Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn

CHIẾT XUẤT STEVIOSIDE TỪ CÂY CỎ NGỌT (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Tôn Nữ Liên Hương[1], Võ Hoàng Duy[1], Dương Mộng Hòa[1], Đỗ Duy Phúc[1] và Nguyễn Duy Thanh[1]
[1] *Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ*

Thông tin chung:
Ngày nhận: 30/11/2014
Ngày chấp nhận: 26/02/2015

Title:
Study on stevioside extract of the species Stevia rebaudiana Bertoni

Từ khóa:
Stevioside, Stevia rebaudiana Bertoni, celite, silica gel, phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Keywords:
Stevioside, Stevia rebaudiana Bertoni, celite, silica gel, NMR

ABSTRACT

Extracting stevioside from the Co Ngot (Stevia rebaudiana Bertoni) grown in Da Lat province was presented in this paper. The study focused on two methods to purify the extracts, such as using column chromatography with silica gel 60 and using celite column. The structure of stevioside was then identified based on the NMR spectral data.

TÓM TẮT

Bài báo trình bày qui trình chiết xuất stevioside từ cây Cỏ ngọt (Stevia rebaudiana Bertoni) trồng tại thành phố Đà Lạt. Nghiên cứu tập trung trên hai phương pháp tinh chế sản phẩm: sắc ký cột pha thường silica gel 60 và phương pháp lọc với chất hấp thụ celite. Cấu trúc hóa học và định danh hợp chất được xác định căn cứ vào dữ liệu phổ NMR.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Cỏ ngọt có tên khoa học là *Stevia rebaudiana* Bertoni là một trong khoảng 145 loài thuộc chi *Stevia,* là loài cây bụi có nguồn gốc từ Paraguay, đã được sử dụng phổ biến và làm thuốc tại Nam Mỹ (K. Ramesh *et al.*, 2006).

Loài *Stevia rebaudiana* đã được trồng ở một số quốc gia trên thế giới như Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan, Thái Lan, Indonesia (M. Upreti *et al.*, 2011). Cây *Stevia rebaudiana* bắt đầu được du nhập vào Việt Nam từ năm 1988. Hiện nay, theo chương trình quốc gia phát triển nguồn cây công nghiệp (2012), giống cỏ ngọt này được trồng và phát triển trên nhiều vùng trong cả nước, từ các tỉnh phía Bắc như Hà Giang, Cao Bằng, Sơn La, Phú Thọ,… cho đến các tỉnh phía Nam như Lâm Đồng, Đăk Lăk (Trương Hương Lan *và ctv.*, 2014).

Stevioside là thành phần chủ yếu thuộc nhóm steviol glycoside - một nhóm các dẫn xuất diterpene glycoside được chiết xuất từ cây *Stevia rebaudiana*. Từ lâu steviol glycoside đã được sử dụng như một nguồn chất làm ngọt không năng lượng, với độ ngọt rất cao (khoảng 200 – 300 lần đường sucrose từ mía). Ngoài ra, theo nhiều tài liệu stevioside còn có tác dụng kháng khuẩn, giúp cải thiện các bệnh về tim mạch, huyết áp. Stevioside đã được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm tại các quốc gia tiên tiến như Nhật, Mỹ,... (K. Ramesh *et al.*, 2006).

Trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu về hoạt tính sinh học, thành phần hóa học cây *Stevia rebaudiana* và khảo sát cấu trúc của nhóm chất chủ yếu tạo vị ngọt. Tuy nhiên, ở nước ta hiện có rất ít nghiên cứu về loài cây cỏ ngọt này, chủ yếu khảo sát qui trình sinh trưởng của cây (Trương Hương Lan *và ctv.*, 2014), và chưa có nghiên cứu nào về qui trình chiết xuất nhóm hợp chất tạo vị ngọt. Vì thế, việc nghiên cứu chiết xuất stevioside từ cây Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bertoni) là một việc rất cần thiết và mang tính thời sự.

Trong nội dung bài báo này chúng tôi đề cập kết quả khảo sát qui trình chiết xuất chất tạo ngọt từ cây và các qui trình tinh chế stevioside, cũng như kết quả kiểm tra sản phẩm bằng phương pháp phân tích hiện đại: HPLC, và phổ nghiệm cộng hưởng từ hạt nhân: NMR.

2 PHƯƠNG TIỆN, PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana*) được thu tại Đà Lạt vào tháng 7, năm 2014. Sau khi thu về nguyên liệu được sơ chế để loại tạp chất, bỏ các phần bị hỏng, sau đó được sấy khô ở 60°C trong 4 giờ.

2.2 Phương tiện

Dung môi sử dụng trong đề tài là các dung môi phân tích (PA) có độ phân cực khác nhau, xuất xứ Việt Nam (Chemsol). Chất hấp phụ silica gel 60 (Merck) dùng cho sắc ký cột. Chất hấp thụ celite (Merck) dùng trong cột lọc tinh chế. Sắc ký lớp mỏng dùng silica gel GF_{254} (Merck).

Sắc ký lỏng hiệu năng cao thực hiện tại Khoa KHTN, Trường Đại học Cần Thơ. Phổ NMR ghi từ máy Bruker Advance 500 MHz, tại Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam, Hà Nội.

2.3 Phương pháp

* Khảo sát qui trình chiết xuất: với dung môi để chiết hoạt chất là nước cất.

* Tinh chế hoạt chất: theo 2 phương pháp là: cách 1: acid hóa dịch chiết và lọc qua celite, cách 2: sắc ký cột silica gel.

* Kiểm tra sản phẩm tinh khiết bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và phổ nghiệm NMR.

Máy HPLC, đầu dò UV-Vis bước sóng 210 nm. Cột ODS hypersil (Thermo scientific), chiều dài cột 150 mm, kích thước hạt 5 µ. Pha động acetonitrile:nước = 30:70 (*v/v*). Tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Nhiệt độ cột 40°C. Lượng mẫu tiêm 5 µl.

Khảo sát cấu trúc bằng việc giải phổ và so sánh với phổ của stevioside đã công bố, ghi phổ ^{1}H - NMR (500 MHz, Pyridine–d_5), ^{13}C – kết hợp DEPT- NMR (125 MHz, Pyridine–d_5).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Qui trình chiết xuất

3.1.1 Chiết hoạt chất

Mỗi lượt thí nghiệm dùng 250 g nguyên liệu đem xay nhỏ với kích thước qua rây khoảng 0,5 mm, ngâm chiết hai lần với nước ở 65°C trong 2 giờ, mỗi lần sử dụng 300 ml nước cất. Đuổi bớt dung môi đến thể tích khoảng 200 ml, để thực hiện các qui trình tinh chế. Mặt khác, đem 3 mẫu cô cạn dung môi để xác định hàm lượng chất chiết thô thu được và xác định hiệu suất.

Từ 250 g nguyên liệu khô ban đầu thu được 53,56 g cao thô chứa các chất có vị ngọt. Hiệu suất chiết thô nhóm chất tạo vị ngọt đạt: 22,67%.

3.1.2 Tinh chế Stevioside

Dịch chiết nước (N) được tinh chế theo 2 cách:

Cách 1: Dịch chiết (N) được acid hóa bằng acid citric đến pH gần bằng 3, khuấy đều nhẹ dung dịch trong 30 phút. Dung dịch sau khi acid hóa được lọc qua cột celite. Dung dịch sau lọc được kiềm hóa bằng calcium hydroxide tới pH 10,5 ở 50°C, khuấy đều trong 1 giờ. Lọc dung dịch với chất hấp thụ celite. Trung hòa lại dung dịch sau lọc bằng acid citric đến pH 7. Cô quay dung dịch đến còn 250 ml. Chiết lỏng lỏng với *n*-butanol để loại phần tạp còn lại, thu lấy lớp nước, làm lạnh ở 0–5°C và để qua đêm, thu lấy tinh thể.

Cách 2: Tiến hành sắc ký cột (SKC), sử dụng chất hấp phụ là silica gel. Giải ly cột sắc ký lần lượt với các hệ dung môi là những hỗn hợp chloroform và methanol với độ phân cực tăng dần. Theo dõi quá trình SKC bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM), với hệ dung môi giải ly là *n*–butanol: nước:acid acetic = 4:5:1 (*v/v*), hiện vết với dung dịch acid sulfuric:methanol = 1:10 (*v/v*), sấy bản mỏng ở 110°C trong 2 phút. Thu phân đoạn cao chứa stevioside và tiếp tục sắc ký cột rồi kết tinh lại trong dung môi thích hợp để thu được stevioside tinh khiết.

Kiểm tra độ tinh khiết của stevioside : Dùng SKLM, hệ giải ly: *n*-butanol:nước:acid acetic tỉ lệ 4:5:1 (*v/v*).

Kết quả tinh chế stevioside theo cách 1: thu được 3,19 g. Hiệu suất tinh chế theo cách 1 là 1,28%.

Kết quả tinh chế stevioside theo cách 2: thu được 0,32 g. Hiệu suất tinh chế theo cách 2 là 0,13%.

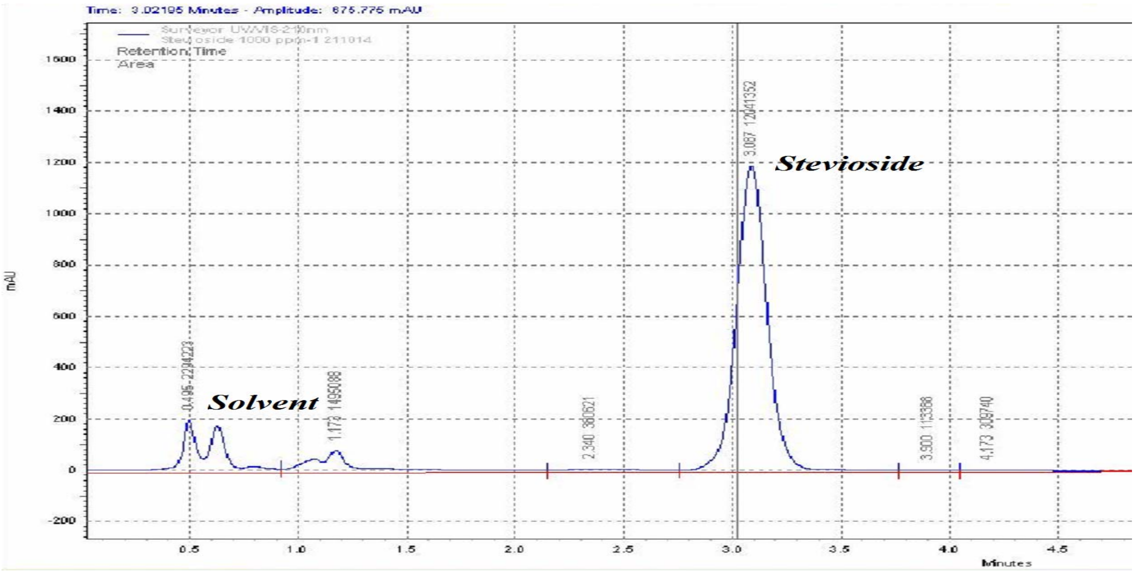
3.2 Kết quả sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao

Sắc ký lớp mỏng (SKLM) các sản phẩm tinh chế theo các phương pháp 1 và 2, sử dụng hệ giải ly là: *n*-butanol:nước:acid acetic tỉ lệ 4:5:1 (*v/v*), hình ảnh bản mỏng được trình bày trong Hình 1, sau đây.

Hình 1: Sắc ký lớp mỏng sản phẩm tinh chế; theo phương pháp 1 (trái), và 2 (phải)

Kết quả SKLM cho thấy R_f của các mẫu chất được sắc ký là tương đồng, màu sắc vết giống nhau, chứng tỏ sản phẩm tinh chế thu được từ hai phương pháp là cùng một chất.

Ngoài ra, sản phẩm đã tinh chế cũng được kiểm tra bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), với phổ đồ HPLC được ghi trong Hình 2, nhằm kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm, trước khi gửi phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân.



Hình 2: Phổ đồ HPLC của stevioside

Phổ đồ HPLC cho thấy sản phẩm có độ tinh khiết cao, nên gửi ghi phổ NMR tại Hà Nội.

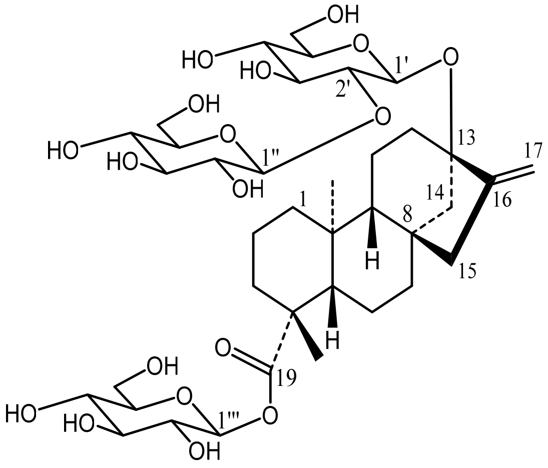
3.3 Kết quả phổ nghiệm NMR

Các thông tin phổ NMR được ghi từ máy Bruker Advance, 500 MHz, tại viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học – Công nghệ, Việt Nam. Căn cứ vào các dữ liệu phổ NMR của hợp chất, với dung môi pyridin, giải đoán cấu trúc hợp chất, và sau đó so sánh với dữ liệu hợp chất chuẩn đã công bố, cụ thể như sau:

Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, C_5D_5N): ở vùng từ trường cao xuất hiện hai mũi đơn của proton methyl, δ (ppm): 1,27 (3H, *s*, H-18); 1,21 (3H, *s*, H-20); kết hợp với các tín hiệu mũi đa của các proton trong vùng 0,7 – 2,7 ppm và proton của liên kết đôi dạng C**H**$_2$=C< tại 5,67 ppm thể hiện các proton đặc trưng của khung *ent*-Kaurene. Ngoài ra, có 3 tín hiệu của proton anomeric với độ dịch chuyển hóa học ở 6,07 (1H, *d*, *J* = 8 Hz, H-1‴); 5,27 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1″); 5,12 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1′) cho thấy hợp chất có mang 3 nhóm đường.

Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, C_5D_5N), δ (ppm): có 38 tín hiệu của các nguyên tử carbon, trong đó, ở vùng từ trường thấp có một tín hiệu với độ dịch chuyển hóa học ở 177,1 ppm của carbon carbonyl (ứng với C-19), hai tín hiệu tại 154,5 ppm và 104,6 ppm thuộc về hai carbon lai hóa sp^2 mang liên kết đôi tại vị trí C-16 và C-17. Ngoài ra, trong vùng 62,0 – 106,7 ppm còn có 19 tín hiệu carbon bao gồm 18 carbon của 3 nhóm đường và một carbon dạng hydroxymethine của khung aglycon, tại 86,0 ppm (ứng với C-13); trong vùng từ trường mạnh: 15,5 – 57,3 ppm có 16 tín hiệu của các nguyên tử carbon còn lại của khung sườn *ent*-kaurene: với đặc điểm của khung, có cầu nối một carbon (C-14: δ 28,2 ppm), giữa C-8 (42,6 ppm) và C-13 (86,0 ppm).

Bằng việc so sánh với phổ của hợp chất Stevioside trong tài liệu tham khảo (Giorgio Colombo *et al,* 2004; Phạm Thị Hồng Minh *et al.*, 2004), nhận thấy các số liệu trùng khớp nên xác định được hợp chất chính là stevioside, với cấu trúc có 3 nhóm đường glucopyranose liên kết vào khung aglycon tại các vị trí C-13, C-19, như Hình 3.



Hình 3: Cấu trúc hóa học của stevioside

Tên hệ thống: 13-[(2-O-D-β-Glucopyranosyl-α-D-glucopyranosyl)oxy]kaur-16-en-19-oic acid β-D-glucopyranosyl ester

4 KẾT LUẬN

Với phương pháp chiết bằng nước nóng 65°C, trên nguyên liệu cỏ ngọt - *Stevia rebaudiana* Bertoni, trồng tại vùng Đà Lạt, thu được cao chiết thô chứa các chất có vị ngọt, hiệu suất là 22,67%. Trong các cách tinh chế nhóm chất tạo vị ngọt, có 2 phương pháp đã được khảo sát.

Qui trình tinh chế stevioside bằng sắc ký cột đạt hiệu suất 0,13%, kém hiệu quả hơn quy trình tinh chế stevioside bằng acid hóa bằng acid citric, lọc qua cột celite rồi đưa về pH = 7, với hiệu suất tinh chế là 1,28%.

Stevioside được chiết xuất từ cây cỏ ngọt và tinh chế theo hai qui trình trong bài có độ tinh khiết cao, qua kiểm chứng trên HPLC và phổ nghiệm NMR, chứng tỏ cả hai phương pháp đều có thể ứng dụng, tuy nhiên trong qui mô công nghiệp việc sắc ký cột có nhiều bất lợi.

Với qui trình chiết xuất bằng nước nóng 65°C và tinh chế theo phương pháp 1, sử dụng các dung môi, hóa chất rẻ, sạch phù hợp với hướng nghiên cứu hóa học xanh, phát triển bền vững và bảo vệ môi trường sống, thiết bị kèm theo cũng không quá đắt tiền, kết quả của nghiên cứu có thể góp phần vào việc chọn giải pháp chiết xuất chất tạo ngọt từ cây cỏ ngọt, ứng dụng vào đời sống. Chúng tôi còn đang tiếp tục những nghiên cứu về hoạt tính sinh học stevioside, mong tăng khả năng ứng dụng của đề tài.

LỜI CẢM TẠ

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài Sinh viên nghiên cứu khoa học, mã số **TSV2014-27**.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Giorgio Colombo, Sergio Riva, and Bruno Danieli. 2004. Remote control of enzyme selectivity the case of stevioside and steviolbioside. Tetrahedron. Vol 60 (741–746).
2. K. Ramesh, Virendra Singh and Nima W. Megeji. 2006 . Cultivation of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. Advances in Agronomy. Vol 89, (137–177).
3. Venkata Sai Prakash Chaturvedula, Mani Upreti and Indra Prakash. 2011. Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*. Molecules. Vol. 16, No. 5 (3552-3562).
4. Trương Hương Lan, Lại Quốc Phong, Nguyễn Thị Làn, Nguyễn Thị Việt Hà, Phạm Linh Kho, Lê Hồng Dũng. 2014. Xác định thành phần dinh dưỡng của lá Cỏ ngọt Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Phát triển. Tập 12, Số 1 (73-77).
5. Phạm Thị Hồng Minh, Phạm Hoàng Ngọc, Walter C. Taylor, Nguyễn Mạnh Cường, 2004, A new *ent*-kaurane diterpenoid from *Crotons tonkinensis* leaves, Fitotherapia, Vol. 75, (552-556).