



Original Article

# A Simplified Method for Simultaneous Extraction and Purification of Stevioside and Rebaudioside A from *Stevia Rebaudiana* Bert. Applying in Pharmaceutical

Tran Trong Bien\*, Nguyen Van Han

Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

Received 16 November 2021

Revised 20 December 2021; Accepted 24 December 2021

**Abstract:** Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bert., notably stevioside and rebaudioside A, are ingredients with many pharmaceutical applications. In which rebaudioside A has a uniform sweetness with no bitter aftertaste. A simple method for the simultaneous extraction of stevioside and rebaudioside A has been studied with basic steps including extracting medicinal herbs with water, removing impurities using lime milk, neutralizing with citric acid, purifying with water-saturated *n*-butanol, and crystallizing fractional to obtain stevioside and rebaudioside A. The spectral data of IR, MS, and NMR have demonstrated the product structure as stevioside and rebaudioside A. This result is a premise for further studies.

**Keywords:** *Stevia rebaudiana*, pharmaceutical, stevioside, rebaudioside A.

\* Corresponding author.

E-mail address: [trantrongbien@gmail.com](mailto:trantrongbien@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4383>

# Nghiên cứu phương pháp chiết xuất và tinh chế đồng thời Steviosid và Rebaudiosid A ứng dụng trong dược phẩm từ Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Trần Trọng Biên\*, Nguyễn Văn Hân

Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 11 năm 2021

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 12 năm 2021; Chấp nhận đăng ngày 24 tháng 12 năm 2021

**Tóm tắt:** Steviol glycosid từ Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bert.), nổi bật là steviosid và rebaudiosid A, là các nguyên liệu có nhiều ứng dụng trong Dược phẩm. Trong đó rebaudiosid A có độ ngọt đồng nhất, không có dư vị đắng. Một phương pháp đơn giản giúp chiết xuất đồng thời steviosid và rebaudiosid A đã được nghiên cứu với các bước cơ bản gồm: chiết xuất dược liệu bằng nước, loại tạp chất bằng nước sữa vôi, trung hòa bằng acid citric, tinh chế bằng *n*-butanol và kết tinh phân đoạn thu được steviosid và rebaudiosid A. Các dữ liệu phổ IR, MS, NMR đã chứng minh cấu trúc sản phẩm là steviosid và rebaudiosid A. Đây là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo.

**Từ khóa:** Cỏ ngọt, dược phẩm, steviosid, rebaudiosid A.

## 1. Mở đầu

Hiện nay, xu hướng sử dụng các chất ngọt tự nhiên trong Dược phẩm ngày càng tăng do những ưu điểm nổi bật về tính an toàn với cơ thể và vai trò đa dạng của chúng (chất điều vị, chất mang thuốc,...) [1, 2]. Một trong số đó là các steviol glycosid từ Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bert.), trong đó steviosid và rebaudiosid A là những nguyên liệu giá trị nhất. Steviosid có độ ngọt thấp hơn rebaudiosid A, lại có dư vị đắng, dư vị đó xuất hiện ngay cả trong mẫu tinh khiết đến 99%. Rebaudiosid A có độ ngọt đồng nhất, không có dư vị đắng [3]. Đã có một số nghiên cứu chiết xuất và phân lập steviosid từ Cỏ ngọt [4-6]. Một số ít nghiên cứu khác về phân lập rebaudiosid A từ steviol glycosid bằng phương pháp sắc ký lỏng tương tác thân nước [7], hấp phụ với nhựa macroporous [8, 9]. Các nghiên

cứu này sử dụng các kỹ thuật phức tạp, tốn thời gian và chủ yếu phân lập được một thành phần steviol glycosid. Do đó, để khai thác hiệu quả giá trị của dược liệu này, chúng tôi nghiên cứu phương pháp đơn giản, khả thi để chiết xuất đồng thời steviosid và rebaudiosid A.

## 2. Nguyên vật liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên vật liệu

Cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bert.) được thu hái tháng 12 năm 2020 tại Hải Hậu, Nam Định và có đặc điểm phù hợp với mô tả trong Dược điển Việt Nam 5 [10]. Tên khoa học của Cỏ ngọt được giám định bởi PGS. TS. Nguyễn Văn Hân, Đại học Dược Hà Nội. Dược liệu (Lá) được sấy

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: trantrongbien@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4383>

ở 50 °C trong 3 giờ, xay nhỏ và bảo quản trong túi nilon kín ở nhiệt độ phòng, hàm ẩm 7,2%. Vôi bột và ethanol 96% (Việt Nam); acid citric, acid phosphoric, acid acetic, *n*-butanol, natri sulfat khan (Trung Quốc), nhựa cationit (Purolite C100E, Anh), nhựa anionit (Trilite, Hàn Quốc). Chất đối chiếu Rebaudiosid A (ĐC, Hàm lượng 97%, Công ty cổ phần thương mại Toàn cầu Stevia, ngày sản xuất 28/8/2020).

## 2.2. Thiết bị

Bình chiết nóng được liệu, máy cô quay chân không Buchi B-490 và R-220 (Thụy Sĩ), máy đo nhiệt độ nóng chảy Mettler Toledo FP62 (Mettler) của trường Đại học Dược Hà Nội. Máy đo phổ hồng ngoại (IR) Perkin Elmer, máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, máy đo phổ khối (MS) Varian 320 MS (Mỹ) của Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1. Phương pháp chiết xuất

Phương pháp ngâm nóng với dung môi nước ở nhiệt độ 60 °C, chiết 2 lần  $\times$  3 giờ/lần, tỷ lệ dung môi/dược liệu (DM/DL) là 7/1. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc [4].

### 2.3.2. Phương pháp tinh chế

Loại tạp bằng nước vôi: cô đặc dịch chiết còn một nửa thể tích, điều chỉnh đến pH 9-10 bằng nước sữa vôi 10%, khuấy nhẹ (1 giờ, 50 °C), sau đó làm lạnh về 0-5 °C, lọc trong và điều chỉnh về pH 6-7 (dùng acid phosphoric hoặc acid citric), khuấy nhẹ (30 phút, 50 °C), cô quay ở 60°C đến khi không còn tủa xuất hiện, lọc nóng loại tủa (nếu có).

Tinh chế bằng nhựa trao đổi ion: cô dịch lọc sau trung hòa ở 60 °C đến còn 1/3 thể tích, thêm 2-3 lần ethanol 96% (EtOH 96%), khuấy đều, để lắng (5-8 °C, 12 giờ), lọc trong, rửa tủa bằng 20 mL EtOH 96%. Cô dịch lọc đến hết EtOH và pha loãng với nước cất thành 200 mL. Nạp dịch chiết lần lượt qua cột chứa nhựa cationit và anionit (40 g nhựa, tốc độ 3 mL/phút), rửa giải bằng nước cất (tốc độ 3 mL/phút) đến hết hoạt chất. Cô dịch

rửa giải đến cạn, hòa tan cạn trong 4 phần methanol (MeOH) nóng và để kết tinh (0-5 °C, 24 giờ), lọc và rửa nhanh tinh thể bằng MeOH lạnh (1 mL), sấy khô thu được glycosid toàn phần.

Tinh chế bằng dung môi: cô dịch lọc sau trung hòa ở 60 °C đến cạn, đun hồi lưu cạn với 10 phần dung dịch *n*-butanol bão hòa nước (2 lần  $\times$  3 giờ). Thu dịch *n*-butanol, loại nước bằng natri sulfat khan. Cô thu hồi dung môi ở 60 °C đến cạn, hòa tan cạn trong MeOH nóng (150 mL) và để kết tinh (0-5 °C, 12 giờ). Lọc và rửa nhanh tinh thể bằng MeOH lạnh (1 mL), sấy khô thu được glycosid toàn phần.

Phân lập stevioid và rebaudiosid A: hòa tan glycosid toàn phần trong MeOH nóng và để kết tinh thu được stevioid. Nước cái được cô đặc và kết tinh trong MeOH thu được rebaudiosid A.

### 2.3.3. Phương pháp kiểm nghiệm

Sắc ký lớp mỏng (SKLM): pha tĩnh là bản mỏng Silicagel 60 GF<sub>254</sub> (Merck) hoạt hóa ở 105-110 °C trong 1 giờ, pha động là *n*-butanol : acid acetic : nước (6:1:2, tt/tt). Mẫu đối chiếu là rebaudiosid A pha trong nước cất có nồng độ 1 mg/mL. Thuốc thử hiện màu là dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong MeOH, sấy 2 phút ở 110 °C và quan sát ở ánh sáng thường [10].

Nhận diện cấu trúc: xác định cấu trúc sản phẩm tinh chế bằng các dữ liệu phổ IR, MS, NMR và so sánh với dữ liệu phổ đã công bố.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Điều chế dịch chiết

Sắc ký đồ dịch chiết nước Cỏ ngọt cho 2 vết màu tím tương đối đậm (Hình 1A). Vết có  $R_f=0,58$  tương ứng với  $R_f$  của vết đối chiếu (rebaudiosid A) nên dự đoán vết này là rebaudiosid A. Vết còn lại có  $R_f=0,67$  được dự đoán là steviosid (chất chiếm tỷ lệ lớn nhất trong các steviol glycosid cỏ ngọt). Tạp chất trong dịch chiết nước tương đối nhiều, phân bố ở cả trên và dưới vết hoạt chất, tuy nhiên tạp ở dưới vết hoạt chất là chủ yếu. Đồng thời, vết hoạt chất ở dịch chiết lần 3 rất mờ so với 2 lần chiết đầu. Do đó, tiến hành chiết 2 lần theo điều kiện đã lựa chọn.

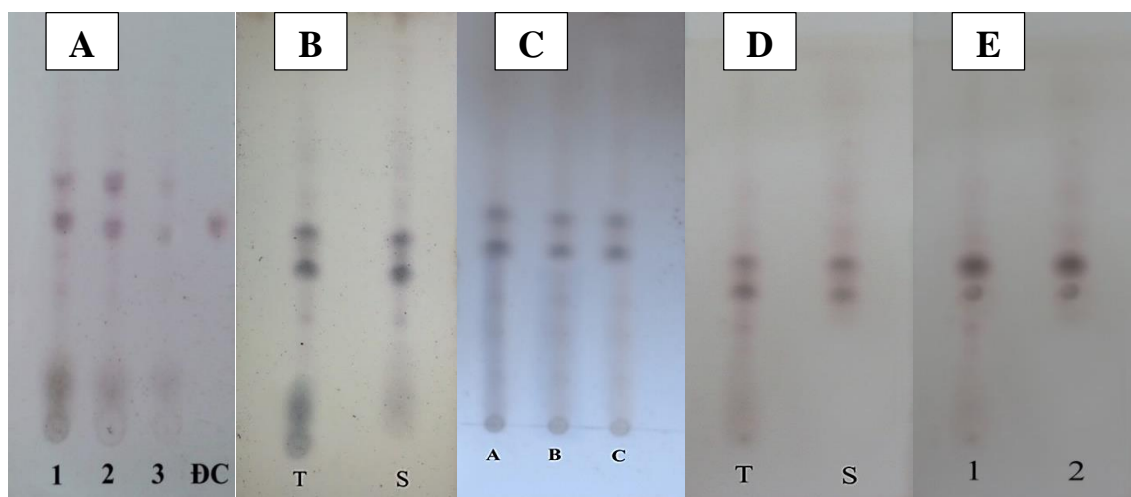
### 3.2. Tinh chế steviol glycosid toàn phần

Loại tạp bằng nước sữa vôi: khi thêm 37,5 g nước sữa vôi vào dịch chiết đã loại được 133,5 g chất rắn. Từ sắc ký đồ Hình 1B cho thấy, các vết tạp chất dưới vết hoạt chất trong dịch tinh chế bằng nước sữa vôi đã giảm đáng kể. Một số nghiên cứu sử dụng vôi bột hay nước vôi trong để kết tủa một số tạp tan trong nước như gôm, chất nhầy, pectin và một số ion kim loại nặng [4]. Tuy nhiên, nếu sử dụng vôi bột thì khó kiểm soát được pH do vôi bột ít tan, nếu sử dụng nước vôi trong thì làm loãng dịch chiết, điều này gây khó khăn cho quá trình cô loại dung môi để thu hồi hoạt chất. Vì vậy, nghiên cứu đã sử dụng nước sữa vôi để khắc phục những hạn chế trên. Đồng thời, so sánh 2 acid sử dụng để trung hòa dịch chiết cho thấy, acid citric ưu điểm hơn acid

phosphoric: thao tác thực hiện đơn giản hơn. Acid citric có khả năng tạo phức hoặc muối khó tan với nhiều ion kim loại (Ví dụ  $Ca^{2+}$  dư) và các tạp chất khác.

Bảng 1. So sánh acid citric và acid phosphoric trong trung hòa dịch chiết

Chỉ tiêu so sánh	Trung hòa với acid citric	Trung hòa với acid phosphoric
Lượng tủa	Nhiều	Ít
Tủa lẫn hoạt chất	Không	Không
Tính chất tủa	Xốp	Nhớt
Khả năng loại tủa	Dễ lọc	Khó lọc



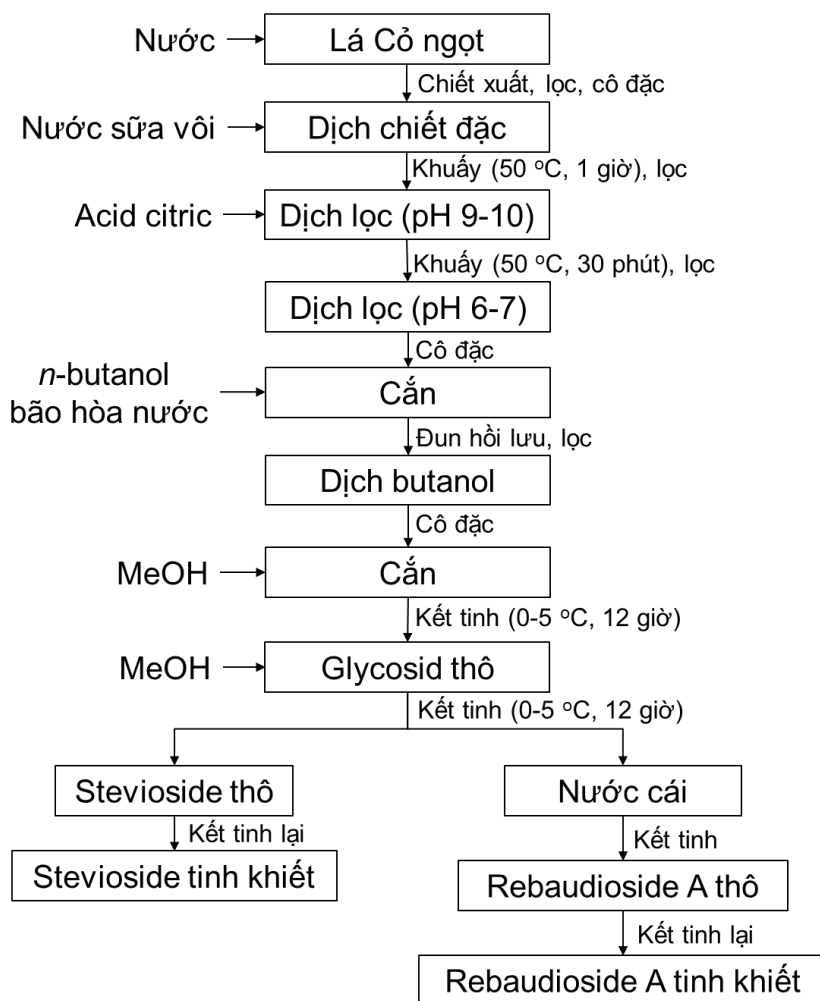
Hình 1. SKLM theo dõi quá trình chiết và tinh chế steviol glycosid. A. Chiết xuất (1, 2, 3, ĐC tương ứng là dịch chiết lần 1, 2, 3 và rebaudiosid A đối chiếu), B. Kết tủa bằng vôi sữa (T: dịch chiết, S: dịch tinh chế), C. Trao đổi ion (A. dịch nạp cột, B. dịch rửa giải từ cationit, C. dịch rửa giải từ anionit), D. Tinh chế bằng dung môi (T: dịch trước tinh chế, S: dịch *n*-butanol), E. Sản phẩm kết tinh (1: kết tinh sau tinh chế bằng nhựa trao đổi ion, 2: kết tinh sau tinh chế bằng *n*-butanol).

So sánh phương pháp trao đổi ion và phương pháp dung môi: với phương pháp trao đổi ion, SKLM ở Hình 1C cho thấy dịch rửa giải khác không đáng kể so với dịch trước tinh chế, mặc dù nhựa anionit có phần thể hiện khả năng loại tạp tốt hơn nhựa cationit khi dịch rửa giải sạch hơn và vết tạp chất mờ hơn. Với phương pháp dung môi, SKLM ở Hình 1D cho thấy dịch chiết

*n*-butanol khá sạch, vết tạp dưới vết hoạt chất còn lại không đáng kể và chỉ còn một số vết tạp trên vết hoạt chất. Phương pháp trao đổi ion có cách tiến hành khá phức tạp, chi phí cao hơn và thời gian kết tinh lâu (7 ngày), hiệu suất thấp hơn (1,96 g/250 g dược liệu) do dịch rửa giải còn lẫn nhiều tạp chất. Phương pháp dung môi tiến hành khá đơn giản, chi phí thấp hơn, thời gian kết tinh

ngắn hơn (2 ngày) và hiệu suất cao hơn (3,07 g/250 g dược liệu). Mặt khác, từ sắc ký đồ Hình 1E cho thấy, sản phẩm kết tinh thu được sau tinh chế bằng 2 phương pháp đều là hỗn hợp các steviol glycosid (trong đó steviosid chiếm tỷ lệ

cao nhất, rebaudiosid A chiếm tỷ lệ ít hơn), tuy nhiên phương pháp dung môi cho sản phẩm ít tạp hơn. Điều này chứng tỏ phương pháp dung môi sử dụng *n*-butanol bão hòa nước để chiết glycosid từ cỏ khá hiệu quả.



Hình 2. Sơ đồ quy trình chiết xuất đồng thời steviosid và rebaudiosid A từ Cỏ ngọt.

### 3.3. Quy trình chiết xuất và tinh chế steviol glycosid từ Cỏ ngọt

Tiến hành theo sơ đồ Hình 2. Cân 250 g bột lá Cỏ ngọt vào bình chiết, chiết xuất bằng nước ở nhiệt độ 60 °C, chiết 2 lần × 3 giờ/lần, tỷ lệ DM/DL là 7/1. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc. Cô đặc dịch chiết còn 1 L, điều chỉnh đến pH 9-10 bằng nước sữa vôi 10%, khuấy nhẹ (1 giờ, 50

°C), sau đó làm lạnh về 0-5 °C, lọc trong và điều chỉnh pH về 6-7 bằng acid citric, khuấy nhẹ (30 phút, 50 °C), cô quay ở 60 °C đến khi không còn tủa xuất hiện, lọc trong. Cô dịch lọc ở 60 °C thu được cắn (20 g), đun hồi lưu cắn với 10 phần dung dịch *n*-butanol bão hòa nước (2 lần × 3 giờ). Thu dịch *n*-butanol, loại nước bằng natri sulfat khan. Cô thu hồi dung môi ở 60 °C đến cắn (5 g), hòa tan cắn trong 150 mL MeOH nóng và

để kết tinh (0-5 °C, 12 giờ). Lọc và rửa nhanh tinh thể bằng 1 mL MeOH lạnh, sấy khô thu được glycosid toàn phần (3 g).

### 3.4. Phân lập steviosid và rebaudiosid A

Hòa tan nóng glycosid toàn phần (5 g) vào MeOH nóng (150 mL, 60 °C), để kết tinh (0-5 °C, 12 giờ), lọc và rửa tinh thể với MeOH lạnh (1 mL) thu được steviosid thô (3,5 g), kết tinh lại trong cùng điều kiện thu được steviosid tinh khiết (3,35 g). Các phần nước cái được gộp lại, cô còn 40-50 mL và để kết tinh (0-5 °C, 12 giờ), lọc và rửa tinh thể với 1 mL MeOH lạnh thu được rebaudiosid A thô (0,85 g), kết tinh lại trong cùng điều kiện thu được rebaudiosid A tinh khiết (0,7 g). SKLM theo dõi quá trình tinh chế được thể hiện ở Hình 3.

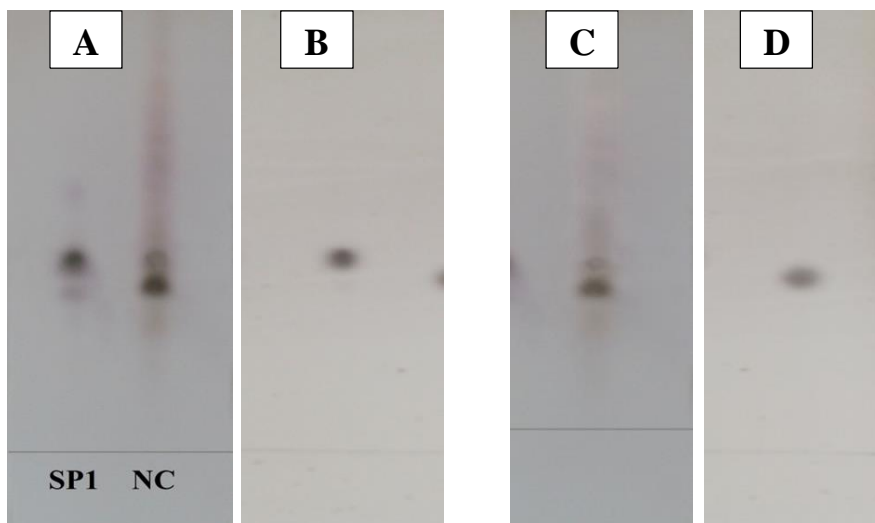
Steviosid thu được là bột màu trắng,  $T_{nc}=206$  °C, IR (KBr)  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3270,27, 3390,71 (-OH), 1746 (C=O), 1657,36 (C=CH<sub>2</sub>), 1085,08, 1044,61 (C-OH). ESI-MS (m/z): 827,22 [M+Na<sup>+</sup>]. ESI-MS (m/z): 803,24 [M-H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz) (ppm): 0,74-0,79 (1H, t), 0,86 (3H, s, CH<sub>3</sub>-20); 0,89-0,90 (1H, d); 0,95-1,05 (2H, m); 1,13 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18); 1,31-1,38 (3H, m); 1,45-1,47 (3H, d); 1,68-1,71 (2H, d); 1,75-1,77 (2H, d); 1,83-1,86 (1H, m); 1,93-2,07 (4H, m); 2,13-2,15 (1H, d); 3,02-3,26 (12H, m); 3,43-3,50 (3H, m); 3,56-3,68 (3H, m); 4,17-4,19 (1H, t); 4,35-4,36 (1H, d); 4,44-4,48 (2H, m); 4,57-4,6 (1H, t); 4,71 (1H, s); 4,83-4,84 (1H, d); 4,95-4,96 (3H); 5,00-5,02 (2H, d); 5,19-5,20 (1H, d); 5,24-5,26 (1H, d); 5,29-5,30 (1H, d); 5,63-5,64 (1H, s). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) (ppm): 15,2 (C-20); 18,7 (C-2); 20,0 (C-11); 21,2 (C-6); 28,1 (C-18); 35,6 (C-12); 37,4 (C-3); 39,0 (C-10); 40,1 (C-1); 41,0 (C-7); 42,0 (C-8); 43,3 (C-4); 43,5 (C-14); 46,9 (C-15); 53,2 (C-9); 56,5 (C-5); 84,7 (C-13); 104,0 (C-17); 153,6 (C-16); 175,7 (C-19) (tổng số 20 carbon của khung steviol). 60,6; 60,8; 61,1 (CH<sub>2</sub>-6',6'',6'''); 69,6; 69,7; 70,4 (CH<sub>2</sub>-4',4'',4'''); 72,6; 75,3; 76,1; 76,2; 76,3; 76,9; 77,0; 77,7; 82,6 (CH-2',2'',2''',3',3'',3''',5',5'',5'''). 94,2; 96,4; 104,6

(CH-1',1'',1''') (tổng số 18 carbon của 3 phân tử đường).

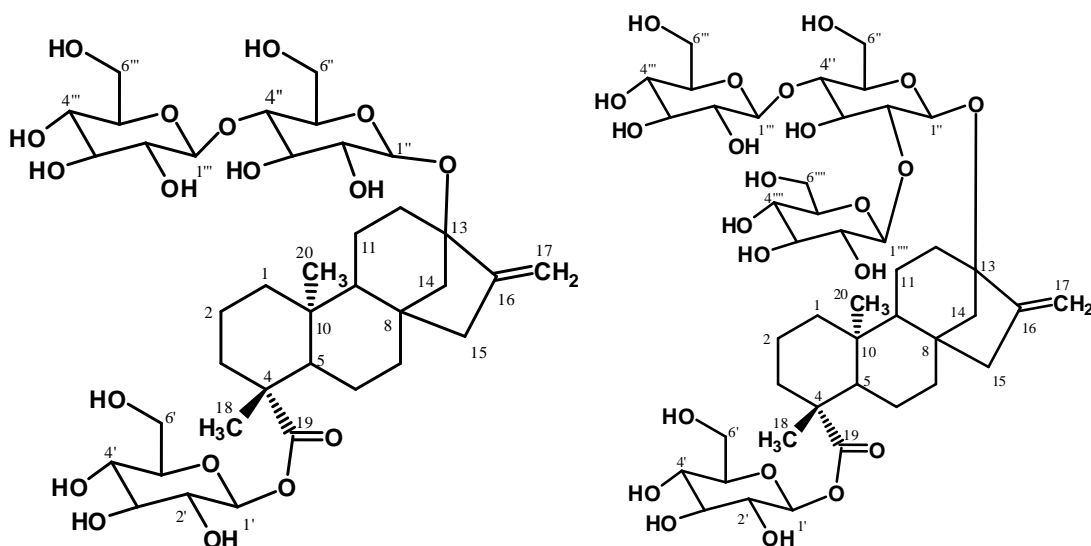
Rebaudiosid A thu được là bột màu trắng,  $T_{nc}=238$  °C, IR (KBr)  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3270,27; 3390,71 (OH), 1746 (C=O), 1657,36 (C=CH<sub>2</sub>), 1085,08; 1044,61 (C-OH). ESI-MS (m/z): 966,19 ([M-H]<sup>-</sup>, 40%); 965,21 ([M-2H]<sup>2-</sup>, 100%). <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500MHz) (ppm): 0,82-0,89 (5H, m); 1,04-1,13 (2H, m); 3,20 (3H, s); 1,42-1,60 (6H, m); 1,82-2,01 (7H, m); 2,16-2,18 (3H); 3,21-3,24 (2H, t); 3,31-3,53 (13H, m); 3,61 (1H); 3,67-3,70 (4H, m); 3,81-3,89 (5H, m); 4,74-4,76 (1H); 4,81-4,83 (1H, d); 4,90 (1H, s); 5,13-5,17 (1H, d); 5,40-5,41 (1H, d). <sup>13</sup>C NMR & DEPT (Pyridin-d<sub>5</sub>) (ppm): 15,5 (CH<sub>3</sub>-20); 19,4 (CH<sub>2</sub>-2); 20,6 (CH<sub>2</sub>-11); 21,1 (CH<sub>2</sub>-6); 28,3 (CH<sub>3</sub>-18); 36,9 (CH<sub>2</sub>-12); 38,4 (CH<sub>2</sub>-3); 39,8 (C-10); 40,7 (CH<sub>2</sub>-1); 41,7 (CH<sub>2</sub>-7); 42,5 (C-8); 44,0 (C-4); 44,5 (CH<sub>2</sub>-14); 47,7 (CH<sub>2</sub>-15); 54,0 (CH-9); 57,3 (CH-5); 87,9 (C-13); 104,7 (CH<sub>2</sub>-17); 154,1 (C-16); 177,0 (C-19) (tổng số 20 carbon của khung steviol). 62,0; 62,3; 62,6; 62,9 (CH<sub>2</sub>-6',6'',6''',6'''); 70,6; 70,9; 71,5; 71,9 (CH<sub>2</sub>-4',4'',4''',4'''); 73,9; 75,2; 76,2; 77,3; 78,1; 78,3; 78,5; 78,6; 78,9; 79,2; 80,7; 86,5 (CH-2',2'',2''',2''',3',3'',3''',3''',5',5'',5''',5'''). 95,7; 98,1; 104,6; 104,7 (CH-1',1'',1''',1''') (tổng số 24 carbon của 4 phân tử đường glucose).

Các dữ liệu thu được phù hợp với các tài liệu tham khảo, chứng tỏ sản phẩm thu được là steviosid và rebaudiosid A (Hình 4) [3, 5, 11].

Quy trình chiết xuất và tinh chế đồng thời steviosid và rebaudiosid A từ lá Cỏ ngọt đã xây dựng có ưu điểm: đơn giản, nhanh, chi phí thấp, không sử dụng các kỹ thuật phức tạp như sắc ký cột, tách màng và hấp phụ như các nghiên cứu trước [5-9, 11]. Việc sử dụng nước sữa vôi và acid citric giúp loại bỏ đáng kể các tạp chất có trong dịch chiết nước, tạo thuận lợi cho các bước tinh chế tiếp theo. Sử dụng dung môi tinh chế là *n*-butanol hiệu quả và đơn giản hơn phương pháp trao đổi ion. Phương pháp kết tinh phân đoạn để phân lập steviosid và rebaudiosid A cho hiệu suất cao và sản phẩm có tính chất và dữ liệu phổ phù hợp theo các tài liệu tham khảo.



Hình 3. SKLM kiểm tra quá trình phân lập steviosid và rebaudiosid A. A. Phân lập steviosid (SP1: Steviosid thô, NC: Nước cái), B. Steviosid tinh khiết, C. Rebaudiosid thô, D. Rebaudiosid tinh khiết).



Hình 4. Cấu trúc hóa học của sản phẩm steviosid (trái) và rebaudiosid A (phải).

#### 4. Kết luận

Đã chiết xuất và tinh chế được đồng thời steviosid và rebaudiosid A từ Cỏ ngọt bằng quy trình đơn giản gồm các bước cơ bản: chiết xuất bằng nước, loại tạp bằng nước sữa vôi, tinh chế với *n*-butanol bão hòa nước và kết tinh trong methanol. Dựa vào đặc điểm tính chất, nhiệt độ nóng chảy và dữ liệu phổ IR, MS, NMR, đã xác

định sản phẩm là steviosid và rebaudiosid A. Đây là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] K. Song, M. Xin, H. Yu, Z. Zheng, J. Li, M. Li, H. Guo, Y. Tan, X. Wu, Novel Ultra-small Micelles Based on Rebaudioside A: A Potential Nanoplatform for Ocular Drug Delivery,

- International Journal of Pharmaceutics, Vol. 552, No. 1-2, 2018, pp. 265-276, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.006>.
- [2] S. K. Goyal, Samsher, R. K. Goyal, Stevia (*Stevia rebaudiana*) a Bio-sweetener: A Review, International Journal of Food and Nutrition, Vol. 61, No. 1, 2010, pp. 1-10, <https://doi.org/10.3109/09637480903193049>.
- [3] G. Brahmachari, C. L. Mandal, R. Rajiv, M. Sadhan, A. K. Brahmachari, Stevioside and Related Compounds - Molecules of Pharmaceutical Promise: A Critical Overview, Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences, Vol. 344, No. 1, 2011, pp. 5-19, <https://doi.org/10.1002/ardp.201000181>.
- [4] N. V. Tai, N. T. Hang, L. T. Tho, Completing the Extraction and Purification of Stevioside from Stevia Leaves (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.), Pharmaceutical Journal, Vol. 2, No. 454, 2014, pp. 21-25 (in Vietnamese).
- [5] T. N. L. Huong, V. H. Duy, D. M. Hoa, D. D. Phuc, N. D. Thanh, Study on Stevioside Extract of the Species *Stevia rebaudiana* Bertoni, Can Tho University Journal of Science, Vol. 36, 2015, pp. 73-76 (in Vietnamese).
- [6] A. B. Rao, E. Prasad, G. R. S. Sridhar, Y. V. L. Ravikumar, Simple Extraction and Membrane Purification Process in Isolation of Steviosides with Improved Organoleptic Activity, Advances in Bioscience and Biotechnology, Vol. 3, No. 4, 2012, pp. 327-335, <https://doi.org/10.4236/abb.2012.34048>.
- [7] B. Chen, R. Li, X. Chen, S. Yang, S. Li, K. Yang, G. Chen, X. Ma, Purification and Preparation of Rebaudioside A from Steviol Glycosides Using One-Dimensional Hydrophilic Interaction Chromatography, Journal of Chromatographic Science, Vol. 54, No. 8, 2016, pp. 1408-1414, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw093>.
- [8] Y. Liu, D. Di, Q. Bai, J. Li, Z. Chen, S. Lou, H. Ye, Preparative Separation and Purification of Rebaudioside A from Steviol Glycosides Using Mixed-Mode Macroporous Adsorption Resins, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 59, No. 17, 2011, pp. 9629-9636, <https://doi.org/10.1021/jf2020232>.
- [9] J. Li, Z. Chen, D. Di, Preparative Separation and Purification of Rebaudioside A from *Stevia Rebaudiana* Bertoni Crude Extracts by Mixed Bed of Macroporous Adsorption Resins, Food Chemistry, Vol. 132, No. 1, 2012, pp. 268-276, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.077>.
- [10] Ministry of Health, Vietnamese Pharmacopoeia, the 5<sup>th</sup> Edition, Stevia (Leaf), 2018, pp. 1116-1117 (in Vietnamese).
- [11] X. Y. Huang, J. F. Fu, D. L. Di, Preparative Isolation and Purification of Steviol Glycosides from *Stevia Rebaudiana* Bertoni using Highspeed Counter-Current Chromatography Separation and Purification Technology, Vol. 71, No. 2, 2010, pp. 220-224, <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2009.11.025>.