

ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტი
ქიმიის დეპარტამენტი

რუსლან დავითაძე

სტევიას ახალი ინტროდუცირებული ჯიშების ბიოლოგიურად
აქტიური ნივთიერებები

(წარდგენილია ქიმიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად
სპეციალობა: ბიორგანული ქიმია)

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: პროფესორი
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
ა. კალანდია

ბათუმი - 2019

„როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად“

აღნიშნული პროექტი განხორციელდა სსიპ შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის ფინანსური ხელშეწყობით, გრანტი DO/124/6-470/13, AP/96/13 და „ა(ა)იპ განათლების, მეცნიერებისა და ტექნოლოგიების განვითარების თს ფონდი ხვალინდელი წარმატებისთვის, დაფინანსებული გრანტის „დაბალკალორიული ტკბილი ტაბლეტები“ SIG/23/1/2015 მეშვეობით.

წინამდებარე პუბლიკაციაში გამოთქმული ნებისმიერი აზრი ეკუთვნის ავტორებს და შესაძლოა არ ასახავდეს შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის შეხედულებებს.

რუსლან დავითაძე -----

თარიღი: __/__/2019

შინაარსი

შესავალი -----	4
1. ლიტერატურული მიმოხილვა -----	8
1.1 სტევია და მისი ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები-----	8
2. ექსპერიმენტული ნაწილი -----	22
2.1 კვლევის ობიექტები -----	22
2.2 კვლევის მეთოდები -----	29
3. სტევიას ფოთლის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების HPLC-UV, IR, UPLC PDA- MS მეთოდებით კვლევა-----	32
3.1 სტევიას ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების გამოყოფა და იდენტიფიკაცია-----	37
3.2 სტევიას ფოთლის ფენოლური ნაერთების კვლევა-----	48
4. სტევიოლ-გლიკოზიდების შემცველობა სხვადასხვა ნედლეულში და მათგან წარმოებულ პრეპარატებში-----	55
5. სტევიას ფოთლის ლიპიდური ბუნების ნაერთები -----	62
6. სტევიას ფოთლისა და მისგან მიღებული პროდუქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობის კვლევა DPPH მეთოდით -----	67
7. სტევიას ფოთლის გადამუშავება სუპერ კრიტიკული წნევის ფლუიდური ექსტრაქციის (SFE) მეთოდით-----	69
8. სტევიას ფოთლის კათიონების კვლევა HPLC ქრომატოგრაფიით კონდუქტომეტრული დეტექტორის გამოყენებით-----	78
9. სტევიას ფოთლის ეთერზეთის კვლევა გაზური ქრომატოგრაფირების მეთოდით	81
10. სტევიას პრეპარატების კვლევა ინფრაწითელი სპექტროსკოპიის მეთოდით----	86
11. სტევიას ფოთლის ტექნოლოგიური კვლევა-----	88
11.1. ექსტრაქტის გაწმენდის ულტრაფილტრაციული მეთოდი-----	89
11.2. სტევიასგან მიღებული პროდუქტების ტაბლეტირება-----	93
დასკვნები-----	95
გამოყენებული ლიტერატურა-----	98
საილუსტრაციო მასალა. დანართი 1 -----	111

შესავალი

თემის აქტუალობა

საქართველო მცირემიწიანი ქვეყანაა, ამიტომაც განსაკუთრებული შესაძლებლობების ნიადაგობრივ-კლიმატური პირობების ეფექტური გამოყენება ადგილობრივი ან ინტროდუცირებული მცენარეების გაშენებით ქვეყნისათვის მნიშვნელოვანია. დღესდღეობით, სამწუხაროდ ხშირ შემთხვევაში ნიადაგი არასწორადაა გამოყენებული, გაშენებულია შეუსწავლელი ან გარემოპირობებისადმი შეუსაბამო მცენარეებით. მცენარის მოსავალი (ფოთოლი, ნაყოფი თუ სხვა) ეკონომიკურად ეფექტურია, როდესაც თანამედროვე ფიზიკო-ქიმიური მეთოდების გამოყენებით შესწავლილია მისი ქიმიური შედგენილობა. კვლევები განსაკუთრებით აქტუალურია, როდესაც საქმე ეხება ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების შემცველ მცენარეებს. უნდა დადგინდეს მათი თვისობრივი და რაოდენობრივი შემცველობა, ქიმიური სტრუქტურა და ბიოლოგიური აქტივობა. გამოკვლეული უნდა იქნას ამ ნაერთების დაგროვების მაქსიმალური პერიოდი და შესაბამისად ნედლეულის აღების დრო. მნიშვნელოვანია ქიმიური შედგენილობით, მოსავლიანობით და სხვა საინტერესო თვისებებით ყველაზე ოპტიმალური ჯიშის თუ სახეობის ადაპტირება მოცემულ რეგიონში. შემუშავებული უნდა იქნას გადამუშავების ტექნოლოგია და ყურადღება მიექცეს ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების კონტროლს გადამუშავების პროცესში და შესაბამისად მიღებულ პროდუქტებში. ადრეული კვლევებით დადგენილია, რომ დასავლეთ საქართველოს ნიადაგობრივ-კლიმატური პირობებისათვის განსაკუთრებით ეფექტურია სამხრეთ ამერიკული წარმოშობის მცენარე სტევია.

მცენარე სტევია (*Stevia rebaudiana*) 30-60სმ სიმაღლის მრავალწლოვანი ბალახია, რომლის სამშობლოა ბრაზილია და პარაგვაი. სტევია მრავალი სინონიმითაა ცნობილი. ამერიკელ ინდიელთა ცნობილი ტომის გუარანის ენაზე: Ca-a jhee, Caa-a yupl, Caa-jhe-he. მათი თარგმნა დაახლოებით ჟღერს როგორც: „თაფლოვანი ბალახი“, „ტკბილი მცენარე“ და დღემდე გამოიყენება ტრადიციულ საკვებში უკვე 1500 წლის განმავლობაში. მცენარე სტევიას ფოთლები შეიცავს დაბალ კალორიულ, მაქარზე 300-ს ჯერ ტკბილ ნივთიერებებს – დიტერპენოიდულ გლიკოზიდებს (სტევიოზიდი, რეზაუდიოზიდი და სხვა). სტევია - ბუნებრივი არა ნახშირწყლოვანი

დამატკობელია, რომელსაც გააჩნია უნიკალური სამკურნალო-პროფილაქტიკური და გამაჯანსაღებელი თვისება.

ტკბილი გლიკოზიდების გარდა სტევას ფოთლები შეიცავს ადამიანის ორგანიზმისათვის სასარგებლო სხვა მრავალ ნივთიერებას. სამწუხაროდ, საქართველოში ძირითადად გვხვდება ხელოვნური დამატკობლები და ნაკლებად გამოიყენება სტევია, რადგანაც ის ნაკლებადაა ცნობილი. ასევე, შედარებით ძვირია უცხოეთიდან იმპორტირებული პროდუქტი მის კონკურენტებთან შედარებით.

საქართველოს აგრო-ეკოლოგიური პირობებისათვის სტევია კარგად შეგუებადი მცენარეა, მისი პირველი ნარგავები ჯერ კიდევ მე-20 საუკუნის 80-იან წლებში გაჩნდა. **კვლევის მიზანს წარმოადგენს** სტევას ახალი ჯიშის თესლიდან მიღებული მცენარის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების გამოყოფა და შესწავლა, მცენარის ფოთლის ქიმიური ანალიზი ზრდა-განვითარების ყველა ეტაპზე. მოსავლის აღების ოპტიმალური პერიოდის დადგენა, ფოთლის შრობისა და გადამუშავების ოპტიმალური პირობების შემუშავება ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მაქსიმალური შენარჩუნებით. ბიოაქტიური ბუნებრივი დაბალკალორიული დამატკობელის წარმოების ტექნოლოგიის შემუშავება, პრეპარატის ქიმიური შედგენილობის შესწავლა და მიღებული შედეგების მიხედვით გადამუშავების და მისგან მიღებული დამატკობლებით კვების პროდუქტების წარმოების ტექნოლოგიის სრულყოფა და ტექნოლოგიური რეჟიმების შერჩევა. სტევას ახალი ჯიშის თესლებისაგან მცირე საცდელი პლანტაციების გაშენება (ცნობილი აგროწესებით).

მეცნიერული სიახლე

საქართველოში პირველად შესწავლილი იქნა ინტროდუცირებული სტევას უცნობი ჯიშების, ფოთლების ბიოაქტიური ნაერთების თვისობრივი და რაოდენობრივი შემცველობა, HPLC-UV, IR, Conductometry და UPLC-PDA, MS მეთოდების გამოყენებით, პრეპარატული და ანალიზური სვეტების, სხვადასხვა სორბენტის და გამხსნელის მეშვეობით, ასევე სხვა თანამედროვე ფიზიკო-ქიმიური მეთოდების გამოყენებით გამოყოფილი და იდენტიფიცირებული იქნა 27 ნაერთი და ჩატარდა მათი იდენტიფიკაცია, დადგინდა მათი რაოდენობრივი შემცველობა. განსხვავებული მეთოდებით, მათ შორის სუპერკრიტიკული წნევის ფლუიდური ექსტრაქციის

გამოყენებით, მიღებული იქნა სხვადასხვა სიტკბოს მქონე პრეპარატები და შემუშავდა სამომხმარებლო ტაბლეტის წარმოების ტექნოლოგია.

ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა - შემუშავებულია სხვადასხვა სიტკბოს და ბიოლოგიური აქტიურობის მქონე, დაბალკალორიული, მცენარეული დამატკბობელის წარმოების ტექნოლოგია, დადგენილია მცენარეული ნედლეულის და მისგან წარმოებული პრეპარატის ქიმიური შედგენილობა. შესწავლილი იქნა სუპერკრიტიკული წნევის ფლუიდური ექსტრაქტის მიღების და შრობის შესაძლებლობები, ფრქვევანა საშრობის გამოყენებისას შრობის ტექნოლოგიური პარამეტრები. მიღებული იქნა 100-ჯერ, 200-ჯერ, 300-ჯერ (ე.წ. თეთრისტევია) ტკბილი ვიდრე საქაროზაა პრეპარატები და ტკბილი ტაბლეტები. მათი ქიმიური შედგენილობა შესწავლილია HPLC and UPLC მეთოდებით სხვადასხვა დეტექტორის გამოყენებით.

გამოქვეყნებული სამეცნიერო შრომები:

1. M. Muradashvili, N. Jabnidze, L. Koiava, R. Dumbadze, K. Memarne, L. Gorgiladze, G. Meparishvili, A. Kalandia and **R. Davitadze** Antibacterial and Antifungal Activity of Stevia rebaudiana (Asteraceae) Leaf Extract in vitro Condition. Biological Forum – An International Journal 11(1): 212-216(2019)
2. **R. Davitadze**, A. Kalandia Characterization of biological activity components of Stevia leaf SFE fraction. Global Journal of Current Research Vol. 6 No. 1. 2018. Pp. 36-40
3. **R. Davitadze**, A. Kalandia Antioxidant activity of stevia products. IX International Conference „Bioantioksidant". Moscow 2015
4. **R. Davitadze**, A. Kalandia Stevia (Stevia Rebaudiana) antioxidant activity of leaf. International scientific-practical conference. Kutaisi 2014
5. **R. Davitadze**, A. Kalandia Stevia - safe sweetener. International scientific-practical conference. Kutaisi. 2014
6. **R. Davitadze**, M. Vanidze, A. Kalandia Sweet tea. Association of Professional Chemists. Third International Conference of Young Chemists ICYC-2012. Tbilisi. 2013

7. **R.Davitadze**, A.Kalandia, M.Vanidze. Stevia - the future of the sugar. The Technical University of Professional Chemists Association. Second International Conference of Young Chemists ICYC-2012. Tbilisi, 2012

საერთაშორისოსამეცნიეროფორუმებშიმონაწილეობა:

1. **R. Davitadze**, A. KalandiaAntioxidant activity of stevia products. IX International Conference „Bioantioxidant". Moscow 2015
2. **R. Davitadze**, A. KalandiaStevia (Stevia Rebaudiana) antioxidant activity of leaf. International scientific-practical conference. Kutaisi 2014
3. **R. Davitadze**, A. KalandiaStevia - safe sweetener. International scientific-practical conference. Kutaisi. 2014
4. **R. Davitadze**, M. Vanidze, A. KalandiaSweet tea. Association of Professional Chemists. Third International Conference of Young Chemists ICYC-2012. Tbilisi. 2013
5. **R.Davitadze**, A.Kalandia, M.Vanidze. Stevia - the future of the sugar. The Technical University of Professional Chemists Association. Second International Conference of Young Chemists ICYC-2012. Tbilisi, 2012

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა - დისერტაცია შედგება 117 ნაბეჭდი გვერდისაგან, დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაციის გაფორმების ინსტრუქციის მიხედვით და მოიცავს სატიტულო და ხელმოწერების გვერდებს, რეზიუმეს ქართულ და ინგლისურ ენაზე, შინაარსს, სურათებს 96, ცხრილებს ნუსხას 15, გრაფიკს 2, სქემებს 4, გამოყენებული ლიტერატურის ნუსხას - 154 ერთეულს და საილუსტრაციო მასალებს დანართი 1. ძირითადი ტექსტის შემადგენლობაშია: შესავალი, ლიტერატურული მიმოხილვა, შედეგების განსჯა, ექსპერიმენტული ნაწილი, დასკვნა, გამოყენებული ლიტერატურის ჩამონათვალი და დანართი.

შესავალში განხილულია თემის აქტუალობა, კვლევის მიზნები, კვლევის ობიექტები, ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და მისი პრაქტიკული მნიშვნელობა.

ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1. სტევია და მისი ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები

სტევიას (*Stevia rebaudiana Bertoni*) სამშობლო სამხრეთ ამერიკაა (არგენტინა, ბოლივია, ბრაზილია, პარაგვაი). სტევიას ეს სახეობა პირველად 1899 წელს აღწერა ბოტანიკოსმა ბერტონიმ (13,14,15). სტევია მიეკუთვნება რთულყვავილოვანთა (Asteracea) ოჯახს (19,20). სტევია მრავალი სინონიმითაა ცნობილი. ამერიკელ ინდელთა ცნობილი ტომის გუარანას ენაზე: Ca-a jhee, Caa-a yupl, Caa-jhe-he. მათი თარგმნა დაახლოებით ჟღერს როგორც: „თაფლოვანი ბალახი“, „ტკბილი მცენარე“. დღეისთვის ცნობილი სტევიას 200-მდე სახეობიდან მხოლოდ (*Stevia rebaudiana Bertoni*) გამოირჩევა ინტენსიურად ტკბილი გემოს მქონე ნაერთებით. ამ ნაერთებით მე-20 საუკუნის 30-იანი წლებიდან დაინტერესდნენ (7,115). სტევია ჯვარედინმტვერია მცენარეა. ყვავილობის დროს ის იმტვერება მწერების საშუალებით. სტევია ძირითადად ყვავილობს სექტემბერში. ყვავილები ორსქესიანია, ანდროციტთა და გინეციტთა. პატარა გვირგვინი შეზრდილია ყვავილის ფურცლით, გაგრძელებული ზამბახისებრი. ზედა ნაწილი იყოფა ხუთ სექტორად. მილისებრი, თეთრი ფერის ფუძესთან შეფერილია იისფრად. ყვავილები შეკრულია კალათად 5 ყვავილედით თითოეულში. კალათები განლაგებულია რთულ თანაყვავილედად.

ნატურალური დაბალკალორიული დამატკბობლების მაღალი შემცველობით *Stevia rebaudiana* პოპულარული გახდა. მცენარე ეკონომიკურად მიმზიდველია სურსათის წარმოებაში და იქ სადაც ფართოდ გამოიყენება დამატკბობელი. მასზე მოთხოვნა მუდმივად მზარდია და ის განიხილება, როგორც ბაზრისათვის მნიშვნელოვანი მომავლის პროდუქტი (დამატკბობელი). (137)

დღეისათვის წარმოებული სტევიას უმეტესი ნაწილი ჩინეთზე და სამხრეთ ამერიკაზე მოდის 4000 ათას ტონამდე. იგი ბუნებაში უმეტესად გვხვდება მჟავა pH 4-5, თუმცა ასევე შესაძლებელია ნეიტრალურ ნიადაგებზე მოყვანა pH 6,5 - 7,5. (81,144,145) სტევია შეიცავს ენტ-კაურენის გლიკოზიდებს როგორცაა სტევიოზიდი, (98,99) რებაუდიოზიდი, A, B, C, D, E, F და დულკოზიდი A, რომლებიც 200-400-ჯერ ტკბილია

და მცენარეს ანიჭებენ სპეციფიკურ ტკბილ გემოს. (18,19). სტევიოზიდი 300-ჯერ, ხოლო რებაუდიოზიდი A 400-ჯერ ტკბილია ვიდრე საქაროზა (32).

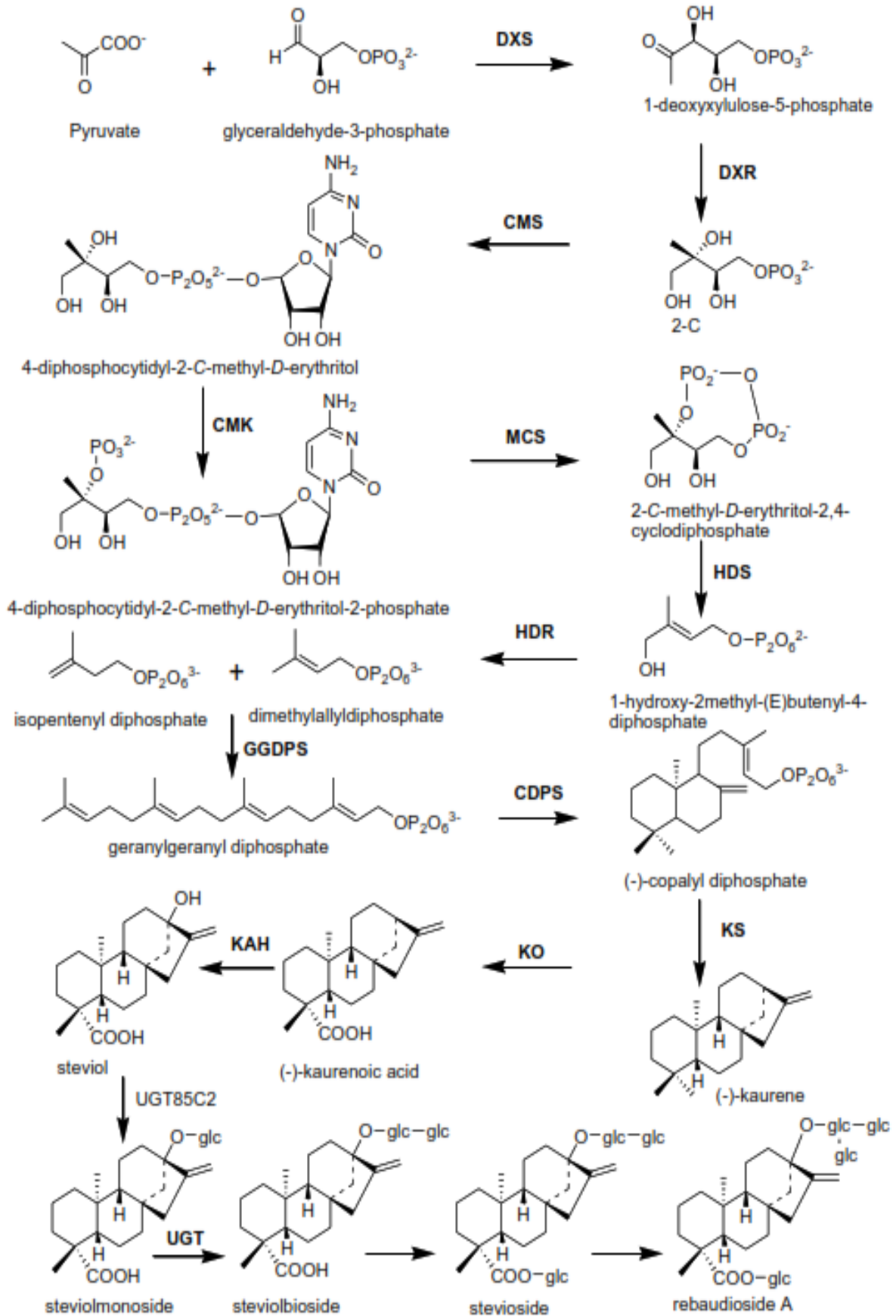
ესენი ყველაზე დომინანტი ნაერთებია, ხოლო სტევიოლბიოზიდი და რებაუდიოზიდი B მიჩნეულია, რომ წარმოიქმნება ექსტრაქციის დროს ნაწილობრივი ჰიდროლიზის შედეგად (32,34). დანარჩენი ტკბილი გლიკოზიდები გვხვდება კვალის სახით. აღსანიშნავია, რომ სტევიას და მისგან წარმოებული პროდუქტების გამოყენება შესაძლებელია სიმსუქნის და დიაბეტის მიდრეკილების მქონე ადამიანებისათვის. ადამიანის ორგანიზმში ტკბილი გლიკოზიდები ნაწილობრივ ჰიდროლიზირდება სტევიოლის წარმოქმნით (34).

გარდა ამ ნაერთებისა სტევიას ფოთლებში იდენტიფიცირებულია მეორეული მეტაბოლიტები ტრიტერპენები, ფენოლური მჟავები და ზეთოვანი კომპონენტები. (116) ასევე ლაზდანის ტიპის დიტერპენები სტერებიინები (A - H) (33,117), ასევე მცენარეული სტეროლების სახით აღმოჩენილია β-ციტოსტერინი, სტიგმასტეროლი და კამპესტეროლი (80).

Stevia rebaudiana დიტერპენულ გლიკოზიდებს აქვთ საერთო აგლიკონი სტევიოლი (13- ჰიდროქსი-ენ-კაურ-16-ენ-19 მჟავა) და ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან მხოლოდ გლიკოზიდური კომპონენტებით, რომლებიც შეერთებულია C-13-თან და/ან C-19-თან რთულ ესტერული კავშირით. ზოგჯერ გლუკოზასთან კომბინაციაში გვხვდება რამნოზა და ქსილოზა.

სტევიოლის გლიკოზიდების ბიოსინთეზის რამდენიმე გზას განიხილავენ, მათ შორის ძირითადია 2-C-მეთილ-D-ერიტრიტოლ-4-ფოსფატ-1-დეჰოქსი-D-ქსილოზო 5-ფოსფატური (MEP /DOXP) და მევალონის მჟავას (MVA) გზები. (12,31,63,64,100) (სქემა №1,2)

სქემა. №1 სტევიოლ გლიკოზიდის (MEP) ბიოსინთეზი



როგორც წესი, ადამიანის ენის რეცეპტორები აღიქვამენ გლუკოზის სიტკბოს, მაგრამ სტევიოლ-გლიკოზიდების სიტკბოს აღქმა გაცილებით უფრო ძლიერად ხდება. (40,118) აღსანიშნავია, რომ რეზაუდიოზიდი A-ს აქვს ყველაზე ნაკლები „სიმწარე“ სხვა გლიკოზიდებთან მიმართებაში.

დამატკობელია ის ნივთიერებები, რომლებიც იძლევიან სიტკბოს შეგრძნებას, მაგრამ არ წარმოადგენენ ნახშირწყლებს. ისინი წარმოშობის მიხედვით იყოფა ბუნებრივ და სინთეზურებად. ამ ნაერთების გამოყენება ნებადართული უნდა იყოს შესაბამის სამსახურების მიერ, მათ შორის ძალზე მნიშვნელოვანია FDA (აშშ-ს საკვებისა და წამლის სააგენტო) და ევროკავშირის რეგულაციები. მრავალი ხელოვნური დამატკობელი დღეს ცნობილია, როგორც სხვადასხვა საფრთხის წინაპირობა (33,37,41,58,59,80,116,117). დამატკობელი დანამატები ევროკავშირში აღინიშნება E-თი და შეესაბამება ნომრები.

განსაკუთრებული აღნიშვნის ღირსია ქლოროგენის მჟავას, მისი წარმოებულებისა და ფლავონოიდური გლიკოზიდების არსებობა სტევიას ფოთოლში. ქლოროგენის მჟავას წარმოებულები წარმოდგენილია მრავალი ნაერთის სახით, კერძოდ ქინისა და ტრანს-ჰიდროქსიყავის მჟავას რთულ ესტერების, აგრეთვე ყავის, კუმარისა და ფერულის მჟავას სახით. (41,45,68)

სტევიას მოხმარება 1500 წელზე მეტი ხნის ისტორია აქვს (გუარანას ინდიელები პარაგვაისა და ბრაზილიაში) (14,45,68). სტევიას ფართო გამოყენება პირველად მე-20 საუკუნის 70-იანი წლებიდან იწყება იაპონიაში. 1991 წელს FDA აკრძალა სტევიას გამოყენება (151,152). მიზეზი სტევიას ტოქსიკურობის არასაკმარისი შესწავლა იყო. დავის ძირითადი მიზეზი სტევიოზიდისა და რეზაუდიოზიდის ჰიდროლიზის შედეგად წარმოქმნილი აგლიკონის სტევიოლის მუტაგენურობა ითვლებოდა (151,152,153,154), თუმცა სხვა შემდგომი კვლევებით დამატკობელის მეტაბოლიტების მუტაგენურობა სადაო აღმოჩნდა და 1994 წლიდან სტევია FDA-ის მიერ ნებადართული პროდუქტია. 2010 წლის 10 მარტიდან საკვები პროდუქტების უსაფრთხოების ევროპულმა ორგანომ დასაშვებად ჩათვალა 4 მგ/კგ სტევიოზიდის გამოყენება დღე-ღამეში (120).

სტევიის გამრავლება ბუნებაში ხდება თესლით. 1000 ცალი თესლის მასა 0,3 - 0,5 გ – ია (86). სათესლე კოლოფი მომწიფებისას ლებულობს მუქ ყავისფერს. თესლის ზედაპირზე შეიმჩნევა 5-6 ღია ყავისფერი ვერტიკალური ზოლი. ჩვენს პირობებში მცენარეზე ბუნებრივად დამწიფებული თესლები ღია გრუნტის პირობებში პრაქტიკულად არ აღმოცენდებიან. ისინი ხელოვნური კლიმატის პირობებშიც კი ცუდი აღმოცენებით ხასიათდებიან (29,97,122,125).

დღეისთვის მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში გამოყვანილია სტევიას ახალი ჯიშები, რომლებიც გამოირჩევიან ტკბილი ნაერთების მაღალი შემცველობით. ჩვენში გავრცელება ჰპოვა მე-20 საუკუნის 80-იან წლებში უკრაინიდან შემოტანილმა სახეობამ (დასახელება უცნობია). პირველი სამუშაოები მცენარის ინტროდუცირებასთან დაკავშირებით ტარდებოდა ქ. სოხუმში, დაბა ჩაქვში, დაბა ანასეულში და ჩვენი უნივერსიტეტის (ბსუ) თანამშრომლების მიერ (78,111,112,135,136)

სტევიათი დაინტერესება და მისი მზარდი პოპულარობა დაკავშირებულია ინტენსიურად ტკბილი გემოს მქონე ნაერთებთან. მცენარით დაინტერესდნენ სელექციონერებიც (101,122,124), რათა გაიზარდოს ფოთლის ხარისხის ძირითადი მაჩვენებელი, ტკბილი ნაერთების ჯამური შემცველობა. ველურად მოზარდ მცენარეებში მათი შემცველობა 6-7 %-ის ფარგლებშია. დღეისათვის მიღებულია ჯიშები, რომლებშიც ტკბილი ნივთიერებების შემცველობა 14 % (Рамонская кластена) და უფრო მეტიც 18 % -ია (Roial sweet) (13,21,22).

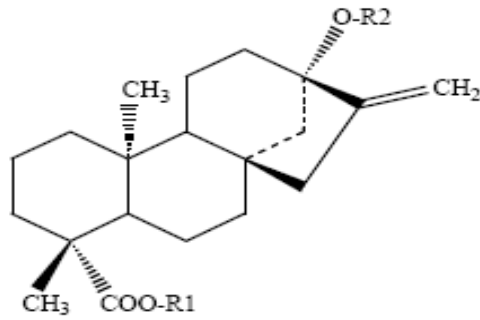
სტევია და მისგან მიღებული პროდუქტები მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში გამოიყენებიან როგორც საკვები დანამატი, დამატკბობელი საშუალება დიაბეტისა და სიმსუქნის პროფილაქტიკის დროს (119,127). რაც შეეხება სტევიას გავლენას დიაბეტზე კვლევებით დადგინდა, რომ ის (200-400 მგ/კგ) მნიშვნელოვნად ამცირებს გლუკოზის დონეს სისხლში და არ იწვევს ჰიპოგლიკემიას (23,56,76). ასევე დამტკიცებულია, რომ სტევიოზიდი და დიტერპენოიდული გლიკოზიდებიწარმოადგენენ ანტიჰიპერგლიკემიურ, სიმსივნის საწინააღმდეგო, შარდმდენ, იმუნომასტიმულირებელ და სხვა ქმედებების მქონე ნაერთებს (58,59). სტევიას ტკბილ გლიკოზიდებს გააჩნიათ უნიკალური თვისება - შეამცირონ

სისტემური არტერიული წნევა. ხანგრძლივი მიღებისას აქვს კარდიოტონული ეფექტი, დადებით გავლენას ახდენს გულსისხლძარღვთა სისტემაზე. მათ გააჩნიათ ანტისეპტიკური თვისებები (125). უნარი აქვთ შეაჩერონ მიკროორგანიზმების გამრავლება და ზრდა. განსაკუთრებით აღსანიშნავია ის მიკროორგანიზმები, რომლებიც იწვევენ კარიესს და ღრძილების დაავადებებს. სტევია იწვევს ინსულინის წარმოქმნის და გლიკოგენის სინთეზის სტიმულირებას (66,69,76). სტევია და მისი პროდუქტები გამოიყენება ცივ და ცხელ სასმელებში, ნამცხვრებში, გაზირებულ და უალკოჰოლო სასმელებში. ძირითადი მომხმარებლები იაპონელები არიან. ისინი წელიწადში 2000 ტონაზე მეტ ექსტრაქტს მოიხმარენ. აღსანიშნავია, რომ ტოქსიკურობის არც ერთი შემთხვევა არაა დაფიქსირებული.

მსოფლიო პრაქტიკაში სტევია გამოიყენება უშუალოდ ფოთლის, ექსტრაქტის, კონცენტრატის, მშრალი ექსტრაქტის და ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების სახით (55,79,86,105,127,128). ამ უკანასკნელის მიღება მსოფლიო გამოცდილების გათვალისწინებით შემდეგნაირად შეიძლება ჩამოყალიბდეს: ექსტრაქტის მიღება, ექსტრაქტის გასუფთავება, პრეპარატის ან ინდივიდუალურ ნაერთთა გამოყოფა და მათი გადაკრისტალება (8,62). ბოლო დროს ამ მიზნების მასალწევად გამოიყენება ულტრაფილტრაციული მეთოდებიც (142).

სტევია დღეისათვის მოჰყავთ მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში: ბრაზილია, ჰარაგვაი, ჩინეთი, ინდოეთი, ვიეტნამი, იაპონია, კანადა, აშშ და სხვა. განსაკუთრებით საინტერესო კვლევებია ჩატარებული იაპონიასა და კანადაში (42,44,88,89).

დღეისათვის ცნობილი რვა ძირითადი ტკბილი დიტერპენოიდური გლიკოზიდიდან სტევიაში, როგორც ავღნიშნეთ გვხდება მნიშვნელოვანი რაოდენობით მხოლოდ ორი - სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდი A(20). შესწავლილია მათი ფიზიკური და ქიმიური თვისებები. სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდის გამძლეობის ტესტირება მოხდა სასმელებში: გაცხელებისას, ნახშირორჟანგით გაზირებისას და pH-ის ცვლილებისას. რებაუდიოზიდი განიცდის დაშლას მზის პირდაპირი სხივის ხანგრძლივად მოქმედებისას. იაპონელთა მრავალრიცხოვანი ნაშრომები მოწმობენ, რომ სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდი ძალზე სტაბილურია.



Compound name	R1	R2
Stevioside	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1)
Rebaudioside A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
Rebaudioside C	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2→1) β -Glc(3→1)
Dulcoside A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2→1)

სქემა №3. სტევიას ძირითადი დიტერპენური გლიკოზიდების სტრუქტურული ფორმულები.

სტევიოზიდი R_1 - β -D-გლუკოპირანოზა; R_2 - β -D-გლუკოპირანოზილ-(1-2) - β -D-გლუკოპირანოზა.

რებაუდიოზიდი A - R_1 - β -D-გლუკოპირანოზა; R_2 - β -D-გლუკოპირანოზილ-(1-2) - β -D-გლუკოპირანოზილ (1-3) - β -D-გლუკოპირანოზა.

რებაუდიოზიდი C - R_1 - β -D-გლუკოპირანოზა; R_2 - β -D-გლუკოპირანოზილ-(1-2) - β -L-რამნოპირანოზილ (1-3) β -D-გლუკოპირანოზა.

დულკოზიდი A - R_1 - β -D-გლუკოპირანოზა; R_2 - β -D-გლუკოპირანოზილ- (1-2) - β -L-რამნოპირანოზა.

მრავალი შრომა ეძღვნება სტევია რებაუდიანას (*Bertoni*) მოყვანის ადგილმდებარეობის მიხედვით კვლევას. სამშობლოში (ბრაზილია და პარაგუაი) ის მრავალწლიანი ბუჩქოვანი მცენარეა. დღეისათვის მისი მოყვანა ხშირად ერთწლიანი კულტურის

სახით ხდება იაპონიაში, ტაივანში, კორეაში, ტაილანდსა და ინდონეზიაში (98,99). სტევას ფოთლების ექსტრაქტს უკვე ათეული წლებია იაპონიაში, სამხრეთ ამერიკაში და ჩინეთში იყენებენ, როგორც საკვებში, ასევე სასმელებში. შესწავლილია დიტერპენული გლიკოზიდების შემცველობა სხვადასხვა ორგანიზაციის მიერ მოწოდებული მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში აღებულ ნიმუშებში.

აღწერილია დიტერპენული გლიკოზიდის გამოყოფა სტევას ფოთლის გაუწმენდელი, პირველადი ექსტრაქტიდან, მათი იდენტიფიცირება და კვლევა ფიზიკური (NMR და MS) და ქიმიურ მეთოდებით. ამის საფუძველზე ახალი ნაერთების გამოყოფა, სტრუქტურის დადგენა, შემდგომი გამოყენების თვალსაზრისით, როგორც ნატურალური დამატკობებელი ან დამატკობელის გამაძლიერებელი. გარდა ამისა შესწავლილია მრავალი სტევიოლ გლიკოზიდის სტაბილურობა სხვადასხვა სისტემებში, ასევე მათი დაშლის პროდუქტები სპექტრალური მეთოდებით.

საინტერესო კვლევებია ჩატარებული სტევია მშრალი ფოთლების ექსტრაქტიდან მიღებული პრეპარატების, ნაერთების ბიოლოგიური აქტიურობასა და გამოყენების პოტენციალის შესახებ საკვებ ან კოსმეტიკურ ინდუსტრიაში წყლიანი, წყალ-ეთანოლიანი და ეთანოლიანი ექსტრაქტების სახით. ექსტრაქტების კვლევა მიმდინარეობდა აგრეთვე პოლიფენოლების და პროტეინების შემცველობაზე. კვლევებში ნაჩვენებია, რომ ყველა ნიმუშში მაღალია ფენოლების (15.50 მგ/გ) და ფლავანოიდების (3.85 მგ/გ) შემცველობა. ყველა ექსტრაქტი შეიცავს პროტეინების მნიშვნელოვან რაოდენობას (69.40–374.67 მგ/გ). სტევას ექსტრაქტებზე ჩატარებული ანალიზებიდან (HPLC) დადგენილი იქნა განსაკუთრებით ფერულის (5.50 მგ/გ) და როზმარინის (4.95 მგ/გ) მქავას ნაწარმების სიჭარბე. დადასტურდა სტევას ექსტრაქტების გამოყენების შესაძლებლობა როგორც ბუნებრივი ანდიოქსიდანტური დანამატი საკვებში და ასევე კოსმეტიკურ ინდუსტრიაში (58,59,113,138).

„სტევია“ ანუ „თაფლოვანი ფოთოლი“, რამდენიმე კვლევის მიხედვით, სიტკბოს გარდა, რომელიც გამოწვეულია სტევიოზიდისა და მისი მონათესავე ნაერთებით, როგორცაა რეზაუდიოზიდი A და იზოსტევიოლი (39), შეიძლება სხვა თვისებების გამოც იქნას გამოყენებული. მას გააჩნია: ანტიჰიპერგლიკემურ, ანტიჰიპერტენზიულ,

ანტიანთებით, ანტისიმსივნურ, ანტიდიარეულ და იმუნომოდულაციურ ეფექტებს (59,61,94,123,126).

ნაჩვენებია, რომ სტევია რეზაუდიანა ბერტონის ხასიათდება ანტიკარიოგენული მოქმედებით. კვლევის შედეგები ადასტურებს იმას, რომ სტევითი არ არის კარიოგენული. მომავალი კვლევა უნდა იყოს ფოკუსირებული in-vivo გარემოში, რადგან მოხდეს სტევიას პროდუქტის რეგულატორად მიღების საფუძველზე ანტიკარიესული ზემოქმედების დაფიქსირება (129).

ამერიკის შეერთებულ შტატებში, კბილის კარიესი ბავშვებში ყველაზე გავრცელებული ქრონიკული დაავადებაა და ის ძირითადად, არის ორიდან – ხუთ წლამდე ასაკში (17,41). დღესდღეობით კარიესი საკმაოდ გავრცელებულია და მოსახლეობაში ვრცელდება საკმაოდ ფართო მასშტაბით. განვითარებად ქვეყნებში როგორცაა ფილიპინები, ადრეულ ბავშვობაში დაუცველი ჯგუფებისათვის კარიესი 85 %-მდე აღწევს (28). კვლევამ აჩვენა, რომ კბილის კარიესის გავრცელება 3 წლამდე ასაკის ბავშვებში 15,4 % იყო, მაგრამ დადებითი შედეგი ძირითადად მხოლოდ მაღალი სოციალურ-ეკონომიკური და ეთნიკური წარმომავლობასთან იყო დაკავშირებული (52,53). მსოფლიო მასშტაბით სტომატოლოგიის დონის გაუმჯობესება შეიძლება მიღწეული იყოს კარიესების პრევენციული სტრატეგიის განხორციელებით. განსაკუთრებული ყურადღება უნდა დაეთმოს მაღალი რისკის მქონე ჯგუფებს, რომლებსაც მიეკუთვნება დაბალი ეკონომიკური და სოციალური სტატუსის მქონე ადამიანები, ნაკლებად განვითარებულ ქვეყნებში (51,54). ამრიგად, კონკრეტული კვლევა ორიენტირებულია კბილის კარიესის წინააღმდეგ ახალი მეთოდების შემუშავებაზე, რომელიც ეფუძნება იდენტიფიკაციას და ნატურალური აქტიური ნაერთების გამოყენებას, რომელსაც გააჩნია ანტიკარიესული მოქმედება, ან ამცირებს კარდიოგენურ მიკროფლორას და/ან მძიმე ქსოვილების სტომატოლოგიურ რემინერალიზაციას (48,49,50,75,90).

სტევია *Rebaudiana Bertoni* და მისი დიტერპენული გლიკოზიდებისადმი დიდ ინტერესს იჩენს კვების ობიექტები (საკონდიტრო), რაც განპირობებულია მისი დაბალი კალორიულობით და მეტად ტკბილი გემოთი. ინტერესი გაიზარდა განსაკუთრებით მას შემდეგ, რაც ამერიკის საკვებისა და წამლების ადმინისტრაციამ (FDA) ის ცნო

უსაფრთხოდ. (95,103) რეზაუდიოზიდ A ერთ-ერთი მთავარი ნაერთია სტევიოლ გლიკოზიდებიდან ფოთლის შემადგენლობაში.(114) მიუხედავად იმისა, რომ ის ჯანმრთელობისთვის სასარგებლოა და 250-300-ჯერ ტკბილია საქაროზაზე, მისი ხანგრძლივი სიტკბოს შეგრძნება მას არც ისე მიმზიდველს ხდის. აქედან გამომდინარე ინტერესს იწვევს მისი წარმოებულები, რომლებიც ნაკლებად ტკბილია და შედარებით ნაკლები ხანგრძლივობის სიტკბო აქვთ. ეს ნაერთებია: ტეტრა-გლუკოპირანოზიდ დიტერპენ გლიკოზიდ 13-[(2-O--D-glucopyranosyl-6-O--D-glucopyranosyl--D-glucopyranosyl) და 13-[(2-O--D-glucopyranosyl-3-O--D-glucopyranosyl--D-glucopyranosyl) oxy]ent-hydroxyatis-16-en-19-oic acid --D-glucopyranosyl ester (რეზაუდიოზიდ A იზომერები) და მათი გასაპვნის პროდუქტებს 13-[(2-O--D-glucopyranosyl-6-O--D-glucopyranosyl--D-glucopyranosyl) oxy]ent-kaur-16-en-19-oic acid (rebaudioside Z1) და 4 13-[(2-O--D-glucopyranosyl-3-O--D-glucopyranosyl--D-glucopyranosyl) oxy]ent-hydroxyatis-16-en-19-oic acid(65,91,121,140,143).

წარმოებული პროდუქტები ორი ახალი ტეტრაციკლია, რომელსაც არ გააჩნია შაქარი C-19 პოზიციაზე, რომელიც მიღებულია რეზაუდიოზიდის მსუბუქი ტუტე ჰიდროლიზის შედეგად. ნაერთი გამოყოფილი იქნა სუფთა სახით და ისინი იდენტიფიცირებული იქნა როგორც რეზაუდიოზიდი A (5), H (6) და J (7). ქიმიური სტრუქტურები ცალსახად დადგენილ იქნა ანალიზის შემდეგი მეთოდებით: HRESIMS, HRESI-MS/MS, და 1D-და 2D-NMR. გარდა ამისა, მეთანოლში გამოკრისტალებული იქნა იზო-სტევიოზიდის მაღალი ხარისხის კრისტალი და მისი სტრუქტურა დადგენილია დიფრაქციული X-ray მეთოდით(38,134,139,140).

დიაბეტი ქრონიკული დაავადებაა, რომლითაც 2014 წელის მონაცემებით 422 მილიონი ადამიანი იყო დაავადებული და ეს მაჩვენებელი ყოველ წლიურად იზრდება. დიაბეტს ახასიათებს ინსულინის დეფიციტის ან ინსულინის მიმართ მგრძნობელობის დაქვეითება და შესაბამისად ეს იწვევს სისხლში შაქრის დონის მომატებას, რასაც შეუძლია გამოიწვიოს სხვა რიგი დაავადებები (38,139). შაქრის მოხმარების შემცირება ან აღმოფხვრა და საქაროზის ჩანაცვლება უფრო ჯანსაღი დამატკობლით ერთერთი პროგრესული მიდგომაა დიაბეტის კონტროლისა და პრევენციისათვის. მას შემდეგ, რაც სტევიას სტევიოლ გლიკოზიდები აღიარებულ იქნა 2008 წელს, როგორც

უსაფრთხო დამატკობელი ამერიკის საკვებისა და წამლების ადმინისტრაციის, ხოლო 2011 წელს კი ევროკავშირის მიერ, რთულყვავილოვანთა ოჯახის წარმომადგენელის სტევიოლ გლიკოზიდებისადმი საკმაოდ დიდი ინტერესი გამოიჩინეს სხვადასხვა კომპანიებმა და საზოგადოებამ, რადგაც ის წარმოადგენდა ნატურალურ, დაბალკალორიულ პროდუქტს, რომელიც გაცილებით უფრო ტკბილი იყო, ვიდრე საქაროზა (95,103).

გარდა ამისა, ვარაუდობენ რომ რეზაუდიოზიდი A-ს პოტენციური აქტივობა დამოკიდებულია Ca^{2+} კათიონზე, ის გავლენას ახდენს მეორე ტიპის დიაბეტზე – უჯრედის რეცეპტორებსა და პანკრეასზე. მიუხედავად იმისა რომ, რეზაუდიოზიდი A საუკეთესო საშუალებაა შაქრის შესაცვლელად და მეორე ტიპის დიაბეტის პრევენციისათვის, მომხმარებლისთვის ის არა სასიამოვნოა, რადგანაც მისი სიტკბო საკმაოდ დიდხანს შეიგრძნობა, რაც გამოწვეულია ტეტრა-გლუკოპირანოზიდის არსებობით (4,5,82,83,84,85).

სხვადასხვა დროს სტევიას დიტერპენული გლიკოზიდების კვლევის მეთოდების ფართო სპექტრია გამოყენებული. ეს მეთოდები მოიცავს თხელფენოვან ქრომატოგრაფიას (71,72), კაპილარულ ელექტროფორეზს (106), ახლო ინფრაწითელი სპექტრით კვლევას (107) და სხვა. ყველაზე გავრცელებული და ეფექტურია კვლევა მაღალ ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფირების მეთოდით სხვადასხვა სვეტისა და დეტექტორის გამოყენებით. საკმაოდ ძნელია იზომერული სტევიოლ გლიკოზიდების ერთმანეთისაგან ქრომატოგრაფიული დაცილება და იდენტიფიკაცია.

სტევიოლ-გლიკოზიდების დაყოფა შესაძლებელია სვეტით, რომელიც მოდიფიცირებულია ამინო ჯგუფით (NH_2) (60,70,80,109,132) C18 და სხვა სვეტებით ულტრაისფერი, რეფრაქტომეტრული ინდექსის ან მას დეტექტორის გამოყენებით. (10,43,130,133) ასევე ხშირად მიმართავენ ორმაგ ქრომატოგრაფირებას თხელ ფენაზე (47,72) და UHPLC ქრომატოგრაფირებას (10,24). ამინო ჯგუფის მქონე სვეტის გამოყენებით მიიღება კარგი დაყოფა სტევიოლ-გლიკოზიდების იზომერების (72,132), ხოლო სვეტი C18 ნაკლებად სელექტიურია, მაგრამ ამავედროულად მდგრადია (73).

ლიტერატურაში იძებნება ოფიციალური ორგანიზაციების ანგარიშები (Food and Agriculture Organization of the United Nations -FAO, World Health Organization-WHO), მაგრამ სამწუხაროდ, დღემდე არ არის შემუშავებული სტევიას ტკბილი გლიკოზიდების შესწავლის სტანდარტიზირებული მეთოდი. ძალზე ეფექტურია ნაერთების გამოყოფის და იდენტიფიკაციის HPLC,UPLC –MS ტექნოლოგიები.

პოლიფენოლები მცენარეებში მრავალფეროვნადაა წარმოდგენილი,ისინი მეორეული მეტაბოლიტებია (146). საკვებს სძენს სიმწკლარტეს, ფერს, გემოს, სუნს და მათი სტაბილურობის ფაქტორს წარმოადგენს, ასევე მაღალია ანტიოქსიდანტური აქტივობა გაცილებით, ვიდრე ვიტამინებისა (110,147,148,149). ზოგიერთი პოლიფენოლი (მაგ. კვერცეტინი) ფართოდ არის გავრცელებული, ზოგიერთი კი სპეციფიკურია (150). ხილი, წვენი, ჩაი და ყავა ითვლება პოლიფენოლების ძირითად წყაროდ. განსაკუთრებით საინტერესოა პროდუქტებში მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობის მქონე კოფეინის მჟავასა და მისი წარმოებულების შემცველობა (25,87).

სტევიას ფენოლური ნაერთები ბევრ ქვეყანაში არის შესწავლილი. კერძოდ, იტალიაში (ჩრდილო-აღმოსავლეთი) სტევიას ექსტრაქტში აღმოჩენილი იქნა ფენოლური ნაერთების მაღალი შემცველობა (78.24 mg GAE g⁻¹ DW by Folin-Ciocalteu method)(74,102) და შესაბამისად მაღალია ანტიოქსიდანტური აქტივობა (812.6 μmol Fe²⁺ g⁻¹ DW by FRAP). DPPH თავისუფალი რადიკალის IC₅₀ ინჰიბირების მაჩვენებელი არის 250 μg mL⁻¹ ანტიოქსიდანტური აქტივობა (16,26,35,131).

სტევია მიჩნეულია ანტიოქსიდანტების ბუნებრივ წყაროდ (67,77,93). ის შეიცავს ფენოლურ ნაერთებს, მათ შორის ფლავონოიდებს (24,01 და 18,93 მგ/კგ შესაბამისად მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით), ხოლო კალუსში მათი შემცველობა ცოტათი მეტია 33,99 და 30,03 მგ/კგ შესაბამისად. ამ ნაერთების მთავარი თვისება არის ადამიანის ჯანმრთელობაზე პროფილაქტიკური ზემოქმედება. განსაზღვრული იქნა მათი ანტიოქსიდანტური, ანტიბაქტერიოლოგიური და ანტიმიკოდიური აქტივობა (11,27,46,92,104).

კვლევები ჩატარებული იქნა მაროკოში კულტივირებულ სტევიას ფოთლის ექსტრაქტების. დადგენილია ანტიოქსიდანტური აქტიურობის კავშირი ფენოლური ნაერთების შემცველობასთან, რომელიც 37,13-დან 67,85 მგ/გ გალის მჟავაზე

გადაანგარიშებით, ხოლო საერთო ანტიოქსიდანტური აქტივობა განსხვავებული იყო ექსტრაგენტის მიხედვით (78.08-დან 69.01-მდე%, 66.42-დან 59.56%-მდე და 68.53-დან 61.90მდე % წყალი, ეთანოლი და მეთანოლი შესაბამისად) (68,141,32,34).

დადგენილია აზოტოვანი სასუქის დიფერენცირებული მიწოდების დამოკიდებულება სტევიასში ფენოლური ნაერთების დაგროვებასთან (30).

საქართველოში გავრცელებული მცენარის სტევიას (სამწუხაროდ ჯიში უცნობია და მათი პირველი ნერგები შემოტანილი იქნა 1986 წელს) ფოთოლი შექარზე 10-15 ჯერ ტკბილია. სტევიას უპირატესობა სხვა ბუნებრივ თუ სინთეზურ დამატკბობლებთან შედარებით არის ის, რომ არ გააჩნია უკუჩვენება (დღემდემარ არის დადგენილი რომელიმე მნიშვნელოვანი უკუჩვენება) და დადებითად აისახება მისი მოქმედება ადამიანის ორგანიზმზე. ის თერმომედეგია და იძლევა საშუალებას დამატკბობელი გამოყენებული იქნას ჯემების, მურაბების, წვენებისა და საკონდიტრო ნაწარმის მისაღებად.

კვლევები ჩატარებულია ნატურალურ წვენებში სტევიას დამატებით და დადასტურებულია, რომ ამით მნიშვნელოვნად მატულობს წვენების ანტიოქსიდანტური აქტივობა (9,11,108).

2 ექსპერიმენტული ნაწილი

2.1 კვლევის ობიექტი

კვლევის ობიექტს წარმოადგენს დასავლეთ საქართველოში ინტროდუცირებული სტევიას (*Stevia rebaudiana* Bertoni) სხვადასხვა ფორმის მცენარეთა ფოთლები, მისი გადამუშავებით წარმოებული პრეპარატები და ტაბლეტები. სტევიას (*Stevia rebaudiana* Bertoni) სამშობლო სამხრეთ ამერიკაა (არგენტინა, ბოლივია, ბრაზილია, ჰარაგვაი). სტევიას ეს სახეობა პირველად 1899 წელს აღწერა ბოტანიკოსმა ბერტონიმ. სტევია მიეკუთვნება რთულყვავილოვანთა (Asteracea) ოჯახს.

დოქტორანტურის საგანმანათლებლო პროგრამის (2013-2014 წელი) გრანტი DO/124/6-470/13 ფარგლებში შეძენილი იქნა გაცილებით უხვმოსავლიანი და დიტერპენული გლიკოზიდების მაღალი შემცველობის მქონე სხვადასხვა ჯიშის სტევიას თესლები (პოლონეთის, პარაგვაის, კანადისა და სხვა მწარმოებლებისაგან).

1. "Paraguay, motherland of Stevia"
2. 3000 STEVIA REBAUDIANA SEEDS - Sweet Leaf seeds HIGH QUALITY High germination
3. >600mg DARK STEVIA SEEDS + FREE DRY LEAVES SAMPLE! SWEET LEAF KAHEE (Polish)
4. 1500 ORGANIC NON GMO STEVIA REBAUDIANA SEEDS - Sweet Leaf High germination. (Stevia Rebaudiana Bertoni, Extremely sweet herb from Paraguay)
5. 1000 STEVIA REBAUDIANA SEEDS - Sweet Leaf High germination
6. Stevia Rebaudiana Seeds * 1g (2000 Seeds) * Stevia * Sweet Leaf * Sugar Herb * Flower * Garden
7. Honey Stevia (Stevia Rebaudiana) Herbal Plant! 10seeds *Natural Sweetener (Singapore)



სურ. 1 სტევიას შექმნილი თესლები

თესლის (სურ. 1) აღმოცენება მოხდა დახურულ გრუნტში (სათბური აღჭურვილი იქნა გრანტის მეშვეობით) (სურ. 3) და მიღებული სტანდარტული ნერგებით (სურ.4) გაშენდა საცდელი ნაკვეთი (სურ.5). ნერგების გამოყვანა მოხდა თესლით (ინტროდიცირებული ჯიშები) და ტრადიციული დაკალმებით გამრავლებით (ნერგების უწყვეტად და მომავალში საწარმოო რაოდენობით მისაღებად) (სურ.2).



სურ.2 ნერგის გამოსაყვანი სპეციალური კონტეინერი



სურ.3 სათბურის შიდა ხედი



სურ.4 სტევიას ჩითილები



სურ.5 სტევიას საცდელი ნაკვეთი, ზრდასრული მცენარეები



სურ.6 სტევიას მოსავალი





სურ.7 სტევიას ფოთლის ფიზიკური მახასიათებლები

აღებული საცდელი ნიმუშებიდან პრაქტიკულმა შედეგმა აჩვენა რომ, საქართველოს აგროკლიმატურ პირობებისათვის შავი ტიპის თესლები ხასიათდებიან მეტი აღმოცენების უნარით (№3 და №4), ვიდრე ღია ფერის თესლები, რომელთა აღმოცენების უნარი უმეტესწილად ნულის ტოლია. სტევიას თესლის აღმოცენება დამოკიდებული იყო რიგ ფაქტორებზე, როგორცაა გარემოს ტემპერატურა (15-25°C), ნიადაგის pH (pH 5,5 - 6,5), ტენიანობა (ნორმირებული) და მზის შუქის ინტენსიობა.

აღმოცენებიდან სრულ ვეგეტაციას მიაღწია ნიმუშმა #3 და #4, რომლებზეც განხორციელდა შემდგომი კვლევები და ასევე შედარებითი ანალიზი, საქართველოში უკვე ინტროდუცირებულ უცნობ ჯიშთან (სახეობასთან).

ერთწლიანი ვეგეტაციის პერიოდში თესლიდან აღმოცენებულმა მცენარეებმ, როგორც №3, ასევე №4-მა მიაღწიენ 20-30 სანტიმეტრს მცირე განტოტვით, რამაც გამოიწვია ნაკლები მოსავლიანობა. თუმცა, ფოთლის ზომა და ფორმა ანალოგიური იყო ზრდასრული მრავალწლოვანი მცენარისა. მცენარეების განვითარების პირველ წელს შედარებითი კვლევები განხორციელდა ზაფხულის ბოლოს და შემოდგომის დასაწყისში.

მცენარე სტევიას ნედლეულის სრულყოფილი კვლევა გაგრძელდა ორწლიან მცენარეზე ვეგეტაციის სხვადასხვა პერიოდში. ორწლიანი მცენარის პირველი ნიმუშები აღებული იქნა სამთვიანი ვეგეტაციის ეტაპზე. საკვლევად აღებული ნიმუშები წარმოადგენდნენ მცენარის ზედა ნაწილს, 18-20 სმ სიმაღლის ღეროს, რომელზეც პარალელურად განლაგებული იყო 8-9 ზრდასრული ფოთლები.

მოსავლის აღება (სურ.6) ხდებოდა ეტაპობრივად. განისაზღვრა მცენარის და ფოთლის ზომები (ცხრილი 1).

ცხრილი № .1 მცენარის ტექნიკური მონაცემები 2014-2018 წლების მოსავალი

№	ნიმუშის დასახელება	მცენარის საშუალო სიმაღლე, სმ	მცენარის საქსიმალური სიმაღლე, სმ	ღეროს ზედა ნაწილში განლაგებული ფოთლები		ღეროს ქვედა ნაწილში განლაგებული ფოთლები		განტოტვილ ღეროზე განლაგებული ფოთლები	
				სიგრძე, მმ	სიგანე, მმ	სიგრძე, მმ	სიგანე, მმ	სიგრძე, მმ	სიგანე, მმ
1	ნიმუში #3	75-100	107±3.2	62,61±1.9	19,16±0.6	59,13±1.8	30,27±0.9	36,82±1.1	17,67±0.5
2	ნიმუში #4	80-100	115±3.5	64,06±1.9	20,41±0.6	60,25±1.8	31,41±0.9	37,11±1.1	18,02±0.5
3	ინტროდუც. სტევია	80-100	120±3.6	63,16±1.9	19,86±0.6	60,09±1.8	30,96±0.9	36,31±1.1	17,27±0.5

მცენარის საშუალო სიმაღლე აღწევს 75-100 სმ-ს. სახეობებს (ჯიშებს) შორის განსაკუთრებული განსხვავება არ დაფიქსირებულა. ფოთლების სიგრძე მცენარის ზედა ნაწილში (62-დან 64 მმ-მდე) ოდნავ მეტია, ვიდრე ქვედაში (59-დან 60 მმ-მდე), ხოლო განტოტვილ ღეროებზე თითქმის 2-ჯერ ნაკლებია (17-დან 18 მმ-მდე).

ცხრილი № 2 სტევიას მცენარის ფოთლისა და ღეროს გამოსავლიანობა.

2014-2018 წლების მოსავალი

№	დასახელება	ფოთლი		ღერო	
		ნედლი %	მშრალი%	ნედლი%	მშრალი%
1	ინტროდუცირებული სტევია ასაკოვანი მცენარე	54.7±1.6	49.4±1.5	45.3±1.4	50.6±1.5
2	ინტროდუცირებული სტევია სტანდარტული მცენარე	74.1±2.2	69.8±2.1	25.9±0.8	30.2±0.9
3	ნიმუში #3	75.2±2.3	78.9±2.4	23.1±0.7	21.1±0.6
4	ნიმუში #4	78.5±2.4	80.4±2.4	21.5±0.6	19.6±0.6

სტევიას მოსავალში მნიშვნელოვანი ფოთლების წილია, რადგანაც სამწუხაროდ ღეროში ჩვენთვის საინტერესო ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები მინიმალური რაოდენობითაა. მცენარის ასაკის ზრდა იწვევს ღეროს წილის მატებას (45,3% ასაკოვანში, ხოლო სტანდარტულში 30.2%). ეს მნიშვნელოვანი ფაქტორია, რადგანაც აუცილებელია მცენარის ფოთლის დამწიფების კონტროლი, რომ დადგენილ იქნეს

სახეობებს შორის განსხვავება. ნიმუში №3 და №4 ნაკლები რაოდენობით შეიცავენ ღეროს (21.1% და 19,6 % შესაბამისად) (ცხრილი 2).

ცხრილი № 3. სტევიას ფოთლის და ღეროს ტენის განსაზღვრა 2015-2018 წლების მოსავალი

№	დასახელება	ტენი %	მშრალი %
1	ინტროდ. სტ-ს ფოთოლი	77.62±2.3	22.38±0.7
2	ინტროდ. სტ-ს ღერო	72.35±2.2	27.65±0.8
3	ნიმუში #3 ფოთოლი	76.10±2.3	23.90±0.7
4	ნიმუში #3 ღერო	79.21±2.4	20.79±0.6
5	ნიმუში #4 ფოთოლი	79.03±2.4	20.97±0.6
6	ნიმუში #4 ღერო	81.33±2.4	18.67±0.6

სტევიას ფოთლის ნედლად ხანგრძლივად შენახვა შეუძლებელია, ამიტომაც აუცილებელია მისი შრობა. შრობა შესაძლებელია სხვადასხვა რეჟიმში, რაც განსხვავებულ ცვლილებებს იწვევს ნედლეულში (ცხრილი №3). ტენის შემცველობა სტევიას ფოთლებში მერყეობს 73-დან 88%-მდე.

ტენი დამოკიდებულია ფოთლის ასაკზე. ამიტომაც არაა რეკომენდირებული ახალგაზრდა ფოთლების აღება. ჯიშებს შორის გარკვეული სხვაობა შეინიშნება, ნიმუში №3 და №4 წყალს მეტი რაოდენობით შეიცავს 79 და 81 % შესაბამისად). საანალიზოდ აიღებოდა მხოლოდ ფოთლები და ნაზი ყლორტები. პირველ ეტაპზე დიტერპენოიდული ნივთიერებების კლევისათვის საჭირო იყო აღნიშნული ნაერების ექსტრაგირება. ჯიშებს შორის საკვლევი ნაერთების შედარების გამარტივების მიზნით საექსტრაქციოდ ავიღეთ ნიმუშების ერთნაირი რაოდენობები, რომელთა მასა შეადგენდა 3,78გ-ს. ექსტრაქცია მიმდინარეობდა 100 მლ-ი 30%-ნი სპირტის წყალხსნარით 84°C-ზე სამი საათის განმავლობაში, რომლის შემდგომაც მოვახდინეთ ცხლად ფილტრაცია. მიღებული ექსტრაქტები კვლავ მივიყვანეთ 100 მლ-დე. პარალელურად მიმდინარეობდა ზემოთ აღნიშნული ნიმუშებში ტენის განსაზღვრა, რომ ნაერთების რაოდენობრივი შემცველობა გადაგვეანგარიშებინა მშრალ მასაზე. მიღებული შედეგები მოყვანილია ცხრილის სახით.

2.2 კვლევის მეთოდები

სტევიას ნედლეულის აღება, შენახვა და მათი შემდგომში შესწავლა ჩატარდა ვეგეტაციის სხვადასხვა პერიოდში, კერძოდ ვეგეტაციის 2 თვიანი, 6 თვიანი და ყვავილობის (მცენარის ზრდასრულების) პერიოდში. შესწავლილია ნედლეულის შრობის სხვადასხვა ტექნოლოგიური რეჟიმი, მათ შორის ბუნებრივი და ხელოვნური შრობა (ბუნებრივი, კონვექციული, კომბინირებული და სხვა). შერჩეულია ფოთლის ხელოვნურ პირობებში შრობის შესაძლებლობები და ოპტიმიზირებული იქნება შრობის ტემპერატურა და ხანგრძლივობა, რაც გამორიცხავს სტევიას ნედლი ფოთლის შრობისას ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების დეგრადაციულ გარდაქმნებს.

კვლევისათვის გამოყენებული იქნა შემდეგი ფიზიკო-ქიმიური მეთოდები:

1. ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების პრეპარატების მიღება სუპერკრიტიკული წნევის ფლუიდური ექსტრაქციით;
2. ინდივიდუალური ნაერთების მიღება პრეპარატული ქრომატოგრაფირებით;
3. ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების იდენტიფიკაცია მაღალეფექტური და ულტრა მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფირების HPLC-UV, RI, UPLC-PDA, MS მეთოდით;
4. ფენოლურ ნაერთთა გამოყოფა და იდენტიფიკაცია HPLC-UV, RI, UPLC-PDA, MS მეთოდით;
5. დიტერპენული გლიკოზიდების და ფენოლური ნაერთების რაოდენობრივი შესწავლა HPLC-UV, RI, UPLC-PDA, MS ქრომატოგრაფიის მეთოდით;
6. კათიონების თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრა HPLC—Conductivity methods.
7. ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა (2.2-დიფენილ-1-პიკრილ ჰიდრაზილის სტაბილური რადიკალის გამოყენებით) DPPH მეთოდით;
8. ფლავონოიდების რაოდენობრივი განსაზღვრასპექტრალური მეთოდით ($AlCl_3$ -ის რეაქტივი, რუთინზე გადაანგარიშებით);
9. საერთო ფენოლების რაოდენობის განსაზღვრა ფოლინ-სიოქალტეუს მეთოდით (Folin-Ciocalteu) (გალის მჟავაზე გადაანგარიშებით);
10. წყლისა და მშრალი ნივთიერების განსაზღვრა რეფრაქტომეტრული მეთოდით;

11. აქროლადი კომპლექსის განსაზღვრა აირ-ქრომატოგრაფიული (GC) მეთოდით (GC Thermo).

1. ნივთიერებების გამოყოფა და შემდგომი იდენტიფიკაცია მოვახდინეთ მაღალ ეფექტური სითხური მასსპექტრალური ქრომატოგრაფიის (UPLC) მეთოდით - (Waters, UPLC Acquity, QDa Detectore). ნაერთთა დასაყოფად გამოყენებული იყო ქრომატოგრაფიული სვეტი Acquity UPLC BEN C18, 1.7m, გამხსნელი სისტემა: 0,3 % ჭიანჭველმჟავა (გამხსნელი A) და აცეტონიტრილი (გამხსნელი B). გრადიენტი-გამხსნელი B: 0 - 20 წთ, 5-16%; 20-28 წთ, 16-40%; 28-32 წთ, 40-47%; 32-36 წთ, 70-99%; 36-45 წთ, 99% და 45-46 წთ, 99-5%. ინჟექტირება 10 μ L. ქრომატოგრაფირებამდე ნიმუშები და ელუენტები იფილტრება 0,45 μ m ფორების ფილტრში (1,2,3).

2. ფლავონოიდების კომპლექსის თვისებრივი და რაოდენობრივი შესწავლა მაღალ ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდით. ხელსაწყო-WatersBreeze 2489, დეტექტორი- ულტრაიისფერი და ხილული ნათების, სვეტი - C18, ელუენტი A – წყალი(H₂O):ჭიანჭველმჟავა(HCOOH) (90:10), ელუენტი B – აცეტონიტრილი (AcCN): მეთანოლი (CH₃OH) : წყალი (H₂O) : ჭიანჭველმჟავა (HCOOH) (22,5:22,5:40:10), სვეტი გაირეცხა - მეთანოლით (CH₃OH), დეტექტირება 370 ნმ.[106].

3. ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა (2,2-დიფენილ-1-პიკრილჰიდრაზილის სტაბილური რადიკალის გამოყენებით) DPPH მეთოდით. საერთო ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრისათვის გამოყენებული იქნა სტაბილური რადიკალის DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil) 0,1 mM DPPH სპირტიანი ხსნარის 50%-იანი ინჰიბირების მეთოდი (1,2,3). მეთანოლიანი ექსტრაქტის მეწამული იისფერი შეფერილობა აღდგენის შედეგად იცვლება ღია ყვითელამდე [77,93]. რეაქცია შემდეგი სქემით მიმდინარეობს:



სადაც AH ანტიოქსიდანტია, ხოლო R* - თავისუფალი რადიკალი [83,93].

ანტიოქსიდანტური აქტივობის - რადიკალური შებოჭვის აქტივობის- დასადგენად საანალიზო ექსტრაქტის 1 მლ-ს ვუმატებდით 3 მლ-ი DPPH- ის სპირტიანი ხსნარს (0,1 mM DPPH - 0,004 გ/100მლეთილის სპირტში) და 30 წუთის შემდეგ

ვახდენდით საკვლევი ნიმუშის ოპტიკური სიმკვრივის სპექტროფოტომეტრულ განსაზღვრას 515 ნმ-ზე. საკონტროლო ხსნარს წარმოადგენს DPPH-ის ხსნარი, ხოლო ფონს 96% ეთილის სპირტი.

თავისუფალი რადიკალის (DPPH) აქტივობის ინჰიბირება გამოითვლება შემდეგი ფორმულით: $In \% = A_c - A_s / A_c * 100$, სადაც A_c - DPPH-ის სპირტიანი ხსნარის აბსორბცია, ხოლო A_s - საანალიზო ექსტრაქტის აბსორბცია (1,2,3). მიღებული შედეგების გადაანგარიშებას ვახდენდით ნიმუშის მასაზე, რომელსაც შეუძლია 0,1 mMDPPH ხსნარის 50%-იანი ინჰიბირება.

4. კატეხინების რაოდენობრივი განსაზღვრა სპექტრალური მეთოდით. საანალიზოდ აღებული ნიმუშის ექსტრაქცია მიმდინარეობდა 80%-იანი ეთილის სპირტით, ნიმუშის სრულ გაუფერულებამდე. ექსტრაქტის საერთო მოცულობიდან აღებულ 1 მლ-ს ემატება 3 მლ ვანილინის რეაქტივი და 3 წუთის შემდეგ ისაზღვრება წითლად შეფერილი ნიმუშის ოპტიკური სიმკვრივე 500 ნმ-ზე. კონტროლად ავიღეთ შესაბამისი ექსტრაგენტის 1 მლ და 3 მლ ვანილინის რეაქტივი [20-25]. განსაზღვრის შედეგად მიღებული მონაცემების გადაანგარიშებას ვახდენდით (+) კატექინის საკალიბრო მრუდზე.

5. ფლავონოიდების რაოდენობრივი განსაზღვრა სპექტრალური მეთოდით ($AlCl_3$ -ის რეაქტივი, რუთინზე გადაანგარიშებით).

6. საერთო ფენოლების რაოდენობის განსაზღვრა Folin-Ciocalteu (ფოლინ-სიოკალტეუს) მეთოდით OIV-MA-AS2-10 (გალის მჟავაზე გადაანგარიშებით);

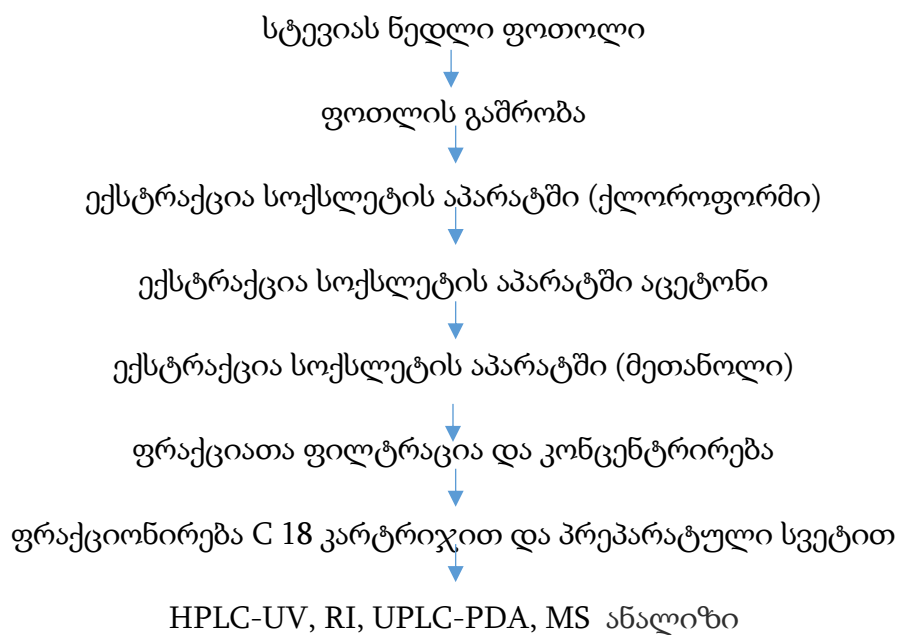
ფენოლური ნაერთი იჟანგება Folin-Ciocalteu რეაქტივით. ეს რეაქტივი წარმოადგენს ფოსფოვოლფრამის მჟავასა და ფოსფომოლიბდენის მჟავას ნარევს, რომელიც ფენოლების დაჟანგვის შემდეგ აღდგება ვოლფრამატისა - W_6O_{21} და მოლიბდატის - Mo_8O_{26} ლურჯი ფერის ოქსიდებამდე. მიღებული ლურჯი შეფერილობა შთანთქმის მაქსიმუმს იძლევა 750 ნმ-ის ფარგლებში და პირდაპირ პროპორციულია ფენოლების საერთო რაოდენობის. გაზომვებს ვაწარმოებთ სპექტროფოტომეტრზე ხილულ დიაპაზონში (750 ნმ).

თავი 3. სტევიას ფოთლის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების HPLC-UV, IR, UPLC PDA-MS მეთოდებით კვლევა

სტევიას ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების და ფენოლური ნაერთების გამოყოფისა და იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებული იქნა შემდეგი (სქემა 4).

აღებული იქნა 100 გრამი სტევიას ნედლი ფოთოლი, გავაშრეთ თერმოსტატში 50 ° C დავაქუცმაცეთ 10 გრამი მშრალი ფოთოლი და მოვათავსეთ სოქსლეტის აპარატში, გავუკეთეთ ექსტრაქცია ქლოროფორმით 24 საათის განმავლობაში. ექსტრაგირებული ფოთოლი გავაშრეთ და მოვათავსეთ ისევ სოქსლეტის აპარატში მრავალჯერადი ექსტრაქციისათვის აცეტონში. აცეტონით ექსტრაქცია მიმდინარეობდა 5 საათის განმავლობაში. შემდეგ ეტაპზე ავიღეთ გამშრალი ექსტრაგირებული ფოთლების უკვე 1გრამი და მოვახდინეთ მისი ექსტრაქცია მეთანოლით. ფრაქციები დავაკონცენტრირეთ ვაკუუმამორთქლებელში, მოვახდინეთ მათი გაფილტვრა-ფრაქციონირება C 18 კარტრიჯით და მოვამზადეთ ანალიზისათვის.

სქემა № 4. სტევიას ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების და ფენოლური ნაერთების გამოყოფა და იდენტიფიკაცია

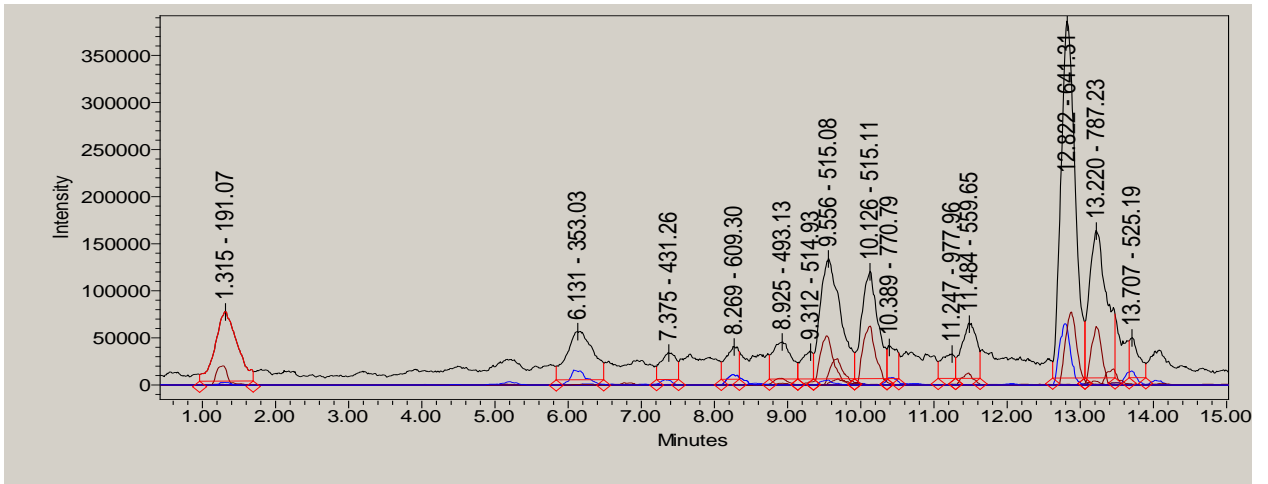


ნაერთების დაყოფას ვაწარმოებდით მაღალ ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფირების მეთოდით, ულტრაიისფერი, რეფრაქტომეტრული ინდექსის დეტექტირების მეშვეობით, ხოლო იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებული იქნა ულტრა ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფირება (UPLC) მას (MS) და პდა (PDA) დეტექტორი. ნივთიერებათა იდენტიფიკაციას ვახდენდით სტანდარტული ნაერთების გამოყენებით და ნივთიერებათა მასის <https://metlin.scripps.edu> თავისუფალი ბაზის საშუალებით, ასევე რეცენზირებული ლიტერატურული გამოცემების მონაცემების შედარებით.

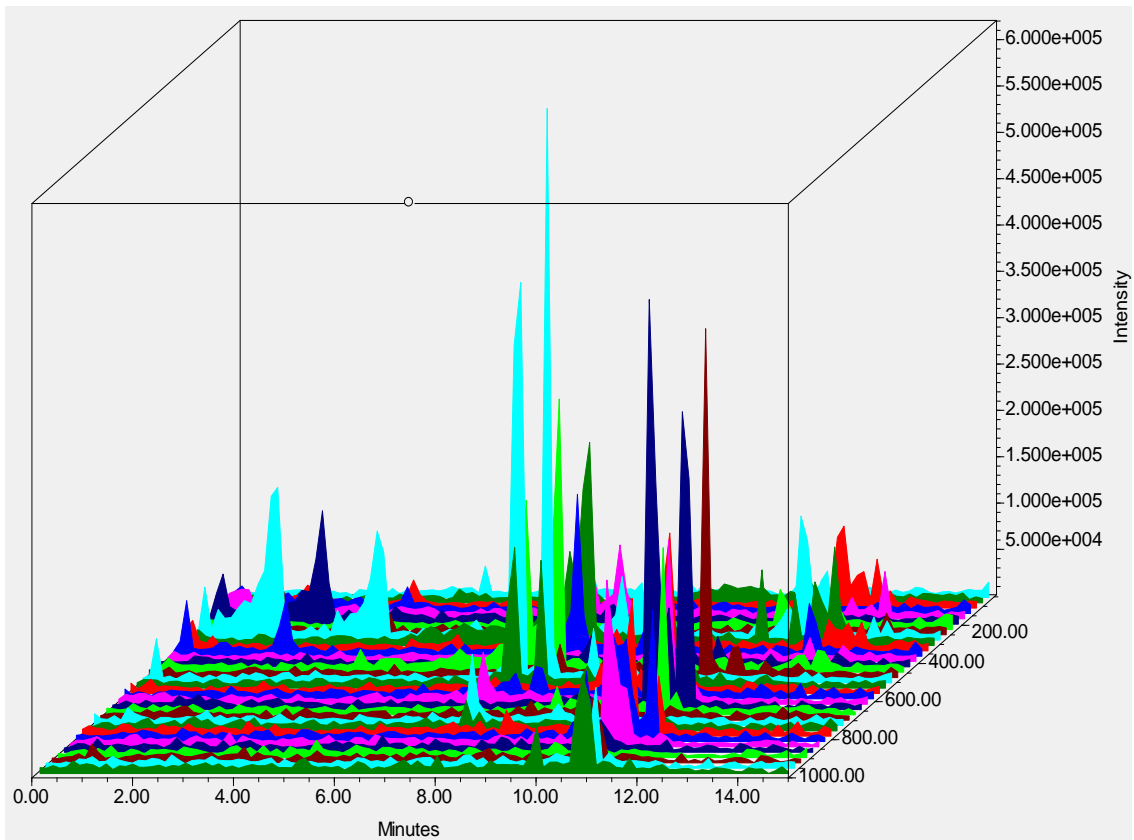
ნაერთების კვლევა, იდენტიფიკაცია და რაოდენობრივი ანალიზი ჩატარდა UPLC-PDA-MS მეთოდის გამოყენებით. მეთოდი საშუალებას იძლევა ერთდროულად ჩატარდეს რამდენიმე ნაერთის კვლევა, მათი იდენტიფიკაციის სარწმუნოება გაცილებით მაღალია. დგინდება როგორც ნაერთის ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები ასევე სპექტრალური და მას-სპექტრალური მახასიათებლები.

SPE მეთოდით სხვადასხვა გამხსნელით მიღებული ექსტრაქტების კონცენტრირების შემდეგ ხდებოდა ქრომატოგრაფირება პრეპარატული ამინური სვეტით (NH₂, 5 µm, 250 x 10mm). ასევე ქრომატოგრაფირებისათვის გამოყენებული იქნა პრეპარატული სვეტი (C18, 5 µm, 250 x 10mm). მიღებული იქნა ფრაქციები (31 ფრაქცია). SPE კარტრიჯი მზადდებოდა (კონდენცირდება) წყლით (1მლ) და 3 მლ ACN/წყალი (90:10). 1მლ სტევიას ექსტრაქტის ტარდებოდა კარტრიჯში. სტევიას გლიკოზიდები ელუირდება მიმდინარეობდა 2 მლ ACN/წყალი (90:10). მიღებული ნიმუშის 3µლ ინჟექტირდებოდა LC-MS-PDA სისტემაში. ფლავონოიდური გლიკოზიდების ელუირება ხდებოდა ეთილაცეტატით, შემდეგ კონცენტრირდებოდა მშრალ ნაშთამდე და კვლავ ელუირება გამხსნელში. ჰიდროლიზისათვის პრეპარატის 5 მგ იხსნებოდა 2 მლ 2 M HCl და ცხელდებოდა 90 ° C 40 წთ-ის განმავლობაში. ყველა შემთხვევაში მიღებული საანალიზო ექსტრაქტი იფილტრებოდა 0.45 µm ფილტრში.

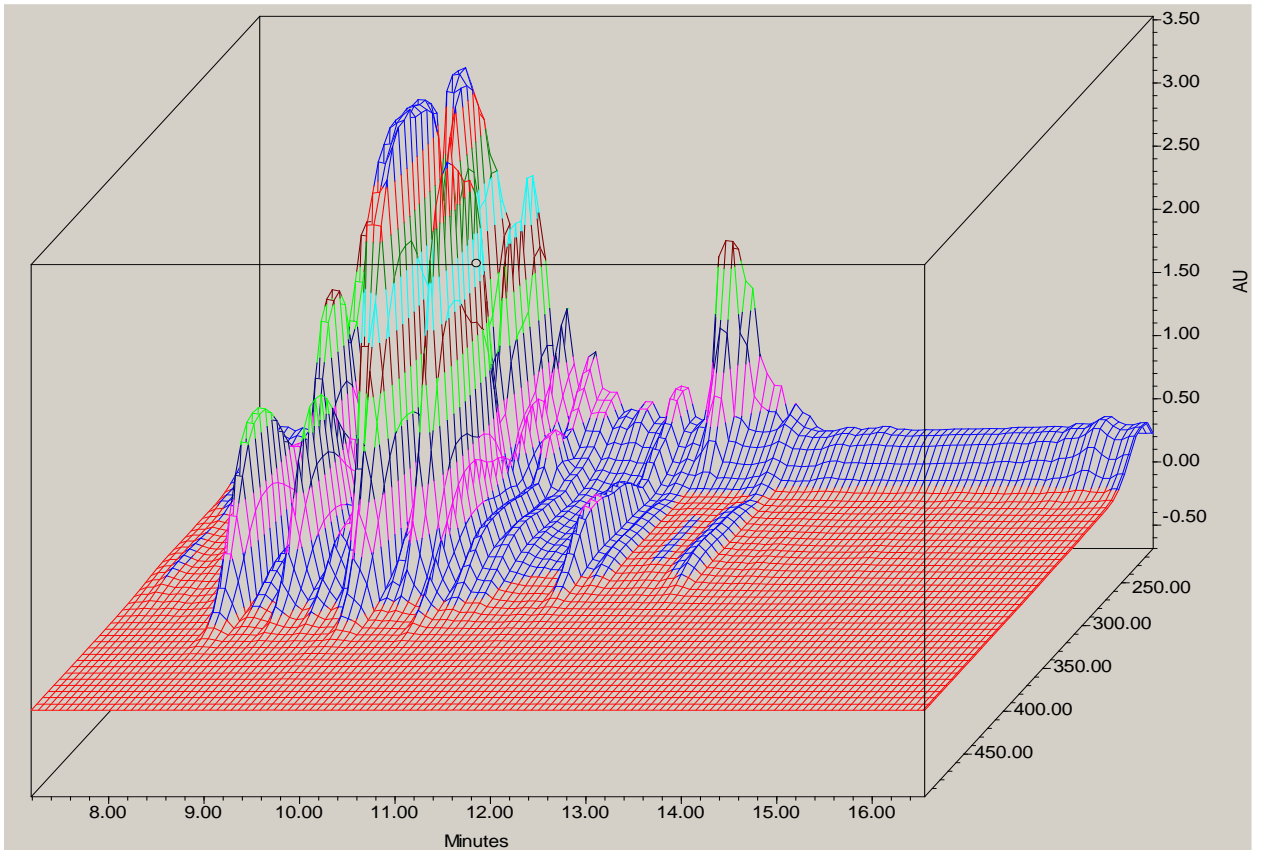
ნაერთების იდენტიფიკაციისათვის მნიშვნელოვანია მათი ფრაგმენტაცია და ასევე მათი მასების ცვლილება (იონთა მიმატების ხარჯზე) და შთანთქმის მაქსიმუმების მნიშვნელობა UV არეში.



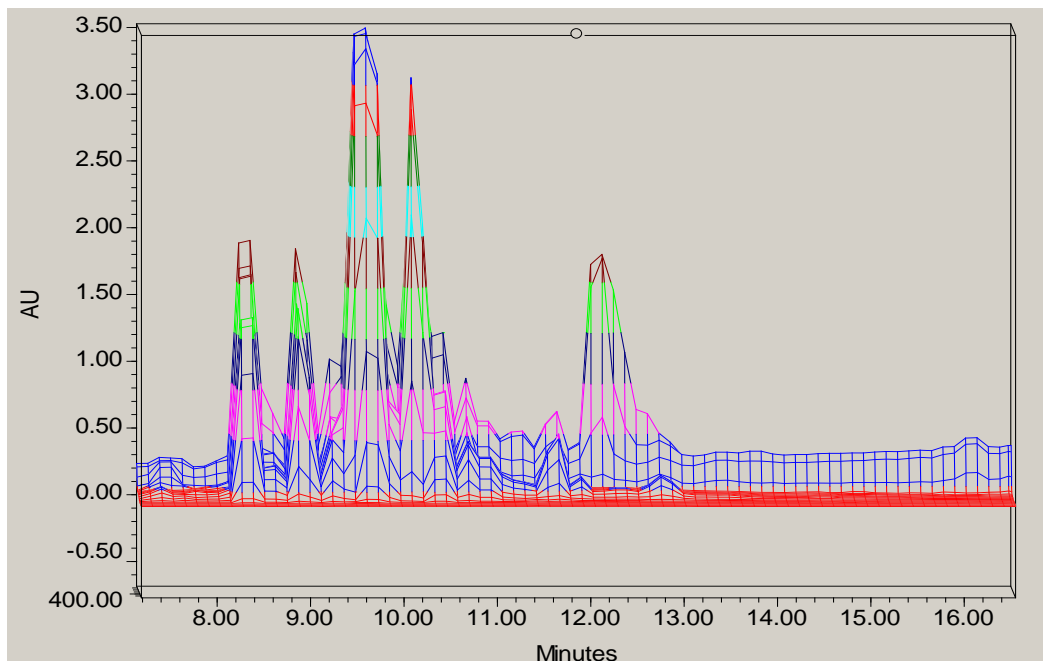
სურ. 8. სტევიას ბიოაქტიური ნაერთების LC-MS-ქრომატოგრამა, scan. 100-1200 Dal



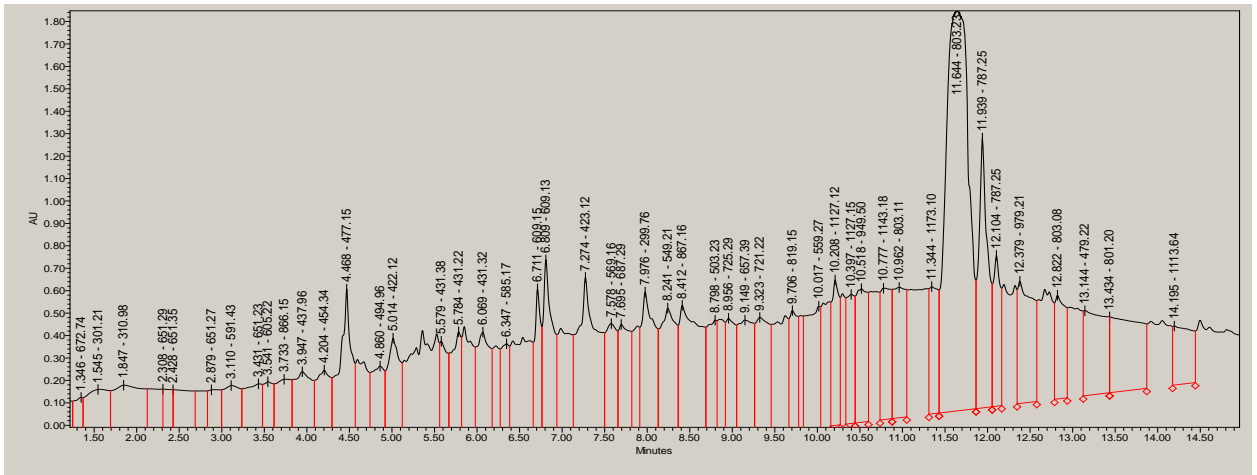
სურ. 9. სტევიას ბიოაქტიური ნაერთების LC-MS ქრომატოგრამა 3 D ფორმატში, scan. 100-1200 Dal



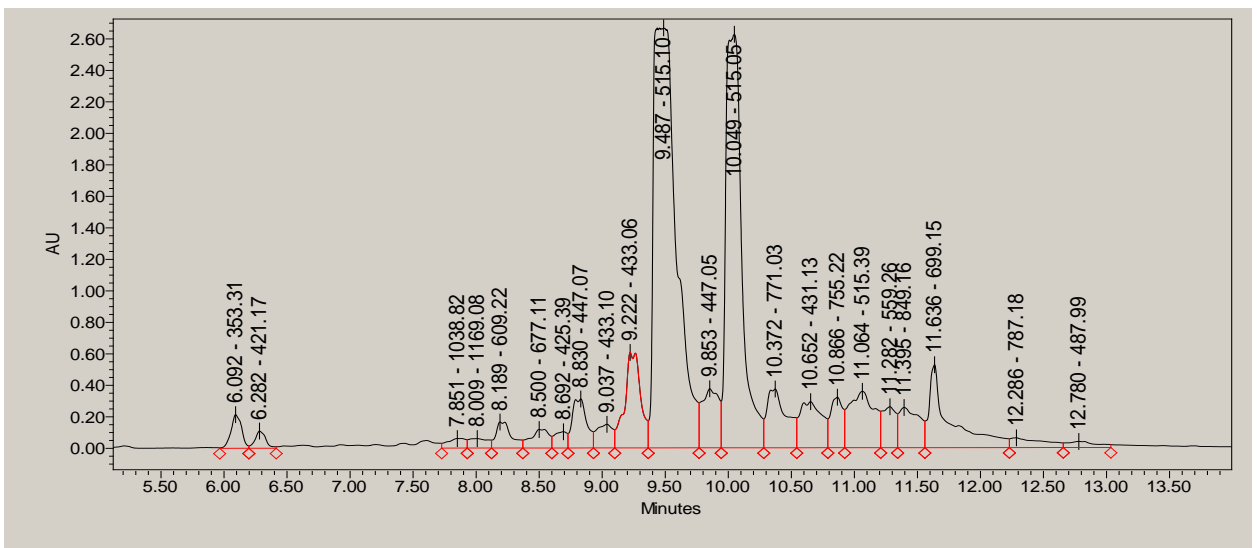
სურ. 10. სტევას ბიოაქტიური ნაერთების LC-PDA ქრომატოგრამა 3 D ფორმატში, scan. 200-499 nm.



სურ. 11. სტევას ბიოაქტიური ნაერთების LC-PDA ქრომატოგრამა, scan. 200-499 nm.



სურ. 12. სტევიას ბიოაქტიური ნაერთების LC-PDA ქრომატოგრამა, scan. 214 nm.



სურ. 13. სტევიას ბიოაქტიური ნაერთების LC-PDA ქრომატოგრამა, scan. 320 nm.

სტევიას ექსტრაქტების ბიოაქტიური ნაერთების LC-MS-ქრომატოგრაფირების (scan. 100-1200 Dal) შედეგები ჩანს სურ. 8-9. სკანირებული შედეგებიდან ირკვევა სხვადასხვა მასის რამდენიმე დომინანტი ნაერთის არსებობა. სტევიას ბიოაქტიური ნაერთების LC-PDA ქრომატოგრამა, scan. 200-499 nm-ზე ადასტურებს, რომ ამ ნაერთებს განსხვავებული შთანთქმის მაქსიმუმები აქვთ. ქრომატოგრამის შესწავლა 214 ნმ-ზე (სურ.12.) ადასტურებს ბიოლოგიურად აქტიური ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების (მათი შთანთქმის მაქსიმუმი 210 ნმ-ის ფარგლებშია) არსებობას, ხოლო ქრომატოგრამის შესწავლა 320 ნმ-ზე (სურ.13.) ადასტურებს ბიოლოგიურად აქტიური ფენოლური ნაერთების (ფენოლური მჟავები და მათი წარმოებულები, რომელთა შთანთქმის მაქსიმუმი 320 ნმ-ს ფარგლებშია) არსებობას.

3.1 სტევიას ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების გამოყოფა და იდენტიფიკაცია

დიტერპენული გლიკოზიდების გამოყოფისა და იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებული იქნა მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფირება (HPLC)- Waters (UV/Visible Detector 2489, Binary HPLC Pump 1525) ქრომატოგრაფიული სვეტი Symmetry C18, 3,5 μm 4,6 x 75 მმ, დეტექტირება 210 ნმ-ზე, გამხსნელთა სისტემები: მეთანოლი (ა), წყალი (ბ) (4:1), (Merck; Sigma-Aldrich) ხაზობრივ გრადიენტში. ქრომატოგრაფიული სვეტი amide (250 მმ 4,5 მმ), სვეტის ტემპერატურა 40°C ელუენტი 80 %-იანი აცეტონიტრილი, დეტექტირება IR.

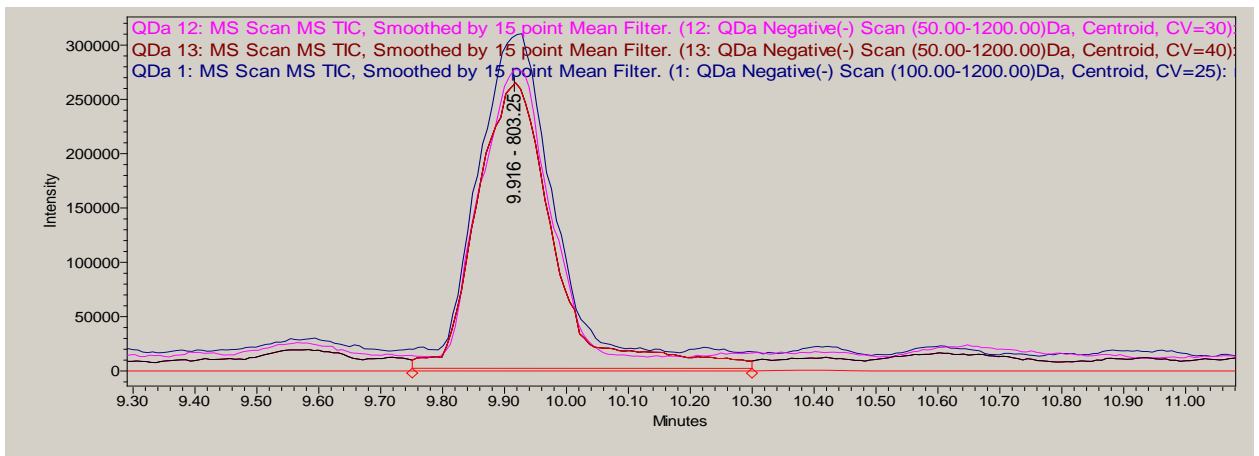
Waters Acuity UPLC-PDA, MS, ქრომატოგრაფიული სვეტი BEN HSS (100x2.1 mm 1.7 μm). მობილური ფაზა 0.1 % ჭიანჭველმჟავა DW-ში (A), 0.1 % ჭიანჭველმჟავა აცეტონიტრილი (B), გრადიენტული სოლვენტი B გრადიენტული ელუენტი 5% B 1.5 წუთი 15% B 4 წუთი, 25% B 25 -დან 16 წუთი 65% B და 100% დან 18,5-19.0 %, 0% B 19.0 to 20 წუთი . სიჩქარე 0.3 ml min⁻¹, სვეტის ტემპერატურა 40 °C, MS- scan 40-1200 da, Probe 600 °C, Positive 0,8 kV, Capillary 1,5 kV, CV -40, PDA scan 210-500 nm.

სტანდარტული დიტერპენული გლიკოზიდების საკალიბრო მრუდი აგებული იქნა სტევიოზიდისა და რებაუდიოზიდის (Sigma-Aldrich) 1.0, 2.0 და 3.0 მგ/მლ კონცენტრაციით გამხსნელი 80% ACN/წყალი. ინჟექტირებული ნიმუში 3 მკლ. საკალიბრო მრუდის ასაგებად გამოყენებული იქნა UPLC-MS სისტემის (ESI) ცალკეული ნაერთისათვის წარმოქმნილი პიკის ფართობები.

სტევიას გლიკოზიდების მყარ ფაზიანი ექსტრაქციისათვის (SPE): 1.0 გ დაქუცმაცებულ ფოთლებს, წინასწარ დამუშავებულს სქემის შესაბამისად სოქსლეტის აპარატში ქლოროფორმით, გაუკეთდა ექსტრაქცია ულტრახმოვან აბაზანაში გაცხელებით 15 წთ, ექსტრაგენტი 50მლ ACN / წყალი (70:30 მოცულობით). მიღებული ექსტრაქტი იფილტრებოდა 0,45 μm ფილტრში. SPE კარტრიჯები შეესებოდა იყო C18 სორბენტით.

სტევიას დიტერპენული გლიკოზიდების LC-MS-PDA კვლევას მნიშვნელოვანია QDa Negative(-) პარამეტრში Capillary-ის მუხტი, რომელიც იცვლება CV=2-75. რაც

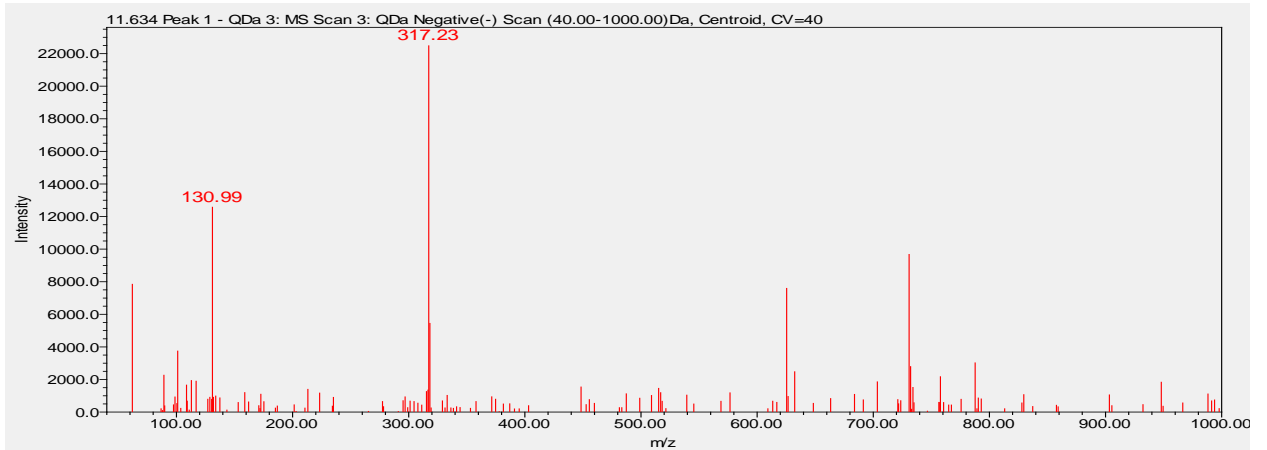
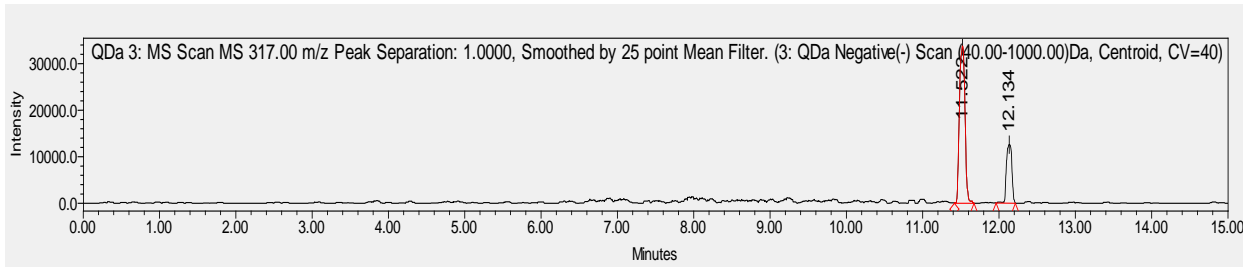
საშუალებას იძლევა მოვახდინოთ ნაერთის ფრაგმენტაცია, ან შევინარჩუნოთ უცვლელად. დიტერპენული გლიკოზიდები საკმაოდ მგრძობიარეები არიან ამ მახასიათებლს მიმართ. სტანდარტული რეზაუდიოზიდი A-ს (Sigma-Aldrich) მაგალითზე დავადგინეთ ჩვენი ხელსაწყოსათვის მგრძობიარე მონაკვეთი (სამწუხაროდ ლიტერატურაში მოცემული ხელსაწყოსათვის მეთოდი არ არის აღწერილი), რამაც საშუალება მოგვცა დაგვედგინა, რომ ოპტიმალური CV=25 პირობაა (სურ.14). ეს მახასიათებელი შემდგომში გამოყენებული იქნა რაოდენობრივი ანალიზისათვის.



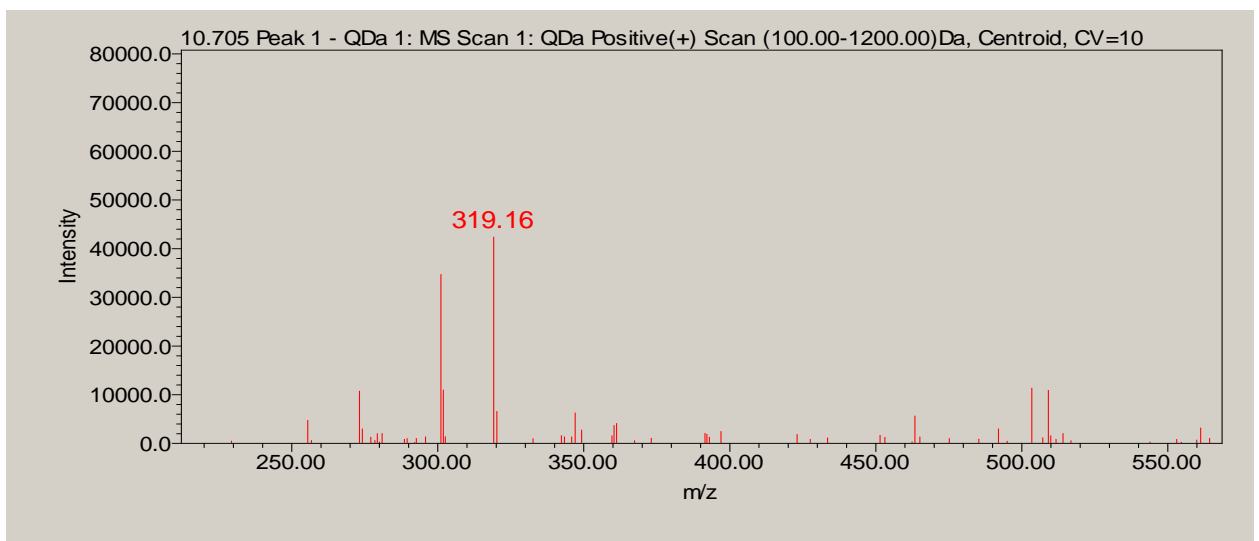
სურ. 14. სტანდარტული რეზაუდიოზიდი A LC-MS ქრომატოგრამა, QDa Negative(-)
SIR Ch9 965.43 Da, CV=25; CV=30; CV=40

სტევიას ბიოაქტიური ნაერთების დიტერპენული გლიკოზიდების LC-MS-PDA კვლევამ საშუალება მოგვცა მოგვეხდინა შემდეგი ნაერთების იდენტიფიკაცია:

ნივთიერება 1 - $[M-H +] - m/z 319$, $[M-H -] - m/z 317$, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე რამდენიმე ადგილზე (სულ მცირე 9 ნაერთთან მიმართებაში, ყველა ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდის შესაბამისად). METLIN (<https://metlin.scripps.edu>) ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად (დანართი) ნივთიერება 1 შეესაბამება აგლიკონ სტევიოლს და მის იზომერს -იზოსტევიოლს ($C_{20}H_{30}O_3$).

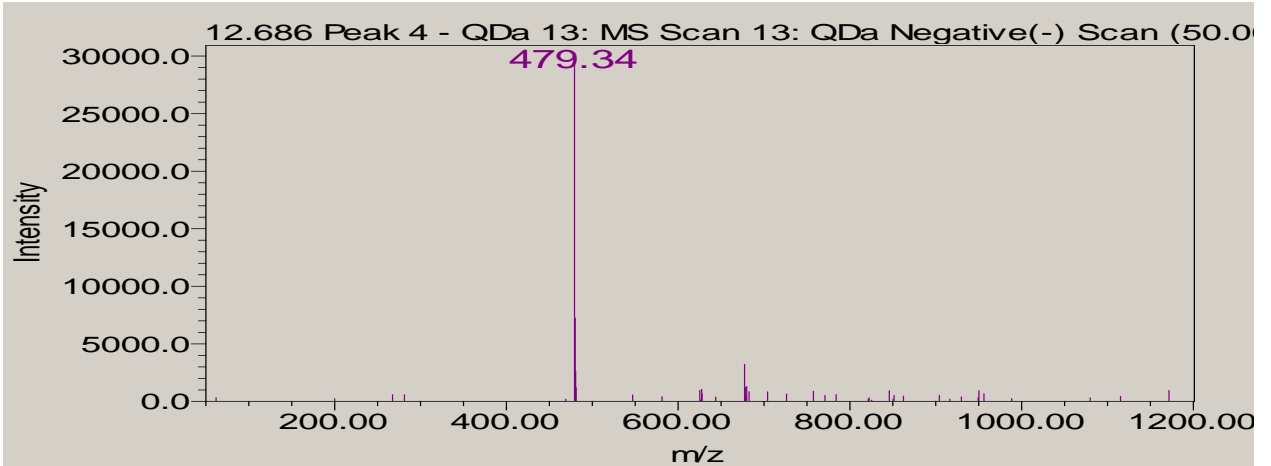
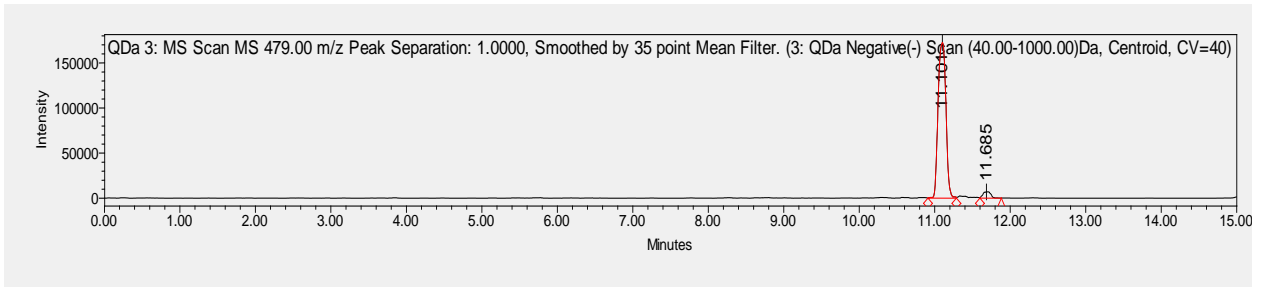


სურ. 15. სტევიოლის UPLC-MS სპექტრი $[M-H]^-$ - m/z 317



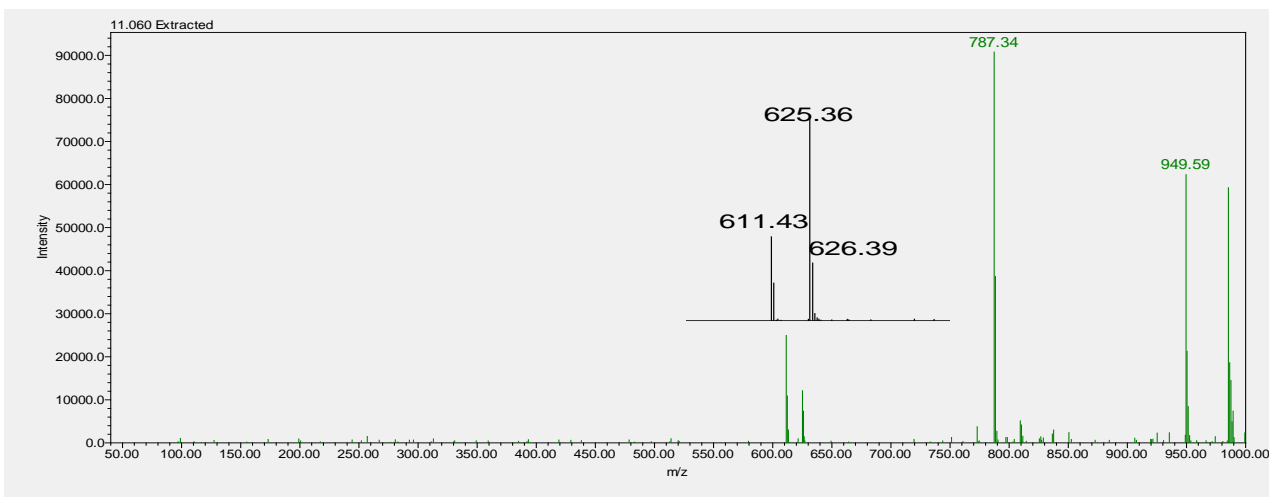
სურ. 16. სტევიოლის UPLC-MS სპექტრი $[M-H]^+$ - m/z 319.16

ნივთიერება 2- $[M-H]^-$ - m/z 479, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე $[M-H]^-$ - m/z 479 ერთად. შეკავების დრო 12.686 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 211.9 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 2 შეესაბამება სტევიოლის გლუკოზიდს ($C_{26}H_{40}O_8$).



სურ. 17 სტევიოლ გლუკოზიდის UPLC-MS სპექტრი

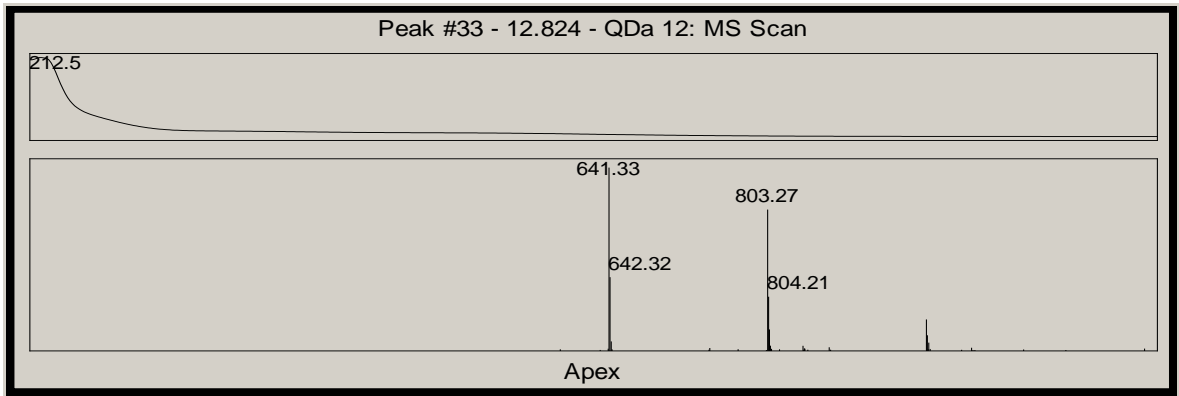
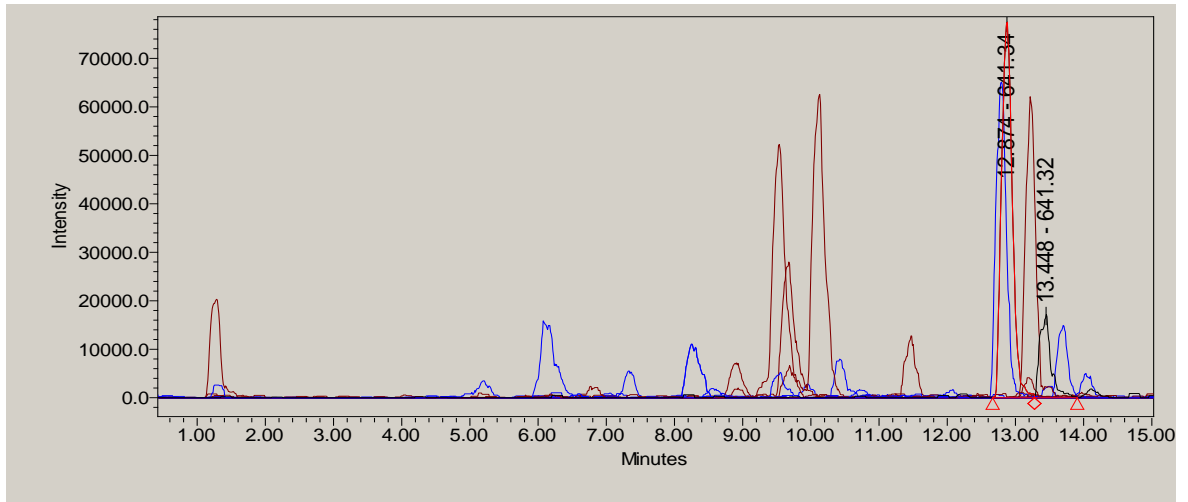
ნივთიერება 3-[M-H -] - m/z 625, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z 787, 949 ერთად. შეკავების დრო 12.686 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.4 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად (დანართი 1) ნივთიერება 3 შეესაბამება სტევიოლის დიგლუკოზიდს[M-16] ($C_{32}H_{52}O_{14}$).



სურ. 18. სტევიოლ დიგლუკოზიდის UPLC-MS სპექტრი

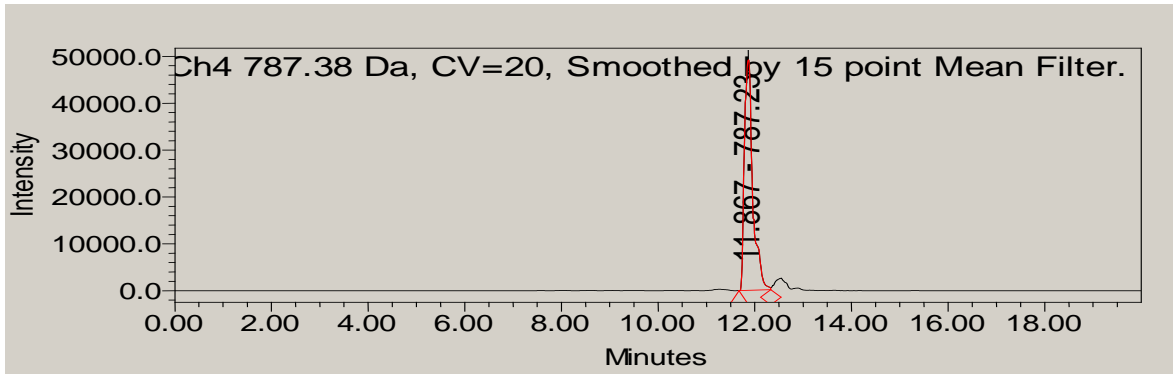
ნივთიერება 4-[M-H -] - m/z 641, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z 803, 965 ერთად. შეკავების დრო 11.591 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.7 nm. METLIN

ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად (დანართი 1) ნივთიერება 4 შეესაბამება სტევიოლბიოზიდს ($C_{32}H_{50}O_{10}$).



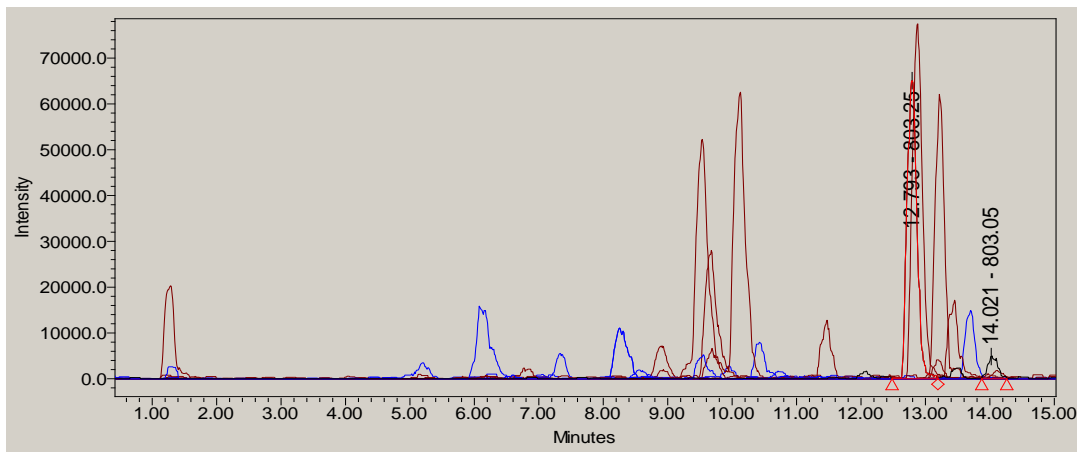
სურ. 19 სტევიოლ ბიოზიდის UPLC-MS-UV სპექტრი

ნივთიერება 5- $[M-H^-]$ - m/z 787, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე $[M-H^-]$ - m/z 803, 965 ერთად. შეკავების დრო 11.867 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.3 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად (დანართი) ნივთიერება 5 შეესაბამება სტევიოლის ტრიგლუკოზიდს $[M-16]$ ($C_{38}H_{62}O_{19}$).

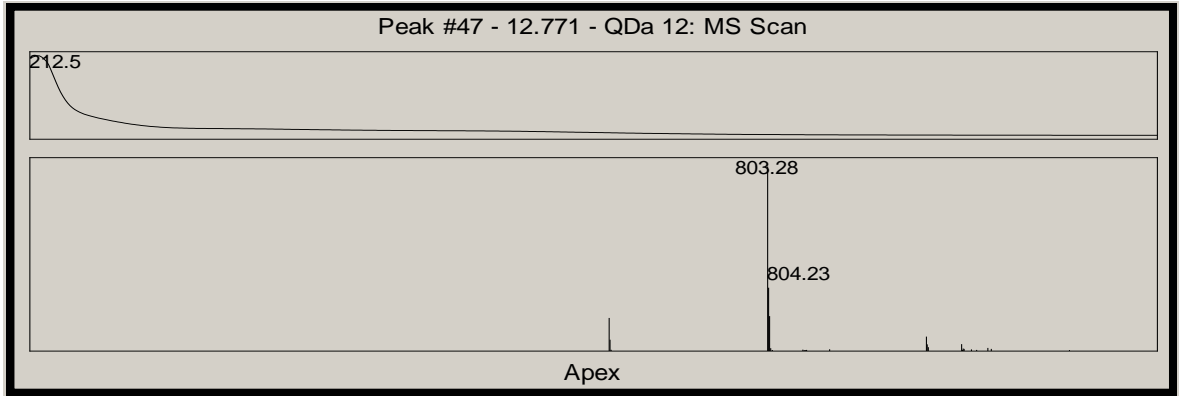


სურ. 20. სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდის [M-16] UPLC-MS, ESI 787.3 Da, სპექტრი

ნივთიერება 6-[M-H -] - m/z 803, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე [M-H -] - m/z, 935, 949, 965 ერთად ან ცალკე. ფრაგმენტაციის MS2-ს შედეგია m/z 787([M-H + -2glc] -), ხოლო გლუკოზის მოლეკულების შემდგომი ჩამოხლეჩით MS3 შედეგია m/z 317 პიკები (სტევიოლი). შეკავების დრო 10.796 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.2 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად (დანართი) ნივთიერება 6-ს შეესაბამება სტევიოლის ტრიგლუკოზიდს ანუ სტევიოზიდს (Stevioside $C_{38}H_{60}O_{18}$) ([M-H +] - m/z 805.4). სტევიოზიდის ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოიქმნება (negative) ([M-H -] - m/z 641), ხოლო (positive) ([M-H +] - m/z 643). ასევე m/z 803, რომელიც ჩვეულებრივ ჩანს ქლორის იონის დამატებით ნეგატიური (negative) და კალიუმის იონის დამატებით პოზიტიური (positive), შესაბამისად წარმოიქმნება ([M-H⁺ +K⁺] - m/z 841) და ([M-H -Cl⁻] - m/z 839).[M-H⁺ -3glc]. სტევიოზიდისაგან ფრაგმენტაციის MS2-ს შედეგი m/z 639 პიკია [M-H - -glc+ K⁺], - გლუკოზა ([M-H₂O]- m/z 162). ეს მოსაზრება დოკუმენტალურადაც დასტურდება.

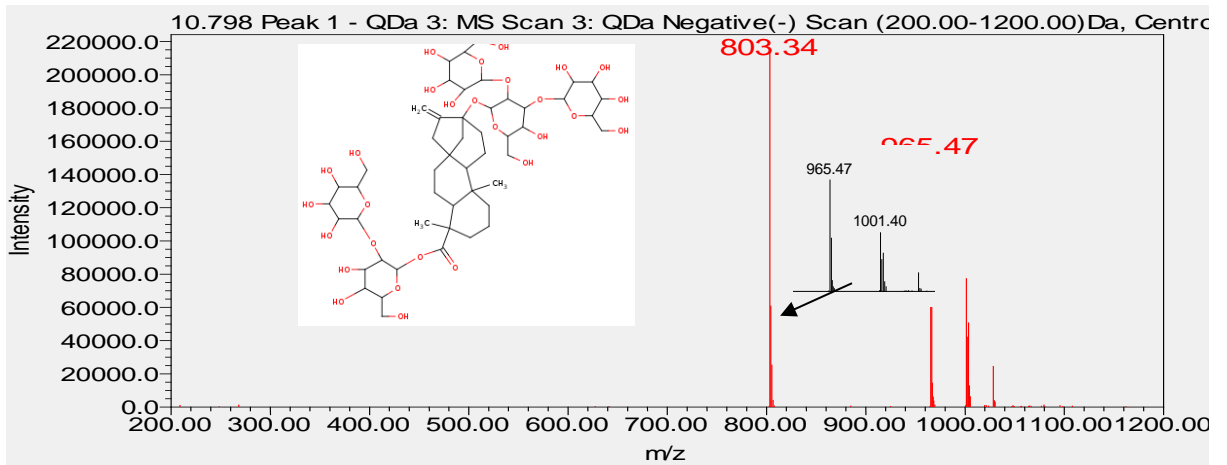
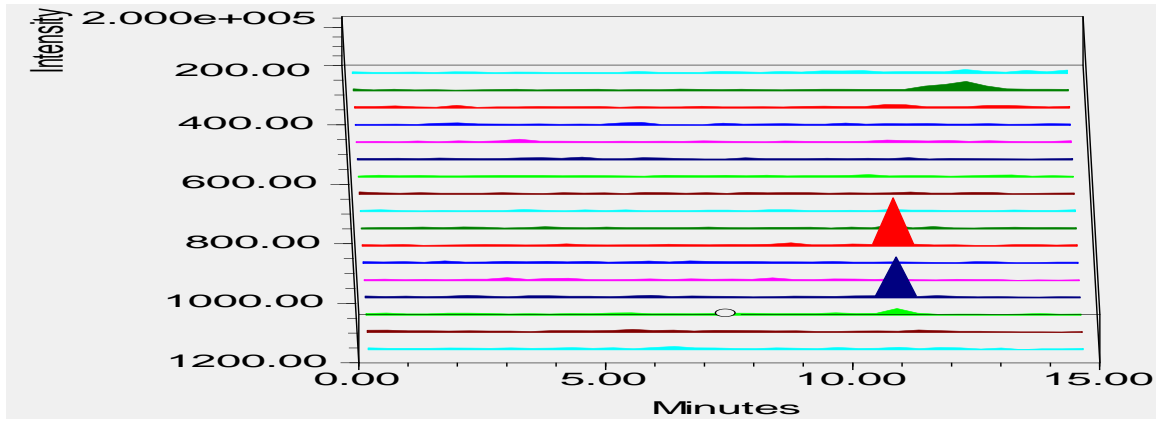


სურ. 21. სტევიოზიდის UPLC-MS, ESI 803.3 Da სპექტრი



სურ. 22. სტევიოზიდის UPLC-MS-UV სპექტრი

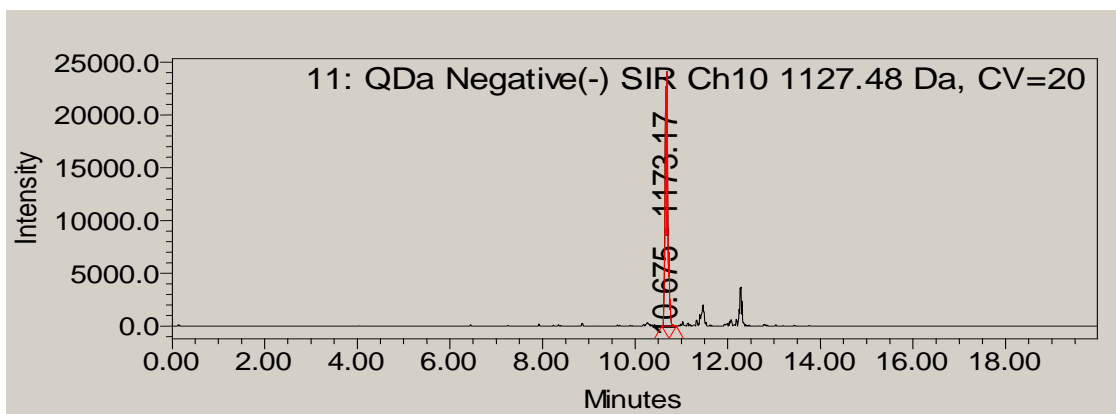
ნივთიერება 7-[M-H⁻] - m/z 965, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H⁻] - m/z 803, 1001-თან ერთად. შეკავების დრო 10.798 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.2nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 7 შეესაბამება სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდს ანუ რებაუდიოზიდი A ($C_{44}H_{70}O_{23}$). რებაუდიოზიდი A-ს (Rebaudioside A ([M-H⁺] - m/z 965), ფრაგმენტაცია MS2-ს შედეგად m/z 803 პიკია [M-H⁻ - glc], - გლუკოზა ([M-H₂O]⁻ m/z 162) რებაუდიოზიდი A-საგან. შემდგომი ფრაგმენტაციით m/z 641([M-H⁺ - 2glc] -). ხოლო რებაუდიოზიდი A გლუკოზის მოლეკულების შემდგომი ჩამოხლეჩით MS3 და MS4 შედეგად m/z 479 და m/z 317 პიკები (სტევიოლი), [M-H⁺ - 3glc]⁻ და [M-H⁺ - 4glc]⁻ იონი შესაბამისად. ქლორის იონის დამატებით ნეგატიური (negative) და კალიუმის იონის დამატებით პოზიტიური (positive), შესაბამისად წარმოიქმნება ([M-H⁺ +K⁺] - m/z 1005) და ([M-H⁺ -Cl⁻] - m/z 1001). სტანდარტული რებაუდიოზიდი A-ს (Sigma-Aldrich) ქრომატოგრაფიული შესწავლის დროსაც, მას-სპექტრომეტრზე ფიქსირდება რამდენიმე პიკი, -[M-H⁺]⁻ m/z 803, -[M-H⁺]⁻ m/z 965, -[M-H⁻]⁻ m/z 1001, ასევე მაღალი (20 ვოლტზე მეტი) მუხტის შემთხვევაში -[M-H⁻]⁻ m/z 317 ან [M-H⁺]⁺ m/z 319.



სურ. 23. რეზუდუოზიდი A UPLC-MS სპექტრი

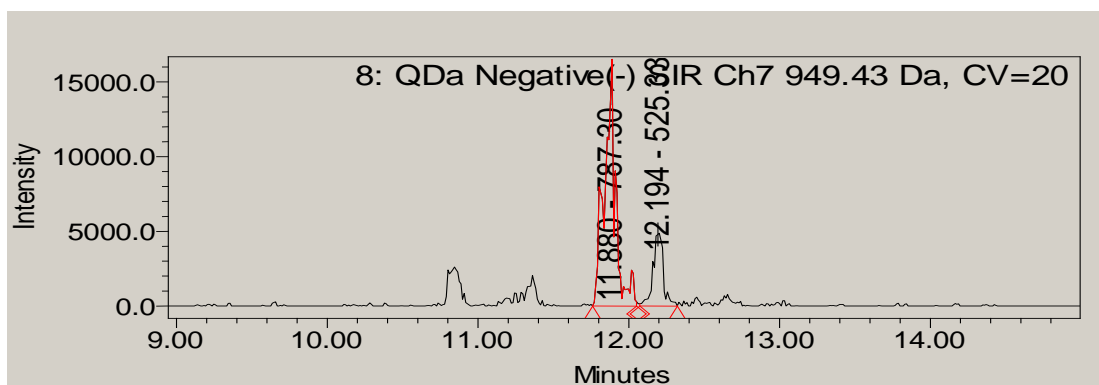
ნივთიერება 8-[M-H⁻] - m/z 1127, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H⁻] - m/z 803, 965 ერთად. შეკავების დრო 10.675 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.3 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 8 შეესაბამება სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდს ანუ რეზუდუოზიდი D (C₅₀H₈₀O₂₈).

რეზუდუოზიდი D-დან ერთი მოლეკულა გლუკოზის [M-H⁺-glc] მოწყვეტის შედეგად ([M-H₂O] - m / z 162) რჩება m / z 787 ხოლო 2 მოლეკულა გლუკოზის მოწყვეტით [M-H⁺-2glc] - c m / z 625. რეზუდუოზიდი D კარგავს გლუკოზის 2 და რამნოზის ერთ მოლეკულას ([MH₂O] - m / z 146), [M-H⁺-2glc - rham] და ნეგატიურ რეჟიმში ვლდებულობთ m / z 479. ნაერთზე ქლორის იონის მიერთებით ვლდებულობთ ([M-H⁺-Cl⁻] - m/z 1173).



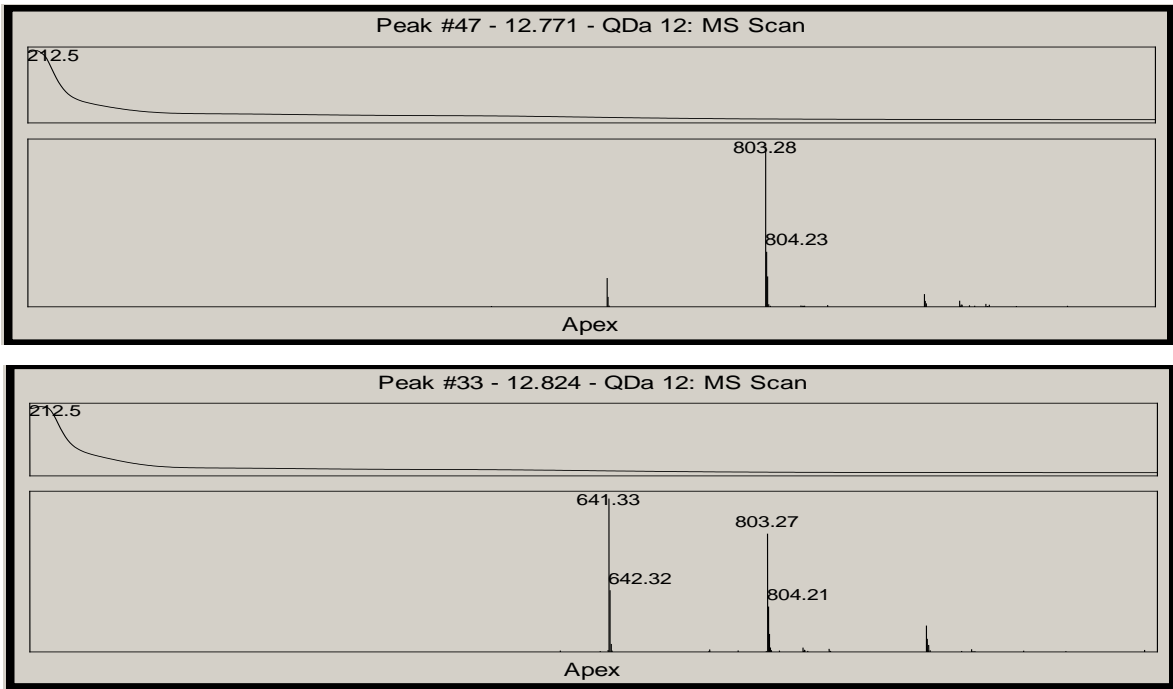
სურ. 24. რეზაუდიოზიდი D-ს UPLC-MS სპექტრი

ნივთიერება 9-[M-H -] - m/z 949, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე ფრაგმენტის -[M-H -] - m/z 787 სახით. შეკავების დრო 11.880 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.4 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 9 შეესაბამება სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდს ანუ რეზაუდიოზიდი C ($C_{44}H_{70}O_{23}$).



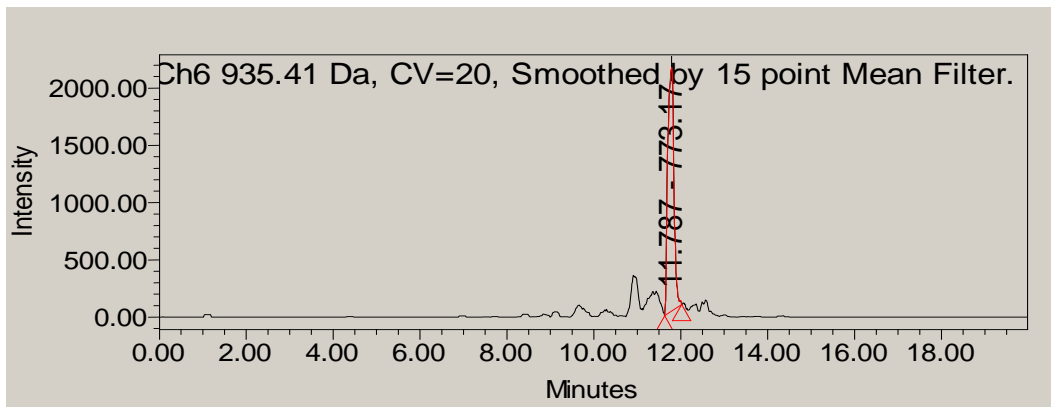
სურ. 25. რეზაუდიოზიდი C-ს UPLC-MS სპექტრი

ნივთიერება 10-[M-H -] - m/z 641,33, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z 803, 1001 ერთად. შეკავების დრო 12.771 და 12.824 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.5nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 10 შეესაბამება სტევიოლის დი-გლუკოზიდს ანუ რუბუსოზიდს ($C_{32}H_{50}O_{13}$).



სურ. 26. რუბუსოზიდის UPLC-MS სპექტრი

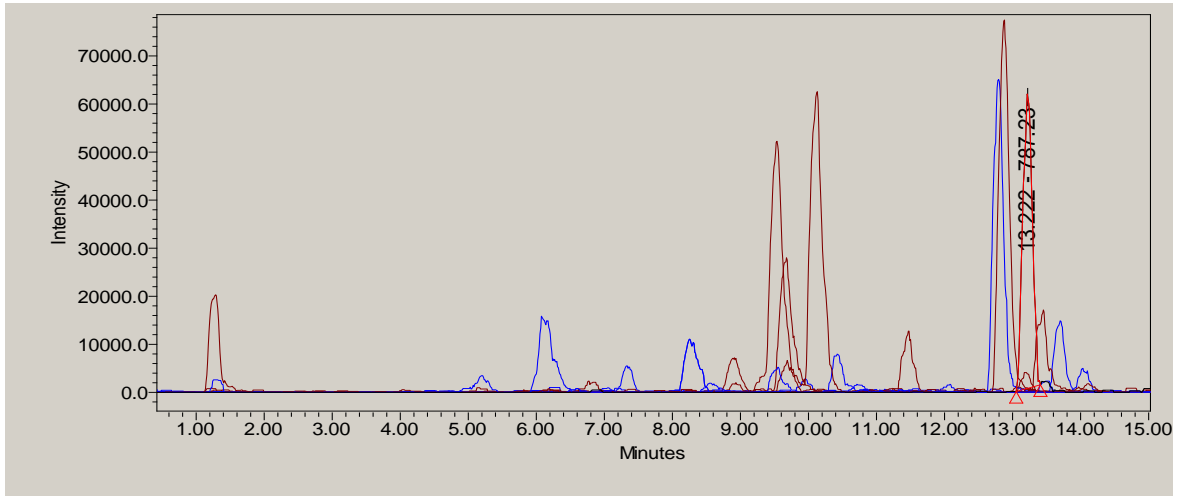
ნივთიერება 11-[M-H⁻] - m/z 935, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე ფრაგმენტის -[M-H⁻] - m/z 773.17-ს სახით, რადგანაც კარგავს 1 მოლეკულა გლუკოზას. შეკავების დრო 11.787 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.5 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 11 შეესაბამება სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდს ანუ რებაუდიოზიდი F(C₄₃H₆₉O₂₃).



სურ. 27. რებაუდიოზიდი F-ს UPLC-MS სპექტრი

ნივთიერება 12-[M-H⁻] - m/z 787, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H⁻] - m/z 803, 965 ერთად, რადგანაც მათი ფრაგმენტაციის პროდუქტია. შეკავების დრო 13,222 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.1 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად

ნივთიერება 12 შეესაბამება სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდს ანუ დულკოზიდი A ($C_{38}H_{60}O_{17}$).



სურ. 28. დულკოზიდი A-ს UPLC-MS სპექტრი

ზოგიერთი ნაერთის ფრაგმენტაცია მთავრდება პიკებით m/z 479 და m/z 317 (სტევიოლი), რაც შედეგია საწყის ნივთიერებაზე შესაბამისად 3 და 4 გლუკოზის მოწყვეტის $[M-H+3glc]$ - და $[M-H+4glc]$.

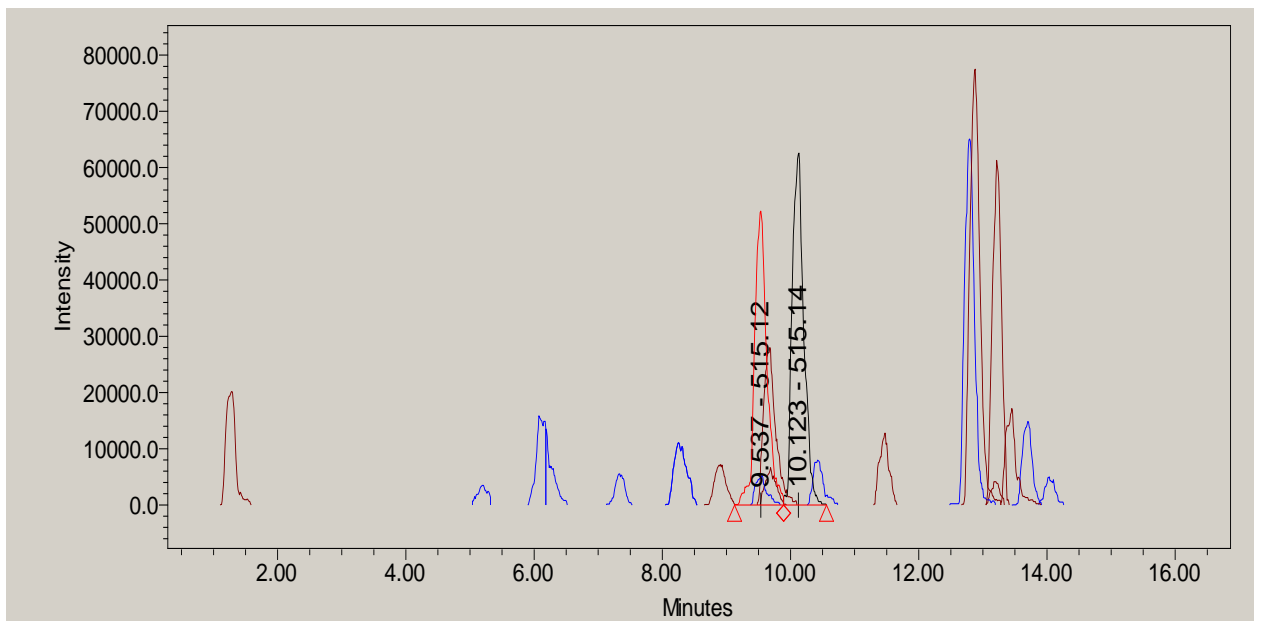
ცხრილი 4. სტევიას ფოთლის დიტერპენული გლიკოზიდების UPLC-MS მახასიათებლები იონის negative LC-ESI MS ანალიზისას

ნივთი ერება	ნაერთი	მოლეკულის ფორმულა	m/z (M-H) ⁻	m/z (M-H) ⁺
1	სტევიოლი	$C_{20}H_{30}O_3$	317.24	319.2
2	სტევიოლ -GLC	$C_{26}H_{40}O_8$	479.12	481.2
3	სტევიოლ-2GLC [M-16]	$C_{32}H_{49}O_{13}$	625.13	627.12
4	სტევიოლ-2GLC	$C_{32}H_{50}O_{13}$	641.33	643.21
5	სტევიოლ-3GLC დეოქსიგლუკოზიდი [M-16]	$C_{38}H_{59}O_{18}$	787.17	789.13
6	სტევიოლბიოზიდი	$C_{32}H_{50}O_{13}$	641.34	643.31
7	სტევიოზიდი სტევიოლ-3GLC	$C_{38}H_{60}O_{18}$	803.31	805.37
8	რებაუდიოზიდი A სტევიოლ-4GLC	$C_{44}H_{70}O_{23}$	965.52	967.42
9	რებაუდიოზიდი C	$C_{44}H_{70}O_{23}$	949.46	951.42
10	რებაუდიოზიდი D	$C_{50}H_{80}O_{28}$	1127.47	1129.47
11	რებაუდიოზიდი F	$C_{43}H_{69}O_{23}$	935.41	937.42
12	დულკოზიდი A	$C_{38}H_{60}O_{17}$	787.38	789.37

როგორც კვლევებიდან ჩანს UPLC-PDA, MS მეთოდების გამოყენებით იდენტიფიცირებული იქნა 12 დიტერპენული გლიკოზიდი: აგლიკონი-[M-H +] - m/z 319, [M-H -] - m/z 317 სტევიოლი; სტევიოლ-გლუკოზიდი -[M-H -] - m/z 479; სტევიოლ-დი-გლუკოზიდი -[M-H -] - m/z 625; სტევიოლბიოზიდი -[M-H -] - m/z 641; სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდი [M-16][M-H -] - m/z 787; სტევიოზიდი-[M-H -] - m/z 803; სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდი ანუ რებაუდიოზიდი A -[M-H -] - m/z 965; სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდს ანუ რებაუდიოზიდი D -[M-H -] - m/z 1127; სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდი ანუ რებაუდიოზიდი C -[M-H -] - m/z 949; სტევიოლის გი-გლუკოზიდი ანუ რუბუსოზიდი -[M-H -] - m/z 641; სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდი ანუ რებაუდიოზიდი F -[M-H -] - m/z 935; სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდი ანუ დულკოზიდი A -[M-H -] - m/z 787.

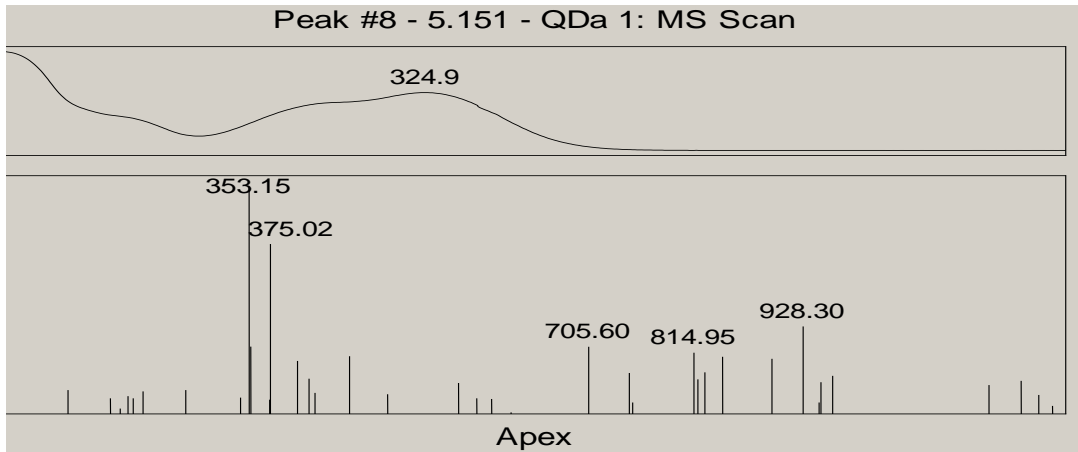
თავი 3.2 სტევიას ფოთლის ფენოლური ნაერთების კვლევა

სტევიას ფოთლის და მისგან მიღებული ექსტრაქტის შედგენილობაში იდენტიფიცირებული იქნა შემდეგი ფენოლური ნაერთები:



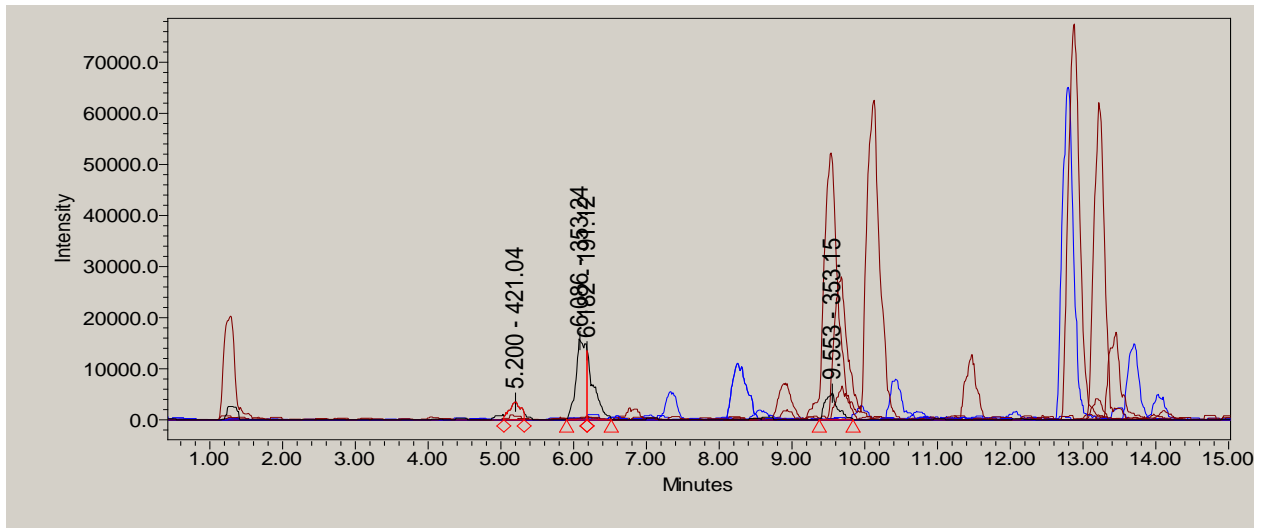
სურ. 28. სტევიას ფენოლური ნაერთების UPLC-MS სპექტრი(1)

ნივთიერება 13-[M-H -] - m/z 353, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 191 პიკია. შეკავების დრო 5.151 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 324.9 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 13 შეესაბამება Chlorogenic acids Mono-caffeoylquinicacids (mono-CQA).

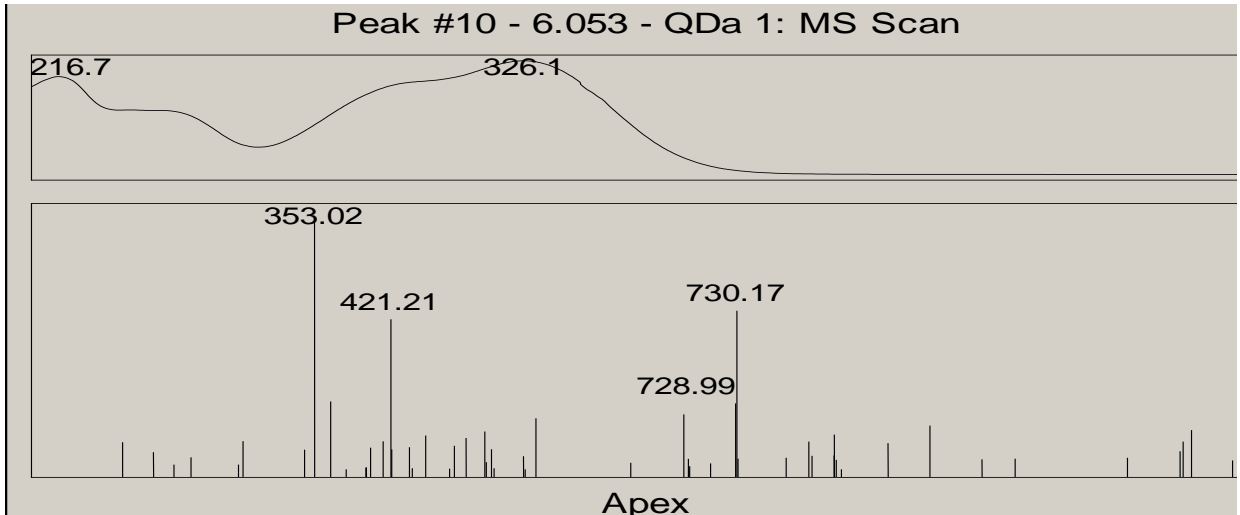


სურ. 29. mono-Caffeoylquinic acids UPLC-PDA-MS სპექტრი

ნივთიერება 14-[M-H -] - m/z 353, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 191 და m/z 173 პიკია. შეკავების დრო 5.151 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 324.9 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 14 შეესაბამება Caffeoylquinic acids (CQAs).

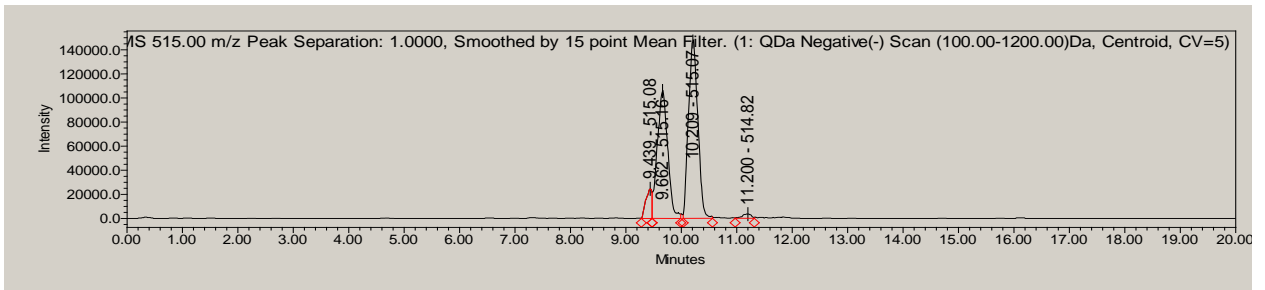


სურ. 30. Caffeoylquinic acids UPLC- MS სპექტრი SIR 353 Da

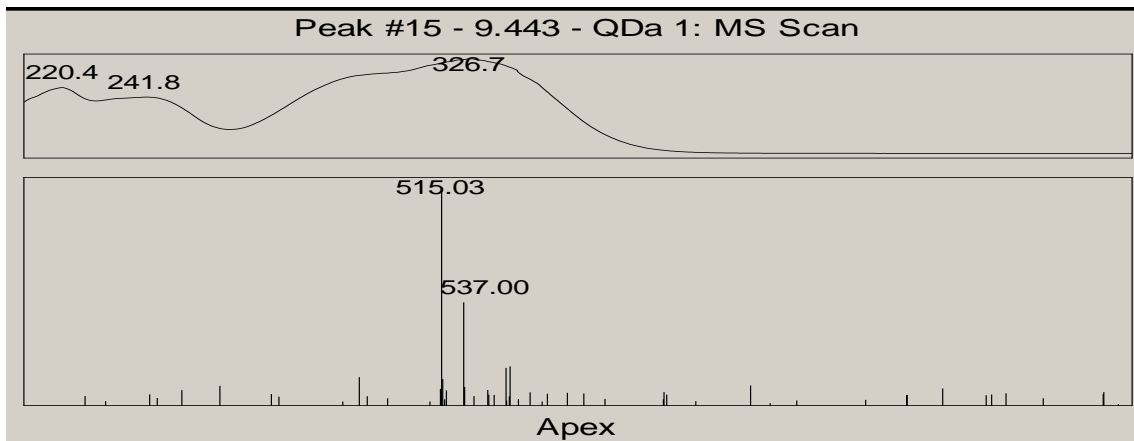


სურ. 31. Caffeoylquinic acids UPLC-PDA-MS სპექტრი

ნივთიერება 15- $[M-H^-]$ - m/z 515, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 353. შეკავების დრო 6.053 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 326.7 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 15 იდენტიფიცირებულია, როგორც 3,5-di-Caffeoylquinic acid (3,5diCQA).

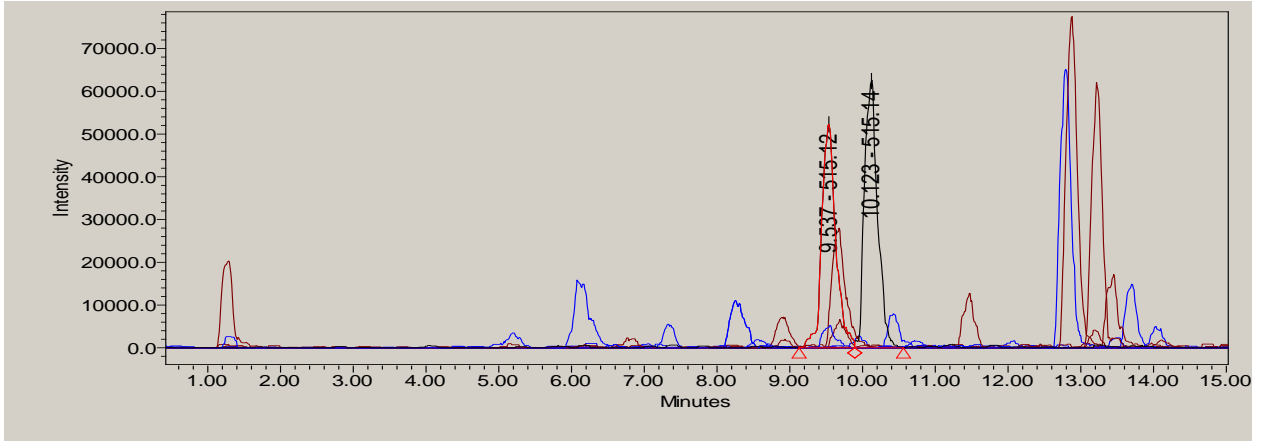


სურ. 32. 3,5-di-Caffeoylquinic acid UPLC-MS სპექტრი SIR 515.0 Da

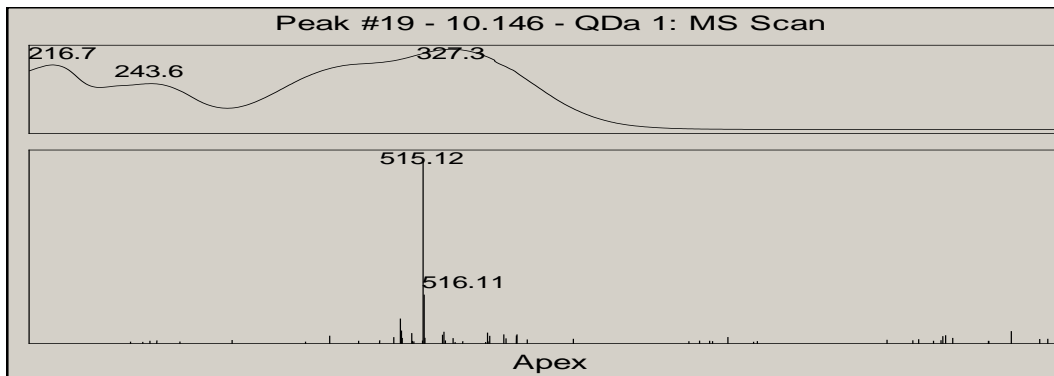


სურ. 33. 3,5-di-Caffeoylquinic acid UPLC-PDA-MS სპექტრი

ნივთიერება 16 -[M-H -] - m/z 515, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 353. შეკავების დრო 10.146 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 327.3 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 16 იდენტიფიცირებულია, როგორც 3,4-di-Caffeoylquinic acid (3,4 diCQA).

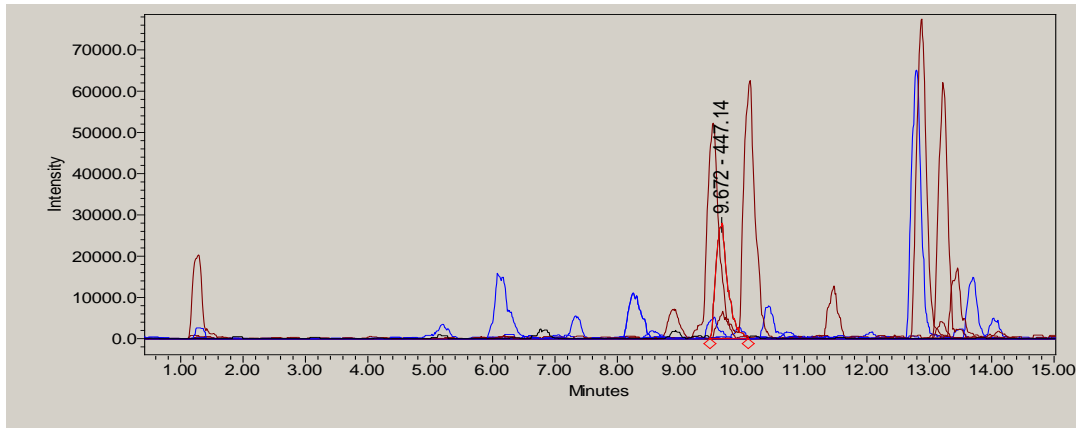


სურ. 34. 3,4-di-Caffeoylquinic acid UPLC-MS სპექტრი SIR 515.0 Da

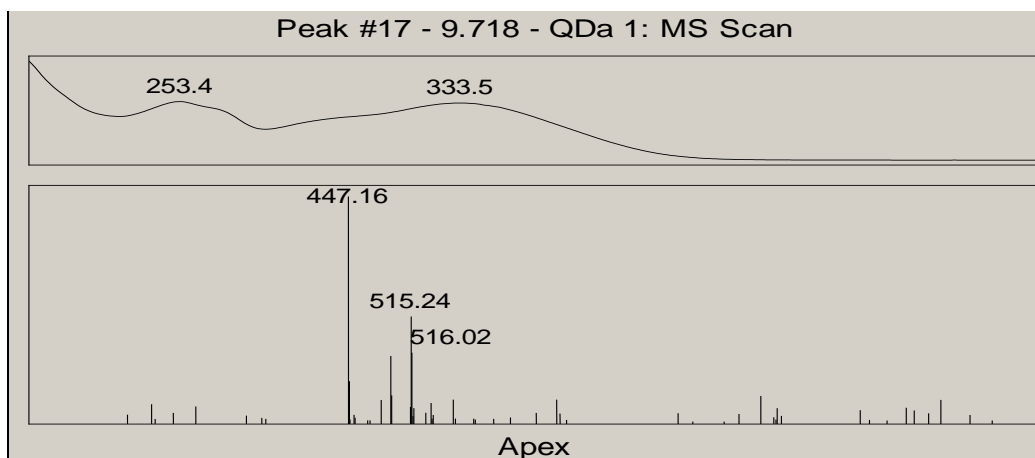


სურ. 35. 3,4-di-Caffeoylquinic acid UPLC-PDA-MS სპექტრი

ნივთიერება 17 -[M-H -] - m/z 463, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 301. შეკავების დრო 9.718 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 333.5 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 17 იდენტიფიცირებულია, როგორც კვერცეტინის-გალაქტოზიდი.

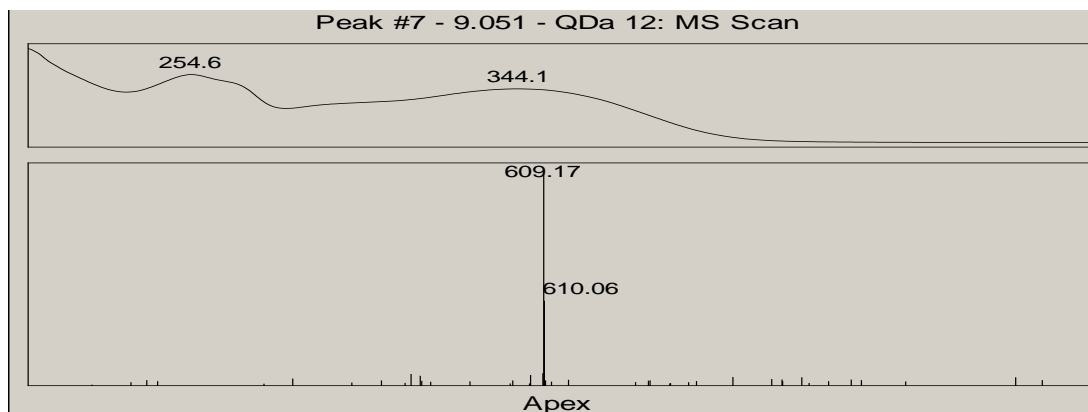


სურ. 36. კვერცეტინის-გალაქტოზიდის UPLC-MS სპექტრი SIR 447.0 Da

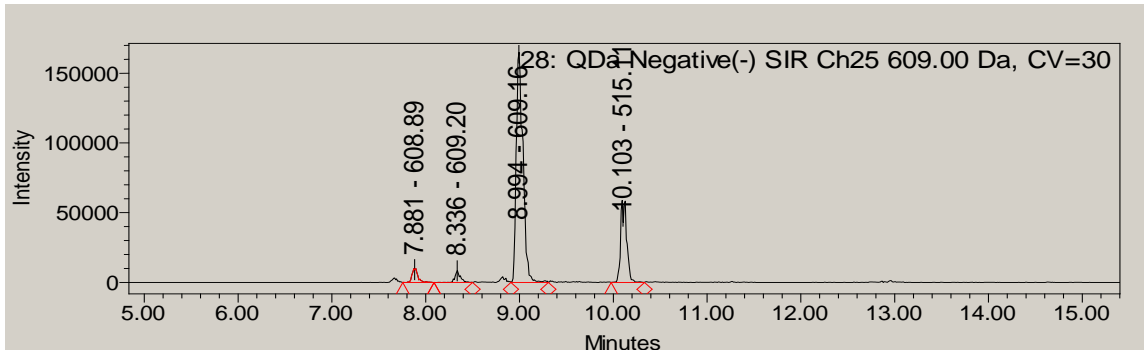


სურ. 37. კვერცეტინის-გალაქტოზიდის UPLC-PDA-MS სპექტრი

ნივთიერება 18- $[M-H^-]$ - m/z 609, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 301. შეკავების დრო 9.051 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 344.1 nm. სტანდარტული ნაერთის და METLIN ნაერთების მასების ბაზის, ასევე სტანდარტულ ნაერთთან შედარებით ნივთიერება 18 იდენტიფიცირებულია, როგორც რუთინი (Rutin).

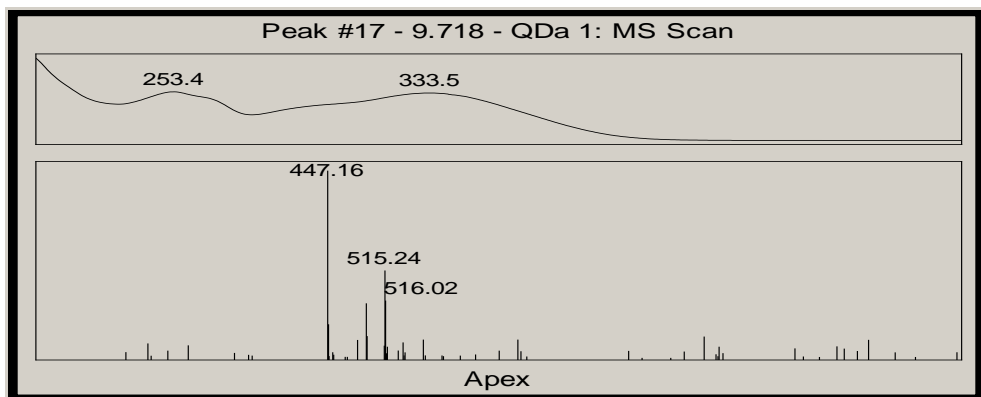


სურ. 38. რუთინი UPLC-PDA-MS სპექტრი

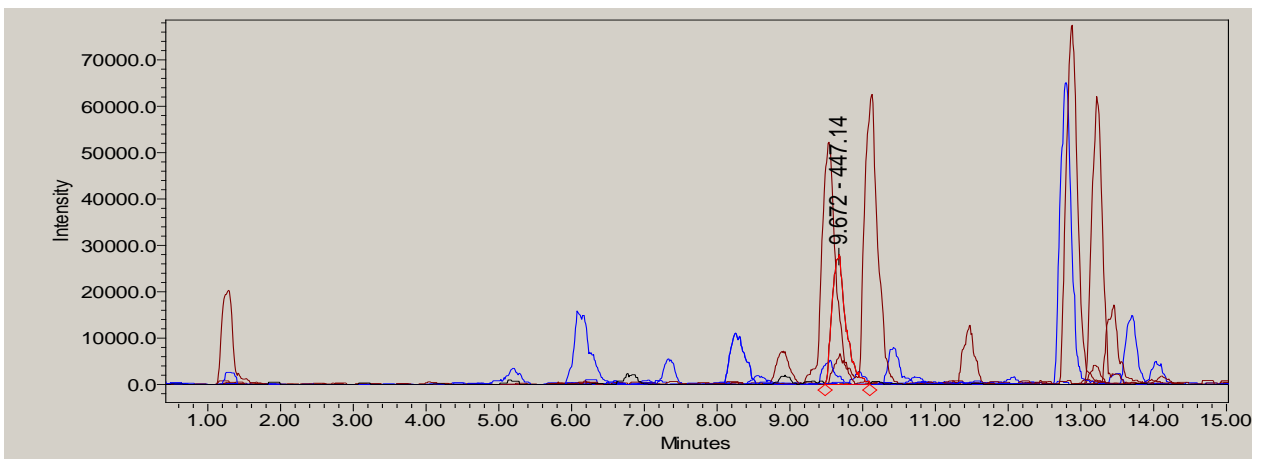


სურ. 39. რუთინი UPLC-MS სპექტრი SIR 609.0 Da

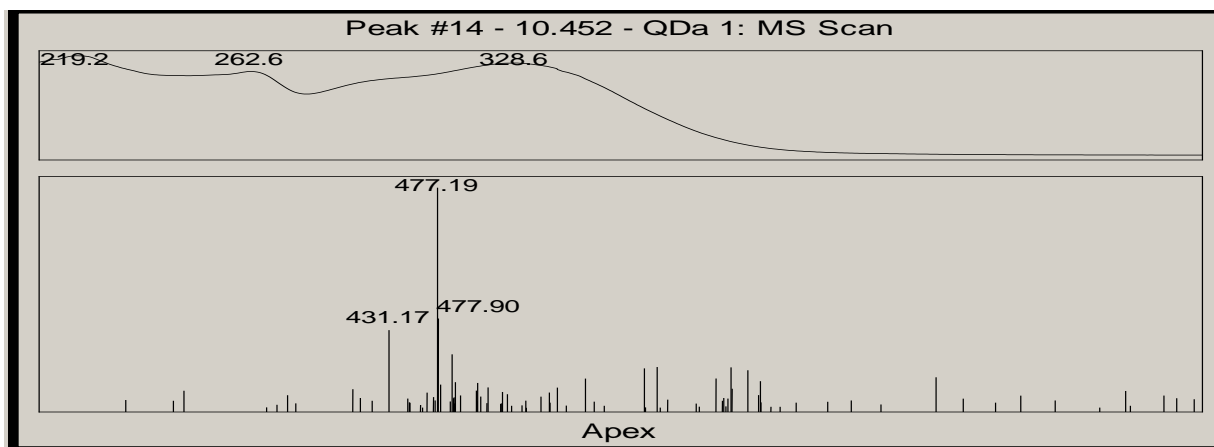
ნივთიერება 19-[M-H⁻] - m/z 447, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 301. შეკავების დრო 9.955 (MS, PDA-ში) წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 360 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 19 იდენტიფიცირებულია, კვერცეტინ-რამნოზიდი (Quercetin- rhamnoside).



სურ. 40. კვერცეტინ-რამნოზიდის UPLC-PDA- MS სპექტრი

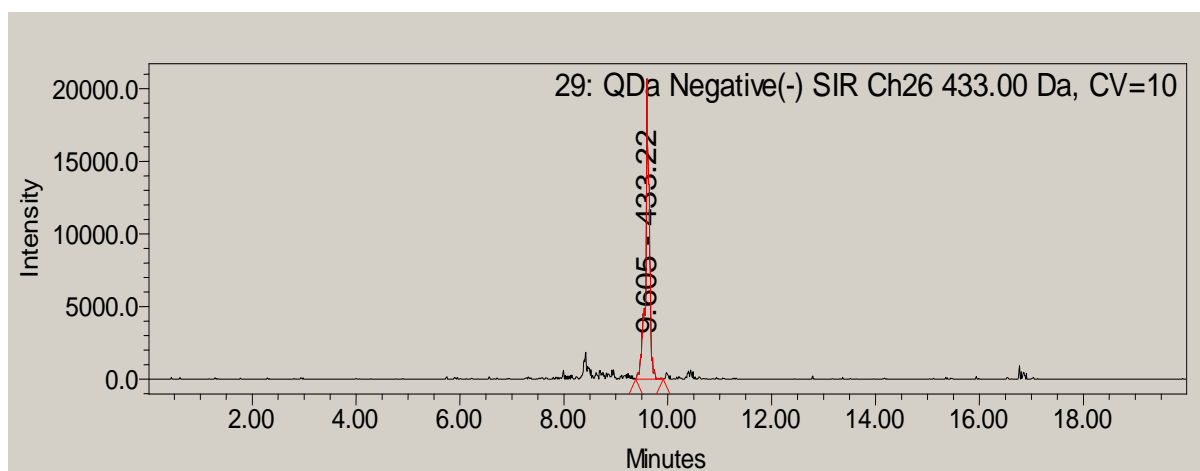


სურ. 41. კვერცეტინ-რამნოზიდის UPLC-MS სპექტრი SIR 447.0 Da



სურ. 42. კვერცეტინ-რამნოზიდის UPLC-PDA-MS სპექტრი

ნივთიერება 20-[M-H⁻] - m/z 433, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 301. შეკავების დრო 9.605 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 360 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 20 იდენტიფიცირებულია, კვერცეტინ-პენტოზიდი (Quercetin- pentoside).



სურ. 43. კვერცეტინ-პენტოზიდის UPLC-MS სპექტრი

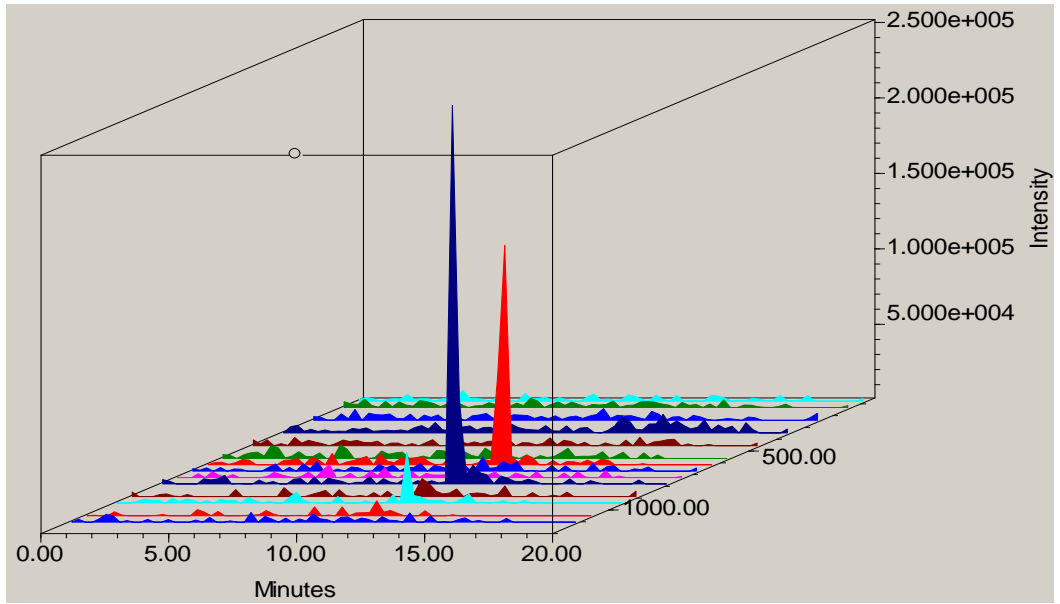
ცხრილი 5. სტევიას ფენოლური ნაერთების UPLC-MS მონაცემები კომპონენტების negative იონიზაციით LC-ESI MS ანალიზისას

#	Compound	Molecular Formula	m/z [M-H +] -
1	3-caffeoylquinic acid (3CQA)	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353
2	4-caffeoylquinic acid (4CQA)	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353
3	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609
4	Quercetin-rhamnoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447
5	Quercetin-galactoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463
6	3,5-di-caffeoylquinic acid (3,5diCQA)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515
7	3,4-dicaffeoylquinic acid(3,4 diCQA)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515
8	Quercetin- pentoside	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433

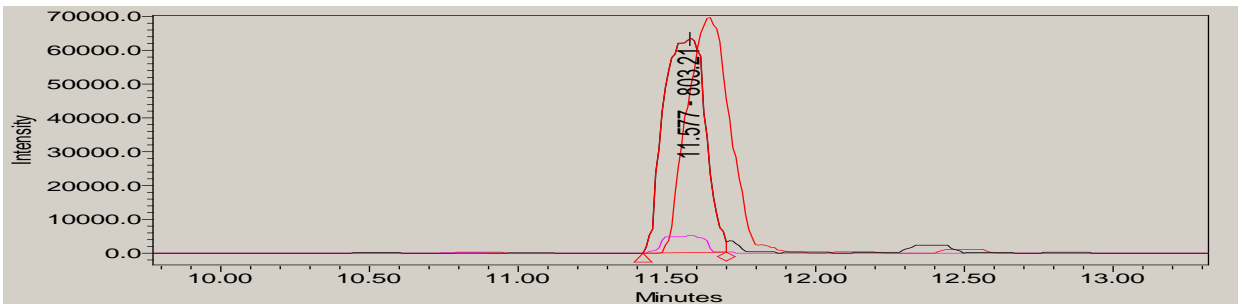
კვლევების საფუძველზე ფოთლებში იდენტიფიცირებული იქნა 4 ფენოლკარბონმჟავა და 4 ფლავონოიდი.

თავი 4. სტევიოლ-გლიკოზიდების შემცველობა სხვადასხვა ნედლეულში და მათგან წარმოებულ პრეპარატებში

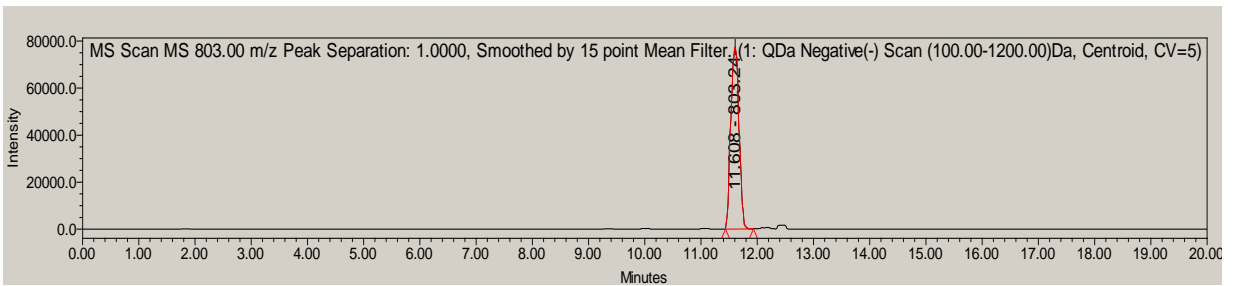
სტევიოლ გლიკოზიდების რაოდენობრივი კვლევა წარმოებდა სტანდარტული სტევიოზიდისა და რეზუდუოზიდის გამოყენებით აგებული საკალიბრო მრუდების მეშვეობით. ამ ნაერთების ქრომატოგრაფიული დაყოფა საკმაოდ ძნელია, რადგან მათი ქრომატოგრამაზე მათი შეკავების დრო საკმაოდ ახლოსაა (11.608 და 11.641 წთ) (სურ.44,45), თუმცა ინდივიდუალურად ექსტრაგირებული იონური SIR 803 (რეზუდუოზიდი) (სურ.46) და SIR 641 (სტევიოზიდი) (სურ.47) ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები, საშუალებას იძლევა მოხდეს მათი ცალ-ცალკე იდენტიფიკაცია და თითოეულისათვის აგებული იქნას საკალიბრო მრუდი (სურ.48). სხვა ტკბილი გლიკოზიდების სტანდარტული ნაერთების არ ქონის გამო, რაოდენობრივი გაანგარიშება ხდებოდა სტევიოზიდთან მიმართებაში (სურ. 49-53, ცხრილი 6).



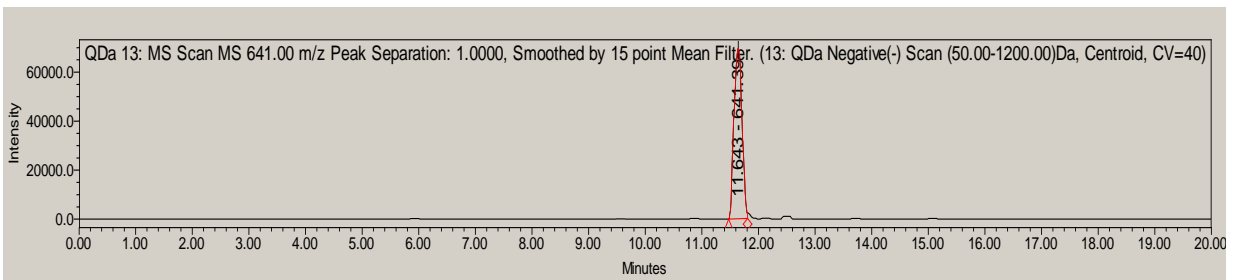
სურ. 44. UPLC-MS სპექტროscan 100-1200 Da რეზაუდიოზიდი A და სტევიოზიდი 500-500 ppm



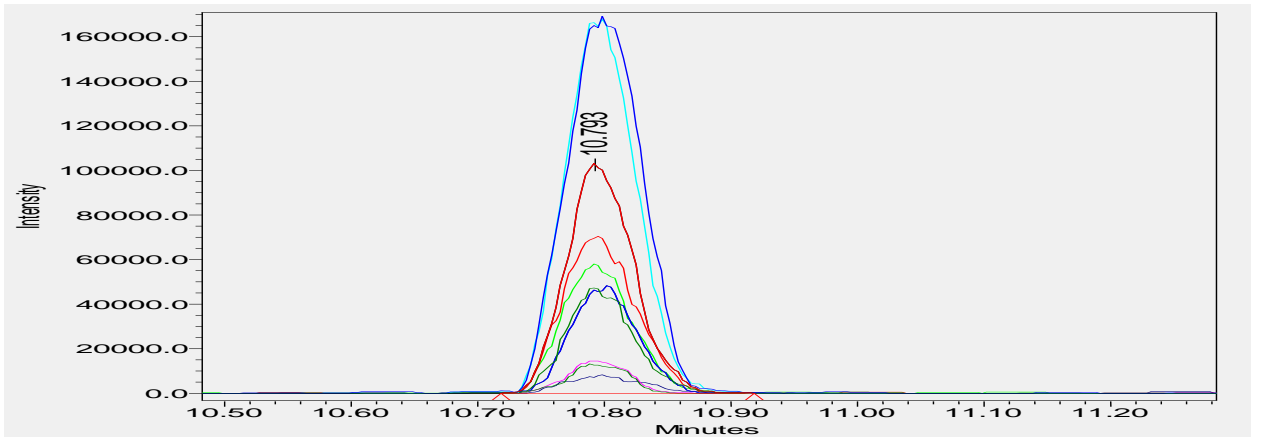
სურ. 45. UPLC-MS სპექტრი SIR



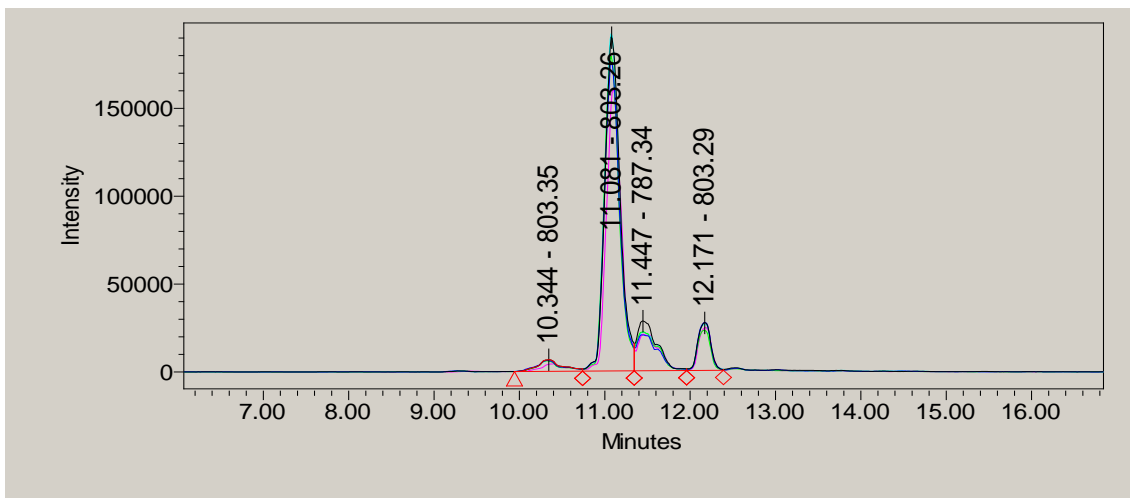
სურ. 46. UPLC-MS სპექტრი SIR 803 Da



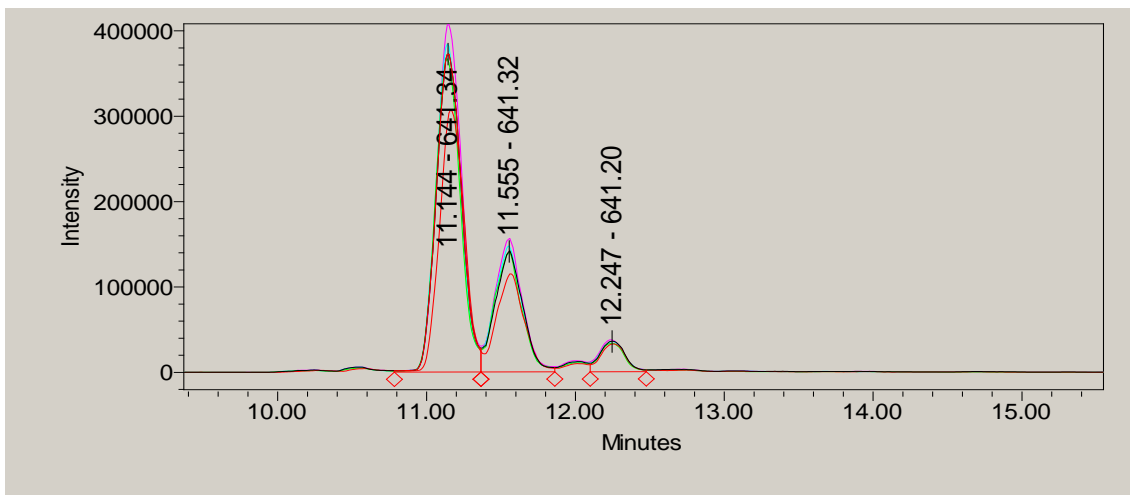
სურ. 47. UPLC-MS სპექტრი SIR 641 Da



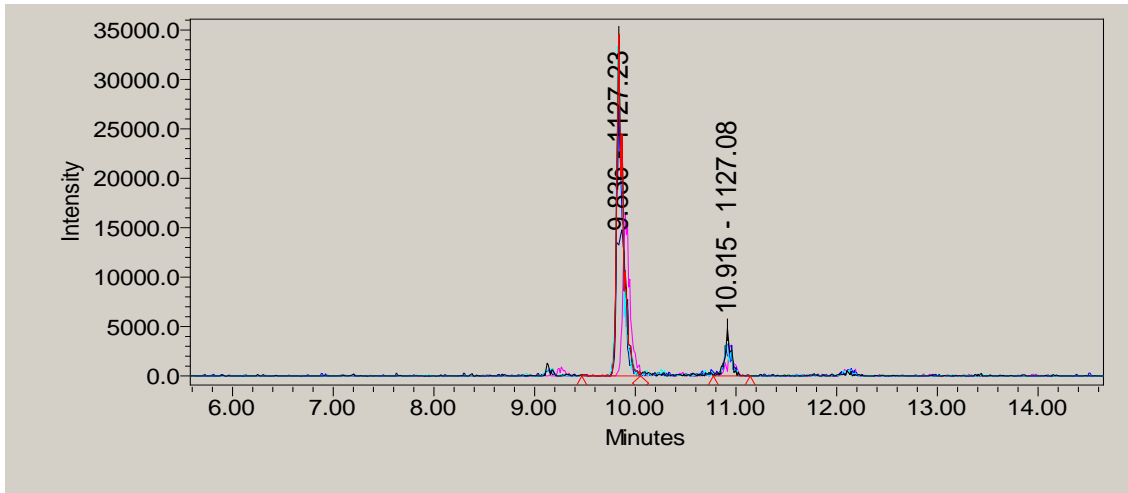
სურ. 48. UPLC-MS სპექტრი SIR 803 Da საკალიბრო მრუდის ასაგებად



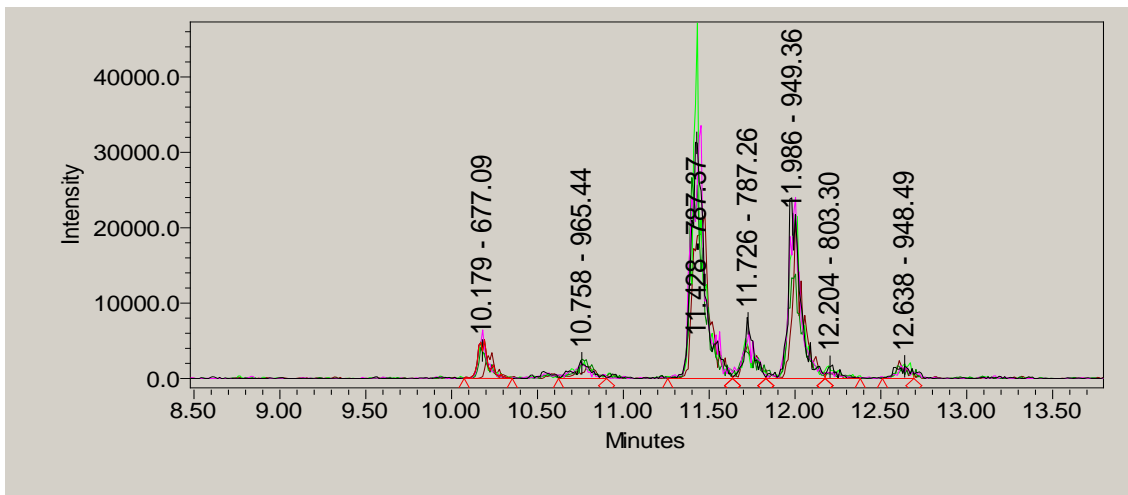
სურ. 49. UPLC-MS სპექტრი SIR 803



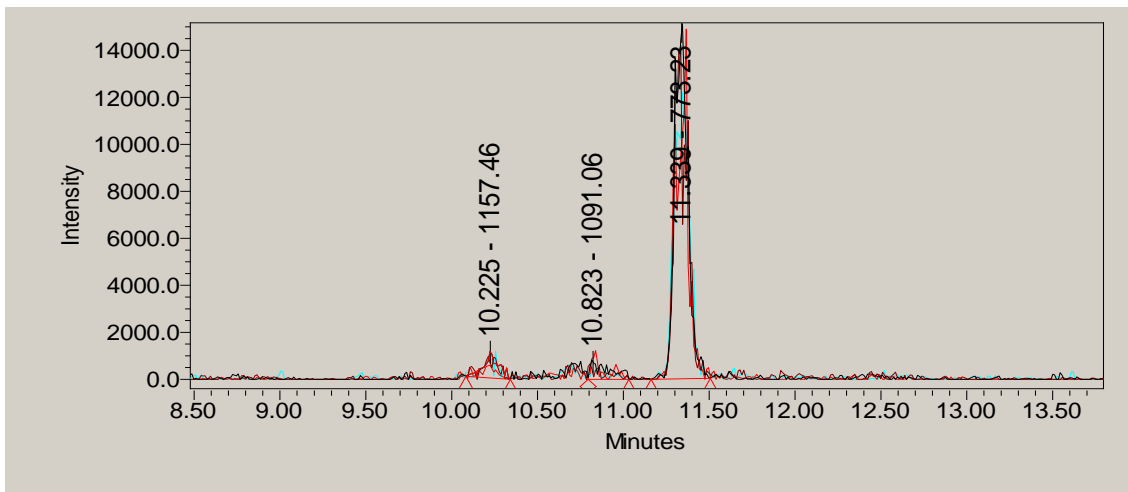
სურ. 50. UPLC-MS სპექტრი SIR 641



სურ. 51. UPLC-MS სპექტრი SIR m/z 1127



სურ. 52. UPLC-MS სპექტრი SIR m/z 949



სურ. 53. UPLC-MS სპექტრი SIR m/z 935

ცხრილი 6. ტკბილი დიტერპენილი გლიკოზიდების შემცველობა სტევიას ფოთოლში
(მგ/100 გ მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით)

ნიმუში	m/z 641	m/z 803	m/z 935	m/z 949	m/z 1127	total
ამერიკა 3	7304±219.1	3686±110.6	269±8.1	747±22.4	330±9.9	12336±370.1
ამერიკა 4	6359±190.8	3357±100.7	256±7.7	712±21.4	342±10.36	11026±330.8
ადგილობრივი ფორმა	4760±142.8	3924±117.7	269±8.1	849±25.5	434±13.0	10236±307.1
ადგილობრივი გვერდითი ფოთოლი	6208±186.2	3896±116.9	218±6.5	615±18.5	472±14.2	11409±342.3
ადგილობრივი ცენტრალური ფოთოლი	7304±219.1	3686±110.6	269±8.1	747±22.4	330±9.9	12336±370.1

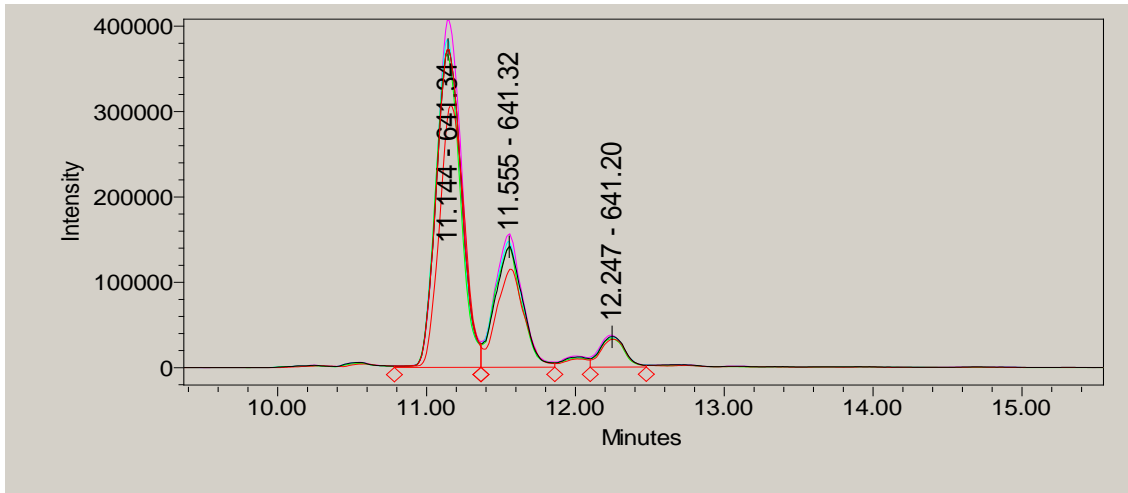
ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების რაოდენობრივი ანალიზის ჩასატარებლად შედარებული იქნა შექმნილი ჯიშები, ადგილობრივი (სპონტანური) ფორმასთან. სტევიას ფოთოლში შექმნილი ფორმების ფოთლებში დიტერპენული გლიკოზიდების ჯამი მეტია. შედარებით მაღალია ეს მაჩვენებელი ამერიკა 3-ში (12336 მგ/100გ) და ამერიკა 4-ში (11026მგ/100გ), ხოლო ადგილობრივ ფორმაში შედარებით ნაკლებია (10823 მგ/100გ). გვერდით (განშტოებული გეროზე განლაგებული ფოთოლი) და ცენტრალურ (ძირითად გეროზე განლაგებული ფოთლები) ფოთლებში ოდნავი განსხვავებაა. ცენტრალური ცოტათი მეტი რაოდენობით აგროვებს ტკბილ დიტერპენულ გლიკოზიდებს (10236 და 11409 მგ/100გ). დომინანტი ყველა შემთხვევაში სტევიოზიდია (m/z 641). რაოდენობრივად სტევიოზიდი ჭარბობს სხვა გლიკოზიდების შემცველობას. ყველა ვარიანტში მათი შემცველობა ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების საერთო შემცველობის 46-დან, 59,2 %-მდეა. რეზუალტირები A-ს შემცველობა შესაბამისად შედარებით ნაკლებია (30-38%), რომელიც სტევიას ფოთლებში ამერიკა #3 (7304 მგ/100გ) ამერიკა #4 (6359 მგ/100გ) ნაკლებია, ვიდრე ადგილობრივ სპონტანური სახეობის ფოთოლში (5484მგ/100 გ). სტევიას განტოტვის გვერდითი ფოთლები აგროვებენ სტევიოზიდს ნაკლები რაოდენობით (4760 მგ/100გ), ვიდრე ცენტრალური ღეროს ფოთლები (6208 მგ/100 გ) (ცხრ. 6).

ცხრილი 7. სტევიას ფოთოლში ტკბილი დიტერპენილი გლიკოზიდების შემცველობის %-ული გადანაწილება (მშრალ მასაზე გადანაგარიშებით)

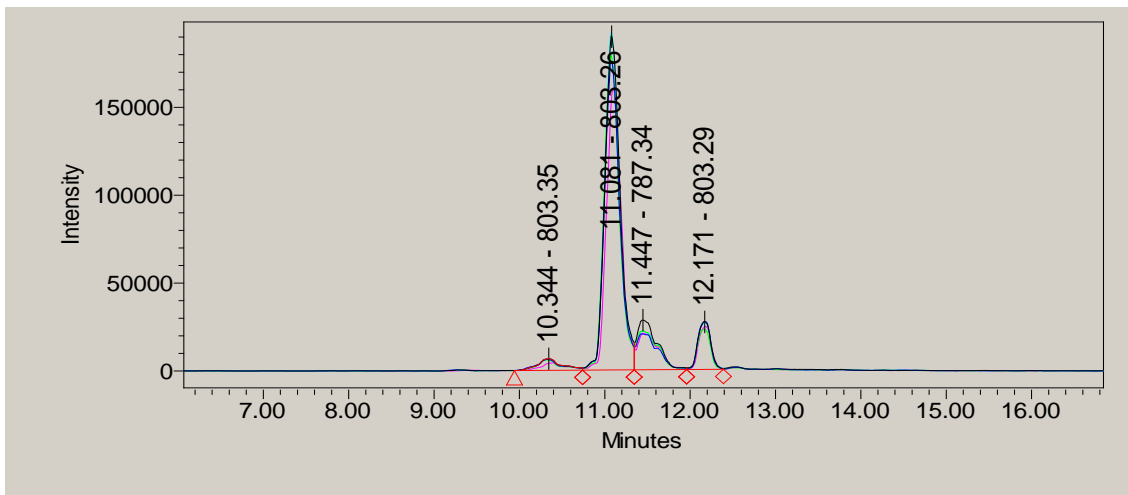
ნიმუში	m/z 641	m/z 803	m/z 935	m/z 949	m/z 1127
ამერიკა 3	59,2	29,9	2,2	6,1	2,7
ამერიკა 4	57,7	30,4	2,3	6,5	3,1
ადგილობრივი ფორმა	50,7	36,1	2,3	6,8	4,2
ადგილობრივი გვერდითი ფოთოლი	46,5	38,3	2,6	8,3	4,2
ადგილობრივი ცენტრალური ფოთოლი	54,4	34,1	1,9	5,4	4,1

სხვადასხვა ნივთიერების დიტერპენული გლიკოზიდები მინორული ნაერთებია, რომელთა შორის შედარებით მეტი არის რეზუდუოზიდი C (მთელი შედგენილობის 5,4-დან 8,3 %-მდე). სხვა დიტერპენული ნაერთები თითქმის თანაბრადაა განაწილებული და 2-დან 4 %-ს არ აღემატება (ცხრილი 7).

შესწავლილი იქნა სტევიას ფოთლის ექსტრაქტის რაფინირების დროს გარკვეული სტევიოზიდისა და რეზუდუოზიდის ცვალებადობა (სურ.54,55). ექსტრაქტის გასუფთავებისას გარკვეული ცვლილებები შეინიშნება. ექსტრაქტის გაფილტვრა 2000 Da ფილტრში იწვევს ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების რაოდენობის მატებას, შესაბამისად კონცენტრატში მათი შემცველობა მცირდება (6935მგ/ლ-დან 6691 მგ/ლ-მდე) (ცხრილი 8), ხოლო ფილტრატში მატულობს (7279 მგ/ლ). შესაბამისი ცვლილებაა 1000 Da ფორების ფილტრშიც. ფილტრატში მატულობს (7570 მგ/ლ), ხოლო კონცენტრატში კლებულობს (6483 მგ/ლ). მემბრანების ფორების ცვლილებით შესაძლებელი ხდება სტევის ექსტრაქტის რაფინირება.



სურ. 54. სტევიას ფოთლის ექსტრაქტების UPLC-MS სპექტრი SIR m/z- 641 Da



სურ. 55. სტევიას ფოთლის ექსტრაქტების UPLC-MS სპექტრი SIR m/z- 803 Da

ცხრილი 8. ტკბილი დიტერპენილი გლიკოზიდების შემცველობა სტევიას ფოთლის ექსტრაქტებში (მგ/ლ)

ნიმუში/ Sampler	m/z- 641	m/z- 803	Total (მგ/ლ)
საწყისი ექსტრაქტი	3819±114.6	3016±90.5	6935±208.1
ფილტრატი 2000 Dal	4217±126.5	3062±91.9	7279±218.4
კონცენტრატი 2000 Dal	3764±112.9	2927±87.8	6691±200.7
ფილტრატი 1000 Dal	4540±136.2	3030±90.9	7570±227.1
კონცენტრატი 1000 Dal	3660±109.8	2823±84.7	6483±194.5

თავი 5. სტევიას ფოთლის ლიპიდური ბუნების ნაერთები

კარბონმჟავების შედგენლობის კვლევა - განხორციელდა გაზური ქრომატოგრაფის (TRACE™ 1310 Gas Chromatograph - Thermo Scientific) საშუალებით. ქრომატოგრაფირება მიმდინარეობდა ქრომატოგრაფიულ კაპილარულ სვეტზე - SGE BPX5 Capillary GC Column 30 მ სიგრძის, 0,25 მმ დიამეტრის და 0,25 მკმ უძრავი ფაზის ნაწილაკების ზომით. უძრავ ფაზას წარმოადგენდა 5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane. სტევიას ფოთლებისაგან ცხიმის მისაღებად აღებული იქნა 10 გრამი ჰაერზე გამშრალი ფოთოლი, რომელიც დაქუცმაცდა Bosh-ის ფირმის საფქვავეში და მოთავსდა წინასწარ ჰექსანში გარეცხილ და მუდმივ წონამდე მიყვანილ ფილტრის ქაღალდში. პაკეტი ნიმუშთან ერთად საექსტრაქციოდ მოთავსებული იქნა სოქსლეტის აპარატში 48 საათის განმავლობაში. ექსტრაქცია მიმდინარეობდა ჰექსანით ცხიმოვანი და პიგმენტური ნაერთების სრულ მოცილებამდე. მიღებული მასა გამრა საშრობ კარადაში 100°C -ზე მუდმივ წონამდე. დადგინდა, რომ ლიპიდები შეადგენს მასის 3,23%-ს.

ნიმუშის აირ-სითხური ქრომატოგრაფირებისათვის აუცილებელია მათი ეთერიფიკაცია, რისთვისაც ისინი მექანიკური მინარევებისაგან გასაწმენდად წინასწარ ექვემდებარება გაფოტვრას. შემდგომ 1 მლ გადატანილ იქნა ცენტრიფუგის სინჯარაში, დაემატა 0.5 მლ 2 ნორმალური KOH-ის 96% სპირტსნარი (შესაძლებელია ეთანოლის ან მეთანოლის გამოყენება). შემდეგ, დაემატა 10 მლ ჰექსანი (საერთო მოცულობა 11,5 მლ). მორევა განხორციელდა სრულ გახსნამდე (მინიმუმ 30 წამის განმავლობაში) და დაცენტრიფუგირდა 10 წუთის განმავლობაში 1000 ბრ/წთ-ზე. ქრომატოგრაფირებისას მოძრავ ფაზას წარმოადგენს ჰელიუმი, რომლის მოძრაობის სიჩქარე შეადგენს 0,700 მლ/წუთში. ნიმუშის ზედა ფრაქციიდან 1 მკლსაკვლევი ნიმუშის ინჟექტირება ხორციელდებოდა SGE Analytical Science ფირმის 10 მკლ მიკროშპრიცის მეშვეობით (სურ.56).



სურ.56. მიკროშპრიცი

ინჟექტორის ტემპერატურული რეჟიმი 250°C-ია, ხოლო, სვეტში შესაყვანი ნიმუშის ჰელიუმის ნაკადში დაყოფა ხორციელდებოდა 1/100 თანაფარდობით. ინჟექტორის მუშაობის პარამეტრები მოცემულია სურ. 57-ზე.

ქრომატოგრაფირება განხორციელდა ტემპერატურულ გრადიენტით სამ ეტაპად. კერძოდ, ქრომატოგრაფირება იწყება 140°C -ზე, რომელიც მიმდინარეობდა 4 წუთის განმავლობაში. მეორე ეტაპზე 20 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 220°C-მდე და ქრომატოგრაფირება გრძელდებოდა 16 წუთი. მესამე ეტაპზე 7 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 300°C-მდე და გრძელდებოდა აღნიშნულ ტემპერატურაზე 7 წუთის განმავლობაში. ქრომატოგრაფირების სრული დრო შეადგენდა 42,43 წუთს. კარბონმჟავების რაოდენობრივი შემცველობა ისაზღვრება პიკის ფართობის მიხედვით პროცენტებში 0,01%-ის სიზუსტით.

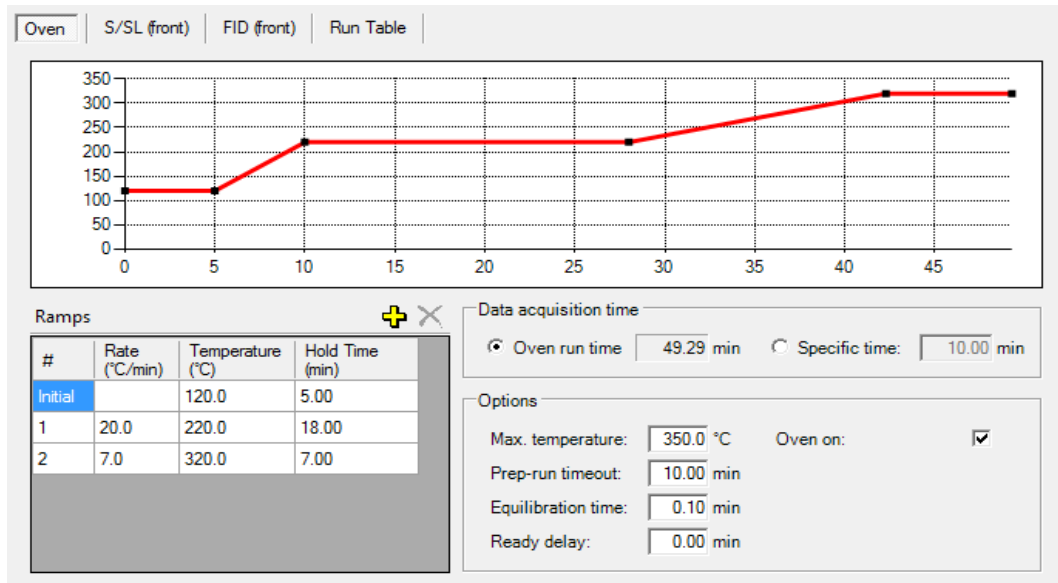
The screenshot shows a software interface for configuring a chromatography system. It includes several sections with adjustable parameters:

- Oven:** S/SL (front), FID (front), Run Table
- S/SL mode:** Split
- Carrier mode:** Constant Flow
- Inlet:**
 - Temperature: 200 °C
 - Split flow: 50.0 mL/min
 - Split ratio: 71.4
 - Splitless time: 1.00 min
- Surge:**
 - Surge pressure: 5.00 kPa
 - Surge duration: 0.00 min
- Septum purge:**
 - Purge flow: 5.0 mL/min
 - Constant septum purge:
 - Stop purge for: 0.00 min
- Carrier flow:**
 - Flow: 0.700 mL/min
- Carrier options:**
 - Vacuum compensation:
 - Carrier gas saver:
 - Gas saver flow: 20.0 mL/min
 - Gas saver time: 2.00 min

სურ.57.ინჟექტირების პარამეტრები

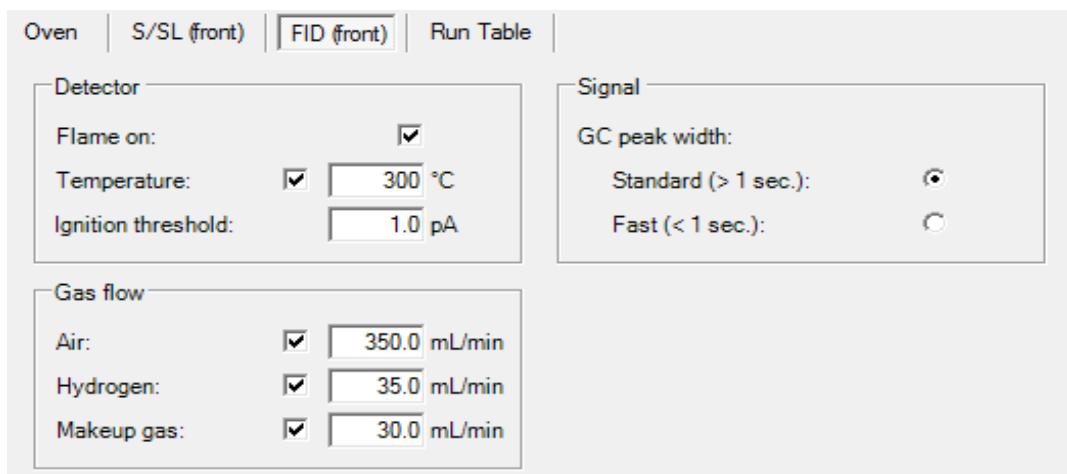
ქრომატოგრაფირება ხორციელდებოდა ტემპერატურულ გრადიენტში სამ ეტაპად. კერძოდ, ქრომატოგრაფირება დაიწყო 140°C -ზე, რომელიც მიმდინარეობდა 4 წუთის განმავლობაში. მეორე ეტაპზე 20 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 220°C-მდე

და ქრომატოგრაფირება გრძელდებოდა 16 წუთი. მესამე ეტაპზე 7 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 300°C-მდე და გრძელდებოდა აღნიშნულ ტემპერატურაზე 7 წუთის განმავლობაში. ქომატოგრაფირების სრული დრო შეადგენდა 42,43 წუთს. ქომატოგრაფირების ტემპერატურული რეჟიმი დიაგრამის სახით მოცემულია სურ. 4-ზე. ქრომატოგრაფირების ტემპერატურული რეჟიმი მოცემული (სურ.58).

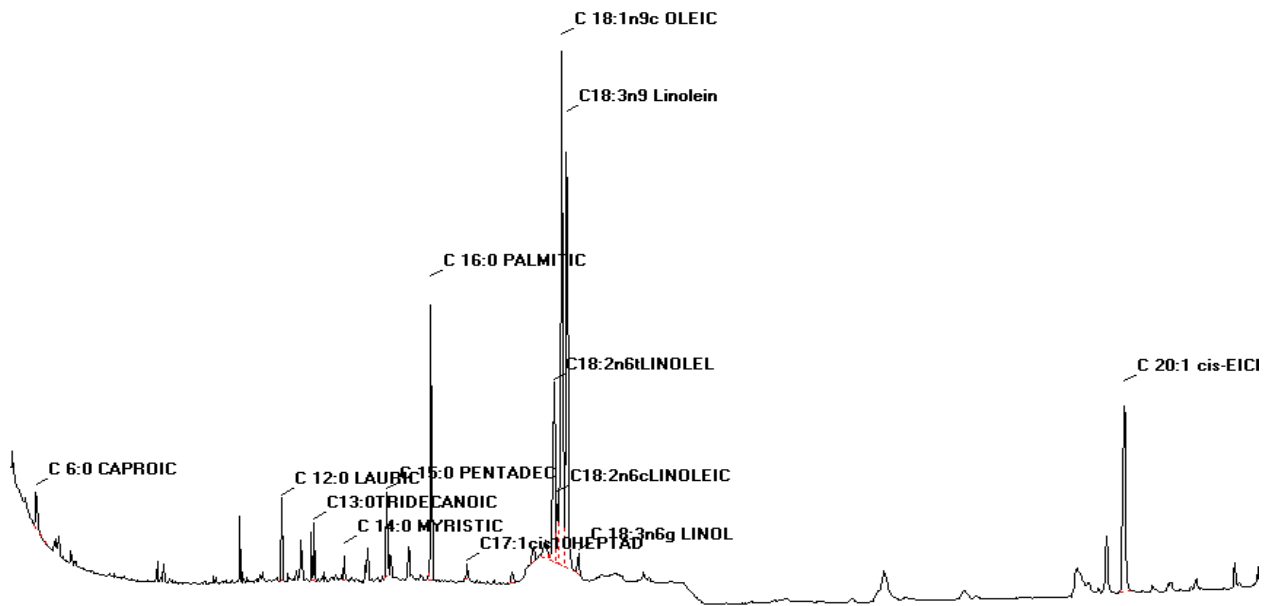


სურ.58. ქრომატოგრაფირების ტემპერატურული რეჟიმი

ქრომატოგრაფირების მეშვეობით დაყოფილი კარბონმჟავების დეტექტირება ხდებოდა ალურ-იონიზაციურ დეტექტორზე, რომლის სამუშაო რეჟიმი მოცემულია სურათ 59-ზე.



სურ. 59. დეტექტორის სამუშაო რეჟიმი



სურ.60. ლიპიდების ესტერების აირ-სითხური ქრომატოგრამა

ქრომატოგრაფირების მეშვეობით მიღებული კომპონენტების იდენტიფიკაცია განხორციელდა ცნობილი შედგენილობის მქონე ნიმუშის და ლიტერატურულ მონაცემებთან შედარებით. დადგინდა სტევიას ზეთში კარბონმჟავების სპეციფიკური შედგენილობა. ანალიზის შედეგები მოყვანილია ქრომატოგრამაზე (სურ.60).

ქრომატოგრაფიულმა კვლევამ აჩვენა რომ სტევიას ფოთლებისაგან მიღებული ზეთი შეიცავს C 6-დან C22-მდე თითქმის ყველა ცხიმმჟავას, კერძოდ C 16 -პალმიტინის მჟავა, C 18- ლინოლენის მჟავა (C18:2n6c) ცის-ლინოლის მჟავა (ომეგა-6), gamma-Linolenic acid (C18:3n6) გამა-ცის-ლინოლენის მჟავა (ომეგა-6), Alpha-Linolenic acid (C18:3n3) ალფა-ლინოლენის მჟავა (ომეგა-3).

ცხრილი №9. კარბონმჟავათა კომპონენტური შემადგენლობა

%-ში (საერთო რაოდენობიდან)

პიკი	კომპონენტის დასახელება	შეკავების დრო (წთ)	ფართობი %
1	Caproic acid methyl ester (C6:0)	3.373	0.069±0.002
2	Undecanoic acid methyl ester (C11:0)	9.540	0.018±0.001
3	Tridecanoic acid methyl ester (C13:1)	11.307	0.338±0.01
4	Tridecanoic acid methyl ester (C13:0)	11.390	0.337±0.01
5	Myristoleic acid methyl ester (C14:1)	11.968	0.152±0.005
6	Myristic acid methyl ester (C14:0)	12.228	0.025±0.001
7	Pentadecanoic acid methyl ester (15:0)	13.317	0.118±0.004
8	Palmitolenic acid methyl ester (C16:2)	13.643	0.792±0.024
9	Palmitoleic acid methyl ester (C16:1)	14.243	9.339±0.28
10	Palmitic acid methyl ester (C16:0)	14.558	0.535±0.016
11	cis-10-Heptadecenoic acid methyl ester (C17:1)	15.408	10.535±0.316
12	Heptadecanoic acid methyl ester (C17:0)	15.623	0.099±0.003
13	gamma-Linolenic acid methyl ester (C18:3n6)	17.575	6.065±0.182
14	Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c)	17.733	6.571±0.197
15	Oleic acid methyl ester (C18:1n9c)	18.137	37.425±1.123
16	Elaidic acid methyl ester (C18:1n9t)	18.318	0.362±0.011
17	Stearic acid methyl ester (C18:0)	18.520	1.743±0.052
18	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester (C20:3n3)	19.573	7.266±0.218
19	Arachidic acid methyl ester (C20:0)	19.772	12.801±0.384
20	Heneicosanoic acid methyl ester (C21:0)	20.508	2.357±0.071

დასკვნის სახით შეიძლება ითქვას, რომ სტევიას ფოთლისაგან მიღებული ზეთის შემადგენლობაში C18 კარბონმჟავები დომინანტია, მათი შემცველობა ცხიმის საერთო შემცველობის 37,425%-ს შეადგენს.

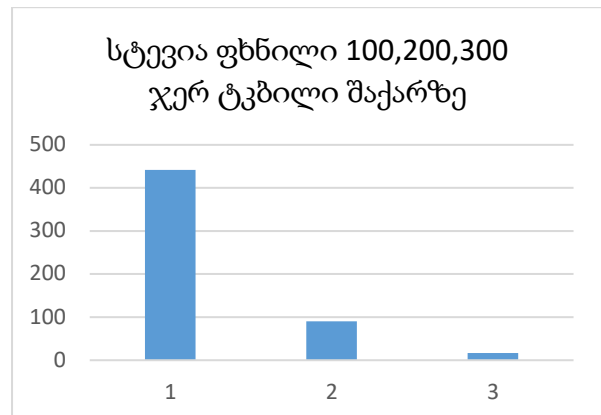
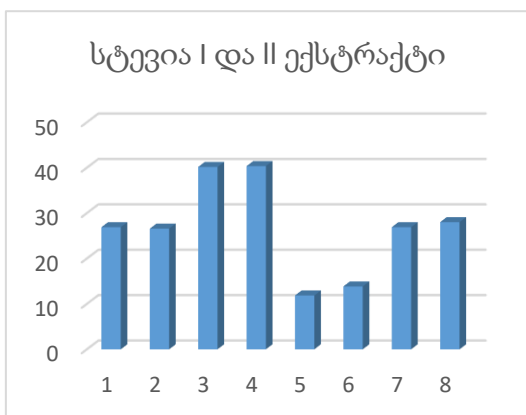
თავი 6. სტევიას ფოთლისა და მისგან მიღებული პროდუქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობის კვლევა DPPH მეთოდით

Stevia rebaudiana ექსტრაქტს გააჩნია ანტიოქსიდანტური აქტივობა, რაც განპირობებულია ფენოლური ნაერთების მთელი კომპლექსით და სხვა ბიოაქტიური ნაერთების შემცველობით (ცხრილი10). ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა ხდებოდა ნიმუშის მგ-ით, რომელსაც შეუძლია DPPH-ის 0.1 mM-ის მეთანოლიანი ხსნარის ინჰიბირება 50 %-ით (IC 50). ასევე გადაანგარიშება მოვახდინეთ %-ში.

ცხრილი 10. სტევიას ფოთლის და პროდუქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობა

ნიმუშის დასახელება	მგ ნიმუშის DPPH-ის 0.1 mM-ის IC50%-იანი	ანტიოქსიდანტური აქტივობა, %
სტევია, ამერიკა 3. I ექსტრაქტი	0.364	27±0.8
სტევია ამერიკა, 4. I ექსტრაქტი	0.341	27±0.8
სტევია სპონტანური I ექსტრაქტი ძირითადი ფოთოლი	0.460	40±1.2
Stevia სპონტანური I ექსტრაქტი გვერდითი ფოთოლი	0.454	40±1.2
სტევია, ამერიკა 3. II ექსტრაქტი	0.102	12±0.4
სტევია ამერიკა, 4. II ექსტრაქტი	0.100	14±0.4
სტევია სპონტანური II ექსტრაქტი ძირითადი ფოთოლი	0.116	27±0.8
სტევია სპონტანური II ექსტრაქტი გვერდითი ფოთოლი	0.115	28±0.8
სტევია 100-ჯერ ტკბილი ვიდრე საქაროზა	0.015	442±13.3
სტევია 200 -ჯერ ტკბილი ვიდრე საქაროზა	0.107	91±2.7
სტევია 300 -ჯერ ტკბილი ვიდრე საქაროზა	0.698	17±0.5
ფილტრატი 2000 დალტონის მემბრანულ ფილტრში	0.045	134±4.0
ფილტრატი 1000 დალტონის მემბრანულ ფილტრში	0.085	87±2.6
კონცენტრატი 1000 დალტონის მემბრანულ ფილტრში	0.075	77±2.3

სხვადასხვა ჯიშის ინტროდუცირებული მცენარეებიდან ოდნავ უფრო აქტიური პარაგვაიდან ინტროდუცირებული მცენარის ფოთლისაგან მიღებული ექსტრაქტი აღმოჩნდა, რომლის 0.341 მგ ახდენს 0.01 mM DPPH-ის 50 %-იან ინჰიბირებას. ადგილობრივი სპონტანური პოპულაცია შედარებით ნაკლებ აქტიურია. მეორე ექსტრაქტები (სპირტის ექსტრაქტი) თითქმის ყველა შემთხვევაში საკმაოდ აქტიურია და დაახლოებით 0.1 მგ ინჰიბირებასახდენს. სტევას ანტიოქსიდანტური აქტივობა გადამუშავების პროცესში მნიშვნელოვნად იცვლება. მნიშვნელოვანი განსხვავებებია ექსტრაქტის რაფინირების დონის მიხედვით. საქაროზაზე 100-ჯერ ტკბილი პრეპარატი განსაკუთრებით აქტიურია (მხოლოდ 0.015 მგ ახდენს ინჰიბირებას), 200-ჯერ ტკბილში ეს მახასიათებელი თითქმის 7-ჯერ მცირდება (0.107 მგ), ხოლო სრულად რაფინირებული პრეპარატის (300-ჯერ ტკბილი) მნიშვნელოვნად კარგავს (45-ჯერ) ანტიოქსიდანტურ აქტივობას.

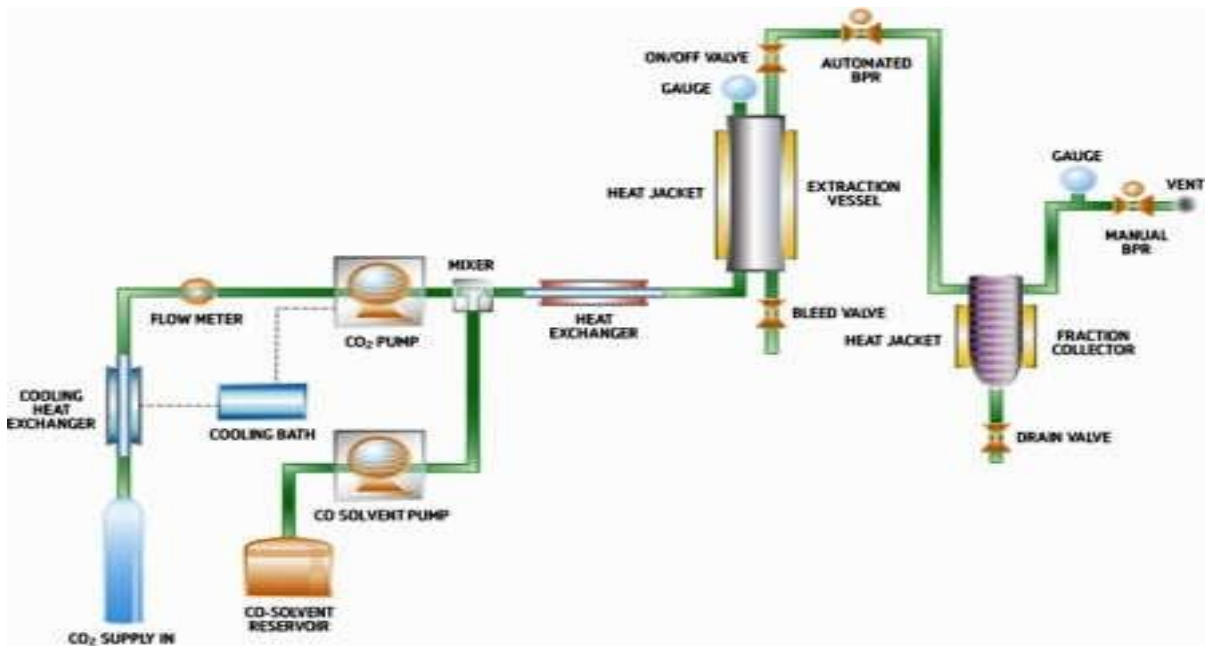


გრაფიკი 1. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) რადიკალის ინჰიბირება სტევას ფოთლის ექსტრაქტის მიერ

სტევას ფოთლის გამოყენების პერსპექტიულობას განსაზღვრავს, არა მარტო, როგორც დამატკბობლის ნულოვანი კალორიულობა, ასევე მისი მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობა.

თავი 7. სტევიას ფოთლის გადამუშავება სუპერ კრიტიკული წნევის ფლუიდური ექსტრაქციის (SFE) მეთოდით

ნედლეულის გადამუშავების ერთ-ერთ პროგრესულ მეთოდად ჩათვლილია სუპერ კრიტიკული წნევით ინერტული აირებით (ნახშირორჟანგი) ფლუიდური ექსტრაქცია. უნივერსიტეტში ფუნქციონირებს აშშ-ს წარმოების კორპორაცია Waters -ის ფლუიდური ექსტრაქტორი მოდელები SFE -100-2-C10 და SFE -500-2-C10.



სურ.61 SFE 500 ხელსაწყო სქემა

სტევიას ფოთლის სუპერ კრიტიკული წნევით ფლუიდური ექსტრაქცია ეფუძნებოდა სტევიას ფოთლების შედგენილობაში შემავალი ქიმიური ნაერთების შერჩევით ექსტრაქციას, სუფთა დიტერპენოიდული გლიკოზიდების მისაღებად. აღნიშნული მიზნის მისაღწევად შერჩეული იქნა ორი საექსტრაქციო რეჟიმი.

პირველი საექსტრაქციო მეთოდით ვახორციელებდით სტევიას ფოთლებიდან დიტერპენოიდული გლიკოზიდების გამოყოფას. ხოლო მეორე მეთოდი ეფუძნება სტევიას ფოთლიდან სხვა ნივთიერებების (მათ შორის ფენოლური) მოცილებას, რაც საშუალებას იძლევა მოვახდინოთ სტევიას ბიოაქტიური ნაერთების ფარქციონირება

და მათი ცალცალკე მიღება. შესაძლებელი ხდება ძირითადი პროდუქტის დიტერპენოიდული გლიკოზიდთა ჯამური პრეპარატის მიღების გამარტივება.

საექსტრაქციოდ აღებული იყო 10 გრამი მწვანედ გამშრალი სტევას ფოთოლი, საიდანაც ექსტრაქციის SFE მეთოდით მიღებული იქნა 31 ფრაქცია (სურ.66).

SFE მეთოდის ჩატარების რეჟიმი მოიცავს ოთხ ეტაპს და მიღებული იქნა შემდეგი ფრაქციები: პირველი ეტაპი:) ექსტრაქცია ზეკრიტიკული წნევის ნახშირორჟანგით;

1 ფრაქცია -30 წუთი 500 ბარი 40°C-ზე ნახშირორჟანგი 20გ/წთ-ში სიჩქარით;

2 ფრაქცია - 20 წუთი 500 ბარი 60°C-ზე ნახშირორჟანგი 20გ/წთ-ში სიჩქარით;

3 ფრაქცია -20 წუთი 500 ბარი 80°C-ზე ნახშირორჟანგი 20 გ/წთ-ში სიჩქარით;

მეორე ეტაპზე ხდებოდა 5%-ი კო-სოლვენტის დამატება (96%-ანი ეთანოლი)

4-7ფრაქცია - 350 ბარი 60°C-ზე ნახშირორჟანგი 20 გ/წთ-ში სიჩქარით ;

მესამე ეტაპი -10%-ი კო-სოლვენტის დამატება (96%-ნი ეთანოლი)

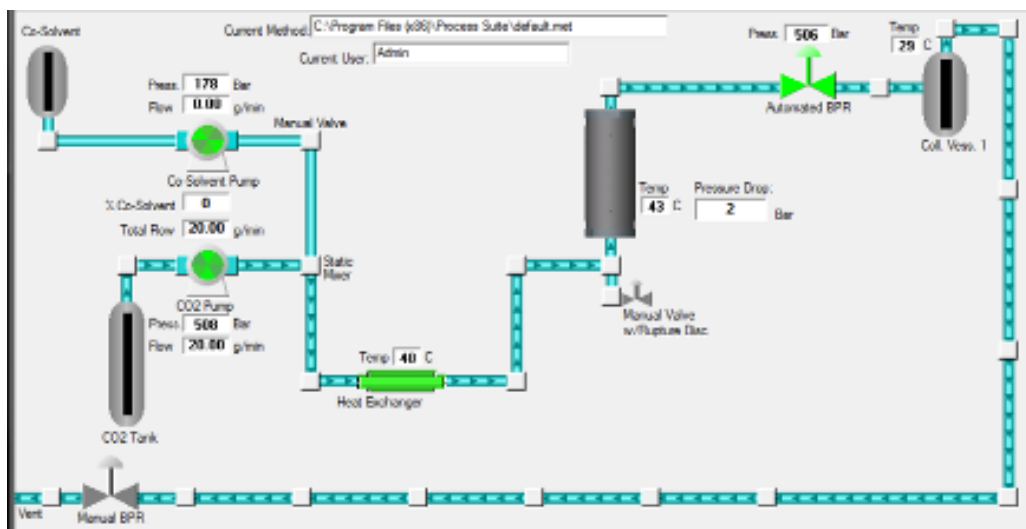
8-16 ფრაქცია - 350 ბარი 60°C-ზე ნახშირორჟანგი 20 გრ/წუთში სიჩქარით;

მეოთხე ეტაპი - 5%-ი კო-სოლვენტის დამატება (50%-ნი ეთანოლი/წყალი)

16-24 ფრაქცია - 350 ბარი 60°C-ზე ნახშირორჟანგი 20 გრ/წუთში სიჩქარით;

მეხუთე ეტაპი - 5%-ი კო-სოლვენტის დამატება (96%-ნი ეთანოლი/წყალი)

24-31ფრაქცია - 350 ბარი 60°C-ზე ნახშირორჟანგი 20 გრ/წუთში სიჩქარით.

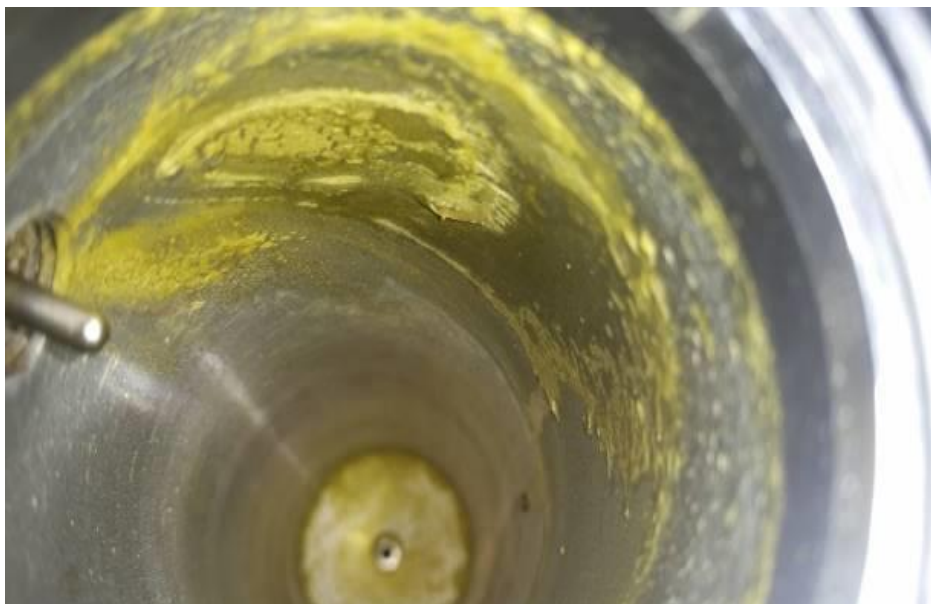


სურ. 62 პროცესის სქემა



სურ.63 სუპერ ფლუიდური ექსტრაქტორი

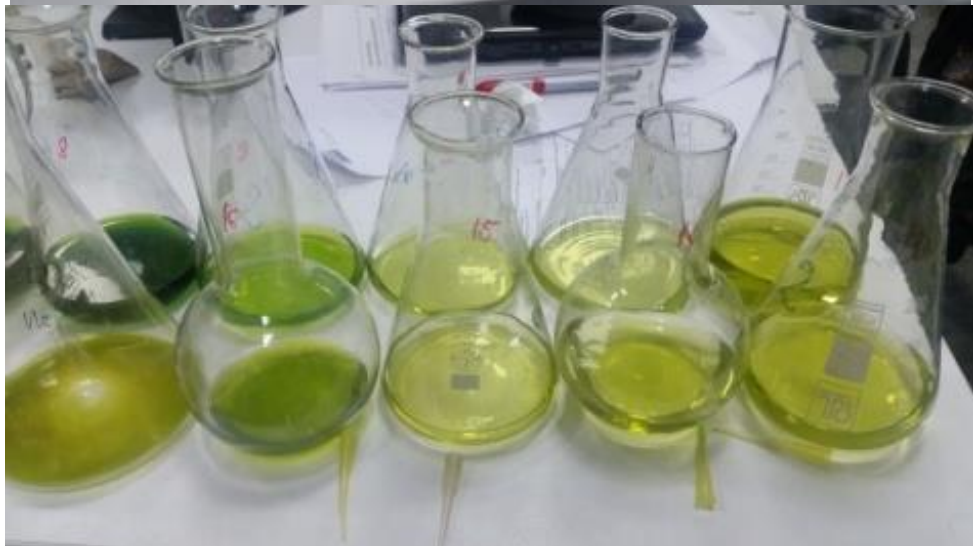
აპარატი შედგება შემდეგი ძირითადი ნაწილებისაგან: ნახშირორჟანგის რეზერვუარი, სოლვენტის (ნახშირორჟანგი) ტუმბო, კოსოლვენტის ტუმბო, კოსოლვენტის რეზერვუარი, შემრევი, ექსტრაქტორი, ამორთქლებელი-ციკლონი და სხვადასხვა მაკონტროლებელი მოწყობილობისაგან. ხელსაწყო იმართება კომპიუტერის მეშვეობით.

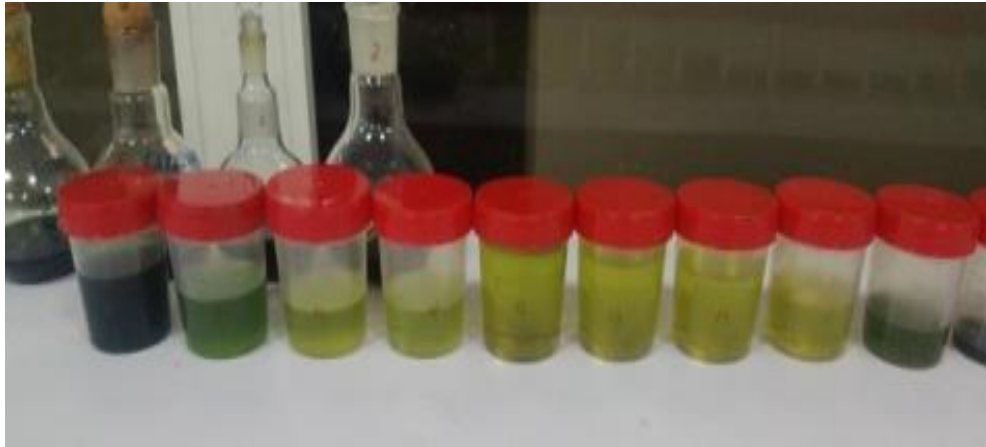


სურ. 64 SFE პრაპარატი



სურ.65 ექსტრაქტის მიმღები, გამოყოფილი კრისტალები





სურ.66 სუპერ ფლუიდური ექსტრაქტორით მიღებული ფრაქციები



სურ.67 სტევიას ფოთლი ექსტრაქციის შემდეგ

SFE მეთოდით სტევიას ფოთლის დამუშავების პირველ ეტაპზე ექსტრაგირდებოდა ორგანულ გამხსნელში ხსნადი ლიპოფილური ნაერთები (სურ 65,66). ამიტომაც ბუნებრივია ფრაქციებში 1-8 ჭარბობს ქლოროფილი A and B (37.54-1.96 mg/g, 24.16-0.427 mg/g შესაბამისად) და კაროტინი 19.1-1.0 mg/g. ფოთოლში არსებული წყლის ხარჯზე ხდება ფენოლკარბონმჟავების, კატექინებისა და ფლავონოიდების ექსტრაქცია (1-8 ფრაქცია -150-7.6 მგ/გ შესაბამისად). მე-8 ფრაქციაში პიგმენტები თითქმის არ არის. მე-9 ფრაქციიდან 31-ე ფრაქციამდე კოსოლვენტის დამატების შემდგომ პიგმენტების რაოდენობა კვალის სახითაა, ხოლო 17 და მე-19 ფრაქციაში აღემატება 3 მგ/გ-ს. ყველა ფენოლური ნაერთების რაოდენობა მე-17 ფრაქციიდან მატულობს. გამონაკლისია ფენოლკარბონმჟავები, რომელთა შემცველობა კანონზომიერების გარეშე მერყეობს. ეს აიხსნება ფენოლკარბონმჟავათა სხვადასხვანაირი ხსნადობით განსხვავებული

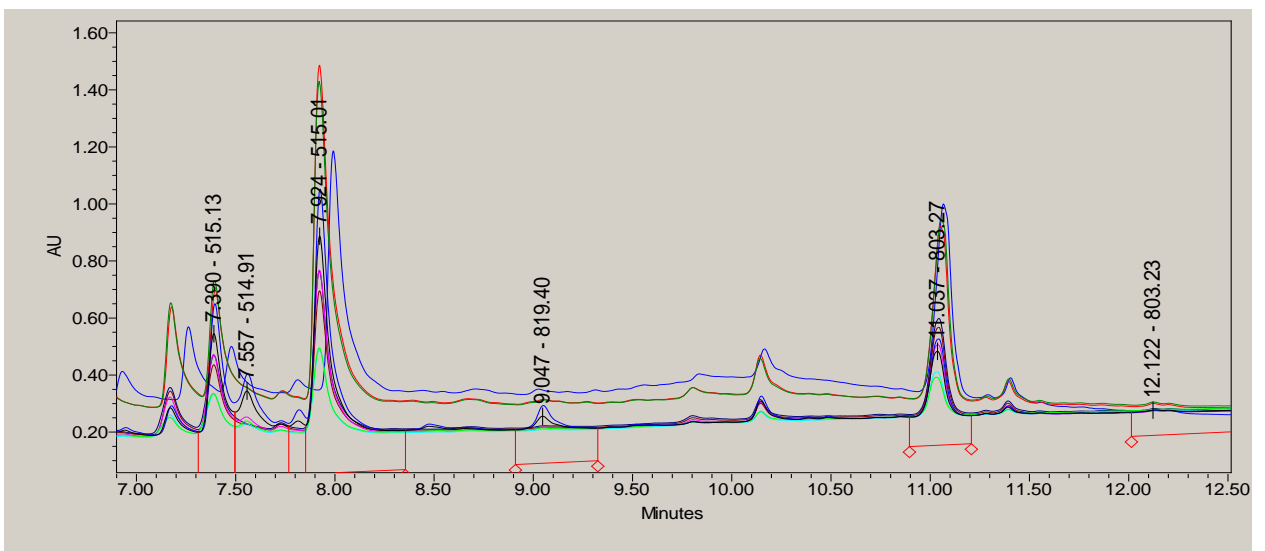
შედგენილობის ორგანულ გამხსნელებში. 1-დან მე-8 ფრაქციამდე ექსტრაქტი მდიდარია მშრალი ნივთიერებებით. იგი მერყეობს 7.75%-დან 0.27 %-მდე დიაპაზონში.

ცხრილი 11. SFE ექსტრაქტების დახასიათება

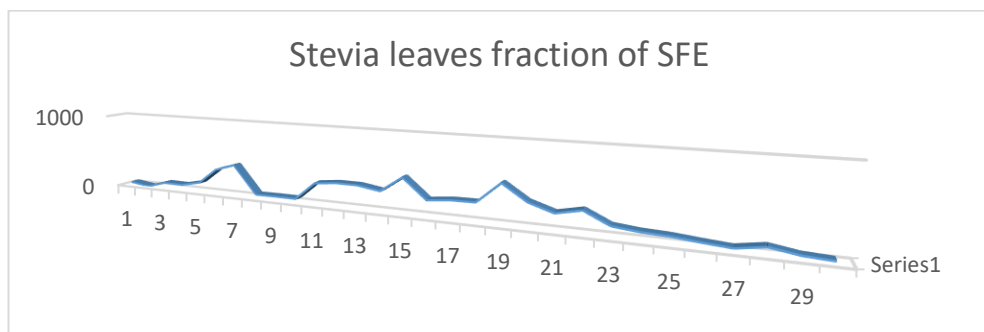
SFE ფრაქციის №	ფრაქციის მლ	ექსტრაქტის %	ქლოროფილი A, mg/g	ქლოროფილი B, mg/g	კაროტინის ჯამი, mg/g	ფენოლ მჟავა მგ/გ Caffeic Acid	საერთო კატექინი mg/g	საერთო ფლავონოიდები mg RUT/g	IC50 mg of sample
1	20	2.81	12.557	3.462	3.811	16.7	0.0	0.0	3.322
2	20	7.75	37.539	24.161	19.155	0.0	0.0	0.0	12.907
4	30	0.95	6.882	4.191	3.495	9.8	0.0	0.0	1.093
5	30	0.62	3.290	0.514	0.996	17.2	0.0	0.0	0.576
6	50	0.61	3.412	0.066	0.563	14.7	0.0	0.0	0.420
7	30	0.85	2.344	0.035	0.359	10.4	0.0	0.0	0.272
8	50	0.27	1.961	0.427	1.021	7.6	0.0	0.0	0.017
9	40	0.08	0.121	0.021	0.063	3.9	5.2	6.9	0.404
10	30	0.01	0.006	0.001	0.003	1.1	1.0	1.8	0.134
11	30	0.07	0.028	0.005	0.015	0.6	0.3	1.1	0.783
12	100	0.12	0.143	0.029	0.089	3.4	2.2	7.2	0.451
13	80	0.09	0.068	0.013	0.045	2.1	0.5	0.0	0.297
14	65	0.09	0.051	0.009	0.036	1.6	0.0	0.8	0.293
15	40	0.07	0.025	0.005	0.018	1.6	0.0	0.0	0.284
16	30	0.20	0.318	0.111	0.253	4.4	0.0	8.4	0.025
17	10	1.82	3.757	1.493	2.289	3.2	1.3	10.6	0.082
18	10	1.13	1.701	0.904	1.238	8.4	2.4	24.2	0.046
19	10	1.58	3.613	2.332	2.008	7.7	3.5	35.5	0.064
20	10	1.88	2.954	1.670	1.973	8.3	4.0	37.7	0.044
21	10	0.91	0.346	0.090	0.258	6.8	2.8	18.2	0.062
22	25	0.65	1.001	0.507	0.730	11.1	8.9	30.0	0.088
23	25	0.74	0.639	0.252	0.584	11.1	11.6	35.8	0.055
24	25	0.64	0.613	0.201	0.460	11.2	8.7	25.0	0.153
25	40	0.50	0.893	0.183	0.447	12.4	19.9	52.6	0.139
26	80	0.36	1.265	0.260	0.568	19.8	32.2	75.7	0.151
27	35	0.32	0.465	0.122	0.213	7.6	11.6	20.5	0.158
28	50	0.23	0.484	0.050	0.089	8.5	8.9	29.1	0.132
29	50	0.51	1.112	0.201	0.404	15.0	15.5	59.1	0.214
30	50	0.37	0.620	0.108	0.265	7.6	22.7	28.0	0.212
31	50	0.61	0.541	0.381	1.291	9.5	68.0	23.2	0.393

მე-9-დან მე-15 ფრაქციამდე მათი შემცველობა კლებულობს შესაბამისად ნაკლებია საკვლევი ნივთიერებებიც. მე-16 ფრაქციიდან იწყება და მე-20-მდე მატულობს როგორც ექტრაქტულ ასევე კატექინების, ფენოლკარბონმჟავებისა და ფლავონოიდების შემცველობა. 21-დან 31-ე ფრაქციამდე ექსტრაქტულ ნაერთთა შემცველობა თანდათან მცირდება (ცხრილი11).

საკვლევი ფრაქციებიდან ტკბილი ტერპენოიდული გლიკოზიდი მიღებული იქნა მე-20-დან 29-ე ფრაქციამდე (სტევიოზიდისა და რებაუდიოზიდის ჯამი 12000- 7000 ppm შესაბამისად). ხოლო 31-ე ფრაქციაში ის 500 ppm-ია. საბოლოო პროდუქტის სახით მიღებული იქნა შაქარზე 100-ჯერ და 300-ჯერ ტკბილი ორი პრეპარატი.



სურ. 68. სტევიას ფოთლის ექსტრაქტების UPLC-PDA-MS სპექტრი



გრაფიკი 2. სტევიას ფოთლის SFE ექსტრაქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობა

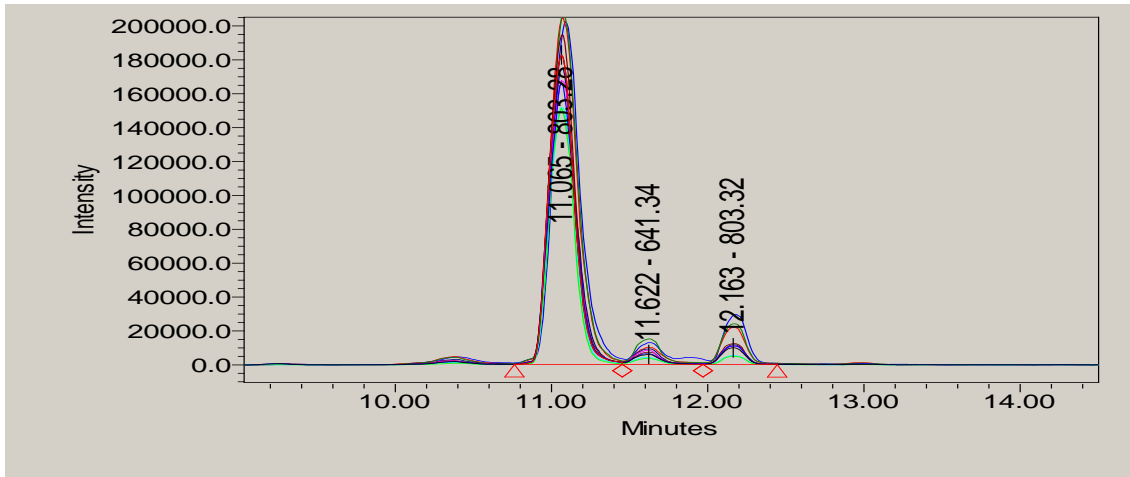
ანტიოქსიდანტურ აქტივობა შესწავლილი იქნა SFE ექსტრაქტებშიც (გრაფიკი 2). მიღებული ფრაქციებისა და პრეპარატების ანტიოქსიდანტური აქტივობა, რომელიც სხვადასხვა კლასის ფენოლური ნაერთთა ჯამური რაოდენობის ზრდასთან ერთად (ფრაქციები 8-23) მნიშვნელოვნად იზრდება.

UPLC-PDA, MS მეთოდით იგივე ფრაქციებიდან (20, 29) და ორივე პრეპარატიდან იდენტიფიცირებული და რაოდენობრივად განსაზღვრული იქნა ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების ჯამური და დომინანტი ნაერთების (სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდი) (სურ.69, 70) შემცველობა (ცხრილი 12). ფრაქციის სახით ხდებოდა 50-50 მლ ექსტრაქტის აღება. SFE ექსტრაქტებში მე-20 ფრაქციიდან ტკბილი გლიკოზიდების შემცველობა მატულობს 25-მდე, შემდეგ კი მცირდება.

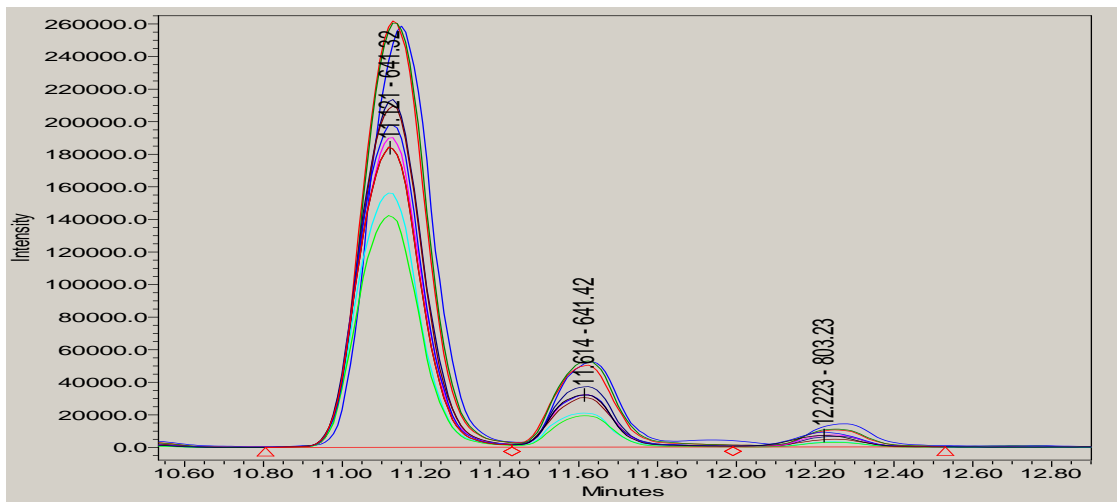
ცხრილი 12. ტკბილი დიტერპენილი გლიკოზიდების შემცველობა სტევიას ფოთლის SFE ექსტრაქტებში (მგ/50 მლ)

ნიმუში/ფრაქცია Sampler/fraction	m/z 641	m/z 803	total
SFE ფრაქცია 20	31.77±1.0	37.36±1.1	69.13±2.1
SFE ფრაქცია 21	38.29±1.1	37.7±1.1	75.99±2.3
SFE ფრაქცია 22	32.45±1.0	37.72±1.1	70.17±2.1
SFE ფრაქცია 23	26.41±0.8	31.21±0.9	57.62±1.7
SFE ფრაქცია 24	25.72±0.8	33.27±1.0	58.99±1.8
SFE ფრაქცია 25	23.35±0.7	29.02±0.9	52.37±1.6
SFE ფრაქცია 26	19.05±0.6	25.63±0.8	44.68±1.3
SFE ფრაქცია 27	17.39±0.5	24.92±0.7	42.31±1.3
SFE ფრაქცია 28	24.25±0.7	28.95±0.9	53.20±1.6
SFE ფრაქცია 29	28.56±0.9	30.86±0.9	59.42±1.8

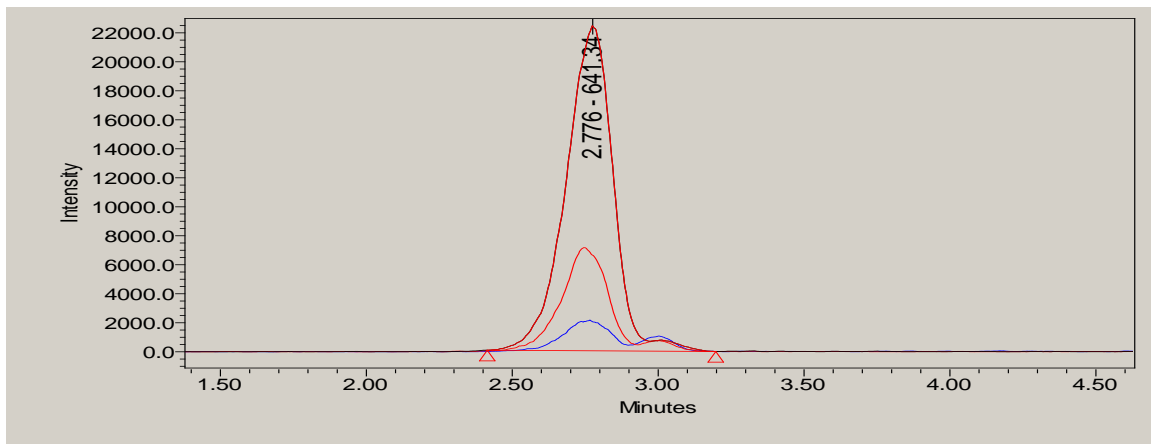
სტევიას ფოთლის SFE ექსტრაქცია კოსოლვენტად ეთანოლის გამოყენებით იძლევა შესაძლებლობას მოვახდინოთ პრეპარატების მიღება სტევიოზიდისა და რებაუდიოზიდის მაღალი შემცველობით (76 მგ/50მლ-ში).



სურ. 69. სტევიას ფოთლის SFE ფრაქცია 20- 29 UPLC-MS-QDa Negative(-) SIR Ch5
803.37 Da, CV=30, Smoothed by 15 point Mean Filter



სურ. 70. სტევიას ფოთლის SFE ფრაქცია 20- 29 UPLC-MS-QDa Negative(-) SIR Ch2
641.32 Da, CV=40, Smoothed by 15 point Mean Filter



სურ. 71. სტევიას ფოთლისაგან მიღებული პრეპარატების UPLC-PDA-MS სპექტრი SIR
641 Da (სტევია 300, სტევია 200. სტევია 100)

ცხრილი 13. ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდები SFE ფრაქციებში

	დასახელება	შეკავების დრო	ფართობი	% ფართობის	სიმაღლე	რაოდენობა	ერთეული
1	rebaudioside A +stevioside	5.602	594316	99.04	317392	2000±60	Ppm
2	ფრაქცია 29	5.640	1052679	76.29	388070	7084,98±212	Ppm
3	ფრაქცია 20	5.640	1789435	71.92	388070	12043,66±361	Ppm
4	Stavia 100	5.619	225691	77.26	98311	29,00±0.9	%
5	Stevia 300	5.626	688461	94.38	306916	93,64±2.8	%

SFE -ს მეთოდის გამოყენებით მოხერხდა სტევიას ფოთლის კომპონენტების ფრაქციონირება, თითოეულ ფრაქციაში განსაზღვრული იქნა ქლოროფილი A and B, საერთო კაროტინები, ფლავონოიდები და ფენოლკარბონმჟავები. მიღებული იქნა სხვადასხვა ხარისხის სიტკბოს მქონე ორი პრეპარატები, მათში განსაზღვრული იქნა გლიკოზიდების რაოდენობრივი შემცველობა. როგორც ფრაქციებისათვის, ასევე პრეპარატებისათვის, დადგენილი იქნა ანტიოქსიდანტური აქტივობა.

ნედლეულის შემდგომი კვლევისა და მისგან სხვადასხვა პროდუქტის მისაღებად გამოყენებული და ადაპტირებული იქნა ექსტრაქციის რამდენიმე ტექნოლოგიური რეჟიმი. ექსტრაქტის გასასუფთავებლად გამოყენებული იქნა მემბრანული ულტრაფილტრაციის ტექნოლოგია. მათი გამოყენებით შესაძლებელი გახდა ექსტრაქტებში ტკბილ დიტერპენული ნაერთების კონცენტრაციის გაზრდა და მათი პრეპარატული სახით მიღება. ასევე გამოიცადა ხსნარის გაუფერულობის სხვა ხერხები. მიღებულ პრეპარატებში სტევიოზიდისა და რებაუდიოზიდის ჯამური შემცველობა შესაბამისად 29% და 93 %-ია (სურ.71, ცხრილი 13).

თავი 8. სტევიას ფოთლების კათიონების კვლევა HPLC ქრომატოგრაფიით კონდუქტომეტრული დეტექტორის გამოყენებით

სტევიასფოთლის და მისგან მიღებული პრეპარატების ზოგიერთი კათიონის კვლევა ჩატარდა ქრომატოგრაფიული მეთოდით, კონდუქტომეტრული დეტექტორით. სტანდარტები ლითიუმის ჰიდროქსიდისმონოჰიდრატი (Li⁺), ნატრიუმის ქლორიდი (Na⁺), ამონიუმის ქლორიდი (NH₄⁺), კალიუმის ქლორიდი (K⁺), მაგნიუმის ჰიდრატი

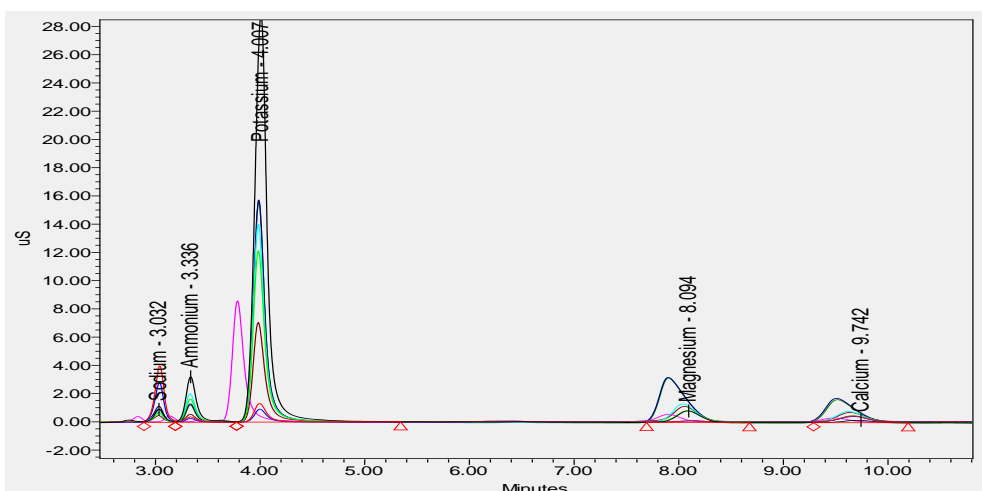
(Mg²⁺), კალიუმის ნიტრატი ტეტრაჰიდრატი(Ca²⁺), სტრონციუმის ნიტრატი ტეტრაჰიდრატი (Sr²⁺), ბარიუმის ქლორიდი დიჰიდრატი(Ba²⁺) (FisherScientific), EDTA (Serva). იზოკრატული ტუმბო (Isocratic HPLC pump -Waters 1515), დეტექტორი (Waters 432 -Conductivity), ქრომატოგრაფიული სვეტიIC-PakCationMD, ელუენტი3 mM HNO₃/0.1 mM EDTA, ელუენტის გამტარებლობა1250 ± 50 μS, საბაზო მგრძნობელობა 2000 μS, ინტეგრატორის მგრძნობელობა 0.01μS, სვეტის ტემპერატურა 35°C, პოლარობა-negative.

სტევიას ფოთლის ძირითადი კათიონების საერთო რაოდენობა დაახლოებით 5 %-მდეა. სტევიასაგან მიღებულ პრეპარატში ბუნებრივია წყალში ხსნადი კათიონებია. მათი შემცველობა პრეპარატში რომელიც შექარზე 100-ჯერ მეტია 5 %-ზე ოდნავ მეტია. პრეპარატის შემდგომი რაფინაცია პირველ ეტაპზე იწვევს კათიონების რაოდენობის მკვეთრ მომატებას, პრეპარატში რომელიც შექარზე 200 -ჯერ ტკბილია მათი შემცველობა 8 %-ზე მეტია. ხოლო სტევიას პრეპარატი რომელშიც სიტკბო 300-ჯერ აღმატება შექრისას კათიონებისსაერთო შემცველობა 0.3 %-მდეა.

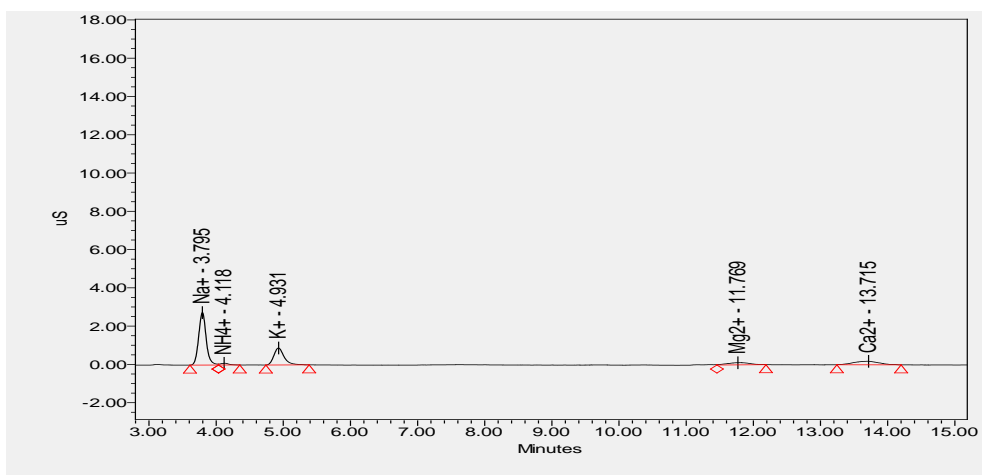
ცხრილი 14. სტევიას ფოთლის და პრეპარატების კათიონების შემცველობა

რაოდენობა PPM	Na+	NH4+	K+	Mg2+	Ca2+	total mass %
სტევიასცენტრალური ფოთლები	895,2±27	2431,6±73	46139,6±1384	1276,4±38	1485,5±45	5,227±0.2
სტევიასგვერდითი ფოთლები	928,0±28	2441,6±73	42795,1±1283	1845,0±55	2520,5±76	5,059±0.2
სტევია ამერიკა 4	447,8±13	158,9±4.8	23169,0±695	675,2±20	612,2±18	2,506±0.1
სტევია ამერიკა3	579,4±17	784,3±23	25914,7±777	1961,6±59	2371,5±71	3,161±0.1
სტევია 100	1261,6±38	1414,9±42	39163,7±1174	4413,7±132	5189,4±156	5,147±0.2
სტევია 200	967,8±29	3413,7±102	75024,5±2250	939,4±28	234,5±7.0	8,058±0.2
სტევია 300	1335,1±40	126,8±3.8	1210,3±36.3	0,0	382,0±12	0,305±0.01

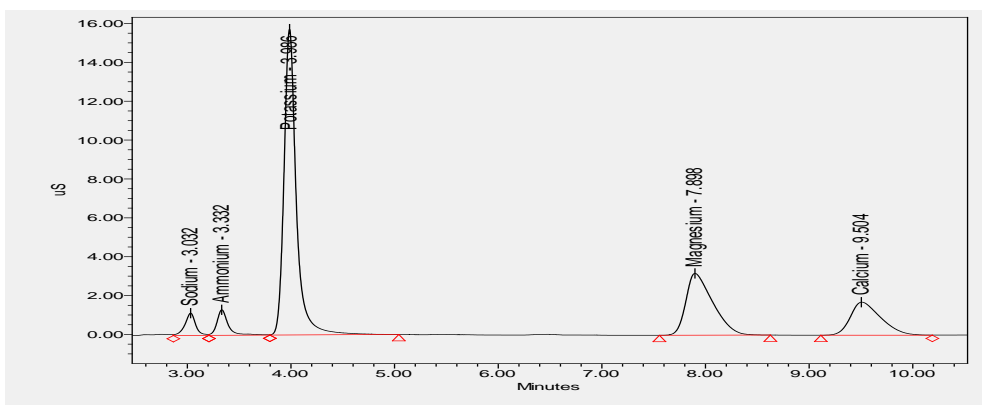
სტევიას ფოთლი განსაკუთრებით დიდი რაოდენობით აგროვებს კალიუმის იონებს, რომლის შემცველობა მთელი კათიონების 80 %-ზე მეტია. განსაკუთრებით საინტერესოა ის გარემოება, რომ პრეპარატის გასუფთავების გარკვეულ ეტაპზე ხდება კალიუმის იონების კონცენტრირება. მიღებული პრეპარატი განსაკუთრებით საინტერესოა კალიუმის მაღალი შემცველობის გამო.



სურ. 72. სტევიას ფოთლისა და პრეპარატების ქრომატოგრამები



სურ. 73. შაქარზე 300-ჯერ ტკბილი პრეპარატის ქრომატოგრამა



სურ.74 შაქარზე 100-ჯერ ტკბილი პრეპარატის ქრომატოგრამა

თავი 9. სტევიას ფოთლების ეთერზეთის კვლევა გაზური ქრომატოგრაფიით

ჰიდროდისტილიაციით მიღებული სტევიას ფოთლის ეთერზეთის კვლევა განხორციელდა გაზური ქრომატოგრაფის (TRACE™ 1310 Gas Chromatograph - Thermo Scientific) საშუალებით. ქრომატოგრაფირება მიმდინარეობდა ქრომატოგრაფიულ კაპილარულ სვეტზე - SGE BPX5 Capillary GC Column 30 მ სიგრძის, 0,25 მმ დიამეტრის და 0,25 მკმ უძრავი ფაზის ნაწილაკების ზომით. უძრავ ფაზას წარმოადგენდა 5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane.

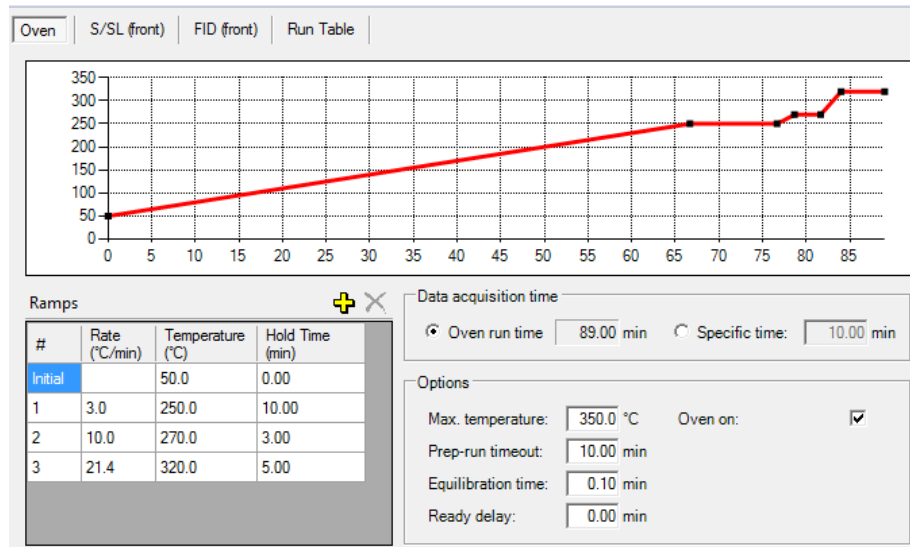
ქრომატოგრაფირებისას მოძრავ ფაზას წარმოადგენს ჰელიუმი, რომლის მოძრაობის სიჩქარე შეადგენს 0,700 მლ/წუთში. საკვლევი ნიმუშის ინჟექტირება ხორციელდებოდა SGE Analytical Science ფირმის 10 მკლ მიკროშპრიცის მეშვეობით.

The screenshot displays the configuration window for the S/SL (front) method. The 'S/SL mode' is set to 'Split' and the 'Carrier mode' is 'Constant Flow'. Under the 'Inlet' section, the temperature is 280 °C, split flow is 70.0 mL/min, split ratio is 100.0, and splitless time is 1.00 min. The 'Surge' section shows a surge pressure of 5.00 kPa and a duration of 0.00 min. The 'Septum purge' section has a purge flow of 5.0 mL/min, constant septum purge checked, and stop purge for 0.00 min. The 'Carrier flow' section shows a flow rate of 0.700 mL/min. The 'Carrier options' section includes vacuum compensation (unchecked), carrier gas saver (checked), gas saver flow of 10.0 mL/min, and gas saver time of 3.00 min.

სურათი 74.ინჟექტირის პარამეტრები (1)

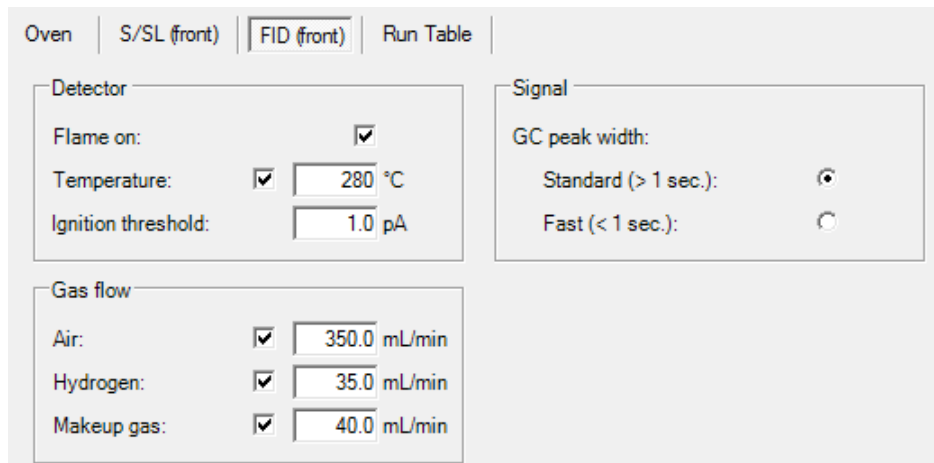
ინჟექტორის ტემპერატურული რეჟიმი 280°C-ია, ხოლო, სვეტში შესაყვანი ნიმუშის ჰელიუმის ნაკადში დაყოფა ხორციელდებოდა 1/100 თანაფარდობით. ქრომატოგრაფირება ხორციელდებოდა ტემპერატურულ გრადიენტში ოთხ ეტაპად. კერძოდ, ქრომატოგრაფირება იწყებოდა 50°C -ზე, რომელიც 3 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 250°C-მდე (მეორე ეტაპი) და ქრომატოგრაფირება გრძელდებოდა 10 წუთი. მესამე ეტაპზე 10 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 270°C-მდე და გრძელდებოდა აღნიშნულ ტემპერატურაზე 3 წუთის განმავლობაში. მეოთხე ეტაპზე 21,4 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 320°C-მდე და გრძელდებოდა აღნიშნულ ტემპერატურაზე 5 წუთის განმავლობაში. ქრომატოგრაფირების სრული დრო

შეადგენდა 89,0 ქრომატოგრაფირების მეშვეობით დაყოფილი ეთერზეთების დეტექტირება ხდებოდა ალურ-იონიზაციურ დეტექტორზე. ეთერზეთის რაოდენობრივი შემცველობა ისაზღვრებოდა პიკის ფართობის მიხედვით პროცენტებში 0,01%-ის სიზუსტით.



სურათი 75. ქრომატოგრაფირების ტემპერატურული რეჟიმი

ქრომატოგრაფირების მეშვეობით დაყოფილი ეთერზეთების დეტექტირება ხდებოდა ალურ-იონიზაციურ დეტექტორზე, რომლის სამუშაო რეჟიმი მოცემულია სურათ 5-ზე.



სურათი 76. დეტექტორის სამუშაო რეჟიმი

სტევიას ფოთოლის არომატული კომპლექსის მიღება ხდებოდა ჰიდროდისტილაციის მეთოდით. 100 გრამი გამშრალი ფოთოლი (დავაქუცმაცებული) 3 ლიტრ წყალთან ერთად თავსდებოდა კოლბაში. დისტილაცია მიმდინარეობდა კლევენჯერის ტიპის აპარატით (სურათი 77) 3 საათის განმავლობაში. კონდენსირება მიმდინარეობდა

ცირკულაციური თერმოსტატით აღჭურვილ მაცივარით რომლის ტემპერატურა შეადგენდა $0,0^{\circ}\text{C}$. მიღებული ეთერზეთი ექსტრაგირებული იქნა ჰექსანით, რომლის ორგანული ნაწილის $0,5$ მკლ ცენტრიფუგირების (2 წუთი 1350 ბრ/წთ) ინჟექტირდა ქრომატოგრაფში.

ქრომატოგრაფირების მეშვეობით მიღებული კომპონენტების იდენტიფიკაცია განხორციელდა ცნობილი შედგენილობის მქონე ნიმუშის მონაცემებთან შედარებით და დადგენილი იქნა სტევიას ეთერზეთში სპეციფიკური ტერპენოიდური შედგენილობა. ანალიზის შედეგები მოყვანილია ქრომატოგრამა №1.

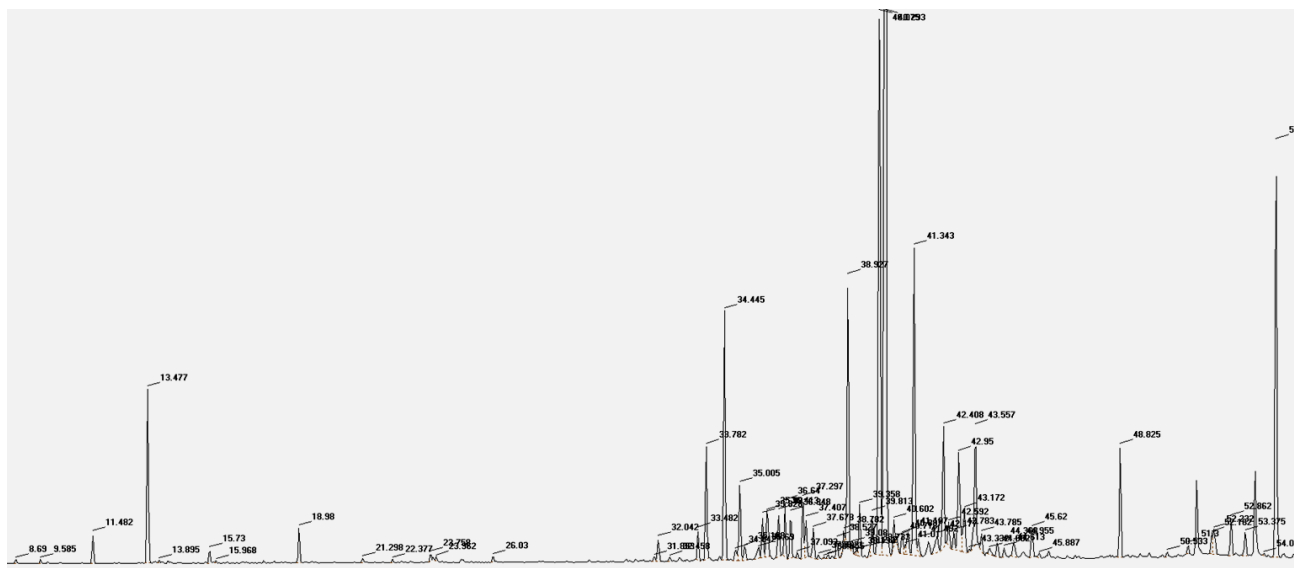


სურათი 77. ეთერზეთის მიღება კლევენჯერის მეთოდით.

მიღებული ეთერზეთი ექსტრაგირებული იქნა ჰექსანით, რომელიც დავაცენტრიფუგირეთ 2 წუთის განმავლობაში 1350 ბრ/წთ-ზე. ნიმუშის ზედა ფრაქციიდან ავიღეთ $0,5$ მკლ და შევიყვანეთ ქრომატოგრაფის ინჟექტორში. ეთერზეთის რაოდენობრივი შემცველობა ისაზღვრება პიკის ფართობის მიხედვით პროცენტებში $0,01\%$ -ის სიზუსტით.

ქრომატოგრაფირების მეშვეობით მიღებული კომპონენტების იდენტიფიკაცია განხორციელდა ცნობილი შედგენილობის მქონე ნიმუშის მონაცემებთან შედარებით

და დავადგინეთ სტევიას ეთერზეთში სპეციფიკური ტერპენოიდური შედგენილობა. ანალიზის შედეგები მოყვანილია ქრომატოგრამა (სურ 78).



სურათი 78. სტევიას ფოთლის ეთერზეთის ქრომატოგრამა.

ცხრილი №15. ეთერზეთის კომპონენტური შემადგენლობა

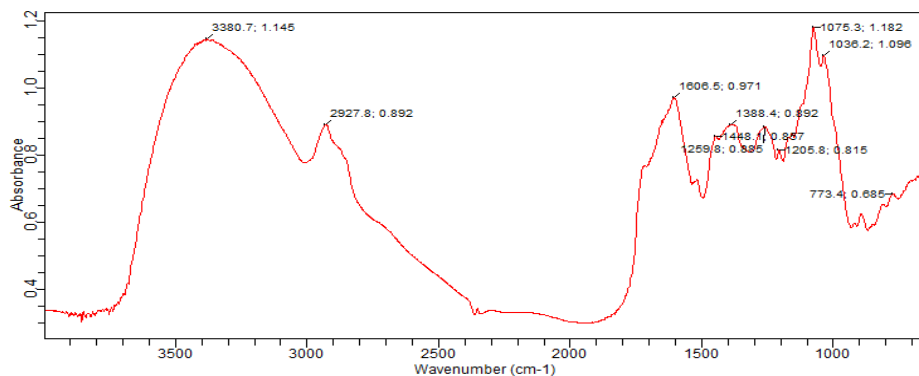
Peak Number	Component Name	Peak Time, (min)	Area, %
1	a-Thujene	8.753	0.056±0.002
2	Peak 1	9.643	0.052±0.002
3	a-Pinene	11.570	0.424±0.013
4	Peak 2	13.588	2.613±0.078
5	γ-Terpinene	13.970	0.043±0.001
6	Nonanal	15.812	0.210±0.006
7	1, 8-eucalypto	16.022	0.032±0.001
8	Peak 3	19.073	0.528±0.016
9	Peak 4	21.372	0.077±0.002
10	Peak 5	22.442	0.056±0.002
11	Perilaldehyde	23.815	0.108±0.003
12	Undecanal	26.107	0.100±0.003
13	2.6-Dodecadien	32.122	0.394±0.012
14	a-Humulene	32.518	0.071±0.002
15	a-Sellnene	33.575	0.502±0.015
16	Peak 6	33.863	1.763±0.053
17	Thymol methyl	34.552	3.891±0.117
18	(E, E)-a-Farnes	34.927	0.271±0.008
19	Peak 7	35.087	1.326±0.040
20	b-Cadinene	35.290	0.317±0.010
21	Peak 8	35.900	0.680±0.020
22	Peak 9	36.105	1.077±0.032

23	Peak 10	36.497	0.782±0.023
24	Peak 11	36.727	0.937±0.028
25	Peak 12	36.950	0.766±0.023
26	Peak 13	37.355	1.002±0.030
27	Peak 14	37.495	0.631±0.019
28	Peak 15	37.778	0.538±0.016
29	Peak 16	37.923	0.063±0.002
30	Peak 17	38.138	0.036±0.001
31	Peak 18	38.268	0.061±0.002
32	Peak 19	38.638	0.361±0.011
33	Peak 20	38.828	0.158±0.005
34	Peak 21	39.032	4.085±0.123
35	Peak 22	39.462	0.831±0.025
36	Peak 23	39.887	0.742±0.022
37	Silphinene	40.163	11.685±0.351
38	α -Longipinene	40.500	30.73±0.922
39	Peak 24	40.815	0.068±0.002
40	Peak 25	40.965	0.386±0.012
41	Peak 26	41.210	0.495±0.015
42	Modheph-2-ene	41.633	5.757±0.173
43	Peak 27	41.637	0.218±0.007
44	Peak 28	42.282	0.592±0.018
45	α -Isocomene	42.487	2.366±0.071
46	Peak 29	42.703	0.418±0.013
47	Peak 30	42.857	0.361±0.011
48	Peak 31	43.267	1.003±0.030
49	Z-Caryophyllen	43.390	0.046±0.001
50	Peak 32	44.480	0.290±0.009
51	Peak 33	44.688	0.142±0.004
52	Peak 34	45.122	0.349±0.010
53	Peak 35	45.713	0.570±0.017
54	E-Caryophyllen	48.917	1.694±0.051
55	Peak 36	50.605	0.081±0.002
56	Peak 37	51.377	0.149±0.004
57	Peak 38	52.950	0.663±0.020
58	Peak 39	53.465	0.425±0.013
59	Peak 40	54.615	7.197±0.216
60	Peak 41	55.982	0.039±0.001
61	Peak 42	57.553	0.154±0.005
62	Peak 43	58.212	0.130±0.004
63	Peak 44	63.865	0.188±0.006
64	Peak 45	65.250	0.158±0.005
65	Peak 46	67.870	0.186±0.006

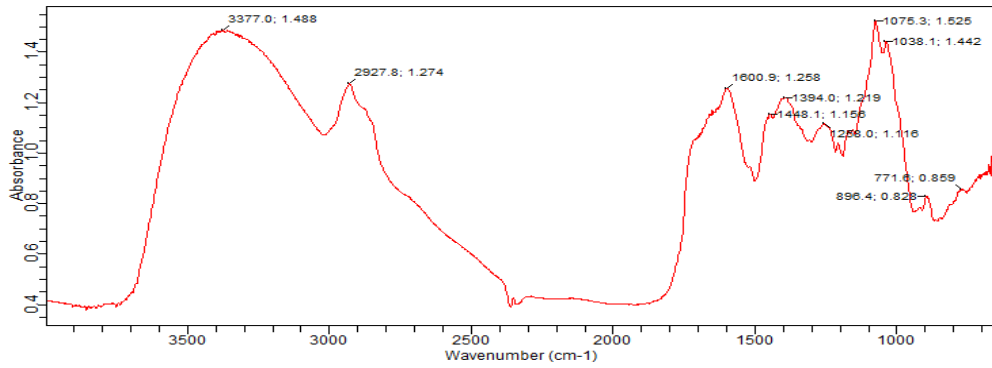
ჩვენს მიერ ქრომატოგრაფიული კვლევის შედეგად, სტევას ფოთლებისაგან მიღებული ეთერზეთის შემადგენლობაში დაფიქსირებული იქნა 65 კომპონენტი. ამათგან იდენტიფიცირებული იქნა 19 კომპონენტი, ამათგან 6 დომინანტი . კერძოდ: Thymol methyl(3.891%), Silphinene(11.685%), α -Longipinene(30.730%), Modheph-2-ene(5.757%), α -Isocomene(2.366%), E-Caryophyllen(1.694%), α -Thujene, α -Pinene, γ -Terpinene, Nonanal, 1,8-eucalyptol, Perilaldehyde, Undecanal, 2,6-Dodecadien, α -Humulene, α -Selinene, (E,E)- α -Farnes, b-Cadinene, Z-Caryophyllen,

თავი 10. სტევას პრეპარატების კვლევა ინფრაწითელი სპექტროსკოპიის მეთოდით.

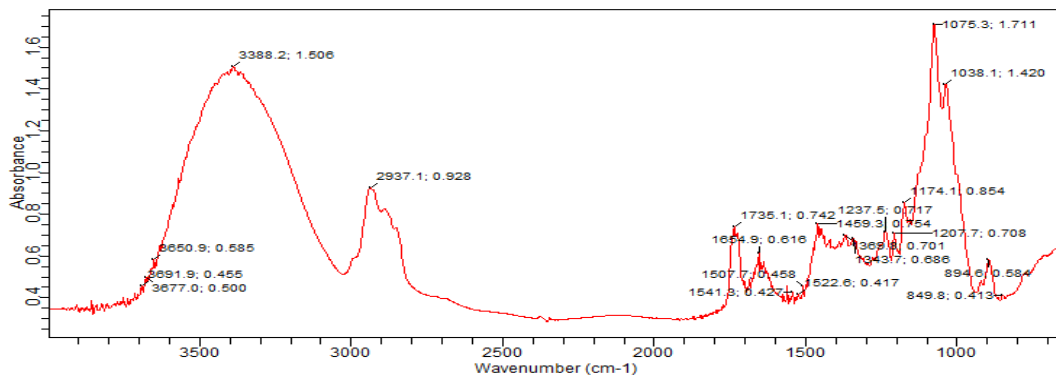
სტევას ინფრაწითელ სპექტრის არეში კვლევას ვატარებდით 700-დან 4000-ს ნმ-ზე. კვლევისათვის გამოყენებული იქნა Agilent-ს ფირმის ხელსაწყო Cary 630 FTIR. სტევას პრეპარატების კვლევისას დაფიქსირებული იქნა რამდენიმე შთანთქმის მაქსიმუმი. კერძოდ: 3377,0-3388,2 სმ^{-1} რომელიც შეესაბამება ჯგუფს; 2927,8-2937,1 სმ^{-1} რომელიც შეესაბამება -CH და სპირტებში -OH ჯგუფს; 1654,9-1735,1 სმ^{-1} რომელიც შეესაბამება C = O ჯგუფს; 1600,9-1606,5 სმ^{-1} რომელიც შეესაბამება - C = C- ჯგუფს; 1388,4-1459,3 სმ^{-1} ; 1075,3- 1036,2 სმ^{-1} რომელიც შეესაბამება - C-O-C- ს მარტივი ეთერის ჯგუფს; 894,6-896,4 სმ^{-1} რომელიც შეესაბამება (R)₂- C = C-H ჯგუფს;



სურ.79 სტევია 100-ის ახლო დიაპაზონის ინფრაწითელი სპექტრი



სურ. 80 სტევია 200-ის ახლო დიაპაზონის ინფრაწითელი სპექტრი



სურ.81 სტევია 300-ის ახლო დიაპაზონის ინფრაწითელი სპექტრი

სტევია სპრეპარატების კვლევის პროცესში შედარებული იქნა ჩვენს მიერ მიღებული სხვადასხვა სისუფთავის სპრეპარატები, რომლების მიღებული იყო გასუფთავების სხვადასხვა ეტაპზე და იდენტიფიცირებული იქნა სიტკბოს მიხედვით, როგორც შაქარზე 100, 200 და 300 ჯერ ტკბილი სპრეპარატი. სპრეპარატი სტევია 300 წარმოადგენს თეთრ დიტერპენოიდული გლიკოზიდების ჯამს, მინარევების გარეშე.

სპრეპარატების კვლევამ აჩვენა რომ სტევია 100 და 200 ფაქტობრივად მსგავსი შთანთქმით ხასიათდება, განსხვავებაა ინტენსივობაში, ხოლო სტევია 300-ში შეიმჩნევა შთანთქმის ფონის ცვლილება, რაც იძლევა საშუალებას ინფრაწითელ სპექტრის არეში კვლევა გამოყენებული იქნას სტევია საგან მიღებული სპრეპარატის სისუფთავის დასადგენად. კერძოდ 2350-3200 cm^{-1} , 1150-1800 cm^{-1} , 950-700 cm^{-1} , შთანთქმის სპექტრის ინტენსივობამ მოიკლო თითქმის 2 ჯერ. ასევე სტევია 300-ში გამოკვეთილია შთანთქმის ფონით ტალღები: 1075,3-1036,2 cm^{-1} რომელიც შეესაბამება - C-O-C- ს მარტივი ეთერის ჯგუფს, 1735,1 cm^{-1} C=O ესტერის ჯგუფს და 3377,0-3388,2 cm^{-1} რომელიც შეესაბამება -OH ჯგუფს. რაც აშკარად მიუთითებს ამ სპრეპარატში დიტერპენოიდული გლიკოზიდების მეტ შემცველობაზე.

თავი 11. სტევიას ფოთლის ტექნოლოგიური კვლევა

სტევიას ფოთლის გადამუშავების ტექნოლოგიური რეჟიმების ოპტიმიზაციის პირველი ეტაპი ითვალისწინებდა სტევიას ნედლი ფოთლის შრობის ოპტიმიზაციას, ამ დროს ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების დეგრადაციული გარდაქმნების გამოსარიცხად. შესწავლილი იქნა ფოთლის ხელოვნურ პირობებში შრობის შესაძლებლობები და ოპტიმიზირებული იქნა შრობის ტემპერატურა და ხანგრძლივობა. გამოყენებული იქნა შრობის შესაძლო მეთოდები (ბუნებრივი, კონვექციული, კომბინირებული და სხვა). ფოთლის გაშრობა გამორიცხავს ნედლეულის სეზონურობას და შესაძლებლობას იძლევა წარმოება მთელი წლის განმავლობაში უწყვეტად წარიმართოს. შესწავლილი იქნება გამხმარი ფოთლის შენახვის დროს მიმდინარე ცვლილებები.

სტევიას ექსტრაქტის მისაღებად შევისწავლეთ ექსტრაგენტის სახეობის, ექსტრაქციის ტემპერატურისა და ხანგრძლივობის გავლენას ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების გამოსავლიანობაზე და ექსტრაქტის კონცენტრაციაზე. ექსტრაქტის გასასუფთავებლად გამოყენებული იქნა მემბრანული ულტრაფილტრაციის მეთოდი, ასევე გამოიცადა სხვა სორბენტები და ხსნარის გაუფერულობის სხვა ხერხები. შესწავლილი იქნა ექსტრაქტის შრობის შესაძლებლობები და მფრქვევანა საშრობის გამოყენებისას შრობის ტექნოლოგიური პარამეტრები. შემუშავდა სხვადასხვა სიტკბოს მქონე პრეპარატების წარმოების ტექნოლოგიური პარამეტრები.

ჩატარდება ფიზიკურ და ქიმიურ მაჩვენებლებზე დაკვირვება და შემოწმდება პროდუქტების უვნებლობა და მათში ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების შემცველობა. მიღწეული იქნა მიღებული პროდუქტების ორგანოლეპტიკური მაჩვენებლების ოპტიმიზაცია.

თავი11.1. ექსტრაქტის გაწმენდის ულტრაფილტრაციული მეთოდი



სურ.81 სტევიას ფოთოლი და ღერო



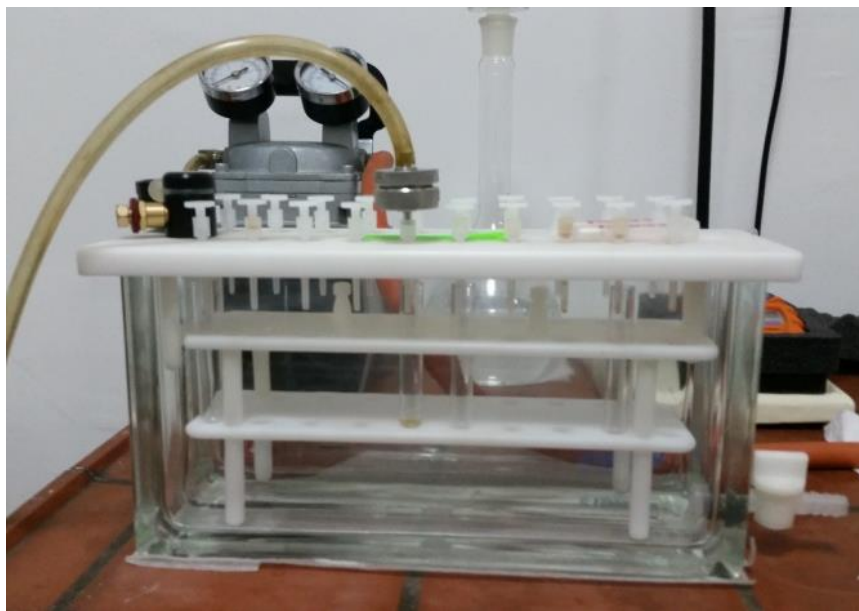
სურ. 82 სტევიას მშრალი ფოთოლი

სტევიას ფოთლის გადამუშავება შესაძლებელია როგორც ნედლად ასევე მშრალი ფოთლის მასის სახით. ფოთლის გაშრობა სასურველია, რადგანაც ნედლი ფოთლის შენახვა შესაძლებელია მხოლოდ რამდენიმე საათით, ხოლო მშრალი ფოთოლი კარგად გამშრალი და შესაბამისი პირობების დაცვით ინახება 2 წლამდე.

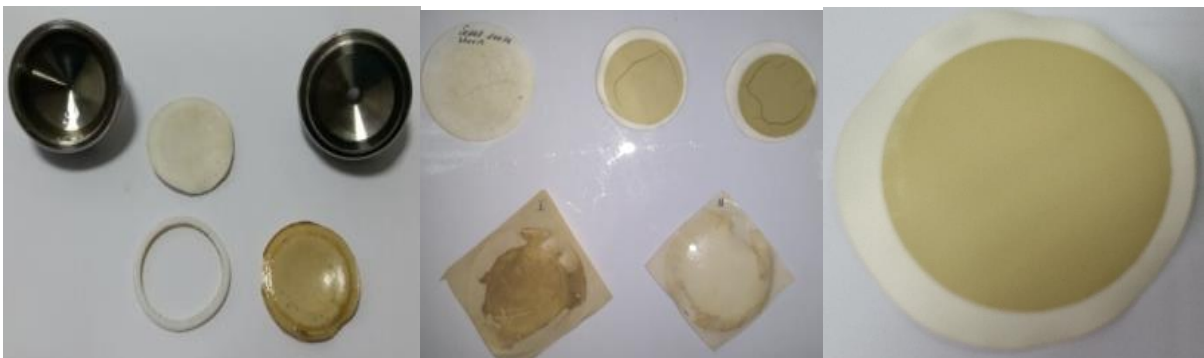
ფოთლის გადამუშავებამდე საჭიროა ღეროების მოცილება. ფოთლის ექსტრაქცია შესაძლებელია სხვადასხვა გამხსნელით (წყლის საფუძველზე). თანაფარდობა ნედლეულსა და გამხსნელს შორის დამოკიდებულია ფოთლის სიმშრალის ხარისხზე (დაახლოებით 1:7-თან).



სურ. 83 სტევიას ფოთლის ექსტრაქცია სურ. 84სტევიას ექსტრაქტის გასუფთავებამდე



სურ.85 სტევიას ექსტრაქტის გასუფთავება მემბრანულ ფილტრებში (Sigma-Aldrich) Vatman 1000 Dal Sartorius 2000 Dal

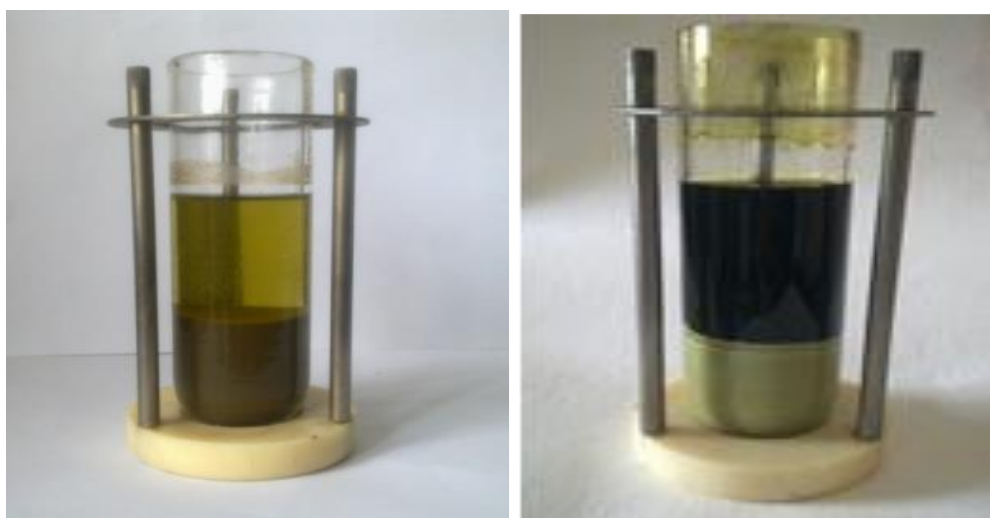


სურ.86 მემბრანული ფილტრი გამოყენების შემდეგ

სტევიას ექსტრაქტების შემდგომი კვლევისა და მისგან სხვადასხვა პროდუქტის მისაღებად გამოყენებული და ადაპტირებული იქნა ექსტრაქტის გასუფთავების რამდენიმე ტექნოლოგიური რეჟიმი. ექსტრაქტის გასასუფთავებლად გამოყენებული იქნა მემბრანული ულტრაფილტრაციის ტექნოლოგია (აღნიშნული მიზნისათვის შექმნილი იქნა Sigma-Aldrich 0,1 (Vatman) და 0,2 μm (Sartorius) ულტრაფილტრაციული მემბრანული ფილტრები, რაც გაცილებით აუმჯობესებს ექსტრაქტებში ტკბილ დიტერპენულ ნაერთთა სისუფთავეს და მათი პრეპარატიული სახით გამოყოფის შემთხვევაში გამოსავალს. ასევე გამოიცადა ხსნარის გაუფერულობის სხვა ხერხები.



სურ. 87 სტევიას ექსტრაქტი მემბრანაში გაფილტვრამდე და გაფილტვრის შემდეგ



სურ. 88 სტევიას ექსტრაქტის გამოლექვა



სურ. 89 სტევიას ექსტრაქტის შრობა



სურ. 90 სტევიას ექსტრაქტის გადაკრისტალეზა



სურ.91 სტევია 100-ჯერ ტკბილი



სურ. 92 სტევია 200-ჯერ ტკბილი



სურ.93 სტევია 250-ჯერ ტკბილი



სურ.94 სტევია 300-ჯერ ტკბილი

შესაძლებელი გახდა შაქარზე 100-ჯერ, 200-ჯერ, 250-ჯერ და 300-ჯერ ტკბილი პრაპარატების მიღება. პრეპარატები შესაძლებელია წარმოებული იქნას თხევადი, ასევე მშრალი სახით. შესაძლებელია მათი ტაბლეტირებაც.

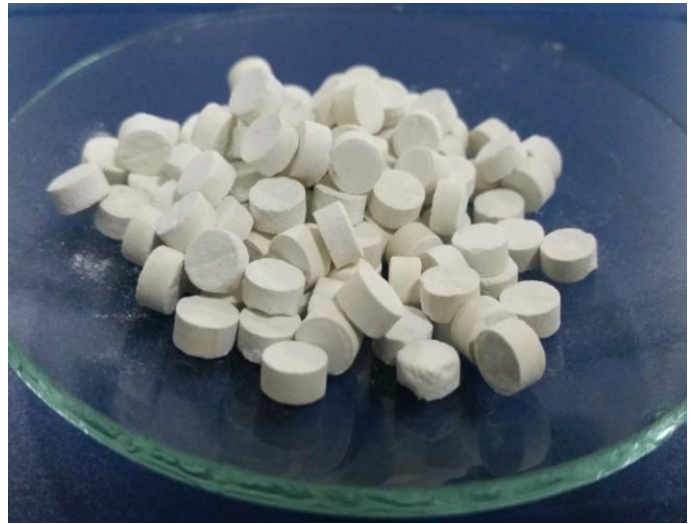
თავი 11.2. სტევიასგან მიღებული პროდუქტების ტაბლეტირება

ჩვენს მიერ მიღებული სხვადასხვა სისუფთავის პრეპარატებისათვის, რომ მიგვენიჭებინა სამომხმარებლო სახე, ჩვენს მიერ შემუშავებული იქნა, ტაბლეტების წარმოების სხვადასხვა ტექნოლოგია (მათ შორის შუმხუნა ტაბლეტის) დასამზადებლად.

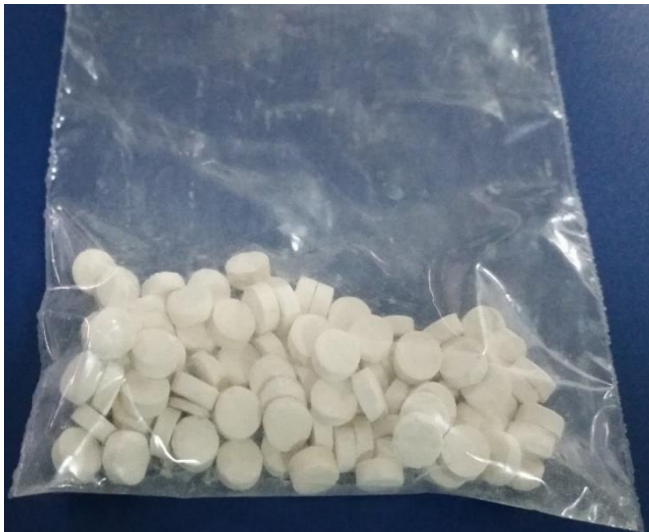
LFA Tablet Press ფირმის TDP-6s Desktop Tablet Press სატაბლეტე მოწყობილობით) ტაბლეტირებისათვის აუცილებელი ხელსაწყოები და მასალები შეძენილი იქნა „ა(ა)იპ განათლების, მეცნიერებისა და ტექნოლოგიების განვითარების თს ფონდი ხვალინდელი წარმატებისთვის,, დაფინანსებული გრანტის ,, დაბალკალორიული ტკბილი ტაბლეტები” SIG/23/1/2015 მეშვეობით. მიღებული იქნა 0.1 გ მასის ტაბლეტები რომელთა სიტკბო 1 კოვზი შაქრის ექვივალენტურია.



სურ. 94 ტაბლეტირების დანადგარი



სურ. 95 მზა ტაბლეტები



სურ. 96 დაფასოებული ტაბლეტები

დასკვნები

1. შესწავლილია საქართველოში ინტროდუცირებული 4 განსხვავებული ჯიშის სტევიას ფოთლის ქიმიური შედგენილობა. მიღებული იქნა პრეპარატი და HPLC-UV, IR და UPLC-PDA, MS მეთოდების გამოყენებით იდენტიფიცირებული იქნა 12 დიტერპენული გლიკოზიდი: აგლიკონი-სტევიოლი $[M-H]^+$ - m/z 319, $[M-H -]$ - m/z 317; სტევიოლ-გლუკოზიდი $-[M-H-]$ - m/z 479; სტევიოლ-დი-გლუკოზიდი $-[M-H -]$ - m/z 625; სტევიოლბიოზიდი $-[M-H-]$ - m/z 641; სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდს $[M-16][M-H-]$ - m/z 787; სტევიოზიდი- $[M-H-]$ - m/z 803; სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდს ანუ რეზაუდიოზიდი A- $[M-H-]$ - m/z 965; სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდს ანუ რეზაუდიოზიდი D- $[M-H-]$ - m/z 1127; სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდს ანუ რეზაუდიოზიდი C- $[M-H-]$ - m/z 949; სტევიოლის დი-გლუკოზიდი ანუ რუბუსოზიდი $-[M-H-]$ - m/z 641; სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდს ანუ რეზაუდიოზიდი F- $[M-H-]$ - m/z 935; სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდს ანუ დულკოზიდი A- $[M-H-]$ - m/z 787;
2. 8 ფენოლური ნაერთი: 3-caffeoylquinic acid (3CQA) $-[M-H -]$ - m/z 353; 4-caffeoylquinic acid (4CQA) $-[M-H -]$ - m/z 353; 3,5-di-caffeoylquinic acid (3,5diCQA) $-[M-H -]$ - m/z 515; 4,3,4-dicaffeoylquinic acid(3,4 diCQA) $-[M-H -]$ - m/z 515; კვერცეტინის-გალაქტოზიდი $-[M-H -]$ - m/z 463; რუთინი $-[M-H -]$ - m/z 609; კვერცეტინ-რამნოზიდი $-[M-H -]$ - m/z 447; კვერცეტინ-პენტოზიდი - m/z 433;
3. შესწავლილი იქნა სტევიას ფოთლისაგან მიღებული ზეთის შემადგენლობა და დააგენილი იქნა C18 კარბონმჟავების დომინანტობა, ისინი ცხიმის საერთო შემცველობის 50%-ზე მეტს შეადგენს. ზეთიდან იდენტიფიცირებული იქნა შემდეგი მჟავები: C 18- Linolenic acid (C18:2n6c), Cis-Linolic Acid (ω-6), gamma-Linolenic acid (C18:3n6) γ-cis-Linolenic acid (ω -6), α-Linolenic acid C18:3n3) α -Linolenic acid (ω -3)
4. შესწავლილია სტევიოლ-გლიკოზიდების რაოდენობრივი შემცველობა სხვადასხვა ჯიშის სტევიას ფოთლსა და მისგან წარმოებულ პრეპარატებში. დადგენილია, რომ საქართველოში გავრცელებული სტევიას (*Stevia rebaudiana*) ფოთლის ტკბილი გლიკოზიდების დომინირებადი ნაერთი სტევიოზიდია, რომელიც

6-7 %-მდე გროვდება ფოთლებში. ზრდასრული ფოთლები ტკბილ ნაერთებს მეტი რაოდენობით აგროვებენ.

5. სტევას ფოთლებისაგან მიღებული იქნა ეთერზეთი და მის შემადგენლობაში დაფიქსირებული 65 კომპონენტიდან იდენტიფიცირებული იქნა 19. ამათგან 6 არის დომინანტური: Thymol methyl (3.891%), Silphinene (11.685%), α -Longipinene (30.730%), Modheph-2-ene(5.757%), α -Isocomene (2.366%), E-Caryophyllen (1.694%), α -Thujene, α -Pinene, γ -Terpinene, Nonanal, 1,8-eucalyptol, Perilaldehyde, Undecanal, 2,6-Dodecadien, α -Humulene, α -Selinene, (E,E)- α -Farnes, β -Cadinene, Z-Caryophyllen.

6. განისაზღვრა სტევას ფოთლისა და მისგან მიღებული პროდუქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობა DPPH მეთოდით. დადგინდა რომ,სტევას ფოთლის ანტიოქსიდანტური აქტივობა ჯიშების მიხედვით თითქმის თანაბარია. გადამუშავების პროცესში კი მნიშვნელოვნად იცვლება. საქაროზაზე 100-ჯერ ტკბილი პრეპარატი განსაკუთრებით აქტიურია (მხოლოდ 0.015 მგ ახდენს DPPH ინჰიბირებას), 200-ჯერ ტკბილში ეს მახასიათებელი თითქმის 7-ჯერ მცირდება (0.107 მგ), ხოლო სრულად რაფინირებული პრეპარატში (300-ჯერ ტკბილი) ანტიოქსიდანტური აქტიურობა 45-ჯერ ნაკლებია, ვიდრე საწყისში.

7. შემუშავდა სტევას ფოთლის გადამუშავების სუპერ კრიტიკული წნევის ფლუიდური ექსტრაქციის (SFE) მეთოდი. შესაძლებელი გახდა ფოთლის ფრაქციონირება ბიოაქტიური ნაერთების განსხვავებული შედგენილობით.

8. სტევას ფოთლების კათიონების ქრომატოგრაფიით კონდუქტომეტრული დეტექტორით კვლევისას დადგინდა რომ, სტევას ფოთლის ძირითადი კათიონების საერთო რაოდენობა დაახლოებით 5 %-მდეა. პრეპარატში რომელიც შაქარზე 100-ჯერ მეტია 5 %-ზე ოდნავ მეტია. პრეპარატის შემდგომი რაფინაცია პირველ ეტაპზე იწვევს კათიონების რაოდენობის მკვეთრ მომატებას. პრეპარატში რომელიც შაქარზე 200 -ჯერ ტკბილია მათი შემცველობა 8 %-ზე მეტია, ხოლო სტევას პრეპარატი რომელშიც სიტკბო 300-ჯერ აღემატება შაქრისას კათიონების საერთო შემცველობა 0.3%-მდეა. დომინანტი კათიონი კალიუმია, რომლის შემცველობა მთელი კათიონების 80 %-ზე მეტია.

9. სტევიას ფოთლებიდან მიღებული სხვადასხვა პრეპარატის კვლევამ ინფრაწითელი სპექტროსკოპიით აჩვენა რომ, სტევია 100 და 200 ფაქტობრივად მსგავსი შემადგენლობისაა, ხოლო სტევია 300-ში შეიმჩნევა განსხვავებული შთანთქმის სპექტრი, რაც მის შედარებით სისუფთავეზე მეტყველებს. კერძოდ 2350-3200 სმ⁻¹, 1150-1800 სმ⁻¹, 950-700 სმ⁻¹, შთანთქმის სპექტრის ინტენსივობა კლებულობს თითქმის 2 ჯერ. ასევე სტევია 300-ში გამოკვეთილია შთანთქმის ინტენსივობის მატება ტალღებზე: 1075,3-1036,2 სმ⁻¹, რომელიც შეესაბამება - C-O-C- ს მარტივ ეთერულ ჯგუფს, 1735,1 სმ⁻¹ C=O ესტერულ ჯგუფს, ხოლო 3377,0-3388,2 სმ⁻¹ -OH ჯგუფს, ეს მახასიათებელი პირდაპირპროპორციულ კავშირშია დიტერპენოიდული გლიკოზიდების შემცველობასთან.

10. შემუშავდა სტევიასგან მიღებული პროდუქტების ტაბლეტირების ტექნოლოგიური რეჟიმები. ჩატარდა მიღებული პრეპარატების ქიმიური ანალიზი.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. რ. დავითაძე, ი. ჯაფარიძე, ა. კალანდია ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრის DPPH მეთოდი. საერთაშორისო სამეცნიერო-პრაქტიკული კონფერენცია. გვ. 132-134
2. რ. დავითაძე, ა. კალანდია სტევია - უსაფთხო დამატკბობელის საერთაშორისო სამეცნიერო-პრაქტიკული კონფერენცია. გვ. 28-30
3. რ. დავითაძე, ი. ჯაფარიძე, ა. კალანდია სტევიას (*Stevia Rebaudiana*) ფოთლის ანტიოქსიდანტური აქტიობა.
4. Abou-Arab, A.E.; Abou-Arab, A.A.; Abu-Salem, M.F. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviol glycosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African J. Food Sci.* 2010, 4, 269–281.
5. Ahmed, M. S. and Dobberstein, R. H. 1982b. *Stevia rebaudiana*. III. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of rebaudiosides B, D, and E, dulcoside A, and steviolbioside. *J. Chromatogr.* 245: 373-376.
6. Akashi, H. & Yokoyama, Y. "Dried leaf extracts of stevia. Toxicological test." *Shokuhin Kogyo*, 18(20), 34-43, 1975.
7. Alekseev V.P. / Honey plant ca-a jhee // *Бюллетень ВНИИЧИСК*. 1956г. №1. ст. 168-169.
8. Alvares, M., et.al., Abstract Pap., Semin. Bras. *Stevia Rebaudiana* Bertoni 1st, 1981, p. XIII.I.
9. Asadujjaman Md., Md. Aslam Hossain, Utpal Kumar Karmakar Assessment of DPPH free radical scavenging activity of some medicinal plants Pharmacy Discipline, Life Science School, Khulna University, Khulna -9208, Bangladesh *email: asadjaman@outlook.com
10. B. Zimmermann, U. Woelwer-Rieck and M. Papagiannopoulos, *Food Analytical Methods*, 2012, 5, 266-271.
11. Bender 1,*, † ID, Karina V. Killermann 2, †, Dirk Rehmann 2 and Helmut H. Weidlich 1 1 Institut Kurz GmbH, Stöckheimer Weg 1. Effect of *Stevia rebaudiana* Bert. Addition on the Antioxidant Activity of Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Juices Cecilia Beverages 2018, 4, 52; doi:10.3390/beverages4030052 www.mdpi.com/journal/beverages
12. Bennett, R. D., Lieber, E. R., and Heftmann, E. 1967. Biosynthesis of steviol from (-)-kaurene. *Phytochemistry* 6: 1107-1110.
13. Bertoni, M.S. "Caa-hee (*stevia rebaudiana* Bertoni)." *Bol. Est. Agr. Puerto Bertoni Paraguay*, V(2), 54, 1911.

14. Bertoni, M.S. "El Caa-ehe (*Eupatorium rebaudianum*, species nova)". *Rev. Agr., Ascunio* 1: 35-37, 1899.
15. Bertoni, M.S. "Le Kaa He-e. Sa nature et ses proprietes." *Ancient.Paraguayos*, 1(5), 1-14, 1905.
16. Bitasta Mandal 1 and Swati Madan 1* Radical Scavenging Activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni From Different Geographical Sources *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* Vol. 2 No. 1 2013 www.phytojournal.com Page | 14 Preliminary Phytochemical Screening and Evaluation of Free Vol. 2 No. 1 2013
17. Bourgeois, D.M.; Llodra, J.C. Global burden of dental condition among children in nine countriesparticipating in an international oral health promotion programme, 2012–2013. *Int. Dent. J.* 2014, 64,27–34. [CrossRef] [PubMed]
18. Brandle, J. (1999). Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science* 79(1): 85-92. {a} Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 1391 Sandford St., London, ON, N5V 4T3, Canada
19. Brandle, J. E., A. N. Starratt, et al. (1998). *Stevia rebaudiana*; Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science* 78(4): 527-536. Agric. and Agri-Food Can., South. Crop Prot. and Food Res. Cent., 1391 Sandford St., London, ON N5V 4T3, Canada
20. Brandle, J.E.; Starratt, A.N.; Gijen, M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological and chemical properties. *Can. J. Plant Sci.*1998, 78, 527-536.
21. Bratus T.N. Kozlova M. *Sbornik Sensornye sistemy*. Red.Gusuni G. V. Nauka 1978 p. 138.
22. Bridel, M. & Lavielle, R. "Sur le principe sucre des feuilles de kaa-he-e (*stevia rebaudiana* B)." *Compt. Rend., Acad. Sci., Parts* 192, 1123-1125, 1931.
23. Bugaj, B.; Leszczynska, T.; Pysz, M.; Kopec, A.; Pacholkarz, J.;Pysz-Izdebska, K.Characteristics and health promoting properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Zywn. NaukaTechnol. Jakosc*2013, 3, 27–38.
24. C. Gardana, M. Scaglianti and P. Simonetti, *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 1463- 1470.
25. Carbonell-Capella, J.M.; Barba, F.J.; Esteve, M.J.; Frigola, A. High pressure processing of fruit juice mixturesweetened with *Stevia rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innov. FoodSci. Emerg. Technol.* 2013, 18, 48–56. [CrossRef]

26. Carbonell-Capella, J.M.; Barba, F.J.; Esteve, M.J.; Frigola, A. Quality parameters, bioactive compounds and their correlation with antioxidant capacity of commercial fruit-based baby foods. *Food Sci. Technol. Int.* 2014, 20, 479–487. [CrossRef]
27. Carbonell-Capella, J.M.; Sic Zlabur, J.; Rimac Brn ˇ circ, S.; Barba, F.J.; Grimi, N.; Koubaa, M.; Brn ˇ circ, M.; Vorobiev, E. Electrotechnologies, microwaves, and ultrasounds combined with binary mixtures of ethanol and water to extract steviol glycosides and antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* leaves. *J. Food Process. Preserv.* 2017. [CrossRef]
28. Carino, K.M.; Shinada, K.; Kawaguchi, Y. Early childhood caries in northern Philippines. *Commun. Dent. Oral Epidemiol.* 2003, 31, 81–89. [CrossRef]
29. Carneiro, J. W. P., A. S. Muniz, et al. (1997). Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. *Canadian Journal of Plant Science* 77(3): 473-474. {a} Univ. Estadual Maringa, Dep. Agron., Av. Colombo 5790, Maringa, Parana 87020-900, Brazil
30. Cellular and Molecular Biology E-ISSN : 1165-158X / P-ISSN : 0145-5680 www.cellmolbiol.org Original Research The Effects of different nitrogen doses on antioxidant and antimicrobial activity of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bert.) Mehmet Atas1 , Nuraniye Eruygur2 , Esra Ucar3*, Yasar Ozyigit4 , Kenan Turgut5 *Cell Mol Biol (Noisy le Grand)* 2018 | Volume 64 | Issue 2
31. Chappell, J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 521-547.
32. Chaturvedula, V.S.P.; Clos, J.F.; Rhea, J.; Milanowski, D.; Mocek, U.; DuBois, G.E.; Prakash, I. Minor diterpenoid glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry Lett.* 2011. (in press)
33. Chaturvedula, V.S.P.; Prakash, I. Structures of the novel diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Carbohydr. Res.* 2011, 346, 1057–1060.
34. Chaturvedula, V.S.P.; Rhea, J.; Milanowski, D.; Mocek, U., Prakash, I. Two minor diterpene glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana*. *Nat. Prod. Commun.* 2011, 6, 175-178.
35. Criado, M.N.; Barba, F.J.; Frigola, A.; Rodrigo, D. Effect of *Stevia rebaudiana* on oxidative enzyme activity and its correlation with antioxidant capacity and bioactive compounds. *Food Bioprocess Technol.* 2014, 7, 1518–1525. [CrossRef]
36. Das, S., A. K. Das, et al. (1992). Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Caries Research* 26(5): 363-366. {a}

- Dep. Pediatric Dentistry, Coll. Dentistry, University Illinois at Chicago, 801 South Paulina, Chicago, Ill. 60612
37. Debnath, M. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Steviarebaudiana*. *J. Med. Plant. Res.* 2008, 2, 45–51.
 38. DeFronzo, R.A.; Ferrannini, E. Insulin resistance: A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991, 14, 173–194.[CrossRef] [PubMed]
 39. Dolder, F., Lichti, H., Mosettig, E. and Quitt, P. 1960. The structure and stereochemistry of steviol and isosteviol. *J. Amer. Chem. Soc.* 82: 246-247.
 40. DuBois, G.E. and Stephenson, R.A. 1984. Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogues with improved organoleptic properties. *J. Med. Chem* 28:93-98.
 41. Dye, B.A.; Tan, S.; Smith, V.; Lewis, B.G.; Barker, L.K.; Thornton-Evans, G.; Eke, P.I.; Beltran-Aguilar, E.D.; Horowitz, A.M.; Li, C.H. Trends in oral health status: United States, 1988–1994 and 1999–2004. *Vital Health Stat.* 2007, 248, 1–92.
 42. Dzyuba, O. O. (1998). *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsley: A new source of natural sugar substitute for Russia. *Rastitel'nye Resursy* 34(2): 86-95. {a} N. I. Vavilov All-Russ. Res. Inst. Plant Breed., St. Petersburg, Russia
 43. e -Rieck, W. Tomberg and A. Wawrzun, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 12216-12220.
 44. Ermakov, E. I. and A. A. Kochetov (1996). Specific features in growth and development of *Stevia* plants under various light regimes in regulated conditions. *Doklady Rossiiskoi Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk*(1): 8-9. *Agrophys. Inst.*, 194354 St. Petersburg, Russia
 45. Esmat A Abou-Arab Ferial M Abu-Salem Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus *African Journal of Food Science* Vol. 4(10), pp. 627–634, October 2010 Available online <http://www.academicjournals.org/ajfs> ISSN 1996-0794 ©2010 Academic Journals
 46. Esmat A. Abou-Arab* and Ferial M. Abu-Salem Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus *African Journal of Food Science* Vol. 4(10), pp. 627–634, October 2010 Department of Food Technology, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt Accepted 17 May, 2010
 47. F. Cacciola, P. Delmonte, K. Jaworska, P. Dugo, L. Mondello and J. I. Rader, *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 2012-2018.

48. Ferrazzano, G.F.; Amato, I.; Cantile, T.; Sangianantoni, G.; Ingenito, A. In vivo remineralising effect of GCTooth mousse on early dental enamel lesions: SEM analysis. *Int. Dent. J.* 2011, 61, 210–216. [PubMed]
49. Ferrazzano, G.F.; Cantile, T.; Quarto, M.; Ingenito, A.; Chianese, L.; Addeo, F. Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization in vitro. *Aust. Dent. J.* 2008, 53, 314–319. [CrossRef] [PubMed]
50. Ferrazzano, G.F.; Roberto, L.; Amato, I.; Cantile, T.; Sangianantoni, G.; Ingenito, A. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: An in vivo study. *J. Med. Food* 2011, 14, 907–911. [CrossRef] [PubMed]
51. Ferrazzano, G.F.; Sangianantoni, G.; Cantile, T.; Ingenito, A. Relationship between social and behavioural factors and caries experience in schoolchildren in Italy. *Oral Health Prev. Dent.* 2015. [CrossRef]
52. Ferrazzano, G.F.; Scaravilli, M.S.; Ingenito, A. Dental and periodontal health status in Campanian children and relation between caries experience and socio-economic behavioural factors. *Eur. J. Paediatr. Dent.* 2006, 7, 174–178. [PubMed]
53. Ferro, R.; Besostri, A.; Meneghetti, B.; Olivieri, A.; Benacchio, L.; Tabaccanti, S.; Mazzoleni, S.; Favero, G.; Stellini, E. Oral health inequalities in preschool children in North-Eastern Italy as reflected by caries prevalence. *Eur. J. Paediatr. Dent.* 2007, 8, 13–18. [PubMed]
54. Folayan, M.O.; Kolawole, K.A.; Oziegbe, E.O.; Oyedele, T.; Oshomoji, O.V.; Chukwumah, N.M.; Onyejaka, N. Prevalence, and early childhood caries risk indicators in preschool children in suburban Nigeria. *BMC Oral Health* 2015, 15, 72. [CrossRef] [PubMed]
55. Fors, A. 1995. A new character in the sweetener scenario. *Sugar J.* 58: 30.
56. Francisco José Barba, María Nieves Criado, Clara Miracle Belda-Galbis, María José Esteve, Dolores Rodrigo. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization Author links open overlay panel *Food Chemistry* Volume 148, 1 April 2014, Pages 261-267 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.048>
57. Gianmaria Fabrizio Ferrazzano, Tiziana Cantile, Brunella Alcidi, Marco Coda, Armando Zarrelli, Giovanni Di Fabio and Antonino Pollio/Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? A Review *Molecules* 2016, 21, 38; doi:10.3390/molecules21010038

58. Goyal, S.; Samsher, S.; Goyal, R. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2010, *61*, 1–10.
59. Gupta, E.; Purwar, S.; Sandaram, S.; Gai, G.K. Nutritional and therapeutic values of *Steviarebaudiana*: A review. *J. Med. Plants Res.* 2013, *7*, 3343–3353.
60. H. C. Makapugay, N. P. D. Nanayakkara and A. D. Kinghorn, *Journal of Chromatography A*, 1984, *283*, 390-395.
61. H. Mizukami, K. Shiiba and H. Ohashi, *Phytochemistry*, 1982, *21*, 1927-1930.
62. Haga, T., Ise, R., and Kobayashi, T. 1976. A method for purifying stevioside (English abstr.).Jap. Patent 51-131900.
63. Hande Karakose, Rakesh Jaiswal, and Nikolai Kuhnert / Characterization and Quantification of Hydroxycinnamate Derivatives in Stevia rebaudiana Leaves by LC-MS [dx.doi.org/10.1021/jf202185m](https://doi.org/10.1021/jf202185m) | *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 10143–10150
64. Hedden, P., and Kamiya, Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *48*: 431-460.
65. Hodge, J.e. & Inglett, G.E. "Structural aspects of glycosidic sweeteners containing (1'2)-linked disaccharides." In Inglett, G.E. (ed.) *Symposium Sweeteners*. The Avi Publishing Company, Inc. Conn., 1974, pp. 216-234.
66. Huebler, M. O., A. Bracht, et al. (1994). Influence of stevioside on hepatic glycogen levels in fasted rats. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* *84*(1): 111-118. Lab. Liver Metabolism, Univ. Maringa, 87020900 Maringa, Brazil
67. Ibrahim, M.A.; Rodenburg, D.L.; Alves, K.; Fronczek, F.R.; McChesney, J.D.; Wu, C.; Nettles, B.J.; Venkataraman, S.K.; Jaksch, F. Minor diterpene glycosides from the leaves of Stevia rebaudiana. *J. Nat. Prod.* 2014, *77*, 1231–1235. [CrossRef] [PubMed]
68. *International Journal of Scientific & Engineering Research* Volume 9, Issue 5, May-2018 1585 ISSN 2229-5518 IJSER © 2018 <http://www.ijser.org> Antioxidant Ability, Total phenolic and Flavonoid contents of Leaf extract of Stevia rebaudiana Bertoni Cultivated in Morocco Abdelkarim Khiraoui^{1,2}, Chaouki Al Faiz², Aziz Hasib³, Mohamed Bakha², Abderrahmane Benhmimou², Fatima Zahra Amchra², Abdelali Boullil
69. Itagaki K., and Ito, T. 1979. Purification of stevioside (English abstr.).Jap. Patent 54-041898.
70. J. Liu and S. F. Y. Li, *Journal of Liquid Chromatography*, 1995, *18*, 1703-1719. Phytochemical Characterization of Stevia rebaudiana Hande Karaköse 109 Jacobs University Bremen

71. J. Metivier and A. M. Viana, *Journal of Experimental Botany*, 1979, 30, 805-810.
72. J. Pol, B. Hohnova and T. Hyotylainen, *Journal of Chromatography A*, 2007, 1150, 85-92.
73. J.M.C. Geuns, Validated techniques of analysis. In *Stevia and Steviol Glycosides*, Euprint:Heverlee, Belgium, 2010; ISBN 978-90-742-53116, p61-113.
74. Jana Sic Zlabur, Jose M. Lorenzo, Nadica Dobrićević, Mladen Brnčić, Francisco J. Barba and Suzana Rimac Brnčić, Daniel Franco, Atanas G. Atanasov, Sandra Vorca Evaluation of the Behavior of Phenolic Compounds and Steviol Glycosides of Sonicated Strawberry Juice Sweetened with Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) *Molecules* 2019, 24, 1202; doi:10.3390/molecules24071202
75. Jeon, J.G.; Rosalen, P.L.; Falsetta, M.L.; Koo, H. Natural products in caries research: Current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011, 45, 243–263. [CrossRef] [PubMed]
76. Jeppesen, P. B., S. Gregersen, et al. (2000). Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity. *Metabolism Clinical and Experimental*. Feb. 49(2): 208-214. {a} Department of Endocrinology and Metabolism, Aarhus University Hospital, Tage-Hansens gade 2, DK-8000, Aarhus C, Denmark
77. *Journal of Food Science and Technology*, 43:185-191
78. Kalandia A, Papunidze G, Vanidze M, S Papunidze HPLC of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) diterpene glycosides - *Bull Georgian Acad Sci*, 2004
79. Kaneda, N., Kasai, R., Yamasaki, K. and Tanaka, O. 1977. Chemical studies on sweet diterpene-glycosides of *Stevia rebaudiana*: conversion of stevioside into rebaudioside-A. *Chem. Pharm. Bull.* 25: 2466-2467.
80. Katarzyna Gawel-Beben, Anna Jakubczyk, Tomasz Bujak, Zofia Nizioł-Lukaszewska, Beata Antosiewicz, Monika Karas and Kamila Rybczynska, *Stevia Rebaudiana* Bert. Leaf Extracts as a Multifunctional Source of Natural Antioxidants *Molecules* 2015, 20, 5468-5486; doi:10.3390/molecules20045468
81. Katayama O., Sumida, T, Hayashi, H. and Mitsuhashi H. 1976. The practical application of Stevia and research and development data (English translation). I.S.U. Company, Japan. 747 pp.
82. Kim, I.-S.; Yang, M.; Lee, O.-H.; Kang, S.-N. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT Food Sci. Technol.* 2011, 44, 1328–1332. [CrossRef]

83. Kim, K. K. and H. Shibata (1997). Characterization of ent-kaurenoic acid 13-hydroxylase in steviol biosynthesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 40(6): 501-507. {a} Dep. Agricultural Chem., Gyeongsang Natl. Univ., Chinju, Gyeongnam 660-701, South Korea
84. Kim, K.K., Sawa, Y., and Shibata, H. 1996a. Hydroxylation of ent-kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni- Purification and partial characterization of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 332: 223-230.
85. Kim, K.K., Yamashita, H., Sawa, Y., and Shibata, H. 1996b. A high activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in chloroplasts of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 685-686.
86. Kinghorn, A.D. 1992. Food ingredient safety review: *Stevia rebaudiana* leaves. Herb Research Foundation, Boulder.
87. Konirc-Ristirc, A.; Savikin, K.; Zdunirc, G.; Jankovirc, T.; Juranic, Z.; Menkovirc, N.; Stankovirc, I. Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chem.* 2011, 125, 1412–1417. [CrossRef]
88. Lee, J.I., Kang, K.K., and Lee, E.U. 1979. Studies on new sweetening resource plant stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) in Korea. I. Effects of transplanting date shifting by cutting and seeding dates on agronomic characteristics and dry leaf yields of stevia (English abstr.). *Res. Rep. ORD* 21: 171-179.
89. Lewis, W.H. 1992. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. *Econ. Bot.* 46: 336-337.
90. M. Jamaluddin Ahmed and R. M. Smith, *Journal of Separation Science*, 2002, 25, 170-172.
91. Machado, E., Chagas, A.M. & Reis, D.S. "Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni in the arterial pressure of the dog." Third Brazilian Seminar on *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni, (Summaries), Angelucci, E. (Coordinator), July 1986, p. 11.
92. MARINOVA* G. and V. BATCHVAROV EVALUATION OF THE METHODS FOR DETERMINATION OF THE FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY BY DPPH Institute of Cryobiology and Food Technologies, BG – 1407 Sofia, Bulgaria
93. Mediesse Kengne Francine, Woguia Alice Louise, Fogue Souopgui Pythagore, Atogho-Tiedeu Barbara,, Simo Gustave³, Thaddée Boudjeko Antioxidant properties of cell wall polysaccharides of *Stevia rebaudiana* leaves Document heading doi: 10.12980/JCLM.2.2014APJTB-2014-0123 襲 2014 by the Journal of Coastal Life Medicine. All rights reserved.

94. Melis, M. S. (1992). Stevioside effect on renal function of normal and hypertensive rats. *Journal Of Ethnopharmacology* 36(3): 213-217.
95. Midmore, D.; Rank, A. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC ProjectNo UCQ-16A; Rural Industries Research and Development Corporation: ACT, Barton, Australia, 2002.
96. Mirpour, M.; Siahmazgi, Z.G.; Kiasaraie, M.S. Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on *Streptococcus mutans* PTCC 1683 and *Streptococcus salivarius*. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.*2015, 5, 7–10. [CrossRef] [PubMed]
97. Miyazaki, Y., and Watanabe, H. 1974. Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni; On the propagation of the plant (English abstr.). *Jap. J. Trop. Agric.* 17: 154-157.
98. Mosettig, E.; Beglinger, U.; Dolder, F.; Lichiti, H.; Quitt, P.; Waters, J.A. The absolute configuration of steviol and isosteviol. *J. Am. Chem. Soc.*1963, 85, 2305.
99. Mosettig, E.; Nes, W.R. Stevioside. II. The structure of the aglucon. *J. Org. Chem.*1955, 20, 884-899.
100. Nakahara, Y., Mori, K. and Matsui, M. 1971. Diterpenoid total synthesis. Part XVI. Alternative synthetic routes to (±)-steviol and (±)-kaur-16-en-19-oic acid. *Agric. Biol. Chem.* 35: 918-928.
101. Nakamura, S. and Tamura, Y. 1985. Variations in the main glycosides of stevia. *Jap. J. Trop. Agric.* 29:109-115.
102. Nelson Lugemwa *, Amanda L. Snyder and Koonj Shaikh Determination of Radical Scavenging Activity and Total Phenols of Wine and Spices: A Randomized Study Fulgentius Department of Chemistry, Pennsylvania State University-York, 1031 Edgecomb Avenue, York, PA 17403, USA; E-Mails: als5216@yahoo.com (A.L.S.); kys5238@psu.edu (K.S.)
103. Ohtani, K.; Yamasaki, K. Methods to improve the taste of the sweet principles of *Stevia rebaudiana*. In *Stevia: The Genus Stevia*; Kinghorn, A.D., Ed.; Taylor & Francis: London, UK, 2002; pp. 138–159.
104. Okawa, M., J. Kinjo, T. Nohara and M. Ono, 2001. DPPH (1,1-Diphenyl-2-Pierylhydrazyl) Radical Scavenging activity of Flavonoids Obtained from Some Medical Plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24, (10): 1202 (Abstr.).
105. Oviedo, C.A., et.al., "Accion hipoglicemiante de la stevia rebaudiana Bertoni (Kaa-hee)." *Excerpta Medica*, 208, 92-93, 1971. (International Congress Series).

106. P. Mauri, G. Catalano, C. Gardana and P. Pietta, ELECTROPHORESIS, 1996, 17, 367-371.
107. P. Nishiyama, M. Alvarez and L. G. E. Vieira, Journal of the Science of Food and Agriculture, 1992, 59, 277-281.
108. P. Padmanabhan *, S. N. Jangle Evaluation of DPPH Radical Scavenging Activity and Reducing Power of Four Selected Medicinal Plants and Their Combinations Department of Biochemistry, Rural Medical College, Loni-413736, Ahmednagar, Maharashtra, India
109. P. Karásek, M. Roth, K. Beneš, K. Řík, Č. Ký Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 388, 1847-1857.
110. Pacifico, S.; Piccolella, S.; Nocera, P.; Tranquillo, E.; Dal Poggetto, F.; Catauro, M. New insights into phenol and polyphenol composition of Stevia rebaudiana leaves. J. Pharm. Biomed. Anal. 2019, 163, 45–57. [CrossRef] [PubMed]
111. Papunidze G, Khomeriki M, Vanidze M, Kalandia A Получение суммарного препарата сладких дитерпеновых гликозидов из листьев стевии- Хранение и переработка сельхозсырья, 2005
112. Papunidze GP, Kalandia AG Stevia in Georgia - PISHCHEVAIA PROMYSHLENNOST'-MOSKVA ..., 2003
113. Pérez-Jiménez, J., And F. Saura-Calixto, 2008. Antioxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. International 61. Sharmila Sutradhar *, U Preeti, Ayesha Humera, and Amtul Maliha Muneem Comparative study of Antioxidant Activity of Methanolic and Ethanolic Extracts of Stevia rebaudiana Leaves Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences
114. Phillips, K.C. 1989. Stevia: steps in developing a new sweetener. Pages 1-43 in T.H. Grenby ed. Developments in sweeteners, Volume 3. Elsevier Applied Science, London.
115. Pomaret, M. Lavieille, R. "Le principe & saveur sucrée du Kaa-he-e (stevia rebaudiana bertonii), IV. Quelques propriétés physiologiques du stevioside." Bull, Soc. Chim, Biol., 13, 1248-1252, 1931.
116. Prakash, I.; Campbell, M.; Miguel, R.I.S.; Chaturvedula, V.S.P. Synthesis and sensory evaluation of *ent*-kaurane diterpene glycosides. *Molecules* 2012, 17, 8908–8916.
117. Prakash, I.; Clos, J.F.; Chaturvedula, V.S.P. Stability of rebaudioside A under acidic conditions and its degradation products. *Food Res. Int.* 2012, 48, 65–75.
118. Rajasekaran, T.; Ramakrishna, A.; Udaya Sankar, K.; Giridhar, P.; Ravishankar, G. Analysis of predominant steviosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni by liquid

- chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Biotechnol.* 2008, 22, 179–188.
119. Research Council of Canada, M-12 Montreal Road Campus, Ottawa, ON, K1A 0R6, Canada
 120. Residue Monograph prepared by the meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 84th meeting 2017 Steviol Glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni <http://www.fao.org/3/BU297en/bu297en.pdf>
 121. Schiffman, S.S., Pecore, S.D., Booth, B.J., Losee, M.L., Carr, B.T., Sattely-Miller, E., Graham, B.G., and Warwick, Z.S. 1994. Adaptation of sweeteners in water and in tannic acid solutions. *Phys. Behavior* 55:
 122. Shizhen, S. 1995. A study on good variety selection in *Stevia rebaudiana*. *Scientia Agricultura Sinica* 28: 37-41.
 123. Sholichin, M., Yamasaki, K., Miyama, R., Yahara, S. and Tanaka, O. 1980. Labdane-type diterpenes from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 19: 326-327.
 124. Shyu, Y.T., Liu, S.Y., Lu, H.Y., Wu, W.K. Su, C.G. 1994. Effects of harvesting dates on the characteristics, yield and sweet components of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) lines. *J. Agric. Res. China* 43:29-39.
 125. Silva, A.R., Saldanha, C.M., Boelter, R. & Chagas, A.M. "Fertility of rats: Aqueous extract of *stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni and stevioside, " Third Brazilian Seminar on *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni, (Summaries), Angelucci, E. (Coordinator), July 1986, p. 19.
 126. Singh, S.; Garg, V.; Yadav, D.; Beg, M.N.; Sharma, N. In-vitro antioxidative and antibacterial activities of various parts of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012, 4, 468–473.
 127. Soejarto, D.D., Compadre, C.M., Medon, P.J., Kamath, S.K., and Kinghorn, A.D. 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Econ. Bot.* 37: 71-79.
 128. Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D., and Farnsworth, N.R. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of *stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *J. Nat. Prod.* 45: 590-599.
 129. SUNANDA SINGH¹, VEENA GARG^{2*}, DEEPAK YADAV³, MOHD.NADEEM BEG⁴ AND NIDHI SHARMA INVITRO ANTIOXIDATIVE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF VARIOUS PARTS OF STEVIA REBAUDIANA (BERTONI) Department of Bioscience and Biotechnology, Banasthali University, Rajasthan, India, Faculty of Medicine, Jamia Hamdard, New Delhi, Faculty of Pharmacy, Jamia hamdard,

New Delhi, India. Email: drveenagarg@gmail.com; singhsunanda83@gmail.com

Received: 24 Mar 2012, Revised and Accepted: 10 May 2012

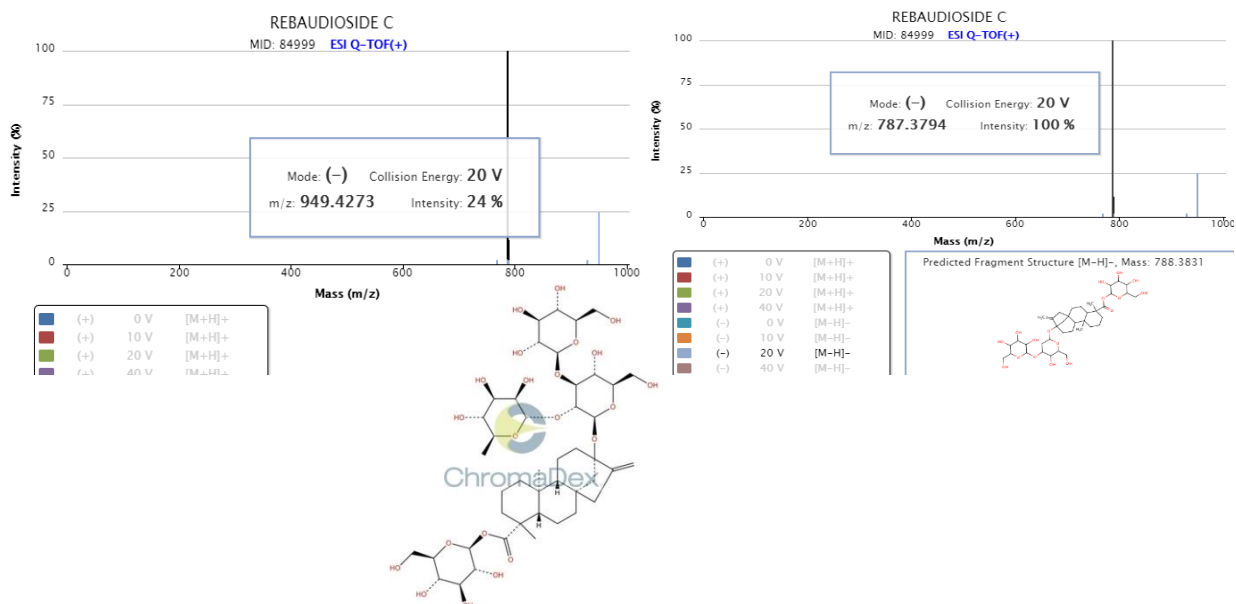
130. Tněk Nepřímý x A m ě nd ěk Journal of Food Composition and Analysis, 2001, 14, 383-388.
131. Tavarini S, Angelini LG. Stevia rebaudiana Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. J Sci Food Agric. 2013 Jul;93(9):2121-9. doi: 10.1002/jsfa.6016. Epub 2013 Jan 10. DOI:10.1002/jsfa.6016
132. U. Woelwer-Rieck, C. Lankes, A. Wawrzun and M. Wüst, European Food Research and Technology, 2010, 231, 581-588.
133. V. J. Y. Minne, F. Compernelle, S. Toppet and J. M. C. Geuns, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52, 2445-2449.
134. Van Calsteren, M.-R., Bussiire, Y. and Bissonnette, M.C. 1993. Spectroscopic characterization of two sweet glycosides from Stevia rebaudiana. Spectroscopy 11:143-156.
135. Vanidze MR, Kalandia AG, Kh R Chanukvadze IDENTIFICATION AND DETERMINATION QUANTITY CONTENT DITERPENE GLYCOSIDES IN STEVIA (STEVIA REBAUDIANA BERTONI) Chemistry, 2009
136. VanidzeMR, KalandiaAG, XP Чануквадзе Идентификация и количественное определение дитерпеновых гликозидов в растении стевия (Stevia rebaudiana Bertoni) - Химия растительного сырья, 2009
137. Venkata Sai Prakash Chaturvedula *, Mani Upreti and Indra Prakash Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana* *Molecules* 2011, 16, 3552-3562; doi:10.3390/molecules16053552
138. Victor N. Enujiugha, Justina Y. Talabi, Sunday A. Malomo, Aderonke I. Olagunju DPPH Radical Scavenging Capacity of Phenolic Extracts from African Yam Bean (*Sphenostylis stenocarpa*) Department of Food Science and Technology, Federal University of Technology, Akure, Nigeria; Department of Biological Sciences, Afe Babalola University, Ado-Ekiti, Nigeria. Email: venujiugha@yahoo.com
139. Whiting, D.R.; Guariguata, L.; Weil, C.; Shaw, J. IDF diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2011, 94, 311–321. [CrossRef] [PubMed]
140. Wilmer H. Perera, Frank T. Wiggers, Ion Ghiviriga, Douglas L. Rodenburg, Kamilla Alves, Ilias Muhammad, Charles D. Hufford, Frank R. Fronczek, Mohamed A. Ibrahim,

- Bharathi Avula, Ikhlas A. Khan and James D. McChesney Tetra-glucopyranosyl Diterpene ent-Kaur-16-en-19-oic Acid and ent-13(S)-Hydroxyatisenoic Acid Derivatives from a Commercial Extract of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni
141. Yolanda Carmona-Jiménez a , M. Valme García-Moreno a,† , Jose M. Igartuburub, Carmelo Garcia Barroso Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products
 142. Zhang, S. Q., A. Kumar, et al. (2000). Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves. *Food Research International*. [print] 33(7): 617-620. {a} Institute for Chemical Process and Environmental Technology, National
 143. Zlabur, J.S.; Vorca, S.; Dobriřceviř, N.; Brnr̄irc, M.; Dujmir̄, F.; Brnr̄irc, S.R. Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Int. Agrophys.* 2015, 29, 231–237.[CrossRef]
 144. Zubenko, V. F., Rogovskii S. V., et al. (1991). Effect of cutting leafiness and light day duration on the rooting ability and growth of *Stevia rebaudiana* Bertoni seedlings. *Fiziologiya i Biokhimiya Kul'turnykh Rastenii* 23(4): 407-411.
 145. Zubenko, V. F., Rogovskii S. V., et al. (1991). Phytohormone-induced stimulation of the rooting of stevia cuttings and growth of its seedlings. *Doklady Vsesoyuznoi Ordena Lenina i Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk Imeni:* 16-1
 146. M. Murata, E. Tanaka, E. Minoura and S. Homma, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68, 501-507.
 147. L. Bravo, *Nutrition Reviews*, 1998, 56, 317-333.
 148. M. Naczki and F. Shahidi, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1054, 95-111.
 149. H. Wang, G. Cao and R. L. Prior, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, 701-705.
 150. M. Naczki and F. Shahidi, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41, 1523-1542.
 151. Official Journal of the European Union, Edition edn., 11 November 2011, vol. 1131/2011, p. 26.
 152. V. Chatsudhipong and C. Muanprasat, *Pharmacology & Therapeutics*, 2009, 121, 41-54.
 153. J. M. C. Geuns, J. Buyse, A. Vankeirsbilck, E. H. M. Temme, F. Compernelle and S. Toppet, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 2794-2798.
 154. G. Brahmachari, L. C. Mandal, R. Roy, S. Mondal and A. K. Brahmachari, *Archiv der Pharmazie*, 2011, 344, 5-19.

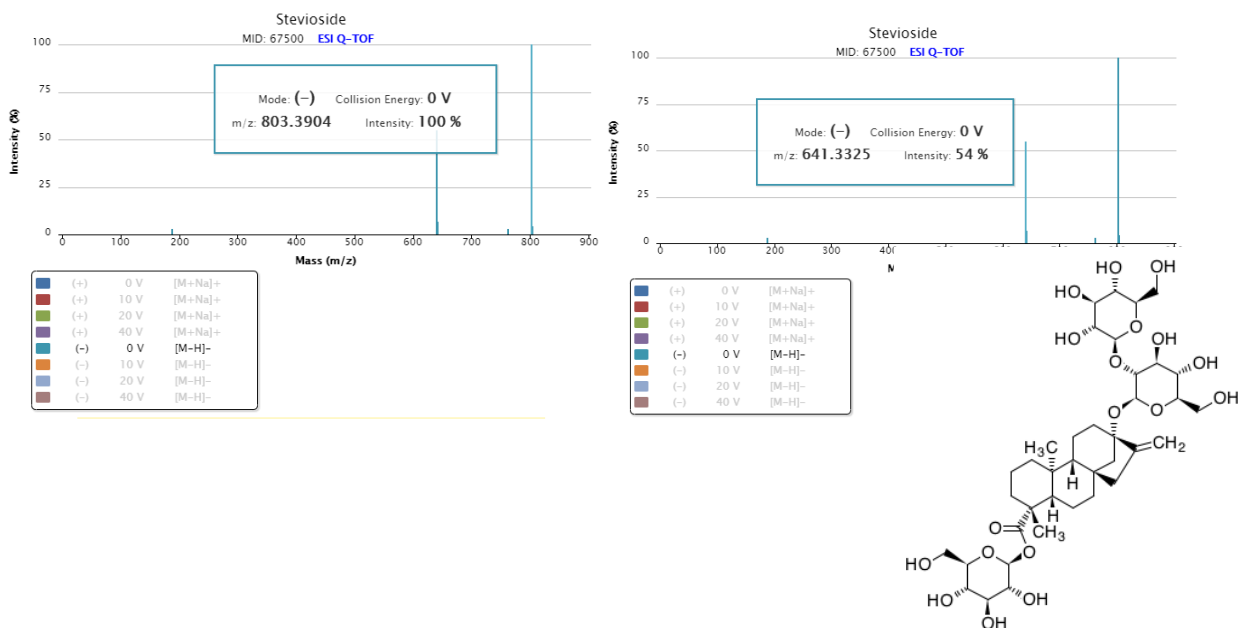
საილუსტრაციო მასალა. დანართი 1

ნაერთების მასების ბაზა

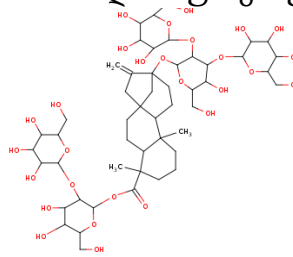
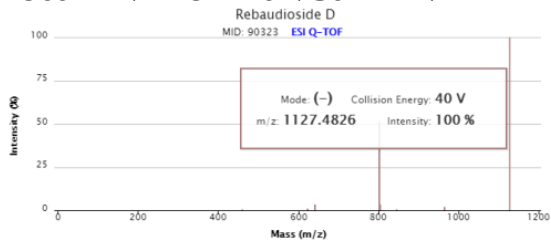
სტევიოლის დი-გლუკოზიდიანუ რეზაუდიოზიდი C (C₃₂H₅₂O₁₄).



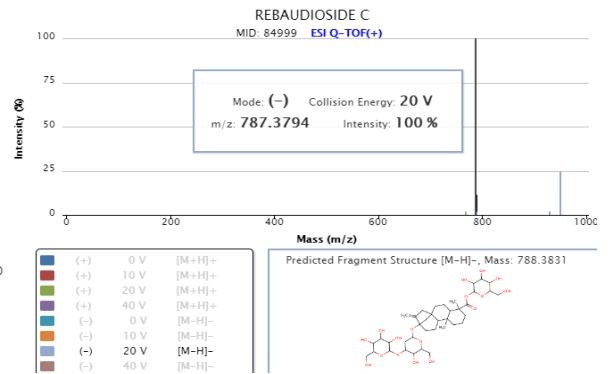
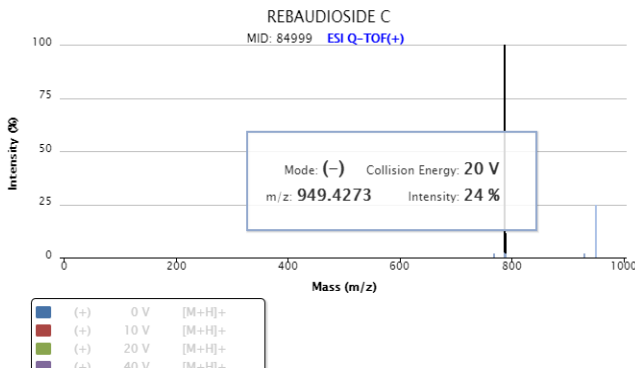
სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდს ანუ სტევიოზიდს (Stevioside C₃₈H₆₀O₁₈)



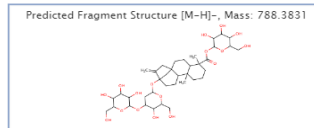
სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდი ანუ რებაუდიოზიდი D ($C_{50}H_{80}O_{28}$).



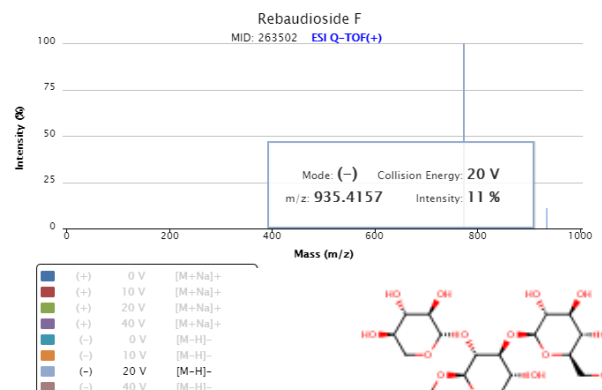
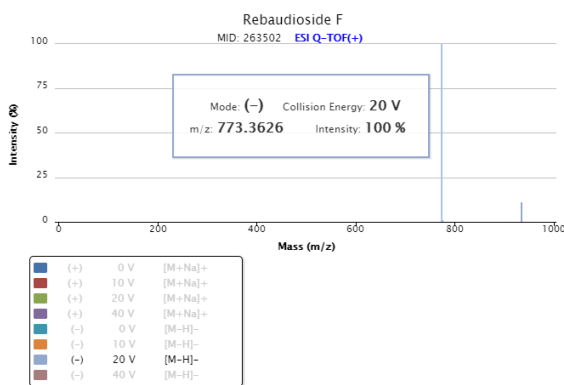
სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდი ანუ რებაუდიოზიდი C ($C_{44}H_{70}O_{23}$).



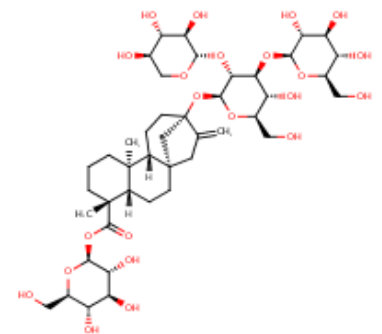
(+)	0 V	[M+H] ⁺
(+)	10 V	[M+H] ⁺
(+)	20 V	[M+H] ⁺
(+)	40 V	[M+H] ⁺
(-)	0 V	[M-H] ⁻
(-)	10 V	[M-H] ⁻
(-)	20 V	[M-H] ⁻
(-)	40 V	[M-H] ⁻



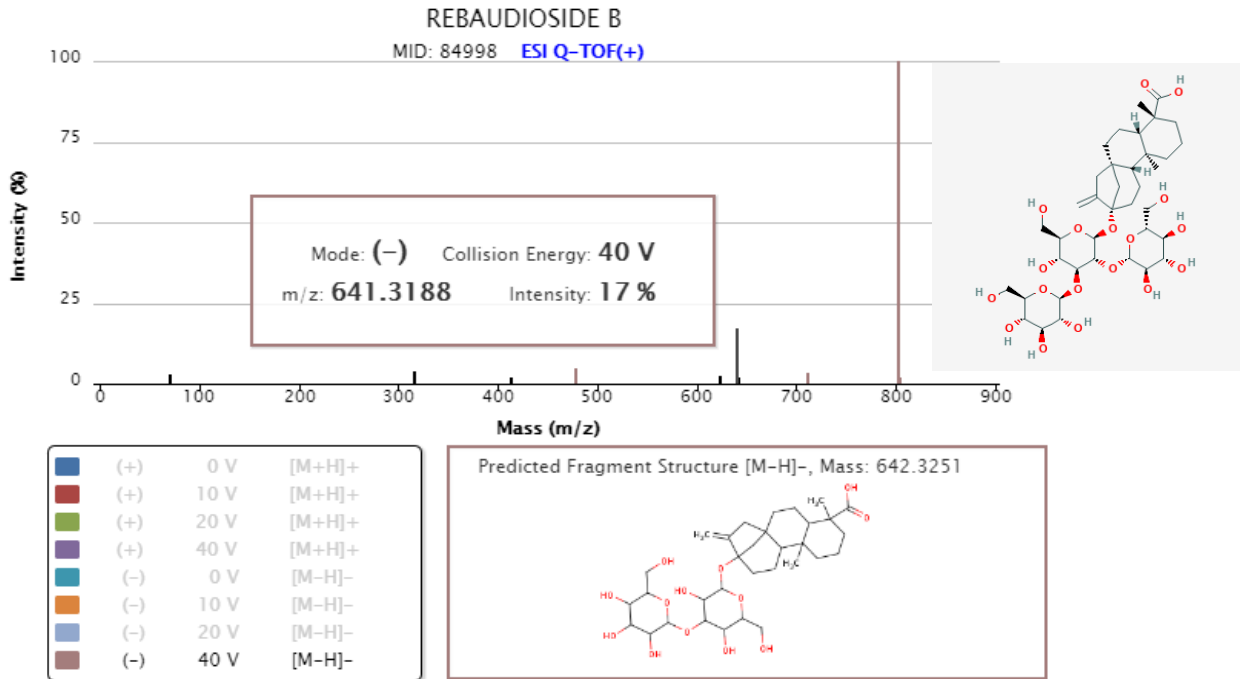
სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდს ანუ რებაუდიოზიდი F ($C_{43}H_{69}O_{23}$).



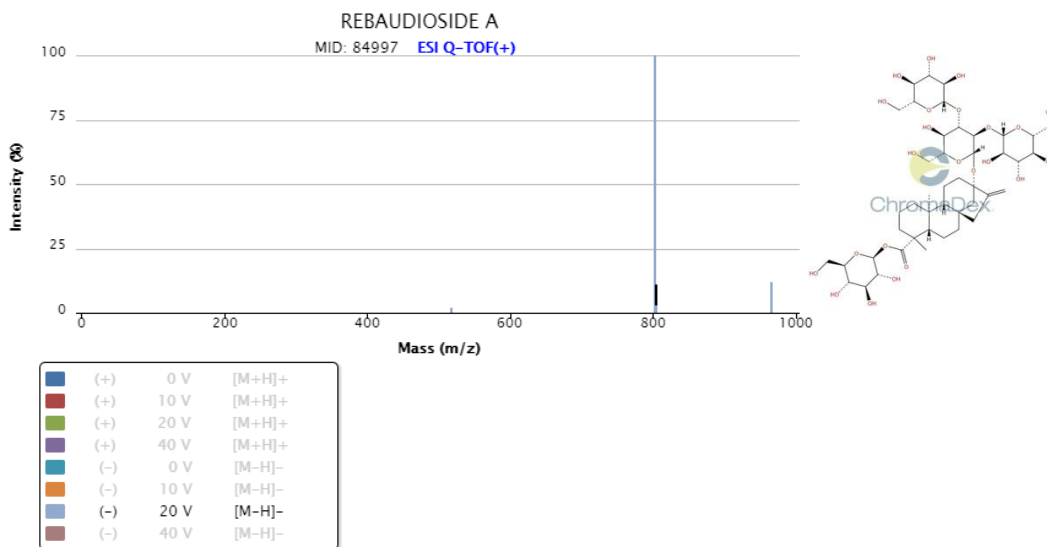
(+)	0 V	[M+Na] ⁺
(+)	10 V	[M+Na] ⁺
(+)	20 V	[M+Na] ⁺
(+)	40 V	[M+Na] ⁺
(-)	0 V	[M-H] ⁻
(-)	10 V	[M-H] ⁻
(-)	20 V	[M-H] ⁻
(-)	40 V	[M-H] ⁻



სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდს ანუ რებაუდიოზიდი B



სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდი ანუ რებაუდიოზიდი A (C₄₄H₇₀O₂₃).



იონების გავლენა მასაზე

