

Nghiên cứu quy trình tạo dẫn xuất và định lượng một số loại đường trong nền mẫu thực phẩm bằng sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID)

Nguyễn Khắc Mạnh*, Nguyễn Từ Hòa, Nguyễn Ngọc Khuê, Huỳnh Lâm Diễm My, Nguyễn Huy Du, Nguyễn Ánh Mai



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Trong đề tài này, các carbohydrate được tạo dẫn xuất với tác chất anhydride acetic acid (AAA), sau đó được phân tách và xác định trên hệ thống sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID). Phản ứng dẫn xuất trải qua hai giai đoạn: (1) Phản ứng oxime hóa các carbohydrate được thực hiện trong điều kiện thời gian 15 phút, thể tích NH_2OH 2,5% là 500 μL và nhiệt độ 60 °C và (2) phản ứng acetyl hóa các carbohydrate được thực hiện trong điều kiện thời gian phản ứng 45 phút, thể tích AAA là 600 μL và nhiệt độ 80°C. Kết quả cho thấy, các dẫn xuất của carbohydrate xuất hiện mũi đơn trên sắc ký đồ, ngoại trừ fructose xuất hiện mũi đôi. Kết quả thẩm định phương pháp cho các carbohydrate có các giá trị: khoảng tuyến tính từ 50 đến 2000 mg/mL cho các đường đơn và 150–3500 mg/mL cho các đường đa, độ đúng trong khoảng 95-115%, % RSD nhỏ hơn 5%, LOD trong khoảng 20 đến 50 mg/g. Quy trình được ứng dụng thành công cho phân tích thành phần carbohydrate trong nền mẫu sữa tươi, mật ong và dịch thủy phân từ polysaccharide. Kết quả cho thấy mẫu mật ong có hàm lượng fructose và glucose lần lượt là 65,8% và 33,4%, sucrose chiếm 0,74% carbohydrates. Mẫu sữa tươi có hàm lượng lactose chiếm 47,6% carbohydrate. Thành phần carbohydrate trong dịch thủy phân polysaccharide trong mẫu nấm nuôi chứa một số loại carbohydrate hiếm gặp như Arabinose, Xylose.

Từ khoá: Carbohydrate, Anhydride acetic acid, GC-FID

MỞ ĐẦU

Carbohydrate là nhóm các hợp chất thuộc loại polyhydroxy aldehyde và ketone. Các chất này đóng vai trò cực kì quan trọng trong cơ thể sống của động, thực vật cũng như các vi sinh vật khi tham gia vào các quá trình sinh học như tích trữ và vận chuyển năng lượng, cấu trúc, miễn dịch¹. Carbohydrate trong thực phẩm có những chức năng chính như tạo vị ngọt, tăng vị giác và cung cấp năng lượng. Nhiều nghiên cứu trong lĩnh vực dinh dưỡng, sinh học, y học đã cho thấy mối liên quan mật thiết giữa thành phần carbohydrate có trong thức ăn với sức khỏe của con người. Hay nói cách khác, việc xác định thành phần và hàm lượng carbohydrate trong thực phẩm là một trong số những tiêu chí để đánh giá chất lượng của thực phẩm^{1,2}. Các loại pentose và hexose là những đơn vị mắt xích cơ bản hình thành nên các cấu trúc của disaccharides, oligosaccharides và polysaccharides (**Bảng 1**). Trong dung dịch, các pentose và hexose có thể hình thành các liên kết hemiacetal tạo cấu trúc vòng pyranose (vòng 6) hoặc cấu trúc vòng furanose (vòng 5) (**Hình 1 và 2**). Dạng cấu trúc vòng pyranose dễ hòa

tan trong dung dịch hơn nên xuất hiện trong tự nhiên nhiều hơn dạng vòng furanose.

Hiện nay, sắc ký lỏng là phương pháp được sử dụng phổ biến cho phân tách và xác định các carbohydrate. Một số cơ chế chính để phân tách các carbohydrate trong sắc ký lỏng bao gồm: tương tác pha thuận trên cột amino với đầu dò khúc xạ hoặc trao đổi ion trên cột trao đổi anion trong môi trường kiềm với đầu dò điện hóa. Như vậy, để phân tách các loại carbohydrate cần sự trang bị về cột phân tích và thiết bị phù hợp. Tuy nhiên, các loại cột trên thường có tuổi thọ ngắn và giá thành cao². Trong khi đó, nhiều nghiên cứu đã tiến hành phân tách và xác định các carbohydrate bằng phương pháp sắc ký khí sau khi tạo dẫn xuất giữa carbohydrate với tác chất phù hợp để chuyển về các dạng hợp chất dễ bay hơi, phản ứng silyl hóa các nhóm hydroxyl của carbohydrate đang được sử dụng phổ biến hiện nay^{3,4}. Tuy nhiên, các dẫn xuất silan tạo thành có hiện tượng đa mũi cho một carbohydrate trên sắc ký đồ gây khó khăn cho quá trình phân tách và định lượng. Ngoài ra, dẫn xuất silan của các carbohydrate rất dễ bị than hóa trong buồng tiêm làm quá trình sắc ký kém ổn định và nhanh bị nhiễm bẩn.

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Liên hệ

Nguyễn Khắc Mạnh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam
Email: nkmanh@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 06-01-2020
- Ngày chấp nhận: 03-03-2020
- Ngày đăng: 15-06-2020

DOI: 10.32508/stdjns.v4i2.874



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Trích dẫn bài báo này: Mạnh N K, Hòa N T, Khuê N N, My H L D, Du N H, Mai N A. **Nghiên cứu quy trình tạo dẫn xuất và định lượng một số loại đường trong nền mẫu thực phẩm bằng sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID).** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(2):519-529.

Tác chất anhydride acetic acid (AAA) được sử dụng có thể cải thiện nhiều vấn đề mà tác chất silan hóa gặp phải hiện nay như sự nhạy ẩm, hiện tượng đa mũi của mỗi carbohydrate trên sắc ký đồ và khả năng nhiễm bẩn thiết bị. Tại Việt Nam, số lượng các nghiên cứu và ứng dụng tác chất AAA cho phân tích các carbohydrate không nhiều. Do đó, trong đề tài này chúng tôi sử dụng tác chất AAA để thực hiện phản ứng acetyl hóa các carbohydrate. Quy trình được triển khai trên thiết bị GC-FID có tính phổ biến rộng, thiết bị đơn giản, chi phí thấp. Điều kiện phản ứng giữa AAA và cacbohydrates được tối ưu hóa nhằm giảm thời gian phân tích, tăng độ nhạy, độ chọn lọc cho xác định các carbohydrate trong nền mẫu thực phẩm. Hơn nữa, các carbohydrate được khảo sát gồm có các aldose (polyhydroxy aldehyde) và ketose (polyhydroxy ketone) nhằm đánh giá khả năng bao quát của quy trình trên các carbohydrate trong thực phẩm. Từ đó, quy trình này có thể giải quyết cho vấn đề phụ thuộc vào các phương pháp phân tích carbohydrate bằng HPLC như hiện nay.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thiết bị

Hệ thống sắc ký khí 6890 N với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID) của hãng Agilent (USA), cột phân tích HP-5MS UI (30 m × 0,25 mm *i.d.* × 0,25 μm), khí mang N₂ với độ tinh khiết 99,999%. Thiết bị cấp nước khử ion Pure water system WP 710 – C20 của hãng PG instrument (Anh)

Hóa chất và thuốc thử

Các chất chuẩn: arabinose, rhamnose, xylose, mannose, glucose, galactose, fructose, maltose, lactose, sucrose, nội chuẩn inositol với độ tinh khiết trên 99% và thuốc thử AAA được mua từ hãng Sigma Aldrich. Các dung dịch chuẩn gốc được chuẩn bị trong nước khử ion vào bảo quản tại nhiệt độ 4°C. Các dung môi ethanol (EtOH), chloroform (CHCl₃), ethylacetate (EtOAc) loại tinh khiết HPLC được mua từ hãng Scharlau (Tây Ban Nha). Các hóa chất pyridine, hydrochloric acid (HCl) loại tinh khiết phân tích được mua từ hãng Merck (Đức). Dung dịch hydroxylamine (NH₂OH) 2,5% (w/v) trong pyridine: cân 6,25 g NH₂OH hòa tan trong 250 mL pyridine và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Phương pháp

Quy trình tạo dẫn xuất aldonitril acetate

Dung dịch mẫu và chuẩn carbohydrate được chuyển vào ống nghiệm thủy tinh 10 mL, có nắp vận teflon và thổi khô mẫu bằng dòng không khí. Tiếp theo, 0,5 mL

dung dịch NH₂OH 2.5% được thêm vào ống nghiệm, lắc nhẹ và vận nắp ống nghiệm thật chặt rồi ủ nhiệt trong thời gian 15 phút tại nhiệt độ 60 °C. Cuối cùng, thêm 0.6 mL dung dịch AAA và ủ nhiệt trong thời gian 45 phút tại nhiệt độ 80 °C để phản ứng acetyl hóa xảy ra. Sau giai đoạn tạo dẫn xuất, thêm 1 mL dung dịch HCl 10% (v/v) để tạo môi trường chiết, tiếp tục thêm 2 mL CHCl₃ vào để tách chiết các dẫn xuất aldonitrile từ pha nước. Quá trình chiết bằng CHCl₃ được lặp lại 3 lần. Pha CHCl₃ được thổi khô hoàn toàn bằng dòng không khí rồi hòa tan lại bằng 1 mL EtOAc và tiêm mẫu vào hệ thống GC-FID.

Quy trình xử lý mẫu

Quy trình được ứng dụng trên ba nền mẫu gồm có: (1) mẫu sữa bò tươi Long Thành tỉnh Đồng Nai; (2) mẫu mật ong Đà Lạt tỉnh Lâm Đồng; và (3) dịch thủy phân polysaccharide được tách chiết từ mẫu nấm nuôi trong môi trường vi sinh tại Trường Đại học Cần Thơ. Cân chính xác khoảng 0,5g cho nền mẫu mật ong hoặc 1 g cho nền mẫu sữa vào ống nghiệm thủy tinh 15 mL có nắp vận teflon. Thêm 3 mL dung dịch chiết EtOH : H₂O 80:20, v/v, siêu âm 10 phút, sau đó ly tâm chuyển phần dung dịch trong vào bình định mức 20 mL. Lặp lại quá trình chiết 3 lần và định mức tới vạch mức bằng dung dịch chiết mẫu. Rút chính xác 1 mL đem thổi khô bằng không khí và tiến hành các bước tạo dẫn xuất acetyl hóa cho các carbohydrate^{7,8}.

Phân tích bằng GC-FID.

Nhiệt độ buồng tiêm 280 °C, với tỉ lệ chia dòng là 1:50, thể tích tiêm mẫu là 1 μL, tốc độ dòng khí mang N₂ là 1 mL/min, nhiệt độ đầu dò 300 °C và chương trình nhiệt như trong (Bảng 2).

Bảng 2: Chương trình nhiệt độ cột

Tốc độ gia nhiệt (°C /phút)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
0	120	2
20	200	4
25	280	5

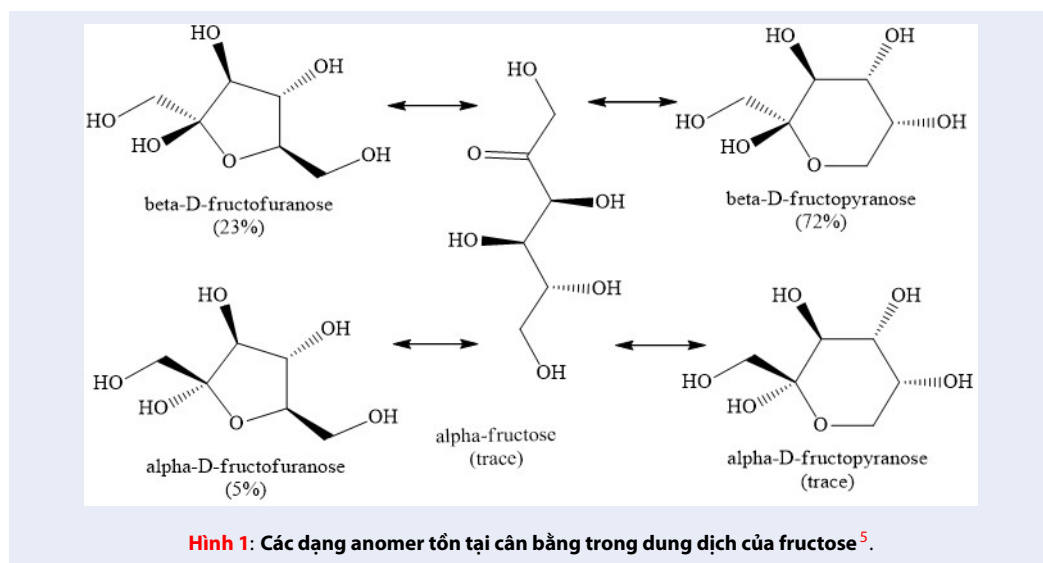
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tách các dẫn xuất aldonitrile acetate trên hệ thống GC-FID

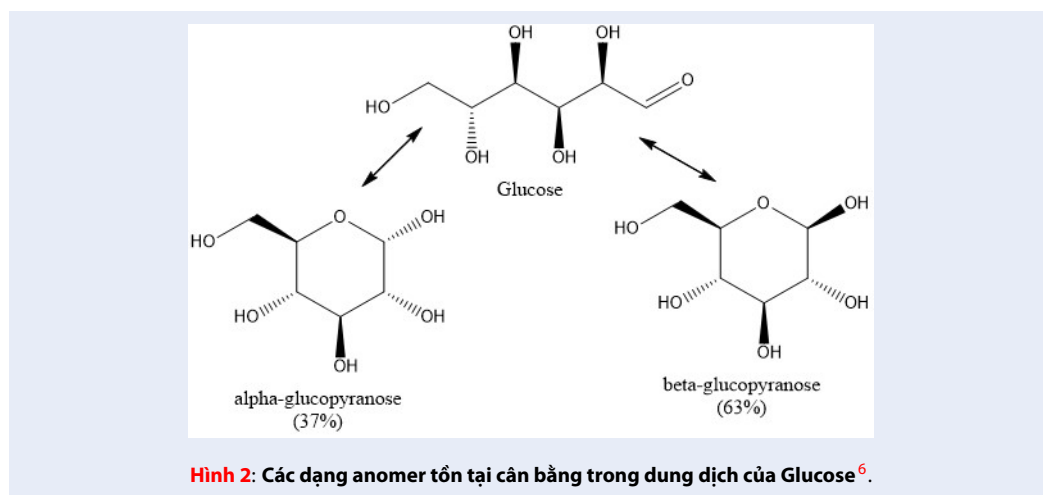
Dẫn xuất silan hóa cho carbohydrate thường được sử dụng trong phân tích bằng GC. Tuy nhiên hiện tượng đa mũi của mỗi carbohydrate trên sắc ký đồ khiến quá trình phân tách trở nên phức tạp⁹. Mục tiêu của chúng tôi là tìm tác chất tạo dẫn xuất phù

Bảng 1: Các carbohydrate quan trọng trong thực phẩm².

Phân loại	Tên	Phạm vi
Pentose	Arabinose, ribose, xylose	Hiếm gặp, chủ yếu trong sản phẩm lên men, hemicellulose
Hexose	Glucose, fructose	Phổ biến, trong các loại trái cây, mật ong
	Mannose, galactose, Fucose	Hiếm, có trong trái việt quất Trong một số loại nấm
Disaccharide	Sucrose	Phổ biến, có nhiều trong mía, trái cây
	Maltose	Thủy phân từ tinh bột
	Lactose	Trong sữa động vật
	Lactulose	Hiếm, chủ yếu trong sữa
Oligosachride	Từ 3- 14 đơn phân	Thủy phân từ tinh bột
Polysaccharide	Từ 100 đến 1000 đơn phân	Tinh bột, vách tế bào



Hình 1: Các dạng anomer tồn tại cân bằng trong dung dịch của fructose⁵.



Hình 2: Các dạng anomer tồn tại cân bằng trong dung dịch của Glucose⁶.

hợp cho carbohydrate để mỗi chất xuất hiện mũi đơn trên sắc ký đồ. Trong số đó, tác chất AAA đáp ứng được tiêu chí để ra so với các phản ứng tạo dẫn xuất khác. Trên sắc ký đồ cho thấy sự phân tách tốt các dẫn xuất aldonitrile acetate trong khoảng thời gian từ 6 đến 18 phút (**Hình 3**). Đặc biệt, mỗi mũi sắc ký tương ứng cho một carbohydrate ngoại trừ fructose xuất hiện mũi đôi trên sắc ký đồ. Giá trị tổng diện tích của hai mũi fructose được sử dụng cho các tính toán trong quy trình này. Khi tăng nồng độ fructose từ thấp tới cao (**Hình 4**), tỉ lệ phần trăm diện tích hai mũi của fructose tiến tới giá trị gần tương ứng với hai dạng beta-fructopyranose (72%) tổng fructofuranose (28%) (**Hình 2**). Khai thác yếu tố này, chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm nhằm thay đổi tỉ lệ giữa các dạng của fructose dựa trên sự thay đổi môi trường phản ứng tạo dẫn xuất nhằm điều khiển phản ứng tạo dẫn xuất tới sản phẩm mong muốn. Các thí nghiệm này được tiến hành trên thiết bị LC-MS (μ TOF) và sẽ được trình bày trong các công trình công bố tiếp theo của nhóm nghiên cứu.

Tối ưu phản ứng tạo oxime và acetyl hóa carbohydrate

Phản ứng oxime hóa các gốc carbonyl ($-C=O$) (**Hình 5**) và acetyl hóa các gốc hydroxy ($-OH$) (**Hình 6**) được tối ưu hóa các thông số về nhiệt độ, thời gian và nồng độ của tác chất trên bốn chất phân tích: (1) arabinose đại diện cho nhóm pentose; (2) glucose đại diện cho nhóm hexose; (3) fructose đại diện cho nhóm ketose; và (4) lactose đại diện cho nhóm disaccharide. Mỗi thí nghiệm được tiến hành ba lần và ghi sắc ký đồ, giá trị trung bình của ba lần đo lặp được biểu thị trên các đồ thị (**Hình 7 và 8**).

Kết quả khảo sát giai đoạn oxime hóa các gốc $-C=O$ của carbohydrate cho thấy thời gian phản ứng và lượng hydroxylamine ít ảnh hưởng tới cường độ tín hiệu của các carbohydrate (S_A/S_{IS}), trong khi đó khảo sát nhiệt độ cho thấy điểm cực đại và ổn định của tín hiệu các carbohydrate trong khoảng từ 60 tới 70°C (**Hình 7**). Do đó, phản ứng oxime hóa được thực hiện tại giá trị thời gian 15 phút, thể tích NH_2OH 2,5% là 500 μ L và nhiệt độ 60 °C cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả khảo sát giai đoạn acetyl hóa các gốc $-OH$ của carbohydrate cho thấy nhiệt độ phản ứng và lượng thể tích AAA thêm vào ít ảnh hưởng tới cường độ tín hiệu của các carbohydrate (S_A/S_{IS}), trong khi đó khảo sát về thời gian phản ứng cho thấy các carbohydrate có cường độ cao và ổn định sau 30 phút (**Hình 8**). Do đó, để phản ứng acetyl hóa ổn định chúng tôi lựa chọn các giá trị thời gian phản ứng 45 phút, nhiệt độ 80°C và thể tích tác chất AAA là 600 μ L cho các thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá khả năng định lượng của phương pháp

Khoảng tuyến tính: Tiến hành tiêm 7 dung dịch chuẩn hỗn hợp của các carbohydrate trong khoảng nồng độ từ 50 đến 5000 μ g/mL và tiến hành ghi sắc ký đồ tại điều kiện tối ưu. Các thành phần đường đơn có mối quan hệ tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 50 đến 2000 μ g/mL và các đường đa có mối quan hệ tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 150 đến 3500 μ g/mL (**Hình 9**). Phương trình đường chuẩn và các hệ số tương quan được nêu trong (**Bảng 3**).

Độ chính xác (% RSD): Thực hiện 6 mẫu lặp chứa hỗn hợp 10 carbohydrates ở mức nồng độ 500 μ g/mL và tiến hành tạo dẫn xuất acetyl hóa tại điều kiện tối ưu và ghi sắc ký đồ. Độ chính xác của phương pháp được đánh giá thông qua giá trị % RSD (**Bảng 4**).

Độ đúng: Đánh giá độ đúng dựa trên phần trăm hiệu suất thu hồi (% HSTH) của các mẫu thêm chuẩn hỗn hợp 10 carbohydrate trên các nền mẫu sữa tươi, mật ong và mẫu polysaccharide với nồng độ các đường đơn và đường đa tương ứng là 500 và 1000 μ g/mL. Các giá trị % HSTH được thể hiện trên (**Bảng 4**) và sắc ký đồ mẫu sữa tươi thêm chuẩn được thể hiện trên (**Hình 10**).

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Tiến hành ghi 7 sắc ký đồ của mẫu chuẩn chứa nồng độ các carbohydrate tại mức 50 μ g/mL, các giá trị LOD và LOQ được tính theo công thức: $LOD = 3,3 \cdot SD/a$ và $LOQ = 10 \cdot SD/a$. Trong đó, SD là độ lệch chuẩn của tỉ số giữa tín hiệu chất phân tích so với tín hiệu của nội chuẩn và a là hệ số góc của đường chuẩn¹⁰. Các giá trị LOD và LOQ được thể hiện trên (**Bảng 4**).

Ứng dụng quy trình phân tích trên nền mẫu thực

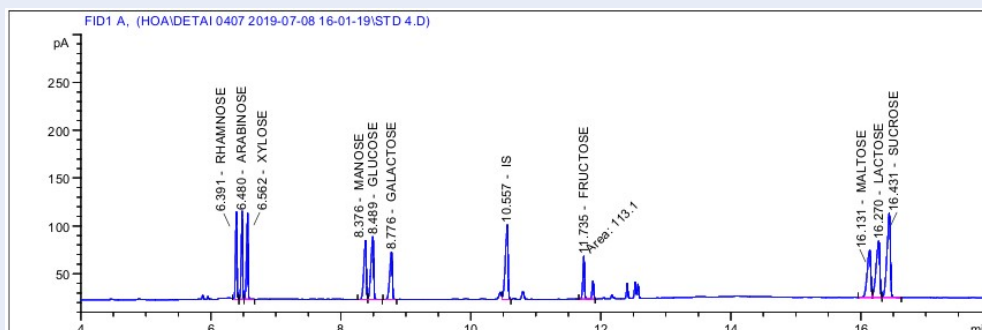
Quy trình được ứng dụng trên ba nền mẫu gồm có: (1) mẫu sữa tươi; (2) mẫu mật ong rừng; và (3) dịch thủy phân polysaccharide được tách chiết từ nấm nuôi trong môi trường vi sinh do Trường Đại học Cần Thơ cung cấp.

Kết quả phân tích các thành phần carbohydrate trong các nền mẫu được biểu diễn trên (**Bảng 5**).

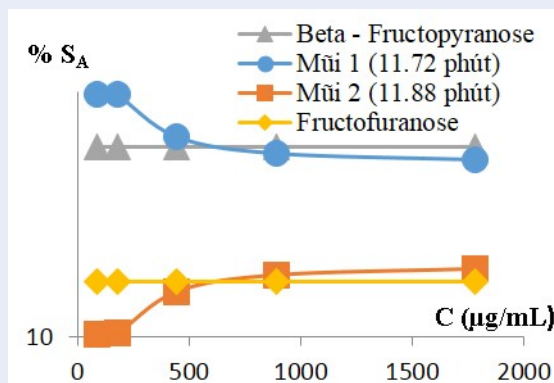
Mẫu sữa tươi (**Hình 11**): Hàm lượng lactose chiếm 47,6% carbohydrate, đây là loại sữa tươi có chất lượng theo tiêu chuẩn của tổ chức FAO¹¹.

Mẫu mật ong (**Hình 12**): Hàm lượng fructose và glucose lần lượt là 65,8% và 33,4%, trong khi đó sucrose chiếm 0,74% carbohydrates. Kết quả cho thấy đây là loại mật ong chất lượng cao theo số liệu công bố của tổ chức mật ong quốc tế IHC¹².

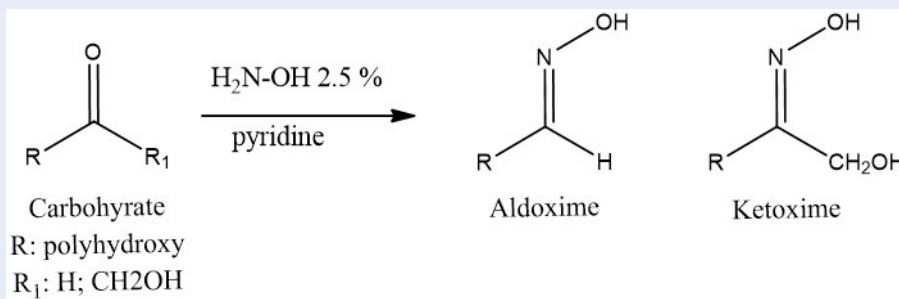
Mẫu dịch thủy phân từ polysaccharide trong nấm nuôi (**Hình 13**): Kết quả phân tích cho thấy sự xuất



Hình 3: Sắc ký đồ phân tách 10 dẫn xuất aldonitrile acetate bằng GC-FID.



Hình 4: Tỷ lệ % diện tích hai mũi sắc ký của fructose.



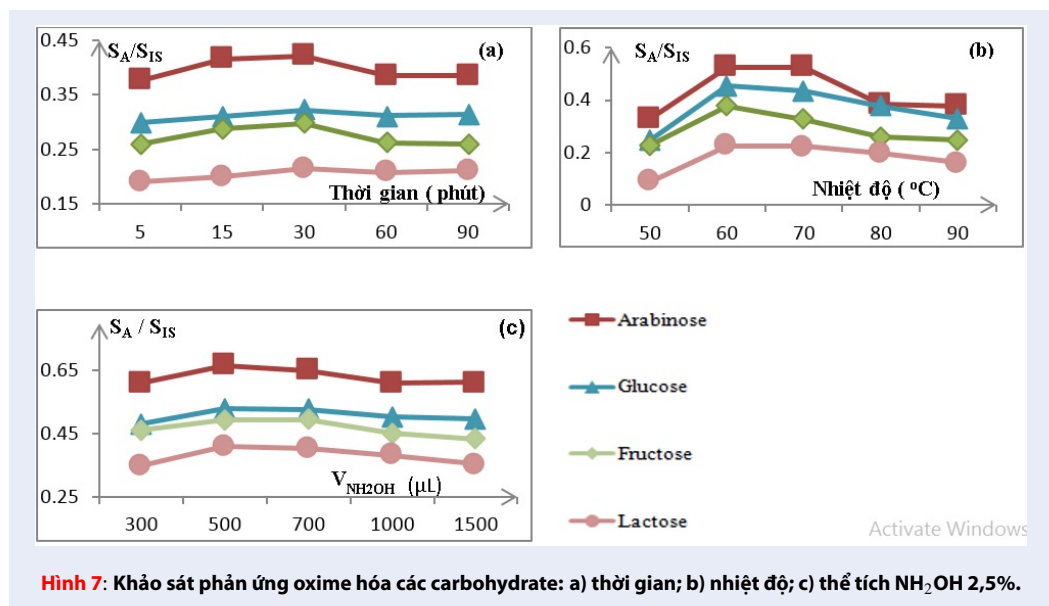
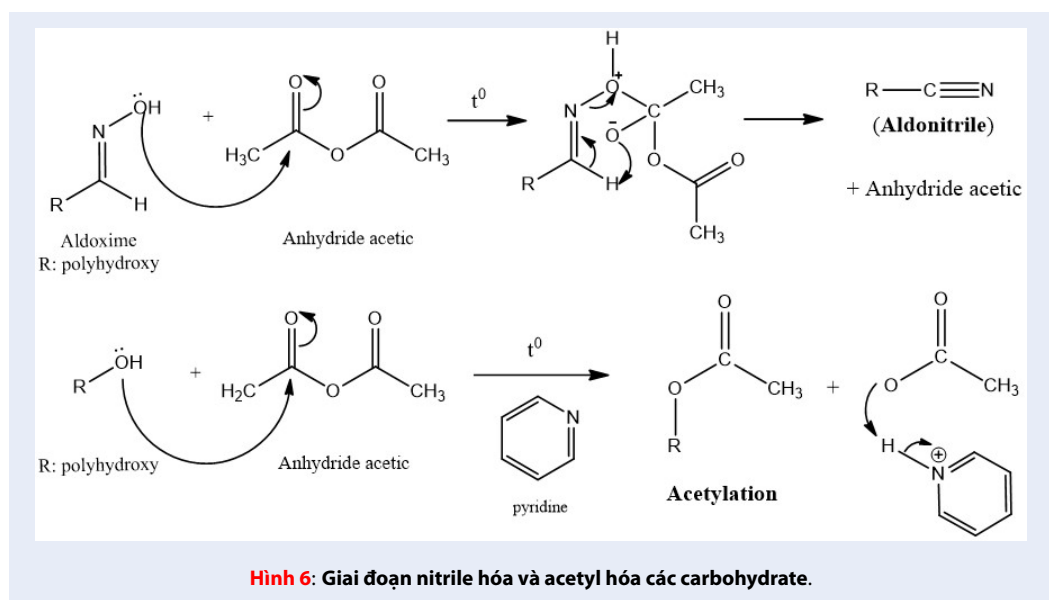
Hình 5: Giai đoạn oxime hóa gốc carbonyl của các carbohydrate.

hiện một số thành phần hiếm gặp như arabinose, xylose và galactose chiếm tỉ lệ thấp lần lượt là 0,34%; 3,4% và 0,24% carbohydrate. Hai thành chiếm tỉ lệ cao nhất là manose và glucose chiếm tỉ lệ lần lượt là 82 % và 14% carbohydrate. Hướng nghiên cứu cấu trúc của polysaccharide đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Trong đó, phân tích thành phần carbohydrate là một trong ba bước để xác định cấu trúc của polysaccharide bên cạnh xác định phân

tử lượng và các liên kết không gian từ phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR^{13,14}. Hiện nay, hướng nghiên cứu này đóng vai trò quan trọng trong lĩnh vực sinh học, y học, dược phẩm nhằm tổng hợp các loại thuốc trị bệnh gắn trên nền polysaccharide^{15,16}.

KẾT LUẬN

Quy trình phân tích các carbohydrate sau phản ứng acetyl hóa với AAA bằng GC-FID cho độ ổn định



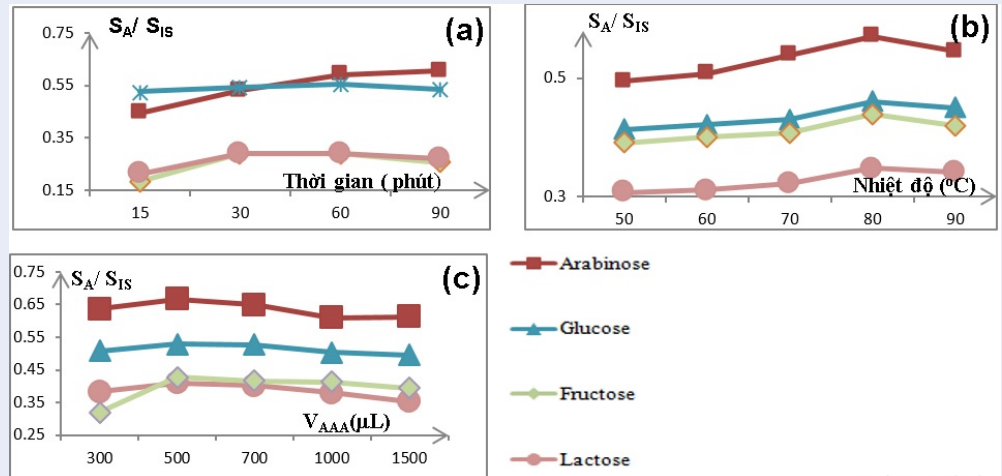
cao, khoảng tuyến tính rộng, độ lặp lại cao và phân tích đồng thời 10 carbohydrate trong nhiều nền mẫu khác nhau. Sự mở rộng của quy trình phân phân này giúp các phòng thí nghiệm phân tích giảm tải được rất nhiều chi phí từ cột phân tích tới trang thiết bị cho phân tích carbohydrate. Một ưu điểm lớn khi áp dụng cho phân tích các carbohydrate trên nền mẫu thực tế so với phương pháp sắc ký lỏng đó là không cần các bước riêng biệt để loại các thành phần gây nhiễu như protein, muối trong nền mẫu.

LỜI CẢM ƠN

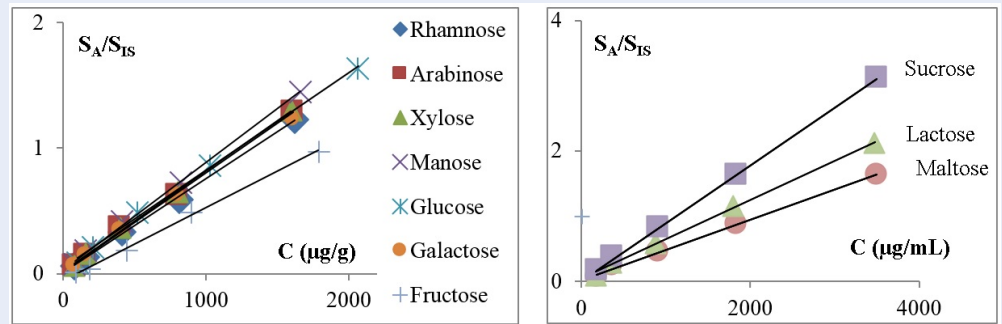
Nhóm tác giả trân thành gửi lời cảm ơn tới Phòng thí nghiệm Phân tích Trung tâm đã hỗ trợ trang thiết bị và địa điểm thực hiện cho nghiên cứu này. Nghiên cứu này được tài trợ nguồn kinh phí từ đề tài cấp trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp.HCM có mã số T2017-47.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả tuyên bố không xung đột về lợi ích.



Hình 8: Khảo sát phản ứng acetyl hóa các carbohydrate: a) thời gian, b) nhiệt độ và c) thể tích AAA.



Hình 9: Đồ thị đường chuẩn của các carbohydrate.

Bảng 3: Phương trình đường chuẩn và hệ số tương quan của các carbohydrate

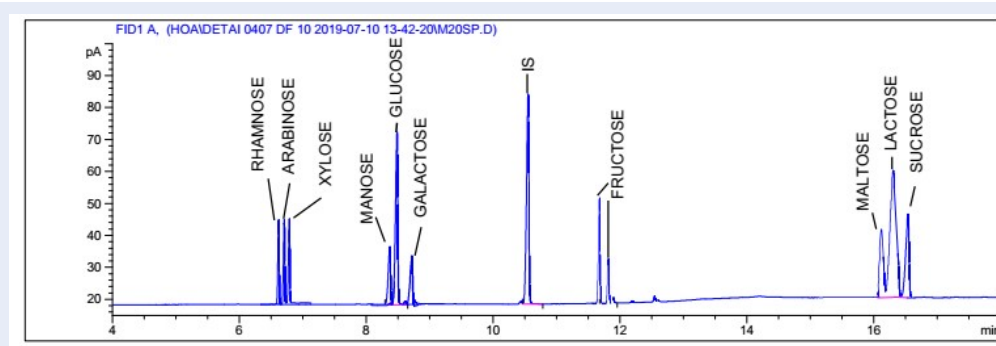
STT	Tên Carbohydrate	Thời gian lưu (phút)	Khoảng tuyến tính (μg/mL)	Phương trình đường chuẩn	R2
01	Arabinose	6,465	80 - 1600	$y=7,88 \cdot 10^{-4}x + 1.36 \cdot 10^{-2}$	0,9984
02	Rhamnose	6,348	80 - 1600	$y=7,46 \cdot 10^{-4}x + 1.04 \cdot 10^{-2}$	0,9992
03	Xylose	6,544	80 - 1500	$y=7,99 \cdot 10^{-4}x + 1.96 \cdot 10^{-2}$	0,9993
04	Mannose	8,355	80 - 1700	$y=8,56 \cdot 10^{-4}x + 2.98 \cdot 10^{-2}$	0,9992
05	Glucose	8,458	100 - 2000	$y=7,79 \cdot 10^{-4}x + 4.40 \cdot 10^{-2}$	0,9980
06	Galactose	8,747	80 - 1600	$y=7,48 \cdot 10^{-4}x + 1.89 \cdot 10^{-2}$	0,9993
07	Fructose	11,728	80 - 1600	$y=5,81 \cdot 10^{-4}x + 5.38 \cdot 10^{-2}$	0,9976
08	Maltose	16,088	150 - 3500	$y=4,63 \cdot 10^{-4}x - 1.48 \cdot 10^{-2}$	0,9974
09	Lactose	16,198	200 - 3500	$y=5,97 \cdot 10^{-4}x + 4.68 \cdot 10^{-2}$	0,9978
10	Sucrose	16,388	200 - 3500	$y=8,79 \cdot 10^{-4}x - 9.37 \cdot 10^{-2}$	0,9990

Bảng 4: Giá trị %RSDs, %HSTH, LODs và LOQs của các carbohydrate

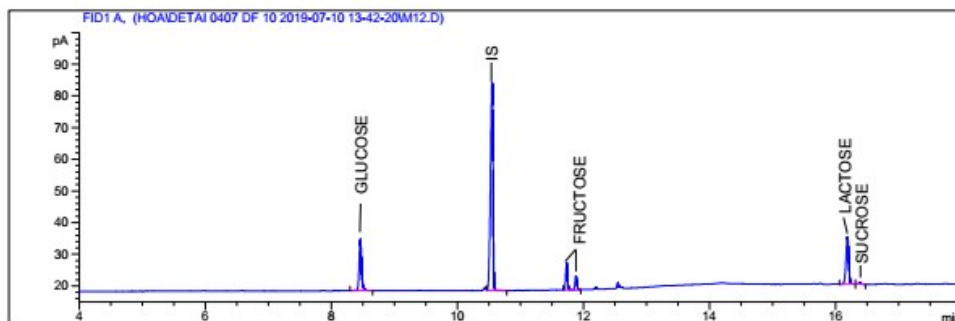
STT	Tên Carbohydrate	Thời gian lưu (phút)	Độ lặp lại (%RSD)	Hiệu suất thu hồi (%)	SD	LOD (mg/g)	LOQ (mg/g)
01	Arabinose	6,465	2,8	99-107	$1,9 \cdot 10^{-3}$	8,0	24
02	Rhamnose	6,348	3,0	106-113	$1,9 \cdot 10^{-3}$	8,3	25
03	Xylose	6,544	1,9	95-99	$1,9 \cdot 10^{-3}$	8,0	24
04	Mannose	8,355	2,8	96-99	$3,4 \cdot 10^{-3}$	13	40
05	Glucose	8,458	3,2	101-104	$1,9 \cdot 10^{-3}$	8,0	24
06	Galactose	8,747	2,5	100-105	$2,5 \cdot 10^{-3}$	11	34
07	Fructose	11,728	5,9	101-110	$8,4 \cdot 10^{-3}$	48	143
08	Maltose	16,088	2,6	100-107	$6,7 \cdot 10^{-3}$	48	143
09	Lactose	16,198	3,8	95-110	$9,0 \cdot 10^{-3}$	50	149
10	Sucrose	16,388	4,4	104-110	$5,6 \cdot 10^{-3}$	21	62

Bảng 5: Kết quả phân tích các carbohydrate trên nền mẫu thực

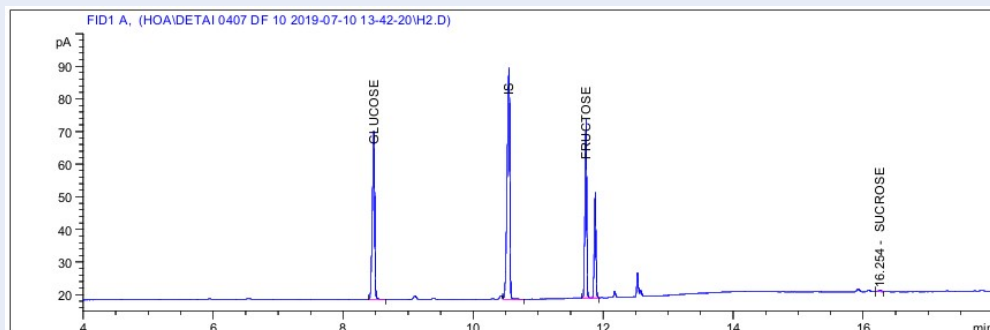
STT	Chỉ tiêu	Nền mẫu		
		Sữa tươi (g/100 mL)	Mật ong (g/100 g)	Polysaccharide (mg/g)
01	Arabinose	ND	ND	41,6 ± 1,6
02	Rhamnose	ND	ND	ND
03	Xylose	ND	ND	417 ± 27
04	Mannose	ND	ND	9973 ± 64
05	Glucose	2,27 ± 0,22	26,60 ± 0,12	1691 ± 72
06	Galactose	ND	ND	28,7 ± 1,3
07	Fructose	ND	52,41 ± 0,23	ND
08	Maltose	ND	ND	ND
09	Lactose	4,13 ± 0,14	ND	ND
10	Sucrose	2,28 ± 0,13	0,586 ± 0,055	ND



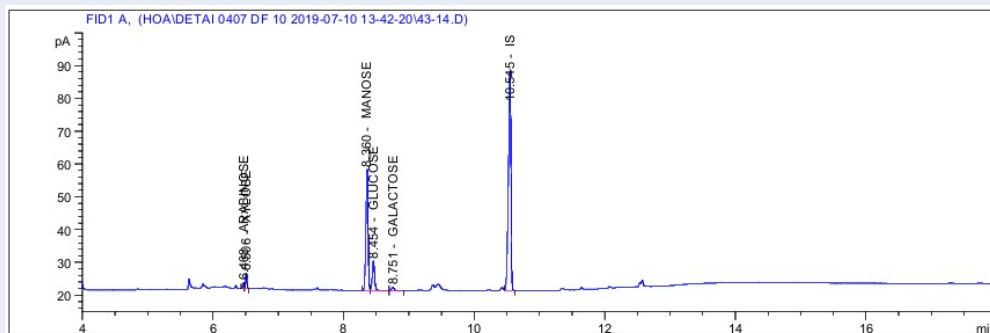
Hình 10: Sắc ký đồ phân tích thành phần carbohydrate trong mẫu sữa tươi thêm chuẩn.



Hình 11: Sắc ký đồ phân tích thành phần carbohydrate trong mẫu sữa tươi.



Hình 12: Sắc ký đồ phân tích thành phần carbohydrate trong mẫu mật ong.



Hình 13: Sắc ký đồ phân tích thành phần carbohydrate trong dịch thủy phân polysaccharide.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Tác giả Nguyễn Khắc Mạnh, Nguyễn Từ Hòa, Huỳnh Lâm Diễm My, Nguyễn Ngọc Khuê phụ trách các thí nghiệm (khảo sát, tối ưu quy trình, phân tích mẫu).

Tác giả Nguyễn Huy Du, Nguyễn Ánh Mai phụ trách tư vấn, định hướng nội dung của đề tài.

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

GC-FID: Gas chromatography – Flame ionization detector

LOD: Limit of detection

LOQ: Limit of quantitation

SD: Standard deviation

RSD: Relative standard deviation

AAA: Anhydride acetic acid

HPLC: High performance liquid chromatography

LC-MS (μ TOF) : Liquid chromatography – mass spectrometry (μ time of flight)

HSTH: Hiệu suất thu hồi

IHC: International honey commission

FAO: Food and agriculture organization

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bemiller JN. Carbohydrate Chemistry for Food Scientists. 2019;p. 323–350. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00017-0>.
2. Nollet LML, Toldra F. Food Analysis by HPLC, USA. 2012;p. 233–249. Available from: <https://doi.org/10.1201/b13024>.
3. Sanz ML, Villamiel M, Inez Castro IM. Inositols and carbohydrates in different fresh fruit juices. Food chemistry. 2004;87:325–328. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.001>.
4. Villamiel M. Quantitative determination of carbohydrates in orange juice by gas chromatography. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A. 1998;206:48–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s002170050212>.
5. Agrirre J. Strategies for carbohydrate model buiding, refinement and validation. Structural biology. 2017;73:171–186. PMID: 28177313. Available from: <https://doi.org/10.1107/S2059798316016910>.
6. Tester RF, Karkalas J. Carbohydrates, classification and properties. Food sciences and nutrition. 2003; Available from: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00166-8>.
7. AOAC Official Method 977.20, Separation of Sugars in Honey. Liquid Chromatographic Method, JAOAC. 2006;60:838.
8. Zhang W, He H, Zhang X. Determination of neutral sugars in soil by capillary gas chromatography after derivatization to aldonitrile acetates. Soil & Biochemistry. 2007; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.003>.
9. Ruiz-Matute AI, Hernandez OH. Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. Journal of Chromatography B. 2011; PMID: 21186143. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.013>.
10. Sơn TC. Thẩm Định Phương Pháp Trong Phân Tích Hóa Học và Vi Sinh Vật. Viện Kiểm Nghiệm An toàn Vệ Sinh Thực Phẩm Quốc gia. 2010;.
11. Milk Testing and Payment Systems, Food and Agriculture Organization of the United Nations.; Available from: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/quality-and-testing/en/>.
12. Official Journal of European Communities. 2002; Available from: www.ihc-platform.net/honeydirective2001.pdf.
13. Cui SW. Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties and Application. CRC press, pages. 2005;p. 108 –162.
14. Cui W, Wood PJ, Blackwell B, Nikiforuk J. Physicochemical properties and structural characterization by 2 dimensional NMR spectroscopy of wheat β -D-glucan - comparison with other cereal β -D-glucans. Carbohydrate Polymers. 2000;41:249–258. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00143-5).
15. Coe EM, Bowen LH, Speer JA, Wang Z, Sayers DE, Bereman RD. The Recharacterization of a polysaccharide iron complex (Niferex). Journal of Inorganic Biochemistry. 1995;58:269–278. Available from: [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(94\)00060-N](https://doi.org/10.1016/0162-0134(94)00060-N).
16. Vetvicka V, Vetvickova J. Addition of Selenium Improves Immunomodulative Effects of Glucan. North American Journal of Medical Sciences. 2016;8:88–92. PMID: 27042606. Available from: <https://doi.org/10.4103/1947-2714.177311>.

Development of an analytical method for determination of carbohydrates in food by gc - fid using chemical derivatization with anhydride acetic acid

Nguyen Khac Manh, Nguyen Tu Hoa, Nguyen Ngoc Khue, Huynh Lam Diem My, Nguyen Huy Du, Nguyen Anh Mai



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

The present research describes a simple and inexpensive derivatization method that uses acetylation to address the challenges associated with the quantification of the ten most common carbohydrates. The derivatization reaction has two periods : (1) The oxime formation of carbohydrates was carried out at 15 minutes, 500 μL of NH_2OH 2.5% and 60 $^\circ\text{C}$ and (2) acetylation of carbohydrates was carried out at 45 minutes, 600 μL of AAA and 80 $^\circ\text{C}$. Most of the carbohydrates generate single peaks via chromatographic separation, except fructose, which generates a double peak. The procedure was successfully applied to analyze carbohydrates in some samples including honey, fresh milk, and polysaccharide hydrolyzate. The method validation results had the linear concentration range of carbohydrates at 50–4000 mg/g, the LODs at 20–50 $\mu\text{g/g}$, the relative standard deviations (% RSDs) of peak area under 5.0 % and the accuracy at 95–115% of recoveries. The method was applied to determine carbohydrate content in raw milk, honey, and hydrolysis polysaccharide extract. The results showed that the honey sample has fructose and glucose content of 65.8% and 33.4%, respectively, while sucrose makes up 0.74% of the total carbohydrate content. The raw milk sample has lactose content of 47.6% of the total carbohydrates. Some rare polysaccharides such as arabinose and xylose were found in the hydrolysis polysaccharide extract from the mushroom sample.

Key words: Carbohydrate, Anhydride acetic acid, GC-FID

University of Science, VNU – HCM, Vietnam

History

- Received: 06-01-2020
- Accepted: 03-03-2020
- Published: 15-6-2020

DOI : 10.32508/stdjns.v4i2.874



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Manh N K, Hoa N T, Khue N N, My H L D, Du N H, Mai N A. **Development of an analytical method for determination of carbohydrates in food by gc - fid using chemical derivatization with anhydride acetic acid.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(2):519-529.