Study of The Chemical Composition, Biological and Sensory Properties of the Natural Sweetener Extracted from (Stevia Rebaudiana) Grown in Lattakia

Dr. Fouad Salman*
Dr. Ahmed Qara Ali**
Manhal Shamieh***

(Received 20 / 11 / 2024. Accepted 16 / 1 /2025)

□ ABSTRACT □

The study was conducted in the laboratories of the Faculty of Agriculture and the laboratories of the Higher Institute of Marine Research at Tishreen University in 2022-2023. The study aimed to determine the chemical composition and sensory and biological properties of the natural sweetener Stevioside extracted from the dry leaves of stevia grown in Lattakia by two methods and compare them with each other. The importance of the research comes as it studies the characteristics and properties of a natural sweetener that is a good alternative to artificial sweeteners in terms of nutrition and health.

Stevioside was extracted from the dry leaves of Stevia by two methods: The first is aqueous extraction was performed according to (Woelwer, 2010), and the second is alcoholic extraction was performed according to (Nikolai, 2001). The analysis of stevia leaves (moisture, ash, protein, fat, crude fiber, total carbohydrates) was performed according to (AOAC,1989), the degree of sweetness was estimated according to (Isima and Kakayama,1976) and the content of Stevioside was estimated by HPLC according to Nishiyama,1992), where the content of stevia leaves of moisture, ash, protein, and fat came respectively (6.2%, 8.3%, 11.2%, 4.1%) while the carbohydrate content was high (59.4%), and the highest amount of Stevioside was obtained by alcoholic extraction (12.7%) compared to aqueous extraction (8.2%).

The results also showed that there was some bitter taste in Stevia leaves compared to sucrose, and the relative sweetness of the aqueous extracted stevia solution was 110 times that of sucrose, while it was 150 times that of sucrose in the alcoholic extract.

Keywords: Stevia Rebaudiana, Stevioside, Natural Sweetener

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Professor, Faculty of Agricultural Engineering, Tishreen University, lattakia, Syria**
****Professor Higher Institute of Marine Research, Tishreen University, lattakia, Syria**
*****PhD student, Faculty of Agricultural Engineering, Tishreen University, lattakia, Syria**

دِراسةُ التَركيبِ الكِيميائيّ وَالخَصائِصِ الحَيويَّةِ والحسيَّةِ للمُحلِّي الطَبيعي المُستَخلَصِ مِن نَباتِ (استيفيا ريبوديانا) المَزروعَةِ في اللاذقيّة

د. فؤاد سلمان*

د. أحمد قره علي**

منهل شامية***

(تاريخ الإيداع 20 / 11 / 2024. قبل للنشر في 16 / 1 / 2025)

□ ملخّص □

أُجريت الدراسةُ في مخابرِ كليّة الهندسَةِ الزراعيّة، ومخابرِ المعهدِ العالي للبُحوثِ البحرية في جامعةِ تشرين في عام (2022-2023)، حيثُ هَدفتِ الدِراسةُ إلى تَحديدِ التَركيبِ الكيميائِّي والخَصائِصِ الحِسيّةِ والحَيويّةِ للمُحلّي الطَبيعي الاستفيوزيد المُستَخلصِ مِن أوراقِ الاستيفيا الجَافَّةِ المَزروعَةِ في اللاذقيّة بِطريقتين ومُقارَنَتِهما مَع بَعضِهما البَعض، وتَأتي أَهميّةُ البَحثِ كَونَهُ يَدرسُ صِفات وخَصائص مُحلٍّ طبيعيٍّ يُعَدُّ بَديلاً جَيداً للمحلياتِ الصِناعيّة مِنَ النَاحيةِ الغذائيةِ والصحيّة.

تَمَّ استخلاصُ الأستفيوزيد مِنَ الأوراقِ الجافّةِ للأستيفيا بطريقتين: الأولى استخلاصٌ مائيٌ وفقاً لطريقةِ (Woelwer, 2010)، والثانية استخلاصٌ كحوليٌ وفقاً لطريقةِ (Nikolai, 2001)، وتَمَّ إجراء التحاليل لأوراقِ الأستيفيا من (رطوبة، رماد، بروتين، دهن، ألياف خام، كربوهيدرات كلية) وفقاً (AOAC,1989)، وتَمَّ تَقديرُ درجةِ الحلاوةِ وفقاً (Isima and Kakayama ,1976)، وتَمَّ تقديرُ مُحتوى الأوراق من الأستفيوزيد بواسطة HPLC وفقاً (Nishiyama,1992)، حيثُ جاءَ مُحتوى أوراقِ الأُستيفيا مِنَ الرطوبةِ، الرماد، البروتين، والدهن على التوالي (6.2%، 8.3%، 11.2%،4.1%) في حين كانَ مُحتواها مِنَ الكَربوهيدرات مُرتفع (59.4%)، كما تَمَّ الحُصولُ على الكميّةِ الأكبر مِنَ الأستفيوزيد وفقاً للاستخلاصِ الكحوليّ (12.7%) مُقارنةً مَع الاستخلاصِ المائيّ الَّذي كانَت فِيهِ كَميَّةُ الأستفيوزيد (8.2%).

كَما أَظهَرتِ النَتَائِجُ بوجودِ بَعضٍ مَنَ الطَعمِ المُرِ في أوراقِ الأستيفيا مُقارنةً مع السَكَروز، وكَانَت دَرجةُ الحَلاوةِ النِسبيَّةِ لِمحلولِ الأُستيفيا المُستَخلَص وفقاً للطريقةِ المائيةِ 110 مَرَّة أَكبر مِن قُدرَةِ السَكَروز، في حين كَانَت 150 مَرَّة أَكبر من قُدرَة السَكَروز في ذَلِكَ المُستَخلصِ وِفقاً للطريقةِ الكُحُولية.

الكلمات المفتاحية: استيفيا ريبوديانا، استفيوزيد، محليات طبيعية.

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

*أستاذ – كلية الهندسة الزراعية- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية fouad.a.salman@tishreen.edu.sy

**أستاذ -المعهد العالي للبحوث البحرية- جامعة تشرين اللاذقية- سورية ahmad.ibrahim.kara-ali@tishreen.edu.sy

***طالب دكتوراه- قسم علوم الأغذية- كلية الهندسة الزراعية - جامعة تشرين اللاذقية- سورية Mnhal.shamieh.89@gmail.com

مُقدمة:

يُعرَّف الإستيفيوزيد على أنَّهُ نَوع جديد مِنَ المُحليَّات الطبيعية، يَتم استِخرَاجهُ مِن أوراقِ نباتِ الاستيفيا، ويتميَّز بِدرجةِ تحليةٍ عاليةٍ مع خُلوِّه مِنَ السُعُراتِ الحراريَّة. وهُو قابلٌ للذوبانِ في الماءِ بسهولةٍ وقابلٌ للخلطِ مع كافَّةِ مواد التَحليَة الأُخرى، مِثلَ سُكرِ القَصبِ والفركتوز، وهُو طَيّبُ المَذاقِ، ولا يُؤثرُ على خَواصِّ الأَغذية بِدرجةٍ تُذكر، وكذلك لا يَترتب على إضافَتهِ أيُّ أثَرٍ التصاقيّ، أو تلوينيّ (Chatsudthipong and Muanprasat, 2009) .

يَتبَعُ نباتُ الاستيفيا العائلة Compositae الجِنس Stevia الاسم العلمي Stevia Rebaudiana Bertoni، والإستيفيا هُو نَباتٌ عُشبيٌ مُعمّر، تَميَّز بأنَّ لَهُ عشراتَ الأصنافِ الأُخرى مِن عَائلةِ هذا النَبَات، والَّتي تَحمِلُ العَديد مِنَ الصِفات، ولها نفس الاسم الأول Stevia، ويَتميَّز نبات (استيفيا ريبوديانا بيرتوني) عنها باحتواءِ أوراقهِ على مجموعةٍ مِنَ المُركباتِ الطبيعيَّة الَّتي لَهَا قُوَّة تَحليةٍ تَتَراوحُ مِن 200 إلى 300 مَرَّة، قَدرَ قُوَّة تَحلية السَكَروز(Bertoni, 1899).

الشكل (1) يُوضح شكل نبات الاستيفيا

وفي عام 1970 قُدِمت الاستيفيا على أسَاسِ أنَّها مُحلي تِجاري في الأسواقِ اليابانية (Ashok et al., 2011)، واليوم تُستخدمُ جليكوسيدات الاستيفيا لإنتاجِ الغِذاء في الولاياتِ المُتحدة، وكندا، واستخدامُ مُستخلصِ الاستيفيا يُصبحُ شائعاً أكثرَ فأكثر فَعَلى سَبيلِ المِثالِ نَجدُها مُستخدمةً في صناعةِ الشوكولا، اليوغورت، والاستخدام المنزلي (Rezai et al.,2017).

جَميعُ مُركَّباتِ الاستيفيا تتكَوَّن مِن مُركَّبٍ كيميائِّي هُوَ الإستيفيول Steviol، لَكنَّها تَختلفُ في بقيَّةِ الكربوهيدرات المَوجودةِ عندَ ذَرات الكَربون (13–19) ، ويَكون المُركَّب الرَئيس للأوراق هُو الإستفيوزيد Stevioside (5–10%) من إجمالي الوزن الجاف، (2–4%) Rebandioside A، Dudcoside A (0.4 –0.7%). (Varanuj and chatachai, 2009).

جليكوسيدات الستيفول (Steviol Glycosides) هِيَ الاسمُ الَّذي يُطلَق على فِئَةٍ مُعيَّنة مِنَ الديتربين المُرتَبِطةِ مَع الغليكوزيل (Glycosylated Diterpenes)، والَّتي يَكَون أسَاسُها الستيفول مَعَ جُزيَئينِ مِنَ الجلوكوز، أو جلوكوز و رامانوز، أو جلوكوز واكسيلوز مُرتَبطةٍ بِروابِط استيرية، وبالتالي الديتربين المَعروف باسم الستيفول هو جلايكون من جليكوسيدات الاستيفيا الحلوة (Rouhani, 2018). إنَّ الصِيغَة الكيميائيَّة للاستفيوزيد هي C38H60O18، في حِين أنّ الصِيغة الكيميائيَّة ل Rebaudioside A هي C44H70O23 مِمَّا يَدلُّ على أنَّه يَحوي على جُزَيء جلوكوز إضافيّ C6H12O6 مُرتبط بِرابطة استيرية، وفيما يلي شَكل يوضح بُنية الستيفول (Masaya et al., 2009).

تَمَّ فَصلُ المادة المُحليَّة الأساسيَّة عام 1909، ثُمَّ تمَّ فَصلُ العديدِ مِنَ المَواد مِن هذا النبات منها Steviol، وفي عام 1952 تمَّ التَّعرُف على التَركيبِ الكيميائيّ للإستيفيوسيد على أنَّه جليكوزيد ثنائي التربين، ويُوصف الإستيفيوسيد على أنَّه مَادة جليكوزيدية يَتكوَّن مِن ثَلاثةِ جُزئياتٍ مِنَ الجلُوكوز أو الجليكون، والستيفول. وخِلال فَترة الثَمانينات تَمَّ فَصل مُركبات أُخرى مثل Rebandioside A ويُعرَف أيضاً باسم Rebtose، وحالياً يَتم استخدام جليكوزيد Steviol كَمادةٍ مُحليَّةٍ، وصَالحةٍ للاستخدام البَشريّ في العديد من الدول (Barriocanal, et al 2008) . ويَتمُ فَصلُ هَذهِ المَواد بِعَدةِ طُرق تَعتمدُ بِشَكلٍ أَساسيٍ على استخدام مجموعةٍ مِنَ المُذيباتِ مِثل الايثانول، أوالميثانول حَيثُ يَتمُ استخراج جليكوسيدات الستيفول مِنَ النَباتاتِ المُجفَفة والمُكَسَّرة، كما تمَّ تطوير عِدَة طُرقٍ مُعتمِدةً على التَبادلِ الأيونيّ، كروماتوغرافيا الادمصاص، والتَرسيب الانتقائي لجليكوسيدات مُعينة مِنَ الاستيفول (Brandle et al., 1998).

وتُعتبر جليكوسيدات الستيفول أمنةً بِشكلٍ عَام، لا تتحلل أنزيمياً أو تُمتص في الجزء العُلويّ للجهازِ الهضمي، حَيثُ أنَّها تتكسر في الجزءِ السُفلي من الجهازِ الهَضمي بواسطةِ البكتيريا الموجودةِ في القولون (Geuns, 2007)، وحددت مُنظمةُ الأممِ المتحدة للأغذية والزراعة FAO الكمية المَسموح تناولها يومياً من جليكوسيدات الستيفول ADI عند 0.4 mg/kg من وزن الجسم (Perrier et al., 2018)، ولتحكم آمن بمستوى جليكوسيدات الستيفول في الغذاء غالباً ما يتم استخدام HPLC حيث أنّها طريقة مرجعية صُدقت من قبل (FAO/WHO,2017)، وتمَّ تأكيدُ فَعاليتها مِن خِلالِ أَحدثِ الأبحاث (Fayaz et al., 2018).

أهمية البحث و أهدافه:

أهمية البحث:

نظراً لأَهميَّة السُكريات واستخدامها الكبير في العمليات التصنيعية، والاستهلاك المنزلي، وارتباطها بالعديد مِنَ المَشاكل الصحيَّة كالسُمنة، وأمراضِ السُكري، والقلب كانَ لابُدَّ مِن إيجادِ بَديلٍ طَبيعيّ للسكريات الصناعية، يكون منخفض السعرات الحرارية، ولايؤدي تناوله إلى ارتفاع سكري الدم، ويتمتع بقيمة غذائية عالية، حيثُ زَادَ الاهتمام حالياً بزراعة الاستيفيا في الجمهورية العربية السورية في العديدِ مِنَ المراكز البحثية.

- **أهداف البحث:**

- دراسة التركيب الكيميائي لأوراق الاستيفيا ريبوديانا المزروعة في اللاذقية.
- دراسة الخصائص الحسيَّة، والحَيويَّة لِهذهِ الأوراق.
- استخلاص المادة المُحلية مِن هَذهِ الأوراق بطريقتين استخلاصٌ مائيّ، واستخلاصٌ كُحوليّ.
- المقارنة بين الطريقتين من حيث الكفاءة في استخلاص المادة الفعالة (غليكوزيد الإستيفوزيد).
- المقارنة بين المستخلصين والسكروز من حيث الخصائص ودرجة التحلية.

طرائق البحث ومواده:

1- المواد والأجهزة المستخدمة:

- حمض الكبريت المركز 95%، محلول فينول 5%، حمض دينترو ساليسيلك (Dinitrosalicylic Acid DNS)، ميثانول، كاشف فولن، كربونات الصوديوم، حمض الغاليك، محلول Dpph (1-1diphenyl 1-2 Picylhydrozyl)، بوتانول.

- طاحونة كهربائية High Speed Blender، حافظات بلاستيكية خاصة، جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer، أنابيب اختبار، جهاز امتصاص ذري Atomic Absorbtion، فرن تجفيف، جهاز كلداهل، جهاز سوكسلت،مرمدة، مقياس طيف اللهب، جهاز طرد مركزي مخبري 3000 دورة/ دقيقة، رفراكتومتر Refractometer، HPLC(HEWLETT) PACHARD 1100، مرشح 45 ميكرون.

2- الطرائق التحليلية:

تَمَّ اعتماد مَنهج البَحث الوَصفيّ، فضلاً عَن إتباعِ أسلوبِ العَملِ التجريبيّ والمخبريّ، وبَعدَ استقراءِ النتائج تَمَّ تَحليلها تحليلاً إحصائياً مناسباً، لإيجاد تفسير علمي لها، وتَمَّ إجراء التحاليل المخبرية والتجارب في مخابر كلّية الزراعة، ومخابر المعهد العالي للبحوث البحرية في جامعة تشرين، وفقاً للطرق التالية:

- **تحضير العينة:**

جُمعت أوراق نبات الاستيفيا من أماكن زراعتها في مدينة اللاذقية (أحواض زراعية في مدينة اللاذقية، قرية جبريون، قرية القنجرة) خلال العام 2022–2023 عندما تبلغ مرحلة النمو القصوى (المرحلة التي تسبق مرحلة الازهار) بين شهري أيلول وتشرين الثاني حيث تقطع على بعد 5–10 سم من التربة، تُزال الأوراق الصفراء والبنية، ثم تغسل بالماء وتجفف تحت أشعة الشمس بمتوسط درجة حرارة °25–30 مئوية، لمدة 24–48 ساعة وبعد ذلك يتم سحق الأوراق بواسطة طاحونة كهربائية (high speed blender) للوصول إلى جزيئات بحجم 1 مم وتحفظ في حافظات خاصة في البراد على درجة حرارة °4±1 مئوية حتى موعد إجراء الاختبارات.

الشكل (3) يوضح جمع وتحضير عينات

- **التحاليل الكيميائية لأوراق الاستيفيا الجافة:**

التحاليل الكيميائية لِعينات الأوراق المُحضَّرة من (رطوبة، رماد، بروتين، دهن، ألياف خام) تَمَّت وفق(AOAC ,2005) حيثُ تَمَّ تقدير الرطوبة باستخدام فرن التجفيف على درجة حرارة 105 درجة مئوية حتى ثبات الوزن، كما تم تقدير الرماد باستخدام مرمدة muffle على درجة حرارة 550–600 درجة مئوية لمدة 6 ساعات، وقدرت البروتينات الكلية عن طريق تقدير النتروجين باستخدامجهاز كلداهل، وقدرت الدهون الكلية باستخدام جهاز سوكسلت والهكسان كمذيب، وقُدرت الألياف في أوراق الاستيفيا الجافة عن طريق أخذ 1 غ من أوراق االستيفيا الجافة، أوضيف لها 50 مل حمض الكبريت تركيزه (1.25%) ،ثم التسخين إلى درجة الغليان ثم تُرك على هذه الدرجة لمدة ربع ساعة أضيف له 10 مل هيدروكسيد الصوديوم % 10 وترك بدرجة الغليان لمدة ربع ساعة مع التحريك ومن ثم خفض الضغط باستخدام مضخة التفريغ، وتَمَّ تقدير الكربوهيدرات الكلية عن طريق طرح مجموع الرطوبة والرماد والبروتين والدهن من 100 غ.

وقدرت الكربوهيدرات الذوابة وفقا لطريقة (Dubois, *et al*., 1956) حيث أضيف 5 مل من حمض الكبريت المركز 96% و 1مل من محلول الفينول 5% إلى 1 مل من المستخلص المائي ثم المزج السريع للمكونات باستخدام محرك الأنابيب، تركت الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة °30 مئوية لمدة 20 دقيقة، قيست بعدها الامتصاصية عند طول موجي 490 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer). وتم تقدير السكريات المختزلة وفقا لطريقة (Miller,1995) وذلك بإضافة 3–5 قطرات من حمض دينترو الساليسيلك (Dinitrosalicylic Acid DNS) واستخدام الفروكتوز كمعيار، وكانت السكريات غير المختزلة هي ناتج طرح السكريات المختزلة من السكريات الكلية.

- **تقدير الطاقة الكلية:**

قُدِرَت الطَاقةُ الكُليَّة لأوراقِ الستيفيا الجافَّة وفقاً ل (Gasmalla *et al*., 2014) ،وذلك باعتبار كل 1غ من الكربوهيدرات تعادل 4 كيلو كالوري، وكل 1غ من البروتينات نعادل 4 كيلو كالوري، وكل 1غ من الدهن يعادل 9 كيلو كالوري.

- **تقدير العناصر المعدنية:**

تَمَّ تقدير العناصر المعدنية (الحديد، المنغنيز، الزنك) من محلول الرماد وفقاً (AOAC, 2000) باستخدام جهاز الامتصاص الذَّري، وتمَّ تقدير البوتاسيوم، الصوديوم، والكالسيوم باستخدام مقياس طيف اللهب وفقاً (Pearson, 1979).

- **تقدير الفينولات الكلية:**

استُخلصَت الفينولات الكليَّة مِن أوراقِ الاستيفيا وفقاً لطريقةِ (Wada, 2002) حيثُ نَأخذُ 2 غ من أوراقِ الاستيفيا الجافَّة ونضيفُ لها 20 مل مِنَ الميثانول النقيّ، ثُمَّ تُمزَج بِمُحركِ الأنابيبِ وتُترك لِمُدة نِصفِ سَاعةٍ بدرجةِ حرارةِ الغُرفة، ثُمَّ تُثَّقل بجهازِ طردٍ مَركزيّ مِخبري (3000 دورة/دقيقة). أُخذَ السائل الرائق ومُدِدَ بنسبة (10:1)، قُدرت الفينولات كَميًّا بطريقةِ Folin-Ciocalteu المُستخدمَة مِن قِبل (Spanos, Wrolstad.1992)، حَيثُ يُؤخذ 1مل ويُضاف له 5 مل من كاشف فولن بنسبة (:101)، ثُمَّ يُضاف 4 مل من كَربونات الصوديوم 7%، وبَعدَ ذلك يَتم قِياس الامتصاصيَّة بالمطيافِ الضوئيّ عِندَ طول موجي 765 نانومتر وعُبّرَ عن النَتائجِ ب مغ مُكافئ مِن حمض الغاليك /غ، بَعدَ تَحضير المُنحَنى القياسي مِن حمض الغاليك وِفقَ التراكيز (0.05–0.25 مغ/مل)، وكانت معادلته: $Y=7.6367X+0.1025$ عند $R^2=0.9852$.

- **تقدير النشاط المضاد للأكسدة:**

تَمَّ تَقدير النَشاط المُضاد للأكسدةِ وفقاً (Ferresers, et.al.2006)، حَيثُ يُؤخذ 3 غ مِن أوراقِ الاستيفيا ويُضافُ إليها 30 مل ميثانول تُزَج العينة جيداً، وتُترك لِمُدةِ 30 دقيقة، ثُمَّ يُؤخذ 60 ميكروليتر مِنَ العَينة، ويُوضع عَليه 3 مل من محلول DPPH 0.05 غ/لتر (1.1-Diphenyl 1-2-Picrylhydrozyl)، بَعدَ ذلك يَتم الرَّج، ووضعهِ في حَمامٍ مَائيّ على دَرجة حرارة 25° مئوية لِمُدةِ 20 دقيقة، وبَعدَ ذلكَ تُقاس العينات باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Specrtophotometer) على طول موجي 517 نانوميتر،عينة الشاهد كانَت 60 ميكروليتر من الماءِ المَنزوعِ الأيونات مُضاف لها 3 مل مِن محلول DPPH

$$SA\%=(1-AC/AD)*100$$

حَيثُ أنَّ SA: النشاط المضاد للأكسدة، AC: امتصاصية العينة، AD: امتصاصية الشاهد.

- استخلاص الاستفيوزيد من نبات الاستيفيا:

➢ استخلاص مائي:

تَمَّ الاستخلاص المائي وفقاً لطريقةِ (Woelwer. et al., 2010) حَيثُ يُؤخذ 10غ مِن مَسحوق أوراقِ الاستيفيا ويُخلَط مَع 100 مل مِن المَاء المُقطَّر، ويُوضَع المُعلَّق الناتج في حمامٍ مَائيّ على درجةِ حرارة 40° مئوية لِمُدةِ ثلاث ساعات للحصولِ على المُستخلص، ثُمَّ يُترك المُستَخلص ليبرد على درجةِ حرارةِ الغُرفة، بَعدَ ذلكَ يَتمّ وَضع المُستخلَص في جهازِ الطرد المركزي 2500Xg/10°C لِمُدةِ 30 دقيقة لِتسهيلِ فَصلِ الأوراقِ عَنِ الطورِ المائيّ، وفي النهاية يتمّ ترشيح المُستَخلص مِن خلالِ مُرشِّح 0.45 ميكرون.

➢ **استخلاص كحولي:**

تَمَّ الاستخلاص الكُحولي لِمسحوقِ أوراقِ الاستيفيا باستخدامِ الميثانول وفقاً لطريقة (Nikolai et al. 2001)، أُضيفَ الميثانول بنسبةِ (4:1 وزن/ حجم) إلى مسحوقِ الأوراقِ وتُركَ لِمُدةِ 7 ساعات، وبَعدَ ذَلِكَ يُرشَّح بواسطةِ أوراقِ (Whatman) رقم 4، وبَعدَ ذَلكَ يَتم تَبخير الميثانول على درجةِ حرارةِ 45° مئوية، ثُمَّ يَتم غَسل المَادة المُتبقيَّة باستخدامِ الإيثر، ثُمَّ يُستخلص باستخدام البوتانول (Butanol) ثلاث مرات.

- **تقدير درجة الحموضة:**

قُدِرت دَرجةُ الحُموضة للمُستخلصِ المائيَ، والمُستخلصِ الكحوليّ للاستيفيا على درجةِ حرارةِ الغُرفةِ باستعمالِ جهاز pH Meter وفقاً (Shuvo,et al.,2015).

- **تقدير المواد الصلبة الذائبة الكلية (TSS):**

حُدِدت كَميةُ المَوادِ الصَلبةِ الذائبةِ الكُليّة في محاليل الاستفيوزيد وفقاً (AOAC 2000) على درجة حرارة الغرفة باستخدام الرفراكتومتر.

- **تقدير كمية الاستفيوزيد:**

تَمَّ تقدير الاستفيوزيد المُستخلص بالطريقةِ المائيةِ، والاستفيوزيد المُستخلصِ بالطريقةِ الكُحوليةِ باستخدامِ جهاز HPLC وفقاً لطريقة (Nishiyama et. al. 1992) ، الفَصلُ كانَ باستخدام الماءِ والميثانول (35:65 حجم/حجم) كَمُذيب بِمُعدَّل تَدفق 2مل/دقيقة ، والكَشف كانَ على طول موجي 290 نانومتر، وكان وقت الاحتفاظ النموذجي (Tr) للاستفيوزيد 9.35 دقيقة، وحدود الكشف 0.1 ميكروغرام.

- **تقدير درجة الحلاوة:**

تَمَّ تَقدير دَرجة الحلاوةِ لِمُستخلصِ أوراقِ الاستيفيا بطريقةِ تَقدير الحَلاوةِ المُطلقةِ (Equal Sweeteners Matches) وفقاً لطريقةِ (Isima and Kakyama, 1976). حَيثُ تَمَّ عَمل ثَلاثة مَحاليل مُختلفةِ التراكيزِ مِنَ السَكروز (3،5،10 غ/100 ماء على التوالي)، ثُمَّ تمَّ تَجهيز عِدَّة محاليلٍ مِن مُستخلصِ الاستيفيا بتراكيزَ مُختلفة ودرجاتِ حَلاوةٍ تتراوحُ من 100 إلى 300 مرة قدرة تحلية السكروز(100،150،200،250،300 مرة)، وذلكَ في ثلاثِ مجموعاتٍ تُقابلُ ثَلاثةَ تراكيز من السَكروز، ثمَّ يَقومُ 10 أشخاص بِتذوقِ المَحاليل في كُلِّ مجموعةٍ على حِدة، لِتحديدِ قُوَّة التحليَّة المُطابقة لتركيزِ السَكروز.

- **التقييم الحسي لحلاوة مستخلص الاستيفيا:**

تم تقييم الخصائص الحسية لحلاوة المستخلص المائي، والمستخلص الكحولي لأوراق الاستيفيا الجافة المزروعة في اللاذقية، والمقارنة مع السكروز طبقاً لطريقة (Dubois and Stephezon, 1985)، وتم عمل تحليل إحصائي طبقا لطريقة (Young and Veldman, 1965).

النتائج والمناقشة:

- **نتائج التركيب الكيميائي:**

أظهرت النتائج بأنَّ محتوى أوراق الاستيفيا الجافة المزروعة في اللاذقية من الرطوبة، الرماد، البروتين، الدهون، والألياف الخام جاءت على التوالي 6.2%، 8.3%، 11.2%، 4.1%، 16.9% كما هو موضّح في الجدول رقم (1) وكانت كمية الكربوهيدرات 59.4%، وهذا ما يتوافق مع النتائج التي توصل لها كل من (Gisleine et al. 2006)، (Manish and Rema 2006)، (Savita et al. 2004) حيث كانت نتائج التحاليل الكيميائية لأوراق الاستيفيا الجافة كما أفادوا لكل من البروتين، الدهن، الألياف الخام، والرماد على التوالي (6.2%–20.42%)، (2.5%–5.6%)، (13.56%–18.5%)، (8.48%–13.12%)، ونلاحظ من النتائج بأنَّ الكربوهيدرات شكلت المحتوى الأعلى لأوراق الاستيفيا 59.4% وهو أعلى مما أشار إلية (Shuvo, et al., 2015)، ومتوافق مع ما أشار إليه (Chughtai, 2019)، وقد

يكون الاختلاف في النتائج ناجماً عن اختلاف الظروف المناخية، وعوامل أُخرى مثل التربة والمياه ودرجة الحرارة التي تؤثر على التركيب الكيميائي لأوراق الاستيفيا.

كما احتوت أوراق الاستيفيا على 15.9%، 5.3%، 10.89% من السكريات الكليَّة الذوابة، السكريات المختزلة، والسكريات غير المختزلة على التوالي كما هو موضَّح في الجدول رقم (1)، وهو ما جاء متوافقاً مع ما توصَّل إليه (Abou-arab et al., 2010) حيث بلغت كمية السكريات الكلية الذوابة، والسكريات المختزلة، والسكريات غير المختزلة على التوالي 15.65%، 5.88%، 9.77%.

جدول رقم (1) يوضّح التركيب الكيميائي لأوراق الاستيفيا الجافَّة

المكوّن الكيميائي	% على أساس الوزن الجاف
الرطوبة	6.2 ± 0.9
الرماد	8.3 ± 0.3
البروتين	11.2 ± 0.5
الدهن	4.1 ± 0.3
الألياف الخام	16.9 ± 0.2
الكربوهيدرات	59.4 ± 0.5
السكريات الكلية الذوابة	15.95 ± 1.3
السكريات المختزلة	5.88 ± 0.2
السكريات غير المختزلة	10.89 ± 0.3
الطاقة الكلية كيلو كالوري/100غ	318.3 ± 1.5

القيم هي عبارة عن متوسط ثلاثة مكررات ± قيمة الانحراف المعياري

ومن هذه النتائج ونتائج الدراسات المرجعية السابقة نجد بأنَّ أوراق الاستيفيا المزروعة في اللاذقية تُعد مصدر غني بالكربوهيدرات، والبروتينات، والألياف الخام، والتي هي عوامل مهمة وأساسية لصحة الإنسان وبالتالي يمكن للمستهلكين الاستفادة منها عند استخدامها كبديل للسكر، ومن جهة أُخرى المحتوى العالي من الرماد يُؤشر إلى أنَّ أوراق الاستيفيا مصدر غني بالمعادن، إلاَّ أن المحتوى المنخفض من الدهن يؤشر إلى أنَّها مصدر غير جيد للزيوت.

- **المحتوى من المعادن:**

أظهرت النتائج بأنَّ محتوى الكالسيوم كان الأعلى في أوراق الاستيفيا الجافة يليه البوتاسيوم ثم الحديد، والصوديوم (19.11، 14.7، 5.1، 5.86 غ/100غ على التوالي)، كما هو موضَّح في الجدول رقم (2)، وكانت كمية الزنك هي الأقل (0.98 غ/100غ)، وهو ما يتواف مع النتيجة التي تحصل عليها (Abou-arab et al., 2010) حيث سجلت كميات البوتاسيوم والكالسيوم والصوديوم الكميات الأعلى إلا أنَّ البوتاسيوم كانت الأعلى على الإطلاق وجاءت على التوالي (21.15، 17.7، 14.93 مغ/100غ) ، ونلاحظ أنَّ كميات الصوديوم المتصحل عليها من قبل (Abou-arab et al., 2010) كانت أعلى بكثير من الكمية المتواجدة في أوراق الاستيفيا المزروعة في اللاذقية وقد يرجع السبب إلى اختلاف مناطق الزراعة، والظروف المناخية، والتربة، والمياه.

جدول(2) محتوى أوراق الاستيفيا الجافة من المعادن مغ/100غ

العناصر المعدنية	المُحتوى ب غ/100غ
حديد Fe	0.3±5.1
زنك Zn	0.1±0.98
منغنيز Mn	0.1±4.01
كالسيوم Ca	0.2±19.11
صوديوم Na	0.3±5.86
بوتاسيوم K	0.3±14.7

القيم هي عبارة عن متوسط ثلاثة مكررات ± قيمة الانحراف المعياري

وبالتالي من النتائج المتحصل عليها يتضح بأنَّ أوراق الاستيفيا المزروعة في اللاذقية تحتوي على كميات كبيرة من المعادن الضرورية لصحة الإنسان وتنظيم عمليات الاستقلاب (Choudhary et al., 1999). ويُعتبر الزنك والمنغنيز من مضادات الأكسدة أو ما يسمى بالعناصر الغذائية الدقيقة (Micronutrients)، والتي وجودها في الجسم يعزز الجهاز المناعي، ويقي من الأمراض الناتجة عن الجذور الحرة كما أنَّ كمية الحديد العالية الَّذي له دور هام في عملية توليد الهيموغلوبين، يُساعد في استقرار كمية الهيموغلوبين في الجسم، وبالتالي استخدام أوراق الاستيفيا في صناعة الحلويات من الممكن أن يساعد في علاج أمراض فقر الدم الناتجة عن نقص الحديد (Jimoh and Oladiji, 2005).

- **المحتوى من البولي فينولات ومضادات الأكسدة:**

أظهرت النتائج بأن أوراق نبات الاستيفيا المزروعة في اللاذقية تتميز بمحتوى عالي من المواد البولي فينولية، ومضادات الأكسدة حيث كان محتوها من المركبات البولي فينولية 41.4 مكافئ غرامي من حمض الغاليك/غ، وهي أعلى من القيمة التي تحصل عليها (Tadhani et al. , 2007)، وأقل من الكمية التي تحصل عليها (Shukla *et al.*, 2009) والَّتي كانت على التولي (25.18، 61.5 مكافئ غرامي من حمض الغاليك/غ) ، كما أظهرت النتائج بأنَّ أوراق نبات الاستيفيا تتمتع بنشاط عالي مضاد للأكسدة حيث كانت قيمته 90.1% كما هو موضح في الجدول رقم (3) ، والَّذي جاء مماثلاً لما توصَّل إليه (Tadhani et al., 2007) وأكثر مما تحصل عليه (Shukla *et al.*, 2009) حيث جاءت على التوالي (93.46%، 33.17% على التوالي).

جدول (3) يوضح محتوى أوراق الاستيفيا من البولي فينولات ومضادات الأكسدة

المكونات الفعالة حيوياً	الكمية
البولي فينولات	0.5±41.4 مكافئ غرامي من حمض الغاليك/غ
النشاط المضاد للأكسدة	%1.27±90.1

القيم هي عبارة عن متوسط ثلاثة مكررات ± قيمة الانحراف المعياري

- **نتائج مستخلص الاستيفيا:**

أظهرت النتائج بأنَّ كمية المواد الصلبة الذوابة في المستخلص المائي كانت أعلى من المستخلص الكحولي ($P<0.01$)، وكانت كمية المواد الصلبة الذوابة في المستخلص المائي (6.1%) كما هو موضح في الجدول رقم (4) وهو أعلى من النتيجة المتحصل عليها من قبل (Abou-arab et al., 2010) حيث كانت كمية المواد الصلبة الذوابة

4.4%، وقد يرجع ذلك إلى اختلاف شوط الاستخلاص المائي بين الطريقتين المتبعتين، وكانت قيمة المواد الصلبة الذوابة الكلية في المستخلص الكحولي لأوراق الاستيفيا (2.9%)، وهو ما جاء مظابقاً للنتيجة التي تحصل عليها (Abou-arab et al., 2010) حيث كانت 1.3%، بينما كانت قيمة pH لِكُلٍ من المستخلص المائي، والمستخلص الكحولي (5.9، 5.5 على التوالي) أي أنَّ وسط كلا المستخلصين ذو وسط حمضي خفيف، وهو ما جاء متوافقاً مع النتيجة الَّتي تحصل عليها (Shuvo, *et al.*,2015).

الجدول رقم (4) يُوضح محتوى مستخلص الاستيفيا من المواد الصلبة الذائبة، ودرجة pH

المكون	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي
المواد الصلبة الذوابة TSS%	6.1** ± 0.2%	2.9 ± 0.2%
pH	5.9 ± 0.5	5.5 ± 0.5

القيم هي عبارة عن متوسط ثلاثة مكررات ± قيمة الانحراف المعياري، $p<0.05$*، $p<0.01$، $p<0.005$*****.

وفي الجدول رقم (5) نبين محتوى كُلٌّ من المستخلص المائي والمستخلص الكحولي من الاستفيوزيد حيث كانت (8.2%، 12.7% على التوالي) حيث كان من الواضح بأنَّ الكمية المتحصل عليها من الاستفيوزيد من خلال الاستخلاص الكحولي أعلى من الاستخلاص المائي ($P<0.01$)، وهذا ما جاء متوافقاً مع النتيجة التي تحصل عليها (Liu et al. 1997) حيث وجد بأن الكمية الأعلى من الاستفيوزيد يمكن الحصول عليها من الأوراق الجافة للاستيفيا يليه الاستخلاص المائي حيث جاء على النحو التالي (27.5%، 15.25% على التوالي).

الجدول رقم (5) يوضح محتوى كِلا المستخلصين من الاستفيوزيد مقدر بHPLC

المكون	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي
الاستفيوزيد %	8.2 ± 0.7	12.7** ± 0.7

القيم هي عبارة عن متوسط ثلاثة مكررات ± قيمة الانحراف المعياري، $p<0.05$*، $p<0.01$، $p<0.005$*****.

- **نتائج درجة الحلاوة:**

وجدنا بأن أعلى درجة قبول كانت عند تركيز المستخلص المائي 0.03 المقابل لدرجة تحلية 100 مرة أعلى من محلول السكروز بتركيز 3% كما هو موضَّح في الجدول رقم (6)، وكذلك كانت أعلى درجة قبول عند تركيز المستخلص المائي 0.05 المقابل لدرجة تحلية 100 مرة أعلى من محلول السكروز بتركيز 5% كما هو موضح في الجدول رقم (7)، كما كانت أعلى درجة قبول كانت عند تركيز المستخلص المائي 0.1 المقابل لدرجة تحلية 100 مرة أعلى من محلول السكروز بتركيز 10% كما هو موضَّح في الجدول رقم (8) وبالتالي قوة التحلية للمستخلص المائي لأوراق الاستيفيا الجاقة المزروعة في اللاذقية كانت أكبر ب 100 مرة من قدرة التحلية للسكروز، بينما وجدنا بأن أعلى درجة قبول كانت عند تركيز المستخلص الكحولي 0.02 المقابل لدرجة تحلية 150 مرة أعلى من محلول السكروز بتركيز 3% كما هو موضَّح في الجدول رقم (6)، وكذلك كانت أعلى درجة قبول عند تركيز المستخلص الكحولي 0.033 المقابل لدرجة تحلية 150 مرة أعلى من محلول السكروز بتركيز 5% كما هو موضح في الجدول رقم (7)، كما كانت أعلى درجة قبول كانت عند تركيز المستخلص المائي 0.066 المقابل لدرجة تحلية 150 مرة أعلى من محلول السكروز بتركيز 10% كما هو موضَّح في الجدول رقم (8) وبالتالي قوة التحلية للمستخلص المائي لأوراق الاستيفيا الجاقة المزروعة في اللاذقية كانت أكبر ب 100 مرة من قدرة التحلية للسكروز، بينما وجدنا بأن قوة التحلية للمستخلص الكحولي كانت أعلى ب 150 مرة من قدرة التحلية للسكروز، وهو ما جاء متطابقاً مع الأبحاث المرجعية

بأنَّ قوة التحلية للاستيفيا أعلى ب 100–300 مرة من قوة تحلية السكروز، إلا أنَّه جاء أقل من النتائج المتحصل عليها من قبل (Allam et al., 2001) ، (Gramner and Ikan, 2006) حيث كانت قوة التحلية أعلى من السكروز (300، 250 مرة على التوالي).

جدول (6) درجة الحلاوة النسبية لكلا المستخلصين المماثلة لدرجة الحلاوة النسبية لمحلول السكروز تركيزه 3%

درجة الحلاوة النسبية مرة / قوة تحلية السكروز	تركيز المستخلص المائي المخفف ليقابل تركيز 3%	درجة القبول %	تركيز المستخلص الكحولي المخفف ليقابل تركيز 5%	درجة القبول %
100	0.03	%69	0.03	%17
150	0.02	%15	0.02	%67
200	0.015	%8	0.015	%12
250	0.012	%6	0.012	%3
300	0.01	%2	0.01	%1

جدول (7) درجة الحلاوة النسبية لكلا المستخلصين المماثلة لدرجة الحلاوة النسبية لمحلول السكروز تركيزه 5%

درجة الحلاوة النسبية مرة / قوة تحلية السكروز	تركيز المستخلص المائي المخفف ليقابل تركيز 5%	درجة القبول %	تركيز المستخلص الكحولي المخفف ليقابل تركيز 5%	درجة القبول %
100	0.05	%81	0.05	%17
150	0.033	%12	0.033	%79
200	0.025	%5	0.025	%4
250	0.002	%2	0.002	–
300	0.016	–	0.016	–

جدول (8) درجة الحلاوة النسبية لكلا المستخلصين المماثلة لدرجة الحلاوة النسبية لمحلول السكروز تركيزه 10%

درجة الحلاوة النسبية مرة / قوة تحلية السكروز	تركيز المستخلص المائي المخفف ليقابل تركيز 10%	درجة القبول %	تركيز المستخلص الكحولي المخفف ليقابل تركيز 10%	درجة القبول %
100	0.1	%75	0.1	%13
150	0.066	%14	0.066	%64
200	0.05	%10	0.05	%14
250	0.04	%1	0.04	%8
300	0.033	–	0.033	–

- **نتائج التقييم الحسي:**

تمَّ تقييم الطعم الحلو، الطعم المر، الطعوم الأخرى، الطعم حلو/مر، لكل من المستخلص المائي، والمستخلص الكحولي لأوراق الاستيفيا، والمقارنة مع محلول السكروز كما هو موضح في الجدول رقم (9)، حيث أظهرت النتائج وجود فروقات معنوية في قبول الطعم الحلو بين المستخلص المائي، والمستخلص الكحول، والسكروز حيث كانت (37.5، 31.9، 39.7 على التوالي) ، وبالتالي فمن الواضح بأن درجة قبول الطعم الحلو للسكروز كانت الأعلى (P<0.01)، يليه المستخلص المائي للاستفيوزيد (P<0.01)، بينما من حيث طعم المرار لم يكن هناك فروق معنوية بين المستخلص المائي، والمستخلص الكحولي للاستفيوزيد لكن الفرق المعنوي الأعلى كان بين المحاليل المحضرة والسكروز (P<0.005). ومن نفس الجدول يتضح اختلافات كبيرة في تقييم الطعم مر/حلو بين السكروز، والمستخلص المائي، والمستخلص الكحولي للاستفيوزيد وهو مايتوافق مع النتيجة التي توصل لها (Yoshikawa et al, 1976)، الَّذي وجد بأنَّ الاستفيوزيد لديه مرارة طفيفة، وبعد من الطعم القابض عند التذوق حيث أظهر قبولاً منخفضاً بشكل عام مقارنة مع الجليكوسيدات ثنائية التربين الأُخرى مثل Rebaudioside A الَّذي أظهر طعم مرار أقل.

جدول رقم (9) التقييم الحسي للطعم الحلو

العينة	الطعم الحلو (40)	الطعم المر (40)	الطعوم الأُخرى (10)	الطعم حلو/مر (10)
السكروز	** 39.76 ± 0.25	***لايوجد	0.05 ± 0.55	10*
المستخلص المائي للاستفيوزيد	**37.5 ± 0.6	0.6 ± 39.4	0.5 ± 8.1	*0.5 ± 8.9
المستخلص الكحولي للاستفيوزيد	**31.9 ± 0.5	1 ± 39	0.5 ± 7	*0.5 ± 7.1

القيم هي عبارة عن متوسط ثلاثة مكررات ± قيمة الانحراف المعياري، p<0.05*، p<0.01، p<0.005*****.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

بعد أن تمت دراسة النتائج وتحليلها إحصائياً تم الوصول إلى الاستنتاجات التالية:

- ❖ تتميز أوراق نبات الاستيفيا المزروعة في اللاذقية بمحتواها العالي من الكربوهيدرات والألياف الغذائية والبروتينات، كما تحتوي كميات كبيرة من المعادن الضرورية لصحة الإنسان.
- ❖ تُعَّد أوراق الاستيفيا ذات محتوى عالي من المواد البولي فينولية كما تتمتَّع بنشاط عالي مُضاد للأكسدة.
- ❖ يُعَّد الاستخلاص الكحولي أعلى كفاءة من الاستخلاص المائي في الحصول على الاستفيوزيد إلاّ أنَّ الاستفيوزيد المُتحصَّل عليه بالاستخلاص المائي بخواص حسيّة أفضل.
- ❖ درجة قوة التحلية للاستفيوزيد المستخلص من أوراق الاستيفيا المزروعة في اللاذقية تتراوح بين 100- 150 مرة قوة تحلية السكروز.

- **التوصيات:**

- إدخال أوراق الاستيفيا في النظم الغذائية كونها مصدر جيد للمواد المغذية.
- استخدام أوراق الاستيفيا كبديل عن السكروز والمحليات الصناعية، كونها مُحلي طبيعي منخفض السعرات ولا يؤدي إلى ارتفاع سكري الدم، ويتمتع به من قدرة تحلية عالية.

References:

1. Alaam AI (2007). Sugar crops council: Future view. The Proceeding of Thirty-eight Annual Conference, Egyptian Sugar Expertese Society Hawamdia, Egypt.
2. Abou-Arab, A.E., Abou-Arab, A.A. and Abu-Salem, M.F. (2010) Physicochemical assessment to natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana bertoni plant. African Journal of Food Science, 4, 269-281.
3. Association of Official Analytical Chemists. (2000) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17th edition. Gaithersburg, United States of America: AOAC.
4. Association of Official Analytical Chemists. (2005) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.17 th Ed. Published by the Association of Official Analytical Chemists. USA.
5. Barriocanal. L.A; Palacios. M; Benitez.G; Benitez. S; Jimenez.J. T and Jimenez. N. (2008): Apparent Lack of Pharmacological Effect of Steviol Glycosides Used as Sweeteners in Humans, A Pilot Study of Repeated Exposures in Some Normotensrve and Hypotensive Individuals and in Type 1 and Type 2 Diabetics.Regulatory Toxicology and Pharmacology,51.37-41.
6. Bertoni, M. S. (1899). Revista de Agronomia de l'Assomption. 1, 35.
7. Brandle, J. E., Starratt, A. N., Gijzen, M. (1998). Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties. Canadian Journal of Plant Science, 78, 527–536.
8. Chatsudthipong, V. and Muanprasat, C. (2009): Stevioside and Relted Compounds: Therapeutic Benefits beyond Sweetness. Pharmacology and Therapeutics, 121(1):41-54.
9. Choudhary KA, Bandyopadhyay NG (1999). Preliminary studies on the inorganic constituents of some indigenous hyperglycaemic herbs on oral glucose tolerance test. J. Ethnopharmacol., 64: 179-184.
10. Chughtai MFJ, Pasha I, Butt MS, Asghar M. (2019) Biochemical and nutritional attributes of Stevia rebaudiana grown in Pakistan. Supplement 2: 210-222.
11. DuBois DE, Stephenson RA (1985). Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogues with improved organolyptic properties. J. Med. Chem. 28: 93-98.
12. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
13. FAO/WHO (2017). Compendium of food additive specifications. Joint FAO/WHO expert committee on food additives 84th meeting 2017. FAO JECFA Monographs 20, Rome.
14. Fayaz, S., Sharma, R., Bimlesh, Y. S. R. (2018). Estimation of steviol glycosides in food matrices by high performance liquid chromatography. Journal of Food Science and Technology, 55(8), 3325–3334.
15. Gasmalla MAA, Yang R, Amadou I, and Hua X. (2014) Nutritional Composition of Stevia rebaudiana Bertoni Leaf: Effect of Drying Method. Trop J Pharm Res. 13:61-65. DOI: 10.4314/tjpr. v13i1.9.

16. Geuns, J. M. C., Buyse, J., Vankeirsbilck, A., & Temme, E. H. M. (2007). Metabolism of stevioside by healthy subjects. Experimental Biology and Medicine, 232(1), 164–173.
17. Gisleine EC, Abdol HA, Caudio CA, Letícia de AFF, Gilson T, Mirian HT, Wilson EF, Roberto BB (2006). Investigation of the tolerability of oral Stevioside in Brazilian hyperlipidemic Patients. Brazilian Archives of Biol. and Techn. An International J. 49(4): 583-587, July 2006 ISSN 1516-8913 Printed in Brazil.
18. Isima ،N and Kakayame ،H. (1976). Sensory evaluation of stevioside as asweetener. National Food Research Institute ،31 ،80- 85.
19. Jimoh FO, Oladiji AT (2005). Preliminary Studies on *Piliostigma thonningii* seeds: Proximate analysis, mineral composition and phytochemical screening. Africani. Biotechnol. 4: 1439-1442.
20. Kolanowski, W. (2013). Steviol glycosides – Properties and use in foods. Bromatologia Chemia Toksykologiczna, 46(2), 140–150.
21. Liu J, Ong CP, Li SFY (1997). Subcritical fluid extraction of stevia sweeteners from *Stevia rebaudiana*. J. Chromatogr. Science 35: 446-450.
22. Manish T, Rema S (2006). Preliminary Studies on *Stevia rebaudianci* Leaves Proximal Composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening. J. Med. Sci. 6: 321-326.
23. Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 420-428.
24. Nikolai B, Oxana R, Alexander N (2001). Peculiarities of deterpenoid steviol glycoside production *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana Bertoni*. Plant Sci. 161: 155-163.
25. Nishiyama P, Alvarez M, Vieira LG (1992). Quantitative analysis of stevioside in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. J. Sci. Food Agric. 59: 277-281.
26. Pearson D (1976). The Chemical Analysis of Food. 7 th ed. Churchill Livingstone, Edinburg London and New York p. 75.
27. Perrier, J. D., Mihalov, J. J., Carlson, S. J. (2018). FDA regulatory approach to steviol glycosides. Food and Chemical Toxicology, 122, 132–142.
28. Rezai, G., Teng, P. K., Shamsudin, M. N., Mohamed, Z., & Stanton, J. L. (2017). Effect of perceptual differences on consumer purchase intention of natural functional food. Journal of Agribusiness in Developing and Emerging Economies, 7(2), 153–173.
29. Rouhani, M. (2018). Full structural analysis of steviol: A DFT study. J. Mol. Struct., 1173, 679–689.
30. Savita SM, Sheela K, Sunanda S (2004). Stevia Rebaudiana-A Functional Component for Food Industry. J. Hum. Ecol.15: 261-264.
31. Shuvo MMA, Al–Mamun M, Chowdhury T, Absar N, Hasanuzzaman M (2015) An assessment of major nutritional components and some secondary metabolites of in vitro propagated stevia rebaudiana (cultured in Bangladesh) plant leaves dry powder. Int J Applied Sci Biotechnol 3:721-26.
32. Spanos GA, Wrolstad RE. Wrolstad, (1992) phenolic of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage. J Agr Food Chem.; 40:1478- 1487.
33. Shukla. S; Archana. M; Vivek.K and Savita. S. (2009): In Vitro Activity and Total Phenolic Content of Ethanolic Leaf Extract of Stevia Rebaudiana Bert. Food and Chemical Toxicology 47 2338-2343.
34. Tadhani, M. B; Patel, V. H. and Subhash, R. (2007): In vitro Antioxidant Activities Stevia rebaudiana leaves and Callus. Journal of food Composition and Analysis,20:323-329.

35. Varanuj .C and Chatchai. M. (2009): Stevioside and Related Compounds: Therapeutic Benefits beyond Sweetness Pharmacology & Therapeutics 121. 41-54.
36. Wada, L., and Ou, B. (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(12), 3495-3500.
37. Woelwer, R. U., Lankes, C., Wawrzun, A., & Wüst, M. (2010). Improved HPLC method for evaluation of the major steviol glycosides in leaves of Stevia rebaudiana. European Food Research and Technology, 231, 581–588.
38. Yoshikawa S, Ishima T, Katayama O (1979). Taste of components of stevioside. Am. Chem. Soc., 177(1): 74.
39. Young ،R. and Veldman ،D. (1965). "In troductory statistics for the Behavioral Science" Holt ،Rinehart and Winston. New York ،Chicago ،San Francisco ،Toronto ،London P.329.