



# Monstervoorbereiding en analyse van steviolglycosiden in voeding

R. Amery<sup>1</sup>, E. Jooken<sup>1,2</sup>, B. Duquenne<sup>3</sup>,  
J. Geuns<sup>2</sup> en B. Meesschaert<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> KHBO ; <sup>2</sup> KULeuven ; <sup>3</sup> ILVO

## Overzicht



- **Introductie**
- Project
- Monstervoorbereiding
- Analyse met HPLC
- Validatie
- Resultaten
- Conclusies

## Introductie



- Suiker in voeding
  - Eén van de oorzaken van overgewicht
  - Ongunstig bij patiënten met suikerziekte
  - Reductie van suiker in "light"-producten door kunstmatige zoetstoffen is niet onomstreden.

→ Alternatief: **STEVIA**



talent@work

3

## Introductie



- Stevia
  - Plant: *Stevia rebaudiana*
  - Inheems in Zuid-Amerika
  - Althans gekweekt in andere landen



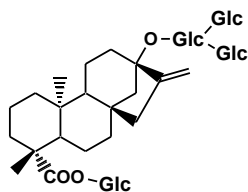
talent@work

4

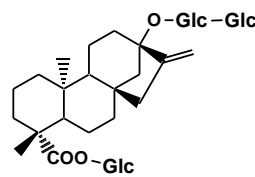
# Introductie



- Stevia
  - Blaadjes bevatten steviolglycosiden
  - Belangrijkste:



*Rebaudioside A*



*Stevioside*



talent@work

5

# Introductie



- Steviolglycosiden
  - Zoetstoffen



talent@work

6

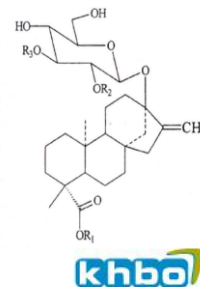
# Introductie



- Steviolglycosiden
  - Zoetstoffen: relatieve zoetkracht van steviolglycosiden tegenover sucrose (4%)

| Steviolglycoside | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | Relatieve Zoetkracht |
|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------------|
| Stevioside       | gluc            | gluc           | H              | 150-300              |
| Steviolbioside   | H               | gluc           | H              | 100-125              |
| Rebaudioside A   | gluc            | gluc           | gluc           | 250-450              |
| Rebaudioside B   | H               | gluc           | gluc           | 300-350              |
| Rebaudioside C   | gluc            | rham           | gluc           | 50-120               |
| Rebaudioside D   | gluc-(1,2)-gluc | gluc           | gluc           | 250-450              |
| Rebaudioside E   | gluc-(1,2)-gluc | gluc           | H              | 150-300              |
| Dulcoside A      | gluc            | rham           | H              | 50-120               |

*gluc = β-D-glucopyranosyl; rham = α-L-Rhamnopyranosyl*



talent@work

7

# Introductie



- Steviolglycosiden
    - Zoetstoffen
    - Natuurlijk
    - Calorie-arm
- TOEPASSING IN VOEDING

khbo

talent@work

8

# Introductie



- Stevia in voeding
  - Al in gebruik buiten EU
    - Diverse landen in Zuid-Amerika
    - Japan, Australië, Nieuw-Zeeland, Rusland, Mexico en Israël
    - Als dieetsupplement in USA
  - EFSA heeft eerder dit jaar al een positief advies gegeven
  - Binnenkort goedkeuring in EU



# Overzicht



- Introductie
- **Project**
- Monstervoorbereiding
- Analyse met HPLC
- Validatie
- Resultaten
- Conclusies



## Project



- Coördinatie: Flanders' Food
- ILVO (Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek):
  - Aanmaak van voedingsproducten
  - Smaaktesten
- KHBO/KULeuven:
  - Stabiliteit van steviolglycosiden ifv productie en tijd



talent@work

11

## Project



- Volgende voedingsproducten werden onderzocht:
  - Melk
  - Sojamelk
  - Drinkyoghurt
  - Yoghurt (magere en volle)
  - Ijsroom
  - Koekjes



talent@work

12

## Project



- Gebruikte steviolglycoside mengels
  - “RebA”: 96.3 % RebA
  - “Ste”: 83.5 % Ste + 6.3 % RebA
  - “SV-Gly Mengsel”: 32.6 % RebA + 49.81 % Ste
  - “Mengsel”: Mengsel van 80 % “RebA” + 20 % “Ste”
  - Blanco (met suiker)



talent@work

13

## Project



- Na aanmaak werden de voedingsproducten bewaard en periodisch geanalyseerd
- Geoptimaliseerde methode nodig:
  - Monstervoorbereiding
    - Extractie SG uit voedingsmatrix
    - Opzuiveren/opconcentreren met SPE
  - HPLC-analyse



talent@work

14

# Overzicht



- Introductie
- Project
- **Monstervoorbereiding**
- Analyse met HPLC
- Validatie
- Resultaten
- Conclusies



# Monstervorb.



- **Zuivelproducten (algemeen)**
  - Melk
  - Sojamelk
  - Drinkyoghurt
  - Standyoghurt
- Ijsroom
- Koekjes





# Zuivelproducten



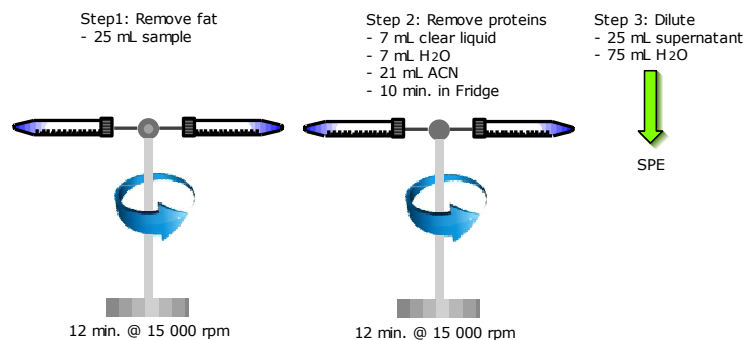
- De zuivelproducten bevatten vetten en eiwitten die moeten verwijderd worden
- Ontvetten: centrifugatie
- Onteiwitten: neerslaan met acetonitrile (niet met zuur)
- Opzuiveren en opconcentreren met SPE



talent@work

17

# Zuivelproducten



– Bij standyoghurt wordt eerst verdund alvorens te ontvetten



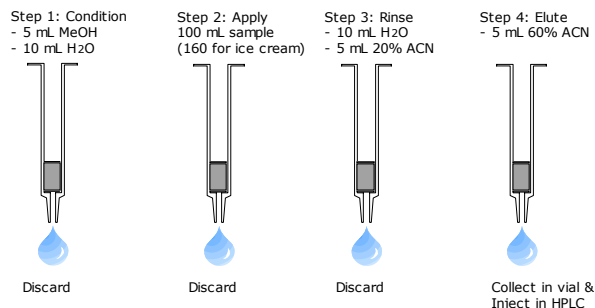
talent@work

18

# Zuivelproducten



- SPE-methode (C18-kolom)



talent@work

19

# Monstervorb.



- Zuivelproducten (algemeen)
  - Melk
  - Sojamelk
  - Drinkyoghurt
  - Standyoghurt
- **Ijsroom**
- Koekjes



talent@work

20

# Ijsroom



- Ijsroom wordt gesmolten alvorens te extraheren
- Zelfde procedures voor ontvetten en onteiwitten als bij de zuivelproducten
- SPE



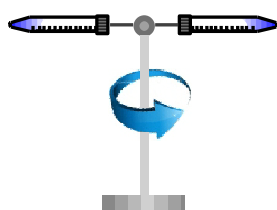
talent@work

21

# Ijsroom

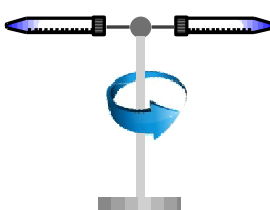


Step 1: Remove fat  
- melt sample  
- 25 mL molten sample



12 min. @ 15 000 rpm

Step 2: Remove proteins  
- 3 mL clear liquid  
- 21 mL H<sub>2</sub>O  
- 36 mL ACN  
- 10 min. in Fridge



12 min. @ 15 000 rpm

Step 3: Dilute  
- 40 mL supernatant  
- 120 mL H<sub>2</sub>O



SPE



talent@work

22

## Monstervorb.



- Zuivelproducten (algemeen)
  - Melk
  - Sojamelk
  - Drinkyoghurt
  - Standyoghurt
- Ijsroom
- **Koekjes**



talent@work

23

## Koekjes



- Bij extractie met water wordt een onfiltreerbaar visceus geheel bekomen
  - Extractie met ethanol (+ indampen)
  - Residu in waterige oplossing
  - SPE



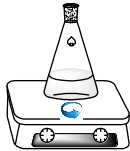
talent@work

24

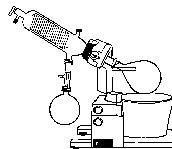
# Koekjes



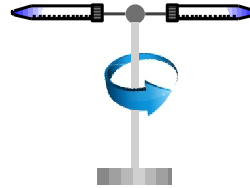
Step 1: Extraction  
 - grind down in mortar  
 - ethanol  
 - 40 °C  
 - 30 min



Step 2: Evaporation  
 - filter over fluted filter paper  
 - evaporate to dryness



Step 3: Removal of fat and proteins  
 - dissolve residue in 50 mL  
 of 10 % ACN



12 min. @ 15 000 rpm

Step 4: Concentrate  
 - filter supernatant over  
 fluted filter paper



SPE

khbo

talent@work

25

# Overzicht



- Introductie
- Project
- Monstervoorbereiding
- **Analyse met HPLC**
- Validatie
- Resultaten
- Conclusies

khbo

talent@work

26

## HPLC-Analyse



- Analyse met HPLC:
  - Injectie van 20  $\mu\text{L}$
  - 2 ODS Hypersil kolommen in serie (20 x 0.3 cm; 5  $\mu\text{m}$ )
  - Lineaire gradiënt
  - A = 25 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ; B = ACN

| Time /(min) | % ACN |
|-------------|-------|
| 0           | 30    |
| 10          | 40    |
| 20          | 80    |
| 30          | 80    |



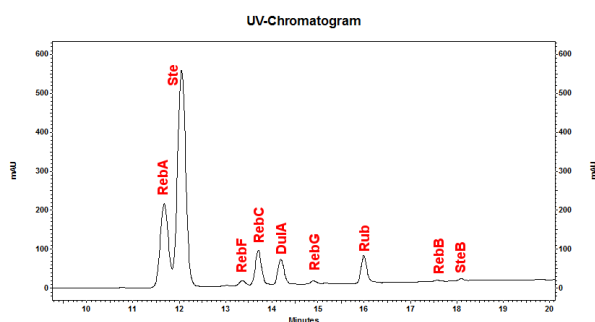
talent@work

27

## HPLC-Analyse



- Detectie met Diode Array Detector op 200 nm.



talent@work

28

# Overzicht



- Introductie
- Project
- Monstervoorbereiding
- Analyse met HPLC
- **Validatie**
- Resultaten
- Conclusies



talent@work

29

# Validatie



- Ijkcurve:
  - Alle steviolglycosiden hebben hetzelfde chromofoor, waardoor het mogelijk is om met 1 standaard te werken indien de molaire massa's in rekening worden gebracht.
  - Zuivere (97,07 m%) RebA werd gebruikt als standaard



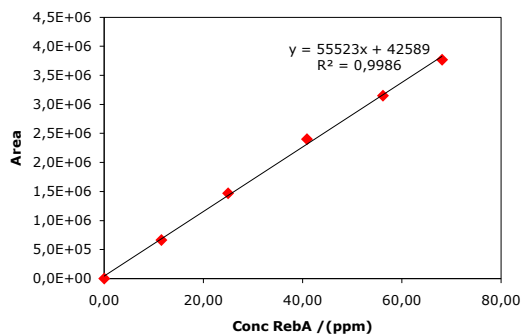
talent@work

30

# Validatie



- Ijkcurve
  - Linear tussen 0 and 70 ppm



khbo

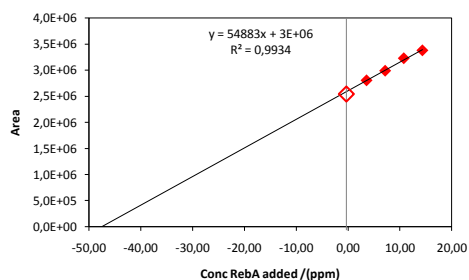
talent@work

31

# Validatie



- Standardadditie:
  - Toegepast op yoghurt met "Reb A" mengsel



khbo

talent@work

32



## Validatie



- Standardadditie:
  - Resultaat van standardadditie: 47.85 ppm
  - Resultaat van externe ijkcurve: 46.84 ppm
  - Verschil: 1.43 %
  - Gelijkaardige resultaten voor andere voedingsproducten



talent@work

33

## Recovery



| Sample         | Added /(ppm) | Found /(ppm) | % RSD (n=3) | % Recovery |
|----------------|--------------|--------------|-------------|------------|
| Melk           | 103,03       | 102          | 1,03        | 99,16      |
| Drinkyoghurt   | 115,55       | 114          | 0,97        | 98,45      |
| Sojadrank      | 64,23        | 63           | 2,03        | 98,23      |
| Ijsroom        | 24,84        | 24           | 0,63        | 96,76      |
| Volle Yoghurt  | 96,16        | 96           | 2,25        | 99,63      |
| Magere Yoghurt | 95,10        | 95           | 1,14        | 99,86      |
| Koekjes        | 63,88        | 61           | 1,96        | 94,80      |



talent@work

34

## Overzicht



- Introductie
- Project
- Monstervoorbereiding
- Analyse met HPLC
- Validatie
- **Resultaten**
- Conclusies



talent@work

35

## Resultaten



- Stabiliteit van steviolglycosiden in de besproken voedingsproducten:
  - In functie van productie
  - In functie van houdbaarheidsdatum
- Enkel de meest voorkomende componenten worden besproken
- RSD-waarden zijn over het algemeen lager dan 3%



talent@work

36

# Melk, drinkyoghurt en sojadrink



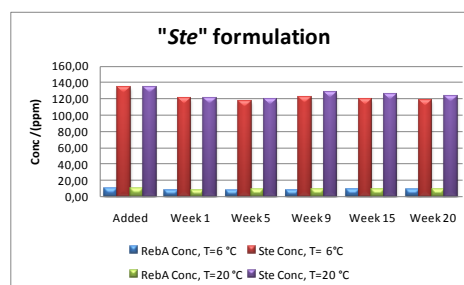
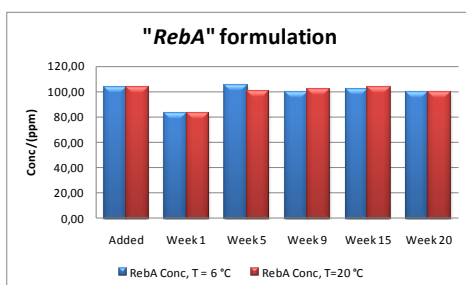
- Vier mengsels worden toegevoegd:
  - "RebA"
  - "Ste"
  - "SV-Gly Mengsel"
  - "Mengsel"
- Stalen werden bewaard gedurende 20 weken op 20 °C en 6°C



talent@work

37

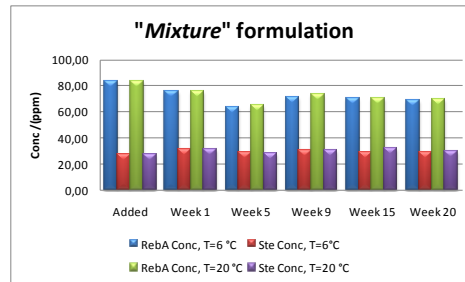
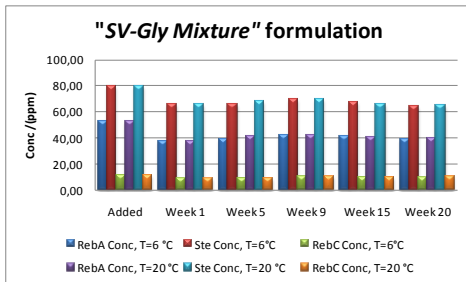
# Melk: Resultaten



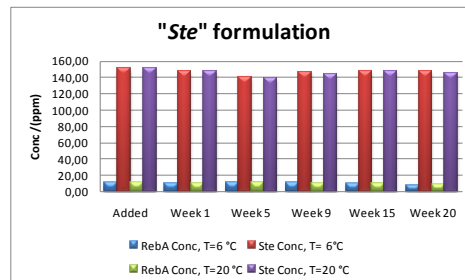
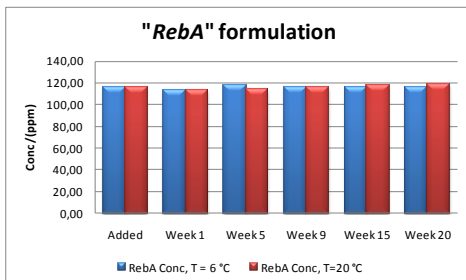
talent@work

38

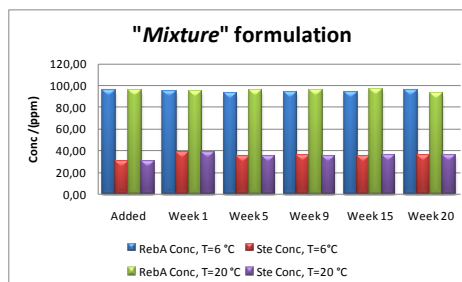
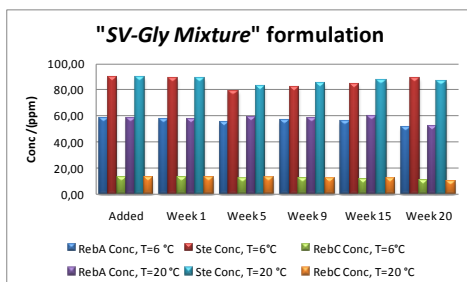
# Melk: Resultaten (vervolg)



# Drinkyoghurt: Resultaten



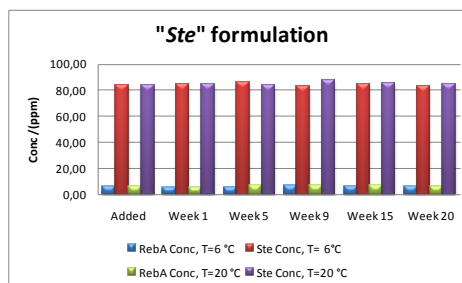
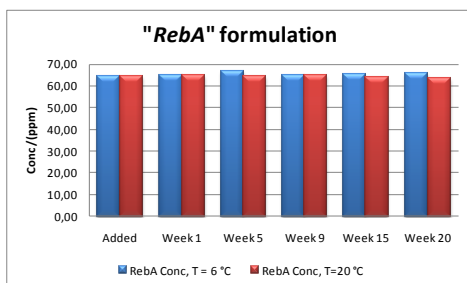
# Drinkyoghurt: Resultaten (vervolg)



talent@work

41

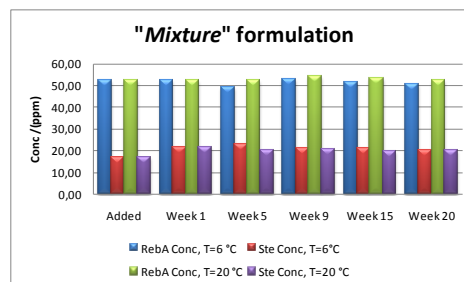
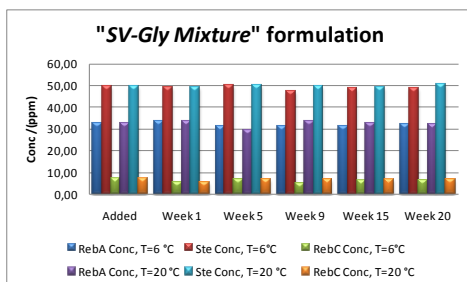
# Sojadrink: Resultaten



talent@work

42

## Sojadrink: Resultaten (vervolg)



talent@work

43

## Ijsroom



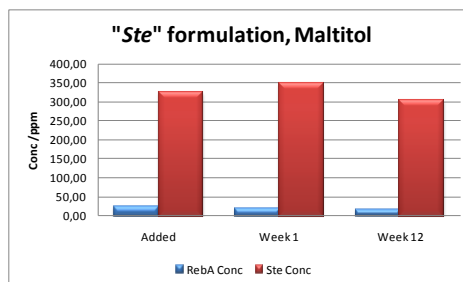
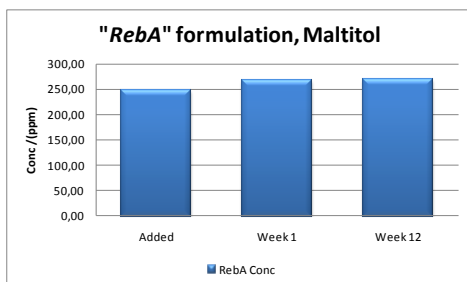
- Ijsroom stalen werden aangemaakt met twee verschillende bulkstoffen:
  - Maltitol
  - Erythritol
- Stalen werden bewaard gedurende 12 weken op -18 °C
- De vier mengsels werden toegevoegd



talent@work

44

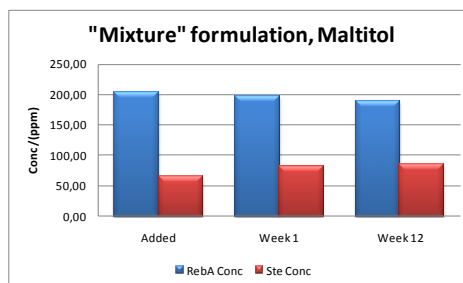
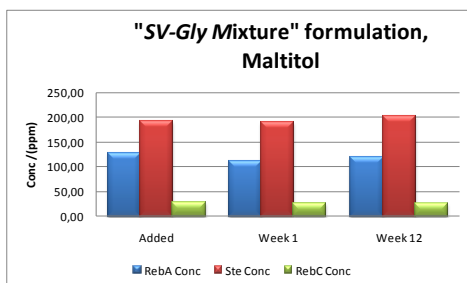
# Ijsroom: Resultaten



talent@work

45

# Ijsroom: Resultaten (vervolg)



talent@work

46

## Ijsroom



- Er werden geen verschillen waargenomen tussen de verschillende bulkstoffen



talent@work

47

## Volle en magere yoghurt



- Twee mengsels werden toegevoegd:
  - “RebA”
  - “SV-Gly Mengsel”
- Stalen werden bewaard gedurende 35 dagen op 6°C

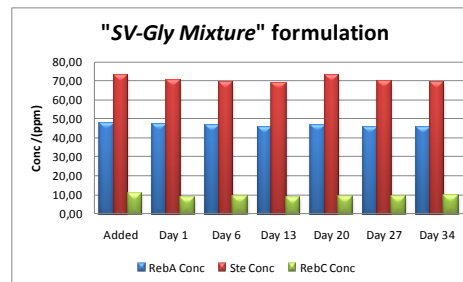
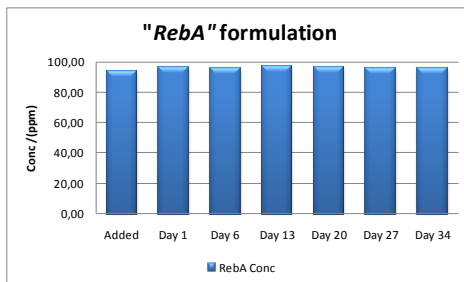


talent@work

48



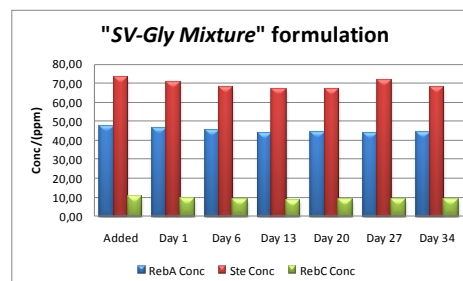
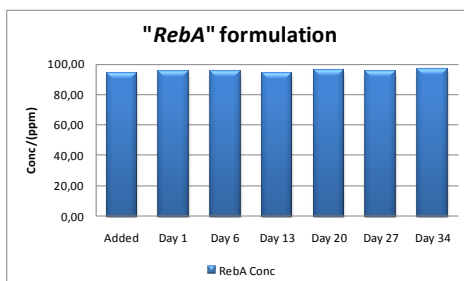
# Volle yoghurt: Resultaten



talent@work

49

# Magere yoghurt: Resultaten



talent@work

50

# Koekjes



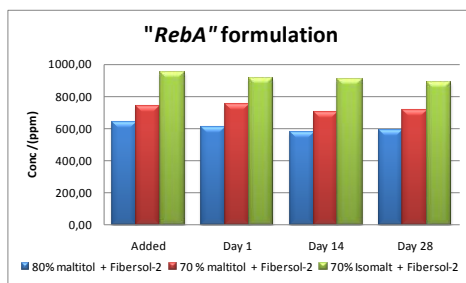
- Enkel het "RebA" mengsel werd toegevoegd
- Koekjes werden gebakken bij 180°C en bewaard gedurende 4 weken op kamertemperatuur.
- Verschillende bulkstoffen werden toegevoegd: 80% maltitol, 70% maltitol en 70% isomalt



talent@work

51

# Koekjes: Resultaten



talent@work

52

# Overzicht



- Introductie
- Project
- Monstervoorbereiding
- Analyse met HPLC
- Validatie
- Resultaten
- **Conclusies**



talent@work

53

# Conclusies



- Steviolglycosiden kunnen geanalyseerd worden:
  - Geoptimaliseerde extractiemethode
  - Geoptimaliseerde HPLC-methode
  - Goeie nauwkeurigheid en precisie
- Steviolglycosiden vertonen geen afname in de voedingsmatrices
  - Tijdens productie
  - In functie van houdbaarheidsdatum



talent@work

54

# Acknowledgements



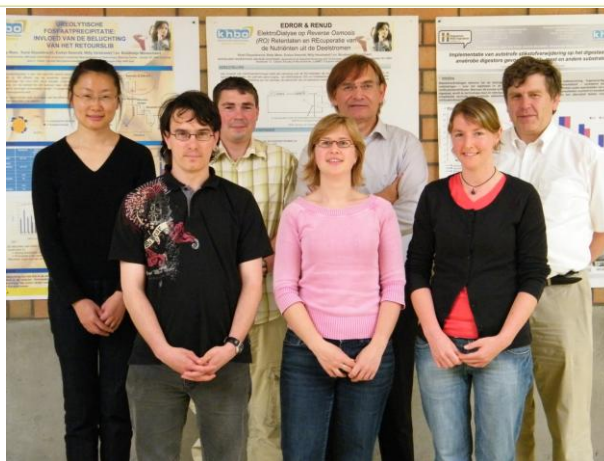
- IWT (Agentschap voor Innovatie door Wetenschap en Technologie) voor financiële steun
- Flanders' FOOD voor coördinatie van het project
- De bedrijven voor hun bijdrage



talent@work

55

## KHBO Onderzoeksgroep chemie



talent@work

56