مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 39 العدد 3 (2023): 117– 120

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 39 No.2 (2023): 117 - 120

أمثلة ظروف استخلاص غليكوزيد الستيفوزيد لأوراق *Stevia rebaudiana*(bertoni) المزروعة في سورية

براء محمد الخطيب[1]، هدى حبال[2]، فهد البيسكي[3]

[1] طالبة ماجستير قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق

[2] أستاذ مساعد في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق

[3] الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وزارة التعليم العالي

الملخص:

نُفذ هذا البحث في مخابر قسم علوم الأغذية –كلية الزراعة– جامعة دمشق والهيئة العامة للتقانة الحيوية– وزارة التعليم العالي في عام 2020-2021 م. هدف البحث إلى تحديد الظروف المثلى لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد لأوراق الستيفيا ريبوديانا باستخدام ثلاثة أنواع من المذيبات (الماء–الإيثانول النقي– الإيثانول 80%) عند مستويات مختلفة من درجات الحرارة (30–60–90 مْ)، وأزمنة مختلفة (30–60–90 دقيقة) باستخدام التصميم الإحصائي Response Surface Methology(RSM). أظهرت النتائج أنّ أفضل مذيب لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد من أوراق الستيفيا ريبوديانا كان باستعمال الماء وأن أفضل مردود لهذا الغليكوزيد كان عند درجة حرارة 90 مْ، وزمن 30 د، بتركيز أعظمي (12.83%)، يليه الإيثانول 80% عند درجة حرارة 90 مْ، وزمن 50 د وبتركيز أعظمي (9.80%)، ومن ثم الإيثانول النقي عند درجة حرارة 90 مْ، وزمن 90 د، حيث كانت قيمة غليكوزيد الستيفوزيد (6.84%).

تاريخ الايداع: 2022/3/27
تاريخ القبول: 2022/4/19

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

الكلمات المفتاحية: *Stevia rebaudiana*(bertoni)، غليكوزيد الستيفوزيد، الاستخلاص، TSS، pH، Spectrophotometer UV-VIS.

Optimum Conditions Extraction of stevioside glycoside of *Stevia rebaudiana* leaves Planted in Syria.

Baraa Alkhatib [1], Hoda Habbal [2], Fahed Albiski [3]

[1] Master's student, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Damascus University

[2] Assistant Professor in the Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Damascus University

[3] The Public Authority for Biotechnology, Ministry of Higher Education

Received: 27 /3/2022
Accepted: 19/4/2022

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

This research was done in the laboratories of Food Science Department- College of Agriculture - Damascus University and the General Authority for Biotechnology - Ministry of Higher Education during 2020- 2021. The aim of the research was to determine the optimum conditions for the extraction of stevioside glycoside from Stevia rebaudiana leaves using three types of solvents (water - pure ethanol - ethanol 80%) at different levels of temperature (30-60-90° C), and different times (30-60-90 minutes). Using a statistical design (RSM) response surface methodology. The results showed that the best solvent for extracting stevioside glycoside from Stevia rebaudiana leaves was using water, and that the best yield of this glycoside was at a temperature of 90°C, and for a time of 30 minutes, with a maximum concentration (12.83%), followed by ethanol 80% at a temperature of 90° C, and for a time of 50 minutes and a maximum concentration (%9.80), and then pure ethanol at a temperature of 90 °C and over a time of 90 °C, where the value of the glycoside value was (6.84%).

Key words: Stevia Rebaudiana, Stevioside Glycoside, Extraction, TSS, Ph, Spectrophotometer UV-VIS.

المقدمة:

ازداد الطلب في السنوات الأخيرة على المحليات الطبيعية بديلة المحليات الصناعية، حيث يعتبر نبات الستيفيا من المحليات الطبيعية، وتعود الحلاوة في هذا النبات إلى وجود غليوكوزيدات الستيفول والتي لها 8 أنواع من الغليكوزيدات ثنائية التربين هي (stevioside, dulcoside, steviolbioside, Steviol glycosidy) (A,B,C,D,E) rebaudiosides)، حيث أشار (Jaroslav *et al.*, 2006, 86) إلى انخفاض سعراته الحرارية وعدم وجود أي تأثيرات مسرطنة لهذا الغليكوزيد وعدم وجود أي رد فعل تحسسي مما يسمح باستخدامه كمادة محلية بديلة للسكروز ولاسيما لمرضى السكري ولعلاج السمنة. يتمّيز غليكوزيد الستيفوزيد بقابليته للذوبان في الماء وقوة تحلية عالية تتراوح من 100 إلى 300 مرة مقارنةً بالسكروز، حيث يمكن استخدام أوراق نبات الستيفيا مباشرة في عملية التحلية وكذلك في الاستخدامات المنزلية، إلا أن تعرض الأوراق للحرارة قد يؤدي لظهور رواسب غير مرغوبة في المادة الغذائية (koyama, *et al*., 2003, 880). يتأثر استخلاص الغليكوزيدات المحلية من أوراق الستيفيا بعدة عوامل من أهمها: نوع المذيب فقد بين (Celaya, et al., 2016, 159) أن قطبية المذيب المستخدم في عملية الاستخلاص تؤثر في كفاءة استخلاص غليكوزيد الستيفيا، أشار (Liu, *et al.*, 1997, 447) إلى أن استخدام الميثانول الساخن لمدة 7 ساعات لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد من أوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة وإزالة المتبقي من الميثانول بالماء ومن ثم إعادة استخلاصها بواسطة البوتانول، كما قام كل من Ahmed and Dobberstein (1982, 524) باستخلاص الغليكوزيدات من أوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة في جهاز Microsoxhlet باستعمال الكلورفورم والميثانول، تبيّن لهما أن استخدام مزيج من الكلورفورم/الميثانول أعطى نتائج أفضل من استخدام الكلورفورم لوحده لاستخلاص الستيفوزيد. استعمل (Brandle, 1998, 531) الميثانول في عملية استخلاص الستيفوزيد، ووجد أنه كان أكثر كفاءة وأسهل في عملية فصل الغليكوزيد من الماء، ومن المذيبات المستخدمة في الاستخلاص الماء الساخن الذي يمكن أن يعطي نسبة استخلاص (98-93%) من الستيفوزيد (Jackson, *et al.*, 2007, 5) وتم اعتماد هذه الطريقة على أنها طريقة كلاسيكية من قبل (Dacome, *et al.*, 2005, 3589). كما أشار Afandi (2013, 65) أن أفضل المذيبات العضوية القطبية في استخلاص الستيفوزيد هو الإيثانول الذي يعتبر الأكثر سلامةً وآمناً للإنسان (Guo-Qing *et al.*, 2005, 1001)، بينما انخفض مردود الاستخلاص عندما تم استخدام مذيبات عضوية غير قطبية (N–هكسان، إيثر بترول)، ولوحظ أيضاً أنه يمكن الاستفادة من هذه المذيبات لإزالة المركبات غير المرغوب بها، ولكن الاستخدام الكبير منها قد يكون غير آمن، لذلك يفضل استخراج تلك المركبات بالضغط العالي باستعمال Co_2، وفي دراسة (Shi, *et al*., 2000, 618) تم استخدام المذيبات العضوية من أجل استخلاص الغليكوزيدات الموجودة في نبات الستيفيا وذلك لكفاءتها في التخلص من الطعم المر أثناء الاستخلاص، من جهة أخرى تؤثر درجة حرارة الاستخلاص في كمية الغليكوزيدات الناتجة حيث أشار (Yaqin, *et al.*, 2005, 43) أن كمية غليكوزيد Rebaudioside A تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة إلى (50 مْ) ثم تبدأ بعد ذلك بالانخفاض، وقد عزي سبب هذا الانخفاض في المحتوى إلى تعرض الغليكوزيد للأكسدة عند درجة حرارة أعلى من 50 مْ. بينما بيّن (Afandi, et al., 2013, 64) أن الدرجة 40 مْ تعطي أفضل نقاوة للمستخلص، وفي دراسة أخرى أجراها (Pol, *et al.*, 2007, 1851) تبيّن أنه في مجال درجات الحرارة من 70 إلى 160 مْ كان للميثانول قدرة أعلى على استخلاص غليكوزيدات الستيفوزيد من الماء. كذلك فإن نسبة المذيب إلى الأوراق تعد عامل مؤثر في كفاءة الاستخلاص، وقد بيّن (Sangha, 2011, 77) أن نسبة 1 غرام من أوراق الستيفيا الجافة إلى 14 مل من الماء أعطت أعلى نسبة استخلاص لغليكوزيد الستيفوزيد عند درجة حرارة 76 مْ، وزمن 60.6 دقيقة، وفي دراسة قام بها (Abou-Arab, *et al.*, 2010, 278) وجد أن أفضل نسبة للاستخلاص بالنسبة للماء هي 1 غرام من أوراق الستيفيا الجافة

إلى 35 مل ماء. ونظراً لزيادة الاهتمام حالياً بزراعة نبات الستيفيا في الجمهورية العربية السورية في العديد من المراكز البحثية حيث تزايد البحث عن بدائل للسكر طبيعية، منخفضة السعرات الحرارية، ذات قيمة غذائية عالية، أدى إلى زيادة الاهتمام بزراعة نبات الستيفيا الذي يعد أحد البدائل الطبيعية للسكروز وإن معرفة افضل الظروف لاستخلاص أكبر كمية من الغليكوزيد المسؤول عن هذا الطعم يساعد في تخفيض التكاليف الاقتصادية ولهذا فقد هدف البحث إلى تحديد أفضل ظروف الاستخلاص لغليكوزيد الستيفوزيد من حيث (الزمن، درجة الحرارة، نوع المذيب).

مواد البحث وطرائقه:

2-1-المواد والأجهزة المستخدمة:

– جُمعت أوراق نبات الستيفيا الطازجة من مزرعة الهيئة العامة للتقانة الحيوية في كلية الزراعة جامعة دمشق التي وصلت إلى أقصى مرحلة نمو (قبل مرحلة الإزهار) وجُففت على درجة حرارة الغرفة لمدة (48 ساعة) ثم طُحنت على شكل مسحوق بسرعة عالية وحُفظت في أكياس من البولي ايتيلن لحين إجراء التحاليل المطلوبة.

–مادة قياسية من غليكوزيد الستيفوزيد ماركة (Sigma-aldrich).

المواد الكيميائية:

- حمض كبريت مركز Sulfuric Acid (H_2SO_4) 96%
- محلول الفينول Phenol 5%.
- جلوكوز نقي.

أجهزة التحليل:

- فرن تجفيف ألماني الصنع ماركة Memmert.
- ميزان حساس ألماني الصنع ماركة Sartorius.
- جهاز المطياف الضوئي Optizim 3000 plus_ (فرنسا).
- مثفلة ألمانية الصنع ماركة Funke gerber.
- جهاز سوكسلت Soxhelt صيني الصنع ماركة (BiobaseSY- 1L4H WATER BATHS).
- حمام مائي ألماني الصنع ماركة (Memmert).
- مازج أنابيب (vortex).
- الرفراكتومتر لقياس تركيز المواد الصلبة الذائبة ألماني الصنع ماركة (Carl Roth-DR 201-95).
- جهاز مقياس الحموضة pH meter (Precisa PH-900).

2-2–طرائق التحليل:

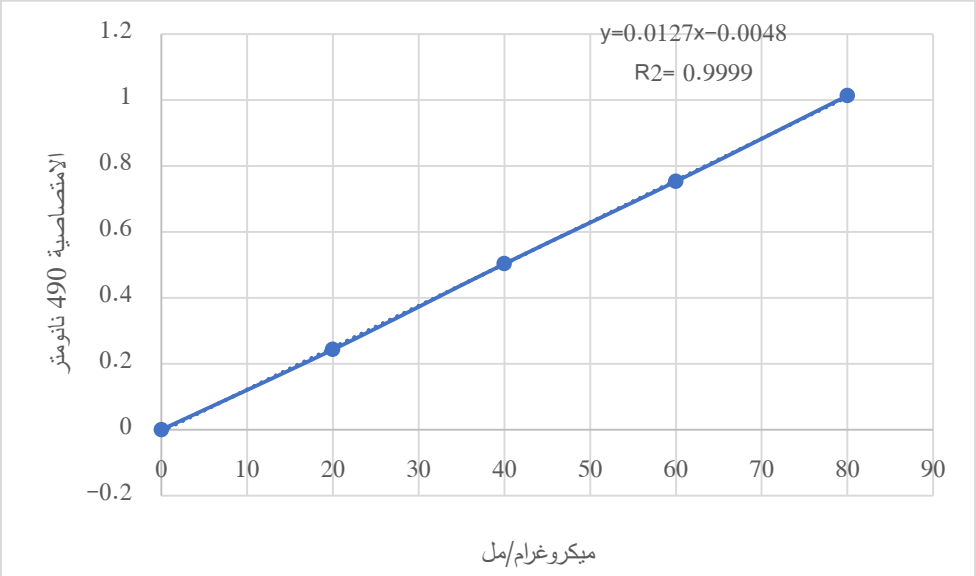
استخلاص غليكوزيدات الستيفوزيد من أوراق الستيفيا ريبوديانا: استخلصت غليكوزيدات الستيفوزيد باستعمال ثلاث أنواع من المذيبات (الماء النقي، الإيثانول80%، الإيثانول النقي) بنسبة 1:14 (أوراق الستيفيا(غ) : مذيب(مل))، باستخدام ثلاث درجات حرارة (30–60–90 مْ) على التوالي لكل مذيب، وبأزمنة مختلفة (30–60–90 دقيقة) وفق التصميم الاحصائي Response Surface Methology(RSM).

تقدير غلوكوزيد الستيفوزيد بالطريقة اللونية: قُدر محتوى Stevioside في المستخلصات المحضرة سابقاً لأوراق نبات الستيفيا وذلك وفق الطريقة المبينة من قبل (Dubois, *et al*., 1956, 350) حيث أضيف إلى 1 مل من المستخلص 5 مل من حمض الكبريت المركز (96%) و1 مل من محلول الفينول (5%) ثم مزج الناتج باستخدام محرك الأنابيب (vortex). تُركت الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة 30مْ لمدة 20 دقيقة، قيست بعدها الامتصاصية عند طول موجة 490 نانومتر باستعمال جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer UV-VIS). بعد أن تم حساب الكربوهيدرات الكلية بطريقة الفينول حمض الكبريت من خلال تحضير منحنى قياسي بتراكيز مختلفة من الغلوكوز النقي (0–800 ميكروغرام/مل) لتقدير الكربوهيدات الكلية الذائبة (الشكل1)، قُدر محتوى المستخلص من الستيفوزيد من خلال المعادلة التي تربط بين محتوى الكربوهيدرات الكلية ومحتوى ال Stevioside والمذكورة من قبل (Nishiyama, *et al*., 1991, 429)

$$TC=7.56+0.96ST$$

TC: محتوى الكربوهيدرات الكلية.

ST: محتوى الستيفوزيد.



الشكل (1): المنحنى القياسي للغلوكوز النقي.

تقدير (pH):

قُدرت درجة الحموضة في المستخلصات المحضرة سابقاً بنسبة (14:1) أوراق الستيفيا(غ)/ مذيب (مل) وفق (Shuvo, *et al*., 2015, 722) باستعمال جهاز pH meter.

تقدير المواد الصلبة الذائبة الكلية (TSS):

قُدرت المواد الصلبة الذائبة الكلية وفق (Abou-Arab *etal*., 2010, 273) مع إجراء بعض التعديلات حيث تم استبدال الكحول بالماء في المستخلصات الكحولية ومن ثم قياس تركيز المواد الصلبة الذائبة في المستخلصات المحضرة سابقاً بنسبة (14:1) أوراق الستيفيا(غ)/ مذيب(مل) باستخدام جهاز الرفراكتومتر.

2-3- تصميم التجربة والتحليل الإحصائي:

2-3-1- تصميم التجربة لدراسة أفضل الظروف لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد:

حددت الظروف المثلى لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد من أوراق الستيفيا ريبوديانا لكل مذيب على حدى باستخدام المتغيرين (درجة الحرارة، والزمن)، ودُرس كل متغير عند ثلاث مستويات(−1 ،0 ،+1)، كما هو مبيّن في الجدول (1).

الجدول(1): مستويات المتغيرات المستخدمة في استخلاص غليكوزيد الإستيفوزيد لكل مذيب(ماء، إيثانول نقي، إيثانول 80%):

المتغير	المستويات		
	1+	0	1−
درجة الحرارة	90	60	30
الزمن	90	60	30

واستخدم تصميم التجارب المتقدم Response Surface Methodology (RSM) باستخدام برنامج Minitab Optmizatio Method لدراسة تأثير كل عامل على حدى وتأثير العوامل المتفاعلة مع بعضها البعض، حيث تضمن التصميم 14 معاملة و متغيرين (درجة الحرارة، والزمن) لكل نوع من المذيبات (ماء، إيثانول نقي، إيثانول 80%) كماهو موضح في الجدول(2).

الجدول(2): تصميم التجربة لأمثلة استخلاص غليكوزيد الستيفوزيد:

عدد المعاملات	القطاعات	الزمن	درجة الحرارة
1	1	30	30
2	1	30	30
3	1	90	90
4	1	90	90
5	1	60	60
6	1	60	60
7	1	60	60
8	2	60	60
9	2	60	60
10	2	30	30
11	2	90	90
12	2	60	60
13	2	60	60
14	2	60	60

2-3-2-التحليل الإحصائي:

عُبر عن العلاقة بين العامل المدروس (تركيز غليكوزيد الستيفوزيد) والمتغيرين (درجة الحرارة، الزمن) بمعادلة من الدرجة الثانية كما يأتي:

$$Y=a+bX_1+cX_2+dX_1^2+eX_2^2-fX_1*X_2$$

$$Y=7.840+1.848\ X_1+1.385\ X_2+2.345\ X_1^2+0.495\ X_2^2-1.082X_1X_2$$

حيث:

Y: المعامل المدروس Response (تركيز غليكوزيد الستيفوزيد).

X_1: درجة الحرارة.

X_2: الزمن.

a: المعامل الثابت constant

b,c: المعاملات الخطية (Liner effect).

d,e: المعاملات المنحنية (Squares effect).

f: المعاملات المتداخلة (Interaction effect).

كما تم إجراء تحليل الانحدار Regression وتحليل التباين للمعاملات المدروسة.

النتائج والمناقشة:

تبيّن النتائج في الجدول (3) المؤشرات الكيميائية لتركيب المستخلصات الناتجة من حيث (كمية غليكوزيد الستيفوزيد، pH، تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية TSS). نلاحظ أنّ أعلى تركيز لغليكوزيد الستيفوزيد يمكن الحصول عليه وفق الظروف المحددة هو **13.56%** عند الاستخلاص بالماء بدرجة حرارة 90مْ وزمن 90دقيقة، يليه الإيثانول80% حيث كان أعلى تركيز لغليكوزيد الستيفوزيد **10.41%**، بينما في الإيثانول النقي **6.91%**، من جهة أخرى يبيّن الجدول (3) أن إجمالي المواد الصلبة الذائبة الكلية الموجودة في المستخلصات المائية انخفض تركيزها إلى 3.7% بانخفاض الزمن ودرجة الحرارة (30 دقيقة، 30مْ) وزاد تركيزها إلى 4.2% بزيادة الزمن ودرجة الحرارة (90دقيقة، 90مْ) بالرغم من انخفاض تركيز غليكوزيد الستيفوزيد ويمكن أن يفسر ذلك إلى زيادة كمية الشوائب أو تحلل الستيفوزيد بزيادة درجة الحرارة والزمن (Sangha, 2011, 78). أما بالنسبة للمستخلصات الكحولية فلم يكن هناك أي تأثير لدرجة الحرارة والزمن على تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية. كذلك يبيّن الجدول (3) تأثير كل من الزمن ودرجة الحرارة على درجة الحموضة حيث تراوحت من 5.2 إلى 5.7 في المستخلصات المائية حيث كان هناك علاقة ارتباط سلبية ضعيفة (R^2= -0.2)، بينما لوحظ انخفاض حاد في درجة الحموضة في المستخلصات الإيثانولية كلما زادت درجة الحرارة حيث كان هناك علاقة ارتباط سلبية قوية بين درجة الحرارة ودرجة الحموضة في المستخلصات الإيثانولية (R^2= -0.7) بينما لم يكن للزمن ودرجة الحرارة ارتباط بدرجة الحموضة في المستخلصات الإيثانولية 80%.

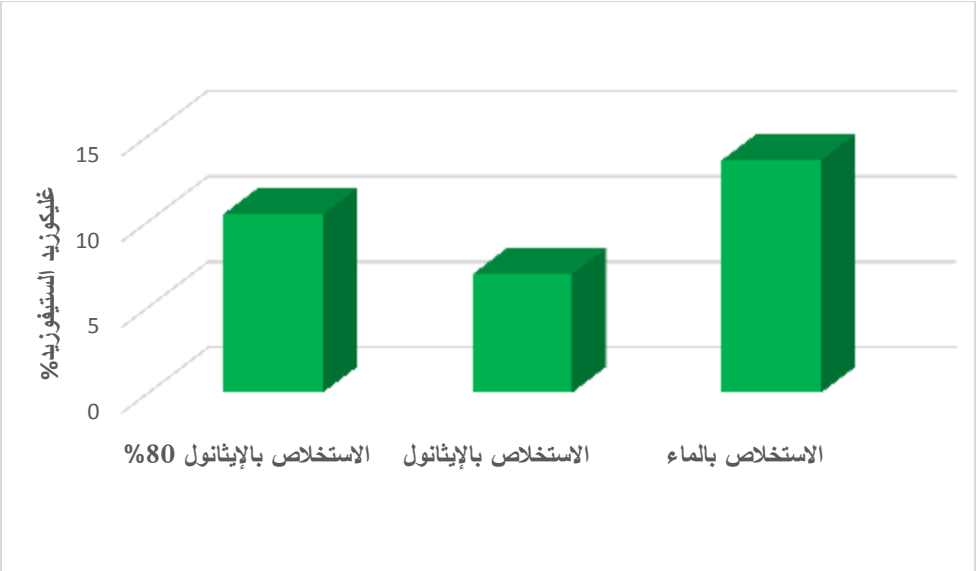
الجدول (3): المؤشرات الكيميائية لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد وفق ظروف الاستخلاص المدروسة.

المؤشرات الكيميائية									ظروف الاستخلاص			
pH			TSS			%stevioside*						
الإيثانول 80%	الإيثانول النقي	الماء	الإيثانول 80%	الإيثانول النقي	الماء	الإيثانول 80%	الإيثانول النقي	الماء	درجة الحرارة	الزمن	Block	المعاملات
6.01	5.2	5.7	3.9	3.3	3.7	4.22	1.71	6.15	30	30	1	1
6.05	**4.9**	5.6	3.2	**2.4**	3.8	9.17	**6.91**	11.68	90	30	1	2
6.03	5.1	5.7	2	3.8	3.7	4.87	2.99	12.36	30	90	1	3
6.02	4.8	**5.6**	3.4	2.1	**4.2**	8.57	6.44	**13.56**	90	90	1	4
5.89	4.9	5.5	3.2	2.2	3.8	7.33	2.99	8.58	60	60	1	5
5.86	4.8	5.4	2.2	2.5	3.9	5.25	2.60	7.68	60	60	1	6
5.89	4.9	5.5	2.4	2.7	3.9	5.27	3.84	6.37	60	60	1	7
6.01	5.2	5.7	2.4	3.1	3.9	4.73	1.28	7.49	30	60	2	8
6.02	4.7	5.6	**2.5**	2.1	4	**10.41**	6.15	11.85	90	60	2	9
5.86	4.9	5.5	2.7	2.8	3.8	6.92	4.56	7.71	60	30	2	10
5.94	4.6	5.2	2.8	2.9	4.1	6.54	2.43	7.93	60	90	2	11
5.84	4.8	5.5	2.2	2.2	3.7	6.89	4.63	8.21	60	60	2	12
5.89	4.9	5.4	2.3	2.6	3.8	7.73	3.07	8.62	60	60	2	13
6.01	4.9	5.6	2.9	2.3	3.9	9.41	4.39	8.61	60	60	2	14

*(غ/ 100غ أوراق جافة)

- **تأثير نوع المذيب في استخلاص غليكوزيد الستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا:**

يبّين الجدول (3) أن تركيز غليكوزيد الستيفوزيد في المستخلصات المائية قد تراوح من 6.15 إلى 13.56% وهذا لم يتوافق مع (Sangha, 2011, 37) الذي تراوح تركيز غليكوزيد الستيفوزيد في المستخلصات المائية من 5.4 إلى 9.3% ويمكن أن يعزى سبب هذا الاختلاف إلى استخدام نسب مختلفة للاستخلاص وأزمنة مختلفة. كما يبّين الجدول (3) أن تركيز غليكوزيد الستيفوزيد في مستخلصات الإيثانول النقي قد تراوح من 1.71 إلى 6.91% بينما تراوح تركيز غليكوزيد الستيفوزيد في مستخلصات الإيثانول 80% من 4.22 إلى 10.41% ويوضح الشكل (2) أن الماء أعطى أعلى تركيز لغليكوزيد الستيفوزيد حيث كان 13.5% ، يليه الإيثانول 80% حيث بلغ تركيز غليكوزيد الستيفوزيد 10.41%، ثم الإيثانول النقي 6.91%، وهذا يتوافق مع (Badr, El-sanat, 2008, 189) الذي بلغ تركيز غليكوزيد الستيفوزيد باستعمال الإيثانول 50%، الإيثانول النقي (9.60، 9.98%) على التوالي، ويمكن أن يكون هذا عائد إلى أنه كلما زادت قطبية المذيب زادت كفاءة عملية الاستخلاص وهذا ما يؤكده (Jackson, *et al.*, 2007, 8) حيث بيّن أنّ الاستخلاص بالماء الساخن يمكن أن يعطي نسبة استخلاص (93–98%) من غليكوزيد الستيفوزيد، بينما لم تتوافق مع نتائج (Muthusamy, Abdul Munaim, 2019,127) حيث أعطى الإيثانول النقي أعلى تركيز لغليكوزيد الستيفوزيد 12.48% ويمكن أن يعود هذا الاختلاف إلى ظروف الاستخلاص حيث تم الاستخلاص بنسبة 1غ ستيفيا إلى 25 مل إيثانول نقي لمدة ساعة على درجة حرارة 40 مْ.



الشكل (2): كمية غليكوزيد الستيفوزيد في أوراق الستيفيا ريبوديانا الجافة.

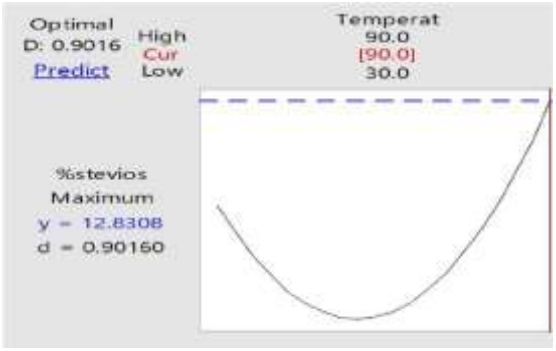
- **تأثير درجة الحرارة في استخلاص غليكوزيد الستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا:**

تؤثر درجة حرارة الاستخلاص تأثيراً معنوياً في كفاءة استخلاص غليكوزيد الستيفوزيد المستخلص من أوراق الستيفيا حيث تشير النتائج الموضحة في الجدول (4) إلى أن التأثير الخطي و(درجة الحرارة)^2 كان معنوياً بالنسبة للاستخلاص بالماء، كما تشير النتائج إلى وجود معادلة من الدرجة الثانية ومعنوية بين درجة الحرارة وغليكوزيد الستيفوزيد وذلك نتيجة التأثير المعنوي لـ (درجة الحرارة)^2 في غليكوزيد الستيفوزيد المستخلص من أوراق الستيفيا ريبوديانا حيث كانت قيمة (P < 0.05)، ولم يكن لـ (درجة الحرارة)^2 في الاستخلاص بالإيثانول النقي والإيثانول 80% تأثير معنوي (P>0.05) بينما كان لدرجة الحرارة تأثير خطي معنوي في الاستخلاص بالإيثانول النقي والإيثانول 80%.

الجدول (4): تأثير العوامل المدروسة في استخلاص غليكوزيد الإستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا باستعمال (الماء، الإيثانول النقي، الإيثانول 80%) إحصائياً.

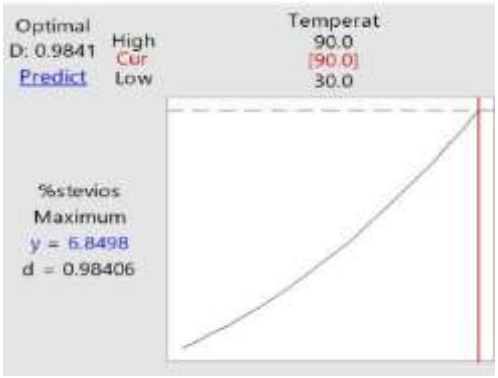
باستعمال الماء				باستعمال الإيثانول النقي				باستعمال الإيثانول 80%			
العامل	Coef	SE Coef	T	P	Coef	SE Coef	T	P	Coef	SE Coef	T	P
الثابت	7.840	0.442	17.76	0.000	3.482	0.362	9.62	0.000	7.052	0.497	14.18	0.000
درجة الحرارة(X_1)	1.848	0.470	3.93	**0.004**	2.253	0.385	5.85	**0.001**	2.388	0.529	4.51	**0.002**
الزمن(X_2)	1.385	0.470	2.95	**0.019**	-0.053	0.385	-0.14	0.893	-0.055	0.529	-0.10	0.920
درجة حرارة*درجة حرارة(X_1)^2	2.345	0.684	3.43	**0.009**	0.547	0.561	0.98	0.358	0.302	0.770	0.39	0.705
الزمن*الزمن(X_2)^2	0.495	0.684	0.72	0.490	0.327	0.561	0.58	0.576	-0.538	0.770	-0.70	0.504
درجة الحرارة*الزمن (X_1*X_2)	-1.082	0.576	-1.88	**0.047**	-0.187	0.472	-0.40	0.701	-0.313	0.648	-0.48	0.643

وإن تأثير درجة الحرارة يختلف باختلاف نوع المذيب المستخدم فبالنسبة لمذيب الماء لوحظ من الشكل (3) أنه كان هناك انخفاض في تركيز غليكوزيد الستيفوزيد عند زيادة درجة الحرارة من 30مْ إلى 60مْ، ومن ثم لوحظ ارتفاع في تركيز غليكوزيد الستيفوزيد بزيادة درجة الحرارة من (60مْ إلى 90مْ).

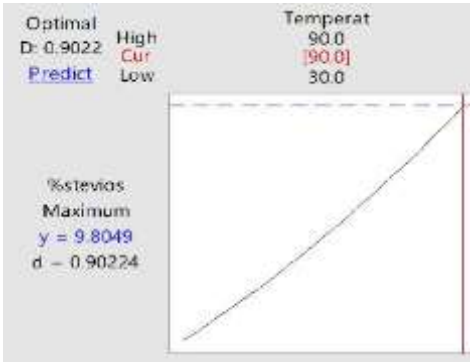


الشكل (3): درجة الحرارة المثلى لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد في الماء.

كما نلاحظ من الشكل (4، 5) أن زيادة درجة الحرارة أدت إلى زيادة محتوى الستيفوزيد حيث كان أعلى تركيز له عند درجة حرارة 90مْ، فكانت درجة الحرارة المثالية لكل من الاستخلاص بالإيثانول النقي والإيثانول 80% هي 90 مْ وذلك ضمن ظروف التجربة المثالية، وقد يُعزى الزيادة في محتوى الستيفوزيد عند درجات حرارة عالية إلى زيادة سرعة التفاعل وبالتالي سهولة فصل الستيفوزيد من الشوائب الأخرى (Sangha, 2011,38).



الشكل (4): درجة الحرارة المثلى لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد في الإيثانول النقي.

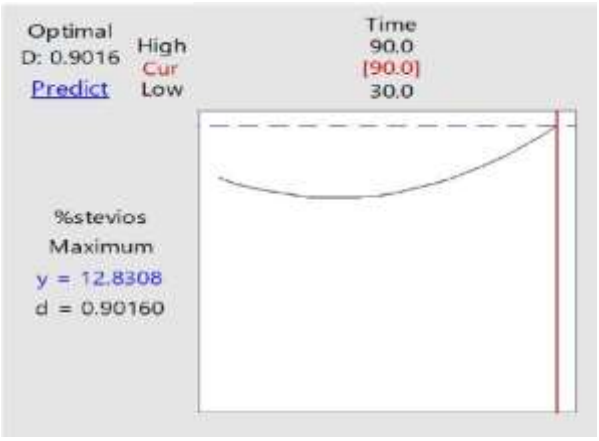


الشكل (5): درجة الحرارة المثلى لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد في الإيثانول 80%.

- **تأثير الزمن في استخلاص غليكوزيد الستيفوزيد من نبات الستيفيا:**

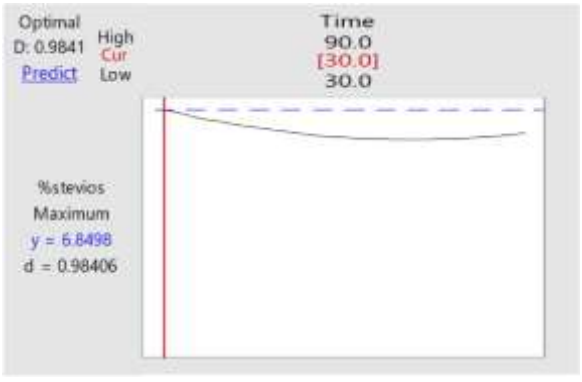
بيّنت نتائج التحليل الإحصائي الموضحة في الجدول (4) إلى أن تأثير(الزمن)^2 في الاستخلاص بالماء لم يكن معنوياً (P>0.05)، بل كان له تأثير خطي معنوي (P < 0.05)على غليكوزيد الستيفوزيد، بينما لم يكن للزمن أي تأثير معنوي على غليكوزيد الستيفوزيد بالنسبة للاستخلاص بالإيثانول والإيثانول 80% (P>0.05)، حيث تراوح محتوى غليكوزيد الستيفوزيد باستعمال الماء من (6.15− 13.56%) زاد محتوى غليكوزيد الستيفوزيد بازدياد الزمن من (60−90 دقيقة) بينما بدء بالانخفاض من زمن 70دقيقة

ولغاية 30 د، فكان الزمن المثالي لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد بالماء هو (90 دقيقة) كما هو موضح في الشكل (6)؛ وذلك ضمن درجة الحرارة المثالية للتجربة (90 مْ) إذْ بلغت قيمة غليكوزيد الستيفوزيد (12.83%). وهذا يتوافق مع Sangha (,2011 28) الذي بيّن أن الزمن المنخفض (20 دقيقة) لا يكفي لاستخلاص الستيفوزيد بشكل جيد من أوراق الستيفيا، من ناحية أخرى زيادة الزمن إلى (120 دقيقة) لم يلاحظ له أية زيادة على تركيز غليكوزيد الستيفوزيد، ويمكن أن يعزى ذلك إلى تشبع المذيبات (Muthusamy, Abdul Munaim,2019,126).



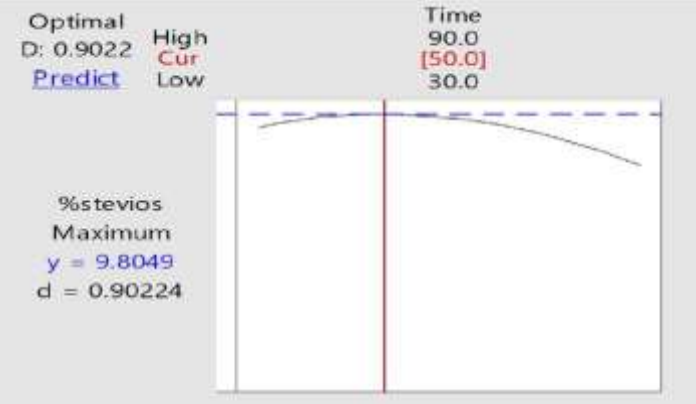
الشكل (6): الزمن الأمثل لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد في الماء.

أما بالنسبة للاستخلاص بالإيثانول النقي فقد تراوح محتوى غليكوزيد الستيفوزيد من 1.71% إلى 6.91% حيث لوحظ من الشكل (7) أن زيادة الزمن أدى إلى انخفاض تركيز غليكوزيد الستيفوزيد حيث كان الزمن المثالي للحصول على أعلى تركيز من غليكوزيد الستيفوزيد هو (30 دقيقة) عند درجة حرارة مثالية (90مْ)؛ إذْ بلغت قيمته (6.85%). وهذا لم يتوافق مع Muthusamy, Abdul Munaim (2019,128) حيث وجدا أن الزمن (60 دقيقة) باستعمال الإيثانول أعطى أعلى تركيز من الستيفوزيد، ويمكن أن يعزى طول الزمن إلى استخدام درجة حرارة منخفضة (40مْ) .



الشكل (7): الزمن الأمثل لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد في الإيثانول النقي.

كما تراوحت كمية غليكوزيد الستيفوزيد باستعمال الإيثانول 80% من 4.22% إلى 10.41% حيث لوحظ من الشكل (8) أن الزمن المثالي لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد باستعمال بالإيثانول 80% هو (50 د)؛ وذلك ضمن درجة الحرارة المثالية للتجربة (90 مْ) إذْ بلغت قيمة غليكوزيد الستيفوزيد (9.80%). كما لوحظ من الشكل (8) أن كمية غليكوزيد الستيفوزيد تزداد بزيادة الزمن من (30 إلى 50 دقيقة) بينما تنخفض عند ازدياد الزمن إلى (90 د) وذلك عند درجة حرارة 90مْ، حيث أظهر Sangha (2011,28) أن ازدياد الزمن مع درجات حرارة مرتفعة يمكن أن يؤدي إلى تحلل الستيفوزيد.



الشكل (8): الزمن الأمثل لاستخلاص غليكوزيد الستيفوزيد في الإيثانول 80%.

- **تأثير العوامل المتداخلة في استخلاص غليكوزيد الستيفوزيد من نبات الستيفيا ريبوديانا:**

يبيّن التحليل الإحصائي في الجدول (4) إلى وجود علاقات تداخل (Interaction effect) بين المتغيرين (الزمن، درجة الحرارة) بالنسبة لكمية غليكوزيد الستيفوزيد المستخلصة بواسطة الماء من أوراق الستيفيا ريبوديانا، حيث كانت العلاقة بين درجة حرارة الاستخلاص والزمن معنوية ($P < 0.05$). كما بلغت قيمة معامل التحديد ($R^2 = 84.92\%$)؛ وهذا يدل على أن العوامل المتغيرة المدروسة مسؤولة عن (R^2=84.92%) من مقدار التغير في كمية غليكوزيد الستيفوزيد المستخلصة بالماء. وبالاعتماد على الجدول (4) يمكن كتابة المعادلة التي تربط بين المتغيرات المدروسة (X) مع غليكوزيد الستيفوزيد المستخلص(Y) كما يلي:

$$Y=8.40- 0.179\ X1+ 0.052\ X2+0.002606\ X12+ 0.000550\ X22- 0.001203\ X1*X2$$

كما بيّن التحليل الإحصائي في الجدول (4) إلى أن كمية غليكوزيد الستيفوزيد المستخلصة باستعمال الإيثانول النقي من أوراق الستيفيا ريبوديانا تأثرت بشكل معنوي بدرجة حرارة الاستخلاص ($P < 0.05$). بينما كانت باقي العلاقات غير معنوية ($P>0.05$) في تأثيرها على كمية غليكوزيد الستيفوزيد. بلغت قيمة معامل معامل التحديد($R^2 = 82.20\%$) ؛ وهذا يدل على أن (درجة الحرارة) مسؤولة عن ($R^2 = 82.20\%$) من مقدار التغير في كمية غليكوزيد الستيفوزيد المستخلصة بالإيثانول النقي.

وبالاعتماد على الجدول (5) يمكن كتابة المعادلة التي تربط بين المتغيرات المدروسة (X) مع غليكوزيد الستيفوزيد المستخلص (Y) كما يلي:

$$Y=1.83+ 0.0147\ X1- 0.0328\ X2+ 0.000608\ X12+ 0.000363X22- 0.000208\ X1*X2$$

كما نلاحظ من نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (4) وجود علاقة تفاعل متبادل معنوي بين درجة الحرارة وكمية غليكوزيد الستيفوزيد المستخلصة باستعمال الإيثانول 80% ($P < 0.05$) بينما كانت باقي العلاقات غير معنوية ($P>0.05$) في تأثيرها على كمية غليكوزيد الستيفوزيد، بلغت قيمة معامل التحديد ($R^2= 84.80\%$)؛ وهذا يدل على أن (درجة الحرارة) مسؤولة عن ($R^2= 84.80\%$) من مقدار التغير في كمية غليكوزيد الستيفوزيد المستخلصة بالإيثانول 80% . وبالاعتماد على الجدول (4) يمكن كتابة المعادلة التي تربط بين المتغيرات المدروسة (X) مع غليكوزيد الستيفوزيد المستخلص (Y) كما يلي:

$$Y=0.19+ 0.060\ X1+ 0.091X2+ 0.000335X12- 0.000598X22- 0.000347\ X1*X2$$

الاستنتاجات:

- يؤثر نوع المذيب في كفاءة استخلاص غليكوزيد الستيفوزيد من أوراق الستيفيا وكلما زادت قطبية المذيب زادت كفاءة الاستخلاص.
- تؤثر درجة الحرارة والزمن بشكل معنوي في كفاءة استخلاص غليكوزيد الستيفوزيد بالماء، في حين كان لدرجة الحرارة فقط التأثير المعنوي في الاستخلاص بالإيثانول 80% والإيثانول النقي.
- إن الظروف المثلى للحصول على أعلى كفاءة استخلاص لغليكوزيد الستيفوزيد عند درجة حرارة 90مْ وزمن 30 دقيقة باستعمال الماء ، و30 دقيقة للإيثانول النقي و 50 دقيقة للإيثانول 80%.
- وجود علاقة ارتباط إيجابية لكل من الزمن ودرجة الحرارة على تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية في المستخلصات المائية.
- لم يكن هناك أي تأثير معنوي لدرجة الحرارة والزمن على تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية في المستخلصات الكحولية.
- كان لدرجة الحرارة تأثير أكبر على درجة الحموضة في المستخلصات الإيثانولية حيث كان أعطت علاقة ارتباط سلبية قوية ($R^2= -0.7$) مقارنة بالزمن ($R^2= -0.3$).
- لم يكن للزمن ودرجة الحرارة علاقة ارتباط بدرجة الحموضة في المستخلصات المائية والإيثانولية 80%.

معلومات التمويل : هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

المراجع (References):

1. Abou-Arab, A.E., Abou-Arab, A.A. and Abu-Salem, M.F. (2010) **Physicochemical assessment to natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana bertoni plant**. African Journal of Food Science, 4, 269-281.
2. Afandi A, Sarijan S and Shaha R K. (2013) **Optimization of Rebaudioside a Extraction from Stevia rebaudiana (Bertoni) and Quantification by High Perfomance Liquid Chromatography Analysis**. J. Tropi. Resources and Sustainable Sci. 1(1):62-70.
3. Ahmed MS and Dobberstein RH (1992) **Stevia reb. II. HPLC separation and quantitation of stevioside, rebaudioside A and rebaudioside C.** J Chromatogr 236: 523-26.
4. Badr. I. Alaa, , El-sanat. Y.A. Samir., (2008). **Optimization of extraction, clarification and crystallization of stevioside extracted from Stevia rebaudiana Bertoni**. J. Agric. Res. Kafrelsheikh Univ ., 34 (1): 183-203.
5. Brandle JSA (1998). **Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties (Review).** Can. J. Plant Sci. 78: 527-536.
6. Celaya S., Liliana, Kolb., Eugenio, and Kolb Nicol (2016) **Solubility of Stevioside and Rebaudioside A in water, ethanol and their binary mixtures**. International Journal of Food Studies. Volume 5. 158-166.
7. Dacome AS, Silva CC and Costa CEM (2005) **Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni: isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods.** Process Biochem 40: 3587–94.
8. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.** Anal. Chem. 28: 350-356.
9. Guo-Qing, H., Hao-Ping, X., Qi-He, C., Ruan, H., Zhao-Yue, W. and Traore, L. (2005). **Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (Humulus lupulus L.)**. Journal of Zhejiang University SCI 6B(10): 999-1004.
10. Jaroslav P, Barbora H, and Tuulia H. (2006) **Characterization of Stevia rebaudiana by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry.** J. Chromatogr. A. 1150:85-92.
11. Jackson, M.C.; Francis, G.J.and Chase, R.G., (2007) **High yield method of producing rebaudioside A.** US patent application 0083838.
12. Koyama. E. ;Kitazawa. K. ;Ohori.Y;.Izawa, Kakegawa, K.and Fujino.A. l. (2003) **: In Vitro Metabolism of the Glycosidic Sweeteners.** Stivia Mizture and Enzymatically Modified Stevia in Human Intestinal Microflora. Food chem Toxicol 41(5). 875-883.
13. Liu J, Ong CP and Li SFY (1997) **Subcritical fluid extraction of Stevia sweeteners from Stevia Rebaudiana.** J Chromatogr Sci 35: 446-50.
14. Muthusamy Kalaiarasan , Abdul Munaim Mimi Sakinah., (2019) **Investigation of Factors Affecting Extraction of Rebaudioside A & Stevioside from Stevia Leaves**. ISSN: 2462-1269 (Online) Vol.6 (1) Universiti Malaysia Pahang.
15. Nishiyama, P.; Kusumoto. I.T; Costa. Sc; Alvarez. M, and vierira, L. Ge. (1991) **Correlation between total carbohydrate contain and stevioside content in stevia rebaudiana (Bertoni) leaves.** Arquivos-de-Biological 34: 3 -4, 425- 434.
16. Pol J, Ostra EV, Karasek P, Roth M, Benesova K, Kotlarikova P and Caslavsky J (2007) **Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from Stevia rebaudiana: methanol versus water.** Anal Bioanal Chem 388: 1847–57.
17. Sangha, G. (2011). **STUDIES ON EXTRACTION OF STEVIOSIDE FROM STEVIA (Stevia rebaudiana Bertoni) LEAVES**. M. Sc, Submitted to the Punjab Agricultural University.
18. Shi Q. Z; Ashwani.K and Oleh. K (2000) : **Membrane-Based Separation Scheme for Processing Sweeteners From Stevia Leaves.** Food Research International 33,617-620.
19. Shuvo MMA, Al–Mamun M, Chowdhury T, Absar N, Hasanuzzaman M (2015) **An assessment of major nutritional components and some secondary metabolites of in vitro propagated stevia rebaudiana (cultured in Bangladesh) plant leaves dry powder.** Int J Applied Sci Biotechnol 3: 721-26.
20. Yaqin, X., Rui, Z. and Hong, F. (2005). **Studies on the optimal process to extract flavonoids from red-raspberry fruits.** Nature and Science 3(2): 43-46.