

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA VIDMAJER

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA VIDMAJER

**VALIDACIJA KROMATOGRAFSKE METODE ZA  
ANALIZO STEVIOL GLIKOZIDOV V ZELI STEVIJE  
(*STEVIA REBAUDIANA*) IN ANALIZA VZORCEV  
RAZLIČNIH KEMOTIPOV IN RAZLIČNIH ŽETEV**

**VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR  
ANALYSIS OF STEVIOL GLYCOSIDES IN STEVIA HERB  
(*STEVIA REBAUDIANA*) AND ANALYSIS OF SAMPLES OF  
DIFFERENT CHEMOTYPES AND DIFFERENT HARVESTS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Praktični del diplomske naloge sem opravljala v laboratoriju Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec, pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Iztoka Jožeta Koširja, univ. dipl. kem.

## **Zahvala**

Mentorju prof. dr. Samu Kreftu in somentorju doc. dr. Iztoku Jožetu Koširju se zahvaljujem za vodenje med laboratorijskim delom in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, ker so mi omogočili izvajanje praktičnega dela diplomske naloge.

Hvala celotnemu kolektivu za agrokemijo in pivovarstvo, še posebno Tanji Potočnik, za nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju.

Ne nazadnje se zahvaljujem moji družini in fantu Marku, ker so mi stali ob strani, me spodbujali in verjeli vame skozi ves študij.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Lea Vidmajer

Ljubljana, 2014

# KAZALO VSEBINE

<b>POVZETEK</b> .....	<b>III</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
<i>1.1 STEVIJA (STEVIA REBAUDIANA)</i> .....	<i>1</i>
1.1.1 Splošno .....	1
1.1.2 Botanični opis .....	1
1.1.3 Sestava .....	3
<i>1.2 STEVIOLNI GLIKOZIDI</i> .....	<i>3</i>
1.2.1 Steviozid in rebaudiozid A .....	4
1.2.1.1 Žetev in vsebnost steviozida in rebaudiozida A .....	5
1.2.1.2 Razmerje rebaudiozid A/steviozid.....	5
1.2.2 Struktura .....	6
1.2.3 Fizikalne in senzorične lastnosti.....	7
1.2.4 Farmakologija.....	7
1.2.5 Farmakokinetika .....	10
1.2.6 Zakonodaja .....	12
1.2.7 Varnost.....	12
1.2.8 Analitika .....	12
1.2.8.1 Izolacija .....	12
1.2.8.2 Ločitev in detekcija .....	13
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>14</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>15</b>
<i>3.1 MATERIALI</i> .....	<i>15</i>
<i>3.2 METODA DELA</i> .....	<i>17</i>
3.2.1 Priprava ekstrakta steviolnih glikozidov iz zeli stevije .....	17
3.2.1.1 Ekstrakcija z vodo .....	17
3.2.1.2 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE) .....	18
3.2.2 Priprava osnovnih standardnih raztopin .....	20
3.2.3 Validacijski postopki za določitev steviolnih glikozidov .....	21

3.2.3.1	Določitev selektivnosti .....	21
3.2.3.2	Določitev linearnosti.....	22
3.2.3.3	Določitev natančnosti metode (ponovljivost, obnovljivost).....	23
3.2.3.4	Določitev pravilnosti oz. točnosti metode .....	24
3.2.3.5	Določitev stabilnosti ekstrakta steviolnih glikozidov.....	24
3.2.4	Določitev vlage.....	24
3.2.5	Kromatografska analiza.....	25
3.2.6	Izračun vsebnosti steviolnih glikozidov v zeli stevije.....	26
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>27</b>
4.1	<i>POSKUS OPTIMIZACIJE METODE.....</i>	27
4.2	<i>VALIDACIJA .....</i>	28
4.2.1	Selektivnost .....	28
4.2.2	Linearnost .....	29
4.2.3	Natančnost .....	31
4.2.4	Pravilnost oz. točnost – določanje izkoristka .....	33
4.2.5	Stabilnost .....	35
4.3	<i>STEVIOJNI GLIKOZIDI V ZELI STEVIJE.....</i>	37
4.3.1	Ugotavljanje razlik med žetvama .....	38
4.3.2	Ugotavljanje razlik med kemitipi .....	40
4.3.3	Razmerje med vsebnostmi rebaudiozida A in steviozida .....	43
4.3.4	Linearna povezava med vsebnostmi rebaudiozida A in steviozida.....	44
4.3.5	Primerjava rezultatov z literaturnimi rezultati.....	45
<b>5</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>48</b>

## POVZETEK

Stevija (*Stevia rebaudiana*) je prepoznana predvsem po svojih sladkih listih, v katerih kopiči snovi, imenovane steviolni glikozidi. Ti so intenzivnega sladkega okusa in brez kalorične vrednosti, zato se v prehrani uporabljajo kot sladila. Največji delež v listih predstavljata steviozid in rebaudiozid A, zaradi česar sta najpogosteje izolirani spojini iz stevije.

Namen diplomske naloge je bil validirati metodo za določitev steviolnih glikozidov (steviozida in rebaudiozida A) v zeli stevije in ugotoviti morebitne razlike v vsebnostih med poletno in jesensko žetvijo ter med različnimi kemotipi.

Za njuno določitev smo uporabili metodo, ki je obsegala vodno ekstrakcijo, čiščenje vzorca z ekstrakcijo na trdni fazi in na koncu ločevanje in določitev obeh glikozidov s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Analizirali smo vzorce zeli sedmih različnih kemotipov stevije požetih dvakrat v letu. Za posamezno žetev in posamezen kemotip smo določili vsebnosti obeh analitov ter izračunali razmerje rebaudiozid A/steviozid, ki je poleg vsebnosti eden izmed pokazateljev kakovosti pridelka.

Pred analizo vzorcev smo metodo validirali in določili, da je metoda selektivna, linearna (za steviozid v območju 6,3–100,8 mg/L in za rebaudiozid A v območju 5,1–101,0 mg/L), natančna (z relativnim standardnim odklikom za steviozid 11,4 % in za rebaudiozid A 11,5 %) in točna (z izkoristkom  $101,9 \pm 6,7$  %). Ekstrakti so obstojni sedem dni pri 4°C.

Z uporabo t-testa smo ovrednotili rezultate in ugotovili, da obstajajo statistično značilne razlike v vsebnostih steviozida in rebaudiozida A med poletno in jesensko žetvijo (vsebnosti pri poletni žetvi so bile večje). Prav tako je razmerje rebaudiozid A/steviozid večje pri poletni žetvi. Pri primerjanju rezultatov med kemotipi smo ugotovili, da med šestimi kemotipi ni večjih razlik, en kemotip (neznana sorta z zeliščnega vrta Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije) pa se od drugih razlikuje po višji vsebnosti rebaudiozida A v obeh žetvah (razlike v vsebnosti steviozida so manj opazne, vendar vseeno najvišje pri omenjenem kemotipu v obeh žetvah).

V primerjavi z rezultati iz drugih držav so vsebnosti steviozida in rebaudiozida A v naši steviji višje.

## SEZNAM OKRAJŠAV

CAD	»charged aerosol« detektor
DAD	detektor z nizom diod (angl.: <i>diode array detector</i> )
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (angl.: <i>European food safety authority</i> )
H <sub>0</sub>	ničelna hipoteza
H <sub>1</sub>	alternativna hipoteza
HILIC	hidrofilna interakcijska kromatografija (angl.: <i>hydrophilic interaction chromatography</i> )
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: <i>high performance liquid chromatography</i> )
IHPS	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenje
IL-1 $\beta$	interlevkin 1 $\beta$
LOQ	meja določanja (angl.: <i>limit of quantification</i> )
LC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrija (angl.: <i>liquid chromatography – mass spectrometry</i> )
PAD	pulzni amperometrični detektor (angl.: <i>pulsed amperometric detector</i> )
R <sup>2</sup>	determinacijski koeficient
REB-A	rebaudiozid A
RSD	relativni standardni odklon (angl.: <i>relative standard deviation</i> )
s <sub>i</sub>	standardni odklon skupine meritev
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (angl.: <i>solid phase extraction</i> )
STD	standard
STE	steviozid
t <sub>r</sub>	retencijski čas
TNF- $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze $\alpha$ (angl.: <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
UV	ultravijoličen
$\bar{x}_i$	povprečje skupine meritev

# 1 UVOD

---

## 1.1 STEVIJA (*STEVIA REBAUDIANA*)

### 1.1.1 SPLOŠNO

*Stevia rebaudiana* (Bertoni) je po svetu poznana predvsem po svojih sladkih listih, iz katerih pridobivajo čiste snovi, ki se uporabljajo kot sladilo. Rastlino so že stoletja uporabljali Indijanci Guarani za sladkanje pijače maté, izboljšanje okusa drugih jedi in za zdravljenje. Klicali so jo »kaa he-he«, kar v njihovem jeziku pomeni »sladka zel«. Zaradi nedostopnosti terena, kjer raste, jo je dokaj pozno, leta 1887, odkril italijanski botanik Moises S. Bertoni, ki je takrat delal v Paragvaju. Leta 1905 jo je znanstveno poimenoval po paragvajskem kemiku dr. Rebaudiju, ki je kot prvi uspel iz listov rastline izločiti sladko snov v čisti obliki (1, 2).

Njeno izvorno okolje je višavje na severovzhodnem predelu Paragvaja, na meji z Brazilijo. Raste na nadmorski višini od 500 do 3000 m na polsuhih gorskih področjih, vendar dobro uspeva tudi na travniških, v grmičastih gozdovih in na subalpskih področjih (2). Za stevijo je idealno polvlažno subtropsko podnebje s temperaturnim razponom od  $-6$  do  $43^{\circ}\text{C}$  s povprečjem  $23^{\circ}\text{C}$  (1).

Danes jo vzgajajo v Paragvaju, Mehiki, Srednji Ameriki, Maleziji, Južni Koreji, na Japonskem in Kitajskem. Na področju Evrope jo gojijo v Španiji, Belgiji in Veliki Britaniji. Listi stevije in ekstrakti iz listov se že desetletja uporabljajo kot sladilo po vsem svetu (Centralna in Južna Amerika, Japonska, Koreja, Kitajska, Jugovzhodna Azija) brez negativnih učinkov (4).

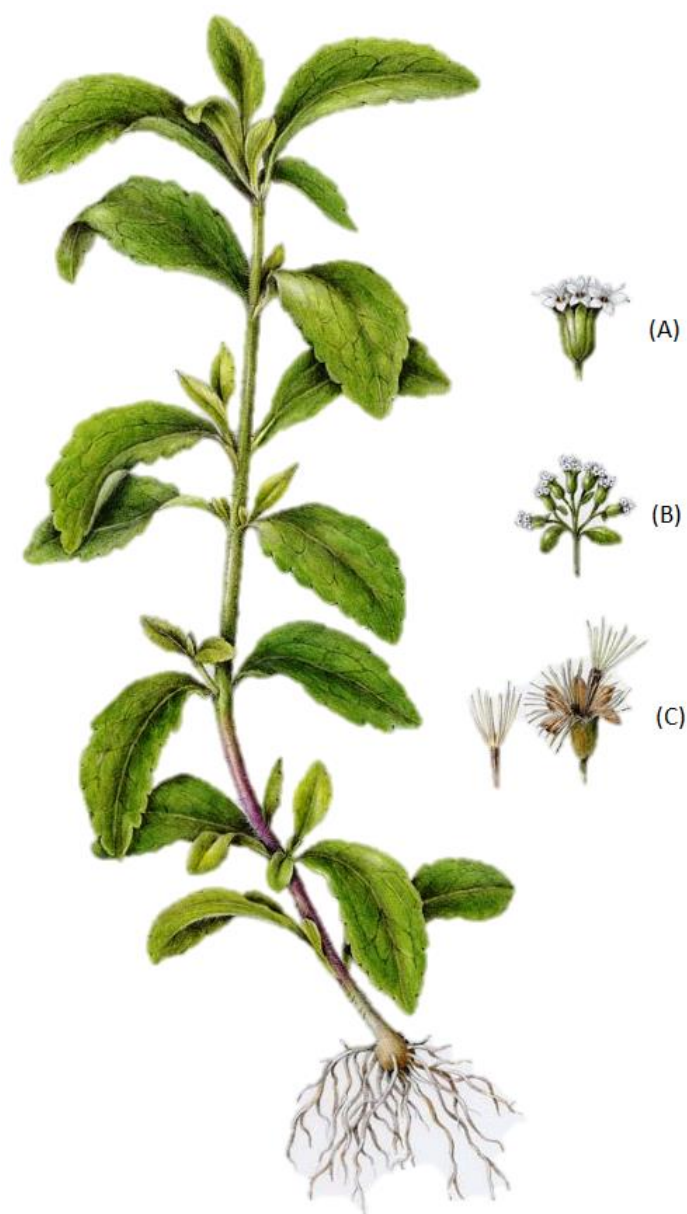
### 1.1.2 BOTANIČNI OPIS

*Stevia rebaudiana* (slika 1) spada v družino nebinovk (Asteraceae) in je ena izmed približno 150–200 vrst rodu *Stevia*. Je majhna grmičasta rastlina, ki zraste do 65 cm, kot kultivirana rastlina tudi do 1,8 m, predvsem na bolj rodovitnih tleh. Ima krhko steblo in razširjen koreninski sistem; sedeče, nasprotno razporejene, suličaste do nasprotno suličaste ali eliptične liste z nazobčanimi robovi. Cvetovi so majhni (7–15 mm) in beli (A) ter



razporejeni v koške, ti pa v nepravilen pakobul (B). Iz cveta se razvije rožka obdana s pernatimi laski (C) (1, 2, 3).

Je obligatorna kratkodnevnic, ki začne cveteti, ko so dnevi krajši od kritične dolžine dneva, ki je okrog 13 h. Vendar pa se pojavljajo velike razlike znotraj populacije glede na občutljivost na dolžino dneva (3).



**Slika 1: *Stevia rebaudiana* (Bertoni), A – glavica s petimi belimi cvetovi, B – pakobul, C – glavica z rožkami.**

### 1.1.3 SESTAVA

Stevija vsebuje številne spojine z različnimi strukturami. Najbolj poznani so sladki diterpenski glikozidi, imenovani steviolni glikozidi. Poleg teh so v rastlini prisotni še neglikozidni diterpeni (diterpeni labdan tipa, sterebini A do N, austroinulin), flavonoidi (kvercetin, apigenin, luteolin in njihovi glikozidi), fenolne spojine (pirogalol), vitamini (folna kislina, askorbinska kislina, vitamina B<sub>2</sub> in B<sub>6</sub>, niacin in tiamin), fitosteroli ( $\beta$ -sitosterol, stigmasterol in lanosterol), triterpeni ( $\beta$ -amirin), polihidroksi indožilidin alkaloid (steviamin), 40 različnih spojin identificiranih v oljni frakciji (spatulenol, kariofilen oksid,  $\beta$ -kariofilen in  $\beta$ -pinen), 17 aminokislin, nenasičene maščobne kisline (oleinska, linolna, linolenska, stearinska, palmitinska in palmitolinolna) in minerali (kalcij, fosfor, kalij, natrij, železo, magnezij, žveplo, baker, kobalt, mangan, cink, selen in molibden) (4, 5).

## 1.2 STEVIOLNI GLIKOZIDI

Z različnimi analitskimi tehnikami je bilo do danes določenih že več kot 30 steviolnih glikozidov. Njihova celokupna vsebnost običajno znaša do 20 % suhe teže listov. Glavna glikozida sta steviozid, običajno 4–14 % suhe teže listov, in rebaudiozid A, 2–4 %, ki sta tudi najslajši komponenti v rastlini. Sledijo jima rebaudiozid C (1–2 %), dulkozid A (0,4–0,7 %), rebaudiozid D, rebaudiozid E, rebaudiozid F, dulkozid C in steviolbiozid (>0,4 %). V zadnjih nekaj letih je bilo zahvaljujoč novim tehnikom (tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrija – LC–MS) odkritih še nekaj novih rebaudiozidov (5, 6).

Zastopanost teh spojin je največja v listih, medtem ko je vsebnost v cvetovih in steblih 7–8 in 12–13 krat manjša. V semenih je količina glikozidov 2–2,5 krat manjša kot v cvetovih, v koreninah pa so te količine skoraj nezaznavne (0,1 %). Prav tako se delež in količina glikozidov v listih razlikuje glede na starost in razvojno stopnjo rastline. V mlajših listih je vsebnost glikozidov višja kot v odraslih listih (7).

Na kopičenje glikozidov v listih vpliva precej dejavnikov: dolžina dneva, sončno obsevanje, znotraj- in medsortne razlike, temperatura zraka in razpoložljivost hranil (8).

### 1.2.1 STEVIOZID IN REBAUDIOZID A

Zaradi izredne sladkosti in visoke vsebnosti v listih sta steviozid in rebaudiozid A najbolj zanimivi spojini v steviji. Izmed vseh steviolnih glikozidov najdemo v literaturi največ podatkov ravno o njiju. Količina teh dveh glikozidov v listih je eden izmed pokazateljev uspešnosti gojenja stevije in kakovosti pridelka.

V preglednici I so prikazani podatki o njihovi količini v vzorcih, ki so bili pripravljene iz listov stevije nabranih v različnih regijah po vsem svetu. Rastline so rastle v zmerno topleni in subtropskem pasu, na območjih z različno količino padavin in na različnih nadmorskih višinah. Zaradi različnih agroklimatskih pogojev je vsebnost glikozidov precej različna, od 3,17 do 12,75 % za steviozid in od 0,6 do 7,27 % za rebaudiozid A, preračunano na suho težo listov.

**Preglednica I: Vsebnost steviozida in rebaudiozida A v različnih vzorcih pripravljenih iz listov stevije v različnih državah**

Država	Vsebnost steviol glikozida v suhi snovi (%)		Referenca
	Steviozid	Rebaudiozid A	
Paragvaj – vzhod	4,36–9,89	ni podatka	13
Argentina – severovzhod	3,78–9,84	1,62–7,27	12
ZDA – jug	7,51–12,75	1,98–6,44	10
Indija	3,348–6,754	1,286–2,378	14
Indija	3,17–9,94	ni podatka	15
Rusija	5,8	1,2	16
Ukrajina	4,8	1,3	16
Italija - severovzhod	3,54–8,96	3,65–6,32	9
Italija – jug	8,36	5,72	7
Italija – jug	4,1–8,2	0,6–4,4	17
Nemčija	6,97–8,75	3,98–5,44	11

### ***1.2.1.1 ŽETEV IN VSEBNOST STEVIOZIDA IN REBAUDIOZIDA A***

Žetev je najprimernejša tik pred cvetenjem, ko je koncentracija steviolnih glikozidov v listih največja. Pred cvetenjem je vegetativna rast najintenzivnejša, biomasa se povečuje in s tem tudi količina glikozidov v listih (3).

Tavarinijeva in Angelinijeva (2013) sta preučevali vpliv časa žetve na vsebnost steviolnih glikozidov v listih stevije, posajeni na severovzhodu Italije. Najvišja vsebnost steviozida je bila na koncu julija, ko je rastlina bujno rastla, sredi septembra, ko je rastlina začela cveteti, pa se je zmanjšala. Za razliko od steviozida se je vsebnost rebaudiozida A od začetka julija do septembra prvo leto povečevala, v drugem letu pa je bila najvišja na koncu julija. Kljub temu pa se je razmerje med vsebnostma rebaudiozida A in steviozida od julija do septembra povečalo v obeh letih gojenja (9).

Moraesova in njeni sodelavci (2013) so preučevali vpliv števila žetev na vsebnost sladkih glikozidov v listih stevije, ki je rastla na severu zvezne države Mississippi, kjer je vlažno subtropsko podnebje z zmernimi zimami, brez hudega mraza. Rastline so poželi trikrat zapored (razmik 60 dni), dvakrat zapored (razmik 90 dni) in enkrat na leto. Ugotovili so, da se pri trikratni žetvi vsebnosti steviozida (11,16, 11,68, 11,53 % na suho snov listov) med žetvami niso bistveno spremenile, večja nihanja so se pojavila v vsebnostih rebaudiozida A (3,12, 6,44, 4,34 %). Pri dvakratni žetvi je bila razlika v vsebnostih steviozida (12,75, 11,91 %) prav tako majhna, medtem ko se je vsebnost rebaudiozida A (3,63, 1,98%) med prvo in drugo žetvijo zmanjšala. Enkrat požete rastline so imele vsebnost steviozida (7,51 %) manjšo in rebaudiozida A (5,68 %) večjo v primerjavi s tistimi pri večkratnih žetvah. Posledično je bilo razmerje med rebaudiozidom A in steviozidom večje pri enkratni kot pri večkratni žetvi (10).

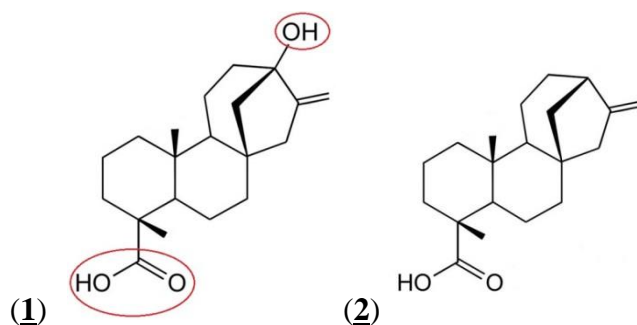
### ***1.2.1.2 RAZMERJE REBAUDIOZID A/STEVIOZID***

Poleg celokupne količine glikozidov je pomembno tudi razmerje rebaudiozid A/steviozid. Višje kot je, boljša je kvaliteta sladkega okusa. Slednjo lahko poslabša predvsem grenak priokus, ki ga ima po zaužitju steviozid. Razmerje je pomembno tudi za oceno kakovosti pridelka. Višja kot je relativna koncentracija rebaudiozida A v listih, kakovostnejši je pridelek. Z upoštevanjem tega dejstva sta Tavarinijeva in Angelinijeva zaključili, da je najboljši pridelek pridobljen v septembru, Moraesova s sodelavci pa potrdila, da je

enkratna žetev stevije primernejša kot večkratne žetve, saj daje večji in kakovostnejši pridelek (9, 10).

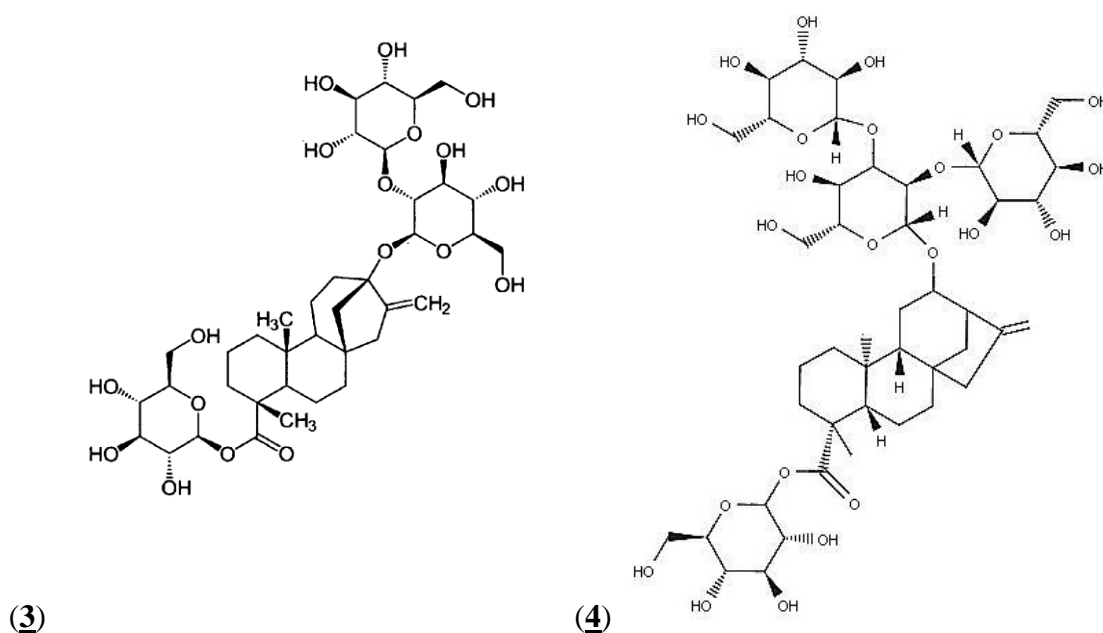
### 1.2.2 STRUKTURA

Steviolni glikozidi so tetraciklični glikozidi. Osnovna struktura je steviol (**1**) (ent-kaurenski skelet (**2**)), na katerega so preko hidroksilne in karboksilne skupine pripete različne sladkorne enote (slika 2).



Slika 2: Strukturi steviola (**1**) in ent-kaurenske kisline (**2**).

Steviozid (**3**) ima na aglikon steviol pripeto eno glukozno enoto preko estrske vezi in eno soforozno enoto (diglukoza z  $\beta$ -1,2 vezjo) preko estrske vezi. Rebaudiozid A (**4**) je produkt glukozilacije steviozida, pri čemer se glukoza veže na soforozno enoto preko  $\beta$ -1,3 glikozidne vezi (slika 3) (2).



Slika 3: Strukturi steviozida (**3**) in rebaudiozida A (**4**).

### 1.2.3 FIZIKALNE IN SENZORIČNE LASTNOSTI

Od vseh sladkih diterpenskikh glikozidov imata steviozid in rebaudiozid A najbolj opisane in raziskane fizikalne in senzorične lastnosti. Za razliko od sladkorja ne fermentirata, sta stabilna pri visoki temperaturi (do 200°C) in skozi širše pH območje (2–10), kar je velika prednost v primerjavi z mnogimi nizkokaloričnimi sladili. Rebaudiozid A je nestabilen pri dolgotrajnem izpostavljanju sončni svetlobi oz. UV sevanju. Topnost steviozida v vodi je 1 % (w/v). Zaradi dodatne glukoze je rebaudiozid A bolj polaren in zato tudi bolj topen. Vendar pa topnost v vodi ne predstavlja problema pri uporabi, saj so količine, ki se uporabljajo za slajenje živil, majhne (3, 18).

Steviozid in rebaudiozid A sta zelo sladki snovi v primerjavi s saharozo, rebaudiozid A je 350–450-krat in steviozid 250–300-krat bolj sladek kot saharoza, nekateri viri navajajo tudi manjše vrednosti, 150–320-krat za rebaudiozid A in 110–270-krat za steviozid. Njuna sladilna moč se sinergistično poveča z mešanjem z drugimi sladili (aspartam). Od vseh steviolnih glikozidov ima rebaudiozid A najbolj kvaliteten okus, ker povzroča najmanj suh, trpek in grenek okus v ustih. Da se zmanjša ta efekt, je priporočljivo, da je vsebnost rebaudiozid A vsaj 50% celokupne vsebnosti steviolnih glikozidov (1, 2, 18).

### 1.2.4 FARMAKOLOGIJA

Za zdravilne učinke stevije so vedeli že indijanci v Južni Ameriki. Tam je postala popularna v alternativni medicini in zeliščarstvu, predvsem za zdravljenje diabetesa.

Ekstrakti stevije in njeni sladki glikozidi so nekalorični, imajo visoko sladilno moč, zato je potrebna majhna količina za sladilen učinek. Zaradi teh lastnosti je primerna kot nadomestek sladkorja za diabetike in debele ljudi (19).

Steviolni glikozidi imajo širok spekter farmakoloških učinkov, predvsem antihipertenzivno, antihyperglikemično, protivnetno, antidiaroično, pa tudi protitumorno, nekariogeno in antiaterosklerozno delovanje (19, 20). Za antioksidativno delovanje pa so odgovorni polifenoli v listih (5).

### **Antihipertenzivno delovanje**

Steviozid zavira vdor kalcijevih ionov v celice gladkih mišic arteriol, kar povzroči njihovo vazodilatacijo in posledično zmanjšanje perifernega upora. Prav tako pospeši diurezo in natriurezo, kar vodi v zmanjšanje volumna krvi. Oba skupaj, zmanjšan periferni upor in zmanjšan volumen krvi, pa vplivata, da se krvni tlak zniža. Te antihipertenzivne učinke izkazujejo tudi drugi steviolni glikozidi in sam ekstrakt (19).

### **Antihyperglikemično delovanje**

Raziskave poročajo o antihyperglikemičnem delovanju steviozida in njegovih sorodnih spojin, vendar mehanizmi še niso dokončno in povsem raziskani. Domnevajo, da naj bi se raven glukoze v krvi znižala na dva načina, in sicer z zmanjšanim nastajanjem v jetrih in s povečanim privzemom v periferna tkiva. Steviozid zavira nastajanje glukoze v jetrih z zaviranjem izločanja glukagona iz  $\alpha$ -celic pankreasa, kar vpliva na glukoneogenezo in glikogenolizo, in z zmanjšanjem ekspresije genov za encim fosfoenolpiruvat-karboksikinazo, regulatorni encim pri glukoneogenezi. Po drugi strani, pa steviozid, steviol in rebaudiozid A stimulirajo privzem glukoze v periferna tkiva z delovanjem na  $\beta$ -celice pankreasa, da izloči več inzulina, in s povečano občutljivostjo perifernih tkiv na inzulin, da privzamejo več glukoze (19).

Učinki, ki vplivajo na raven glukoze v krvi in krvni tlak, se pokažejo samo takrat, ko so njune vrednosti višje od normalnih. Nasprotno pa se učinki ne pojavijo pri normotenzivnih ljudeh in ljudeh z normalnimi vrednostmi glukoze v krvi. Prav tako se ti učinki pokažejo šele pri višjih odmerkih (5–10 mg/kg telesne mase/dan izraženo kot steviol), pri nižjih vrednostih, ki so sprejemljive za dnevni vnos (pod 4 mg/kg tm/dan izraženo kot steviol), pa tega učinka ni (6, 19, 20).

### **Protivnetno delovanje**

Študije *in vivo* in *in vitro* so pokazale, da imajo glikozidi iz stevije protivnetni učinek. Tako steviozid kot tudi rebaudiozid A, rebaudiozid C in dulkozid A zavirajo vnetje kože, ki je bilo lokalno izzvano z 12-O-tetradekaniolforbol-13-acetatom. Steviozid naj bi poleg tega zaviral z lipopolisaharidi sproženo sproščanje dveh proinflammatoryh citokinov, TNF- $\alpha$  in IL-1 $\beta$ , in dušikovega oksida, le-ti pa sodelujejo pri razvoju različnih vnetnih obolenjih. Steviozid naj bi preprečil neželene učinke vnetnega odziva pri okuženih ljudeh, pri zdravih pa naj bi okreplil naravno imunost s spodbujanjem aktivnosti monocitov proti prihodnjim okužbam (19, 20).

### **Antidiaroično delovanje**

Diarejo pogosto povzročajo okužbe z bakterijami in virusi, kar lahko privede do poškodb črevesja in okvare njegovih funkcij. Vroči vodni izvlečki imajo baktericidno delovanje in zavirajo rast rotavirusov, ki so povzročitelji gastroenteritisov pri otrocih. Steviolni glikozidi vplivajo na motorično in sekrecijsko diarejo. Za slednjo je značilno, da je izločanje vode in elektrolitov večje kot njihova absorpcija. Večinoma nastane zaradi okužb z bakterijami (*Vibrio cholera*, *Escherichia coli*). Njihovi toksini posredno pospešijo aktivni transport kloridnih ionov, kar privede do pasivnega prehajanja vode in ionov v lumen tankega črevesa. Posledica je velika izguba vode in dehidracija. Steviol in nekateri njegovi analogi (dihidroizosteviol) reverzibilno zavirajo posebne kloridne kanalčke, zato je aktivni transport onemogočen, kar vodi v izgubo večje količine vode. Pri motorični diareji je opazna povečana gibljivost črevesa, kar povzroči krajše zadrževanje vsebine v njem in privede do slabše absorpcije in večje izgube tekočine. Steviozid se je izkazal kot učinkovit tudi pri tej vrsti diareje, saj zavira krčenje gladkih mišic črevesa, ki ga sproži vdor kalcijevih ionov v mišične celice (19).



## **Drugo**

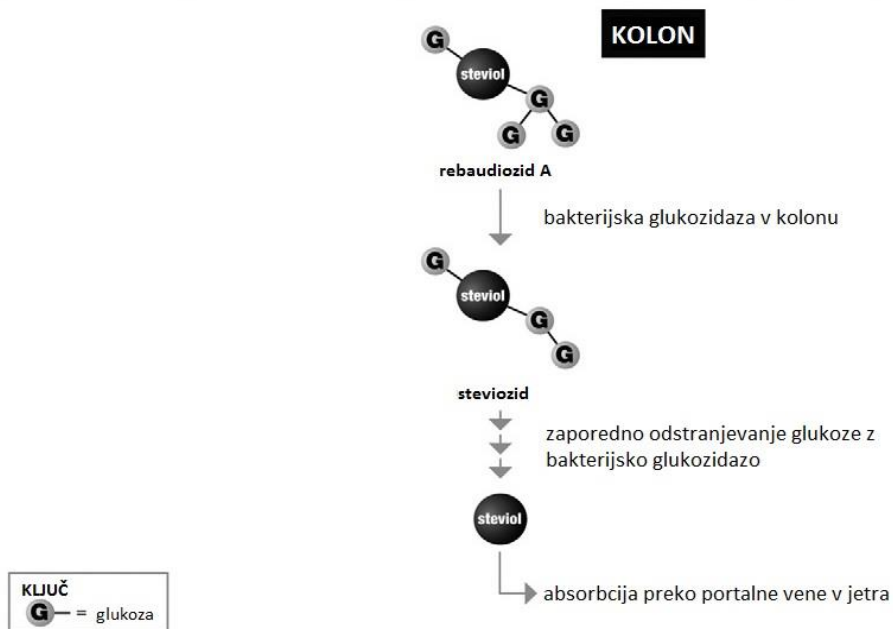
Tako kot druga sladila, imajo sladki glikozidi stevijske pomembno vlogo pri preprečevanju zobne gnilobe oziroma kariesa. Višji odmerki steviozida in izvlečka stevijske značilno zavirajo rast bakterij, kar še okrepi nekariozno delovanje (6). Imeli naj bi tudi protitumorno delovanje, saj naj bi vplivali na ključne faktorje pri razvoju rakavih obolenj. Poleg tega naj bi zmanjšali oksidativni stres in vnetje, ki sta pomembna pri razvoju ateroskleroze (19, 20). Metanolni izvlečki stevijske so pokazali izredno antioksidativno delovanje, ki ga lahko pripišemo prisotnosti flavonoidov in drugih fenolnih spojin v listih (5).

Večina raziskav je bilo narejenih na celičnih kulturah, izoliranih tkivih in testnih živalih, manj pa je bilo izvedenih raziskav na ljudeh (19). Tudi mehanizmi delovanja niso povsem pojasnjeni, kot tudi ne, ali je za določen učinek odgovorna ena spojina ali kombinacija več spojin, ali so odgovorni samo steviolni glikozidi, ali tudi drugi metaboliti v steviji, kot so  $\beta$ -karoten, riboflavin, tiamin, austroinulin, različni terpeni in flavonoidi, ki tudi izkazujejo terapevtske koristi (6).

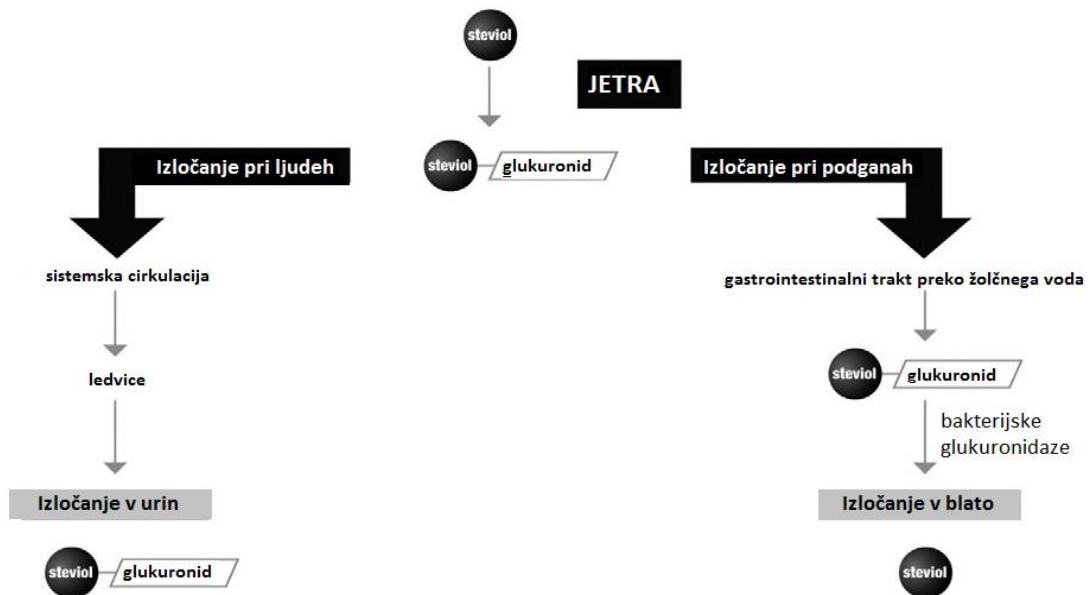
### **1.2.5 FARMAKOKINETIKA**

Steviozid in njegovi analogi imajo relativno visoko molekularno maso (>800), zaradi česar se zelo slabo ali sploh ne absorbirajo v prebavnem traktu. V bakterijski mikrofliori se pretvorijo v steviol tako, da bakterijske glukozidaze zaporedno cepijo glukozne enote, ki so pripete na aglikon steviol (slika 4). Slednji dobro prehaja skozi membrane enterocitov s pasivno difuzijo in s pomočjo membranskih prenašalcev, ter se po portalni veni prenese do jeter, kjer je podvržen nadaljnji presnovi. V študijah še ni bilo dokazano, vendar domnevajo, da naj bi v prvi fazi presnove nastali oksidirani metaboliti, nato pa naj bi se ti v drugi fazi konjugirali z glukuronsko kislino do steviol glukuronida. Absorpcija in presnova potekata pri ljudeh in živalih enako, razlike pa se pojavijo pri izločanju. *In vivo* študije na podganah so pokazale, da se steviol glukuronid izteka z žolčem v prebavni trakt in se nato izloči z blatom. Študije na ljudeh pa kažejo, da se steviol glukuronid po vstopu v sistemski krvni obtok nadalje izloči preko ledvic, nekaj malega pa se ga izloči z blatom (19, 21).

**V kolonu - razgradnja do steviola:**



**V jetrih ljudi in podgan:**



Slika 4: Presnova rebaudiozida A pri ljudeh in podganah.

## 1.2.6 ZAKONODAJA

Evropska komisija je 11. novembra 2011 sprejela uredbo št. 1131/2011, ki v Evropski skupnosti dovoljuje uporabo ekstraktov rastline *Stevia rebaudiana* oz. steviolnih glikozidov kot aditiv za živila z oznako E960 v razredu sladil.

Če so steviolni glikozidi uporabljeni v živilu, morajo biti navedeni v seznamu sestavin, prav tako je potrebno označiti embalažo z napisom »s sladilom«.

Zaradi pomanjkljivih dokazov o varnosti, uporaba v živilih ni dovoljena za sveže ali posušene dele rastlin vrst *Stevia*. Dovoljena pa je uporaba steviolnih glikozidov v velikem naboru kategorij živil: v brezalkoholnih in alkoholnih pijačah, omakah, juhah, namazih, mlečnih in finih pekovskih izdelkih (oblati za peko), ribjih proizvodih, slaščičarskih izdelkih, marmeladah, džemih, čokoladnih in kakavovih proizvodih, živilih za posebne zdravstvene ali prehranske namene, prehranskih dopolnilih in tudi kot namizna sladila (22).

## 1.2.7 VARNOST

Do sedaj so bile izvedene številne toksikološke študije, *in vitro* in *in vivo* študije na živalih in nekatere tolerančne študije na ljudeh. Na podlagi rezultatov teh študij je Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) zaključila, da steviolni glikozidi niso rakotvorni, genotoksični ali povezani z reproduktivno ali razvojno toksičnostjo. Določila je sprejemljiv dnevni odmerek, in sicer 4 mg/kg telesne mase/dan, izraženo kot steviol. Ta vrednost bi lahko bila presežena pri tistih posameznikih, ki uživajo več kategorij živil, ki vsebujejo steviolne glikozide (22, 23).

## 1.2.8 ANALITIKA

### 1.2.8.1 IZOLACIJA

Steviolne glikozide iz posušenih listov najpogosteje pridobivajo z ekstrakcijo z vročo vodo (11). Z namenom odstraniti vpliv matriksa lahko po ekstrakcijski stopnji sledi ekstrakcija na trdni fazi (angl.: *solid phase extraction* – SPE), večinoma s kartušami s C-18 polnilom (5, 11).

Da bi se izognili uporabi organskih topil (kloroform in metanol), ki jih je Makapugay uporabil pri ekstrakciji v Soxhlet aparaturi, je Kolb razvil metodo, pri kateri se kot topilo za ekstrakcijo uporablja 70 % etanol, ki ima manjši vpliv na okolje in zdravje ljudi (12).

V uporabi so tudi druge vrste ekstrakcij, ki potekajo krajši čas in pri nižjih temperaturah ter imajo boljše izkoristke. Te so vodna ekstrakcija z mikrovalovi (angl.: *microwave-assisted water*), ultrazvočna ekstrakcija (angl.: *ultrasound*), ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami (angl.: *supercritical fluid*) (5) in ekstrakcija s pomočjo encimov (angl.: *enzyme-assisted*) (2).

### **1.2.8.2 LOČITEV IN DETEKCIJA**

Najpogosteje uporabljena analitska metoda za določitev steviolnih glikozidov je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), pri kateri se za ločitev uporabljajo C-18 (24), HILIC (11) in amino (10, 11, 12) kolone. Večinoma se uporabljajo amino kolone, ki imajo visoko selektivnost za vse steviolne glikozide, vendar pa so slabo ponovljive in imajo dolg čas, potreben za vzpostavitev ravnotežja. V nasprotju z njimi so C-18 in HILIC kolone bolj robustne, vendar kažejo slabo selektivnost za ločitev rebaudiozida A in steviozida, kar pa se lahko reši z gradientno elucijo ali z uporabo dveh kolon (11). Kot mobilno fazo se uporablja mešanica vode in acetonitrila v različnih razmerjih.

Po HPLC ločitvi se za detekcijo pogosto uporablja UV detektor pri valovni dolžini 210 ali 200 nm, ki pa ima nizko občutljivost. Občutljivost se lahko poveča za faktor 3-5 z uporabo CAD (angl.: *charged aerosol detector*) ali PAD (angl.: *pulsed amperometric detector*). Izmed vseh pa ima največjo občutljivost masni spektrometer (5).

Kot druge analitske metode za določitev steviolnih glikozidov v steviji se omenjajo še kapilarna elektroforeza, bližnja infrardeča spektroskopija (6), tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti (14), tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti sklopljena z masno spektrometrijo, ki je primerna za rutinsko delo (17) in desorpcijska elektrosprej ionizacijska masna spektrometrija (angl.: *desorption electrospray ionization mass spectrometry*), ki ne zahteva predhodne priprave vzorcev (5).

## 2 NAMEN DELA

---

V prvem delu diplomske naloge bomo izvedli optimizacijo in validacijo metode za določitev dveh glavnih steviolnih glikozidov v steviji (steviozida in rebaudiozida A), ki so jo uporabili Woelwer-Rieckova in sodelavci (2010) (11). Delo bo zajemalo vodno ekstrakcijo posušenih nadzemnih delov stevije, čiščenje vzorca z ekstrakcijo na trdni fazi in nato ločevanje in določitev glikozidov stevije s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Detekcija bo potekala z detektorjem z nizom diod – DAD (angl.: *diode array detector*) v UV delu spektra.

V drugem delu diplomske naloge bomo vzorcem zeli sedmih sort stevije z različnimi kemotipi, ki so bile požete dvakrat v letu, določili vsebnost steviozida in rebaudiozida A. Ugotavljali bomo morebitne razlike v vsebnostih med poletno in jesensko žetvijo ter med različnimi kemotipi.

### 3 MATERIALI IN METODE

---

#### 3.1 MATERIALI

##### Rastlinski material

Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenje (IHPS) so bile iz semen šestih različnih sort iz Paragvaja in potaknjencev neznane sorte z zeliščnega vrta IHPS (preglednica II) vzgojene sadike, ki so bile spomladi leta 2012 posajene v vrt. Avgusta (14.8.), pred cvetenjem, in konec oktobra (24.10.) istega leta, je bilo nabranih po 10 rastlin vsake sorte (nadzemni deli). Sušene so bile dva dni pri 30–35°C v sušilnici istega inštituta. Pred ekstrakcijo smo posušene rastline zmleli in premešali, da smo dobili homogen vzorec. Za analizo smo imeli pripravljenih 14 vzorcev (7 kemotipov, 2 žetvi) uprašene droge, ki smo jih shranjevali v plastičnih vrečkah in v zamrzovalniku pri -18°C.

Preglednica II: Kemotip in izvor stevije

Kemotip	Izvor
Eirete I	Paragvaj
Eirete II	Paragvaj
Katupyry	Paragvaj
Morita A	Paragvaj
Morita B	Paragvaj
Native	Paragvaj
Neznan kemotip z zeliščnega vrta IHPS	Slovenija

##### Kemikalije

- acetonitril CHROMASOLV® za HPLC (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N), min. 99,9 %, Sigma-Aldrich (Nemčija)
- demineralizirana voda (H<sub>2</sub>O), ki zadostuje pogojem po ISO 3696:1998
- metanol CHROMASOLV® za HPLC (CH<sub>4</sub>O), min. 99,9 %, Sigma-Aldrich (Nemčija)

##### Standardi

- rebaudiozid A (C<sub>44</sub>H<sub>70</sub>O<sub>23</sub>, MM=967,03), min. 96 %, Sigma-Aldrich (Nemčija)
- steviozid (C<sub>38</sub>H<sub>60</sub>O<sub>18</sub>, MM=804,88), min. 90 %, PhytoLab (Nemčija)

### **Laboratorijski pribor**

- kartuše (angl.: *cartridges*) za ekstrakcijo na trdno fazo: DSC-18, 3 mL, 500 mg (Discovery)
- membranski filtri: 0,45  $\mu\text{m}$ ,  $\phi$  25 mm, celulozni acetat, rumeni, nesterilni (LabLogistics Group GmbH)
- polnilne pipete: 1, 2, 5 mL (Hirschmann, Assistent)
- avtomatske pipete: 1 mL (Hirschmann laborgeräte), 5 in 10 mL (Transferpette S)
- nastavki za pipete (Finntip 250, Universal)
- merilne bučke: 5, 10, 25 mL (Brand, Hirschmann)
- merilni valji: 50, 100 mL (Assistent)
- vialo: 1,5 mL, rjavo steklo (Supelco)
- steklene in plastične čaše
- steklene epruvete z zamaškom na navoj: 10 mL
- plastične kapalke
- brizga: 5 mL
- kovinski čolniček
- posodice za določanje vlage, 200 mL

### **Aparature**

- analitska tehtnica; max. 220 g, d = 0,1 mg (Sartorius)
- analitska tehtnica; max. 220 g, d = 0,001 g (Sartorius)
- HPLC kolona; Luna Silica, 250 mm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$  (Phenomenex)
- HPLC sistem (Agilent Technologies 1200 Series)
- Detektor z nizom diod (DAD) (Agilent)
- Programska oprema (Agilent Chem Station)
- centrifuga; Biofuge primo (Heraeus Instruments)
- vodna kopel, VK200 ERN (Inkolab)
- sušilnik, ST-01/02 (Instrumentaria)
- ultrazvočna kadička (Sonis)
- eksikator
- kavni mlinček (Bosch)

## 3.2 METODA DELA

### 3.2.1 PRIPRAVA EKSTRAKTA STEVIOLNIH GLIKOZIDOV IZ ZELI STEVIJE

Iz zeli stevijske smo želeli pridobiti steviolne glikozide na enostaven način, prav tako smo želeli uporabiti čim manj organskih topil, zato smo se odločili, da glikozide izoliramo po postopku opisanem v članku Woelwer-Rieckove in sod. (11). Pri tem postopku gre za ekstrakcijo steviolnih glikozidov z vodo in nato čiščenje vzorca z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) ter na koncu določitev s HPLC.

#### 3.2.1.1 EKSTRAKCIJA Z VODO

V epruveto smo natančno natehtali približno 0,25 g uprašene droge, z avtomatsko pipeto dodali 8,0 mL vode, zaprli s plastičnim pokrovčkom in pretresli. Nato smo na vodni kopeli (nastavljena temperatura 100°C) zmes segrevali 30 minut (slika 5). Po pretečenem času smo epruveto ohladili na sobno temperaturo in jo centrifugirali 15 minut pri 4000 obratih/min. Supernatant smo prenesli v 25 mL merilno bučko, usedlini pa dodali 8,0 mL vode in pretresli. Ekstrakcijo in centrifugiranje smo ponovili še dvakrat. Obakrat smo supernatant po koncu centrifugiranja dodali k prvemu v 25 mL bučki in nato dopolnili do oznake z vodo. Dobili smo raztopino, ki smo jo nadaljnje uporabili pri SPE.



Slika 5: Vodna kopel VK 200 ERN, Inkolab.



### 3.2.1.2 EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE)

SPE je izredno uporabna tehnika za ekstrakcijo komponent, koncentriranje in čiščenje vzorcev. Osnovni princip je porazdelitev ene ali več komponent med tekočo fazo (vzorcem) in trdno fazo (sorbentom). Njena uporaba je zelo razširjena zaradi številnih prednosti, ki jih ima pred ekstrakcijo tekoče/tekoče. Te so popolna fazna ločitev, boljši izkoristek ekstrakcije in uporaba manjših količin organskih topil. (25, 26).

Postopek ekstrakcije sestoji iz naslednjih stopenj: kondicioniranje kolone, odstranitev aktivacijskega topila, nanos vzorca, spiranje neželenih snovi, elucija želenih komponent.

S kondicioniranjem površine polnila (trdne faze) kolono aktiviramo, kar pomeni, da se analit bolje veže. Mi smo pri tej stopnji uporabili metanol.

Naslednji korak je odstranitev aktivacijskega topila. Največkrat to storimo s tekočino, ki ima podobno sestavo kot matriks vzorca. V našem primeru je bila to demineralizirana voda.

Sledi nanos vzorca, ki ga lahko spuščamo skozi kolono z nadtlakom ali pustimo, da prosto pada. Pri prehodu vzorca skozi kolono se bodo zelene in neželene komponente, zadržale na polnilu.

V naslednji fazi SPE spiramo kolono s primernim topilom in pri tem odstranimo neželene komponente iz polnila. V našem primeru smo uporabili vodo in nato še mešanico acetonitrila (MeCN) in vode v razmerju 2:8 (v/v).

Polnilo nato sušimo v vakuumu ali z dušikom, kar traja nekaj minut.

Zadnja faza SPE je elucija analita s polnila s primernim organskim topilom (26). Za elucijo steviolnih glikozidov smo uporabili mešanico MeCN/H<sub>2</sub>O v razmerju 8:2 (v/v).

#### **Priprava mešanice MeCN/H<sub>2</sub>O (8:2 v/v)**

Pri ekstrakciji na trdni fazi potrebujemo za zbiranje steviolnih glikozidov mešanico MeCN (80 %) in prečiščene vode (20 %). Za pripravo 100 mL mešanice smo v enem merilnem valju odmerili 80 mL MeCN in v drugem 20 mL prečiščene vode, oboje prelili v stekleno posodo z zamaškom in pretresli.

### Priprava mešanice MeCN/H<sub>2</sub>O (2:8 v/v)

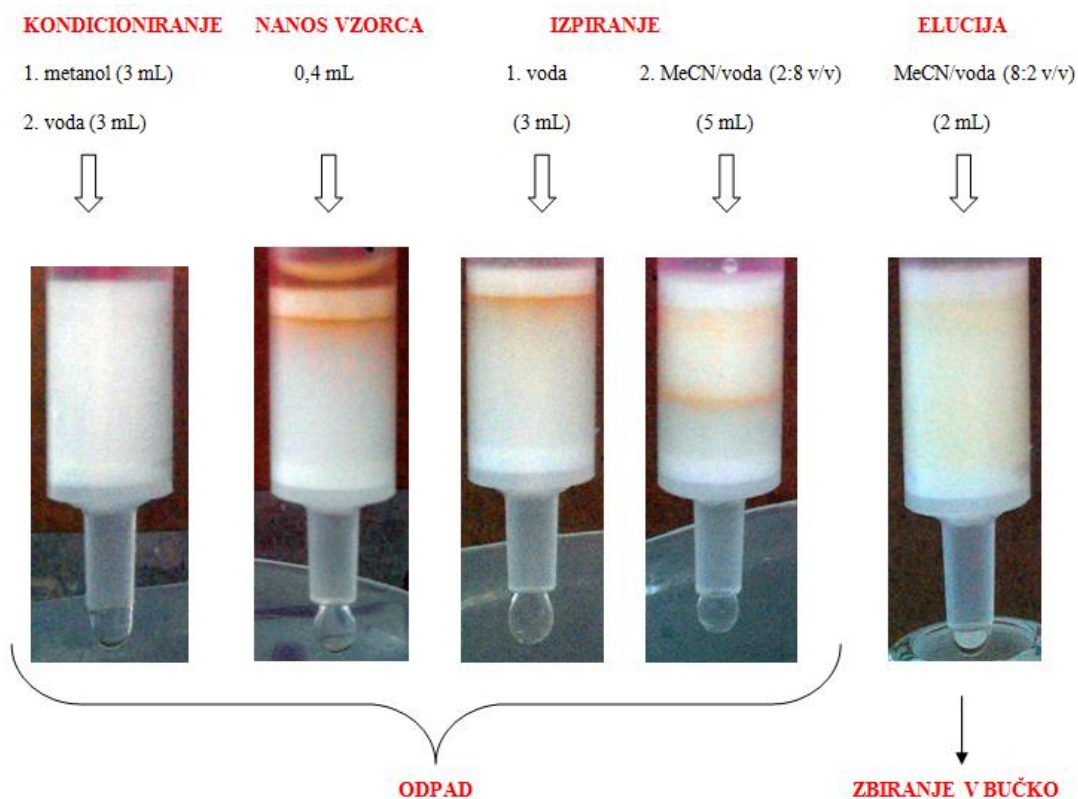
Za spiranje neželenih komponent s kolone potrebujemo mešanico MeCN in prečiščene vode v razmerju 2:8 (v/v). Za pripravo 100 mL mešanice smo v enem merilnem valju odmerili 20 mL MeCN in v drugem 80 mL prečiščene vode, oboje prelili v stekleno posodo z zamaškom in pretresli.

### Potek SPE

Za SPE smo uporabljali kartuše DSC-18 (Discovery) (slika 6), ki smo jih najprej sprali s 3 mL metanola in nato s 3 mL vode. Pazili smo, da se po aktivaciji polnilo ni posušilo, zato smo vedno pustili nekaj mm topila nad polnilom. Po aktivaciji smo nanесли 0,4 mL vzorca (raztopina iz prejšnje faze), temu je sledilo spiranje neželenih snovi s 3 mL vode in 5 mL mešanice MeCN/H<sub>2</sub>O (2:8 v/v). Po končanem spiranju smo kolono pustili sušiti na zraku 3 minute in eluat, ki se je stekal pod kolono, zavrgli. Nazadnje je sledila elucija steviolnih glikozidov z 2 mL mešanice MeCN/H<sub>2</sub>O (8:2 v/v). Spodaj pod kolono smo v 10 mL merilno bučko zbirali eluat in na koncu dopolnili do oznake z isto mešanico topil (slika 7). Pripravljeno raztopino smo filtrirali skozi 0,45 µm membranski filter, prenesli v vialo in jo shranili do analize v zamrzovalniku pri -18°C.



Slika 6: Kartuše SPE, DSC-18, 500 mg, Discovery.



Slika 7: Shematski prikaz poteka SPE in fotografije kolone v posamezni fazi ekstrakcije.

### 3.2.2 PRIPRAVA OSNOVNIH STANDARDNIH RAZTOPIN

#### Priprava osnovne standardne raztopine rebaudiozida A s koncentracijo 1 g/L

Osnovno standardno raztopino rebaudiozida A smo pripravili tako, da smo natančno natehtali približno 10 mg standarda rebaudiozida A (preglednica III). Natehto smo kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko in dopolnili do oznake z mešanico MeCN/H<sub>2</sub>O (8:2 v/v). Bučko smo za 5 min postavili v ultrazvočno kadičko, da se je rebaudiozid A popolnoma raztopil. Raztopina je bila pripravljena za nadaljnje redčenje.

**Preglednica III: Priprava osnovne standardne raztopine rebaudiozida A**

Masa (REB-A7) = 10,1 mg
Volumen (bučka) = 10 mL
Koncentracija (REB-A7) = 1010 mg/L

### **Priprava osnovne standardne raztopine steviozida s koncentracijo 0,8g/L**

Osnovno standardno raztopino steviozida smo pripravili tako, da smo natančno natehtali približno 8 mg standarda steviozida (preglednica IV). Nadalje smo postopali enako kot pri pripravi osnovne standardne raztopine rebaudiozida A.

**Preglednica IV: Priprava osnovne standardne raztopine steviozida**

Masa (STE7) = 8,4 mg
Volumen (bučka) = 10 mL
Koncentracija (STE7) = 840 mg/L

### **3.2.3 VALIDACIJSKI POSTOPKI ZA DOLOČITEV STEVIOLNIH GLIKOZIDOV**

Pred določitvijo vsebnosti steviozida in rebaudiozida A smo validirali celotno metodo, in sicer pripravo vzorca in samo kromatografsko analizo. Ker za pripravke iz stevije ni specifičnih smernic, smo se odločili, da se zgledujemo po smernicah Generalnega direktorata za zdravje in varstvo potrošnikov »Guidance document on pesticide residue analytical methods«, SANCO/825/00 rev. 8.1 (27). Določili smo naslednje parametre validacije: selektivnost, linearnost, točnost, natančnost (ponovljivost in obnovljivost) in stabilnost (obstojnost ekstrakta). Pri izvedbi validacije smo uporabili pripravljene standardne raztopine in vzorec stevije neznanega kemotipa z zeliščnega vrta IHPS, ki je bil požet v avgustu (1. žetev).

#### **3.2.3.1 DOLOČITEV SELEKTIVNOSTI**

Z določitvijo selektivnosti potrdimo, da nobena druga komponenta (drug analit, nečistote, razpadni produkti) v vzorcu ne moti oz. prekriva našega iskanega analita (28).

Po postopku opisanem v poglavju 3.2.2 smo pripravili osnovni standardni raztopini steviozida (0,8 g/L) in rebaudiozida A (1 g/L). Mešanico standardov smo pripravili tako, da smo v 10 mL bučko odpipetirali 0,5 mL osnovne raztopine vsakega standarda in dopolnili do oznake z mešanico MeCN/H<sub>2</sub>O (8:2 v/v). Vzorčno raztopino smo pripravili v skladu s postopkom za pripravo ekstrakta steviolnih glikozidov (priprava v poglavju 3.2.1).

Vse pripravljene raztopine smo prefiltrirali skozi 0,45 µm filter v vialo, injicirali in posneli kromatograme.

### 3.2.3.2 DOLOČITEV LINEARNOSTI

Analizni postopek mora biti sposoben dajati rezultate, ki so neposredno sorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Parameter, ki nam da to informacijo je linearnost, ki jo določimo z merjenjem raztopin standardov v različnih koncentracijah po celotnem delovnem območju. Kot rezultat podamo enačbo linearne regresije in determinacijski koeficient ( $R^2$ ). Za potrditev linearnosti metode v delovnem območju, mora biti vrednost determinacijskega koeficienta večja ali enaka 0,99. Prav tako moramo linearnost preveriti z risanjem umeritvene krivulje, ki ponazarja odvisnost merjene količine od koncentracije analita (28).

Za določitev linearnosti v območju koncentracij od 5 mg/L do 100 mg/L, smo z redčenjem osnovne standardne raztopine (postopek opisan v poglavju 3.2.2) pripravili šest različnih koncentracij standarda, kot prikazujeta preglednica V za rebaudiozid A in preglednica VI za steviozid.

Vsako bučko smo na koncu dopolnili do oznake z mešanico MeCN/H<sub>2</sub>O (8:2 v/v), prefiltrirali skozi 0,45 µm filter v vialo, injicirali in posneli kromatograme.

**Preglednica V: Prikaz priprave standardnih raztopin rebaudiozida A (REB-A) za določanje linearnosti**

Standard	Volumen REB-A [mL]				Volumen bučke [mL]	Koncentracija standarda [mg/L]
	REB-A7	REB-A6	REB-A3	REB-A2		
REB-A1				5	10	5,1
REB-A2			5		10	10,1
REB-A3		2			10	20,2
REB-A4	0,4				10	40,4
REB-A5	0,6				10	60,6
REB-A6	1				10	101,0

Preglednica VI: Prikaz priprave standardnih raztopin steviozida (STE) za določanje linearnosti

Standard	Volumen STE [mL]					Volumen bučke [mL]	Koncentracija standarda [mg/L]
	STE7	STE6	STE5	STE3	STE2		
STE1					5	10	6,3
STE2				5		10	12,6
STE3			5			10	25,2
STE4	0,5					10	42,0
STE5		5				10	50,4
STE6	3					25	100,8

### 3.2.3.3 DOLOČITEV NATANČNOSTI METODE (PONOVLJIVOST, OBNOVLJIVOST)

Natančnost metode nam pove, kakšna je medsebojna skladnost rezultatov v seriji meritev, ki smo jih dobili z večkratnim analiziranjem istega vzorca pod istimi pogoji. Podamo jo kot standardni odklon (s) ali kot relativni standardni odklon (RSD) (28).

Natančnost metode podajamo kot:

- ponovljivost (angl.: *repeatability*), ki je natančnost rezultatov, ki jih dobimo pri uporabi določene metode, izvedene znotraj kratkega časovnega obdobja in pri ponovljivih pogojih (ista metoda in vzorec, isti analitik, isti laboratorij in oprema).
- obnovljivost (angl.: *reproducibility*), ki je natančnost rezultatov, ki jih dobimo pri različnih pogojih (različni analitiki, različni dnevi analize, različni laboratoriji in oprema), vendar uporabimo isto metodo in isti vzorec (26).

Ponovljivost metode (ekstrakcija in kromatografija) smo preverili s šestimi ponovitvami istega vzorca, tako da smo pripravili šest ekstraktov steviolnih glikozidov po postopku opisanem v poglavju (3.2.1) ter posneli kromatograme. Rezultate smo podali kot povprečno vrednost meritev, standardni odklon in RSD. Naslednji dan smo po isti metodi in z istim vzorcem pripravili še šest ekstraktov in jih analizirali. Za vrednotenje obnovljivosti smo primerjali rezultate med prvim in drugim dnem in jo ovrednotili s statističnimi testi (F- in t-test).

#### **3.2.3.4 DOLOČITEV PRAVILNOSTI OZ. TOČNOSTI METODE**

Pravilnost oz. točnost nam pove, ali nam daje določena analitska metoda pravilne (točne) rezultate. Določimo jo lahko s primerjanjem rezultatov z referenčnim standardom, ki nima sistemske napake, ali z metodo standardnih dodatkov, kjer vzorcu dodajamo standard z znano koncentracijo. Rezultat podamo kot odstotek (%) izkoristka analita (28).

Točnost smo določili tako, da smo vzorcu (0,25 mg uprašene droge) dodali standardno raztopino rebaudiozida A s koncentracijo 5,12 mg/mL, pripravljeno tako, da smo v 10 mL bučko natehtali 51,2 mg standarda in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

Pred ekstrakcijo smo v pet epruвет natehtali vzorec in dodali prečiščeno vodo (8 mL). K trem vzorcem smo dodali 0,5 mL pripravljene raztopine standarda, dva vzorca sta služila kot kontrola. Nato smo izvedli ekstrakcijo po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.1 in na koncu posneli kromatograme.

#### **3.2.3.5 DOLOČITEV STABILNOSTI EKSTRAKTA STEVIOLNIH GLIKOZIDOV**

Priprava ekstraktov je najdalgotrajnejši postopek pri določevanju steviolnih glikozidov, prav tako ne moremo naenkrat pripraviti večjega števila ekstraktov, ki jih potem analiziramo s HPLC. Zato je zelo pomembno, da ugotovimo, kakšna je stabilnost glikozidov skozi daljše časovno obdobje ob primernem shranjevanju.

V ta namen smo pripravili dva ekstrakta steviolnih glikozidov (priprava v poglavju 3.2.1), ki smo ju shranjevali pri različnih temperaturah. Enega smo shranjevali v hladilniku pri 4°C in ga merili 4 krat v 69 dneh (1., 7., 48. in 69. dan), drugega smo postavili na sobno temperaturo, zaščitenega pred svetlobo in ga merili skupaj s prejšnjim vzorcem.

#### **3.2.4 DOLOČITEV VLAGE**

Prazno aluminijasto posodo za določevanje vlage smo stehtali ( $m_0$ ), vanjo natehtali približno 4 g vzorca in ponovno stehtali ( $m_1$ ), dali v sušilnik in sušili 4 ure pri 110°C. Po koncu sušenja smo posodo pokrili in ohladili v eksikatorju ter nato ponovno stehtali ( $m_2$ ).

Delež vode v posušeni zeli stevije smo izračunali po enačbi 1:

$$w [\%] \text{vlage} = \frac{(m_1 - m_0) - (m_2 - m_0)}{m_1 - m_0} \times 100 = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (\text{Enačba 1})$$

Legenda: w (vlaga) – delež vode v drogi,  $m_0$  - masa posodice za določevanje vlage (g),  $m_1$  - masa vzorca pred sušenjem + masa posodice (g),  $m_2$  - masa vzorca po sušenju + masa posodice (g)

### 3.2.5 KROMATOGRAFSKA ANALIZA

Steviolne glikozide smo določili na HPLC sistemu (Agilent Technologies 1200 Series) (slika 8), v katerega smo vstavili kolono z vgrajeno predkolono (Phenomenex Luna Silica, 250 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m). Valovno dolžino DAD detektorja smo nastavili na 210 nm. Gradientna elucija je potekala po programu, ki je prikazan v preglednici VII, pri temperaturi 36°C. Mobilna faza A je bila demineralizirana voda, B pa acetonitril. Pretok smo naravnali na 1,0 mL/min, injiciranje na 30  $\mu$ L. Pred injiciranjem smo kolono spirali z mobilno fazo vsaj pol ure. Na začetku smo injicirali raztopine standardov, nato še raztopine vzorcev. Po končani analizi smo spirali kolono še eno uro z mobilno fazo. Iz dobljenih kromatogramov smo nato določili površine vrhov steviozida in rebaudiozida A.

Preglednica VII: Program gradientne elucije

Čas [min]	Mobilna faza A (H <sub>2</sub> O) [%]	Mobilna faza B (MeCN) [%]
0	20	80
7	0	100
7,01	20	80
8	20	80





**Slika 8: HPLC sistem Agilent Technologies 1200 Series.**

### 3.2.6 IZRAČUN VSEBNOSTI STEVIOLNIH GLIKOZIDOV V ZELI STEVIJE

Vsebnost steviolnih glikozidov v zeli stevije smo izračunali po enačbi 2:

$$w(SG) \left[ \frac{mg}{g} \right] = \frac{c_{st} \times A_x}{A_{st} \times m_{vz}} \times V \times \frac{25}{0,4} \quad (\text{Enačba 2})$$

Legenda:  $w(SG)$  [mg/g] – delež steviolnega glikozida v drogi,  $c_{st}$  - koncentracija standarda (mg/mL),  $A_x$  - površina vrha analita na kromatogramu ekstrakta steviolnih glikozidov,  $A_{st}$  - površina vrha analita na kromatogramu standardne raztopine,  $m_{vz}$  - natehta vzorca v epruveto (g),  $V$  - volumen bučke, v kateri smo zbirali končno frakcijo pri ekstrakciji na trdni fazi (mL), 25/0,4 – redčitev

Pred vsako analizo vzorcev smo posneli kromatogram mešanice obeh standardov in jima določili površini vrhov ( $A_{st}$ ), ki smo ju potem uporabili pri izračunu vsebnosti.

Pri validaciji metode (poglavje 4.2) smo to enačbo uporabili za izračun rezultatov, ki smo jih podali v mg/g (mg določenega steviolnega glikozida v g droge).

Pri analizi vzorcev (poglavje 4.3) smo za lažjo primerjavo rezultate podali v g/100 g droge ter pri izračunu upoštevali še delež vlage v posameznem vzorcu, tako da so rezultati podani na suho snov.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

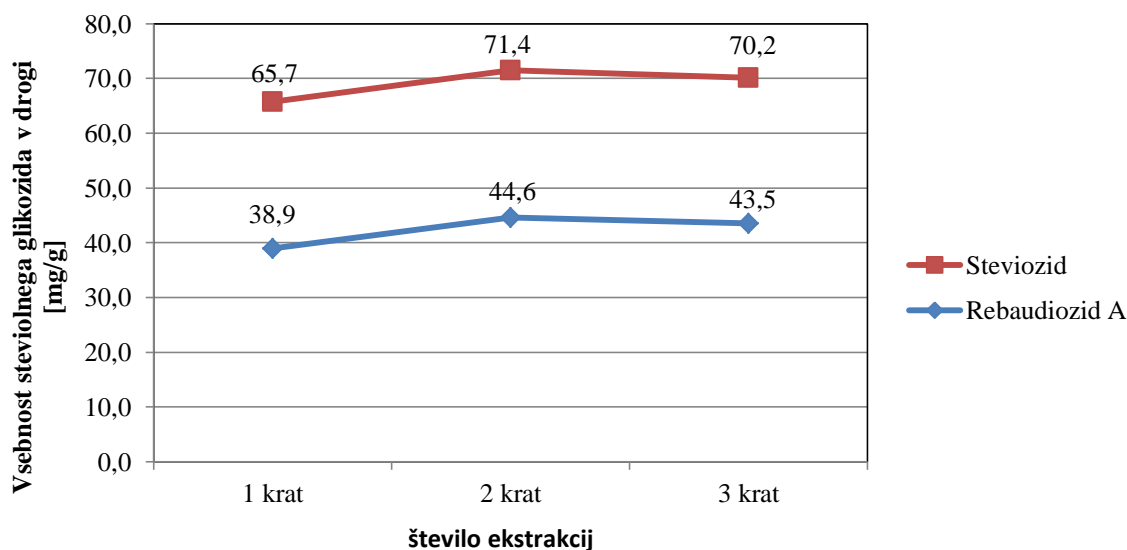
---

### 4.1 POSKUS OPTIMIZACIJE METODE

#### Vpliv časa ekstrakcije

Ozko grlo metode je ravno ekstrakcija z vodo, saj tu porabimo največ časa. Za trikratno ponovitev ekstrakcije potrebujemo eno uro in pol (ena ponovitev traja pol ure), poleg tega vsaki ponovitvi ekstrakcije sledi centrifugiranje in zbiranje steviolnih glikozidov v bučki, kar še podaljša ta postopek.

Hoteli smo preveriti, ali bi lahko izvedli ekstrakcijo samo v dveh ali pa celo v eni ponovitvi. Slika 9 prikazuje določitev vsebnost rebaudiozida A in steviozida v zeli stevije enkratni, dvakratni in trikratni ekstrakciji droge.



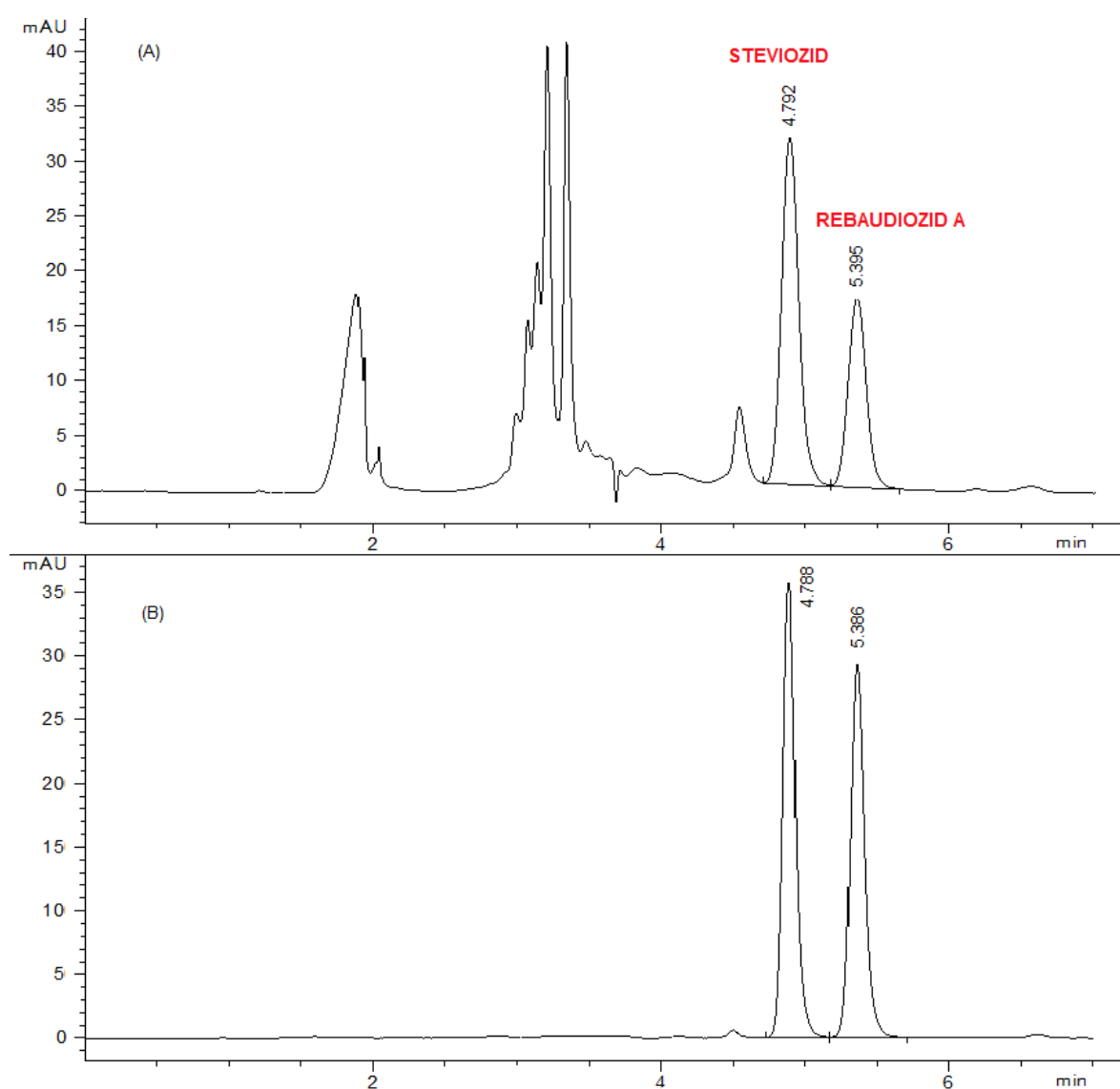
Slika 9: Vpliv števila ekstrakcij na rezultat analize vsebnosti rebaudiozida A in steviozida v drogi (temperatura 100°C, čas ene ekstrakcije 30 min).

Predvidevali smo, da se bo vsebnost povečevala s številom ekstrakcij, vendar je bila najvišja vsebnost po dveh ponovitvah, po treh pa se je znižala. Ker nismo našli vzroka za to znižanje, prav tako je bila razlika zelo majhna (manj kot 3%), smo se odločili, da vseeno izvedemo ekstrakcijo v treh ponovitvah, kot je opisano v članku, po katerem smo prevzeli metodo (11).

## 4.2 VALIDACIJA

### 4.2.1 SELEKTIVNOST

Pred analizo vzorcev smo najprej analizirali vsak standard posebej. Osnovnima standardnima raztopinama steviozida in rebaudiozida A (priprava v poglavju 3.2.2) smo posneli kromatograme in določili retencijska časa ( $t_r$ ) za steviozid –  $t_r = 4,8$  in za rebaudiozid A –  $t_r = 5,4$ . Nato smo posneli še kromatogram mešanice standardov (priprava v poglavju 3.2.3.1) ter videli, ali se ujemajo  $t_r$  posameznega analita.



Slika 10: Kromatogram ekstrakta steviolnih glikozidov (vzorec neznane sorte z zeliščnega vrta IHPS, 1. žetev) (A) in standardnih raztopin rebaudiozida A in steviozida (B).

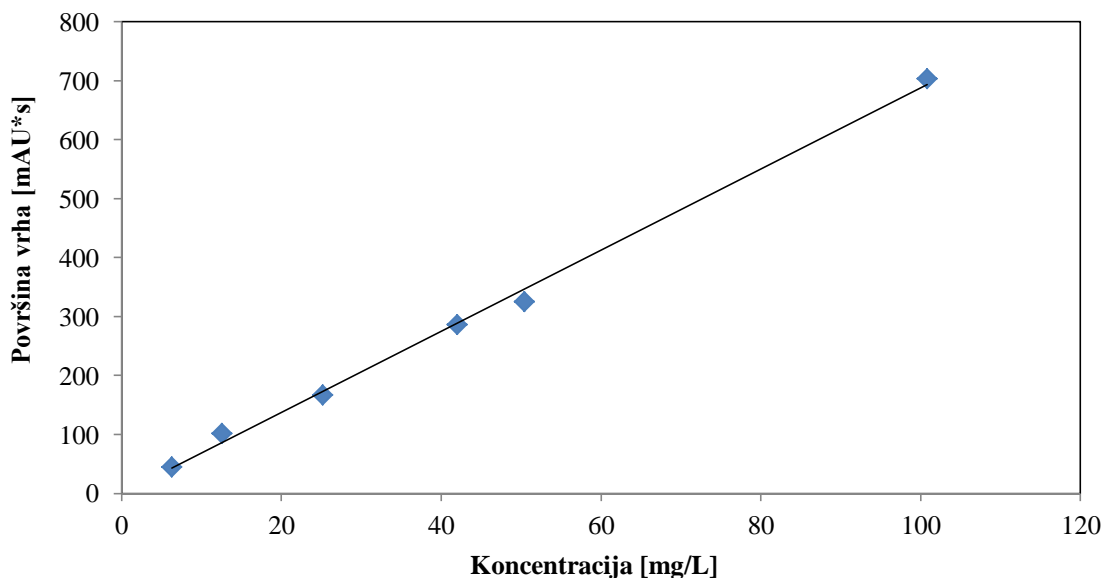
Na sliki 10 B vidimo, da se vrhova obeh standardov dobro ločita na bazni liniji.

Nadalje smo posneli kromatogram naključnemu vzorcu (slika 10 A), ter ugotovili, da se retencijska časa rebaudiozida A in steviozida v kromatogramu vzorca ujemata z retencijskima časoma v kromatogramu mešanice standardov. Prav tako lahko vidimo, da se vrhovi iskanih analitov ne prekrivajo z vrhovi matriksa (ostalimi spojinami v vzorcu).

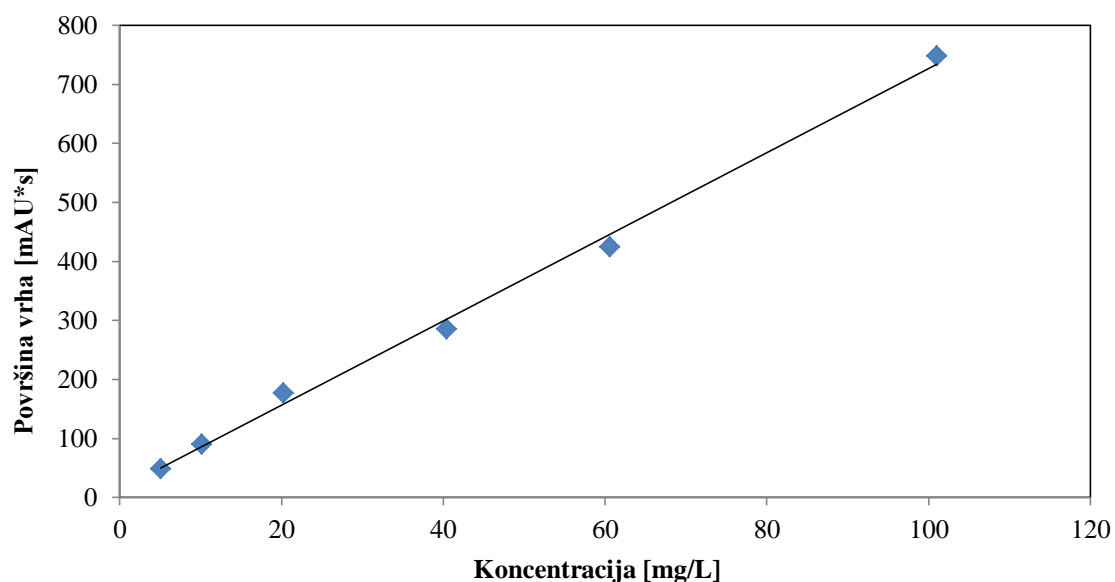
Na podlagi teh ugotovitev, lahko domnevamo, da je metoda selektivna.

#### 4.2.2 LINEARNOST

Linearnost metode smo preverjali na območju med 5 mg/L in 100 mg/L, s šestimi različnimi koncentracijami rebaudiozida A in steviozida, ki smo jih pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.3.2. Za vsak analit smo z uporabo povprečnih površin kromatografskih vrhov, dobljenih po dveh injiciranjih, narisali umeritveno premico (slika 11 in slika 12). Linearnost smo vrednotili s pomočjo vizualne ocene premice, enačbe umeritvene krivulje in z determinacijskim koeficientom ( $R^2$ ) (preglednica VIII).



Slika 11: Umeritvena krivulja standarda steviozida.



Slika 12: Umeritvena krivulja standarda rebaudiozida A.

Preglednica VIII: Enačba linearne regresije in  $R^2$  za steviozid in rebaudiozid A

	Naklon	Presečišče [mAU*s]	$R^2$
Steviozid	6,8851	-0,571	0,9971
Rebaudiozid A	7,1276	14,161	0,9962

Na podlagi dobljenih determinacijskih koeficientov (preglednica VIII), ki ustrezata zahtevi  $R^2 \geq 0,99$ , lahko potrdimo, da je metoda linearna po celotnem delovnem območju (za steviozid 6,3–100,8 mg/L in za rebaudiozid A 5,1–101,0 mg/L), kar je razvidno tudi iz grafičnega prikaza umeritvene krivulje posameznega analita (slika 11 in slika 12).

### 4.2.3 NATANČNOST

Pri nadaljnem delu smo želeli ugotoviti, ali so dobljeni rezultati istega vzorca med sabo primerljivi oziroma, da med njimi ni prevelikih odstopanj. V ta namen smo za vrednotenje ponovljivosti in obnovljivosti metode pripravili vzorce in jih analizirali, kot je opisano v poglavju 3.2.3.3. Dobljeni rezultati so prikazani v preglednicah IX – XI.

#### Ponovljivost

Najprej smo s pomočjo Dixonovega Q-testa iskali morebitno zunaj ležečo meritev. Test je pokazal, da v nobeni skupini meritev ni ubežnikov. Zato smo vse meritve vključili v nadaljnjo statistično obdelavo.

Za ugotavljanje ponovljivosti smo določili povprečne vrednosti, standardni odklon in RSD za vsak dan in za vsak analit posebej.

**Preglednica IX: Ponovljivost 1. dan**

n	Steviozid [mg/g]	Rebaudiozid A [mg/g]
1	78,4	44,2
2	80,6	44,8
3	71,1	37,1
4	67,1	39,1
5	81,2	47,0
6	67,4	37,0
$\bar{x}$	74,3	41,5
s	6,6	4,3
RSD	8,8	10,4

**Preglednica X: Ponovljivost 2. dan**

n	Steviozid [mg/g]	Rebaudiozid A [mg/g]
1	80,5	40,5
2	91,7	48,5
3	72,4	41,8
4	67,4	40,5
5	69,6	36,9
6	90,8	52,0
$\bar{x}$	78,7	43,4
s	10,7	5,7
RSD	13,5	13,1

Legenda: n - zaporedje meritev,  $\bar{x}$  - povprečje meritev, s - standardni odklon meritev, RSD - relativni standardni odklon (%)

Predhodno smo kot kriterij ustrezne ponovljivosti določili  $RSD \leq 15\%$ . Prvi dan sta bili vrednosti RSD 8,8 % za steviozid in 10,4 % za rebaudiozid A, drugi dan so bile vrednosti malo višje, in sicer 13,5 in 13,1 %. Na podlagi teh rezultatov, lahko povzamemo, da so meritve znotraj posameznih skupin primerljive in da povprečni relativni standardni odmik ni večji kot 15 %.

### Obnovljivost

Nadalje smo ovrednotili obnovljivost s t-testom za primerjavo povprečij meritev prvega in drugega dne.

Pred uporabo t-testa uporabimo F-test, s katerim ugotovljamo, ali sta standardna odklona dveh skupin meritev primerljiva ali ne. Kadar je izračunana vrednost F-testa večja kot tabelarična F vrednost ( $F_{\text{izrač}} > F_{\text{tab}}$ ), takrat standardna odklona NISTA primerljiva in izračunamo t vrednost po enačbi 3. Če je ravno obratno ( $F_{\text{izrač}} < F_{\text{tab}}$ ), standardna odklona STA primerljiva, izračunamo t vrednost po enačbi 4 in skupni standardni odklon po enačbi 5 (29).

$$t_{\text{izrač}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{Enačba 3})$$

$$t_{\text{izrač}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{\text{skupni}} \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (\text{Enačba 4})$$

$$s_{\text{skupni}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (\text{Enačba 5})$$

Legenda:  $\bar{x}_i$  – povprečje skupine meritev,  $s_i$  – standardni odklon skupine meritev,  $n_i$  – število meritev,  $s_{\text{skupni}}$  – skupni standardni odklon

Rezultati v preglednici XI kažejo, da sta obe vrednosti  $F_{\text{izrač}}$  (tako za steviozid kot za rebaudiozid A) manjši kot vrednosti  $F_{\text{tab}}$ . To pomeni, da sta standardna odklona obeh skupin meritev primerljiva in za izračun t vrednosti uporabimo enačbo 4. Ta nam da rezultat  $t_{\text{izrač}}$  za steviozid 0,87 in za rebaudiozid A 0,63. Tabelarična t vrednost znaša 2,23, zato velja  $t_{\text{izrač}} < t_{\text{tab}}$ . To pomeni, da sta povprečji obeh skupin meritev primerljivi.

Zato lahko sklenemo, da med meritvami prvega dne in meritvami drugega dne za steviozid in rebaudiozid A ni statistično značilnih razlik.

**Preglednica XI: Obnovljivost**

	Steviozid [mg/g]		Rebaudiozid A [mg/g]	
	1. dan	2. dan	1. dan	2. dan
$\bar{x}_i$	74,3	78,7	41,5	43,4
$s_i$	6,6	10,7	4,3	5,7
$F_{izrač}$	2,64		1,72	
$F_{tab}$	5,82		5,82	
$s_{skupni}$	8,8		5,0	
$t_{izrač}$	0,87		0,63	
$t_{tab}$	2,23		2,23	

Legenda:  $\bar{x}_i$  – povprečje skupine meritev,  $s_i$  - standardni odklon skupine meritev,  $F_{izrač}$  - izračunana F vrednost,  $F_{tab}$  - tabelarična F vrednost pri 95 % stopnji zaupanja,  $s_{skupni}$  - skupni standardni odklon,  $t_{izrač}$  - izračunana t vrednost,  $t_{tab}$  - tabelarična t vrednost pri 95% stopnji zaupanja

Ker ni značilnih razlik med meritvami izvedenih v obeh dnevih, smo izračunali skupno povprečje ter določili standardni odklon in RSD za steviozid in rebaudiozid A, kar je prikazano v preglednici XII.

**Preglednica XII: Skupno povprečje, standardni odklon in relativni standardni odklon (RSD) za steviozid in rebaudiozid A (izračunano iz meritev obeh dni)**

Steviolni glikozid	Število meritev	Povprečje [mg/g]	Standardni odklon [mg/g]	RSD [%]
Steviozid	12	76,5	8,7	11,4
Rebaudiozid A	12	42,5	4,9	11,5

#### 4.2.4 PRAVILNOST OZ. TOČNOST – DOLOČANJE IZKORISTKA

Točnost smo določali z ovrednotenjem izkoristka in RSD. Izkoristek smo določili s pomočjo dodatka standardne raztopine rebaudiozida A. Za steviozid točnosti nismo določali, ker smo imeli na razpolago premajhno količino standarda.

Najprej smo posneli kromatograma za kontrolna vzorca, izmerili površini vrhov za rebaudiozid A, izračunali vsebnost v vzorcih (3.2.6) in nato podali rezultat kot povprečje vsebnosti v obeh kontrolnih vzorcih (Brez STD). Enako smo izračunali še vsebnost v



vzorcih, ki smo jim dodali raztopino standarda z znano koncentracijo (STD 1, STD 2, STD 3). Rezultati so predstavljeni v preglednici XIII.

Delež dodanega rebaudiozida A v vzorcu smo izračunali kot prikazuje enačba 6.

$$w \left[ \frac{mg}{g} \right] = \frac{c_{st}}{m_{vz}} \times V_{st} = \frac{5,12 \frac{mg}{mL}}{0,25 g} \times 0,5 mL = 10,24 \frac{mg}{g} \quad (\text{Enačba 6})$$

Legenda: w - delež standarda rebaudiozida A glede na količino vzorca,  $c_{st}$  - koncentracija standarda rebaudiozida A (mg/mL),  $m_{vz}$  - natehta vzorca v epruveto (g),  $V_{st}$  - volumen dodanega standarda rebaudiozida A k vzorcu (mL)

**Preglednica XIII: Določanje izkoristka z dodatkom standarda (STD) rebaudiozida A**

n	Dodatek standarda [mg/g]	Izmerjena vrednost [mg/g]	Izkoristek [%]
Brez STD	0	38,2	
STD 1	10,24	52,7	108,8
STD 2	10,24	46,2	95,4
STD 3	10,24	49,2	101,6
$\bar{x}$			101,9
s			6,7
RSD			6,6

Legenda: n - zaporedje meritev,  $\bar{x}$  - povprečje izkoristkov, s - standardni odklon, RSD - relativni standardni odklon (%)

Vse izkoristke smo izračunali kot prikazuje enačba 7:

$$\text{Izkoristek}[\%] = \frac{52,7}{10,24+38,2} \times 100 \% = 108,8 \% \quad (\text{Enačba 7})$$

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da daje ta metoda visoke izkoristke s povprečjem  $101,9 \pm 6,7$  %. Ti rezultati so primerljivi z rezultati v članku, po katerem smo povzeli metodo (11), kjer znaša izkoristek za steviozid  $99 \pm 4,4$  % in za rebaudiozid A  $100 \pm 5,0$  %.

Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da pri tej metodi ne pride do bistvenih izgub rebaudiozida A in da bi podobne rezultate dobili tudi za steviozid, saj imata oba podobni strukturi in lastnosti.

#### 4.2.5 STABILNOST

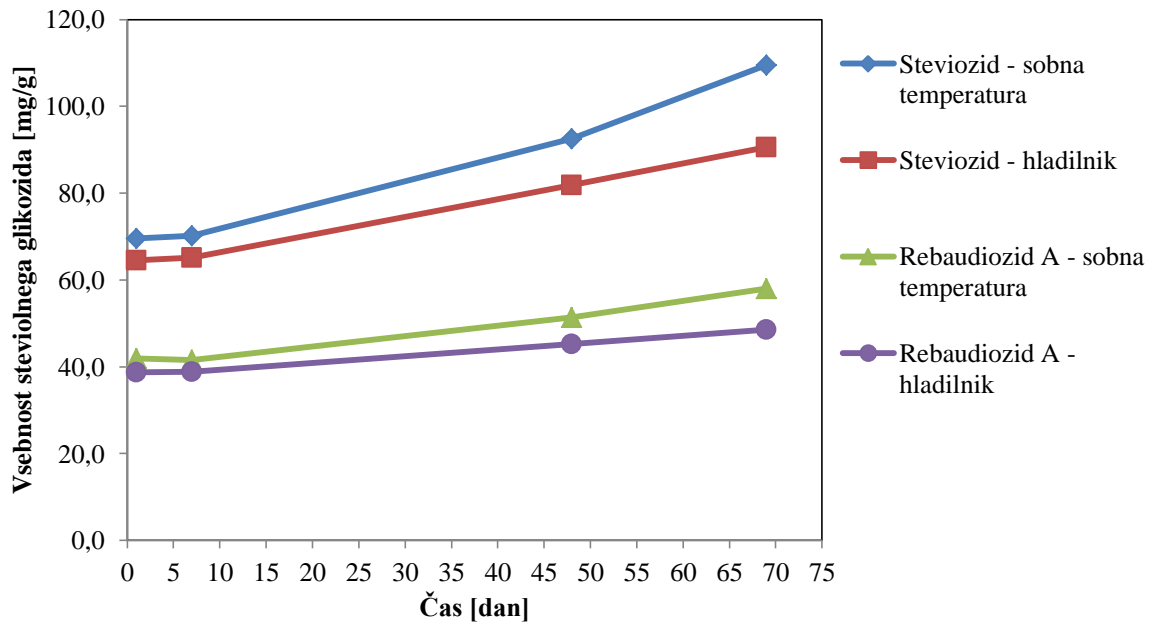
Stabilnost ekstrakta steviolnih glikozidov smo preverjali skozi daljše časovno obdobje (69 dni) in pri dveh različnih temperaturah (na sobni temperaturi – pribl. 20°C in v hladilniku – 4°C). Rezultati so prikazani v preglednici XIV.

**Preglednica XIV: Vrednosti steviolnih glikozidov v ekstraktu, hranjenega v hladilniku pri 4°C in na sobni temperaturi, v viali**

Dan merjenja	Steviozid [mg/g]		Rebaudiozid A [mg/g]	
	Hladilnik	Sobna temperatura	Hladilnik	Sobna temperatura
1	64,6	69,6	38,7	41,9
7	65,2	70,2	38,9	41,6
48	81,9	92,6	45,2	51,4
69	90,7	109,6	48,5	58,0

Grafični prikaz (slika 13) kaže, da je bila vsebnost steviozida in rebaudiozida A po enem tednu skoraj enaka (manj kot 2% odstopanje) oz. ni odstopala za več kot 11 % kot znaša RSD določen v poglavju Natančnost (4.2.3. – preglednica XII). V nadaljnjih dneh je vsebnost konstantno naraščala, vendar v vzorcu hranjenem na sobni temperaturi bolj kot v vzorcu v hladilniku. Vzrok za ta porast je najverjetneje koncentriranje ekstrakta zaradi uhajanja topila (acetonitrila) iz vial, potem ko jo je pri injiciranju prebodla igla.

Zato je priporočljivo analizo HPLC opraviti v enem tednu po pripravi vzorcev in do takrat shranjevati v hladilniku v primerni ovojnini, iz katere ne uhaja topilo.



Slika 13: Grafični prikaz vsebnosti steviolnih glikozidov v ekstraktu, hranjenega v hladilniku pri 4°C in na sobni temperaturi, v viali.

Pri določanju parametrov validacije metode dobljeni rezultati ustrezajo postavljenim kriterijem, zato lahko rečemo, da je metoda primerna za določitev steviozida in rebaudiozida A v posušeni zeli stevije.

### 4.3 STEVIOLNI GLIKOZIDI V ZELI STEVIJE

Vsak vzorec smo pripravili v dveh ponovitvah (paralelkah), izračunali vsebnost posameznega glikozida (3.2.6) ter kot rezultat podali povprečje obeh ponovitev. Z upoštevanjem deleža vlage v drogi smo preračunali vsebnosti na suho snov. Vsi dobljeni rezultati so predstavljeni v preglednici XV.

**Preglednica XV: Vsebnost rebaudiozida A, steviozida in skupna vsebnost v zeli steviije v posameznem vzorcu, preračunana na suho snov, odstotek vlage**

Kemotip	Rebaudiozid A [g/100g]	Steviozid [g/100g]	Skupna vsebnost [g/100g]	Vlaga [%]
<b>14. avgust – 1. žetev</b>				
Eirete I	3,13 ± 0,08	6,12 ± 0,21	9,25	9,45
Eirete II	3,31 ± 0,06	7,61 ± 0,04	10,92	9,28
Katupyry	2,46 ± 0,11	6,26 ± 0,28	8,72	9,78
Morita A	3,35 ± 0,05	6,56 ± 0,04	9,90	9,65
Morita B	2,94 ± 0,08	7,14 ± 0,28	10,08	8,87
Native	2,59 ± 0,12	5,81 ± 0,37	8,40	9,67
IHPS	4,64 ± 0,18	8,05 ± 0,13	12,69	8,74
<b>28. oktober – 2. žetev</b>				
Eirete I	0,84 ± 0,05	2,22 ± 0,15	3,05	7,55
Eirete II	0,82 ± 0,01	2,79 ± 0,09	3,60	8,43
Katupyry	0,81 ± 0,07	3,12 ± 0,26	3,93	8,35
Morita A	0,89 ± 0,00	2,86 ± 0,04	3,74	8,79
Morita B	0,78 ± 0,02	2,44 ± 0,05	3,21	7,96
Native	0,63 ± 0,05	2,89 ± 0,02	3,52	8,73
IHPS	2,08 ± 0,04	3,94 ± 0,06	6,02	8,54

Delež steviozida v zeli steviije požeti v avgustu se giblje med 5,81 in 8,05 g/100g. Pri rebaudiozidu A so vrednosti od 2,46 do 4,64 g/100g. Vrednosti iz oktobrske žetve so nižje, in sicer za steviozid med 2,22 in 3,94 g/100g, za rebaudiozid A pa od 0,63 do 2,08 g/100g.

#### 4.3.1 UGOTAVLJANJE RAZLIK MED ŽETVAMA

Že pri hitri oceni rezultatov iz preglednice XV smo opazili, da so vsebnosti steviozida in rebaudiozida A precej višje v prvi žetvi kot v drugi žetvi.

Da bi preverili, ali je ta razlika statistično značilna, smo uporabili t-test, s katerim smo parno primerjali rezultate vzorcev. Pri 95% stopnji zaupanja smo preizkušali naslednjo hipotezo:

$H_0$ : Med vzorci prve in vzorci druge žetve NI razlik glede vsebnosti steviolnih glikozidov.

Alternativna hipoteza pravi, da SO razlike med vzorci, ki jih primerjamo.

Vrednost t-testa smo izračunali po enačbi 8:

$$t_{izrač} = \frac{\bar{d}}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}} \quad (\text{Enačba 8})$$

Legenda:  $t_{izrač}$  – izračunana vrednost parnega t-testa,  $\bar{d}$  - povprečje razlik med vrednostmi prve in druge žetve,  $s_d$  – standardni odklon razlik med vrednostmi prve in druge žetve,  $n$  – število razlik

**Preglednica XVI: Parni t-test za ugotavljanje razlik med žetvama (vsi kemotipi)**

Kemotip	Rebaudiozid A [g/100g]			Steviozid [g/100g]		
	1. žetev	2. žetev	d	1. žetev	2. žetev	d
Eirete I	3,13	0,84	2,29	6,12	2,22	3,91
Eirete II	3,31	0,82	2,50	7,61	2,79	4,82
Katupyry	2,46	0,81	1,64	6,26	3,12	3,15
Morita A	3,35	0,89	2,46	6,56	2,86	3,70
Morita B	2,94	0,78	2,16	7,14	2,44	4,71
Native	2,59	0,63	1,95	5,81	2,89	2,93
IHPS	4,64	2,08	2,57	8,05	3,94	4,11
$\bar{x}_i$	3,20	0,98	2,22	6,79	2,89	3,90
$s_i$	0,72	0,49	0,33	0,83	0,55	0,72
$t_{izrač}$	17,66			14,36		
$t_{tab}$	2,45			2,45		

Legenda:  $\bar{x}_i$  – povprečje skupine meritev,  $s_i$  - standardni odklon skupine meritev,  $t_{izrač}$  - izračunana t vrednost,  $t_{tab}$  - tabelarična t vrednost pri 95% stopnji zaupanja

Rezultati v preglednici XVI kažejo, da so med žetvama značilne razlike v vsebnostih steviozida in rebaudiozida A, saj velja  $t_{izrač} > t_{tab}$ . Ničelno hipotezo zavrnamo in sprejmemo alternativno.

Ker rezultati vzorca IHPS kemotipa precej odstopajo od rezultatov ostalih vzorcev, smo enako izračunali t vrednost brez upoštevanja rezultatov vzorcev IHPS kemotipa. Rezultat testa je prikazan v preglednici XVII. Vidimo, da je  $t_{izrač}$  manjša kot v prejšnjem primeru, vendar še vedno precej večja od  $t_{tab}$ , tako za steviozid kot za rebaudiozid A. Zato lahko prav tako zavrnamo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno.

**Preglednica XVII: Parni t-test za ugotavljanje razlik med žetvama (brez podatkov za neznan kemotip z zeliščnega vrta IHPS)**

Kemotip	Rebaudiozid A [g/100g]			Steviozid [g/100g]		
	1. žetev	2. žetev	d	1. žetev	2. žetev	d
Eirete I	3,13	0,84	2,29	6,12	2,22	3,91
Eirete II	3,31	0,82	2,50	7,61	2,79	4,82
Katupyry	2,46	0,81	1,64	6,26	3,12	3,15
Morita A	3,35	0,89	2,46	6,56	2,86	3,70
Morita B	2,94	0,78	2,16	7,14	2,44	4,71
Native	2,59	0,63	1,95	5,81	2,89	2,93
$\bar{x}_i$	2,96	0,79	2,17	6,58	2,72	3,87
$s_i$	0,37	0,09	0,33	0,67	0,33	0,78
$t_{izrač}$	16,32			12,13		
$t_{tab}$	2,57			2,57		

Legenda:  $\bar{x}_i$  – povprečje skupine meritev,  $s_i$  - standardni odklon skupine meritev, d - razlika med vrednostjo prve in druge žetve,  $t_{izrač}$  - izračunana t vrednost,  $t_{tab}$  - tabelarična t vrednost pri 95% stopnji zaupanja

Tako lahko potrdimo našo domnevo, da je statistično značilna razlika v vsebnosti glikozidov med vzorci prve in druge žetve.

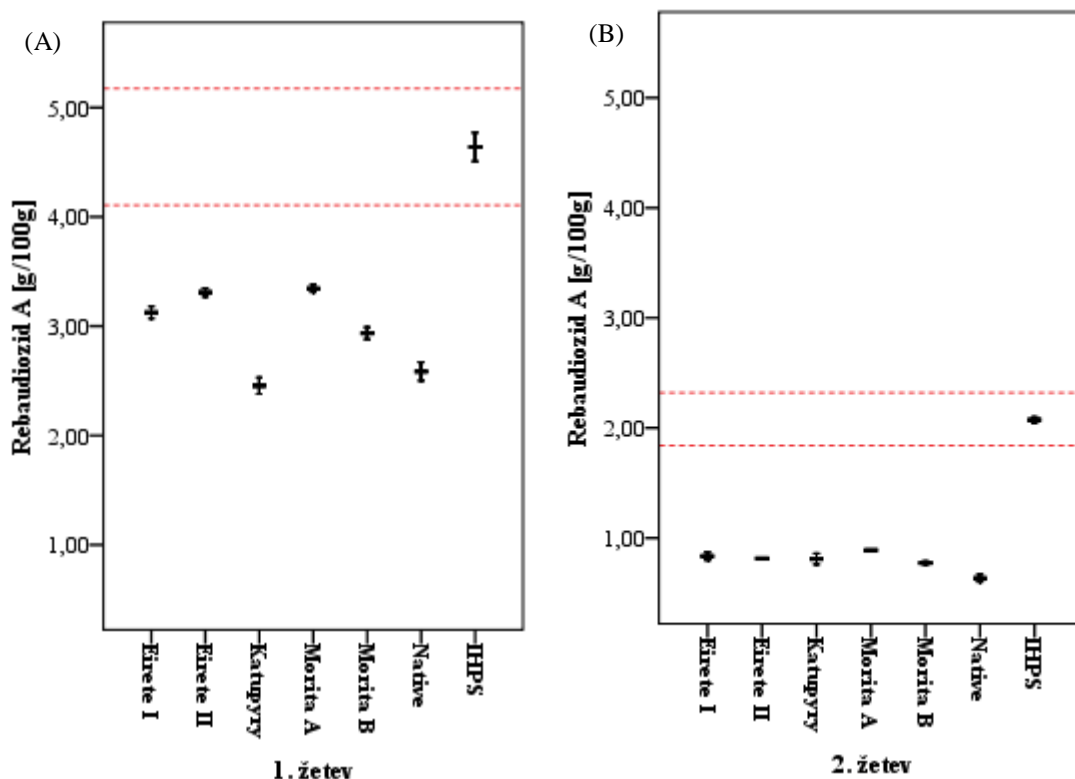
Če primerjamo povprečja vsebnosti med eno in drugo žetvijo (preglednica XVI), vidimo, da je vsebnost v vzorcih avgustovske žetve za steviozid 2,3 krat in za rebaudiozid A 3,3 krat večja kot v vzorcih oktobrske žetve.

Možni vzrok za manjšo vsebnost steviolnih glikozidov v rastlinah iz oktobrske žetve je manjše kopičenje glikozidov v listih. Stevija je kratkodnevnik, kar pomeni, da cveti, ko so dnevi kratki. Vegetativna rast je omogočena, ko so dnevi dolgi (več kot 13 h), takrat je tudi kopičenje glikozidov največje. Ko se začnejo dnevi krajšati, se zmanjšuje tudi kopičenje glikozidov (8, 10). Rastline požete v jeseni so rastle v obdobju, ko se je dolžina dneva krajšala, zato tudi niso kopičile toliko glikozidov kot takrat, ko so bili dnevi daljši.

#### 4.3.2 UGOTAVLJANJE RAZLIK MED KEMOTIPI

##### Rebaudiozid A

Že z vizualno oceno grafov (slika 14) lahko rečemo, da je vsebnost rebaudiozida A v vzorcih IHPS kemotipa višja kot v vzorcih ostalih kemotipov. Da bi potrdili to trditev, smo s pomočjo t-testov primerjali med vzorci IHPS in ostalimi vzorci drugih kemotipov.



Slika 14: Vsebnost rebaudiozida A v zeli stevije različnih kemotipov, požetih v avgustu - 1. žetev (A) in oktobru - 2. žetev (B), interval označen z dvema rdečima črtkanima črtama predstavlja RSD = 11,5 % (preglednica XII) za IHPS kemotip.

Izračuni so pokazali (preglednica XVIII), da v vseh primerih velja  $t_{\text{izrač}} > t_{\text{tab}}$ . Tako lahko rečemo, da se vsebnost rebaudiozida A v vzorcih IHPS kemotipa statistično značilno razlikuje od vsebnosti rebaudiozida A v vzorcih vseh drugih kemotipov.

**Preglednica XVIII: Izračunane t-vrednosti primerjav vsebnosti rebaudiozida A med IHPS in ostalimi kemotipi.**

$t_{\text{tab}} = 4,30$	IHPS	
Kemotip	1. žetev	2. žetev
Eirete I	10,73	46,98
Eirete II	9,78	49,42
Katupyry	14,56	22,63
Morita A	9,62	47,40
Morita B	12,08	44,59
Native	13,23	33,48

### Steviozid

Enako smo želeli ugotoviti, ali obstajajo razlike v vsebnosti steviozida med vzorci IHPS in ostalimi vzorci drugih kemotipov. Izračunane t-vrednosti so prikazane v preglednici XIX.

**Preglednica XIX: Izračunane t-vrednosti primerjav vsebnosti steviozida med IHPS in ostalimi kemotipi**

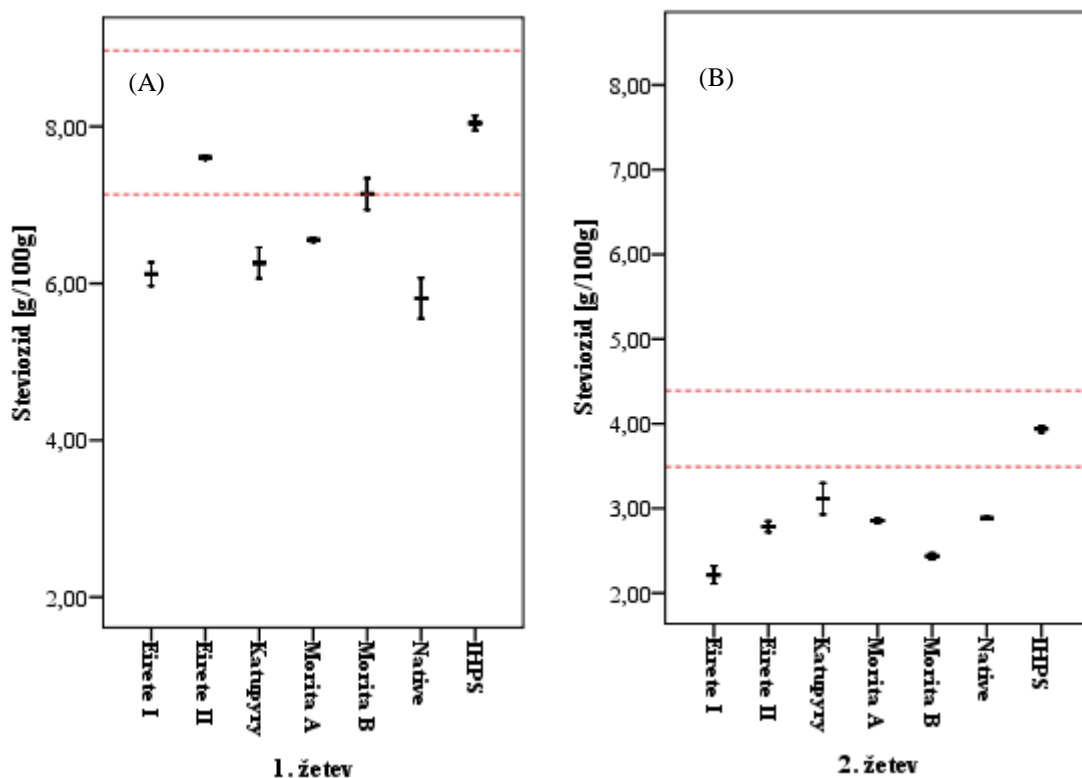
$t_{\text{tab}} = 4,30$	IHPS	
Kemotip	1. žetev	2. žetev
Eirete I	10,84	15,35
Eirete II	4,48	15,13
Katupyry	8,06	4,36
Morita A	15,17	23,00
Morita B	4,09*	28,32
Native	8,07	24,70

Izračuni so pokazali (preglednica XIX), da je v vseh primerih razen v enem,  $t_{\text{izrač}}$  večja od  $t_{\text{tab}}$ . V enem primeru (Morita B – 1. žetev) je bila vrednost  $t_{\text{izrač}}$  (\*) manjša kot  $t_{\text{tab}}$ . Vendar lahko iz grafa (slika 15 A) vidimo, da je med kemotipoma Eirete II in IHPS manjša razlika v vsebnosti steviozida kot med kemotipoma Morita B in IHPS, pa je vendar t-test pokazal statistično značilno razliko. Zaradi majhnega števila meritev vključenih v izračun (dve



ponovitvi vsakega vzorca) in nižjega standardnega odklona je ta rezultat ( $t_{izrač} = 4,48$ ) lahko zavajajoč.

Ob upoštevanju  $RSD = 11,4\%$  (preglednica XII), smo na sliki 15 A označili interval odstopanja od povprečne vrednosti za IHPS z rdečo črtkano črto. Vidimo, da sta povprečni vrednosti kemotipov Eirete II in Morita B znotraj tega območja. Zato ne moremo z gotovostjo trditi, da se v prvi žetvi IHPS kemotip statistično značilno razlikuje v vsebnosti steviozida od kemotipov Eirete II in Morita B. Potrebno bi bilo izvesti analizo na večjem številu vzorcev, da bi lahko z gotovostjo potrdili te razlike.



Slika 15: Vsebnost steviozida v zeli stevije različnih sort/kemotipov, požetih v avgustu - 1. žetev (A) in oktobru - 2. žetev (B), interval označen z dvema rdečima črtkanima črtama predstavlja  $RSD = 11,4\%$  (preglednica XII) za IHPS kemotip.

Na koncu lahko zaključimo, da se pojavljajo razlike v vsebnosti med IHPS kemotipom in ostalimi kemotipi v obeh žetvah, vendar so pri rebaudiozidu A razlike bolj opazne, pri steviozidu pa manj.

Za ostale kemotipe lahko rečemo, da med njimi ni razlik v vsebnosti steviozida in rebaudiozida A.

Možen vzrok za višjo vsebnost steviolnih glikozidov v steviji z vrta IHPS je višja starost rastline. Te rastline so bile vzgojene iz podtaknjencev rastlin, ki so rastle na vrtu IHPS že več let. Rastline ostalih kemotipov smo vzgojili iz semen in so bile nabrane v prvem letu rasti. Literaturni viri (15) poročajo, da se opazijo razlike v vsebnostih steviolnih glikozidov glede na starost rastline. Več letne rastline imajo višje vsebnosti kot enoletne. Mogoče bi bilo potrebno vzgojiti vse rastline iz semen in med temi ugotavljati razlike med kemotipi.

#### 4.3.3 RAZMERJE MED VSEBNOSTMI REBAUDIOZIDA A IN STEVIOZIDA

Poleg celokupne količine glikozidov je pomembno tudi razmerje rebaudiozid A/steviozid. Višje kot je, boljša je kvaliteta sladkega okusa. Zaradi večjega deleža rebaudiozida A ima stevija bolj sladek okus in pa manj zaznaven grenak priokus, ki ga daje steviozid. Razmerja med vsebnostjo rebaudiozida A in vsebnostjo steviozida za posamezen kemotip in vsako žetev so prikazana v preglednici XX.

**Preglednica XX: Razmerje med vsebnostjo rebaudiozida A in vsebnostjo steviozida.**

Kemotip	Razmerje REB-A/STE	
	1. žetev	2. žetev
Eirete I	0,51	0,38
Eirete II	0,44	0,29
Katupyry	0,39	0,26
Morita A	0,51	0,31
Morita B	0,41	0,32
Native	0,44	0,22
IHPS	0,58	0,53
$\bar{x}_i$	0,47	0,33
$s_i$	0,07	0,10

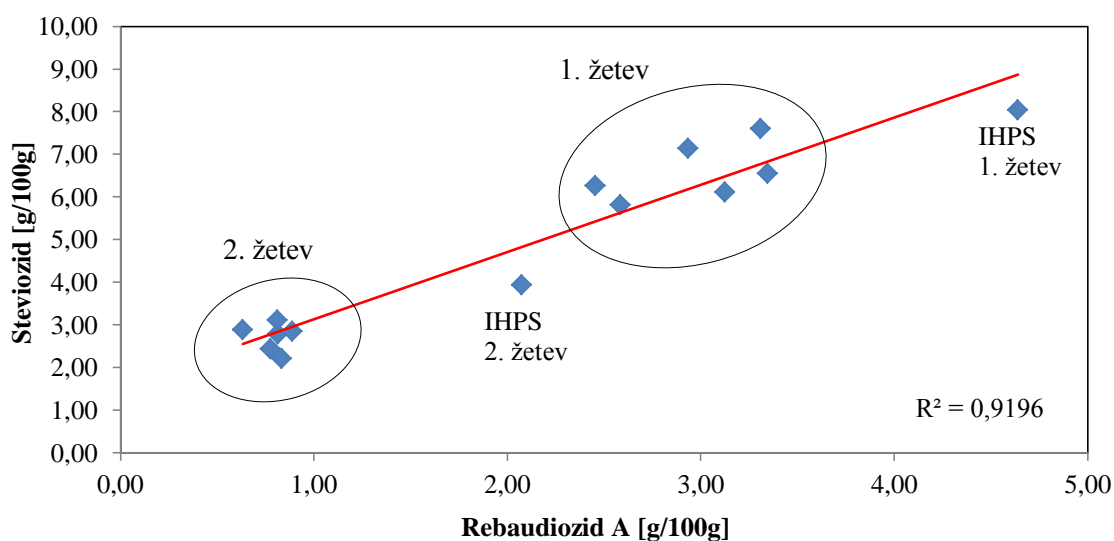
Rezultati za avgustovsko žetev nihajo med 0,39 in 0,58, s povprečno vrednostjo 0,47, ter za oktobrsko žetev med 0,22 in 0,53, s povprečjem 0,33.

Kot vidimo v preglednici, je povprečje razmerja večje pri prvi žetvi kot pri drugi. Najvišje razmerje med kemotipi ima IHPS, ki ima tudi najvišjo vsebnost steviolnih glikozidov.

Tako lahko zaključimo, da je v primerjavi z drugo žetvijo pridelek prve žetve kakovostnejšega okusa, saj ima višjo vsebnost steviolnih glikozidov, prav tako tudi višje razmerje med rebaudiozidom A in steviozidom. Med kemotipi pa je najkvalitetnejši IHPS.

#### 4.3.4 LINEARNA POVEZAVA MED VSEBNOSTMI REBAUDIOZIDA A IN STEVIOZIDA

Zanimalo nas je, ali obstaja povezava med količino steviozida in rebaudiozida A v steviji. Iz slike 16 je razvidno, da z naraščanjem količine steviozida narašča tudi vsebnost rebaudiozida A. Vidimo, da je korelacija zelo dobra, saj je determinacijski koeficient večji kot 0,90. Opazimo lahko, da so rezultati strnjeni v dveh skupinah, prva in druga žetev, samo rezultata vzorcev IHPS kemotipa sta ločena od ostalih rezultatov.



Slika 16: Povezava med vsebnostmi rebaudiozida A in steviozida.

Vzrok za tako visoko korelacijo bi lahko bil ta, da je v procesu biosinteze steviozid substrat za nastanek rebaudiozida A. Pri pripenjanju glukoze enote na soforozno enoto na steviozidu sodeluje encim glukozil-transferaza, pri čemer nastane rebaudiozid A (30). Zaradi tega sklepamo, da večja kot bo akumulacija steviozida v listih, več bo nastalo tudi rebaudiozida A.

Zelo dobra korelacija med vsebnostmi steviozida in rebaudiozida A bi koristila pri hitrem določevanju steviolnih glikozidov v steviji, iste sorte, ki raste na določenem področju, pri čemer nas ne bi zanimalo okvirne vrednosti glikozidov. Pri tem bi z uporabo ustrezne

metode določili samo enega od analitov, drugega pa določili z upoštevanjem razmerja med obema analitoma, ki bi ga predhodno določili na večjem številu vzorcev.

#### 4.3.5 PRIMERJAVA REZULTATOV Z LITERATURNIMI REZULTATI

Ko smo sešteli vsebnosti iz prve in druge žetve skupaj, smo dobili rezultate, ki so predstavljeni v preglednici XXI.

**Preglednica XXI: Vsebnost steviozida, rebaudiozida A in celokupna vsebnost (obe žetvi skupaj)**

<b>Kemotip</b>	<b>Rebaudiozid A [g/100g ali %]</b>	<b>Steviozid [g/100g ali %]</b>	<b>Skupaj [g/100g ali %]</b>
Eirete I	3,96	8,34	12,30
Eirete II	4,13	10,39	14,52
Katupyry	3,27	9,38	12,64
Morita A	4,23	9,41	13,64
Morita B	3,71	9,58	13,29
Native	3,22	8,70	11,91
IHPS	6,72	11,99	18,70
$\bar{x}_i$	4,18	9,68	13,86
$s_i$	1,19	1,21	2,31

Delež steviozida v zeli stevije se giblje med 8,34 in 11,99 %, povprečno pa znaša 9,68 %. Pri rebaudiozidu A so vrednosti od 3,22 do 6,72 %, s povprečjem 4,18 %. Najvišjo vsebnost tako steviozida kot tudi rebaudiozida A ima kemotip IHPS.

Če primerjamo povprečje steviozida s podatki iz drugih držav (preglednica I), vidimo, da je vsebnost v naši steviji relativno visoka. Delež rebaudiozida A pa je znotraj območja rezultatov iz drugih držav.

Lahko rečemo, da je odstotek obeh visok, glede na to, da smo mi določali glikozida v zeli (listi in stebela skupaj), medtem ko so podatki iz drugih držav samo za vsebnost v listih, kjer je prisotnost glikozidov največja.

## 5 SKLEP

---

Na podlagi rezultatov validacije metode lahko zaključimo, da je metoda selektivna, linearna (za steviozid v območju 6,3–100,8 mg/L in za rebaudiozid A v območju 5,1–101,0 mg/L), natančna (z relativnim standardnim odklikom za steviozid 11,4 % in za rebaudiozid A 11,5 %) in točna (z izkoristkom  $101,9 \pm 6,7$  %).

Preizkus stabilnosti ekstrakta steviolnih glikozidov je pokazal, da je ekstrakt obstojen do enega tedna, če ga hranimo v hladilniku pri 4°C in v primerni ovojnini, ki preprečuje uhajanje topila. Kasneje začne koncentracija steviozida in rebaudiozida A naraščati. Zaradi tega je priporočljivo izvesti analizo s HPLC v sedmih dneh po pripravi vzorcev.

S pomočjo HPLC smo določili vsebnosti steviozida in rebaudiozida A v 14 vzorcih (sedem kemotipov, dve žetvi). Pri poletni žetvi smo dobili rezultate vsebnosti za steviozid 5,81–8,05 g/100g in za rebaudiozid A 2,46–4,64 g/100g. Vrednosti vzorcev oktobrske žetve so bile nižje, in sicer za steviozid 2,22–3,94 g/100g in za rebaudiozid A 0,63–2,08 g/100g.

Primerjavo med poletno in jesensko žetvijo smo ovrednotili s t-testom, ki je pokazal, da se vsebnosti med žetvama statistično značilno razlikujejo. Povprečna vsebnost v vzorcih poletne žetve je za steviozid 2,3 krat in za rebaudiozid A 3,3 krat večja kot v vzorcih jesenske žetve. Poleg tega smo ugotovili, da je tudi razmerje med rebaudiozidom A in steviozidom večje pri prvi žetvi kot pri drugi. Najvišje razmerje med kemotipi ima IHPS, ki ima tudi najvišjo vsebnost steviolnih glikozidov.

S statističnim t-testom smo ugotovili, da se pojavljajo razlike med IHPS kemotipom in ostalimi kemotipi v obeh žetvah, vendar so pri rebaudiozidu A razlike bolj opazne, pri steviozidu manj. Za ostale kemotipe lahko rečemo, da med njimi ni razlik v vsebnosti obeh analitov.

Iz teh ugotovitev lahko zaključimo, da je pridelek prve žetve kakovostnejši, saj ima višjo vsebnost steviolnih glikozidov, prav tako tudi višje razmerje rebaudiozid A/steviozid. Med kemotipi je najkakovostnejši IHPS.

Opazili smo, da z naraščanjem količine steviozida narašča tudi količina rebaudiozida A, opaziti je zelo dobro korelacijo, saj determinacijski koeficient znaša 0,92.

S primerjavo rezultatov iz drugih držav smo ugotovili, da so vsebnosti steviozida in rebaudiozida A v naši steviji relativno visoke, če upoštevamo, da smo mi določevali glikozida v zeli (listi in stebila), medtem ko so podatki iz drugih držav za vsebnosti v listih, kjer pa je količina glikozidov največja.

Zaradi majhnih vsebnosti steviolnih glikozidov v jesenski žetvi in velike razlike v primerjavi s poletno žetvijo se v prihodnje priporoča žetev samo enkrat v letu, najbolje v začetku cvetenja.

Za potrditev razlik med kemotipi pa bi bilo potrebno izvesti analizo na večjem številu vzorcev in povečati število ponovitev. Prav tako bi bilo potrebno vzgojiti vse rastline na enak način (semena ali potaknjenci).

## 6 LITERATURA

---

1. Yadav A K, Dhyani D, Singh S, Ahuja P S: A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can J Plant Sci* 2011; 91: 1–27.
2. Puri M, Sharma D, Tiwari A K: Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances* 2011; 29: 78–791.
3. Brandle J E, Starratt A N, Gijzen M: *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Can J Plant Sci* 1998; 78: 527–536.
4. Hrvatska agencija za hranu: Znanstveno mišljenje o mogućnosti upotrebe proizvoda koji se dobivaju od sušenog lista biljke *Stevia rebaudiana* Bertoni <http://HAH> [http://www.hah.hr/upisnik\\_z\\_m.php?id=9](http://www.hah.hr/upisnik_z_m.php?id=9) (dostop: oktober 2013).
5. Woelwer-Rieck U: The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 886–895.
6. Yadav S K, Guleria P: Steviol glycosides from stevia: biosynthesis pathway review and their application in food and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2012; 52: 988–998.
7. Lavini A, Riccardi M, Pulvento, De Luca S, Scamosci M, d'Andria R: Yield, quality and water consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown under different irrigation regimes in southern Italy. *Ital J Agron / Riv Agron* 2008; 2: 135–143.
8. Serfaty M, Ibdah M, Fischer R, Chaimovitsh D, Saranga Y, Dudai N: Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. *Industrial Crop and Products* 2013; 50: 731–736.
9. Tavarini S, Angelini L: *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *J Sci Food Agric* 2013; 93: 2121–2129.
10. Moraes R M, Donega M A, Cantrell C L, Mello S C, McChesney J D: Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. *Ind Crops Prod* 2013; 51: 385–389.
11. Woelwer-Rieck U, Lankes C, Wawrzun A, Wüst M: Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Eur Food Res Technol* 2010; 231: 581–588.

12. Kolb N, Herrera J L, Ferreyra D J, Uliana R F: Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC method. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 4538–4541.
13. Tateo F, Sanchez Escobar M L, Bononi M, Lubian E: Stevioside content of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in East Paraguay. *Italian Journal Of Food Science* 1999; 11(3): 265–269.
14. Jaitak V, Gupta A P, Kaul V K, Ahuja P S: Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47: 790–794.
15. Megeji N W, Kumar J K, Singh V, Kaul V K, Ahuja P S: Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. *Current Sci* 2005; 88: 801–804.
16. Kovylyayeva G I, Bakaleinik G A, Strobykina I Yu, Gubskaya V I, Sharipova R R, Al'fonsov V A, Kataev V E, Tolstikov A G: Glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Chem Nat Comp* 2007; 43: 81–85.
17. Gardana C, Scaglianti M, Simonetti P: Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 1463–1470.
18. Mitchell H: *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*, Wiley, Chichester, VB, 2008: 342–347.
19. Chatsudthipong V, Muanprasat C: Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics* 2009; 121: 41–54.
20. Herranz-Lopez M, Barrajon-Catalan E, Beltran-Debon R, Joven J, Micol V: Potential medical benefits of high intensity sweetener from *Stevia*. *International Sugar Journal* 2011; 113: 26–31.
21. Carakostas M C, Curry L L, Boileau A C, Brusick D J: Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem Toxicol* 2008; 46 (7): 1–10.
22. Nacionalni inštitut za javno zdravje: Varnost rastline *Stevia rebaudiana* in njenih ekstraktov - steviol glikozidov  
[http://www.ivz.si/prehrana?pi=5& 5\\_Filename=attName.png& 5\\_MediaId=5119& 5\\_AutoResize=false&pl=8-5.3](http://www.ivz.si/prehrana?pi=5& 5_Filename=attName.png& 5_MediaId=5119& 5_AutoResize=false&pl=8-5.3). (dostop: oktober 2013).
23. Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA J* 2010; 8 (4): 1537.



24. Vaněk T, Nepovim A, Valiček P: Determination of stevioside in plant material and fruit teas. *J Food Comp Anal* 2001; 14: 383–388
25. Guide to solid phase extraction. Bulletin 910, Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA, 1998: 1–12.
26. Brodnjak Vončina D: Analizna kemija II. Zbrano gradivo, Maribor, 2006: 108–118.
27. European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection: Guidance document on pesticide residue analytical methods. SANCO/825/00 rev. 8.1, 2010: 1–28.  
[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide\\_doc\\_825-00\\_rev7\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf)
28. Moder M: Validacija analizne metode. V: Statistične metode in merilna negotovost. Zbornik predavanj, ZTI, Ljubljana, 1998 : 43–53.
29. Bohanec S: Osnove statistike in statistični testi. V: Statistične metode in merilna negotovost. Zbornik predavanj, ZTI, Ljubljana, 1998: 1–19.
30. Brandle J E, Telmer P G: Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 2007; 68: 1855–1863.