



## Tổng quan các phương pháp định lượng đường khử

Hoàng Thị Oanh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công nghệ Đông Á

\*Email: [oanhht@eaut.edu.vn](mailto:oanhht@eaut.edu.vn)

### Tóm tắt

Đường khử có mặt tự nhiên trong nhiều loại rau quả hoặc sản phẩm của quá trình thủy phân các disaccharide, oligosaccharide và polysaccharide. Đường khử đóng vai trò quan trọng trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp thực phẩm, y học, công nghệ sinh học. Nhờ tính chất khử mà các phương pháp định lượng được dựa trên sử dụng tác nhân oxi hóa. Do đó, cần phải tìm ra các phương pháp chính xác và đáng tin cậy để đo lượng đường khử trong mẫu. Mục đích của bài tổng quan này là thảo luận về các phương pháp khác nhau được sử dụng để xác định hàm lượng đường khử. Các phương pháp khác nhau được sử dụng để xác định đường khử bao gồm: chuẩn độ, quang phổ UV, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), phương pháp enzyme và phương pháp điện hóa (voltammetry).

**Từ khóa:** Đường khử, nguyên tắc, phương pháp định lượng.

### Abstract

Reducing sugars are naturally present in various fruits, vegetables and hydrolysis products of disaccharides, oligosaccharides or polysaccharides. They play a crucial role in the food industry, medicine, and biotechnology. The principle of quantification methods is based on the use of oxidizing agents due to their reducing properties. Therefore, there is a need to find an accurate and reliable method for measuring the amount of reducing sugar in a sample. The purpose of this review is to discuss the different methods used for the determination of reducing sugar content. Various techniques employed for reducing sugar analysis include titration, UV spectroscopy, high-performance liquid chromatography (HPLC), enzymatic methods, and voltammetry methods.

**Keywords:** determination methods, reducing sugar (RDS), principle.

### 1. Mở đầu

Carbohydrate (còn được gọi là saccharide) - gồm các nguyên tử C, H và O, là một nhóm chất dinh dưỡng đa lượng thiết yếu được tổng hợp bởi thực vật và có thể được sử dụng làm nguồn năng lượng chính trong dinh dưỡng của con người. Saccharide được phân loại thành monosaccharide (glucose, fructose và galactose), disaccharide (sucrose, lactose và maltose), oligosaccharide (maltodextrin, cyclodextrin, v.v.), và polysaccharide (tinh bột, glycogen và cellulose). Các monosaccharide dạng tự do (đường đơn) và disaccharide có thể được phân loại dựa trên phản ứng hóa học gồm đường khử và đường không khử.

Sự khác biệt chính giữa đường khử và đường không khử là đường khử có nhóm hemiacetal tự do và có thể bị oxy hóa bởi các chất oxy hóa yếu. Một số đường khử thường



gặp bao gồm glucose, fructose và galactose thuộc nhóm monosaccharide, cũng như lactose và maltose thuộc nhóm disaccharide. Đường khử có khả năng tham gia vào các phản ứng oxy hóa khử và cung cấp electron cho các phân tử khác. Các loại đường này đóng vai trò quan trọng trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp thực phẩm, xét nghiệm và phân tích sinh hóa hoặc đánh giá chất lượng dinh dưỡng trong chiết xuất thảo dược.

Trong ngành công nghiệp thực phẩm và đồ uống, phản ứng Maillard tạo ra hương vị và mùi thơm cho các thực phẩm như bánh mì, ngũ cốc, thịt, cà phê qua quá trình đun nấu. Đây là phản ứng hóa nâu không có sự tham gia của enzyme và đóng vai trò quan trọng về các đặc tính mùi vị, kết cấu cũng như giá trị cảm quan của sản phẩm thực phẩm [1]. Phản ứng đặc biệt xảy ra nhiều giai đoạn với sự tham gia chính của axit amin và đường khử ở nhiệt độ cao. Trong đó đường khử đã được đánh giá tác động lên cấu trúc và hương vị sản phẩm phản ứng Maillard của dịch thủy phân bột hạt *Lycium barbarum* (LSH) [2]. Trong ngành sản xuất rượu vang, xác định tổng lượng đường khử là thông số quan trọng để theo dõi quá trình lên men rượu. Glucose và fructose đóng vai trò chính quyết định hiệu suất lên men và lượng đường dư sau quá trình lên men, ảnh hưởng đến sự cân bằng vị và hàm lượng axit, các chất hòa tan khác của rượu vang sản phẩm [3]. Giai đoạn chín của trái cây cũng có thể được đánh giá thông qua việc xác định tổng hàm lượng đường khử [4], [5]. Tuy nhiên, sự hiện diện của đường khử cũng có thể gây ra các vấn đề như sự biến đổi màu sắc hoặc giảm chất lượng dinh dưỡng trong quá trình bảo quản thực phẩm. Do đó, việc kiểm soát và tối ưu hóa vai trò của đường khử là yếu tố quan trọng trong công nghệ thực phẩm.

Đường khử không chỉ quan trọng đối với thực phẩm mà còn là thành phần có mặt trong các mẫu sinh học như máu, huyết thanh, huyết tương và mô. Glucose là nhiên liệu carbohydrate quan trọng nhất trong cơ thể. Ở trạng thái no, phần lớn glucose lưu thông đến từ chế độ ăn; ở trạng thái nhịn ăn, quá trình tái tạo glucose và phân giải glycogen duy trì nồng độ glucose. Thông thường, nồng độ glucose trong máu được duy trì ở mức tương đối ổn định từ 80 đến 120 mg/dl. Tính chất khử mạnh của glucose giúp việc đo lường tương đối dễ dàng và ước tính lâm sàng về glucose lưu thông là một trong những xét nghiệm sớm nhất mà bác sĩ lâm sàng có thể thực hiện. Để chẩn đoán bệnh tiểu đường, glucose được xét nghiệm trong mẫu nước tiểu cùng với mẫu máu. [6], [7].

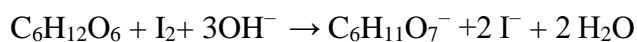
Xác định tổng lượng đường khử là một bước quan trọng trong công nghệ sinh học do đây là sản phẩm cuối cùng của nhiều tương tác sinh học và enzyme. Quá trình thủy phân polysaccharide từ thân ngô, hạt mít bằng enzyme đã được nghiên cứu để sản xuất đường khử làm nguyên liệu cho quá trình sản xuất xăng sinh học. [8]

Việc phát triển các phương pháp phân tích nhanh, đơn giản và chi phí thấp để xác định hàm lượng đường khử là một lĩnh vực đang được quan tâm ngày càng nhiều, do ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm cần đưa ra các quyết định nhanh chóng. Nhiều phương pháp phân tích sử dụng để xác định hàm lượng đường khử như chuẩn độ, sắc ký, điện hóa, enzyme và kỹ thuật phân tích được cải tiến để phù hợp với yêu cầu của mẫu phân tích.

## 2. Các phương pháp xác định hàm lượng đường khử

### ❖ Phương pháp chuẩn độ iod

Trong dung dịch kiềm, đường khử aldose bị oxy hóa bởi iod thành axit cacboxylic. Vì phản ứng không đủ nhanh để thực hiện chuẩn độ trực tiếp, dung dịch đường được trộn với một lượng dư iod và kiềm. Sau một thời gian, dung dịch được axit hóa và xác định lượng iod dư bằng chuẩn độ bằng dung dịch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .



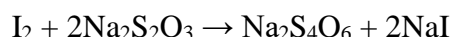
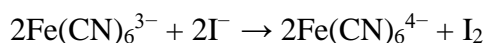
Phương pháp này ban đầu được mô tả bởi Romijn và phản ứng phải được thực hiện trong môi trường kiềm yếu. Sau đó Bougault đã phát triển một phương pháp tốt hơn trong thực tế. Nghiên cứu sử dụng hỗn hợp  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  và  $\text{NaHCO}_3$  làm bazơ. Sự oxy hóa aldose diễn ra hoàn toàn trong 1 giờ với sự có mặt của đệm và trong 30 phút với soda. Auerbach và Bodländer đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ion  $\text{H}^+$  một cách hệ thống hơn. Kết quả tốt nhất đạt được với tỷ lệ mol bằng nhau của  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  và  $\text{NaHCO}_3$ . Lindersdrem-Lang và Holter đã kết luận rằng đệm cacbonat có tính bazơ cao hơn là tốt hơn. Phương pháp của Willstätter và Schudel đã sử dụng  $\text{NaOH}$  làm bazơ. Dung dịch đường được trộn với khoảng gấp đôi lượng cần thiết của 0,1 N iod; từng giọt  $\text{NaOH}$  0,1 N được thêm vào với lượng gấp 1,5 lần lượng lý thuyết; sau 12-15 phút, dung dịch được axit hóa và lượng iốt dư được chuẩn độ. Goebel đã chứng minh rằng phương pháp này chỉ cho kết quả tốt nếu bazơ được thêm vào rất chậm do sự hình thành iodat. Myrbäck và Örténblad mô tả lại phương pháp này bằng việc thêm từng giọt 1,5 lần lượng lý thuyết của  $\text{NaOH}$  0,1 N trong thời gian không ít hơn 4 phút. Ảnh hưởng của pH, thời gian phản ứng, hàm lượng đường đến sự oxy hóa đường khử của các phương pháp trên đã được nghiên cứu lại bởi Blom and Rosted. Kết quả chứng minh tốc độ phản ứng tăng khi pH tăng và dung dịch đệm cần đảm bảo pH không bé hơn 10. Thời gian phản ứng không có sự khác biệt rõ rệt giữa tốc độ oxy hóa của monosaccharide và disaccharide nhưng quá trình oxy hóa phải được coi hoàn thành trong 30 phút. Theo Bougault do phản ứng oxy hóa đường khử luôn kèm với một phản ứng phụ, bao gồm quá trình oxy hóa chậm các nhóm alcohol mặc dù không đáng kể. Tỷ lệ iodine/đường không có ảnh hưởng đáng



kể đến quá trình oxy hóa glucose, maltose và maltodextrin. Tuy nhiên, nó có ý nghĩa quyết định đối với quá trình oxy hóa dextrin dư và amylopectin [9], [10]. Đối với phương pháp sử dụng tác nhân oxy hóa là iod phù hợp cho nhiều loại mẫu phân tích đảm bảo độ chính xác cao mà không cần sử dụng thiết bị phức tạp nhờ iod phản ứng chọn lọc với nhóm aldose trong môi trường kiềm. Tuy nhiên phương pháp không xác định được hàm lượng từng loại đường khử riêng rẽ mà chỉ xác định được tổng đường khử. Ngoài ra, quá trình chuẩn độ cần ước lượng sử dụng iod dư và chuẩn độ lượng dư iod bằng thiosulfat. Do đó nồng độ thuốc thử  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  cần được chuẩn hóa cũng như thời điểm thêm chỉ thị hồ tinh bột vào cuối quá trình chuẩn độ để đảm bảo độ chính xác của phép đo. Phương pháp có thể phát hiện đường khử hàm lượng 5mg, phụ thuộc vào nồng độ thuốc thử, pH, nhiệt độ cũng như độ nhạy của chỉ thị hồ tinh bột.

#### ❖ Phương pháp sử dụng tác nhân oxy hóa ferricyanide

Theo Hagedorn và Jensen (1923) dung dịch đường được đun nóng với một lượng dư dung dịch kali ferricyanide ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) môi trường kiềm yếu. Trong quá trình này, đường khử  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  thành  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Để hoàn thành quá trình phản ứng  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  được kết tủa bởi  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) và  $\text{K}^+$  dưới dạng kết tủa  $\text{K}_2\text{Zn}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ . Lượng ferricyanide dư sau phản ứng được xác định bằng cách chuẩn độ với thiosulfat, theo các phản ứng:



Vì phản ứng giữa đường và ferricyanide không diễn ra theo tỷ lệ mol chính xác, lượng đường khử được xác định thông qua các bảng được thiết lập thực nghiệm hoặc tính toán bằng các hệ số thực nghiệm. Phương pháp Hagedorn và Jensen được sử dụng rộng rãi trong phân tích hóa học để xác định lượng đường khử trong các mẫu sinh học hoặc thực phẩm [11], [12], [13]. Phương pháp sau đó đã được mở rộng cho các loại đường khác bởi Hanes (1929), Hulme và Narain (1931). Việc ferricyanide chỉ có màu nhạt do đó không phù hợp cho phương pháp chuẩn độ trực tiếp. Tuy nhiên, Hawkins và Van Slyke (1929) đã giới thiệu một phương pháp quy định thời gian để ước lượng glucose trong máu và nước tiểu, dựa trên thời gian cần thiết để làm mất màu của ferricyanide kiềm khi đun nóng mẫu bằng cách thủy.

S. Cole (1933) nhận thấy rằng việc thêm xanh methylen vào dung dịch ferricyanide kiềm cho phép ước lượng các đường khử bằng cách chuẩn độ trực tiếp một cách nhanh chóng và chính xác. Chất chỉ thị này không bị khử cho đến khi toàn bộ ferricyanide đã bị khử và điểm cuối chuẩn độ được xác định bằng sự thay đổi từ dung dịch màu xanh hoặc tím sang



không màu. Phương trình tính toán hàm lượng glucose, maltose, lactose được đưa ra tương ứng với các hệ số được xác định bằng đường tinh khiết [14].

E. Friedemann (1962) cũng đề xuất quy trình áp dụng cho lượng glucose từ 0,3 –13 mg dựa trên quá trình oxy hóa bởi dung dịch ferricyanide, môi trường kiềm. Phương pháp này cho mẫu phản ứng với dung dịch kali ferricyanide 0,04 M, bổ sung 5,0%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  được đun nóng bằng bể điều nhiệt  $80^\circ\text{C}$  trong 30 phút. Lượng ferricyanide dư được xác định bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 418 nm hoặc bằng phương pháp Morh. Ba yếu tố ảnh hưởng lớn đến quá trình oxy hóa: Sự hiện diện của  $\text{NaHCO}_3$ , có trong thuốc thử hoặc được tạo ra bởi axit chưa trung hòa trong mẫu; tỷ lệ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : ferricyanide; nồng độ ferricyanide. Hai yếu tố đầu tiên được loại bỏ khi sử dụng thuốc thử được khuyến nghị của tác giả và mẫu được trung hòa đúng cách. Do đó, yếu tố thứ ba là biến số quan trọng nhất. Phương trình tổng quát sau đây được đưa ra để tính toán gần đúng lượng glucose  $g$  (tính bằng mg) trong mẫu khi biết số mili đương lượng ferricyanide ( $T$ ) bị khử và nồng độ mol  $F$  của ferricyanide:  $g = 0.02884T + 0.2127F$  [15]. Phương pháp sử dụng tác nhân ferricyanide có ưu điểm vượt trội so với hầu hết các phương pháp dựa trên phản ứng khử đồng, vì ferricyanide ổn định trong không khí và không bị oxy hóa ngược lại. Độ chính xác của phương pháp cao, đồng thời cho phép thực hiện hàng loạt phân tích nhanh hơn so với các phương pháp yêu cầu sử dụng dung dịch Fehling. Tuy nhiên, khả năng oxy hóa của ferricyanide không đặc hiệu bằng các phức hợp đồng, do nó dễ bị khử bởi các chất khác không phải đường khử. Ngoài ra, quá trình oxy hóa tạo ra nhiều sản phẩm khác nhau, một số trong đó tiếp tục bị oxy hóa thêm; do đó, không tồn tại mối quan hệ định lượng chặt chẽ cho phản ứng oxy hóa đường.

#### ❖ Phương pháp sử dụng tác nhân oxy hóa đồng (II) $\text{Cu}^{2+}$

Khi được đun nóng, các dung dịch kiềm của muối đồng  $\text{Cu}^{2+}$  oxy hóa đường khử tạo kết tủa  $\text{Cu}_2\text{O}$  đỏ gạch và  $\text{Cu}^{2+}$  được giữ trong dung dịch thông qua sự hình thành phức chất. Thông thường, các axit oxy hóa được sử dụng cho mục đích này, phổ biến nhất là axit tartaric như trong dung dịch Fehling. Dung dịch đồng tartrate kiềm không ổn định do chứa lượng lớn chất hữu cơ trong môi trường kiềm mạnh. Dung dịch muối Seignette là môi trường tốt cho vi sinh vật phát triển nên cũng không ổn định. Do đó, dung dịch Fehling được chia thành hai thành phần, chỉ được pha và trộn lẫn ngay trước khi sử dụng: dung dịch Fehling I ( $\text{CuSO}_4$ ) và dung dịch Fehling II (muối Seignette +  $\text{NaOH}$ ).

Phương pháp của Bertrand là một phương pháp sử dụng thuốc thử Fehling rất phổ biến. Dung dịch đường được đun sôi trên ngọn lửa trực tiếp với một lượng dư dung dịch Fehling



trong 3 phút. Kết tủa đồng (I) oxit  $\text{Cu}_2\text{O}$  được lọc và tham gia phản ứng khử muối sắt  $\text{Fe}^{3+}$  tạo muối sắt  $\text{Fe}^{2+}$  trong môi trường axit. Lượng sắt (II) tạo thành được xác định bằng phản ứng oxy hoá - khử với dung dịch  $\text{KMnO}_4$  trong môi trường axit. Dựa vào lượng  $\text{KMnO}_4$  sử dụng tính được lượng  $\text{Cu}_2\text{O}$  và từ đó xác định được hàm lượng đường khử trong dung dịch mẫu bằng cách tra bảng tỉ lệ giữa dung dịch  $\text{KMnO}_4$  và đường khử của Bertrand. Phương pháp này đã được đề cập trong một số bài báo và đã được Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ tạm thời thông qua từ năm 1899, trước khi Bertrand công bố các bảng số liệu tiện lợi giúp phương pháp này được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh hóa [16].

Lane và Eynon cũng dựa trên nguyên tắc khử dung dịch Fehling để định lượng đường khử, tuy nhiên sử dụng xanh methylen để làm chất chỉ thị nhận biết điểm cuối chuẩn độ. Khi tất cả đồng sunfat trong dung dịch đã phản ứng tạo thành  $\text{Cu}_2\text{O}$ , nếu tiếp tục bổ sung đường khử, chất chỉ thị sẽ chuyển từ màu xanh lam sang trắng. Bước đầu tiên trong việc ước lượng đường khử bằng phương pháp Lane và Eynon là xác định hệ số của dung dịch Fehling. Hệ số Fehling là số mL của dung dịch đường chuẩn cần thiết để khử hoàn toàn 10mL dung dịch Fehling. Phương pháp này đặc biệt phù hợp với các dung dịch chứa từ 0,15 đến 2,35% đường khử và các sản phẩm như nước ép, sirup, mật và mật đường [17]. Ngoài ra, A. Dunsmore và P. Mellet (1980) đã nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến phương pháp chuẩn độ Lane và Eynon để xác định đường khử trong các sản phẩm của nhà máy đường như tốc độ đun sôi mẫu, quá trình chuẩn hóa dung dịch fehling, phương pháp loại bỏ canxi trong mẫu trước khi chuẩn độ. Kết quả cho thấy rằng dung dịch cần chuẩn độ nên đạt đến điểm sôi trong 2 đến 2,5 phút; chuẩn bị dung dịch Fehling hỗn hợp (10mL A + 10mL B) và nồng độ của dung dịch đường chuẩn (0,25% thay vì 0,5%) cần được chuẩn hóa; sử dụng vừa đủ lượng dung dịch EDTA 4% ưu tiên làm chất khử canxi thay vì kali oxalat [18].

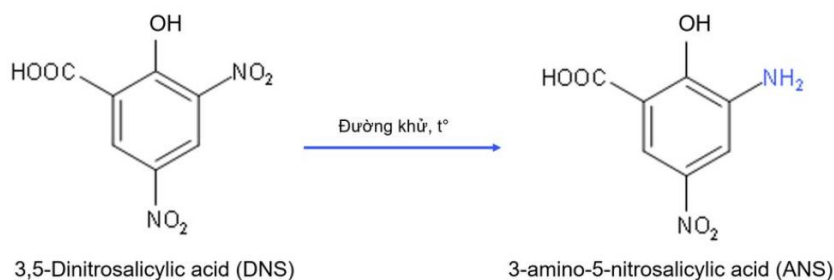
Muối Rochelle (natri kali tartrat) là thành phần của các dung dịch đồng kiểm bị biến đổi khi để lâu, tạo ra các sản phẩm gây ra sự khử tự phát của dung dịch. Benedict (1908) đã đề xuất thay thế muối Rochelle bằng natri citrat và tạo môi trường kiềm nhờ natri cacbonat. Thuốc thử này nhạy cảm hơn với dextrose trong dung dịch tinh khiết hoặc trong nước tiểu so với dung dịch Fehling. Nó không bị khử bởi axit uric (hoặc chỉ bị khử không đáng kể bởi chloroform hoặc formaldehyde) và ít bị biến đổi khi bảo quản lâu. Một lượng nhỏ dextrose trong nước tiểu (0,1%) cũng tạo ra kết tủa có khối lượng đáng kể với thuốc thử này. Thuốc thử Benedict cho kết quả rất rõ ràng với thử nghiệm nước tiểu chứa 0,08% dextrose trong khi dung dịch Fehling yêu cầu nồng độ dextrose khoảng 0,12% để cho phản ứng dương tính tương đương [19].



Phương pháp Somogyi - Nelson (1952) là một trong những phương pháp cổ điển và được sử dụng rộng rãi để xác định định lượng đường khử. Việc xác định đường khử bằng phương pháp Somogyi - Nelson dựa trên độ hấp thụ ở bước sóng vùng 520nm (500-660nm tùy thiết bị) của một phức hợp màu xanh được tạo thành giữa đường bị oxy hóa bởi đồng và arsenomolybdate. Lượng đường khử hiện diện được xác định bằng cách so sánh với đường chuẩn sử dụng máy so màu, trong điều kiện thích hợp, phương pháp này có độ chính xác lên đến 10  $\mu\text{g}$  glucose. Việc sử dụng thuốc thử màu để đo lượng đồng khử được hình thành trong thuốc thử Somogyi – Nelson được coi chỉ là một phương pháp thay thế cho chuẩn độ iodometric do tạo ra màu sắc ổn định và có khả năng tái tạo cao [20] [21]. Tuy nhiên, thuốc thử này chứa asen, một chất có độc tính cao, gây ra vấn đề nghiêm trọng về môi trường. Nghiên cứu Chitoshi Hatanaka and Yoshiaki Kobara (1980) được thực hiện bằng cách thay thế nó bằng thuốc thử phenol Folin-Ciocalteu cho thuốc thử arsenomolybdate để loại bỏ nhược điểm và so sánh độ bền màu của phức tạo thành. Khả năng tạo màu của thuốc thử phenol Folin-Ciocalteu thấp hơn đáng kể so với thuốc thử arsenomolybdate của Nelson. Tuy nhiên, phương pháp cải tiến này ưu điểm hơn với phương pháp Somogyi-Nelson về độ đơn giản, khả năng tái tạo và độ ổn định của màu phát triển. Để cải thiện độ chính xác trong cả hai phương pháp, sai số có thể được giảm xuống khoảng 1/4 bằng cách thêm natri benzoat (nồng độ cuối cùng khoảng 0.5%) vào các dung dịch mẫu [22]. Đối với phương pháp sử dụng tác nhân oxy hóa đồng (II) phù hợp cho nhiều loại phân tích nhờ thời gian phân tích nhanh và độ chính xác kết quả trong điều kiện chấp nhận được. Tuy nhiên các thuốc thử Fehling yêu cầu pha ngay trước khi sử dụng. Sản phẩm kết tủa đồng (I) dễ bị oxy hóa nhanh với oxy không khí, ảnh hưởng đến độ chính xác kết quả. Do đó, sử dụng tác nhân đồng (II) cần thao tác nhanh và hạn chế quá trình khuấy trộn mẫu sau phản ứng.

#### ❖ Phương pháp sử dụng tác nhân oxy hóa axit Dinitrosalicylic (DNS)

Axit 3,5-Dinitrosalicylic (DNS hay DNSA) được sử dụng rộng rãi trong quá trình xác định hàm lượng đường khử. Nguyên tắc phương pháp DNS dựa trên sự phản ứng với thuốc thử, quá trình oxy hóa nhóm chức aldehyde (trong glucose) và nhóm chức xeton (trong fructose) sẽ diễn ra. Axit 3,5-Dinitrosalicylic bị khử thành axit 3-amino 5-nitrosalicylic (ANS), có màu đỏ cam trong môi trường kiềm và độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 540 nm. Hàm lượng đường khử được xác định bằng phương pháp dựng đường chuẩn. Phương pháp dùng tác nhân DNS và Somogyi – Nelson thuộc phương pháp so màu.



Muối Rochelle, thường có mặt trong thuốc thử DNS để xác định đường khử, gây cản trở tác dụng bảo vệ của sulfite, nhưng lại cần thiết cho sự ổn định màu sắc. Nghiên cứu của Miller (1959) đã chỉ ra phương pháp tối ưu sử dụng muối Rochelle là bằng cách loại bỏ khỏi thuốc thử, thêm nó vào hỗn hợp đường khử và thuốc thử sau khi màu đã phát triển hoặc bằng cách thêm một lượng glucose đã biết vào các mẫu đường khử để bù đắp cho sự mất mát xảy ra khi có mặt muối Rochelle. Thí nghiệm cũng đưa ra nồng độ sulfite 0,05% và DNS 1% cường độ màu đạt được tối đa [23]. Mức độ phản ứng của các loại đường monosaccharide và disaccharide với DNS đã được so sánh, do đó mỗi loại đường được phân tích nên xây dựng đường chuẩn riêng và đặc biệt chú ý khi kết quả là hỗn hợp đường khử [24].

Phương pháp axit dinitrosalicylic (DNS) thường được sử dụng để ước tính nồng độ đường khử trong phản ứng thủy phân bằng enzyme, cung cấp một giải pháp thay thế không đặc hiệu cho các phương pháp chuyên sâu và tốn thời gian hơn như GC hoặc HPLC [25], [26]. Nghiên cứu I. Wood (2012) cũng chứng minh chọn bước sóng, chế độ gia nhiệt và thể tích phản ứng ảnh hưởng đến hiệu suất định lượng đường khử. [27]. Phương pháp sử dụng tác nhân DNS phổ biến vì quá trình thực hiện đơn giản, nhanh chóng và độ nhạy cao. Tuy nhiên định lượng hàm lượng các loại đường khử yêu cầu dựng các đường chuẩn riêng cho từng loại đường. Đối với các loại đường có nhiều liên kết hơn sẽ bị oxy hóa quá mức và tạo ra các giá trị hấp thụ cao hơn. Ngoài ra thuốc thử DNS giá thành cao hơn so với một số thuốc thử thông thường khác cũng như lưu ý quá trình pha thuốc thử.

#### ❖ Phương pháp điện hóa

Trong số các phương pháp phân tích khác nhau được sử dụng để xác định nồng độ vết của đường khử, các phương pháp điện hóa đã được coi là quan trọng. Các phương pháp điện hóa là những lựa chọn thay thế đầy hứa hẹn, nhờ vào thời gian phản ứng nhanh, chi phí thấp, tính đơn giản của thiết bị, độ nhạy cao, và chúng cũng thân thiện với môi trường. Phương pháp này được phát triển bằng cách sử dụng ampe kế xung với điện cực cacbon thủy tinh được biến tính bằng oxit graphene chứa các hạt nano đồng [28]. Hoặc phương pháp phân tích điện thế (PSA) áp dụng để xác định đường khử trong nước ngọt, rượu, đồ uống có cồn, mật

ong, mứt. Mẫu thử và dung dịch đường chuẩn được thêm một lượng dư thuốc thử Soxhlet, quá trình khử Cu(II) thành Cu<sub>2</sub>O diễn ra bằng cách đun nóng ở nhiệt độ không đổi trong một khoảng thời gian xác định. Đồng chưa khử trong dung dịch hoặc đồng đã khử trong kết tủa Cu<sub>2</sub>O được xác định bằng kỹ thuật PSA [29]. Phương pháp điện hóa có nhiều ưu điểm như độ nhạy cao, thời gian phân tích nhanh và độ chọn lọc tốt hơn so với các phương pháp chuẩn độ. Tuy nhiên, phương pháp đòi hỏi kiểm soát tốt điều kiện nhiệt độ, pH phân tích cũng như tuổi thọ của điện cực.

#### ❖ Các phương pháp phân tích hiện đại

Kỹ thuật sắc ký là các kỹ thuật phân tích tiên tiến và hiệu quả được sử dụng để phân tích định tính và định lượng các loại đường cũng như đường khử [30]. Sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký khí lỏng (GLC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) thường được sử dụng để tách và xác định các loại đường khác nhau dựa trên các đặc điểm hấp phụ khác biệt của từng loại đường. Hệ số phân bố, độ phân cực, kích thước và loại cột được sử dụng là những yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình tách. HPLC và GLC là những phương pháp được áp dụng để xác định hàm lượng đường khử do tính đặc hiệu cao và khả năng xác định đồng thời nhiều loại đường. Điều kiện tiên quyết đối với GLC là mẫu phải dễ bay hơi hoặc ở trạng thái dẫn xuất, trong khi các mẫu HPLC có thể được phân tích như vậy, với việc chuẩn bị mẫu đơn giản mà không cần dẫn xuất, giúp tiết kiệm thời gian. HPLC và GLC thường được sử dụng cùng với cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) hoặc phổ khối, do đó cấu trúc hóa học của các phân tử tạo nên các đỉnh cũng có thể được xác định. Hiện nay các kỹ thuật xác định bằng phương pháp hiện đại đang được nghiên cứu cải tiến thời gian, độ chọn lọc và độ nhạy để xác định hàm lượng đường khử trong mẫu.

Một phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC kết hợp phản ứng sau cột với đường khử đã được phát triển để cải thiện các phương pháp hiện có về thời gian vận hành, độ chọn lọc và độ nhạy. Phương pháp này bao gồm việc tách đường khử trên cột HPLC ở 30°C và tốc độ dòng chảy 0,8 mL phút<sup>-1</sup>, phản ứng sau cột của đường với thuốc thử Cu(II)-neocuproine (Nc) ở 80 °C, tốc độ dòng chảy 0,3 mL phút<sup>-1</sup> và đo sản phẩm Cu(I)-Nc ở 450 nm. Nghiên cứu áp dụng cho glucose, fructose, maltose và lactose dưới dạng đường khử. Các mẫu mật ong, nước ép táo và sữa đã được đánh giá là các sản phẩm thương mại. Phương pháp này đưa ra có hệ số tương quan lớn hơn 0,996 đối với bốn chất phân tích (glucose, fructose, maltose và lactose) trong phạm vi từ 9,0 - 342,3 mg/L [31]. Các kỹ thuật phân tích hiện đại có độ chọn lọc, độ nhạy cao khi phát hiện được nồng độ mẫu rất thấp cũng như có thể xác định

chính xác được hàm lượng từng loại đường khử riêng biệt. Tuy nhiên phương pháp đòi hỏi chi phí thiết bị cao cũng như thời gian phân tích dài.

#### ❖ Phương pháp sử dụng enzyme

Sử dụng enzyme để xác định hàm lượng đường khử là một phương pháp có độ đặc hiệu cao, chính xác và an toàn. Tùy thuộc vào loại đường cần đo (glucose, fructose, sucrose, maltose, v.v.) để sử dụng enzyme phù hợp. Glucose oxidase là một trong những enzyme được sử dụng rộng rãi nhất để phát hiện glucose vì khả năng khử oxy thành hydrogen peroxide đồng thời oxy hóa glucose thành axit gluconic. Ở pH trung tính, glucose tồn tại ở hai dạng,  $\alpha$ -D-glucose và  $\beta$ -D-glucose. Khi  $\beta$ -D-glucose được tiêu thụ trong phản ứng, trạng thái cân bằng của hai đồng phân glucose được duy trì bằng cách chuyển sản xuất về phía  $\beta$ -D-glucose, cho phép glucose oxidase tác động lên tất cả glucose trong dung dịch. Xác định glucose trong máu là xét nghiệm phổ biến nhất được thực hiện trong phòng xét nghiệm lâm sàng, trong đó sử dụng phương pháp glucose oxidase-peroxidase là phổ biến. Dưới tác dụng của enzyme glucose oxidase, glucose bị oxy hóa thành axit gluconic trong khi oxy đồng thời bị khử thành hydrogen peroxide bởi enzyme glucose oxidase. Hydrogen peroxide sau đó bị phân tách thành nước và oxy mới sinh bởi enzyme peroxidase. Oxy mới sinh tiếp tục phản ứng với 4-aminoantipyrine và với sự có mặt của phenol, phản ứng này tạo ra quinoneimine, một hợp chất có màu có thể được phân tích bằng phương pháp phân tích màu. Cường độ màu tạo ra có mối tương quan trực tiếp với nồng độ glucose trong mẫu. Phân tích màu được thực hiện ở bước sóng 505 nm và so sánh với chuẩn, được xử lý tương tự. Ngoài ra sử dụng enzyme hexokinase là một phương pháp có độ đặc hiệu cao để xác định glucose huyết tương. Phản ứng tạo ra NADH thông qua các chuyển đổi glucose do hexokinase xúc tác. Sau đó, NADH được phân tích bằng phương pháp quang phổ để xác định nồng độ glucose trong mẫu [32], [33]. Sử dụng enzyme trong phân tích là một kỹ thuật đang được áp dụng nhiều nhờ tính chọn lọc cao, tốc độ nhanh đặc biệt phù hợp với nền mẫu sinh học. Tuy nhiên enzyme dễ bị biến tính bởi nhiệt độ, pH cũng như mỗi enzyme chỉ áp dụng được một số ít chất nền phù hợp, chi phí enzyme tinh khiết trong phân tích có giá thành cao hơn nhiều thuốc thử chuẩn độ thông thường khác.

### 3. Trao đổi và kết luận

Xác định hàm lượng đường khử đóng vai trò quan trọng trong nhiều lĩnh vực. Các phương pháp định lượng đơn giản như chuẩn độ, đo cường độ màu đã được áp dụng trong nhiều nghiên cứu, ở các phòng thí nghiệm và đang được điều chỉnh để phù hợp hơn với những



mẫu phức tạp. Bên cạnh đó, các phương pháp phân tích công cụ như HPLC, điện hóa, enzyme ngày càng được áp dụng nhiều để đảm bảo độ nhạy hoặc dùng để xác định hàm lượng đường khử hiện diện trong các mẫu có nồng độ rất bé.

### **Tài liệu tham khảo**

- [1] Nahid Tamanna (2015). Food processing and Maillard reaction products: effect on human health and nutrition, *Int J Food Sci*.
- [2] Tao Chen (2023). Effects of reducing sugars on the structural and flavor properties of the Maillard reaction products of *Lycium barbarum* seed meal, *Foods*.
- [3] Ye Zhang, Chun Hao Chang (2024). Effect of the initial glucose concentration on the performance of ice wine fermentation of Vidal grape juice, *Scientific Reports*, Vol 14, Article number: 31341.
- [4] Lê Văn Trọng, Nguyễn Như Khanh (2021). Nghiên cứu một số chỉ tiêu sinh hóa theo tuổi phát triển của quả nhãn lồng (*Euphoria longan* Lamk.) trồng tại Quảng Ninh, *Vietnam J. Agri. Sci*, Vol. 19, No.1: 1-7.
- [5] Vũ Thị Thu Hiền, Lại Thị Thanh, Hoàng Thị Huế (2022). Nghiên cứu sự chuyển hóa sinh lí, hóa sinh theo tuổi phát triển của quả dưa chuột (*cucumis sativus l.*) giống baby Hà Lan F1 Fadia trồng tại Thanh Hóa, *tạp chí Khoa học trường Đại học Hồng Đức*, số 59.
- [6] H. Kenneth Walker, W. Dallas Hall and J. Willis Hurst (1990). *Clinical Methods*, 3rd edition.
- [7] Fitri Fadhilah and Noviana Vanawati (2019). Comparison of glucose reduction in urine using Benedict method heated by methylated flame with 100°C waterbath, *Indonesean Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, 44-51.
- [8] Phạm Thị Mỹ Trâm, Nguyễn Thị Phương Hảo (2016). Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng lên quá trình thủy phân tinh bột hạt mít thành nguyên liệu sản xuất ethanol, *Tạp chí Khoa học TDMU*, số 3 (28), Pages 29-26.
- [9] Jakob Blom and Carl Olof Rosted (1947). On the Determination of Reducing Sugars, *Acta Chemica Scandinavica*, 32-53.
- [10] P. H. Heinze and A. E. Murneek (1940). Director comparative accuracy and efficiency in determination of carbohydrates in plant material, *Agricultural Experiment Station Research Bulletin*, 314.
- [11] Donald M. Pillsbury and George V. Kulchar (1934). The use of the hagedorn-jensen method in the determination of skin glucose, *Journal of Biological Chemistry*, Vol 106, 343 - 349.



- [12] Susumu Yamada (1932). A note on the Hagedorn-Jensen's method of blood sugar determination in case of phlorhizin diabetes, *The Journal of Biochemistry*, Vol 15, Pages 311–318.
- [13] C. Hanes (1929). An application of the method of Hagedorn and Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars, *Biochem J*, Vol 23, 99-106.
- [14] Sydney William Cole (1933). The determination of reducing sugars by titration of ferricyanide, *Biochem*, 723 – 726.
- [15] Theodore E. Friedemann, Charles W. Weber and Norman F. Witt (1962). Determination of reducing sugars by oxidation in alkaline ferricyanide solution, *Analytical Biochemistry*, Volume 4, Pages 358-377.
- [16] Davis. W. A. and Daish. A. J (1913). A Study of the methods of estimation of Carbohydrates, especially in Plant-extracts: A new method for the estimation of Maltose in presence of other Sugars, *The Journal of Agricultural Science*, Vol 5 (4), Pages 437-468.
- [17] Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng (2016). Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 11470:2016: Đường và sản phẩm đường - Xác định hàm lượng đường khử trong đường mía thô, đường chuyên biệt và các sản phẩm chế biến từ mía bằng quy trình thể tích không đổi Lane và Eynon, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- [18] A. Dunsmore, P. Mellet, M. Wolff (1980). Some factors affecting the Lane and Eynon titration method for determining reducing sugars in sugar products, *Sugar Milling Research Institute*, 72-76.
- [19] Stanley R. Benedict (1908). A reagent for the detection of reducing sugars, *Biochemistry*.
- [20] Nelson (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *The Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.
- [21] M. Somogyi (1952). Notes on sugar determination, *J Biol Chem*, 195(1):19-23.
- [22] Chitoshi Hatanaka and Yoshiaki Kobara (1980). Determination of Glucose by a Modification of Somogyi-Nelson Method, *Bioi. Chem.* 44 (12), 2943 ~ 2949.
- [23] Gail Lorenz Miller (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, Vol 31, No 3, P.426-428,
- [24] Abdul Aala Najmus Saqib and Philip John Whitney (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars, *Biomass and Bioenergy*, 35(11), 4748 - 4750.



- [25] Hồ Quốc Phong và Huỳnh Liên Hương (2013). Khả năng sử dụng bã mía trong sản xuất chất béo từ nấm men *Yarrowia Lipolytica*, *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ*, 26 (2013) 134-142
- [26] Alexander V Gusakov (2011). Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities, *Int J Anal Chem*
- [27] I. P. Wood, Adam Elliston (2012) Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay, *Biomass and Bioenergy*, 44:117-121.
- [28] L. L. Paim and José Luiz da Silva (2015). Electrochemical determination of total reducing sugars from bioethanol production using glassy carbon electrode modified with graphene oxide containing copper nanoparticles, *Fuel*, 163:112-121.
- [29] Christos G. Nanos and Miltiadis Karayannis (1991). Assay of reducing sugars in beverages, wines, honey and marmalades using potentiometric stripping analysis (PSA), *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 340(4), Pages 253-257.
- [30] Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng (2023). Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 13845:2023 - Mật ong - Xác định hàm lượng đường - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- [31] Esin Akyüz (2021). High performance liquid chromatographic method with post-column detection for quantification of reducing sugars in food, *Journal of Chromatography A*, Volume 1660.
- [32] Jae Sik Kim, Seong Jik Yoon and Hi Sook Park (1969). The determination of blood sugar by Glucose Oxidase method, *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 3(1):9-12.
- [33] Angel Luis García-Ponce, Beatriz Martínez-Poveda and Angel Blanco-Lópe (2019). Not all has been said about glucose oxidase/peroxidase: new pedagogical uses for a classical and robust undergraduate laboratory experiment, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, Volume 47, Pages 341–347.