

· 技术方法 ·

基于天然低共熔溶剂的甜叶菊中甜菊糖绿色提取方法及优化

缪晴, 萨比哈·帕合尔丁, 曾思瑀, 潘琪芳*

上海交通大学农业与生物学院, 交大-复旦-诺丁汉植物生物技术研发中心, 上海 200240

摘要 尝试利用天然低共熔溶剂(NADES)提取甜叶菊(*Stevia rebaudiana*)中的甜菊糖, 探索一种高效、绿色和环保的甜菊糖提取新方法。以甜叶菊干叶为原料, 对照传统提取溶剂水, 以甜菊糖中甜菊苷和莱鲍迪苷A的提取浓度作为指标, 筛选出最优的NADES提取配方, 然后通过Box-Behnken响应面法对NADES提取甜叶菊中甜菊糖的工艺条件进行筛选优化。结果表明, 提取效率最高的NADES配方为1,2-丙二醇:甘油:水=8:1:1 (v/v/v), 提取的甜菊苷浓度为2.59 mg·mL⁻¹, 比水提取高16.40%, 提取的莱鲍迪苷A浓度为1.06 mg·mL⁻¹, 比水提取高12.62%; 通过响应面法得到最优提取条件: 提取时间90分钟, 提取温度60°C, 超声功率为80 J·s⁻¹, 预测甜菊苷提取浓度为3.49 mg·mL⁻¹, 莱鲍迪苷A提取浓度为1.43 mg·mL⁻¹, 与实验验证值(甜菊苷浓度为3.48 mg·mL⁻¹, 莱鲍迪苷A浓度为1.42 mg·mL⁻¹)接近。在最优条件下, 甜菊苷提取浓度比初始条件提高了34.36%, 莱鲍迪苷A提取浓度比初始条件提高了33.96%。NADES绿色环保, 且提取效率高于传统溶剂, 可用于甜叶菊中甜菊糖的绿色提取; 同时, 该提取方法可为后续推广至其它大宗经济植物类天然产物的绿色工业生产提供参考。

关键词 天然低共熔溶剂, 甜叶菊, 甜菊苷, 莱鲍迪苷A, 绿色提取

缪晴, 萨比哈·帕合尔丁, 曾思瑀, 潘琪芳 (2021). 基于天然低共熔溶剂的甜叶菊中甜菊糖绿色提取方法及优化. 植物学报 56, 722–731.

甜菊糖是甜叶菊(*Stevia rebaudiana*)中的甜味成分, 主要由甜菊苷和莱鲍迪苷A组成。其中, 甜菊苷约占甜叶菊干叶的6%–8%, 而莱鲍迪苷A含量仅次于甜菊苷, 约占甜叶菊的2%–3% (张杨等, 1998)。甜菊糖是一种天然甜味剂, 具有低热量、高甜度、耐高温及稳定性好等特点, 并且在体内不参与代谢, 无毒性, 无致癌作用, 对人体无副作用, 因此已广泛应用于糖果、饮料、食品和医药等行业, 可以替代蔗糖用于制作无糖食品和饮料等, 被国际上誉为“第三糖源” (陈育如等, 2016)。甜菊糖苷对肥胖病、糖尿病、高血压病、龋齿和动脉硬化等有一定的辅助治疗作用; 此外, 还具有抑制细菌等作用, 并可作为苯丙酮尿症(PKU)病人的糖类替代物(刘贵君和石浩, 2016)。经过几十年的努力, 我国甜菊糖工业生产技术已经成熟。目前, 我国已成为世界第一大甜叶菊种植国、甜菊糖生产国、和甜叶菊出口国。但传统的生产工艺污染高, 产品收率低, 不符合绿色发展理念, 因此, 开展绿色

提取甜菊糖的工艺研究具有重要意义(吴则东等, 2016)。

从甜叶菊中提取甜菊糖的方法包括溶剂提取法(Lemus-Mondaca et al., 2012)、超声辅助提取法(郎青云等, 2019)、微波辅助提取法(Jaitak et al., 2009)、超临界流体萃取法(Erkucuk et al., 2009)、加速溶剂萃取法(Jentzer et al., 2015)、酶解-微膜提取法(Puri et al., 2012)和膜分离技术法(赵永良等, 2010)等。其中, 溶剂提取法是工业生产中主要采用的方法, 而其它方法虽较新颖, 但难以实现工业化生产(严贤春, 2003)。在溶剂提取法中, 由于甜菊糖易溶于水和醇, 因此从甜叶菊中提取甜菊糖一般采用水或醇进行提取。以水作为溶剂提取时, 提取液中包含大量的多糖、蛋白质和鞣质等水溶性杂质, 其含量高于甜菊糖3–6倍, 若不去除会对下一步纯化产生很大干扰(应以坚和王雪奇, 2012)。而醇提取涉及醇的回收, 并且溶剂消耗大, 工艺较复杂, 成本相对较高, 实用性差。

收稿日期: 2021-04-17; 接受日期: 2021-09-17

基金项目: 国家重点研发计划(N0.2018YFA0900600)和上海交通大学农工交叉项目(No.Agri-X201700X)

* 通讯作者。E-mail: panqf@sjtu.edu.cn

天然低共熔溶剂(natural deep eutectic solvent, NADES)是一种由氢键供体和氢键受体组成的低熔混合物(Dai et al., 2015), 具有无毒、易合成、生产成本低廉、生物可降解及环境友好等特点。NADES由细胞初生代谢产物组成, 适合对溶剂残留和毒性要求严格的食品和药品提取, 是一种绿色溶剂。这种溶剂表现出极大的化学选择性, 无论是水溶性的花青素(Dai et al., 2016), 亦或是水溶性极差的有机物芦丁(Huang et al., 2017)都能很好地溶解。因此, NADES在提取、分离、酶催化、有机合成、电化学和农业生物医学等领域都有广泛的应用。

本研究以NADES和传统溶剂水作为提取介质, 采用超声辅助方法提取甜叶菊中的甜菊糖, 筛选出提取率高于水提取的NADES配方; 并结合单因素试验和Box-Behnken设计-响应面法优化NADES提取条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甜叶菊(*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl)干叶于2018年购自广西玉林市芳馨商贸有限公司, 用液氮研磨后密封, 备用。甜菊苷标品纯度 $\geq 96\%$, 莱鲍迪苷A标品纯度 $\geq 96\%$, 均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。1,2-丙二醇和乳酸购自萨恩化学技术(上海)有限公司。甘油购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。葡萄糖购自北京伊诺凯科技有限公司。水来自Minipore超纯水系统(Minipore公司, 法国)。

1.2 主要仪器与设备

电子天平购自赛多利斯科学仪器有限公司。DL-720E智能超声波清洗器购自上海之信仪器有限公司。5425离心机购自德国Eppendorf公司。高效液相色谱-线性离子阱质谱联用仪(LTQ XL)由Thermo Fisher Scientific生产。

1.3 实验方法

1.3.1 NADES制备

按照表1的成分和比例配制NADES, 然后将配好的溶剂置于80℃水浴加热, 直至形成均匀的液体。

表1 不同组合的天然低共熔溶剂

Table 1 Different combinations of natural deep eutectic solvents

No.	Component 1	Component 2	Component 3	Mole ratio (v/v)
NADES-1	1,2-propanediol	Glycerol	Water	8:1:1
NADES-2	1,2-propanediol	Glycerol	Water	1:1:1
NADES-3	1,2-propanediol	Glucose	Lactic acid	3:1:5
NADES-4	1,2-propanediol	Water		2:1
NADES-5	1,2-propanediol	Glycerol		1:2
NADES-6	Glycerol	Water		9:1

1.3.2 甜菊糖提取

准确称取100 mg甜叶菊于5 mL EP管中, 加入3 mL溶剂, 振荡混匀。在功率65 J·s⁻¹、温度60℃条件下超声处理30分钟。然后在室温条件下, 15 984 ×g离心10分钟。取上清, 使用0.22 μm聚醚砜滤膜过滤。取1 mL滤液, 加入1 mL水稀释, 振荡1分钟, 得到待测液。传统溶剂(水)提取采用相同步骤。每种溶剂提取时均重复3次。NADES和传统溶剂提取同时进行。

1.3.3 标准品溶液的制备

称取8 mg甜菊苷标准品, 加入2 mL水, 摇匀, 得到4 mg·mL⁻¹甜菊苷标准品溶液, 然后按表2所列浓度梯度进行逐步稀释。称取6 mg莱鲍迪苷A标准品, 加水2 mL, 摇匀, 得到3 mg·mL⁻¹莱鲍迪苷A标准品溶液, 然后按表2所列浓度梯度逐步稀释。

表2 标准品溶液浓度

Table 2 Standard solution concentration

No.	1	2	3	4	5	6
Stevioside (mg·mL ⁻¹)	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Rebaudioside A (mg·mL ⁻¹)	3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.09375

1.3.4 单因素试验设计

选择甜菊糖提取效率最高的NADES进行单因素试验。考察影响甜菊糖提取的3个主要因素: 提取温度、提取时间和超声功率。首先固定提取时间30分钟、提取温度60℃, 考察超声功率(35、50、65、80和95 J·s⁻¹)对提取浓度的影响。然后选择最优超声功率和提取时间30分钟, 考察提取温度(50、60、70、80和90℃)对提取浓度的影响。最后选择最优的提取温度和超声

功率,考察提取时间(10、30、60、90和120分钟)对提取浓度的影响。

1.3.5 响应面试验设计

在单因素试验的基础上,根据Box-Behnken响应面法(Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) (张桂春等, 2017)原理设计响应面试验。以甜菊苷和莱鲍迪苷A的提取浓度作为指标,对提取时间、提取温度和超声功率3个指标进行考察,筛选提取甜菊糖的最优条件。响应面试验的因素与水平见表3。

1.4 测定方法

1.4.1 甜菊苷和莱鲍迪苷A含量测定(LTQ XL)

1.4.1.1 色谱条件

色谱柱: Welch Ultimate XS-C18 (2.1×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(B)-水(C), 均含有0.1%氨水溶液, 梯度洗脱(表4); 流速: 350.0 μL·min⁻¹; 检测波长: 210 nm、254 nm; 柱温: 35°C; 进样量: 10 μL。

1.4.1.2 质谱条件

负离子模式条件: 源电压4 kV, 毛细管温度320°C, 鞘气流速35 L·min⁻¹, 辅助气流速10 L·min⁻¹, 毛细管电压24 V, 扫描范围50–1 500 m·z⁻¹。

表3 响应面试验的因素与水平

Table 3 Factors and levels of response surface methodology

Level	Factor		
	A: Temperature (°C)	B: Power (J·s ⁻¹)	C: Time (min)
-1	60	50	30
0	70	65	60
1	80	80	90

表4 梯度洗脱程序

Table 4 Gradient elution procedure

Time (min)	Mobile phase C (%)	Mobile phase B (%)
0	80	20
3	80	20
15	30	70
20	30	70
20.1	80	20
27	80	20

1.5 指标计算方法

采用浓度梯度的甜菊苷和莱鲍迪苷A标准品,使用LTQ XL进行检测。使用Xcalibur软件处理得到的峰面积。以峰面积为横坐标X,甜菊苷和莱鲍迪苷A浓度(mg·mL⁻¹)为纵坐标Y制作标准曲线,并进行线性回归分析,得到甜菊苷浓度与积分峰面积之间的回归方程: $Y=4E-08X-0.204\ 1$ ($R^2=0.992\ 9$),莱鲍迪苷A浓度与积分峰面积之间的回归方程: $Y=2E-08X-0.648\ 8$ ($R^2=0.980\ 3$)。

同样使用LTQ XL检测甜叶菊待测液,根据得到的峰面积,依据回归方程计算出样品中甜菊苷和莱鲍迪苷A的提取浓度。

1.6 数据处理

所有提取实验均平行重复3次。单因素试验结果用Excel 2016软件绘图。对于不同溶剂对甜菊苷和莱鲍迪苷A浓度的影响,采用SPSS软件中的独立样本T检验进行差异显著性分析,单因素试验采用ANOVA方法进行差异显著性检验。采用Design Expert 12软件进行响应面试验设计及响应曲面模型的回归分析并绘制三维图。回归方程采用方差分析进行多重比较,拟合模型的判断通过方差分析中的F值检验, $P<0.05$ 表示差异显著。模型的拟合度和合理性通过回归系数 R^2 等进行评判。

2 结果与讨论

2.1 筛选提取甜菊糖最优的NADES配方

2.1.1 不同NADES溶剂对甜菊苷提取浓度的影响

本研究探讨6种NADES对甜菊苷提取浓度的影响(图1)。结果表明,用NADES-1提取的甜菊苷浓度最高(2.59 mg·mL⁻¹),比传统溶剂水提取高16.4%,且与其它NADES差异显著($P<0.05$),表明NADES-1比其它NADES具有更好的提取性能。研究发现,含有1,2-丙二醇的NADES配方提取效果较好,可能是1,2-丙二醇使得溶剂扩散性增强,植物材料的破壁速度与有效成分的溶出速率加快,有助于提高甜菊苷提取效率。但是1,2-丙二醇浓度太高会导致溶剂黏度变大、流动性变差,且1,2-丙二醇的含量增加会使低共熔溶剂的极性降低,可能减弱了其余目标成分的相互作用,从而使提取率降低。

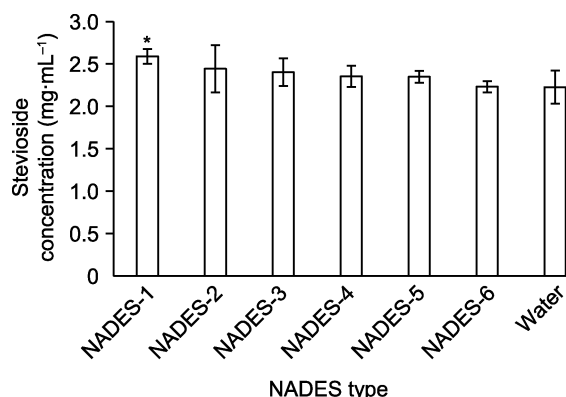


图1 用不同溶剂提取的甜菊苷浓度

* $P < 0.05$; NADES-1–6见表1。

Figure 1 Extraction concentration of stevioside in different solvents

* $P < 0.05$; NADES-1–6 are shown in Table 1.

2.1.2 不同NADES溶剂对莱鲍迪苷A提取浓度的影响

本研究探讨6种NADES对莱鲍迪苷A提取浓度的影响(图2)。结果表明, 采用NADES-1提取的莱鲍迪苷A浓度最高($1.06 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 比采用传统溶剂水提取高12.62%, 且与其它NADES差异显著($P < 0.05$), 表明NADES-1比其它NADES具有更好的提取性能。采用NADES-1提取的甜菊苷和莱鲍迪苷A浓度均最高, 表明NADES-1更适合甜菊糖提取, 因此将NADES-1用作后续实验的提取溶剂。

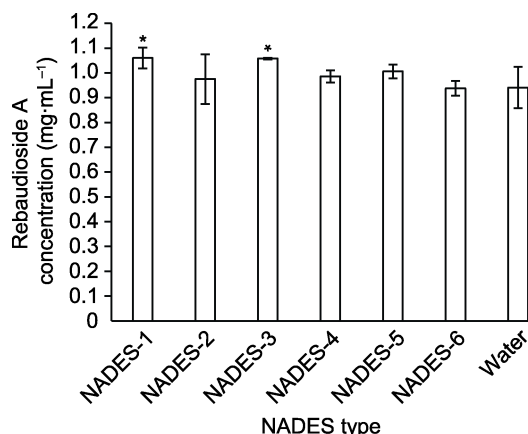


图2 用不同溶剂提取的莱鲍迪苷A浓度

* $P < 0.05$; NADES-1–6见表1。

Figure 2 Extraction concentration of rebaudioside A in different solvents

* $P < 0.05$; NADES-1–6 are shown in Table 1.

2.2 甜菊糖提取的单因素试验

2.2.1 不同超声功率对甜菊苷和莱鲍迪苷A提取浓度的影响

当提取温度为 60°C 、提取时间为30分钟时, 不同超声功率对甜菊苷和莱鲍迪苷A提取率的影响趋势一致(图3A, B)。随着超声功率的增加, 提取浓度逐渐升高, 在 $80 \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$ 时达到最大值, 甜菊苷提取浓度为 $2.62 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 莱鲍迪苷A提取浓度为 $1.07 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。然后, 随着超声功率继续升高, 提取浓度下降。因此, 选取 $80 \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$ 作为最优条件进行后续实验。低功率时超声效果较差, 提取效率较低。而随着超声功率的增加, 超声波对于植物细胞壁的破坏作用更显著, 对植物材料的破碎效果也更好, 可加快有效成分的溶出, 从而使提取浓度增高。但超声功率为 $95 \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$ 的提取浓度低于 $80 \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$ 。因此, 响应面试验选取50、65和 $80 \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$ 的超声功率进行优化。

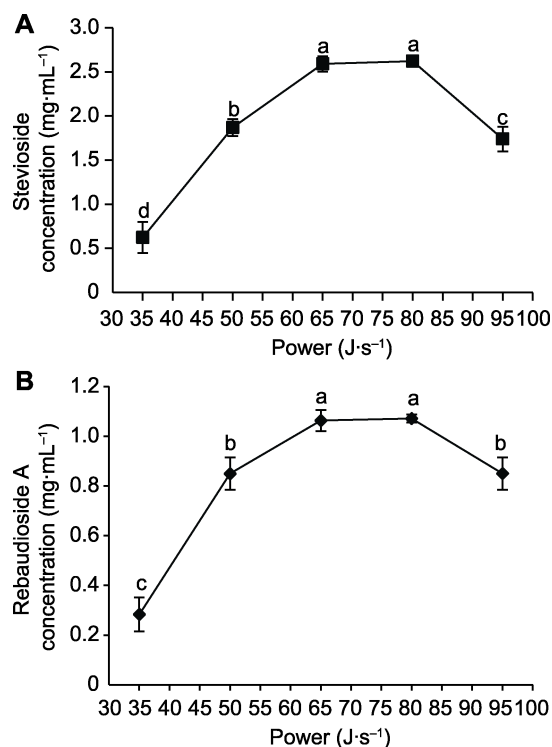


图3 超声功率对甜菊苷(A)和莱鲍迪苷A(B)浓度的影响
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 3 The effects of ultrasonic power on the concentration of stevioside (A) and rebaudioside A (B)
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.2.2 不同提取温度对甜菊苷和莱鲍迪苷A提取浓度的影响

提取过程中另一个重要参数是温度。溶剂扩散率、黏度和溶解度均受温度影响。而对于萃取过程来说,温度主要影响溶质扩散率和溶解度。当提取功率为 $80\text{ J}\cdot\text{s}^{-1}$ 、提取时间为30分钟时,提取温度对甜菊苷和莱鲍迪苷A提取浓度的影响一致(图4A, B)。随着温度的升高提取浓度增加,其原因可能是由于温度升高使植物细胞基质迅速打开,导致溶质扩散增强,从而使有效成分更容易溶出。当温度增至 60°C 时达到峰值,甜菊苷提取浓度为 $2.62\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,莱鲍迪苷A提取浓度为 $1.07\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,因此将提取温度 60°C 作为最优条件继续后续实验。随着提取温度继续升高,提取浓度呈下降趋势,可能是在较高的温度下某些生物活性成分被破坏,从而导致提取浓度降低。温度升高

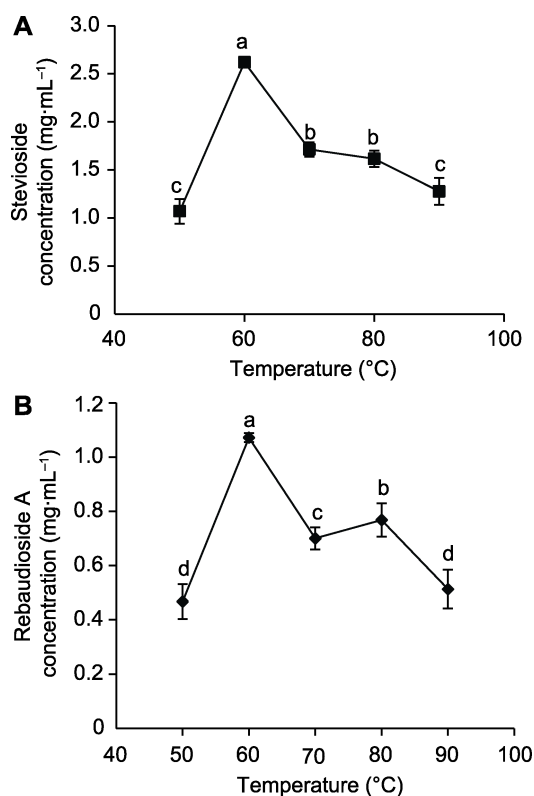


图4 提取温度对甜菊苷(A)和莱鲍迪苷A(B)浓度的影响
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 4 The effects of extraction temperature on the concentration of stevioside (A) and rebaudioside A (B)
Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

可在一定程度内提高提取率,但随着温度的持续升高,可能对提取物质的稳定性有影响,因此从节省能耗和甜菊糖的稳定性两方面考虑,响应面试验选取 60°C 、 70°C 和 80°C 三个水平的提取温度进行优化。

2.2.3 不同提取时间对甜菊苷和莱鲍迪苷A提取浓度的影响

在提取温度 60°C 和超声功率 $80\text{ J}\cdot\text{s}^{-1}$ 的条件下,提取时间对甜菊苷和莱鲍迪苷A提取浓度的影响一致(图5A, B)。随着提取时间的延长,以提取90分钟为最高值,提取的甜菊苷浓度为 $3.48\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,提取的莱鲍迪苷A浓度为 $1.42\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。提取时间较短时,还没有完全将物质提取出来。而提取时间为120分钟时,时间过长可能使材料中的其它杂质逐渐被溶解,导致提取浓度降低,并且较长的提取时间会使实验流程

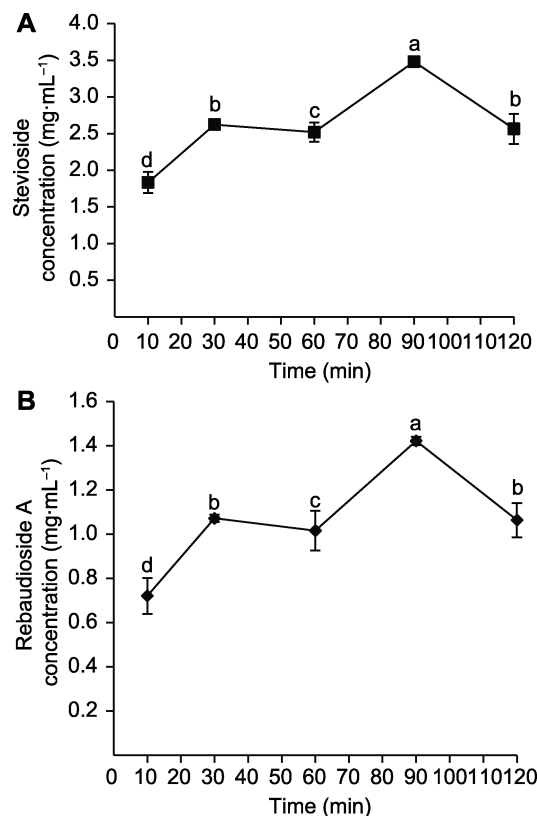


图5 提取时间对甜菊苷(A)和莱鲍迪苷A浓度(B)的影响
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 5 The effects of extraction time on the concentration of stevioside (A) and rebaudioside A (B)
Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

进展缓慢, 增加能耗。因此, 提取90分钟在定量甜叶菊中提取出的甜菊糖最多。综上, 响应面实验选取30、60和90分钟三个水平的提取时间进行优化。

2.3 响应面法优化提取条件结果分析

响应面试验涉及3个因素、3个水平, 5次重复, 用于评价模型变异性和稳定性。响应面实验结果见表5。

表5 响应面实验结果

Table 5 Response surface experimental results

Run units	A: Temperature (°C)	B: Power (J·s ⁻¹)	C: Time (min)	Stevioside concentration (mg·mL ⁻¹)	Rebaudioside A concentration (mg·mL ⁻¹)
1	70	50	30	2.30	1.11
2	80	65	90	2.08	0.90
3	70	80	90	2.77	1.03
4	70	50	90	0.11	0.09
5	70	80	30	1.71	0.70
6	60	65	90	2.57	1.18
7	60	65	30	2.59	1.06
8	80	80	60	2.00	0.83
9	60	80	60	2.52	1.02
10	70	65	60	1.52	0.64
11	70	65	60	1.52	0.64
12	70	65	60	1.52	0.64
13	80	50	60	0.06	0.02
14	70	65	60	1.52	0.64
15	70	65	60	1.52	0.64
16	80	65	30	1.31	0.65
17	60	50	60	0.49	0.35

对实验数据进行方差分析, 得到甜菊苷浓度Y和自变量X (提取温度A、超声功率B、提取时间C)的关系为: 甜菊苷浓度 $Y=1.52-0.341\ 9A+0.756\ 8B-0.048\ 4C-0.021\ 1AB+0.194\ 9AC+0.813\ 2BC+0.079\ 3A^2-0.336\ 5B^2+0.535\ 3C^2$; 得到莱鲍迪苷A浓度Y和自变量X (提取温度A、超声功率B、提取时间C)的关系为: 莱鲍迪苷A浓度 $Y=3.07-0.728\ 3A+1.20B-0.190\ 9C+0.159\ 8AB+0.152\ 5AC+1.63BC+0.308\ 1A^2-0.723\ 2B^2+1.18C^2$ 。

回归模型的显著性通过F检验和P值进行评估。甜菊苷浓度的回归模型经过ANOVA检验(表6)显示, F

表6 甜菊苷浓度的回归模型方差分析

Table 6 Analysis of the model variances of stevioside concentration

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F value	P-value
Model	9.98	9	1.11	8.00	0.0060**
A: Temperature	0.9351	1	0.9351	6.75	0.0355*
B: Power	4.58	1	4.58	33.08	0.0007**
C: Time	0.0188	1	0.0188	0.1355	0.7237
AB	0.0018	1	0.0018	0.0128	0.9130
AC	0.1520	1	0.1520	1.10	0.3297
BC	2.64	1	2.64	19.09	0.0033**
A ²	0.0265	1	0.0265	0.1910	0.6752
B ²	0.4768	1	0.4768	3.44	0.1059
C ²	1.21	1	1.21	8.71	0.0214*
Residual	0.9697	7	0.1385		
Lack of fit	0.9697	3	0.3232		
Pure error	0.0000	4	0.0000		
Cor total	10.95	16			
R ²	0.9114				
R _{adj} ²	0.7975				
R _{pred} ²	-0.4173				
Adeq precision	10.9996				

* $P<0.05$; ** $P<0.01$

值为8.00, $P<0.01$, 说明该回归模型极显著。并且 R^2 为0.911 4, 说明模型拟合程度较好。该模型的适当性还可以由 R_{adj}^2 的值(0.797 5)验证, 表明该模型可以解释79.75%的响应变异性, 证实了使用回归方程计算的数据与通过实验获得的数据之间的良好相关性。从显著性上看, 提取温度与提取时间的平方对甜菊苷浓度的影响显著($P<0.05$), 超声功率、超声功率与提取时间的交互作用对甜菊苷浓度的影响极显著($P<0.01$)。

莱鲍迪苷A浓度的回归模型经过ANOVA检验显示, F值为4.53, $P<0.05$, 说明该回归模型显著(表7)。并且 R^2 为0.853 6, 说明模型拟合程度较好。 R_{adj}^2 值为0.665 3, 表明模型可以解释66.53%的响应变异性, 证实了使用回归方程计算的数据与通过实验获得的数据之间的良好相关性。从显著性上看, 提取时间的平方对莱鲍迪苷A浓度的影响显著($P<0.05$), 超声功率以及超声功率与提取时间的交互作用对莱鲍迪苷A浓度的影响极显著($P<0.01$)。

表7 莱鲍迪苷A浓度的回归模型方差分析

Table 7 Analysis of the model variances of rebaudioside A concentration

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F value	P-value
Model	1.51	9	0.1682	4.53	0.0294*
A: Temperature	0.1834	1	0.1834	4.94	0.0616
B: Power	0.4988	1	0.4988	13.45	0.0080**
C: Time	0.0126	1	0.0126	0.3396	0.5783
AB	0.0044	1	0.0044	0.1185	0.7408
AC	0.0040	1	0.0040	0.1083	0.7517
BC	0.4567	1	0.4567	12.31	0.0099**
A ²	0.0173	1	0.0173	0.4660	0.5168
B ²	0.0951	1	0.0951	2.56	0.1534
C ²	0.2538	1	0.2538	6.84	0.0346*
Residual	0.2597	7	0.0371		
Lack of fit	0.2597	3	0.0866		
Pure error	0.0000	4	0.0000		
Cor total	1.77	16			
R ²	0.8536				
R _{adj} ²	0.6653				
R _{pred} ²	-1.3429				
Adeq precision	7.9551				

*P<0.05; **P<0.01

对响应面试验结果进行绘图,得到响应面三维图,通过三维图可以反映变量间的相互作用。提取温度、超声功率和提取时间对甜菊苷浓度和莱鲍迪苷A浓度的影响如图6所示。其中,提取温度和超声功率的三维图倾斜度较低(图6A, D),说明两者的交互作用不显著。此外,提取温度和提取时间的三维图倾斜度也比较低(图6B, E),说明两者的交互作用不显著。而超声功率和提取时间的三维图倾斜度最高(图6C, F),说明二者之间交互作用较大,该结果与方差分析(表6, 表7)的显著性结果一致。

利用拟合模型对甜叶菊中甜菊糖的NADES (1,2-丙二醇:甘油:水=8:1:1, v/v/v)的最优提取条件进行选择,即提取时间90分钟,提取温度60℃,超声功率为80 J·s⁻¹,模型预测甜菊苷提取浓度为3.49 mg·mL⁻¹,莱鲍迪苷A浓度为1.43 mg·mL⁻¹。为了验证预测的准确性,选取最优条件进行实验。结果(表8)表明,最优条件下甜菊苷提取浓度为3.48 mg·mL⁻¹,比初始条件提高了34.36%,莱鲍迪苷A提取浓度为1.42 mg·mL⁻¹,比初始条件提高了33.96%,并且与预测值接近,说

表8 不同提取条件对甜菊苷和莱鲍迪苷A提取浓度比较

Table 8 Extraction concentration of stevioside and rebaudioside A by different extraction conditions

	Tempera- ture (°C)	Power (J·s ⁻¹)	Time (min)	Stevioside concentra- tion (mg·mL ⁻¹)	Rebaudi- oside A con- centration (mg·mL ⁻¹)
Initial condition	60	65	30	2.59±0.04	1.06±0.08
Optimal condition	60	80	90	3.48±0.36*	1.42±0.18*

*P<0.05

明模型预测良好,可以用于甜菊糖提取。同时,t检验结果表明,最优条件的提取效果显著优于初始条件(P<0.05)。

3 结论

采用新型绿色溶剂NADES提取甜叶菊中的甜菊糖,通过与传统溶剂水进行对比,发现NADES配方1,2-丙二醇:甘油:水=8:1:1 (v/v/v)提取到的甜菊糖浓度最高(2.59 mg·mL⁻¹),比水提取高16.40%;莱鲍迪苷A的提取浓度为1.06 mg·mL⁻¹,比水提取高12.62%。单因素试验和响应面法分析表明,NADES提取甜叶菊中甜菊糖的最优条件为:提取溶剂1,2-丙二醇:甘油:水=8:1:1 (v/v/v),提取时间90分钟,提取温度60℃,超声功率为80 J·s⁻¹,预测甜菊苷提取浓度为3.49 mg·mL⁻¹,莱鲍迪苷A浓度为1.43 mg·mL⁻¹。经实验验证,提取的甜菊苷浓度为3.48 mg·mL⁻¹,比初始条件提高了34.36%,提取的莱鲍迪苷A浓度为1.42 mg·mL⁻¹,比初始条件提高了33.96%。

本研究采用NADES代替传统溶剂提取甜菊糖,绿色环保,且提取效率高于传统溶剂。从溶剂成本上看,采用传统溶剂进行提取时,水的成本比NADES低廉。但采用水作为溶剂提取时,水溶性杂质含量很高,需要对提取液进行除杂,生产成本低,并且在生产过程中也需要耗费大量的水资源。而采用NADES提取时,溶剂由初级代谢产物组成,工业生产时可以免去去除提取溶剂的步骤,并且溶剂成本低廉,提取效率高,符合绿色提取的原则,在甜菊糖的工业生产中具有可观的应用潜力,未来可进一步开发应用。此外,本研究采用超声辅助提取甜菊糖的方法,与浸渍和热提取等经典方法相比更简便有效(Gasmalla et

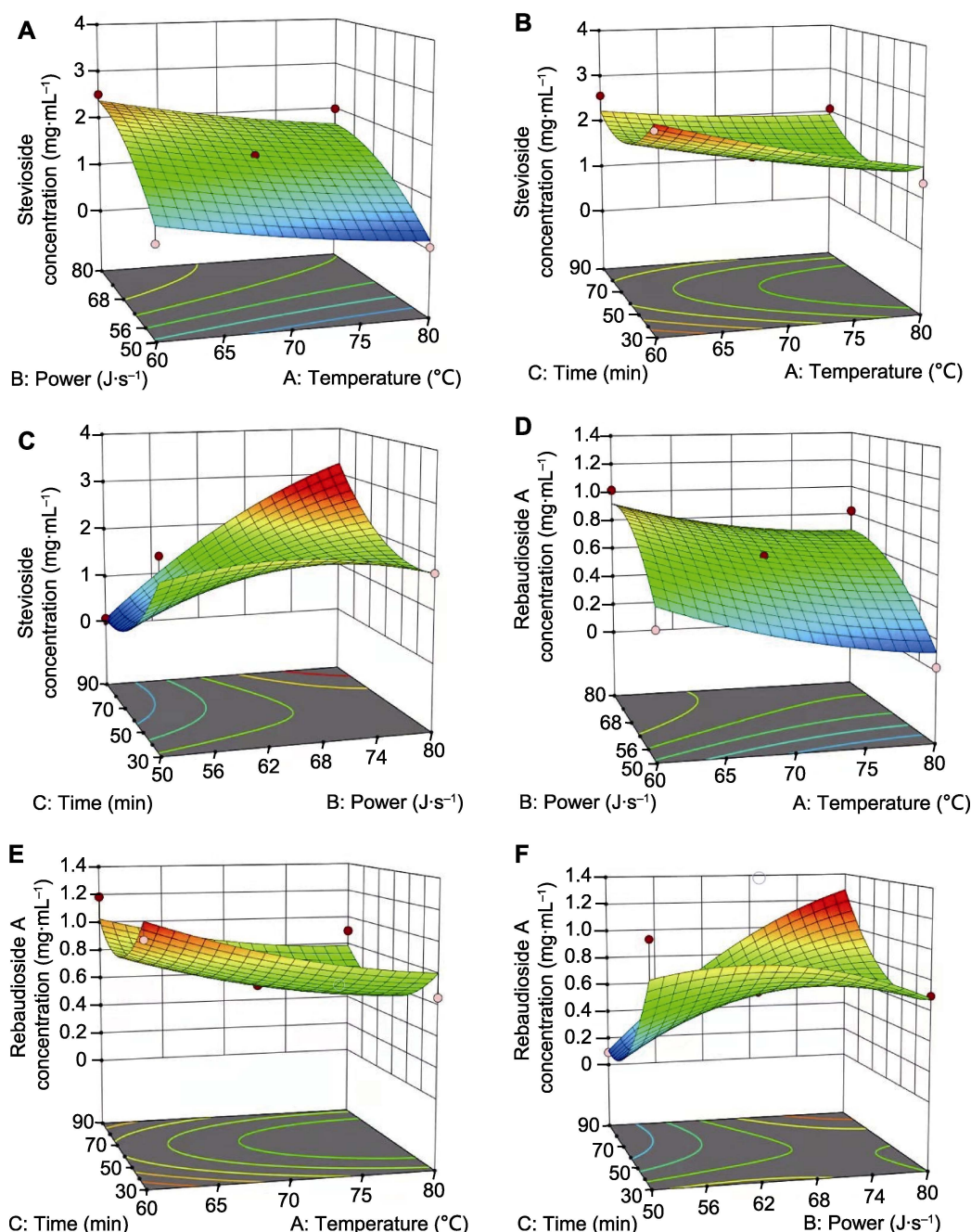


图6 提取温度、超声功率和提取时间对甜菊苷和莱鲍迪苷A的响应面分析

(A) 温度与功率的交互作用对甜菊苷提取影响的响应面; (B) 温度与时间的交互作用对甜菊苷提取影响的响应面; (C) 功率与时间的交互作用对甜菊苷提取影响的响应面; (D) 温度与功率的交互作用对莱鲍迪苷A提取影响的响应面; (E) 温度与时间的交互作用对莱鲍迪苷A提取影响的响应面; (F) 功率与时间的交互作用对莱鲍迪苷A提取影响的响应面

Figure 6 Response surface analysis of extraction temperature, ultrasonic power and extraction time for stevioside and rebaudioside A

(A) Response surface (3D) showing effect of temperature and power on stevioside; (B) Response surface (3D) showing effect of temperature and time on stevioside; (C) Response surface (3D) showing effect of power and time on stevioside; (D) Response surface (3D) showing effect of temperature and power on rebaudioside A; (E) Response surface (3D) showing effect of temperature and time on rebaudioside A; (F) Response surface (3D) showing effect of power and time on rebaudioside A

al., 2017), 可在更短的时间内进行提取, 在工业生产中可以降低运营成本并且提高生产力。同时, NADES 提取甜菊糖也为后续推广至其它大宗经济型植物类天然产物的绿色工艺提取提供新思路。

参考文献

- 陈育如, 杨凤平, 杨帆, 宋婷婷, 束成杰, 尹慧慧 (2016). 甜叶菊及甜菊糖的多效功能与保健应用. 南京师大学报(自然科学版) **39**(2), 56–60.
- 郎青云, 李慧, 祝谢民, 周艳, 史保国 (2019). 超声辅助纤维素酶提取甜菊糖及其抑菌活性研究. 安徽农学通报 **25**(21), 30–35.
- 刘贵君, 石浩 (2016). 甜菊糖的应用研究进展. 浙江化工 **47** (11), 34–41.
- 吴则东, 张文彬, 吴玉梅, 刘乃新 (2016). 世界甜叶菊发展概况. 中国糖料 **38**(4), 62–65.
- 严贤春 (2003). 天然甜味剂植物的开发利用研究. 食品研究与开发 **24**, 59–62.
- 应以坚, 王雪奇 (2012). 生物产品甜菊苷综述. 轻工科技 **28**, 9–10, 53.
- 张桂春, 刘玉静, 李延敏, 牟萍, 曲明娟, 李清, 周菊华 (2017). 火龙果果皮中可溶性膳食纤维的提取方法. 植物学报 **52**, 622–630.
- 张杨, 陈天红, 孙君坦, 何炳林 (1998). 甜叶菊糖的组分分离与味质改进研究进展. 化学通报 (6), 11–16.
- 赵永良, 韩晓, 刘景彬, 谢印芝 (2010). 膜分离技术在甜菊糖甙提取分离中的应用研究. 化学与生物工程 **27**, 84–85.
- Dai YT, Rozema E, Verpoorte R, Choi YH (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *J Chromatogr A* **1434**, 50–56.
- Dai YT, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2015). Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem* **187**, 14–19.
- Erkucuk A, Akgun IH, Yesil-Celiktas O (2009). Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: identification and optimization. *J Supercrit Fluids* **51**, 29–35.
- Gasmalla MAA, Yang RJ, Musa A, Hua X, Ye FY (2017). Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves. *Arab J Chem* **10**, 726–731.
- Huang Y, Feng F, Jiang J, Qiao Y, Wu T, Voglmeir J, Chen ZG (2017). Green and efficient extraction of rutin from Tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem* **221**, 1400–1405.
- Jaitak V, Bandna BS, Kaul VK (2009). An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytochem Anal* **20**, 240–245.
- Jentzer JB, Alignan M, Vaca-Garcia C, Rigal L, Vilarem G (2015). Response surface methodology to optimise accelerated solvent extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem* **166**, 561–567.
- Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem* **132**, 1121–1132.
- Puri M, Sharma D, Barrow CJ, Tiwary AK (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem* **132**, 1113–1120.

Green Extraction Method and Optimization of Steviosides from *Stevia rebaudiana* by Natural Deep Eutectic Solvent

Qing Miao, Pa-he-er-ding Sabiha, Siyu Zeng, Qifang Pan *

Joint Plant Biotechnology R&D Center of Jiaotong University-Fudan University-Nottingham University, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract Natural deep eutectic solvent (NADES) was used to extract steviosides from *Stevia rebaudiana* as an efficient, green and environmentally friendly new method. Compared with traditional solvent water, the optimal NADES formula was selected to extract *S. rebaudiana* dry leaves by measuring the concentration of stevioside and rebaudioside A, two main components in steviosides. The extraction conditions of NADES extracting steviosides were optimized by Box-Behnken design from response surface methodology. The best NADES formula for steviosides extraction was selected: 1,2-propanediol:glycerol:water=8:1:1 (v/v/v), the extraction concentration of stevioside was $2.59 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (16.40% higher than water), and the extraction concentration of rebaudioside A was $1.06 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (12.62% higher than water). The NADES extraction conditions were optimized by response surface methodology: extraction time was 90 min, extraction temperature was 60°C , ultrasonic power was $80 \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}$, the predicted extraction concentration of stevioside was $3.49 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the concentration of rebaudioside A was $1.43 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, which was close to the experimental verification value (the concentration of stevioside is $3.48 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the concentration of rebaudioside A is $1.42 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Under the best condition, the extraction of stevioside was 34.36% higher than the initial condition, and the extraction of rebaudioside A was 33.96% higher than the initial condition. NADES is environmentally friendly and has higher extraction efficiency than traditional solvents. It can be used for the green extraction of steviosides from *S. rebaudiana*. At the same time, it provides a promising prospect for the green extraction of natural products from other bulk economic plants.

Key words NADES, *Stevia rebaudiana*, stevioside, rebaudioside A, green extraction

Miao Q, Sabiha PHED, Zeng SY, Pan QF (2021). Green extraction method and optimization of steviosides from *Stevia rebaudiana* by natural deep eutectic solvent. *Chin Bull Bot* **56**, 722–731.

* Author for correspondence. E-mail: panqf@sjtu.edu.cn