

Hoàn thiện quy trình chiết xuất và tinh chế steviosid từ lá cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.)

Nguyễn Văn Tài¹, Nguyễn Thu Hằng^{2*}, Lê Thị Thọ²

¹Khoa Hóa thực vật, Viện Dược liệu

²Bộ môn Dược liệu, Trường Đại học Dược Hà Nội

*E-mail: hangninhhanh@gmail.com

Summary

The process for extraction and purification of Stevioside, a sweet ent-kauran triterpenoid glycoside from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. Leaves, was improved. Various parameters including resin, solvent system, extraction time and temperature, material/solvent ratio, number of times of extraction and recrystallization were optimised. The isolated Stevioside was identified by MS and NMR in reference to the literature data.

Keywords: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl., leaves, stevioside, steviol glycoside, ent-kauran triterpenoid, sweetening agent, extraction, purification.

Đặt vấn đề

Steviosid là một glycosid được chiết xuất từ lá cỏ ngọt, có độ ngọt gấp 110 đến 270 lần so với saccharose, hiện nay đang được sử dụng tương đối rộng rãi để thay thế đường và chất ngọt tổng hợp trong các thực phẩm, đồ uống, dược phẩm dành cho người bị tiểu đường hoặc béo phì ở nhiều nước trên thế giới^[1]. Do đó, việc chiết xuất và tinh chế steviosid từ lá cỏ ngọt để đưa vào sản xuất đang là vấn đề được quan tâm nghiên cứu^[2, 3, 5, 6]. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu hoàn thiện quy trình chiết xuất và tinh chế steviosid từ lá cỏ ngọt để có thể áp dụng vào sản xuất ở Việt Nam. Sản phẩm của quy trình chiết xuất - steviosid được xác định cấu trúc hóa học dựa trên số liệu phổ khối (MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Lá và mẫu cây cỏ ngọt được thu hái tại huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình vào tháng 5 năm 2011. Để thẩm định tên khoa học, đặc điểm hình thái của mẫu nghiên cứu được so sánh với bản mô tả của tài liệu Thực vật chí Việt Nam^[1]. Kết quả mẫu

nghiên cứu có tên khoa học là *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl., họ Cúc (Asteraceae). Lá cỏ ngọt được sấy ở 50 °C trong 3 giờ, xay nhỏ rồi bảo quản ở nhiệt độ phòng trong túi nilon kín.

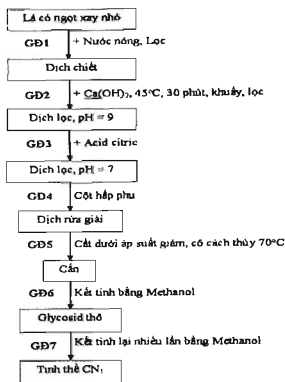
Phương pháp nghiên cứu

Chiết xuất và tinh chế steviosid từ lá cỏ ngọt

Quy trình chiết xuất và tinh chế steviosid từ lá cỏ ngọt gồm 7 giai đoạn chính được trình bày ở sơ đồ hình 1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chiết xuất glycosid thô: Nhựa hấp phụ, hệ dung môi rửa giải, nhiệt độ chiết xuất, thời gian chiết xuất, tỷ lệ được liệu/dung môi, số lần chiết xuất, từ đó lựa chọn được các thông số thích hợp cho quy trình chiết xuất glycosid thô. Glycosid thô được tinh chế bằng cách kết tinh lại trong methanol thu được chất tinh khiết ký hiệu là CN₁.

Xác định cấu trúc hóa học của CN₁

Cấu trúc hóa học của hợp chất CN₁ được xác định dựa trên các số liệu phổ khối (MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Phổ khối được đo trên máy AGILENT 6310 ION TRAP, phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy BRUKER AVANCE 500MHz NMR SPECTROMETER tại Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.



Hình 1: Sơ đồ tóm tắt quy trình chiết xuất và tinh chế steviosid từ lá cỏ ngọt

Kết quả và bàn luận

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chiết xuất glycosid thô

Bảng 1: Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chiết xuất glycosid thô và lựa chọn các thông số

TT	Yếu tố khảo sát	Thông số		TT	Yếu tố khảo sát	Thông số	
		Hiệu suất				Hiệu suất	
1	Nhựa hấp phụ	Amberlite XAD-7	2,17 %	4	Thời gian chiết xuất	3 giờ	2,27 %
		Diaion HP-20	2,31 %			4 giờ	2,31 %
		Amberlite XAD-2	Không kết tinh			5 giờ	2,31 %
2	Dung môi rửa giải cột	Methanol 75%	2,31 %	5	Tỷ lệ được liệu/ dung môi (kg/l)	1/1,5	2,12 %
		Ethanol 75%	2,31 %			1/2,5	2,20 %
						1/3,5	2,31 %
3	Nhiệt độ chiết xuất	55°C	2,17 %	6	Số lần chiết xuất	1 lần	2,31 %
		65°C	2,31 %			2 lần	2,39 %
		75°C	Không kết tinh			3 lần	2,39 %

Từ kết quả ở bảng 1, quy trình chiết xuất glycosid thô được tiến hành theo sơ đồ hình 1 với các thông số được lựa chọn như sau:

Giai đoạn 1 (GD1)

Dung môi chiết xuất: Nước nóng; Nhiệt độ chiết xuất: 65 °C. Số lần chiết xuất: 2 lần; Thời gian chiết xuất mỗi lần: 4 giờ; Tỷ lệ được liệu/ dung môi (kg/l): 1/3,5.

Trước tiên, khảo sát sự ảnh hưởng của các loại nhựa hấp phụ đến hiệu suất chiết xuất. Tiến hành chiết xuất theo sơ đồ hình 1 để thu được glycosid thô với các điều kiện ban đầu như sau:

Giai đoạn 1 (GD1)

Khối lượng được liệu đem chiết: 100,00 g; Dung môi chiết xuất: Nước nóng; Nhiệt độ chiết xuất: 65 °C; Tỷ lệ được liệu/dung môi (kg/l): 1/3,5; Thời gian chiết xuất: 4 giờ.

Giai đoạn 4 (GD4)

Loại tạp bằng cách cho dịch chiết qua cột hấp phụ. Khảo sát lần lượt với các loại nhựa hấp phụ Amberlite XAD-2, Amberlite XAD-7 và Diaion HP-20 (Sigma - Aldrich). Rửa giải cột bằng 500 ml methanol 75%; tốc độ rửa giải 3 ml/phút.

Tính hiệu suất chiết xuất glycosid thô cho thấy khi sử dụng nhựa Diaion HP-20 thu được hiệu suất cao nhất (2,31%). Vì vậy, trong tất cả các quy trình khảo sát tiếp theo, ở giai đoạn 4 (GD4), cột nhựa Diaion HP-20 được lựa chọn để loại tạp và tách glycosid thô.

Các yếu tố khác được khảo sát tương tự, từ đó lựa chọn được các thông số thích hợp cho kết quả được tóm tắt ở bảng 1. Khi lựa chọn được thông số nào thì sẽ áp dụng thông số đó cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo.

Giai đoạn 4 (GD4)

Cột nhựa Diaion HP-20; dung môi rửa giải: Ethanol 75%; tốc độ rửa giải: 3 ml/phút.

Tinh chế glycosid thô (GD6)

Tiến hành chiết xuất glycosid thô theo quy trình đã xây dựng với khối lượng được liệu chiết là 100,00 g thu được 2,13 g glycosid thô. Glycosid thô được đun hồi lưu trong 10 phút với

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

methanol, thêm than hoạt, lọc nóng, rửa than bằng 5 ml methanol. Gộp các dịch lọc. Dịch lọc được đem cất dưới áp suất giảm thu được cặn. Hòa tan cặn trong methanol, làm lạnh và để kết tinh ở nhiệt độ 0-5°C, lọc qua phễu Buchner thu được tinh thể (1,80 g). Tinh thể tiếp tục kết tinh lại lần 2 trong methanol ở nhiệt độ 0-5°C, lọc thu được tinh thể ký hiệu là CN₁ (1,67 g).

Glycosid thô, tinh thể sau khi kết tinh lần 1 và tinh thể sau khi kết tinh lần 2 (CN₁) được hòa tan trong methanol và định tính bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi CHCl₃:MeOH:H₂O (15:8:1). Hiện vết bằng dung dịch H₂SO₄ 10% trong cồn. Kết quả cho thấy glycosid thô vẫn còn lẫn tạp chất, cho 2 vết trên sắc ký đồ, sau khi kết tinh lần 1 độ tinh khiết đã tăng lên song vẫn còn 1 vết rất mờ ngoài vết chính trên sắc ký đồ. Sản phẩm sau khi kết tinh lần 2 tương đối tinh khiết, chỉ cho 1 vết trên sắc ký đồ. Do đó, phương pháp tinh chế được lựa chọn là kết tinh lại 2 lần trong methanol. Hiệu suất chiết xuất và tinh chế CN₁ là 1,87%.



1 2 3

Hình 2: Sắc ký đồ định tính sản phẩm các giai đoạn của quá trình chiết xuất

Ghi chú: 1: Glycosid thô, 2: Tinh thể kết tinh lần 1; 3: Tinh thể kết tinh lần 2

Xác định cấu trúc hóa học của CN₁

Phổ khối (MS): [M]⁺ = 805,40, ứng với công thức phân tử là C₃₈H₆₀O₁₈.

Số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của CN₁ được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Số liệu phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO) và ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO) của hợp chất CN₁

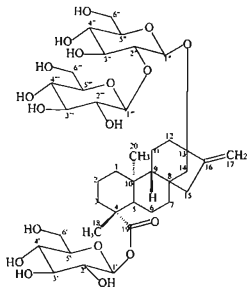
Vị trí C	¹ H-NMR (δ ppm)	¹³ C-NMR (δ ppm)	Vị trí C	¹ H-NMR (δ ppm)	¹³ C-NMR (δ ppm)
1	0,77 (m, 1H); 1,77 (m, 1H)	40,9	1'	5,25 (d, J = 8,0 Hz; 1H)	94,1
2	1,39 (m, 1H); 1,99 (m, 1H)	18,6	2'	3,50 (m, 1H)	82,6
3	1,05 (m, 1H); 2,17 (d, J = 13 Hz, 1H)	38,8	3'	3,48 (m, 1H)	76,6
4		46,8	4'	3,37 (m, 1H)	70,3
5	1,03 (m, 1H)	56,4	5'	3,35 (m, 1H)	76,9
6	1,77 (m, 1H); 1,94 (m, 1H)	20,0	6'	3,63 (m, 1H); 3,83 (m, 1H)	61,0
7	1,36 (m, 1H); 1,52 (m, 1H)	41,9	1"	4,45 (d; J = 7,5 Hz; 1H)	96,3
8		43,1	2"	3,61 (m, 1H)	77,0
9	0,91 (m, 1H)	53,1	3"	3,72 (m, 1H)	84,6
10		40,0	4"	3,37 (m, 1H)	70,3
11	1,19 (m, 1H); 1,70 (m, 1H)	21,2	5"	3,30 (m, 1H)	76,9
12	1,47 (m, 1H); 1,79 (m, 1H)	37,3	6"	3,63 (m, 1H); 3,82 (m, 1H)	60,6
13		84,6	1'''	4,35 (d; J = 8,0 Hz; 1H)	104,6
14	1,53 (m, 1H); 2,15 (d; J = 11,5 Hz; 1H)	47,0	2'''	3,16 (d; J = 8,0 Hz; 1H)	75,3
15	2,03 (m, 1H); 2,06 (d; J = 13,5 Hz; 1H)	46,8	3'''	3,60 (m, 1H)	76,9
16		153,5	4'''	3,15 (m, 1H)	72,5
17	4,71 (s, 1H); 5,02 (s, 1H)	104,5	5'''	3,44 (m, 1H)	77,6
18	1,13 (s, 3H)	28,0	6'''	3,63 (m, 1H); 3,82 (m, 1H)	61,0
19		175,6			
20	0,86 (s, 3H)	15,1			

Phổ ¹H-NMR chỉ ra sự có mặt của 2 nhóm methyl singlet ở δ 0,86 (H₂₀) và 1,13 (H₁₈). Hai proton olefinic của nối đôi exocyclic ở δ 4,71 và 5,02; 9 nhóm methylen và 2 nhóm methin nằm trong khoảng δ 0,77-2,15 đặc trưng cho

khung cấu trúc ent-kauran diterpenoid. Trên phổ ESI-MS của CN₁ cho thấy các mảnh ion ở 805,40; 643,40; 481,40 chứng tỏ sự có mặt của 3 đường hexose. Sự phân mảnh từ m/z 805,40 xuống 659,40 chứng tỏ sự có mặt của

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

cấu trúc deoxyhexose trong phân tử. Sự có mặt của 3 phân tử đường glucose trong CN₁ được thể hiện trên phổ ¹H-NMR với sự có mặt của 3 proton anomer ở δ 5,25 ppm (d, J = 8,0 Hz); 4,45 ppm (d, J = 7,5 Hz) và 4,35 ppm (d, J = 8,0 Hz). Các hằng số tương tác J được đối chiếu với các tài liệu tham khảo¹⁶⁻²¹ cho thấy các đường có hướng β. Phổ ¹³C-NMR chỉ ra sự có mặt của 38 carbon, trong đó có 20 carbon của khung ent-kauran (steviol) và 18 carbon của 3 đường. Sự có mặt của carbon trong cấu trúc steviol thể hiện ở nhóm carbonyl trong ester ở δ 175,6 ppm (C₁₉) và 1 carbon bậc 4 ở 153,5 ppm (C₁₂). 3 carbon anomer cho các tín hiệu δ 94,1 (C₁); 96,3 ppm (C₂) và 104,6 ppm (C₃). Từ sự phân tích các phổ MS và NMR cho thấy hợp chất CN₁ có khung cấu trúc ent-kauran diterpenoid với 1 nối đôi exocyclic ở vị trí C₁₅, 3 đường β-glucopyranose, trong đó 2 đường ở C₁₃ và 1 đường ở C₁₉. Do đó, dự đoán CN₁ là steviosid có cấu trúc được trình bày ở hình 3. Số liệu phổ của CN₁ được so sánh với số liệu phổ của steviosid đã được công bố trong tài liệu²² cho kết quả phù hợp.



Hình 3: Cấu trúc hóa học của chất CN₁ - steviosid

Căn cứ vào số liệu phổ khối và phổ cộng hưởng từ hạt nhân, chất CN₁ được xác định là steviosid.

Quy trình chiết xuất và tinh chế steviosid từ lá cỏ ngọt

Từ các kết quả được trình bày ở trên, quy trình chiết xuất và tinh chế steviosid từ lá cỏ ngọt được tiến hành như sau:

Bột lá cỏ ngọt được chiết hai lần bằng nước nóng ở 65°C, thời gian chiết mỗi lần là 4 giờ, tỷ lệ được liệu/dung môi (kg/l) là 1/3,5. Lọc nóng, gộp các dịch chiết. Thêm Ca(OH)₂ vào dịch chiết nước và điều chỉnh pH đến pH = 9, khuấy trong 30 phút ở 45°C. Hỗn dịch thu được đem lọc hút bằng phễu lọc Buchner thu được dịch lọc. Thêm acid citric vào dịch lọc và điều chỉnh pH đến pH = 7 thu được dịch chiết đã loại tạp. Dịch chiết đã loại tạp được đưa lên cột Diaion HP-20. Rửa giải cột bằng ethanol 75%, tốc độ rửa giải 3 ml/phút. Dịch rửa giải được cất dưới áp suất giảm rồi cô cách thủy ở 70°C đến cạn. Cặn được thêm methanol với tỷ lệ cặn/methanol 1/40 (g/ml) rồi đun hồi lưu trong 10 phút. Để nguội, làm lạnh và để kết tinh ở nhiệt độ 0-5°C. Lọc lấy tinh thể bằng phễu Buchner, rửa nhanh linh thể bằng môi thể tích tối thiểu methanol lạnh rồi đem sấy chân không thu được tinh thể glycosid thô. Glycosid thô được thêm methanol với tỷ lệ cặn/methanol 1/50 (g/ml) rồi đun hồi lưu trong 10 phút, thêm than hoạt với tỷ lệ 5%, lọc nóng thu được dịch lọc. Rửa than bằng thể tích tối thiểu methanol. Gộp các dịch lọc. Dịch lọc được đem cất dưới áp suất giảm thu được cặn. Hòa tan cặn trong methanol, làm lạnh và để kết tinh ở nhiệt độ 0-5°C, lọc qua phễu Buchner thu được tinh thể. Tinh thể này tiếp tục được kết tinh lại lần 2 trong methanol thu được tinh thể steviosid tinh khiết. Hiệu suất chiết xuất glycosid thô là 2,39%; hiệu suất chiết xuất steviosid là 1,87%.

Kết luận

Quy trình chiết xuất và tinh chế steviosid từ lá cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Hemsl.) đã được hoàn thiện để có thể áp dụng vào sản xuất ở Việt Nam. Quy trình đơn giản, dễ thực hiện, tiết kiệm được thời gian và chi phí, tương đối thân thiện với môi trường và cho hiệu suất chiết xuất là 1,87%. Dựa vào số liệu phổ khối (MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) đã nhận dạng chất chiết được sau khi tinh chế là steviosid.

Tài liệu tham khảo

1. Lê Kim Biên (2007), *Thực vật chí Việt Nam*, Tập 7, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, tr. 110-111.
2. Adari Bhaskar Rao, Emala Prasad, Goka Roopa, Sundergopal Sridhar (2012), "Simple extraction

and membrane purification process in isolation of steviosides with improved organoleptic activity", *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, pp. 327-335

3. Erkucuk A., Akgun I. H., Yesil-Celiktas O. (2009), "Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization", *The Journal of Supercritical Fluids*, 51, pp. 29-35.

4. Goyal S.K. et al. (2010), "Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review", *International Journal of Food and Nutrition*, 61(1), pp. 1-10.

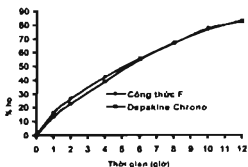
5. Munish Puri, Deepika Sharma, Colin J. Barrow, A. K. Tiwary (2012), "Optimisation of novel method for the extraction of Steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves", *Food Chemistry*, 132, pp. 1113-1120.

(Ngày nhận bài: 07/12/2013 - Ngày thông qua phản biện: 08/01/2014)

Nghiên cứu xây dựng... (Tiếp theo trang 11)

Bảng 4: Thành phần công thức viên công thức F

Thành phần	1 viên (mg)	%
Acid valproic	145,0	20,71
Natri valproat	333,0	47,57
HPMC K15M	115,0	16,43
HPMC 615	25,0	3,57
PVP K30	15,0	2,14
Dicalci phosphat dihydrat	10,0	1,43
Aerosil	39,8	5,69
Talc	6,8	0,97
Magnesi stearat	10,4	1,49
Tổng	700	100



Hình 4: Đồ thị GPDC của viên từ công thức F và Depakin Chrono 500 (Sanofi Aventis)

(Ngày nhận bài: 22/09/2013 - Ngày thông qua phản biện: 28/01/2014)

6. Venkata Sai Prakash Chaturvedula, Indra Prakash (2011), "A new diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*", *Molecules*, 16, 2937-2943

7 Venkata Sai Prakash Chaturvedula, Indra Prakash (2013), "Structural characterization and hydrolysis studies of Rebaudioside E, a minor sweet component of *Stevia rebaudiana*", *Eur. Chem. Bull.*, 2(5), pp. 298-302

8. Xin-Yi Huang, Jun-Fang Fu, Duo-Long Di (2010), "Preparative isolation and purification of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-speed counter-current chromatography", *Separation and Purification Technology*, 71, pp. 220-224.

Kết luận

Các kết quả của nghiên cứu đã chứng minh bằng cách sử dụng các polymer với kỹ thuật xát hạt ướt tạo khung matrix thân nước, có thể thiết kế được viên nén chứa AV và NV dạng GPKD, có tốc độ GPDC tương đương với sản phẩm Depakine Chrono 500. Với độ GPDC đã đạt được, công thức F có thể được sử dụng để tiếp tục thực hiện các nghiên cứu tiếp theo gồm bao màng chống ẩm, nâng cấp cỡ lô và hoàn thiện qui trình sản xuất sản phẩm.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2009), *Dược thư quốc gia*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 127-130.

2. VA Pharmacy Benefits Management Strategic Healthcare Group and Medical Advisory Panel (2006), *Depakote EC versus Depakote ER*.

3. Phaechamud T., Mueannoorn W., Tuntarawongsa S., Chitrattha S. (2010), "Preparation of coated valproic acid and sodium valproate sustained-release matrix tablets", *Ind. J. Pharm. Sci.*, 72 (2), 173-183.

4. Chakraborty S., Pandit J. K., Srinatha A. (2009), "Development of extended release divalproex sodium tablets containing hydrophobic and hydrophilic matrix", *Curr. Drug Deliv.*, 6 (3), 291-296.

5. *United States Pharmacopoeia* 34.