

Định lượng đồng thời steviosid và rebaudiosid A trong lá cỏ ngọt Việt Nam bằng phương pháp HPLC

Nguyễn Thành Công, Nguyễn Thị Trâm
Phạm Thị Minh Hải, Vũ Văn Tuấn*
Khoa Dược, Trường Đại học Đại Nam

Summary

Objective: To develop and validate a high - performance liquid chromatography (HPLC) for simultaneous quantification of stevioside (STE) and rebaudioside A (RA) in *Stevia* leaves. **Methods:** Samples were extracted with methanol 30%. The separation system contained a normal phase column Allsphere Amino (250 x 4.6mm; 5 μ m), a mobile phase of water: acetonitrile (20 : 80, v: v) and UV detector at 210 nm. The method was validated according to AOAC with basic specifications: System suitability, selectivity, linear range, accuracy, repeatability. **Results:** A simple, rapid and reproducible normal phase HPLC method was developed for the simultaneous analysis of stevioside and rebaudioside A in *Stevia* leaves cultivated in Vietnam.

Conclusion: The developed method can be applied for simultaneous quantification of STE and RA in *Stevia* leaves.

Keywords: Stevioside, rebaudioside, *Stevia* leaves.

Đặt vấn đề

Ngày nay, xu hướng tiêu thụ đường tăng cao ở các nước đang phát triển có thể dẫn đến các vấn đề sức khỏe như: Béo phì, tim mạch, tiểu đường^[1]. Một giải pháp thay thế là sử dụng các chất làm ngọt không sinh năng lượng, trong đó các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên như các steviol glycosid trong cỏ ngọt là nhóm chất tiềm năng. Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bert.) có nguồn gốc từ Nam Mỹ, có chứa các diterpen glycosid là chất làm ngọt ít calo, ngọt hơn saccharose khoảng 300 lần. Steviosid (STE) và rebaudioside A (RA) là các hợp chất làm ngọt chính được quan tâm. Chúng có thể ổn định ngay cả ở nhiệt độ lên đến 200 °C, phù hợp để sử dụng cho thực phẩm nấu chín^[2]. Ở Việt Nam, cỏ ngọt được trồng ở nhiều nơi và sử dụng phổ biến trong công thức của các chế phẩm dược liệu với mục đích điều vị. Một số nghiên cứu đã tiến hành định lượng steviosid trong cây cỏ ngọt. Tuy nhiên, các phương pháp

sử dụng lại chưa hiệu quả, do cấu trúc của các steviol glycosid tương tự nhau, khó tách riêng trong quá trình định lượng hoặc cần thiết quá trình xử lý mẫu phức tạp. Ngoài ra, chuyên luận cỏ ngọt trong Dược điển Việt Nam V cũng chưa có chỉ tiêu về định lượng các steviol glycosid^[3]. Do đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục đích xây dựng và thẩm định một phương pháp định lượng đồng thời steviosid và rebaudiosid A trong lá cỏ ngọt bằng HPLC, từ đó ứng dụng đánh giá hàm lượng của hai hoạt chất này trong lá cỏ ngọt trồng ở Việt Nam.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Mẫu nghiên cứu: Lá cây cỏ ngọt (6 tháng tuổi) được lấy ở Huyện Hải Hậu, Tỉnh Nam Định (S1) (10/2019); Quận Nam Từ Liêm, TP. Hà Nội (S2) (11/2019); Huyện Liên Sơn, Tỉnh Hòa Bình (S3) (12/2019); Huyện Hoài Đức, TP. Hà Nội (S4) (12/2019); Huyện Văn Chấn, Tỉnh Yên Bái (S5) (01/2020). Các mẫu sau khi thu thập được giám định tên khoa học tại Khoa Dược, Trường Đại học Đại Nam và sấy khô ở 50 °C, nghiền nhỏ đến kích thước dưới 1 mm và bảo quản trong túi PE kín, trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Chịu trách nhiệm: Vũ Văn Tuấn
Email: vuvantuandkh@gmail.com
Ngày nhận: 27/7/2021
Ngày phản biện: 29/7/2021
Ngày duyệt bài: 24/8/2021

Chất chuẩn: Steviosid được cung cấp bởi Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Trung Quốc), hàm lượng 99,65% tính theo nguyên trạng. *Rebaudiosid A* được cung cấp bởi Ak scientific, Inc., (Mỹ), hàm lượng 98,06% tính theo nguyên trạng.

Thiết bị: Hệ thống HPLC JASCO (Nhật Bản) bơm PU – 4180, buồng điều nhiệt: CO – 4060, Detector UV 4070, phần mềm xử lý ChromNAV. Các cột sắc ký gồm Allsphere NH2 (250 x 4,6 mm; 5 µm), Kinetex® C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) và Ascentis® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

Phương pháp định lượng

Dung dịch thử: 1,0 g mẫu thử được cho vào bình nón nút mài 100 ml, thêm vào bình 25 ml hỗn hợp nước - methanol (7:3), siêu âm 30 phút trong bể. Gạn lấy lớp dịch chiết vào bình định mức 100 ml, lặp lại thêm 3 lần, thêm hỗn hợp nước - methanol (7:3) vừa đủ.

Dung dịch chuẩn gốc: Hoà tan 20 mg STE chuẩn và 20 mg RA chuẩn trong vừa đủ 20,0 ml hỗn hợp nước - acetonitril (7 : 3).

Hàm lượng STE và RA sẽ được tính theo công thức sau:

$$\%STE = \frac{1000 \times m_{STE} \times a \times S_{T1}}{S_{STE} \times m_c \times (100-x)} (\%)$$

$$\%RA = \frac{1000 \times m_{RA} \times b \times S_{T2}}{S_{RA} \times m_c \times (100-x)} (\%)$$

Trong đó: % STE, % RA là hàm lượng STE, RA trong mẫu thử (%); m_{STE} , m_{RA} là khối lượng của STE chuẩn, RA chuẩn (mg); S_{T1} , S_{T2} là diện tích pic của STE, RA trên SKĐ dung dịch thử (µV.s); S_{ST} , S_{RA} là diện tích pic của STE và RA trên SKĐ dung dịch chuẩn (µV.s); m_c là lượng

mẫu thử đã cân (mg); a và b là độ hàm lượng của STE chuẩn và RA chuẩn (%); x là độ ẩm được liệu (%).

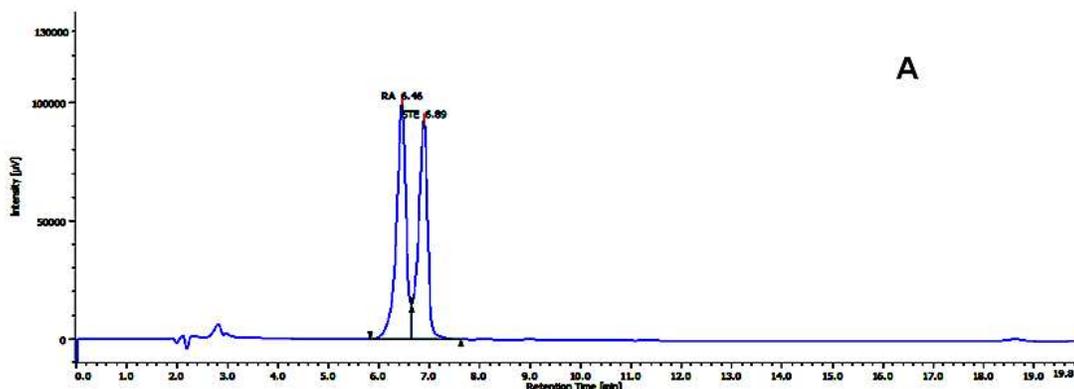
Điều kiện sắc ký: Detector UV phát hiện tại bước sóng 210 nm. Nhiệt độ cột 40 °C. Thể tích mẫu tiêm 20 µl. Khảo sát 03 điều kiện sắc ký: Điều kiện A theo Yohanes Martono và CS. [4] gồm cột Ascentis® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) với pha động là hỗn hợp nước - methanol (90:10, v/v, điều chỉnh đến pH 3,0 với acid phosphoric), acetonitril và acid acetic với tỉ lệ 65:35:0,01 (v/v/v). Điều kiện B theo Vũ Bình Dương và CS. [5] gồm cột Kinetex® C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) và pha động gồm dung dịch acid phosphoric 0,1% trong nước và acetonitril (67:33). Điều kiện C theo Atsuko Tada cải tiến phương pháp của JECFA [6] gồm cột Allsphere Amino (250 x 4,6 mm; 5 µm) và pha động gồm hỗn hợp nước - acetonitril với tỉ lệ 20:80 (v/v). Lựa chọn điều kiện thích hợp để định lượng đồng thời STE và RA.

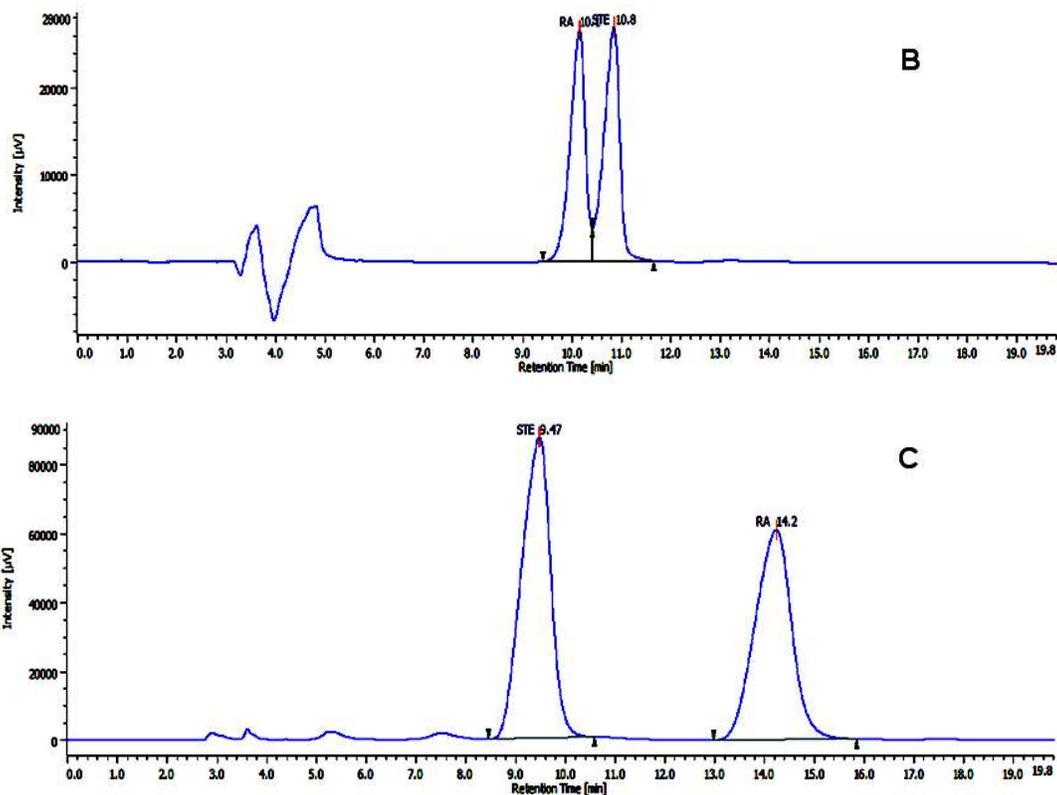
Phương pháp HPLC lựa chọn được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC [7] về các tiêu chí cơ bản gồm tính thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Khảo sát điều kiện sắc ký

Dung dịch chuẩn hỗn hợp được phân tích theo 03 điều kiện sắc ký cần khảo sát. Kết quả được thể hiện trong hình 1.





Hình 1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Kết quả hình 1 cho thấy: Trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp, pic STE và RA bị dính rất nhiều ở điều kiện A, dính một phần ở điều kiện B và tách rõ ràng, hoàn toàn với độ phân giải $R_s = 3,7$ khi tiến hành theo điều kiện C. Ngoài ra, ở điều kiện C, các pic STE và RA đối xứng và có thời gian lưu hợp lý với các nghiên cứu Atsuko

Tada và CS. [6].

**Thẩm định phương pháp định lượng
Độ thích hợp của hệ thống**

Dung dịch chuẩn hỗn hợp được tiến hành sắc ký 6 lần theo điều kiện C. Kết quả được tổng hợp trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra tính thích hợp hệ thống

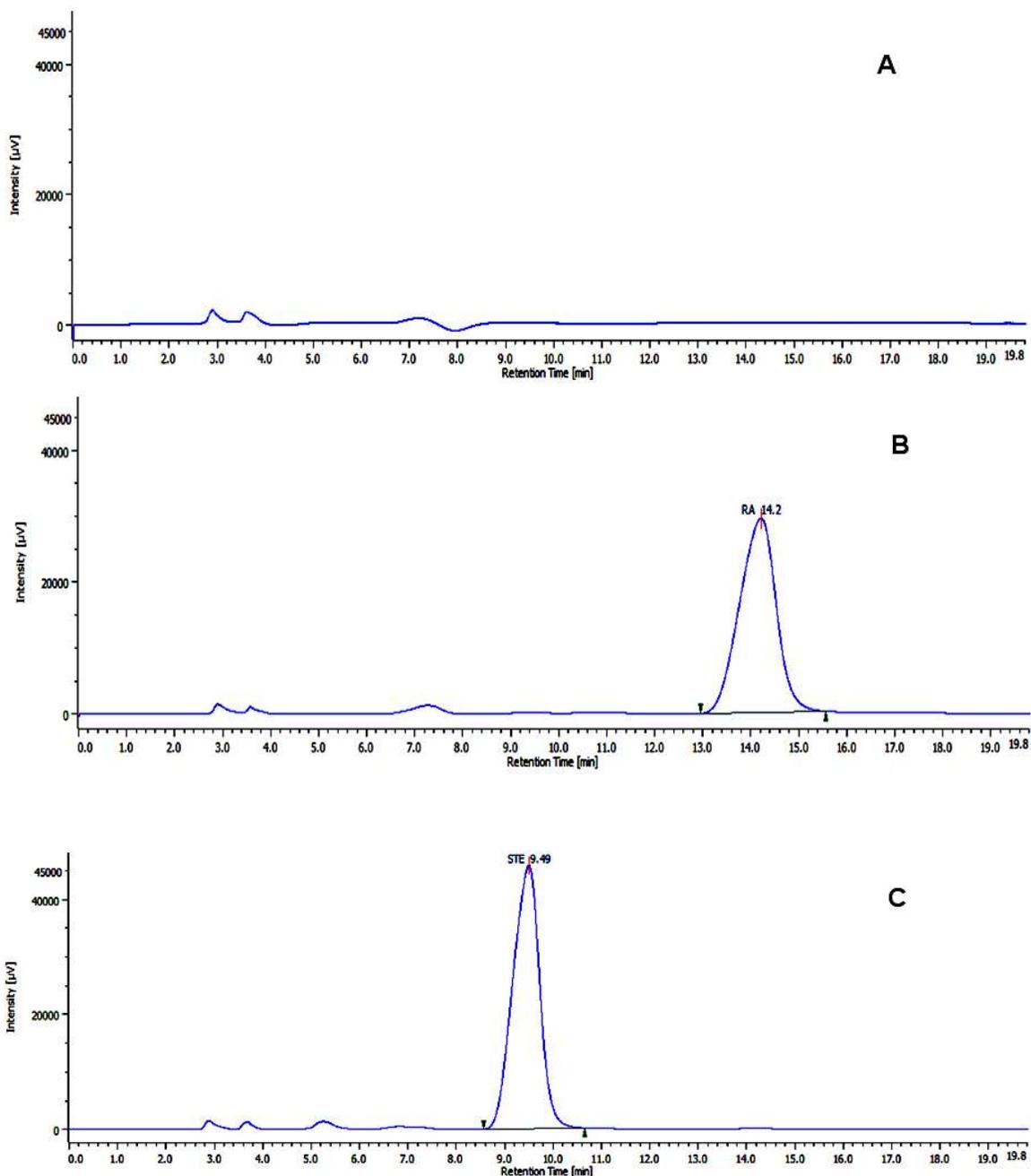
STT	Steviosid		Rebaudiosid A	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu V.s$)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu V.s$)
1	9,53	1919078	14,30	1841607
2	9,50	1932010	14,20	1858370
3	9,38	1904102	14,10	1855438
4	9,53	1933220	14,20	1883681
5	9,51	1968553	14,20	1911880
6	9,44	1944731	14,20	1847864
TB	9,48	1933616	14,20	1866473
RSD (%)	0,6	1,1	0,5	1,4

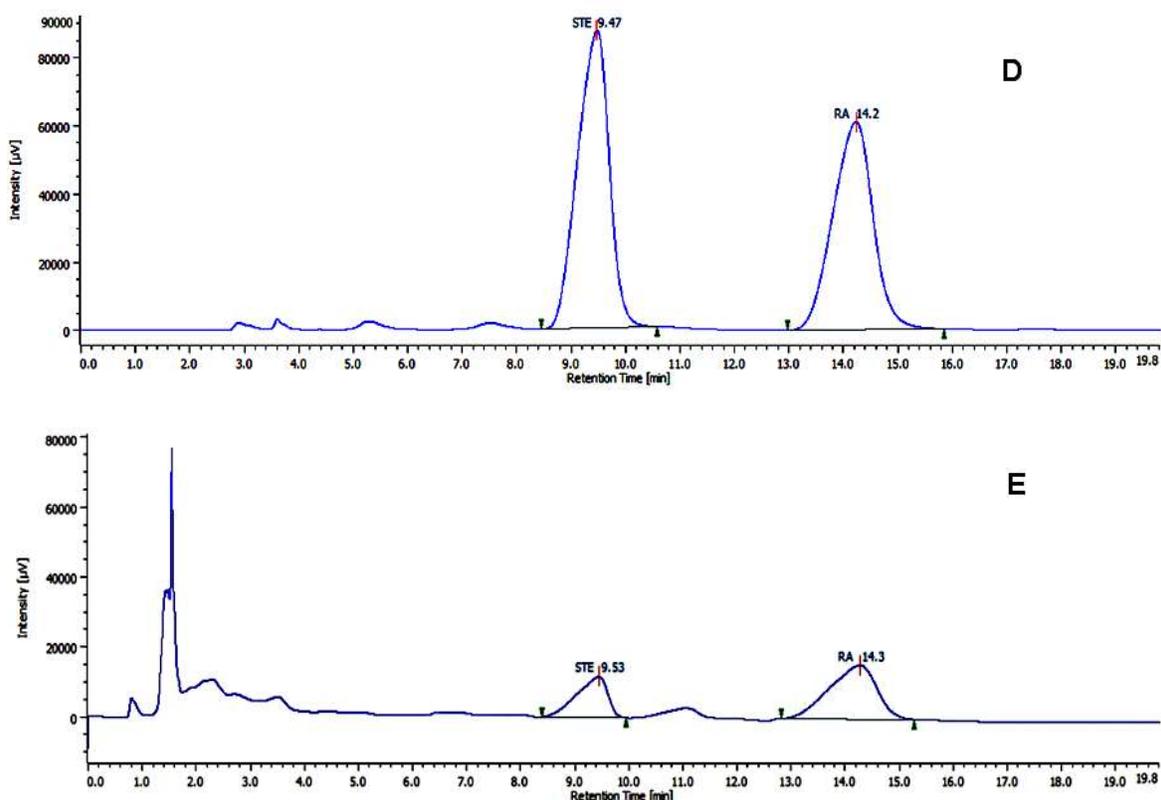
Số liệu trong bảng 1 cho thấy: STE có thời gian lưu trung bình 9,48 phút, RA có thời gian lưu trung bình 14,2 phút. Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu với 2 chất đều dưới 1,0% và RSD của diện tích pic dưới 2,0%, đáp ứng các yêu cầu của AOAC [7]. Kết quả thể hiện hệ thống thích hợp để phân tích đồng thời STE và

RA theo phương pháp đã xây dựng.

Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích sắc ký mẫu trắng, mẫu chuẩn hỗn hợp, mẫu chuẩn độc lập và mẫu thử theo phương pháp đã xây dựng. Sử dụng hỗn hợp dung môi chiết mẫu làm mẫu trắng. Các sắc ký đồ thu được thể hiện trong hình 2.





Hình 2. Hình ảnh sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu
(A: mẫu trắng; B: chuẩn RA; C: chuẩn STE; D: chuẩn hỗn hợp; E: dung dịch thử)

Kết quả hình 2 cho thấy: STE có thời gian lưu là 9,49 phút, RA có thời gian lưu khoảng 14,2 phút. Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu pic tại các thời gian lưu chất phân tích và trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử có tín hiệu pic của 2 hoạt chất tại các thời gian lưu tương ứng. Như vậy, phương pháp xây dựng đảm bảo tính đặc hiệu

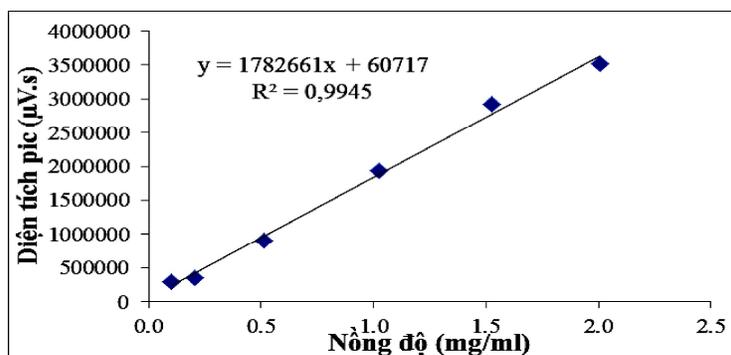
theo yêu cầu AOAC [7], có thể phát hiện đúng các chất phân tích trong điều kiện định lượng.

Khoảng tuyến tính

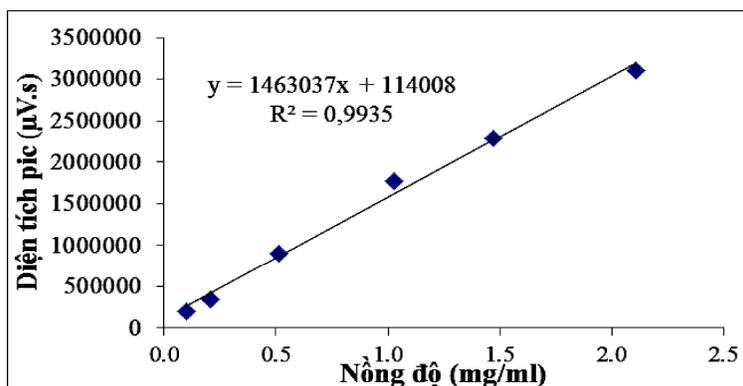
Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp ở 6 nồng độ lần lượt là 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/ml. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã khảo sát. Kết quả được thể hiện trong bảng 2, hình 3 và 4.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

STT	STE		RA	
	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic (μV.s)	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic (μV.s)
1	0,10	294071	0,10	204549
2	0,20	354857	0,21	342919
3	0,51	909081	0,51	906681
4	1,02	1933616	1,03	1771607
5	1,52	2926212	1,47	2292627
6	2,00	3517033	2,11	3106452
Phương trình hồi quy	$y = 1782661x + 60717$		$y = 1463037x + 114008$	
R²	0,9945		0,9935	



Hình 3. Đồ thị biểu thị sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ của STE



Hình 4. Đồ thị biểu thị sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ của RA

Kết quả bảng 2, hình 3, 4 cho thấy: Đường chuẩn của STE và RA có hệ số R^2 lần lượt là 0,9945 và 0,9935, đạt yêu cầu quy định theo AOAC [7] ($R^2 \geq 0,99$). Trong khoảng nồng độ khảo sát (0,1-2,0 mg/ml) có sự phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ của tín hiệu đo vào nồng độ chất phân tích. Do đó có thể sử dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng STE và RA có nồng độ nằm trong khoảng 0,1 - 2,0 mg/ml.

Độ đúng

Chuẩn bị các dung dịch thử thêm chuẩn có nồng độ là 0,125; 0,25; 1,05 mg/ml đối với STE và 0,5; 1,0; 1,5 mg/ml đối với RA (mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 dung dịch). Kết quả được so sánh với dung dịch chuẩn STE (1 mg/ml) và dung dịch chuẩn RA (1 mg/ml) có diện tích pic lần lượt là 1001412 và 1015052. Kết quả được thể hiện trong bảng 3 và 4.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng của STE

Nồng độ dung dịch thử thêm chuẩn (mg/ml)	Khối lượng mẫu thử (g)	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Diện tích pic ($\mu\text{V.s}$)	Lượng chuẩn tìm lại (mg)	Độ thu hồi (%)	TB	RSD (%)
0,125	0,5204	0,60	136513	0,58	97,0	97,6	1,9
	0,5211	0,60	136513	0,58	96,2		
	0,5207	0,60	138520	0,60	99,7		
0,250	1,2053	1,00	248935	0,98	98,6	98,3	1,4
	1,2039	1,00	247931	0,97	96,9		
	1,2021	1,00	249939	0,99	99,5		
1,050	2,0014	7,98	1107059	8,03	100,6	100,3	1,0
	2,0032	7,98	1111074	8,07	101,1		
	2,0020	7,98	1095014	7,91	99,1		

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng của RA

Nồng độ dung dịch thử thêm chuẩn (mg/ml)	Khối lượng mẫu thử (g)	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Diện tích pic ($\mu V.s$)	Lượng chuẩn tìm lại (mg)	Độ thu hồi (%)	TB	RSD (%)
0,500	0,6007	2,02	499786	1,92	95,1	96,9	1,9
	0,6006	2,02	503807	1,96	96,9		
	0,6026	2,02	507828	2,00	98,8		
1,000	1,2028	4,04	1030834	4,15	102,7	101,0	1,6
	1,2029	4,04	1017766	4,02	99,4		
	1,2047	4,04	1022792	4,07	100,9		
1,500	2,4012	3,03	1538862	3,10	102,5	101,8	1,5
	2,4066	3,03	1540873	3,12	102,9		
	2,4044	3,03	1531826	3,03	100,1		

Kết quả bảng 3, 4 cho thấy: Độ thu hồi của STE từ 96,2 - 101,1% và của RA từ 95,1 - 102,9%. Các giá trị độ thu hồi của STE và RA đều nằm trong giới hạn cho phép (92,0-105,0%). Độ lệch chuẩn tương đối độ thu hồi của STE và RA lần lượt là 1,0-1,9% và 1,5-1,9%. Các giá trị này đều nằm trong giới hạn cho phép ($\leq 2,0\%$). Kết quả thể hiện

phương pháp đáp ứng độ đúng yêu cầu theo quy định AOAC [7].

Độ lặp lại

Mẫu thử được phân tích lặp lại 6 lần ở cùng điều kiện trong một ngày. Dung dịch chuẩn STE (1 mg/ml) và dung dịch chuẩn RA (1 mg/ml) có diện tích pic lần lượt là 1081441 và 1007463. Kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ lặp lại

STT	Khối lượng mẫu thử (g)	STE		RA	
		Diện tích pic ($\mu V.s$)	Hàm lượng STE (%)	Diện tích pic ($\mu V.s$)	Hàm lượng RA (%)
1	2,0056	305135	2,85	1028220	10,17
2	2,0003	300578	2,82	1022558	10,12
3	2,0076	309812	2,89	1018375	10,08
4	2,0049	307992	2,88	1018431	10,08
5	1,9908	295002	2,78	1045087	10,33
6	1,9990	296985	2,79	1003598	9,90
TB (%)			2,82	10,11	
RSD (%)			1,7	1,4	

Kết quả bảng 5 cho thấy: Độ lệch chuẩn tương đối của hàm lượng STE và RA có trong lá cỏ ngọt lần lượt là 1,7 và 1,4%, các giá trị này nằm trong giới hạn ($< 2,0\%$). Vậy phương pháp xây dựng đạt yêu cầu về độ lặp lại theo AOAC [7].

Định lượng STE và RA trong một số mẫu cỏ ngọt Việt Nam

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng STE và RA trong 5 mẫu cỏ ngọt được thu hái ở các vùng khác nhau. Kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng một số mẫu cỏ ngọt Việt Nam

Mẫu	Địa điểm	Diện tích pic ($\mu V.s$)		Hàm lượng (%)	
		STE	RA	STE	RA
S1	Hải Hậu, Nam Định	798042	3139595	2,85	10,28
S2	Nam Từ Liêm, Hà Nội	389251	3566176	1,24	12,36
S3	Liên Sơn, Hòa Bình	426819	678379	1,38	2,38
S4	Hoài Đức, Hà Nội	843829	323851	2,69	1,12
S5	Văn Chấn, Yên Bái	1590483	1540726	5,68	5,34

Số liệu trong bảng cho thấy các mẫu cỏ ngọt được trồng ở các khu vực khác nhau có hàm lượng STE và RA rất khác nhau. Mẫu **S1** và mẫu **S2** cho hàm lượng RA cao hơn cả là 10,28% và 12,36%, trong khi mẫu **S4** có hàm lượng RA thấp nhất đạt 1,12%. Tương tự, hàm lượng STE cũng dao động trong khoảng từ 1,38 đến 5,68%. Kết quả cho thấy có sự khác biệt đáng kể về hàm lượng STE và RA trong dược liệu, điều này gợi ý việc kiểm soát chất lượng dược liệu cần được chú trọng hơn, đặc biệt trong việc lựa chọn nguồn nguyên liệu sản xuất STE và RA.

Kết luận

Nghiên cứu đã một xây dựng phương pháp **HPLC** đơn giản, nhanh, tin cậy cho phép định lượng đồng thời steviosid và rebaudiosid trong lá cỏ ngọt và đã ứng dụng để định lượng một số mẫu cỏ ngọt Việt Nam. Hàm lượng STE trong lá cỏ ngọt từ 1,38 đến 5,68%, hàm lượng RA từ 1,12 đến 12,36% tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt.

Tài liệu tham khảo

1. Rippe J. M., Angelopoulos T. J. (2016), "Added sugars and risk factors for obesity, diabetes and heart disease", *International Journal of Obesity*, 40, pp. 22-27.

2. Roberto Lemus-Mondaca, et al. (2012), "Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects", *Food Chemistry*, 132, pp. 1121–1132.

3. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 1116-1117.

4. Yohanes Martono, et al., (2016), "Improvement method of fast and isocratic RP-HPLC analysis of major diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana* leaves", *Advances of Science and Technology for Society*, 1755, pp. 1-8.

5. Vũ Bình Dương và CS. (2014), "Nghiên cứu định lượng stevioside trong cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana*) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Y Dược học Quân sự*, 4, tr. 13-19.

6. Atsuko Tada, et al., (2013), "Improvement of the assay method for steviol glycosides in the JECFA specifications", *American Journal of Analytical Chemistry*, 4, pp.190-196.

7. AOAC International (2013), *AOAC official methods of analysis, Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*.