



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OBSAH VYBRANÝCH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK VE STÉVII CUKERNÉ

AMOUNT OF SELECTED BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN STEVIA REBAUDIANA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

VLADIMÍRA PORUBČANOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0737/2012** Akademický rok: **2012/2013**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Vladimíra Porubčanová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)
Vedoucí práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Obsah vybraných biologicky aktivních látek ve Stévii cukerné

Zadání bakalářské práce:

Literární část:

- 1) Botanický popis stévie cukerné
- 2) Obsahové látky rostliny
- 3) Využití stévie v potravinářství a přehled trhu s výrobky obsahujícími stévii
- 4) Metody stanovení vybraných biologicky aktivních látek

Experimentální část:

- 1) Stanovení vybraných obsahových látek v extraktech stévie cukerné
- 2) Zpracování a vyhodnocení získaných dat

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2013

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Vladimíra Porubčanová
Student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá rastlinou, nazývanou stévia sladká a analýzou fenolických látok v extraktoch z nej. Teoretická časť zahŕňa botanický popis rastliny, jej chemické zloženie i vplyv na ľudské zdravie. Zaoberá sa tiež sladidlom vyrobeným zo stévie, označeným ako E 960: steviol-glykozidy. V práci je uvedený i zoznam firiem, ktoré vyrábajú toto sladilo, vrátane potravinárskych výrobkov, v ktorých je použité.

Experimentálna časť je zameraná na stanovenie fenolických látok v extraktoch zo stévie, pretože listy rastliny sa najčastejšie využívajú na sladenie čaju. Cieľom bolo zistiť, ako sa mení obsah fenolických látok vylúhovaním listov pri rôznom čase, ale i rôznej teplote vody. Tiež bol porovnaný obsah týchto látok v listoch z rôznych vzoriek rastlín.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with plant, called stevia rebaudiana and analysis of phenolic compounds in the extracts from it. The theoretical part describes its botanical characteristics, chemical constitution and effect on humans health. This thesis is interested in sweetener, produced from stevia, commercially used as E 960: steviol-glycosides, too. There is listed register of companies producing this sweetener and food products, where stevia is used in.

The experimental part of thesis is focused to analysis of total phenolic content in stevia extracts, because leaves of stevia are primary used for sweetening of tea. The main aim of the thesis was find out, how is total phenolic content changed during extraction of leaves in time, in water with different temperature and in different samples.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Stévia sladká, sladidlo, extrakty, fenolické látky

KEYWORDS

Stevia rebaudiana, sweetener, extracts, phenolic compounds

PORUBČANOVÁ, V. *Obsah vybraných biologicky aktivních látek ve Stévii cukerné*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 47 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala svojej vedúcej RNDr. Milene Vespalcovej, Ph.D. za umožnenie spracovania témy, ktorá ma zaujíma, ale i za odborné vedenie, konzultácie a čas, ktorý mi venovala počas celej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Prehľad o histórii, charakteristike a pestovaní Stévie sladkej.....	8
2.1.1	Pôvod a rozšírenie Stévie sladkej	8
2.1.2	Botanická charakteristika	9
2.1.3	Pestovanie Stévie sladkej.....	9
2.2	Chemické zloženie Stévie sladkej.....	10
2.2.1	Sacharidy	11
2.2.2	Proteíny.....	11
2.2.3	Minerálne látky.....	11
2.2.4	Lipidy.....	12
2.2.5	Vitamíny	12
2.2.6	Diterpénové glykozidy	13
2.2.7	Polyfenolické látky	16
2.2.8	Stereobiny a iné chemické zlúčeniny	17
2.3	Vplyv stévie na ľudské zdravie.....	18
2.3.1	Anti-hyperglykemické účinky	19
2.3.2	Účinky na zníženie vysokého krvného tlaku	19
2.3.3	Protizápalové účinky a vplyv na rakovinu	19
2.3.4	Antimikrobiálne účinky	20
2.3.5	Antioxidačné účinky	20
2.3.6	Vplyv na tvorbu zubného kazu	20
2.3.7	Liečba hnačky.....	20
2.3.8	Bezpečnosť stévie	21
2.4	Použitie, stabilita a interakcie steviol-glykozidov s potravinami	21
2.4.1	Stabilita sladidla steviol-glykozidov pri zmenách teploty.....	21
2.4.2	Stabilita sladidla pri rôznom pH a rôznej teplote	22
2.4.3	Stabilita sladidla v organických kyselinách.....	23
2.4.4	Vzájomné pôsobenie stéviozidu a vitamínov rozpustných vo vode.....	23
2.4.5	Stabilita a interakcie sladidla v horúcich nápojoch	24
2.5	Legislatíva stévie a jej využitie v potravinárstve.....	24
2.6	Metódy stanovenia fenolických látok v stévii	25
2.6.1	Vysoko účinná kvapalinová chromatografia (HPLC)	25
2.6.2	Metóda s využitím Folin-Ciocalteuového činidla	26
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
3.1	Použité pomôcky a prístroje.....	27
3.2	Použité chemikálie	27
3.3	Použité vzorky, postupy a metódy	27
3.3.1	Vzorky stévie sladkej.....	27
3.3.2	Príprava roztokov	27
3.3.3	Príprava kalibračnej závislosti.....	27
3.3.4	Príprava extraktov zo vzoriek listov stévie sladkej	28
3.3.5	Stanovenie celkového obsahu fenolických látok.....	29
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	30

4.1	Stanovenie celkového obsahu fenolických látok v závislosti na čase	30
4.2	Stanovenie celkového obsahu fenolických látok v závislosti na teplote vody	30
4.3	Stanovenie celkového obsahu fenolických látok po dlhšej dobe vylúhovania	31
4.4	Stanovenie fenolických látok v extraktoch z rôznych vzoriek	32
5	ZÁVER.....	34
6	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	35
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	38
8	ZOZNAM PRÍLOH	39
9	PRÍLOHY.....	40

1 ÚVOD

Stévia sladká (latinsky *Stevia rebaudiana* Bertoni) je tropická rastlina, ktorá pochádza z Južnej Ameriky, odkiaľ sa postupne rozšírila do celého sveta. Je možné ju pestovať i v miernom pásme, avšak rastlina nie je schopná vonku prezimovať.

Táto rastlina je výnimočná tým, že jej listy sú 30-45krát sladšie než sacharóza, pretože obsahujú sladké látky, nazývané steviol-glykozidy. Tieto látky sú až 300krát sladšie než sacharóza. Vďaka nim túto rastlinu používajú Indiáni v Južnej Amerike už mnoho rokov, napríklad na sladenie čaju. V Japonsku sa používa ako prírodné neenergetické sladidlo vhodné pre diabetikov od sedemdesiatych rokov 20. storočia [1]. Európska únia však dlho skúmala jej účinky i bezpečnosť, preto schválila jej používanie až v roku 2011. Odvtedy rôzne firmy vyrábajú steviol-glykozidy vo forme stolového sladidla a tiež čiastočne alebo úplne nahrádzajú sacharózu v niektorých potravinárskych výrobkoch, predovšetkým v nápojoch.

Extrakty zo stévie majú priaznivý vplyv na ľudské zdravie. Majú schopnosť znižovať krvný tlak i hladinu glukózy v krvi. Nezanedbateľné sú i antioxidantné účinky, ktoré má rastlina vďaka fenolickým látkam. Výhodou sladidla na báze extraktu zo stévie je, že nespôsobuje zubný kaz, ani neprispieva k obezite. Práve preto sa považuje za výbornú náhradu sacharózy, vďaka čomu má veľkú perspektívu.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Prehľad o histórii, charakteristike a pestovaní Stévie sladkej

2.1.1 Pôvod a rozšírenie Stévie sladkej

Pôvodná oblasť, z ktorej stévia pochádza je severovýchod Paraguaya v oblasti Amazonky, západne od And, v blízkosti rieky Yapame a v južnej Brazílii (oblasť Mato Grosso do Sul). Rastie v nadmorskej výške 200-6 000 m v blate, na brehoch riek alebo na trávnatých pampách. Ako sladidlo bola stévia používaná Indiánmi, hlavne z kmeňa Guarani. Nazývali ju Azuca-caá (sladká tráva), či Kaá-he-é a okrem sladidla do čaju Maté ju používali i v medicíne, na liečenie pálenia záhy a ďalších zdravotných problémov.

Stévia bola do Európy privezená Španielskymi dobyvateľmi už v 16. storočí, do Japonska sa dostala až v roku 1971, pretože Paraguajská vláda zakázala vývoz semien. Pokusne bola pestovaná predovšetkým na ostrovoch Hokkaido a Okinawa. Po šiestich rokoch začala Japonská firma Maruzen Kasei Co. obchodovať s extraktom zo stévie. V súčasnosti je najväčším svetovým producentom práve Japonsko. Vypestuje niekoľko desiatok tisíc ton suchých listov ročne a vyrába približne 3 000 ton sladidla. Stévia sladká sa postupne rozšírila aj do ďalších štátov juhovýchodnej a východnej oblasti Ázie, ako sú Čína, Kórea, Thajsko a Vietnam. V súčasnosti sa pestuje aj v USA, Nemecku, Bulharsku i na Slovensku. [2,3]



Obrázok 1: Stévia sladká [4]

2.1.2 Botanická charakteristika

Stévia je rod, ktorý zahŕňa približne 200 druhov rastlín, avšak len niekoľko z nich sa vyznačuje sladkou chuťou.

Prvýkrát bola stévia sladká popísaná v roku 1887 paraguayským prírodovedcom dr. Bertonim, ktorý jej pôvodný názov *Eupatorium rebaudianum* zmenil na *Stevia rebaudina Bertoni* v roku 1905. Táto pôvodne jednoročná bylina bola neskôr vyšľachtená na viacročnú. Patrí do čeľade astrovité, *Asteraceae*.

Jej bohato vetvená stonka dorastá do výšky 0,3-1,8 m. Mladé rastliny majú stonky a listy chlpaté, neskôr je ochlpenie redšie. Korene sú pomerne slabé a rozkladajú sa nízko pod povrchom pôdy. Ako jediný orgán tejto rastliny neobsahujú sladké látky. Zelené listy, 3-8 cm dlhé a 2-3,5 cm široké sú úzko deltovité až vajcovité, v hornej časti výrazne vrúbkované. Pred začiatkom kvitnutia sú listy na výhonkoch s kvetmi užšie a celkovo menšie. Úbory sú rozložené vo vrcholovej časti stonky a tvorí ich 3-5 trúbkovitých kvetov. Kvety sú drobné, rúrkovité, obojpohlavné, bielej, prípadne ružovkastej farby. Kalich je tvorený piatimi zrastenými lístkami. V korune je uložených päť tyčiniek s dlhými nitkami a dvojklaná blizna.

Hlboká koruna a úzky trúbkovitý tvar kvetu spôsobujú ťažší prístup opelenia hmyzom, dôsledkom čoho je priemerne asi len 25% klíčivosť. Semená sú uložené v úzkych tmavohnedých nažkách, približne 3 mm dlhých, ktoré sú vďaka chlpkom ľahko prenášané vetrom. Pomerne rýchlo strácajú klíčivosť, za štyri mesiace až o 40-70 %. Rozmnožovaním semenami nie je možná produkcia homogénnej populácie, dôsledkom čoho je rozmanitosť dôležitých vlastností ako napríklad zloženie a stupeň sladkosti. Stévia je práve preto najčastejšie rozmnožovaná odrezkami stoniek, ktoré sa ľahko zakoreňujú. [2,3,4]



Obrázok 2: *Stévia sladká* (1 – časť rastliny, 2 – list, 3 – súkvetie, 4 – kvet, 5 – plod). [2]

2.1.3 Pestovanie Stévie sladkej

Vo svete je rozšírených približne 90 druhov stévie sladkej v závislosti na odlišných klimatických podmienkach počas pestovania. Stévia je nenáročná rastlina, ktorá veľmi dobre rastie prevažne na hlinitopiesočnatých pôdach s dostatočnou vlhkosťou. Hladina spodnej vody by

mala byť v hĺbke 0,3-0,5 m. Pri nedostatku vody môžu stonky a listy rýchlo vyschnúť, avšak po dodaní vlhky sa znovu obnovia. Najvhodnejšia teplota pre jej pestovanie je v rozmedzí 20-24 °C. Poklesom teploty pod 9 °C rastlina vyhynie. Preto môže byť v tropických oblastiach pestovaná ako trvalka. Avšak v miernom pásme a v oblasti Stredozemného mora s horúcimi a daždivými letami sa pestuje len ako jednoročná plodina rastúca od jari do jesene alebo je pestovaná v skleníkoch. Dlhšie dni podporujú úrodu listov i obsah stéviozidu, kratšie dni podporujú úrodu kvetov.

Rastliny môžu byť využívané na komerčnú produkciu až 8 rokov, pričom zber vegetatívnych častí sa uskutočňuje 6krát ročne. Keďže korene ostávajú v zemi, rastlina sa môže rýchlo regenerovať. Množstvo suchých listov získaných z jednej rastliny sa pohybuje v rozmedzí od 15 do 35 g. Rastliny vysadené na jednom hektári pôdy môžu produkovať 1 000-1 200 kg suchých listov, z ktorých je možné získať množstvo 60-70 kg stéviozidu. V porovnaní s cukrovou repou či cukrovou trstinou je to menej, avšak množstvo 70 kg stéviozidu, ktorý je 300krát sladší než sacharóza, je ekvivalentné výt'azku 21 000 kg cukru z jedného hektáru cukrovej repy alebo trstiny.

Stévia nemá vysoké nároky na výživu, vyžaduje hlavne časté povrchové zavlažovanie. Zvyčajne sa zavlažovanie aplikuje najmenej raz za týždeň alebo keď vrchol stonky začne upadať. [4]



Obrázok 3: Pestovanie stévie [5]

2.2 Chemické zloženie Stévie sladkej

Táto rastlina je výborným zdrojom cukrov, bielkovín a vlákniny. Obsahuje glykozidy, vďaka ktorým majú jej listy a stonka sladkú chuť. Na analýzu zloženia stévie sa využíva extrakt zo suchých listov. Zloženie stévie pestovanej v odlišných podmienkach sa líši. V tabuľke 1 je uvedené množstvo analyzovaných látok podľa viacerých prírodovedcov. [4]

Tabuľka 1: Analýza látok v suchých listoch stévie [g v 100 g] [4]

Zložka	Mishra a kol. (2010)	Goyal a kol. (2010)	Serio (2010)	Kaushik a kol (2010)	Abou-Arab a kol. (2010)
Vlhkosť	7	4,65	nezistené	7,7	5,37
Proteíny	10	11,2	11,2	12	11,4
Lipidy	3	1,9	5,6	2,7	3,73
Popol	11	6,3	nezistené	8,4	7,41
Sacharidy	52	nezistené	53	nezistené	61,9
Vláknina	18	15,2	15	nezistené	15,5

2.2.1 Sacharidy

Korene a listy rastliny obsahujú inulín, čo je fruktooligosacharid. Bežne sa vyskytuje v rastlinách ako zásobná látka, ktorá nahrádza škrob. Má dôležité vlastnosti, ktoré vplyvajú na činnosť metabolizmu lipidov a reguláciou cukrovky. Braz de Oliveira a ďalší, získali z koreňov jednej rastliny výťažok 4,6 % čistých fruktooligosacharidov. Z listov bol získan iba 0,46 % tejto zásobnej látky. Vďaka tomu je možné uplatnenie používania extraktov ako doplnku pri diéte. [4]

2.2.2 Proteíny

V roku 2007 bolo v listoch stévie identifikovaných 9 aminokyselín, konkrétne: lyzín, serín, izoleucín, alanín, prolín, tyrozín, metionín, kyselina asparágová a kyselina glutámová. O tri roky neskôr bolo zistených 17 aminokyselín, klasifikovaných ako esenciálne i neesenciálne. Tabuľka 2 uvádza, že listy stévie obsahujú takmer všetky aminokyseliny nevyhnutné pre ľudské telo, vrátane cysteínu a tyrozínu. [4]

Tabuľka 2: Obsah aminokyselín v extrakte z listov stévie [4]

Esenciálne aminokyseliny	g na 100 g	Neesenciálne aminokyseliny	g na 100 g
Metionín	1,45	Tyrozín	1,08
Treonín	1,13	Alanín	0,56
Histidín	1,13	Serín	0,46
Leucín	0,98	Kyselina glutámová	0,43
Fenylalanín	0,77	Cysteín	0,40
Lyzín	0,70	Kyselina asparágová	0,37
Valín	0,64	Glycín	0,25
Arginín	0,45	Prolín	0,17
Izoleucín	0,42		

2.2.3 Minerálne látky

Vo významnom množstve boli v listoch stévie zistené i minerály: draslík, vápnik, horčík a sodík, ktoré sú dôležitou súčasťou výživy. Výskyt týchto minerálov je priaznivý pre zdravie. Množstvo makro a mikro prvkov, ktoré boli identifikované viacerými vedcami v listoch

stévie, je zobrazené v tabuľke 3. Rôzny obsah minerálov podľa viacerých autorov môže byť spôsobený odlišnými podmienkami, v ktorých bola rastlina pestovaná. [4]

Tabuľka 3: Obsah minerálov s suchých listoch stévie podľa viacerých prírodovedcov v g na 100 g [4]

Minerály	Mishra a kol. (2010)	Goyal a kol. (2010)	Serio (2010)	Kaushik a kol. (2010)	Abou-Arab a kol. (2010)
Vápnik	464,4	544	600	722	17,7
Fosfor	11,4	318	318	nezistené	nezistené
Sodík	190	89,2	nezistené	32,7	14,93
Draslík	1800	1780	1800	839	21,15
Železo	55,3	3,9	3,9	31,1	5,89
Horčík	349	349	500	nezistené	3,26
Zinok	1,5	1,5	nezistené	nezistené	1,26

2.2.4 Lipidy

Olej z listov stévie obsahuje 6 mastných kyselín: palmitovú, steárovú (nasýtené mastné kyseliny), olejovú, palmitolejovú (nenasýtené mastné kyseliny s jednou dvojitou väzbou), linolovú (nenasýtená mastná kyselina s dvomi dvojitými väzbami) a linolénovú (nenasýtená mastná kyselina s tromi dvojitými väzbami). Tabuľka 4 udáva obsah mastných kyselín v oleji z listov stévie, pričom je zrejmé, že kyselina palmitová je v ňom obsiahnutá najviac. Naopak, množstvo kyseliny steárovej je najmenšie. Pomerne vysoký obsah kyseliny linolénovej prispieva k ideálnemu podielu mastných kyselín v ľudskej strave. [4]

Tabuľka 4: Obsah mastných kyselín identifikovaných v stévií [4]

Mastná kyselina	g v 100 g
Kyselina palmitová (C16)	27,51
Kyselina palmitolejová (C16-1)	1,27
Kyselina steárová (C18)	1,18
Kyselina olejová (C18-1)	4,36
Kyselina linolová (C18-2)	12,40
Kyselina linolénová (C18-3)	21,59

2.2.5 Vitamíny

Množstvo vitamínov rozpustných vo vode, izolovaných zo stévie, je uvedené v tabuľke 5. Obsah vitamínov v listoch je väčší než ich obsah v stonke. V extrakte z listov má najvyšší obsah kyselina listová, za ktorou nasleduje vitamín C, avšak v extrakte zo stonky je to naopak. Zo stanovovaných vitamínov bolo okrem kyseliny listovej a vitamínu C izolované malé množstvo vitamínu B2. [4]

Tabuľka 5: Obsah vitamínov, rozpustých vo vode v extrakte z listov i stonky [4]

Vitamín rozpustný vo vode	Listy mg v 100 g	Stonka mg v 100 g
Vitamín C	14,98 ± 0,07	1,64 ± 0,02
Vitamín B2	0,43 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Vitamín B6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Kyselina listová	52,18 ± 0,21	0,09 ± 0,01
Niacín	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Thiamín	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

2.2.6 Diterpénové glykozidy

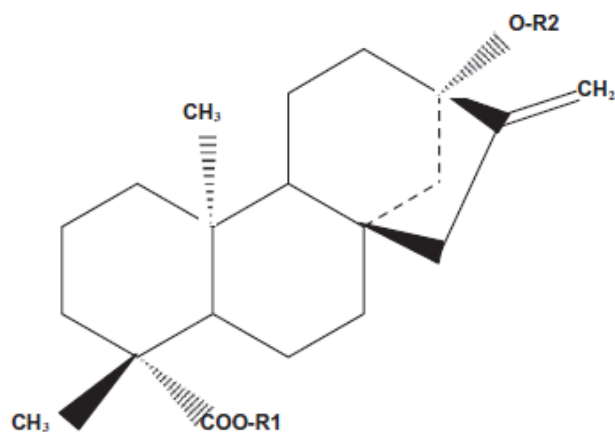
Glykozidy sú zlúčeniny obsahujúce sacharidovú zložku naviazanú na nesacharidovú časť, nazývanú aglykón. Sú to sekundárne metabolity produkované hlavne rastlinami a môžu byť degradované alkalicou hydrolyzou. Majú špecifické názvy podľa typu cukru, ktorý obsahujú, ako napríklad glukozidy, pentozidy, fruktozidy, a iné. Prírodné sladké látky v listoch stévie, nazývané steviol-glykozidy, sú diterpény, izolované a identifikované ako stéviozid, steviolbiozid, rebaudiozid A, B, C, D, E, F a dulkozid A. Pretože z týchto zlúčenín ľudský organizmus nezískava energiu, patria medzi neenergetické sladidlá. Množstvo prítomných glykozidov závisí od podmienok, v ktorých bola rastlina pestovaná. (tabuľka 6). [4,6]

Tabuľka 6: Percentuálne množstvo glykozidov v listoch stévie podľa viacerých prírodovedcov [4]

Typ glykozidu	Gardana a kol. (2010)	Goyal a kol. (2010)	Kinghorn a Soejarto (1985)
Stéviozid	5,8 ± 1,3	9,1	5 – 10
Rebaudiozid A	1,8 ± 1,2	3,8	2 – 4
Rebaudiozid C	1,3 ± 1,4	0,6	1 – 2
Dulkozid A	nezistené	0,3	0,4 – 0,7

Snaha popísať chemickú štruktúru sladkých zložiek stévie začala v 20. storočí. Počas sedemdesiatych rokov 20. storočia izoloval a popísal ich štruktúru dr. Osamu Tanaka na Hirošimskej Univerzite v Japonsku.

Všetky diterpény glykozidov získané z listov stévie majú rovnakú steviolovú kostru a líšia sa hlavne v obsahu sacharidového zvyšku (R1 a R2), mono-, di-, trisacharidov obsahujúcich glukózu, prípadne ramanózu na pozícií C13 a C19. Sladkosť rebaudiozidov stúpa s rastúcim množstvom sacharidových jednotiek naviazaných na steviolový aglykón (tabuľka 7), avšak ich obsah v rastline zároveň klesá. [4,6,7]



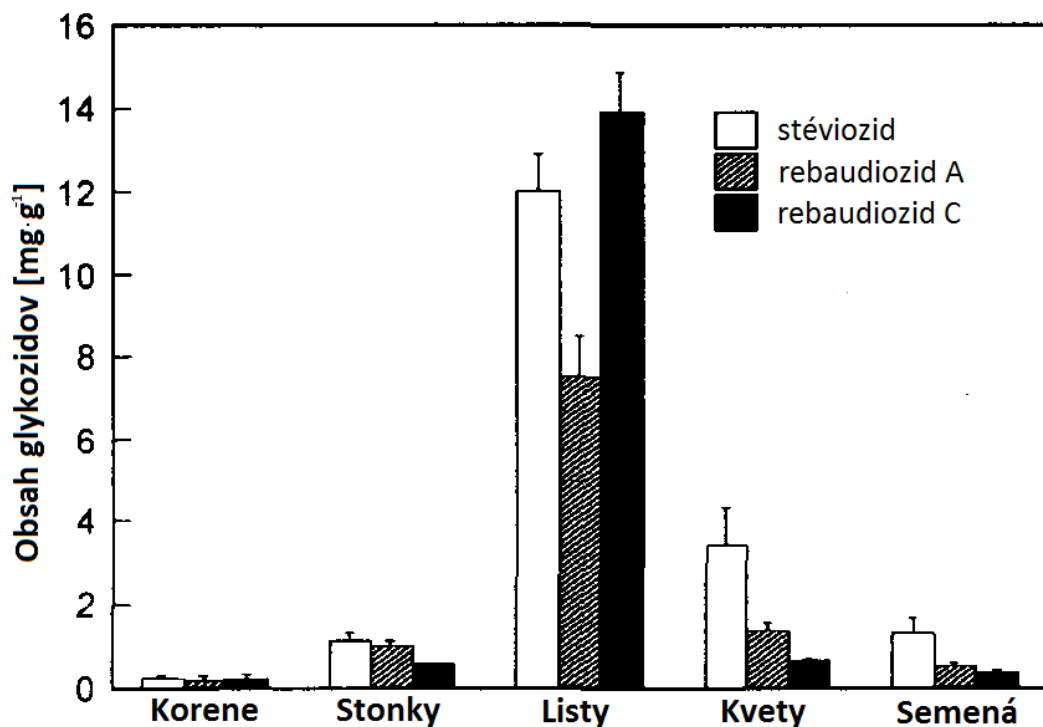
Základná steviolová kostra

Tabuľka 7: Štruktúra a sladivosť glykozidov v stévií [4,6,7]

Zlúčenina	R1	R2	Sumárny vzorec	Sladkosť
Steviol	H	H	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	–
Steviolbiozid	H	β-Glu-β-Glu(2→1)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	100 – 125
Stéviozid	β-Glu	β-Glu-β-Glu(2→1)	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	250 – 300
Rebaudiozid A	β-Glu	β-Glu-β-Glu(2→1) β-Glu(3→1)	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	350 – 450
Rebaudiozid B	H	β-Glu-β-Glu(2→1) β-Glu(3→1)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	300 – 350
Rebaudiozid C	β-Glu	β-Glu-α-Ram(2→1) β-Glu(3→1)	C ₄₄ H ₇₀ O ₂	50 – 120
Rebaudiozid D	β-Glu-β-Glu(2→1)	β-Glu-β-Glu(2→1) β-Glu(3→1)	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	200 – 300
Rebaudiozid E	β-Glu-β-Glu(2→1)	β-Glu-β-Glu(2→1)	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	250 – 300
Rebaudiozid F	β-Glu	β-Glu-β-Xyl(2→1) β-Glu(3→1)	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	–
Dulkozid A	β-Glu	β-Glu-α-Ram(2→1)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	100 – 125

Vysvetlivky: Glu – glukóza, Ram – ramnóza, Xyl – xylóza

Časti rastliny s výnimkou koreňa majú sladkú chuť, avšak obsah diterpénových glykozidov v nich nie je rovnaký. Najviac sa ich nachádza v listoch, vďaka čomu sa hlavne táto časť rastliny používa na výrobu extraktov.



Obrázok 4: Graf znázorňujúci obsah glykozidov v rôznych častiach rastliny [8]

2.2.6.1 Steviol

Steviol je diterpenoidný aglykón, ktorý vzniká hydrolytickým odštiepením sacharidových jednotiek. Jeho systematický názov je: *ent*-13-hydroxykaur-16-en-19-ová kyselina. Teplota topenia je v rozmedzí 245-246 °C. Biosyntetickým prekursorom je kyselina *ent* – kaurenová, ktorá je zároveň jedným z medzi stupňov pri syntéze rastových faktorov – gibberelínov. V ľudskom tele sa do krvi vstrebáva v tenkom čreve. [9]

2.2.6.2 Stéviozid

V roku 1931 Bridel a Lavieille prvýkrát izolovali kryštalický stéviozid. Obsahuje sacharidové zložky β -D-glukózu i α -soforózu a má chemický vzorec diterpénu glykozidu ($C_{38}H_{60}O_{18}$). Je to aktívna zložka, ktorá je zodpovedná za sladkú chuť, avšak pri vyšších koncentráciách sa prejavuje ako chuť horká. Má charakter bieleho prášku, dobre rozpustného vo vode, s teplotou topenia 197-198 °C a mólovou hmotnosťou 804,881. Systematický názov je odvodený od steviolu: 13-*O*-(2- β -glukosyl- β -glukosyl)-19-*O*- β -glukosylsteviol. Jeho zmydlením veľmi silnou zásadou vzniká steviolbiozid. Najväčší obsah stéviozidu sa nachádza v listoch, približne 3-10 % suchej váhy a závisí od miesta pestovania i veku porastu. Rastlinou je produkovaný hlavne za dlhého dňa a v 3. a 4. roku života. Chemickými a enzymatickými postupmi môže byť konvertovaný na rebaudiozid A. V ľudskom tele je hydrolyzovaný baktériami tráviaceho traktu na steviol a glukózu. [6,10,11]

2.2.6.3 Rebaudiozidy a ďalšie glykozidy

Rebaudiozid A má sumárny vzorec $C_{44}H_{70}O_{23} \cdot 3H_2O$, a jeho systematický názov je 2'-*O*- β -glukosyl-13-*O*- β -soforosyl-19-*O*- β -glukosyl-steviol. Je vo vode rozpustnejší než stéviozid, pretože obsahuje ďalšiu glukózovú jednotku v molekule. Má i vyššiu teplotu topenia: 242-244 °C a je stabilnejší v kyslom prostredí. Hydrolýzou rebaudiozidu A kyselinou vzniká izosteviol. Hydrolýzou s hesperidinom vzniká rebaudiozid B. Rebaudiozid A s vysokou čistotou je prírodné sladidlo predávané pod názvom rebiana.

Rebaudiozid B má na uhlíku C_{19} hydroxylovú skupinu, vďaka ktorej má kyslejší charakter. Teplota topenia je v rozmedzí 193-195 °C.

Rebaudiozid C, nazývaný aj dulkozid B, sa od rebaudiozidu A odlišuje tým, že namiesto glukózy viazanej na vetviacej glukóze do polohy 2 má naviazanú ramnú viazanú cez α .

Rebaudiozid D obsahuje oproti rebaudiozidu A ešte jednu glukózu v polohe 2 glukózy, viazanej na uhlíku C_{19} .

Rebaudiozid E má v porovnaní s rebaudiozidom D o jednu glukózu menej na vetviacej glukóze (viazanej na uhlík C_{13}) v polohe 2.

Rebaudiozid F sa od rebaudiozidu A líši tým, že má nahradenú glukózu viazanú na vetviacej glukóze v polohe 2 xylózu viazanou β . [10,12]

Dulkozid A je svojou štruktúrou podobný rebaudiozidu C (dulkozidu B), avšak na rozdiel od neho má na vetviacej glukóze v polohe 3 atóm vodíku. Kryštalizáciou z metanolu vznikajú bezfarebné ihličkovité kryštály. Teplota topenia je v rozmedzí 193-195 °C. [10]

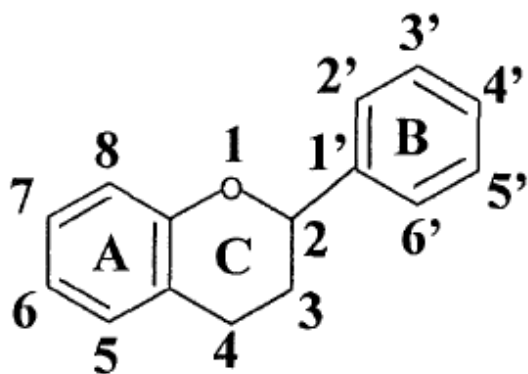
Steviolbiozid má štruktúru, ktorá sa najviac podobá stéviozidu, od ktorého sa líši len nahradením glukózy na uhlíku C_{19} za vodíkový atóm. [10]

2.2.7 Polyfenolické látky

Tieto zlúčeniny sú súčasťou rastlín a plnia v nich rôzne funkcie. Zapríčiňujú farbu, trpkú a horkú chuť a majú tiež antioxidačné účinky. Delia sa na hydrolyzovateľné triesloviny (estery kyseliny gallovej a monosacharidu), fenypropanoidy (ligniny, flavonoidy) a kondenzované triesloviny. [13]

Flavonoidy

Je to skupina polyfenolických zlúčenín s rôznou chemickou štruktúrou, vyskytujúcich sa v rastlinách. Flavonoidy možno rozdeliť do týchto základných skupín: flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, anthokyanidy, izoflavony, dihydroflavonoly a chalkony. Sú to látky odvodené od kyslíkatej heterocyklickej zlúčeniny flavanu, ktorého štruktúra je znázornená na obrázku č. 5. Najčastejšie plnia funkciu rastlinných farbív a antioxidantov. [9]



Obrázok 5: Štruktúra flavanu [14]

Fenolové kyseliny

Štruktúra týchto kyselín je tvorená benzénovým jadrom, na ktorom sú naviazané hydroxylové a karboxylové skupiny. [9]

Kyselina kávová

Jej sumárny vzorec je $C_9H_8O_4$ a systematický názov je 3,4-dihydroxyfenylprop-3-énová kyselina. Patrí medzi hydroxyderiváty kyseliny škoricovej. [9]

Kyselina chlorogenová

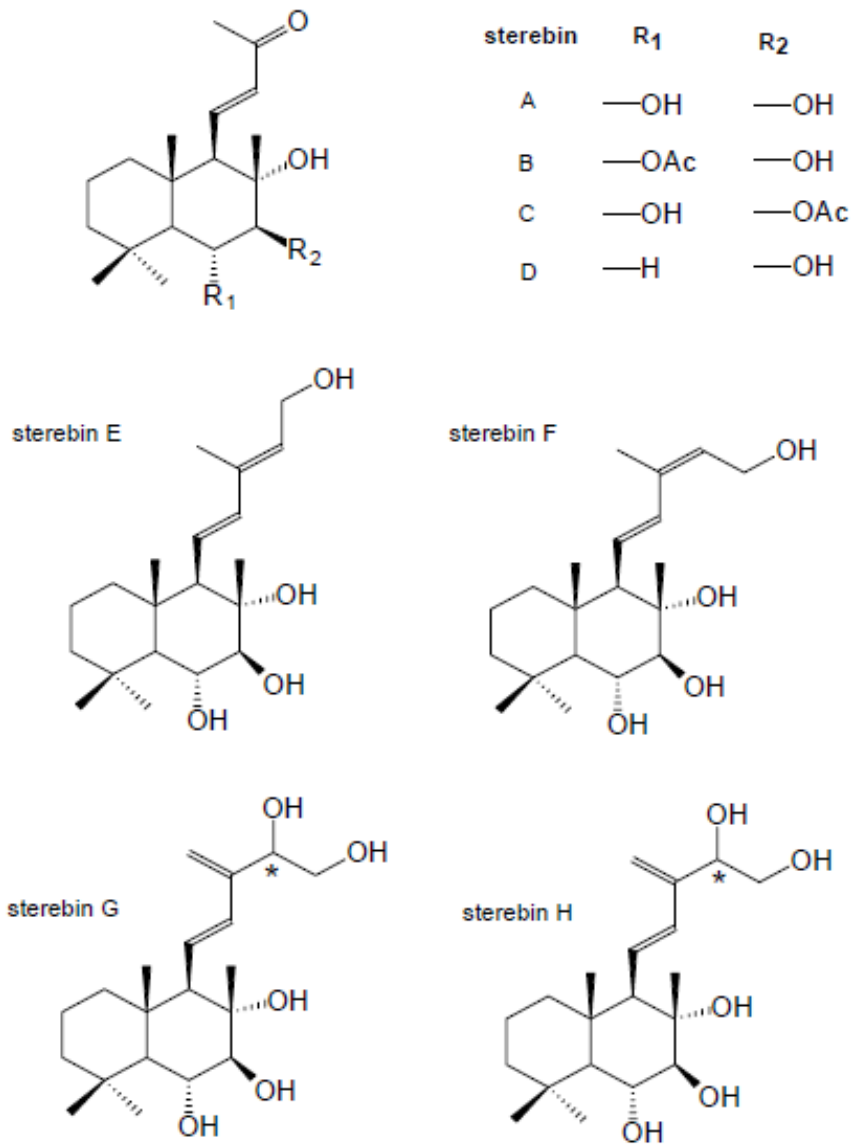
Je to ester kyseliny kávovej so systematickým názvom 3-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,4,5-trihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina. Jej sumárny vzorec je $C_{16}H_{18}O_9$. [9]

Ďalšie fenolické látky v stévii

V listoch stévie sa okrem už spomenutých fenolov a polyfenolov nachádza kvercetin, epikatechin, avikularin, guayaverin, kvercitrin, apigenin-4'-O-glukozid, luteolin-7-O-glukozid, kvercetin-3-O-glukozid, kemferol-3-O-ramnozid a metoxylovaný kentaureidin. [9,14]

2.2.8 Sterebiny a iné chemické zlúčeniny

Sterebyny patria do skupiny bisnorditerpénoidov, ktorých štruktúru a základné fyzikálne chemické vlastnosti popísal Oshima a kolektív v roku 1986 a 1988. V stévii sa nachádzajú serebyny A-H.



Obrázek 6: Štruktúrne vzorce sterebinov A-H [9]

Ďalšie identifikované látky v stévii sladkej sú: sigmasterol, β -sitosterol, β -amyrin acetát, austroinulin, 6-*O*-acetylaustroinulin, 7-*O*-acetylaustroinulin, triestery lupeolu, pigmenty, rastlinné gummy, prchavé olejové zložky a anorganické látky. [9,15]

2.3 Vplyv stévie na ľudské zdravie

Rôzne vedecké štúdie potvrdzujú priaznivé účinky stévie na zdravie ľudí. V určitých prípadoch môže zmierňovať alebo dokonca liečiť niektoré zdravotné problémy. Steviolglykozidy sú prirodzeným adaptogénom, teda pomáhajú organizmu prispôbovať sa nevhodným podmienkam vonkajšieho prostredia, napríklad rádioaktívnemu žiareniu, pôsobeniu ťažkých kovov a toxických zlúčenín. Tieto vlastnosti využili prvý raz v Japonsku po zhodení 2 atómových bômb a druhý raz po výbuchu atómovej elektrárne v Ukrajine. [16]

2.3.1 Anti-hyperglykemické účinky

V južnej Amerike sa už dlhé roky stévia používa na liečenie cukrovky. Stéviozid, ako hlavná zložka extraktu stévie, má vysokú sladkosť a takmer žiadne kalórie, vďaka čomu môže byť dobrou alternatívou sladidla pre diabetikov. Podľa štúdie Suzukiho a kol. z roku 1977, množstvo 0,5 hm. % stéviozidu alebo 10 hm. % prášku z listov stévie podávané potkanom spôsobilo značné zníženie hladiny glukózy v krvi po 4 týždňoch dávkovania. Curi a kol. v roku 1986 uskutočnili testovanie na ľuďoch, pričom po podávaní množstva 5 hm. % vodného extraktu z listov stévie v 6 hodinových intervaloch po dobu 3 dní bol zistený značný pokles hladiny glukózy v krvi. Avšak, Toskulkao a kolektív v roku 1995 uviedol, že 1 mmol steviolu inhibuje vstrebávanie glukózy približne o 40 %. Spôsobuje tiež pokles hromadenia glukózy v tkanive tenkého čreva. [10]

2.3.2 Účinky na zníženie vysokého krvného tlaku

Vysoký krvný tlak v cievach, čiže hypertenzia, je dôsledok nadmerného pôsobenia tlaku krvi na stenu ciev. Štúdie preukázali, že stéviozid a extrakt zo stévie pôsobia na kardiovaskulárny systém tým, že spôsobujú zníženie frekvencie srdca a krvného tlaku. Avšak tieto účinky sú závislé na čase a vyžadujú dlhšiu dobu užívania. Tento poznatok bol preukázaný testom na zdravých potkanoch a potkanoch trpiacich vysokým krvným tlakom. Test bol uskutočnený Melisom v roku 1996 a vyplynulo z neho, že po orálnom podávaní 2,67 g suchých listov stévie denne počas 20 dní nebola zaznamenaná žiadna zmena krvného tlaku. Avšak po 40 dňoch sa prejavilo jeho zníženie. V roku 2003 uskutočnili Jeppesen s kolektívom test na potkanoch podávaním 25 mg na kg hmotnosti tela počas 6 týždňov, pričom výsledky boli podobné. Na druhej strane, stéviozid podávaný intravenózne znížil krvný tlak u zdravých potkanov i u potkanov s hypertenziou takmer okamžite. Intravenózne podávanie stéviozidu znižuje systolický i diastolický tlak v závislosti na dávke. Z vykonaných testov vyplýva, že iba stéviozid, ktorý bol podaný priamo do krvného obehu môže spôsobiť akútnu hypotenziu.

Podobný účinok bol na základe štúdie z roku 1977 pozorovaný i u ľudí. Pitie čaju zo stévie každý deň počas 30 dní spôsobilo zníženie systolického i diastolického krvného tlaku a tiež zníženie frekvencie srdca. Stéviozid má vplyv i na svalovú kontrakciu, pretože skracuje dobu sťahu srdca. Tým sa znižuje objem krvi prechádzajúci cez srdcom, čiže sa redukuje krvný tlak. [10]

2.3.3 Protizápalové účinky a vplyv na rakovinu

Zápal, ako prirodzená imunitná reakcia na škodlivé podnety, býva spojený s rôznymi druhmi chorôb, ako sú napríklad: autoimunitné ochorenie, ateroskleróza, či rakovina. Na jeho výskyt poukazujú chemické mediátory produkované aktivovanými makrofágmi.

Yasukawa a kol. v roku 2002 uskutočnili štúdiu, ktorá potvrdila protizápalové účinky stéviozidu. Lokálny zápal kože, spôsobený 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetátom (TPA), bol potlačený steviol-glykozidmi, vrátane stéviozidu. Preskúmaný bol i proti-nádorový účinok stéviozidu, pretože je známe, že TPA podporuje tvorbu rakoviny v bunkách cicavcov. Aj izosteviol spomaľuje rast troch rôznych typov rakoviny ľudských buniek a tiež inhibuje zápal spôsobený TPA. [10, 17]

2.3.4 Antimikrobiálne účinky

V rôznych druhoch extraktov (vodný, metanolový, chloroformový, acetónový alebo hexánový) bol preukázaný antimikrobiálny účinok na niektoré mikroorganizmy, ako napríklad *Salmonella typhi*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*. Tomita a kolektív (v roku 1997) študovali baktericídne účinky fermentovaného vodného extraktu Stévie na enterohemoragickú *Escherichia coli* a ďalších patogénnych baktérií vyskytujúcich sa v potravinách. Schopnosť stévie inhibovať rast určitých baktérií vysvetľuje i jej tradičné použitie pri liečení poranení, bolestivých miest a ochorení ďasien. Je tiež účinná pre ľudí, citlivých na kvasinkové alebo streptokokové infekcie. Pomáha i ako prevencia voči prechladnutiu a chrípke. Využitie nachádza tiež pri liečbe nehojajúcich sa rán, vrátane vredov predkolenia. [4,16]

2.3.5 Antioxidačné účinky

Prírodné antioxidanty rastlín neutralizujú voľné radikály, čím predchádzajú oxidačným poškodeniam. Hlavné flavonoidy a fenoly sú komerčne využívané ako antioxidanty vo výživových doplnkoch alebo v potravinárskych prísadách, avšak je náročné stanovovať množstvo jednotlivých antioxidačných zložiek. Extrakt z listov stévie vykazuje vysoký stupeň antioxidačnej aktivity. Potvrzuje to štúdia vykonaná modifikovanou metódou pomocou DPPH (2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Štandardizované množstvo extraktu bolo pridané do roztoku DPPH. Po 30 minútovej inkubácii a zmeraní absorbancie pri 520 nm bola zistená inhibícia 50 % voľných radikálov. Tiež bola preukázaná inhibícia tvorby hydroperoxidov a superoxidov v sardinkovom oleji. Súčasné štúdie preukazujú, že etanolický extrakt z listov *Stevia rebaudiana* má značné potenciálne využitie ako prírodný antioxidant. [4,18]

2.3.6 Vplyv na tvorbu zubného kazu

Das a kolektív v roku 1992 pomocou pokusov na potkanoch zistili, že stéviozid ani rebaudiozid A nespôsobujú zubný kaz. Dokonca vyššia koncentrácia stéviozidu spôsobuje redukciu rastu niektorých kariogénnych baktérií, čiže baktérií spôsobujúcich zubný kaz, ako napríklad *Streptococcus mutans*, *Proteus vulgaris*, a ďalšie. Sladenie stéviou je preto pre zuby vhodnejšie než používanie cukru. [4,6]

2.3.7 Liečba hnačky

Možnosť využitia stéviozidu na liečbu hnačky vyplýva z baktericídneho a anti-rotavírusového účinku vodného extraktu zo stévie. V roku 1997 bol prvý raz zverejnený baktericídny efekt na enterohemoragickú *Escherichia coli*, ktorá spôsobuje hnačku. Extrakt zo stévie tiež inhibuje rast rotavírusov a RNA vírusu, ktorých infekcia spôsobuje gastroenteritídu u detí.

Stimuláciou hladkého svalstva čriev dochádza k ich nadmernej peristaltike, čo tiež vyvoláva hnačku. Stéviozid pôsobí naopak, teda inhibuje kontrakcie tohto svalstva tým, že zabraňuje prestupu Ca^{2+} katiónov do svalových buniek. Pri testoch na morčatách, koncentrácia 1 mmol stéviozidu spôsobila zníženie prestupu Ca^{2+} katiónov v bedrovníku tenkého čreva o 40 %. [10]

2.3.8 Bezpečnosť stévie

Stévia je používaná vo svete už dlhú dobu, no Európska únia jej bezpečnosť detailne a dlhší čas skúmala. Testy boli zamerané hlavne na toxické, karcinogénne, mutagénne a teratogénne účinky stéviozidu a steviolu v organizme.

Toxicita

Štúdia uskutočnená na myšiach, potkanoch a škrečkoch preukázala, že príjem stéviozidu v potrave v množstve 15 g na kg hmotnosti tela nespôsobuje akútnu toxicitu. Avšak orálne podávanie steviolu v množstve 5-25 g na kg hmotnosti tela je smrteľné. Toto množstvo sa líši v závislosti na živočíšnom druhu. U zdravých ľudí alebo ľudí s vysokým krvným tlakom či u diabetikov pri užívaní 750 mg stéviozidu denne počas 3 mesiacov sa nevyskytli žiadne abnormality alebo poškodenia pečene a obličiek. Svetová zdravotnícka organizácia rozhodla, že množstvo 0-2 mg na kg hmotnosti tela steviolu, čo je ekvivalent k množstvu 0-5 mg na kg hmotnosti tela stéviozidu nemá toxické účinky na ľudí. [4]

Karcinogénne a mutagénne účinky

Bakteriálne genetické výskumy preukázali, že stéviozid nie je mutagénny. U steviolu však bol preukázaný slabý mutagénny účinok na *Salmonella typhimurium* TM 677 a u *E. coli* je steviol schopný spôsobovať genetické poruchy, ktoré môžu viesť k vzniku rakoviny. Ďalšie bakteriálne mutagénne účinky steviolu neboli dokázané. Spoločný výbor expertov FAO/WHO pre potravinárske aditíva (JECFA) v roku 2006 uviedol, že nebol zaznamenaný žiadny náznak genotoxicity stéviozidu. Dávky stéviozidu do 2 g na kg hmotnosti tela mužov a 2,4 g na kg hmotnosti tela žien nespôsobujú výskyt rakoviny. [4]

Teratogénne účinky

Niektoré látky môžu prispievať k neplodnosti alebo poškodzovať plod. Pre zistenie týchto účinkov boli vykonané mnohé štúdie. Yamada a kolektív v roku 1985 vykonali testy na potkanoch, ktoré boli kŕmené stravou obsahujúcou maximálne 1 % stéviozidu. Toto množstvo nemalo vplyv na spermatogézu, ani delenie tkanivových buniek. Melis v roku 1999 uskutočnil test s nezvyčajne vysokými dávkami (2,6 g váhy tela na deň) extraktu zo stévie počas 2 mesiacov. Následkom bolo zníženie plodnosti. Avšak, príčinou mohla byť prítomnosť minoritných zložiek v stévií, ktoré môžu byť v tak vysokých koncentráciách toxické. [4]

Väčšina štúdií sa zhoduje v tom, že konzumácia stéviozidu v prijateľnom dennom množstve 5 mg na kg hmotnosti tela nie je toxická, karcinogénna ani teratogénna. [4]

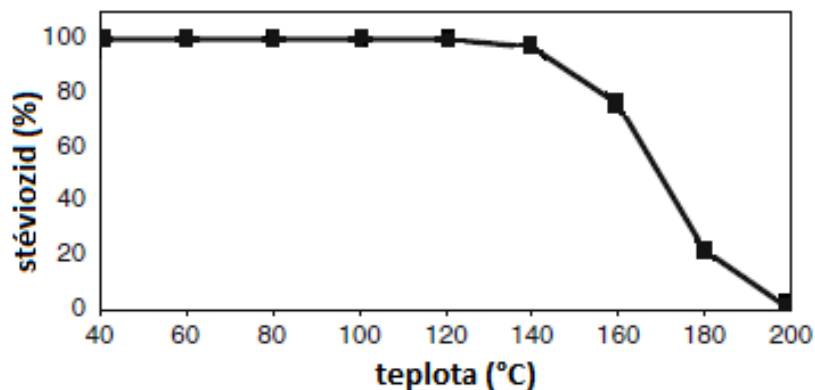
2.4 Použitie, stabilita a interakcie steviol-glykozidov s potravinami

Extrakty z listov stévie sú v mnohých krajinách používané ako sladidlo v rôznych potravinách a nápojoch. Preto je dôležité poznať ich stabilitu a prípadné zmeny počas procesov pri výrobe potravín i pri skladovaní v rôznych podmienkach.

2.4.1 Stabilita sladidla steviol-glykozidov pri zmenách teploty

Zvýšením teploty klesá stabilita steviol-glykozidov. Na testovanie bolo použité množstvo 50 mg pevného sladidla, ktoré bolo inkubované v uzavretej sklenenej nádobe pri teplotách v rozmedzí od 40 do 200 °C po dobu 1 hodiny. Sladidlo vykazovalo dobrú stabilitu až po

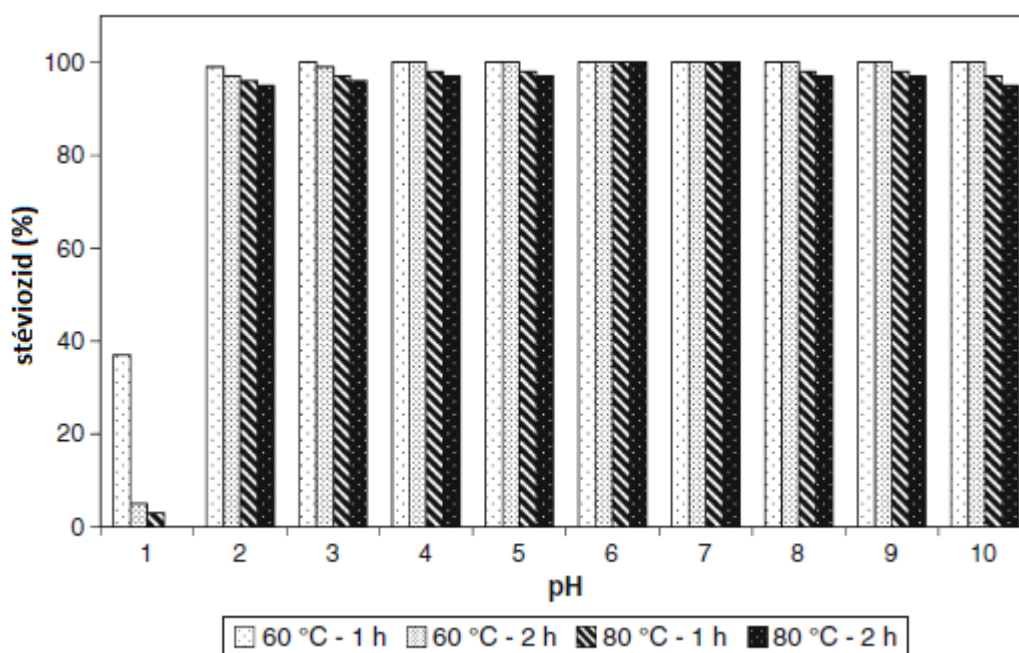
teplotu 120 °C. Ďalším zvyšovaním teploty začalo dochádzať k rozkladu stéviozidu, až po jeho úplné rozloženie pri teplote 200 °C. Postupný rozklad stéviozidu znázorňuje obrázok 4. Keďže stéviozid je pri vysokých teplotách nestabilný, neodporúča sa využitie sladidla zo stévie v pekárstve. [19]



Obrázok 7: Graf závislosti rozkladu stéviozidu na teplote [19]

2.4.2 Stabilita sladidla pri rôznom pH a rôznej teplote

Testovaný bol vodný roztok stéviozidu s koncentráciou 0,5 g·l⁻¹ pri teplote 60 a 80 °C po dobu 1 až 2 hodín v rozmedzí pH 1-10. Stéviozid vo vodnom roztoku s pH 2-10 temperovanom pri 60 °C po dobu 2 hodín prakticky nepodlieha rozkladu. Po zvýšení teploty na 80 °C dochádza k rozkladu 5 % stéviozidu pri hodnote pH 2 a 10. Vo veľmi kyslom prostredí (pH 1) dochádza k rýchlej až úplnej degradácii stéviozidu pri inkubácii za teploty 80 °C po dobu 2 hodín. Výslednými produktmi rozkladu sú steviolbiozid a glukóza, pretože štiepenie prebieha na C₁₉ esterovej väzbe stéviozidu. [19]



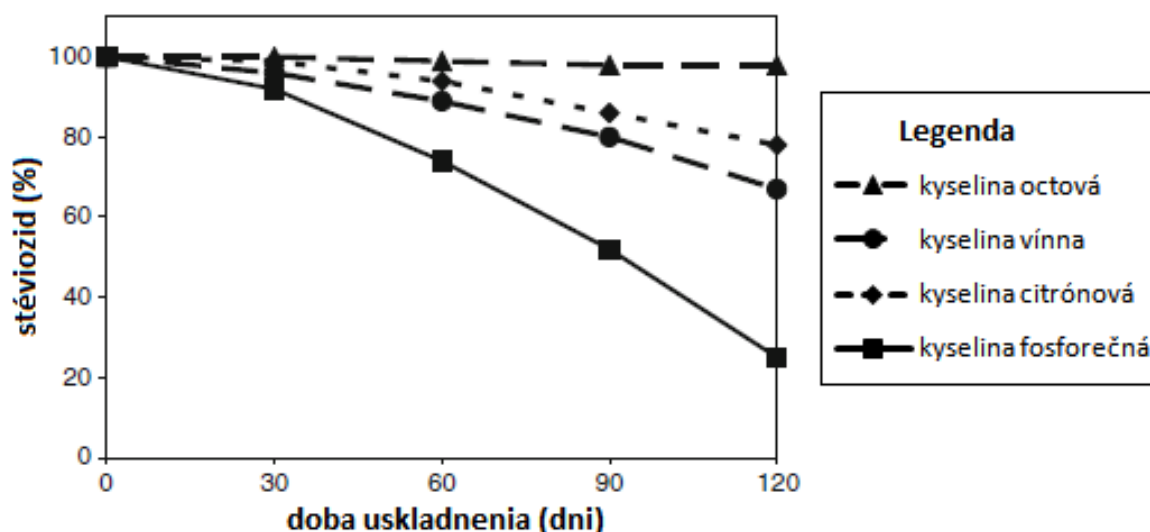
Obrázok 8: Množstvo stéviozidu pri rôznom pH, teplote a rôznej dobe [19]

2.4.3 Stabilita sladidla v organických kyselinách

Stabilita stéviozidu bola testovaná pri izbovej teplote v zriedenej kyseline octovej, citrónovej, vínnej a fosforečnej s koncentraciami od 1 po 10 g·l⁻¹ počas 4 mesiacov.

Pri koncentracií 1 g·l⁻¹ kyseliny octovej (pH 3,1), citrónovej (pH 2,6) a vínnej (pH 2,6) nebol pozorovaný rozklad stéviozidu. U kyseliny fosforečnej s rovnakou koncentraciou a s pH 2,2 došlo k degradácii 30 % stéviozidu.

Pri koncentracií 10 g·l⁻¹ kyseliny octovej (pH 2,6), citrónovej (pH 2,1), vínnej (pH 2,1) a fosforečnej (pH 1,6) bol pokles množstva stéviozidu 2, 22, 33 a 75 %. [19]

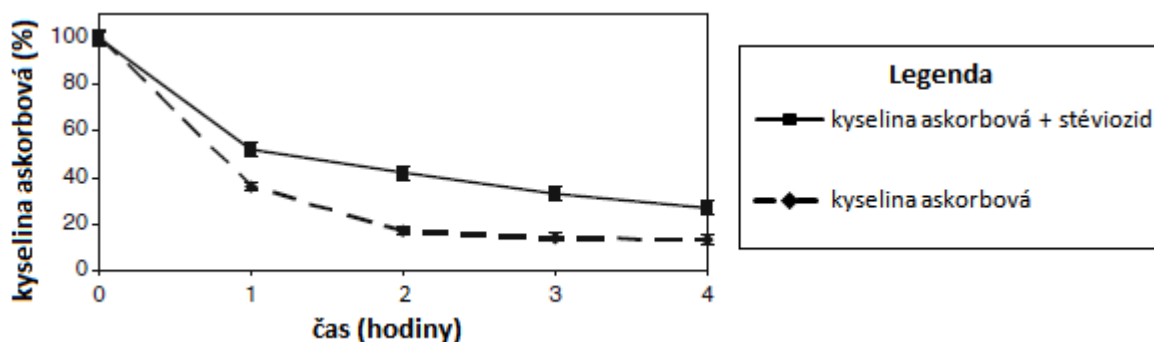


Obrázok 9: Graf rýchllosti rozkladu stéviozidu v kyselinách s koncentraciou 10 g·l⁻¹ [19]

2.4.4 Vzájomné pôsobenie stéviozidu a vitamínov rozpustných vo vode

Inkubáciou stéviozidu jednotlivito s vitamínmi skupiny B a vitamínom C po dobu 4 hodín pri teplote 80 °C neboli pozorované žiadne výrazné zmeny koncentrácie sladidla ani koncentrácie vitamínov skupiny B.

V prípade vitamínu C inkubácia pri 80 °C so stéviozidom spôsobila degradáciu kyseliny askorbovej závislú na čase. Bol pozorovaný ochranný efekt, ktorý znížil rýchlosť rozkladu kyseliny askorbovej. V prítomnosti stéviozidu bol jej obsah po 4 hodinách inkubácie 27 %, na rozdiel od 4 hodinovej inkubácie samotnej kyseliny askorbovej, kedy tento obsah činil len 13 %. [19]



Obrázok 10: Rýchlosť rozkladu čistej kyseliny askorbovej a v prítomnosti stéviozidu [19]

2.4.5 Stabilita a interakcie sladidla v horúcich nápojoch

Kroyer v roku 2010 testoval pôsobenie horúcich nápojov so stéviou. Preukázal, že použitie steviol-glykozidov (E 960) na osladenie kávy a čaju s teplotou 80 °C nemalo výrazný vplyv na kofeín ani na množstvo stéviozidu. Pri udržiavaní tejto teploty po dobu 4 hodín boli pozorované len 5% straty z pôvodného množstva stéviozidu. Výsledkom tejto štúdie je, že za normálnych podmienok prípravy kávy a čaju nedochádza k poklesu sladkosti ani k žiadnym interakciám. [19]

2.5 Legislatíva stévie a jej využitie v potravinárstve

Európsky úrad pre bezpečnosť potravín skúmal bezpečnosť použitia steviol-glykozidov, extrahovaných z listov rastliny *Stevia rebaudiana* Bertoni, ako sladidla. Dňa 10. marca 2010 vydal svoje stanovisko. Úrad stanovil prijateľný denný príjem steviol-glykozidov, vyjadrený ako ekvivalenty steviolu, na 4 mg·kg⁻¹ telesnej hmotnosti na deň. Používanie steviol-glykozidov (E 960) upravuje nariadenie komisie č. 1131/2011/EU z 11. novembra 2011. Toto nariadenie je priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch Európskej únie. V prílohe je uvedené používanie sladidla E 960 v potravinách, vrátane najvyššieho prípustného množstva i obmedzení. [20]

Stévia v potravinách:

Vďaka zdraviu prospešným účinkom a hlavne nízkemu obsahu kalórií sa stévia používa ako sladidlo hlavne v rôznych nápojoch. Keďže v krajinách ako Japonsko, Čína, USA atď, bola stévia schválená skôr, je preto i viac využívaná v zahraničí. V Českej a Slovenskej republike je toto umelé sladidlo povolené od 11. novembra 2011, preto sa zatiaľ využíva len málo. Zoznam nápojov a potravín, ktoré obsahujú E 960 [21]:

Česká republika:

Green tea peach (Coca – Cola HBC ČR s.r.o.)
Grena grep & citron (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Jupík se stévií (Kofola ČeskoSlovensko a.s.)
Ketchup Stevia (SPAK foods, s.r.o.)
Koala (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Kofola bez cukru se stévií (Kofola a.s.)
Kombajnerka (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Malina malinová limča (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Malina malinová limča s chmelem (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Nativa green tea lemon (Rauch Praha spol. s.r.o.)
Sylvána hroznové víno (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Sylvána hroznové víno s chmelem (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Tonik lahodně hořký (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Vita pomeranč & broskev (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Zázvorka (Pivovar Černá Hora, a.s.)

Slovenská republika:

Rio s pridaním stévie (McCarter, a.s.)
Čokolády Steviola® LuckyChoc (STARWEB, s.r.o.)

Stévia v lekárňach

Keďže extrakty zo stévie nezvyšujú hladinu cukru v krvi, sú vhodné i pre diabetikov. Najmä vďaka tomu sa začala stévia využívať vo farmaceutickom priemysle. V lekárňach je možné ju nájsť vo forme tabliet, prášku a tekutého sladidla. Pridáva sa aj do zubných pást, pretože znižuje tvorbu zubného kazu a obmedzuje zápaly ďasien. Zoznam firiem vyrábajúcich sladidlá so stéviou:

Česká republika:

AGROBAC, s.r.o. (Přimda)
F&N dodavatelé, s.r.o. (Tišice)
Green Diamond Medical, s.r.o. (Praha)
SOLIA, spol. s.r.o. (Jablonec nad Nisou)
OKG, s.r.o. (Pardubice)

Slovenská republika:

Lama Bioinštitút, s.r.o. (Piešťany)
STARWEB s.r.o. (Trnava)
IMBER s.r.o. (Bratislava)
EDENPharma s.r.o. (Martin)

2.6 Metódy stanovenia fenolických látok v stévii

Základné metódy, ktorými je možné stanoviť fenolické látky v stévii je metóda s využitím Folin- Ciocalteuového činidla alebo pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie.

2.6.1 Vysoko účinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Shivanna a kolektív využili túto metódu pri stanovení celkového množstva fenolických látok v stévii. Zo sušených listov bol pripravený etanolický extrakt, ktorý bol zahustený odparovaním. Následne bola uskutočnená analýza pomocou HPLC s UV-VIS detektorom. Separácia prebehla na obrátených fázach s kolónou C18 (150 x 4,5 mm). Mobilná fáza A obsahovala 0,1% kyselinu mravčiu a mobilná fáza B obsahovala metanol. Pre analýzu bola použitá gradientová elúcia a množstvo 20 µl vzorku i štandardov. Detekcia prebehla pri vlnovej dĺžke 270 nm. Retenčný čas a píky UV-Vis spektra boli porovnané s použitými štandardmi. Celkový obsah fenolických látok bol stanovený na 91 mg na 100 g vzorku listov stévie. [22]

Kim s kolektívom analyzovali množstvo fenolických látok v stévii pomocou HPLC. Suché listy boli destilované vodou pod spätným chladičom 3 hodiny pri teplote 100 °C. Extrakcia bola trikrát zopakovaná, následne bol extrakt prefiltrovaný. Takto bola pripravená vzorka, z ktorej množstvo 20 µl bolo analyzované na prístroji Nova pack C18 UG120 (150 x 4,6 mm, 5 µm) použitím kolony Guard (10 x 4,0 mm) s teplotou 40 °C. Mobilná fáza A obsahovala 50 mmol vodný roztok fosforečnanu trisodného : metanol (93:7) a mobilná fáza B obsahovala 70% roztok metanolu vo vode. Vzorka bola eluovaná ich gradientom a detekovaná UV-VIS diódovým poľom pri vlnovej dĺžke 280 nm. Celkové množstvo fenolických látok bolo stanovené na 130,67 µg·mg⁻¹. Konkrétne fenolické zlúčeniny zistené v listoch stévie sú uvedené v nasledujúcej tabuľke. [23]

Tabuľka 8: Obsah niektorých fenolických látok v listoch stévie [23]

Zlúčenina	mg v 100 g suchých listov
Pyrogallol	951,27 ± 1,12
Kyselina 4-metoxybenzoová	33,80 ± 0,65
Kyselina p-kumarová	30,47 ± 0,36
Kyselina sinapová	25,61 ± 0,26
Kyselina škoricová	9,03 ± 0,17
4-metylkatechol	2,42 ± 0,03

Metóda však nie je veľmi využívaná pre stanovenie celkového množstva fenolických látok, pretože pomocou HPLC sa dajú získať množstvá jednotlivých fenolických látok, ktoré je potrebné ešte spočítať.

2.6.2 Metóda s využitím Folin-Ciocalteuového činidla

Táto metóda je založená na reakcii fenolických zlúčenín s kolorimetrickým činidlom, ktoré umožňuje meranie absorpcie vo viditeľnej oblasti spektra. Princípom metódy s Folin-Ciocalteuovým činidlom je prenos elektrónov v alkalickom prostredí z fenolickej zlúčeniny na komplex tvorený fosfomolybdenom a fosfovolfamanom. Vytvorí sa modrý komplex, ktorého absorpciu je možné zistiť spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 765 nm. Táto reakcia je však nešpecifická, preto i ďalšie oxidačné zložky vo vzorku môžu interferovať a tým zvýšiť alebo znížiť množstvo fenolických látok vo vzorku. Jedná sa o aromatické amíny, kyselinu askorbovú, oxid siričitý a iné. Z tohto dôvodu sa pridáva najskôr Folin-Ciocalteuovo činidlo a až potom zásaditý roztok, najčastejšie uhličitan sodný. Pre alkalizáciu roztoku je možné použiť i hydroxid sodný alebo kyanid sodný, pričom požadujúce pH celého roztoku je približne 10.

Ako štandard je možné použiť kyselinu trieslovú, kyselinu gallovú alebo katechin. Najčastejšie je však využívaná kyselina gallová, pretože nie je drahá, je rozpustná vo vode a je tiež stabilná v suchej forme. Táto metóda je jednoduchá a reprodukovateľná. [13,24]

Existujú i ďalšie metódy stanovenia celkového obsahu fenolických látok, napríklad manganometrická titrácia, kolorimetria s iónmi železa a ultrafialová absorbanca. Žiadna metóda však nie je dokonalá, z dôvodu rôznorodosti prírodných fenolov, ale i možnosti interferencie s ďalšími ľahko oxidujúcimi látkami.

Pri manganometrickej titracii je oxidácia s manganistanom draselným náročnejšia na štandardizáciu rôznych analytov a dochádza k väčším interferenciám, hlavne s prítomnými sacharidmi. Preto je vhodnejšie využiť metódu s Folin-Ciocalteuovým činidlom.

Metóda kolorimetrie s iónmi železa nie je úplne vhodná pre stanovenie celkového obsahu fenolických látok. Monofenoly obecné nereagujú s iónmi železa a za určitých podmienok prítomné difenoly a trifenoly dávajú odlišné sfarbenie roztokov. Z dôvodu nižšej interferencie s dextrínmi a bielkovinami sa táto metóda často využíva pri analýze piva. V mnohých iných analýzach je však preferovaná metóda s Folin-Ciocalteuovým činidlom.

Ultrafialová absorbanca je náročná na analýzu celkového obsahu fenolických látok, pretože jednotlivé prírodné fenoly sa značne líšia vo vlnových dĺžkach maximálnej absorpcie, i v ich molárnej absorpcii. [13]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité pomôcky a prístroje

- Laboratórne sklo
- Tretia miska s tláčikom
- Filtračný papier – KA 5 – M
- Mikropipety
- Chladnička s mrazničkou Amica AD 250
- Analytické digitálne váhy
- Varná kanvica (Bravo)
- Spektrofotometer - Spectronic Unicam Helios γ (Unicam Helios, USA)

3.2 Použité chemikálie

- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Penta, ČR)
- Uhličitan sodný (Penta, ČR)
- Kyselina gallová (Sigma, Nemecko)

3.3 Použité vzorky, postupy a metódy

3.3.1 Vzorky stévie sladkej

- Suché listy z roku 2009 zo stévie pestovanej vonku
- Suché listy z roku 2010 zo stévie pestovanej v kvetináči
- Suché listy z roku 2012 zo stévie pestovanej v kvetináči
- Čerstvé listy

3.3.2 Príprava roztokov

- Príprava 20% roztoku uhličitanu sodného

V 100 ml kadičke bolo asi v 70 ml destilovanej vody rozpustené množstvo 20 g Na_2CO_3 . Roztok bol následne prevedený do 100 ml odmernej banky, ktorá bola doplnená po rysku destilovanou vodou.

- Príprava zásobného roztoku kyseliny gallovej s koncentráciou $1\,000\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

V 25 ml odmernej banke bolo v destilovanej vode rozpustené množstvo 25 mg kyseliny gallovej a odmerná banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.

3.3.3 Príprava kalibračnej závislosti

Pipetovaním 0,5; 1; 1,5; 3; 4,5; 6,5 ml zásobného roztoku kyseliny gallovej do 10 ml odmerných baniek a doplnením destilovanou vodou po rysku boli pripravené roztoky kalibračnej krivky s koncentraciami 50, 100, 150, 300, 450 a $650\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Do skúmaviek bolo pipetované množstvo 0,5 ml Folin-Ciocalteuovho činidla, 6 ml vody a 0,1 ml roztoku kyseliny gallovej s príslušnou koncentráciou. Zároveň bol pripravený i blank, ktorý obsahoval namiesto kyseliny gallovej 0,1 ml destilovanej vody. Roztoky boli premiešané a ponechané stáť. Po 5 minútach bolo pridané množstvo 1,5 ml 20% roztoku uhličitanu sodného a roztoky

v skúmavkách boli opäť premiešané. Po 2 hodinách bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 765 nm.

3.3.4 Príprava extraktov z listov stévie sladkej

- Extrakt č. 1, pre stanovenie obsahu fenolických látok v závislosti na dobe vylúhovania

Do kadičky bolo na analytických váhach navážené presné množstvo 0,5 g jemne podrvených suchých listov stévie z roku 2009. Tieto listy boli zaliate 50 ml destilovanej vody s teplotou 23 °C. Každých 5 minút po dobu 40 minút bolo z tohto výluhu odoberané malé množstvo, ktoré bolo prefiltrované cez filtračný papier.

- Extrakt č. 2, pre stanovenie obsahu fenolických látok v závislosti na teplote vody

Do 6 kadičiek bolo na analytických váhach navážené presné množstvo 0,5 g jemne podrvených suchých listov stévie z roku 2009. Listy v jednotlivých kadičkách boli zaliate 50 ml vody zohriatej na teplotu 40, 60, 80 a 100 °C. Do ďalšej kadičky bola naliata voda v množstve 50 ml s laboratórnou teplotou, teda 23 °C. Listy v poslednej kadičke boli zaliate 50 ml vody ochladenej na teplotu 10 °C. Po 20 minútach boli výluhy prefiltrované.

- Extrakt č. 3, pre stanovenie obsahu fenolických látok v závislosti na teplote vody

Tento postup sa od predchádzajúceho postupu pre extrakt č. 2 líšil len tým, že použité listy boli pred vážením rozdrvené v trecej miske na prášok.

- Extrakt č. 4 a 5, pre stanovenie obsahu fenolických látok po dlhšej dobe vylúhovania

Do kadičky bolo na analytických váhach navážené presné množstvo 0,5 g jemne podrvených suchých listov stévie z roku 2009. Tieto listy boli zaliate množstvom 50 ml destilovanej vody s teplotou 60 °C. Každú pol hodinu po dobu 4 hodín bolo odoberané malé množstvo extraktu, ktoré bolo prefiltrované. Takto bolo pripravených 8 vzoriek. Posledná vzorka bola získaná odobraním a prefiltrovaním malého množstva extraktu po 5 hodinách. Stanovenie bolo uskutočnené 2krát, takže rovnaký postup bol vykonaný znovu. Tým bol pripravený extrakt č. 5.

- Extrakt č. 6 a 7, pre stanovenie obsahu fenolických látok vo vzorkách stévie

Do kadičky bolo na analytických váhach navážené presné množstvo 0,5 g jemne podrvených suchých listov stévie z roku 2010. Do druhej kadičky bolo navážené rovnaké množstvo jemne podrvených listov stévie z roku 2012. Do každej z kadičiek bolo priliate množstvo 50 ml destilovanej vody s teplotou 60 °C. Po 20 minútach boli extrakty prefiltrované.

- Extrakt č. 8 a 9, pre stanovenie obsahu fenolických látok v čerstvých listoch stévie

Malé množstvo čerstvých listov bolo v trecej miske zmrazené tekutým dusíkom. Do jednej kadičky bolo na analytických váhach navážené presné množstvo 0,5 g týchto zmrazených a podrvených listov. Do druhej kadičky bolo na analytických váhach navážené presné množstvo 0,5 g kusov čerstvých listov. Následne bolo do oboch kadičiek priliate množstvo 50 ml destilovanej vody s teplotou 60 °C a po 20 minútach boli extrakty prefiltrované.

3.3.5 Stanovenie celkového obsahu fenolických látok

Každé stanovenie jednotlivých extraktov bolo uskutočnené v troch skúmavkách, do ktorých bolo pipetované množstvo 6 ml vody, 0,5 ml Folin-Ciocalteuovho činidla a 0,1 ml príslušného výluhu. Obsah skúmaviek bol po premiešaní ponechaný stáť 5 minút. Následne bolo pridané množstvo 1,5 ml 20% roztoku uhličitanu sodného a roztoky boli premiešané. Po 2 hodinách bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 765 nm. [13]

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

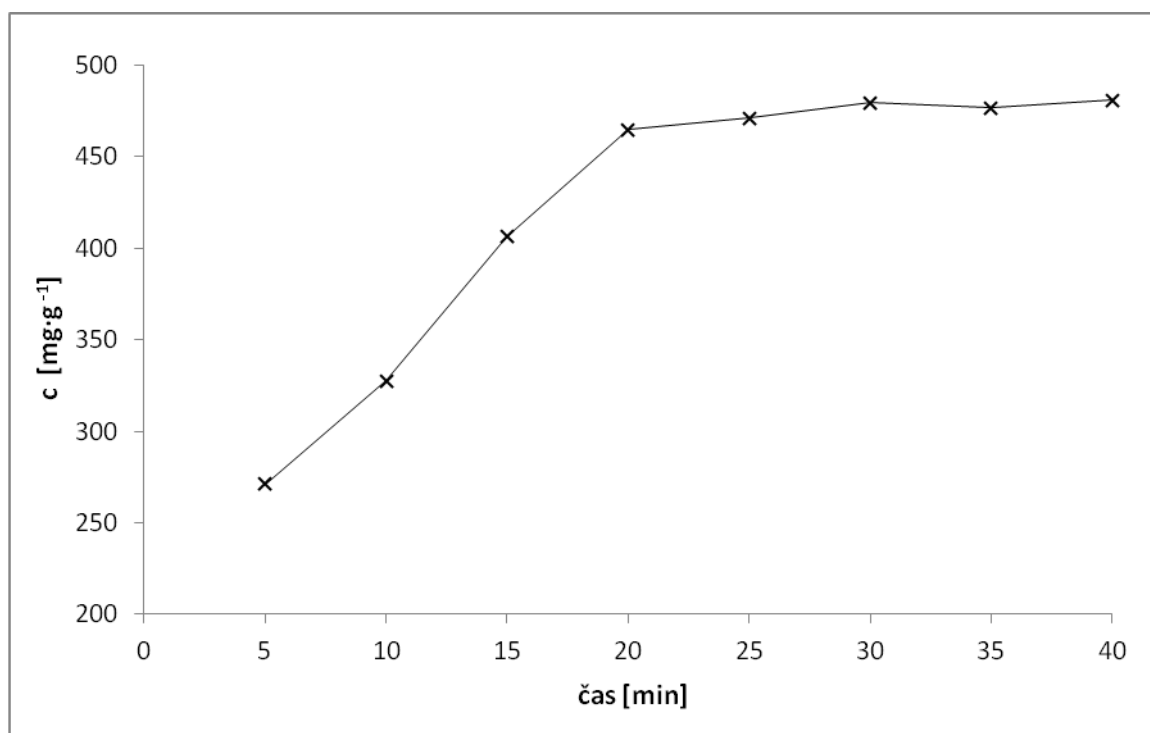
Pre stanovenie celkového obsahu fenolických látok v extraktoch z listov stévie sladkej bola využitá metóda, popísaná v článku [13].

4.1 Stanovenie celkového obsahu fenolických látok v závislosti na čase

Pre toto stanovenie bol využitý extrakt č. 1. Koncentrácia fenolických látok je vyjadrená v ekvivalentom množstve kyseliny gallovej v mg na g listov stévie.

Tabuľka 9: Výsledky stanovenia fenolických látok v závislosti na čase

t [min]	5	10	15	20	25	30	35	40
c_1 [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	271,07	327,56	406,36	464,93	471,21	479,58	477,79	480,97



Graf 1: Množstvo fenolických látok v závislosti na čase

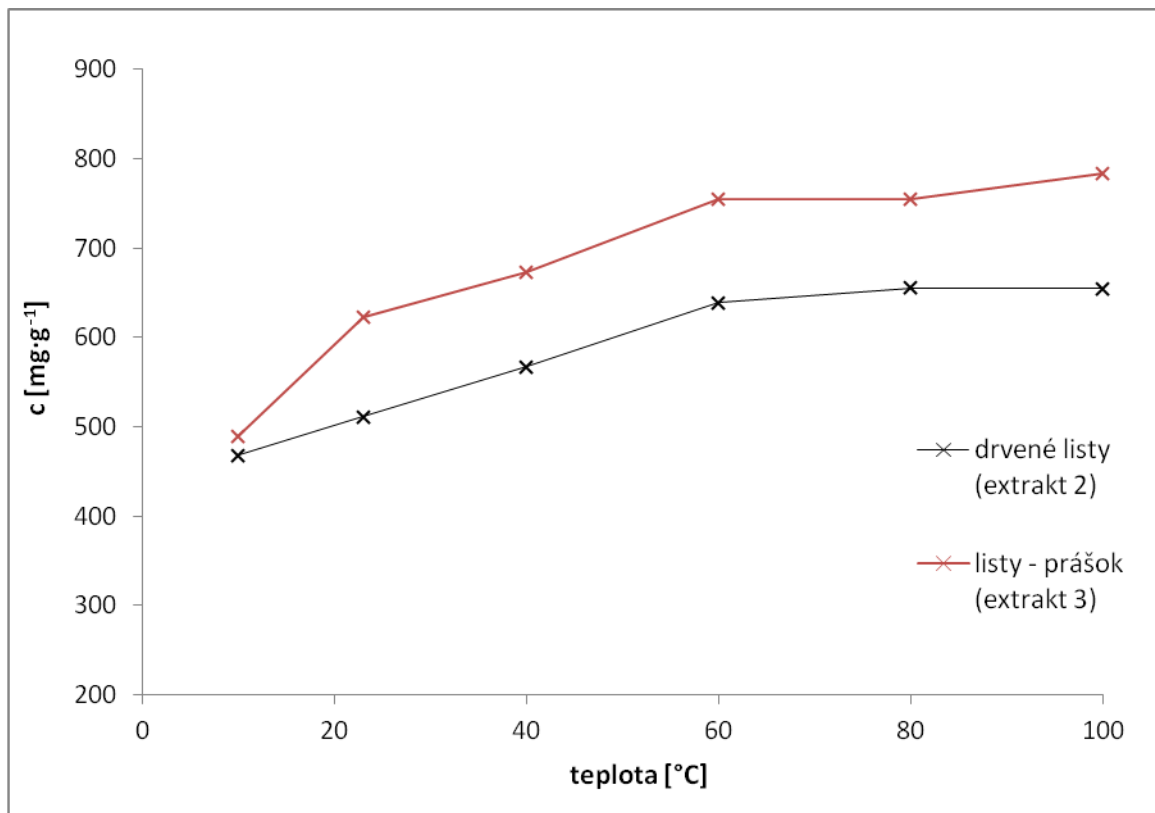
Obsah fenolických látok v extrakte z listov stévie stúpal počas 20 minút vylúhovania. Po tejto dobe sa množstvo fenolických látok už výrazne nezvyšovalo. Preto sa ako štandardný čas extrakcie v ďalších stanoveniach využívala doba 20 minút.

4.2 Stanovenie celkového obsahu fenolických látok v závislosti na teplote vody

Pre toto stanovenie bol použitý extrakt č. 2 (jemne drvené listy) a extrakt č. 3 (listy rozdrvené na prášok).

Tabuľka 10: Výsledky stanovenia obsahu fenolických látok v závislosti na teplote vody

teplota [°C]	10	23	40	60	80	100
c ₂ [mg·g ⁻¹]	467,72	510,96	566,75	638,57	655,31	654,61
c ₃ [mg·g ⁻¹]	488,64	622,61	672,77	754,51	755,38	783,20



Graf 2: Množstvo fenolických látok v závislosti na teplote vody

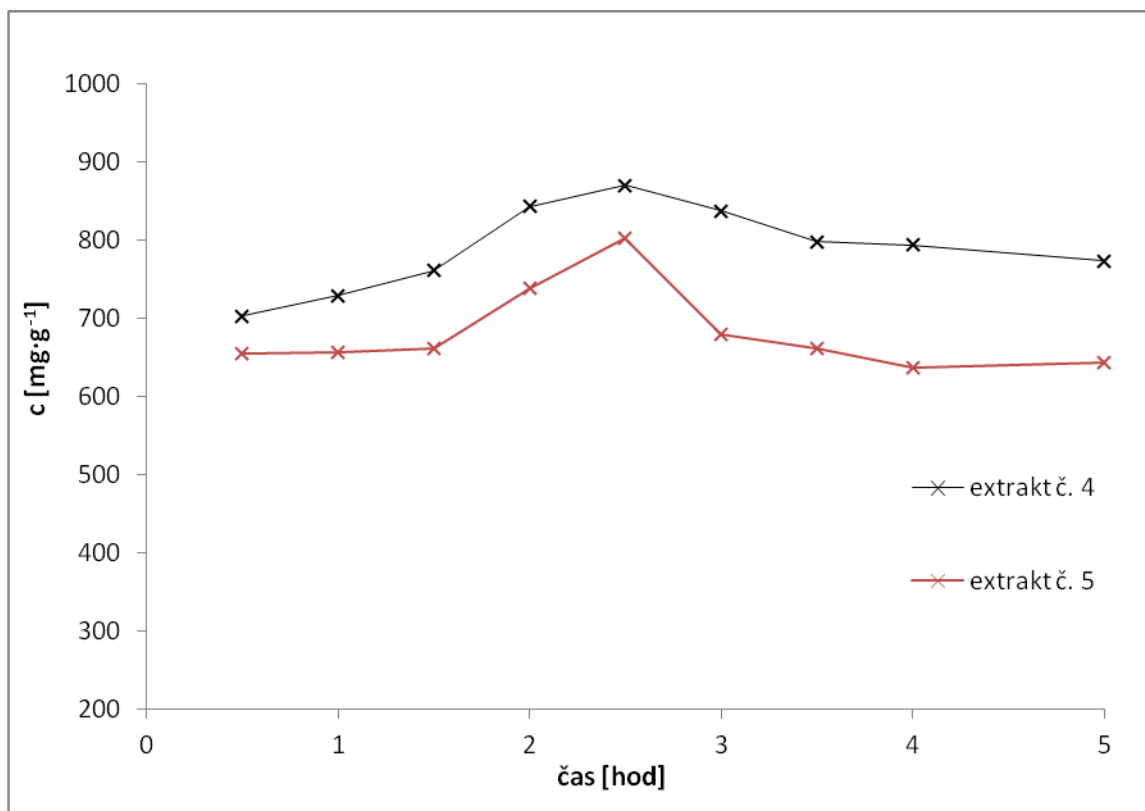
Obsah fenolických látok v extrakte z listov stévie sa zvyšoval so stúpajúcou teplotou vody, v ktorej boli listy vylúhované. S teplotou vody nad 60 °C obsah fenolických látok výrazne nezvyšoval, preto za ideálnu teplotu vody na extrakciu sa dá považovať práve teplota 60 °C. Vylúhovaním podrvených listov na prášok sa do extraktu uvoľní oveľa viac fenolických látok, avšak kvôli výraznejšej zmene chuti sa odporúča do čaju používať listy len jemne podrvené.

4.3 Stanovenie celkového obsahu fenolických látok po dlhšej dobe vylúhovania

Pre toto stanovenie boli použité extrakty č. 4 a 5. Stanovenie bolo rovnako uskutočnené 2krát, pre overenie správnosti výsledkov.

Tabuľka 11: Výsledky stanovenia obsahu fenolických látok po dlhšej dobe vylúhovania

teplota [°C]	10	23	40	60	80	100
c ₄ [mg·g ⁻¹]	467,72	510,96	566,75	638,57	655,31	654,61
c ₅ [mg·g ⁻¹]	488,64	622,61	672,77	754,51	755,38	783,20



Graf 3: Množstvo fenolických látok v závislosti na predĺženej dobe extrakcie

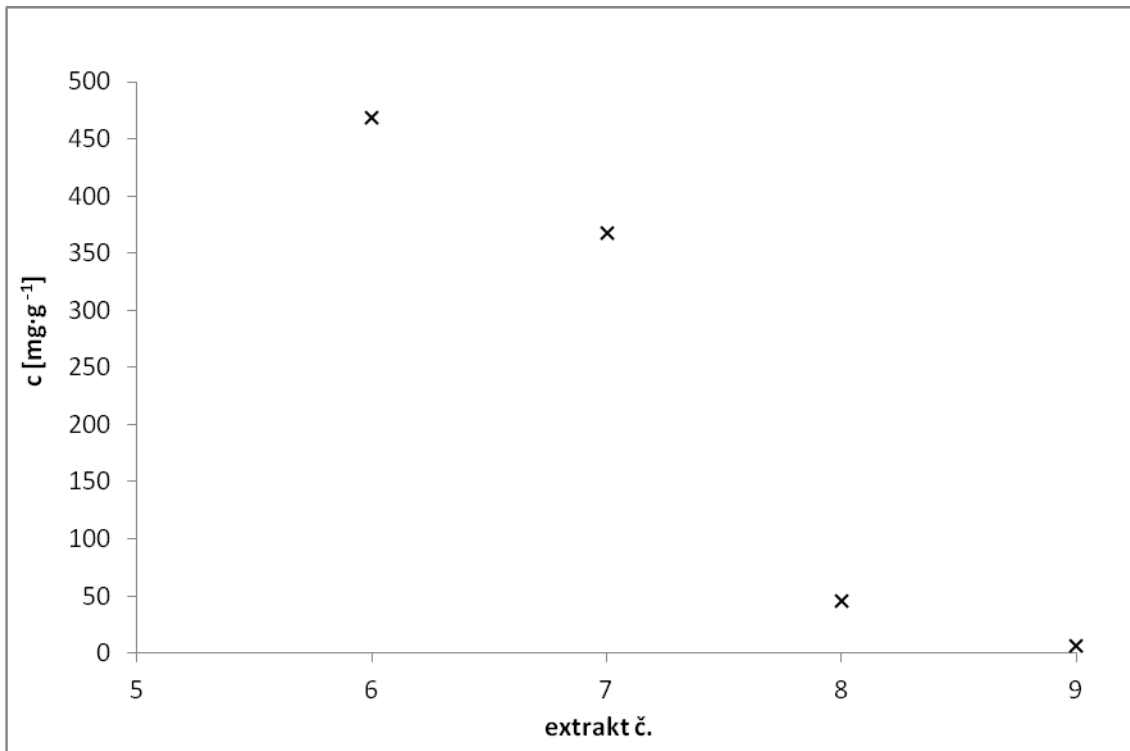
Po dobu 2,5 hodiny dochádzalo najskôr k miernemu, no časom k výraznému zvýšeniu obsahu fenolických látok extrakte počas vylúhovania. Maximálny možný obsah týchto stanovovaných látok bol dosiahnutý práve po 2,5 hodinách vylúhovania. Tento jav zrejme súvisí s tým, že niektoré fenolické látky, ako napríklad epikatechin, gallokatechin gallát a epikatechin gallát sa extrahujú až po dlhšej dobe. Následné znižovanie množstva stanovovaných látok bolo spôsobené oxidáciou a rozkladom fenolických látok [25]. Listy boli drvené v rukách, teda podrvené časti nemali rovnakú veľkosť. V extrakte č. 4 sa nachádzali menšie úlomky, čo sa prejavilo ako vyšší obsah fenolických látok v tomto extrakte.

4.4 Stanovenie fenolických látok v extraktoch z rôznych vzoriek

Pre extrakciu boli použité vzorky suchých listov stévie z roku 2010, 2012 a čerstvé listy (extrakty č. 6-9). Postup prípravy extraktov je popísaný v kapitole 3.3.4.

Tabuľka 12: Výsledky stanovenia fenolických látok v extraktoch z rôznych vzoriek

extrakt č.	6	7	8	9
c [mg·g ⁻¹]	469,12	367,30	45,83	6,77



Graf 4: Množstvo fenolických látok v extraktoch z rôznych vzoriek

V extraktoch č. 8 a 9 (čerstvé listy) bolo oveľa menej fenolických látok ako v extraktoch zo suchých listov. Hlavným dôvodom je, že 70-90 % hmotnosti čerstvých listov tvorí voda. Roztrhaním čerstvých listov na malé kúsky je poškodená bunková stena len niektorých buniek, čím sa do extraktu neuvolnia všetky fenolické látky. Zmrazením došlo k účinnejšiemu poškodeniu bunkových stien, preto extrakt č. 8 obsahoval viac stanovovaných látok. Obsah fenolických látok sa v rastlinách líši, pretože nezávisí len na druhu rastliny, ale i na spôsobe jej pestovania.

5 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce je informovať o rastline s názvom stévia sladká (*Stevia rebaudiana*, Bertoni). Vďaka svojim pozitívnym účinkom a sladkej chuti listov i stonky je považovaná za rastlinu budúcnosti, keďže výrazne narastá počet ľudí s ochorením diabetes mellitus, ale i s obezitou. Ďalšou výhodou je, že nespôsobuje zubný kaz a má tiež antimikrobiálne účinky, vďaka ktorým má veľkú perspektívu nielen v potravinárskom, ale i kozmetickom priemysle.

Z extraktov stévie sa vyrába náhradné sladidlo, predávané pod označením E 960, s názvom steviol-glykozidy. Pretože toto náhradné sladidlo je vyrobené z rastliny, má na trhu väčšiu perspektívu než umelé sladidlá. Okrem samotného stolového sladidla sa pridáva do rôznych potravinárskych výrobkov, hlavne nápojov, kde čiastočne alebo úplne nahrádza cukor. V potravinách sa vyskytuje čoraz častejšie, preto je v práci jedna podkapitola venovaná stabilite stéviozidu, ako hlavnej zložky sladidla, za rôznych podmienok.

Experimentálna časť je zameraná na stanovenie obsahu fenolických látok v extraktoch z listov stévie sladkej, pripravených rôznym spôsobom. Keďže najčastejšie sa listy využívajú na sladenie čaju, extrakcie boli uskutočňované za účelom zistenia najväčšieho obsahu týchto látok. Vylúhovaním listov vo vode s izbovou teplotou v čase stúpal obsah fenolických látok. Po 20 minútach sa už toto množstvo výrazne nezvyšovalo. Vylúhovaním listov vo vode s rôznou teplotou bolo zistené, že optimálna teplota pre extrakciu najväčšieho množstva fenolických látok sa z listov je približne 60 °C. Najúčinnějšía extrakcia stanovovaných látok je zo suchých listov podrvených na prášok, avšak vysoký obsah trieslovín spôsobuje zhoršenie chuti čaju, preto sa odporúča používať na sladenie čaju len jemne v rukách podrvené suché listy.

6 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

1. NOLD, Matthias. New analytical standards of Stevia Rebaudiana. *Analytix*. 2013, č. 1, s. 8-9.
2. VALÍČEK, P., KOKOŠKA, L., HOLUBOVÁ K.: *Léčivé rostliny třetího tisíciletí*. 1. vyd. Benešov: START, 2001, 175 s. ISBN 80-862-3114-3.
3. VALÍČEK, P., VANĚK, T., NEPOVÍM, A.: *Diabetes mellitus a rostliny*, Remedica 6, č. 2-3, 1996.
4. LEMUS-MONDACA, Roberto, VEGA-GÁLVEZ, Antonio, ZURA-BRAVO, Liliana, AH-HEN, Kong.: Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* [online]. 2012, roč. 132, č. 3, s. 1121-1132 [cit. 2013-12-01]. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140.
5. MELE, Lucy. D. Blog. [online]. 2011, 16.02.2012 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <http://dalberg.com/blog/?p=166>
6. Stévia: Sladidlo tretieho tisícročia. *Stevia.eu* [online]. 1. marec 2013 [cit. 2013-12-04]. Dostupné z: <http://www.stevia.eu.sk/sladvost-steviozid-rebaudiozid>
7. NAKAHARA, Y., MORI, K., MATSUI, M.: Diterpenoid total synthesis. Part XVI. Alternative sythetic routes to (\pm)-steviol and (\pm)kaur-16-en-19oic Acid. *Agr. Biol. Chem.*, 1971, vol. 35, pages 918-928.
8. BONDAREV, N. I., SUKHANOVA, M. A., RESHETNYAK, O. V., NOSOV, A. M. Steviol glycoside content in different organs of Stevia rebaudiana and its dynamics during ontogeny. *Biologia plantarum*. 2003/4, č. 47, s. 261-264.
9. NEPOVÍM, A.: *Studium obsahových látek v intaktních a tumorově transformovaných rostlinách u druhu Stevia rebaudiana Bertoni*. Praha, 1998. 11 s. Diplomová práce na Katedre tropických a subtropických plodin na České zemědělské univerzitě v Praze. Vedúci diplomovej práce Prof. Ing. Pavel Valíček, DrSc.
10. CHATSUDTHIPONG, V., MUANPRASAT, Chatchai.: Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology* [online]. 2009, roč. 121, č. 1, s. 41-54 [cit. 2013-12-10]. ISSN 01637258. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2008.09.007.
11. PURI, M., SHARMA, D., TIWARI, A. K.: Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, roč. 29, č. 6, s. 781-791 [cit. 2013-01-18]. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011000826>

12. PRAKASH, I., DuBOIS, G. E., CLOS, J. F., WILKENS, K.L.; FOSDICK, L. E.: Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, roč. 46, č. 7, S75-S82 [cit. 2013-01-18]. ISSN 02786915.
13. SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Polyphenols and flavonoids: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in enzymology*. 1999, č. 299, s. 152-177.
14. COOK, N. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of the European Ceramic Society* [online]. 2004, s. 66-76 [cit. 2013-02-03]. ISSN 09552219. DOI: 10.1016/S0955-2863(95)00168-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286395001689>
15. BRANDLE, J. E, STARRATT, A. N., GIJZEN M. Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian journal of plant science: Revue canadienne de phytotechnie* [online]. 1998, roč. 78, č. 4, s. 527-536 [cit. 2013-01-31]. ISSN 0008-4220
16. ČUMAKOV, A.: BARENTZ. *Varíme, pečieme: Stevia rebaudiana, Bertoni, Rastlina budúcnosti*. Tlačiareň Impress. Zvolen, 2012.
17. MUANDA, F. N., SOULIMANI, R., DIOP, B., DICKO, A.: Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2011, roč. 44, č. 9, s. 1865-1872 [cit. 2013-01-22]. ISSN 00236438. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.12.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643810004160>
18. RAO, A. B., REDDY, G. R., ERNALA, P., SRIDHAR, S., RAVIKUMAR, Y. V. L. An improvised process of isolation, purification of steviosides from Stevia rebaudiana Bertoni leaves and its biological activity. *International Journal of Food Science* [online]. 2012, roč. 47, č. 12, s. 2554-2560 [cit. 2013-01-19]. ISSN 09505423. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03134.x.
19. KROYER, Gerhard. Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* [online]. 2010, roč. 5, č. 2, s. 225-229 [cit. 2013-12-30]. ISSN 1661-5751. DOI: 10.1007/s00003-010-0557-3.
20. Úradný vestník Európskej únie: Nariadenie komisie (EÚ) č. 1131/2011. In: [online]. 11.11.2011. Brusel [cit. 2013-01-018]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0205:0211:SK:PDF>
21. E960 - Steviol-glykosidy. In: *Emulgatory* [online]. [cit. 2013-01-20]. Dostupné z: <http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E960>

22. SHIVANNA, N., NAIKA, M., KHANUM, F., KAUL, V. K. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications* [online]. 2012, s. - [cit. 2013-02-02]. ISSN 10568727. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2012.10.001.
23. KIM, I., YANG, M., LEE, O. H., KANG, S. N. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2011, roč. 44, č. 5, s. 1328-1332 [cit. 2013-03-03]. ISSN 00236438. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.12.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643810004172>
24. AINSWORTH, E. A., GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* [online]. 2007, roč. 2, č. 4, s. 875-877 [cit. 2013-02-12]. ISSN 1754-2189. DOI: 10.1038/nprot.2007.102.
25. KOSIŃSKA, A., XIE, Y., DIERING, S., HÄRITIER, J., ANDLAUER, W. Stability of Phenolic Compounds Isolated from Cocoa, Green Tea and Strawberries in Hank's Balanced Salt Solution under Cell Culture Conditions. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* [online]. roč. 62, č. 2, s. - [cit. 2013-04-13]. ISSN 2083-6007. DOI: 10.2478/v10222-011-0048-y.
26. Nuovo Caffè. [online]. 2013 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <http://www.napojoveautomaty.cz/produkty/balene-potravin/cerna-hora-malina#bmDescription>
27. SPÁK, kečupy. [online]. 2009 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <http://www.spak.cz/produkt/kecupy>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

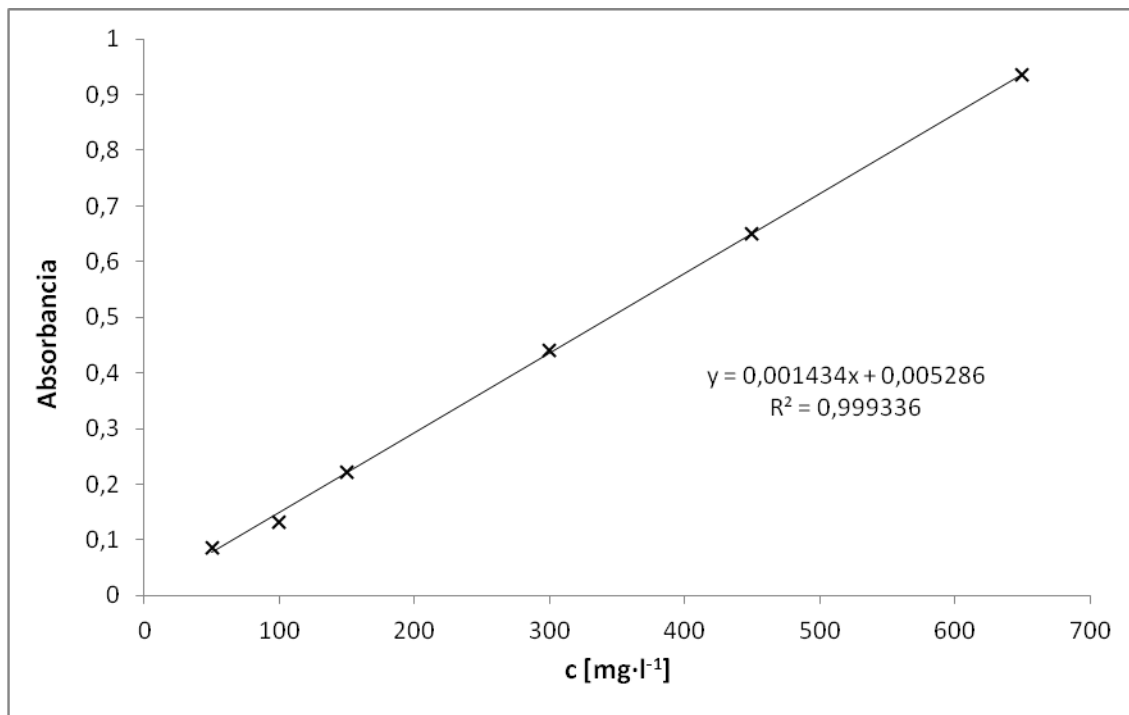
- A - absorbancia
FAO (Food and agriculture organization) - Organizácia pre stravu a poľnohospodárstvo
hm. - hmotnostný
JECFA (Joint FAO/WHO expert committee on food additives) - Spoločný výbor expertov
FAO/WHO pre potravinárske aditíva
kol. - kolektív
RNA (Ribonucleic acid) - Ribonukleová kyselina
USA (United states of America) - Spojené štáty americké
UV (ultraviolet radiation) - ultrafialové žiarenie
VIS (visible radiation) - viditeľné svetlo
WHO (World health organization) - Svetová zdravotnícka organizácia

8 ZOZNAM PRÍLOH

- Príloha č. 1: Graf – Kalibračná závislosť kyseliny gallovej
- Príloha č. 2: Niektoré potravinárske produkty so stéviou
- Príloha č. 3: Steviol-glykozidy vo forme stolového sladidla
- Príloha č.4: Schválené prídavné látky v potravinách a podmienky ich používania v kategóriách potravín

9 PRÍLOHY

Príloha č.1: Graf – Kalibračná závislosť kyseliny gallovej



c [mg·l ⁻¹]	A
50	0,086
100	0,133
150	0,223
300	0,441
450	0,651
650	0,936

Príloha č.2: Niektoré potravinárske produkty so stéviou [26,27]



Príloha č. 3: Steviol-glykozidy vo forme stolového sladidla



Príloha č. 4: Schválené prídavné látky v potravinách a podmienky ich používania v kategóriách potravín [20]

Kategória (číslo)	Číslo E	Názov	Najvyššie prípustné množstvo (mg/l prípadne mg/kg)	Poznámky pod čiarou	Obmedzenia/výnimka
01.4	Ochutené fermentované mliečne výrobky vrátane výrobkov, ktoré boli tepelne ošetrované				
	E 960	Glykozidy steviolu	100	(60)	iba výrobky so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
03	Zmrzliny				
	E 960	Glykozidy steviolu	200	(60)	iba výrobky so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
04.2.2	Ovocie a zelenina v octe, oleji alebo náleve				
	E 960	Glykozidy steviolu	100	(60)	iba sladkokyslé nakladané ovocie a zelenina
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
04.2.4.1	Ovocné a zeleninové prípravky okrem kompótov				
	E 960	Glykozidy steviolu	200	(60)	iba prípravky so zníženou energetickou hodnotou
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
04.2.5.1	Extra džem a extra rôsol v zmysle vymedzenia v smernici 2001/113/ES				
	E 960	Glykozidy steviolu	200	(60)	iba džemy, rôsoly a marmelády so zníženou energetickou hodnotou
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
04.2.5.2	Džemy, rôsoly, marmelády a sladené gaštanové pyr v zmysle vymedzenia v smernici 2001/113/ES				
	E 960	Glykozidy steviolu	200	(60)	iba džemy, rôsoly a marmelády so zníženou energetickou hodnotou
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			

Kategória (číslo)	Číslo E	Názov	Najvyššie prípustné množstvo (mg/l prípadne mg/kg)	Poznámky pod čiarou	Obmedzenia/výnimka
04.2.5.3	Iné podobné ovocné alebo zeleninové nátierky				
	E 960	Glykozidy steviolu	200	(60)	iba nátierky na báze sušeného ovocia so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
05.1	Výrobky z kakaá a čokolády zahrnuté v smernici 2000/36/ES				
	E 960	Glykozidy steviolu	270	(60)	iba výrobky so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukrov
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
05.2	Iné cukrovinky vrátane drobných cukríkov na osvieženie dychu				
	E 960	Glykozidy steviolu	270	(60)	iba cukrovinky na báze kakaá alebo sušeného ovocia so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru
	E 960	Glykozidy steviolu	330	(60)	iba nátierky na báze kakaá, mlieka, sušeného ovocia alebo tukov, so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru
	E 960	Glykozidy steviolu	350	(60)	iba cukrovinky bez prídavku cukru
	E 960	Glykozidy steviolu	2 000	(60)	iba drobné cukríky na osvieženie dychu, bez prídavku cukru
	E 960	Glykozidy steviolu	670	(60)	iba silne ochutené osviežujúce pastilky na hrdlo, bez prídavku cukru
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
05.3	Žuvačky				
	E 960	Glykozidy steviolu	3 300	(60)	iba bez prídavku cukru
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
05.4	Dekorácie, povlaky a náplne okrem náplní na báze ovocia zahrnutých v kategórii 4.2.4				
	E 960	Glykozidy steviolu	330	(60)	iba cukrovinky bez prídavku cukru
	E 960	Glykozidy steviolu	270	(60)	iba cukrovinky na báze kakaá alebo sušeného ovocia so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				

Katégoria (číslo)	Číslo E	Názov	Najvyššie prípustné množstvo (mg/l prípadne mg/kg)	Poznámky pod čiarou	Obmedzenia/výnimka
06.3	Cereálie na prípravu raňajok				
	E 960	Glykozidy steviolu	330	(60)	iba cereálie na prípravu raňajok s obsahom vlákniny vyšším ako 15 % a s obsahom otrúb najmenej 20 %, so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
07.2	Jemné pečivo				
	E 960	Glykozidy steviolu	330	(60)	iba essoblaten (jedlé oblátky)
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
09.2	Spracované ryby a produkty rybolovu vrátane mäkkýšov a kôrovcov				
	E 960	Glykozidy steviolu	200	(60)	iba rybie výrobky v sladkokyslom náleve v konzervách a polokonzervách, marinády z rýb, kôrovcov a mäkkýšov
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
11.4.1	Stolové sladidlá v tekutej forme				
	E 960	Glykozidy steviolu	QS	(60)	
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
11.4.2	Stolové sladidlá vo forme prášku				
	E 960	Glykozidy steviolu	QS	(60)	
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
11.4.3	Stolové sladidlá vo forme tabliet				
	E 960	Glykozidy steviolu	QS	(60)	
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			
12.5	Polievky a vývary				
	E 960	Glykozidy steviolu	40	(60)	iba polievky so zníženou energetickou hodnotou
		(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu			

Kategória (číslo)	Číslo E	Názov	Najvyššie prípustné množstvo (mg/l prípadne mg/kg)	Poznámky pod čiarou	Obmedzenia/výnimka
12.6	Omáčky				
	E 960	Glykozidy steviolu	120	(60)	okrem omáčky zo sójových bôbov (fermentovaných a nefermentovaných)
	E 960	Glykozidy steviolu	175	(60)	len omáčka zo sójových bôbov (fermentovaných a nefermentovaných)
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
13.2	Dietetické potraviny na osobitné medicínske účely v zmysle vymedzenia v smernici 1999/21/ES (okrem výrobkov zahrnutých v kategórii potravín 13.1.5)				
	E 960	Glykozidy steviolu	330	(60)	
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
13.3	Dietetické potraviny na regulovanie telesnej hmotnosti ako náhrada celodenného príjmu stravy alebo jedného denného jedla (celodenná strava alebo časť celkovej dennej stravy)				
	E 960	Glykozidy steviolu	270	(60)	
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
14.1.3	Ovocné nektáre v zmysle vymedzenia v smernici Rady 2001/112/ES, zeleninové nektáre a podobné produkty				
	E 960	Glykozidy steviolu	100	(60)	iba výrobky so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
14.1.4	Ochutené nápoje				
	E 960	Glykozidy steviolu	80	(60)	iba výrobky so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru;
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
14.2.1	Pivo a sladové nápoje				
	E 960	Glykozidy steviolu	70	(60)	iba nealkoholické pivo alebo pivo s obsahom alkoholu neprekračujúcim 1,2 % objemu; ľahké pivo „Bière de table/Tafelbier/ Table beer“ (obsah pôvodnej mladiny nižší než 6 %) s výnimkou jednoduchého piva získaného vrchným kvasením „Obergäriges Einfachbier“; piva s minimálnou kyslosťou 30 miliekvivalentov vyjadrené ako NaOH; tmavé piva typu „oud bruin“
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
14.2.8	Iné alkoholické nápoje vrátane liehovín s menej ako 15 % alkoholu a zmesi alkoholických nápojov s nealkoholickými nápojmi				
	E 960	Glykozidy steviolu	150	(60)	
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				

Kategória (číslo)	Číslo E	Názov	Najvyššie prípustné množstvo (mg/l prípadne mg/kg)	Poznámky pod čiarou	Obmedzenia/výnimka
15.1	Snacky na báze zemiakov, obilia, múky alebo škrobu				
	E 960	Glykozidy steviolu	20	(60)	
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
15.2	Spracované orechy				
	E 960	Glykozidy steviolu	20	(60)	
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
16.	Dezerty okrem výrobkov zahrnutých v kategórii 1, 3 a 4				
	E 960	Glykozidy steviolu	100	(60)	iba výrobky so zníženou energetickou hodnotou alebo bez prídavku cukru
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
17.1	Potravinové doplnky dodávané v tuhej forme vrátane kapsúl, tabliet a podobných foriem				
	E 960	Glykozidy steviolu	670	(60)	
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
17.2	Potravinové doplnky dodávané v tekutej forme				
	E 960	Glykozidy steviolu	200	(60)	
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				
17.3	Doplnky dodávané vo forme sirupu alebo v žuvacej forme				
	E 960	Glykozidy steviolu	1 800	(60)	
	(60): vyjadrené ako ekvivalenty steviolu				