

## CHIẾT XUẤT STEVIOSID VÀ REBAUDIOSID A TỪ CÂY CỎ NGỌT (*STEVIA REBAUDIANA BERTONI*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP XANH

Đình Trường Sơn<sup>1</sup>, Lâm Bích Thảo<sup>1</sup>, Nguyễn Nhật Minh<sup>1</sup>,  
Nguyễn Văn Trí<sup>1</sup>, Lê Văn Minh<sup>1\*</sup> và Nguyễn Đan Thảo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Đại học Bách Khoa TP. Hồ Chí Minh

(\*Email: lvminh05@gmail.com)

**Ngày nhận:** 11/3/2022

**Ngày phản biện:** 10/4/2022

**Ngày duyệt đăng:** 29/4/2022

### TÓM TẮT

Nghiên cứu tiến hành khảo sát và tối ưu hóa quy trình tách chiết các steviol glycosid từ cỏ ngọt. Quy trình tách chiết bao gồm các bước: Chiết xuất cỏ ngọt, loại màu dịch chiết bằng phương pháp gia vôi và tinh chế các steviol glycosid bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion. Quy trình sử dụng “phương pháp xanh” để thu nhận các chất ngọt từ cỏ ngọt mà không sử dụng các dung môi hữu cơ trong quá trình chiết tách. Cỏ ngọt sau khi chiết nóng với nước thu cao lỏng được gia vôi với tỉ lệ 1/1 (kl/kl) ở 5°C trong 10 phút để loại bỏ các tạp chất và màu. Sau đó, dịch chiết tiếp tục được triển khai qua lần lượt cột sắc ký trao đổi anion và cation để tinh chế hoạt chất. Kết quả khảo sát đã ghi nhận điều kiện sắc ký tối ưu ở cột anion: tỉ lệ cao chiết/nhựa là 1/4 (kl/kl), số lần chạy là 3 lần, tốc độ dòng là 10 mL/phút; ở cột cation: tỉ lệ cao chiết/nhựa là 4/1 (kl/kl), số lần chạy là 1 lần, tốc độ dòng là 15 mL/phút. Hiệu suất chiết tách của 2 quy trình tinh chế lần lượt là 2,12% và 2,31%.

**Từ khóa:** Ca(OH)<sub>2</sub>, cỏ ngọt, rebaudiosid A, sắc ký trao đổi ion, steviosid

Trích dẫn: Đình Trường Sơn, Lâm Bích Thảo, Nguyễn Nhật Minh, Nguyễn Văn Trí, Lê Văn Minh và Nguyễn Đan Thảo, 2022. Chiết xuất steviosid và rebaudiosid A từ cây cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana bertoni*) bằng phương pháp xanh. Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô. 15: 205-217.

\*TS. Lê Văn Minh – Giám đốc Trung Tâm Sâm và Dược Liệu TP. Hồ Chí Minh

## 1. GIỚI THIỆU

Cây cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bertoni) là loại thảo dược có nguồn gốc từ Nam Mỹ, hiện nay đã được trồng ở Việt Nam. Lá cỏ ngọt có chứa nhiều các hợp chất steviol glycosid như steviosid, rebaudiosid A, rebaudiosid C, rebaudiosid B, rebaudiosid D, rebaudiosid E và dulcosid A (Kinghorn và Soejarto, 1991). Trong đó độ ngọt của rebaudiosid A gấp 250 - 450 lần so với đường mía và steviosid ngọt gấp 150 - 300 lần so với đường mía (Cramer và Ikan, 1986). Các steviol glycosid là loại chất tạo ngọt tự nhiên, không sinh năng lượng, hỗ trợ điều trị một số bệnh lý như đái tháo đường (Lailerd *et al*, 2004), rối loạn lipid huyết, tăng huyết áp (Dyrs *et al*, 2005). Ngoài ra, các steviol glycosid còn có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, kháng viêm (Ghosh *et al*, 2008). Hai hợp chất steviosid và rebaudiosid A là các steviol glycosid có độ ngọt cao, chiếm hàm lượng lớn trong cỏ ngọt đang là đối tượng được lựa chọn để làm sản phẩm chất tạo ngọt thay thế các chất tạo ngọt hóa học.

Ở Việt Nam có một số nghiên cứu đã tiến hành phân lập và tinh sạch các steviol glycosid từ cỏ ngọt, tuy nhiên hiệu suất tách chiết của các phương pháp này vẫn còn khá thấp 0,1 - 2% và quy trình tách chiết sử dụng nhiều loại dung môi hữu cơ, không an toàn cho sức khỏe người dùng, khó áp dụng trên quy mô lớn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá “phương pháp xanh” tách chiết các steviol glycosid từ cỏ ngọt. Đây là phương pháp tách chiết đơn giản, sử dụng các dung môi ít độc hại với hiệu suất tách

chiết tương đối cao, có khả năng áp dụng trên quy mô công nghiệp.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

*Nguyên liệu:* Lá cỏ ngọt được sấy khô có độ ẩm đạt theo tiêu chuẩn Dược Điển Việt Nam V (Bộ Y Tế, 2017)  $\leq 13\%$  và xay thành bột mịn (qua rây 355), lưu giữ trong túi nilon kín bảo quản nơi khô mát. Mẫu được thu hái tại Thanh Hóa (vào tháng 03/2021).

*Dung môi và chất chuẩn:* Ca(OH)<sub>2</sub> (Việt Nam), aceton (Merck), *iso*-propanol (Merck), Amberlite IRP64 (Đức), Amberlite FPA98CI (Đức), steviosid (Sigma-Aldrich, CAS 57817-89-7); rebaudiosid A (Sigma-Aldrich, CAS 58543-16-1).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**Qui trình thực hiện:** Chiết xuất cỏ ngọt với dung môi nước thu cao lỏng, cao lỏng được loại màu sơ bộ bằng phương pháp gia vôi và tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhựa trao đổi ion.

#### 2.2.1. Chiết xuất cao lỏng cỏ ngọt

Quy trình chiết xuất cỏ ngọt được tiến hành theo báo cáo của Hồ Thị Mỹ Linh (2018) bằng cách lấy 1,0 kg bột lá cỏ ngọt chiết hồi lưu trong cách thủy với nước theo tỷ lệ dược liệu/nước là 1/20 (g/mL) trong 60 phút ở nhiệt độ 90 °C. Lọc dịch chiết qua giấy lọc Whatman No.1 và tiến hành cô bay hơi dung môi bằng máy cô quay chân không (Buchi R-300, Thụy Sĩ) ở 70 °C thu cao lỏng.

### 2.2.2. Gia vôi

Gia vôi là phương pháp loại màu và tạp sử dụng  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , các điều kiện gia vôi của dịch chiết cỏ ngọt theo nghiên cứu trước đây của Abou-Arab *et al.* (2010) và Lemus-Mondaca *et al.* (2012) với tỷ lệ cao/ $\text{Ca}(\text{OH})_2 = 1/1$  (g/g), ở nhiệt độ 5 °C trong 10 phút và loại tủa với chất trợ lọc diatomite. Dịch sau khi loại tủa được trung hòa bằng acid citric đến pH = 7.

### 2.2.3. Tinh chế hoạt chất

Dịch sau gia vôi được tinh chế các hoạt chất bằng cách tiến hành sắc ký trao đổi ion (qua cột anion và sau đó là qua cột cation), các thông số được khảo sát để tối ưu hóa điều kiện sắc ký trao đổi ion gồm: Tỷ lệ cao/nhựa (g/g), số lần chạy cột và tốc độ dòng chảy (mL/phút). Mỗi thí nghiệm được khảo sát lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

**a) Khảo sát tỷ lệ cao/nhựa (g/g):** Lấy 200 mL dịch lọc cho chảy qua cột có khối lượng nhựa với tỷ lệ khối lượng cao/nhựa lần lượt 1/1; 1/2; 1/3; 1/4 (cột anion) và tỷ lệ khối lượng cao/khối lượng nhựa lần lượt 4/1; 2/1; 1/1; 1/2 (cột cation) với tốc độ dòng 10 mL/phút.

**b) Khảo sát số lần chạy cột:** Lấy 200 mL dịch lọc cho chảy qua cột có khối lượng nhựa với tỷ lệ khối lượng cao/ khối lượng nhựa đã được khảo sát, cột anion có tốc độ dòng là 10 mL/phút với số lần khảo sát 1; 2; 3; 4 lần và cột cation có tốc độ 12 mL/phút với số lần chạy khảo sát 1; 2; 3 lần.

**c) Khảo sát tốc độ dòng chảy:** Lấy 200 mL dịch lọc tiến hành với các điều kiện thích hợp đã khảo sát ở trên, khảo sát qua

cột anion và cation với tốc độ dòng chảy lần lượt là 2,5; 5; 10; 15; 20 mL/phút.

Quá trình gia vôi và tinh chế hoạt chất được kiểm tra định tính bằng sắc ký lớp mỏng với bản mỏng silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) khai triển với hệ dung môi pha động *n*-butanol - acid acetic - nước (4 : 1 : 5) và phát hiện vết chất thuốc thử  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%. Đồng thời đo quang phổ tại vùng Vis (bước sóng 420 nm và 670 nm) bằng máy đo phổ UV-Vis (Beckman Coulter DU-730, Đức) để xác định độ mất màu và đo độ giảm màu sắc ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) bằng máy đo màu (CHN Spec CS-520, Trung Quốc) để xác định độ khác biệt màu sắc  $\Delta E$ .

### 2.2.4. Các công thức tính

**a) Xác định độ mất màu:** Độ mất màu được xác định theo công thức của Fuh và Chiang (1990):

$$\text{Độ mất màu} = 1 - \frac{A_{420 \text{ sau}} \text{ (hoặc } A_{670 \text{ sau}})}{A_{420 \text{ trước}} \text{ (hoặc } A_{670 \text{ trước}})}$$

( $A_{420}$ ,  $A_{670}$  là độ hấp thụ ở 420 nm và 670 nm, trước và sau khi chạy cột)

**b) Đo cường độ màu:** Độ khác biệt màu sắc ( $\Delta E$ ) được xác định theo công thức của Vega-Galves (2012):

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(L^* - L_0)^2 + (a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2}$$

( $L_0$ ,  $a_0$ ,  $b_0$ : Giá trị trước khi loại màu;  
 $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ : Giá trị sau loại màu)

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Steviol glycosid là các diterpen glycosid có khung aglycol là steviol liên kết với một hoặc nhiều phân tử đường, trong đó steviosid và rebaudiosid A là các

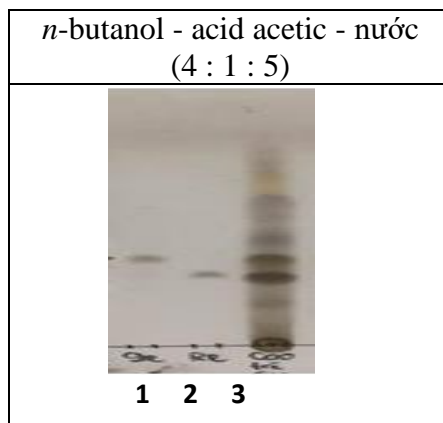
steviol glycosid chiếm hàm lượng chủ yếu trong cỏ ngọt. Các steviol glycosid được dùng làm chất tạo ngọt tự nhiên, có tính an toàn cao, hiện nay được sử dụng nhiều làm phụ gia trong kỹ nghệ thực

phẩm và dược phẩm để tạo độ ngọt cho sản phẩm. Steviol glycosid được thu nhận chủ yếu từ cây Cỏ ngọt với các phương pháp hóa lý khác nhau.

### 3.1. Chiết xuất cao cỏ ngọt

**Bảng 1. Hiệu suất chiết cao cỏ ngọt**

Khối lượng nguyên liệu (kg)	Khối lượng cao (kg)	Độ ẩm nguyên liệu (%)	Độ ẩm cao (%)	Hiệu suất chiết (%)
1,0	0,67	10,7	65,6	25,81



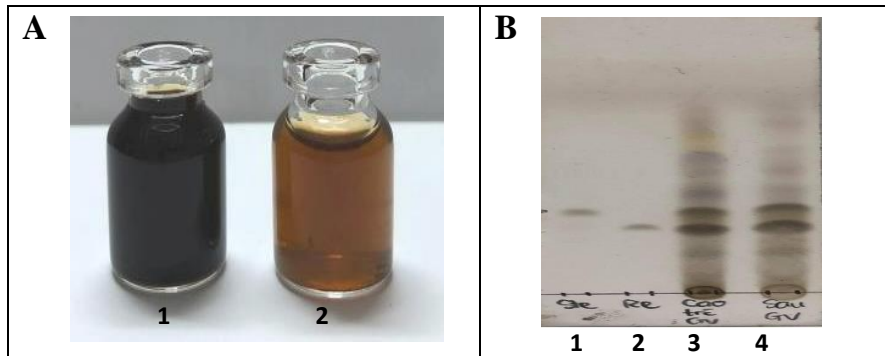
**Hình 1. Sắc kí đồ sự hiện diện steviosid và rebaudiosid A trong cao lỏng cỏ ngọt**

1: chuẩn steviosid, 2: chuẩn rebaudiosid A, 3: cao lỏng cỏ ngọt

Sắc kí đồ cho thấy vết thử cao cỏ ngọt sau khi khai triển sắc ký lớp mỏng trên hệ dung môi *n*-butanol - acid acetic - nước (4 : 1 : 5) có sự hiện diện của 2 vết chất có màu sắc và giá trị  $R_f$  tương đồng với 2 chuẩn steviosid và rebaudiosid A (Hình 1).

### 3.2. Gia vôi

Cao lỏng cỏ ngọt tiến hành cho gia vôi với  $\text{Ca(OH)}_2$  theo tỷ lệ cao/ $\text{Ca(OH)}_2$  là 1/1 (g/g), ở nhiệt độ 5 °C trong 10 phút, dịch sau khi gia vôi có pH = 11 và được trung hòa bằng acid citric đến pH = 7. Kết quả kiểm tra định tính bằng TLC, đo quang phổ để xác định độ mất màu và đo màu để xác định độ khác biệt màu sắc (Bảng 2).



**Hình 2A. Dịch chiết cao cỏ ngọt trước (1) và sau gia vôi (2)**

**Hình 2B. Sắc ký đồ định tính cao cỏ ngọt trước khi gia vôi và sau khi gia vôi**

*1: chuẩn steviosid, 2: chuẩn rebaudiosid A, 3: cao trước gia vôi, 4: cao sau gia vôi*

**Bảng 2. Thông số dịch cỏ ngọt sau khi gia vôi**

	Độ mất màu (420 nm)	Độ mất màu (670 nm)	Độ khác biệt màu sắc ΔE		
			L*	a*	b*
Dịch trước gia vôi	3,55±0,16	2,84±0,07	15,68±0,36	1,30±0,12	8,45±0,33
Dịch sau gia vôi	3,19±0,11	1,52±0,09	31,94±0,13	3,11±0,04	15,49±0,21
Độ mất màu (%)	10,14±0,33	46,32±0,25		17,81±0,47	

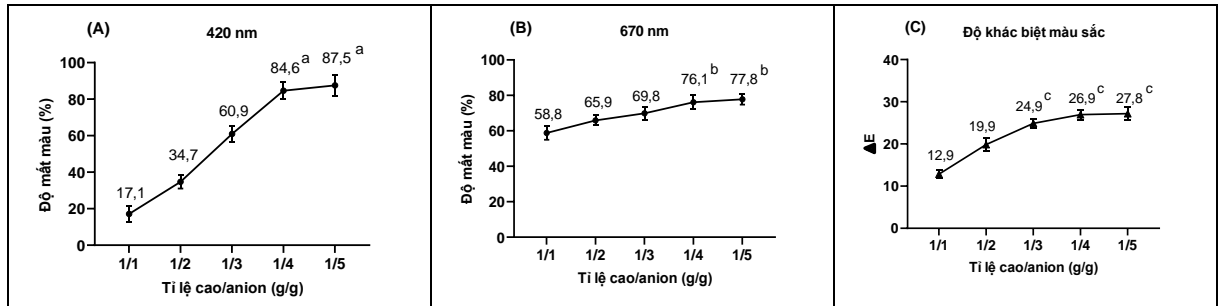
Kết quả ở Bảng 2 cho thấy quá trình gia vôi đã loại bỏ được phần lớn sắc tố diệp lục hấp thu ở hai bước sóng 420 nm (giảm 10,14%) và 670 nm (giảm 46,32%). Do đó, màu sắc của dịch chiết sau khi gia vôi giảm đi đáng kể so với trước khi gia vôi Hình 2A. Độ giảm màu của báo cáo cũng phù hợp với nghiên cứu của Abou-Arab *et al.* (2010) khi hiệu quả loại màu và tạp khi gia vôi đo ở 420 nm

và 760 nm lần lượt là 23,2% và 41,92%. Ngoài ra, sắc ký đồ định tính ở Hình 2B cũng cho thấy, quá trình xử lý với vôi đã loại được một số vết tạp chất kém phân cực mà không làm mất đi các steviol glycosid. Điều này cho thấy tác dụng đáng kể của quá trình xử lý với vôi giúp loại được tương đối các tạp chất màu tạo thuận lợi cho giai đoạn tinh chế kế tiếp bằng sắc ký trao đổi ion.

### 3.3. Tinh chế hoạt chất

#### 3.3.1. Khảo sát quá trình trao đổi anion

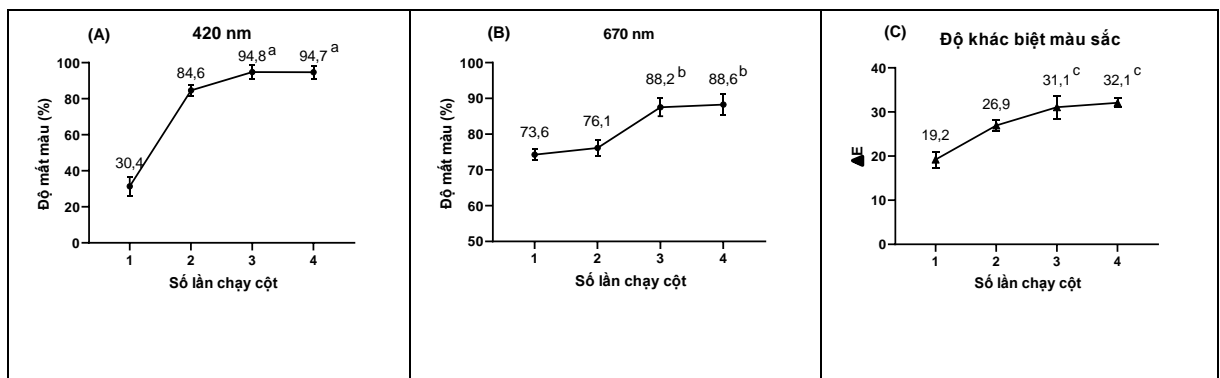
##### a) Tỷ lệ cao/nhựa



**Hình 3. Độ mất màu ở bước sóng 420 nm (A), độ mất màu ở bước sóng 670 nm (B) và độ khác biệt màu sắc ΔE (C) của các dịch chiết theo tỷ lệ cao/nhựa cột anion**

(a:  $p = 0,1961$ , b:  $p = 0,8040$ , c:  $p > 0,05$ )

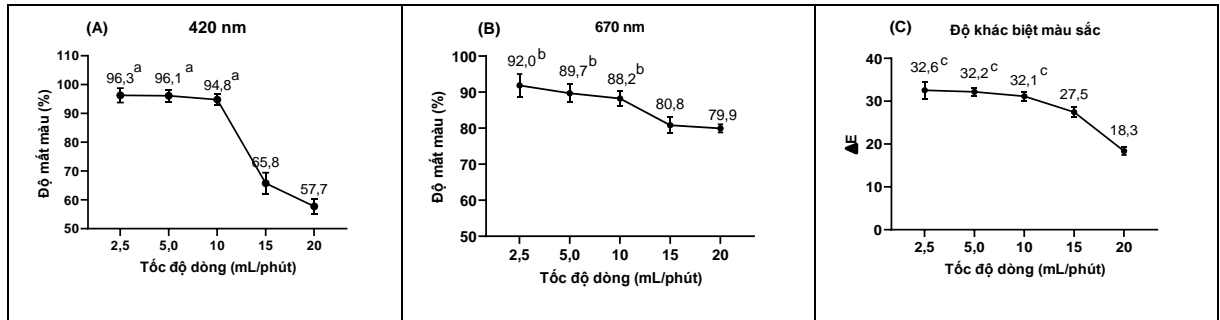
##### b) Số lần chạy cột



**Hình 4. Độ mất màu ở bước sóng 420 nm (A), độ mất màu ở bước sóng 670 nm (B) và độ khác biệt màu sắc ΔE (C) của các dịch chiết theo số lần chạy cột anion**

(a:  $p > 0,9999$ , b:  $p = 0,9893$ , c:  $p = 0,9744$ )

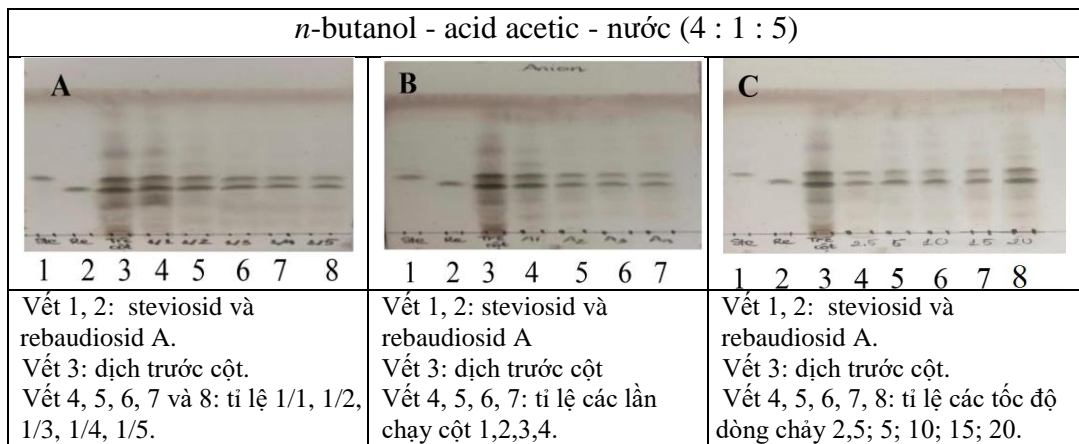
**c) Tốc độ dòng chảy**



**Hình 5. Độ mất màu ở bước sóng 420 nm (A), độ mất màu ở bước sóng 670 nm (B) và độ khác biệt màu sắc ΔE (C) của các dịch chiết theo tốc độ dòng cột anion**

(a:  $p > 0,05$ , b:  $p > 0,05$ , c:  $p > 0,05$ )

**d) Định tính dịch qua cột anion bằng sắc ký lớp mỏng**



**Hình 6. Sắc kí đồ định tính các dịch chiết khảo sát tỷ lệ cao/nhựa (A), số lần chạy cột (B) và tốc độ dòng chảy (C) cột anion**

Kết quả khảo sát tỷ lệ cao/nhựa cho thấy độ giảm màu tăng dần từ tỷ lệ 1/1 đến 1/5, trong đó tỷ lệ 1/4 và 1/5 độ giảm sắc không có khác biệt ( $p = 0,1961$ ). Vì vậy, để tiết kiệm nhựa lựa chọn tỷ lệ cao/nhựa là 1/4. Khi tăng số lần chạy cột từ 1 đến 5 lần thì thấy rằng màu sắc dịch chiết nhạt dần, tuy nhiên kết quả sau chạy cột 3 và 4 lần có độ giảm màu không có

khác biệt ( $p = 0,8040$ ). Do đó để tiết kiệm thời gian số lần chạy được lựa chọn cho cột anion là 3 lần. Mặt khác, trong thí nghiệm khảo sát tốc độ dòng theo mức tăng dần từ 2,5 đến 20 mL/phút thấy rằng tốc độ càng cao thì khả năng loại màu của cột anion càng kém, độ giảm màu của dịch chiết sẽ giảm đi khi tốc độ dòng tăng từ 2,5 đến 20 mL/phút. Tuy nhiên, kết quả

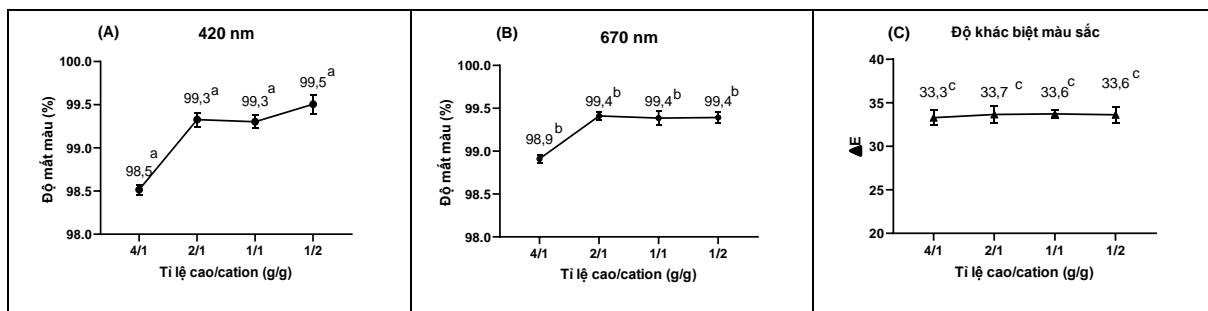
đánh giá thống kê cho thấy ở các tốc độ 2,5; 5; 10 mL/phút độ giảm màu là không khác biệt ( $p > 0,05$ ) và hiệu quả hơn so với hai tốc độ còn lại ( $p < 0,001$ ). Để tiết kiệm thời gian tốc độ dòng được lựa chọn là 10 mL/phút. Quan sát sắc ký đồ định tính cho thấy các mẫu dịch cỏ ngọt sau khi qua cột anion vẫn có sự hiện diện của hai chất ngọt steviosid và rebaudiosid A (Hình 6).

Sau quá trình khảo sát các yếu tố, các điều kiện phù hợp được lựa chọn để chạy cột anion lần lượt là tỷ lệ cao/nhựa 1/4 (g/g); số lần chạy cột là 3 lần với tốc độ

dòng chảy là 10 mL/phút. Kết thúc quá trình chạy cột với các điều kiện trên, dịch chiết thu được có độ mất màu 94,8% (420 nm) và 88,2% (670 nm); độ khác biệt màu sắc  $\Delta E$  là 31,08. Dựa vào các kết quả cho thấy quá trình trao đổi anion đã loại bỏ lượng lớn các chất màu và tạp ra khỏi dịch chiết mà vẫn đảm bảo được độ bền các chất ngọt, đem lại hiệu quả cũng như tiềm năng trong việc tinh chế chất ngọt ở quy mô công nghiệp.

### 3.3.2. Khảo sát quá trình trao đổi cation

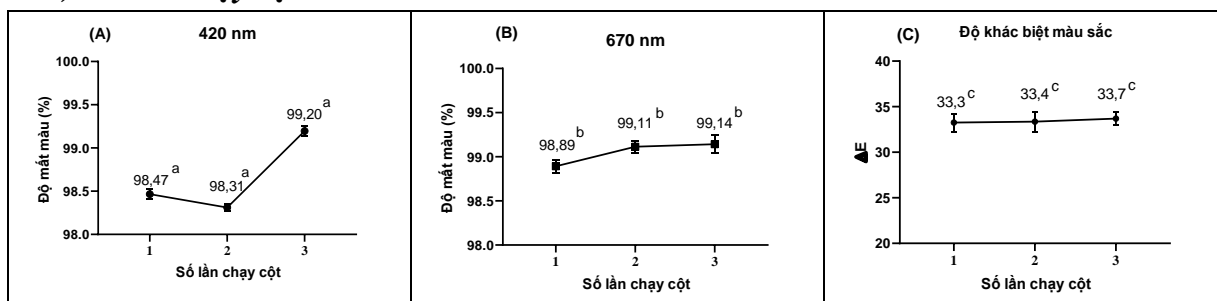
#### a) Khảo sát tỷ lệ cao/nhựa cation



**Hình 7. Độ mất màu ở bước sóng 420 nm (A), độ mất màu ở bước sóng 670 nm (B) và độ khác biệt màu sắc  $\Delta E$  (C) của các dịch chiết theo tỷ lệ cao/nhựa cột cation.**

(a:  $p > 0,05$ , b:  $p > 0,05$ , c:  $p > 0,05$ )

#### b) Số lần chạy cột

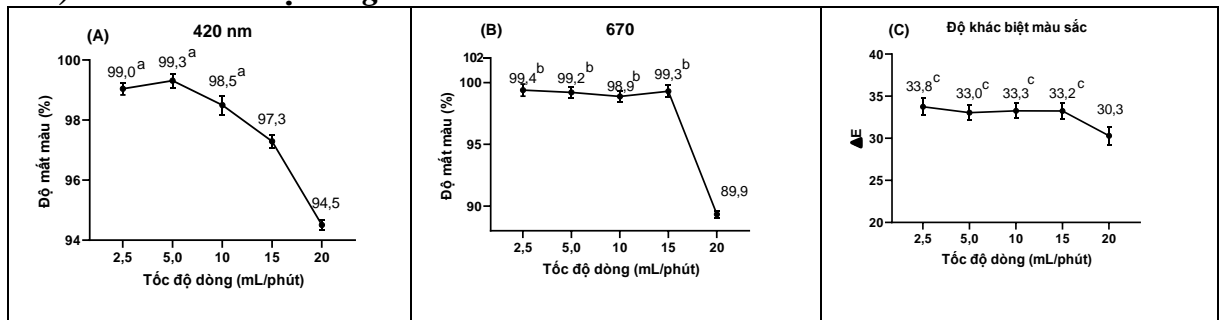


**Hình 8. Độ mất màu ở bước sóng 420 nm (A), độ mất màu ở bước sóng 670 nm (B) và độ khác biệt màu sắc  $\Delta E$  (C) của các dịch chiết theo số lần chạy cột cation.**

(a:  $p > 0,05$ , b:  $p > 0,05$ , c:  $p > 0,05$ )



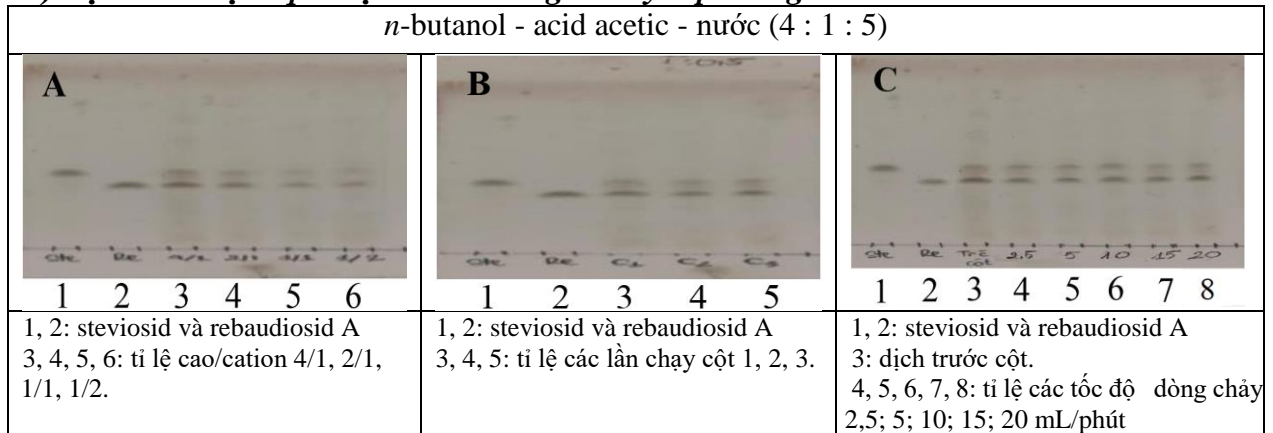
**c) Khảo sát tốc độ dòng**



**Hình 9. Độ mất màu ở bước sóng 420 nm (A), độ mất màu ở bước sóng 670 nm (B) và độ khác biệt màu sắc ΔE (C) của các dịch chiết theo tốc độ dòng chảy cột cation.**

(a:  $p > 0,05$ , b:  $p > 0,05$ , c:  $p > 0,05$ )

**d) Định tính dịch qua cột cation bằng sắc ký lớp mỏng**



**Hình 10. Sắc kí đồ định tính các dịch chiết khảo sát tỷ lệ cao/nhựa (A), số lần chạy cột (B) và tốc độ dòng chảy (C) cột cation**

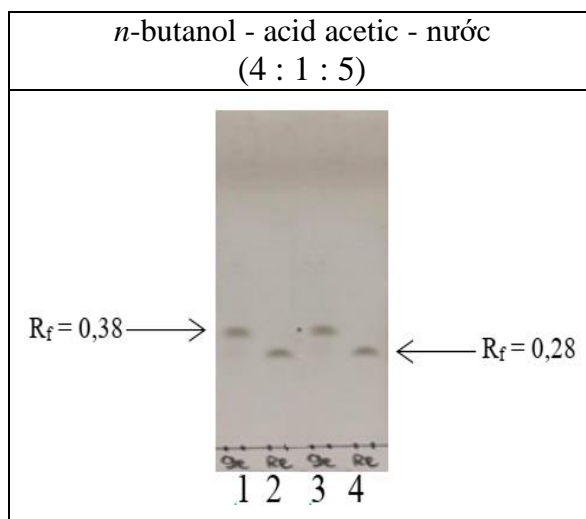
Kết quả khảo sát khối lượng cao/nhựa cation ở các tỉ lệ 4/1, 2/1, 1/1 và 1/2 cho thấy không có sự khác biệt về độ giảm màu và độ thay đổi màu sắc ( $p > 0,05$ ). Khi tăng số lần chạy cột từ 1 đến 3 lần, độ giảm màu và thay đổi màu sắc tương đương nhau ( $p > 0,05$ ). Mặt khác, kết quả khảo sát tốc độ dòng chảy, ở tốc độ 2,5; 5; 10; 15 mL/phút cho kết quả độ giảm màu tương đương ( $p > 0,05$ ) và tốt hơn so với tốc độ 20 mL/phút ( $p < 0,001$ ). Sau

quá trình khảo sát các yếu tố, các điều kiện phù hợp được lựa chọn để tinh chế cao lần lượt là tỷ lệ cao/nhựa cation 4/1 (g/g); số lần chạy cột 1 lần và tốc độ dòng chảy 15 mL/phút. Kết thúc quá trình chạy cột với các điều kiện trên, độ mất màu của dịch đạt đến 97,3% (420 nm) và 99,3% (670 nm); độ khác biệt màu sắc ΔE đạt 33,21. Quá trình sắc ký với nhựa cation được sử dụng để loại lượng màu và tạp còn sót lại trong dịch cỏ ngọt mà cột

anion chưa loại được. Do lượng tạp chất chủ yếu đã được loại trong giai đoạn gia vôi và sắc ký với nhựa anion nên quá trình trao đổi cation sử dụng lượng nhựa và số lần chạy cột ít hơn đáng kể so với cột trao đổi anion. Định tính bằng sắc ký lớp mỏng thì các mẫu dịch cỏ ngọt sau khi trao đổi cation vẫn có sự hiện diện của các chất ngọt steviosid và rebaudiosid A (Hình 10).

### 3.3.3. Tinh chế steviosid và rebaudiosid A

Cao lỏng cỏ ngọt sau khi xử lý gia vôi và tinh chế với sắc ký trao đổi ion sẽ được cô bay hơi dung môi thu nhận cao tinh chế. Hòa tan cao trong acetone, phần không tan được rửa nhiều lần với ethanol tinh khiết 80% thu được rebaudiosid A, dịch hòa tan cho bay hơi acetone và rửa nhiều lần bằng *iso*-propanol tinh khiết thu được steviosid.



**Hình 11. Sắc kí lớp mỏng sản phẩm tinh chế đối chiếu với chất chuẩn**

1: chuẩn steviosid, 2: chuẩn rebaudiosid A, 3: steviosid tinh chế, 4: rebaudiosid A tinh chế.

Kết quả kiểm tra sắc kí lớp mỏng cho thấy sản phẩm tinh chế có  $R_f$  và màu sắc tương đồng với hai chất chuẩn steviosid

và rebaudiosid A đối chiếu chứng tỏ hai sản phẩm tinh chế thu được là steviosid và rebaudiosid A.

**Bảng 3. Khối lượng và hiệu suất tinh chế các steviol glycosid**

	Nguyên liệu	Cao lỏng thô	Cao tinh chế	Steviosid	Rebaudiosid A
Khối lượng (g)	1000	670	280	18,90	20,65
Độ ẩm (%)	10,7	65,60	2,25		
Hiệu suất (%)		25,81	30,65	2,12	2,31

Hiệu suất thu nhận steviosid và rebaudiosid A từ lá cỏ ngọt lần lượt là 2,12% và 2,31% tính trên khối lượng nguyên liệu khô. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Gupta *et al* (2013) đánh giá hàm lượng steviosid là 2 - 10% và rebaudiosid A là 1 - 5%. Trước đây, nhiều báo cáo tách chiết steviol glycosid sử dụng phương pháp chiết phân đoạn cố định với *n*-butanol, sau đó tiến hành kết tinh lại trong ethanol hoặc methanol cho hiệu suất thu nhận steviosid và rebaudiosid A khá cao (từ 5 - 8%) (Kovylyayeva *et al*, 2007). Tuy nhiên, phương pháp này sử dụng nhiều dung môi độc hại và sản phẩm steviol glycosid thu nhận không thể sử dụng trong thực phẩm và dược phẩm. Ngoài ra, phương pháp chiết với *n*-butanol sử dụng lượng dung môi lớn chi phí cao, khó thu hồi, tái sử dụng như nhựa trao đổi ion. Do đó, việc sử dụng nhựa trao đổi ion là phương pháp tối ưu, tiết kiệm chi phí, có tiềm năng nâng cấp ở quy mô lớn trong việc tách chiết steviol glycosid từ cỏ ngọt.

#### 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, các steviol glycosid được tách chiết bằng phương pháp xanh, sử dụng các dung môi thân thiện với môi trường nhằm tách chiết các steviol glycosid với tính an toàn cao có thể phát triển trên quy mô công nghiệp. Trước tiên, Cỏ ngọt được chiết hồi lưu trong cách thủy với nước thu cao lỏng chứa chất tạo ngọt (hiệu suất chiết 25,81%). Tiếp theo các steviol glycosid được tinh chế qua 3 giai đoạn (1) gia vôi, (2) sắc ký trao đổi anion và (3) sắc ký trao đổi cation. Các quá trình đã được khảo sát và xử lý thống kê để chọn được các thông

số tối ưu. Hiệu suất tinh chế hai hoạt chất steviosid và rebaudiosid A bằng dung môi xanh lần lượt là 2,12 % và 2,31 %. Steviosid và rebaudiosid A được chiết xuất từ cây cỏ ngọt và tinh chế theo quy trình, sử dụng dung môi xanh cho hiệu suất cao, có thể ứng dụng trong quy mô công nghiệp.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abou-Arab, A. Esmat, A. Azza, Abu-Salem, M. Ferial, 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. African Journal of Food Science, vol.4(5): 269-281.
2. Bộ Y tế, 2017. Dược điển Việt Nam. Hà Nội. Nhà xuất bản Y học. vol.5: 1116-1117.
3. Cramer B, Ikan R., 1986. Sweet glycosides from the Stevia plant. Chemistry in Britain, vol.22: 915-916.
4. Dyrskog S.E., Jeppensen P.B., Colombo M., Abudula R., Hermansen K., 2005. Preventive effects of soy based diet supplemented with stevioside on development of type 2 diabetes. Metabolism, vol.54: 1181-1188.
5. Fuh, W.S., Chiang, B.H., 1990. Purification of Steviosides by Membrane and Ion Exchange Processes. Journal of Food Science, vol.55(5): 1454-1457.
6. Ghosh S., Subhudhi E., Nayak S., 2008. Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogen. International Journal of Integrative Biology, vol.2(1): 27-31.

7. Hồ Thị Mỹ Linh, 2018. Nghiên cứu quy trình chiết các hợp chất steviol glycoside từ Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* B.). Luận văn Thạc sĩ, Đại học Bách Khoa TPHCM.

8. Kinghorn A.D, Soejarto D.D., Nabors L.B., Gelardi R.C., 2012. Alternative Sweeteners. New York: Marcel Dekker, 157-171.

9. Lailerd N., Saengsirisuwan V., Sloniger J.A., Toskulkao C, Henriksen E.J., 2004. Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Metabolism*, vol.53, 101-107.

10. Gasmalla M. A. A., Yang R., Musa A., Hua X., Zhang W., 2014. Physico-chemical Assessment and Rebaudioside A. Productively of Natural Sweeteners (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Journal of Food and Nutrition Research*, vol.2(5): 209-214.

11. Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., Zura-Bravo L., Ah-Hen K., 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A

comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, vol.132(3): 1121-1132.

12. Vega-Gálvez A., Ah-Hen K., Chacana M., Vergara J., Martínez-Monzó J., García-Segovia P., Lemus-Mondaca R., Di Scala K., 2012. Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chemistry*, vol.132, 51-59.

13. Gupta E., Purwar S., Sundaram S., Rai G. K., 2013. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol.7(46), 3343-3353.

14. Kovylyaeva G. I., Bakaleinik G. A., Strobykina I. Y., Gubskaya V. I., Sharipova R. R., Al'Fonsov V. A., Tolstikov A. G., 2007. Glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds*, vol.43(1), 81-85.

## **ISOLATED AND PURIFIED STEVIOSIDE AND REBAUDIOSIDE A FROM STEVIA (*STEVIA REBAUDIANA* BERTONI) BY GREEN METHOD**

Dinh Truong Son<sup>1</sup>, Lam Bich Thao<sup>1</sup>, Nguyen Nhat Minh<sup>1</sup>,  
Nguyen Van Tri<sup>1</sup>, Le Van Minh<sup>1\*</sup> and Nguyen Dan Thao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Ho Chi Minh City Research Center of Ginseng and Medicinal Materials*

<sup>2</sup>*University of Technology - Viet Nam National University HCMC*

(\*Email: lvminh05@gmail.com)

### **ABSTRACT**

*This study was carried out to investigate and optimize the process of purifying steviol glycosides from stevia. The extraction procedure consisted of three steps: Extracting stevia with water, color removal by liming, and purifying steviol glycosides by ion exchange chromatography. The study used a “green method” to obtain sweeteners from stevia without using organic solvents. The crude stevia extraction procedure was adding lime to remove impurities and color. The resulting de-pigmentation fluid was further purified by ion exchange processes. The results showed that the optimal anion exchange condition was the stevia extract/anion ratio of 1/4 (w/w); the number of column runs were 3 times; and the flow rate was at 10 mL/min. For the cation exchange process, the effective removal condition was the stevia extract/cation ratio of 4/1(w/w); the number of column runs was 1 time; and the flow rate was at 15 mL/min. The yields of two purification processes were 2.12% and 2.31%, respectively.*

**Keywords:** *Ion exchange chromatography, Ca(OH)<sub>2</sub>, rebaudioside A, stevioside, Stevia*