

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



დასავლეთ საქართველოში გავრცელებული სხვადასხვა  
მცენარეული წარმოშობის თაფლის ბიოლოგიურად აქტიური  
ნაერთების კვლევა UPLC - MS მეთოდებით

ნონა აბაშიძე

წარდგენილია ქიმიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად  
სპეციალობა - ბუნებრივ ნაერთთა ანალიზი

## ა ნ ო ტ ა ც ი ა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ინდირა ჯაფარიძე,  
ტექნოლოგიის დოქტორი,  
უფროსი მეცნიერ თანამშრომელი

ბათუმი - 2024

„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“.

ნონა აბაშიძე

დისერტაციის კვლევითი ნაწილი შესრულდა პროექტის ფარგლებში, რომელიც განხორციელდა შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის ფინანსური ხელშეწყობით (გრანტი PHDF-22-3218 “დასავლეთ საქართველოში მოწეული თაფლის ბოტანიკური წარმოშობის დასადგენად თაფლის მტვრიანების, ბიოაქტიური ნაერთებისა და ბიოლოგიური აქტიურობის კვლევა”).

## სარჩევი

შესავალი.....	4
1. ექსპერიმენტული ნაწილი.....	8
1.1. კვლევის ობიექტი .....	8
1.3. თაფლის ბოტანიკური წარმოშობის დადასტურებისათვის მტვრიანების მიკროსკოპული კვლევა.....	9
1.4. თაფლის ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლების შესწავლა.....	12
1.5. დასავლეთ საქართველოში მოწეული თაფლის ნახშირწყლების კვლევა HPLC რეფრაქტომეტრული დეტექტირების მეთოდით.....	24
1.6. თაფლის კატიონების თვისობრივი და რაოდენობრივი კვლევა HPLC კონდუქტომეტრული დეტექტირების მეთოდის გამოყენებით.....	29
1.7. თაფლის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების UPLC PDA-MS მეთოდით კვლევა.....	37
1.8. თაფლის საერთო ფენოლების, ფლავონოიდების, ფენოლკარბონმჟავების შეცვლობის შესწავლა და ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა .....	48
1.9. ანდრომედოტოქსინის ანალიზი UPLC PDA-MS მეთოდით.....	51
1.10. მძიმე მეტალებისა და ანტიბიოტიკების კვლევა .....	55
დასკვნა.....	60

## შესავალი

**თემის აქტუალობა** - თავლი პოპულარული საკვები დანამატია, რომლის წარმოების ისტორია უძველესი დროიდან იწყება. იგი წარმოადგენს ერთადერთ კონცეტირებულ და მზა ნატურალურ დამატკობელს, რომელსაც ადამიანი ასწლეულების განმავლობაში ინტენსიურად იყენებდა. დღეისათვის მსოფლიოს მრავალი ქვეყანა მისდევს მეფუტკრეობას, აწარმოებს სხვადასხვა სახის თავლს და, შესაბამისად, მსოფლიო ბაზარზე ის ნაირსახეობითაა წარმოდგენილი. მართალია, თავლის, როგორც დამატკობლის მოხმარება უფრო ინტენსიური იყო შაქრის სამრეწველო წარმოებამდე (მე-19 საუკუნემდე), მაგრამ დღეს იგი განიხილება, როგორც ფუნქციური ნატურალური პროდუქტი.

მეფუტკრეობა, როგორც სოფლის მეურნეობის ერთ-ერთი უძველესი დარგი, მჭიდროდ იყო დაკავშირებული საქართველოს ისტორიასთან და დღესაც მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია. საქართველოს მსოფლიოში ერთ-ერთი უდიდესი ეკოსისტემა აქვს, იგი აგროეკოლოგიური ზონების ფართო სპექტრს მოიცავს, რაც იდეალურ პირობას ქმნის სხვადასხვა წარმოშობის თავლის წარმოებისათვის. საქართველოში თავლის დოვლათს, ძირითადად, საოჯახო მეურნეობები ქმნიან.

თავლის ბაზრის გლობალიზაციის პირობებში, რომელშიც დღეისათვის ჩართულია ათეულობით ქვეყანა, მეტად მნიშვნელოვან ამოცანას წარმოადგენს თავლის წარმომავლობისა და იდენტიობის დადასტურება. თავლის ფერი, არომატი, გემო და სამკურნალო-პროფილაქტიკური თვისებები დამოკიდებულია ყვავილის ნექტარზე, ამ უკანასკნელის შედგენილობა კი სწორედ იმ ენტომოფილურ მცენარეებზე, რომლებიც თავლის მოწვევის დროს ყვავილობენ მოცემულ რეგიონში. ყვავილების ქიმიური შედგენილობა მთლიანობაში დამოკიდებულია არა მარტო მცენარის სახეობაზე, არამედ მცენარის ზრდა-განვითარების ნიადაგობრივ-კლიმატურ პირობებზე. მცენარის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები ჯერ ხვდება ნექტარში და შემდეგ თავლში, რომელიც მას სძენს სხვადასხვა თვისებას - ანტიოქსიდანტურ, ანტიბაქტერიულ და ანტიმიკრობულ.

თაფლი მაღალი კვებითი და ფუნქციონალური თვისებების გამო ფართო მოხმარებით, მაღალი ფასითა და მზარდი პოპულარობით ხასიათდება, როგორც მთელ მსოფლიოში, ასევე საქართველოში. თაფლის შემადგენლობა საერთაშორისო დონეზე Codex Alimentarius-სის მიერ (Codex Standard for Honey, 2001) დადგენილი სტანდარტებითა და ნორმებით რეგულირდება. ჩვენი ქვეყნის რეალობაში თაფლის ქიმიური შემადგენლობის კვლევამ მეტი აქტუალობა შეიძინა, როდესაც ევროკავშირის ქვეყნებში ქართული თაფლის ექსპორტის შესაძლებლობა გაჩნდა. თაფლის ცნობადობა იზრდება მასზე მრავალფეროვანი და სხვადასხვა მიმართულებით წარმართული კვლევების სიმრავლით. სამწუხაროდ, ქართული თაფლის შემთხვევაში ეს ჯერ კიდევ მხოლოდ ჩანასახშია. თაფლის ქიმიური შემადგენლობის შესწავლა საშუალებას მოგვცემს, შევაფასოთ თაფლის ხარისხის მრავალფეროვანი მახასიათებლები, დავადგინოთ თაფლის ბოტანიკური წარმოშობა, ანტიბიოტიკებითა და მძიმე მეტალებით დაბინძურების ხარისხი, მიღებული შეჯერებული მონაცემების გამოქვეყნებით უფრო ცნობადი გახადონ ქართული თაფლი.

**კვლევის მიზანი და ამოცანები** - დასავლეთ საქართველოში მოწეული სხვადასხვა წარმოშობის მონო და პოლიფლორული თაფლის, ასევე, ნახევრად ველური - ჯარას თაფლის, ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლების შესწავლა, ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების გამოყოფა და იდენტიფიკაცია, მათი რაოდენობრივი შემცველობის დადგენა და ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა თანამედროვე - UPLC მეთოდების გამოყენებით. ბოტანიკური წარმოშობის დასადგენად თაფლში არსებული მტვრიანების ატლასის შექმნა, მორფოლოგიური სტრუქტურისა და კონცენტრაციის დადგენა. თაფლში ანდრომედოტოქსინის, მძიმე მეტალებისა და ანტიბიოტიკების განსაზღვრა. ქემომეტრიული მეთოდების გამოყენებით თაფლის მახასიათებლების ანალიზი და მიღებულ შედეგებს შორის ურთიერთ კორელაციის დადგენა. ეს უკანასკნელი მოგვცემს თაფლის წრმოშობის უტყუარობის დამადასტურებელ მოდელს.

#### **ამოცანები:**

1. თაფლის ბოტანიკური წარმოშობის დადასტურებისათვის მტვრიანების მიკროსკოპული კვლევა;

2. თაფლის ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლების შესწავლა;
3. თაფლის ნახშირწყლების თვისობრივი და რაოდენობრივი კვლევა HPLC-UV, Vis, RI - ის მეთოდით;
4. თაფლის კატიონების თვისობრივი და რაოდენობრივი კვლევა HPLC კონდუქტომეტრული მეთოდის გამოყენებით;
5. თაფლის ფენოლური ნაერთებისა და ანტიბიოტიკების UPLC PDA-MS მეთოდით კვლევა;
6. თაფლის საერთო ფენოლების, ფლავონოიდების, ფენოლკარბონმჟავების შეცვლობის შესწავლა ფა ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა;
7. ანდრომედოტოქსინის ანალიზი UPLC PDA-MS მეთოდით;
8. მძიმე მეტალებისა კვლევა პლაზმურ-ემისიური სპექტრომეტრული მეთოდით;
9. სტატისტიკური ანალიზი;

**კვლევის საგანს და ობიექტს** წარმოადგენს აკაციის, წაბლის, ჯარას, ცაცხვისა, ცაცხვი-წაბლის და პოლიფლორული (შემოდგომა და გაზაფხული) თაფლი. ნიმუშები აღებულ იქნა 2018-2023 წლებში, დასავლეთ საქართველოს 4 რეგიონში: აჭარა, გურიას, იმერეთი და სამეგრელო.

კერძოდ, კვლევა განხორციელდა აკაციის 30, ჯარას 18 და წაბლის 14 ნიმუშში, ანდრომედოტოქსინი შესწავლილი იქნა შერჩევით შემოდგომის პოლიფლორული თაფლის 12 ნიმუშში.

**კვლევის მეთოდოლოგია** – კვლევის ობიექტს ვსწავლობდით კვლევის თანამედროვე ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდებით. თაფლის ნიმუშებს ვიკვლევდით შემდეგი სქემის მიხედვით:

1. მტვრიანების ანალიზი - ბოტანიკური წარმოშობის დადასტურება
2. ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლების განსაზღვრა
3. ქრომატოგრაფიული ანალიზი:
  - 3.1. ნახშირწყლების თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზი;
  - 3.2. კატიონების თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზი;
  - 3.3. ფენოლური ნაერთების თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზი;

3.4. ანდრომედოტოქსინის ანალიზი;

3.5. მძიმე მეტალებისა და ანტიბიოტიკების ანალიზი;

კვლევისათვის გამოყენებულ იქნა ხელსაწყოები: მაღალ ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფი (HPLC) - Waters, რომელიც აღჭურვილია UV, Vis და RI დეტექტორით (Binary HPLC Pump 1525) და (HPLC) - Waters 432 -კონდუქტომეტრული დეტექტორით. ასევე, ულტრა ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფი (Waters, UPLC - Acquity H Class-ის) ფოტოდოდური მატრიცითა (PDA) და მას (MS) დეტექტორით, პლაზმურ-ემისიური სპექტომეტრია; pH მეტრი და კონდუქტომეტრი - Mettler Toledo-ს pH/Ion meter S220 და S230 Conductivity; Mettler Toledo-ს UV5, UV/Vis სკანირებადი სპექტოფოტომეტრი. სინათლის მიკროსკოპი, რომელიც აღჭურვილი იყო ვიდეოთვალით (AmScope/ Microscope Digital Camera 18MP Aptina Color CMOS/Ultra-Fine Color Engine Inside/MU1803 USB3.0DC5V.900mA.

**სამეცნიერო სიახლე** - საქართველოში პირველად ჩატარდა თაფლის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების კვლევები თანამედროვე ინსტუმენტული მეთოდების გამოყენებით. ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთებიდან გამოყოფილი და იდენტიფიცირებული იქნა 25 ნაერთი - 4 ნახშირწყალი: ფრუქტოზა, გლუკოზა, საქაროზა და მალტოზა; 4 ორგანული მჟავა: ვაშლმჟავა, გლუკონის მჟავა, მჟაუნმჟავა, ქინაქინის მჟავა; 10 ფენოლკარბონმჟავა: 4 ჰიდროქსიბენზოის მჟავა, აზცისის მჟავა, კოფეინის მჟავა, პროტოკატექინის მჟავა, P - კუმარის მჟავა, შიკიმის მჟავა, 2,5 დიჰიდროქსიბენზოის მჟავა, სალიცილის მჟავა, ჰიდროქსიბენზოის მჟავა, 2,4 დიჰიდროქსიბენზოის მჟავა, 7 ფლავონოიდი: პინობაქსინი, აპიგენინი, აკაცეტინი, 6-მეთოქსიკემფეროლი, იზორამნეტინი, დიმეთილ კვერცეტინი, გენტისალდეჰიდი.

იდენტიფიცირებული იქნა გრაიანოტოქსინი-III. რაც განაპირობებს თაფლის ტოქსიკურობას.

თაფლის ნიმუშებში კვლევა ჩატარდა 12 ანტიბიოტიკზე: ოქსიტეტრაციკლინი, ტეტრაციკლინი, სტრეპტომიცინი, სილფადიმეტოქსინი, ქლორამფენიკოლი, მეტრონიდაზოლი, რონიდაზოლი, ერიტრომიცინი, ნიტროფურანი, ლინკომიცინი, ტილოსინი და რიფამპიციინუმი.

ასევე განსაზღვრულ იქნა 7 მძიმე მეტალი: კადმიუმი, კობალტი, ქრომი, ვერცხლისწყალი, დარიშხანი, ტყვია, თუთია და 5 კატიონი: ნატრიუმის, ამონიუმის, კალიუმის, მაგნიუმისა და კალციუმის.

**ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა** - შესწავლილი იქნა ხუთი სახეობის თაფლი, დასავლეთ საქართველოს სამ რეგიონიდან თანამედროვე ინსტუმენტული მეთოდების გამოყენებით, იდენტიფიცირებულ იქნა 25 ნაერთი, კვლევა ჩატარდა 12 ანტიბიოტიკზე, განსაზღვრულ იქნა 5 კატიონი და 7 მძიმე მეტალი. მიღებული შედეგები საინტერესოა არა მარტო მეცნიერული თვალსაზრისით, არამედ მას მნიშვნელოვანი პრაქტიკული ღირებულება აქვს აგრარულ სექტორში მომუშავე სპეციალისტებისათვის. მიღებული შედეგებით მოხდება თაფლის პასპორტიზაცია და გაკეთდება დასკვნები მათი წარმომავლობის შესახებ. ეს კი ხელს შეუწყობს უნივერსიტეტის კვლევითი პოტენციალის ცნობადობას რეგიონში და აგრარულ სექტორში კონკურენტუნარიანობისა და პროდუქციის ხარისხის ამაღლებას.

**სამუშაოს აპრობაცია** - კვლევის შედეგები ასახულია 5 სამეცნიერო სტატიაში, 1 მონოგრაფიასა და 3 საერთაშორისო სამეცნიერო კონფერენციის მასალაში.

## **1. ექსპერიმენტული ნაწილი:**

### **1.1. კვლევის ობიექტი**

**კვლევის ობიექტს** წარმოადგენდა აკაციის, წაბლის, ჯარას, ცაცხვისა, ცაცხვი-წაბლის და პოლიფლორული (შემოდგომა და გაზაფხული) თაფლი. ნიმუშები აღებულ იქნა 2018-2023 წლებში, დასავლეთ საქართველოს 4 რეგიონში: აჭარა, გურია, იმერეთი და სამეგრელო.

აკაციის თაფლი - 2022 და 2023 წლის მოსავალი. ნიმუშების შერჩევა მოხდა მტვრიანების მიკროსკოპული დათვალიერების საფუძველზე. კერძოდ, საანალიზოდ შერჩეულ იქნა თაფლის ის ნიმუშები, რომლებშიც აკაციის მტვრიანების რაოდენობა იყო 45%-ზე მეტი. აღებული ნიმუშებიდან შერჩეულ იქნა აკაციის თაფლის 30 ნიმუში (10-10 ნიმუში თითოეული მუნიციპალიტეტიდან და ჯამში 60 ნიმუში 2 წლის განმავლობაში).



წაბლის თაფლის ნიმუშები აღებულ იქნა გურიის, აჭარისა და იმერეთის რეგიონში. მტვრიანების ანალიზის შედეგად შერჩეულ იქნა ის ნიმუშები, რომლებშიც მტვრიანების რაოდენობა 75%-ზე მეტი იყო. წაბლის თაფლის (ChH) 14 ნიმუში იყო 2022 წლის მოსავალი.ჯარას თაფლის ნიმუშები აღებულ იქნა აჭარის სამი სხვადასხვა მუნიციპალიტეტიდან (ქედა, შუახევი, ხულო) 2018 წლის შემოდგომაზე (სექტემბერი). თაფლის ნიმუშებს ვინახავდით ჰერმეტიკულ კონტეინერებში (4-5°C).

### 1.3. თაფლის ბოტანიკური წარმოშობის დადასტურებისათვის

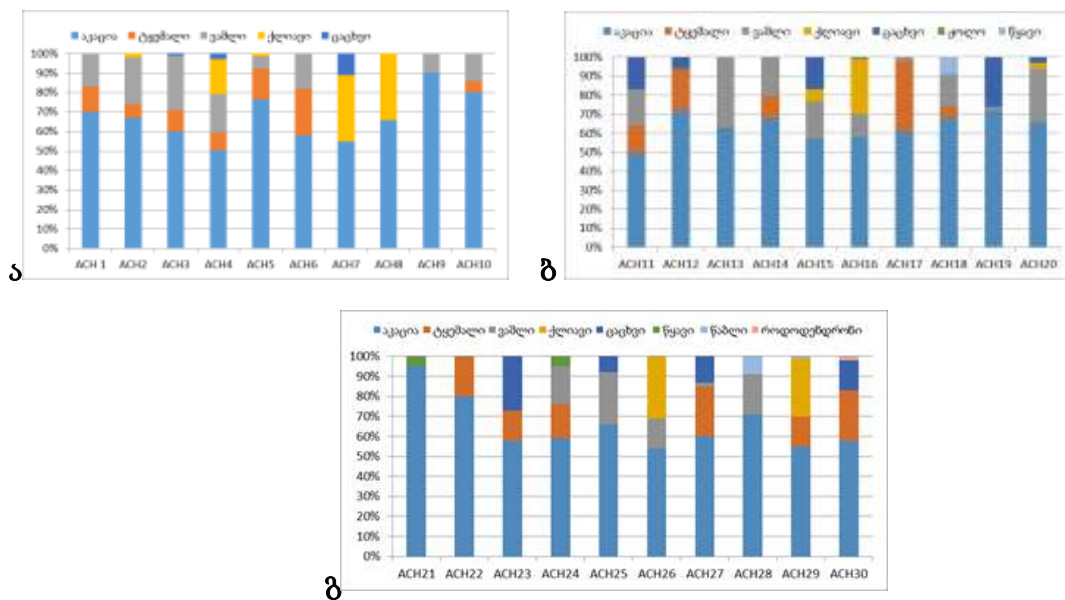
#### მტვრიანების მიკროსკოპული კვლევა

თაფლის ფერი, არომატი, გემო და სამკურნალო-პროფილაქტიკური თვისებები დამოკიდებულია ყვავილის ნექტარზე, ხოლო ამ უკანასკნელის შემადგენლობა დამოკიდებულია იმ ენტომოფილურ მცენარეებზე, რომლებიც ყვავილობენ თაფლის შეგროვების პერიოდში. ყვავილის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები განსაზღვრავენ თაფლის ბიოლოგიურ აქტივობას.

მტვრიანების ანალიზისათვის გამოყენებულ იქნა სინათლის მიკროსკოპი, რომელიც აღჭურვილი იყო ვიდეოთვალით (AmScope/ Microscope Digital Camera 18MP Aptina Color CMOS/Ultra-Fine Color Engine Inside /MU1803 USB3.0DC5V.900mA). ანალიზისათვის ვილებდით თაფლის ნიმუშის 10 გ ± 0,1გ, ვუმატებდით 20 მლ წყალს და მორევით ვხსნიდით არაუმეტეს 40 °C-ისა. ნიმუშის გახსნის შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 1000 ბრუნი/წმ სიჩქარით 10 წუთის განმავლობაში. ცენტრიფუგირებული სითხის მოცილების შემდეგ ვუმატებდით წყლის ახალ ულუფას (20 მლ) და კვლავ ვაცენტრიფუგირებდით 1000 ბრუნი/წმ სიჩქარით 5 წუთის განმავლობაში. მიღებულ სითხეს ვაცილებდით დეკანტაციით და ცენტრიფუგის ჭურჭელს 45-გრადუსიანი კუთხით ვაყოვნებდით ფილტრის ქაღალდზე სითხის სრულად მოცილებისათვის. დარჩენილი ნალექი გადაგვექონდა სასაგნე მინაზე (22x22 მმ), რომელიც წინასწარ იყო გაცხელებული 40°C-ზე. მტვრიანებს ჯვარედინი მოძრაობით თანაბრად ვანაწილებდით გლიცერინ - ჟელატინის ზედაპირზე. ნარევის მაქსიმალური გაჯირჯვების (40°C-ზე 5 წუთის განმავლობაში) შემდეგ ვათვალთვინებდით მიკროსკოპში.

მტვრიანების იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებულ იქნა თაფლოვანი მცენარეების მტვრიანების პრეპარატები და სხვადასხვა მცენარის მტვრიანების ატლასები. თითოეულ ნიმუშში დათვლილ იქნა 500-ზე მეტი მტვრიანა. მეტი სიზუსტისათვის მტვრიანების დათვლა ხორცილედებოდა სამჯერადად და თითოეული ნიმუშისათვის გამოთვლილ იქნა საშუალო მაჩვენებელი. მაჩვენებელი გამოთვლილია პროცენტებში და შედეგები მოცემულია დიაგრამა №1-№5-ში. შემცველობის მიხედვით მტვრიანები დაყვავით 4 ჯგუფად: დომინანტი მტვრიანები (45%-ზე მეტი), მეორადი მტვრიანები (16-45%), მნიშვნელოვანი მინორული მტვრიანები (3- 15%), მინორული მტვრიანები (3%-ზე მეტი).

აკაციის თაფლის მტვრიანების ანალიზმა აჩვენა, რომ საანალიზოდ აღებულ თაფლის ნიმუშებში გამოვლენილია: აკაციის, ცაცხვის, ვაშლის, ჟოლოს, ქლიავის, ტყემლის, წყავის მტვრიანა.(დიაგრამა 1).

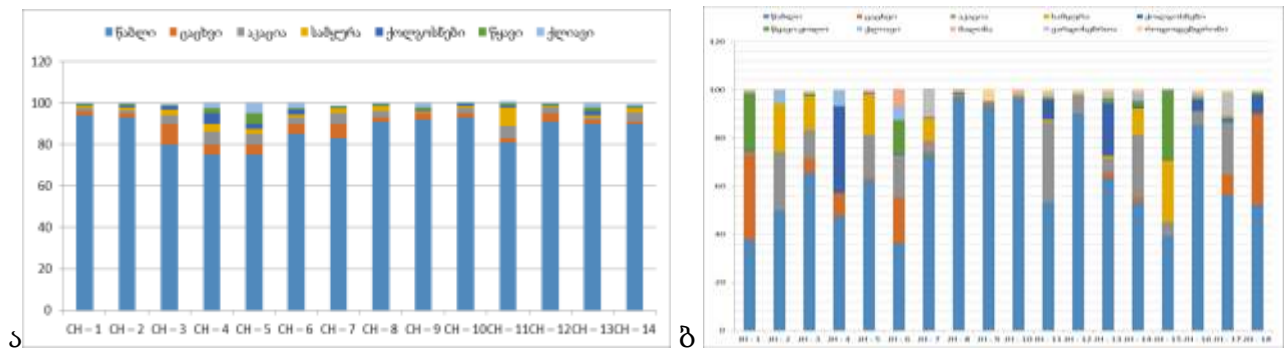


**დიაგრამა 1.** იმერეთის (ა) გურიის (ბ) და აჭარის (გ) რეგიონის აკაციის თაფლის 10-10 ნიმუშში მტვრიანების შემცველობა

აკაციის თაფლის ყველა ნიმუშში დომინანტს წარმოადგენს აკაციის მტვრიანა. მეორადი მტვრიანების სახით შეინიშნება ვაშლისა და ტყემლის მტვრიანა. ნიმუშებში: ACH11, ACH19, ACH23, ACH26, ACH29, მეორად მტვრიანას წარმოადგენს ცაცხვი. ასევე ACH30 კვალის სახით აღინიშნება როდოდენდრონის მტვრიანა. რომელიც იდენტიფიცირებულია აჭარის, კერძოდ, ხულოს რაიონში მოწეული თაფლის ნიმუშში.

აკაციის მტვრიანების მაღალი შემცველობით გამოირჩევა ACH9 იმერეთის რაიონი და ACH21 - 95% აჭარის რაიონი.

წაბლის თაფლის ნიმუშებში გვხვდება დომინანტი მტვრიანას სახით წაბლის მტვრიანები, მათი რაოდენობა 75%-დან 94%-მდეა, 5-დან 10%-მდე გვხვდება ცაცხვის, აკაციის, ტყის სამყურას, ქოლგოსნების, წყავისა და ქლიავის ყვავილის მტვრიანები. ცაცხვის მტვრიანები წაბლის თაფლის მხოლოდ მე-3 ნიმუშში გვხვდება 10%-ით, მე-7 თაფლში - 7%-ია, მე-4, მე-5 და მე-6 ნიმუშში 5%-ით არის წარმოდგენილი. 5%-ზე ნაკლები რაოდენობით გვხვდება ყველა სხვა დანარჩენი მტვრიანა (დიაგრამა 2 ა).



**დიაგრამა 2.** (ა) წაბლის თაფლის 14 ნიმუშში მტვრიანების შემცველობა, (ბ) ჯარას თაფლის 18 ნიმუშში მტვრიანების შემცველობა

ჯარას თაფლში მტვრიანების ანალიზის შედეგები მიუთითებს საკვლევ რეგიონში ფუტკრების მიერ გამოყენებული რესურსების მრავალფეროვნებაზე. ჯარას თაფლში მტვრიანების ანალიზმა აჩვენა, რომ საანალიზოდ აღებული 18 ნიმუშიდან გამოვლინდა წაბლის, ცაცხვის, აკაციის, კაკლის, წყავის, ვაშლის, ჟოლოს, ქლიავის, სამყურასა და ბაბუაწვერას მტვრიანა (ცხრილი 2 ბ.).

თაფლის 15 ნიმუშში წაბლის მტვრიანების შემცველობა 45-ზე მეტი იყო, მაგალითად, ქედის ნიმუშებში 47,5 – 96,89%, შუახევში 53,28 – 96,6 და ხულოში 46,19 – 80,47%. ჯარას თაფლის 3 ნიმუშში (JH 1, JH 6 და JH 15) წაბლის მტვრიანა არ არის დომინანტური, მაგრამ მისი შემცველობა უფრო მაღალია, ვიდრე ცაცხვის, აკაციისა და სხვა. (ცხრილი 7). როდოდენდრონის მტვრიანები იდენტიფიცირებულია - JH 1, JH 6, JH9, JH10, JH11, JH13, JH14, JH15, JH16 და JH17 ნიმუშებში. მტვრიანების შემცველობა უფრო

მაღალია 9, 13 და 16 ნიმუშში (JH9 – 4,45%, JH13 – 4,88 % და JH9 – 4,26%), სხვა ნიმუშებში მათი რაოდენობა 3%-ზე ნაკლებია.

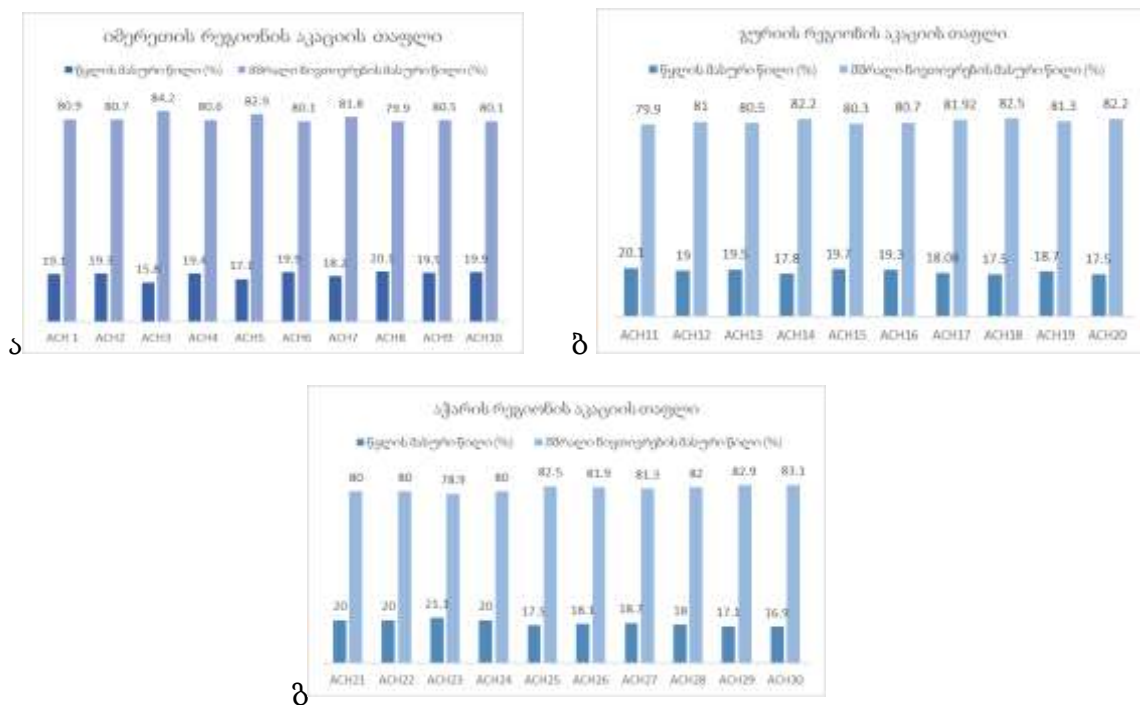
მიკროსკოპული ანალიზის შედეგებიდან გამომდინარე, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ჯარას თაფლი შეიძლება კლასიფიცირდეს, როგორც პოლიფლორული თაფლი. მიუხედავად იმისა, რომ თაფლის 7, 8, 9, 10, 12 და 16 ნიმუშში, წაბლის მტვრიანების კონცენტრაცია ისეთივე მაღალია, როგორც მონოფლორული თაფლის (73,36 – 96,89 %) შემთხვევაში იქნებოდა. მტვრიანების მიკროსკოპული ანალიზის საფუძველზე დადასტურებულ იქნა თაფლის ბოტანიკური წარმოშობა და საანალიზოდ შერჩეულ იქნა აკაციის თაფლი, სადაც ფსევდო აკაციის ყვავილის (*Pseudi acacia*) მტვრიანების რაოდენობა 45%-ზე მეტი იყო, წაბლის თაფლი - წაბლის ყვავილის მტვრიანები (*Castanea sativa* Mill) 75%-დან 94%-მდე რაოდენობით, ხოლო ჯარას თაფლი იდენტიფიცირებულ იქნა, როგორც პოლიფლორული თაფლი.

#### **1.4. თაფლის ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლების შესწავლა**

თაფლი შედის ევროპაში ყველაზე მეტად ფალსიფიცირებადი საკვები პროდუქტების ათეულში. მისი ფალსიფიკაციის ხერხები და მეთოდები ვრცელია, რაც უარყოფით გავლენას ახდენს თაფლის ხარისხსა და მომხმარებლის ჯანმრთელობაზე. იმისათვის, რომ ასეთი ღირებული პროდუქტი დაეცვათ, 1981 წელს მიიღეს კოდექსი თაფლის სტანდარტის შესახებ, რომელიც პერიოდულად იხვეწებოდა და ცვლილებები შეტანილ იქნა 1987, 2001 და 2019 წლებში. კოდექსის შექმნის მიზანი გახლდათ თაფლის წარმოებისა და შენახვის პირობების რეგულირება იმ პარამეტრების დადგენით, რომელიც განსაზღვრავდა თაფლის ხარისხს. ამ უკანასკნელის განსაზღვრის კრიტერიუმები, ევრორეგულაციის მიხედვით იყოფა 2 ჯგუფად: პირველი, ორგანოლეპტიკური მახასიათებლები, რომლებიც მოიცავს თაფლის ფერის, გემოს, კონსისტენციისა და არომატის განსაზღვრას და მეორე, ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლები (ტენიანობა, ნახშირწყლების შემცველობა, მჟავიანობა, pH, მინერალები, ელექტროგამტარობა, ვიტამინები, ცილები, ჰიდროქსიმეთილფურფუროლი, ორგანული მჟავების შემცველობა). ამ მახასიათებლებზე გავლენას ახდენს როგორც ნექტრის ტიპი, ასევე კლიმატი, ნიადაგი და თაფლის დამუშავების მეთოდები.

მტვრიანების ანალიზის საფუძველზე თავლის ნიმუშების ბოტანიკური წარმოშობის დადასტურების შემდეგ აკაციის, წაბლისა და ჯარას თავლის ნიმუშებში განსაზღვრულ იქნა ევრორეგულაციით გათვალისწინებული ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლები: წყლისა და მშრალი ნივთიერების შემცველობა, აქტიური მჟავიანობა, თავისუფალი მჟავების კონცენტრაცია, ელექტროგამტარობა, დიასტაზური აქტივობა, ცილისა და პროლინის რაოდენობა.

წყლის შემცველობა თავლში ხარისხის განმსაზღვრელი ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი პარამეტრია. რაც უფრო მეტია წყლის შემცველობა, მით უფრო მეტია შანსი თავლის შენახვის პერიოდში სპირტული დუღილის პროცესის განვითარებისათვის, რაც იწვევს თავლის ხარისხის გაუარესებას. წყლის მასური წილი ყველა თავლისათვის უნდა იყოს არაუმეტეს 20%.



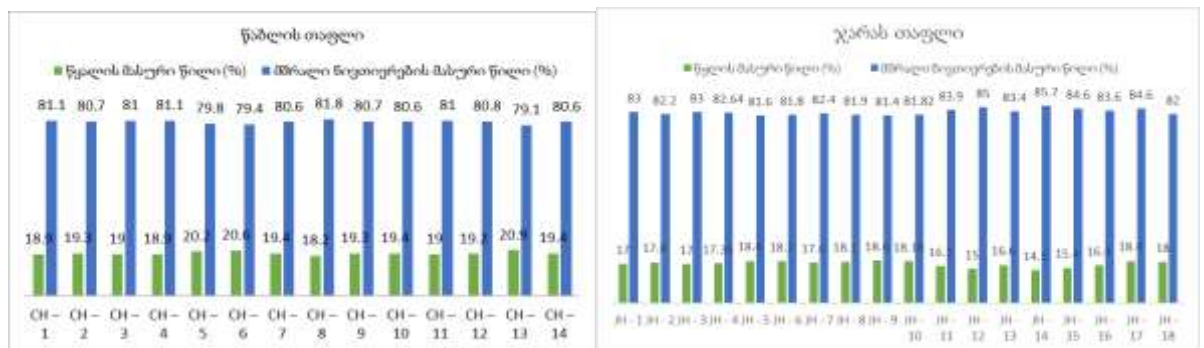
**დიაგრამა 3.** იმერეთის (ა), გურიის (ბ) და აჭარის (გ) რეგიონის აკაციის თავლის წყლისა და მშრალი ნივთიერების შემცველობა

საანალიზოდ აღებული აკაციის თავლის ნიმუშები მოყვითალო-ქარვისფერია, ხასიათდება აკაციის ყვავილისათვის დამახასიათებელი არომატით. ნიმუშებში წყლის მასური წილი, ევრორეგულაციისა და საქართველოში მოქმედი თავლის შესახებ ტექნიკური რეგლამენტის თანახმად, ნორმის ფარგლებშია (არაუმეტეს 20%-სა), კერძოდ,

16,9-დან 20%-მდე (დიაგრამა 3). მხოლოდ გამონაკლისს წარმოადგენს ACH8 (ხარაგაულის), ACH11 (ლანჩხუთის) და ACH23 (ქედის) ნიმუში, სადაც მაჩვენებელი 21,1%-ია. შედარებით დაბალი მაჩვენებელი, 15,8% დაფიქსირდა სამტრედიის მუნიციპალიტეტში აღებულ ნიმუშში (დიაგრამა 3 ა).

სამივე რეგიონიდან აღებულ ნიმუშებში წყლის საშუალო მაჩვენებელი ფაქტობრივად მსგავსია, იმერეთის რეგიონი 18.83 %, გურიის რეგიონი 18.75 % და აჭარის რეგიონი 18.74%. აკაციის თაფლში ხსნადი ნივთიერებების საერთო შემცველობა 78,9 – 84,2 %-ის ფარგლებშია.

საანალიზოდ აღებული წაბლის თაფლის 14-ვე ნიმუში მუქი ფერისაა, აქვს მომწარო-მოტკბო გემო, სუსტი არომატი და ძალიან სპეციფიკური, წაბლის ყვავილისათვის დამახასიათებელი სუნი. წყლის შემცველობა წაბლის თაფლის ნიმუშებში იყო 17,8-დან 20,0 %-მდე (დიაგრამა 4 ა). ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი ქობულეთში (ჩაქვში) მოპოვებულ თაფლში იყო, რაც რეგიონის მაღალი ფარდობითი ტენიანობით შეიძლება იყოს განპირობებული. შესაბამისად, წაბლის თაფლში შაქრის საერთო შემცველობა შეადგენს 80,0-82,3%-ს (საშუალო მაჩვენებელი 81,15%), რაც ასევე შეესაბამება რეგლამენტის მოთხოვნებს.



ა

ბ

**დიაგრამა 4.** წაბლის (ა) და ჯარას (ბ) თაფლის ნიმუშებში წყლისა და მშრალი ნივთიერების შემცველობა

ჯარას თაფლი წელიწადში ერთხელ, ჩვეულებრივ, იხილება შემოდგომის დასაწყისში, როდესაც ყვავილობის სეზონი დასრულდება. იქიდან გამომდინარე, რომ იგი შეიცავს მრავალი მცენარისა და ყვავილის თაფლს, ჯარას თაფლი შეიძლება

განსხვავდებოდეს ფერით, გემოთი და არომატით. წყლის მასური წილი ჯარას თაფლში მერყეობდა 14.3-დან 18.6%-მდე (დიაგრამა 4 ბ). მშრალი ნივთიერების მაღალი მნიშვნელობით (85-86%) გამოირჩევა მე-14, მე-15 და მე-17 ნიმუში.

აჭარის რეგიონიდან აღებული აკაციის თაფლის ნიმუშებში წყლის შემცველობის საშუალო მაჩვენებელია 18,77% შეადგინა, ხოლო ხსნადი ნივთიერებების საერთო შემცველობა 81,23%. ჯარას თაფლის ნიმუშებში წყლის შემცველობა 14,3%-დან 18,6%-მდე დიაპაზონში მერყეობს, შესაბამისად, ხსნადი ნივთიერებების მასური წილი 81,4%-დან - 85%-მდეა. ე.ი. ჯარას თაფლში წყლის შემცველობის საშუალო მაჩვენებელი 17,13%-ია, ხოლო ხსნადი ნივთიერებისა - 82,87%. წაბლის თაფლის ნიმუშებში წყლის შემცველობა 18,2 - 20,9 % ფარგლებშია, საშუალო მაჩვენებელი კი 19,40 %-ია. შესაბამისად, ხსნადი ნივთიერებების მასური წილი 79,1-81,8 %, ხოლო საშუალო მაჩვენებელი 80,58 %-ია.

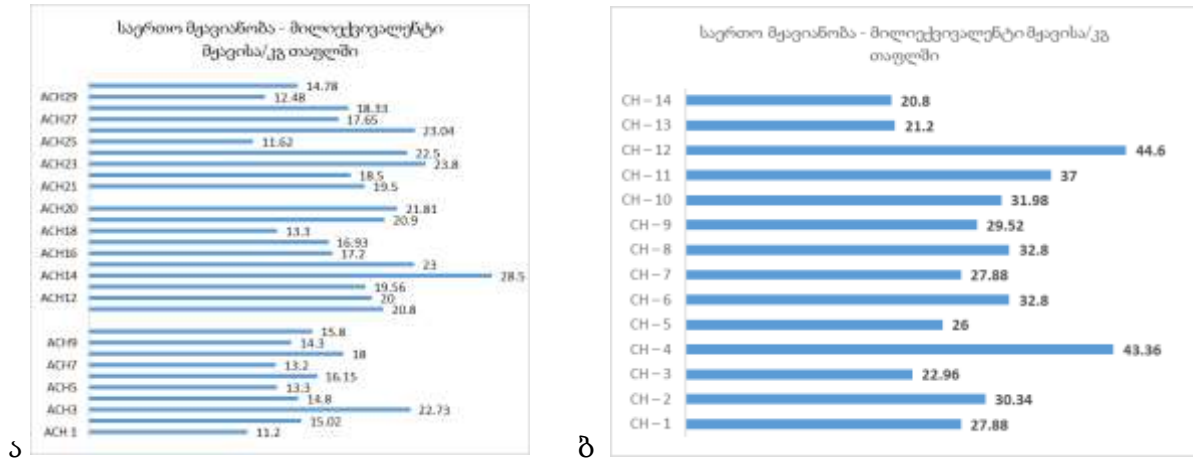
დასავლეთ საქართველოში მოწეულ თაფლის ნიმუშებში წყლის შემცველობა 20%-ზე ნაკლებია, კერძოდ, ყველაზე დაბალი მაჩვენებლით ჯარას თაფლის ნიმუშები გამოირჩევა - 17,13 %, მას მოსდევს აკაციის თაფლი - 18,77% და წაბლის თაფლი 19,40 %, რაც სტანდარტით (თაფლის საერთაშორისო კომისია) დადგენილ ნორმაშია. წყლის დაბალი შემცველობა უზრუნველყოფს თაფლის სტაბილურობასა და მდგრადობას ფერმენტული პროცესების მიმართ.

თავისუფალი მჟავების შემცველობა მნიშვნელოვანი მარკერია თაფლის სიმწიფის განსაზღვრისას. ასევე, ასახავს თაფლის შენახვის პერიოდში მიმდინარე ცვლილებებს. მისი მნიშვნელობა დაკავშირებულია თაფლში არსებულ ორგანულ მჟავებთან, რომლებიც წონასწორულ თანაფარდობაშია თაფლში არსებულ ესთერებთან, ლაქტონებთან და ზოგიერთ იონთან, როგორებიცაა: ფოსფატები, სულფატები და ქლორიდები. მჟავიანობის მომატებული მაჩვენებელი ასევე შეიძლება აჩვენებდეს იმ ფაქტს, რომ რაღაც ეტაპზე თაფლში მიმდინარეობდა დუდილის პროცესი და წარმოქმნილი სპირტი გარდაიქმნა ორგანულ მჟავად.

თაფლში მჟავიანობა შედარებით დაბალია, მაგრამ მნიშვნელოვანია თაფლის გემოს ფორმირებისათვის. თაფლის მჟავიანობა გამოიხატება მილიეკვივალენტებში კგ-ზე. საანალიზოდ წარმოდგენილ ნიმუშებში მჟავიანობა 50 ერთეულზე ნაკლებია,

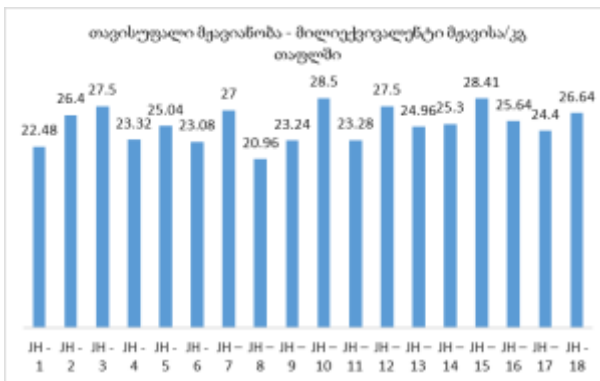


კერძოდ, იმერეთის აკაციის თაფლის ნიმუშებში საშუალო მაჩვენებელი 15,45 მილიექვივ/კგ, აჭარის ნიმუშებში 18,22 მილიექვივალენტი მჟავისა/კგ თაფლში და შედარებით მაღალია გურიის ნიმუშებში 20,2 მილიექვივალენტი მჟავისა/კგ თაფლში.



**დიაგრამა 5.** აკაციის (ა) და წაბლის (ბ) თაფლის ნიმუშების საერთო მჟავიანობა

წაბლის თაფლში კი 20,8-44,6 მილიექვივალენტი მჟავისა/კგ დიაპაზონშია (დიაგრამა 5 ბ). ჯარას თაფლის საერთო მჟავიანობის ანალიზის შედეგები ნაჩვენებია მე-6 დიაგრამაზე. კერძოდ, თავისუფალი მჟავიანობის მაჩვენებელი მერყეობდა 20,96-დან 28,5 მილიექვივალენტი მჟავისა /კგ-მდე, ხოლო აკაციის თაფლში შემცველობა 11,2-28,5 მილიექვივალენტი მჟავისა/კგ-ის ფარგლებშია (დიაგრამა 5 ბ).



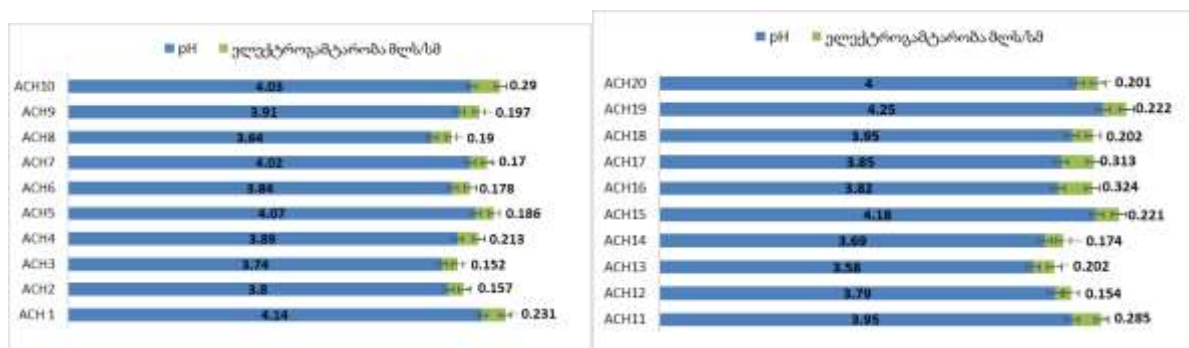
**დიაგრამა 6.** ჯარას თაფლის ნიმუშების საერთო მჟავიანობა

მიღებული შედეგების საშუალო მაჩვენებლების შეჯერებით, საერთო მჟავიანობა შედარებით დაბალია აკაციის თაფლში - 17,96, შემდეგ მაჩვენებელი იმატებს ჯარას თაფლში 25,2 და შედარებით მაღალია წაბლის ნიმუშებში 30,65 ერთეული.



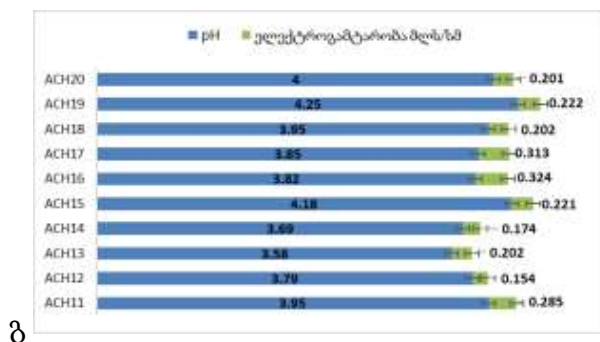
pH არის თაფლის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მახასიათებელი, რადგან იგი გავლენას ახდენს თაფლის ტექსტურაზე, სტაბილურობასა და შენახვის ვადაზე. კერძოდ, ხელს უშლის მიკრობიოლოგიური პროცესების განვითარებას. თაფლში pH მნიშვნელობა Codex Alimentarius Commission-ის მიერ არ არის განსაზღვრული. მისი მაჩვენებელი, ძირითადად, 3,2-დან 4,5-მდეა. მისი მნიშვნელობა ბევრ ფაქტორზეა დამოკიდებული, მათ შორის, ნექტრისა და ნიადაგის pH-იც.

საანალიზოდ წარმოდგენილი აკაციის თაფლის ნიმუშებში pH-ის მაჩვენებელი თითქმის მსგავსია. კერძოდ, იმერეთის აკაციის თაფლში 3,64-4,14, გურიის ნიმუშებში 3,58-4,25 და აჭარის ნიმუშებში 3,61-4,08 (დიაგრამა 7). წაბლის თაფლის ნიმუშებში pH - 4,5-დან 4,97-მდე (დიაგრამა 17), ჯარას ნიმუშებში კი pH - 4,23-დან - 5,63-მდეა (დიაგრამა 18), რაც სტანდარტთან შესაბამისობაშია (pH 3.40–6.10).



ა

ბ



გ

**დიაგრამა 7.** იმერეთის (ა), გურიის (ბ) და აჭარის (გ) რეგიონის აკაციის თაფლში pH და ელექტროგამტარობა

თაფლში ელექტროგამტარობის მაჩვენებელი მჭიდროდ არის დაკავშირებული თაფლის ბოტანიკურ წარმოშობასთან, ასევე მჟავიანობისა და მინერალების

მაჩვენებელთან. თაფლის შესახებ რეგლამენტის შესაბამისად ყვავილოვანი თაფლისათვის მისი მაჩვენებელი  $\leq 0,800$  მლს/სმ მაშინ, როცა წაბლის თაფლისათვის მისი მნიშვნელობა  $>0,800$  მლს/სმ-ზე მეტია. შესაბამისად, ელექტროგამტარობის ინდექსი, ყველა სხვა პარამეტრთან ერთად, არის მთავარი მარკერი თაფლის ბოტანიკური წარმოშობის დასადასტურებლად.

აკაციის თაფლის ნიმუშებში ელექტროგამტარობის მაჩვენებლის ზღვარი მსგავსია. კერძოდ, მინიმალური მნიშვნელობა დაფიქსირდა 0,152 მლს/სმ (საშუალო მაჩვენებელი) იმერეთის, 0,154 მლს/სმ (საშუალო მაჩვენებელი) გურიისა და აჭარის რეგიონის ნიმუშებისათვის. მაქსიმალური მაჩვენებელი 0,29 მლს/სმ (საშუალო მაჩვენებელი) იმერეთის, 0,285 მლს/სმ (საშუალო მაჩვენებელი) გურიისა და 0,282 მლს/სმ (საშუალო მაჩვენებელი) აჭარის თაფლებისათვის (დიაგრამა 7).

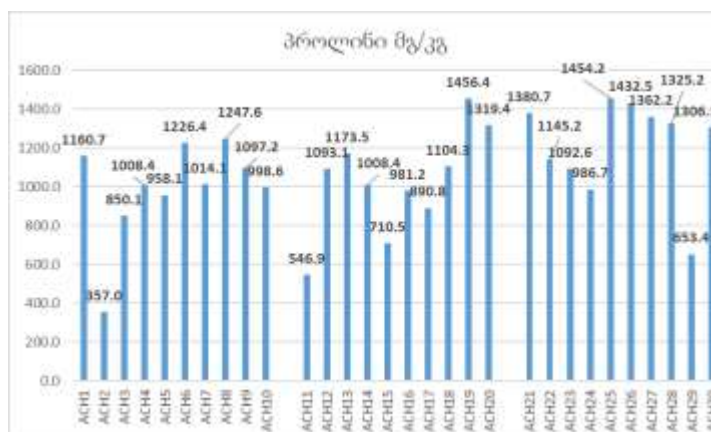


**დიაგრამა 8.** წაბლის (ა) და ჯარას (ბ) თაფლში pH და ელექტროგამტარობა

ელექტროგამტარობის მნიშვნელობები საანალიზოდ აღებულ წაბლის თაფლში იცვლებოდა 1,036-დან - 1,9162 მლს/სმ-მდე (დიაგრამა 8 ა), რაც შეეხება ჯარას თაფლის ნიმუშებს, ის 1.071-დან 1.706 მლს/სმ-მდეა (დიაგრამა 8 ბ).

ელექტროგამტარობის საშუალო მაჩვენებლებით ჯარასა და წაბლის თაფლის ნიმუშები თითქმის მსგავსია, შესაბამისად, 1,2441 და 1.43 მილისიმენსი/სმ, მაგრამ მეტად მცირეა აკაციის თაფლში-0,2293, რაც ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი განმასხვავებელი მარკერია სხვა თაფლებთან მიმართებით.

თაფლის ამინომჟავური შემადგენლობა მთლიანად არის დამოკიდებული თაფლის ბოტანიკურ წარმოშობაზე და ამიტომ მისი ხარისხობრივი და რაოდენობრივი შემცველობა წარმატებით გამოიყენება, როგორც თაფლის ნატურალობისა და ხარისხის მაჩვენებელი. თაფლში ამინომჟავების მასური წილი დაახლოებით 1%-ია. მის შემადგენლობაში შედის გლუტამინის მჟავა, ასპარაგინის მჟავა, გლიცინი, ტრეონინი, ჰისტიდინი, გლუტამინი, პროლინი და სხვა, მაგრამ მათ შორის უფრო მეტია პროლინი, რომელიც ძირითადად წარმოიქმნება ფუტკრის მიერ ნექტრის დამუშავებისას. მისი შემცველობა დამოკიდებულია ფუტკრის მიერ ნექტრის დამუშავების დროზე და, შესაბამისად, თაფლის წარმოშობაზე. იგი შეადგენს ამინომჟავების მთლიანი მასის დაახლოებით 50-85%-ს და მისი კონცენტრაცია სხვადასხვა თაფლში განსხვავებულია. რეგულაცია განსაზღვრავს პროლინის შემცველობას თაფლში და ის არ უნდა იყოს 180 მგ/კგ-ზე ნაკლები.



**დიაგრამა 9 . აკაციის თაფლში პროლინის შემცველობა**

მიღებული შედეგების შეჯერებით აკაციის თაფლის ნიმუშებში პროლინის შემცველობა 357-დან 1247 -მდე მგ/კგ იმერეთის ნიმუშებში (საშუალო მაჩვენებელი 991,8 მგ/კგ), გურიის თაფლში 546-დან 1456-მდე მგ/კგ (საშუალო მაჩვენებელი 1028,43 მგ/კგ) და აჭარის თაფლში 653-დან 1380-მდე მგ/კგ (საშუალო მაჩვენებელი 1213,88 მგ/კგ). საშუალო მაჩვენებლის მიხედვით, პროლინის შემცველობა შედარებით დაბალია იმერეთის რეგიონში, მას მოსდევს გურიისა და აჭარის რეგიონები (დიაგრამა 9 ).



ა



ბ

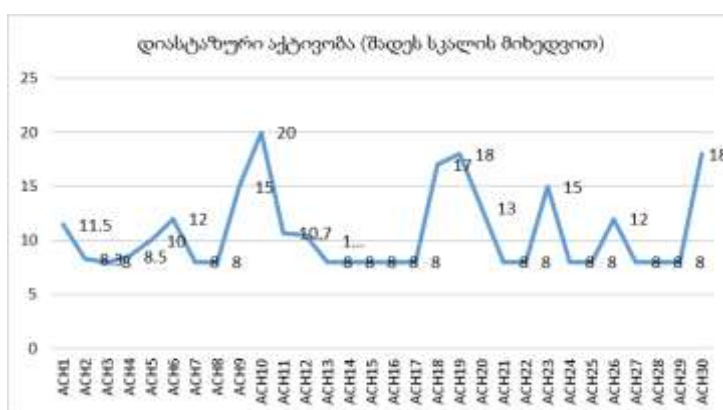
**დიაგრამა 10.** ჯარას (ა) და წაბლის (ბ) თაფლის ნიმუშებში პროლინის შემცველობა ჯარას თაფლის ნიმუშებში პროლინის შემცველობა მერყეობდა 761,28-დან 1372,29 მგ/კგ-მდე (დიაგრამა 23). პროლინის ყველაზე დაბალი კონცენტრაცია - JH-2 (761,28 მგ/კგ) და JH-3 (790,62 მგ/კგ) - დაფიქსირდა ქედის თაფლის ნიმუშებში. ხოლო ყველაზე მაღალი რაოდენობა დაფიქსირდა ხუთ ნიმუშში, JH - 5 (12498.39 მგ/კგ) და JH - 7 (1311,06 მგ/კგ), JH - 12 (1234.9 მგ/კგ), JH - 13 (1208.16 მგ/კგ) და JH - 18 (1372.29 მგ/კგ) (დიაგრამა 10 ა).

წაბლის თაფლში პროლინის შემცველობა 557,82 მგ/კგ-დან 1938,86 მგ/კგ-მდეა. შედარებით დაბალი მაჩვენებელია გურიის, ასკანის ნიმუშში - 557,82 მგ/კგ, 803,13 მგ/კგ ქედა, ოტოლადეების თაფლში და 980,67 მგ/კგ წყალტუბოს (ნამახვანი) ნიმუშში. 1300 ერთეულის ფარგლებშია იმერეთის (ბაღდათი, ზეგანი), ქობულეთისა (CH5) და ქედის რამდენიმე ნიმუშში (CH3 და CH4). წარმოდგენილ ნიმუშებს შორის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი დაფიქსირდა ქედის, სოფელ ჯალაბაშვილების თაფლში - 1938,86 მგ/კგ (დიაგრამა 10 ბ).

№22, №23, №24 და №25 დიაგრამა გვიჩვენებს, რომ ჯარას თაფლის ყველა ნიმუშში პროლინის შემცველობა საკმაოდ მაღალი იყო, წაბლის თაფლის ნიმუშებში პროლინის კონცენტრაცია 557,82-დან - 1938,86 მგ/კგ-მდეა, ხოლო აკაციის თაფლში 357 – 1556,1 მგ/კგ. წარმოდგენილ ნიმუშებს შორის პროლინის ყველაზე დაბალი მაჩვენებელი დაფიქსირდა აკაციის თაფლში 357 მგ/კგ და ყველაზე მაღალი \_ წაბლის თაფლში 1938,86 მგ/კგ. საშუალო მაჩვენებლის მიხედვით, აკაციისა და ჯარას თაფლის ნიმუშებში პროლინის შემცველობა თითქმის თანაბარია (1078,04 მგ/კგ და 1063,22 მგ/კგ), შედარებით მეტია 1277,21 მგ/კგ წაბლის თაფლში.

დიასტაზური აქტივობა არის თავლის ხარისხის ერთ-ერთი განმსაზღვრელი ფაქტორი. თავლში გვხვდება გლუკოოქსიდაზები,  $\alpha$  და  $\beta$  ამილაზები,  $\alpha$  და  $\beta$  გლუკოზიდაზები, ასევე – პროტეაზა. თავლი ერთმანეთისაგან განსხვავდება ფერმენტების შემადგენლობითა და რაოდენობით, რადგან მათი შემცველობა მთლიანად დამოკიდებულია როგორც ნექტრის შეგროვების პერიოდზე, ასევე ფუტკრის კოლონიის ფიზიოლოგიურ ასაკსა და ნიმუშის შენახვის პირობებზე.  $\alpha$  და  $\beta$  ამილაზები ანუ დიასტაზები - ეს ის ფერმენტებია, რომლებიც შედარებით დიდი რაოდენობით გვხვდება თავლში და მათი შემცველობა დამოკიდებულია ბოტანიკურ და გეოგრაფიულ წარმომავლობაზე. დიასტაზა სახამებელს შლის მალტოზად. დიასტაზური (ამილოლიზური) აქტივობა იზომება შადეს სკალის მიხედვით და ყველა სახის თავლისათვის უნდა იყოს არანაკლებ 8 ერთეულისა.

ანალიზის შედეგად აკაციის თავლის 30 ნიმუშიდან 15 ნიმუშში (ACH 3, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 29) მისი მაჩვენებელი 8-ზე ნაკლებია. დიასტაზური აქტივობის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი დაფიქსირდა გურიის რეგიონის მეათე ნიმუშში - 20, აჭარის ოცდამესამე - 15, ოცდამეექვსე - 12 და ოცდამეათე ნიმუშში - 18 ერთეული. დიასტაზური აქტივობის 8 ერთეულზე მეტი მაჩვენებლის გამოკლებით დანარჩენ 15 ნიმუშში მაჩვენებელი განისაზღვრა 13,3 ერთეულით (საშუალო მაჩვენებელი) (დიაგრამა 11).



**დიაგრამა 11.** აკაციის თავლში დიასტაზური აქტივობა

წაბლის თავლის 14 ნიმუშიდან მხოლოდ 3 თავლში დაფიქსირდა 8 ერთეული, ეს გახლავთ ქედის რაიონის 2 სოფლის, ხარაულასა და დანდალოს, ნიმუში, ასევეა



ქობულეთის ნიმუშში. ყველა დანარჩენ შემთხვევაში ის 8-ზე მეტია (11-დან 25-მდე) (დიაგრამა 12 ა).



ა

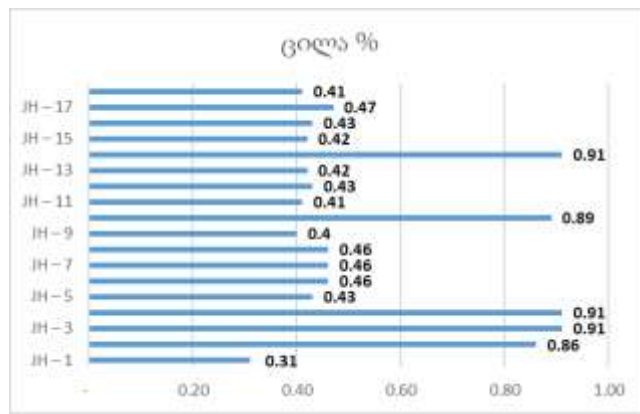
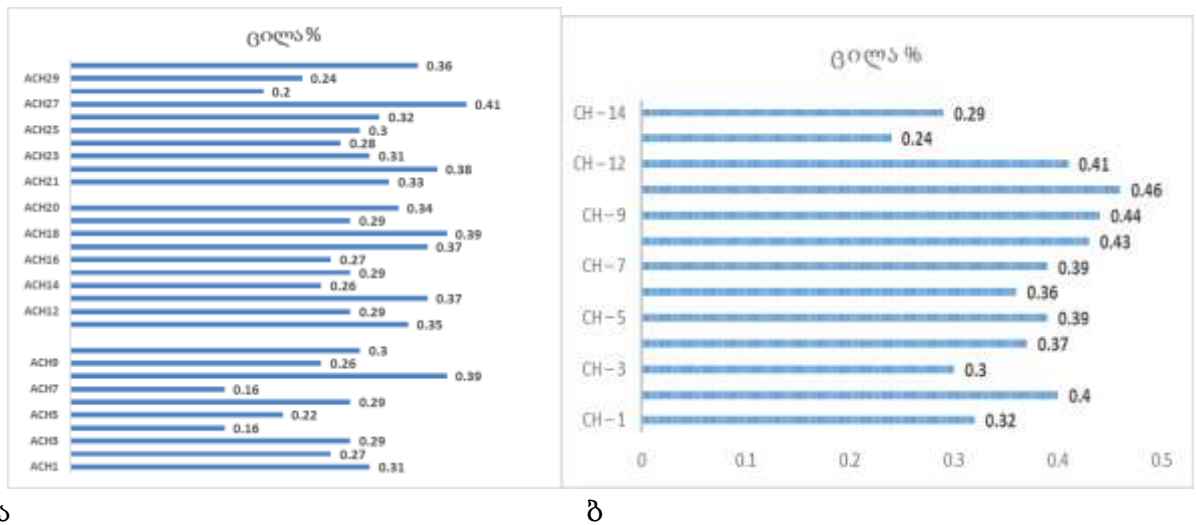
ბ

**დიაგრამა 12.** წაბლის (ა) და ჯარას (ბ) თაფლში დიასტოლური აქტივობა

ჯარას თაფლში დიასტოლური აქტივობის მაჩვენებელი 9-დან 27-მდეა, განსაკუთრებით აღსანიშნავია, შუახვევის თაფლის ნიმუშები, რომლებშიც გაცილებით მაღალია აქტივობის მაჩვენებელი, შესაბამისად, ფერმენტების კონცენტრაცია (დიაგრამა 12 ბ). ჯარას თაფლის ნიმუშებში ასეთი კანონზომიერება მართებულია, რადგანაც ტყეში თაფლოვან მცენარეთა არსენალია.

საანალიზოდ აღებულ თაფლის ნიმუშებში დიასტოლური აქტივობა გაცილებით მაღალია, ვიდრე 8 ერთეული, კერძოდ, აკაციის თაფლისათვის 8-დან 30-მდეა (საშუალო მაჩვენებელი: 11.91 ერთეულია), თითქმის მსგავსია წაბლისა და ჯარას თაფლის შემთხვევაში 8-დან 27-მდე (საშუალო მაჩვენებელი: 16.42 - 16.44).

თაფლში ცილის კონცენტრაცია ძალიან მცირეა, იგი ძირითადად ფუტკრის მიერ ხვდება, შესაბამისად, მისი შემცველობა დამოკიდებულია ფუტკრის მიერ თაფლის გადამუშავების დროსა და ხარისხზე. მისი შემცველობა საანალიზოდ აღებული აკაციის თაფლის ნიმუშებში 0,16 – 0,39%-ის ფარგლებშია. შედარებით მაღალი მაჩვენებლით გამოირჩევა იმერეთის ერთი (აკაციის თაფლი 8) ნიმუში - 0,39%, გურიის 3 ნიმუში (აკაციის თაფლი 13 (0,37%), 17 (0,37%) და 18 (0,39%)) და აჭარის 1 ნიმუში (აკაციის თაფლი 8 (0,39%) (დიაგრამა 13 ა).



დიაგრამა 13. აკაციის (ა), წაბლის (ბ) და ჯარას (გ) თაფლის ნიმუშებში ცილის შემცველობა დასავლეთ საქართველოში მოწეული თაფლების ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლები ცხრილი №1

ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლები	დასავლეთ საქართველოში მოწეული თაფლი		
	აკაციის თაფლი	წაბლის თაფლი	ჯარას თაფლი
წყლის შემცველობა %	18,77	19,4	17,13
მშრალი ნივთიერებების მასური წილი, გ/100 გ	81,23	80,58	82,87
საერთო მჟავიანობა მლიექვივალენტი მჟავისა/კგ თაფლში	17,0	30,65	25,2
ელექტროგამტარობა მლს/სმ	0,2293	1,430	1,2551
pH	3,93	4,7	5,06
პროლინი მგ/კგ	1078,04	1277,21	1063,22
ცილა %	0,3	0,37	0,56
დიასტაზური აქტივობა (შადეს სკალის მიხედვით)	10,65	16,43	21,14

წალის თაფლში ცილის შემცველობა თითქმის მსგავსია (0,24%-დან 0,46%-მდე), მკვეთრი სხვაობა ნიმუშებს შორის არ ფიქსირდება. შედარებით დაბალი მაჩვენებელია წაბლის თაფლის მე-13 ნიმუშში (ბაღდათი, ზეგანი)(დიაგრამა 13 ბ).

ჯარას თაფლის ნიმუშებში ცილის შემცველობა მერყეობდა 0,31-დან 0,91%-მდე (დიაგრამა 13 გ). ცილის მაღალი კონცენტრაცია, თითქმის 1%-მდე, ფიქსირდება ქედისა 4 (JH2, JH3, JH4 JH და ხულოს 1 ნიმუშში (JH14).

მიღებული შედეგების შეჯერებით აკაციის თაფლში ცილის შემცველობის საშუალო მაჩვენებელი 0,3 %-ია, წაბლის თაფლის ნიმუშებში 0,37%, ხოლო ჯარას ნიმუშებში 0,56%-ია.

დასავლეთ საქართველოში მოწეული აკაციის, წაბლისა და ჯარას თაფლის ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლების საშუალო მაჩვენებლები მოცემულია №4 ცხრილის სახით. განსაზღვრული მახასიათებლების მნიშვნელობებით (სხვა ქრომატოგრაფიულ კვლევებთან ერთად) შევძლებთ, დავადასტუროთ დასავლეთ საქართველოში მოწეული თაფლის ნატურალობა და წარმოშობა.

## **1.5. დასავლეთ საქართველოში მოწეული თაფლის ნახშირწყლების კვლევა HPLC რეფრაქტომეტრული დეტექტირების მეთოდით**

ნახშირწყლები თაფლის მეტად მნიშვნელოვანი კომპონენტია და ძირითადად წარმოდგენილია მონო და დისაქარიდების სახით. თაფლში ნახშირწყლების ხარისხობრივ და რაოდენობრივ შემცველობას, უპირველეს ყოვლისა, მისი ბოტანიკური და გეოგრაფიული წარმოშობა განაპირობებს. თუმცა, ნახშირწყლების რაოდენობას ასევე განსაზღვრავს ისეთი ფაქტორები, როგორებიცაა ამინდი, თაფლის დამუშავების მეთოდები და შენახვის პირობები.

თაფლში ნახშირწყლების იდენტიფიკაცია განხორციელდა მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდით, HPLC-Waters Breeze RI Detector 2414 ხელსაწყო გამოყენებით. სვეტი - Carbohydrate, სვეტის ტემპერატურა 40°C მობილურ ფაზა 80 %-იანი აცეტონიტრილი (Merck; Sigma-Aldrich), დეტექტირება RI.



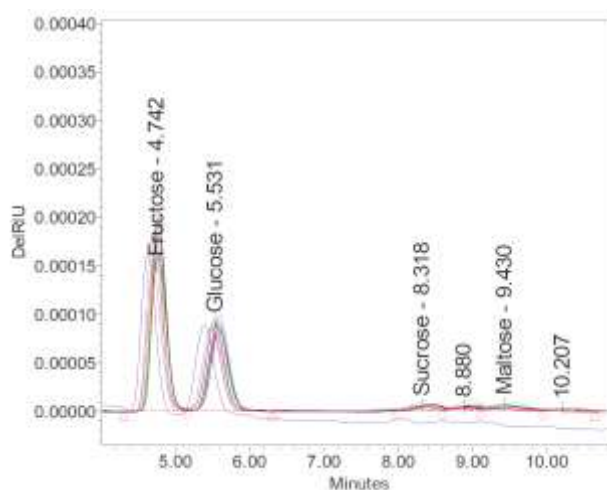
ცალკეული ნაერთების იდენტიფიკაციისა და რაოდენობრივი ანალიზისათვის გამოყენებულ იქნა ჩვენს ხელთ არსებული სტანდარტული ნაერთები: გლუკოზა, ფრუქტოზა, მალტოზა და საქაროზა. პიკების იდენტიფიცირება განხორციელდა მათი შეკავების დროის მიხედვით, ხოლო მიღებული შედეგების გადაანგარიშება – სტანდარტული ნაერთების საკალიბრო მრუდის მიხედვით (ცხრილი 2).

### ნახშირწყლების სტანდარტების ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები

ცხრილი 2

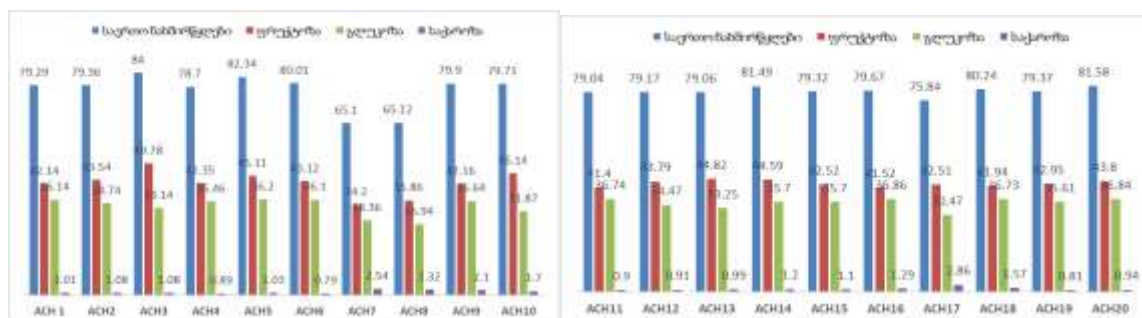
Name	Time	R	R <sup>2</sup>	Standard Error	Equation
Fructose	4.344	0.999791	0.999582	1.577167e+004	Y = 4.36e+005 X + 6.44e+003
Glucose	5.351	0.999930	0.999860	2.187388e+004	Y = 8.71e+005 X + 8.93e+003
Sucrose	7.236	0.999894	0.999788	2.178549e+004	Y = 8.47e+005 X + 8.89e+003
Maltose	8.640	0.999877	0.999753	1.705166e+004	Y = 6.14e+005 X + 6.96e+003

საანალიზოდ აღებულ იქნა 5 გ თაფლის ნიმუში, რომელიც გავხსენით 40 მლ. წყალში, წყალხსნარი რაოდენობრივად გადაგვქონდა 100 მლ მოცულობის მზომ კოლბაში და ვუმატებდით 25 მლ მეთანოლს. კოლბის მოცულობა გამოხდილი წყლით მიგვყავდა ნიმუნხანამდე. საანალიზოდ მომზადებულ ნიმუშს ვფილტრავდით 0,45 მიკრონის ზომის მემბრანულ ფილტრში და შემდეგ ვახდენდით ნიმუშების ქრომატოგრაფიულ კვლევას.



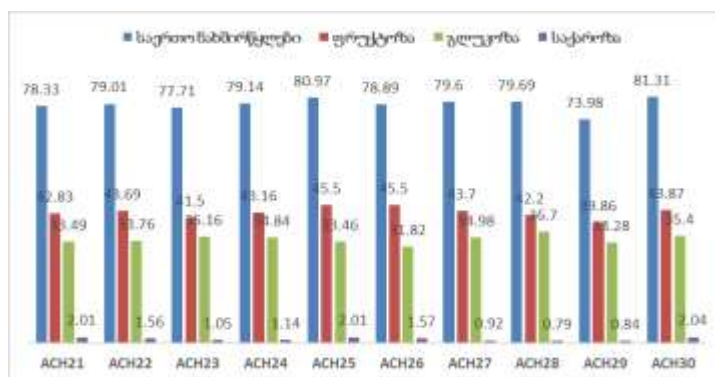
სურათი 1. თაფლის ნახშირწყლების საერთო ქრომატოგრამა

აკაციის თაფლის ნიმუშებში იდენტიფიცირებულ იქნა ფრუქტოზა, გლუკოზა და საქაროზა. მიღებული შედეგების შეჯერებით საანალიზოდ აღებულ 30-ვე ნიმუშში დომინანტი ნახშირწყალი არის ფრუქტოზა, მისი რაოდენობა იმერეთის რეგიონის ნიმუშებში 34,2 – 49,78%-ის ფარგლებშია (საშუალო მაჩვენებელი - 42,44%) (დიაგრამა 14 ა).



ა

ბ

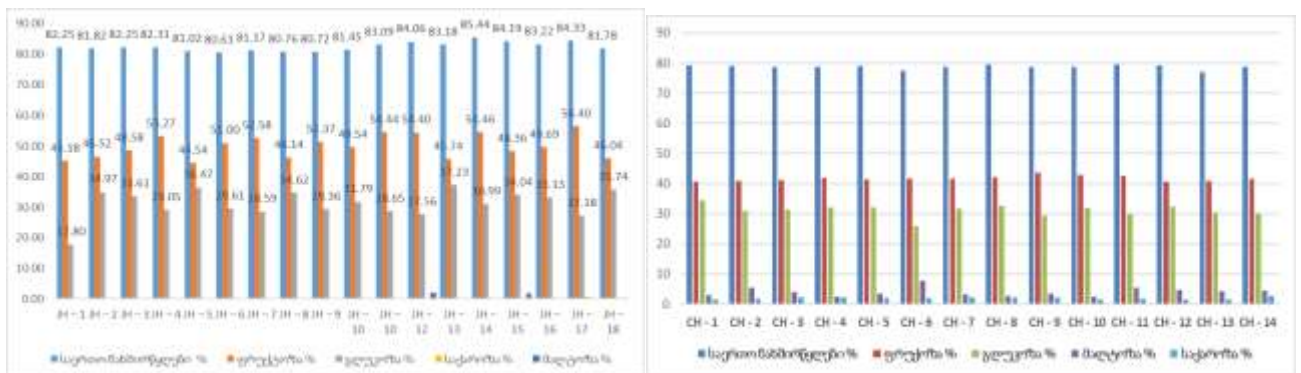


გ

**დიაგრამა 14.** იმერეთის (ა), გურიის (ბ) და აჭარის (გ) რეგიონის აკაციის თაფლის ნახშირწყლების შემცველობა (%)

გურიის რეგიონის ნიმუშებში 41,4-44,82%-ის ფარგლებში (საშუალო მაჩვენებელი - 42,98%) (დიაგრამა 14 ბ) და აჭარის რეგიონის ნიმუშებში 41,5-45,5% (საშუალო მაჩვენებელი - 43,18%) (დიაგრამა 14 გ). რაც შეეხება გლუკოზის შემცველობას, მისი საშუალო მაჩვენებელი იმერეთის რეგიონის თაფლებში - 33,46% (26,94-დან 36,14% -მდე) (დიაგრამა 14 ა), გურიის რეგიონის ნიმუშებში - 35,24% (30,47%-დან 36,86%-მდე) (დიაგრამა 14 ბ) და 34,3% (31,82%-დან 35,4%-მდე) აჭარის რეგიონის ნიმუშებისათვის (დიაგრამა 14 გ).

თაფლში საქაროზის რაოდენობა მნიშვნელოვანი პარამეტრია თაფლის ნატურალობის დადასტურებისათვის, რადგანაც თაფლის შესახებ ტექნიკურ რეგლამენტში მითითებულია, რომ საქაროზის შემცველობა არ უნდა აღემატებოდეს 5%-ს . საქაროზის შემცველობის საშუალო მაჩვენებელი სამივე რეგიონის აკაციის თაფლის ნიმუშებისათვის 1,26-1,44-ია, რაც ნორმის ფარგლებშია. მიღებული შედეგებით, ფრუქტოზის შემცველობა (საშუალო მაჩვენებლის მიხედვით) შედარებით მეტია აჭარის რეგიონის თაფლებში, ხოლო გლუკოზის შემცველობა \_ გურის ნიმუშებში.



ა

ბ

**დიაგრამა 15. ჯარას (ა) და წაბლის (ბ) თაფლის ნახშირწყლების შემცველობა (%)**

ჯარას თაფლში მონოსაქარიდების (ფრუქტოზა და გლუკოზა) საერთო შემცველობა შეადგენს დაახლოებით 75%-ს, ხოლო დისაქარიდების 10-15%-ს . ჯარას თაფლის ნიმუშებში იდენტიფიცირებულ იქნა ფრუქტოზა, გლუკოზა, საქაროზა და მალტოზა. მათ შორის დომინანტი ნაერთი იყო ფრუქტოზა და გლუკოზა. მიღებული შედეგების შედარებისას შეიძლება დავასკვნათ, რომ ჯარას თაფლის ნიმუშებში ფრუქტოზის კონცენტრაცია იყო 44,5 - 56,4%, ხოლო გლუკოზის 27,8 - 37,07 % (დიაგრამა 15 ა). საანალიზოდ აღებულ ჯარას თაფლის ნიმუშებში, მაჩვენებლების საშუალო მნიშვნელობის გათვალისწინებით, დომინანტი ნაერთია ფრუქტოზა (38,94%), მას მოსდევს გლუკოზა (31,65%).

საქაროზა იდენტიფიცირებული იყო მხოლოდ 8 ნიმუშში - JH -2, JH - 3, JH - 10, JH - 13, JH - 16, JH - 17 0,065-დან 0,403%-მდე დიაპაზონში. მალტოზა იდენტიფიცირებული იყო მხოლოდ 2 ნიმუშში JH - 12 და Jh - 15 (დიაგრამა 15 ა). მალტოზის შემცველობა იყო

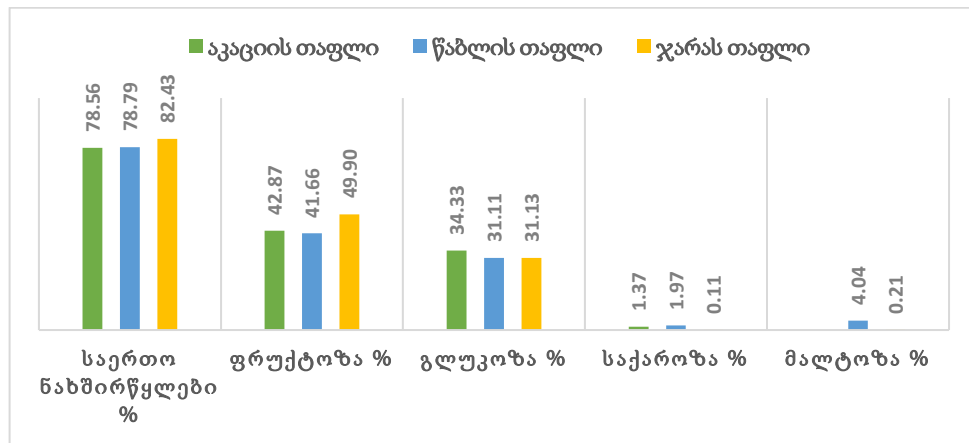
2,006 და 1,8%. საქაროზასა და მალტოზის შემცველობა მნიშვნელოვნად დაბალია, ვიდრე ფრუქტოზისა და გლუკოზის შემცველობა.

წაბლის თაფლის ნიმუშებში ნახშირწყლებიდან დომინანტი არის ფრუქტოზა. იგი წარმოადგენს ნახშირწყლების საერთო რაოდენობის 50 – 55 %-ს. ხოლო 35 – 42 % არის გლუკოზა, საქაროზა საერთო შემცველობის 1.4 -2.75 %-ია, მალტოზა კი 2.4-7.5 %. უნდა აღინიშნოს, რომ საქაროზა არცერთ ნიმუშში არ აღემატება 2,75%-ს, რაც ასევე ადასტურებს ყველა ნიმუშის ნატურალობას (დიაგრამა 15 ბ). ჯარას თაფლის ნიმუშებისაგან განსხვავებით წაბლის თაფლის ყველა ნიმუშში იდენტიფიცირებულია საქაროზა და მალტოზა.

თაფლის ხარისხის შეფასებისას ასევე მნიშვნელოვანი მაჩვენებელია ფრუქტოზა/გლუკოზისა (F/G) და გლუკოზა/წყლის (G/W) თანაფარდობა. თაფლი მაშინ კრისტალდება, როცა ფრუქტოზისა და გლუკოზის თანაფარდობის მაჩვენებელი 1-ზე ნაკლებია, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ მოცემულ თაფლში გლუკოზის შემცველობა ჭარბობს ფრუქტოზისას. საანალიზოდ აღებულ აკაციის თაფლის ნიმუშებში ფრუქტოზა/გლუკოზის ფარდობის საშუალო მაჩვენებელი პირველი 10 თაფლის ნიმუშისათვის (აჭარის რეგიონი) 1,27-ია, მეორე 10 ნიმუშისათვის ( ACH11 – ACH20) არის 1,22 და 1,25-ია იმერეთის თაფლში, რაც კარგი მახასიათებელია აკაციის თაფლისთვის.

ასევე, მეტად მნიშვნელოვანია გლუკოზისა და წყლის თანაფარდობის მაჩვენებელი აკაციის თაფლის წარმოდგენილი ნიმუშიდან 7-ში - ACH3, ACH5, ACH14, ACH18, ACH20, ACH28 და ACH30-ში - გლუკოზისა და წყლის ფარდობის მაჩვენებელი 2,03 – 2,11-ის ფარგლებშია, რაც კრისტალიზაციის პროცესის განვითარების მაჩვენებელია. იმერეთის რეგიონის 3 ნიმუშში (ACH7, ACH8, ACH10), ასევე აჭარის რეგიონის 3 ნიმუშში (ACH21, ACH22, ACH23) ფარდობის მაჩვენებელი 1,7-ზე ნაკლებია, სადაც კრისტალიზაციის პროცესის წარმართვის შანსი ნაკლებია ან სუსტად წარიმართება. თაფლის დანარჩენ ნიმუშებში კი ფარდობის მაჩვენებელი 1,74-დან 1,94-მდეა.

წაბლის თაფლის წარმოდგენილ ნიმუშებში ორივე ფარდობის მახასიათებელი საკმაოდ მაღალია. კერძოდ, ფრუქტოზა/გლუკოზის თანაფარდობის საშუალო მაჩვენებელი 1,34-ია, ხოლო გლუკოზა/წყლის \_ 1,6.



**დიაგრამა 16.** აკაციის, ჯარასა და წაბლის თაფლის ნახშირწყლების საშუალო შემცველობა

ჯარას თაფლის ნიმუშებში ფრუქტოზა/გლუკოზის თანაფარდობა მერყეობდა 1.09-დან 2.08-მდე და გლუკოზა/წყლის თანაფარდობა 1,05-დან 2,24-მდე. ფიქსირდება მხოლოდ 2 შემთხვევა, როცა ფარდობის მაჩვენებელი 1-თან ახლოს არის. პირველი, როცა ფრუქტოზა/გლუკოზის თანაფარდობა არის 1,09 (JH18), მაგრამ ამ შემთხვევაში საკმაოდ მაღალია გლუკოზა/წყლის ფარდობა (1,99). მეორე შემთხვევა, როცა გლუკოზა/წყლის ფარდობის მაჩვენებელი 1,05-ია (JH1), მაგრამ აქაც ფრუქტოზა/გლუკოზის განაყოფის მაჩვენებელი 1,22-ია. შესაბამისად, არ ფიქსირდება კრისტალიზაციის პროცესი.

წაბლისა და ჯარას თაფლი არ მიეკუთვნება ადვილად კრისტალირებად თაფლებს. HPLC მეთოდით თაფლის ნიმუშებში გამოყოფილ და იდენტიფიცირებულ იქნა 4 ნახშირწყალი: ფრუქტოზა, გლუკოზა, საქაროზა და მალტოზა. მათ შორის დომინანტი არის ფრუქტოზა. ფრუქტოზა/გლუკოზისა (F/G) და გლუკოზა/წყლის (G/W) ფარდობის მაჩვენებლის მიხედვით, აკაციის თაფლისაგან განსხვავებით, წაბლისა და ჯარას თაფლი არ მიეკუთვნება ადვილად კრისტალირებად თაფლებს.

## 1.6. თაფლის კატიონების თვისობრივი და რაოდენობრივი კვლევა HPLC

### კონდუქტომეტრული დეტექტირების მეთოდის გამოყენებით

თაფლი შეიცავს სხვადასხვა მაკრო და მიკრო ელემენტს. ისინი თაფლში წარმოდგენილია 0,02–1,03%-ის ფარგლებში: k, Na, Mg, Ca, P, Mn, Fe, Li, Co და ა.შ. მათი შემადგენლობა იცვლება თაფლის ბოტანიკური და გეოგრაფიული წარმოშობის შესაბამისად. მინერალების შემცველობა გავლენას ახდენს თაფლის ფერზე, კერძოდ, რაც

უფრო მეტია მათი კონცენტრაცია თაფლში, მით უფრო მუქი შეფერილობისაა იგი. მინერალების შემცველობა ასევე შეიძლება გამოყენებულ იქნას, როგორც ერთ-ერთი მარკერი თაფლის ნატურალობის დადასტურებისათვის.

კატიონების კვლევა ჩატარდა ქრომატოგრაფიული მეთოდით, მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფის, კონდუქტომეტრული დეტექტორის გამოყენებით. იზოკრატული ტუმბო (Isocratic HPLC pump - Waters 1515), დეტექტორი (Waters 432 - Conductivity), ქრომატოგრაფიული სვეტი ICPakCationMD, ელუენტი 0.1 mM EDTA, ელუენტის გამტარებლობა  $1250 \pm 50 \mu\text{S}$ , საბაზო მგრძნობელობა  $2000 \mu\text{S}$ , ინტეგრატორის მგრძნობელობა  $0.01\mu\text{S}$ , სვეტის ტემპერატურა  $35^{\circ}\text{C}$ , პოლარობა-negative.

მიღებული კომპონენტების იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებულ იქნა სტანდარტები: ლითიუმის ჰიდროქსიდის მონოჰიდრატი ( $\text{Li}^+$ ), ნატრიუმის ქლორიდი ( $\text{Na}^+$ ), ამონიუმის ქლორიდი ( $\text{NH}_4^+$ ), კალიუმის ქლორიდი ( $\text{K}^+$ ), მაგნიუმის ჰიდრატი ( $\text{Mg}^{2+}$ ), კალციუმის ნიტრატი ტეტრაჰიდრატი ( $\text{Ca}^{2+}$ ), სტრონციუმის ნიტრატი ტეტრაჰიდრატი ( $\text{Sr}^{2+}$ ), ბარიუმის ქლორიდი დიჰიდრატი ( $\text{Ba}^{2+}$ ) (FisherScientific), EDTA (Serva).

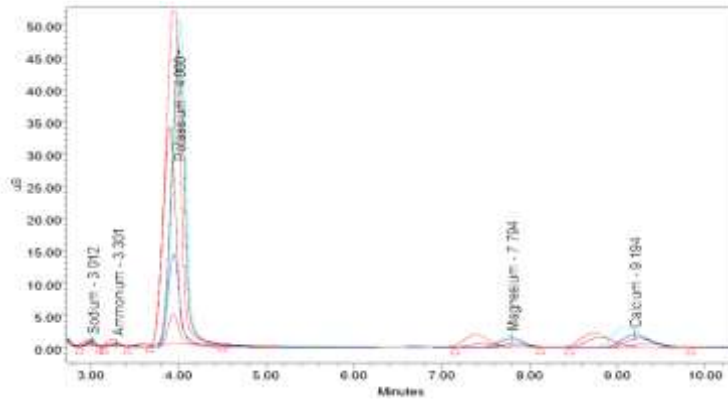
მინერალების რაოდენობრივი შემცველობის განსაზღვრისათვის გამოყენებულ იქნა სტანდარტულ ნაერთთა საკალიბრო მრუდები.

**სტანდარტულ კატიონთა გამოსათვლელი საკალიბრო მრუდები ფორმულები**

**ცხრილი №3**

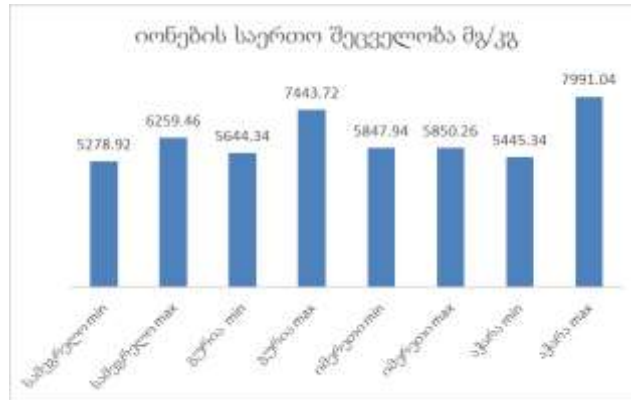
სტანდარტულ ნაერთთა საკალიბრო მრუდები	
ლითიუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა	$Y = 3.55e+005 X - 7.26e+003$
ნატრიუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა	$Y = 1.44e+005 X + 9.50e+004$
ამონიუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა	$Y = 1.65e+005 X + 1.21e+005$
კალიუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა	$Y = 7.79e+004 X + 6.01e+004$
მაგნიუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა	$Y = 2.97e+005 X + 2.76e+005$
კალციუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა	$Y = 1.28e+005 X + 2.28e+005$

კატიონების კვლევა განხორციელდა აკაციის, წაბლის, ცაცხვის, ცაცხვ-წაბლის, პოლიფლორულ თაფლსა და ჯარას თაფლის ნიმუშებში. თაფლის ნიმუშები აღებულ იქნა სამეგრელოს, გურიის, იმერეთისა და აჭარის რეგიონებში.



**სურათი 2:** თაფლის კატიონების დამახასიათებელი ქრომატოგრამა

ქრომატოგრაფიული კვლევისათვის თაფლის ნიმუშებს ვხსნიდით 1:10 თანაფარდობით დეიონიზებულ წყალში და მიღებულ წყალხსნარს ვფილტრავდით 0.45 მიკრონი ზომის ფილტრში.



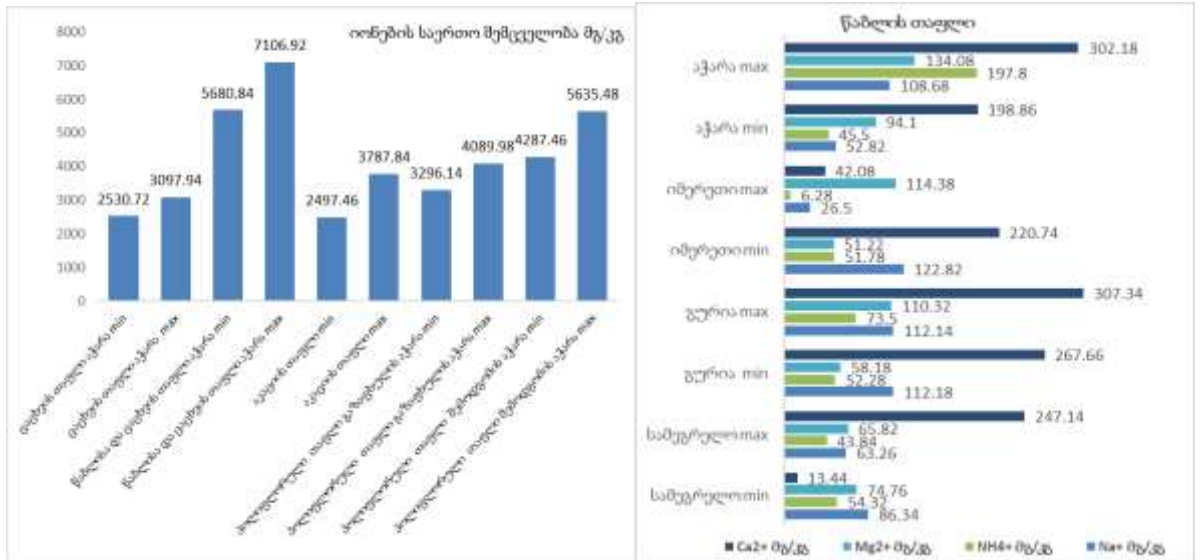
**დიაგრამა 17.** იონების საერთო შემცველობა სამეგრელოს, გურიის, იმერეთისა და აჭარის წაბლის თაფლში

საანალიზოდ აღებულ ნიმუშებში იდენტიფიცირებულ იქნა ნატრიუმის, ამონიუმის, კალიუმის, მაგნიუმისა და კალციუმის იონები. მათი ჯამური შემცველობა საშუალო მაჩვენებლების მინიმალური (min) და მაქსიმალური (max) მნიშვნელობებითაა წარმოდგენილი (დიაგრამა 17), კერძოდ, წაბლის თაფლის ნიმუშებში - სამეგრელო 5278,92 და 6259,46 მგ/კგ, გურია 5644,34 და 7443,72 მგ/კგ, იმერეთი 5847,94 და 5850,26 მგ/კგ, აჭარა 5445,34 და 7991,04 მგ/კგ.

წაბლის თაფლში იონების შემცველობა შედარებით მეტია, ვიდრე ცაცხვის (2530,72 - 3097,94 მგ/კგ), აკაციის (2497,46 - 3787,84 მგ/კგ), გაზაფხულის პოლიფლორულ (3296,14 - 4089,98 მგ/კგ) და შემოდგომის პოლიფლორულ (4287,46 - 5635,48 მგ/კგ) თაფლში. მაგრამ



ცაცხვი-წაბლის თაფლში თითქმის მსგავსია 5680,84-7106,92 მგ/კგ, რაც შეიძლება გამოწვეული იყოს თაფლში წაბლის მტვრიანების არსებობით.



**დიაგრამა 18.** (ა) აჭარის რეგიონში მოწეულ სხვადასხვა თაფლში იონების საერთო შემცველობა მგ/კგ (მინიმალური (min) და მაქსიმალური (max) მნიშვნელობებით). (ბ) წაბლის თაფლში იონების საერთო შემცველობა მგ/კგ

საანალიზოდ აღებულ ყველა ნიმუშში კატიონებს შორის დომინანტი კალიუმის იონია, მაგრამ მისი რაოდენობა ცვალებადია თაფლის წარმოშობის მიხედვით. კალიუმის მაღალი შემცველობით წაბლის თაფლის ნიმუშები გამოირჩევა. მისი შემცველობა თაფლში დაახლოებით 5050,06-დან 7248,30 მგ/კგ-მდეა. რეგიონების მიხედვით, კალიუმის იონებს შორის მკვეთრად გამოხატული სხვაობა არ ფიქსირდება. განსაკუთრებით საინტერესო იყო ზღვის დონიდან 300მ სიმაღლეზე მდებარე მთიან სოფელში შეგროვებული თაფლი. მასში კალიუმის შემცველობა აღემატებოდა 7000 მგ/კგ-ს.

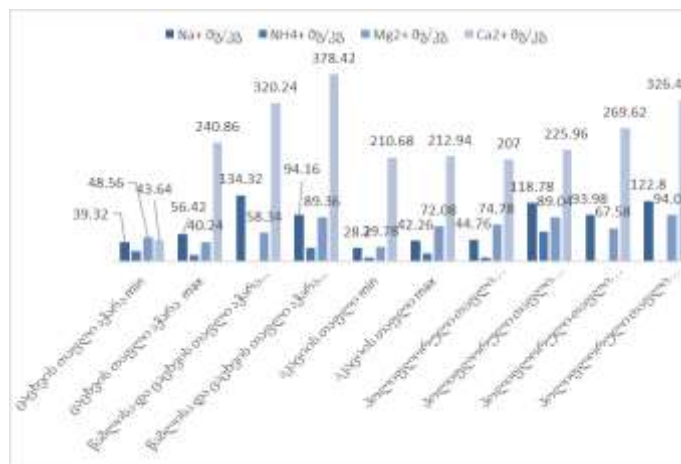
კალიუმის იონები შედარებით ნაკლები რაოდენობით არის წარმოდგენილი ცაცხვის (2377,34-2746,58 მგ/კგ), აკაციის (2220,22-3444,50 მგ/კგ), გაზაფხულისა (296,72-3595,44 მგ/კგ) და შემოდგომის (3856,28-5092,18 მგ/კგ) პოლიფლორულ თაფლში, მაგრამ ცაცხვი-წაბლის ნიმუშებში მისი კონცენტრაცია იმატებს (5167,94-6516,32 მგ/კგ) (მსგავსად იონების საერთო შემცველობისა) და თითქმის მსგავსია წაბლის თაფლის ნიმუშებისა.



თაფლის ყველა ნიმუშში კალიუმის მასური წილი კატიონების საერთო შემცველობის 90%-ზე მეტია.

კალიუმის იონების ფონზე სხვა კატიონების შემცველობა გაცილებით დაბალია. წაბლის თაფლში კალციუმი 13,44-307,34 მგ/კგ, ნატრიუმი 26,5-122,82 მგ/კგ, მაგნიუმი 58,18-134,08 მგ/კგ და ამონიუმი 6,28-197,80 მგ/კგ შემცველობით არის წარმოდგენილი. მსგავსი თანაფარდობით არის წარმოდგენილი კატიონები აკაციის, წაბლის, ცაცხვის, ცაცხვ-წაბლისა და პოლიფლორული თაფლის ნიმუშებში (დიაგრამა 18 ბ).

როგორც შედეგებმა აჩვენა, წაბლის თაფლში კატიონების საერთო შემცველობა არ აღემატება 8-9%-ს. ნიმუშების უმეტესობაში კალციუმის მაჩვენებლებია 14 მგ/კგ-დან 500 მგ/კგ-მდე, რაც შეადგენს კატიონების მთლიანი შემცველობის 0,33-7,2%-ს, ხოლო მაგნიუმი არის 51-დან 130 მგ/კგ-მდე, რაც კატიონების საერთო შემცველობის 0,88-1,95%-ს შეადგენს. რაც შეეხება ნატრიუმს, მისი შემცველობა 26-დან 140 მგ/კგ-მდეა, რაც კატიონების მთლიანი შემცველობის 0,45-2,1%-ია. ამონიუმის იონის შემცველობა იცვლება დიდი დიაპაზონით, 24-დან 197 მგ/კგ-მდე (დიაგრამა 19 ).



**დიაგრამა 19,** აჭარის რეგიონში მოწეულ სხვადასხვა თაფლში Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> იონების საერთო შემცველობა მგ/კგ (მინიმალური (min) და მაქსიმალური (max) მნიშვნელობებით)

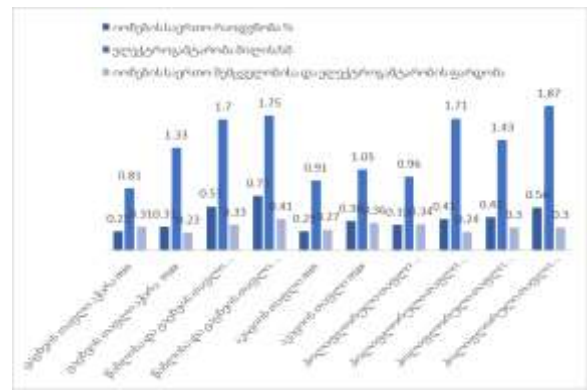
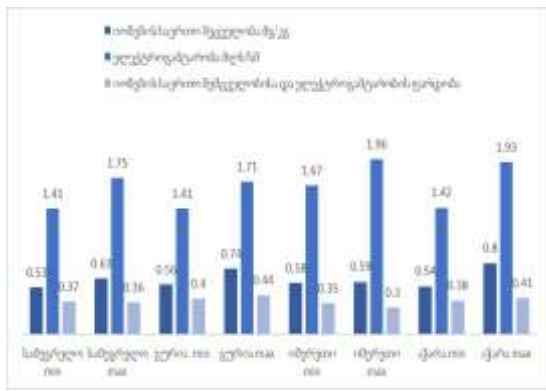
გაზაფხულსა და შემოდგომაზე თაფლი პოლიფლორულია და მასში კალიუმის შემცველობა, როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, საკმაოდ მაღალია - კატიონების საერთო რაოდენობის მინიმუმ 87,9 %. საანალიზოდ აღებული თაფლის ნიმუშებში სხვა იონებს შორის (წაბლის თაფლიც) Ca<sup>2+</sup> მერყეობს 43,6-დან 378 მგ/კგ-მდე, ხოლო Mg<sup>2+</sup> არის 29,8-

დან 94,1 მგ/კგ-მდე, რაც შეადგენს მთლიანი კატიონების რაოდენობის 1,77-8,44%-ს. Na<sup>+</sup> კატიონების შემცველობა არის 28.2 – 134.3 მგ/კგ, რაც, დაახლოებით, კატიონის მთლიანი შემცველობის 1.12-დან 2.9%-მდეა (დიაგრამა 18).



**დიაგრამა 20.** (ა) კალიუმის იონის შემცველობა მგ/კგ (მინიმალური (min) და მაქსიმალური (max) მნიშვნელობებით). (ბ) წაბლის, ცაცხვის, აკაციისა და პოლიფლორულ თაფლში იონების საერთო შემცველობა, ელექტროგამტარობა და მათი თანაფარდობა (მინიმალური (min) და მაქსიმალური (max) მნიშვნელობებით) თაფლის წარმოდგენილ ნიმუშებში ასევე განსაზღვრულ იქნა ელექტროგამტარობა. მისი შემცველობა მერყეობდა წაბლის თაფლის ნიმუშებში 1,41-დან 1,96 მილისიმენსი/სმ-მდე. ცაცხვის თაფლში - 0,81-დან 1,33-მდე, ცაცხვ-წაბლის ნიმუშებში - 1,7-დან 1,75-მდე, აკაციის ნიმუშებში 0,91-დან 1,05-მდე, პოლიფლორულ თაფლებში 0,96-დან 1,87-მდე.

წაბლის თაფლში კატიონების შემადგენლობასა და ელექტროგამტარობას შორის გარკვეული კორელაცია დადგინდა. კერძოდ, სადაც მეტია იონების რაოდენობა, იქ მეტია ელექტროგამტარობის მაჩვენებელიც. იონების შემცველობასა და ელექტროგამტარობას შორის ფარდობა წაბლის თაფლის შემთხვევაში განისაზღვრა, როგორც 0,30 და 0,44 (მინიმალური და მაქსიმალური მაჩვენებელი). სხვა თაფლების შემთხვევაში, როგორც 0,24 და 0,41.

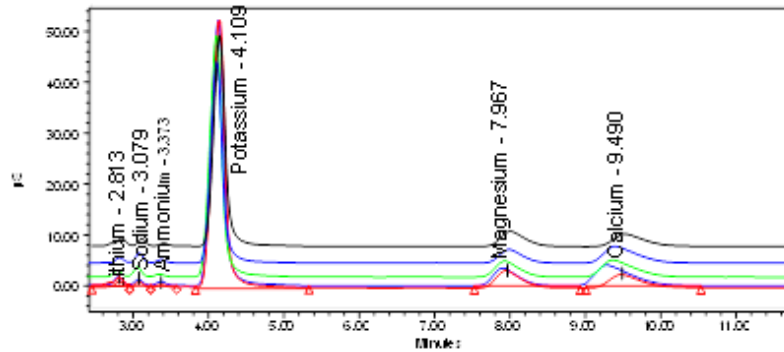


ა

ბ

**დიაგრამა 21.** წაზლის თაფლში იონების საერთო შემცველობა,

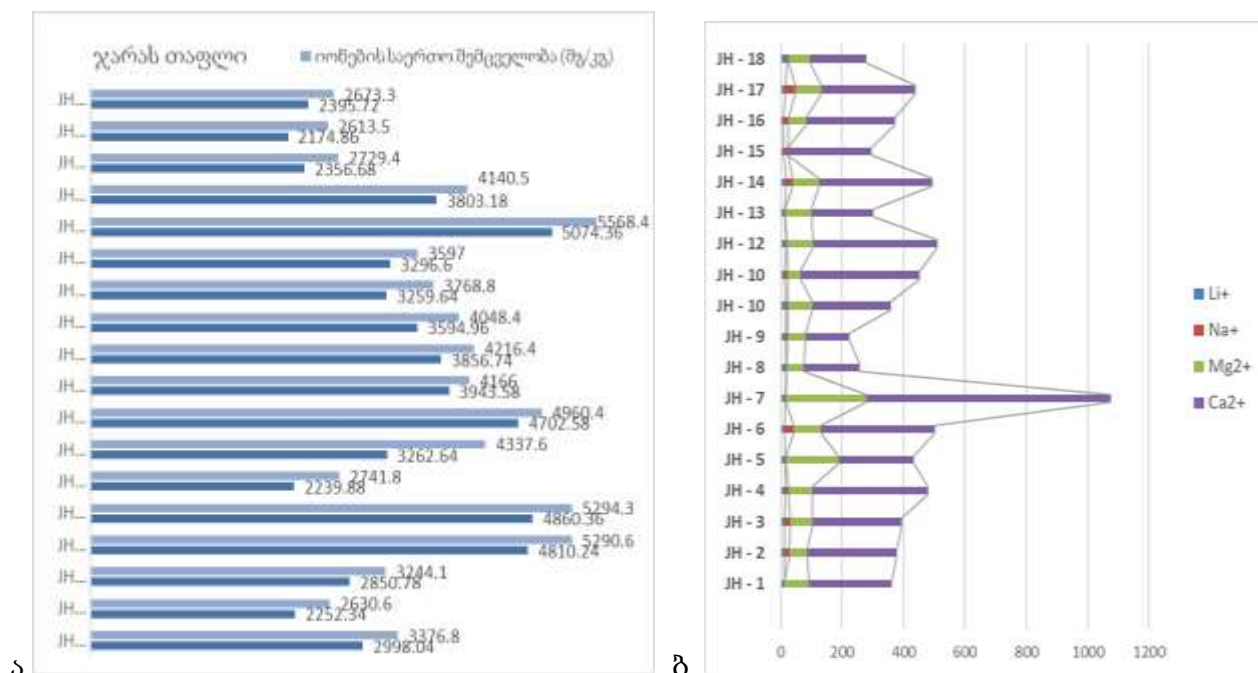
იონების ქრომატოგრაფიული კვლევა ასევე განხორციელდა ჯარას თაფლის 18 ნიმუშში, სადაც იდენტიფიცირებულ იქნა Li, Na, K, Mg ი Ca (სურათი11 ), რომელთა შემცველობა 2613,5 - 5568,4 მგ/კგ-ის ფარგლებშია (დიაგრამა 22 ). მიღებული შედეგების შეჯერებით, კალიუმი წარმოადგენს დომინანტ იონს და მისი შემცველობა 2174,86 მგ/კგ - დან 5074,36 მგ/კგ -მდეა.



**სურათი 3 .** ჯარას თაფლის კატიონების HPLC ქრომატოგრამა

კალიუმის იონი ჯარას თაფლის ნიმუშებში საერთო შემცველობის 89%-ს შეადგენს. კალიუმის იონების შემცველობით (საშუალო მაჩვენებლით) ქედისა (3546,72 მგ/კგ) და შუახევის (3501,46 მგ/კგ) თაფლის ნიმუშები მსგავსია. თუმცა, ქედის ნიმუშებში კალიუმის იონების რაოდენობა საკმაოდ ცვალებადია, მაგალითად, JH1, JH2, JH3 და JH6 ნიმუშებში მისი კონცენტრაცია 2239,88 მგ/კგ - დან 2998,04 მგ/კგ - მდეა, ხოლო JH4, JH5 და JH8 თაფლში 4702,58 მგ/კგ - დან 48603,36 მგ/კგ - მდეა. შუახევის თაფლის ნიმუშებში მაჩვენებლებს შორის ასეთი მკვეთრი ცვალებადობა არ აღინიშნება (3259,64 – 3856,74 მგ/კგ). ქედის ნიმუშების მსგავსად იცვლება კალიუმის შემცველობა ხულოს თაფლში,

კერძოდ, JH 16 (2356.68 მგ/კგ) და JH 18 (2395,72 მგ/კგ) თითქმის იდენტურია, მაგრამ ამ ნიმუშებთან შედარებით კალიუმის შემცველობა 2-ჯერ მეტია - 5074,36 მგ/კგ ხულოს თაფლის მეთოთხმეტე ნიმუშში.



**დიაგრამა 22.** (ა) ჯარას თაფლის კალიუმისა იონისა და კატიონების საერთო შემცველობა (მგ/კგ). (ბ) ჯარას თაფლში Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> და Ca<sup>2+</sup> იონების შემცველობა კალიუმის იონების შემდეგ, შემცველობის მიხედვით მეორე იონი (Ca) - 141.28 – 795.06 მგ/კგ. მაგნიუმისა (Mg) და ნატრიუმის (Na) -ის იონების შემცველობა მეტად ცვალებადია ნიმუშებს შორის. მაგნიუმი გვხვდება 41.6–დან 262.34-მდე, ხოლო ნატრიუმი 2.4-დან 33.58-მდე. ჯარას თაფლში ლითიუმი (Li) ძალიან მცირე რაოდენობით გვხვდება (8.22 – 19.44 მგ/კგ) (დიაგრამა 22 ბ).

კალიუმის რაოდენობრივი თანაფარდობა კატიონების საერთო რაოდენობასთან და ელექტროგამტარობა შეიძლება გამოყენებულ იქნას, როგორც მარკერები თაფლის ნატურალობის დასადგენად.

## 1.7. თაფლის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების UPLC PDA-MS მეთოდით კვლევა

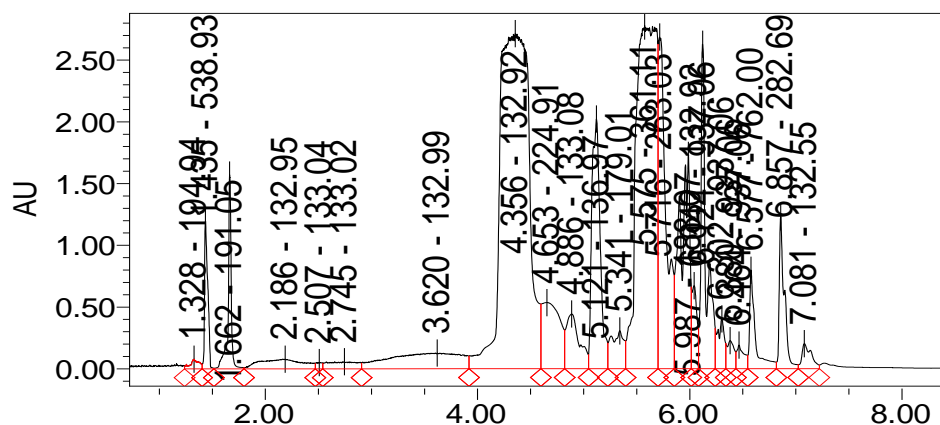
ფენოლური ნაერთები წარმოადგენენ თაფლის მნიშვნელოვან მარკერს. თაფლში მათი თვისობრივი და რაოდენობრივი შემცველობა დამოკიდებულია ბევრ ფაქტორზე, მათ შორის არის თაფლის ბოტანიკური წამოშობა, ფუტკრის ფერმენტული აქტივობა და გარემომცველი სამყარო.

ბოლო ათწლეულებია, თაფლში ფენოლური ნაერთების ანალიზი მეტად აქტუალურია, რადგან ადამიანის ჯანმრთელობაზე ნაერთების თვისობრივ და რაოდენობრივ შემცველობაზე. შესაბამისად, მეტად მნიშვნელოვანია იდენტიფიკაცია და რაოდენობრივი განსაზღვრა. თაფლში ამ ნაერთების განსაზღვრა რამდენიმე ეტაპიან კვლევას მოიცავს, კერძოდ, მათ გამოწვლილვას თაფლიდან და შემდგომ კვლევის თანამედროვე მეთოდების გამოყენებით მათ რაოდენობრივ განსაზღვრას.

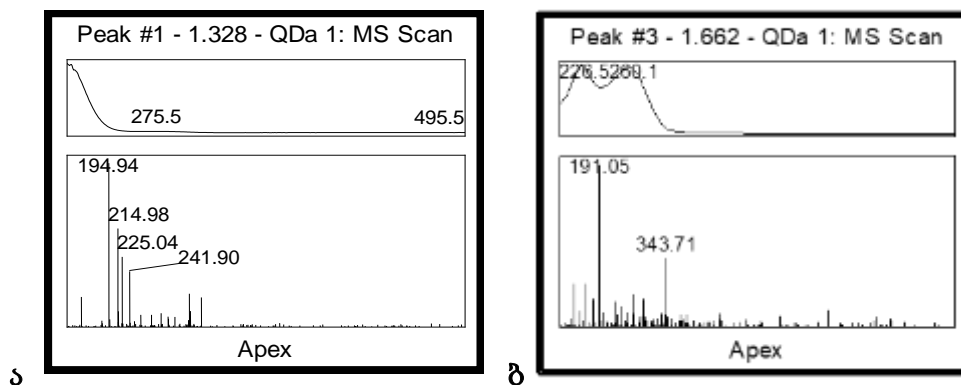
თაფლის ნიმუშებში ფენოლური ნაერთების ქრომატოგრაფიული კვლევისათვის, საწყის ეტაპზე ნიმუშს ვამზადებდით მყარფაზოვანი ექსტრაქციით. სორბენტად ვიყენებდით Amberlite XAD-2. საწყის ეტაპზე ვამზადებდით თაფლის 10 % – 30 % წყალხსნარს (გამხსნელი - მარილმჟავას წყალხსნარი, pH=2). თაფლის წყალხსნარის კონცენტრაცია დამოკიდებულია თაფლის სახეობაზე, კერძოდ, აკაციის თაფლის შემთხვევაში ვიღებდით 25-30% წყალხსნარს, წაბლის, ცაცხვისა და ჯარას თაფლის შემთხვევაში 10 % წყალხსნარს. შემდეგ ეტაპზე ხდებოდა ნიმუშისა და სორბენტის Amberlite XAD2 (30გ) შერევა და ქრომატოგრაფიულ სვეტში შეტანა, (სვეტის ზომები - სიმაღლე 35 სმ, დიამეტრი 25 მმ). Amberlite XAD-2, როგორც სორბენტი ახდენს ფენოლური ნაერთების სორბციას. ნიმუშის მომზადების მნიშვნელოვანი ეტაპია რეცხვა, პირველად მიმდინარეობს რეცხვა 150 – 200 მლ მარილმჟავას წყალხსნარით (pH=2). ამ ეტაპზე ხდება ნახშირწყლების მოცილება. შემდეგ რეცხვას ვაგრძელებდით 100 მლ გამოხდილი წყლით, რეცხვის დასრულებას ვამოწმებდით რეფრაქტომეტრის საშუალებით (რეფრაქტომეტრზე ნულოვანი მაჩვენებელი).

ფენოლური ნაერთების ელუირებას ვაწარმოებდით 80 % მეთანოლით (150 – 200 მლ). ელუირების დასრულებას ვამოწმებდით ულტრაიისფერ და ხილულ არეში

მეთანოლიანი ფრაქციების სკანირებით. ამ ეტაპის დასრულების შემდეგ ვახდენდით ელუენტის კონცენტრირებას ვაკუუმის პირობებში 40°C და მიღებული კონცენტრატის აღდგენა 1 – 2 მლ 80 % მეთანოლით (მეთანოლით აღდგენის მოცულობა დამოკიდებულია ფენოლური ნაერთების კონცენტრაციით ელუენტში). ნიმუშის მომზადების დასასრულს ნიმუშს ვფილტრავდით 0,45-მიკრონიან ფილტრში. ინდივიდუალური ნაერთების იდენტიფიკაცია ხდებოდა ულტრაეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიებით UPLC, ფოტოდოდური მატრიცისა (PDA) და მას (MS) დეტექტორების გამოყენებით.



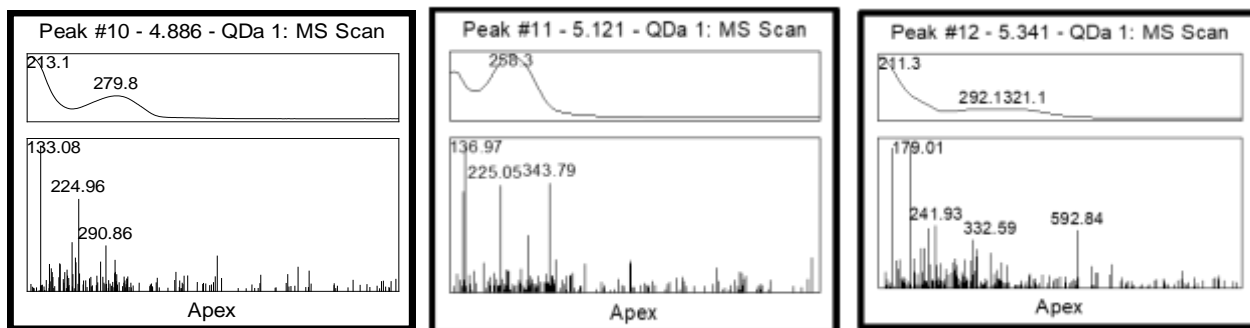
სურათი 4. აკაციის თაფლის UPLC-PDA MS ქრომატოგრამა (სკანირება 205-500 nm)



სურათი 5. (ა)თაფლის UPLC- PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 194,94 (M-H<sup>-</sup>). ბ)თაფლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 191 (M-H<sup>-</sup>)

ნივთიერება 1 -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 194,94, შეკავების დრო 1.328 წთ, METLIN ნაერთების მასების ბაზისა და ლიტერატურული მონაცემების (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) შესაბამისად ნივთიერება 1 შეესაბამება გლუკონის მჟავას (Gluconic acid, 2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexanoic acid) (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>) (სურათი 5 ა).

**ნივთიერება 2** -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 191, შეკავების დრო 1.662 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 225.5 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 2 შეესაბამება ქინაქინის მჟავას (Quinic acid, 1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexane-1-carboxylic acid) (C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (სურათი 5 ბ).



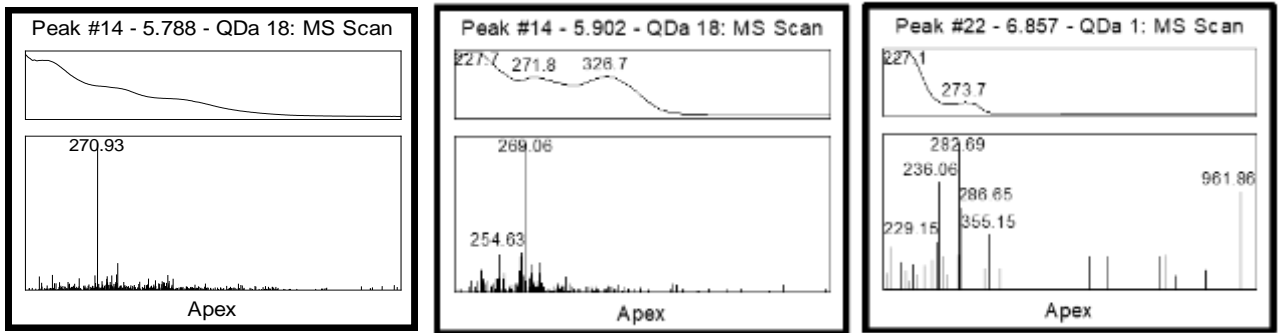
ს სურათი 6. (ა) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 133,08 (M-H<sup>-</sup>). (ბ) თავლის UPLC-PDA -MS ქრომატოგრამა ESI m/z 136,97 (M-H<sup>-</sup>). (გ) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 179,01 (M-H<sup>-</sup>)

**ნივთიერება 3** -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 133.08, შეკავების დრო 4.886 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 213.1 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზისა და ლიტერატურული მონაცემების (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) შესაბამისად ნივთიერება შეესაბამება ვაშლმჟავას (Malic acid, 2-Hydroxybutanedioic acid) (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) (სურათი 6 ა).

**ნივთიერება 4** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 136.97, შეკავების დრო 5,121 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 258,3 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 4 შეესაბამება 4 ჰიდროქსიბენზოის მჟავას (4 Hydroxybenzoic acid) (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) (სურათი 6 ბ).

**ნივთიერება 5** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 179,01, შეკავების დრო 5,341 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 211.3 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 5 შეესაბამება კოფეინის მჟავას (Caffeic acid, 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid) (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>) (სურათი 6 გ).



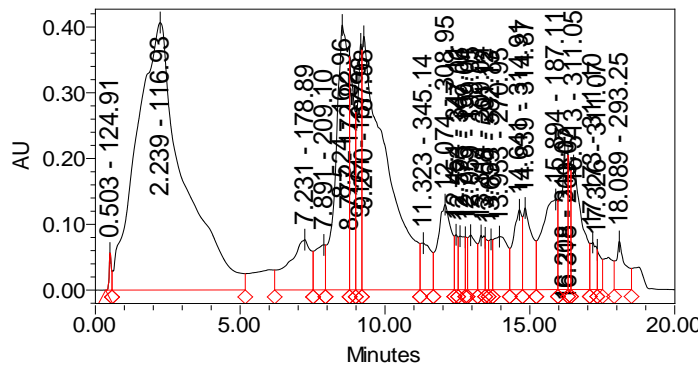


ს სურათი 7. (ა) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 270,93 (M-H<sup>-</sup>). (ბ) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 269 (M-H<sup>-</sup>). (გ) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 282,69 (M-H<sup>-</sup>)

ნივთიერება 6 -[M-H<sup>-</sup>]-m/z 270,93, შეკავების დრო 5,778 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-271.8 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 6 შეესაბამება პინობანქსინი (Pinobanksin, (2 R ,3 R )-3,5,7-Trihydroxyflavan-4-one) (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>)(სურათი 7 ა).

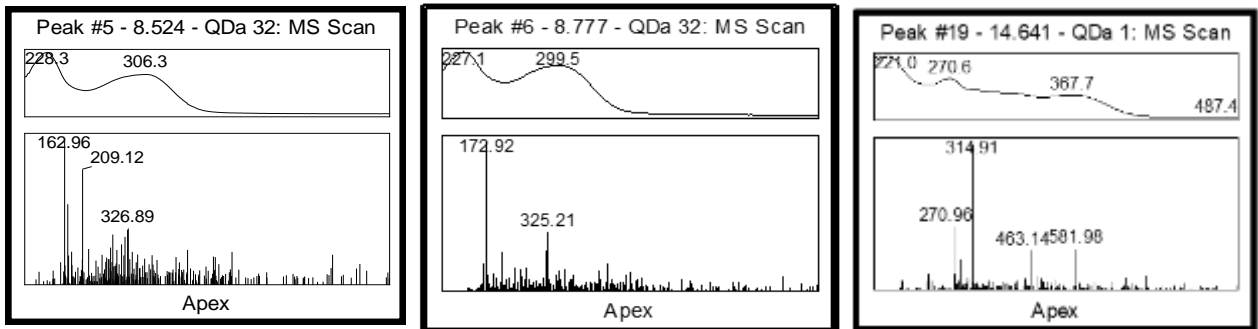
ნივთიერება 7 - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 269, შეკავების დრო 5,902 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-271.8 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 7 შეესაბამება აპიგენინს (Apigenin, 4',5,7-Trihydroxyflavone) (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub> O<sub>5</sub>) (სურათი 7 ბ).

ნივთიერება 8 - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 282.69, შეკავების დრო 6.857 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-227.1 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 8 შეესაბამება აკაცეტინს (Acacetin, 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavone) (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>) (სურათი 7 გ).



სურათი 8. აკაცის თავლის UPLC-PDA MS ქრომატოგრამა (სკანირება 205-500 nm 100-700 დალტონი)



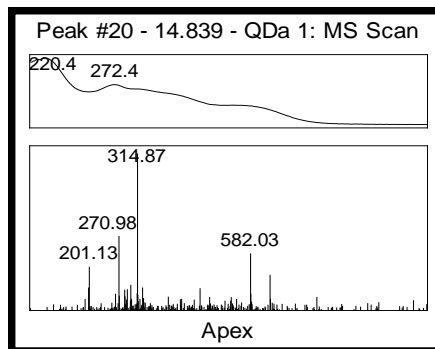


ს სურათი 9. (ა) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 162,96 (M-H<sup>-</sup>). (ბ) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 172,92 (M-H<sup>-</sup>). (გ) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 314,91 (M-H<sup>-</sup>)

**ნივთიერება 9** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 162,96, შეკავების დრო 8,524 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-228,3 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 9 შეესაბამება - p-კუმარის მჟავას, (p-Coumaric acid (trans 4-Hydroxycinnamic acid)) (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) (სურათი 9 ა).

**ნივთიერება 10** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 172,92, შეკავების დრო 8,777 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-227,1 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 10 შეესაბამება შიკიმის მჟავას, (Shikimic acid; 3,4,5-trihydroxycyclohexene-1-carboxylic acid) (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>) (სურათი 9 ბ).

**ნივთიერება 11** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 314.91, შეკავების დრო 14.641 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-270.6 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 11 შეესაბამება 6-მეთოქსიკემფეროლს - (6-methoxykaemperol, 6-Methoxy-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone) (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>) (სურათი 9 გ).

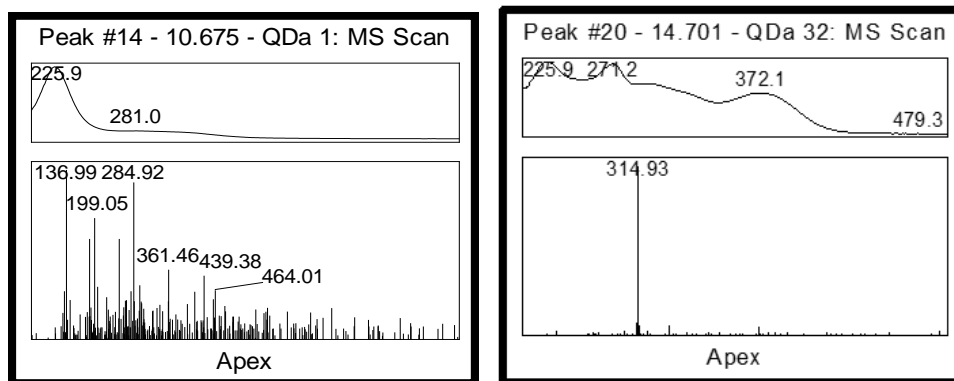


ს სურათი 10. თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 314,87 (M-H<sup>-</sup>)



ნივთიერება 14 -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 153,03, შეკავების დრო 7.558 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-218.6 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 14 შეესაბამება - 2,5 დიჰიდროქსიბენზოის მჟავას Gentisic acid (2,5 - Dihydroxybenzoic acid) (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>) (სურათი 12 ბ).

წაბლის თავლში ნივთიერება ESI m/z 162,93 (M-H<sup>-</sup>) იდენტიფიცირებულია, როგორც ნივთიერება 9 – p კუმარის მჟავა (p – Coumaric acids) (სურათი 12 გ).



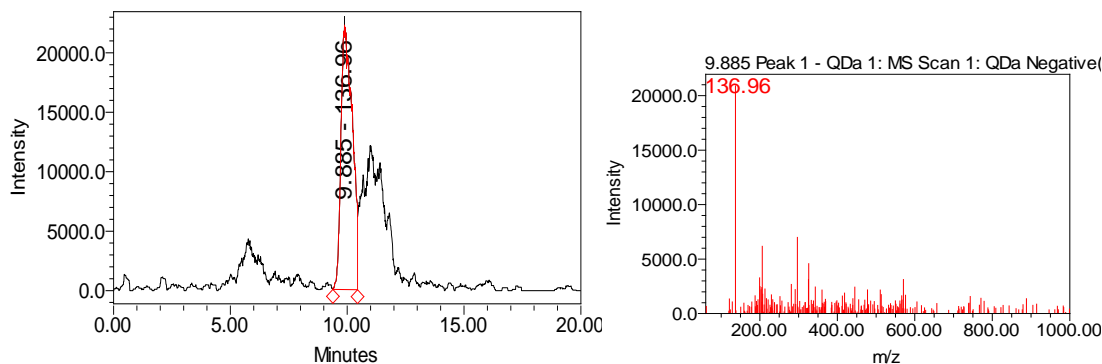
ა

ბ

სურათი 13. (ა) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 136,99 (M-H<sup>-</sup>). (ბ) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 314,93 (M-H<sup>-</sup>)

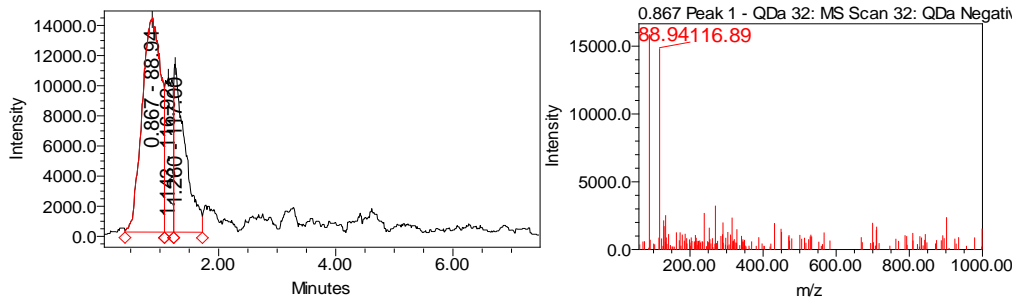
ნივთიერება 15 -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 136.99, შეკავების დრო 10.675 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-225.9 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 15 შეესაბამება - Salicylic acid (O Hydroxybenzoic acid) (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) (სურათი 13 ა).

წაბლის თავლში ნივთიერება ESI m/z 314,93 (M-H<sup>-</sup>) იდენტიფიცირებულია, როგორც ნივთიერება 12 – იზორამნეტინი (Isoramnetin, 3-Methylquercetin) (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>) (სურათი 13 ბ).



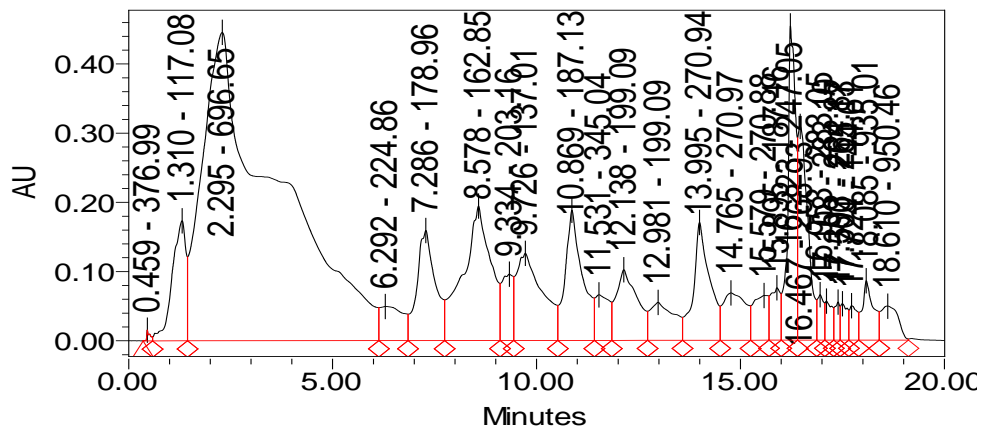
სურათი 14. ნივთიერება 16 - ის UPLC-PDA-MS სპექტრი m/z 136.96

ნივთიერება 16 -[M-H -] - m/z 136.96, შეკავების დრო 9.885 წთ, METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 16 შეესაბამება - 2.5 დიჰიდროქსილბენზალდეჰიდს Gentsaldehyde (2,5-Dihydroxybenzaldehyde) (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) (სურათი 14).

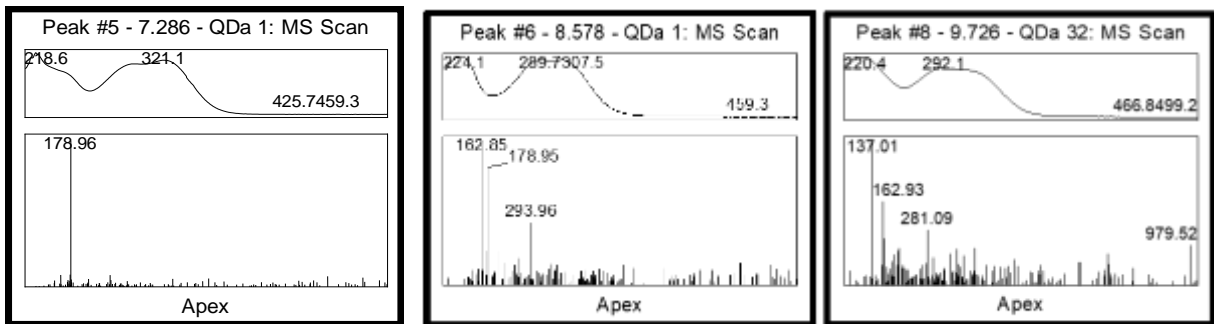


სურათი 15. ცაცხვის თაფლის UPLC- PDA -MS ქრომატოგრამა m/z 88,94 (M-H<sup>-</sup>)

ნივთიერება 17 - [M-H -] - m/z 88,94, შეკავების დრო 0,869 METLIN ნაერთების მასების ბაზისა და და ლიტერატურული მონაცემების (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) შესაბამისად ნივთიერება 17 შეესაბამება მჟაუნმჟავას (Oxalic acid, ethanedioic acid) (H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) (სურათი 15).



სურათი 16. ცაცხვის თაფლის UPLC-MS ქრომატოგრამა (სკანირება 100-700 დალტონი)



ა

ბ

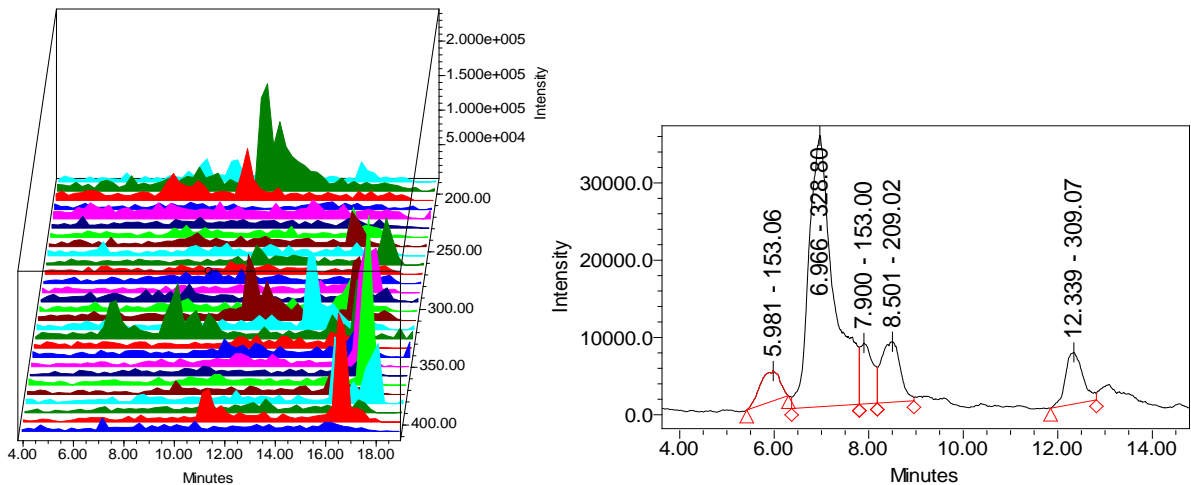
ბ

სურათი 17. (ა) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 178,96 (M-H<sup>-</sup>). (ბ) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 162,58 (M-H<sup>-</sup>). (გ) თავლის UPLC-PDA-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 137,01 (M-H<sup>-</sup>)

წაბლის თავლში ნივთიერება ESI m/z 178,96 (M-H<sup>-</sup>) იდენტიფიცირებულია, როგორც ნივთიერება 5 – კოფეინის მჟავა (Caffeic acid, 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid) (სურათი 17 ა).

წაბლის თავლში ნივთიერება ESI m/z 162,58 (M-H<sup>-</sup>) იდენტიფიცირებულია, როგორც ნივთიერება 9 – p კუმარის მჟავა (p – Coumaric acids) (სურათი 17 ბ).

ნივთიერება 18 - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 137.01, შეკავების დრო 9.726 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-220,4 nm METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 18 შეესაბამება ჰიდროქსიბენზოის მჟავას - (Hydroxybenzoic acid) (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) (სურათი 17 გ.).

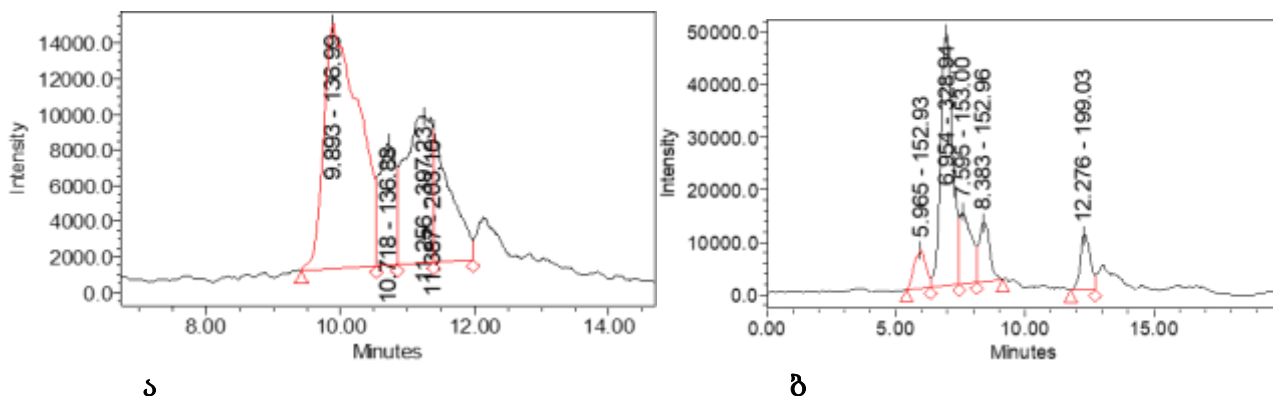


სურათი 18. ჯარას თავლის UPLC-MS ქრომატოგრამა (სკანირება 100-700 დალტონი); თავლის UPLC-MS ქრომატოგრამა ESI m/z153,06 (M-H<sup>-</sup>), m/z328 (M-H<sup>-</sup>) და m/z153 (M-H<sup>-</sup>)

ნივთიერება 19 - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 153,06, შეკავების დრო 5,981 წთ, METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 19 შეესაბამება 2,4 - დიჰიდროქსიბენზოის მჟავას (2,4 - Dihydroxybenzoic acid (Resorcylic acid) (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>)) (სურათი 18).

ჯარას თავლში ნივთიერება ESI m/z 328,8 (M-H<sup>-</sup>) იდენტიფიცირებულია, როგორც ნივთიერება 13 – (Bis - Methylated quercetin) (სურათი 18)

ჯარას თავლში ნივთიერება ESI m/z 153 (M-H) იდენტიფიცირებულია, როგორც ნივთიერება 14 – (Gentisic acid (2,5 - dihydroxybenzoic acid)) (სურათი 18).

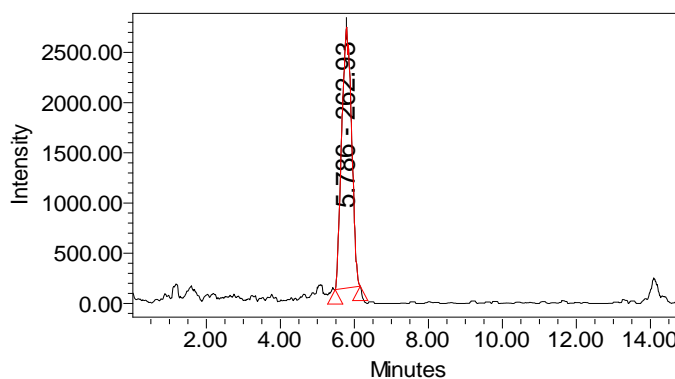


სურათი 19. (ა) თავლის UPLC-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 136,99 (M-H<sup>-</sup>) და m/z 136,88 (M-H<sup>-</sup>). (ბ) თავლის UPLC-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 153 (M-H<sup>-</sup>)

ჯარას თავლში ნივთიერება ESI m/z 136,99 (M-H<sup>-</sup>) იდენტიფიცირებულია, როგორც ნივთიერება 4 - 4 ჰიდროქსიბენზოის მჟავა (4 Hydroxybenzoic acid) (სურათი 19 ა).

ჯარას თავლში ნივთიერება ESI m/z 136,88 (M-H<sup>-</sup>) იდენტიფიცირებულია, როგორც ნივთიერება 15 - O - ჰიდროქსიბენზოის მჟავა Salicylic acid (O Hydroxybenzoic acid) (სურათი 19 ა).

ნივთიერება 20 - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 153, შეკავების დრო 7.595 წთ, METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 20 შეესაბამება (Protocatechuic acid, 3,4-Dihydroxybenzoic acid) (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>) (სურათი 19 ბ).



სურათი 20. თავლის UPLC-MS ქრომატოგრამა ESI m/z 262,93 (M-H<sup>-</sup>)

ნივთიერება 21 - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 262,93, შეკავების დრო 5,786 წთ, METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 21 შეესაბამება (Abscisic acid, 1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxocyclohex-2-en-1-yl]-3-methylpenta-2,4-dienoic acid) (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>) (სურათი 20).

ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთებიდან იდენტიფიცირებულ იქნა 21 ნაერთი: 4 ორგანული მჟავა (ვაშლმჟავა, გლუკონის მჟავა, მჟაუნმჟავა, ქინაქინის მჟავა), 10 ფენოლკარბონმჟავა (4 ჰიდროქსიბენზოის მჟავა, აზცისის მჟავა, კოფეინის მჟავა, პროტოკატეჟინის მჟავა, P - კუმარის მჟავა, შიკიმის მჟავა, 2,5 - დიჰიდროქსიბენზოის მჟავა, სალიცილის მჟავა, ჰიდროქსიბენზოის მჟავა, 2,4 - დიჰიდროქსიბენზოის მჟავა), 7 ფლავონოიდი (პინობაქსინი, აპიგენინი, აკაცეტინი, 6-მეთოქსიკემფეროლი, იზორამნეტინი, დი მეთილ კვერცეტინი, გენტისალდეჰიდი).

**ცხრილი 4**

თაფლის ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთთა UPLC – PDA – MS მეთოდით კვლევა					
№	ნაერთები	აკაციის თაფლი	წაბლის თაფლი	ცაცხვის თაფლი	ჯარას თაფლი
<b>ორგანული მჟავები</b>					
1	ვაშლმჟავა	+	-	-	-
2	გლუკონის მჟავა	+	-	-	-
3	მჟაუნმჟავა	-	-	+	-
4	ქინაქინის მჟავა	+	-	-	-
<b>ფენოლკარბონმჟავები</b>					
5	4 ჰიდროქსიბენზოის მჟავა	+	-	-	+
6	აზცისის მჟავა	-	-	-	+
7	კოფეინის მჟავა	+	-	+	-
8	პროტოკატეჟინის მჟავა	-	-	-	+
9	P - კუმარის მჟავა	+	+	+	-
10	შიკიმის მჟავა	+	-	-	-
11	2,5 დიჰიდროქსიბენზოის მჟავა	-	+	-	+
12	სალიცილის მჟავა (O - ჰიდროქსიბენზოის მჟავა)	-	+	-	+
13	ჰიდროქსიბენზოის მჟავა	-	-	+	-
14	2,4 დიჰიდროქსიბენზოის მჟავა	-	-	-	+
<b>ფლავონოიდები</b>					
15	პინობაქსინი	+	-	-	-
16	აპიგენინი	+	-	-	-
17	აკაცეტინი	+	-	-	-
18	6-მეთოქსიკემფეროლი	+	-	-	-
19	იზორამნეტინი	+	+	-	-
20	დი მეთილ კვერცეტინი	-	+	-	+
21	გენტისალდეჰიდი	-	+	-	-

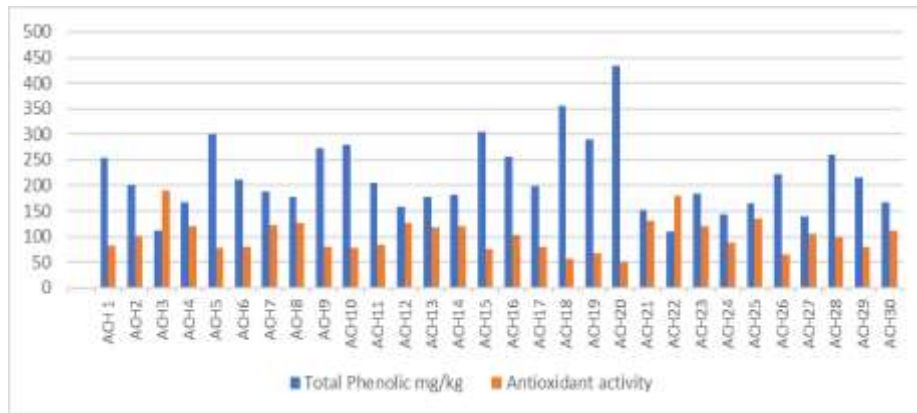
მხოლოდ აკაციის თაფლში იქნა იდენტიფიცირებული ვაშლის, გლუკონის და ქინაქინის მჟავა, ცაცხვის თაფლში მჟაუნმჟავა.

ფენოლკარბონმჟავებიდან შიკიმინის მჟავა - აკაციის თაფლში, ჰიდროქსიბენზოის მჟავა - ცაცხვის თაფლში, 2,4 - დიჰიდროქსიბენზოისა და აბცისის მჟავა ჯარას თაფლში. ბენზოის მჟავას წარმოებულები ძირითადად გვხვდება წაბლისა და ჯარას თაფლში.

ფლავონოიდებიდან იზორამნეტინი გვხვდება აკაციისა და წაბლის თაფლში. პინობაქსინი, აპიგენინი, აკაცეტინი და 6-მეთოქსიკემფეროლი იდენტიფიცირებულია აკაციის თაფლში, გენტისალდეჰიდი - წაბლის თაფლში, დიმეთილ კვერცეტინი კი წაბლისა და ჯარას თაფლში.

### 1.8. თაფლის საერთო ფენოლების, ფლავონოიდების, ფენოლკარბონმჟავების შემცველობის შესწავლა და ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა

თაფლი შეიცავს ბიოლოგიურად აქტიურ ფენოლურ ნაერთებს, რომლებიც თაფლში ხვდება ყვავილის ნექტრიდან ან ცვარტკბილადან. თაფლის, როგორც ფენოლური ნაერთების შემცველობა, ასევე ანტიოქსიდანტური აქტივობა დამოკიდებულია მის ბოტანიკურ და გეოგრაფიულ წარმოშობაზე.

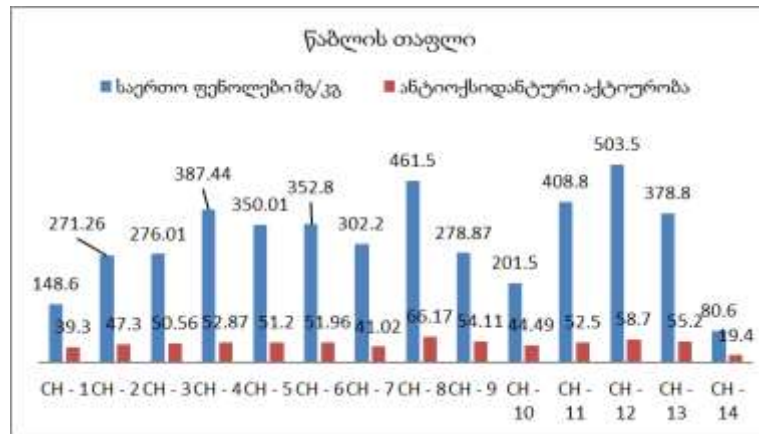


**დიაგრამა 23.** აკაციის თაფლის საერთო ფენოლები და ანტიოქსიდანტური აქტივობა

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, აკაციის თაფლში საერთო ფენოლების რაოდენობა 109 – 433 მგ/კგ-ის ფარგლებშია. იმერეთის თაფლის ნიმუშებში საშუალო



მაჩვენებელი 216,64 მგ/კგ (112 - 279 მგ/კგ), გურიის ნიმუშებში - 256,04 მგ/კგ (158,64-433 მგ/კგ) და 176,05 მგ/კგ (109-259,73 მგ/კგ) აჭარის ნიმუშებში. გურიის ნიმუშებში შედარებით მაღალია ფენოლების კონცენტრაცია. შესაბამისად, მაღალია ანტიოქსიდანტური აქტივობა. მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობა რიცხობრივად მცირე მნიშვნელობებით გამოიხატება, რადგანაც 433 მგ/კგ ფენოლების შემთხვევაში ამ ნიმუშის მხოლოდ 50,55 მგ საკმარისი იყო DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირებისათვის, ხოლო 158,64 მგ/კგ ფენოლების შემთხვევაში შედარებით მეტი - 126,5 მგ თაფლის ნიმუში.



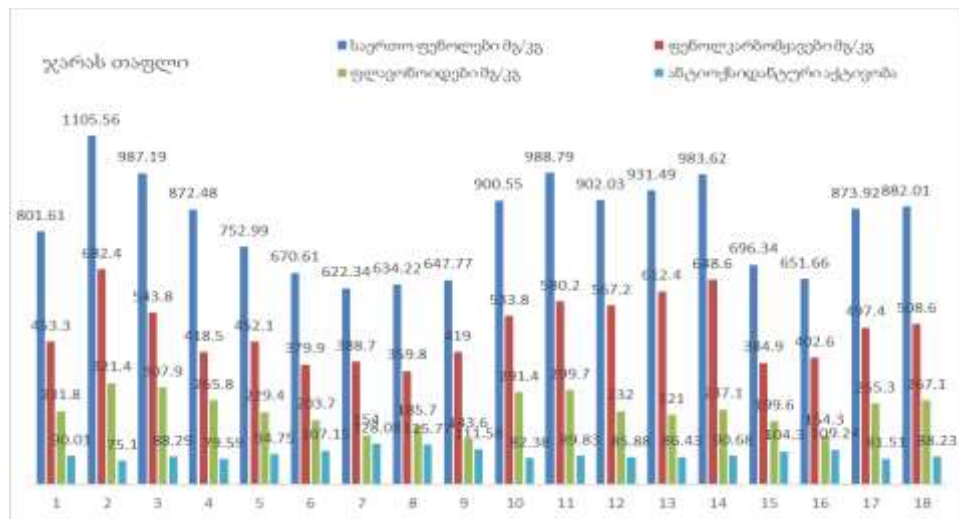
**დიაგრამა 24.** წაბლის თაფლის საერთო ფენოლები და ანტიოქსიდანტური აქტივობა

წაბლის თაფლში ფენოლების საერთო შემცველობა და ანტიოქსიდანტური აქტივობა განსხვავებულია რეგიონების მიხედვით. კერძოდ, ბათუმის ბოტანიკური ბაღის ნიმუშში, CH-12, აღინიშნება მაღალი ფენოლური შემცველობა 503,5მგ/კგ. მას მოსდევს ქედის ნიმუში CH-8 - 461,5მგ/კგ და ყველაზე დაბალი შემცველობა ფიქსირდება ლეჩხუმის რაიონის წაბლის თაფლის ნიმუშში CH-14 - 80,6 მგ/კგ.

ჯარას თაფლში საერთო ფენოლების შემცველობა იცვლება 622-დან-1105,56 მგ/კგ-მდე. ფენოლების საშუალო მაჩვენებლის მიხედვით, ქედისა (788,31მგ/კგ) და ხულოს (817,51 მგ/კგ) ნიმუშებში ფენოლების შემცველობა თითქმის თანაბარია, მაგრამ ქედის თაფლში ნიმუშებს შორის სხვაობა ფიქსირდება, კერძოდ, JH 6 – 9 ჩათვლით ფენოლების შემცველობა 643,73 მგ/კგ (საშუალო მაჩვენებელი). შედარებით მაღალი შემცველობა დაფიქსირდა მესამე (987,19 მგ/კგ) და მეორე ნიმუშში (1105,56 მგ/კგ). მსგავსი სხვაობა ფიქსირდება ხულოს ჯარას თაფლის ნიმუშებში. საერთო ფენოლების

შემცველობა, საშუალო მაჩვენებლის მიხედვით, შედარებით მაღალია შუახევის თაფლში 930,72 მგ/კგ.

ფენოლკარბონმჟავების შემცველობა ჯარას თაფლის ნიმუშებში იცვლება 359,8-დან 682,4 მგ/კგ-მდე, რაც შეადგენს საერთო ფენოლების შემცველობის 45-65%-ს. ფენოლკარბონმჟავების რაოდენობა (საშუალო მაჩვენებლის მიხედვით), საერთო ფენოლების შემცველობის მსგავსად, შუახევის ნიმუშებში გაცილებით მეტია და იგი შეადგენს 573,40 ერთეულს, ხოლო ქედისა (455,25მგ/კგ) და ხულოს ( 488,42 მგ/კგ) ნიმუშებში თითქმის თანაბარია. მაღალი შემცველობა დაფიქსირდა JH - 2 (682,4 მგ/კგ), JH - 13 (612,4 მგ/კგ) და JH - 14 (648 მგ/კგ), ხოლო ყველაზე დაბალი შემცველობა JH1-ს ჰქონდა (453,3 მგ /კგ).



**დიაგრამა 25.** ჯარას თაფლის საერთო ფენოლები, ფენოლკარბონმჟავები, ფლავონოიდები და ანტიოქსიდანტური აქტივობა.

ჯარას თაფლის ნიმუშებში ფლავონოიდების საერთო შემცველობა განსხვავებულია და მისი მნიშვნელობა 143,6 – 321,9 მგ/კგ-მდე იზრდება, შედარებით მაღალი დაფიქსირდა JH - 2 (321,9 მგ/კგ) და JH - 3 (307,9 მგ/კგ), შედარებით ნაკლები JH - 6 (203,7მგ/კგ), JH - 15 (199,6 მგ/კგ) და JH -16 (154,3 მგ/კგ), JH - 9 (143,6 მგ/კგ), სხვა ნიმუშებში შემცველობა თითქმის თანაბარია.

ჯარას თაფლის ნიმუშებს შორის ფენოლების საერთო შემცველობა 622,34-დან 1105,56 მგ/კგ-მდე. ნიმუშებს რომლებიც ხასიათდებიან საერთო ფენოლების 801,61-1105,56მგ/კგ-მდე აქვთ შედარებით მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობა, კერძოდ, 75,1მგ

- 68მგ-მდე, ხოლო 622,34 - 752,95 მგ/კგ საერთო ფენოლების ინჰიბირებას - 94,75 - 128,08მგ თაფლი. წარმოდგენილ ნიმუშებში შედარებით მაღალი აქტივობით (75,1 მგ, თაფლის 50% ინჰიბირება 0,1 მმ DPPH) გამოირჩევა ქედის მუნიციპალიტეტში მოყვანილი თაფლი - JH-2, რომელიც შეიცავს დიდი რაოდენობით საერთო ფენოლებს (1105,56 მგ/კგ), ფენოლკარბონმჟავებსა (682.4 მგ/კგ) და ფლავონოიდებს (321.4 მგ/კგ) .

მიღებული შედეგების შეჯერებით შეიძლება დავასკვნათ, რომ ჯარას თაფლში მეტია ფენოლური ნაერთების შემცველობა და შესაბამისად ანტიოქსიდანტური აქტივობაც.

### 1.9. ანდრომედოტოქსინის ანალიზი UPLC PDA-MS მეთოდით

ხშირია შემთხვევები, როცა მომხმარებლები ფიქრობენ, რომ „ნატურალური პროდუქტი“ უვნებელია. მაგრამ ტოქსინი, რომელიც შეიძლება აღმოჩნდეს საკვებში, ადამიანის ჯანმრთელობისათვის სახიფათოა. თაფლი, როგორც ნატურალური დამატკობელი, მსოფლიოში ერთ-ერთი ხშირად მომხმარებადი პროდუქტია და მასზე მოთხოვნა წლიდან წლამდე იზრდება. თუმცა, თაფლის უსაფრთხოებასთან დაკავშირებული პრობლემები ხშირია. განსაკუთრებით მაშინ, როცა ფუტკარი ნექტარს აგროვებს შხამიანი მცენარეებისგან (*Rhododendron* sp, *Pieris*, *Agarista*, *Kalmia*, *Coriaria arborera*, *Tripterygium wilfordii* Hook F.). ასეთი თაფლი შეიცავს გრაიანოტოქსინს (graianotoxins), ტრიპტოლიდს (triptolides), ტუტინს (tutin) და პიროლიზიდურ ალკალოიდებს (pyrrolizidine alkaloids). ტოქსიკური თაფლის გამოიყენებამ შეიძლება გამოიწვიოს ძლიერი ინტოქსიკაცია და იშვიათ შემთხვევაში შესაძლოა, ფატალური შედეგიც დადგეს.

მთიან აჭარაში ალპური და სუბალპური ტყეების ზონა გამოირჩევა თაფლოვანი მცენარეების მრავალფეროვნებით, შესაბამისად, ამ ტერიტორიაზე მოწეული თაფლის უმეტესობა პოლიფლორულია და მდიდარია ქიმიური შემადგენლობით. თაფლოვანი მცენარეების აყვავებას ცივი და გვიანი გაზაფხულის პირობებში წინ უსწრებს როდოდენდრონის ყვავილობა, რომელიც შეიცავს ტოქსინს. შესაბამისად, დიდია

ალბათობა იმისა, რომ ფუტკარმა აიღოს როდოდენდრონის ნექტარი და ტოქსინი მოხვდეს თაფლის შემადგენლობაში.

იელი - *Rhododendron luteum*, როდოდენდრონის ამ სახეობას უკავშირდება მაღალმთიან აჭარაში „შხამიანი“ („მაწყენარა“, „მათრობელა“) თაფლის მოპოვება. იელის დიდი რაოდენობით ნექტრის მოხვედრის შემდეგ თაფლი ტოქსიკური ხდება, ტოქსიკური თაფლი ძირითადად მოწითალო ყავისფერია და ხასიათდება მომწარო გემოთი.

გრაიანოტოქსინი, ასევე ცნობილია, როგორც ანდრომედოტოქსინი, აცეტილანდრომედოლი და როდოტოქსინი. იგი მაღალ ტოქსიკური დიტერპენოიდული ნაერთია. დღეისათვის დარეგისტრირებულია გრაიანოტოქსინის 25 იზომერული ფორმა. მათ შორის გრაიანოტოქსინი I, II და III თაფლში ყველაზე მეტად გავრცელებული ტოქსინია.

გრაიანოტოქსინ-III-ის იდენტიფიკაციისთვის 5 გ თაფლის ნიმუში შერეული იქნა 30 მლ მეთანოლთან, რომელსაც ვათავსებდით მჯღრეველაზე 60°C ტემპერატურაზე 6 საათის განმავლობაში. მიღებული ექსტრაქტი ვაკუუმ ამორთქლებლით იქნა დაკონცენტრირებული მშრალ მასამდე (INGOS RVO 400) 40°C-ზე. შედეგად მშრალი მასა გავხსენით 10 მლ გამოხდილ წყალში და დატანილ იქნა C18 (SPE) კარტრიჯზე (Waters Sep-Pak, Vac 6cc, C18 – 500 მგ). კარტრიჯი თავდაპირველად გააქტივებული იყო 5 მლ მეთანოლით, შემდეგ გაწონასწორებული 5 მლ წყლით. C18 SPE-დან 5 მლ მეთანოლით ელუირებულ იქნა ტოქსინი. ელუირებული მეთანოლიანი ფრაქცია დავაკონცენტრირეთ მშრალ მასამდე ვაკუუმ ამორთქლებელში დაბალი წნევის ქვეშ 40°C-ზე. დავაფიქსირეთ მშრალი ნაშთის მასა, გავხსენით მეთანოლში და მოვამზადეთ ქრომატოგრაფირებისათვის.

ულტრა მაღალი სიბხური ქრომატოგრაფირება (Waters, UPLC Acquity, QDa Detectore) გამოყენებული იყო გრაიანოტოქსინ-III-ის იდენტიფიკაციისთვის, ანალიტიკური სვეტი იყო Acquity UPLC BEN C18, მობილური ფაზა შედგებოდა 50:50 წყალი/მეთანოლისაგან, რომელიც შეიცავდა 1% ძმარმჟავას. 0,3 მლ/წთ ნაკადის სიჩქარით 8 წუთში გამოყოფილ იქნა GTX-III.

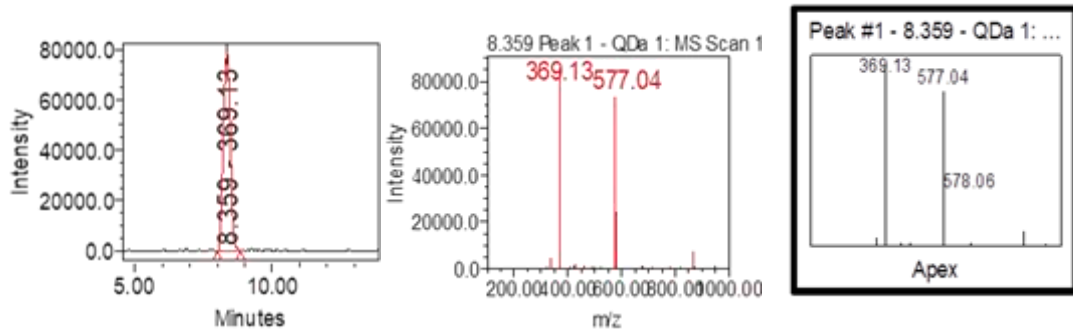
შედარებული იყო როდოდენდრონის ყვავილის ექსტრაქტი, მათრობელა თავლი და შემოდგომის პოლიფლორული თავლის 12 ნიმუში (ცხრილი 5). თავლის ნიმუშები აღებულ იქნა მაღალმთიან აჭარაში, ზღვის დონიდან სხვადასხვა სიმაღლეზე (ზღვის დონიდან 450 მ-დან 2040 მ-მდე).

**საანალიზოდ აღებული შემოდგომის პოლიფლორული თავლის ნიმუშები**

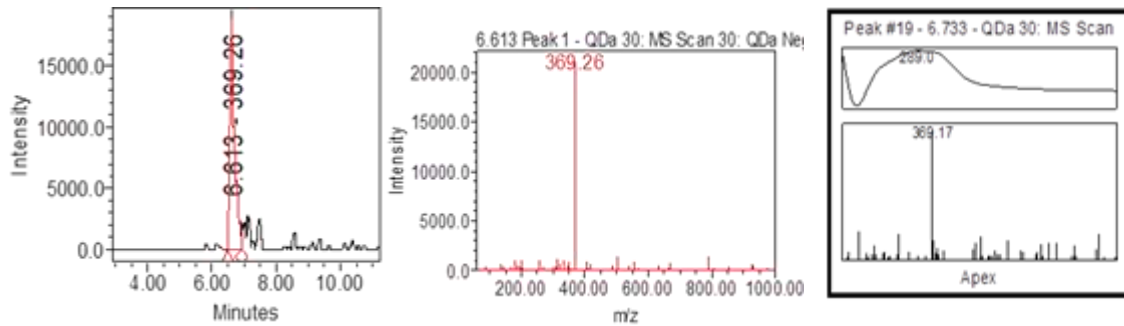
**ცხრილი 5.**

ნიმუში	დასახელება	აღების დრო	სიმაღლე ზღვის დონიდან, მ
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 1	AH - 1	2019	450
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 2	AH - 2	2019	600
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 3	AH - 3	2019	780
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 4	AH - 4	2019	1566
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 5	AH - 5	2019	720
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 6	AH - 6	2019	760
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 7	AH - 7	2019	1400
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 8	AH - 8	2019	1600
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 9	AH - 9	2019	923
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 10	AH - 10	2019	1000
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 11	AH - 11	2019	1750
შემოდგომის პოლიფლორული თავლი 12	AH - 12	2019	2040

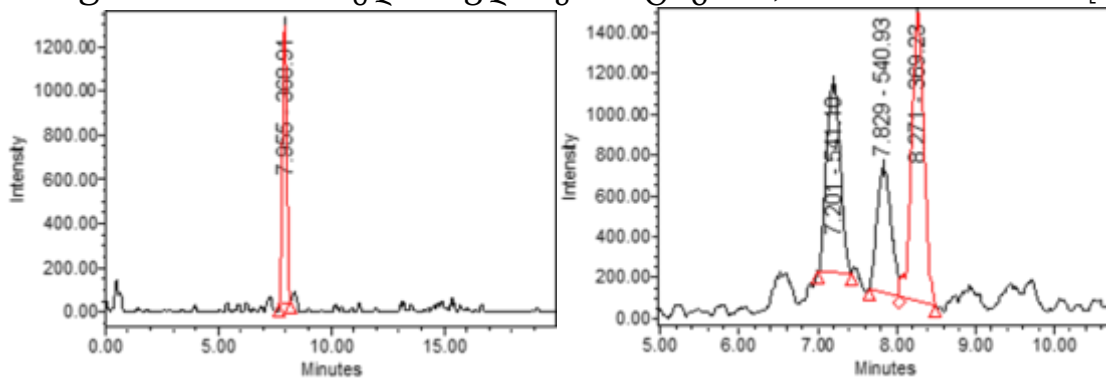
**ნივთიერება 22** (სურათი 21.) შეკავების დრო 8,359 წთ, m/z 369 [M-H]<sup>-</sup>, λ max 289 ნმ; მიღებული შედეგებისა და ნაერთების მასის მონაცემთა ბაზის METLIN (<https://metlin.scripps.edu>) მიხედვით 1 ნივთიერება იდენტიფიცირებულ იქნა, როგორც გრაიანოტოქსინი-III. - C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>: m/z= 369.26 [M-H]<sup>-</sup>, მოლეკულური მასა: 370 გ/მოლი.



სურათი 21. როდოდენდრონის ყვავილის ქრომატოგრამა, scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>-</sup>]



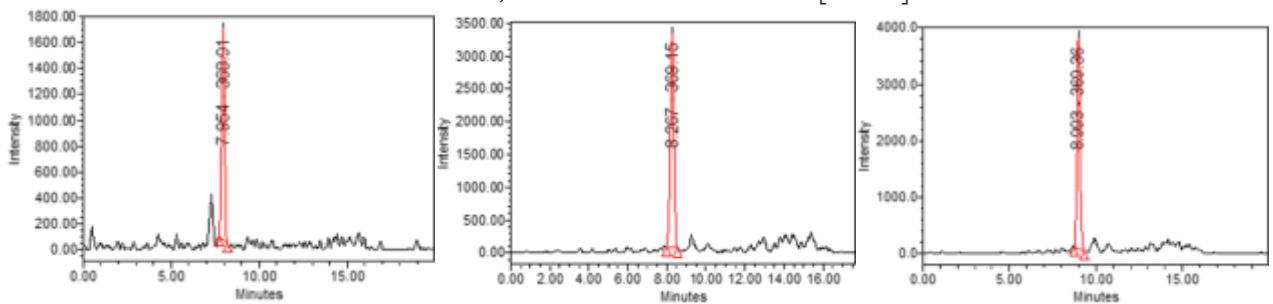
სურათი 22. მათრობელა თავლის ქრომატოგრამა, scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>-</sup>]



ა

ბ

სურათი 23. შემოდგომის თავლის AH4 ნიმუშის ქრომატოგრამა ; MSL –1566 m; scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>-</sup>]. (ბ) შემოდგომის თავლის AH7 ნიმუშის ქრომატოგრამა; MSL – 1400 m; scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>-</sup>]



ა

ბ

გ

სურათი 24. (ა) შემოდგომის თავლის AH8 ნიმუშების ქრომატოგრამა; MSL – 1600 m; scan ESI-MS m/z: 369 369 [M-H<sup>-</sup>]. (ბ) შემოდგომის თავლის AH11 ნიმუშის

ქრომატოგრამა; MSL – 1750 m; scan ESI-MS m/z: 369 369 [M-H-]. (გ) შემოდგომის თაფლის AH12 ნიმუშის ქრომატოგრამა; MSL – 2040 m; scan ESI-MS m/z: 369 [M-H-]

**გრაინოტოქსინი-III რაოდენობა შემოდგომის თაფლში**

ცხრილი 6.

ნიმუში	გრაინოტოქსინი-III მგ/კგ
მათრობელა თაფლი	500±15
AH – 4	4.2±0.126
AH – 7	6.3±0.189
AH – 8	8.4±0.252
AH – 11	17.0±0.51
AH – 12	24.0±0.72

მიღებული შედეგების გაანგარიშებით, მათრობელა თაფლში ტოქსინის შემცველობა იყო 500 მგ/კგ. საანალიზოდ აღებულ თაფლის 12 ნიმუშს შორის ტოქსინი გამოვლინდა თაფლის 5 ნიმუშში, კერძოდ ზღვის დონიდან 1566, 1400, 1600, 1750 და 2040 მეტრზე აღებულ ნიმუშებში - AH-4 (4,2 მგ/კგ), AH-7 (6,3 მგ/კგ), AH-8 (8,4 მგ/კგ), AH-11 (17,0 მგ/კგ) და AH-12 (24,0 მგ/კგ), რაც გაცილებით ნაკლები კონცენტრაციაა მათრობელა თაფლთან შედარებით (სურათი 44-48) (ცხრილი 6). თაფლში ტოქსინების შემცველობა იზრდება სიმაღლის მატებასთან ერთად (4.2 – 24.0 მგ/კგ) (ცხრილი 6).

ქრომატოგრაფიული მეთოდით თაფლში ტოქსინის განსაზღვრა 15 წთ-ზე ნაკლებ დროში იძლევა საშუალებას იდენტიფიცირებულ იქნეს ტოქსინი და თავიდან იქნეს აცილებული საფრთხე (ტოქსინით ინტოქსიკაცია).

**1.10. მძიმე მეტალებისა და ანტიბიოტიკების კვლევა**

თაფლი მედიცინაში გამოიყენება, როგორც სამკურნალო-პროფილაქტიკური საშუალება: ხველის, ანგინის, კანის დაავადების, კუჭის წყლულისა და სხვა დროს, მაგრამ მასში შეიძლება იყოს ანტიბიოტიკებისა და მძიმე მეტალების ჭარბი რაოდენობა, რაც ამ მნიშვნელოვან პროდუქტს საკმაოდ სახიფათოს ხდის.

საანალიზოდ აღებულ იქნა დასავლეთ საქართველოში (აჭარა, გურია, სამეგრელო და იმერეთი) მოწეული სხვადასხვა ბოტანიკური წარმოშობის თაფლის 50 ნიმუში, აქედან

10 წაბლის, 10 ცაცხვის, 10 აკაციის, 10 პოლიფლორა (მინდვრის) და 10 ნიმუში ჯარას თაფლის.

ანალიზისათვის თაფლის ნიმუშების 3გ ვხსნიდით ბუფერში. ანტიბიოტიკების ელუირებისა და კონცენტრირებისათვის ვიყენებდით Waters Sep-Pak C18-ში (500 mg);

ანალიზის დაწყებამდე ყველა ნიმუშს ვფილტრავდით Acrodisc LC PVDF Filter 13 mm 0,45  $\mu\text{m}$  ფილტრის გამოიყენებით.

ანტიბიოტიკების კვლევა ქრომატოგრაფიულ მეთოდებზეა დაფუძნებული, ულტრაიისფერი და მას-დეტექტორების გამოყენებით, რაც იძლევა საშუალებას, აღმოჩენილ იქნას მათი უმნიშვნელო რაოდენობაც კი (0.1 მკგ/კგ).

ანტიბიოტიკების კვლევა ჩატარდა HPLC, C18-ის ანალიტიკურ სვეტზე. ხსნარი A: აცეტონიტრილი, ხსნარი B: წყალი-pH (8.5) (B) შეტუტიანებული 0.01% ამიაკით, გრადიენტი (0-7 წთ-20%-0%B-დან, 8წთ 0% B, 10-12 წთ 20% B, 14-20% B). UPLC-MS ანალიზი BEN C18, 1.7 $\mu\text{m}$ , BENAmide1.7 $\mu\text{m}$ , სვეტი. ნაკადი 0,4მლ/წთ, სვეტის ტემპერატურა 50°C, MS- სკანირება 200–1200 დალტონი, ზონდი 600°C, დადებითი (უარყოფითი) 0,8 კვ, სვეტი 1,5 კვ, CV -15. DAD დეტექტორის მონიტორინგი (220-400 ნმ), ნიმუშის ინექციის მოცულობა იყო 10 მკლ.

ანალიზი ჩატარდა მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფირებით HPLC-, რომელიც აღჭურვილია UV დეტექტორით Bridje C18 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 მმ I.D.). მოცემულ გრადიენტულ პირობებში: მობილური ფაზა - აცეტონიტრილი (A) და წყალი-pH (8,5) (B). ) შეტუტიანებული 0,01% ამიაკით. გრადიენტი (0-14 წთ- 20%-0%B-დან, 16წთ 0% B, 20-24 წთ 20% B, 25-80% B). ნაკადი 1 მლ/წთ.

საქართველოში მეფუტკრეები ძირითადად იყენებენ 12 ანტიბიოტიკს, ესენია: მეტრონიდაზოლი (Retention Time-6,759), რონიდაზოლი (RT-8,228), ერითრომიცინი (RT-8.868), ნიტროფურანი (RT-11,712), ლინკომიცინი (RT-12.185). UPLC-MS მეთოდით იდენტიფიცირებულია ოქსიტეტრაციკლინი (m/z-459.14, m/z+461,14), ტეტრაციკლინი (m/z-443.15, m/z+445.16), სტრეპტომიცინი (m/z-580.25, m/z+582.27), სულფადიმეტოქსი (m/z- 309.06, m/z+311.08), ქლორამფენიკოლი (m/z- 321.00, m/z+323.01), მეტრონიდაზოლი (m/z-170.05, m/z+ 172.07), რონიდაზოლი (m/z- 199.04, m/z+201.06), ერითრომიცინი (m/z-



732.45, m/z+ 734.47), ნიტროფურანი (m/z-112.00, m/z+114.01), ლინკომიცინი (m/z- 405.21, m/z+407.22), ტილოსინი (m/z-914.51, m/z+916.52), რიფამპიცინი (m/z- 821.39, m/z+823.41) (სურათი 25 ).

ანალიზის შედეგად ოქსიტეტრაციკლინი ფიქსირდება წაბლის თაფლის ნიმუშის 20%-ში, ცაცხვის 30%-ში, აკაციის 30%-ში და მინდვრის 20%-ში. ტეტრაციკლინი - წაბლის 30%-ში, ცაცხვის 20%-ში, აკაციის 40%-ში და მინდვრის 20%-ში დასაშვებზე მეტი რაოდენობა. სტრეპტომიცინი - წაბლის ნიმუშის 30 %-ში, ცაცხვის 30%-ში, აკაციის 50 %-ში და მინდვრის 20%-ში. სულფადიმეტოქსინი წაბლის ნიმუშის 20 %-ში, ცაცხვის 20%-ში, აკაციის 30%-ში და მინდვრის 10%-ში. ქლორამფენიკოლი - წაბლის ნიმუშის 10%-ში, ცაცხვის 10%-ში, აკაციის 30%-ში და მინდვრის 10%-ში. მეტრონიდაზოლი წაბლის ნიმუშის 30%-ში, ცაცხვის 30%-ში, აკაციის 40%-ში და მინდვრის თაფლის 20%-ში. რონიდაზოლი მეტრონიდაზოლის მსგავსად გადანაწილდა (წაბლის თაფლის 20%-ში, ცაცხვის თაფლის 20%-ში, აკაციის თაფლის 30%-ში და მინდვრის თაფლის 10%-ში). ნიტროფურანი გვხვდება წაბლის თაფლის 20%-ში, ცაცხვის თაფლის 20%-ში, აკაციის თაფლის 20%-ში და მინდვრის თაფლის 10%-ში. ლივკომიცინი - წაბლის თაფლის 30 %-ში, ცაცხვის თაფლის 30%-ში, აკაციის თაფლის 50%-ში და მინდვრის თაფლის 20%-ში. ტილოსინი წაბლის თაფლის 20%-ში, ცაცხვის თაფლის 20%-ში, აკაციის თაფლის 30%-ში და მინდვრის თაფლის 10%-ში. რიფამპიცინი წაბლის თაფლის 20%-ში ცაცხვის თაფლის 40%-ში, აკაციის თაფლის 50%-ში და მინდვრის თაფლის 10%-ში (ცხრილი 7). ცხრილში მოცემულია ანტიბიოტიკების M/Z მახასიათებლები და იმ თაფლის ნიმუშებში ანტიბიოტიკების რაოდენობა (%-ში), რომელშიც ანტიბიოტიკების რაოდენობრივი შემცველობა 1.5 მგ/კგ-ზე მეტი იყო (ცხრილი 7).

### თაფლის ნიმუშებში ანტიბიოტიკების რაოდენობა

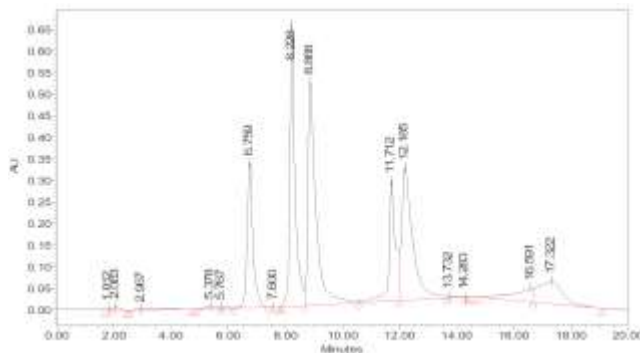
ცხრილი 7

ანტიბიოტიკების დასახელება	მკგ/კგ	ჯარას თაფლი	წაბლის თაფლი	ცაცხვის თაფლი	აკაციის თაფლი	მინდვრის თაფლი	MS-	MS+
ოქსიტეტრაციკლინი	5.0±0.15	n.n.*	20	30	30	20	459.14	461,14
ტეტრაციკლინი	5.0±0.15	n.n.	30	20	40	20	443.15	445.16
სტრეპტომიცინი	5.0±0.15	n.n.	30	30	50	20	580.25	582.27

სილვადიმეტოქსინი	5.0±0.15	n.n.	20	20	30	10	309.06	311.08
ქლორამფენიკოლი	5.0±0.15	n.n.	10	10	30	10	321.00	323.01
მეტრონიდაზოლი	5.0±0.15	n.n.	30	30	40	20	170.05	172.07
რონიდაზოლი	5.0±0.15	n.n.	30	30	40	20	199.04	201.06
ერიტრომიცინი	5.0±0.15	n.n.	20	20	30	10		734.47
ნიტროფურანი	5.0±0.15	n.n.	20	20	20	10	112.00	114.01
ლინკომიცილი	5.0±0.15	n.n.	30	30	50	20	405.21	407.22
ტილოსინი	5.0±0.15	n.n.	20	20	30	10	914.51	916.52
რიფამპიცინუმი	5.0±0.15	n.n.	10	40	50	10	821.39	823.41

n.n.\* = არ არის ნაპოვნი = რაოდენობრივი განსაზღვრის ლიმიტი იყო 2 ppb (მკგკგ)

აღსანიშნავია, რომ ჯარას თაფლში არ არის ინედენტიფიცირებული არც ერთი ანტიბიოტიკი, რადგანაც იგი დასახლებული ტერიტორიიდან დაშორებით მოიპოვება და ფუტკარი თაფლს მის მიერ გამომუშავებული ცვილისაგან აშენებულ ფიჭაში აგროვებს. აქ პრაქტიკულად გამორიცხულია ადამიანის ჩარევა (მხოლოდ ჯარა არის მომზადებული ადამიანის მიერ) თაფლის წარმოების პროცესში და შედეგად შესაბამისია.



სურათი 25. HPLC-UV დეტექტორი-320 ნმ, სტანდარტული ანტიბიოტიკების ქრომატოგრამა (მეტრონიდაზოლი, რონიდაზოლი, ერიტრომიცინი, ნიტროფურანი, ლინკომიცილი)

ანტიბიოტიკების დაგროვება თაფლის ნიმუშებში, ბუნებრივია, განპირობებულია მათი არასწორი და მაღალი დოზებით გამოყენებით. კვლევების შედეგად დადგინდა, რომ გაზაფხულის თაფლში (აკაციისა და ცაცხვის) პროცენტულად მაღალი შემცველობა

განპირობებული იყო ანტიბიოტიკების გამოყენების სიხშირით, რადგანაც სწორედ გაზაფხულზე ხდება ფუტკრის ჯანმრთელობაზე ზრუნვის მიზნით ჭარბი ანტიბიოტიკებისა და სხვა პრეპარატების გამოყენება. ასევე, გაზაფხულზე ხდება სკაში ადრე გამოყენებული და ანტიბიოტიკების შემცველობაზე შეუმოწმებელი ფიჭის შემდგომი გამოყენება.

თაფლის ნიმუშებში მძიმე მეტალების შემცველობა მგ/კგ

**ცხრილი 8**

ნიმუში	Cd მგ/კგ	Co მგ/კგ	Cr მგ/კგ	Hg მგ/კგ	As მგ/კგ	Pb მგ/კგ	Zn მგ/კგ
მაქსიმალური ლიმიტი	2.0	1.0	1.0	0.01	0.2	1.0	20,0
ჯარას თაფლი	0.03±0.01	0.17±0.01	0.24±0.05	n.n.*	n.n.	n.n.	0.7±0.01
წაბლის თაფლი	0.28±0.02	0.31±0.02	0.53±0.05	n.n.	n.n.	0.14±0.001	4.57±0.1
ცაცხვის თაფლი	0.26±0.01	0.32±0.02	0.535±0.05	n.n.	n.n.	0.16±0.002	10.3±0.2
აკაციის თაფლი	0.295±0.03	0.27±0.01	0.54±0.05	n.n.	n.n.	0.07±0.001	6.40±0.1
მინდვრის თაფლი	0.27±0.01	0.30±0.02	0.875±0.07	n.n.	n.n.	0.16±0.002	4.23±0.1

n.n.\* = არ არის ნაკონი = რაოდენობრივი განსაზღვრის ლიმიტი იყო 1 ppb (მგ/კგ)

ასევე, შესწავლილ იქნა მძიმე მეტალები თაფლის ყველა ნიმუშში, მიუხედავად მისი წარმოშობისა. არც ერთ ნიმუშში არ დაფიქსირდა დარიშხანის შემცველობა. Cd-ის შემცველობა ყველა ნიმუშში მერყეობს 0.26-დან 0.29 მგ/კგ-მდეა, მხოლოდ ჯარას თაფლში არის 0,15 მგ/კგ-ის ფარგლებში. Co-ის შემცველობა კი 0.28-დან 0.31-მდეა, ხოლო ჯარას თაფლში კი მისი შემცველობა გაცილებით ნაკლებია (0.17 მგ/კგ).

ხშირად თაფლში Cr-ის Zn-ის შემცველობას უკავშირებენ წარმოების დროს გამოყენებულ ჭურჭელს, თუმცა ჩვენ მიერ შესწავლილ ნიმუშებში მათი შემცველობა კრიტიკულ ზღვართან არ იყო მიახლოებული (0.53-0.87მგ/კგ და 4.23-10.3 მგ/კგ შესაბამისად). სპილენძის შემცველობაც საკმაოდ დაბალია 0.3მგ/კგ-დან 1.06 მგ/კგ-მდე.

რკინა შესწავლილ თაფლში შედარებით მაღალია 9,65 მგ/კგ-დან 12,7 მგ/კგ-მდე. მნიშვნელოვანია, ტყვიის დაბალი შემცველობა 0.07-დან 0.16 მგ/კგ-მდე. ჩვენ მიერ შესწავლილ ყველა ნიმუშში Hg და As შემცველობა დასაშვებ ზღვარზე ნაკლებია. განსაკუთრებით აღსანიშნავია ჯარას თაფლი, რომელშიც არა მარტო ტყვიის შემცველობა, რომელიც ზღვარზე ნაკლებია, არამედ სხვა მძიმე მეტალების შემცველობაც მნიშვნელოვნად ნაკლებია სხვა თაფლებთან შედარებით. როგორც წესი, ჯარას თაფლი მოიპოვება შედარებით ეკოლოგიურად სუფთა მთიან რეგიონში, რაც მინიმუმადე ამცირებს მცენარეთა და, შესაბამისად, მათგან მიღებული ნექტრისა და თაფლის დაბინძურებას (ცხრილი 8).

თაფლში მძიმე მეტალების შემცველობა ძირითადად დამოკიდებულია გარემო ფაქტორებზე და არ არის დაკავშირებული ბოტანიკურ წარმოშობასთან.

#### დასკვნა:

1. შესწავლილია დასავლეთ საქართველოს 4 რეგიონში (აჭარა, გურია, იმერეთი და სამეგრელო), მოწეული პოლიფლორული, აკაციის, წაბლის, ცაცხვისა და ჯარას თაფლის ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლები. საწყის ეტაპზე მტვრიანების მიკროსკოპული ანალიზის საფუძველზე დადასტურებულ იქნა თაფლის ბოტანიკური წარმოშობა. აკაციის თაფლში მტვრიანების რაოდენობის 45%-ზე მეტი იყო ფსევდო აკაციის ყვავილის (*Pseudis acacia*) მტვრიანა, წაბლის თაფლში 75%-დან 94%-მდე იყო წაბლის ყვავილის მტვრიანები (*Castanea sativa* Mill), ხოლო ჯარას თაფლი იდენტიფიცირებულ იქნა, როგორც პოლიფლორული თაფლი.

2. 74 ნიმუშში განსაზღვრულ იქნა Codex Alimentarius-ით გათვალისწინებული მახასიათებლები: წყლისა და მშრალი ნივთიერების შემცველობა, აქტიური მჟავიანობა, საერთო მჟავების კონცენტრაცია, ელექტროგამტარობა, დიასტაზური აქტივობა, ცილისა და პროტინის რაოდენობა.

3. დადგენილი იქნა, რომ დასავლეთ საქართველოში მოწეულ თაფლის ნიმუშებში წყლის შემცველობა 20%-ზე ნაკლებია, კერძოდ, ყველაზე დაბალი მაჩვენებლით ჯარას თაფლის ნიმუშები გამოირჩევა - 17,13 %, მას მოსდევს აკაციის თაფლი - 18,77% და წაბლის თაფლი 19,40 %, რაც სტანდარტით დადგენილ ნორმაშია. წყლის დაბალი შემცველობა

უზრუნველყოფს თაფლის სტაბილურობასა და მდგრადობას ფერმენტული პროცესების მიმართ.

4. საერთო მჟავიანობის ყველაზე დაბალი მაჩვენებლით გამოირჩევა აკაციის თაფლი (17,96) და ყველაზე მაღალით წაბლის თაფლი (30,65 მილიექვივალენტი მჟავისა/კგ თაფლში). თაფლის ნიმუშებში pH-ის მაჩვენებელი სტანდარტს შეესაბამება (pH 3.40–6.10). ელექტროგამტარობის საშუალო მაჩვენებლებით ჯარასა და წაბლის თაფლის ნიმუშები თითქმის მსგავსია, შესაბამისად, 1,2441 და 1.43 მლს/სმ, მაგრამ მეტად მცირეა აკაციის თაფლში - 0,2293, რაც ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი განმასხვავებელი მარკერია სხვა თაფლებთან მიმართებით.

5. აკაციისა და ჯარას თაფლის ნიმუშებში პროლინის შემცველობა თითქმის თანაბარია (1078,04 მგ/კგ და 1063,22 მგ/კგ), შედარებით მეტია 1277,21 მგ/კგ წაბლის თაფლში. პროლინის შემცველობით დგინდება თაფლის ასაკი და ნატურალობა. ხოლო რაც შეეხება დიასტაზური აქტივობას ის მაღალია 8 ერთეულზე, რაც ნორმის ფარგლებშია. კერძოდ, აკაციის თაფლისათვის 8-დან 30-მდეა (საშუალო მაჩვენებელი: 11,91 ერთეულია), თითქმის მსგავსია წაბლისა და ჯარას თაფლის შემთხვევაში 8-დან 27-მდე (საშუალო მაჩვენებელი: 16,42 – 16,44). ხოლო აკაციის თაფლში ცილის შემცველობის საშუალო მაჩვენებელი 0,3%-ია, წაბლის თაფლის ნიმუშებში 0,37 % და ჯარას ნიმუშებში 0,56%. რაც ადასტურებს პროდუქტის ბიოწარმოშობას.

6. HPLC მეთოდით თაფლის ნიმუშებში გამოყოფილი და იდენტიფიცირებული იქნა 4 ნახშირწყალი: ფრუქტოზა, გლუკოზა, საქაროზა და მალტოზა. მათ შორის დომინანტს წარმოადგენს არის ფრუქტოზა. ფრუქტოზა/გლუკოზისა (F/G) და გლუკოზა/წყლის (G/W) ფარდობის მაჩვენებლის მიხედვით, აკაციის თაფლისაგან განსხვავებით, წაბლისა და ჯარას თაფლი არ მიეკუთვნება ადვილად კრისტალიზირებად თაფლებს.

7. HPLC (კონდუქტომეტრული დეტექტირება) მეთოდით განხორციელდა კატიონების კვლევა აკაციის, წაბლის, ცაცხვის, ცაცხვი-წაბლის, პოლიფლორულსა და ჯარას თაფლში. იდენტიფიცირებულ იქნა ნატრიუმის, ამონიუმის, კალიუმის, მაგნიუმისა და კალციუმის იონები. წაბლის თაფლში იონების შემცველობა შედარებით მეტია, ვიდრე ცაცხვის (2530,72-3097,94 მგ/კგ), აკაციის (2497,46-3787,84 მგ/კგ), გაზაფხულის პოლიფლორულ

(3296,14-4089,98 მგ/კგ) და შემოდგომის პოლიფლორულ (4287,46 – 5635,48 მგ/კგ) თაფლში. მაგრამ ცაცხვ-წაბლის თაფლში თითქმის მსგავსია 5680,84-7106,92 მგ/კგ. კატიონებს შორის დომინანტი კალიუმის იონია. მისი რაოდენობა იცვლება თაფლის წარმოშობის მიხედვით. კალიუმის მაღალი შემცველობით წაბლის თაფლის ნიმუშები გამოირჩევა.

8. UPLC PDA-MS მეთოდით ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთებიდან იდენტიფიცირებული იქნა 21 ნაერთი: 4 ორგანული მჟავა (ვაშლმჟავა, გლუკონის მჟავა, მჟაუნმჟავა, ქინაქინის მჟავა), 10 ფენოლკარბონმჟავა (4 ჰიდროქსიბენზოის მჟავა, აზცისის მჟავა, კოფეინის მჟავა, პროტოკატექინის მჟავა, P - კუმარის მჟავა, შიკიმის მჟავა, 2,5 დიჰიდროქსიბენზოის მჟავა, სალიცილის მჟავა, ჰიდროქსიბენზოის მჟავა, 2,4 დიჰიდროქსიბენზოის მჟავა), 7 ფლავონოიდი (პინობაქსინი, აპიგენინი, აკაცეტინი, 6-მეთოქსიკემფეროლი, იზორამნეტინი, დიმეთილ კვერცეტინი, გენტისალდეჰიდი). მხოლოდ აკაციის თაფლში იქნა იდენტიფიცირებული ვაშლის, გლუკონის და ქინაქინის მჟავა, ცაცხვის თაფლში მჟაუნმჟავა. ფენოლკარბონმჟავებიდან: შიკიმინის მჟავა - აკაციის თაფლში, ჰიდროქსიბენზოის მჟავა - ცაცხვის თაფლში, 2,4 - დიჰიდროქსიბენზოისა და აზცისის მჟავა ჯარას თაფლში. ბენზოის მჟავას წარმოებულები ძირითადად გვხვდება წაბლისა და ჯარას თაფლში. ფლავონოიდებიდან იზორამნეტინი გვხვდება აკაციისა და წაბლის თაფლში. პინობაქსინი, აპიგენინი, აკაცეტინი და 6-მეთოქსიკემფეროლი იდენტიფიცირებულია აკაციის თაფლში, გენტისალდეჰიდი - წაბლის თაფლში, დიმეთილ კვერცეტინი კი წაბლისა და ჯარას თაფლში. კვლევის ეს შედეგები შეიძლება გამოყენებული იქნას, როგორც მარკერი თაფლის ბოტანიკური წარმოშობის დადასტურებისათვის.

9. ფენოლური ნაერთების სხვადასხვა კლასის რაოდენობრივი ანალიზის საფუძველზე დადგენილი იქნა, რომ ჯარას თაფლი გამოირჩევა ამ ნაერთების მაღალი შემცველობით აკაციისა და წაბლის თაფლთან შედარებით. კერძოდ საერთო ფენოლების რაოდენობა მერყეობს 801,61-დან 1105,56 მგ/კგ-მდე, ფლავონოიდების საშუალო მაჩვენებელი 151 მგ/კგ. რაც განაპირობებს ჯარას თაფლის მაღალ ანტიოქსიდანტური აქტივობას.

10. მნიშვნელოვანია კვლევები გრაიანოტოქსინი-III-სა, რაც განაპირობებს თაფლის ტოქსიკურობას. საანალიზოდ აღებული თაფლის 12 ნიმუშს შორის გრაიანოტოქსინ-III-ი

გამოვლინდა თავლის 5 ნიმუშში - AH-4, AH-7, AH-8, AH-11 და AH-12. კერძოდ, ზღვის დონიდან 1566, 1400, 1600, 1750 და 2040 მეტრზე აღებულ ნიმუშებში. თავლში ტოქსინების შემცველობა იზრდება სიმაღლის მატებასთან ერთად (4,2 – 24,0 მგ/კგ).

11. მთელს მსოფლიოში პრიორიტეტულია თავლში ანტიბიოტიკების კვლევა, რადგანაც მისი არსებობა საფრთხეს უქმნის ადამიანის ჯანმრთელობას. HPLC და UPLC-MS მეთოდებით 50 საკვლევ ნიმუშში აღმოჩენილ იქნა 12 ანტიბიოტიკი. ანტიბიოტიკების თვისობრივი მრავალფეროვნებითა და დაბინძურების საშუალო დონით ხასიათდებოდა აკაციისა და ცაცხვის, ხოლო შედარებით ნაკლებით მინდვრისა და წაბლის თავლის ნიმუშები. ანტიბიოტიკებს არ შეიცავს ნახევრად ველური ჯარას თავლი.

12. პლაზმურ-ემისიური სპექტრომეტრული მეთოდით მძიმე მეტალების შესწავლისას დადგენილ იქნა, რომ თავლის ნიმუშებში მეტი რაოდენობით არის რკინა, ხოლო შედარებით ნაკლები და ნორმის ფარგლებშია Cd, Co, Cr, Cu, Zn, Pb. ჯარას თავლი ამ შემთხვევაშიც გამოირჩევა მძიმე მეტალების მინიმალური შემცველობით, რაც განპირობებულია მისი წარმოშობის თავისებურებით.

**გამოქვეყნებული სამეცნიერო შრომები:**

**სტატია:**

1. Abashidze, N., Japaridze, I., Vanidze, M., Baazovi, Z., & Peshkova, T. (2021). "Study of honey Andromedotoxin in Western Georgia by UPLC-MS". *Annals of Agrarian Science* 19(2):111-119
2. Abashidze, N., Japaridze, I., Chikovani, D., Kalandia, A., & Vanidze, M. (2020). "Antibiotics and heavy metals in Georgian honey". *Annals of Agrarian Science* V.3 P.404-408
3. Abashidze N., Vanidze M., Djaparidze I., Kalandia A. (2018). "PHENOL COMPOUNDS AS THE MARCERS OF BOTANICAL ORIGINS OF HONEY". &quot; PRESS-BOOK.RU& quot;, <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35380890>
4. Abashidze, N., Vanidze, M., Kharadze, M., Djaparidze, I., & Kalandia, A. (2018). "West Georgian honey cations". *OPEN JOURNAL SYSTEMS*. DOI:<http://dx.doi.org/10.12955/cbup.v6.1283>

5. Abashidze, N., Djaparidze, I., Vanidze, M., & Kalandia, A. (2018).” Antioxidant activity of chestnut honey produced in Western Georgia”. Bull. Georg. Natl. Acad. Sci, 12(2).

**მონოგრაფია:**

6. M Vanidze, M Kharadze, I Djafaridze, A Kalandia N.Abashidze (2022) “West Georgia Honey Passports” BSU DOI: <https://doi.org/10.52340/sp.2022.02.01> (Monograph)

**კონფერენცია:**

1. Nona Abashidze, Indira Jafaridze, Maia Vanidze, Aleko Kalandia (2023) “The study of the physical-chemical characteristics of field honey, common in Western Georgia “The European Biotechnology Congress (Abstract: 117) page 43 DOI: 10.2478/ebtj-2023-0019

2. Nona Abashidze, Indira Jafaridze, Maia Vanidze, Aleko Kalandia (2022.)” Determination of biologically active compounds of honey common in Western Georgia” ACS 3rd International Symposium. Georgian Technical University. Pp7.

2. Abashidze, N., Vanidze, M., Kharadze, M., Djaparidze, I., & Kalandia, A. (2018, September). West Georgian honey cations. In CBU International Conference Proceedings (Vol. 6, pp. 990-994). DOI: <http://dx.doi.org/10.12955/cbup.v6.1283>



Legal Entity of Public Law (LEPL) - Batumi Shota Rustaveli State University  
Faculty of Natural Sciences and Health  
Department of Chemistry



**Nona Abashidze**

**Study of biologically active compounds in honey of various plant origins from  
western Georgia using UPLC-MS methods**

**Submitted in Fulfillment of the Requirements for PhD Degree  
of Chemical Sciences  
Specialty - Analysis of Natural Compounds**

## **A N N O T A T I O N**

**Scientific Adviser: Indira Djafaridze  
Doctor of Technology, Senior research fellow**

**Batumi - 2024**

The dissertation has been completed at the at the Faculty of Natural Sciences and Health of the Department of Chemistry of Batumi Shota Rustaveli State University.

The mentioned project has been implemented with the financial support of the Shota Rustaveli National Science Foundation of Georgia (grant AP/96/13, PHDF-22-3218).

## Introduction

**Topic's relevance.** A popular food supplement, honey has a long history of production dating back to antiquity. All natural sweeteners are concentrated and ready-made; for hundreds of years, people have utilized them extensively. Nowadays, beekeeping is practiced in many nations, and as a result, a wide variety of honey is produced and sold on the global market. Even though honey was consumed more extensively as a sweetener before the industrial manufacturing of sugar (until the 19th century), it is now regarded as a useful natural substance. Given its status as one of the most ancient agricultural practices, beekeeping has maintained a significant historical and contemporary relevance in Georgia. Georgia possesses one of the most expansive ecosystems globally, encompassing diverse agroecological zones that foster optimal circumstances for the cultivation of honey originating from various sources. The honey industry in Georgia is predominantly managed by family plantations. Due to the globalization of the honey market, which presently involves dozens of countries, verifying the identity and provenance of honey is a critical undertaking. The constituents of the nectar, which determine the medicinal and prophylactic properties, color, fragrance, and flavor of honey, are contingent upon the entomophilous plants that flourish in the region where the honey is smoked. The chemical composition of flowers, in addition to the plant itself, is influenced by the soil and climatic conditions under which the plant develops and grows. The plant's biologically active compounds are initially detected in the nectar and subsequently transferred to the honey, resulting in varying degrees of antioxidant, antibacterial, and antiradical properties.

**Formulation of the issue:** Honey, which is gaining worldwide and Georgian popularity, is characterized by extensive consumption, a high price, and its high nutritional and functional properties. The composition of honey is regulated at the international level by the standards and norms established by the Codex Alimentarius (Codex Standard for Honey, 2001). In the reality of our country, the study of the chemical composition of honey acquired more relevance when the opportunity to export Georgian honey to EU countries appeared. By analyzing the chemical composition of honey, its nutritional and medicinal value, degree of adulteration, and contamination with antibiotics and heavy metals can be determined, in addition to honey's quality

and naturalness. Additionally, it is critical to analyze the qualitative indicators of honey in order to determine the optimal processing methods and storage conditions for preserving biologically active honey compounds for an extended period of time. Consequently, the examination of the attributes stipulated by the European legislation guarantees the evaluation of Georgian honey's nutritional and functional worth, safeguarding consumer interests, and promoting healthy competition in both domestic and global markets.

**The purpose of the study** is to examine the physical and chemical properties of mono- and polyfloral honey from different sources in Western Georgia, as well as semi-wild Jara honey. Additionally, the research aims to identify and isolate biologically active compounds, as well as quantify their content and measure antioxidant activity. Assess the morphological makeup and honey pollen concentration to ascertain the botanical provenance of the honey. analysis of honey for heavy metals, antibiotics, and andromedotoxin.

**The object of the study** was Acacia, Chestnut and Jara honey collected in 3 regions of Western Georgia - Imereti, Guria, Adjara. **Research methodology** – The research examined the quantitative and qualitative content of carbohydrates, total phenols, flavonoids, phenolic acids, and cations using modern instrumental research methods such as HPLC, UPLC-MS Acquity H Class, pH/Ion meter S220 and S230 Conductivity, Mettler Toledo UV5, UV/Visible Scanning Spectrophotometer

The honey samples were analyzed for physicochemical characteristics. According to the EU Regulation (Council EU, 2001) and Codex Alimentarius (2001): **The refractometric method was used to determine the moisture, or conversely the soluble solids** in honey. **pH/Ion and free acidity** meter S220 and S230 Conductivity (Seven Compact, Mettler Toledo). **Determination of electrical conductivity** - Electrical conductivity was using a conductometer Mettler Toledo. **Determination of diastase activity** –Standard Schade method and proline. **Color** intensity - was determined using the Pfund scale ( Lovibond 2000 & 1000 comparator).

**Bioactive compounds** - identification of phenolic compounds by ultra-high performance (under pressure) liquid chromatography UPLC-PDA, MS method. **Total content of phenolic compounds (TCPC)**, Determination to the Folin-Ciocalteu method (in terms of gallic acid). **Total content of flavonoids (TCF)**, by the spectral method (AlCl<sub>3</sub> reagent in terms of rutin). **Total**

**content of phenolic acids (TCPA)**, Phenolic acids were determined according to the method of Mazza, Fukumoto, Delaquis, Girard, and Ewert with some modifications. **Antioxidant activity assay with DPPH- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl** - DPPH 0.1 N 50% inhibition mg, with a sample. **Carbohydrates** - the sugar content is determined by Waters HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) with RI-detection. **Cations** - the minerals are determined by the Waters 1515 isocratic HPLC Pump (High-Pressure Liquid Chromatography) with Waters 432 Conductivity detection. Column - IC-Pak C M/D; Mobile phase: 0.1 mM EDTA/3 mM HNO<sub>3</sub>. **Protein** - Based on the Kjeldahl method, determining the nitrogen and the conversion factor yields the result of the crude protein. **Pollen Analysis** - The pollen analysis was made according to the method of Louveaux et al. slides were prepared from each sample and photographed under a light microscope. The identification of the pollen grains is based on their size and shape. **Grayanotoxin-III Analysis** - Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Waters, UPLC Acquity, QDa Detector) was used for the identification of grayanotoxin-III.

**Scientific novelty**- For the first time in Georgia, studies were conducted on the analysis of biologically active compounds in honey. Using chemical, physico-chemical and modern instrumental methods, 4 carbohydrates were separated and identified: fructose, glucose, sucrose and maltose. Among the biologically active compounds, 21 compounds were identified: 3 organic acids: Malic acid, Gluconic acid, Oxalic acid, 10 Phenolic acids: Quinic acid, 4 Hydroxybenzoic acid, Abscisic acid, Caffeic acid, Protocatechuic acid, P-coumaric acid (trans 4-Hydroxycinnamic acid), Shikimic acid, 2,5 - Dihydroxybenzoic acid (Gentisic acid), Salicylic acid (O hydroxybenzoic acid), Hydroxybenzoic acid, 2,4 - Dihydroxybenzoic acid (Resorcylic acid). 7 flavonoids: Pinobanksin, Apigenin, Acacetin, Methoxy kaemperol, Isoramnetin, Bis methylated quercetin. Gentisaldehyde. Research was conducted on 12 antibiotics in honey samples: Oxytetracycline, Tetracycline, Streptomycin, Sulfadimethoxine, Chloramphenicol, Metronidazole, Ronidazole, Erythromycin, Nitrofurantoin, Lincomycin, Tylosin, Rifampicinum. 7 heavy metals were also determined: cadmium, cobalt, chromium, mercury, arsenic, lead, zinc. 5 cations: Sodium, Ammonium, Potassium, Magnesium and Calcium.

**Theoretical and practical significance of the work** The obtained results may not only be of significant scientific interest, but they hold practical importance for specialists in the agricultural sector. With these results, honey can be authenticated and its origin determined. This will enhance awareness of the university's research potential in the region and improve the competitiveness and quality of agricultural products.

**Approbation of the work** - the results of the study are presented in 5 scientific articles, 1 in the monograph, and 3 presentations of the international scientific conference.

## **1. Experimental part:**

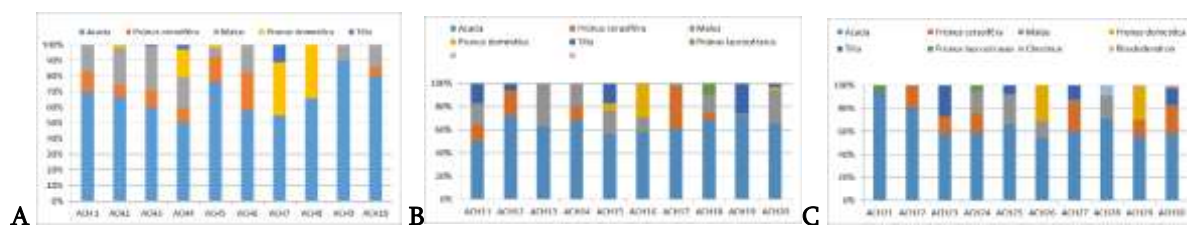
### **1.1. research object**

The object of the study was Acacia, Chestnut and Jara honey collected in 3 regions of Western Georgia - Imereti, Guria, Adjara. Acacia honey - Samples collected over a span of two years 2022 and 2023. Samples were selected based on microscopic examination of stamens. In particular, those honey samples where the amount of acacia pollen was more than 45% were selected for analysis. Out of the collected samples, 30 honey samples were chosen for analysis (10-10 samples from each municipality and a total of 60 samples over 2 years). Chestnut honey samples were taken in Guria, Adjara and Imereti regions. As a result of the analysis of Pollens, those samples were selected in which the number of stamens was more than 75%. 14 samples of chestnut honey (ChH), 2022 harvest. Jara honey samples collected from three different municipalities - Adjara, in particular, Keda, Shuaxevi, Khulo. The harvest took place in the fall of 2018 (in September). Autumn polyfloral honey 12 samples. We stored honey samples in hermetic containers (4-5 ° C).

## **2. Microscopic study of pollen grains to confirm the botanical origin of honey**

The flower nectar, composed of entomophilous plants that bloom during the honey collection time, gives honey its color, flavor, taste, and curative-prophylactic qualities. The flower's biologically active components determine the biological activity of honey. Pollen analysis was conducted using a light microscope that was equipped with a video eye (AmScope/Microscope Digital Camera 18MP Aptina Color CMOS/Ultra-Fine Color Engine Inside /MU1803 USB3.0DC5V.900mA). In order to conduct the analysis, 10 g ± 0.1 g of the honey sample was

combined with 20 ml of water and dissolved at a maximum temperature of 400 °C using a vortex. Ten minutes after being opened, the sample was centrifuged at 1000 rpm. Following the extraction of the centrifuged liquid, 20 ml of fresh water was introduced and the mixture was centrifuged at 1000 rpm for an additional 5 minutes. To remove the liquid entirely, the resultant substance was decanted and centrifuged at a 45-degree angle on filter paper while inverted with the open end down. The residual precipitate was transferred to a preheated glass slide measuring 22 x 22 mm, with a temperature of 400 °C. The stamens were uniformly distributed onto the glycerine-gelatin surface using a cross-motion. Following the mixture's maximal heating at 400 degrees Celsius for five minutes, it was scrutinized under a microscope. Pollen identification was accomplished using pollen preparations of honey plants (which we produced ourselves) and pollen atlases of various plants. Pollen grains exceeding 500 in number were analyzed in each sample. For increased accuracy, pollen counts were performed in triplicate, and the average rate was calculated for each sample. The indicator is calculated in percentages, and the results are given in the chart #1–#5. According to the content, pollens were divided into 4 groups: dominant pollens (more than 45%), secondary pollens (16–45%), essential minor pollens (3–15%), and minor pollens (less than 3%). The study's findings showed that of the honey samples collected for examination included acacia pollen, with pollens being those from Linden, apple, raspberry, plum, oak, and leather.( Diagram 1)

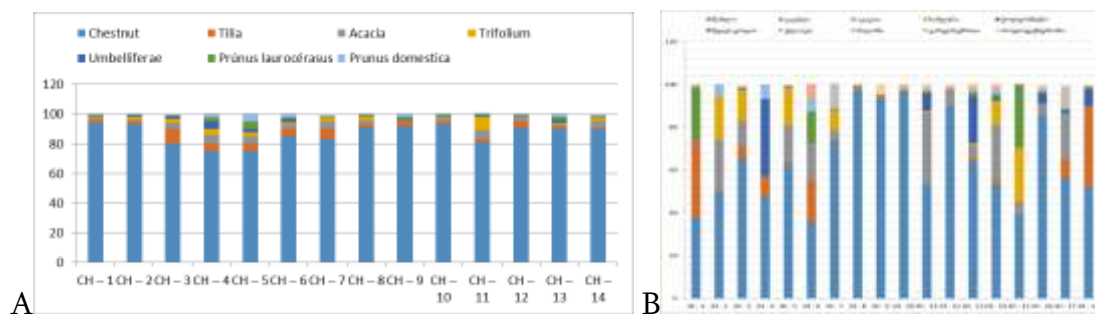


**Diagram 1.** A.Pollen content in 10 samples of Acacia honey from Imereti region B.Pollen content in 10 samples of Acacia honey from Guria region C.Pollen content in 10 samples of Acacia honey from Adjara region.

The study's findings showed that of the honey samples collected for examination included dominant acacia pollen, with the remaining secondary pollens being those from apple and plum. In samples: ACH11, ACH19, ACH23, ACH26, ACH29, secondary pollens being Linden.

Rhododendron pollen was also detected as trace in sample ACH30. which is identified in Adjara, namely the Khulo district. ACH9 in the Imereti region and ACH21 in the Adjara region are distinguished by a high content of acacia pollen.

Chestnut pollen makes up the majority of the pollen in the samples of chestnut honey; it ranges in number from 75% to 94%. The remaining pollens in the samples are composed of 5–10% Linden, acacia, woodland clover, umbelliferae, tea tree, and plum flower pollens. Only 10% of the CH-3 sample of chestnut honey, 7% of the CH-7 honey, and 5% of the CH-4, CH-5, and CH-6 samples contain Linden pollen. Of the rest, less than 5 percent are pollen (Diagram 2.A.)



**Diagram 2.A** Pollen content in 14 samples of ; **B.** Chestnut honey Pollen content in 18 Jara honey samples

The results of qualitative pollen analysis indicates the diversity of resources utilized by honeybees in the region of investigation. Pollen analysis of Jara Honey showed that out of 18 analyzed samples were identified: Chestnut, Tilia, Acacia, Juglans regia, Prunus laurocerasus, Malus domestica, Pyrus communis L, Prunus domestica, Trifolium pratense, Taraxacum, Solidago virgaurea, Rubus idaeus pollen (Diagram2.B.). In 15 samples of honey, the content of chestnut pollen was more than 45; in Kedi samples, it ranged from 47.5-26.789%, in Shuakhevi, from 53.28 to 96.6, and in Khulo, from 46.19 to 80.47%. In three Jara honey samples, the presence of chestnut pollen is not predominant (JH 1, JH 6, and JH 15). However, it has a higher composition than acacia, Linden, and others. Rhododendron pollen has been identified in the samples: (JH 1, JH 6, JH9, JH10, JH11, JH13, JH14, JH15, JH16 and JH17). The consistency of Rhododendron pollen is higher in JH-9, JH-13 and JH-16 samples. This samples belong to important minor pollen group (JH-9 – 4.45%, JH-13 – 4.88 % and JH-9 – 4.26%), in other cases their consistency is lower than 3%. Depend on melissopalynology analysis result we can conclude that jara`s honey can be classified as multiflorals honey. Although JH-7, JH-8, JH-9, JH-10, JH-12 and JH-16 samples of



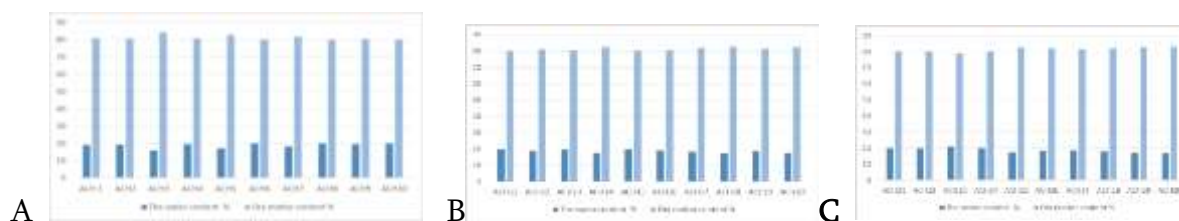
honey, concentration of chestnut pollen for unifloral honey is in settled limits (73.36 – 96.89 %). Physico-chemical characteristics of acacia, chestnut and jara honey collected in 3 regions of Western Georgia (Imereti, Guria, Adjara) were studied. At the Initially stage, based on the microscopic analysis of pollen, the botanical origin of honey was confirmed and acacia honey was selected for analysis, where the amount of pseudo acacia pollen was more than 45%. Chestnut honey had 75% to 94% chestnut pollen. Jara honey was identified as polyfloral honey.

#### **4. study of physico-chemical characteristics of honey**

One of the most contaminated foods in Europe is honey. There are many different ways and means of falsifying it, which is bad for both the consumer's health and the quality of the honey. The Code on the Standard of Honey was established in 1981 to safeguard such a valuable commodity. It has since been updated on a regular basis, with modifications made in 1987, 2001, and 2019. By identifying the factors that affected honey quality, the code was designed to control the environment of honey production and storage. According to the European regulation, the criteria for determining the latter are separated into two groups: organoleptic characteristics, which include evaluating the honey's color, taste, consistency, and aroma; and physicochemical characteristics (moisture, carbohydrate content, acidity, pH, minerals, electrical conductivity, vitamins, proteins, hydroxymethylfurfural, organic acid content). The type of nectar, the climate, and the procedures used to process the honey all affect these qualities.

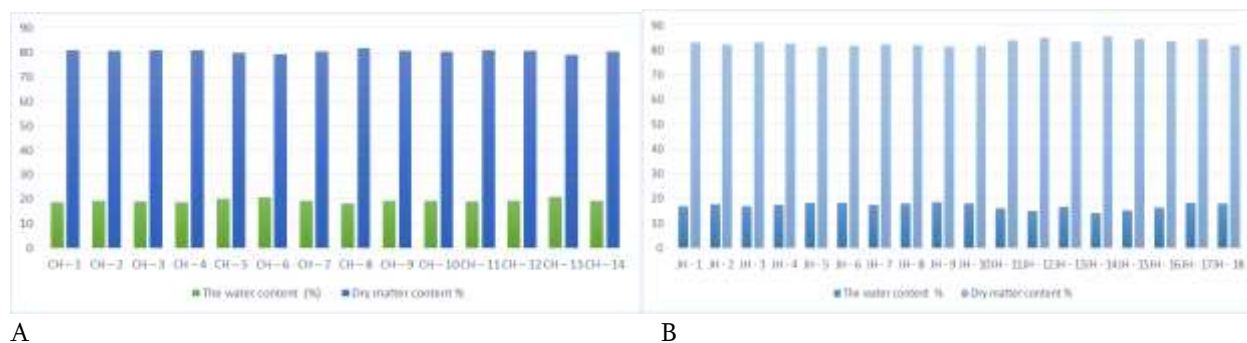
The physico-chemical properties required by the European regulation were ascertained in the acacia, chestnut, and Jara honey samples after the pollen analysis verified the honey samples' botanical origin. These characteristics included water and solid content, active acidity, concentration of free acids, electrical conductivity, diastatic activity, protein, and proline amount. The water content in honey stands as the important parameter. The mass fraction of water in the honey samples taken for analysis is within the norm according to the European regulation and the technical regulation on honey in force in Georgia. (no more than 20%), in particular from 16.9 to 20%. The samples of acacia honey taken for analysis are yellowish-amber and characterized by the distinctive aroma of acacia flowers. The water content in honey stands as the important parameter. The mass fraction of water in the honey samples taken for analysis is within

the norm according to the European regulation and the technical regulation on honey in force in Georgia. (no more than 20%), in particular from 16.9 to 20% (Diagram 6;7;8.). It is only an exception ACH8 (Kharagauli), ACH11 (Lanchkhuti) and ACH23 (Keda) sample, where the rate is 21.1%. A relatively low rate was observed in the sample taken in Samtredia municipality, 15.8% (Diagram 3 ). In the samples taken from all three regions, the average rate of water is actually similar, Imereti region 18.83%, Guria region 18.75% and Ajara region 18.74%.The total content of soluble substances in acacia honey is in the range of 78.9-84.2%.



**Diagram 3. A.** Mass ratio of water and dry matter of Acacia honey in Imereti region **B.** Mass ratio of water and dry matter of Acacia honey in Guria region **C.** Mass ratio of water and dry matter of Acacia honey in Ajara region

The fourteen samples of chestnut honey that were collected for examination all have a black hue, a taste that is somewhere between bitter and sweet, a faint scent, and a distinct smell that is unique to chestnut flowers. Samples of chestnut honey had water contents ranging from 17.8% to 20.0% (Diagram 4.A). The honey from Kobuleti (Chakvi) had the greatest rate, which may have been brought on by the area's high relative humidity. As a result, the dry matter content of chestnut honey is 80.0-82.3% (average 81.15%), which also complies with the regulations.



**Diagram 4. A** Water and dry matter content of Chestnut honey samples **B.** Water and dry Substans content of Jara honey samples

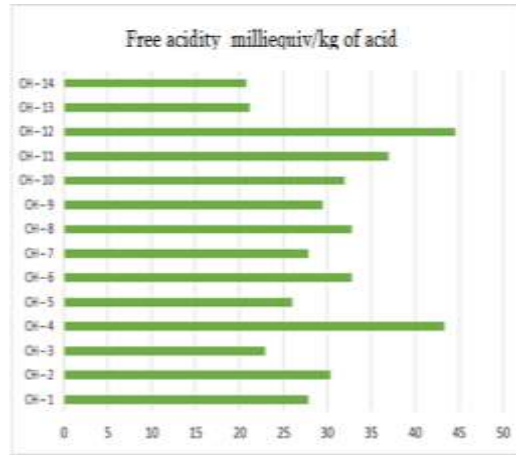
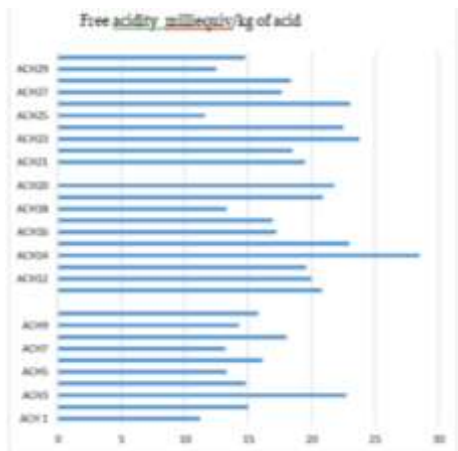
Jara honey is collected once a year, at the beginning of autumn. Since it contains pollen from many plants and flowers, Jara honey can differ in color, taste and aroma from other honeys. The moisture level in this inquiry ranged from 14.3% to 18.6%. (Diagram 4.B.), As a result, the dry

matter content of Jara honey is 80.0-82.3% (average 81.15%), JH-14, JH-15 and JH-17 samples are distinguished by high Content of dry matter (85-86%).

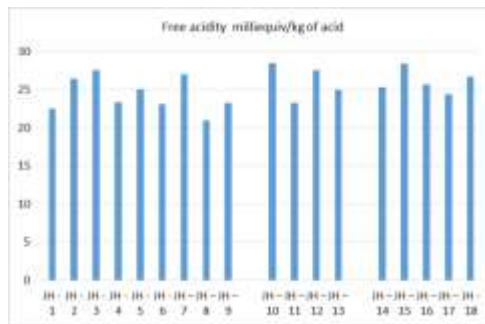
The average rate of water content in acacia honey samples taken from the Adjara region was 18.77%, and the total content of dray substances was 81.23%. The water content in Jara honey samples ranges from 14.3% to 18.6%, so the mass fraction of dry matter is from 81.4% to 85%. i.e. Average rate of water content in jara honey is 17.13%, and dry matter is 83.17%. The water content in chestnut honey samples ranges from 18.2% to 20.9%, with an average rate of 19.40%. Consequently, the mass share of dry substances ranges from 79.1% to 81.8%, with an average rate of 80.58%

Honey samples from Western Georgia have less than 20% water content; of these, Jara honey samples have the lowest rate (17.13%), followed by acacia honey (18.77%) and chestnut honey (19.40%). These rates are within the established norm and the International Honey Commission standard. Honey's stability and resistance to enzymatic reactions are guaranteed by its low water content.

One of the key indicators of honey's ripeness is its free acid level. It also shows the modifications that occurred when the honey was being stored. The organic acids found in honey, which are in balance with lactones, esters, and certain ions like phosphates, sulfates, and chlorides, are what give it its significance. An elevated acidity level may also suggest that the honey underwent fermentation at some point, converting the alcohol that resulted into an organic acid. The acid content of honey is relatively low, but it is crucial for the taste of honey. The acidity of honey is determined by titration and is expressed in milliequivalents per kg, Calculated as milliequivalents of acid per kg of honey. The acidity in the samples submitted for analysis is less than 50 units, In particular, the average rate in Imereti acacia honey samples is 15.45 mEq/kg, 18.22 mEq/kg in Adjara samples and It is relatively high in Guria samples at 20.2 mEq/kg.



**Diagram 5. A.** Free acidity of Acacia honey samples **B.** Free acidity of Chestnut honey samples. Additionally, it ranges from 20.8 to 44.6 milliequiv/kg in chestnut honey (Diagram 5). Diagram 6 displays the findings of the free acidity study of Jara honey. The free acidity index varied between 20.96 and 28.5 mEq/kg, whereas the range of acacia honey concentration is between 11.2-28.5 mEq/kg (Diagram 5.A.).



**Diagram 6.** Free acidity of Jara honey samples

By comparing the average rates of the obtained results, free acidity is relatively low in Acacia honey at 17.96 units, increases in jara honey to 25.2 units, and is relatively high in chestnut samples at 30.65 units.

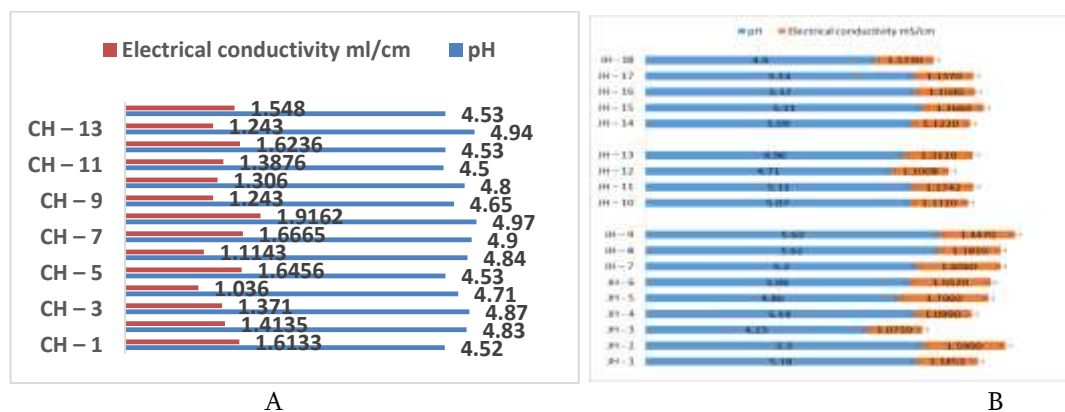
Since pH has an impact on the texture, stability, and shelf life of honey, it is one of the key elements of honey. Specifically, it stops microbiological activities from growing. The Codex Alimentarius Commission does not specify the pH of honey; it often ranges from 3.2 to 4.5. Numerous variables, such as the pH of the soil and nectar, affect its worth. The acacia honey samples that were submitted for analysis all had very identical pH values. Specifically, 3.64–4.14 for Imereti acacia honey, 3.58–4.25 for Guria samples, and 3.61-4.08 for Adjara samples (diagram 7). The pH values of the chestnut honey samples range from 4.5 to 4.97 while the Jara samples, which correspond to the standard (pH 3.40–6.10), range from 4.23 to 5.63 (Diagram 8.A.B.).

The honey's acidity, mineral content, and botanical origin all have a direct impact on its electrical conductivity. As per the honey regulations, the value of floral honey is less than or equal to 0,800 mS/cm, whereas the value of chestnut honey exceeds this limit.



**Diagram 7.** A. Acacia honey from the Ajara region: pH and electrical conductivity B. Acacia honey from the Guria region: pH and electrical conductivity. C. Acacia honey from the Ajara region: pH and electrical conductivity

The electrical conductivity limit in samples of acacia honey is comparable. Specifically, the average value of the minimum value for Imereti was 0.152 milliliters/cm, while the average value for the samples from the Adjara and Guria regions was 0.154 mS/cm. The maximum value is 0.29 mS/cm (average value) for Imereti, 0.285 mS/cm (average value) for Guria, and 0.282 ml/cm (average value) for Adjara honey (Diagram 7).

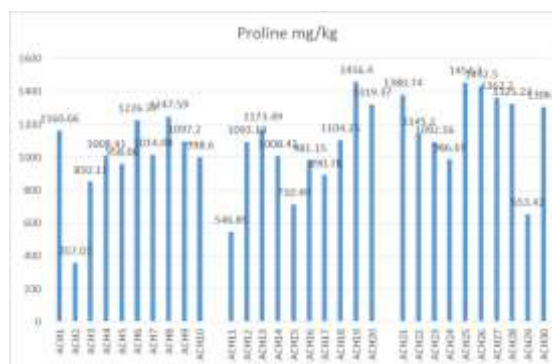


**Diagram 8.** A. pH and electrical conductivity in Chestnut honey B. pH and electrical conductivity in Jara honey

In the chestnut honey samples that were analyzed, the electrical conductivity values ranged from 1.036 to 1.9162 μS/cm (diagram 8.A.); in the Jara honey samples, they varied from 1.071 to 1.706 μS/cm (diagram 8.B.).

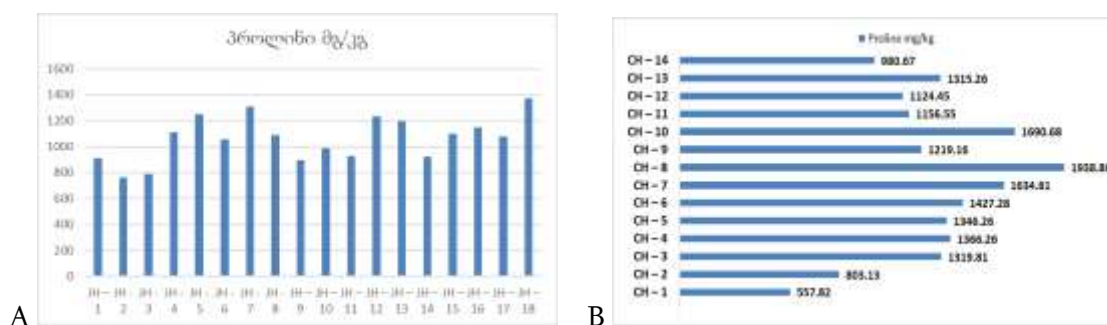
Average values of electrical conductivity in the samples of jara and chestnut honey are almost similar, 1.2441 and 1.43 μS/cm, respectively, but it is much smaller in acacia honey - 0.2293, which is one of the important distinguishing markers in relation to other honeys. Since the amino

acid composition of honey is entirely based on its botanical origin, both its qualitative and quantitative content can be used to successfully gauge the product's naturalness and quality. Honey contains 1% or less of amino acids by mass. Its composition includes glutamic acid, aspartic acid, glycine, threonine, histidine, glutamine, proline, and others. But among them there is more proline, which is mainly produced by bees during nectar processing. Its content depends on the time of nectar processing by the bees and, accordingly, on the botanical origin of the honey. It makes up about 50-85% of the total mass of amino acids and its concentration is different in different honeys. The European regulation determines the proline content in honey and it should not be less than 180 mg/kg.



**Diagram.** Proline content in Acacia honey

In Imereti honey samples, proline concentration ranged from 357 to 1247 mg/kg (average value 991.8 mg/kg), in Guria honey, from 546 to 1456 mg/kg (average value 1028.43 mg/kg), and in Adjara honey, from 653 to 1380 mg/kg (average value 1213.88 mg/kg), according to a comparison of the obtained data. The Imereti region has the lowest proline content on average, followed by the regions of Guria and Adjara (Diagram 9).



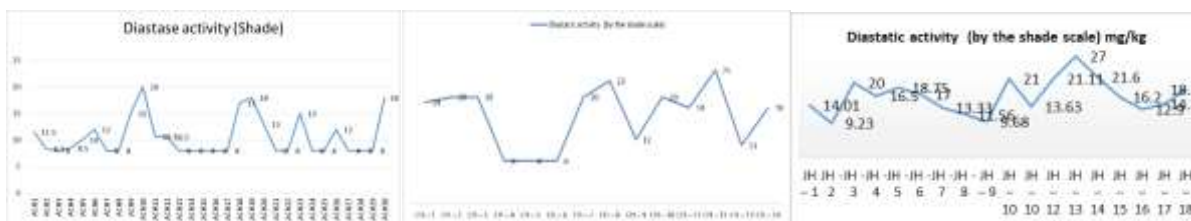
**Diagram 10.A** Proline content in Jara honey **B.** Proline content in Chestnut honey

The proline content of Jara honey samples ranged from 761.28 to 1372.29 mg/kg (Diagram 10.A.). The lowest proline concentration was measured in JH-2 (761.28 mg/kg) and JH-3 (790.62 mg/kg) in the honey samples from Keda. The highest amount was observed in five samples: JH-5 (12498.39 mg/kg), JH-7 (1311,06 mg/kg), JH-12 (1234.9 mg/kg), JH-13 (1208.16 mg/kg), and JH-18 (1372.29 mg/kg). Diagram 10.A.- shows that all proline values for honey were well above the 180 mg of proline per kilo of honey standard.

Chestnut honey has a proline concentration ranging from 557.82 mg/kg to 1938.86 mg/kg. The rate is comparatively low in the samples from Askani and Guria (557.82 mg/kg), Keda (803.13 mg/kg) honey, and Tskaltubo (980.67 mg/kg) honey (viewed). It is found in multiple samples of Imereti (Baghdati, Zegan), Kobuleti (CH5), and Kedi (CH3 and CH4), all within 1300 units. The honey from Jalabashvili village in Kedi had the highest rate of 1938.86 mg/kg among the samples that were given (diagram 10.B).

Diagrams No. 9, 10 demonstrate that all Jara honey samples had a rather high proline content. Proline concentrations in chestnut and acacia honey samples ranged from 557.82 to 1938.86 mg/kg and 357 to 1556,1 mg/kg, respectively. Of the samples that were given, chestnut honey had the highest proline content (1938.86 mg/kg) and acacia honey had the lowest (357 mg/kg). The average proline level in the Jara and acacia honey samples is 1063.22 mg/kg and 1078.04 mg/kg, respectively, whereas the proline amount in the chestnut honey is 1277.21 mg/kg. The activities of diastase are the basis for evaluating the quality of honey. The enzymatic composition of honey includes glucosidases,  $\alpha$  and  $\beta$  amylases,  $\alpha$  and  $\beta$  glucosidases, as well as proteases. Honey differs from each other in the composition and quantity of enzymes, as their content is completely dependent on both the nectar collection period and the physiological age of the bee colony and sample storage conditions.  $\alpha$  and  $\beta$  amylases, or diastases, are the enzymes that occur in relatively large quantities in honey, and their content depends on their botanical and geographical origin. [28]. A diastase catalyzes the breakdown of starch into maltose. For all varieties of honey, the diastase (amylase) activity should be at least 8 units, as determined by the shade scale. The analysis shows that the rate is less than 8 in 15 samples of acacia honey (ACH 3, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 29). The Guria region's tenth sample had the highest

rate of diastatic activity (20 units), followed by the twenty-third sample (15 units), the twenty-sixth sample (12 units), and the thirty-third sample (18 units). The average rate of diastatic activity in the remaining 15 samples was found to be 13.3 units, after accounting for rates higher than 8 units (Diagram 11).



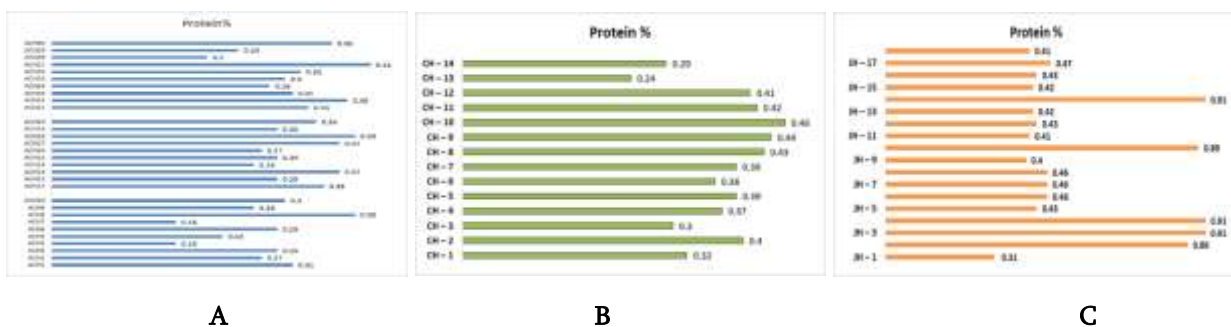
**Diagram 11.** A. Diastatic activity in acacia honey. B. Diastatic activity in Chestnut honey C. Diastatic activity in Jara honey

Only three of the fourteen samples of chestnut honey—the samples from the Kedi district, the two villages of Kharaula and Dandallo, and the sample from Kobuleti—showed eight units. It is more than 8 (between 11 and 25) in all other circumstances (diagram 11.B.).

The diastatic activity rate in Jara honey ranges from 9 to 27, particularly in samples of Shuakhevi honey, where the activity rate is significantly higher, along with the concentration of enzymes (diagram 11.C.). This consistency in Jara honey samples is expected due to the diverse array of honey plants found in the forest.

In the honey samples taken for analysis, the diastase activity is notably higher than 8 units. Specifically, for acacia honey, it ranges from 8 to 30 units (with an average rate of 11.91 units), while for chestnut and jara honey, it ranges from 8 to 27 units (with average rate of 16.42 and 16.44, respectively). Since bees are the primary producers of honey, which has a very low protein concentration, the amount of protein in honey is mostly determined by how well and how long the bees digest the honey. Samples of acacia honey collected for examination contain 0.16–0.39% of it. Diagram 30 shows that three samples from Guria (acacia honey ACH-13 (0.37%), ACH-17 (0.37%), and ACH-18 (0.39%)) and one sample from Adjara (acacia honey ACH-8 (0.39%)) had quite high rates.





**Diagram12.** A. Protein content of Acacia honey B. samples Protein content of Chestnut honey samples C. Protein content of Jara honey samples

**Physico-chemical of honey Western Georgia characteristics Table №1**

Physico-chemical characteristics	Western Georgia honey		
	Acacia honey	Chestnut honey	Jara honey
Water content%	18,77	19,4	17,13
Mass fraction of soluble substances,g/100 g	81,23	80,58	83,17
Free acide milliequiv/kg	17,0	30,65	25,2
Electrical conductivity µs/sm	0,2293	1,4300	1,2551
pH	3,93	4,7	5,06
Proline mg/kg	1078,04	1277,21	1063,22
Protein %	0,3	0,37	0,56
diastase activity (by the shade scale)	10,65	16,43	21,14

**Table1** lists the average indicators of the physico-chemical properties of Jara, chestnut, and acacia honey produced in Western Georgia.

Chestnut honey's protein content ranges from 0.24% to 0.46%, with little discernible variation between the samples. The 13th sample of chestnut honey (Baghdati, Zegani) has a comparatively low rate. The nitrogen content of Jara honey samples ranged from 0.31 to 0.91% (Diagram 14 C). A high concentration of protein, almost 1%, is recorded in ridge 4 (JH2, JH3, JH4 JH and sample 1 of Khulo (JH14). The average rate of protein content in acacia honey is 0.3%, in samples of chestnut honey it is 0.37%, and in samples of Jara honey it is 0.56%.

### 5. Qualitative and quantitative analysis of honey carbohydrates using HPLC-UV, Vis, and RI methods

Honey contains a significant amount of carbohydrates, mostly in the form of mono- and disaccharides. Honey's botanical and geographical origins are the primary determinants of its carbohydrate content, both in terms of quality and quantity. But other variables including weather, honey processing techniques, and storage conditions also affect the amount of carbs. Carbohydrates in honey were identified by the high-pressure liquid chromatography method

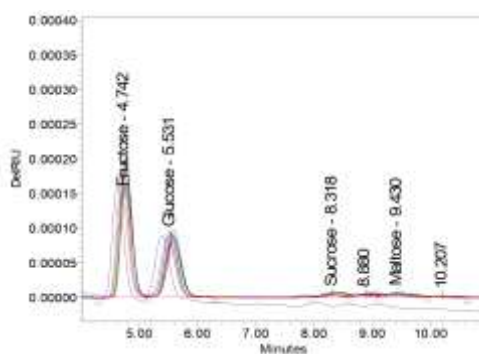
using the HPLC-Waters Breeze instrument. Column: carbohydrate, column temperature: 40 oC, mobile phase: 80% acetonitrile (Merck; Sigma-Aldrich), detection: RI Detector 2414. For the identification and quantitative analysis of individual compounds, the standard compounds at our disposal were: glucose, fructose, maltose, and sucrose. The peaks were identified according to their retention time, and the obtained results were recalculated according to the calibration curve of the standard compounds (table 2).

### Description of carbohydrate calibration curves

Table 2

Name	Time	R	R <sup>2</sup>	Standard Error	Equation
Fructose	4.344	0.999791	0.999582	1.577167e+004	$Y = 4.36e+005 X + 6.44e+003$
Glucose	5.351	0.999930	0.999860	2.187388e+004	$Y = 8.71e+005 X + 8.93e+003$
Sucrose	7.236	0.999894	0.999788	2.178549e+004	$Y = 8.47e+005 X + 8.89e+003$
Maltose	8.640	0.999877	0.999753	1.705166e+004	$Y = 6.14e+005 X + 6.96e+003$

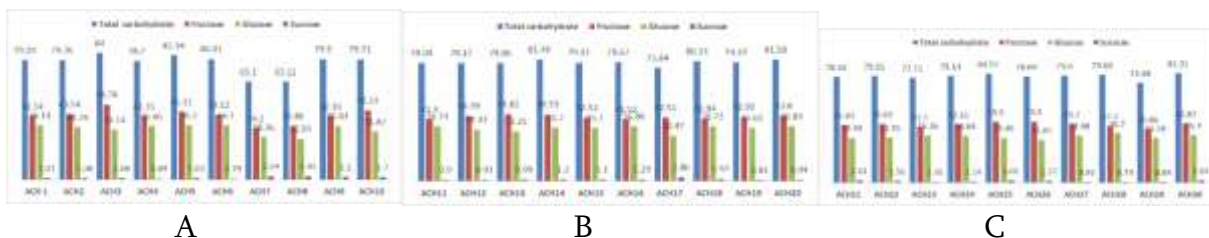
For examination, a 5 g sample of honey was obtained and diluted in 40 ml. We added 25 ml of methanol to the aqueous solution after quantitatively transferring it to a 100 ml volumetric flask in water. The flask with the distilled water was filled to the mark. After passing a 0.45-micron membrane filter through the sample that was ready for analysis, we carried out the chromatographic analysis of the material.



Picture 1. Carbohydrate calibration curve

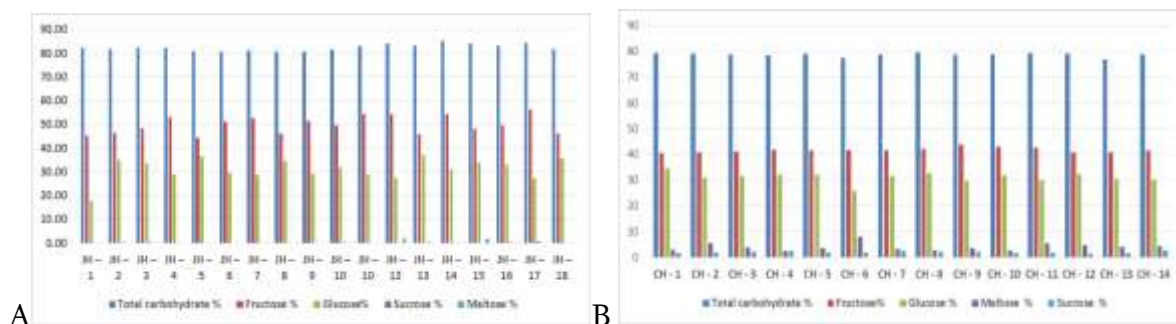
Samples of acacia honey detected fructose, glucose, and sucrose. According to a comparison of the obtained results, fructose is the predominant carbohydrate in all 30 samples that were taken for analysis; its amount in the samples from the Imereti region falls between 34.2-49.78% (average rate: 42.44%) (Diagram13.A.), in the samples from the Guria region, between 41.4-44, within 82% (average rate: 42.98%) (Diagram13.B), and in the samples from the Adjara region, between 41.5-45.5% (average rate: 43.18%) (Diagram13.C). Regarding the glucose content, the average value is 33.46% (ranging from 26.94 to 36.14%) (Diagram13.A) in the honey from the Imereti region,

35.24% (ranging from 30.47% to 36.86%)(Diagram13.B) in the samples from the Guria region, and 31.82% to 35.4% in the samples from the Adjara region(Diagram13.C).



**Diagram 13. A.** Carbohydrate content in Acacia honey from Imereti region **B.** Carbohydrate content in Acacia honey from Guria region **C.** Carbohydrate content in acacia honey from Adjara region

Since the technical standard on honey stipulates that the concentration of sucrose should not exceed 5%, the amount of sucrose in honey is a crucial metric for verifying its naturalness. All three locations' average rates of sugar concentration for acacia honey samples range from 1.26 to 1.44%, which is within normal limits. The results show that the honeys from the Adjara region have a relatively greater fructose content (based on the average indicator) while the samples from Guria have a higher glucose content.



**Diagram 14. A.** Carbohydrate content in Jara honey **B.** Carbohydrate content in Chestnut honey

About 75% of Jara honey's total composition consists of monosaccharides (fructose and glucose), and the remaining 10% to 15% are disaccharides. In samples of Jara honey, fructose, glucose, sucrose, and maltose were detected. Among them, glucose and fructose were the most prevalent molecules. Based on a comparison of the obtained data, it can be determined that the samples of Jara honey had a fructose percentage of 44.5–56.4% and a glucose concentration of 27.8–37.07% (diagram 14.A). In the Jara honey samples taken for analysis, taking into account the average value of the indicators, the dominant compound is fructose (38.94%), followed by glucose (31.65%). Sucrose identified in identified in samples: JH-2, JH-3, JH-10, JH-13, JH-16, and JH-17, and the contents of the honey samples ranged from 0.065% to 0.403%. Maltose was

identified only in 2 samples: JH-12 and JH-15. (diagram 14.A). The maltose content was 2.006% and 1.8%. The sucrose and maltose contents are significantly lower than the fructose content as well as the glucose content. The predominant carbohydrate in samples of chestnut honey is fructose. It makes up between fifty and fifty-five percent of all carbs. Additionally, maltose makes about 2.4–7.5%, sucrose 1.4–2.75%, and glucose 35–42% of the overall amount. It should be mentioned that no sample had more sucrose than 2.75% (diagram 14.B). Every sample of chestnut honey included both sucrose and maltose. The ratios of glucose to water G/W and fructose to glucose F/G are also significant indicators when assessing the quality of honey. When the fructose and glucose ratio is less than 1, honey crystallizes, indicating that there is more glucose than fructose in the honey. A good characteristic of acacia honey is the average fructose/glucose ratio in the samples collected for analysis: 1.25 in Imereti honey, 1.22 in the second 10 samples (ACH11–ACH20), and 1.27 in the first 10 honey samples (Adjara region).

Furthermore, the ratio of glucose and water is crucial. The ratio of glucose and water in the seven acacia honey samples (ACH3, ACH5, ACH14, ACH18, ACH20, ACH28, and ACH30) is between 2.03 and 2.11, indicating that the crystallization process is progressing. The ratio is less than 1.7 in three samples from the Imereti region (ACH7, ACH8, ACH10) and three samples from the Adjara region (ACH21, ACH22, ACH23), indicating a low or negligible possibility of crystallization. The ratios in the remaining honey samples range from 1.74 to 1.94. The features of both ratios are rather high in the samples of chestnut honey that are being shown. Specifically, the average rate of the glucose/water ratio is 1.6 and the fructose/glucose ratio is 1.34.

In Jara honey samples, the fructose/glucose ratio varied between 1.09 and 2.08, and the glucose/water ratio was between 1.05 and 2.24. When the ratio is near 1, just two cases are documented. First, the glucose/water ratio in this instance is rather high at 1.99, whereas the fructose/glucose ratio is 1.09 (JH18). A glucose/water ratio of 1.05 is the second (JH1). However, the fructose-to-glucose ratio is 1.22 here as well. The crystallization process is therefore not fixed. The honey that crystallizes readily does not include chestnut and Jara honey.



**Diagram 15.** Average rate carbohydrate content of Acacia, Jara and Chestnut honey

All samples of acacia, chestnut, and Jara honey from Western Georgia contained fructose (acacia: 42.87%; chestnut: 41.66%; Jara: 49.90%), glucose, and sucrose. The amount of fructose and total carbs in Jara honey samples is comparatively greater. Acacia honey has an average glucose rate of 34.33%, which is comparatively higher. Moreover, maltose is detected in samples of Jara and chestnut honey; its average rate is 0.21% in Jara honey and 4.04% in chestnut honey (diagram 15).

## 6. Qualitative and quantitative analysis of honey cations using the HPLC conductometric method

Numerous macro- and microelements can be found in honey. The range of their presence in honey is 0.02–1.03%. The majority of these elements are Fe, Li, Co, K, Na, Mg, Ca, P, Mn, and so on. Depending on the honey's botanical and geographic origins, their composition varies. Honey's color is influenced by the minerals it contains; in particular, the more minerals there are in the honey, the darker the hue. One of the indicators to verify the naturalness of honey is its mineral content. The mineral value of the honey is particularly reduced when the beekeeper further feeds the bees sugar syrup.

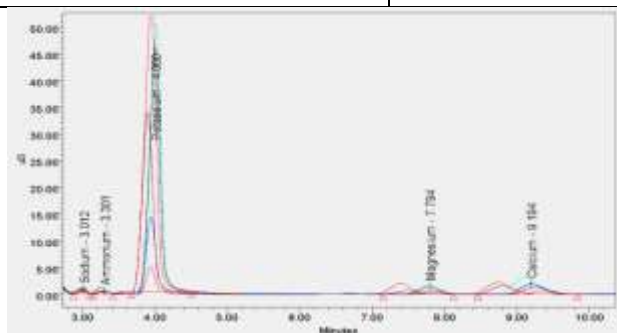
The study of cations was carried out by the chromatographic method, using a high-pressure liquid chromatograph, a conductometric detector. Isocratic HPLC pump - Waters 1515 (Waters 1515), Detector Waters 432 (Conductivity) Column IC-Pak Cation MD, Eluent 0.1 mM EDTA, Blank conductivity  $1250 \pm 50 \mu\text{S}$ , Base Sensitivity  $2000 \mu\text{S}$ , Integrator Sensitivity  $\mu\text{S}$ , column temperature  $35^\circ\text{C}$ , Polarity-negative. Standards were obtained for Lithium hydroxide monohydrate ( $\text{Li}^+$ ), Sodium chloride ( $\text{Na}^+$ ), Ammonium chloride ( $\text{NH}_4^+$ ), Potassium chloride ( $\text{K}^+$ ), Magnesium nitrate hexahydrate ( $\text{Mg}^{2+}$ ), Calcium nitrate tetrahydrate ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Strontium nitrate tetrahydrate ( $\text{Sr}^{2+}$ ),

Barium chloride dihydrate ( $Ba^{2+}$ ) (Fisher Scientific), EDTA (Serva). Calibration curves of standard compounds were used to determine the quantitative content of minerals.

### Formulas of calibration curves of standard compounds

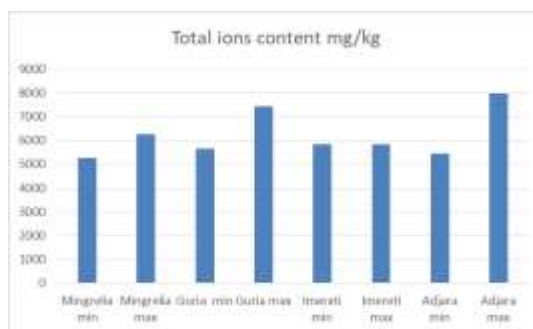
Table № 3

Calibration curves of standard compounds	
Lithium calibration curve formula	$Y = 3.55e+005 X - 7.26e+003$
Sodium calibration curve formula	$Y = 1.44e+005 X + 9.50e+004$
Ammonium calibration curve formula	$Y = 1.65e+005 X + 1.21e+005$
Potassium calibration curve formula	$Y = 7.79e+004 X + 6.01e+004$
Magnesium calibration curve formula	$Y = 2.97e+005 X + 2.76e+005$
Calcium calibration curve formula	$Y = 1.28e+005 X + 2.28e+005$



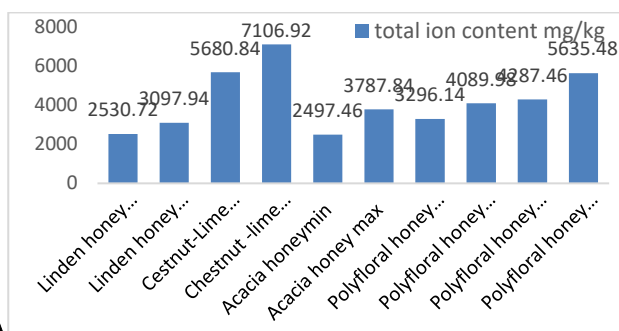
Picture2: HPLC chromatogram of honey cations

The cation analysis was done on jara honey, polyfloral honey, acacia, Linden, and Linden-chestnut samples. In the districts of Samegrelo, Guria, Imereti, and Adjara, samples of honey were collected. After comparing the findings, 115 samples in all were examined, and 18 samples with the lowest and greatest values of the indicators were given. The findings from eighteen jara honey samples are shown below. We used deionized water to dilute the honey samples 1:10 for chromatographic research, and then we filtered the resulting aqueous solution using a 0.45-micron filter. The ions found in the samples collected for analysis were calcium, magnesium, sodium, ammonium, and potassium. The average indicators (diagram) in the samples of chestnut honey have the following values that indicate their total content: Samegrelo 5278.92 and 6259.46 mg/kg, Guria 5644.34 and 7443.72 mg/kg, Imereti 5847.94 and 5850.26 mg/kg, and Adjara 5445.34 and 7991.04 mg/kg.



**Diagram 16.** Total ions in Samegrelo, Guria, Imereti, and Adjara chestnut honey

Compared to Linden (2530.72–3097.94 mg/kg), acacia (2497.46–3787.84 mg/kg), spring polyfloral (3296.14–4089.98 mg/kg), and autumn polyfloral (4287.46–5635.48 mg/kg), chestnut honey has a comparatively greater ion concentration. However, it is nearly identical in Linden-chestnut honey (5680.84–7106.92 mg/kg), which could be related to the honey's inclusion of chestnut pollen.



**Diagram 17. A.** Total amount of ions in different honeys of Adjara region mg/kg **B.** Total content of cations in chestnut honey

The amount of the potassium ion, which is the predominant cation in all of the samples collected for examination, varies according to the honey's place of origin. Samples of chestnut honey can be identified by their high potassium content. Honey contains between 5050.06 and 7248.30 mg/kg of it. Regional variations in potassium ion concentrations are negligible. Particularly intriguing was the honey that was harvested in a highland community 300 meters above sea level. It had more than 7000 mg/kg of potassium. Potassium ions are present in relatively smaller amounts in Linden (2377.34-2746.58 mg/kg), acacia (2220.22-3444.50 mg/kg), spring (296.72-3595.44 mg/kg) and autumn (3856.28-5092.18 mg/kg) in polyfloral honey, but in Linden-chestnut samples its concentration increases (5167.94-6516.32 mg/kg) (similar to total ion content) and is



almost similar to chestnut honey samples. In all honey samples, the mass fraction of potassium is more than 90% of the total content of cations.

Against the background of potassium ions, the content of other cations is much lower: in chestnut honey: calcium 13.44-307.34 mg/kg, sodium 26.5-122.82 mg/kg, magnesium 58.18-134.08 mg/kg and ammonium 6 28-197.80 mg/kg is present. The cation content of the acacia, chestnut, Linden, Linden-chestnut, and polyfloral honey samples is comparable. The findings indicated that chestnut honey had a total cation level of no more than 8–9%. Magnesium concentrations in most samples range from 51 to 130 mg/kg, or 0.88–1.95% of the total content of cations, while calcium values range from 14 mg/kg to 500 mg/kg, or 0.33–7.2%. Sodium makes up between 26 and 140 mg/kg, or 0.45-2.1%, of the total concentration of cations. There is a wide range in the ammonium ion content, ranging from 24 to 197 mg/kg. (Diagram17.B. ).



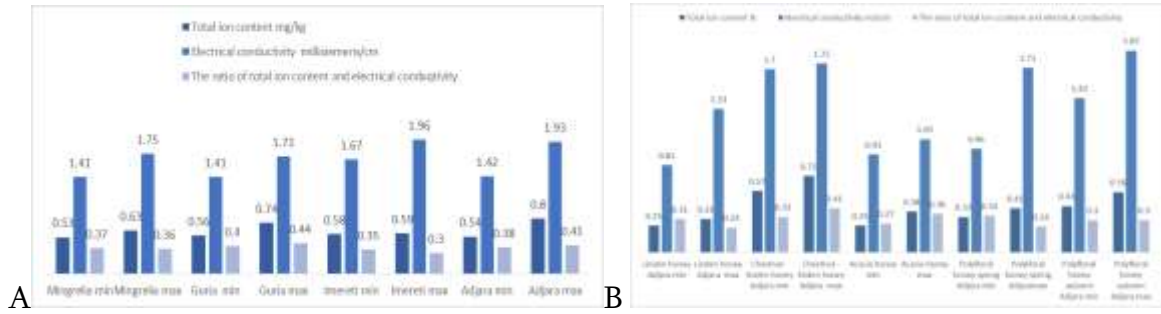
**Diagram 18 .** The content of Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> cations in different honeys of the Adjara region Honey is polyfloral in the spring and fall, and as we previously discussed, it contains a significant amount of potassium—at least 87.9% of all the cations. The additional ions in the examined honey samples (also found in chestnut honey) include Mg<sup>2+</sup>, which ranges from 29.8 to 94.1 ppm, and Ca<sup>2+</sup>, which ranges from 43.6 to 378 ppm. Together, these ions make for 1.77-8.44% of the total number of cations. Only 1.12–2.9% of the total cation content—28.2–134.3 ppm—is made up of the Na<sup>+</sup> cation (diagram18).





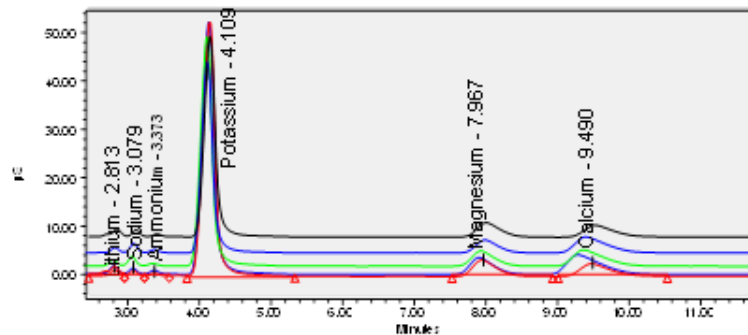
**Diagram19. A.**Content of potassium cations in chestnut honey mg/kg **B.**Content of potassium cations in polyfloral honey mg/kg

The electrical conductivity content of the honey samples that were provided was also measured, and it ranged from 1.41 to 1.96 millisiemens/cm for the samples of chestnut honey. From 0.91 to 1.05 in acacia samples, from 1.7 to 1.75 in Linden honey, from 0.81 to 1.33 in Linden-chestnut samples, and from 0.96 to 1.87 in polyfloral honeys.



**Diagram 20. A.**Total ion content, electrical conductivity and their ratio in chestnut honey **B.**Total ion content, electrical conductivity and their ratio in chestnut, Linden, acacia and polyfloral honey

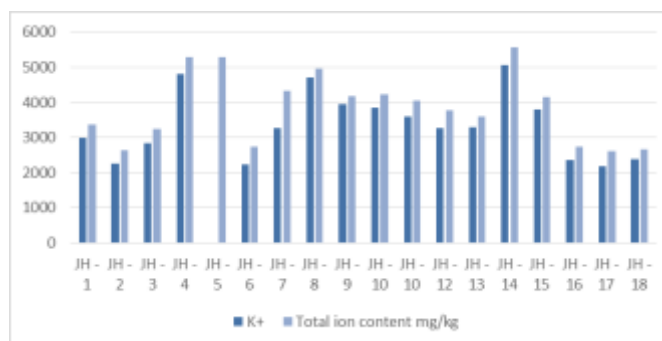
It was found that there is a specific relationship between electrical conductivity and the cation composition of chestnut honey. Specifically, higher ion concentrations are correlated with higher electrical conductivity indices. In the case of chestnut honey, the ratio between ion content and electrical conductivity was found to be between 0.30 and 0.44 (the minimum and maximum values). 0.24 and 0.41 in the case of other honeys. Two quantitative measures that can be used to assess the naturalness of honey are electrical conductivity and the potassium to total cation ratio.



**Picture 3. .** HPLC chromatograms of the Cations Jara honey

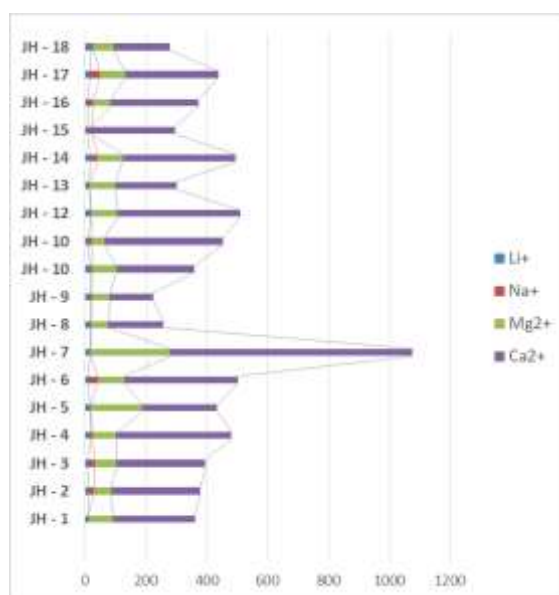
In the Jara Honey, there were identified microelements such as Li, Na, K, Mg, and Ca (picture 3), with concentrations ranging from 2613.5 to 5568.4 ppm. Analysis of the results is presented in

Diagram52. Based on the obtained results, it can be concluded that K is the dominant element, with its content ranging from 2174.86 to 5074.36 ppm.



**Diagram21.** Total potassium and ion content of jara honey

This mineral is the most quantitatively important in honey, accounting for around 89% of the total mineral content. The average potassium ion concentrations in the honey samples from Keda (3546.72 ppm) and Shuakhevi (3501.46 ppm) are similar. However, the concentration of potassium ions in the ridge samples varies significantly. For instance, in the first, second, third, and sixth samples, the concentration ranges from 2239.88 ppm to 2998.04 ppm, while in the fourth, fifth, and eighth honey, it ranges from 4702.58 ppm to 48603 ppm, with a difference of up to 36 ppm. In Shuakhevi honey samples, there is no significant variation in the indicators (3259.64 ppm to 3856.74 ppm). Similar to the ridge samples, the potassium content in Khulo honey varies. For instance, JH 16 (2356.68 ppm) and JH 18 (2395.72 ppm) have almost identical concentrations. However, compared to these samples, the potassium content is twice as high in the fourteenth sample of Khulo honey, reaching 5074.36 ppm.



**Diagram 22 .** The Cations - Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> - of Jara honey

The second most abundant mineral in all samples was Ca, ranging from 141.28 – 795.06 ppm. The average content of Mg and Na varied significantly among samples. The concentrations found in the samples ranged from 41.6 to 262.34 ppm for Mg and from 2.4 to 33.58 ppm for Na. The concentration of Li was the lowest (8.22 – 19.44 ppm). (Diagram22)

Two quantitative measures that can be used to assess the naturalness of honey are electrical conductivity and the potassium to total cation ratio.

### 7. Study of biological activity compounds in honey using the UPLC PDA-MS method

Phenolic compounds are an important marker of honey, because their qualitative and quantitative content in honey depends on many factors, including: botanical origin of honey, enzymatic activity of bees and surrounding world.

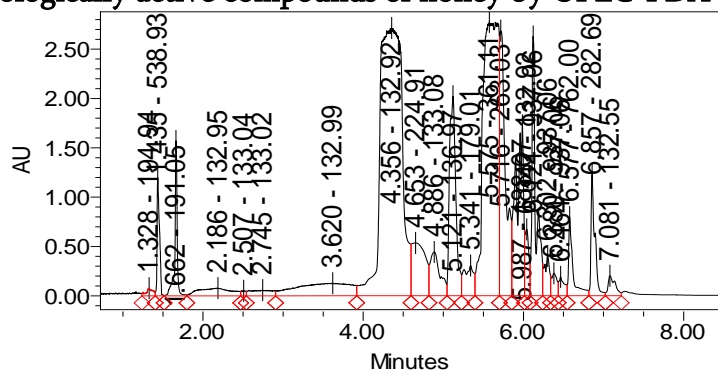
The analysis of phenolic compounds in honey has been more relevant in recent decades than in the past, because the effects of phenolic compounds on human health are closely related to the qualitative and quantitative content of these compounds in food. Therefore, identification and quantification are very important. The determination of these compounds in honey includes several stages of research, namely their extraction from honey and their subsequent quantitative determination using modern research methods.

For the chromatographic study of phenolic compounds in honey samples, at the initial stage, we prepared the sample by solid phase extraction (Scheme 1). We used Amberlite XAD-2 as a sorbent.

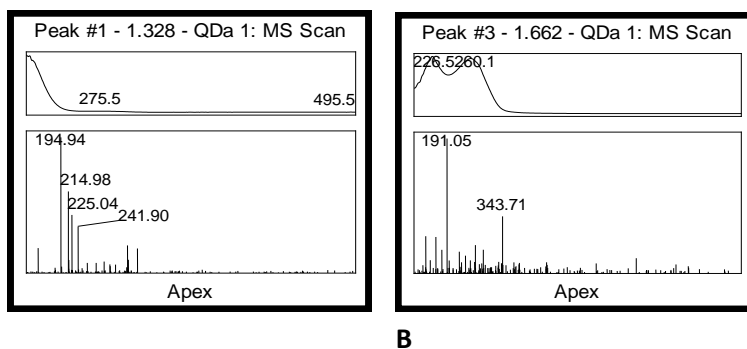
At the initial stage, we prepared a 10%-30% aqueous solution of honey (solvent - hydrochloric acid aqueous solution, pH=2). The concentration of the aqueous solution of honey depends on the type of honey, in particular, in the case of acacia honey, we obtained a 25-30% aqueous solution, in the case of chestnut, Linden and jara honey, a 10% aqueous solution. In the next step, the sample and the sorbent Amberlite XAD2 (30g) were mixed and introduced into the chromatographic column (column dimensions - height 35 cm, diameter 25 mm). Amberlite XAD-2 as a sorbent performs sorption of phenolic compounds. An important stage of sample preparation is washing, for the first time washing is carried out with 150-200 ml of hydrochloric acid aqueous solution (pH=2). At this stage, carbohydrates are removed. Then we continued washing with 100 ml of distilled water, checking the end of washing with a refractometer (zero point on the refractometer).

Phenolic compounds were eluted with 80% methanol (150-200 ml). We checked the completion of the elution by scanning the methanolic fractions in the ultraviolet and visible light. After completing this step, we concentrated the eluent in a vacuum oven at 40°C and recovered the obtained concentrate with 1-2 ml of 80% methanol (the amount of methanol recovery depends on the concentration of phenolic compounds in the eluent). At the end of sample preparation, we filtered the sample through a 0.45 micron filter. Individual compounds were identified by ultra-performance liquid chromatography using UPLC, photodiode array (PDA) and mass (MS) detectors.

#### Study of biologically active compounds of honey by UPLC-PDA-MS method



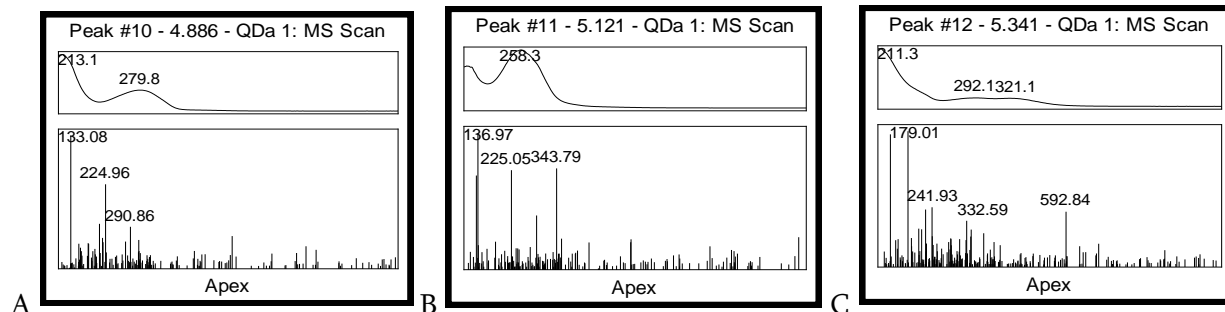
**Picture 4.** UPLC-PDA MS chromatogram of acacia honey (Scan 205-500 nm 100-700 daltons)



**Picture 5.A** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 194,94 (M-H<sup>-</sup>) **Picture B.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 191 (M-H<sup>-</sup>)

**Substance 1** -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 194,94, is recorded on the chromatogram of the retention time of 1.328 sc, and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 1 corresponds to - gluconic acid.(Picture 5.A).

**Substance 2** -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 191, is recorded on the chromatogram of the retention time of 1.662 sc, absorption maximum at UV- 225.5 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 2 corresponds to - Quinic acid.(Picture 5.B).



**Picture 6 A.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 133,08 (M-H<sup>-</sup>) **Picture 6B.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 136,97 (M-H<sup>-</sup>) **Picture 6C.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 179,01 (M-H<sup>-</sup>)

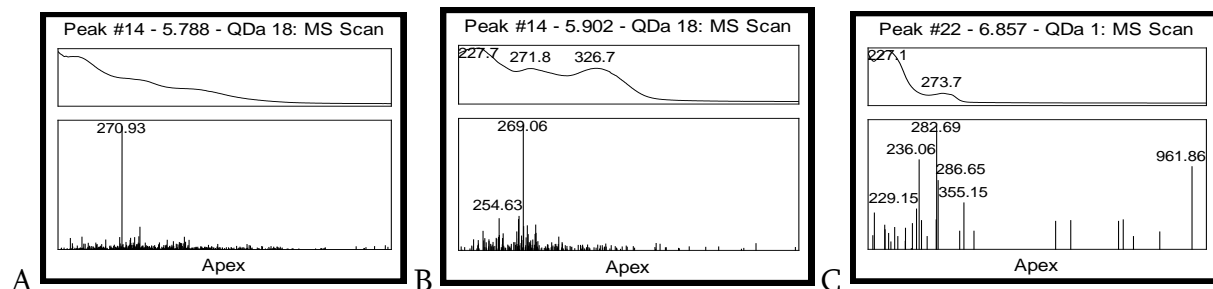
**Substance 3** -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 133.08, is recorded on the chromatogram of the retention time of 4.886 sc, absorption maximum at UV- 213.1 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 3- corresponds to - Malic acid(**Picture 6 A**)

**Substance 4** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 136.97, is recorded on the chromatogram of the retention time of 5,121 sc, absorption maximum at UV- 258,3 nm and mass of substance from

METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034)

Substance 4 - corresponds to - 4 hydroxybenzoic acid. ( **Picture 6B**)

**Substance 5** - [M-H - ] - m/z 179,01 is recorded on the chromatogram of the retention time of 5,341 sc, absorption maximum at UV- 211.3 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 5 corresponds to - caffeic acid. ( **Picture 6C**)

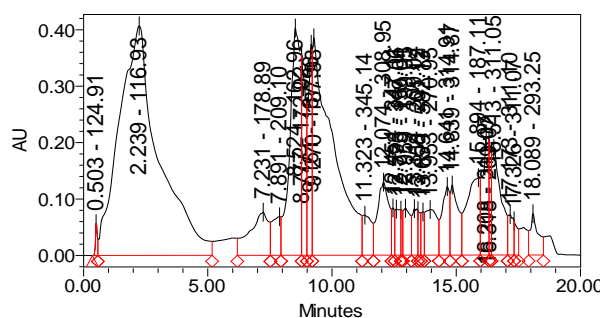


**Picture 7A.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 270,93 (M-H) **Picture 7C.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 269 (M-H) **Picture 7B.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 282,69 (M-H)

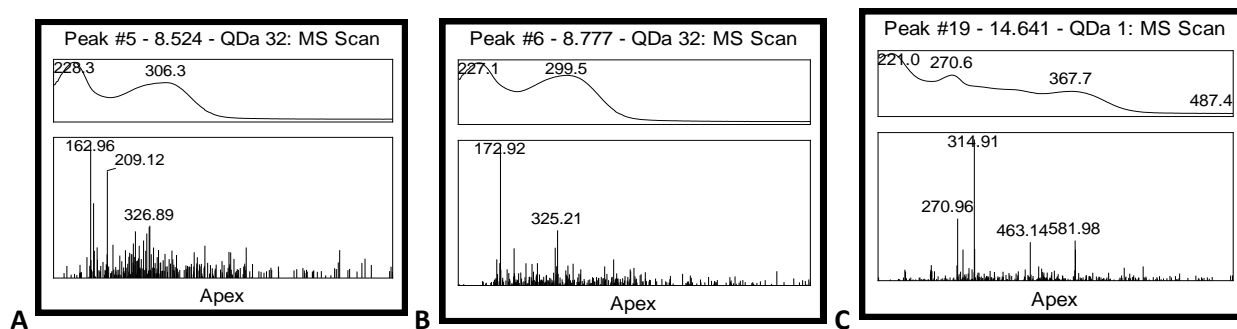
**Substance 6** - [M-H - ] - m/z 270,93, is recorded on the chromatogram of the retention time of 5,778 sc, absorption maximum at UV- 271.8 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 6 corresponds to - Pinobanksin. ( **Picture 7A**).

**Substance 7** - [M-H - ] - m/z 269, is recorded on the chromatogram of the retention time of 5,902 sc, absorption maximum at UV- 271.8 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 7 corresponds to - **Apigenin.** ( **Picture 7B**)

**Substance 8** - [M-H - ] - m/z 282.69, is recorded on the chromatogram of the retention time of 6.857 sc, absorption maximum at UV- 227.1 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 8 corresponds to - **Acacetin.** ( **Picture 7C**)



**Picture 8.** UPLC- PDA-MS chromatogram of acacia honey (scan205-500 nm 100-700 Dalton)

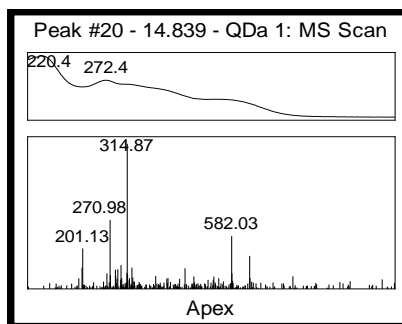


**Picture 9A.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 162,96 (M-H<sup>-</sup>). **Picture 9B.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 172,92 (M-H<sup>-</sup>) **Picture 9C.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 314,91 (M-H<sup>-</sup>)

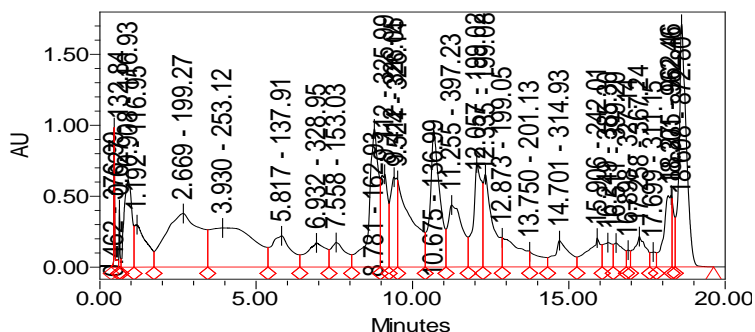
**Substance 9** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 162,96, is recorded on the chromatogram of the retention time of 8,524 sc, absorption maximum at UV- 228,3 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 9 corresponds to - **p-coumaric acid** (trans 4-Hydroxycinnamic acid). (Picture 9A)

**Substance 10** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 172,92, is recorded on the chromatogram of the retention time of 8,777 sc, absorption maximum at UV- 227,1 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 10 corresponds to - **Shikimic acid**.( Picture 9B)

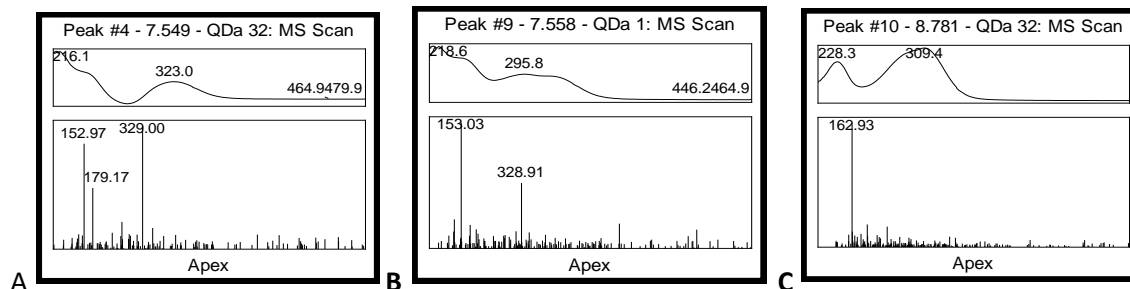
**Substance 11** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 314,91, is recorded on the chromatogram of the retention time of 14,641 sc, absorption maximum at UV- 270.6 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 11 corresponds to - **methoxy kaemperol**(Picture 9C)



**Picture 10.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 314,87 (M-H) Substance 12 - [M-H - ] - m/z 314.87, is recorded on the chromatogram of the retention time of 14.839 sc, absorption maximum at UV- 272.4 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 12 corresponds to - **Isoramnetin**



**Picture 11.** UPLC-PDA MS chromatogram of chestnut honey (scan 205-500 nm 100-700 Dalton)



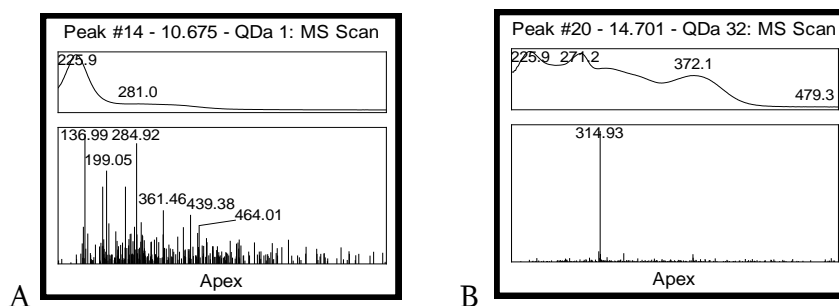
**Picture 12.A.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 329 (M-H). **Picture 12.B.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 153,03 (M-H). **Picture 12.C.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 162,93 (M-H)

**Substance 13** - [M-H - ] - m/z 329, is recorded on the chromatogram of the retention time of 7,549 sc, absorption maximum at UV- 216.1 nm. and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance -13 corresponds to - bis - methylated quercetin. (**Picture 12.A.**)

**Substance 14** -[M-H - ] - m/z 153,03, is recorded on the chromatogram of the retention time of 7.558 sc, absorption maximum at UV- 218.6 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 14 corresponds to - Gentisic acid (2,5 - dihydroxybenzoic acid).(**Picture 12.A.**)



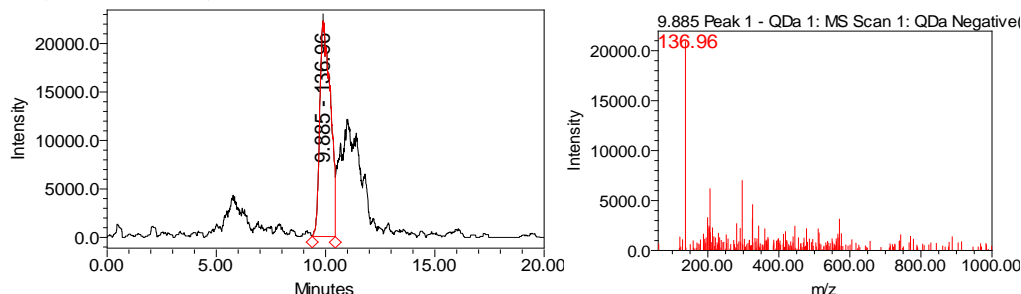
In chestnut honey, substance ESI m/z 162.93 (M-H<sup>-</sup>) was identified as **substance 9**-p-coumaric acid(**Picture 12.A.**)



**Picture 13.A.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 136,99 (M-H<sup>-</sup>). **Picture 13.B.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 314,93 (M-H<sup>-</sup>)

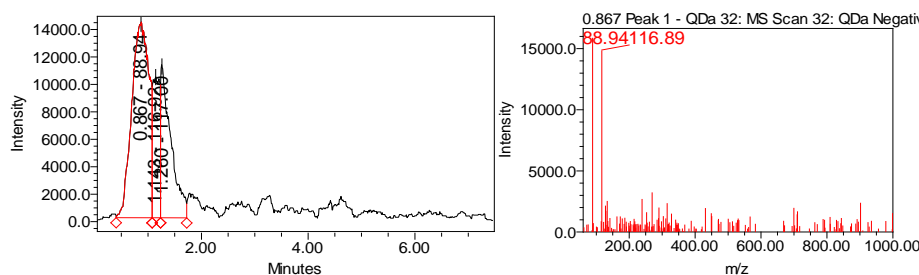
**Substance 15** -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 136.99, is recorded on the chromatogram of the retention time of 10.675 sc, absorption maximum at UV- 225.9 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 15 corresponds to - Salicylic acid (O hydroxybenzoic acid).(**Picture 13.A.**)

In chestnut honey, substance ESI m/z 314,93 (M-H<sup>-</sup>) was identified as **substance 12** – Isoramnetin.(**Picture 13.B.**)



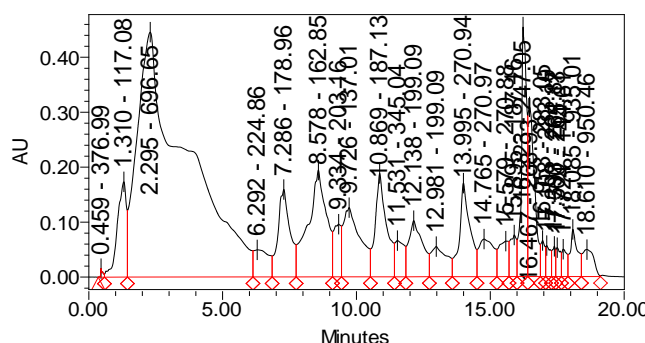
**Picture 14.** Substance 16 - UPLC-PDA-MS spectr m/z 136.96

**Substance- 16** -[M-H<sup>-</sup>] - m/z 136.96, is recorded on the chromatogram of the retention time of 9.885 sc. and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 16 corresponds to - Gentisaldehyde (2,5-Dihydroxybenzaldehyde)

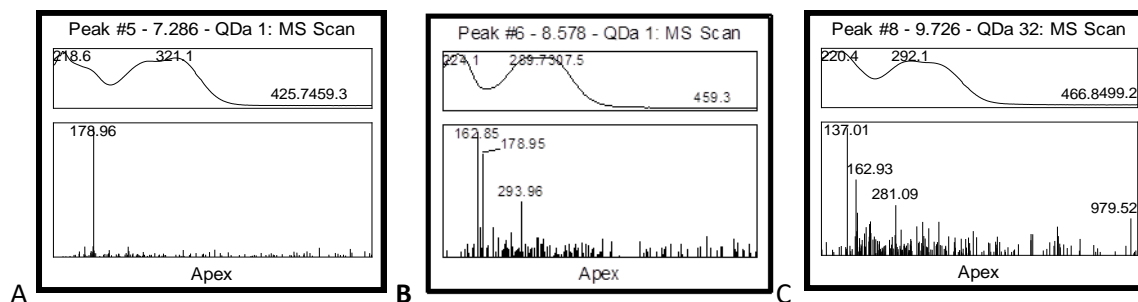


**Picture15.** UPLC- PDA -MS chromatogram of linden honey m/z 88,94 (M-H<sup>-</sup>)

Substance 17 - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 88,94, is recorded on the chromatogram of the retention time of 0,869 and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 17 corresponds to - Oxalic acid.



**Picture 16.** UPLC-PDA MS chromatogram of Linden honey(scan 100-700 Dalton)

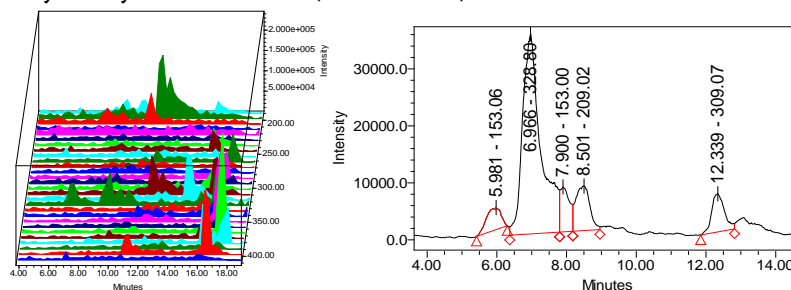


**Picture 17A.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 178,96 (M-H<sup>-</sup>). **Picture 17B.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 162,58 (M-H<sup>-</sup>). **Picture 17C.** UPLC- PDA-MS chromatogram of honey ESI m/z 137,01 (M-H<sup>-</sup>)

In chestnut honey, substance ESI m/z 178,96 (M-H<sup>-</sup>) was identified as **substance 5** – caffeic acid(Picture 17A.).

In chestnut honey, substance ESI m/z 162,58 (M-H<sup>-</sup>) was identified as **substance 9** – p-coumaric acid.( Picture 17B).

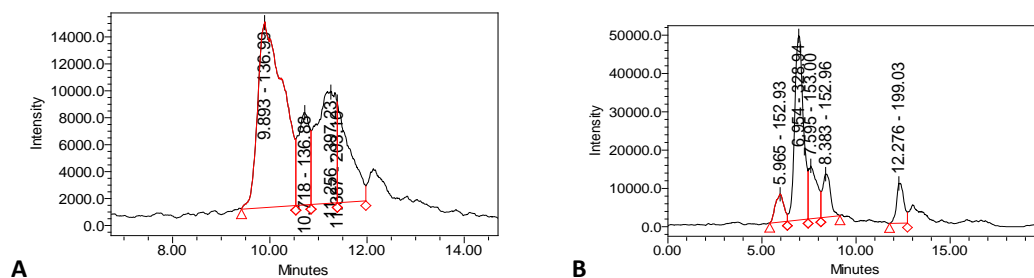
**Substance 18** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 137.01, is recorded on the chromatogram of the retention time of 9.726 sc, absorption maximum at UV- 220,4 nm and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 18 corresponds to - hydroxybenzoic acid.( Picture 17C).



**Picture 19.** UPLC-MS chromatogram of jara honey (scan 100-700 Dalton)  
UPLC-MSchromatogram of honey ESI m/z153,06 (M-H<sup>-</sup>), m/z328 (M-H<sup>-</sup>) and m/z153 (M-H<sup>-</sup>),

**Substance 19** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 153,06, is recorded on the chromatogram of the retention time of 5,981 and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 19 corresponds to 2,4 - dihydroxybenzoic acid (resorcylic acid). In jara honey, substance ESI m/z 328,8 (M-H<sup>-</sup>) was identified as substance 13 –

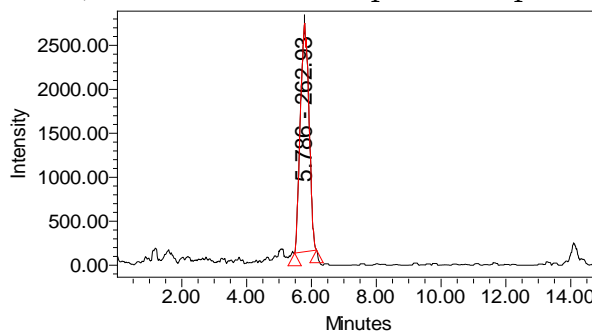
bis - methylated quercetin In jara honey, substance ESI m/z 153 (M-H<sup>-</sup>) was identified as substance 14 - Gentisic acid (2,5 - dihydroxybenzoic acid).



**Picture 20.A.** UPLC-MS chromatogram of honey ESI m/z 136,99 (M-H<sup>-</sup>) and m/z 136,88 (M-H<sup>-</sup>) **Picture 20.B.** UPLC-MS chromatogram of honey ESI m/z 153 (M-H<sup>-</sup>)

In jara honey, substance ESI m/z 136,99 (M-H<sup>-</sup>) was identified as substance 4 - 4 hydroxybenzoic acid. In jara honey, substance ESI m/z 136,88 (M-H<sup>-</sup>) was identified as substance 15 - Salicylic acid (O -hydroxybenzoic acid).

**Substance 20** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 153, is recorded on the chromatogram of the retention time of 7.595 and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 20 corresponds to - protocatechuic acid



**Picture 21.** UPLC-MS chromatogram of honey ESI m/z 262,93 (M-H<sup>-</sup>)

**Substance 21** - [M-H<sup>-</sup>] - m/z 262,93, is recorded on the chromatogram of the retention time of 5,786 and mass of substance from METLIN <https://metlin.scripps.edu> with free base and literary (DOI: 10.22616/rrd.25.2019.034) Substance 21 - corresponds to - Abscisic acid

**Biologically active compounds of honey by UPLC-PDA-MS method**

**Table 4**

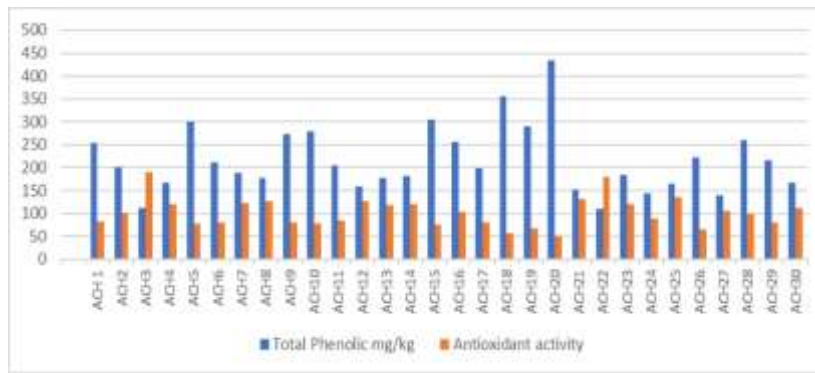
Biologically active compounds of honey by UPLC-PDA-MS method					
Nº	Substance	Acacia honey	Chestnut honey	Linden honey	Jara honey
Organic acid					
1	Malic acid	+	-	-	-
2	Gluconic acid	+	-	-	-
3	Oxalic acid	-	-	+	-
Phenolic acids					
4	Quinic acid	+	-	-	-
6	Abscisic acid	-	-	-	+
7	Caffeic acid	+	-	+	-

8	Protocatechuic acid	-	-	-	+
9	P-coumaric acid (trans 4-Hydroxycinnamic acid)	+	+	+	-
10	Shikimic acid	+	-	-	-
11	2,5 -Dihydroxybenzoic acid (Gentisic acid)	-	+	-	+
12	Salicylic acid (O hydroxybenzoic acid)	-	+	-	+
13	Hydroxybenzoic acid	-	-	+	-
14	2,4-Dihydroxybenzoic acid (Resorcylic acid)	-	-	-	+
	Flavonoids				
15	Pinobanksin	+	-	-	-
16	Apigenin	+	-	-	-
17	Acacetin.	+	-	-	-
18	Methoxy kaemperol	+	-	-	-
19	Isoramnetin	+	+	-	-
20	Bis – methylated quercetin	-	+	-	+
21	Gentisaldehyde	-	+	-	-

Among the biologically active compounds, 21 compounds were identified: 3 Organic acid (Malic acid, Gluconic acid, Oxalic acid), 7 Phenolic acids (Quinic acid, 4 hydroxybenzoic acid, Abscisic acid, Caffeic acid, Protocatechuic acid, P-coumaric acid, Shikimic acid , 2,5 5 - Dihydroxybenzoic acid (Gentisic acid), Salicylic acid , Hydroxybenzoic acid, 2,4 Dihydroxybenzoic acid), 7 Flavonoids (Pinobanksin, Apigenin, Acacetin, Methoxy kaemperol , Isoramnetin, Bis – methylated quercetin, Gentisaldehyde.

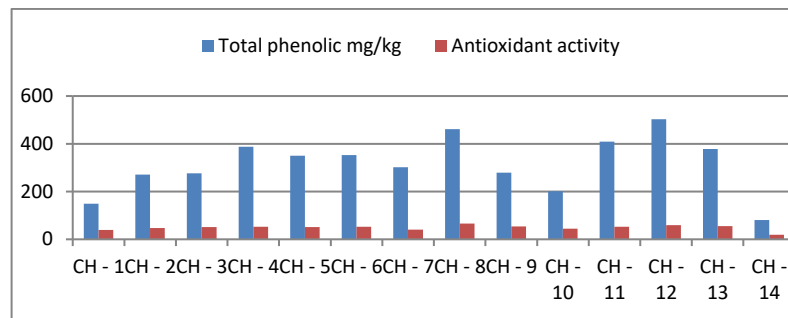
## 7. study of changes in total phenols, flavonoids, phenolic acids in honey and determination of antioxidant activity

Phenolic chemicals that are biologically active are found in acacia honey and are derived from the nectar of the flower or citron . The botanical and geographic origins of honey determine its amount of phenolic compounds and antioxidant activity. The results show that the total phenol content of acacia honey ranges from 109 to 433 mg/kg. The average value of the honey samples from Imereti is 216.64 mg/kg (112 - 279 mg/kg), whereas the samples from Guria are 256.04 mg/kg (158.64-433 mg/kg) and the samples from Adjara are 176.05 mg/kg (109-259 73 mg/kg). Samples from Guria have a comparatively high phenol content. Antioxidant activity is hence high. Because only 50.55 mg of this sample was required for 50% suppression of the DPPH radical in the case of 433 mg/kg of phenols and 126.5 mg of honey sample in the case of 158.64 mg/kg of phenols, high antioxidant activity is expressed in numerically tiny amounts.



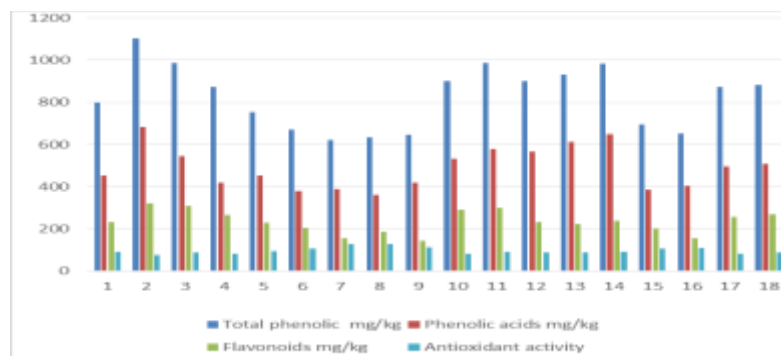
**Diagram 23.** Total phenolic and antioxidant activity in acacia honey

Besides the qualitative characteristics, the total number of phenolic compounds and their antioxidant activity were also studied in the samples. These data are slightly different in the region. The honey obtained in the Botanic Garden in Batumi (ChH 12) is distinguished by comparatively high phenolic compounds. Next, there is the harvest of 2016 in the Keda District (ChH 8). while the lowest content was fixed in the Lechkhumi region in 2017



**Diagram 24.** Total phenolic and antioxidant activity in chestnut honey

The total phenolic content and antioxidant activity of chestnut honey varies by region. In particular, the sample of the Batumi Botanical Garden, CH-12, has a high phenolic content of 503.5 mg/kg. It is followed by the ridge sample CH-8 - 461.5 mg/kg and the lowest content is recorded in the chestnut honey sample of Lechkhumi region CH-14 - 80.6 mg/kg.



**Diagram 25.** Total phenols, total phenolic acids, total flavonoids and antioxidant activity in jara honey

The total amount of phenols in the honey samples taken for analysis ranges from 622.34 to 1105.56 mg/kg: According to the phenol content, the samples from Keda (788.31 mg/kg) and Khulo (817.51 mg/kg) have similar phenol levels. However, in Keda honey, there is a noticeable difference between the samples. In particular, the phenol content, including JH 6-9, averages 643.73 mg/kg, with a relatively high content observed in the third sample (987.19 mg/kg) and the second sample (1105.56 mg/kg). A similar difference is observed in the samples of Khulo Jara honey. The average total phenols content in Shuakhevi honey is relatively high at 930.72 mg/kg. The phenolic acids content in the Jara honey samples ranged from 359.8 to 682.4 mg/kg and accounted for around 45 - 65 % of the total phenolic content. The amount of phenolic acids (according to the average indicator) is much higher in Shuakhevi samples, amounting to 573.40 units, while it is almost equal in Keda (455.25 mg/kg) and Khulo (488.42 mg/kg) samples, similar to the content of total phenols. Phenolic acids content was highest in honey samples: JH-2 (682.4 mg/kg), JH-13 (612.4 mg/kg), and JH-14 (648 mg/kg), whereas samples JH1 had the lowest content (453,3 mg/kg). The total content of flavonoids in Jara honey samples was 75.1 – 321.9 mg / kg, JH 2 (321.9 mg/kg), JH 3 (307.9 mg/kg), relatively less in JH - 6 (107.15 mg/kg), JH - 9 (111.58 mg/kg), JH - 15 (104.3 mg/kg) and Honey 16 (109.24 mg/kg), in other samples the content is almost equal.

Among Jara's honey samples, those with a total phenol content of 801.61 to 1105.56 mg/kg have a relatively high antioxidant activity, so less of the honey mass is required to inhibit 50% of the radical, namely 75.1 to 90, 68 mg, While 622.34 - 752.95 mg/kg of total phenols are inhibited by 94.75 - 128.08 mg of honey. In the presented samples the relatively high activity (75.1 mg, 50% inhibition of honey 0.1 mm DPPH) stands out among the honey grown in Keda municipality - JH-2, which contains a large amount of total phenols (1105.56 mg/kg), total phenolic acids (682.4 mg/kg), and total flavonoids (321.4 mg/kg)

By comparing the obtained results, it can be concluded that the content of phenolic compounds is higher in jara honey and, accordingly, the antioxidant activity.

## **8.Study of andromedotoxin in West Georgia honey by UPLC-MS method**

Customers frequently believe that a "natural product" is safe. However, the toxin is harmful to human health and is present in food. One of the most widely used natural sweeteners in the world, honey is becoming more and more popular every year. Nonetheless, issues about the safety of honey are frequent. It happens when bees gather nectar from plants that are toxic (including *Tripterygium wilfordii* Hook F., *Agarista*, *Kalmia*, *Coriaria arborera*, and *Rhododendron* sp.). Such honey is rich in pyrrolizidine alkaloids, triptolides, grayanotoxins, and tutin. Toxic honey consumption has the potential to be extremely intoxicating and, in rare circumstances, deadly.

In mountainous Adjara, the alpine and subalpine forest zone is distinguished by the diversity of honey plants, therefore, most of the honey harvested in this area is polyfloral and rich in its chemical composition. It is also worth noting that the flowering of honey plants in the highlands of Adjara is preceded by the flowering of *Rhododendron*, which contains a toxin, in cold and late spring conditions. Accordingly, there is a high probability that bees collect *Rhododendron* nectar and the toxin gets into the honey.

Yale - *Rhododendron luteum*, this species of *Rhododendron* is associated with the extraction of "poisonous" ("Makzenara", "Matrobela") honey in the highlands of Adjara. The honey turns poisonous after obtaining a significant amount of nectar from the hive. The majority of toxic honey is reddish brown and tastes harsh. Additionally referred to as andromethotoxin, acetylandromedol, and rhodotoxin, is grayanotoxin. It is a diterpenoid molecule that is quite poisonous. There have been 25 isomeric variants of grayanotoxin registered thus far. The most prevalent toxins in honey are grayanotoxin I, II, and III.

Approximately 5 g of honey sample was extracted with 30 mL methanol in flask attached to a condenser at 60°C in 6 h. The remaining extract was evaporated until dry using a rotary evaporator (INGOS RVO 400) at 40°C. The residues were dissolved in 10 mL distilled water and transferred to a C18 solid phase extraction (SPE) cartridge (Waters Sep-Pak, Vac 6cc, C18 – 500mg) which was initially conditioned with 5 mL methanol followed by 5 mL water. Using 5 milliliters of methanol, the toxin was extracted from the C18 SPE. At 40°C and low pressure, the eluted methanolic fraction was concentrated until it was completely dry in a vacuum evaporator. Weighing the dry bulk, we dissolved it in methanol.

Ultra high Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Waters, UPLC Acquity, QDa Detectore) was used for the identification of grayanotoxin-III. The analytical column was a Acquity UPLC BEN C18. GTX-III was eluted using a mobile phase consisting 50:50 water/methanol solution containing 1% acetic acid at flow rate of 0.3 mL/min in 8 min.

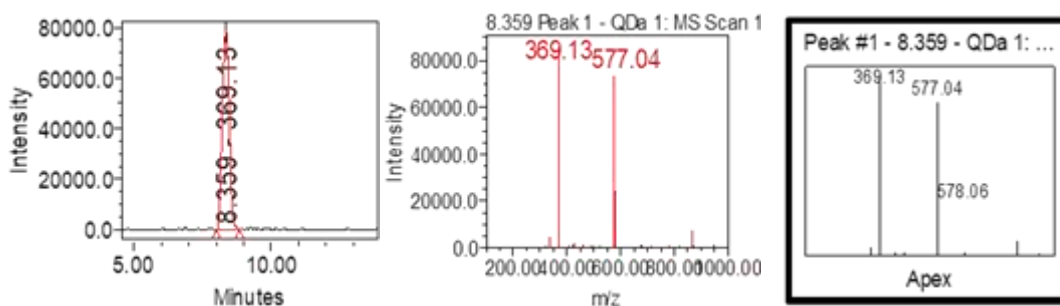
Twelve samples of autumn polyfloral honey, 'Matrobela' honey, and rhododendron flower extract were compared. In the Adjara highlands, samples of honey were collected at various elevations ranging from 450 meters to 2040 meters above sea level.

Samples of autumn polyfloral honey were collected for examination

**Table 5**

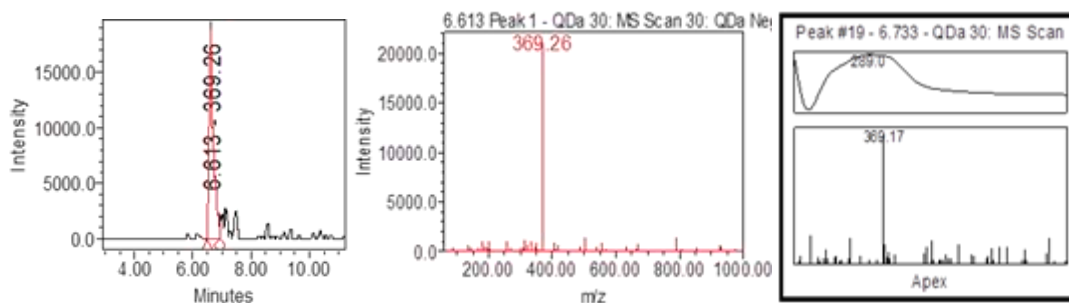
Sample	N	Harvest Date	Mean sea level (MSL)
Autumn polyfloral honey 1	AH - 1	2019	450
Autumn polyfloral honey 2	AH - 2	2019	600
Autumn polyfloral honey 3	AH - 3	2019	780
Autumn polyfloral honey 4	AH - 4	2019	1566
Autumn polyfloral honey 5	AH - 5	2019	720
Autumn polyfloral honey 6	AH - 6	2019	760
Autumn polyfloral honey 7	AH - 7	2019	1400
Autumn polyfloral honey 8	AH - 8	2019	1600
Autumn polyfloral honey 9	AH - 9	2019	923
Autumn polyfloral honey 10	AH - 10	2019	1000
Autumn polyfloral honey 11	AH - 11	2019	1750
Autumn polyfloral honey 12	AH - 12	2019	2040

A substance 1 (Pic. 34) is retention time 7.749 min, m/z 369 [M-H]<sup>+</sup>, λ max 289 nm; according to the obtained results and compounds mass database METLIN (<https://metlin.scripps.edu>) the substance 1 is grayanotoxin-III. - C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub> Negative FABMS: m/z= 369.26 [M-H]<sup>+</sup>, Molecular Weight: 370 g/mol.

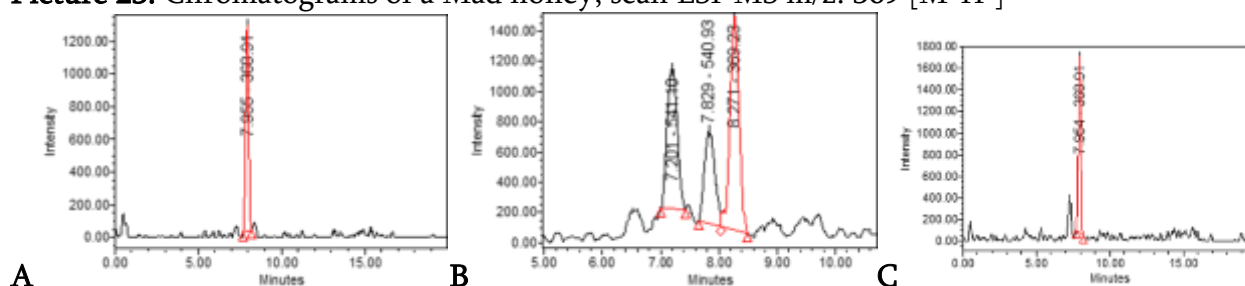


**Picture 22.** Chromatograms of a Flower of Rhododendron, scan ESI-MS m/z: 369 [M-H]<sup>+</sup>

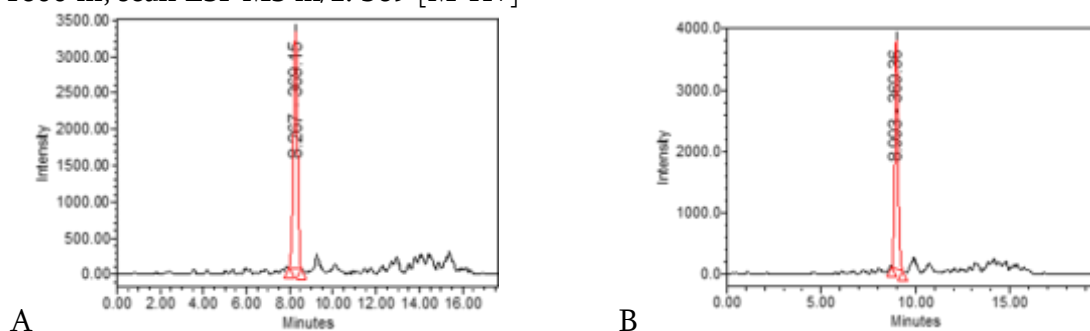




**Picture 23.** Chromatograms of a Mad honey, scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>+</sup>]



**Picture 24.A.** (AH 4) Chromatograms of Honey produced in autumn; MSL – 1566 m; scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>+</sup>]. **B.** (AH 7) Chromatograms of Honey produced in autumn; MSL – 1400 m; scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>+</sup>]. **C.** (AH 8) Chromatograms of Honey produced in autumn; MSL – 1600 m; scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>+</sup>]



**Picture 25.A.** (AH 11) Chromatograms of Honey produced in autumn; MSL – 1750 m; scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>+</sup>]. **B.** (AH 12) Chromatograms of Honey produced in autumn; MSL – 2040 m; scan ESI-MS m/z: 369 [M-H<sup>+</sup>]

### The grayanotoxin-III content of autumn honey

**Table 6**

Samples	Grayanotoxin-III mg/kg
Mad honey	500±15
AH – 4	4.2±0.126
AH – 7	6.3±0.189
AH – 8	8.4±0.252
AH – 11	17.0±0.51
AH – 12	24.0±0.72

Among the 12 samples of honey taken for analysis, the toxin was identified in 5 samples of honey - AH-4, AH-7, AH-8, AH-11 and AH-12. In particular, in samples taken at 1566, 1400, 1600, 1750 and 2040 meters above sea level. The toxin content in honey increases with increasing height (4.2 – 24.0 mg/kg).

## **9. Research on heavy metals and antibiotics using the UPLC PDA-MS method**

In medicine, honey is used as a preventive and therapeutic measure for a variety of ailments, including stomach ulcers, skin ulcers, angina, and cough. However, it can include excessive amounts of heavy metals and antibiotics, which makes this crucial commodity extremely hazardous. Twenty samples of chestnuts, ten Lindens, ten acacias, ten polyflora (field), and ten samples of Jara honey (obtained in semi-wild settings) were among the fifty samples of honey of various botanical origins that were smoked in Western Georgia (Adjara, Guria, Samegrelo, and Imereti) and collected for examination. For analysis, we dissolved three grams of honey samples in the buffer. For the elution and concentration of antibiotics, we utilized Waters Sep-Pak C18 (500 mg); before to analysis, all samples were filtered using a Waters Acrodisc LC PVDF Filter 13mm 0.45µm filter. Antibiotic research relies on chromatographic techniques that employ UV and mass detectors to identify even minute quantities (0.1 ppb) .

A study of antibiotics was conducted HPLC , in the C18 analytical and preparatory column C18. The solution A: Acetonitrile, The solution B: Water-pH (8.5) (B) adjusted with 0.01% ammonia, the gradient (0-7 min- 20%-from 0%B, 8 min 0% B, 10-12 min 20% B, 14-20% B). UPLC-MS the analysis BEN C18, 1.7 µm, BENAmide 1.7 µm, column. Flow 0,4 ml/min, column temp 50 °C, MS- scan 200-1200 da, Probe 600 °C, Positive (Negative) 0,8 kV, Capilari 1,5 kV, CV -15. The DAD detector monitoring (220-400 nm), the sample injection volume was 10 µl. The sample was analysed by HPLC equipped with UV detector using a Bridje C<sub>18</sub> 5 µm (150 x 4.6 mm I.D.) column in gradient conditions in gradient conditions given below, with mobile phase - Acetonitrile (A) and Water-pH (8.5) (B) adjusted with 0.01% ammonia. The gradient (0-14 min- 20%-from 0%B, 16 min 0% B, 20-24 min 20% B, 25-80% B). Flow (1 ml/ min).

Beekeepers in Georgia mainly use 12 antibiotics, they are: Metronidazole (Retention Time-6,759), Ronidazole (RT-8,228), Erythromycin (RT-8.868), Nitrofurantoin (RT-11,712), Lincomycin (RT-12.185). By the UPLC-MS Method Identified : Oxytetracycline (m/z-459.14, m/z+461,14), Tetracycline (m/z-443.15, m/z+445.16), streptomycin (m/z-580.25, m/z+582.27), sulfadimethoxine (m/z- 309.06, m/z+311.08), chloramphenicol (m/z- 321.00, m/z+323.01), Metronidazole (m/z-170.05, m/z+ 172.07), Ronidazole (m/z- 199.04, m/z+201.06), Erythromycin (m/z-732.45, m/z+ 734.47), Nitrofurantoin (m/z-112.00, m/z+114.01), Lincomycin (m/z- 405.21, m/z+407.22), Tilozina (m/z-914.51, m/z+916.52), Rimfampicinium (m/z- 821.39, m/z+823.41). M/Z characteristics of honey antibiotics and the number of honey samples (in %) in which the quantitative content of antibiotics above 1.5 mg/kg was recorded.

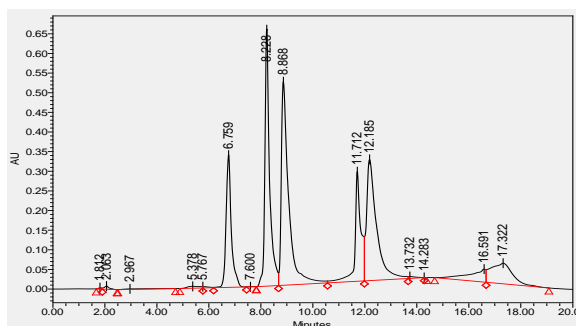
**Table 7**

Antibiotics	µg/kg	Jara honey	Chestnut honey	Linden honey	Acacia honey	Field honey	MS-	MS+
Oxytetracycline	5.0±0.15	n.n.*	20	30	30	20	459.14	461,14
Tetracycline	5.0±0.15	n.n.	30	20	40	20	443.15	445.16
streptomycin	5.0±0.15	n.n.	30	30	50	20	580.25	582.27
sulfadimethoxine	5.0±0.15	n.n.	20	20	30	10	309.06	311.08
chloramphenicol	5.0±0.15	n.n.	10	10	30	10	321.00	323.01
Metronidazole	5.0±0.15	n.n.	30	30	40	20	170.05	172.07
Ronidazole	5.0±0.15	n.n.	30	30	40	20	199.04	201.06
Erythromycin	5.0±0.15	n.n.	20	20	30	10		734.47
Nitrofurantoin	5.0±0.15	n.n.	20	20	20	10	112.00	114.01
Lincomycin	5.0±0.15	n.n.	30	30	50	20	405.21	407.22
Tilozina	5.0±0.15	n.n.	20	20	30	10	914.51	916.52
Rimfampicinium	5.0±0.15	n.n.	10	40	50	10	821.39	823.41

n.n.\* = not found= The limit of quantification was 2 ppb (µg/kg)

As a result of the analysis detected oxytetracycline in 20% of chestnut honey samples, 30% of Linden, 30% of acacia, and 20% of field honey. Tetracycline is more than allowed in 30% of chestnut, 20% of Linden, 40% of acacia, and 20% of field. Streptomycin - in 30% of the chestnut sample, 30% of the linden, 50% of the acacia, and 20% of the field. Sulfadimethoxine in 20% of the chestnut sample, 20% of Linden, 30% of acacia, and 10% of the field. Chloramphenicol - in 10% of the chestnut sample, 10% of the Linden, 30% of the acacia, and 10% of the field. Metronidazole in 30% of the chestnut sample, 30% of Linden, 40% of acacia, and 20% of field

honey. Ronidazole was distributed similarly to metronidazole - in 20% of chestnut honey, 20% of Linden honey, 30% of acacia honey, and 10% of field honey. Nitrofurantoin occurs in 20% of chestnut honey, 20% of Linden honey, 20% of acacia honey, and 10% of field honey. Lysozym - in 30% of chestnut honey, 30% of Linden honey, 50% of acacia honey, and 20% of field honey. Tylosin in 20% chestnut honey, 20% Linden honey, 30% acacia honey, and 10% field honey. Rifampicin in 20% of chestnut honey, 40% of Linden honey, 50% of acacia honey, and 10% of field honey (Table 7). Jara honey is noteworthy, which is obtained far from the inhabited area and the bees collect it in a cone built from the wax produced by it. Human intervention is practically excluded here (only Jara is prepared by man) in the process of honey production.



**Picture 41.** HPLC-UV detector-320 nm, Chromatogram of standart antibiotics (Metronidazole, Ronidazole, Erytromycin, Nitrofurantoin, Lincomycinu)

Antibiotics are naturally present in honey samples in excess because of improper dosages. The study's findings showed that the high quantity of acacia and Linden in spring honey was caused by the regular use of antibiotics, as large amounts of antibiotics and other medications are administered during this season to maintain bee health. Additionally, the pine that was previously utilized in the hive but whose antibiotic content was not examined is used once more in the spring. All honey samples were examined for heavy metals, irrespective of where they came from. None of the samples had any detectable amounts of arsenic. All samples have cd contents between 0.26 and 0.29 mg/kg; only Jara honey has cd concentration between 0.15 and 0.29 mg/kg. While the level of Co in Jara honey is significantly lower (0.17 mg/kg), it ranges from 0.28 to 0.31.

Content of heavy metals in honey samples mg/kg

**Table 8**

Sample	Cd mg/kg	Co mg/kg	Cr mg/kg	Hg mg/kg	As mg/kg	Pb mg/kg	Zn mg/kg
Max. limit	2.0	1.0	1.0	0.01	0.2	1.0	20,0

Jara honey	0.03±0.01	0.17±0.01	0.24±0.05	n.n.*	n.n.	n.n.	0.7±0.01
Chestnut honey	0.28±0.02	0.31±0.02	0.53±0.05	n.n.	n.n.	0.14±0.001	4.57±0.1
Linden honey	0.26±0.01	0.32±0.02	0.535±0.05	n.n.	n.n.	0.16±0.002	10.3±0.2
Acacia hooney	0.295±0.03	0.27±0.01	0.54±0.05	n.n.	n.n.	0.07±0.001	6.40±0.1
Field honey	0.27±0.01	0.30±0.02	0.875±0.07	n.n.	n.n.	0.16±0.002	4.23±0.1

n.n.\* = not found= The limit of quantification was 1 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Although the utensils used during manufacturing are frequently linked to the level of Cr and Zn in honey, the content of these elements in the samples we examined did not approach the critical limit (0.53-0.87 mg/kg and 4.23-10.3 mg/kg, respectively). There is also very little copper present—between 0.3 and 1.06 mg/kg. The examined honey had a comparatively high iron content, ranging from 9.65 mg/kg to 12.7 mg/kg. The low lead concentration of 0.07 to 0.16 mg/kg is significant. The levels of As and Hg in every sample we looked at were below the LOQ.

Jara honey stands out in particular since its lead concentration is below the detection limit. When compared to other honeys, the concentration of other heavy metals is noticeably lower. Jara honey is typically gathered in a hilly area that is quite clean environmentally, minimizing plant pollution and, thus, the pollution of the nectar and honey extracted from it (Table 8). The primary determinant of heavy metal concentration in honey is environmental conditions rather than the plant's place of origin. Using HPLC and UPLC-MS techniques, 12 antibiotics were found in 50 samples of honey produced in Western Georgia, originating from various plants and localities. Field and chestnut honey samples were scarce, whereas samples from acacia and Linden trees showed an average degree of contamination and a qualitative diversity of antibiotics. Antibiotics are absent from jara honey that is semi-wild. Iron is the most prevalent heavy metal in the honey samples, but Cd, Co, Cr, Cu, Zn, and Pb are comparatively less prevalent and fall within the usual range. Because of its unusual origin, jara honey also has a minimal heavy metal level.

## Conclusion

1. Physico-chemical characteristics of acacia, chestnut and jara honey collected in 3 regions of Western Georgia (Imereti, Guria, Adjara) were studied. At the Initially stage, a database of

microscopic characteristics of the pollen of flowers of plants distributed in the region was created, on the basis of which it was confirmed that based on the microscopic analysis of pollen, the botanical origin of honey was confirmed and acacia honey was selected for analysis, where the amount of pseudo acacia pollen was more than 45%. Chestnut honey had 75% to 94% chestnut pollen. Jara honey was identified as polyfloral honey.

2. After verifying the botanical origin of the honey samples, the characteristics stipulated by the European regulation were determined in the acacia, chestnut and jara honey samples and the passportization process was.

3. Samples with less than 20% water content, provided by the standard, were taken for research. of these, Jara honey samples have the lowest rate (17.13%), followed by acacia honey (18.77%) and chestnut honey (19.40%) (diagram 11). These rates are within the established norm and the International Honey Commission standard. Honey's stability and resistance to enzymatic reactions are guaranteed by its low water content.

4. By comparing the average rates of the obtained results, free acidity is relatively low in Acacia honey at 17.96 units, increases in jara honey to 25.2 units, and is relatively high in chestnut samples at 30.65 units. In the honey sample, the pH corresponds to the standard (pH 3.40–6.10), Average values of electrical conductivity in the samples of jara and chestnut honey are almost similar, 1.2441 and 1.43  $\mu\text{s}/\text{sm}$ , respectively, but it is much smaller in acacia honey - 0.2293, which is one of the important distinguishing markers in relation to other honeys.

5. Proline level in the Jara and acacia honey samples is 1063.22 mg/kg and 1078.04 mg/kg, respectively, whereas the proline amount in the chestnut honey is 1277.21 mg/kg

6. In the honey samples taken for analysis, the diastase activity is notably higher than 8 units (with the shade scale). Specifically, for acacia honey, it ranges from 8 to 30 units (with an average rate of 11.91 units with the shade scale), while for chestnut and jara honey, it ranges from 8 to 27 units (with average rate of 16.42 and 16.44, respectively). the average rate of protein content in acacia honey is 0.3%, in samples of chestnut honey it is 0.37%, and in samples of Jara honey it is 0.56%.

7. Carbohydrates were isolated and identified in honey samples by the method: fructose, glucose, sucrose and maltose. Fructose is the dominant carbohydrate among them According to

fructose/glucose (F/G) and glucose/water (G/W) ratios, unlike acacia honey, chestnut and jara honey do not belong to easily crystallized honeys.

8. The cation analysis was done on jara honey, polyfloral honey, acacia, Linden, and Linden-chestnut samples. The ions found in the samples collected for analysis were calcium, magnesium, sodium, ammonium, and potassium. Compared to Linden (2530.72–3097.94 mg/kg), acacia (2497.46–3787.84 mg/kg), spring polyfloral (3296.14–4089.98 mg/kg), and autumn polyfloral (4287.46–5635.48 mg/kg) chestnut honey has a comparatively greater ion concentration. The amount of the potassium ion, which is the predominant cation in all of the samples collected for examination, varies according to the honey's place of origin. Samples of chestnut honey can be identified by their high potassium content.

9. Among the biologically active compounds, 21 compounds were identified: 3 organic acids: Malic acid, Gluconic acid, Oxalic acid,

7 Phenolic acids: Quinic acid, 4 Hydroxybenzoic acid, Abscisic acid, Caffeic acid, Protocatechuic acid, P-coumaric acid (trans 4-Hydroxycinnamic acid), Shikimic acid, 2,5 - Dihydroxybenzoic acid (Gentisic acid), Salicylic acid (O hydroxybenzoic acid), Hydroxybenzoic acid, 2,4 - Dihydroxybenzoic acid (Resorcylic acid).

7 flavonoids: Pinobanksin, Apigenin, Acacetin, Methoxy kaemperol, Isoramnetin, Bis methylated quercetin. Gentisaldehyde.

10. The results show that the total phenol content of acacia honey ranges from 109 to 433 mg/kg. In Chestnut honey – from 80-503 mg/kg, in jaraa honey from 622.34 to 1105.56 mg/kg. The total content of flavonoids in Jara honey samples was 151 mg/kg. and accounted for around 45 - 65 % of the total phenolic content. By comparing the obtained results, it can be concluded that the content of phenolic compounds is higher in jara honey and, accordingly, the antioxidant activity.

11. Among the 12 samples of honey taken for analysis, the toxin was identified in 5 samples of honey - AH-4, AH-7, AH-8, AH-11 and AH-12. In particular, in samples taken at 1566, 1400, 1600, 1750 and 2040 meters above sea level. The toxin content in honey increases with increasing height (4.2 – 24.0 mg/kg).

12. 12 antibiotics were detected by HPLC and UPLC-MS methods in 50 samples of honey produced in Western Georgia of different plant and local origin. Acacia and Linden honey samples were characterized by a qualitative diversity of antibiotics and an average level of contamination, while field and chestnut honey samples were relatively less. Semi-wild jara honey does not contain antibiotics.

13. Iron is the most prevalent heavy metal in the honey samples, but Cd, Co, Cr, Cu, Zn, and Pb are comparatively less prevalent and fall within the usual range. Because of its unusual origin, jara honey also has a minimal heavy metal level.

**Published scientific works:**

**Article:**

2. Abashidze, N., Japaridze, I., Vanidze, M., Baazovi, Z., & Peshkova, T. (2021). "Study of honey Andromedotoxin in Western Georgia by UPLC-MS". *Annals of Agrarian Science* 19(2):111-119
2. Abashidze, N., Japaridze, I., Chikovani, D., Kalandia, A., & Vanidze, M. (2020). "Antibiotics and heavy metals in Georgian honey". *Annals of Agrarian Science* V.3 P.404-408
3. Abashidze N., Vanidze M., Djaparidze I., Kalandia A. (2018). "PHENOL COMPOUNDS AS THE MARCERS OF BOTANICAL ORIGINS OF HONEY". &quot; PRESS-BOOK.RU& quot;, <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35380890>
4. Abashidze, N., Vanidze, M., Kharadze, M., Djaparidze, I., & Kalandia, A. (2018). "West Georgian honey cations". *OPEN JOURNAL SYSTEMS*. DOI:<http://dx.doi.org/10.12955/cbup.v6.1283>
5. Abashidze, N., Djaparidze, I., Vanidze, M., & Kalandia, A. (2018). "Antioxidant activity of chestnut honey produced in Western Georgia". *Bull. Georg. Natl. Acad. Sci*, 12(2).

**Monograph:**

6. M Vanidze, M Kharadze, I Djafaridze, A Kalandia N. Abashidze (2022) "West Georgia Honey Passports" BSU DOI: <https://doi.org/10.52340/sp.2022.02.01>

**Conference:**



1. Nona Abashidze, Indira Jafaridze, Maia Vanidze, Aleko Kalandia (2023) “The study of the physical-chemical characteristics of field honey, common in Western Georgia “The European Biotechnology Congress (Abstract: 117) page 43 DOI: 10.2478/ebtj-2023-0019
2. Nona Abashidze, Indira Jafaridze, Maia Vanidze, Aleko Kalandia (2022.)” Determination of biologically active compounds of honey common in Western Georgia” ACS 3rd International Symposium. Georgian Technical University. Pp7.
3. Abashidze, N., Vanidze, M., Kharadze, M., Djaparidze, I., & Kalandia, A. (2018, September). West Georgian honey cations. In CBU International Conference Proceedings (Vol. 6, pp. 990-994). DOI: <http://dx.doi.org/10.12955/cbup.v6.1283>