

Xác định đường và chất tạo ngọt nhân tạo trong một lần phân tích

Suitable for Agilent
1260 Infinity III LC



Tác giả

Florian Rieck
Agilent Technologies, Inc.

Tóm tắt

Việc xác định hàm lượng đường trong thực phẩm và đồ uống là một quy trình đã được thiết lập trong nhiều phòng thí nghiệm phân tích. Với xu hướng của ngành công nghiệp và người tiêu dùng hướng tới các sản phẩm có hàm lượng đường giảm và bổ sung chất tạo ngọt ít calo, các phòng thí nghiệm phân tích cần triển khai thêm một phương pháp thứ hai để phân tích các chất tạo ngọt. Tài liệu ứng dụng này giới thiệu một phương pháp cho phép xác định đồng thời đường và chất tạo ngọt chỉ trong một lần chạy, giúp giảm đáng kể công sức và thời gian phân tích.

Giới thiệu

Việc tiêu thụ quá mức đường trong chế độ ăn uống kém lành mạnh phổ biến đã được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) xác định là một nguy cơ chính gây tử vong sớm.¹ Vì vậy, tổ chức WHO khuyến cáo mạnh mẽ nên giảm lượng đường tự do nạp vào cơ thể. Nhằm hạn chế việc bổ sung đường vào thực phẩm và đồ uống, nhiều quốc gia đã áp dụng thuế tiêu thụ đặc biệt đối với đường bổ sung trong các sản phẩm thực phẩm và đồ uống. Vì lý do này, ngành công nghiệp đang tìm cách giảm lượng đường bổ sung trong sản phẩm. Tuy nhiên, để duy trì hương vị đặc trưng và chất lượng của sản phẩm, đường bị loại bỏ thường được thay thế bằng các chất tạo ngọt ít calo. Xu hướng này được thể hiện qua sự sụt giảm doanh số hoặc mức tiêu thụ đường bổ sung, cùng với sự gia tăng sử dụng chất tạo ngọt (ví dụ: tại Canada, Hoa Kỳ và Liên minh châu Âu⁵). Sự gia tăng các sản phẩm chứa đồng thời cả đường và chất tạo ngọt đã làm gia tăng nhu cầu về các phương pháp phân tích cho phép phân tích đồng thời cả hai nhóm chất này. Trong khi hầu hết các chất tạo ngọt nhân tạo có chứa nhóm mang màu (chromophore), cho phép chúng được phát hiện bằng đầu dò UV, thì đường lại không có nhóm này, do đó không thể được phát hiện một cách đáng tin cậy và nhạy bằng đầu dò UV. Ngược lại, đầu dò chiết suất (RID) có thể phát hiện bất kỳ hợp chất nào khác biệt so với pha động, do đó nó là đầu dò lý tưởng để phân tích đường. Tài liệu ứng dụng giới thiệu một phương pháp tách và định lượng đồng thời bốn chất tạo ngọt thường dùng cùng với năm loại mono- và disaccharide có trong thành phần tự nhiên cũng như trong các phụ gia thực phẩm.

Thí nghiệm

Thiết bị

The Agilent 1260 Infinity II LC bao gồm các hệ sau đây:

- Agilent 1260 Infinity II Isocratic Pump (G7110B)
- Agilent 1260 Infinity II Vialsampler (G7129A)
- Agilent 1260 Infinity II Multicolumn Thermostat (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II Refractive Index Detector (G7162A)

Cột

Agilent ZORBAX Carbohydrate Analysis, 4.6 × 250 mm, 5 µm (mã 840300-908)

Phần mềm

Agilent OpenLab CDS, bản 2.6, hoặc bản gần đây

Dung môi

Acetonitrile (ACN) cấp gradient cho HPLC được mua từ VWR (Darmstadt, Đức). Nước siêu tinh khiết mới được lấy từ hệ thống Milli-Q Integral, được trang bị cartridge màng lọc tại điểm sử dụng 0,22 µm (Millipak).

Hóa chất và mẫu

Acesulfame, ammonium acetate, aspartame, cyclamate, fructose, glucose, lactose monohydrate, maltose monohydrate, saccharin và sucrose được mua từ Merck (Darmstadt, Đức).

Dung dịch gốc hiệu chuẩn của tất cả các chất chuẩn được pha trong dung dịch ammonium acetate/ acetonitrile 20 mM, tỷ lệ 1:1 (theo thể tích). Dung dịch gốc tinh khiết được sử dụng cho điểm hiệu chuẩn cao nhất; các điểm hiệu chuẩn khác được tạo ra bằng cách pha loãng dung dịch gốc với pha động. Đường chuẩn được xây dựng trong khoảng từ 31 đến 1.000 µg/mL đối với các chất tạo ngọt và từ 156 đến 5.000 µg/mL đối với đường. Mỗi điểm được đo lặp lại ba lần.

Mẫu soda được mua từ cửa hàng tạp hóa địa phương. Trước tiêm, mẫu được ly tâm trong 5 phút ở 14.100 × g, sau đó lọc bằng màng lọc syringe Agilent Captiva premium (0,45 µm, cellulose tái sinh, mã số 5190-5107), và pha loãng bằng ACN tinh khiết hoặc pha động.

Cài đặt phương pháp

Bảng 1. Điều kiện sắc ký.

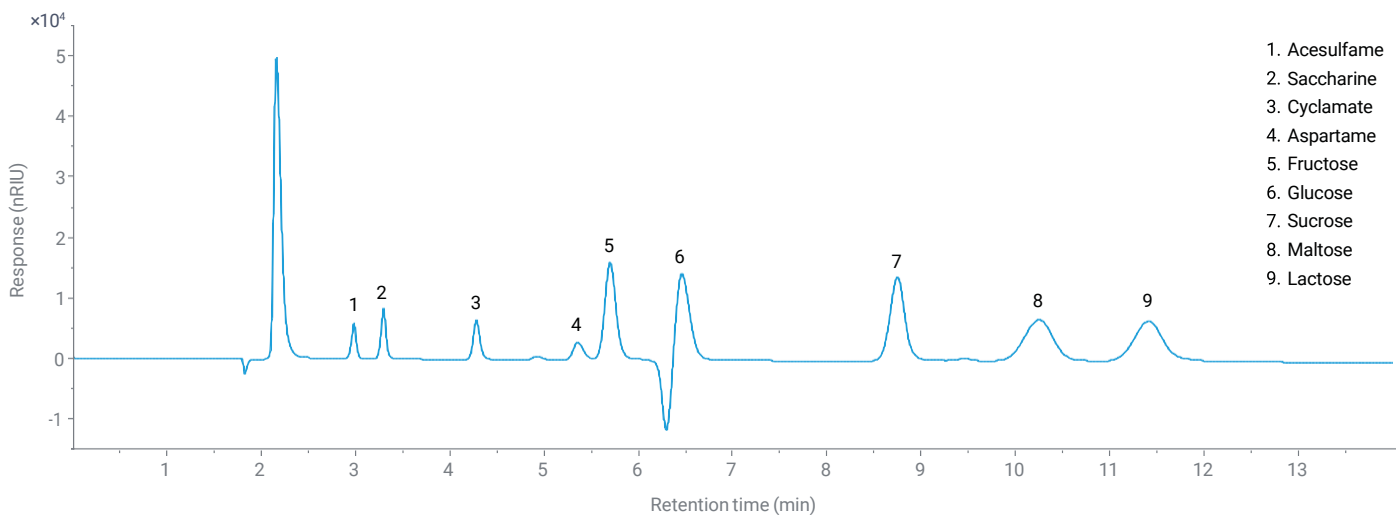
Thông số	Giá trị
Mobile Phase	20 mM ammonium acetate in acetonitrile/water 75:25 (v:v)
Flow Rate	1.5 mL/min
Injection Volume	5 µL
Sample Temperature	Ambient
Column Temperature	35 °C
RI Detector	35 °C Peak width >0.025 min (0.5 s response time, 18.5 Hz) Signal polarity: positive (+)

Kết quả và thảo luận

Hình 1 trình bày sắc ký đồ của điểm hiệu chuẩn cao nhất. Bốn chất tạo ngọt nhân tạo và năm loại đường đã được tách thành công. Độ phân giải giữa tất cả các chất phân tích thường lớn hơn 2; ngoại lệ duy nhất là độ phân giải từ 1,6 đến 1,7 giữa aspartame và fructose, mức này chỉ vừa đủ chấp nhận được cho việc định lượng. Giữa fructose và glucose (peak 5 và 6), mỗi điểm hiệu chuẩn đều xuất hiện một peak âm. Tín hiệu âm lớn nhất xuất hiện ở mẫu hiệu chuẩn có nồng độ cao nhất và giảm dần khi chất chuẩn được pha loãng; trong khi đó, một lần tiêm trắng với pha động tinh khiết không cho thấy bất kỳ peak âm nào. Do đó, giả thuyết được đưa ra là đầu dò RID đã phát hiện sự khác biệt về nồng độ đậm giữa dung môi hiệu chuẩn và pha động. Nồng độ đậm càng thấp trong các mẫu hiệu chuẩn

ít được pha loãng thì diện tích pic âm càng lớn. Để tích phân peak số 6 một cách lặp lại được, điểm giao của đường nền sau peak 5 và 6 được coi là điểm bắt đầu của peak 6.

Đường chuẩn của tất cả các chất phân tích được xây dựng dựa trên 6 điểm hiệu chuẩn, mỗi điểm được đo lặp lại ba lần. Các mức nồng độ đối với chất tạo ngọt lần lượt là 31,25; 62,5; 125; 250; 500 và 1.000 µg/mL, và đối với đường là 156,25; 312,5; 625; 1.250; 2.500 và 5.000 µg/mL. Tất cả các chất phân tích đều cho thấy hệ số tương quan (R^2) xuất sắc và độ lệch chuẩn của quy trình (s_x), như được trình bày trong Bảng 2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được tính toán cho từng chất phân tích dựa trên tỷ lệ tín hiệu/nhiều, trong đó mức nhiễu được xác định theo tiêu chuẩn ASTM E 685-93.



Hình 1. Tách mẫu hiệu chuẩn.

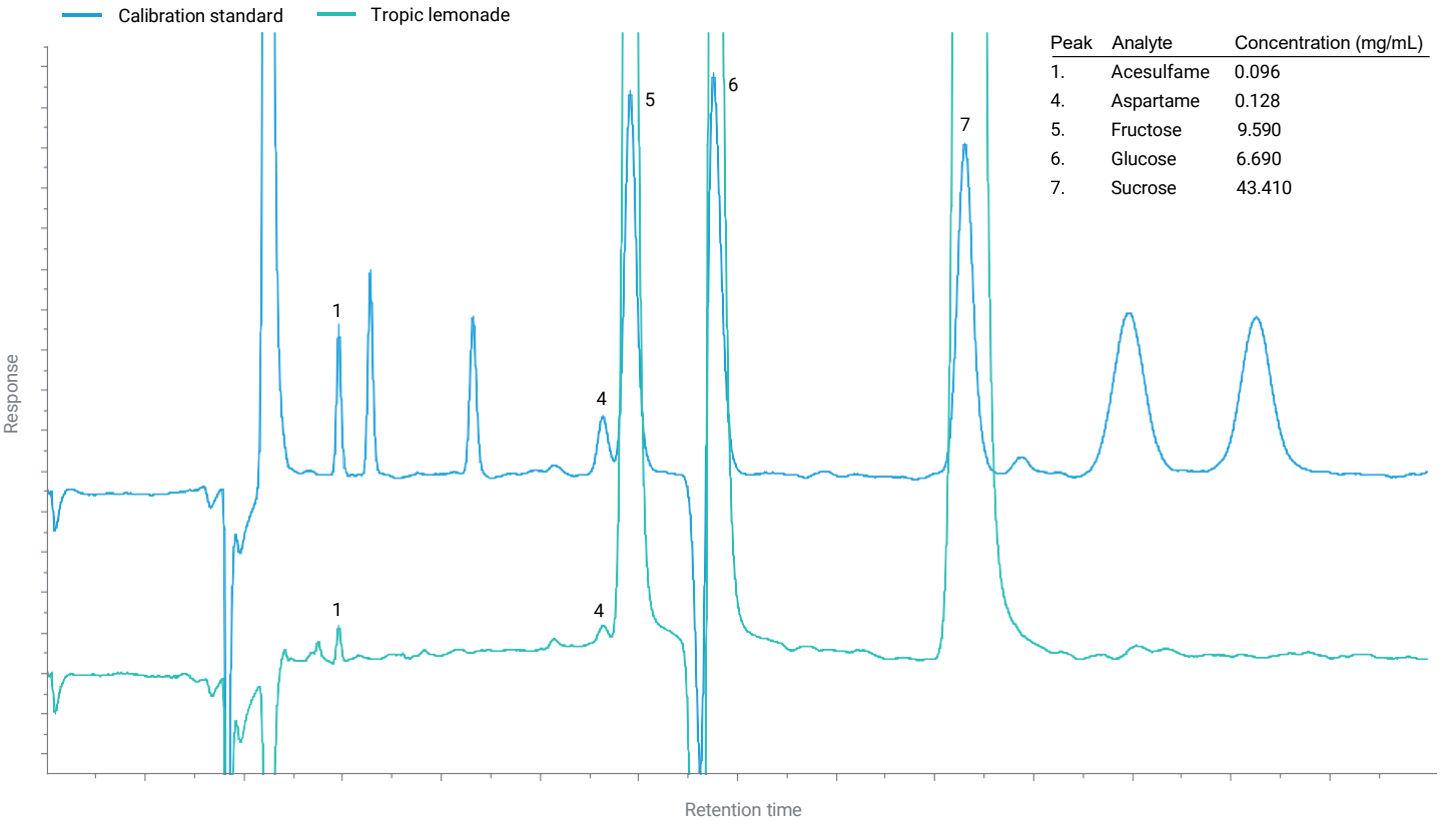
Bảng 2. Thống kê hiệu chuẩn.

Chất	Calibrated Range (µg/mL)	Resolution	R^2	LOQ (mg/mL)	LOD (mg/mL)	s_{x0} (mg/mL)
Acesulfame	31.25–1,000	—	0.99998	0.006	0.002	0.002
Saccharine	31.25–1,000	3.4–3.6	0.99994	0.003	0.001	0.003
Cyclamate	31.25–1,000	8.8–9.0	0.99999	0.004	0.001	0.001
Aspartame	31.25–1,000	6.6–6.8	0.99947	0.011	0.003	0.010
Fructose	156.25–5,000	1.6–1.7	0.99998	0.010	0.003	0.010
Glucose	156.25–5,000	3.3–3.4	0.99999	0.010	0.003	0.005
Sucrose	156.25–5,000	8.5–8.9	0.99999	0.010	0.003	0.006
Maltose	156.25–5,000	3.5–3.6	0.99999	0.019	0.006	0.005
Lactose	156.25–5,000	2.0–2.1	0.99999	0.020	0.006	0.008

Các khoảng hiệu chuẩn khác nhau cho chất tạo ngọt và đường được lựa chọn nhằm phản ánh nồng độ dự kiến của hai nhóm chất phân tích này trong các mẫu thực tế. Sự chênh lệch nồng độ giữa chất tạo ngọt và đường trong các mẫu được chọn thực tế quá lớn, đến mức cần phải pha loãng để định lượng chính xác hàm lượng đường. Để tránh hiện tượng breakthrough của mẫu, các mẫu được pha loãng với thể tích gấp ba lần ACN tinh khiết, nhằm mô phỏng thành phần của pha động. Nếu nồng độ đường nằm ngoài khoảng hiệu chuẩn, một phần mẫu khác được pha loãng gấp mười lần bằng pha động tinh khiết. Hai mẫu nước chanh được phân tích: một mẫu được giảm đường và thêm chất tạo ngọt (tropic lemonade), và một mẫu nước chanh diet dựa trên whey, có bổ sung chất tạo ngọt nhưng không thêm đường ('whey lemonade').

Hình 2 chỉ ra phân tích nước chanh tropic lemonade, được pha loãng với ACN theo tỉ lệ 1:4. Đã phát hiện được hai chất tạo ngọt và ba loại đường. Để định lượng chính xác hàm lượng đường, cần phân tích mẫu sau khi đã pha loãng 10 lần (không trình bày ở đây).

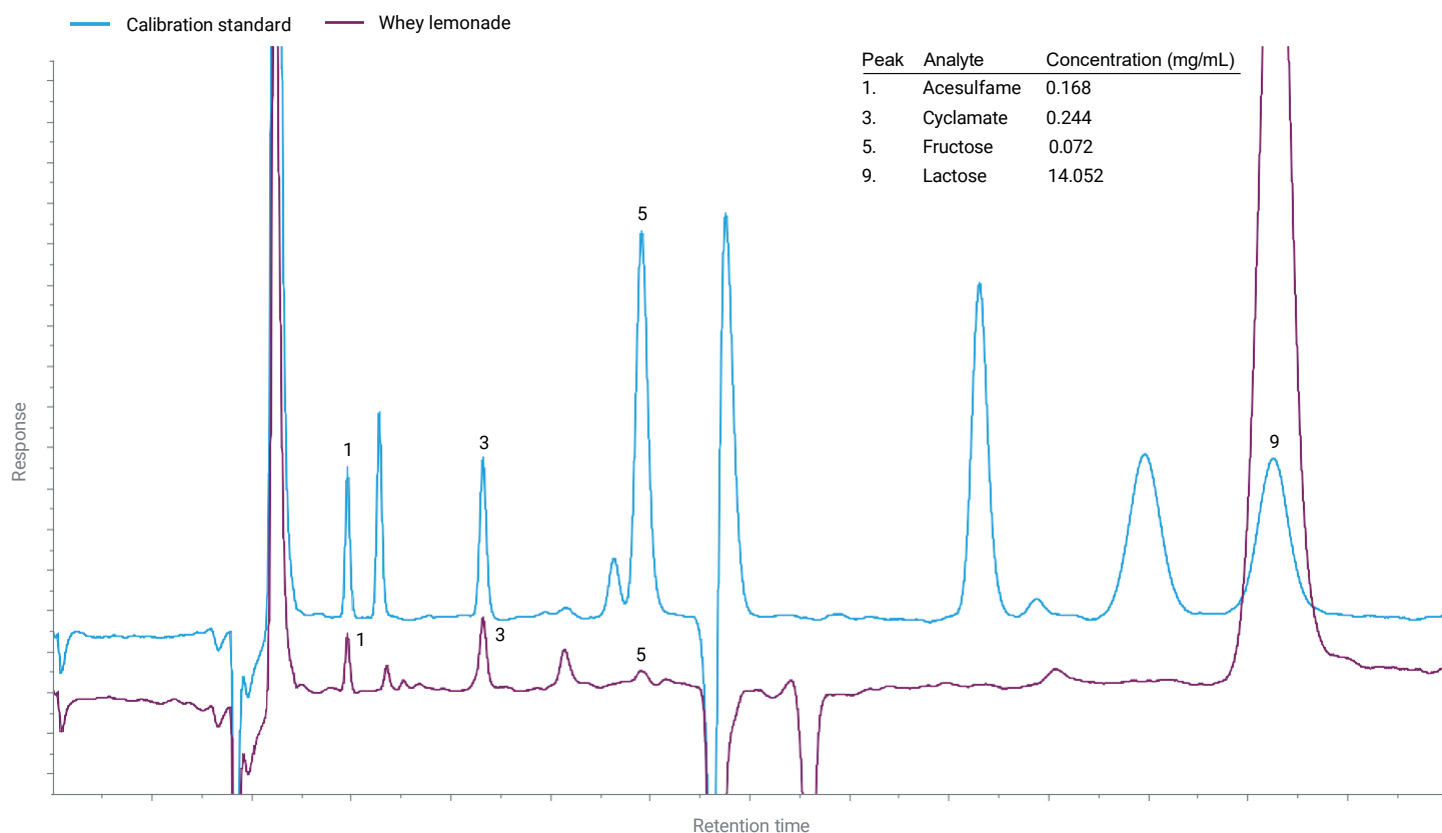
Acesulfame và aspartame được định lượng lần lượt là 96 và 128 µg/mL. Fructose, glucose và sucrose được tìm thấy với lượng lớn hơn, lần lượt là 9,59; 6,69 và 43,41 mg/mL. Tổng lượng của ba loại đường này, 59,69 mg/mL, khớp với con số được ghi trên nhãn dinh dưỡng (60 mg/mL). Lượng chất ngọt bổ sung không được ghi trên nhãn, nhưng nồng độ đo được tương đối phù hợp với các giá trị trong tài liệu: 126 ± 72 µg/mL đối với acesulfame và 162 ± 120 µg/mL đối với aspartame, dựa trên khảo sát 57 loại đồ uống khác nhau.⁶



Hình 2 Sắc ký đồ chồng của mẫu nước chanh tropic (pha loãng 1:4 với ACN) và dung dịch chuẩn hiệu chuẩn.

Phân tích nước chanh whey được thể hiện trong Hình 3. Một lần nữa, hai chất tạo ngọt có thể được phát hiện, lần này là acesulfame ở 168 µg/mL và cyclamate ở 244 µg/mL. Vì loại nước chanh này được làm từ sữa whey, nên dự kiến sẽ có một lượng lactose đáng kể, và lactose được định lượng là 14,05 mg/mL. Nhãn của loại nước chanh này chỉ ghi tổng lượng đường, được công bố là 15 mg/mL. Tuy nhiên, con số này bao gồm cả lượng đường caramen được thêm vào để tạo màu. Để phản hồi một yêu cầu trực tiếp, nhà cung cấp đã báo cáo nồng độ lactose là 14 mg/mL. Không chất tạo ngọt nào được ghi kèm số lượng trên nhãn, nhưng một lần nữa, các giá trị đo phù hợp với tài liệu⁶: 126 ± 72 µg/mL đối với acesulfame và 207 ± 47 µg/mL đối với cyclamate.

Tổng lượng chất làm ngọt tìm thấy trong nước chanh whey (412 µg/mL) cao hơn trong nước chanh tropic (224 µg/mL). Điều này có thể giải thích bằng 2 cách: Đầu tiên, nước chanh whey chỉ chứa một phần tư lượng đường so với nước chanh tropic. Để đáp ứng kỳ vọng của khách hàng về độ ngọt của nước chanh, có thể cần bổ sung thêm chất tạo ngọt. Thứ hai, cyclamate được tìm thấy trong mẫu nước chanh whey nhưng không có trong nước chanh tropic, có độ ngọt thấp hơn aspartame và acesulfame 6 lần, những chất đã được bổ sung vào nước chanh tropic. Với hệ số này được tính từ nồng độ cyclamate, tổng lượng chất làm ngọt trong cả hai loại nước chanh gần như tương đương nhau (224 so với 209 µg/mL).



Hình 3. Sắc ký đồ chồng của mẫu nước chanh whey (được pha loãng theo tỉ lệ 1:4 với ACN) với dung dịch hiệu chuẩn.

Kết luận

Tài liệu ứng dụng này giới thiệu phương pháp isocratic có khả năng phân tích đồng thời bốn chất làm ngọt và năm loại mono- và disaccharide có trong thực phẩm và đồ uống. Trong 14 phút, chín chất được tách và định lượng. Đối với tất cả các hợp chất trừ maltose và lactose, Giới hạn định lượng (LOQ) là 11 µg/mL hoặc thấp hơn, tương đương 55 ng trên cột. Việc xác định đồng thời chất làm ngọt và đường trong một lần chạy có thể rút ngắn đáng kể thời gian phân tích các mẫu chứa cả hai nhóm chất phân tích, giúp quá trình phân tích nhanh hơn và tiết kiệm chi phí hơn.

Tài liệu tham khảo

1. Guideline: Sugars intake for adults and children. Geneva: World Health Organization; **2015**.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241549028> (last accessed on 2 February 2023).
2. Jones, A. C.; Kirkpatrick, S. I.; Hammond, D. Beverage Consumption and Energy Intake Among Canadians: Analyses of 2004 and 2015 National Dietary Intake Data. *Nutrition Journal* **2019**, *18*(60).
3. Sylvetsky, A. C. *et al.* Low-Calorie Sweetener Consumption Is Increasing in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*(3), 640–6.
4. Welsh, J. A. *et al.* Consumption of Added Sugars Is Decreasing in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *94*(3), 726–34.
5. UNESDA sales numbers **2022**.
<https://www.unesda.eu/sales-and-consumption/> (last accessed on 2 February 2023).
6. Janvier, S. *et al.* Low-Calorie Sweeteners in Food and Food Supplements on the Italian Market. *Food Addit. Contam.* **2015**, *8*(4), 298–308.
7. Sweetening agents for Pharmaceutical Preparations
<https://pharmaeducation.net/sweetening-agents/> (last accessed on 8 February, 2023).