

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2016.

Dragana Obradović 665/PI

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH
SPOJEVA IZ STEVIJE (*Stevia
rebaudiana* Bertoni) PRIMJENOM
UBRZANE EKSTRAKCIJE
OTAPALIMA PRI POVIŠENOM
TLAKU**

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane” (IP-PE-FF) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Rad je izrađen u *Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća* te u *Laboratoriju za procese sušenja i praćenje aktivnosti biološki aktivnih spojeva* na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Predraga Putnika, stručnog suradnika.

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević na ukazanom povjerenju, strpljenju, vodstvu i izuzetnoj suradnji tijekom izrade rada. Isto tako, zahvaljujem se i prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac, te cijeloj njezinoj katedri i Laboratoriju na ukazanom povjerenju kako tijekom izrade završnog rada tako i ovog rada. Od srca, hvala objema na brojnim pruženim stručnim i prijateljskim savjetima, na velikom razumijevanju i podršci te pristupačnosti i izdvojenom vremenu.

Zahvaljujem svim profesorima i asistentima Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta na nesebičnom prenošenju vlastitog znanja i iskustva.

Hvala svim mojim kolegicama i kolegama zbog kojih su se stvari uvijek činile jednostavnijima i ljepšima u svim segmentima obrazovanja i života.

Na kraju, ali ne i manje važno, želim se zahvaliti svojoj obitelji na podršci, strpljenju i razumijevanju tokom svih godina studiranja. Posebno se zahvaljujem svojoj majci, kojoj i posvećujem ovaj rad, koja mi daje snage i sada kada nije sa nama, a koja bi bila najponosnija na moj uspjeh.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ STEVIJE (*Stevia rebaudiana* Bertoni) PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

Dragana Obradović 665/PI

Sažetak

U ovom radu ispitavana je učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku uz vodu kao otapalo. ASE ekstrakcija je provedena variranjem statičkog vremena ekstrakcije (5 i 10 minuta), temperature ekstrakcije (100 °C, 130 °C i 160 °C) te broja ciklusa ekstrakcije (1, 2 ili 3 ciklusa). U ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, proantocijanidina, klorofila A i B. Na temelju dobivenih rezultata statističkom analizom određeni su optimalni parametri ASE ekstrakcije pri kojima se postižu najveći prinosi. Za ukupne fenole optimalni parametri bi bili 160°C, 5 min, 2 ciklusa, za proantocijanidine: 160°C, 10 min, 3 ciklusa, za klorofil A: 100°C, 10 min, 2 ciklusa te za klorofil B: 160°C, 10 min, 3 ciklusa.

Ključne riječi: list stevije, ASE, ukupni fenoli, proantocijanidini, klorofil A, klorofil B

Rad sadrži: 51 stranica, 14 slika, 7 tablica, 103 literarna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*

Pomoć pri izradi: dr. sc. *Predrag Putnik*, stručni suradnik

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac
2. Doc. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević
3. Izv. prof. dr. sc. Sandra Albino
4. Prof. dr. sc. Branka Levaj (zamjena)

Datum obrane: 21. prosinca 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni) LEAVES

Dragana Obradović 665/PI

Abstract

The aim of this study was to investigate the extraction efficiency of bioactive compounds from stevia leaves by using accelerated solvent extraction with water as solvent. ASE extraction is carried out by varying the static extraction time (5 , 10 minutes) , the extraction temperature (100 ° C , 130 ° C and 160 ° C) and the number of extraction cycles (1 , 2 or 3 cycles) . The content of total phenols , proanthocyanidins , chlorophyll A and B were determined spectrophotometrically. The optimal parameters for ASE extraction were determined based on the results and statistical analysis. For total phenols optimal parameters were 160 ° C , 5 min , 2 cycles , for the proanthocyanidins : 160 ° C , 10 min , 3 cycles , for the chlorophyll A : 100 ° C , 10 min , 2 cycles and for chlorophyll B: 160 ° C , 10 min , 3 cycles .

Keywords: *stevia leaf, ASE, total phenols, proanthocyanidins, chlorophyll A and B*

Thesis contains: 51 pages, 14 figures, 7 table, 103 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor
2. PhD. Danijela Bursać Kovačević, Assistant Professor
3. PhD. Sandra Balbino, Associate Professor
4. PhD. Branka Levaj (substitute), Full Professor

Thesis defended: 21 December 2016

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. STEVIJA	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA STEVIJE	4
2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI U LISTU STEVIJE	7
2.3.1. FENOLNI SPOJEVI LISTA STEVIJE	7
3.3.1.1. Flavonoidi i fenolne kiseline u listu stevije.....	8
2.3.2. KAROTENOIDI I KLOOROFILI LISTA STEVIJE	11
3.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA STEVIJE	14
3.4.1. UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU.....	15
4. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.2 METODE RADA.....	18
3.2.1. Izolacija bioaktivnih spojeva iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak	18
4.3.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	20
4.3.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH PROANTOCIJANIDINA	23
4.3.3. ODREĐIVANJE KLOOROFILA <i>a</i> i KLOOROFILA <i>b</i>	26
4.3.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	27
5. REZULTATI I RASPRAVA	28
5.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	28
5.4. ODREĐIVANJE PROANTOCIJANIDINA.....	32
5.5. ODREĐIVANJE KLOOROFILA <i>a</i> I KLOOROFILA <i>b</i>	35
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Stevija (*Stevia Rebaudiana*) je višegodišnji zeljasti grm iz porodice glavočika (*Asteraceae*). Potječe iz Brazila gdje se više od 1500 godina koristi za zaslađivanje hrane i pića te liječenje rana, a u današnje vrijeme smatra se adekvatnom zamjenom za saharozu, dok se biološki potencijal lista stevije još uvijek istražuje. Steviozid, rebaudiozid A te dulkozid A su najznačajniji steviol glikozidi, odgovorni za slatkoću lista stevije. Uz njih sadrži i značajne količine proteina, ali i veliku količinu biološki aktivnih spojeva koji pridonose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti te ostalim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje.

Ekstrakcija predstavlja bitan korak u izdvajanju biološki aktivnih komponenata iz različitih dijelova biljke. Pravilan odabir ekstrakcijske tehnike, kao i optimalnih uvjeta ekstrakcije važni su čimbenici koji će utjecati na prinos izoliranih bioaktivnih komponenata. Za izolaciju biološki aktivnih spojeva iz lista stevije trenutno se koriste klasične metode ekstrakcije, koje su u usporedbi s naprednim tehnikama ekstrakcije dugotrajne, relativno nižih iskorištenja te ekonomski manje opravdane obzirom na veći utrošak otapala i energije. U posljednje vrijeme znanstvena istraživanja su sve više usmjerena na razvoj i optimiranje novih tehnika ekstrakcije koje bi prevazišle nedostatke klasične ekstrakcije. Jedna od tih tehnika je i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. Accelerated Solvent Extraction, ASE), potpuno automatizirana tehnika ekstrakcije koja primjenom visoke temperature i tlaka s tekućim otapalima brzo i učinkovito izolira biološki aktivne spojeve iz biljnog materijala. Glavne prednosti ove metode ogledaju se u uštedi energije i otapala te značajno skraćenog vremena ekstrakcije zahvaljujući provedbi ekstrakcije u statičkim ciklusima. Upravo zbog prethodno navedenih prednosti, cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz lista stevije primjenom ASE ekstrakcije. Uz destiliranu vodu kao ekstrakcijsko otapalo, ispitivani su sljedeći parametri ekstrakcije: (i) statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min); (ii) broj ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3); te (iii) temperatura (100 °C, 130 °C, 160 °C). U dobivenim ekstraktima određivani su maseni udjeli ukupnih fenola, proantocijanidina te klorofila *a* i klorofila *b*. Na temelju dobivenih rezultata određeni su optimalni parametri ASE ekstrakcije uz koje se postižu najveći prinosi navedenih bioaktivnih komponenata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. STEVIJA

Stevija (*Stevia Rebaudiana* Bertoni) (Slika 1.) je višegodišnji zeljasti grm iz porodice glavočika (*Asteraceae*), rod *Eupatoriae*, koji broji od 150 do 300 vrsta. Podrijetlom je iz Brazila gdje se više od 1500 godina koristi kao zaslađivač gorkih ljekovitih pripravaka, čajeva i ostalih napitaka (Brandle i sur., 1998). Od svih vrsta iz obitelji *Astracae* s karakteristikama zaslađivača poput vrsta *Stevia dianthoidea*, *S. phlebophylla*, *S. anisostemma*, *S. bertholdii*, *S. crenata*, *S. enigmatica*, *S. eupatoria*, *S. lemmonii*, *S. micrantha*, *S. plummerae*, *S. rebaudiana*, *S. salicifolia*, *S. serrata* i *S. Viscida*, poznato je da *Stevia rebaudiana* sadrži najveći stupanj slatkoće (Carakostas i sur., 2008). Može narasti do 1 m u visinu, a njeni listovi dugi su oko 5 cm te široki oko 2 cm. Listovi imaju ugodan, slatkast, osvježavajući okus koji se može dugo zadržati u ustima (Maiti i Purohit, 2008).



Slika 1. *Stevia Rebaudiana* Bertoni (Anonymous 1., 2016)

Sistematika vrste *Stevia rebaudiana* Bert. (Anonymous 6):

Carstvo: *Plantae* (biljke)
Podcarstvo: *Angiospermae* (Cvjetnjače)
Odjel: *Magnoliophyta*
Razred: *Magnoliopsida*
Podrazred: *Asteridae*
Red: *Asterales*

Porodica: *Asteraceae* (Glavočike)

Rod: *Stevia* Cav.

Vrsta: *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevija je poznata po visokoj koncentraciji diterpena (4-20 %) u suhoj tvari listova (Ghanta i sur., 2007). Neki od tih diterpena su glikozidi koji su odgovorni za slatkoću. Upravo zbog svoje slatkoće, ali i dokazanih ljekovitih svojstava njezinih listova, privukla je ekonomski i znanstveni interes. Japan je bio prva zemlja u Aziji koja je uvela na tržište steviozid kao zaslađivač u hrani i medicini. Od tada, uzgoj ove biljke se proširio na druge zemlje Azije, uključujući Kinu, Maleziju, Singapur, Južnu Koreju, Tajvan i Tajland. Stevija se na tržištu najčešće može naći u formi zelenog praha (Slika 2.), koji je dobiven mljevenjem sušenih zelenih listova (Mishra i sur., 2010), te u formi bijelog praha (Slika 3.), koji je dobiven depigmentacijom zelenog praha (Brandle i sur., 1992). Također, stevija se komercijalno može pronaći i kao otopina steviozida i rebaudiozida A, dobivena različitim ekstrakcijskim metodama iz zelenog praha (Abou-Arab i sur., 2010).



Slika 2. Zeleni prah sušenog lista stevije
(Anonymous 2.,2016)



Slika 3. Bijeli prah depigmentiranog sušenog lista stevije (Simpson, 2016)

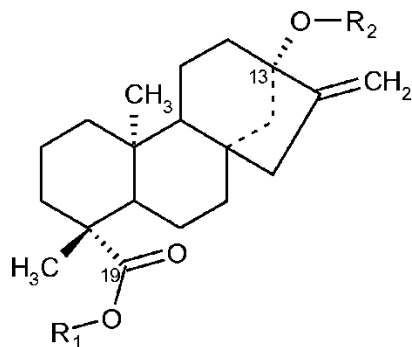
Brojne studije su pokazala da, osim slatkoće, steviozid, zajedno sa srodnim spojevima kao što su rebaudiozid A, steviol i isosteviol posjeduje antihiperglikemijsko, antihipertenzijsko, protuupalno, protutumorsko djelovanje, a može poslužiti kao diuretik (Chatsudthipong i Muanprasat, 2009). Stevija osobito može biti korisna za osobe koje pate od pretilosti, dijabetičare, osobe sa povišenim krvnim tlakom ili dentalnim problemima jer je od saharoze slađa 300 puta te ima malu kalorijsku vrijednost (Ghanta i sur., 2007). Upravo su to potkrijepili i rezultati istraživanja Savita i suradnika (2004) koji su u sušenim listovima stevije odredili

energetsku vrijednost od 2.7 kcal g⁻¹, za razliku od aspartama, jednog od najčešće korištenog zaslađivača, čija je energetska vrijednost iznosila 4 kcal g⁻¹.

Listovi stevije imaju funkcionalna i senzorska svojstva superiornija u odnosu na mnoga druga visoko potencijalna sladila te se pretpostavlja da će u budućnosti postati glavni izvor u proizvodnji zaslađivača za rastuće tržište prirodne hrane (Goyal i sur., 2010).

2.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA STEVIJE

Suhu tvar lista stevije čine u najvećoj mjeri ugljikohidrati (52,8 %), zatim različite tvari topljive u vodi (42 %), proteini (6,2 %), lipidi (5,6 %) te diterpeni (15 %) (Geuns, 2003). Rezultati znanstvenog istraživanja Wolwer-Rieck (2012) potvrdili su da se u listu stevije nalazi preko stotinu različitih komponenata. Obzirom da je stevija potpuno prirodna zamjena za šećer, od iznimnog su značaja sastavnice njezina lista, odgovorne za slatkoću diterpenski glikozidi, koje uključuju: steviozide (4-13 % suhe tvari), steviolbiozide (u tragovima), rebaudiozid A (2-4 %), rebaudiozid B (u tragovima), rebaudiozid C (1-2 %), rebaudiozid D, E, i F (u tragovima) i dulkozid A (0,4-0,7 %) (Carakostas i sur., 2012; Makapugay i sur., 1984). Slatkoća, odnosno koncentracija steviozida najveća je netom prije cvjetanja biljke, stoga bi biljka trebala biti ubrana prije početka cvatnje ili prije prvog mraza (Brandle i sur., 1992). Svi ovi izolirani diterpenski glikozidi imaju istu osnovnu aglikonsku strukturu (steviol), a razlikuju se po šećernom ostatku na položajima C 13 i C 19 (Slika 4).



	R1	R2
Steviol	H	H
Steviozid	β-Glc	β-Glc- β-Glc (2→1)
Rebaudiozid A	β-Glc	β-Glc- β-Glc (2→1) β-Glc (3→1)

Slika 4. Strukturna formula steviola, steviozida i rebaudiozida A (Walters, 2013)

Iako je u listu stevije identificirano preko 30 različitih steviol glikozida, rezultati svih istraživanja upućuju da je **steviozid** ($C_{38}H_{60}O_{18}$) dominantan (Slika 4), poznat po svojoj slatkoći, 250-300 puta slađi od saharoze (Kim i sur., 2011). Kemijski gledano, steviozid predstavlja 13-[2-O- β -D-glukopiranozil- β -D-glukopiranozil) oksij] kaur-16-en-18-olnu kiselinu, β -D-glukopiranozil ester (Abou-Arab i sur., 2010). Molekula steviozida je vrlo stabilna u vodenim otopinama pri velikom rasponu pH i temperature (Virendra i Kalpagam, 2008). Rezultati istraživanja Buckenhuskera i Omrana (1997) pokazali su da steviozid posjeduje izvrsnu stabilnost pri 100 °C/ 1 h uz pH 3-9, ali pri pH>9 dolazi do brze razgradnje. Rezultati istraživanja Kroyera (2010) pokazuju kako su steviozidi stabilni tijekom različitih procesa prerade, uvjeta skladištenja, ali i u interakciji s topljivim vitaminima, organskim kiselinama, zaslađivačima i kavom. Prednosti korištenja steviozida u prehrani su mnogobrojne: stabilan je, nekaloričan, osigurava dentalno zdravlje reduciranjem unosa šećera, povoljan je za dijabetičare i pretilu osobu (Geuns, 2003). Toksikološke analize pokazale su da steviozidi nemaju mutagene, teratogene niti kancerogene učinke, te nisu primjećene alergijske reakcije nakon konzumacije (Pól i sur., 2007).

Rebaudiozid A ($C_{44}H_{70}O_{23}$) je poznat još i kao Rebiana, a od šećera je slađi 250 – 400 puta. Kemijski gledano, rebaudiozid A predstavlja 13-[(2-O- β -D-glukopiranozil-3-O- β -D-glukopiranozil- β -D-glukopiranozil)oksi]kaur-16-en-18-olna kiselina, β -D-glukopiranozil ester (Wölwer-Rieck, 2012). Razlika između rebaudiozida A i steviozida je u tome što rebaudiozid ima jednu molekulu glukoze više (Slika 4 B). Bez obzira što je u lišću stevije prisutan u manjoj koncentraciji, rebaudiozid A značajnije pridonosi ugodnom slatkastom okusu u usporedbi sa steviozidom, koji je odgovoran za gorkast, opor okus (Lindley, 2012). Razlika u okusu uzrokovana je prisutnošću većih količina polarnih skupina u strukturi molekule rebaudiozida A, što za posljedicu ima i bolju topljivost te veću sličnost okusu saharoze (Lindley, 2012; Carakostas i sur., 2008). Termodinamička ravnoteža rebaudiozida A u vodi pri 25 °C iznosi 0,8 %, a topljivost u etanolu iznosi 1,69 % (Prakash, 2008).

Nadalje, prethodna istraživanja pokazala su da vodeni ekstrakt stevije sadrži značajnu količinu proteina, kao i slobodnih aminokiselina, minerala, spojeve iz skupine neglikozidnih

diterpena, vitamina, polifenola, karotenoida i klorofila (Barba i sur., 2014a, Lemus-Mondaca i sur., 2012; Tadhani i sur., 2007). Rezultati najnovijih istraživanja također pokazuju da su vodeni ekstrakti lišća stevije prirodni inhibitori enzima polifelnol oksidaze (PPO) i peroksidaze (POD), stoga bi svoju komercijalnu primjenu mogli pronaći i kao supstituenti kemijskih aditiva, te na taj način smanjiti unos štetnih aditiva u prehrani (Barba i sur., 2014b).

Glikozidi diterpena imaju brojne povoljne fiziološke učinke na zdravlje. Poolsup i suradnici (2012) istraživali su utjecaj steviozida na krvni tlak kod osoba koje pate od hipertenzije. Zaključeno je kako steviozidi utječu na smanjenje sistoličkog krvnog tlaka, ali bez značajnijeg utjecaja na dijastolički krvni tlak. Nekalorični ili niskokalorični zasladivači postali su dio trenda tzv. „zdrave prehrane“. U istraživanju Elnaga i suradnika (2016) određen je utjecaj stevije, kao zasladivača, na promjenu tjelesne težine, te hematološke i biokemijske parametre u ženki štakora. Rezultati dobiveni korištenjem različitih doza (25, 250, 500 i 1000 mg/kg na dan) nakon dvanaest tjedana pokazali su da je unosom 500 mg/kg došlo do značajnog gubitka tjelesne mase, sniženja kolesterola, triglicerida, ali i opadanja koncentracije nisko topljivih lipoproteina, uz istovremeni porast visoko topljivih lipoproteina. Zaključci upućuju kako bi ova dnevna doza bila sigurna za osobe koje boluju od dijabetesa, ali i onih koji žele kontrolirati koncentraciju glukoze u krvi. Ograničena su istraživanja o mehanizmu djelovanja rebaudoizida A, no neki od podataka govore o antiepileptičkom djelovanju, gdje se unosom određene količine rebaudoizida A smanjila jačina epileptičkog napada (Uyanikgil i sur., 2016).

U SAD-u su pročišćeni ekstrakti steviol glikozida (čistoće 95 %) 2008. i 2009. godine dobili GRAS status (Generally Recognized As Safe), dok su na europskom tržištu prisutni od 2010. godine, nakon što je EFSA-in panel za prehrambene aditive i prirodne tvari dodane hrani (European Food Safety Authority) izradio znanstveno mišljenje o sigurnosti steviol glikozida u svrhu korištenja kao prehrambenih aditiva. U RH se biljna vrsta *Stevia rebaudiana* (Bertoni) trenutno nalazi na listi dozvoljenih biljnih vrsta (NN 46/11) te se list ove biljke može koristiti kao dodatak prehrani. Proizvodi koji sadržavaju steviju moraju biti označeni sukladno Pravilniku o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane (NN 63/11, 79/11). Prema US FDA preporučeni dnevni unos stevije kod štakora iznosi 25 mg/kg (Genus i sur., 2003), odnosno oko 7.9 mg/kg za ljude. Xili i suradnika su već 1992. odredili preporučenu dnevnu dozu od 7.9 mg/kg tjelesne težine.

Danas u prehrambenoj industriji, ekstrakti lista stevije koriste se kao zaslađivači i to bezalkoholnih pića i voćnih sokova, deserata, umaka, slatkog kukuruza, kruha i kolača (Goyal i sur., 2010). Diterpeni izolirani iz stevije mogu zamijeniti saharozu u žitaricama (Wallin, 2007), jogurtu (Amzad-Hossain i sur., 2010), soji i sojinim umacima (Amzad-Hossain i sur., 2010, slatkišima, ali i morskoj hrani (Goyal i sur., 2010).

2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI U LISTU STEVIJE

2.3.1. FENOLNI SPOJEVI LISTA STEVIJE

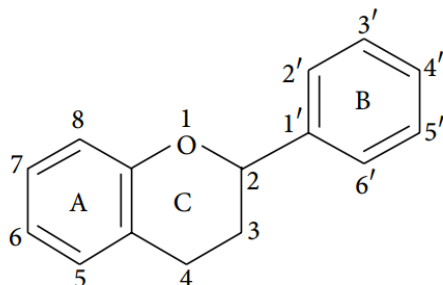
Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni biljni metaboliti prisutni u biljnim tkivima (voće, povrće, žitarice, čajevi, začini, itd.), sa različitim ulogama u regulaciji fizioloških i biokemijskih procesa koji se odvijaju tijekom rasta i/ili dozrijevanja kao što su formiranje boje, arome i okusa te gorčine i trpkosti. Identificirano je više od 8 000 različitih struktura biljnih polifenola koji se ubrajaju u biološki aktivne tvari s različitim farmakološkim učincima zbog kojih su često sastavni dio medicinskih lijekova kao aktivna komponenta (Wollenweber, 1988). Neka od pozitivnih djelovanja polifenola su antioksidacijsko, protuupalno, antialergijsko, antitumorsko, antimikrobno, anti-HIV djelovanje (Middleton i Kandaswami, 1992; Cooks i Samman, 1996), antistresno i antihiperглиkemijsko djelovanje (Balasundram i sur. 2006). Količina fenolnih spojeva u biljkama ovisi o parametrima okoliša (svjetlost, temperatura), agrotehničkim i klimatskim uvjetima, uvjetima dozrijevanja, skladištenja, obrade kao i stupnja zrelosti ploda te periodu berbe (Crozier i sur, 2009).

Prema kemijskoj strukturi fenolni spojevi se ubrajaju u skupinu organskih spojeva kod kojih je na aromatski prsten vezana jedna ili više hidroksilnih skupina te se mogu podijeliti na (Naczki i Shahidi, 2006):

1. Flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani, proantocijanidini i dr.);
2. Fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne);
3. Ostale polifenolne spojeve (lignani, stilbeni, kumarini i dr.).

3.3.1.1. Flavonoidi i fenolne kiseline u listu stevije

S više od 4100 izoliranih i identificiranih spojeva (Williams i Grayer, 2004, Agati i sur., 2012.) flavonoidi se sintetiziraju u fenilpropanoidnom biosintetskom putu gdje je osnovni prekursor aminokiselina fenilalanin. Svi flavonoidi dijele osnovnu C 15 strukturu (C6-C3-C6), koja se sastoji od dva aromatska prstena (A i B) i heterocikličkog prstena (C) koji sadrži jedan oksidirani atom.



Slika 5. Kemijska struktura flavonoida (Anonymous 4.)

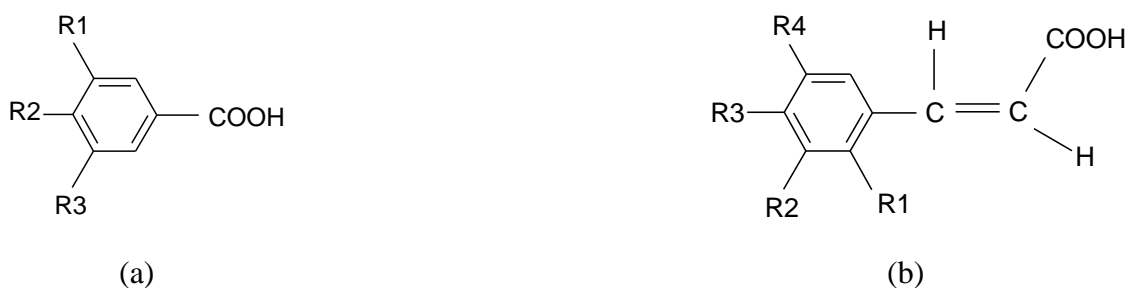
Prema kemijskoj strukturi mogu biti podjeljeni u šest podgrupa (Hollman i Katan, 1999):

- Flavoni (npr. luteonin, apigenin, tangeritin);
- Flavonoli (npr. kvercetin, kaemferol, miricetin, isorhamnetin, pahipodol);
- Flavanoni (npr. hesteretin, naringenin, eriodictiol);
- Flavan-3-ol (npr. katehin i epikatehin);
- Izoflavoni (npr. genistein, daidzein, glicitein);
- Antocijanidini (npr. cijanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin).

Ove komponente nalaze se u gotovo svim biljnim vrstama, uglavnom u obliku glikozida, a rezultati brojnih znanstvenih istraživanja upućuju da flavonoidi imaju pozitivan utjecaj na razvoj novih terapijskih metoda u liječenju bolesti vezanih uz oksidativni stres (Oršolić i sur,

2014), dijabetes (Gonzalez-Abuin i sur, 2015), Alzheimerovu bolest (Apetz i sur, 2014) te rak (Bagchi i sur, 2014).

Obzirom na kemijsku strukturu, fenolne kiseline se dijele na dvije podskupine, a to su hidroksibenzojeve (C6-C1) i hidroksicimetne kiseline (C6-C3) te njihovi derivati (Bravo, 1998) (Slika 6.), a međusobno se razlikuju prema stupnju hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Macheix i sur., 1990). U hidroksicimetne kiseline ubrajaju se kafeinska kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina), ferulinska (4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina), *p*-kumarinska (4-hidroksicimetna kiselina) i sinapinska (3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kiselina) kiselina, dok u hidroksibenzojeve kiseline spadaju galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska, siringinska, elaginska te salicilna kiselina (Bravo, 1998).



Slika 6. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (a) i hidroksicimetnih kiselina (b)

Literaturni podaci za koncentracije ukupnih, kao i pojedinačnih flavonoidnih spojeva u listu stevije veoma se razlikuju, obzirom na primjenu različitih otapala u ekstrakciji kao i različitih metoda određivanja. Abou-Arab i Abu-Salem (2010) navode da u listu stevije prosječno ima 24.01. mg/g ukupnih fenola te 19.93 mg/g ukupnih flavonoida. Ghanta i sur. (2007) u 85 %-tnom metanolnom ekstraktu odredili sadržaj ukupnih flavonoida od 0.83 mg kvercetin ekvivalenata/mg uzorka, a Kim i suradnici (2011) su u vodenom ekstraktu odredili sadržaj ukupnih flavonoida od 15.64 µg kvercetin ekvivalenata/mg uzorka.

Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja u ekstraktima lista stevije identificirani su i kvantificirani strukturuom različiti polifenolni spojevi. Od flavonoida u listu stevije do sada su detektirani spojevi iz skupina flavonola i flavona (Wölwer-Rieck, 2012). Rajbhandari i Roberts

(1983) su primjenom UV i ¹H-NMR spektroskopije te spektroskopije masa u etil-acetatnoj frakciji lista stevije odredili šest flavonoida: apigenin 4'-O-glukozid, kamferol 3-O-ramnozid, luteolin 7-O-glukozid, kvercetin 3-O-arabinozid, kvercetin 3-O-glukozid i kvercetin 3-O-ramnozid (kvercitrin).

Gaweł-Bęben i suradnici (2015) su određivali sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktu pripremljenom od sušenih listova stevije primjenom tri različita otapala: vode, 96 %-tnog etanola i smjese propilen glikola i vode (4:1, v/v). Ekstrakti su pripremljeni miješanjem sa otapalom pri sobnoj temperaturi tijekom 3 h. Dobiveni rezultati pokazuju da su najveći prinosi ukupnih fenola (15.50 mg/g) i ukupnih flavonoida (3.85 mg/g) ostvareni uz smjesu propilen glikola i vode. Ipak, voda se pokazala kao otapalo sa najnižim prinosom ukupnih fenola (3.85 mg/g), a etanol kao otapalo s najnižim prinosom ukupnih flavonoida (2.03 mg/g). Autori su također u pripremljenim ekstraktima HPLC-om utvrdili i razlike fenolnog profila istraživanih ekstrakata u ovisnosti o primjenjenom otapalu. Zanimljivo je da iako se smjesa propilen glikola i vode pokazala najuspješnijom ekstrakcijskim otapalom u prinosu ukupnih fenola, maseni udjeli kafeinske kiseline (0.29 mg/g), protokatehinske kiseline (0.12 mg/g) i katehina (0.24 mg/g) bili su značajno viši u vodenim ekstraktima. Rezultati ove studije u skladu su i s prijašnjim rezultatima Muanda i suradnika (2011) koji su pokazali da su u vodenim ekstraktima stevije dominantni spojevi derivati kvercetina te protokatehinska kiselina. Glavne sastavnice fenolnog profila u etanolnim ekstraktima bile su ferulinska kiselina (0.86 mg/g), derivati ružmarinske kiseline (0.42 mg/g), ružmarinska kiselina (0.36 mg/g) te klorogenska kiselina (0.30 mg/g).

Muanda i suradnici (2011) su određivali fenolne spojeve u vodenom ekstraktu i metanol-vodenom (50:50) ekstraktu lista stevije. Kvalitativnom HPLC analizom u vodenom i metanol-vodenom ekstraktu identificirana je galna, protokatehinska, klorogena, kafeinska, cimetna i kumarinska kiselina, katehin, epikatehin, rutin, kvercetin, kvercetin dihidrat i apigenin. Izuzev galne i protokatehinske kiseline te katehina koji zbog svoje transformacije u ester u alkohol-vodenom mediju imaju veću koncentraciju u vodenom ekstraktu, svi ostali spojevi imaju veće koncentracije u metanol-vodenom ekstraktu, od kojih su najveće koncentracije određene za kvercetin dihidrat (4,48 mg/mL), rutin (1,99 mg/mL) te klorogensku kiselinu (1,03 mg/mL).

Periche i suradnici (2015) su utvrdili da i način sušenja (sušenje vrućim zrakom, sušenje zamrzavanjem, sušenje pri sobnoj temperature u mraku) ima značajan utjecaj na fenolni sastav lista stevije. Dobiveni rezultati pokazuju da su udjeli apigenina i kvercetina bili najveći tijekom

sušenja pri sobnoj temperaturi (0,39 mg/100 g za apigenin te 0,36 mg/100g za kvercetin). Različiti režimi sušenja značajno su utjecali i na stabilnost rutina, pa je tako sušenjem zamrzavanjem udio rutina bio najviši 20,07 mg/100 g, sušenjem vrućim zrakom nešto niži 15,08 mg/100 g, dok je sušenjem u mraku iznosio svega 7,05 mg/100 g.

Flavonoidi proantocijanidini u posljednje vrijeme privlače veliki znanstveni interes obzirom na dokazane brojne pozitivne zdravstvene učinke (Yoshida i sur., 1989; Sun i sur., 2002; Scalberti i sur., 2005; Mennen i sur., 2004.) Proantocijanidini su nehidrolizirani ili kondenzirani tanini, oligomerne i polimerne forme sastavnih jedinica flavan-3-ola. Gradivne flavan-3-ol jedinice mogu biti povezane B- tipom veze i to između C4- C8, odnosno C4 i C6 (Proantocijanidini tipa B) ili A- tipom veze (Proantocijanidini tipa A) gdje flavan-3-ol jedinice mogu biti dvostruko vezane dodatnom esterskom vezom između C2-O7 (Gu i sur., 2004). Vrsta i količina proantocijanidina prisutna u hrani ovisi o biljnoj vrsti, agronomskim faktorima, načinu rukovanja nakon berbe, proizvodnim procesima, skladištenju te metodama i načinima pripreme hrane (Schnoeter i sur., 2010). Gasmalla i suradnici (2014) navode da listovi stevije u prosjeku sadrže 5.43 – 5.91 % tanina. Preethi i suradnici (2011) istraživali su, između ostalog, utjecaj različitih otapala na izolaciju tanina iz lista stevije pa su tako ispitali učinkovitost etanola, metanola, etilacetata, kloroforma, heksana i petroletera. Dobiveni rezultati pokazuju da su daleko najviše koncentracije tanina određene u etanolnom ekstraktu. Slično, Muanda i suradnici (2011) su utvrdili koncentraciju kondenziranih tanina neznatno višu u metanol-vodenom ekstraktu u usporedbi sa vodenim ekstraktom (10.20 vs. 8.15 mg/g s.tv.). Općenito, prema pregledu literature veoma je malo podataka o sadržaju proantocijanidina u listu stevije, stoga su, između ostaloga, uzeti kao zavisna varijabla u ovom istraživanju.

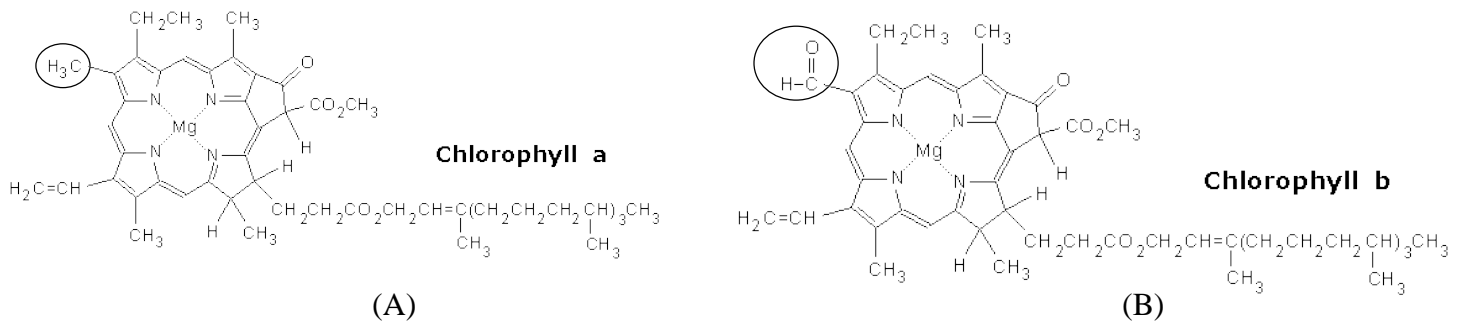
2.3.2. KAROTENOIDI I KLOROFILI LISTA STEVIJE

Fotosinteza je osnovni proces u prirodi kojim biljke i cijanobakterije uz pomoć sunčeve energije i fotosintetskih pigmenata osiguravaju organske tvari za sve žive organizme. Upravo u skupinu tih pigmenata ubrajaju se klorofili i karotenoidi.

Klorofili su pigmenti zaslužni za zelenu boju biljaka, ali i najvažniji su spojevi na zemlji zbog svoje značajne uloge u apsorpciji i prijenosu svjetlosne energije u fotosintezi (Willows, 2004). Po kemijskom sastavu, klorofili se ubrajaju u skupinu tetrapirola, a od drugih tetrapirola

razlikuju se po atomu magnezija koji se nalazi u središtu molekule te po dodatnom petom, tzv. izocikličkom prstenu (Willows, 2004). Kemijski gledano, klorofili su esteri dikarbonske kiseline klorofilina i alkohola fitola. Osnovna građevna jedinica je porfirinski prsten sa magnezijem u središtu na koji su vezana četiri pirolova prstena. Na porfirinsku jezgru, koja je hidrofilna, vezan je fitolni rep, koji je hidrofoban i lipofilan.

Klorofili *a* i *b* najvažnije su skupine klorofila u biljkama, kemijski su srodni oblici te imaju karakterističnu zelenu boju zbog apsorpcije plavog i crvenog svjetla, s tim da je klorofil *a* modrozelen, a klorofil *b* žutozelen. Njihov je kvantitativni odnos otprilike iznosi 3:1. Razlika u strukturi klorofila *a* i *b* vidljiva je na trećem (III) pirolnom prstenu. Klorofil *a* na toj poziciji ima metilnu skupinu (-CH₃) (Slika 7a), dok je kod klorofila *b* to aldehidna skupina (-CHO) (Slika 7.b) (Von Wettstein i sur., 1995). Klorofil *a* je primarni fotosintetski pigment jer se nalazi u reakcijskom središtu fotosistema i omogućuje pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku, dok u sekundarne metabolite zbog pomoćne i zaštitne uloge, ubrajamo sve ostale klorofile i druge fotosintetske pigmente (Taiz i Zeiger, 2010). Klorofili imaju anti-mutagenu i antioksidacijsku aktivnost zbog mogućnosti prekidanja reakcije radikala uzrokovane autooksidacijom putem mehanizma kojemu je vodik donor (Ferruzzi i sur., 2002).



Slika 7. Kemijska struktura klorofila *a* (A) i klorofila *b* (B) (Anonymous 3., 2014)

Karotenoidi su druga najbrojnija grupa pigmenta koja plodovima, cvjetovima i lišću daje prepoznatljivu crvenu, narančastu i žutu boju. Ubrajaju se u skupinu tetraterpena, derivata

izoprena koji sadrže 8 izoprenskih jedinica smještenih simetrično u odnosu na centar molekule. Dijele se na karotene i njihove oksidirane derivate ksantofile.

Iako se stevija u početku ponajviše istraživala zbog značaja steviozida, u novije vrijeme sve se više istraživanja usmjerava i na ostale tzv. „nešećerne komponente“ poput diterpena, triterpena, sterola, pigmenata i dr. koji predstavljaju 80- 90 % suhe tvari lista.

Ruiz-Ruiz i suradnici (2015) su istraživali sadržaj ukupnih karotenoida te klorofila *a* i *b* u dva različita meksička kultivara stevije (Criolla i Morita II) te su pokazali da se u ova dva kultivara sadržaj klorofila *a* i *b* nije značajno mijenjao ovisno o kultivaru te je iznosio oko 4 mg/g, dok je u značajno veći sadržaj ukupnih karotenoida određen u kultivaru Criolla u odnosu na kultivar Morita II (16,3 mg/g vs. 10,7 mg/g).

Abau-Arab i suradnici (2010) određivali su iste ove parametre u svježem listu stevije te u listu stevije osušenom na suncu. Dobiveni rezultati značajno su viši u usporedbi sa rezultatima Ruiz-Ruiz i sur. (2015). Maseni udio klorofila *a* svježeg lista stevije iznosio je 10,1 g/g, dok je nakon sušenja taj udio bio niži za 47,4 % te je iznosio 4,7 g/g. Za klorofil *b* početni maseni udio iznosio je 6,6 g/g, a nakon sušenja je bio za 41,3 % niži (2,7 g/g). Maseni udio ukupnih karotenoida tijekom sušenja smanjio se za čak 74,8 %, odnosno prije sušenja iznosio je 3,9 g/g, a nakon sušenja 0,76 g/g. Ovi rezultati pokazuju kako se količina karotenoida i klorofila značajno smanjuje uslijed procesa sušenja.

U istraživanju Barbe i suradnika (2015) ispitivana je primjena novih tehnika u izolaciji biološki aktivnih spojeva poput visokoelektričnog naponskog pražnjenja (HVED), pulsirajućeg električnog polja (PEF) i ultrazvuka (US). Rezultati su pokazali da primjena sve tri tehnike značajno doprinosi iskorištenju ekstrakcije te da je sadržaj klorofila čak triput bio veći nakon primjene HVED tehnike (141 kJ/kg), prosječno 1 g/100 g s.tv. za klorofil *a* te 2 g/100 g s tv. za klorofil *b*.

3.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA STEVIJE

Analiza kompleksnih bioaktivnih spojeva zahtijeva učinkovito razdvajanje analita od matrice uzorka, odnosno potrebno je provesti ekstrakciju pod određenim uvjetima. Ekstrakcija je stoga postupak potpunog ili djelomičnog izdvajanja neke tvari iz uzorka pomoću otapala pri čemu dolazi do prijenosa tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo, a tvar koja se ekstrahira mora u otapalu biti topljivija nego u polaznoj fazi (Wang i Weller, 2006).

Za ekstrakciju je važno odabrati učinkovito otapalo, pri čemu se moraju pratiti određeni parametri i značajke samog otapala poput polarnosti, temperature vrelišta, viskoznosti, stabilnosti na toplinu, kisik i svjetlo, sigurnost pri upotrebi, ali i cijenu koštanja (Albu i sur., 2004). Utjecaj različitih ekstrakcijskih otapala (vode, metanola i metanola/vode (4:1)) na izolaciju steviol glikozida iz lišća stevije ispitali su Abou-Arab i suradnici (2010). Dobiveni rezultati pokazuju da je voda najučinkovitije otapalo pri čemu se primjenom vode kao ekstrakcijskog otapala izolirano 98 % prisutnih steviozida čime se dobiva potpuno prirodni ekstrakt bez korištenja kemijskih otapala.

Postupak ekstrakcije, u idealnim uvjetima, trebao bi biti jednostavan, brz i jeftin uz dobivanje kvantitativnih analitičkih rezultata bez gubitaka i/ili razgradnje analita. Ove zahtjeve, konvencionalne tehnike ekstrakcije, kakve se danas i najviše primjenjuju, gotovo u potpunosti ne mogu ispuniti. Ipak, konvencionalne ekstrakcijske tehnike bazirane na maceraciji i toplinskoj ekstrakciji često su korištene metode za dobivanje bijelog praha stevije (Barba i sur., 2014), no u novije vrijeme, koriste se novije ekstrakcijske tehnike kao što je ubrzana ekstrakcija otapalima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta enzimama (Puri i sur., 2012), superkritična ekstrakcija fluidima (Erkucuk i sur., 2009; Prakash Chaturvedula i sur., 2011) čime se povećalo iskorištenje i produktivnost ekstrakcije u kraćem vremenskom periodu (Gasmalla i sur., 2014).

Alupului i suradnici (2009) istraživali su primjenu klasične ekstrakcije vs. ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te ultrazvukom na izolaciju steviozida u listu stevije. Prema

dobivenim rezultatima, tijekom klasične ekstrakcije došlo je do termičke degradacije steviozida pri temperaturama višim od 100 °C u vremenu dužem od 3 minute. Primjenom mikrovalova i ultrazvuka, maksimalna koncentracija steviozida postignuta je u manje od 5 minuta. Uz brojne prednosti novih tehnologija ekstrakcije, problem može biti u cijeni koštanja uređaja, specijalnim dijelovima, ali i dodatnim troškovima za postizanje uvjeta rada uređaja, kao što je uspostava magnetskog polja ili ultrazvučnih valova.

3.4.1. UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

Ubrzana ekstrakcija otapalima (eng. Accelerated Solvent Extraction, ASE ili Pressurized Solvent Liquid Extraction, PSLE) je automatizirana tehnika ekstrakcije koja primjenom povišene temperature i tlaka postiže brzo i učinkovito ekstrahiranje ciljanih spojeva iz analiziranog materijala (Slika 7.A). Visoka temperatura dovodi do bolje topljivosti analita, brže difuzije, niže viskoznosti otapala i slabljenje veza između otopine i matrice uzorka (Mustafa i Turner, 2011). Visoki tlak omogućuje da otapalo ostane u tekućem stanju i iznad točke vrenja čime se ubrzava cjelokupni proces ekstrakcije. Proces ekstrakcije najčešće završi kroz 15-25 min, uz volumni utrošak otapala od 15-45 mL, pri temperaturama od 25 °C do 200 °C i tlakovima do 20 MPa (Mottaleb i Sarker, 2012).

Od prije je poznato da ASE ekstrakcija može biti učinkovita za ekstrakciju velikog broja ekoloških onečišćivača iz zemlje, plastike, životinja, biljaka i ljudskog tkiva, a u novije vrijeme ova inovativna metoda počela se uspješno koristiti za ekstrakciju prirodnih spojeva, kao što su alkaloidi, steroidi, fenoli i terpeni. U usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije, ova metoda ekstrakcije omogućuje visok stupanj automatizacije uz veće prinose ekstrakcije i kraće trajanje cijelog procesa (Jentzer i sur., 2014)

Priprema uzoraka za ekstrakciju

Bolja efikasnost ekstrakcije zahtjeva što manju veličinu čestica (manju od 1 mm), stoga je priprema uzoraka važan korak za svaku ekstrakciju. Priprema uzoraka za ASE ekstrakciju uključuje mljevenje ili usitnjavanje analita i homogenizaciju. Kako bi se spriječilo stvaranje aglomeriranih nakupina materijala, koji umanjuju efikasnost ekstrakcije jer mogu dovesti do zaštopavanja ekstrakcijske ćelije, uzorak je potrebno pomiješati sa Ottawa pijeskom ili

dijatomejskom zemljom koja apsorbira vlagu. Tako pripremljen uzorak, postavlja se u ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika (Slika 8.B) koja se postavlja na odgovarajuće mjesto na rotirajućem dijelu unutar ASE uređaja, gdje je moguće postaviti ukupno 24 ekstrakcijske ćelije (Zaghoudi i sur., 2015) različitih volumena (1, 5, 10, 22, 34, 66 i 100 mL) (Slika 8.B) (Mottaleb i Sarker, 2012).



Slika 8. Sustav za ubranu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku (Dionex ASE 350) (A) i ekstrakcijske ćelije različitih volumena (B) (Anonymous 5., 2013)

Proces ekstrakcije

Nakon postavljanja ekstrakcijskih ćelija i podešavanja ekstrakcijskih parametara (tip otapala, statičko vrijeme ekstrakcije, broj ciklusa ekstrakcije, temperatura ekstrakcije), proces je u potpunosti automatiziran. Ćelija se zagrijava u peći, puni otapalom za ekstrakciju i tlači programirano zadano vrijeme (statičko vrijeme ekstrakcije). Otapalo koje se koristi za ekstrakciju može biti različitih polarnosti, ali odabir prvenstveno ovisi o analitu koji se ekstrahira. Po provedenom režimu ekstrakcije, ekstrakcijska ćelija ispire se sa strujom dušika (30-90 s) kako bi se posve osušila, a dobiveni ekstrakt je profiltriran te sakupljen u staklene prihvatne boce. Svježe otapalo uvodi se zadani broj puta (broj ciklusa) s ciljem otapanja preostale količine neekstrahiranog željenog spoja. Primjena većeg broja ciklusa poželjna je za uzorke s velikom koncentracijom analita, a može se prilagoditi kraćem statičkom vremenu

ekstrakcije kako bi se skratilo ukupno vrijeme ekstrakcije. Visoke temperature i tlakovi povećavaju prodiranje otapala u materijal i povećavaju topljivost analita, ubrzavajući ekstrakcijski proces kao i prinos ekstrahiranih spojeva. Obzirom je nakon ekstrakcije materijal osušen, moguće je vršiti ponovljene ekstrakcije s istim ili različitim otapalom ili primjeniti sukcesivnu ekstrakciju koristeći otapala s rastućom polarnosti.

Jetzer i suradnici (2014) su ispitivali učinkovitost ASE ekstrakcije u izolaciji steviol glikozida iz lista stevije te su utvrdili optimalne parametre ekstrakcije: (i) ekstrakcijsko otapalo: voda; (ii) temperatura ekstrakcije od 100 °C; (iii) broj ciklusa: 1; (iv) statičko vrijeme ekstrakcije: 4 min.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

3.1.1. Uzorak lista Stevije

Za izolaciju biološki aktivnih spojeva iz lista stevije korišteni su listovi biljke *Stevia rebaudiana* Bertoni, prethodno osušeni u sušnici na cca 90 % suhe tvari. Suho lišće je pakirano u dobro zatvorene plastične vrećice i do provedbe ekstrakcije skladišteno u tamnom prostoru pri sobnoj temperaturi. Neposredno prije provedbe ekstrakcije suhi listovi stevije su samljeveni pomoću električnog mlinca (Imetec Dolcevita CG1, Italy) u prah, a dobiveni prah je korišten za ekstrakcije fenolnih spojeva.

3.2 METODE RADA

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz uzorka lista stevije provedena je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (ASE) uz upotrebu destilirane vode kao ekstrakcijskog otapala. Provedene su ekstrakcije pri različitim uvjetima, tj, različitim temperaturama, vremenu trajanja ekstrakcije i broju ponavljanih ciklus ekstrakcije. U ekstraktima lista stevije provedeno je određivanje ukupnih fenola, ukupnih proantocijanidina, klorofila A te klorofila B primjenom spektrofotometrijskih metoda.

3.2.1. Izolacija bioaktivnih spojeva iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

3.2.1.1. Aparatura i pribor:

1. Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern &Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
2. ASE uređaj - Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)

3. Staklene boce za ekstrakciju (ThermoScientific, 250 mL)
4. Glass Fiber filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
5. Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika, volumena 34 mL
6. Odmjerne tikvice, volumena 100 mL
7. Plastične kivete, volumena 50 mL
8. Plastične lađice za vaganje

Princip ekstrakcije:

Na analitičkoj vagi u plastičnoj lađici odvaže se 2 g ($\pm 0,0001$) uzorka praha lista stevije. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika prvotno se postavi Glass Fiber filter papir, a potom jedna mjerica dijatomejske zemlje (~ 2,0 g) (DE, P/N 062819), na koju se potom dodaje odvagani uzorak i sve dobro promiješa sa staklenim štapićem. Nakon toga ponovno se dodaje dijatomejska zemlja do vrha ćelije (5 mm ispod gornjeg ruba). Ekstrakcijska ćelija se zatvori ručno i postavi u ASE uređaj. Prije početka same ekstrakcije, potrebno je na displayu uređaja ručno unijeti zadane parametre ekstrakcije (temperatura, vrijeme ekstrakcije te broj ciklusa ekstrakcije). U uređaj se postavlja 12 tako pripremljenih ekstrakcijskih ćelija na pozicije označene brojevima, dok se za navedene ekstrakcijske ćelije u donjem dijelu uređaja na pozicije označene brojevima postavljaju staklene bočice za sakupljanje ekstrakata. Plan eksperimenta napravljen je u računalnom programu STATGRAPHICS Centurion (StatPoint tehnologija, Inc) (Tablica 3.) pri čemu su varirani slijedeći parametri: (i) temperatura ekstrakcije (60, 80 i 100 °C); (ii) statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te (iii) broj ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3 ciklusa). Po završetku ekstrakcije, dobiveni ekstrakti kvantitativno se prenesu u odmjerne tikvice volumena 100 mL te nadopune do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju (destilirana voda). Tako pripremljen ekstrakt prenese se u dvije prethodno označene plastične kivete volumena 50 mL te se skladišti zamrzivaču na -18 °C do provođenja analize.

Tablica 3. Eksperimentalni plan pokusa ekstrakcije bioaktivnih spojeva ubrzanom ekstrakcijom otapalima uz povišeni tlak iz lista stevije

Otapalo	Statičko vrijeme ekstrakcije (min)	Temperatura (°C)	Broj ciklusa ekstrakcije
Destilirana voda	5	100	1
			2
			3
		130	1
			2
			3
		160	1
			2
			3
	10	100	1
			2
			3
		130	1
			2
			3
160		1	
		2	
		3	

4.3.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Princip metode:

Određivanje ukupnih fenola provodi se u vodenom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Muanda i sur., 2011).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
3. Staklene kivete

4. Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
5. Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
6. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
7. Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
8. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
9. Staklene epruvete
10. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Otopina natrijeva karbonata (7,5 %-tna otopina)

Priprema: Odvaže se 7,5 g anhidrida natrijeva karbonata u staklenoj čašici te se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te destiliranom vodom nadopuni do oznake.

3. Standard galne kiseline

Priprema: Odvaže se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Postupak određivanja:

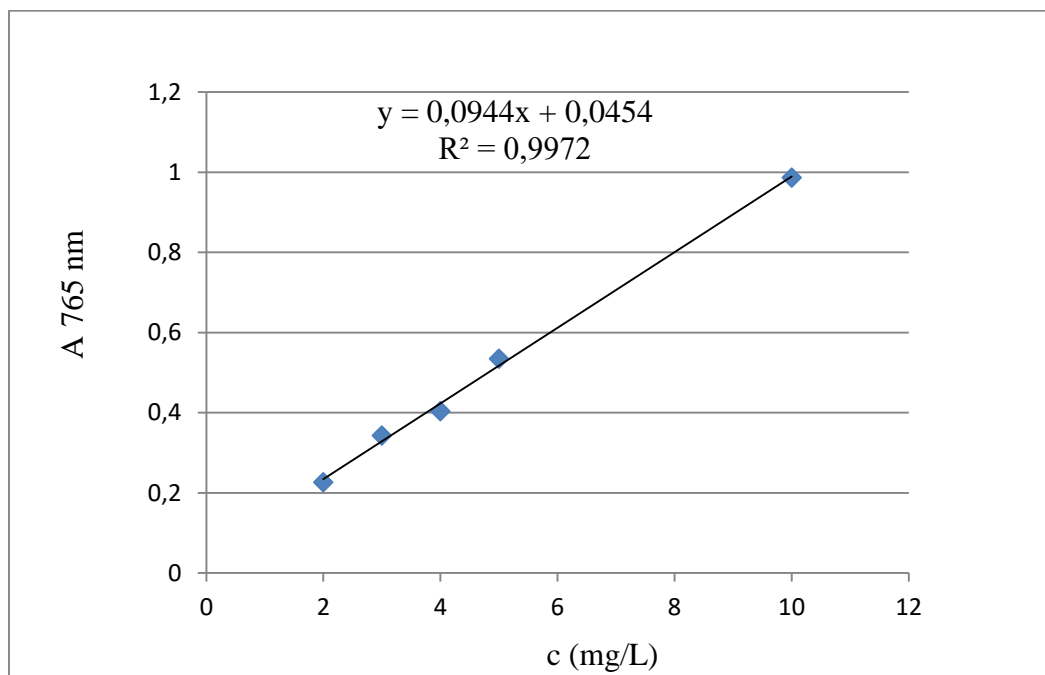
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,6 mL ekstrakta koji je 20x razrijeđen, 3 mL F.C. reagensa (koji je 10x razrijeđen), te nakon nekoliko minuta 2,4 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Sve skupa se dobro promiješa na vortexu, a potom se uzorci ostave stajati 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (destilirana voda).

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerneji tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Iz svake tikvice otpipetira se 0,6 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 3 mL F.C. reagensa (koji je 10x razrijeđen) te nakon nekoliko minuta 2,4 mL 7,5 %-tnog natrijeva karbonata. Na isti način se pripremi slijepa proba ali se umjesto otopine standarda uzima destilirana voda, odnosno otapalo za ekstrakciju. Uzorci se ostave stajati 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbanija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/100 mL), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbanije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 9. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0944 X + 0,0454$$

$$R^2 = 0,9972$$

gdje je:

Y - apsorbancija pri 765 nm,

X - koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

R²- koeficijent determinacije

$$X \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = X \text{ (mg L}^{-1}\text{)} \times V_{\text{ekstrakta}} \text{ (L)} \times \text{razrjeđenje /m (g)}$$

Maseni udjeli ukupnih fenola izraženi su kao ekvivalent galne kiseline mg GAE g⁻¹.

4.3.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH PROANTOCIJANIDINA

Princip metode:

Princip određivanja polimernih proantocijanidina temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun et al., 1998).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
4. Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
5. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
6. Odmjerne tikvice, volumena 25 mL
7. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
8. Staklene epruvete
9. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. 100 %-tni metanol
2. 1 %-tna etanolna otopina vanilina

Priprema: 1 g vanilina se u odmjerne tikvici od 100 ml nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake.

3. 25 %-tna otopina H₂SO₄

Priprema: 13,02 mL 96 %-tne H₂SO₄ prenese se u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je prethodno dodano malo 100 %-tnog metanola (cca 20 mL). Tikvica se obavezno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a konc. H₂SO₄ se dodaje u malim obrocima. Po dodatku cijelog volumena kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.

4. Standard katehina (5 g/L)

Priprema: Odvaži se 500 mg standarda katehina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

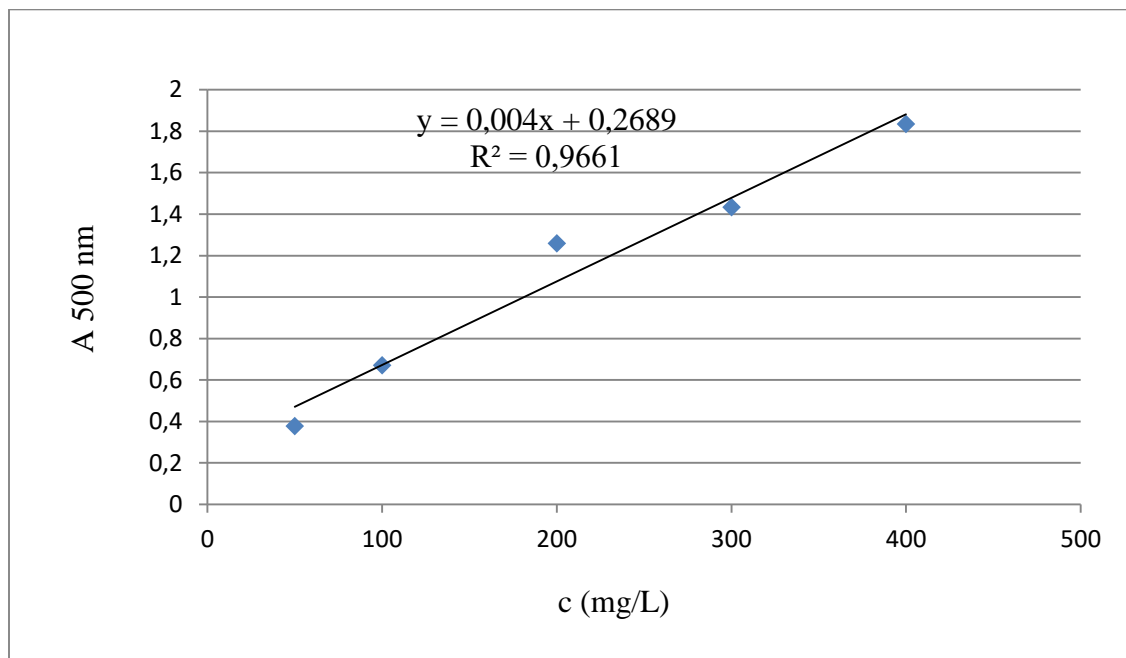
Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se 2,5 mL 1 %-tnog vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H₂SO₄ te 1 mL ekstrakta lista stevije. Reakcijska smjesa se promiješa, a potom ostavi stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se priprema i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju, tj. destilirana voda.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina koncentracije 5 g/L (500 mg/100 mL). Od te otopine prirede se slijedeća razrijeđenja: 50, 100, 200, 300 i 400 mg/100 mL na način da se otpipetira redom: 1, 2, 4, 6 i 8 mL alikvotne otopine u odmjerne tikvice od 10 mL, te se do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

Iz svake tikvice se potom otpipetira po 1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Zatim se dodaje 2,5 mL 1 %-tnog vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H₂SO₄. Reakcijske smjese stoje 10 minuta pri sobnoj temperaturi, a potom se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima metanol.



Slika 10. Baždarni pravac za katehin

Jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,004 X$$

$$R^2 = 0,9168$$

gdje je:

Y - apsorbancija pri 415 nm,

X - koncentracija katehina (mg/L)

R²- koeficijent determinacije

$$X \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = X \text{ (mg L}^{-1}\text{)} \times V_{\text{ekstrakta}} \text{ (L)} \times \text{razrjeđenje /m (g)}$$

Maseni udjeli ukupnih proantocijanidina izraženi su kao ekvivalent katehina mg CE g⁻¹.

4.3.3. ODREĐIVANJE KLOROFILA *a* i KLOROFILA *b*

Princip metode:

Određivanje klorofila i karotenoida bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra pri čemu je apsorpcijski maksimum za klorofil *a* u plavom dijelu (~430 nm) te u crvenom dijelu spektra (~660 nm) dok se apsorpcijski maksimumi za klorofil *b* nalaze između dvaju maksimuma klorofila *A*, i to na oko 450 i 640 nm. Apсорpcijski spektar svih fotosintetski aktivnih karotenoida pokazuje tri karakteristična apsorpcijska maksimuma u plavom dijelu spektra (Abou-Arab i sur., 2010; Barba i sur., 2014).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Pipete, volumena 1 mL i 5 mL
4. Staklene epruvete od 10 mL

Reagensi:

1. 85 %-tna otopina acetona

Priprema: U odmjernu tikvicu od 500 mL doda se 425 mL 100 %-tnog acetona te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Postupak određivanja:

U tikvicu od 10 mL otpipetira se 0,5 mL ekstrakta te 3 mL 85 %-tnog acetona i ostavi u mraku na sobnoj temperaturi 15 sati. Nakon toga, tikvice se nadopune 85 %-tnim acetonom do oznake te se mjeri apsorbanacija na spektrofotometru pri 440, 644 i 662 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, gdje se umjesto ekstrakta uzima 85 %-tni aceton.

Izračun:

$$\text{Klorofil } a \text{ (mg/L)} = (9.784 \times A662) - (0.99 \times A664)$$

$$\text{Klorofil } b \text{ (mg/L)} = (21.426 \times A664) - (4.65 \times A662)$$

$$\text{Ukupni karotenoidi (mg/L)} = (4.695 \times A440) - 0.369 (\text{Klorofil } a + \text{Klorofil } b)$$

$$X \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = X \text{ (mg L}^{-1}\text{)} \times V_{\text{ekstrakta}} \text{ (L)} \times \text{razrjeđenje /m (g)}$$

$$X \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} = X \text{ (mg g}^{-1}\text{)}/1000$$

Obzirom da su dobiveni rezultati za ukupne karotenoide u ekstraktu lista stevije pokazali negativne vrijednosti, izuzeti su iz ovog dijela istraživanja.

4.3.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

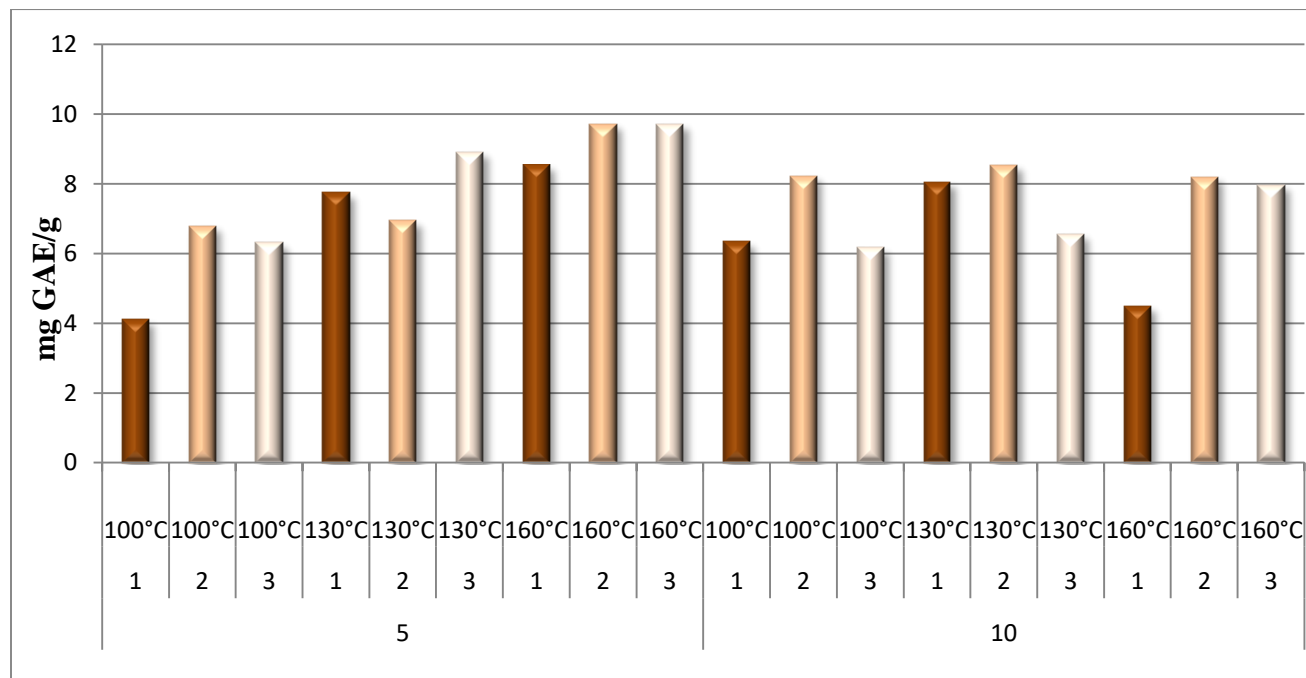
Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni statističkim programom SPSS (ver. 17). Kategorijske varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance, a marginalni prosjeci (npr. usporedbe između različitih parametara ekstrakcije) su uspoređeni s Tukey HSD testom. Izvori varijacija su temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije te broj ciklusa ekstrakcije. Svi dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

5. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (dalje: ASE ekstrakcija). ASE ekstrakcija je provedena variranjem statičkog vremena ekstrakcije (5 i 10 minuta), temperature ekstrakcije (100 °C, 130 °C i 160 °C) te broja ciklusa ekstrakcije (1, 2 ili 3 ciklusa).

Ekstrakti su podvrgnuti spektrofotometrijskom određivanju ukupnih fenola, ukupnih proantocijanidina, klorofila *a* te klorofila *b*, a rezultati su prikazani grafički kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja. U tablicama su prikazani svi dobiveni rezultati koji su statistički obrađeni te su na temelju dobivenih rezultata određeni statistički signifikantni utjecaji ispitivanih parametara na masene udjele ispitivanih skupina spojeva.

5.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA



Slika 11. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/g) izoliranih iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Tablica 4. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih fenola izoliranih iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametri ekstrakcije	n	Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/g)
Temperatura (°C)		p≤0.01 †
100	12	6.32±0.05 ^a
130	12	7.79±0.05 ^b
160	12	8.11±0.05 ^c
Statičko vrijeme ekstrakcije (min)		p≤0.01 †
5	18	7.64±0.04 ^a
10	18	7.17±0.04 ^b
Broj ciklusa		p≤0.01 †
1	12	6.55±0.05 ^a
2	12	8.07±0.05 ^b
3	12	7.61±0.05 ^c
Prosječna vrijednost		7.41±0.31

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,1$

Maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva (UF) u listu stevije određeni su u rasponu od 4,1 mg GAE/g do 9,72 mg GAE/g (Slika 11.), a prosječna vrijednost iznosi 7,41±0,31 mg GAE/g (Tablica 2.). Najveća koncentracija ukupnih fenola u listu stevije primjenom ASE ekstrakcije određena je u ekstraktima koji su dobiveni pri najvišoj temperaturi ekstrakcije, uz dva ciklusa i statičko vrijeme od 5 minuta te je iznosila 9,72 mg GAE/g.

U istraživanju Beben i suradnici (2015) za vodeni ekstrakt lista stevije maseni udio ukupnih fenola iznosio je 7,65 mg GAE/g što je u skladu s prosječnom vrijednošću masenog udjela ukupnih fenola dobivenih unutar ovog istraživanja.

Barba i suradnici (2014) su ispitivali primjenu novih tehnika ekstrakcije sa ciljem povećanja učinkovitosti izolacije fenola iz lista stevije. Korištene su tehnike visoko naponskog električnog pražnjenja (HVED), visoko pulsirajućeg električnog polja (PEF) i ultrazvuk (US) kao tehnike predtretmana u kombinaciji sa ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi uz vodu kao otapalo. Utvrđene su koncentracije ukupnih fenola u rasponu od 9.00 do 29.14 mg GAE/g, pri čemu se

HVED pokazao kao najučinkovitija, a US najmanje učinkovita tehnika. Ovi rezultati nešto su viši u usporedbi sa našim vrijednostima.

Prema dobivenim rezultatima u ovom istraživanju jasno se vidi kako se udio ukupnih fenola u listu stevije povećava s porastom temperature, pa je tako pri 100 °C zabilježen najniži (6,32 mg GAE/g), a pri 160 °C najviši maseni udio ukupnih fenola (8,11 mg GAE/g). Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanim jer se porastom temperature povećava topljivost mnogih spojeva, ali i koeficijent difuzije vode, što pospješuje bolje prodiranje otapala u matriks te tako utječe na učinkovitost ekstrakcije (Hossain, 2011).

Porast ukupnih fenola uz porast temperature ekstrakcije ranije je zabilježen u rezultatima istraživanja Hossaina (2011) analizirajući dobivene ekstrakte ružmarina, origana i mažurana primjenom ASE ekstrakcije. Temperature ekstrakcije (66, 75, 99, 120 i 129 °C) kombinirane su s različitim koncentracijama vodene otopine metanola (32, 40, 60, 80 i 88 %) uz konstantno statičko vrijeme od 5 minuta, a dobiveni rezultati pokazuju da su najveći udjeli ukupnih fenola ostvareni pri najvišoj temperaturi. Nadalje, uz optimalnu koncentraciju vodene otopine metanola ispitane su i temperature od 150 °C, 175 °C i 200 °C. Rezultati pokazuju da se koncentracija ružmarinske kiseline povećanjem temperature značajno smanjila, ali pozitivan trend porasta prinosa ukupnih fenola sa porastom temperature i dalje se nastavio.

U prilog rezultatima ovog istraživanja idu i rezultati studije Zgorke (2009) gdje je pokazano kako primjenom ASE ekstrakcije koncentracija izoflavona iz djeteline (*Trifolium L.*) povećava porastom temperature (75 °C do 125 °C) bez termičke degradacije ciljnih spojeva. Nekoliko drugih studija koje su također ispitivale učinkovitost ASE ekstrakcije također su zabilježile sličan učinak temperature na prinos izolacije fenola iz biljnog materijala (Santoyo i sur., 2009; Zaibunnisa i sur., 2009).

Analizirajući sadržaj fenola u vodenim infuzijama listića stevije, Periche i suradnici (2013) su također zaključili da porast temperature 50 °C - 70 °C - 90 °C tijekom pripreme same infuzije djeluje pozitivno na porast koncentracije ukupnih fenola u pripremljenim infuzijama.

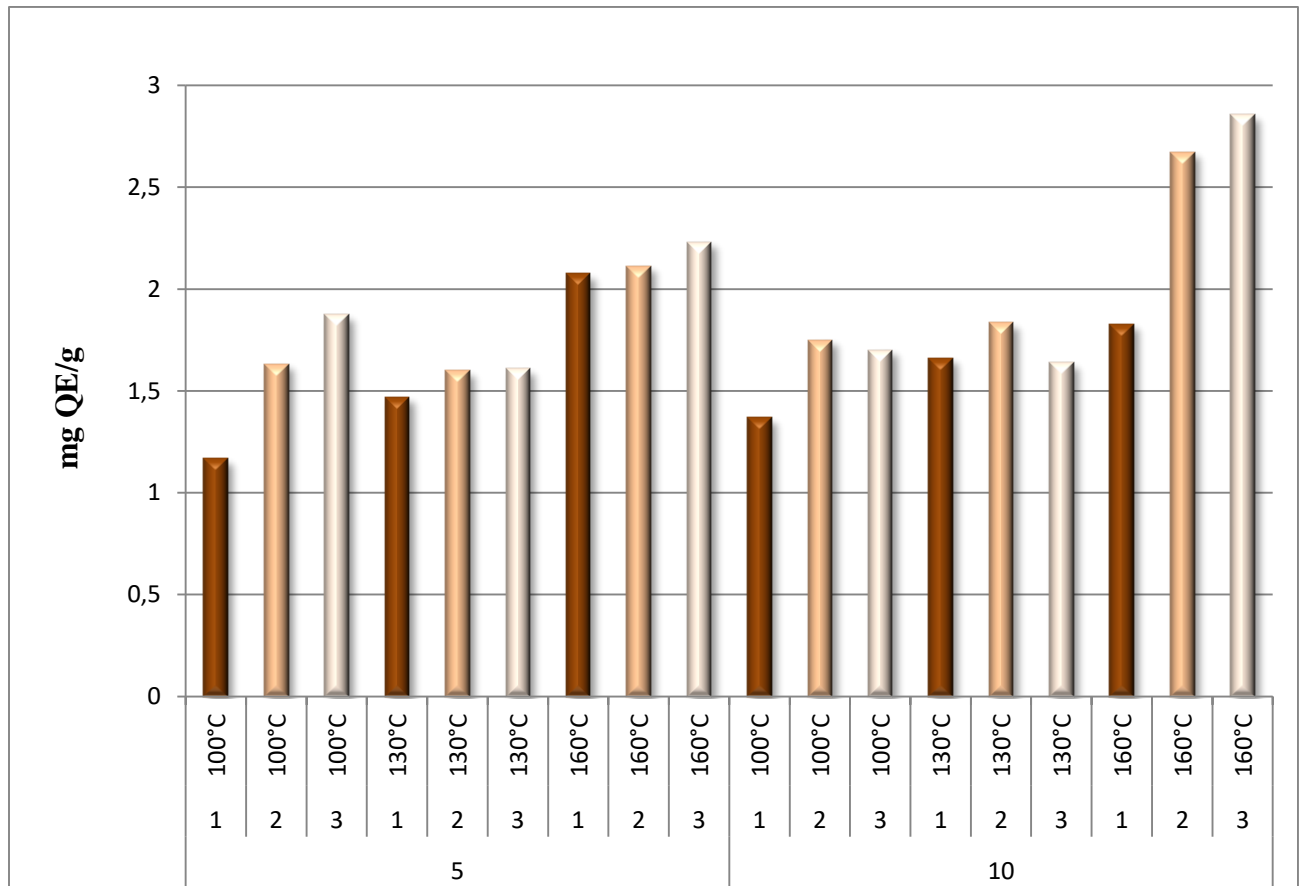
Pored temperature, učinkovitost ASE ekstrakcije ovisi i o vremenu, stoga ako se usporede statička vremena ekstrakcije od 5 i 10 min, dobiveni rezultati pokazuju da je statičko vrijeme od 5 min rezultiralo većim prinosom ukupnih fenola (7.64 vs. 7.17 mg/g). Ipak, rezultati ovog

istraživanja ukazuju na pozitivno koreliranje broja ciklusa ekstrakcije sa učinkovitošću izolacije ukupnih fenola iz lista stevije pa je tako evidentan porast udjela ukupnih fenola sa 6.55 na 8.07 mg/g kada se broj ciklusa poveća sa 1 na 2. Ipak, porast broja ciklusa na 3 neće dovesti do još većeg prinosa ukupnih fenola (7.61 mg/g). Razlog tome vjerojatno leži u činjenici da dužim vremenom ekstrakcije, uslijed ekstrakcije oksidacijskih enzima i slobodnih radikala koji reagiraju sa ekstrahiranim fenolnim spojevima čime dolazi do nepoželjne degradacije polifenola (Biesaga i Pyrzyńska, 2013).

Jentzer i suradnici (2015) su ispitivali utjecaj temperature (40-100 °C), statičkog vremena ekstrakcije (1-7 min) te broja ciklusa (1, 2, 3) na sadržaj steviol glikozida u listu stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) primjenom ASE ekstrakcije. Dobiveni rezultati upućuju da sve tri nezavisne varijable značajno doprinose učinkovitosti ASE ekstrakcije pri čemu su najveća iskorištenja ostvarena pri najvišoj temperaturi (100 °C), kraćem statičkom vremenu (4 min) i jednim ekstrakcijskim ciklusom nakon kojeg je ekstrahirano 86 % steviol glikozida. Nakon trećeg ciklusa ekstrakcije više nije bilo moguće kvantificirati količinu steviol glikozida, dok je ukupna koncentracija rebaudoizida A nakon drugog ekstrakcijskog ciklusa iznosila 3,16 g/100g suhog lista stevije, a steviozida 6,32 g/100g suhog lista stevije.

Uspoređujući novije tehnike ekstrakcije, osim ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (Jaitak i sur., 2009) kod koje ekstrakcija može trajati oko 1 min, općenito se može zaključiti da ASE ekstrakcija osigurava brzu i učinkovitu izolaciju fenolnih spojeva uz mogućnost korištenja vode kao otapala čime se osigurava čist i siguran ekstrakt. Stoga, optimalnim uvjetima za ASE ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista stevije mogu se smatrati temperatura ekstrakcije od 160 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 10 min i 2 ciklusa ekstrakcije.

5.4. ODREĐIVANJE PROANTOCIJANIDINA



Slika 12. Maseni udjeli proantocijanidina (mg katehina/g) izoliranih iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Tablica 5. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na masene udjele ukupnih proantocijana iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametri ekstrakcije	n	Maseni udjeli ukupnih proantocijana (mg katehina/g)
Temperatura (°C)		$p \leq 0.01^\dagger$
100	12	1.58 ± 0.04^a
130	12	1.64 ± 0.04^a
160	12	2.30 ± 0.04^b
Statičko vrijeme ekstrakcije (min)		$p \leq 0.01^\dagger$
5	18	1.75 ± 0.03^a
10	18	1.92 ± 0.03^b
Broj ciklusa		$p \leq 0.01^\dagger$
1	12	1.60 ± 0.04^a
2	12	1.93 ± 0.04^b
3	12	1.99 ± 0.04^b
Prosječna vrijednost		1.84 ± 0.23

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Maseni udjeli proantocijanidina u listu stevije određeni su u rasponu od 1,58 mg katehina/g do 2,30 mg katehina/g (Slika 12.), a prosječna vrijednost iznosi $1,84 \pm 0,23$ mg katehina/g (Tablica 5.).

Uzrok niskih koncentracija ekstrahiranih proantocijanidina može ležati u tome što sve biljke koje sadrže proantocijanidine, također sadrže i određeni dio ovih molekula koje nisu topljive u vodenim, već organskim otapalima. Ova grupa netopljivih proantocijanidina slična je ligninu i kovalentno je vezana uz ugljikohidrate ili njihove polimere unutar stanične stijenke (Haslam, 1989). Također, problem se može javiti i zbog samog sušenja listova. Naime, u istraživanju koje je proveo Hagerman (1988) koncentracija tanina sušenjem svježih listova hrasta u autoklavu, smanjilo je koncentraciju tanina čak za 50 %. Na temelju dobivenih rezultata, autori predlažu korištenje svježih listova biljaka za ekstrakciju tanina jer sušenje može dovesti do modifikacije relativno stabilnih kondenziranih tanina.

Najveći udio proantocijanidina u listu stevije (2,30 mg katehina/g) određen je u ekstraktima koji su dobiveni pri temperaturi od 160 °C, uz tri ciklusa ekstrakcije i uz statičko vrijeme ekstrakcije od 10 minuta. Udjeli izoliranih proantocijanidina povećavali su se povišenjem temperature, no te vrijednosti se nisu značajno mijenjale ako usporedimo udjele izolirane pri 100 °C i 130 °C, dok je signifikantno veći udio detektiran pri 160 °C. Obzirom su proantocijanidini visoko polimerne molekule, može se pretpostaviti da više temperature, kao i duže vrijeme ekstrakcije pogoduju depolimerizaciji dijela molekula, čime se molekule skraćuju te se tako pospješuje učinkovitost ekstrakcije. S druge strane, porastom temperature, smanjuje se viskoznost i površinska napetost otapala čime se omogućuje efikasnije prodiranje otapala u tkivo uzorka, utječući tako neposredno na brzinu i djelotvornost same ekstrakcije (Dai i Mumper, 2010).

Sličan trend povećanja koncentracije proantocijanidina i njihovih podjedinica uslijed porasta temperature ekstrakcije potvrdili su i rezultati drugih istraživanja. Bozan i Altinay (2014) su ispitivali utjecaj temperature (50-120 °C) i statičkog vremena ekstrakcije (5-30 min) na sadržaj flavan-3-ola u ekstraktima sjemenki grožđa dobivenih ASE ekstrakcijom. Njihovi rezultati pokazali su kako se porastom temperature sa 50 °C na 80 °C koncentracija flavan-3-ola poveća 1,5 puta, dok se taj prirast kod temperature od 120 °C poveća čak 2,5 puta.

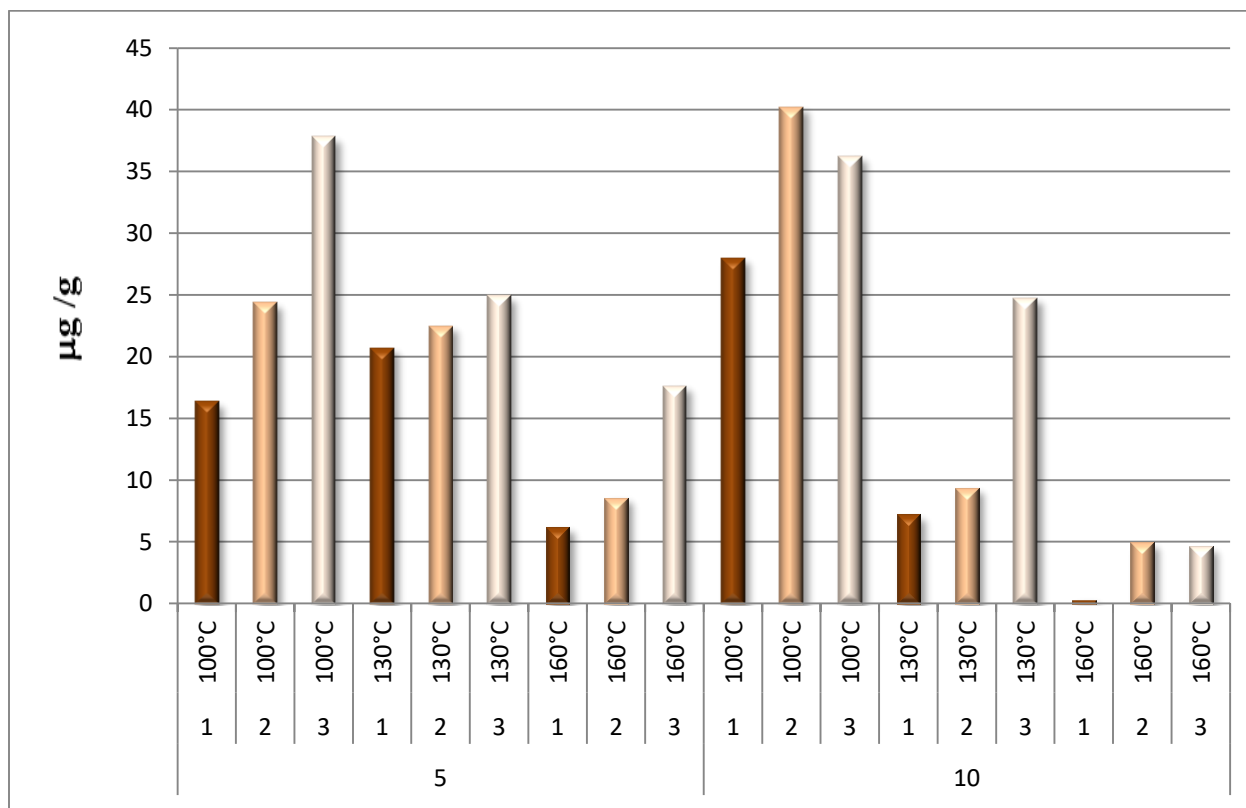
Ako se razmotri utjecaj statičkog vremena ekstrakcije, dobiveni rezultati ukazuju da se dužim statičkim vremenom (5 vs. 10 min) dobivaju signifikantno veći maseni udjeli proantocijanidina u vodenim ekstraktima lista stevije. Slično, i porast broja ciklusa značajno doprinosi povećanju masenog udjela proantocijanidina u dobivenim ekstraktima, ali to se odnosi samo za porast sa 1. na 2. ciklusa. Stoga, maseni udjeli proantocijanidina izolirani s 3. ekstrakcijska ciklusa značajno se ne razlikuju od udjela proantocijanidina izoliranih s 2 ciklusa ASE ekstrakcije (1,99 vs. 1,93 mg/g).

Rehman i suradnici (2002) uspoređivali su utjecaj vremena (2, 4, 6, 8, 10 min) i temperature (90 °C, 95° C i 100 °C) ekstrakcije tanina uz pomoć destilirane vode iz različitih komercijalnih vrsta čajeva. Prema rezultatima, porast temperature, kao i vremena ekstrakcije pozitivno su korelirali s povećanjem prinosa tanina kod svih vrsta čajeva. Za svaku ispitivanu temperaturu, dužim ekstrakcijskim vremenom se povećavala koncentracija tanina te je najveći prinos tanina bio pri vremenu od 10 minuta i 100 °C. Dobivene rezultate moguće je usporediti sa

rezultatima ovog rada, gdje je produženje statičkog vremena ekstrakcije, kao i broja ciklusa ekstrakcije, pozitivno utjecao na veći prinos izoliranih spojeva.

Na temelju dobivenih statističkih rezultata, optimalnim uvjetima za ASE ekstrakciju proantocijanidina iz lista stevije mogu se smatrati temperatura ekstrakcije 160 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 10 min i 2 ciklusa ekstrakcije.

5.5. ODREĐIVANJE KLOROFILA *a* I KLOROFILA *b*

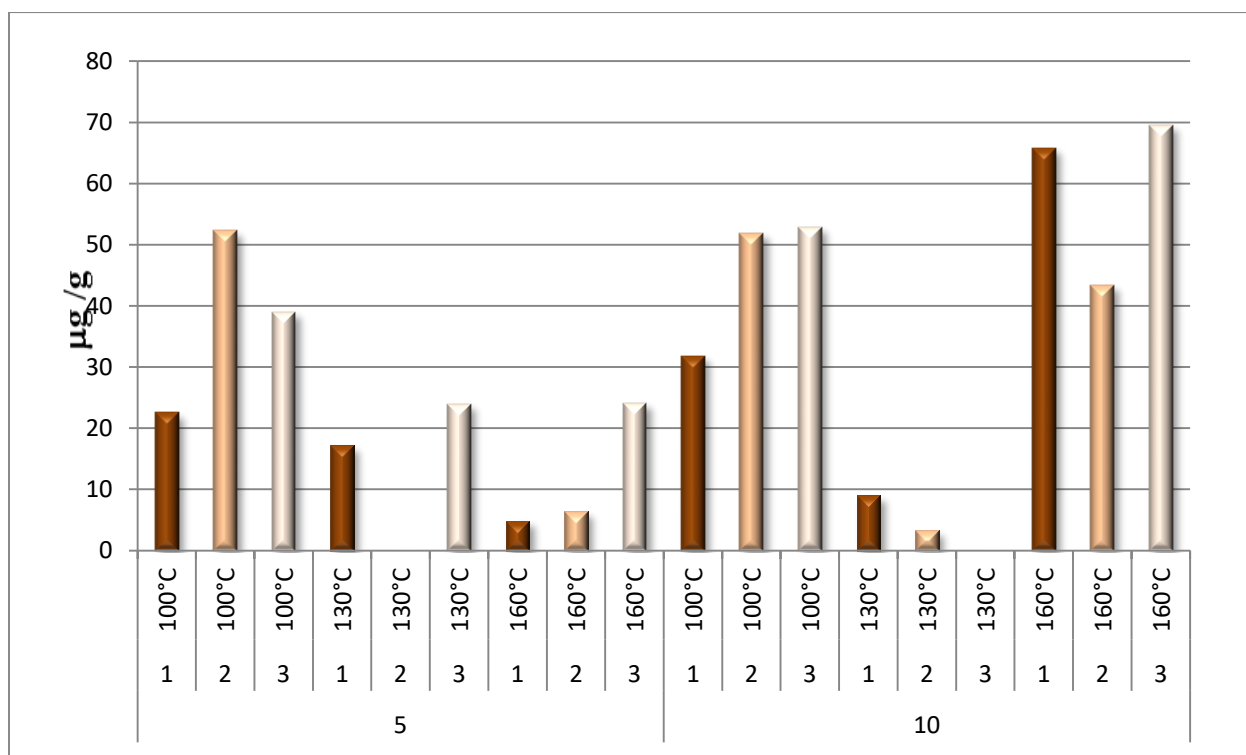


Slika 13. Maseni udjeli klorofila *a* (µg/g) izoliranih iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Tablica 6. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na masene udjele klorofila *a* iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametri ekstrakcije	n	Maseni udjeli klorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/g}$)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		$p \leq 0.01^{\dagger}$
100	12	$30.5 \pm 1.2^{\text{a}}$
130	12	$18.2 \pm 1.2^{\text{b}}$
160	12	$7.0 \pm 1.2^{\text{c}}$
Statičko vrijeme ekstrakcije (min)		$p = 0.09^{\ddagger}$
5	18	$19.9 \pm 1.0^{\text{a}}$
10	18	$17.3 \pm 1.0^{\text{a}}$
Broj ciklusa		$p \leq 0.01^{\dagger}$
1	12	$13.1 \pm 1.2^{\text{a}}$
2	12	$18.3 \pm 1.2^{\text{b}}$
3	12	$24.3 \pm 1.2^{\text{c}}$
Prosječna vrijednost		18.6 ± 1.0

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$



Slika 14. Maseni udjeli klorofila *b* ($\mu\text{g/g}$) izoliranih iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Tablica 7. Rezultati multifaktorske analize o utjecaju ekstrakcijskih parametara na masene udjele klorofila *b* iz lista stevije primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak

Parametri ekstrakcije	n	Maseni udjeli klorofila <i>b</i> ($\mu\text{g/g}$)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		$p \leq 0.01^{\dagger}$
100	12	$41.7 \pm 6.0^{\text{a}}$
130	12	$10.0 \pm 6.0^{\text{b}}$
160	12	$35.7 \pm 6.0^{\text{b}}$
Statičko vrijeme ekstrakcije (min)		$p = 0.04^{\dagger}$
5	18	$21.4 \pm 4.9^{\text{a}}$
10	18	$36.8 \pm 4.9^{\text{b}}$
Broj ciklusa		$p = 0.23^{\ddagger}$
1	12	$25.2 \pm 6.0^{\text{a}}$
2	12	$26.7 \pm 6.0^{\text{a}}$
3	12	$35.5 \pm 6.0^{\text{a}}$
Prosječna vrijednost		29.0 ± 3.0

*Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,01$

Vodeni ekstrakti stevije sadržavali su značajno više udjele klorofila *b* u odnosu na klorofil *a* sa prosječnim vrijednostima $29.0 \mu\text{g/g}$ (klorofil *b*) te $18.6 \mu\text{g/g}$ (klorofil *a*) (Tablica 6. i 7.). Više udjele klorofila *b* u odnosu na klorofil *a* odredili su i Barba i suradnici (2014) u listu stevije. Ipak, rezultati Abou-Arab i suradnika (2010) navode obratan trend, sa značajno većim udjelom klorofila *a* u odnosu na klorofil *b*, no autori su maksimume apsorpcije mjerili na drugim valnim duljinama (440, 640 te 662 nm).

Najveći maseni udio klorofila *a* u vodenom ekstraktu listu stevije određen je u ekstraktima koji su dobiveni pri temperaturi od 100°C , uz dva ciklusa ekstrakcije i uz najduže statičko vrijeme ekstrakcije 10 minuta, dok je najveći maseni udio klorofila *b* zabilježen pri temperaturi od 160°C , uz tri ciklusa ekstrakcije i statičko vrijeme od 10 minuta (Slika 13. i 14.). Abou-Arab i suradnici (2010) su u svježim listovima stevije odredili udio klorofila *a* od $0,77 \text{ mg/g}$, dok se u sušenim listovima stevije udio smanjio za 47 % te je iznosio $0,41 \text{ mg/g}$. Ove vrijednosti su više od onih dobivenih ovim istraživanjem, no autori su kao ekstrakcijsko otapalo koristili organsko otapalo metanol, koje je u usporedbi sa vodom, značajno bolje ekstrakcijsko otapalo za nepolarne spojeve. Nadalje, Abou-Arab i suradnici (2010) utvrdili su da se i maseni udio klorofila *b* smanji sušenjem za 41 % te je u sušenom listu stevije iznosio $0,27 \text{ mg/g}$. Ovi

rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima koja su pokazala da je klorofil *a* manje stabilan u usporedbi sa klorofilom *b* (Tan i Francis, 1962; Lajollo i sur., 1971; Schwartz i Von Elbe, 1983; Canjura i sur., 1991).

Ako se razmotri utjecaj temperature na izolaciju klorofila ASE ekstrakcijom dobiveni rezultati upućuju da su značajno viša iskorištenja ostvarena pri nižim temperaturama (100 °C vs. 160 °C). Ranija istraživanja su potvrdila da se uslijed povišenih temperatura u zelenom grašku dešava degradacija klorofila prema kinetici reakcije prvog reda (Úzerine i Etkisi, 2008). Degradaciju klorofila uslijed porasta temperature potvrdili su i rezultati istraživanja Petrović i suradnici (2013) koji su pokazali da porast temperature od 5 do 50 °C uzrokuje degradaciju klorofila *a* za 50 % u listovima špinata.

Utjecaj statičkog vremena na izolaciju klorofila iz lista stevije bio je od signifikantnog značaja samo za klorofil *b* gdje su dužim statičkim vremenom (10 min vs. 5 min) ostvarene veće koncentracije (36.8 vs. 21.4 µg/g). Veći broj ciklusa ekstrakcije imao je značajan utjecaj na veći prinos klorofila *a*, dok ovaj parametar nije značajno utjecao na udjele klorofila *b*.

S obzirom da nije pronađena niti jedna znanstvena publikacija sa spektrofotometrijskim određivanjem klorofila *a* i *b* u ASE ekstraktu lista stevije, rezultate za utjecaje ASE parametara na izolaciju klorofila *a* i *b* iz lista stevije nije moguće usporediti s literaturnim podacima.

Na koncu, prema statističkim podacima, optimalnim uvjetima za ASE ekstrakciju klorofila iz lista stevije mogu se smatrati temperatura ekstrakcije 100 °C i 3 ciklusa ekstrakcije, dok statičko vrijeme ekstrakcije nije odlučujući parametar.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja u vodenim ekstraktima sušenih listovima stevije uz pomoć ASE ekstrakcije, te provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Optimalni uvjeti za ekstrakciju ukupnih fenola primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku osigurani su pri temperaturi od 160 °C, statičkim vremenom od 5 minuta te uz 2 ciklusa ekstrakcije. Najveći maseni udio ukupnih fenola iz lista stevije iznosio je 9,72 mg GAE/g, sa prosječnom vrijednošću 7,41 mg GAE/g.
2. Optimalna temperatura za ekstrakciju proantocijanidina je 160 °C uz statičko vrijeme 10 minuta, te uz 2 ciklusa ekstrakcije. Najveći maseni udio proantocijanidina iznosio je 2,3 mg katehina/g, dok je prosječna vrijednost iznosila 1,84 mg katehina/g.
3. Učinkovitoj izolaciji klorofila iz vodenog ekstrakta stevije pogodovale su niže temperature ekstrakcije, stoga je temperatura od 100 °C bila optimalna za ASE ekstrakciju klorofila *a* i *b* iz vodenog ekstrakta lista stevije. Najveći maseni udjeli klorofila *a* i *b* iznosili su 0,04 mg/g i 0,07 mg/g.
4. Općenito, optimalni uvjeti ASE ekstrakcije klorofila, izuzev temperature od 100 °C, podrazumijevaju 3 ciklusa ekstrakcije, dok statičko vrijeme ekstrakcije nije signifikantan parametar.

6. LITERATURA

Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, M. F. (2010) Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertonii plant. *Afr. J. Food Sci.* **4(5)**, 269- 281.

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* **196**, 67-76.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason Sonochem.* **11**, 261–265.

Alupului, A., Calinescu, I., Lavric, L. (2009) Ultrasonic vs. Microwave Extraction Intensification of Active Principles from Medicinal Plants. *AIDIC Conference series*, **09**, 1-8.

Amzad-Hossain, M., Siddique, A., Mizanur-Rahman, S., Amzad-Hossain, M. (2010) Chemical composition of the essential oils of *Stevia rebaudiana* Bertonii leaves. *Asian J. Trad. Med.* **5 (2)**, 56–61.

Anonymous 1. (2015) National exports private limited, <<http://www.nepl.com.np/herbs/details?herb=Stevia-Sweet-Leaf/33/NE619> >. Pristupljeno 22. rujna, 2016.

Anonymous 2. (2016) < <http://professionalwhey.com.au/resources/images/faq/stevia-leaf.jpg>>. Pristupljeno 4. rujna, 2016

Anonymous 3. (2014) Food- info < <http://www.food-info.net/uk/colour/chlorophyll.htm> >. Pristupljeno 16. Rujna, 2016.

Anonymous 4. Freeland <http://www.freelandtime.com/images/Flavonoid_structure.png>. Pristupljeno 1. Listopada 2016.

Anonymous 5. (2013) Unsurpassed Extraction Technology Accelerated Solvent Extraction, Thermo Fisher Scientific.

Anonymous 6. (2015-2016) Garden plants <<http://www.gardenplantsvs.com/en/stevia-plant/model-1450-10>>. Pristupljeno 10.listopada 2016.

Apetz, N., Munch, G., Govindaraghavan, S., Gyengesi, E. (2014) Natural compounds and plant extracts as therapeutics against chronic inflammation in Alzheimer's disease--a translational perspective. *Neurol. Disord. Drug Targets* **13**: 1175–91.

Bagchi, D., Swaroop, A., Preuss, H. G., Bagchi, M. (2014) Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview. *Mutat. Re.* **768**, 69–73.

Balasundram, N., Sundaram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plant and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203.

Barba, F. J., Grimi, N., Vorobiev, E. (2014) Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *J. Food Eng.* **149**, 222–228.

Barba, F. J., Esteve, M. J., Frígola, A. (2014a) Bioactive components from leaf vegetable products. U: Studies in natural products chemistry, (Atta- ur- Rahman, ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 321–346

Barba, F. J., Criado, M. N., Belda-Galbis, C. M. Esteve, M. J., Rodrigo, D. (2014b) *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. *Food Chem.* **148**, 261-267.

Biesaga, M., Pyrzyńska, K. (2013) Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chem.* **136**, 46-54.

Brandle, J. E., Rosa, N. (1992) Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci.* **72** (4), 1263-1266

- Brandle, J. E., Starrat, A. N., Gijezen, M. (1998) *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Can. J. Plant Sci.* **78(4)**, 527-536
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Buckenhuskers, H. J., Omron, H. T. (1997) *Stevia rebaudiana* Bertoni and stevioside, sugar and its substitutes in food. *Proc. Nutr.* **7**, 157-178.
- Bozan, B., Altinay, R. C. (2014) Accelerated Solvent Extraction of Flavan-3-OL Derivatives from Grape Seeds. *Food Sci. Technol. Res.* **20 (2)**, 409-414.
- Canjura, F. L., Schwartz, S. J., Nunes, R. V. (1991) Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophyllins. *J. Food Sci.* **56**, 1639-1643.
- Carakostas, M. C., Curry, L. L., Boileau, A. C., Brusick, D. J. (2008) Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem. Toxicol.* **46**, S1-S10.
- Carakostas, M., Prakash, I., Kinghorn, D.A., Wu, C.D., Soejarto, D.D. (2012) Steviol glycosides. U: Alternative Sweeteners, (O'Brien-Nabors, L., ured.), Taylor and Francis Group, New York, USA, str., 159-181.
- Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. (2009) Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Therapeut.* **121**, 41-54.
- Cooks, N. C., Samman, S. (1996) Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, **7(2)**, 66-76.
- Crozier, A., Jagannath, I. B., Clifford, M. N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **26(8)**: 1001-43.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15(10)**, 7313-7352.

Elnaga, N. I. E. A., Massoud, M. I., Yousef, M. I., Mohamed, H. H. A. (2016) Effect of stevia sweetener consumption as non-caloric sweetening on body weight gain and biochemical's parameters in overweight female rats. *Ann. Agr. Sci.* **61(1)**, 155–163

Erkucuk, A., Akgun, I. H., Yesil-Celiktas, O. (2009) Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: identification and optimization. *J. Supercrit. Fluids* **51(1)**, 29–35.

Ferruzzi, M. G., Bohm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* **67**, 2589-2595.

Gasmalla, M. A. T. A., Yang, R. A., Amadou, I., Hua, X. (2014) Nutritional composition of *Stevia rebaudiana* bertoni leaf: effect of drying method. *Trop. J. Pharm. Res.* **13(1)**, 61–65.

Gawel-Bęben, Bujak, T., Nizioł-Łukaszewska, Z., Antosiewicz, B., Jakubczyk, A., Karaś, M., Rybczyńska, K. (2015) *Stevia Rebaudiana* Bert. Leaf Extracts as a Multifunctional Source of Natural Antioxidants. *Molecules*, **20**, 5468-5486.

Geuns, J. M. C. (2003) Stevioside. *Phytochemistry* **64**, 913–921.

Geuns, J. M., Augustijns, P., Moles, R., Buyse, J. G., Driessen, B. (2003) Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 599-607.

Ghanta, S., Banerjee, A., Poddar, A., Chattopadhyay, S. (2007) Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. *J. Agr. Food Chem.* **55**, 10962–10967.

Curr Med Chem. 2015;22(1):39-50.

Gonzalez-Abuin, N., Pinent, M., Casanova-Marti, A., Arola, L., Blay, M., Ardevol, A. (2015) Procyanidins and their healthy protective effects against type 2 diabetes. *Curr. Med. Chem.* **22(1)**, 39-50.

Goyal, S., Samsher, Goyal R. (2010) Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. *Int. J. Food Sci Nutr.* **61(1)**, 1-10.

Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. L. (2004) Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *J. Nutr.* **134**, 613–617.

Hagerman, A. E. (1988) Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *J. Chem. Ecol.* **14**, 453-461.

Haslam, E. (1989) Plant Polyphenols- Vegetable Tannins Revised. U: Chemistry and Pharmacology of Natural Products (Phillipson, J. D., Ayres, D. C., Baxter, H., ured.) Cambridge University Press, Cambridge, str. 230.

Hollman, P. C., Katan, M. B. (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **37(9-10)**: 937-42.

Hossain, M. B., C. Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., Brunton, N. P. (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem.* **126**, 339–346.

Hossain, M. B., Brunton, N. P., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., Wilkinson, M. (2008) Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants. *Rasayan J. Chem.* **1(4)**, 751–756.

Jaitak, V., Bandana, B. S., Kaul, V. K. (2009) An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytochem. Analysis*, **20(3)**, 240–245.

Jentzer, J. B., Alignan, M., Vaca-Garica, C., Rigal, L., Vilarem, G. (2014) Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **166**, 561–567.

Kim, D., Jeond, S. M, Lee, C., (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars od plums. *Food Chem.* **81**, 312-326.

- Kim, I., Yang, M., Lee, O., Kang, S. (2011) The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *Food Sci. Technol.-LEB* **44(5)**, 1328-1332
- Kroyer, G. (2010) Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *J. Verbrauch Lebens.* **5(2)**, 225-229.
- Lajollo, F., Tannenbaum, S. R., Labuza, T. P. (1971) Reaction at limited water concentrations. Chlorophyll degradation. *J. Food Sci.* **36**, 850-853.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. (2012) *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* **132(3)**, 1121–1132.
- Lindley, M. G. (2012) Natural High-Potency Sweeteners. U: Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology, (O'Donnel, K., Kearsley, M.W., ured.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, str. 185-204.
- Macheix, J. J., Fleureit, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Maiti, R. K. I, Purohit, S. S. (2008) Stevia: A miracle plant for human health. Agrobios (India) Jodhpur, India
- Makapugay, H. C., Nanayakkara, N. P. D., Kinghorn, A. D. (1984) Improved high-pressure liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. *J. Chromatogr.* **283**, 390–395.
- Mennen, L. I., Sapinyho, D., DeBree, A. (2004) Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy French women. *J. Nutr.* **134**, 923–826.
- Middleton, E. J. R., Kandaswami, C. (1992) Effect of flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Biochem. Pharmacol.* **43(6)**, 1167-1179.

Mishra, P., Singh, R., Kumar, U., Prakash, V. (2010) *Stevia rebaudiana*-A magical sweetener. *Global J. Biotech. & Biochem.* **5** (1), 62–74

Mottaleb, M. A., Sarker, S. D. (2015) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. U: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology, (Sarker, S. D. i Nahar, L., ured.), Springer Science & Bussines media, LLC, str. 75-87

Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A. (2011) Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Sci. Technol.-LEB* **44**(9), 1865-1872.

Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Act.* **703**, 8-18.

Naczka, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.* **41**(5), 1523–1542.

Oršolić, N., Goluža, E., Dikić, D., Lisičić, D., Sašilo, K., Rođak, E. (2014) Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. *Eur. J. Nutr.* **53**: 1217–27.

Periche, A., Koutsidis, G., Escriche, I. (2013) Composition of antioxidants and amino acids in *Stevia* leaf infusions. *Plant Foods Hum. Nutr.* **69**(1), 1-7.

Poolsup, N., Pongmesa, T., Cheunchom, C., Rachawat, P., Boonsong, R. (2012) Meta-analysis of the efficacy and safety of stevioside (from *Stevia rebaudiana* Bertoni) in blood pressure control in patients with hypertension. *Value in Health* **15**, A602–A681.

Pól, J., Hohnová, B., Hyötyläinen, T. (2007) Characterization of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1150**(1-2), 85–92.

Prakash, I., Dubois, G., Clos, J., Wilkens, K., & Fosdick, L. (2008) Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food Chem. Toxicol.* **46**, S75–S82.

Pravilnik o dodacima prehrani (2011) *Narodne novine* **46**, zagreb

Pravilniku o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane (2011) *Narodne novine* , **63,79**, Zagreb

Preethi, D., Sridhar, T. M., Josthna, P., Naidu, C. V. (2011) Microbial Biotechnology Studies on Antibacterial Activity, Phytochemical Analysis of *Stevia rebaudiana* (Bert.) - An Important Calorie Free Biosweetner. *J. Ecobiotechnol.* **3(7)**, 5-10.

Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J., Tiwary, A. K. (2012) Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem.* **132 (3)**, 1113–1120.

Rehman, S. U., Almas, K. I., Shahzadi, K., Bhatti, N., Saleem, A. (2002) Effect of Time and Temperature on Infusion of Tannins from Commercial Brands of Tea. *Int. J. Agr. Biol.* **4(2)**, 285-287

Rajbhandari, A., Roberts, M.F. (1983) The flavonoids of *Stevia rebaudiana*. *J. Nat. Prod.* **46**, 194–195.

Ruiz-Ruiz, J. C., Ordoñez Y. B. M., Basto, E. M., Campos, M. R. S. (2015) Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutr. Hosp.* **31(3)**, 1163-1170.

Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Señorans, F. J. i sur. (2009) Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Food Sci. Technol.-LEB*, **42(7)**, 1213–1218

Savita, S., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A., Ramakrishna, P. (2004) *Stevia rebaudiana* – A functional component for food industry. *J. Hum. Ecol.* **15(4)**, 261–264.

Scalbert, A., Manach, C., Mornad, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Cri. Rev. Food Sci.* **45**, 287–306.

Schroeter, H., Heiss, C., Spencer, J. P. E., Keen, C. L., Lupton, J. R., Schmitz, H. H. (2010) A review: Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Current knowledge and future needs. *Mol. Aspects Med.* **31**, 546–557.

Schwartz, S. J., Von Elbe, J. H. (1983) Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables. *J. Food Sci.* **48**, 1303-1306.

Simpson, C. (2016) Stevia Powder Facts: Wave Goodbye To Your Sugary Regrets, <<http://www.interestingreality.com/stevia-powder-facts-wave-goodbye-to-your-sugary-regrets/>>. Pristupljeno 19. Listopada 2016.

Sun, B., Conceicao, L., Ricardo Da Silva, J. M., Spranger, I. (1998) Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerize. *J. Agric. Food Chem.* **46** (4), 1390–1396.

Sun, C. L., Yuan, J. M., Lee, M. J., Yang, C. S., Gao, Y. T., Ross, R. K., Yu, M. C. (2002) Urinary tea polyphenols in relation to gastric and esophageal cancers: a prospective study of men in Shanghai, China. *Carcinogenesis* **23**, 1497–1503.

Tadhani, M. B., Patel, V. H., Subhash, R. (2007) In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Compos. Anal.* **20(3–4)**, 323–329.

Taiz L., Zeiger, E. (1998) Stress Physiology. U: Plant Physiology (Bressan, R.A., Lacy R.B.,ured.), Sinauer Associates, Sunderland, str. 591-614.

Tan, C. T., Francis, F. J. (1962) Effect of processing temperature on pigments and color of spinach. *J. Food Sci.* **27**, 232-240.

Uyanikgil, Y., Cavusoglu, T., Balcioğlu, H. A., Gurgul, S., Solmaz, V., Ozlece, H. K., Erten, E., Erbas, O. (2016) Rebaudioside A inhibits pentylenetetrazol-induced convulsions in rats. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **32(9)**: 446-51.

- Virendra, V., Kaplagam, P. (2008) Assessment of Stevia (*Stevia rebaudiana*) natural sweetener: A review. *J. Food Sci. Tech.* **45(6)**, 467-473.
- Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C. (1995) Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell* **7(7)**, 1039–1057.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Review Article, *Trends Food Sci. Tech.* **17 (6)**, 300-312.
- Wallin, H. (2007) Steviol glycosides. 63rd Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) – Chemical and Technical Assessment (CTA): 1-7
- Walters, D.E. (2013) The Sweetner Book. < http://www.sweetenerbook.com/stevia_2.html> .
Pristupljeno 14. listopada 2016.
- Williams C. A., Grayer R. J. (2004) Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Report*, **21(4)**, 539–573.
- Willows, R. D. (2004) Chlorophylls. U: *Plant Pigments and their Manipulation* (Davies, K. ured.), Blackwell Publishing, Oxford, str. 23-56.
- Wollenweber, E. (1988) Occurrence of flavonoid aglycones in medicinal plants. *Prog. Clin. Biol. Res.* **280**, 45-55.
- Wolwer-Rieck, U. (2012) The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 886-895.
- Xili, L., Chengjiany, B., Eryi, X., Reiming, S., Yuengming, W., Haodong, S. Zhiyian, H. (1992) Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food Chem. Toxicol.* **30(11)**, 957–965.
- Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K. (1989) Studies of inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids vs. radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on DPPH radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1919–1921.

Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., Kalthoum-cherif, J., Vanderesse, R., Frochot, C., Guiavarc'h, Y. (2015) Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chem.* **184**, 131-139.

Zaibunnisa, A. H., Norashikin, S., Mamot, S., Osman, H. (2009) An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (*Curcuma domestica*) using pressurised liquid extraction (PLE). *Food Sci. Technol.-LEB*, **42(1)**, 233–238.