặp lại và theo các tiêu chuẩn tương ứng. Để thực hiện, 10 mẫu chuẩn sau khi sản xuất được lựa chọn ngẫu nhiên và phân tích hàm lượng các chất tạo ngọt, lặp lại 2 lần. Kết quả phân tích hàm lượng các chất tạo ngọt trong mẫu chuẩn được đánh giá theo ISO 13528:2022 [7] và ISO Guide 35:2017 [8] để xác định độ đồng nhất của lô mẫu sản xuất. Kết quả được xử lý thống kê bằng ANOVA một yếu tố, nếu giá trị P-value > 0,05 thì kết luận sự khác biệt giữa các mẫu không có ý nghĩa thống kê.

2.4.4. Đánh giá độ ổn định và hạn sử dụng của mẫu chuẩn

Độ ổn định được đánh giá dựa trên kết quả phân tích ba chất tạo ngọt trong mẫu theo thời gian, đồng thời đánh giá ở điều kiện lão hóa cấp tốc và ước tính thời hạn sử dụng của mẫu chuẩn. Cụ thể như sau:

Đánh giá độ ổn định đặc tính của mẫu chuẩn theo thời gian: Aspartam không bền ở nhiệt độ cao hoặc pH thấp, dần dần bị thủy phân, hình thành aspartylphenylalanine và methanol. Tại pH 4,3 và nhiệt độ thấp, aspartam ổn định một cách hợp lý [5], do đó nhiệt độ 5°C ± 2°C được lựa chọn để bảo quản mẫu. Trong thời gian từ ngày sản xuất đến 4 tháng, mỗi tháng lấy ra 3 mẫu ngẫu nhiên, kiểm nghiệm hàm lượng ba chất tạo ngọt và đánh giá kết quả độ ổn định của mẫu.

Đánh giá độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc và ước tính thời hạn sử dụng của mẫu chuẩn: Mẫu chuẩn được thử nghiệm với điều kiện lão hóa cấp tốc ở 25°C, 45°C, định kỳ mỗi tháng lấy ngẫu nhiên 3 mẫu/điều kiện nhiệt độ để kiểm nghiệm hàm lượng ba chất tạo ngọt và đánh giá độ ổn định. Hạn sử dụng của mẫu chuẩn được ước tính là thời gian ngắn nhất được ngoại suy từ kết quả đánh giá hạn sử dụng theo thời gian thực và lão hóa cấp tốc.

2.4.5. Đánh giá đặc tính của mẫu chuẩn nghiên cứu

Ngoài độ đồng nhất và độ ổn định của từng đặc tính mẫu chuẩn thì giá trị chứng nhận cho từng đặc tính của mẫu chuẩn được xác định từ các phòng thí nghiệm được lựa chọn dựa trên kết quả tham gia thử nghiệm thành thạo, cụ thể như sau:

- Giá trị ấn định của mục thử nghiệm thành thạo được tính theo giá trị đồng thuận của các phòng thí nghiệm tham gia chương trình thử nghiệm thành thạo.

Từ các kết quả thử nghiệm thu được của các phòng thí nghiệm có năng lực tham gia thử nghiệm thành thạo phân tích ba chất tạo ngọt, số liệu sau khi loại số chệch theo ISO 5725-2:2019 [9] được xử lý thống kê theo Thuật toán A trong ISO 13528:2022 [7]. Từ đó,

các phòng thí nghiệm có giá trị ($|z|$ hoặc $|z'|$) $\leq 1,0$ được lựa chọn để thực hiện ấn định giá trị chứng nhận cho từng đặc tính của mẫu chuẩn chứng nhận.

- Từ dữ liệu độ đồng nhất, độ ổn định và kết quả của các phòng thí nghiệm tham gia ấn định đặc tính mẫu chuẩn, độ không đảm bảo đo chứng nhận từng đặc tính của mẫu chuẩn chứng nhận được tính theo ISO Guide 35:2017.

2.4.6. Xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, các số liệu được xử lý sử dụng các phần mềm sau:

- Phần mềm R phân tích phương sai một yếu tố (one-way analysis of variance - ANOVA) để đánh giá độ đồng nhất.

- Sử dụng phần mềm “Microsoft Excel” để đánh giá độ ổn định dài hạn bao gồm hạn sử dụng của mẫu và độ không đảm bảo đo dài hạn của từng chất tạo ngọt tương ứng (u_{lts}).

Ấn định giá trị chứng nhận từng đặc tính của mẫu chuẩn:

Sau khi lựa chọn các phòng thí nghiệm ấn định giá trị chứng nhận của từng đặc tính tương ứng mẫu chuẩn được tính theo công thức:

$$x_{CRM} = \frac{\sum x_i}{p} \quad (1)$$

Trong đó: x_{CRM} : Giá trị chứng nhận của đặc tính mẫu chuẩn (CRM); x_i : Giá trị của phòng thí nghiệm thứ i phân tích đặc tính mẫu chuẩn; p : số lượng phòng thí nghiệm được lựa chọn ấn định giá trị đặc tính của mẫu chuẩn

Độ không đảm bảo đo mở rộng của giá trị chứng nhận cho đặc tính mẫu chuẩn được tính theo công thức:

$$U_{CRM} = k \times u_{CRM} \quad (2)$$

Với hệ số phủ $k=2$ với độ tin cậy 95%

$$u_{CRM} = \sqrt{u_{char}^2 + u_{hom}^2 + u_{lts}^2} \quad (3)$$

Trong đó: u_{CRM} : độ không đảm bảo đo của giá trị chứng nhận cho đặc tính mẫu chuẩn; u_{char} : Độ không đảm bảo đo từ ấn định giá trị chứng nhận đặc tính của mẫu chuẩn thu được từ kết quả các phòng thí nghiệm tham gia ấn định giá trị chứng nhận đặc tính của mẫu chuẩn; u_{hom} : Độ không đảm bảo đo liên quan đến độ đồng nhất đặc tính của mẫu chuẩn; u_{lts} : Độ không đảm bảo đo của độ ổn định dài hạn đặc tính của mẫu chuẩn

Độ không đảm bảo đo từ ấn định giá trị chứng nhận đặc tính của mẫu chuẩn từ các phòng thí nghiệm tham gia ấn định giá trị chứng nhận đặc tính của mẫu chuẩn được tính theo công thức:

$$u_{char} = \sqrt{u_{ref}^2 + u_{lab}^2} = \sqrt{u_{ref}^2 + \left(\frac{s(y)}{\sqrt{p}} \right)^2} \quad (4)$$

Trong đó: $s(y)$: độ lệch chuẩn của các phòng thí nghiệm được lựa chọn tham gia ấn định giá trị chứng nhận đặc tính của mẫu chuẩn; u_{lab} : độ không đảm bảo đo thu được từ các

phòng thí nghiệm được lựa chọn tham gia ấn định giá trị chứng nhận đặc tính của mẫu chuẩn; u_{ref} : Độ không đảm bảo đo của liên kết chuẩn so sánh

Độ không đảm bảo đo liên quan đến độ đồng nhất đặc tính của mẫu chuẩn:

$$u_{hom} = \sqrt{u_r^2 + u_{bb}^2} \quad (5)$$

Độ không đảm bảo đo lặp lại trong mẫu của đặc tính mẫu chuẩn theo công thức:

$$u_r = \frac{s_r}{\sqrt{n_o}} \quad (6)$$

Trong đó: u_r : độ không đảm bảo đo lặp lại; s_r : độ lệch chuẩn lặp lại; u_{bb} : độ không đảm bảo đo giữa các mẫu trong nghiên cứu độ đồng nhất của mẫu; s_{bb} : độ lệch chuẩn giữa các mẫu trong nghiên cứu độ đồng nhất của mẫu.

Độ không đảm bảo đo cho sự ổn định dài hạn (u_{lts}) được thể hiện bởi công thức:

$$u_{lts} = s_{(b_1)} \times (t_{m_1} + t_{cert}) \quad (7)$$

Trong đó: $s_{(b_1)}$: là độ lệch chuẩn của hệ số độ dốc b_1 ; t_{m_1} : là khoảng thời gian giữa thời điểm sản xuất mẫu chuẩn đến thời điểm ấn định giá trị chứng nhận; t_{cert} : là khoảng thời gian giữa thời điểm ấn định giá trị chứng nhận đến thời điểm ước lượng mẫu chuẩn còn được chứng nhận (hạn sử dụng dự kiến).

Sử dụng chuẩn Student để kiểm tra mô hình có ý nghĩa thống kê hay không thông qua đánh giá sự khác nhau thống kê giữa độ dốc với giá trị 0, sử dụng công thức:

$$t_{b_1} = \frac{|b_1|}{s_{b_1}} \quad (8)$$

Trong đó: b_0 : hệ số chặn của đường tuyến tính; b_1 : hệ số độ dốc của đường tuyến tính; $t_{b_1} > t_{s,n-2} = 0,064$, hệ số độ dốc khác 0 có ý nghĩa thống kê

- Xây dựng đường giới hạn trong đồ thị nghiên cứu hạn sử dụng (L_{up} và L_{low})
- Từ kết quả các độ không đảm bảo đo đã biết (Độ không đảm bảo đo từ độ đồng nhất - u_{hom} , độ không đảm bảo đo từ ấn định giá trị chứng nhận đặc tính của mẫu chuẩn - u_{char}), có thể tính được độ không đảm bảo đo giới hạn đặc tính của mẫu chuẩn nghiên cứu (u_{NC}):

$$u_{NC} = \sqrt{u_{hom}^2 + u_{char}^2} \quad (9)$$

- Với hệ số phủ $k = 2$, $U_{NC} = 2 \times u_{NC}$ thì đường giới hạn được xác định như sau:

$$\begin{aligned} L_{gh} &= X_{CRM} \pm U_{NC} = X_{CRM} \pm 2 \times u_{NC} \\ L_{up} &= X_{CRM} + U_{NC} \\ L_{low} &= X_{CRM} - U_{NC} \end{aligned} \quad (10)$$

Nghiên cứu lão hóa cấp tốc

Mẫu chuẩn được theo dõi độ ổn định ở hai điều kiện lão hóa cấp tốc 25°C và 45°C. Đối với từng chất phân tích cũng như từng nền mẫu thì hàm lượng chất phân tích trong mẫu

suy thoái theo một hằng số Q_n , với bước thay đổi nhiệt độ là 10°C thì chất phân tích suy giảm theo hệ số Q_{10} , và sự suy giảm được tính theo công thức:

$$F_1 = F_2 \times Q_{10}^{(\Delta T/10)} \quad (11)$$

Trong đó: F_1, F_2 : Lần lượt là hạn sử dụng dự kiến ở điều kiện nhiệt độ lão hóa t_1 và t_2 ; Q_{10} : Hệ số suy giảm của chất nghiên cứu; ΔT : Khoảng chênh lệch giữa nhiệt độ lão hóa t_1 và t_2 ($\Delta T = t_1 - t_2$).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả phân tích độ đồng nhất

3.1.1. Đánh giá độ đồng nhất mẫu nước cam tự nhiên

Sau khi tạo được lô mẫu chuẩn, 10 mẫu được lựa chọn ngẫu nhiên để phân tích và đánh giá độ đồng nhất. Kết quả kiểm nghiệm các chỉ tiêu aspartam, acesulfam kali, natri saccharin được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ đồng nhất về hàm lượng aspartam, acesulfam kali, natri saccharin trong mẫu nước cam tự nhiên

TT	Kết quả (mg/L)					
	Aspartam		Acesulfam kali		Natri saccharin	
	Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2
1	435	452	270	279	265	265
2	452	433	282	273	269	270
3	437	457	276	280	271	273
4	452	450	282	274	267	268
5	444	452	276	281	267	273
6	454	447	284	278	265	270
7	439	457	284	278	266	272
8	433	447	278	282	270	275
9	439	454	277	270	268	272
10	443	462	283	276	265	269

Các kết quả ở Bảng 1 được phân tích ANOVA một yếu tố bằng phần mềm R thu được các giá trị p-value đều lớn hơn 0,05. Do đó, sự khác biệt giữa các mẫu không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, mẫu nước cam tự nhiên đạt độ đồng nhất về hàm lượng aspartam, acesulfam kali, natri saccharin.

3.1.2. Đánh giá độ đồng nhất mẫu nước cam hương liệu

Tương tự mẫu nước cam tự nhiên, 10 mẫu nước cam hương liệu sau khi sản xuất được lựa chọn ngẫu nhiên để phân tích và đánh giá độ đồng nhất. Kết quả kiểm nghiệm các chỉ tiêu aspartam, acesulfam kali, natri saccharin được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đồng nhất về hàm lượng aspartam, acesulfam kali, natri saccharin trong mẫu nước cam hương liệu

TT	Kết quả (mg/L)					
	Aspartam		Acesulfam kali		Natri saccharin	
	Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2	Lần 1	Lần 2
1	594	588	714	695	363	351
2	606	593	728	704	359	357
3	602	584	729	711	360	365
4	598	585	728	708	360	355
5	602	590	730	704	360	354
6	586	573	715	705	351	353
7	605	586	734	714	359	356
8	601	593	736	705	360	355
9	600	593	734	710	365	357
10	599	587	741	711	362	356

Từ các kết quả trong Bảng 3, phần mềm R được sử dụng để phân tích ANOVA một yếu tố thu được các giá trị p-value đều lớn hơn 0,05. Do đó, mẫu chuẩn nước cam hương liệu đạt độ đồng nhất về hàm lượng aspartam, acesulfam kali, natri saccharin vì sự khác biệt giữa các mẫu không có ý nghĩa thống kê.

3.2. Đánh giá kết quả thử nghiệm thành thạo và ấn định giá trị chứng nhận

Sau khi xem xét năng lực kiểm nghiệm của các phòng thí nghiệm, 18 phòng thử nghiệm (Hà Nội, Thành phố Hồ Chí Minh, Cần Thơ), đã được công nhận phù hợp theo yêu cầu của ISO/IEC 17025, được lựa chọn để thực hiện phân tích mẫu chuẩn. Kết quả thu được trình bày trong Bảng 4 và 5.

Bảng 4. Hàm lượng aspartam, acesulfam kali, natri saccharin trong mẫu nước cam tự nhiên của các phòng thí nghiệm

STT	Mã PTN	Aspartam		Acesulfam kali		Natri saccharin	
		Kết quả (mg/L)	Z-score	Kết quả (mg/L)	Z'-score	Kết quả (mg/L)	Z-score
1	02	441	0,38	258	-0,30	237	-0,32
2	05	402	-0,85	297	1,02	200	-1,22
3	09	448	0,61	266	-0,01	243	-0,16
4	10	400	-0,91	235	-1,05	236	-0,34
5	14	410	-0,59	290	0,80	-	-
6	15	550	3,88	293	0,90	131	-2,89
7	20	441	0,41	265	-0,03	280	0,72
8	31	304	-3,98	641	12,59	280	0,72
9	32	450	0,70	257	-0,31	255	0,12
10	33	435	0,21	252	-0,48	240	-0,24
11	36	388	-1,31	260	-0,21	281	0,75

STT	Mã PTN	Aspartam		Acesulfam kali		Natri saccharin	
		Kết quả (mg/L)	Z-score	Kết quả (mg/L)	Z'-score	Kết quả (mg/L)	Z-score
12	37	430	0,06	286	0,64	264	0,35
13	38	436	0,25	194	-2,43	105	-3,51
14	39	405	-0,75	291	0,83	287	0,90
15	40	344	-2,69	219	-1,58	227	-0,56
16	41	-	-	-	-	280	0,72
17	42	442	0,44	264	-0,07	285	0,85
18	43	518	2,86	319	1,78	444	4,70
19	45	449	0,65	258	-0,28	218	-0,77

Bảng 5. Hàm lượng aspartam, acesulfam kali, natri saccharin trong mẫu nước cam hương liệu của các phòng thí nghiệm

STT	Mã PTN	Aspartam		Acesulfam kali		Natri saccharin	
		Kết quả (mg/L)	Z-score	Kết quả (mg/L)	Z-score	Kết quả (mg/L)	Z-score
1	02	578	-0,06	694	-0,48	350	-0,12
2	05	557	-0,57	803	2,31	309	-1,16
3	09	597	0,40	715	0,06	346	-0,21
4	10	530	-1,24	663	-1,26	360	0,14
5	14	590	0,24	700	-0,32	-	-
6	15	620	0,97	724	0,30	267	-2,24
7	20	600	0,48	721	0,23	378	0,59
8	31	402	-4,38	676	-0,93	318	-0,93
9	32	638	1,41	702	-0,27	339	-0,39
10	33	560	-0,50	663	-1,26	337	-0,45
11	36	576	-0,11	683	-0,75	390	0,90
12	37	587	0,17	779	1,69	393	0,98
13	38	579	-0,03	730	0,44	373	0,47
14	39	507	-1,80	661	-1,31	333	-0,55
15	40	432	-3,64	740	0,70	401	1,18
16	41	-	-	-	-	382	0,69
17	42	598	0,44	725	0,33	400	1,18
18	43	689	2,65	804	2,32	617	6,71
19	45	612	0,78	717	0,12	319	-0,90

Từ các kết quả ở Bảng 3 và 4, chuẩn thống kê “Grubb’s test” theo ISO 5725:2019 được sử dụng để loại bỏ số chệch. Các số liệu đã bị loại bỏ sẽ không được đưa vào các bước đánh giá sau đó.

Lựa chọn các phòng thí nghiệm có $|z\text{-score}|$ hoặc $|z'\text{-score}| < 1$, từ đó tính được giá trị chứng nhận của aspartam, acesulfam kali, natri saccharin trong mẫu chuẩn nước cam tự nhiên lần lượt là 430 mg/L, 270 mg/L, 258 mg/L. Đối với mẫu chuẩn nước cam hương liệu,

giá trị chứng nhận của aspartam, acesulfam kali, natri saccharin lần lượt là 588 mg/L, 711 mg/L, 355 mg/L.

3.3. Kết quả nghiên cứu và đánh giá độ ổn định

Mẫu chuẩn được đánh giá độ ổn định ở ba điều kiện: ở nhiệt độ trong tủ lạnh ($5 \pm 2^\circ\text{C}$), nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) và lão hóa cấp tốc trong tủ vi khí hậu ($45 \pm 2^\circ\text{C}$).

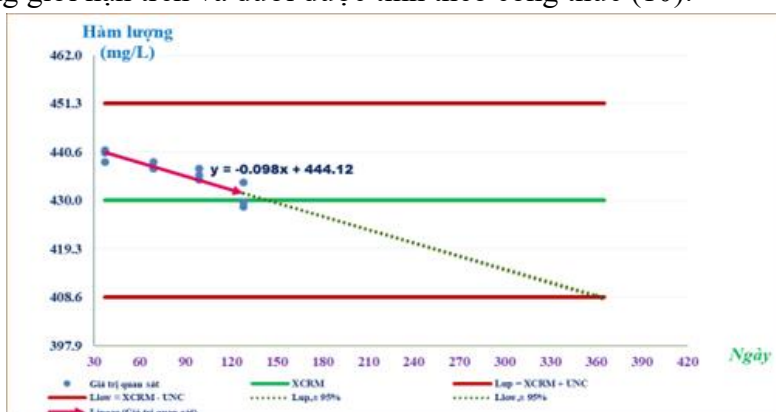
3.3.1. Theo dõi ở nhiệt độ trong tủ lạnh ($5 \pm 2^\circ\text{C}$)

Các mẫu nước cam tự nhiên và hương liệu được lựa chọn ngẫu nhiên để theo dõi độ ổn định trong tủ lạnh, với chế độ cài đặt 5°C . Kết quả phân tích theo dõi độ ổn định đối với nước cam tự nhiên và nước cam hương liệu được trình bày trong Bảng 6.

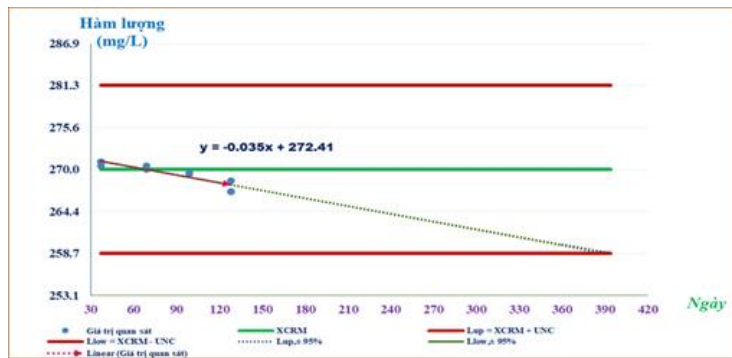
Bảng 6. Kết quả phân tích theo dõi độ ổn định của mẫu chuẩn nước cam tự nhiên và hương liệu

TT	Thời gian (ngày)	Kết quả trung bình (mg/L)					
		Nước cam tự nhiên			Nước cam hương liệu		
		Aspartam	Acesulfam kali	Natri saccharin	Aspartam	Acesulfam kali	Natri saccharin
1	37	439	271	261	586	709	361
		441	271	261	592	708	363
		441	271	260	591	710	359
2	69	437	270	259	590	704	361
		437	270	258	585	704	362
		439	271	259	588	707	361
3	99	437	270	259	587	703	361
		436	270	258	586	705	358
		435	270	259	586	708	360
4	128	430	267	254	584	705	358
		434	269	258	584	703	358
		429	267	257	589	706	357

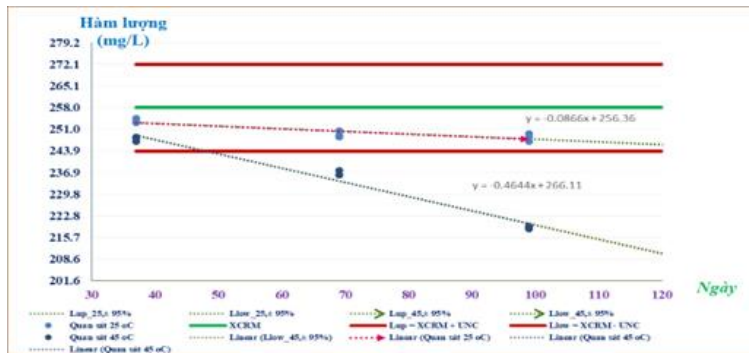
Trên cơ sở kết quả nghiên cứu độ ổn định tại nhiệt độ bảo quản 5°C và giá trị chứng nhận, đồ thị biểu diễn hạn sử dụng của mẫu nước cam tự nhiên được thể hiện ở các Hình 4 - 6 với các đường giới hạn trên và dưới được tính theo công thức (10):



Hình 4. Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của aspartam trong mẫu nước cam tự nhiên



Hình 5. Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của acesulfam kali trong mẫu nước cam tự nhiên



Hình 6. Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của natri saccharin trong mẫu nước cam tự nhiên

Từ các kết quả thu được trong Hình 4-6 cho thấy, hạn sử dụng ước tính của aspartam, acesulfam kali, natri saccharin trong mẫu nước cam tự nhiên lần lượt là 360 ngày, 389 ngày và 418 ngày. Do đó, hạn sử dụng ước lượng của mẫu chuẩn nước cam tự nhiên là 360 ngày.

Tương tự đối với mẫu nước cam hương liệu, hạn sử dụng của aspartam, acesulfam kali, natri saccharin thu được lần lượt là 530 ngày, 561 ngày và 604 ngày. Do đó, hạn sử dụng ước lượng của mẫu chuẩn nước cam hương liệu là 530 ngày.

Các giá trị thành phần độ không đảm bảo đo của aspartam, acesulfam kali, natri saccharin được tính dựa vào công thức (2) - (7) trong hai loại mẫu chuẩn được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Độ không đảm bảo đo của aspartam, acesulfam kali, natri saccharin trong hai loại mẫu chuẩn

Độ không đảm bảo đo (mg/L)	Nước cam tự nhiên			Nước cam hương liệu		
	Aspartam	Acesulfam kali	Natri saccharin	Aspartam	Acesulfam kali	Natri saccharin
U_{hom}	7,5	3,4	2,0	6,4	11,5	3,1
U_{char}	7,6	4,5	6,8	7,8	5,8	7,4
U_{lst}	5,6	1,9	3,9	9,9	8,8	6,5
U_{CRM}	12,1	6,0	8,1	14,2	15,6	10,4
$U_{CRM} (k=2)$	24,2	12,0	16,2	28,4	31,2	20,8

Từ các kết quả thu được cho thấy, giá trị chứng nhận của aspartam, acesulfam kali, natri saccharin và độ không đảm bảo đo trong mẫu chuẩn nước cam tự nhiên lần lượt là 430

$\pm 24,2$ mg/L, $270 \pm 12,0$ mg/L, $258 \pm 16,2$ mg/L, trong mẫu chuẩn nước cam hương liệu lần lượt là $588 \pm 28,4$ mg/L, $711 \pm 31,2$ mg/L, $355 \pm 20,8$ mg/L.

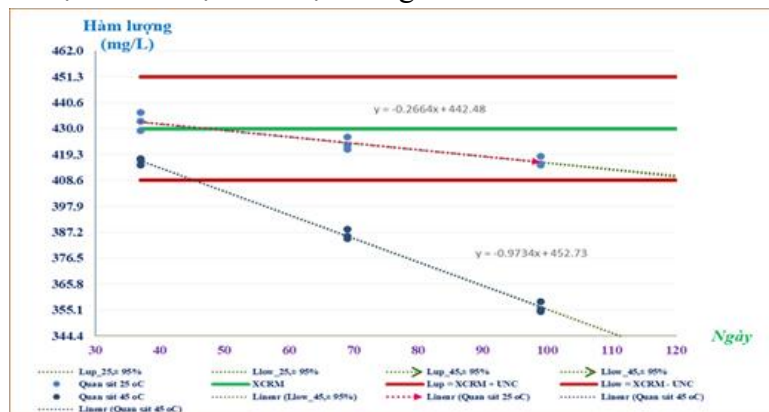
3.3.2. Theo dõi ở điều kiện thường và lão hóa cấp tốc đối với mẫu nước cam tự nhiên và hương liệu

Kết quả theo dõi độ ổn định ở điều kiện thường và lão hóa cấp tốc (25°C và 45°C) đối với mẫu chuẩn nước cam tự nhiên và nước cam hương liệu được trình bày trong Bảng 8.

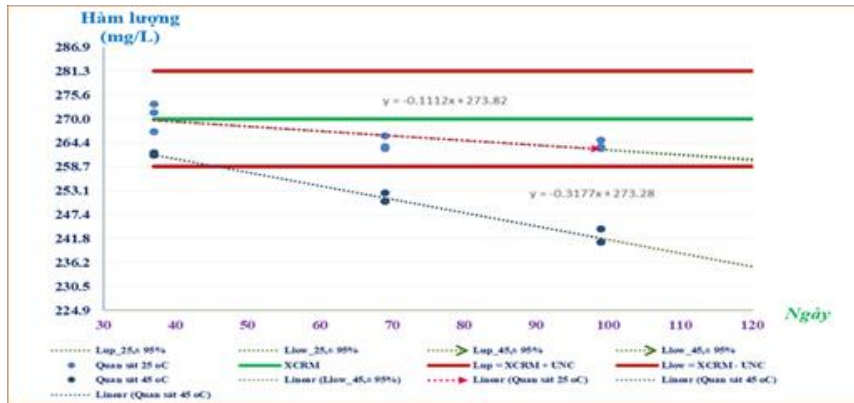
Bảng 8. Kết quả theo dõi độ ổn định của mẫu chuẩn nước cam tự nhiên và hương liệu

Thời gian (ngày)	Nhiệt độ	Kết quả trung bình (mg/L)					
		Nước cam tự nhiên			Nước cam hương liệu		
		Aspartam	Acesulfam kali	Natri saccharin	Aspartam	Acesulfam kali	Natri saccharin
37	25°C	433	274	253	583	711	362
		437	267	255	579	705	360
		429	272	254	582	710	364
	45°C	417	262	248	571	697	347
		415	262	249	568	696	349
		418	262	247	570	697	349
69	25°C	427	264	249	576	703	356
		422	266	251	577	701	356
		423	263	249	576	707	353
	45°C	386	251	236	568	683	341
		389	253	236	563	678	341
		385	251	238	569	678	342
99	25°C	416	263	247	575	696	353
		415	265	250	575	702	356
		419	264	249	576	697	352
	45°C	356	241	220	549	652	322
		359	244	219	547	654	326
		355	241	219	548	651	325

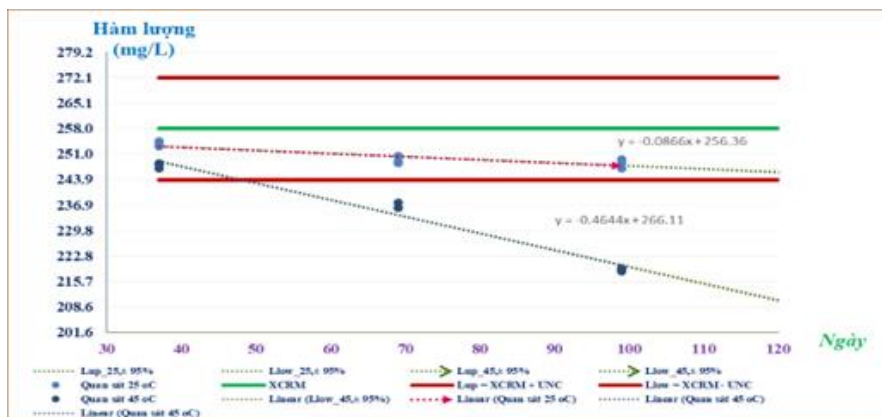
Trên cơ sở các kết quả thu được ở Bảng 8, đồ thị biểu thị hạn sử dụng ước lượng của mẫu chuẩn nước cam tự nhiên được thể hiện trong các Hình 7-9.



Hình 7. Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của aspartam trong mẫu chuẩn nước cam tự nhiên ở điều kiện 25°C và 45°C



Hình 8. Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của acesulfam kali trong mẫu chuẩn nước cam tự nhiên ở điều kiện 25°C và 45°C



Hình 9. Đồ thị biểu thị hạn sử dụng của natri saccharin trong mẫu chuẩn nước cam tự nhiên ở điều kiện 25°C và 45°C

Từ các kết quả ở đồ thị Hình 7-9 và công thức (21), các giá trị hệ số Q_{10} của các chất đã được tính và trình bày trong Bảng 9 cùng với các thông số đặc tính khác của hai loại mẫu chuẩn.

Bảng 9. Các thông số đặc tính của mẫu chuẩn

Thông số	Nước cam tự nhiên			Nước cam hương liệu		
	Ước lượng HSD thực tế	Hệ số Q_{10}	Ước lượng HSD nội suy từ Q_{10}	Ước lượng HSD thực tế	Hệ số Q_{10}	Ước lượng HSD nội suy từ Q_{10}
Aspartam	360	1,58	357	530	1,69	528
Acesulfam kali	389	1,61	390	561	1,66	561
Natri saccharin	418	1,62	421	604	1,64	603

Hệ số Q_{10} của mỗi chất trên các nền mẫu khác nhau là khác nhau và hệ số này càng lớn thì hạn sử dụng càng dài hơn. Kết quả này cũng phù hợp với với số liệu thực tế thu được trên cơ sở theo dõi độ ổn định thực tế. Từ các giá trị hạn sử dụng nội suy từ hệ số Q_{10} , hạn sử dụng nội suy và hạn sử dụng theo dõi thực tế cũng tương đồng nhau.

Dựa trên kết quả theo dõi độ ổn định ở 5°C, 25°C và 45°C trong các tháng, phương trình tuyến tính đa biến của các chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) thu được từ phân tích hồi quy tuyến tính đa biến thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10. Phương trình tuyến tính đa biến của các chất tạo ngọt (aspartam, acesulfam kali, natri saccharin) trong hai loại mẫu chuẩn

Nền mẫu chuẩn	Chất tạo ngọt	Phương trình tuyến tính đa biến (t_1 : nhiệt độ, t_2 : thời gian)
Nước cam tự nhiên	Aspartam	$y = 478,07 - 1,29 t_1 - 0,44 t_2$
	Acesulfam kali	$y = 284,52 - 0,46 t_1 - 0,15 t_2$
	Natri saccharin	$y = 276,58 - 0,62 t_1 - 0,19 t_2$
Nước cam hương liệu	Aspartam	$y = 603,38 - 0,66 t_1 - 0,17 t_2$
	Acesulfam kali	$y = 735,71 - 0,76 t_1 - 0,31 t_2$
	Natri saccharin	$y = 378,06 - 0,57 t_1 - 0,18 t_2$

Với các phương trình tuyến tính đa biến thu được của các chất tạo ngọt trong Bảng 10 cho thấy được hàm lượng chất phân tích suy giảm tỉ lệ nghịch với cả hai yếu tố nhiệt độ và thời gian bảo quản, mặt khác từ các hệ số tuyến tính bởi từng yếu tố có thể thấy rằng nhiệt độ bảo quản mẫu ảnh hưởng lớn hơn so với yếu tố thời gian bảo quản mẫu tới chất phân tích, điều này rất hữu ích cho việc thiết kế nghiên cứu đối với các nghiên cứu tương tự trong tương lai.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã được thực hiện nhằm đánh giá đặc tính của mẫu chuẩn chất tạo ngọt aspartam, acesulfam kali, natri saccharin trong nước cam tự nhiên và hương liệu. Kết quả theo dõi độ ổn định đạt được của hai loại mẫu chuẩn nước cam tự nhiên và hương liệu lần lượt là 360 ngày và 530 ngày. Giá trị chứng nhận của aspartam, acesulfam kali, natri saccharin và độ không đảm bảo đo trong nước cam tự nhiên lần lượt là $430 \pm 24,2$ mg/L, $270 \pm 12,0$ mg/L, $258 \pm 16,2$ mg/L, trong nước cam hương liệu lần lượt là $588 \pm 28,4$ mg/L, $711 \pm 31,2$ mg/L, $355 \pm 20,8$ mg/L. Mẫu chuẩn nước cam hương liệu có độ ổn định dài hơn so với nước cam tự nhiên. Do đó mẫu chuẩn nước cam hương liệu là lựa chọn tối ưu hơn so với việc tạo mẫu chuẩn nước cam tự nhiên. Các kết quả đặc tính của mẫu chuẩn (giá trị chứng nhận, độ không đảm bảo đo, hạn sử dụng) thu được sẽ giúp rút ngắn thời gian nghiên cứu cho các lô mẫu sản xuất tương tự sau này. Đồng thời, kết quả này sẽ tạo tiền đề cho việc nghiên cứu các mẫu chuẩn với các nền mẫu và chỉ tiêu khác nhau, góp phần đảm bảo chất lượng kết quả kiểm nghiệm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia trong đề tài mã số NIFC.ĐTCS.22.02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyen Thi Thu Hang, Le Duy Hung, *VietinbankSc Industry Report, Vietnam Non-Alcoholic Beverage Industry*, Vietnam Joint Stock Commercial Bank For Industry And Trade (VietinBank), 2015.
- [2]. Ministry of Health, Circular 24/2019/TT-BYT, *Prescribing the management and use of food additives*, date 30/8/2019.
- [3]. G. Galaverna, C. Dall'Asta, "Production Processes of Orange Juice and Effects on Antioxidant Components," *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, Elsevier, pp. 203-214, 2014.
- [4]. D. Kregiel, "Health Safety of Soft Drinks: Contents, Containers, and Microorganisms," *BioMed Research International*, vol. 2015, iss. 1, 15 pages, 2014.
- [5]. Dam Sao Mai, Nguyen Thi Hoang Yen, Bui Dang Khue, *Food additive*, Vietnam National University Ho Chi Minh city, 2012.
- [6]. Commission for the Standards, Metrology and Quality of Viet Nam, *TCVN 8471:2010 – Foodstuffs – Determination of Acesulfame-K, Aspartame and Saccharin – High performance liquid chromatographic method*, 2010.
- [7]. ISO 13528:2022, *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison*, 2022.
- [8]. ISO Guide 35:2017. *Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*, 2017.
- [9]. ISO 5725-2:2019, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*, 2019.