

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT ĐẾN HÀM LƯỢNG MOGROSIDE THU ĐƯỢC TỪ QUẢ LA HÁN

Phạm Hương Sơn*, Hoàng Văn Tuấn, Nguyễn Thị Hiền, Lê Kiều Oanh

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, *sonph@most.gov.vn

TÓM TẮT: Dịch chiết từ quả La hán và các thành phần của nó, đặc biệt là mogroside được sử dụng rộng rãi như một chất phụ gia thực phẩm và nhiều ứng dụng khác trong công nghiệp dược phẩm, y học. Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định ảnh hưởng của các điều kiện tách chiết đến tỷ lệ mogroside thu được trong dịch chiết. Kết quả chỉ ra rằng, áp suất thẩm thấu ở các nồng độ dung môi khác nhau ảnh hưởng đến hàm lượng mogroside thu được. Nhiệt độ tăng làm tăng vận tốc khuếch tán của mogroside vào dung môi. Khi sử dụng phương pháp chiết ngâm phân đoạn trong dung môi ethanol 55% ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 70 phút và tỷ lệ sinh khối/dung môi là 1:19 (g/ml) thu được hàm lượng mogroside cao nhất. Tỷ lệ mogroside tách ra được xác định ở mức 76,4%.

Từ khóa: *Siraitia grovenorii*, điều kiện tách chiết, glycoside, mogroside.

MỞ ĐẦU

La hán (*Siraitia grovenorii* Swingle) là loài thực vật thuộc họ bầu bí, được xếp vào nhóm thảo dược truyền thống của Trung Quốc. Quả La hán được sử dụng như một loại dược liệu quý trong chữa trị một số bệnh như sốt, ho [8]. Với độ ngọt cao, quả La hán được bổ sung kèm trong các vị thuốc bắc hoặc dùng làm nước uống hàng ngày trong thói quen của người Trung Quốc. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng, các hợp chất mogroside (glycoside) có trong quả La hán là nguyên nhân làm giảm một số căn bệnh liên quan đến hệ thống hô hấp và tiêu hóa ở người như: chứng tăng huyết áp, bệnh lao, bệnh suyễn, tiểu đường [7]. Nhiều hợp chất mogroside có trong quả La hán đã được phát hiện và tách chiết thành công, trong số đó có mogroside IV và mogroside V chiếm thành phần chủ yếu và có độ ngọt cao nhất [1]. Mặc dù có độ ngọt cao, nhưng chất ngọt trong quả La hán rất khó bị phân hủy bởi enzyme trong cơ thể người, khó hấp thu và chuyển hóa thành năng lượng, vì vậy, khả năng sinh năng lượng thấp [5]. Do đó, cây La hán là một nguồn cung cấp đường rất tốt cho những người ăn kiêng, đặc biệt là người bị tiểu đường.

Nhiều nghiên cứu đã khẳng định mogroside có hoạt tính sinh học cao, có khả năng kháng viêm, chống oxy hóa, chống lại sự tăng sinh của tế bào ung thư. Qi et al. (2008) [6] đã tiến hành thử nghiệm hiệu quả trên chuột kháng bệnh tiểu đường của mogroside được tách chiết từ quả La

hán. Sau 4 tuần thử nghiệm cho thấy, hàm lượng đường, cholesterol tổng số của tất cả nhóm chuột tiểu đường đều giảm đáng kể. Ngoài ra, các kết quả thu được còn cho thấy, mogroside còn có khả năng làm tăng quá trình lưu thông oxy trong máu, kim hãm sự gia tăng cholesterol, một dạng biến chứng thường gặp khi mắc bệnh tiểu đường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Quả La hán; dung dịch mogroside chuẩn (Biotech Co., Trung Quốc), vanillin (Đức), ethanol 97,6% (Trung Quốc), methanol, butanol (Đức).

Phương pháp

Phương pháp tách chiết

Quả La hán được rửa sạch, sấy khô, sau đó nghiền nhỏ. Tiến hành quá trình tách chiết thu dịch chiết giàu glycoside (mogroside) với các điều kiện được khảo sát và thiết lập dựa trên các nghiên cứu của Song et al. (2007) [7], Qi et al. (2008) [6], Liu et al. (2011) [4], gồm: dung môi tách chiết là methanol, ethanol, butanol và nước có nồng độ trong khoảng 30-70%. Sử dụng 2 phương pháp tách chiết là ngâm 1 lần và ngâm phân đoạn ở điều kiện nhiệt độ tách chiết (50-70°C), thời gian chiết (30-90 phút) và tỷ lệ sinh khối/dung môi (1:10-1:25, g/ml) khác nhau. Dịch chiết thô được lọc qua vải lọc, sau đó là màng lọc kích thước 0,45 μm . Cô đặc loại dung

môi trên thiết bị cô chân không Heidolph (Đức) và sử dụng cho xác định tổng mogroside có trong dịch chiết.

Phương pháp xác định mogroside

Nguyên tắc: Glycoside trong quả La hán tồn tại dưới dạng các mogroside, chủ yếu là triterpene glucoside. Aglycone của triterpene là một terpene alcohol có khả năng tạo màu trong dung dịch vanillin-sulfuric acid. Phản ứng này sử dụng để xác định hàm lượng mogroside có trong quả và dịch chiết từ quả La hán. Cường độ màu tỉ lệ thuận với hàm lượng mogroside được xác định ở bước sóng 590 nm [3].

Dụng cụ chuẩn: Cân chính xác 30 mg dịch chiết từ quả La hán chuẩn cho vào ống nghiệm thể tích 10 ml. Bổ sung ethanol 70% để hòa tan và định mức đến thể tích 10 ml. Lắc đều và lấy chính xác 20, 30, 40, 50, 60 μ l dung dịch cho vào ống nghiệm 10 ml có nắp. Bổ sung ethanol 70% vào ống nghiệm sao cho tổng thể tích là 0,5 ml. Bổ sung tiếp 0,5 ml dung dịch ethanol - vanillin 10% vào mỗi ống, lắc nhẹ và giữ ống nghiệm trong nước đá. Bổ sung thêm 5 ml dung dịch sulfuric acid 75% và lắc nhẹ. Giữ

ống nghiệm trong bể ổn nhiệt ở 50°C trong 20 phút sau đó cho vào nước đá ngay. Sau 10 phút, đo độ hấp thụ màu của mẫu ở bước sóng 590 nm trên máy UV-Vis HeLIOS α v7.07 (Đức).

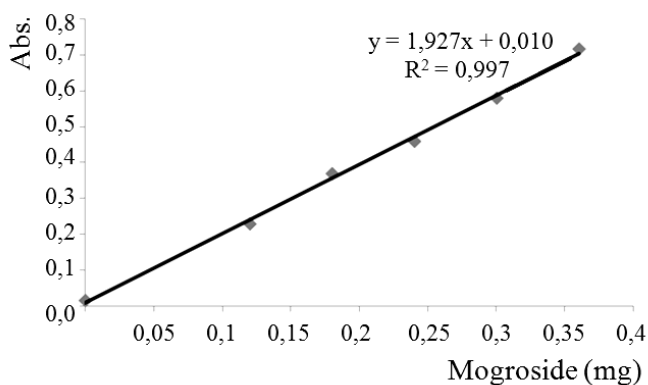
Xác định tổng mogroside: Cân chính xác 30 mg mẫu cho vào ống có thể tích 10 ml. Bổ sung ethanol 70% để hòa tan và định mức đến thể tích 10 ml. Lắc nhẹ và lấy chính xác 75 μ l dịch cho vào ống nghiệm 10 ml có nắp. Tiếp tục thực hiện như bước dựng đường chuẩn để xác định bước sóng ở 590 nm (bổ sung ethanol 70%, bước sóng 590 nm). Sử dụng đồ thị đường chuẩn để xác định hàm lượng mogroside chuẩn. Tỷ lệ thu hồi (độ tinh khiết) của mogroside tách ra trong dịch chiết được xác định theo công thức sau:

$$Y, \% = C / (7,5 \times W) \times 100$$

Trong đó, C là hàm lượng mogroside chuẩn xác định từ đường chuẩn (μ g); W là khối lượng mẫu (mg); Y là tỷ lệ mogroside được tách ra từ mẫu thô.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả dựng đường chuẩn mogroside



Hình 1. Đường chuẩn mogroside

Từ phương trình đường chuẩn: $A = 1,9276 C + 0,01$ ($R^2 = 0,9976$). Trong đó, C (μ g) là hàm lượng mogroside, A là độ hấp thụ màu.

Ảnh hưởng của loại dung môi

Kết quả phân tích ảnh hưởng của các dung môi khác nhau sử dụng để tách chiết mogroside từ quả La hán được chỉ ra trong bảng 1 cho thấy, trong các dung môi sử dụng, methanol cho hiệu quả tách chiết cao nhất, thứ 2 là ethanol. Tuy

nhiên, do mục đích thu nhận chế phẩm giàu mogroside và ứng dụng trong sản xuất thực phẩm nên nghiên cứu đã lựa chọn ethanol là dung môi tách chiết. Ngoài ra, trong 2 phương pháp sử dụng là ngâm 1 lần và ngâm phân đoạn, ở cùng một dung môi, phương pháp ngâm phân đoạn cho hiệu quả tách cao hơn. Lượng mogroside được tách ra khi sử dụng phương pháp ngâm phân đoạn trong dung môi ethanol là 50,8%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của loại dung môi tách chiết đến hàm lượng mogroside thu được

Dung môi	% Mogroside	Std. Deviation	Std. Error
S-Methanol	47,4	0,6557	0,3786
S-Ethanol	45,57	1,097	0,6333
R-Ethanol	50,8	0,9644	0,5568
S-Butanol	32,47	0,7024	0,4055
S-Nước	35,57	0,7095	0,4096

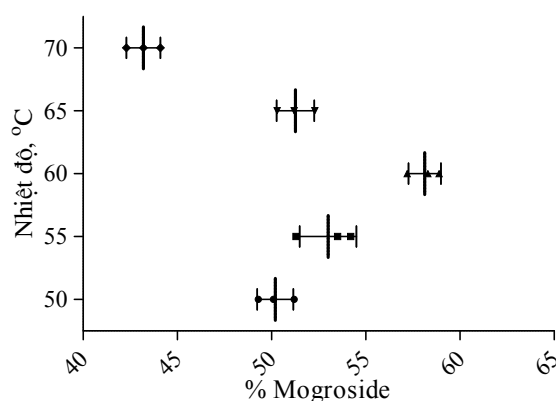
S. Ngâm 1 lần; R. Ngâm phân đoạn

Ảnh hưởng của nhiệt độ tách chiết

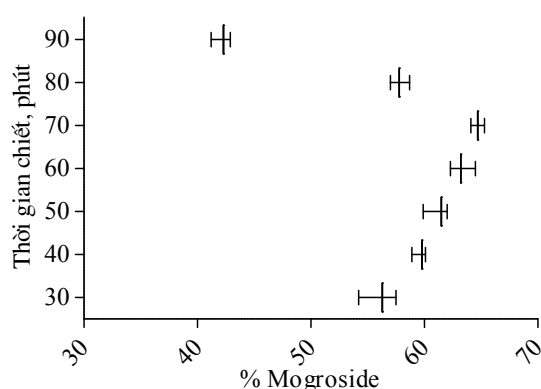
Ảnh hưởng của nhiệt độ tách chiết đến lượng mogroside được tách ra trong dung môi được chỉ ra trong hình 2.

Nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến lượng mogroside tách ra trong dịch chiết. Nhiệt độ cao làm tăng vận tốc khuếch tán của mogroside ra

ngoài dung môi. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng quá cao sẽ làm giảm hiệu quả của quá trình tách vì đã làm bay hơi một phần dung môi và gây ảnh hưởng đến trạng thái của tế bào. Tổng hợp các số liệu thu được (hình 2) cho thấy, giá trị nhiệt độ thích hợp nhằm thu được hàm lượng mogroside cao nhất xác định được là 60°C, tỷ lệ mogroside được tách ra là 58,13%.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ tách chiết đến hàm lượng mogroside có trong dịch chiết



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian tách chiết đến hàm lượng mogroside có trong dịch chiết

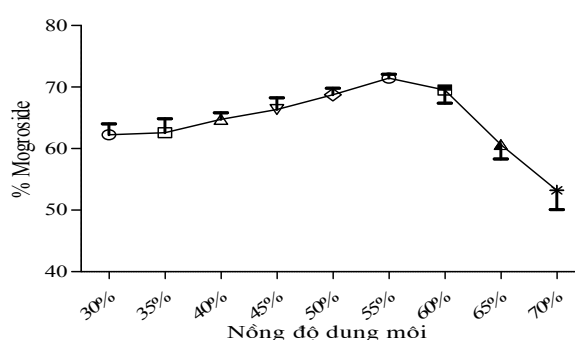
Ảnh hưởng của thời gian tách chiết

Kết quả phân tích hàm lượng tổng mogroside có trong dịch chiết từ quả La hán ở các khoảng thời gian tách chiết khác nhau cho thấy, ở điều kiện nhiệt độ 60°C, thời gian 70 phút cho hiệu quả tách chiết cao nhất, lượng mogroside đạt 64,7%. Khi tăng thời gian chiết sẽ làm tăng quá trình bốc hơi của dung môi, làm giảm tính thấm của màng tế bào, do đó làm giảm hàm lượng mogroside có trong dịch chiết (80 phút là 57,83%; 90 phút là 42,13%). Vì vậy,

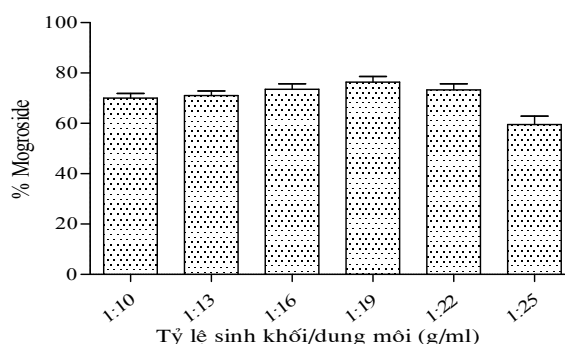
thời gian 70 phút được lựa chọn là một trong những điều kiện tách chiết thích hợp để thu nhận dịch chiết giàu mogroside từ quả La hán (hình 3).

Ảnh hưởng của nồng độ dung môi

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nồng độ dung môi ethanol khác nhau đến khả năng phá vỡ tế bào thông qua hàm lượng tổng mogroside được trích ly vào trong dung môi đã được nghiên cứu, kết quả được chỉ ra trong hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng mogroside có trong dịch chiết



Hình 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ sinh khối/dung môi đến hàm lượng mogroside có trong dịch chiết

Ở các nồng độ dung môi lớn hơn, do sự chênh lệch áp suất thẩm thấu nên làm giảm quá trình khuếch tán của các mogroside ra ngoài môi trường lỏng, vì vậy, làm giảm hàm lượng mogroside có trong dịch chiết la hán thu được. Sử dụng ethanol ở nồng độ 55% giúp tạo ra trạng thái chênh lệch áp suất thẩm thấu giữa bên trong và bên ngoài tế bào tốt nhất, hàm lượng mogroside được giải phóng ra ở mức cao nhất so với các nồng độ dung môi khác, giá trị tổng

mogroside xác định được là 71,9%, cao hơn so với ethanol ở nồng độ 50% (69,5%) và ethanol ở nồng độ 60% (71%).

Ảnh hưởng của tỷ lệ sinh khối/dung môi

Kết quả phân tích hàm lượng tổng mogroside có trong dịch chiết từ quả La hán thu được khi sử dụng các tỷ lệ bổ sung sinh khối khác nhau cho thấy, sử dụng tỷ lệ bổ sung ở mức 1:19 (g/ml) cho kết quả tách chiết cao nhất, lượng mogroside đạt được là 76,4% (hình 5).

Kết quả thu được cũng gần tương đương với giá trị được đưa ra trong nghiên cứu của Li Hai-bin (2007), 76,56%.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác lập được các điều kiện tách chiết thích hợp nhằm thu được dịch chiết la hán có hàm lượng mogroside cao. Mogroside được tách chiết từ quả La hán theo phương pháp chiết ngâm phân đoạn trong dung môi ethanol 55%, ở điều kiện nhiệt độ 60°C, thời gian 70 phút, tỷ lệ sinh khối/dung môi sử dụng cho tách chiết là 1:19 (g/ml). Độ tinh khiết của mogroside có trong dịch chiết thu được đạt 76,4%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Li D., Ikeda T., Huang Y., Liu J., Nohara T., Sakamoto T., Nonaka G., 2007. Seasonal variation of mogrosides in Lo Han Kuo (*Siraitia grosvenori*) fruits. *J. Nat. Med.*, 61: 307-312.
- Li Hai-bin, 2007. Microwave extraction of triterpene glucoside from Luohanguo. *Chinese*, 28(3): 143-147.
- Li J., He R., Hou G., Lu C., Danli L., 2004. Effects of ultrasonic wave on the extraction of mogrosides. *Food Ferment. Ind.*, 30(10), 136-138.
- Liu C., Liu J., Rong Y., Rong L., 2011. Preparation of productive and highly purified mogroside from *Siraitia grosvenorii*. *African Journal of Biotechnology*, 10(36): 7021-7025.
- Matsumoto S., Jin M., Dewa Y., Nishimura J., Moto M., Murata Y., Shibutani M., Mitsumori K., 2009. Suppressive effect of *Siraitia grosvenorii* extraction dicyclanil-promoted hepatocellular proliferative lesions in male mice. *J. Toxicol. Sci.*, 34(1): 109-118.
- Qi X. Y., Chen W. J., Zhang L. Q., Xie B. J., 2008. Mogroside extract from *Siraitia grosvenori* scavenges free radicals in vitro and lowers oxidative stress, serum glucose, and lipid levels in alloxan-induced diabetic mice. *Nutrition Research*, 28: 278-284.
- Song F., Qi X., Chen., Jia W., Yao., Nussler A. K., Sun X., Liu L., 2007. Effect of *Momordica grosvenori* on oxidative stress pathways in renal mitochondria of normal and alloxan-induced diabetic mice. *Eur. J. Nutr.*, 46: 61-69.
- Tsang K. Y., Ng T. B., 2001. Isolation and characterization of a nes ribosome inactivating protein, momogrosin, from seeds of the monk's fruit *Momordica grosvenorii*. *Life Sciences*, 68: 773-784.

EFFECTIVE INVESTIGATION OF EXTRACTED CONDITIONS TO OBTAINED MOGROSIDE CONTENT FROM *SIRAITIA GROSVENORII*

Pham Huong Son, Hoang Van Tuan, Nguyen Thi Hien, Le Kieu Oanh

Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress

SUMMARY

Siraitia grosvenorii extract and its ingredients, the characteristic is mogroside, were widely used as a food additive and many other applications in medical industry. The purpose of this study is to determine the effect of extracted conditions to percentage of mogroside in *S. grosvenorii* extract. The results indicated that the osmotic pressure at the different concentration of solvent affects to obtained mogroside content. Increasing temperature rise the diffuse velocity of mogroside into solvent. Using the method of fractional soaking extraction with 55% ethanol solvent at 60°C temperature in 70 minutes, and rate of biomass/solvent is 1:19 (g/ml) was obtained the highest mogroside. The percentage of obtained mogroside is determined at 76.4%.

Keywords: *Siraitia grosvenorii*, extract condition, glycoside, mogroside.

Ngày nhận bài: 17-2-2012