

XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN DINH DƯỠNG CỦA LÁ CỔ NGỌT VIỆT NAM**Trương Hương Lan^{1*}, Lại Quốc Phong¹, Nguyễn Thị Làn¹, Nguyễn Thị Việt Hà¹,
Phạm Linh Khoa¹, Lê Hồng Dũng²**¹*Viện Công nghiệp Thực phẩm; ²Viện Dinh dưỡng Quốc gia**Email*: truonghuonglan@yahoo.com*

Ngày gửi bài: 24.10.2013

Ngày chấp nhận: 12.02.2014

TÓM TẮT

Stevioside và Rebaudioside A là hai thành phần chính trong số các diterpene Steviol Glycoside của lá cỏ ngọt *Stevia rebaudiana*. Trong nghiên cứu này, hàm lượng Stevioside và Rebaudioside A trong lá khô của 4 giống cỏ ngọt trồng tại Việt Nam đã được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao và so sánh với 1 giống cỏ ngọt Hàn Quốc. Hàm lượng Stevioside trong lá của các giống cỏ ngọt này dao động từ 2,13% đến 7,72% và Rebaudioside A thay đổi từ 2,05% đến 9,32%. Trong đó, lá cỏ ngọt *S. rebaudiana* S77 của Việt Nam có hàm lượng Steviol glycoside lớn nhất (11,53%), có tiềm năng là nguyên liệu để sản xuất các loại đường phục vụ công nghiệp chế biến thực phẩm. Ngoài ra, một số thành phần dinh dưỡng chính của lá cỏ ngọt *S. rebaudiana* S77 cũng đã được xác định, trong đó hàm lượng protein, lipid, cacbonhydrat và đường khử, tương ứng là 10,87%; 3,95%; 62,55% và 5,12%.

Từ khóa: Hàm lượng stevioside, lá cỏ ngọt, rebaudioside A, Việt Nam.

Study on the Determination of Nutrient Components of Vietnamese Stevia Leaves**ABSTRACT**

Stevioside and Rebaudioside A are two major sweeteners of the diterpene Steviol glycosides compounds derived from Stevia (*Stevia rebaudiana*) leaves. In this study, the levels of Stevioside and Rebaudioside A in the dried leaves of 4 sweet grasses grown in Vietnam were determined by high liquid performance chromatography and compared with the Korean sweet grass. Stevioside content in dried leaves of these Stevia varieties ranged from 2.13% to 7.72% and Rebaudioside A (RebA) changed from 2.05% to 9.32%. In particular, the Vietnamese sweet grass *S. rebaudiana* S77 had the highest STG concentration (11.53%). This is a potential material for production of sweeteners using in food processing technology. In addition, other nutritional components of *S. rebaudiana* S77 stevia leaf has also been identified, including protein, lipid, carbohydrates and reducing sugars.

Keywords: Rebaudioside A and steviol glycosides, stevia, stevioside.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cỏ ngọt *Stevia rebaudiana* có nguồn gốc từ Nam Mỹ, là một loại cây bụi lâu năm thuộc họ Cúc *Asteraceae* bao gồm hơn 200 loài khác nhau. Thành phần chất ngọt trong lá cỏ ngọt *S. rebaudiana* là các loại đường Steviol Glycoside (STG), như Stevioside và Rebaudioside A (RebA), mỗi loại chiếm từ 3 - 10% khối lượng lá khô, tiếp theo là Rebaudioside C ~ 1,1% và Dulcoside A ~ 0,5% và Steviolbioside ~ 0,1%... (Abou-Arab et al., 2010; Abelyan et al., 2010;

Gardana et al., 2006 và Jaitak et al., 2009). Các chế phẩm Stevioside và RebA từ lá cỏ ngọt được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới như là các loại đường chức năng, tác nhân tạo ngọt, các chất điều vị có năng lượng thấp và thay thế đường mía truyền thống trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm, cũng như mỹ phẩm... Hiện nay, chúng đã được coi là glycogen 'thế hệ thứ ba' của thế giới. Stevioside và RebA là hai loại đường được sản xuất nhiều nhất từ cỏ ngọt, có độ ngọt gấp từ 250 đến 450 lần so với đường mía. Ngoài ra, Stevioside và RebA còn có nhiều

tác dụng lâm sàng, như khả năng kích thích tiết insulin của tuyến tụy trong điều trị các bệnh nhân tiểu đường và rối loạn các chuyển hóa cacbonhydrat khác (Chatsudthipong et al., 2009 và Munish et al., 2012).

Cây cỏ ngọt bắt đầu được du nhập từ Nam Mỹ vào Việt Nam từ năm 1988 (Trần Đình Long, 1992). Hiện nay, đã có khá nhiều giống cỏ ngọt 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, Vĩnh Phúc, Hòa Bình, Hà Nội... cho đến các tỉnh phía Nam như Lâm Đồng, Đắk Lắk. Tuy nhiên, mới chỉ có rất ít nghiên cứu về thành phần STG, cũng như dinh dưỡng của lá cỏ ngọt được trồng tại Việt Nam. Năm 2001, Nguyễn Kim Cẩn và Lê Nguyệt Nga đã định lượng Stevioside trong lá cỏ ngọt khô là từ 3% đến 6%. Năm 2009, Phạm Thành Lộc và Lê Ngọc Thạch cũng đã xác định hàm lượng Stevioside trong lá cỏ ngọt khô là 3,38%.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng các loại đường Stevioside và RebA trong lá khô của một số giống cỏ ngọt đang được trồng phổ biến ở Việt Nam, như *S. rebaudiana* S22, S77, S99 và SV1. Ngoài ra, thành phần dinh dưỡng của giống cỏ ngọt *S. rebaudiana* S77 cũng được xác định và so sánh với một giống cỏ ngọt của Hàn Quốc.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

- Lá cỏ ngọt *S. rebaudiana* các giống S22, S77, S99, SV1 (Việt Nam) và HQ (Hàn Quốc)

- Chất chuẩn Stevioside hydrat (Code 3572 - Sigma - Mỹ) và Rebaudioside A (Code 01432 - Sigma - Mỹ), Acetonitrile (Sigma - Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Phương pháp phân tích thành phần hóa lý

- Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Kjeldahl (AOAC 991.20).

- Xác định hàm lượng lipid bằng phương pháp Soxhlet (AOAC 991.36).

- Xác định hàm lượng cacbonhydrat theo phương pháp Bertrand (AOAC 920.183).

- Xác định độ ẩm bằng sấy ở 105 °C đến khối lượng không đổi (AOAC, 2000).

- Xác định hàm lượng đường Stevioside và Rebaudioside A bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo phương pháp của Abou-Arab et al. (2010) trên hệ thống thiết bị Alliance của hãng Waters, Mỹ, của Viện Dinh dưỡng Quốc gia, Bộ Y tế.

Cân 5g mẫu bột lá cỏ ngọt đã được sấy khô và nghiền mịn vào bình nón, bổ sung 50ml nước cất và lắc đều, sau đó đun cách thủy 100°C, trong 30 phút, có lắc. Tiếp theo, lọc qua giấy lọc và chiết thêm 3 lần như trên. Sau đó, gộp dịch lọc và định mức dịch lọc vừa đủ 100ml, để nguội và lọc qua màng lọc 0,45µm, trước khi mang đi phân tích STG bằng HPLC. Điều kiện HPLC: cột sắc ký: Supelco LC-NH₂ 250 x 4,6mm, 5µm, pha động acetonitrile/nước (70/30), tốc độ dòng 1,5 ml/phút, nhiệt độ buồng cột 30°C và detector PDA 2996 ở bước sóng 210nm. Stevioside và Reb A tinh khiết 99,9% của Sigma (Đức) được sử dụng làm chất chuẩn. Hàm lượng đường Stevioside và RebA được tính theo tỷ lệ giữa diện tích peak của chất phân tích và diện tích peak của chất chuẩn ở các nồng độ tăng dần từ 0; 60; 120; 180 đến 240ppm đối với Stevioside và từ 0; 36,125; 72,25; 108,375 đến 145,5ppm đối với RebA.

Công thức tính toán: Hàm lượng Stevioside và Reb A được tính theo công thức sau:

- Hàm lượng (mg/100g) = $(A_m \times C_s \times V \times 100) / (A_s \times m \times 1.000)$, trong đó A_m , A_s là diện tích peak của mẫu và chuẩn tương ứng, C_s là nồng độ chuẩn (tính bằng µg/ml); V là thể tích định mức cuối của dịch chiết (100ml); m là lượng mẫu cân ban đầu.

- Hàm lượng STG được tính bằng tổng hàm lượng Stevioside và Reb A của mỗi mẫu cỏ được phân tích bằng HPLC.

2.1.2. Phương pháp toán học

- Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý bằng Excel 2003 và SAS 9.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định hàm lượng STG, Stevioside và RebA trong lá của một số giống cỏ ngọt khác nhau

Lá khô của 4 giống cỏ ngọt khác nhau của Việt Nam là SV1, S22, S77 và S99, cùng với lá khô của 1 giống cỏ ngọt HQ của Hàn Quốc đã được phân tích và xác định hàm lượng Stevioside và RebA bằng HPLC.

Kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy các giống cỏ ngọt khác nhau cho hàm lượng Stevioside và RebA khác nhau (với mức ý nghĩa $p = 0,05$ khi xử lý bằng phần mềm SAS 9.0). Cụ thể, Stevioside thay đổi từ 2,13% ở giống cỏ SV1 đến 7,72% ở giống cỏ HQ và Reb A thay đổi từ 2,05% ở giống S99 đến 9,32% ở giống S77. Tuy nhiên, có thể chia thành 2 nhóm cỏ ngọt chính bao gồm nhóm cỏ SV1, S22 và S77 có hàm lượng RebA chiếm đa số và ngược lại nhóm cỏ S99 và HQ có hàm lượng Stevioside chiếm tỷ lệ cao. Giống cỏ ngọt S77 của Việt Nam cho hàm lượng đường RebA và STG lớn nhất, tương ứng đạt 9,32% và 11,53%. Trong khi đó, Abou - Arab et al. (2010) cho thấy hàm lượng Stevioside trong cỏ ngọt của Ai Cập đạt tới 6,86%, cao gấp gần 3 lần so với hàm lượng Stevioside trong lá cỏ ngọt của Việt Nam *S. rebaudiana* S77. Điều này có thể được giải thích do mỗi giống cỏ ngọt có đặc điểm di truyền khác nhau và khi phát triển trong các điều kiện và môi trường khác nhau sẽ cho hàm lượng các loại đường không giống nhau. Tuy nhiên, theo Jackson et al. (2006), đường RebA có độ ngọt lớn nhất trong số các loại đường từ cỏ ngọt, gấp khoảng 350 - 450 lần so với đường mía. Ngoài ra, đường RebA tinh khiết không có mùi cỏ ngọt và không có vị đắng như đường Stevioside và các đường STG khác. Chính vì thế, RebA được đánh giá là dễ chịu nhất và thuận lợi cho việc bổ sung vào các loại thực phẩm mà không làm thay đổi mùi và vị của sản phẩm tạo thành (Babcock et al., 2011). Ngoài ra, theo công bố của các bằng sáng chế gần đây, các giống cỏ ngọt có hàm lượng Reb A chiếm đa số là 6,9% (Abelyan et al., 2010);

7,2% (Babcock et al., 2011) và 8,0% (Yang et al., 2012). Trong khi đó, hàm lượng Stevioside chỉ chiếm 1,5%; 1,1% và 1,3%, tương ứng. Các giống cỏ ngọt này đã được sử dụng để sản xuất RebA tinh khiết phục vụ cho chế biến một số loại thực phẩm và đồ uống.

Các sắc ký đồ HPLC của chất chuẩn Stevioside và RebA, cũng như các STG của các giống cỏ ngọt SV1, S22, S77, S22 và HQ, lần lượt được trình bày ở hình 1 A, B, C, D, E và F. Ngoài 2 peak có diện tích lớn nhất là Stevioside và RebA, sắc ký đồ của giống cỏ ngọt S77 Việt Nam còn có 4 peak khác với diện tích nhỏ hơn. Các peak kiểu này cũng được quan sát thấy ở mẫu cỏ ngọt Hàn Quốc (Brandle et al., 2001 và Abelyan et al., 2006).

3.2. Xác định một số thành phần dinh dưỡng chính trong lá cỏ ngọt *S. rebaudiana* S77 của Việt nam

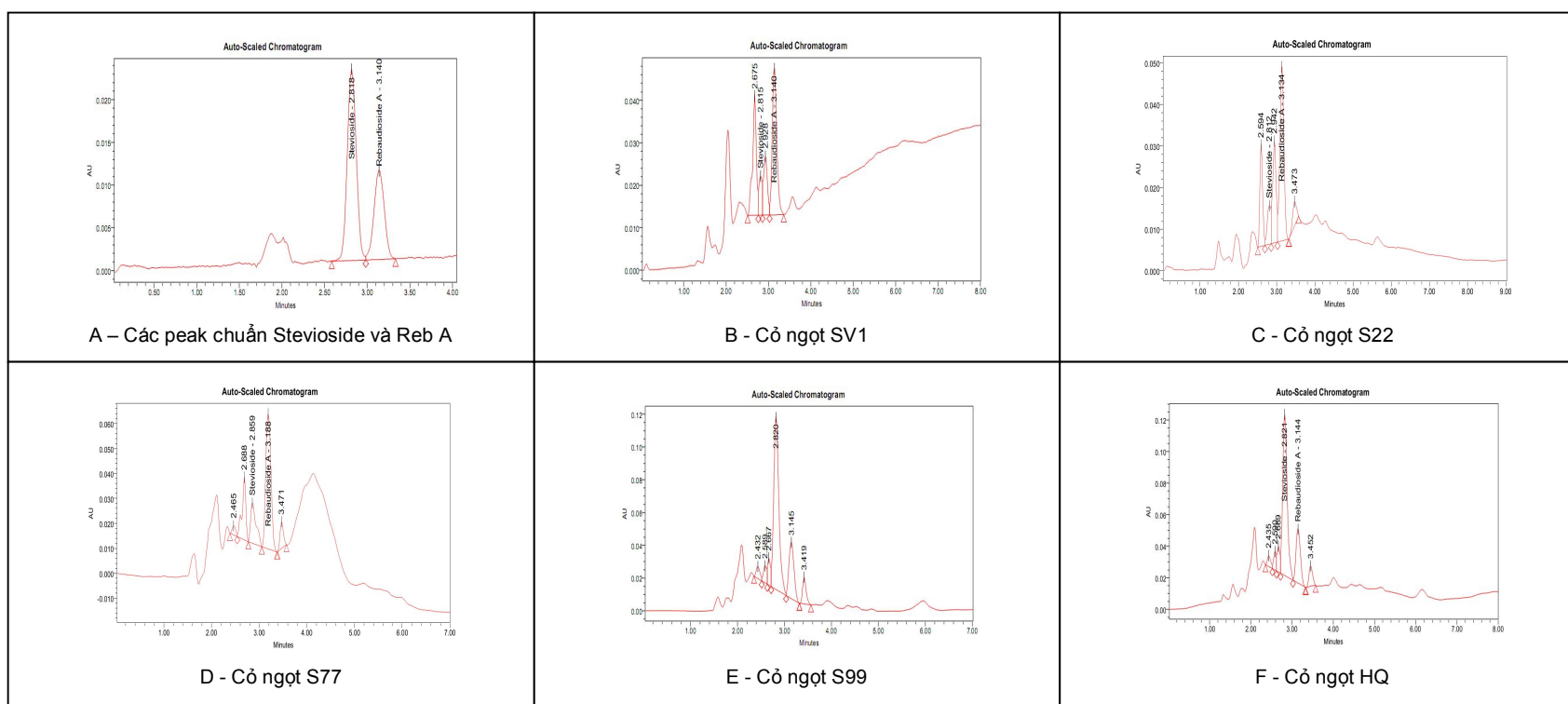
Kết quả xử lý bằng phần mềm SAS 9.0 được trình bày ở bảng 2 cho thấy các thành phần dinh dưỡng chủ yếu trong lá cỏ ngọt *S. rebaudiana* S77 và HQ của Hàn Quốc rất khác nhau, với mức ý nghĩa 0,05, chỉ duy nhất hàm lượng cacbonhydrat trong lá của cả hai giống cỏ ngọt là tương tự. Trong lá cỏ ngọt của Việt Nam *S. rebaudiana* S77, hàm lượng protein chiếm khá cao là 10,87%, đường khử 5,12% và thấp nhất là hàm lượng lipid chỉ là 3,95%. Trong khi đó, các thành phần này trong lá giống cỏ ngọt HQ của Hàn Quốc, tương ứng là 11,25%; 7,15% và 3,78%.

Các thành phần dinh dưỡng trong lá cỏ ngọt của Việt Nam *S. rebaudioside* S77 xác định được ở trên đều nằm trong khoảng giá trị đã được nhiều tác giả quốc tế công bố từ năm 2006 đến 2010, trong đó độ ẩm thay đổi từ 4,65% đến 7,7%, hàm lượng Protein từ 9,8% đến 20,4%, chất béo từ 1,9% đến 5,9%, cacbonhydrat từ 35,5 đến 61,9% và đường khử từ 3,3% đến 6,9% (Munish et al., 2012).

Bảng 1. Hàm lượng Stevioside, RebA và STG* trong lá của một số giống cỏ ngọt khác nhau

Thành phần	Đơn vị	SV1	S22	S77	S99	HQ
Stevioside	%	2,13 ^e	2,56 ^c	2,21 ^d	7,63 ^b	7,72 ^a
Rebaudioside A	%	7,04 ^c	7,52 ^b	9,32 ^a	2,05 ^d	2,63 ^e
STG*	%	9,17	10,08	11,53	9,68	10,35

Ghi chú: Các số với các chữ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $p = 0,05$; STG* = Tổng hàm lượng Stevioside và RebA



Hình 1. Sắc ký đồ của các chất chuẩn Stevioside và RebA (A); của các STG cỏ ngọt Việt Nam SV1 (B), S22 (C), S77 (D), S99 (E) và HQ của Hàn Quốc (F)

Bảng 2. Một số thành phần dinh dưỡng của lá cỏ S77 (Việt Nam) và HQ (Hàn Quốc)

Thành phần	Đơn vị	Hàm lượng	
		Cỏ ngọt S77	Cỏ ngọt HQ
Protein	%	10,87 ^b	11,25 ^a
Lipit	%	3,95 ^a	3,78 ^b
Cacbonhydrat	%	62,55 ^a	63,49 ^a
Đường khử	%	5,12 ^b	7,15 ^a

Ghi chú: Các số với các chữ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa 0,05.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được hàm lượng các loại đường Stevioside và RebA trong lá cỏ ngọt *S. rebaudiana* S77 là cao nhất trong 4 giống cỏ ngọt trồng tại Việt Nam (là *S. rebaudiana* S22, S77, S99 và SV1). Thành phần cacbonhydrat của giống cỏ ngọt này là tương tự với giống cỏ ngọt HQ của Hàn Quốc, nhưng các thành phần dinh dưỡng khác như Protein, lipit và đường khử lại có sự khác biệt đáng kể.

LỜI CẢM ƠN

Viện Công nghiệp Thực phẩm là cơ quan chủ trì và Viện Dinh dưỡng Quốc gia là đơn vị phối hợp thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abelyan Varuzhan H. (2010). Extraction, separation and modification of sweet glycosides from the *Stevia rebaudiana* plant. US 2006/0134292 A1.

Abou-Arab, A., Abou-Arab, A., & Abu-Salem, M. F. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners Steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4: 269-281.

A. O. A. C. (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International 17th Ed. Published by the AOAC International, Suite 400, 2200 Wilson Boulevard, Arlington, Virginia 22201 - 3301. USA.

Babcock Audrey, J. (2011). High purity steviol glycoside. WO/2011/112892.

Brandle Jime (2001). *Stevia Rebaudiana* with altered steviol glycoside composition. London CA, Patent number: 6255557.

Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, 121: 41-54.

Gardana, C., Scaglianti, M., & Simonetti, P. (2010). Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1217: 1463-1470.

Jackson Mel Clinton, Gordon James Francis, Robert Gordon Chase (2006). High yield method of producing pure rebaudioside A. United States Patent, 7923552.

Jaitak, V., Gupta, A. P., Kaul, V., & Ahuja, P., 2008, Validated high-performance thinlayer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47: 790-794.

Munish Puria, Deepika Sharma, Ashok K. Tiwari, 2012, Downstream processing of Stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances*; 29: 781-791.

Nguyễn Kim Cẩn, Lê Nguyệt Nga (2001). Định lượng stevioside trong lá cỏ ngọt, Công trình nghiên cứu khoa học 1987-2000, Viện dược liệu, Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 125-128.

Phạm Thành Lộc, Lê Ngọc Thạch (2009). Nghiên cứu sử dụng thiết bị Soxhlex-vi sóng trích ly một số hợp chất thiên nhiên, Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG-TPHCM

Trần Đình Long, Liakhovkin A. G., Mai Phương Anh (1992). Cây cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bertoni). NXB Nông nghiệp.

Yang; Míngfú, Hua; Jun, Qín; Ling (2007). High-purity rebaudioside A and method of extracting same. United States Patent, 7, 923,541.