



HỘI KHOA HỌC KỸ THUẬT PHÂN TÍCH HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC VIỆT NAM
VIETNAM ANALYTICAL SCIENCES SOCIETY

ISSN - 0868 - 3224

Tạp chí
PHÂN TÍCH HÓA , LÝ VÀ SINH HỌC
Journal of Analytical Sciences

TẠP CHÍ PHÂN TÍCH HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC

Tạp chí
PHÂN TÍCH
HÓA , LÝ VÀ SINH HỌC
Journal of Analytical Sciences

T - 23

Số 4 (Đặc biệt)

2018

PHÂN TÍCH CHẤT ĐỘC TRONG THỰC PHẨM VÀ MÔI TRƯỜNG

In 500 cuốn, khổ 19 x 27 cm. Giấy phép xuất bản số 445/GP-BTTTT cấp ngày 24/9/2016.
Chỉ số: ISN 0868 - 3224. In xong và nộp lưu chiểu tháng 12 năm 2018

HA NOI

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG REBAUDIOSIDE A TRONG CÂY CỎ NGỌT
(*Stevia rebaudiana*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO
HPLC**

Đến tòa soạn: 20-05-2018

Lê Thế Tâm, Trần Phương Chi, Lê Thị Mỹ Châu
Viện CN Hóa Sinh Môi trường – Trường Đại học Vinh

SUMMARY

**DETERMINATION OF REBAUDIOSIDE A IN STEVIA (STEVIA
REBAUDIANA) LEAVES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY UV DETECTION METHOD**

*Stevioside and Rebaudioside A are two major sweeteners of the diterpene glycosides compounds derived from Stevia (*Stevia rebaudiana*) grasses. In this study, the levels of Rebaudioside A in flowers, leaves, branches of fresh Stevia grasses and dried Stevia grasses were determined by high liquid performance chromatography. The chromatographic separation was realized using a ZOBAX Carbohydrate (4,6 x150mm; 5µm) column, mobile phase consisting of acetonitrile:water with UV detection at 205nm. The method is reproducible and accurate, with respect to demonstrating a relative standard deviation 0,098%. The method is then applied for the determination of Rebaudioside A in food in Viet Nam. The amounts of Rebaudioside A are calculated by using the standard addition method.*

Keywords: *Rebaudioside A, Stevioside, Stevia rebaudiana, high-performance liquid chromatography HPLC, food.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, trên thị trường có rất nhiều sản phẩm hóa học tạo vị ngọt cao, ít sinh năng lượng có thể dùng để thay thế đường (aspartame, saccharin, sodium cyclamate, acesulfame potassium...). Các chất hóa học này xuất hiện nhiều trong các loại

thức ăn và đồ uống hằng ngày. Mặc dù chúng rẻ và tiện dụng nhưng người tiêu dùng e ngại chúng sẽ ảnh hưởng về lâu dài đến sức khỏe. Trước các nguy hại có thể mang lại từ các chất hóa học, tâm lý chung của người tiêu dùng là muốn tìm lại các sản phẩm thực phẩm từ thiên

nhiên. Trong nhóm các chất tạo vị ngọt từ thiên nhiên thì đường có trong cây cỏ ngọt ngày càng được nhiều người chú ý đến.

Cây cỏ ngọt *Stevia rebaudiana* có nguồn gốc từ Nam Mỹ, là một loại cây bụi lâu năm thuộc họ Cúc Asteraceae. Thành phần chất ngọt trong lá cỏ ngọt *S. rebaudiana* là các loại đường Steviol Glycoside (STG), như Stevioside và Rebaudioside A (RebA), mỗi loại chiếm từ 3 - 10% khối lượng lá khô, tiếp theo là Rebaudioside C ~ 1,1% và Dulcoside A ~ 0,5% và Steviolbioside ~ 0,1%... (Abou-Arab et al., 2010; Abelyan et al., 2010; Gardana et al., 2006 và Jaitak et al., 2009). Đây là các loại đường có vị ngọt gấp hơn 300 lần đường mía (saccharose), đặc biệt là không tạo năng lượng và rất ổn định ở nhiệt độ cao 198°C. Các chế phẩm Stevioside và Rebaudioside A từ lá cỏ ngọt đã được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới giới như là các loại đường chức năng, tác nhân tạo ngọt, các chất điều vị có năng lượng thấp. Ngoài ra, Stevioside và RebA còn có nhiều tác dụng lâm sàng, như khả năng kích thích tiết insulin của tuyến tụy trong điều trị các bệnh nhân tiểu đường và rối loạn các chuyển hóa cacbonhydrat khác (Chatsudthipong et al., 2009 và Munish et al., 2012).

Do đó việc xác định hàm lượng hai hợp chất này trong cỏ ngọt là rất quan trọng vì nó cho biết hiệu suất thu hồi chất tạo ngọt trong cỏ ngọt và nó có ý nghĩa to lớn với ngành công nghiệp thực phẩm và y học. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân tích **“Định lượng Rebaudioside A trong cây cỏ ngọt và một số sản phẩm từ cây cỏ ngọt bằng**

phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)”.

2. THỰC NGHIỆM

2.1 Hóa chất và thiết bị

- Chất chuẩn Rebaudioside A (Sigma), Acetonitrile nguyên chất
- Cột sắc ký: Cột ZOBAX Carbohydrate (4,6 x150mm; 5 μ m), cân phân tích độ chính xác 0,0001g; máy siêu âm hoặc máy lắc; máy nghiền mẫu thực phẩm; máy cắt quay chân không; các dụng cụ thủy tinh cần thiết; màng lọc dung môi 0,45 μ m.

2.2 Phương pháp lấy mẫu

Mẫu cây cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana*) được lấy tại vườn ươm thuộc công ty cỏ phần Stevia Á Châu. Mẫu tươi sau khi lấy về được rửa sạch, để nơi thoáng mát hoặc sấy khô ở 40°C. Tại phòng thí nghiệm, mẫu được tiến hành xử lý sơ bộ bằng máy nghiền mẫu sau đó được xử lý tiếp bằng phương pháp chiết chọn lọc với dung môi thích hợp để thu được chất phân tích.

2.3. Kỹ thuật thực nghiệm.

2.3.1. Điều kiện sắc ký

Sau khi tiến hành khảo sát các yếu tố thực nghiệm chúng tôi đã xây dựng được điều kiện phân tích HPLC như sau: - Cột sắc ký: cột ZOBAX Carbohydrate (150 x4,6mm; 5 μ m); Nhiệt độ lò cột: 30°C; Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút; Pha động: ACN: H₂O = 80: 20; Bước sóng: 205 nm; Thể tích tiêm mẫu: 10 μ l

2.3.2 Xác định khoảng tuyến tính và đường chuẩn của Rebaudioside A

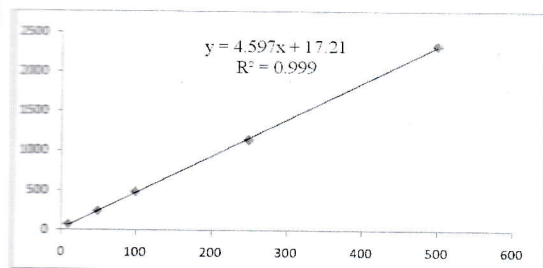
Đầy chuẩn Rebaudioside A được khảo sát có nồng độ như sau: 0ppm, 50ppm, 100ppm, 250ppm, 500ppm.. Tiến hành chạy trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) từ kết quả thu được chúng tôi đã

xây dựng phương trình hồi quy của đường chuẩn Rebaudioside A theo diện tích peak có dạng như sau:

$$y = 4,597x + 17,21 \quad R^2 = 0,999$$

Bảng 1. Diện tích peak của Rebaudioside A tương ứng với từng nồng độ chuẩn

Nồng độ chuẩn (µg/ml)	Diện tích peak	A	B	R ²
0	0	17,21	4,597	0,999
50	241.7095			
100	487.1663			
250	1142.4941			
500	2326.5668			



Hình 1. Đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích peak và nồng độ chuẩn Rebaudioside A

Bảng 2. Kết quả phân tích hàm lượng Rebaudioside A trong các mẫu cỏ ngọt tươi và khô

Mẫu	Các mẫu	C ₀ (µg/ml)	Khối lượng mẫu (g)	Diện tích pic	C (mg/g)
1	Cỏ ngọt tươi	337.7196	0.5002	1569.7071	6.7544
2	Cỏ tươi thêm chuẩn	474.8860	0.5000	2200.2608	9.4977
3	Hoa cỏ ngọt tươi	98.5867	0.5001	470.4135	1.9717
4	Lá cỏ ngọt tươi	244.6946	0.5002	1142.0710	14.6817
5	Cành cỏ ngọt tươi	32.0282	0.5003	116.4436	0.6406
6	Cỏ ngọt khô	231.2484	0.5001	1080.2591	13.8749

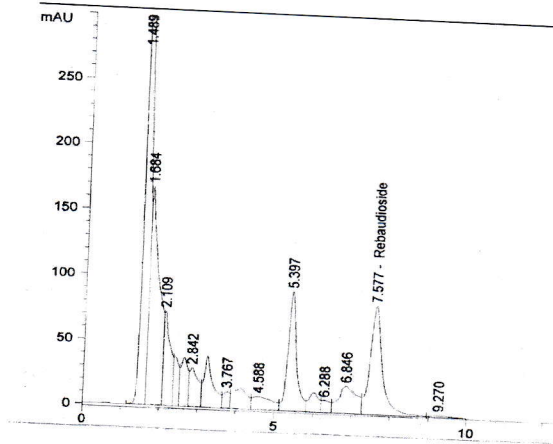
2.3.3 Chuẩn bị mẫu

Các mẫu cỏ ngọt khô, hoa, lá, cành cỏ ngọt tươi được cắt nhỏ sau đó được nghiền mịn, đồng nhất bằng máy nghiền mẫu. Cân chính xác 0,5g các mẫu bằng cân phân tích, sau đó cho vào ống ly tâm dung tích 50ml, thêm 10 ml dung dịch pha động (ACN: H₂O = 80: 20). Sau đó đồng nhất mẫu trong 60 phút bằng máy siêu âm và ly tâm trong vòng 15 phút ở tốc độ 3000 vòng/phút, lọc lấy dịch trong cho vào ống ly tâm. Cho thêm 5 ml ACN: H₂O = 80: 20 vào phần cặn trong ống ly tâm rồi đánh siêu âm 15 phút. Sau đó, ly tâm trong 5 phút với tốc độ 3000 vòng/phút, lọc lấy dịch trong cho vào ống trên. Lọc dung dịch qua màng lọc 0,45µm và thu dịch lọc vào lọ vial.

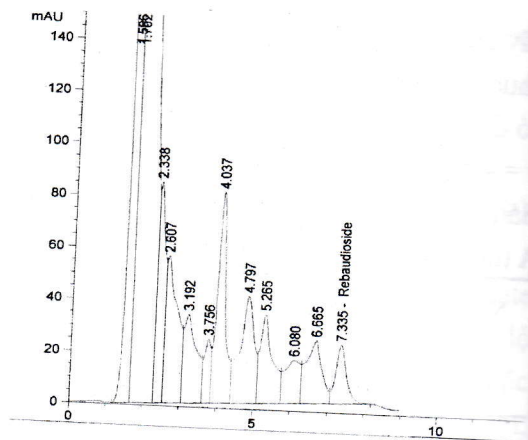
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định hàm lượng Rebaudioside A trong các mẫu cỏ ngọt

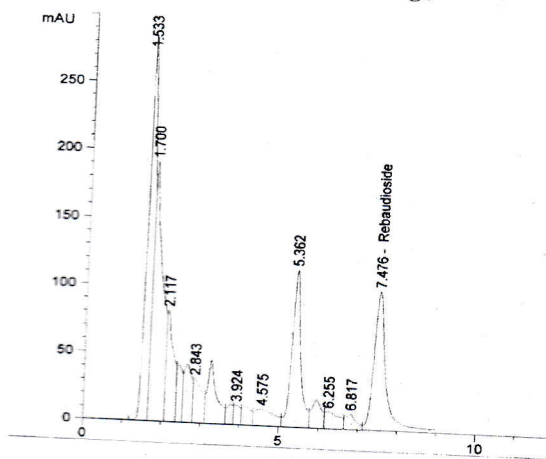
Để biết sự phân bố hàm lượng Rebaudioside A trong cây cỏ ngọt, chúng tôi tiến hành phân tích các mẫu hoa, lá, cành cỏ ngọt tươi, cỏ ngọt khô, 2 mẫu cỏ ngọt tươi trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả thu được thể hiện ở bảng 2 và các hình 2 đến hình 8.



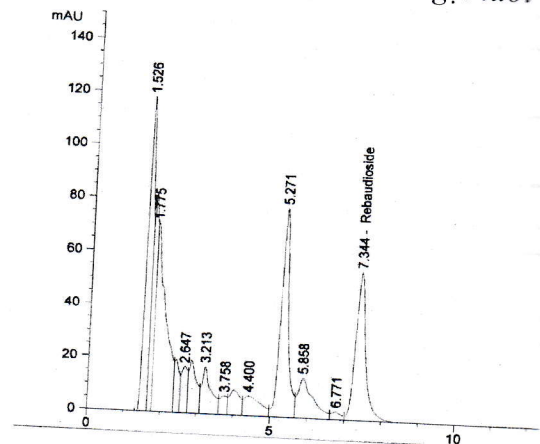
Hình 2: Sắc đồ mẫu củ ngọt tươi



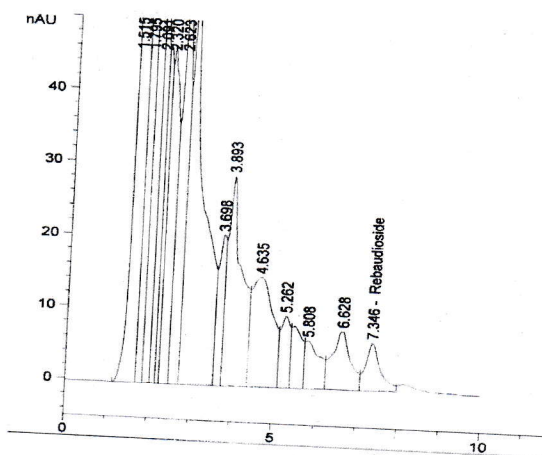
Hình 5: Sắc đồ mẫu hoa củ ngọt tươi



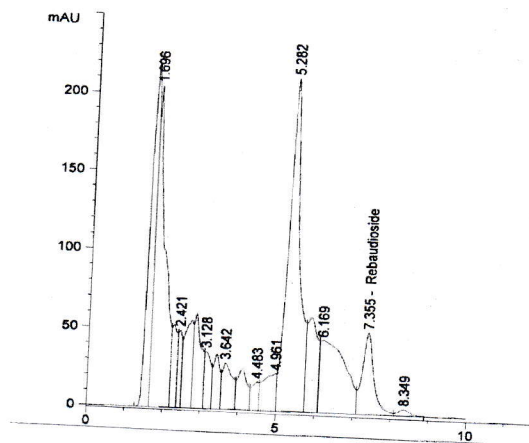
Hình 3: Sắc đồ mẫu củ ngọt tươi thêm chuẩn



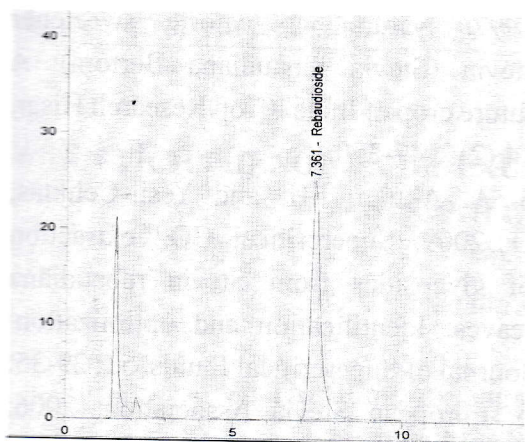
Hình 6: Sắc đồ mẫu lá củ ngọt tươi



Hình 4: Sắc đồ mẫu cành củ ngọt tươi



Hình 7: Sắc đồ mẫu củ ngọt khô



Hình 8: Sắc đồ chuẩn rebaudioside A nồng độ 100 µg/ml

3.2. Đánh giá phương pháp định lượng

3.2.1. Đánh giá hiệu suất thu hồi của phương pháp

Độ thu hồi của phương pháp cũng được xác định bằng cách tiến hành phân tích 3 lần lặp lại đối với mẫu đã được tiến hành tách chiết theo quy trình xử lý và phân tích mẫu với nồng độ thêm chuẩn là 100 µg/ml. Kết quả thu được ghi ở bảng 3:

Bảng 3. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi của phương pháp

Mẫu	Lần	Khối lượng (g)	Diện tích peak	C _{mẫu} (µg/kg)	C _{spike} (ppm)	H%
1	1	0,5002	1569,7071	6,7544	0	
2	1	0,5001	2191,0688	9,4577	10	96,17
	2	0,5000	2209,4539	9,5377	10	97,02
	3	0,5001	2200,2600	9,4977	10	96,38

Qua kết quả phân tích cho thấy, hiệu suất thu hồi cao, tỷ lệ % tìm lại chất phân tích $Htb (\%) = 96,52\%$ đáp ứng yêu cầu phân tích.

3.2.2. Đánh giá độ lặp của phương pháp

Theo lý thuyết thống kê, các đại lượng đặc trưng cho độ lặp lại là độ lệch chuẩn SD và hệ số biến thiên CV% (RSD).

Thực hiện phân tích 1g mẫu, lặp lại 3 lần trong cùng một điều kiện. Kết quả phân tích 3 lần lặp lại và độ lặp lại của phương pháp được ghi ở bảng 4:

Bảng 4: Kết quả xác định độ lặp của phương pháp

STT	Khối lượng (g)	Diện tích peak	Hàm lượng rebaudioside A (µg/ml)
1	0,5001	1568,8267	337,5281
2	0,5002	1568,8267	337,5281
3	0,5000	1571,4680	338,1027

Độ lệch chuẩn: $s = 0,332$. Độ lệch chuẩn tương đối: $RSD (\%) = 0,098$. Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp cao, đáp ứng yêu cầu định lượng.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp định

lượng Rebaudioside A bằng phương pháp HPLC.

Đã tiến hành đánh giá phương pháp định lượng và cho thấy phương pháp thỏa mãn tính thích hợp của hệ thống sắc ký, tính chính xác, tính tuyến tính, tính đúng và

tính đặc hiệu.

Đã xác định hàm lượng Rebaudioside A trong một số bộ phận của cây cỏ ngọt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Luận (1999). Cơ sở lý thuyết phân tích sắc ký lỏng hiệu suất cao. Đại học quốc gia Hà Nội.
2. Mai Tất Tố, Vũ Thị Trâm, Đào Thị Vui, Lê Phan Tuấn (2007). Dược lý học, tập 2. Trường Đại học Dược Hà Nội.
3. Cacciola, F., Delmonte, P., Jaworska, K., Dugo, P., Mondello, L. and Rader, J. I. 2010. Employing ultra high pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts. *Journal of Chromatography A*.
4. Chalapathi, M.V. and S. Thimmegowda, 1997. Natural non-calorie sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A future crop of India. *Crop Research Hisar*, 14 (2): 347-350.
5. A. Akgun, I.H. and Yesil-Celiktas, O. 2009. Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. *Journal of Supercritical Fluids*. 51: 29-35.
6. European Stevia Association. 2006. Steviol glycosides as food additive. Document 3, 2007.
7. Geuns, J.M.C. 2003. Molecules of interest stevioside. *Journal of Phytochemistry*. 64:913.
8. Joint Expert Committee on Food Additive. 1956. Steviol glycosides, Chemical and Technical Assessment. Document 3, 2007.

MỤC LỤC

Trang

CONTENTS

1. Xác định hàm lượng Glyphosate bằng phương pháp GC-MS/MS. Ứng dụng đánh giá tồn dư Glyphosate trong môi trường và thực phẩm 2
Development of immunochromatographic test strip for rapid detection of shiga toxin type 2 in food
Lê Thanh Tâm, Phú Minh Tấn, Hồ Hoàng Khánh, Lý Tuấn Kiệt, Chu Vân Hải, Thái Văn Nam
2. Chế tạo que thử phát hiện nhanh độc tố shiga 2 trong thực phẩm bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch 9
Development of immunochromatographic test strip for rapid detection of shiga toxin type 2 in food
Tô Lan Anh, Trần Thị Thanh Quỳnh, Nguyễn Khánh Hoàng Việt, Tô Văn Thiệp, Nguyễn Văn Hoàng, Nguyễn Ngọc Tùng, Lê Quang Hòa
3. Xác định hàm lượng sắt và kẽm trong thực phẩm chức năng dạng viên nén bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (F-Aas) 20
Vũ Hồng Sơn, Nguyễn Thị Hồng, Nguyễn Thị Thảo, Trần Quang Thủy
4. Nghiên cứu bảo quản nghèo oxi đối với ngô hạt trong vi môi trường kín khí sử dụng chất khử oxi focoar 27
Studying poor oxygen preservation for corn in air tight micro – environments using the focoar deoxidizer
Lê Quốc Khánh, Nguyễn Văn Dương, Nguyễn Thị Hảo, Nguyễn Thị Thơ, Tạ Đức Thắng, Đỗ Trà Hương, Lê Xuân Quế
5. Xác định thành phần và hàm lượng của lipit trong một số loài nấm linh chi và vân chi bằng phương pháp sắc ký khí và sắc ký khí - khối phổ 34
Lê Thị Mỹ Châu, Lê Thế Tâm, Nguyễn Thị Bích Ngọc
6. Xây dựng các bước nghiên cứu cơ bản trong phân tích thuốc kích thích tăng trưởng trans-zeatin sử dụng thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ 41
Research the basic steps in application of high performance liquid chromatography – mass spectrometry for determining trans-zeatin
Lê Văn Nhân, Nguyễn Quang Trung, Nguyễn Ngọc Tùng, Vũ Đức Nam, Lê Trường Giang, Đinh Ngọc Huy

7. Nghiên cứu định lượng rebaudioside A trong cây cỏ ngọt (stevia rebaudiana) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC 50
 Determination of rebaudioside a in stevia (stevia rebaudiana) leaves by high-performance liquid chromatography uv detection method
Lê Thế Tâm, Trần Phương Chi, Lê Thị Mỹ Châu
8. Phân tích phenol và dẫn xuất clophenol trong mẫu hải sản: so sánh GC-MS và GC-ECD 56
Vũ Thị Hồng Ân, Nguyễn Lan Anh, Chu Thị Huệ, Nguyễn Mạnh Hà, Chu Đình Bình
9. Nghiên cứu phát triển và ứng dụng cảm biến sinh học điện hóa trên cơ sở vật liệu tổ hợp ba chiều graphene/CNTs nhằm phát hiện hàm lượng cholesterol 65
Phan Nguyễn Đức Dược, Trần Văn Hậu, Nguyễn Hải Bình, Cao Thị Thanh, Lê Đình Quang, Bùi Thị Phương Thảo, Nguyễn Việt Tuyên, Nguyễn Tuấn Dung, Nguyễn Văn Chúc
10. Khảo sát và tối ưu hóa điều kiện trích ly polyphenol trong lá chè già (camellia sinensis l.) 73
 Optimization of polyphenol extraction from aged tea leaves (camellia sinensis l.)
Trần Phương Chi, Lê Thế Tâm, Lê Thị Mỹ*
11. Định lượng các dạng arsen trong mẫu nước mắm bằng phương pháp HPLC ghép nối khối phổ plasma cao tần cảm ứng (ICP-MS) 80
 Determination of arsenic speciation in fish sauce by HPLC coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry
Nguyễn Mạnh Hà, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Dung, Chu Thị Huệ, Tạ Thị Thảo, Nguyễn Thị Hồng Yến, Từ Bình Minh, Đỗ Hồng Quân, Chu Đình Bình
12. Xác định hàm lượng vitamin C (acid L-ascorbic) trong một số loại quả bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) 87
Lê Thị Mỹ Châu, Nguyễn Thị Bích Ngọc
13. Phát hiện malachite green ở nồng độ thấp bằng hệ các hạt nanô vàng thông qua kỹ thuật tán xạ Raman tăng cường bề mặt 93
Cao Tuấn Anh, Đào Trần Cao, Kiều Ngọc Minh, Lê Văn Vũ, Hoàng Thị Thu Hải, Lương Trúc Quỳnh Ngân
14. Nghiên cứu chế tạo hệ gel nano curcumin bổ sung đường cỏ ngọt Stevia và dầu gấc, ứng dụng làm thực phẩm chức năng 101
Lê Thế Tâm, Nguyễn Hoa Du
15. Nghiên cứu ảnh hưởng của kích thước hạt vàng nano đến khả năng phát hiện độc tố SEA của staphylococcus aureus bằng phương pháp sắc ký miễn dịch 110
 Study on the effect of gold nano particle size to SEA detection ability of staphylococcus aureus by lateral flow immunoassay

- Trần Thị Thanh Quỳnh, Tô Lan Anh, Tô Văn Thiệp, Nguyễn Văn Hoàng,
Nguyễn Ngọc Tùng, Nguyễn Khánh Hoàng Việt*
16. Định lượng acepromazine và atropine trong thịt lợn bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ UPLC-MS/MS 122
*Hoàng Ngọc Vinh, Nguyễn Thành Duy, Lý Tuấn Kiệt,
Nguyễn Quốc Hùng, Chu Vân Hải.*
17. Xây dựng quy trình phân tích định lượng piceatannol trong hương phụ bằng HPLC 128
Method of quantification of piceatannol in rhizoma cyperi by HPLC
*Nguyễn Tiến Đạt, Nguyễn Thị Luyến, Nguyễn Hải Đăng,
Nguyễn Thu Minh, Nguyễn Minh Châu*
18. Đánh giá hiệu quả phương pháp ủ kỵ khí bằng bình nến cải tiến để định lượng clostridium perfringens trong thực phẩm 133
Evaluate the effectiveness of modified candle jar to quantify of clostridium perfringens in food
Trần Quang Cảnh, Đặng Thị Thùy Dương
19. Kiểm tra chất lượng sinh khối vi khuẩn lam arthrospira (spirulina) platensis nuôi trồng trên quy mô công nghiệp tại công ty cổ phần khoa học xanh Hidumi Pharma, Nghệ An 142
Quality control of cyanobacteria arthrospira (spirulina) platensis biomass cultivated on the industrial scale at green science joint stock company of Hidumi Pharma, Nghe An
Lê Thị Thom, Đặng Diễm Hồng
20. Điều chế oligo-alginat bằng phương pháp hóa học và ứng dụng làm chất kích thích nảy mầm hạt lúa 154
Preparation of oligo-alginate by chemical methods and its application as a germinating stimulator for rice seeds
*Lê Thị Nhung, Phạm Trung Sơn, Nguyễn Hoàng,
Trương Anh Khoa, Nguyễn Thu Hiền, Trần Kim Oanh*
21. Xác định một số kim loại trong thực phẩm chức năng bằng phương pháp quang phổ nguồn plasma cảm ứng cao tần ghép nối khối phổ (ICP-MS) 160
Determination of some metals in functional foods utilizing inductively coupled plasma tandem mass spectrometry (ICP-MS) method
Phạm Thị Trà, Nguyễn Quang Trung, Nguyễn Ngọc Tùng,
Nguyễn Tiến Đạt, Đậu Anh Đức*
22. Sự lưu giữ và di chuyển của một số kim loại nặng trong bùn nạo vét đô thị 169
Lê Thị Hải Lê, Trần Hồng Côn, Lê Thu Thủy, Cù Thị Thúy Hà
23. Xác định cloramphenicol trong môi trường nước bằng kỹ thuật polyme in phân tử trên điện cực graphen/poly(1,8diaminonaphthalen) 177
Determination of chloramphenicol in aqueous solution using molecularly