ISBN 978-9941-0-1543-4

ვანიძე მაია კალანდია ალეკო

საქართველოში ინტროდუცირებული სტევიას (*Stevia rebaudiana Bertoni*) ტერპენოიდები და ფენოლური ნაერთები და მათი გამოყენება კვების მრეწველობაში

ბ ა თ უ მ ი

2 0 0 9

შ ი ნ ა ა რ ს ი

	გვ.
შესავალი	5
1. ტერპენოიდები, მათი ბიოსინთეზი	7
2. სიტკბო და მისი აღქმა	16
3. სტევიას (*Stevia rebaudiana Bertoni*) ბიოლოგიური დახასიათება	23
4. ტერპენოიდების კვლევის მეთოდები	32
5. ფენოლური ნაერთების კვლევის მეთოდები	34
6. ტკბილი დიტერპენური ნაერთები	41
7. ტკბილი დიტერპენური ნაერთების შემცველობა მცენარის სხვადასხვა ნაწილში და მათი ცვალებადობა ვეგეტაციის დროს	49
8. სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური ნაერთების ჯამური პრეპარატის მიღება	52
9. ტკბილი დიტერპენული ნაერთების განსაზღვრის ექსპრეს მეთოდი	63
10. სტევიას ფოთლის ფენოლკარბონმჟავები	66
11. სტევიას ნახშირწყლები	69
12. სტევიას ვიტამინები და მინერალური ნივთიერებანი	71
13. სტევიას და მისგან მიღებული პროდუქტების აქროლადი კომპლექსი	74
14. სტევიას კომპლექსური გადამუშავება.	80
დასკვნა	88
გამოყენებული ლიტერატურა	90

დასავლეთ საქართველოს აგროსამრეწველო სექტორის მყარი სანედლეულო ბაზის უზრუნველსაყოფად აუცილებელია ადგილობრივი ნიადაგობრივ-კლიმატური პირობებისადმი მისადაგებული ტრადიციული და არატრადიციული სასოფლო-სამეურნეო კულტურების გამოვლენა და გავრცელება. მათი ჩანაცვლება უმეტესწილად ამორტიზირებულ არარენტაბელურ პლანტაციებში, რომლებზეც დღეისათვის გაშენებულია ერთწლიანი და მრავალწლიანი სუბტროპიკული კულტურები და სხვა მცენარეები.

ამ მხრივ ერთ-ერთ მნიშვნელოვან რენტაბელურ და პერსპექტიულ კულტურად უნდა ჩაითვალოს სტევია *(Stevia rebaudiana bertoni)* ეს კულტურა საქართველოსათვის არატრადიციულია. მისი ინტროდუცირება მე-20 საუკუნის 80-იან წლებში მოხდა. პირველი ნერგები ქ. სოხუმში (ჩაის, სუბტროპიკულ კულტურათა და ჩაის მრეწველობის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტის ფილიალი-ვალერიან გვასალია) შემოიტანეს უკრაინიდან შაქრის ჭარხლის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტიდან (ქ. კიევი). შემდგომ მცენარე გავრცელდა დაბა ჩაქვში (იმავე ინსტიტუტის ფილიალი), დაბა ანასეულში (სათაო ინსტიტუტი), ბათუმის ბოტანიკურ ბაღში და სხვა. პირველი პლანტაცია გაშენდა ლანჩხუთის რაიონის სოფელ ღრმაღელეში (კარლო სარჯველაძე). ფართო სამეცნიერო სამუშაოები გაიმართა მცენარის ინტროდუცირების, მოვლა-მოყვანის, გადამუშავების და სხვა ტექნოლოგიების შესამუშავებლად. სამუშაოებს კოორდინირებას უწევდნენ ე.მ.დ ვახტანგ ჯაყელი, ს/მმ.დ., საქართველოს სოფლის მეურნეობის მეცნიერებათა აკადემიის წევრი ვალერიან ცანავა, ბ.მ.კ. ნატალია ცანავა. პირველი კვლევები ჩაატარეს ს/მმ.დ. ზაურ გაბრიჩიძემ, ტ.მ.კ. გივი სარჯველაძემ, ს/მ.მ.კ.-ებმა ვახტანგ კუტუბიძემ, ბადრი გოძიაშვილმა, მარტა ჩებოტარევამ ბ.მ.კ. ლიანა სარჯველაძემ,

ტ.მ.კ. ლევან ხარებავამ, ბ.მ.კ. ოთარ და გალინა თავართქილაძეებმა და სხვებმა.

1999 ქ. ბათუმში სასწავლო სემინარით – "როგორ იწერება პროექტი გრანტის მოსაპოვებლად" ჩამოვიდა საქართველოს მთავრობისა და მსოფლიო ბანკის ერთობლივი პროექტის "სასოფლო-სამეურნეო კვლევები, სწავლება-დემონსტრირება" წარმომადგენლობა სამდივნოს ხელმძღვანელის ე.მ.დ., საქართველოს სოფლის მეურნეობის მეცნიერებათა აკადემიის წევრის რევაზ ასათიანის ხელმძღვანელობით. იდეა გაგვეშენებინა პირველი სამრეწველო პლანტაცია ხობის რაიონის სოფელ პატარა ფოთში (დაშრობით უზრუნველყოფილი ნიადაგები) მათ მიერ მოწონებული და დაფინანსებული იქნა (პროექტის ხელმძღვანელი ტ.მ.დ. საქართველოს ს/მ მეცნიერებათა აკადემიის წევრ-კორ. გურამ პაპუნიძე). 2001 წელს გაშენებული იყო 2,5 ჰა პლანტაცია. პროექტის დაფინანსებამ საშუალება მოგვცა მიგვეღო სტევიას სამრეწველო მოსავალი, რომელიც გადამუშავდა პროდუქციად. კვლევების შედეგები გამოქვეყნდა აკადემიურ ჟურნალებში (მათ შორის საზღვარგარეთ), გამოიცა რამდენიმე ათეული სტატია, ნორმატიულ-ტექნიკური დოკუმენტაცია და სხვა.

ნაშრომის ავტორები ჩაის, სუბტროპკულ კულტურათა და ჩაის მრეწველობის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტის ასპირანტურაში სწავლის პერიოდიდან (1987წ.) ჩართულები არიან კვლევებში. წინამდებარე ნაშრომიც ამ კვლევების გარკვეული შეჯამებაა.

შ ე ს ა ვ ა ლ ი

სამუშაოს აქტუალობა: სტევიას ფოთოლი ძირითადად ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების შემცველობის გამო მოიხმარება. ამ მცენარის ფოთოლში ასევე მრავლადაა სხვა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთებიც. სამხრეთ ამერიკიდან სტევიას კულტურის გადატანამ სხვა ქვეყნებში მისი ფოთლის შემცველობაში შეიძლება გამოიწვიოს გარკვეული ცვლილებები. სტევიას ფოთლისა და მისგან მიღებული პრეპარატების წარმოება პატენტებითაა დაცული და ეს პრეპარატები საკმაოდ ძვირადღირებულია.

სამუშაოს მიზანს შეადგენდა საქართველოში ინტროდუცირებული კულტურის სტევიას ტერპენოიდური, ფენოლური და სხვა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების შესწავლა, მათი გადამუშავების ტექნოლოგიური რეჟიმების დადგენა და ამის საფუძველზე კვების მრეწველობაში ამ ნედლეულის გამოყენების მეცნიერული საფუძვლების შექმნა. ამ მიზნის განსახორციელებლად დასახული იქნა შემდეგი ამოცანები:

- სტევიას ფოთლის დიტერპენური გლიკოზიდების და ფენოლური ნაერთების შესწავლა;
- სტევიას ფოთლის მინერალური ნივთიერებების, ვიტამინებისა და სხვა ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთთა შესწავლა;
- სტევიას ფოთლიდან ტკბილი პრეპარატების მიღების ტექნოლოგიური სქემის დამუშავება;
-სტევიას ფოთლის ზრდა – განვითარების დროს ნივთიერებათა თვისობრივი და რაოდენობრივი ცვლილებების შესწავლა;
- სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების განსაზღვრის გამარტივებული ხერხის შემუშავება;

ნაშრომის მეცნიერული სიახლეს წარმოადგენს ის, რომ შესაძლებელი გახდა საქართველოში ინტროდუცირებული სტევიას

ტკბილი, დიტერპენოიდური გლიკოზიდების გამოკვლევა, მათი თვისობრივი და რაოდენობრივი შემცველობის დადგენა. დამუშავებულია ტკბილი გლიკოზიდების განსაზღვრის ექსპრეს მეთოდი. შემუშავებულია სტევიას ტკბილი ექსტრაქტის, კონცენტრატის, მშრალი ექსტრაქტის და ტკბილი დიტერპენოიდური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის წარმოების ტექნოლოგიური სქემები. შესწავლილია სტევიას ფოთლის ფენოლური ნაერთები, ზოგიერთი ვიტამინი, სხვა ტერპენოიდური ნაერთები, მინერალური ნივთიერებანი.

შექმნილია მეცნიერული საფუძვლები სტევიას ფოთლის და მისგან მიღებული პრეპარატების კვების მრეწველობაში გამოსაყენებლად.

სამუშაოს პრაქტიკულ ღირებულებას წარმოადგენს ის, რომ საქართველოში ინტროდუცირებული სტევიას კულტურის გაშენებით შესაძლებელი ხდება სასოფლო - სამეურნეო სავარგულების უფრო ეფექტურად გამოყენება. სტევიას ნედლეულის და მისგან მიღებული პროდუქტების ქიმიური შემადგენლობის შესწავლა და მისი გადამუშავების დროს მიმდინარე ცვლილებების დადგენა საშუალებას იძლევა მიღებული ნედლეული უფრო ეფექტურად გამოვიყენოთ. მეცნიერული კვლევების საფუძველზე შედგენილია სამეურნეო ობიექტის სტანდარტები და ტექნოლოგიური ინსტრუქციები.

1. ტერპენოიდები, მათი ბიოსინთეზი

მცენარეთა განსაცვიფრებელი უნარი მოახდინონ განსხვავებული ბუნების ნივთიერებათა ბიოსინთეზი. განსაკუთრებით მკაფიოდ ჩანს ბუნებრივ ნაერთთა ჯგუფის ტერპენოიდების მაგალითზე. ტერპენოიდები, ფენოლების მსგავსად ბუნებრივ ნაერთთა ერთერთი მრავალრიცხოვანი ჯგუფია.

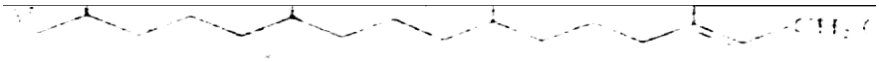
ჩვეულებრივ ტერმინს ტერპენი იყენებენ იმ ნივთიერებების მიმართ, რომლებიც შეგვიძლია წარმოვიდგინოთ როგორც იზოფრენული (C_5) ფრაგმენტის მთელ რაოდენობის შემცველი ნაერთები. ნივთიერება მოიხსენიება ტერპენად მიუხედავად იმისა შეიცავს თუ არა სხვა ელემენტს, მაგალითად ჟანგბადს (25). ტერპენოიდებს მიიჩნევენ ბოსინთეზის მეორეულ პროდუქტებად, თუმცა ჭარბობს აზრი იმის შესახებ, რომ ისინი „ჩიხური“ ჯგუფის ნაერთებია.

ტერპენებისა და ტერპენოიდების კლასიფიკაცია ხდება C_5 ჯგუფის რაოდენობის მიხედვით: ჰემიტერპენები – 5 ნახშირბადს შეიცავენ; მონოტერპენები – C_{10}, სესკვიტერპენები - C_{15}, დიტერპენები - C_{20}, სესტერპენები - C_{25}, ტრიტერპენები - C_{30}, ტეტრატერპენები - C_{40} და ა.შ. პოლიტერპენები.

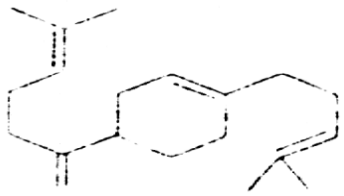
მონოტერპენები და სესკვიტერპენები ფართოდ არიან გავრცელებული უმაღლეს მცენარეებში, მრავალ მათგანს მძაფრი სუნი აქვს და აქროლადი კომპლექსის მნიშვნელოვანი შემადგენელი ნაერთები არიან.

დიტერპენები თავის მხრივ იყოფა აციკლურ, მონოციკლურ, ბიციკლურ, ტრიციკლურ, ტეტრაციკლურ ნაერთებად. აღსანიშნავია ერთი და იგივე ძირითადი სტრუქტურით, მაგრამ განსხვავებული კონფიგურაციით ორი ტეტრაციკლური ჯგუფის არსებობა. სახელდობრ, კაურენისა და ენტ-კაურენის ჯგუფები (ნახ.1.). ამ უკანასკნელის წარმოებულია სტევიოლი. სტევიოლი აგლიკონია ბუნებრივ ნაერთთა ერთ-ერთი ყველაზე ტკბილი წარმომადგენლებისა,

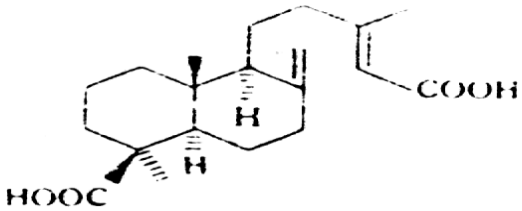
ациклური :
ფიტოლი



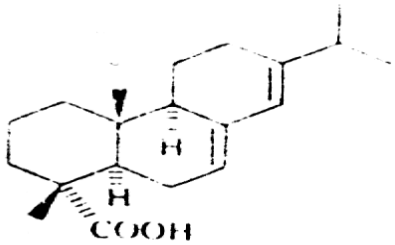
მონოციკლური:
კამფორენი

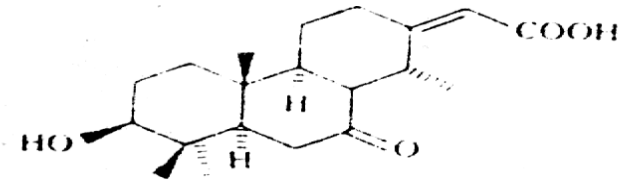


ბიციკლური:
აგატის მჟავა

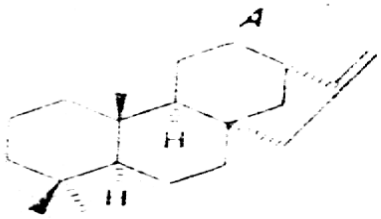


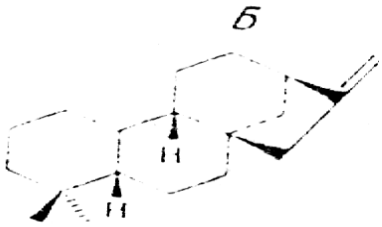
ტრიციკლური



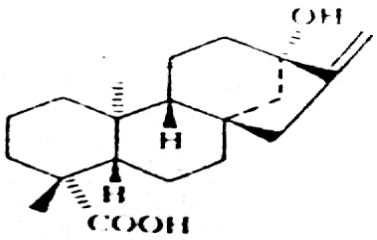


ტეტრაციკლური
ა. კაურენი
ბ. ენტ-კაურენი





სტევიოლი



ნახ. № 1.

ზოგიერთი ტიპიური დიტერპენი

რომლებიც მნიშვნელოვანი რაოდენობით გროვდება სამხრეთ ამერიკული წარმოშობის მცენარის სტევიას (*Stevia rebaudiana Bertoni*) ფოთლებში.

ფართო გავრცელება და ინტერესი სტევიას მიმართ გამოწვულია მასში ინტენსიურად ტკბილი გემოს მქონე ნაერთების შემცველობის გამო, რომლებიც ძირითადად წყალში ხსნადი რვა დიტერპენური გლიკოზიდის: სტევიოზიდი, სტევიოლბიოზიდი, დულკოზიდები და რებაუდიოზიდების სახითაა წარმოდგენილი. ეს ნაერთები 50-400-ჯერ ტკბილი არიან ვიდრე საქაროზა. მათი აგლიკონი სტევიოლია (13 –ჰიდროქსი, ენტ – კავრენ-16, 18-კარბონმჟავა), ამ ნაერთთაგან რაოდენობრივად მნიშვნელოვანია სტევიოზიდი (13-0-β-D-გლუკოპირანოზილ (1 – 2)-β-D-გლუკოპირანოზილ, 19- ოქსო -0- β -D გლუკოპირანოზილ, ენტ–კაურენ -16) და რებაუდიოზიდი A (13-0-β-D-გლუკოპირანოზილ - (1 – 2) –0-β - D - გლუკოპირანოზილ (1-3)-0-β –D-გლუკოპირანოზილ, 19- ოქსო -0- β -D გლუკოპირანოზილ, ენტ -კაურენ -16). აგლიკონთან სტევიოლთან C_{13} და C_{19} მდგომარეობაში მიერთებულია გლუკოზა, პირველ შემთხვევაში ერთი, ხოლო მეორეში ორი (სოფოროზა) ან სამი მოლეკულა (ნახ. № 2.) (139;140;168;236;237). სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების სტრუქტურული ფორმულების დადგენა ჯერ კიდევ მე-20 საუკუნის 30 –იან წლებში დაიწყო (85,86,87). 60 – იანი წლებისათვის დადგინდა მათი სტრუქტურა, სტერეოქიმია და აბსოლიტური კონფიგურაცია (103,108,109,198,199). შემუშავებულია სტევიას ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების კვლევის მეთოდები (61,62,63,70).

სტევიოზიდის გლიკოზიდების ბიოსინთეზი ხდება მევალონის მჟავას გზით. ეს ფუნდამენტალური მარშრუტია, რომელიც უზრუნველყოფილია ორი c_5 სტანდარტული მოლეკულით იზოპენტენილ პიროფოსფატითა

(იპპფ) და დიმეთილალილ პიროფოსფატით (დმაპფ), რომლებიც აუცილებელია ყველა იზოფრენიანი კომპონენტისათვის (101.

სტევიოზიდის ბიოსინთეზი თავდაპირველად შესწავლილი იყო მე-20 საუკუნის 60-იან წლებში, (73,135,234,235). ამ გამოკვლევებით დადგინდა, რომ სტევიოლის ბიოსინთეზი მსგავსად გიბერინისა წარიმართება გერანილ გერანილ პიროფოსფატიდან (გგპფ). გგპფ გარდაიქმნება ენტ-კოპალილ პიროფოსფატად (კპფ), კპფ სინთეტაზას თანაობისას (ასევე იწოდება ent-კაურენსინთეტაზა A) და შემდგომ ent-კაურენად კპფ სინთეტაზას თანაობისას (ასევე იწოდება ent-კაურენთეტაზა B). ამ პროდუქტების შემდგომ დაჟანგვას C_{19} მდგომარეობაში მივყავართ ent-კაურენის მჟავას წარმოქმნამდე. ეს პროცესი წარიმართება ერთ ან რამდენიმეP_{450} მონოოქსიგენაზას მონაწილეობით (137,138,169,271,280,298). ბიოსინთეზის გზები ამ ადგილიდან გიბერინისა და სტევიოლისათვის განსხვავებულია. სტევიოლი წარმოებულია ent-კაურენონისა C_{13} მდგომარეობაში ჰიდროქსილირების შედეგად. ეს ფერმენტი ent-კაურენის მჟავას 13-ჰიდროქსილაზა გამოყოფილი იყო სტევიას ფოთლებიდან, შესწავლილი და ნაწილობრივ დახასიათებული (246;247). ნატიური ფერმენტი საჭიროებს ნადფ H და O_2 კატალაზისათვის.

სტევიოლზე ფუნქციონალურ ჯგუფებთან -კარბოქსილური C_{19} და სპირტული C_{13} ნახშირწყლების მიერთება ხდება. ნახშირწყლების მიერთება და მათი ხასიათი განსაზღვრავს დღემდე ცნობილი რვა განსხვავებული გლიკოზიდის არსებობას. ეს გლიკოზიდები გვერდით ჯაჭვებად შეიცავენ გლუკოზას, შესაძლებელია რამნოზას არსებობაც. გლიკოზიდების ბიოსინთეზების თანმიმდევრობა, ჯერ კიდევ გარკვევის სტადიაშია. დღეისათვის გლუკოზიდტრანსფერაზას ქმედებაა გამოხატული (194;249;250). ამ ფერმენტის სამი წარმომადგენლიდან ორი იყო გამოყოფილი და შესწავლილი. ეს ფერმენტები ახდენენ სტევიოზიდის

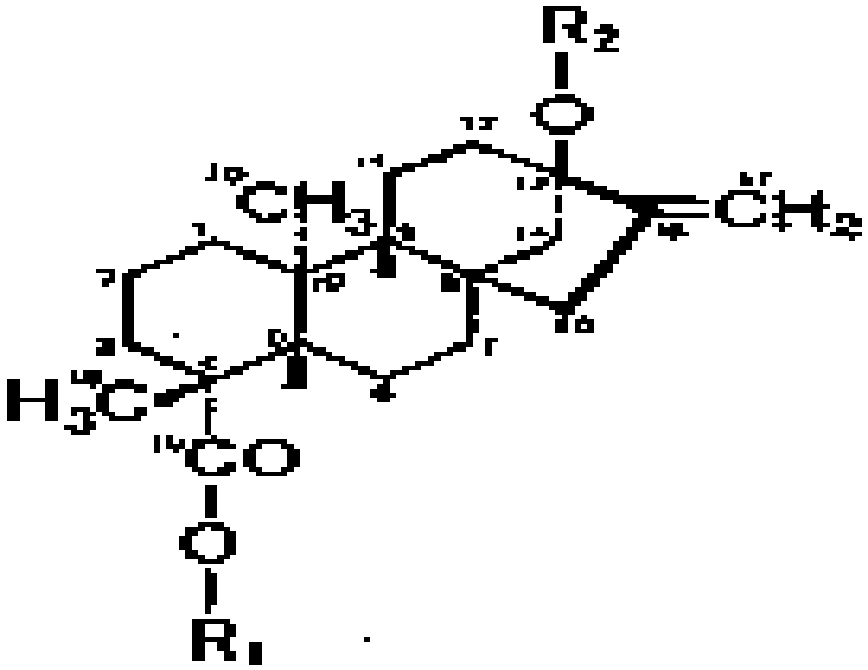
C_{13} –მდგომარეობაში გლუკოზირებას, ფერმენტი გლუკოზა-უდფ-ტრანსფერაზით, სტევიოლმონოზიდის წარმოქმნით. მეორე ფერმენტის მოქმედებას გაცილებით ფართო სპექტრი აქვს.

მიჩნეულია, რომ დიტერპენების ბიოსინთეზი მიმდინარეობს მცენარეული უჯრედის პლასტიდებში (137;198). არსებობს მტკიცებები იმის შესახებ, რომ აღნიშნული სტევიოლის ბიოსინთეზსაც შეესაბამება. ეს პროცესი ლოკალიზებულია ფოთლის ქლოროპლასტებში. სტევიას ფოთლის ქლოროპლასტებიდან გამოიკვეთება ent-კაურენის მჟავას 13-ჰიდროქსილაზას აქტივობის მაღალი დონე, რომელიც გარდაქმნის ent-კაურენის მჟავას სტევიოლად. გამოყოფილი იქნა აგრეთვე ქლოროპლასტებიდან (156) უდფ-გლუკოზიდ ტრანსფერაზა, რომელიც განსხვავებით აღნიშნული ენზიმებისაგან სტევიოლის გლუკოზირებას ახდენს ქლოროპლასტის გარეთ. ეს პროცესი მიმდინარეობს ვაკუოლში, სადაც ხდება ბიოსინთეზის პროდუქტების დაგროვება. გლიკოზიდების დაგროვება ძირითადად ხდება ფოთლებში, სადაც მათი შემცველობა 10-დან 15 %-მდეა მშრალ მასაზე გაანგარიშებით.

ამრიგად, მცენარე მეტაბოლიზმის პროცესში ახდენს რთულ მოლეკულათა სინთეზს. რა დანიშნულებით აგროვებს მცენარე დიტერპენოლთა გლიკოზიდებს არაა ცნობილი. შესაძლებელია, ეს ნაერთები მცენარეს სჭირდებოდეს, როგორც დამცავი საშუალება ბალახით მკვებავი ცხოველთაგან ან როგორც ანტიმიკრობული აგენტი სფეციფიკური ბალახის მჭამელი მავნებლების და პათოგენების წინააღმდეგ.

დღეისთვის ცნობილ რვა ძირითად ტკბილ დიტერპენოიდური გლიკოზიდიდან სტევიაში გვხდება მნიშვნელოვანი რაოდენობით მხოლოდ ორი - სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდი A. შესწავლილია მათი ფიზიკური და ქიმიური თვისებები. სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდის გამძლეობის

ტესტირება მოხდა სასმელებში, გაცხელებისას, ნახშირორჟანგით გაზირებისას და PH-ის ცვლილებისას (99;100). რებაუდიოზიდი განიცდის დაშლას მზის პირდაპირი სხივის ხანგრძლივად მოქმედებისას (98;99;159). იაპონელთა მრავალრიცხოვანი ნაშრომები მოწმობენ რომ სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდი ძალზე სტაბილურია.



სტევიოზიდიR_1 β -D-გლუკოპირანოზა; R_2 - β -D-გლუკოპირანოზილ-(1 – 2) –β -D-გლუკოპირანოზა.

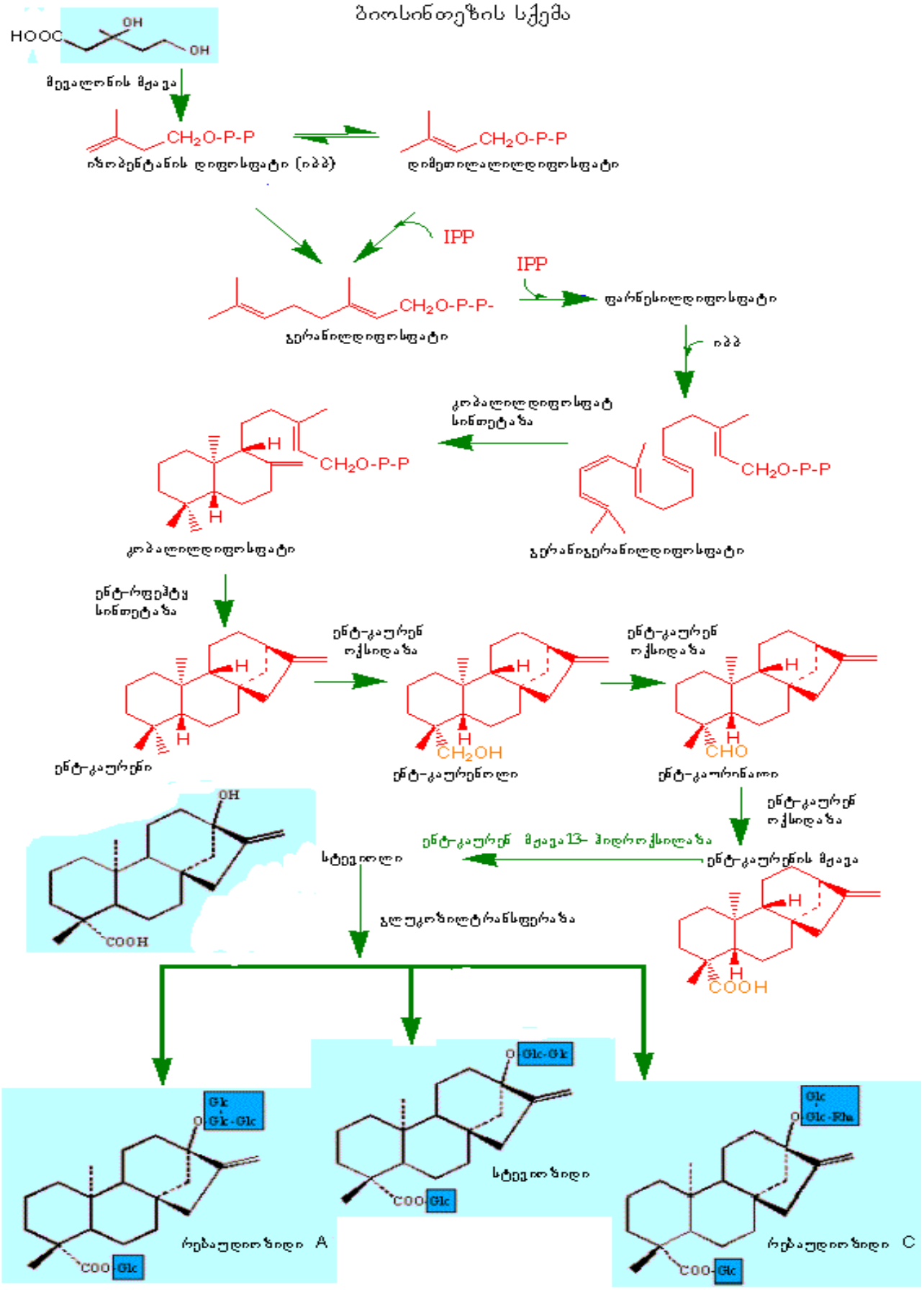
რებაუდიოზიდი A - R_1 - β -D-გლუკოპირანოზა ; R_2 - β -D-გლუკოპირანოზილ-(1 – 2) – β -D-გლუკოპირანოზილ (1-3) β –D-გლუკოპირანოზა.

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

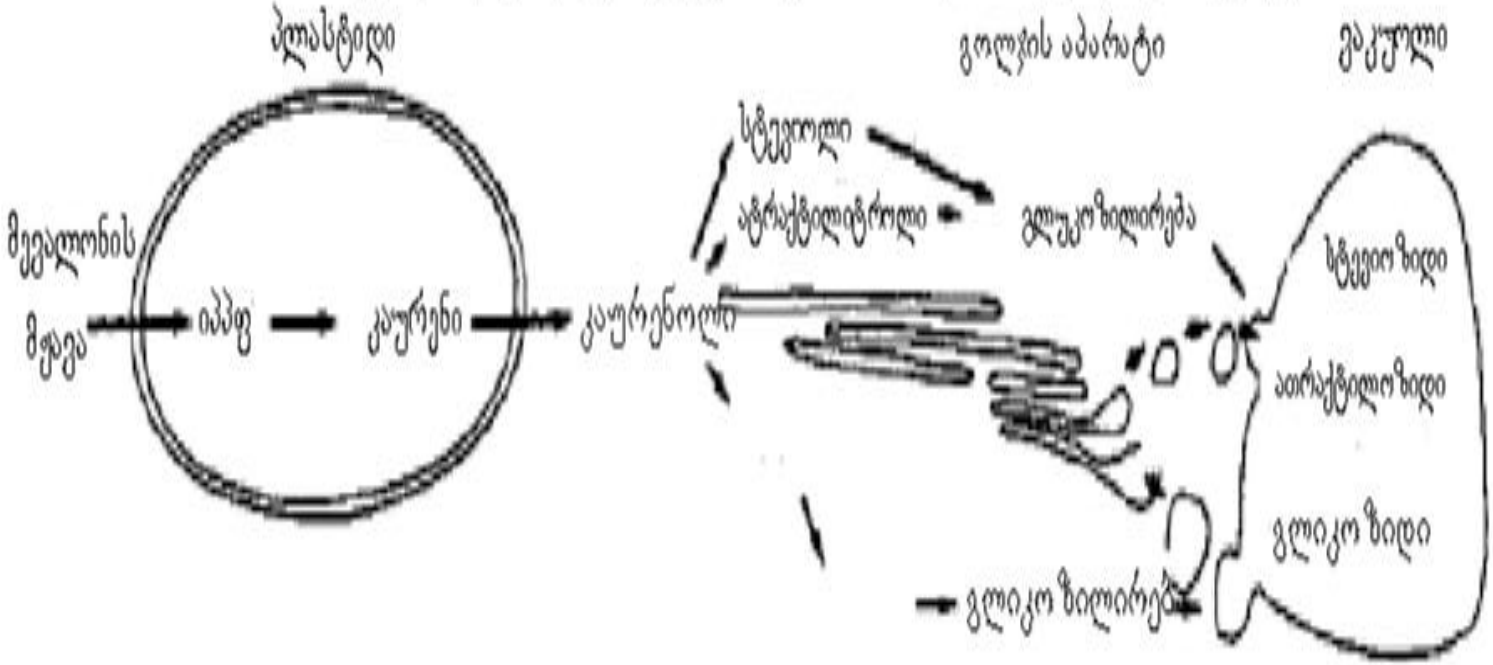
დულკოზიდი A - R_1 - β -D-გლუკოპირანოზა; R_2 - β -D-გლუკოპირანოზილ- (1 – 2) – β -L-რამნოპირანოზა.

ნახ. № 1.1.2. სტევიას ძირითადი დიტერპენური გლიკოზიდების სტრუქტურული ფორმულები.

სტევიოლის და ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების ბიოსინთეზის სქემა



ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების ბიოსინთეზის ლოკალიზაცია უჯრედში



ფილიპსმა (224) მოახდინა მიღწევების შეჯამება და მისი აზრით სტევიოზიდი 110-279-ჯერ, ხოლო რებაუდიოზიდის A 150 – 320 – ჯერ , რებაუდიოზიდი C 40 - 60-ჯერ, ხოლო დულკოზიდი 30-ჯერ ტკბილია ვიდრე საქაროზა. ამ ნივთიერებებს იმდენად ინტენსიური სიტკბო გააჩნიათ, რომ ის ,,სიმწარე"-ში გადადის. რებაუდიოზიდი ნაკლებად „მწარე" გემოს მატარებელია, ვიდრე სტევიოზიდი. პროდუქტებს მისი გამოყენებით უფრო სასიამოვნო გემო აქვს, ვიდრე სხვა რომელიმე გლიკოზიდის გამოყენებისას. დადგინდა რომ სტევიას ტკბილი დიტერპენულ გლიკოზიდებს თავად გააჩნიათ დამახასიათებელი გემო და ეს არაა მცენარიდან მიღებული ექსტრაქტის გაუსუფთავებლობის შედეგი (111). პრეპარატების ,,სიმწარე" მატულობს პროდუქტში მათი კონცენტრატის ზრდასთან ერთად (242;246). სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდი სინერგისტები არიან, სხვა სიტკბოს მაღალი ხარისხის მქონე პრეპარატების მიმართ, როგორიცაა მაგალითად ასპარტამი, ამიტომ მათი გამოყენება კომპოზიციებში ძალზე მოსახერხებელია (243). In vitro მეთოდებით შესაძლებელი გახდა გლიკოზიდების აგლიკონის სტევიოლისაგან სტევიოზიდის მიღება (71; 77; 79; 204; 301; 230).

სტევიოზიდის ჰიდროლიზით მიიღება სოფოროზა (287), რომელიც აგლიკონთან C_{13} მდგომარეობაში დაკავშირებული იყო გლიკოზიდური კავშირით (288; 294). სტევიოზიდის სტრუქტურული მახასიათებლების დადგენა საბოლოოდ 90 –იანი წლებისათვის დასრულდა (283).

მე -20 საუკუნის 80 –იანი წლებისათვის აღმოჩენილი და შესწავლილი იყო კიდევ ორი დიტერპენური გლიკოზიდი რებაუდიოზიდი A და C (168) და სხვა ტკბილი ნაერთები (62).

2. სიტკბო და მისი აღქმა

ნივთიერების გემოს აღქმა რთული არა საკმარისად შესწავლილი პროცესია. ის დაკავშირებულია გემოს გამომწვევი ნივთიერების შესაბამის რეცეპტორებთან მოქმედებაზე. ადამიანის სენსორული სისტემა შედგება რამდენიმე ტიპის გემოს რეცეპტორისაგან. ისინი განლაგებულია ენის სხვადასხვა ნაწილში და ურთიერთქმედებენ სხვადასხვა ნივთიერებაზე, რომელთაც გააჩნიათ ოთხი განსხვავებული გემო: მლაშე, მჟავე, მწარე და ტკბილი.

დადგენილია, რომ რეცეპტორები რომლებიც რეაგირებენ ტკბილ გემოზე იმყოფებიან სოკოსმაგვარი ფორმის წანაზარდებზე, რომელიც განლაგებულია ენის წინა ნაწილზე, მათ გააჩნიათ ერთნაირი აგებულება. გარდა საყრდენი უჯრედებისა, მათში განლაგებულია რეცეპტორთა უჯრედები, რომელთაც შეუძლიათ რეაგირება გემოზე. ერთ წანაზარდში 10-15 ასეთი უჯრედია (88).

რეცეპტორების სტრუქტურა და თვისებები ბოლომდე არ არის დადგენილი. თუმცა დადგენილია, რომ რეცეპტორების ტკბილ გემოზე რეაქციის საფუძველს წარმოადგენს ცილა. ასე მაგალითად, მსხვილფეხა რქოსანი საქონლის ენის ქსოვილებისაგან გამოყოფილი იქნა ცილა, რომელიც შედის რეცეპტორის შემადგენლობაში და შესწავლილი იქნა მისი უნარი, წარმოქნას კომპლექსნაერთები შაქრებთან (42).

პირველი წარმოდგენები ნივთიერებების გემურ თვისებებზე ეყრდნობოდა მათ ფიზიკო-ქიმიურ ხასიათს. რეცეპტორთან ადსორფციის დროს ხდება რეცეპტორის ზედაპირული მემბრანის გეომეტრიის ლოკალური ცვლილება, რაც იწვევს სიტკბოს შეგრძნებას. ამ ჰიპოთეზის დასამტკიცებლად საჭირო გახდა დიდი დრო.

ადამიანის კვებაში დამატკბობელი ნივთიერებების დიდი მნიშვნელობა, სახელდობრ მათი მოქმედება ჯამრთელობაზე ხელი შეუწყო ტკბილი

გემოს აღქმის მექანიზმის ინტენსიურ შესწავლას. ადრე ითვლებოდა, რომ შაქრების ტკბილი გემო წარმოადგენს მათ ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს თვისებას, შემდგომში აღმოჩნდა, რომ სხვადასხვა შაქრებს სიტკბოს სხვადასხვა ეფექტი გააჩნია. ითვლებოდა, რომ აციკლური პოლიოლების ტკბილი გემო, რომლებიც თავისი სტრუქტურით შაქრებთან ახლოს არიან, გამოწვეული იყო მათ მოლეკულაში შემავალი ჰიდროქსილის ჯგუფებით, მაგრამ ეს შემდგომში შეცდომა აღმოჩნდა.

დადგენილი იქნა, რომ ნივთიერებები რომლებიც მოლეკულაში შეიცავენ ჰიდროქსილის ერთნაირ რაოდენობას, მაგალითად: გლუკოზა და გალაქტოზა აქვთ სიტკბოს სხვადასხვა ხარისხი. ასევე პოლიოლები, რომელთაც მოლეკულაში აქვთ 5 ჰიდროქსილიანი (ქსილიტი) ჯგუფი უფრო მაღალი სიტკბოს ეფექტით ხასიათდებიან ვიდრე 6 ჰიდროქსილიანები (სორბიტი).

მას შემდეგ, რაც დადგენილი იქნა ნახშირწყლების ციკლური აგებულება ცნობილი გახდა, რომ მათი იზომერების სიტკბოს ხარისხში განსხვავება შეიძლება გამოწვეული იყო ჰიდროქსილის ჯგუფების სივრცულ განლაგებად ნახშირბადის ერთ-ერთ ატომთან. ასე მაგალითად: α-D გლუკოპირანოზა - ტკბილია, α-D გალაქტოპირანოზა - ნაკლებად ტკბილი, α-D მანოპირანოზა – ტკბილია, ხოლო β-D მანოპირანოზა – მწარეა.

დამატკბობელი ნივთიერების განსხვავებული შემადგენლობა და სტრუქტურა დიდი ხნის განმავლობაში ართულებდა მათი რეცეპტორებთან მოქმედების საერთო მომენტების დადგენას. მხოლოდ 70-იან წლებში შალენბერგერმა დაადგინა დამატკბობელი ნივთიერების მოლეკულაში სპეციფიკური რგოლი და შეიმუშავა ჰიპოთეზა, რომლის მიხედვითაც აღნიშნული რგოლი წყალბადური კავშირების მეშვეობით ურთიერთქმედებს, რეცეპტორის აქტიურ ცენტრებთან.

შალენბერგის მიერ შემოთავაზებული იქნა ძირითადი დებულება, რომელიც იძლევა საშუალებას ავხსნათ ზოგიერთი ნივთიერებების ტკბილი გემო. მის მიერ შემოთავაზებული იქნა სისტემა: AH, B სადაც, A და B ელექტროუარყოფითი ატომებია, რომლებიც მოლეკულაში განლაგებული არიან გარკვეული დაშორებით. ამასთან AH ასრულებს მჟავას ფუნქციას (H-მჟაური თვისებებით ხასიათდება) B კი წარმოადგენს პროტონების აქცეპტორს და ამიტომ რეაგირებს როგორც ფუძე. სისტემა AH,B ტკბილი ნაერთების მოლეკულების წყალბადური ბმის ხარჯზე შეიძლება მიერთებული იქნას, სასურველი სხვა AH, B სისტემის რეცეპტორის ცილის სისტემაში. ამ დროს წარმოქმნილი კომპლექსი იძლევა ტკბილი გემოს შეგრძნებას.

შაქრებში AH ,B სისტემის წარმოქმნას α-გლიკოლური ჯგუფი ახდენს. ამ ჰიპოთეზის მეშვეობით მოძებნილი იქნა ახსნა სხვადასხვა შაქრის სიტკბოს განსხვავებული ხარისხისა. ჩათვლილია, რომ ყველა ჰიდროქსილის ჯგუფი, რომელიც იმყოფება კომფორმაციაში წარმოადგენს ტკბილი გემოს მატარებლებს.

β-D-ფრუქტოფურანოზის მოლეკულაში ანომერული OH ჯგუფი შეიცავს წყალბადის ატომს, რომელსაც გააჩნია განსაკუთრებით გამოხატული თვისებები და წარმოადგენს AH, B სისტემაში AH-ს .

ცნობილია, რომ სინთეტიკური დამატკბობელი ნაერთის სიტკბოს ხარისხი რამდენჯერმე მეტია, ვიდრე შაქრებისა. შაქრით გამოწვეული სიტკბოს შეგრძნება გრძელდება რამდენიმე წამს, რადგან ისინი რეცეპტორთან ამყარებენ უფრო მტკიცე კავშირს.

ასევე მნიშვნელოვან როლს სიტკბოს შეგრძნებაში ასრულებს რეაგენტისა და აქცეპტორის ფუნქციონალური ჯგუფების ურთიერთქმედების სიჩქარე და წარმოქმნილი კომპლექსის მედეგობა.

დამატკბობელი ნივთიერებები საკვებ პროდუქტებში მკაცრად ნორმირებული არიან.

სტევიას ფოთლის და მისგან წარმოქმნილი პროდუქტების გამოყენების ნებართვამ ძალზე ძნელი გზა გაიარა ძლიერი კონკურენტების ზემოქმედებით. კონკურენტები ძირითადად ხელოვნური დამატკბობელების (სახარინი, ასპარტამი) მწარმოებელი ფირმები იყვნენ.

ადამიანის მიერ მრავალი ნივთიერება აღიქმება ტკბილად. მათ შორისაა მე-20 საუკუნეში ძალზე პოპულარული საქარინი (250-450-ჯერ ტკბილი ვიდრე საქაროზა), ასპარტამი (250-ჯერ ტკბილი), სორბიტი, ქსილიტი, მანიტი და სხვა. თითოეული ამ პრეპარატის პოპულარობა ეცემა, მათ შესახებ არსებული მაკომპრომიტირებელი ინფორმაციის არსებობის გამო. კაცობრიობა უხსოვარი დროიდან მიმართავდა ბუნებრივ დამატკბობელ ნივთიერებებს. პირველი ასეთი პროდუქტი თაფლი იქნებოდა, მაგრამ ადამიანთა დიდი ჯგუფი თავს უფლებას ვერ მისცემს მიიღოს ნახშირწყლებით მდიდარი ენერგეტიკული პროდუქტი. ისეთ მცენარეებს შორის რომლებიც უზრუნველყოფენ ადამიანის მოთხოვნილებას ტკბილ ნაერთებზე ერთერთ პერსპექტიულ მცენარედ ითვლება სტევია.

სტევიაში შემავალი ტკბილი გლიკოზიდები მრავალმხრივადაა შემოწმებული. უკრაინაში, რუსეთში, აშშ-ში, იაპონიაში, ევროპის მრავალ ქვეყანაში ჩატარებული მედიკო-ბოლოგიური გამოკვლევები აჩვენებს, რომ პრეპერატი სტაბილურია თერმული დამუშავების დროს, მჟავე არეში, წყალში კარგად იხსნება, 300-ჯერ ტკბილია ვიდრე საქაროზა. უარყოფით თვისებად შეიძლება ჩაითვალოს სუსტი სუნი (ბალახის) და სიტკბოს შეგრძნების გვიან დაკარგვა (106,122,123,184).

გაზური ქრომატოგრაფირების გამოყენების შესწავლილია სტევიოლის მოქმედება ვირთხის ღვიძლზე. მიღებული 9 ფრაქციიდან

დი-მეტაბილიტ-1-15 ოქსოსტევიოლი, რომელიც პირდაპირი მუტაგენური ქმედებით ხასიათდება კოვალენტურად უერთდებიან დნმ-ს. ამ ფრაქციის თანაობისას ვირთხის და ადამიანის ღვიძლში მიკროსომაში აღინიშნება მუტაგენური აქტივობა. მისი ინჰიბირება შეიძლება ცისტეინით, ცისტეინამინით ან გლუკათიონით.

სტევიოლის მუტაგენად დადასტურებულია ვირთხის ღვიძლზე მოქმედების შესწავლის საფუძველზე, თუმცა ნაერთებში რომელთა აგლიკონსაც წარმოადგენს სტევიოლი და სტევიოლიბიოზიდი, არაა შემჩნეული მუტაგენური აქტივობისათვის საჭირო შემდეგი ნიშნები C_{18}-იან-OH-ის ჯგუფი და C_{16-17} მდგომარეობაში ორმაგი ბმა. მიუხედავად იმისა, რომ ამ ნაერთების მუტაგენური აქტიურობა არ იყო დამტკიცებული მათ მიმართ მაინც იჩენდნენ სიფრთხილეს.

სტევიოზიდს და სტევიოლბიოზიდს იყენებდნენ სხვადასხვა წარმოშობის β-D გლუკოზიდაზების სუბსტრაქტად. ყველაზე ძლიერი ფერმენტატული აქტივობით ხასიათდება *Aspergillus rider*-ისაგან და *Aspergillus –japonicus*-საგან მიღებული კომერციული პრეპარატი, რომელიც ახდენს მათ დაშლას სტევიოლად და გლუკოზად. ღორის ღვიძლიდან მიღებულ გაუსუფთავებელი შესაბამისი ფერმენტის პრეპარატი სტევიოზიდს არ იყენებს სუბსტრაქტად.

სტევიადან მიღებული ტკბილი გლიკოზიდების ჯამი „საქაროლი“ შემოწმებული იქნა ტოქსიკურობაზე კვების ჰიგიენის სამეცნიერო-კვლევით ინსტიტუტში (კიევი). ზღვრულ დონედ საქაროლისათვის მიჩნეულია 7,7 გ/კგ სხეულის მასისათვის. გაკეთებულია დასკვნა, რომ კლასიფიკაციის მიხედვით კვებისათვის რეკომენდირებული რაოდენობით (დოზა რომელიც ადეკვატურია სიტკბოთი შაქრის ფიზიოლოგიური დოზისა) საქაროლი განკუთვნილია სტევიას შედარებით უსაფრთხო ნივთიერებად. თუმცა სიფრთხილის მიზნით გლიკოზიდების საბოლოო ტოქსიკოლოგიურ შემოწმებამდე სასურველია

სტევიოზიდისაგან მიღებული იქნას უფრო სტაბილური ნაერთი ან მივიღოთ მისი სინთეზური ანალოგი, რათა არ მოხდეს ორგანიზმში მისი დაშლა სტევიალამდე (აგლიკონის, რომლის მუტაგენური აქტივობა არაა დასამტკიცებელი, მაგრამ მაინც სიფრთხილით ეპყრობიან). მიუხედავად არსებული მონაცემებისა, მოცემული კონკრეტული ცდების გამომრიცხავი მონაცემები არსებობს, სადაც მითითებულია ჩატარებული სამუშაოების ტენდენციურობაზე.

სტევიას ფოთლების და მისი პროდუქტების გამოყენებას ხანგრძლივი ისტორია აქვს სამხრეთ ამერიკასა და იაპონიაში. აღსანიშნავია, რომ არ არსებობს არც ერთი უარყოფითი დასკვნა. მიუხედავად ამისა სტევიას უსაფრთხოება დიდ დისკუსიის საგანია (80). არსებობს ინფორმაცია იმის შესახებ, რომ სტევიას 5%-იანი ექსტრაქტი იწვევს თაგვებში გამრავლების უნარის შეჩერებას. საწინააღმდეგო მონაცმებია შემდგომში დაფიქსირებული, 2,5 გ/კგ დღეში გამოყენება არავითარ ცვლილებას არ იძლევა (107). ტოქსიკურ რაოდენობად დაფიქსირდა LD 50 8,2 გ. დასაშვებ რაოდენობად ჩათვლილი იქნა 7,9 მგ/კგ (292,297). საფრთხის მიზეზი აგლიკონშია (157,162,164,186,221,222) თუმცა დღემდე არაა დაზუსტებული თუ რა გარდაქმნებს განიცდის ადამიანის ორგანიზმში ეს ნაერთები (65,68,186,228).

ნედლი სოიოს სოუსიდან გამოყოფილია (ქრომატოგრაფირებისა და ელექტროფორეზის მეთოდით). სტევიოლის ჰიდროლიზში მონაწილე ფერმენტი β-გლუკოზიდაზა (β-D გლუკოზიდ-გლუკოჰიდროლაზა (EC.3.2.1.2.1.) მიხაელისის კონსტანტა 9.71, სტევიოზიდისათვის).

ნედლი სოიოს სოუსში სტევიოზიდის ინკუბაციის შემდეგ მიიღება მისი წარმოებული, რომელიც იშლება რუბდოზიდამდე. ამ რეაქციაში მონაწილეობას ღებულობს ამილაზა და ციკლო-

მალტოდექსტრინგლუკონატტრანსფერაზა, რომელიც სახამებლის თანაობისას ახდენს სტევიოზიდის ტრანსგლუკოლიზაცია.

სტეიოზიდის გლუკოზირებამ აჩვენა, რომ თითოეული მოლეკულა გლუკოზიდის დამატება იწვევს მისი სიტკბოს მატებას. გლუკოზირება ხდება სტევიოზიდის მოლეკულის 13-0-β-სოფოროზულ ფრაგმენტზე ანუ 4-ჰიდროქსილურ ჯგუფზე ბოლო β-გლუკოზიდულ ნაშთთან. დადგენილია ასევე, რომ სტევიოზიდის ყველა მოდიფიცირებული პროდუქტები გემური თვისებებით უმჯობესია სტევიოზიდზე. სტვიოზიდის მონო- დი- და ტრი-გლიკოზირებული გლუკოზიდები ქრომატოგრაფიულადაა დაყოფილი.

სტევოზიდის (13-0-β-სოფოროზილ-19-0-β-გლიკოზიდსტევიოლი) მომწარო გემოს მოსახსნელად ახდენენ მის გარდაქმნებს. ერთ-ერთი ასეთი პრეპარატი მიიღება streptomyces sp. N19-1 ფერმენტატული სისტემის გამოყენებით.

სტევიოზიდისაგან ძალზე მარტივი მეთოდით ღებულობენ სოფოროზას (2-0-β-D-გლუკოპირანოზილ-β-D-გლუკოპირანოს), რისთვისაც სტევიოზიდის ნაწილობრივ ჰიდროლიზს ახდენენ განზავებულ HCl-ის მოქმედებით 100^0C-ზე. შემდგომი ნეიტრალიზაციით NaOH-ით და ქრომატოგრაფირებით ნახშირზე, გრადიენტში წყალი-სპირტი, საიდანაც სოფოროზა გამოკრისტალდება.

3. სტევიას (*Stevia rebaudiana Bertoni*) ბიოლოგიური დახასიათება

სტევიას სამშობლო სამხრეთ ამერიკაა (არგენტინა, ბოლივია, ბრაზილია, ჰარაგვაი). სტევიას ეს სახეობა პირველად 1899წელს აღწერა ბოტანიკოსმა ბერტონიმ (74,75,76). სტევია მიეკუთვნება რთულყვავილოვანთა (Asteracea)ოჯახს (82,83).

სტევია მრავალი სინონიმითაა ცნობილი. ამერიკელ ინდელთა ცნობილი ტომის გუარანას ენაზე: Ca-a jhee, Caa-a yupl, Caa-jhe-he. მათი თარგმნა დაახლოებით ჟღერს როგორც: ,,თაფლოვანი ბალახი“, ,,ტკბილი მცენარე“.

დღეისთვის ცნობილი სტევიას 200 -მდე სახეობიდან მხოლოდ (Stevia rebaudiana Bertoni) გამოირჩევა ინტენსიურად ტკბილი გემოს მქონე ნაერთებით. ამ ნაერთებით მე-20 საუკუნის 30-იანი წლებიდან დაინტერესდნენ (18,227). სამშობლოში მცენარე 120-სმ აღწევს. ღეროს დიამეტრი 10 მმ-მდეა. პირველი რიგის განტოტვაში 25-30 დუყია. ღეროზე ფოთლები წყვილადაა განთავსებული (ნახ. № 1), ამიტომაც ყოფილ საბჭოთა კავშირში მცენარე ,,ტკბილი ორფოთლიანას“ სახელით (Двулистнык сладкий) მოიხსენებოდა (112,302,303). საქართველოს პირობებში ღია გრუნტში მცენარის სიმაღლე 80სმ–ს აღწევს. ჩვენში მცენარე ინტროდუცირდა, როგორც მრავალწლიანი ბალახი, ზამთარში ხმობადი და გაზაფხულზე განახლებადი სახით. ზამთრის პირობების მიხედვით მცენარის 70 %-მდე კვლავ აღმოცენდება. ფოთლები წაგრძელებული ელიფსოიდური ფორმისაა. ზრდასრული ფოთლის სიგრძე 4-6 სმ-ია, ხოლო სიგანე 1,5-2 სმ. სტევია ჯვარედინად დამტვერიანებადი მცენარეა. ყვავილობის დროს ის იმტვერება მწერების საშუალებით. სტევია ძირითადად ყვავილობს სექტემბერში. ყვავილები ორსქესიანია, ანდროცეითა და გინეცეით. პატარა გვირგვინი შეზრდილია ყვავილის ფურცლით,

გაგრძელებული ზამბახისებრი. ზედა ნაწილი იყოფა ხუთ სექტორად. მილისებრი, თეთრი ფერის ფუძესთან შეფერილია იისფრად. ყვავილები შეკრულია კალათაში 5 ყვავილედით თითოეულში. კალათები განლაგებულია რთულ თანაყვავილედად (ნახ. № .2). ნაყოფი წვრილთესლაა. არ იხსნება,

ნახ. № 1. სტევია ღია გრუნტში.

ნახ. № 2. სტევიას ყვავილი.

ერთ თესლიანია, მკვრივი, მაგრამ არა სქელი ნაჭუჭგარემოთი, რომელიც სცილდება თესლს. თესლი წვრილია მაქოსმაგვარი ფორმის. სათესლე კოლოფი მომწიფებისას ღებულობს მუქ ყავისფერს. თესლის ზედაპირზე შეიმჩნევა 5-6 ღია ყავისფერი ვერტიკალური ზოლი. ჩვენს პირობებში მცენარეზე ბუნებრივად დამწიფებული თესლები ღია გრუნტის პირობებში პრაქტიკულად არ აღმოცენდებიან. ხელოვნური კლიმატის პირობებშიც კი ისინი ცუდი აღმოცენებით ხასიათდებიან (93,194,251,257). თესლები ძალზე წვრილია. 1000 თესლის მასა 0,3 - 0,5 გ –ია (153). ერთ ჰექტარზე შესაძლებელია 8 კგ – მდე თესლის მოყვანა (94). თესლით მცენარის გამრავლების დროს საჭიროა მისი დამუშავება და რეჟიმების შექმნა. ჩვენს პირობებში სტევიას გამრავლება ძირითადად მწვანე დაკალმებით ხდება (95,96,97207,272). დაკალმება შესაძლებელია წლის ყველა დროს. სტევიას ნერგის გამოყვანა ყველაზე უკეთესად შესაძლებელია სათბურის ან კვალსათბურის პირობებში (ნახ. № .3), სადაც დაცული უნდა იყოს შემდეგი ძირითადი პირობები: ოპტიმალური ტემპერატურა, კალმების დაფესვიანებისათვის 24-26 ^{0}C. ფოთლის ზედაპირი დაფესვიანების პერიოდში ყოველთვის უნდა იყოს სველი. ასეთ პირობებში დაკალმებიდან მე -10 -12 დღეს ვითარდება ფესვები, ხოლო მე - 16-20 დღეს ნერგები მზად არიან დასარგავად. სუბსტრატად დაკალმებისათვის შეიძლება გამოყენებული იქნას გადამწვარი ნაკელი, ნიადაგი, ქვიშა, თანაფარდობით (1:1:1), ნიადაგი, ქვიშა, ტორფი (3:1:1), მდინარის შლამიანი ქვიშა და სხვა (1;36;60). ასეთი ქვიშალამი იყრება სათბურში კვლებზე 5-6 სმ სისქეზე. სწორდება, უხვად მოირწყება და შემდეგ მასზე წარმოებს ახლად აღებული კალმების ყლორტების დარგვა. ყლორტებს იღებენ 4-5 სმ სიგრძისას, მას გადაჭრიან ბასრი საგნით და

ათავსებენ სველი ნაჭრის ქვეშ. ხშირად მიმართავენ ფოთლის ფირფიტის დამოკლებას. კალმებს რგავენ 1,5-2,5 სმ სიღრმეში. მათ შორის მანძილი 3 X 3სმ ან 3 X 4სმ -ია (ნახ. №.4). დაკალმებული მასალის პროდუქტიულობის გაზრდის მიზნით უნდა ჩატარდეს ყლორტების პინცირება, რომელიც ზრდის გვერდითი ტოტების რაოდენობას.

ნახ. № 3 სათბური სტევიას ნერგების გამოსაყვანად.

ნახ. № 4. სტევიას დაკალმება.

ნახ. № 5. სტევიას პლანტაცია ხობის რაიონის სოფელ პატარა ფოთში

ნახ. № 6. სტევიას მიწისზედა მოჭრილი მასა.

ჩითილების დარგვა ღია გრუნტში წარმოებს 10^0 C-ზე მეტი საშუალო დღეღამური ტემპერატურის პირობებში. 1 ჰა –ზე ირგვება 50 –დან 100 ათასამდე ნერგი (92,153,192,282,299) (ნახ. № 5).

დღეისთვის მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში გამოყვანილია სტევიას ჯიშები, რომლებიც გამოირჩევიან ტკბილი ნაერთების მაღალი შემცველობით. ჩვენში გავრცელება ჰპოვა მე-20 საუკუნის 80-იან წლებში უკრაინიდან შემოტანილმა ჯიშმა. პირველი სამუშაოები მცენარის ინტროდუცირებასთან დაკავშირებით ტარდებოდა ქ. სოხუმში, დაბა ჩაქვში და დაბა ანასეულში.

სტევიათი დაინტერესება და მისი მზარდი პოპულარობა დაკავშირებულია ინტენსიურად ტკბილი გემოს მქონე ნაერთებთან. ეს ნაერთები წარმოადგენენ დიტერპენულ გლიკოზიდებს. სტევიასადმი მსოფლიო ინტერესი ძალზე დიდია (118,150,163,219,260,261). მცენარით დაინტერესდნენ სელექციონერებიც (205,251,255), რათა გაიზარდოს ფოთლის ხარისხის ძირითადი მაჩვენებელი, ტკბილი ნაერთების ჯამური შემცველობა. ველურად მოზარდ მცენარეებში მათი შემცველობა 6-7 %-ის ფარგლებშია. დღეისათვის მიღებულია ჯიშები, რომლებშიც ტკბილი ნივთიერებების შემცველობა 14 % (Рамонская сластена) და უფრო მეტიც 18 % -is (Roial sweet) რაოდენობითაა (46).

სტევია და მისგან მიღებული პროდუქტები მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში გამოიყენებიან როგორც საკვები დანამატი, დამატკბობელი საშუალება დიაბეტისა და სიმსუქნის პროფილაქტიკის დროს (189,293). მათ გააჩნიათ ანტისეპტიკური თვისებები (278). უნარი აქვთ შეაჩერონ მიკროორგანიზმების გამრავლება და ზრდა. განსაკუთრებით აღსანიშნავია ის მიკროორგანიზმები, რომლებიც იწვევენ კარიესს და ღრძილების დაავადებებს. სტევია იწვევს ინსულინის წარმოქმნის და

გლიკოგენის სინთეზის სტიმულირებას (142,147,210,211). სტევია და მისი პროდუქტები გამოიყენება ცივ და ცხელ სასმელებში, ნამცხვრებში, გაზირებულ და უალკოჰოლო სასმელებში. ძირითადი მომხმარებლები იაპონლები არიან. ისინი წელიწადში 2000 ტონაზე მეტ ექსტრაქტს მოიხმარენ. აღსანიშნავია, რომ ტოქსიკურობის არც ერთი შემთხვევა არაა დაფიქსირებული.

სტევია საქართველოს (დასავლეთი) პირობებში ინტროდუცირებულია საწარმოო პლანტაციების სახით. მცენარეზე და მისგან მიღებულ პროდუქტებზე მზარდი ინტერესის და პროდუქტების მაღალი ფასების გათვალისწინებით საქართველოს სოფლის მეურნეობისათვის საინტერესო და პერსპექტიულ მცენარედ შეიძლება ჩაითვალოს.

მსოფლიო პრაქტიკაში სტევია გამოიყენება უშუალოდ ფოთლის, ექსტრაქტის, კონცენტრატის, მშრალი ექსტრაქტის და ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების სახით. ამ უკანასკნელის მიღება მსოფლიო გამოცდილების გათვალისწინებით შემდეგნაირად შეიძლება ჩამოყალიბდეს: ექსტრაქტის მიღება, ექსტრაქტის გასუფთავება, პრეპარატის ან ინდივიდუალურ ნაერთთა გამოყოფა და მათი გადაკრისტალება (67,131,146,158,187), ბოლო დროს ამ მიზნების მასაღწევად გამოყენება ულტრაფილტრაციული მეთოდებიც (300).

სტევია დღეისათვის მოჰყავთ მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში: ბრაზილია, ჰარაგვაი, ჩინეთი, ინდოეთი, ვიეტნამი, იაპონია, კანადა, აშშ და სხვა. განსაკუთრებით საინტერესო კვლევებია ჩატარებული იაპონიასა და კანადაში (112,113,171,173,182,206,230,252).

გარდა ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდებისა სტევიას ფოთლებში Raeblardati და Robert 1983 წელს მოახდინეს ექვსი ფლაკონოლური გლიკოზიდის ინდენტიფიკაცია. ეს ნაერთები აპიგენინი 4|- 0 გლიკოზიდი, ლუტეოლინ 7-0- გლუკოზიდი, კემპფეროლ-3-0 რამნოზიდი, და კვერცეტინ-3-0 არაბინოზიდი და 6,7,3|, ტრიჰიდოქსი -3,6,4|

,ტრიმეთილფლავინი (ტენტაურედინი) (229). ასევე აღმოჩენილია ჯანოლი და ასტროინელინი, 6-0-აცეტილასტროინელინი (253).

სტევიას ფოთლის სპეციფიკური სუნის გამოსაკვლევად მიღებული იყო ეთერზეთი, რომელშიც იდენტიფიცირებულია სესქვიტერპენური ნაერთები – კარიოფილენი, ტრანს-ფარნესენი, გუმულენი, კადინენი, კარიოფილენის ოქსიდი, ასევე ლინალოოლის მონოტერპენი, ტერპინენონოლი და სხვა (106,122,123,184).

სტევიას ფოთოლში აღმოჩენილია სტერებინები A, B, C … H, ეს ნაერთები განიხილებიან, როგორც ზრდის დაბალმოლეკულური რეგულატორები (217,218).

დიტერპენური გლიკოზიდების განსაზღვრის მრავალი მეთოდია. გამოყენებულია თხელფენოვანი მაღალეფექტური ქრომატოგრაფია (69,125,160,161,196,208,274) კაპილარული ელექტროფორეზით, ასევე ფერმენტატული (195) და ინფრაწითელი სხივების გამოყენების მეთოდები (209) მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფირებისას გამოიყენება სილიკაგელზე დამზადებული სვეტები. მეთოდი გამოიყენება არა მარტო სტევიას ფოთლების არამედ პრეპარატებისა და მისგან დამზადებული პროდუქტების ანალიზაისათვის (121,165).

სტევიას ფოთლებიდან გლიკოზიდების ექსტრაქციას ახდენენ 50 %-იანი მეთანოლით ოთახის ტემპერატურაზე. მიღებულ ექსტრაქტს აკონცენტრირებენ და ახდენენ მაღალეფექტური თხელფენა ქრომატოგრაფირებას ნარევით ეთილაცეტატი – იზოპროპანოლი – – ბუთანოლი – წყალი (20:12:7:6). ქრომატოგრამას ასხურებენ 50%-იან გოგირდმჟავას. აცხელებენ 10წთ 120^0C-ზე და ახდენენ დენსიდომეტრირებას 395 ნმ.

მსგავსი მეთოდით ხდება ტკბილი გლიკოზიდების განსაზღვრა ტექნიკური პირობების მიხედვითაც. სტევიას ფოთლების 3-ჯერად

ექსტრაქციას ახდენენ წყლით მადუღარ წყლიან აბაზანაზე. ექსტრაქტებს აერთებენ და აორთქლებენ. ვაკუუმის პირობებში მშრალ ნარჩენამდე. შემდგომი ექსტრაქცია 96% -იან ეთილის სპირტით 5-ჯერ (20-20-მლ) ეთანოლიან ექსტრაქტებს აორთქლებენ 1-2 მლ-მდე. ქრომატოგრაფირება ხდება სილიკაგელის თხელ შრეზე (კიზელგელი, 60 ფირმა merk, Germany). დაყოფისათვის იყენებენ გამხსნელთა სისტემას: ქლოროფორმი-მეთანოლი-წყალი (30:20:4). ქრომატოგრამას ამჟღავნებენ 10% H_2SO_4-ით აცხელებენ 110^0C-ზე და ახდენენ დენსიდომეტრირებას.

სტევიას ტკბილი გლიკოზიდების განსაზღვრას ახდენენ მათი ჰიდროლიზის შემდეგ (114). H ჰიდროლიზს ახდენენ მარილმჟავათი, რისთვისაც საკვლევ ობიექტს ჯერ ხსნიან წყალში, შემდეგ კი ატარებენ HCl-ს და ადუღებენ უკუმაცივრით 3,5 სთ მადუღარა წყლიან აბაზანაზე. ხსნარს ფილტრავენ, აცივებენ და გადააქვთ გამყოფ ძაბრში, ამატებენ ქლოროფორმს და ანჯღრევენ 5 წთ. ქლოროფორმის დამუშავებას იმეორებენ 5-ჯერ. ქლოროფორმიან გამონაწვლილებს აგროვებენ და ამოაორთქლებენ მშრალ ნარჩენამდე. კოლბას აშრობენ 100^0C-ზე 1 სთ. გაცივებულ ნარჩენს ამატებენ დიმეთილფორმაზიდს, რომლის ნეიტრალიზებას ახდენენ გამოყენებამდე. შემდეგ ხსნარს ტიტრავენ 0,1H NaOH-ით მეთილის სპირტსა და ბენზოლის ნარევში (1:4) ინდიკატორულ ელექტრულად გამოიყენება მინის, ხოლო შესადარებელ ქლორვერცხლიანი ელექტროდი. სტევიას ტკბილი გლიკოზიდების აირ-სითხური ქრომატოგრაფირებისათვის საჭიროა წინასწარ მოვახდინოთ მათი გადაყვანა აქროლად ნაერთებში - მეთოქსინაერთებში (62,63,81,159,183,263).

4. ტერპენოიდების კვლევის მეთოდები

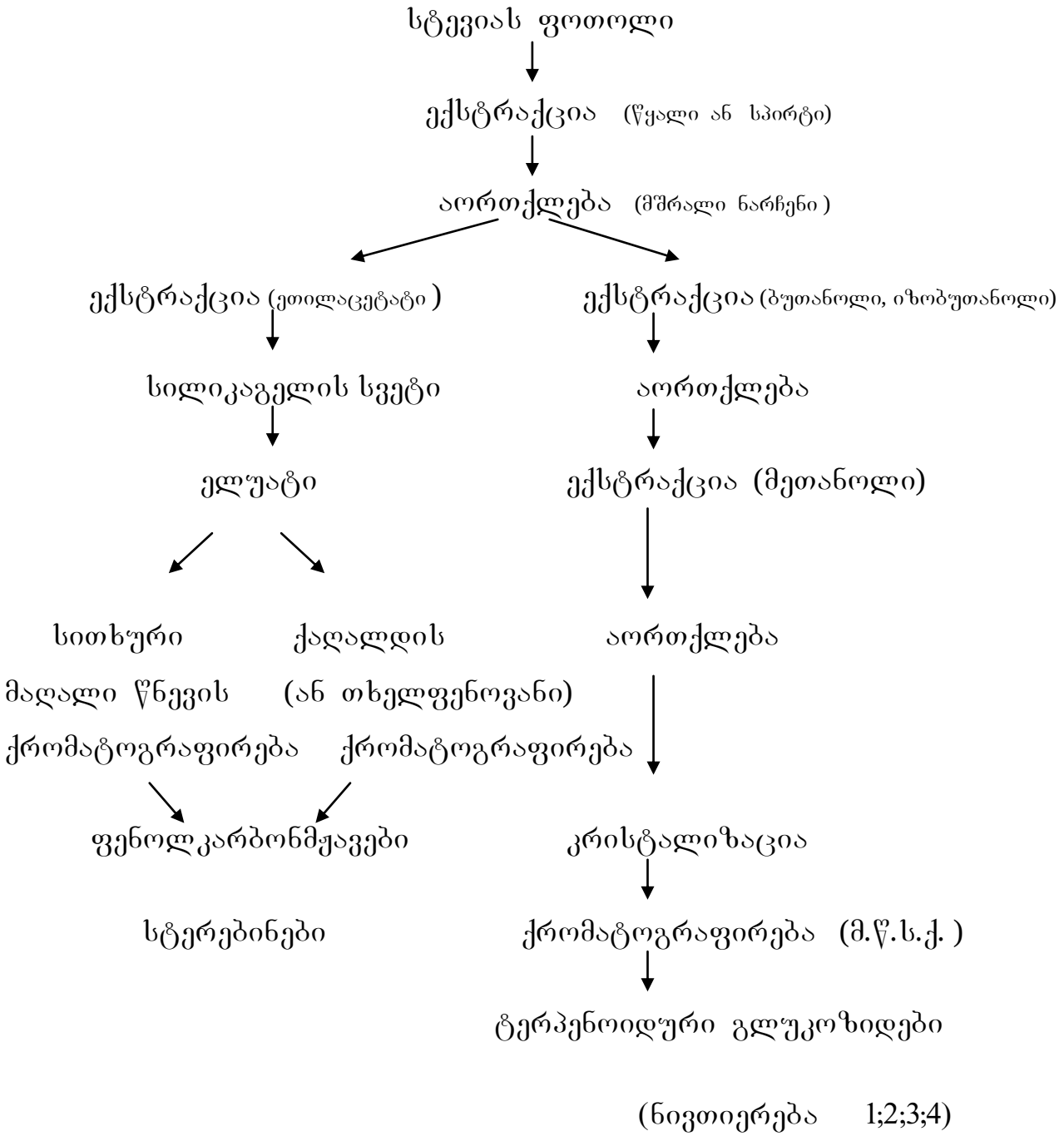
სტევიას ფოთლის ტერპენოიდების კვლევას ვახდენდით სქემა № 1 მიხედვით, რისთვისაც სტევიას ნედლ ფოთლებს ვაფიქსირებდით მწვავე ორთქლით 1 წთ – ის განმავლობაში. საკვლევ ნიმუშებს ვაშრობდით და ვინახავდით.

სითხური ქრომატოგრაფირებისათვის სტევიას ფოთლების ექსტრაგირებას ვახდით წყლით. ექსტრაქტს ვფილტრავდით და ვამუშავებდით იზობუთანოლით. წყლიან ფაზას ვაქცევდით, ორგანულ გამხსნელს ვაორთქლებდით მშრალ ნარჩენებამდე და ნარჩენს ვხსნიდით მეთანოლში. სამჯერადი გადავაკრისტალებდით, შემდეგ კი ვახდენდით ქრომატოგრაფირებას ქრომატოგრაფიულ სვეტზე Lichrasorb C-18. მოძრავი ფაზა: მეთანოლი - 5 HM NaOH (65:35). ნაერთთა იდენტიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ მოწმეები. აღწერილი მეთოდი საშუალებას იძლევა განვსაზღვროთ სტევიოზიდი, რებაუზიდი A. სტევიოლბიოზოდი, სტევიოლი და იზოსტევიოზიდი. უმდაბლესი დონე განსაზღვრისა შეადგენს 1,25 მკგ იზოსტევიოლისათვის და 0,6 მკგ სხვა გლიკოზიდებისათვის.

სტევიას გლიკოზიდების განსაზღვრისათვის ასევე გამოვიყენეთ ქრომატოგრაფიული სვეტი Lichrasorb NH_2, გამხსნელი სისტემა: აცეტონიტრილი - წყალი (85: 15). განსაზღვრა ხორციელდება ორი სვეტით. თითოეულ მათგანს თავისი უპირატესობა და ნაკლოვანება აქვს. NH_2 სვეტზე ხდება სხვადასხვა ნაერთების გადაფარავა, ხოლო C-18-ზე კი არ ხდება სტევიოზიდის და რებაუზიდის A-ს დაყოფა, მეორე მხრივ C_{18} სვეტი უფრო რეგენირებადია და გამოსადეგია სერიული განსაზღვრებისათვის.

სქემა № 1.

სტევიას ტერპენოიდური და ფენოლური ნაერთების დაყოფის სქემა



(ნივთიერება 1;2;3;4)

5. ფენოლური ნაერთების კვლევის მეთოდები

ფერმენტთა ინაქტივაციის მიზნით მცენარეულ ნიმუშებს ვაფიქსირებდით წყლის ორთქლით 1 წუთის განმავლობაში. შემდგომ ვაშრობდით ოთახის ტემპერატურაზე და ვაქუცმაცებდით. ფლავონოიდების ექსტრაქციას ვახდენდით 80 %-იანი ეთანოლით, ხოლო კატექინების და ლეიკოანტოციანების – ეთილაცეტატით (სქემა №2)3.

ექსტრაქცია მიმდინარეობდა წყლის აბაზანაზე უკუმაცივარით. ექსტრაქტებს ვაკონცენტრირებდით ვაკუუმის პირობებში. სპირტის აორთქლების შემდეგ დარჩენილ წყლიან ხსნარს ვამუშავებდით ქლოროფორმით ქლოროფილის, კაროტინოიდების და სხვა ლიპოფილური ნაერთების მოშორების მიზნით. დიეთილეთერით დამუშავებისას კი ეთერში გადადის ფენოლკარბონმჟავები.

ფლავონოიდური ნაერთების გამოყოფას და ფრაქციონირებას ვახდენდით პოლიამიდის, სილიკაგელის და სეფადექს LH – ის სვეტებზე, სილიკაგელისა და ცელულოზას თხელ ფენაზე. სვეტისათვის ვიყენებდით ხარკოვის გაერთიანება „Здоровье“ – ს მიერ დამზადებულ პოლიამიდს, ჩეხური წარმოების სილიკაგელს და ცელულოზა ЛК- ს (chemapol). პოლიამიდის ხსნარის სუსპენზირებას ვახდენდით წყალში. სუსპენზია შეგვქონდა მინის სვეტში და ვრეცხავდით წყლით. ფლავონოიდების შემცველ წყლიან ხსნარს ვამატებდით მშრალ პოლიამიდს და დაგვქონდა სვეტზე. ფლავონოიდების დასაყოფად ვიყენებდით პოლიამიდის სვეტს, ელუაციისათვის წყლისა და მეთანოლის ნარევს, რომელშიც მეთანოლის კონცენტრაციას თანდათანობით ვზრდიდით.

ელუატის ფრაქციების თვისობრივი შემცველობის ანალიზი კეთდებოდა ,, C “ და ,, M “ მარკის (სანკტ – პეტერბურგის ქაღალდის

ფაბრიკა) ქრომატოგრაფიულ ქაღალდებზე, სილიკაგელის თხელფენოვან ფირფიტებზე Силуфол – 254 (ЧР), სილიკაგლის ფირფიტას წინასწარ ვააქტიურებდით 110^0C 1 სთ – ის განმავლობაში. ქაღალდზე და თხელ შრეზე ქრომატოგრაფირების დროს ვიყენებდით გამხსნელთა შემდეგ სისტემებს:

1. ქლოროფორმი – მეთანოლი – წყალი 26:14:3
2. ეთილაცეტატი – მეთანოლი 9:1
3. ბენზოლი – აცეტონი 1 : 1
4. ქლოროფორმი – მეთანოლი 6:1
5. ქლოროფორმი – მეთანოლი – მეთილეთილკეტონი 12:2:1
6. ბუთანოლი – ძმარმჟავა – წყალი 40:12:28
7. ბუთანოლი – ძმარმჟავა – წყალი 4:1:5
8. 2 % -იანი ძმარმჟავა
9. 15% -იანი ძმარმჟავა
10. ფენოლი გაჯერებული წყლით
11. ძმარმჟავა – მარილმჟავა – წყალი 5:2:3
12. ჭიანჭველამჟავა – მარილმჟავა – წყალი 5:2:3
13. ბუთანოლი – პირიდინი – წყალი 6:4:3
14. ბუთანოლი – ბენზოლი – პირიდინი - წყალი 5:1:3:3

ფლავონოიდების აღმოჩენის მიზნით, ქრომატოგრამებს გაშრობის შემდეგ ვაკვირდებოდით ულტრაიისფერ შუქზე, ალუმინის ქლორიდის 1 % -იანი ხსნარით ეთანოლში დამუშავებამდე და დამუშავების შემდეგ (ფლავონოიდები იძლევიან ყვითელ შეფერილობას). შემდგომში ქრომატოგრამას ვასხურებდით ვანილინის 1%-იან ხსნარს კონცენტრირებულ მარილმჟავაში (კატექინები და ლეიკოანტოციანები იძლევიან ნათელ წითელ შეფერვას). ერთნაირი შემადგენლობის მქონე ფრაქციებს ვაერთიანებდით, ვაორთქლებდით ვაკუუმში 40-60^0 C, რის შემდეგ

ვატარებდით დამატებდით ქრომატოგრაფირებას და ვახდენდით ქრომატოგრაფიულად ერთგვაროვანი ნაერთების გადაკრისტალებას. გამოყოფილი ნაერთების იდენტიფიკაციისათვის ვიყენებდით ანალიზის შემდეგ ფიზიკო – ქიმიურ მეთოდებს:

მჟავური ჰიდროლიზი. საკვლევი ნივთიერების 2 მგ – ს ვაცხელებდით 1 მლ 2N მარილმჟავას თანხლებით წყლიან აბაზანაზე 1 სთ – ის განმავლობაში. ჰიდროლიზის დასასრულ ვამოწმებდით თფქ მეთოდით. გაცივებული ნარევიდან ვახდენდით აგლიკონის კრისტალების გამოფილტვრას. ფილტრატს ვაშრობდით და ვახდენდით ნახშირწყლების იდენტიფიცირებას ქაღალდის ქრომატოგრაფირების მეთოდით გამხსნელთა სისტემაში: ბუთანოლი – პირიდინი – წყალი (6:4:3) და ბუთანოლი – ბენზოლი – პირიდინი - წყალი (5:1:3:3). ქრომატოგრაფირების შემდეგ ქრომატოგრამებს ვაშრობდით და ვასხურებდით ანილინფტალატის რეაქტივს, შესხურების შემდეგ ქრომატოგრამებს ვათავსებდით 105^0 C 5 წთ – ის განმავლობაში. ამ დროს შაქრები მჟღავნდებიან ყავისფერ და ვარდისფერ ლაქებად.

აგლიკონის ქრომატოგრაფირებას ვახდენდით სილიკაგელის ფირფიტაზე გამხსნელთა სისტემაში: ბენზოლი – მეთანოლი (4:1), ეთილაცეტატი – მეთანოლი (9:1), ქლოროფორმი – მეთანოლი – მეთილეთილკეტონი (12:2:1) (23, 25).

შაქროვანი ნაშთის ფლავონოლ – აგლიკონის მოლეკულასთან მიერთება მე -3 მდგომარეობაში განვსაზღვრეთ აზოტმჟავა ცირკონილთან და ლიმონმჟავასთან რეაქციების მიხედვით. ფლავონოლ -3 – გლიკოზიდს 1 მგ-ის რაოდენობით ვხსნიდით 10 მლ მეთანოლში, ვამატებდით 1 მლ აზოტმჟავა ცირკონილის და ლიმონმჟავას მეთანოლიან ხსნარებს. ხსნარს ვანზავებდით წყლით 50 მლ –მდე. უარყოფითი რეაქცია (ხსნარი რჩება გამჭირვალე)

მიუთითებს იმაზე, რომ ხსნარში ფლავონოლია, რომელსაც მესამე მდგომარეობაში ჩანაცვლებული აქვს შაქროვანი ნაშთი. დადებითი რეაქცია (ხსნარი იფერება ინტენსიურად ყვითლად) მიუთითებს იმაზე, რომ ფლავონოლს მე -3 მდგომარეობაში გააჩნია თავისუფალი ჰიდროქსილის ჯგუფი.

ფლავონოიდების სტრუქტურის დასადგენად ვიყენებდით უ.ი. სპექტროსკოპიას დიაგნოსტიკური დამატებებით, ფლავონოიდთა ძირითადი კლასების სპექტრები მეთანოლში იძლევა შთანთქმის ორ მაქსიმუმს: 240-285 ნმ-ზე, რომელიც დაკავშირებულია A ბირთვის შთანთქმასთან და 300 -350 ნმ -ზე - B ბირთვის შთანთქმასთან.

ფლავონოიდების ყოველი კლასი ხასიათდება ძირითადი და დამატებითი მაქსიმუმებით. ლიტერატურაში მრავლადაა ცნობილი და ნაპოვნი ემპირიული დამოკიდებულება ფლავონოიდის სპექტრალურ მახასიათებლებსა და სტრუქტურას შორის.

დიაგნოსტიკური დამატებები („გადახრის რეაგენტები“), რომლებიც გავლენას ახდენენ ქრომოფორულ სისტემაზე, გვაძლევენ საშუალებას ფლავონოიდებში განსაზღვროთ ფენოლური ჰიდროქსილის ჯგუფების განლაგება A და B ბირთვებში. მაგალითად, ფლავონების და ფლავონოლების სპექტრებში, რომლებიც შეიცავენ ჰიდროქსილს ჯგუფს ნახშირბადს C-4 ატომთან, ნატრიუმის მეთილატთან იწვევს ბატოქრომულ გადახრას I ზოლთან 45-65 ნმ-ზე. ფლავონოიდების C-7 ატომთან ჰიდროქსილის ჯგუფის არსებობის აღმოჩენა ხდება ნატრიუმის აცეტატის დამატებისას I I ზოლთან მცირე ბატოქრომული გადახრით (5-20ნმ). ორთო -დიოქსიჯგუფების არსებობა ფლავონების და ფლავონოლების B ბირთვში შეიძლება დავადგინოთ 12-36 ნმ-ით ბატოქრომული გადახრით ბორის მჟავას (H_3BO_3) დამატებსას. ალუმინის ქლორიდის დამატებისას I ზოლში ბატოქრომული გადახრა 35 -55 ნმ

მიუთითებს ფლავონოლების და ფლავონოლ -3-გლიკოზიდების მოლეკულის მე -5 ატომთან თავისუფალი ჰიდროქსილის ჯგუფის არსებობაზე, ამასთან ეს გადახრა არ იცვლება მარილმჟავას დამატებით. ამით შეიძლება განვასხვაოთ 3-გლიკოზიდები აგლიკონებისაგან.

ულტრაიისფერ სპექტრს ვიღებდით სპექტროფოტომეტრზე Becman (USA).

კომპლექსწარმომქმნელ და მაიონიზირებელ საშუალებად ვიყენებდით $AICI_3$-ის 10 %-იან ხსნარს მეთანოლში (1 წვეთი 2,5 მლ –ში, სპექტრს ვიღებდით 5 წუთის შემდეგ), მარილმჟავას განზავებულ ხსნარს (50 მლ HCI 100მლ წყალში, 3 წვეთი 2,5 მლ-ში) და გალღობილი ნატრიუმის აცეტატის გაჯერებულ ხსნარს მეთანოლში (13 წვეთი 2,5 მლ –ში სპექტრს ვიღებდით 10 წთ – ის შემდეგ).

ლეიკოანტოციანების აღმოჩენის მიზნით ვიყენებდით მათი ანტოციანებში გარდაქმნის მეთოდს. საკვლევ ხსნარს ვაცხელებდით 2 N HCI-ის თანაობისას 20 წთ – ის განმავლობაში. მიღებულ სარეაქციო ნარევს, რომელსაც მუქი – ვარდისფერი შეფერილობა აქვს, ვაცივებდით და ვახდენდით ქრომატოგრაფირებას ცელულოზის ფირფიტაზე გამხსნელთა სამ სისტემაში: ძმარმჟავა – მარილმჟავა – წყალი (30:3:10), ჭიანჭველამჟავა – მარილმჟავა – წყალი (5:2:3) და ბუთანოლი – ძმარმჟავა – წყალი (4:1:5). სპექტრალური კვლევისათვის ანტოციანების ზოლებს ვაცილებდით ფირფიტიდან და ვუკეთებდით ელუციას 10 მლ 0,1N მარილმჟავა მეთანოლით, დაბალ ტემპერატურაზე. მეთანოლიანი ექსტრაქტების სპექტროფოტომეტრირებას ვახდენდით ხილულ არეში.

ლეიკოანტოციანების რაოდენობის განსაზღვრას ვახდენდით ლეიკოანტოციანიდური რეაქტივით (95).

ზოგიერთი ნივთიერების იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებული იქნა ბირთვულ – მაგნიტურ რეზონანსული სპექტროსკოპიის მეთოდი (მოლეკულური კვლევის სამეცნიერო ცენტრი, სომხეთი).

გარდა ტერპენოიდებისა და ფენოლური ნაერთებისა სტევიას ფოთლის კვლევისას შესწავლილი იქნა ზოგიერთი სხვა კლასის ნაერთები:

L- ასკორბინის მჟავას განსაზღვრას ვაწარმოებდით ტილმანსის მეთოდით 2,6-დიოქლორფენოლინდოფენოლის საღებავის გატიტვრით (15), ასევე ჩვენს მიერ ადაპტირებული მაღალი წნევის სითხოვანი ქრომატოგრაფირების მეთოდით.

-ამქროლავ კომპლექსში შემავალი ნაერთების ანალიზი ტარდებოდა აირ - სითხური ქრომატოგრაფიის გამოყენებით.

-ნახშირწყლები და ორგანული მჟავები შეისწავლებოდა - ქრომატოგრაფიული მეთოდებით.

-ვიტამინები: L – ასკორბინის მჟავა – ქრომატოგრაფიული მეთოდით;

B_1 (თიამინი) - ფლუორიმეტრული მეთოდით (ერმაკოვი 1987);

B_2 (რიბოფლავინი) - ფლუორიმეტრული მეთოდით (ერმაკოვი 1987);

E (ტოკოფეროლი) – რიხტერის მეთოდით (რიხტერი 1976);

PP (ნიკოტინის მჟავა) – სტეპანოვის მეთოდით (ერმაკოვი 1987);

-კაროტინოიდები - ქრომატოგრაფიული და სპექტრალური მეთოდებით.

-მინერალური ნივთიერებები განისაზღვრა დანაცვრის მეთოდით, ხოლო ინდივიდუალური ნაერთები კი როგორც ქიმიური, ასევე ატომურ – ადსორბციული და სპექტრო - ფოტომეტრული მეთოდებით (Ермаков 1987г.).

ფიზიკო-ქიმიური კვლევები ტარდებოდა შემდეგი ხელსაწყოების გამოყენებით:

- მაღალი წნევის სითხოვანი გრადიენტული ქრომატოგრაფი Beckman 332 (USA);

- სპექტრალური ანალიზი - სპექტროფოტომეტრი Millipore - Waters;

- ზოგიერთი ნივთიერების იდენტიფიცირებისათვის გამოყენებული იქნა ბირთვულ – მაგნიტურ - რეზონანსული სპექტროსკოპი (Mercuri - aSS).

- ატომურ – ადსორბციული სპექტრო - ფოტომეტრი (Hitachi –იაპონია).

- აირ -სითხური ქრომატოგრაფი Xrom-4 (ჩეხოსლოვაკია).

ცდები ტარდებოდა 1992 – 2001 წლებში მიღებულ მოსავალზე 4 – ჯერადი განმეორებით. მიღებული შედეგები დამუშავდა სტატისტიკურად (17).

6. ტკბილი დიტერპენური ნაერთები

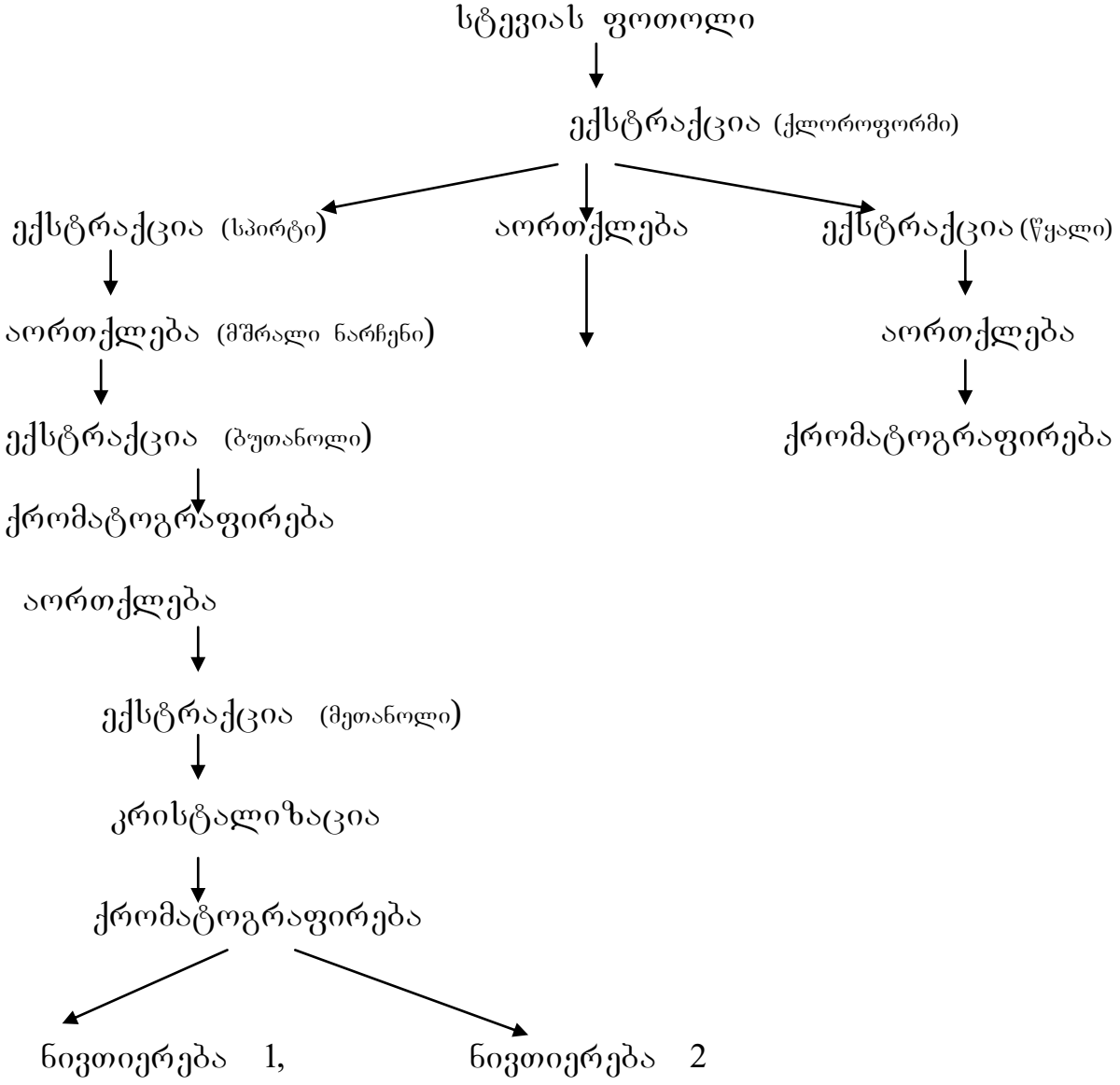
სტევიას კულტურის მიმართ ინტერესი და მისი ფართო გავრცელება განპირობებულია ინტენსიურად ტკბილი გემოს მქონე ნაერთების შემცველობით, რომლებიც ძირითადად წყალში ხსნადი რვა დიტერპენური გლუკოზიდის: სტევიოზიდის, სტევიოლბიოზიდის, დულკოზიდების და რებაუდიოზიდების სახითაა წარმოდგენილი. მათი აგლიკონი სტევიოლია (13 – ჰიდროქსი, ენტ –კაურენ -16, 18-კარბომჟავა), ამ ნაერთთაგან რაოდენობრივად ძირითადია: სტევიოზიდი (13-0-β-D-გლუკოპირანოზილ (1 – 2)-β-D-გლუკოპირანოზილ, 19- ოქსო -0- β -D გლუკოპირანოზილ, ენტ–კაურენ -16) და რებაუდიოზიდი A (13-0-β-D-გლუკოპირანოზილ - (1 – 2) –0-β- D - გლუკოპირანოზილ (1-3)-0-β –D-გლუკოპირანოზილ, 19- ოქსო -0- β -D გლუკოპირანოზილ, ენტ -კაურენ -16). როგორც სახელწოდებიდან ჩანს, აგლიკონ – სტევიოლთან C_{13} და C_{19} მდგომარეობაში მიერთებულია გლუკოზა, პირველ შემთხვევაში ერთი, ხოლო მეორეში ორი (სოფოროზა) ან სამი მოლეკულა (ნახ. № 6). ეს ნაერთები 50-400-ჯერ ტკბილია, ვიდრე საქაროზა. სტაბილურებია გაცხელების, pH –ის ცვლილების მიმართ, ნახშირორჟანგით გაჯერებულ სასმელებში და სხვა. მათ გააჩნიათ ანტისეპტიკური თვისებები და მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში გამოიყენება საკვები დანამატის სახით, როგორც დიაბეტისა და სიმსუქნის საწინააღმდეგო პროფილაქტიკური საშუალება.

სტევიას ფოთლის ტკბილი ტერპენოიდური გლიკოზიდური ნაერთების კვლევას ვახდენდით შემდეგი სქემის მიხედვით (სქემა №3) (3,8,10,50). ფოთლის ექსტრაქციას ვახდენდით წყლით ან სპირტით 3-ჯერადად, ნიმუშის და გამხსნელის 1:100 თანაფარდობის პირობებში. მიღებულ ექსტრაქტებს გაფილტვრის შემდეგ ვაკონცენტრირებდით. ვამუშავებდით მეთანოლით,

იზობუთანოლით ან ვახდენდით ქრომატოგრაფირებას პოლიამიდის, სილიკაგელის და სეფადექსი (LH-20) სვეტზე. ქაღალდზე, სილიკაგელისა და ცელულოზის თხელ ფენაზე ქრომატოგრაფირებით ვაკონტროლებდით ექსტრაქციის სისრულეს და პრეპარაციის სისუფთავეს. ელუაციისათვის ვიყენებდით წყლისა და სპირტის, ასევე ქლოროფორმისა და სპირტის ნარევს, რომლებშიც სპირტის კონცენტრაცია თანდათანობით იზრდებოდა.

სქემა № 3.

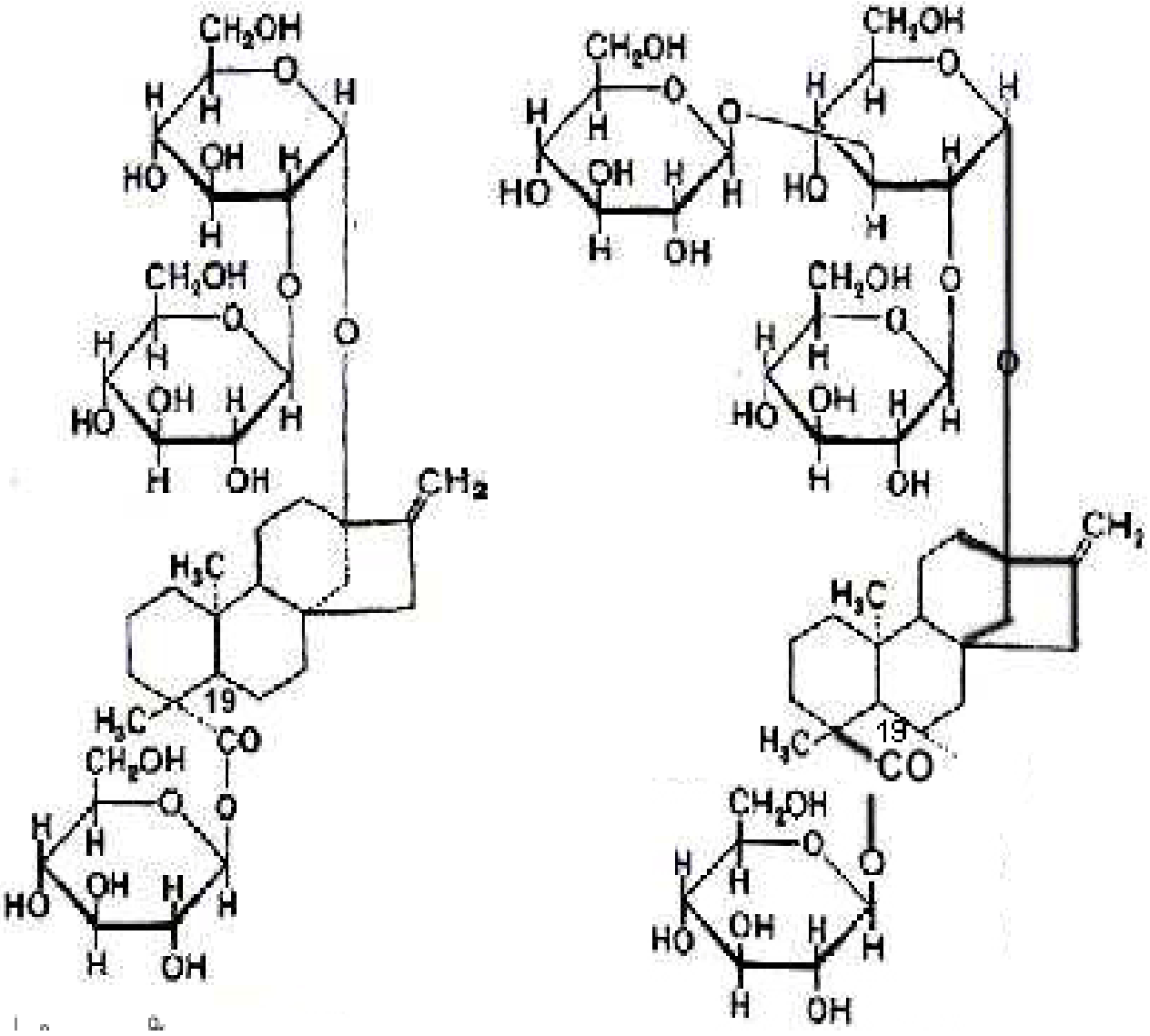
სტევიას ტერპენოიდური და ფენოლური ნაერთების დაყოფის სქემა



ფრაქციების თვისობრივი ანალიზი ტარდებოდა „C“ და „M“ მარკის ქრომატოგრაფიულ ქაღალდზე. სილიკაგელის თხელფენოვან ფირფიტაზე, (Merk, GEP.) ფირფიტას წინასწარ ვაცხელებდით 110^0 C-ზე 1სთ-ის განმავლობაში.

ქრომატოგრაფირებისას გამხსნელებად ვიყენებდით:

1. ქლოროფორმი - მეთანოლი – წყალი (30 : 20 : 4).
2. ეთილაცეტატი -იზოპროპანოლი -n-ბუთანოლი -წყალი. (20:12:7:6).



სტევიოზიდი

რებაუდიოზიდი A

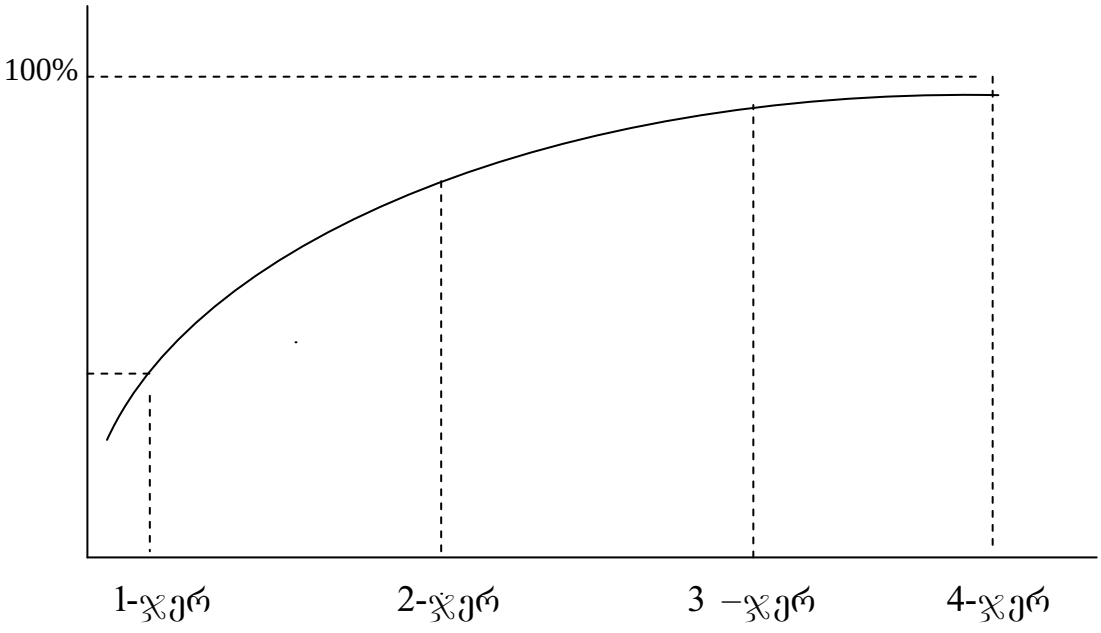
ნახ. № 6. სტევიას ძირითადი დიტერპენური გლიკოზიდების სტრუქტურული ფორმულები

ტერპენოიდური ნაერთების შესწავლისას ვიყენებდით მაღალი წნევის სითხოვანი ქრომატოგრაფირების მეთოდის შესაძლებლობებს. ქრომატოგრაფირებას ვახდენდით ქრომატოგრაფზე Beckman (USA), დეტექტორით Millipore, Waters 210 ნმ. ქრომატოგრაფიული სვეტი: Bordapac C_{18}; Bordapac NH_2.

გამხსნელთა სისტემები :

1. მეთანოლი - წყალი (65 : 35)
2. აცეტონიტრილი - წყალი (85 : 15)
3. აცეტონიტრილი – წყალი (40 : 60)

სტევიას ფოთოლს (5გ) ვაქუცმაცებდით, ვამუშავებდით სოქსლეტის აპარატში, ქლოროფორმით (300 მლ) 2საათის განმავლობაში, შემდეგ მეთანოლით (300 მლ) 5 საათს, შემდეგ წყლით (30 მლ). მიღებულ ექსტრაქტებს ვფილტრავდით და ვაკონცენტრირებდით ვაკუუმის პირობებში. ქლოროფორმიანი და წყლიანი ექსტრაქტები ტკბილ დიტერპენურ გლიკოზიდებს არ შეიცავენ. წყლიანი ექსტრაქტიც თავისუფალია ასეთი ნაერთებისაგან. დიტერპენული გლიკოზიდები სტევიას ფოთლიდან ექსტრაქტირდება სრულად სპირტის მეშვეობით.



ნახ. №7 ექსტრაქციის ჯერადობისა და ექსტრაქციის ხარისხს შორის დამოკიდებულება.

სპირტიანი გამონაწვლილი გარდა დიტერპენური გლიკოზიდებისა შეიცავს განსხვავებული კლასის ნაერთებს. ტერპენოიდების შემდგომი შესწავლისათვის საჭიროა ექსტრაქტის ქრომატოგრაფირება. სპირტიან ექსტრაქტს აორთქლებენ ვაკუუმის პირობებში ამოშრობამდე და ნარჩენს უტარდება ექსტრაქცია სპირტით. ექსტრაქციის სისრულე მოწმდება ქრომატოგრაფიულად (ნახ. №7). მშრალი ნარჩენიდან სპირტით 3 ჯერადი ექსტრაქციაა ოპტიმალური. სპირტიანი ექსტრაქტი საჭიროებს ამოშრობას და გადაკრისტალებას სპირტში სამჯერ. მიღებული თეთრი კრისტალები გავხსენით სპირტში (10 მლ), გავფილტრეთ მემბრანულ ფილტრში (0,45 მკრ) და ვაწარმოებდით მაღალეფექტურ თხელფენოვან ქრომატოგრაფირებას სილიკაგელის თხელ შრეზე (Merc), გამხსნელთა სისტემაში: ქლოროფორმი: მეთანოლი :წყალი (30:20:4). ქრომატოგრამას ვამჟღავნებდით 10 %-იანი გოგირდმჟავათი (ნახ.№8.)

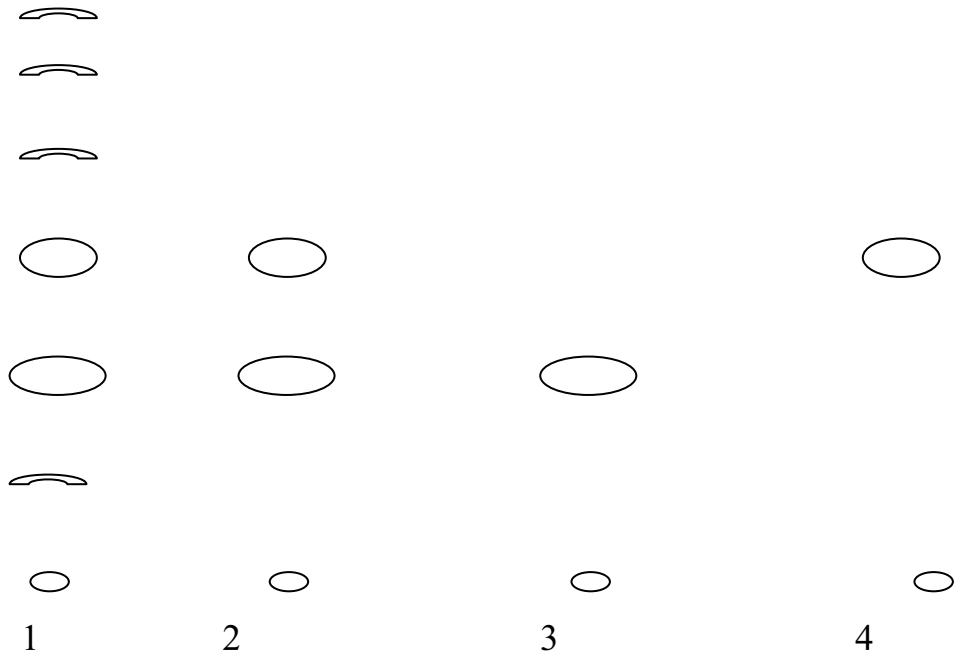
ცხრილი №1.

სტევიას ტკბილი ტერპენოიდური გლიკოზიდების ქრომატოგრაფიული დახასიათება

დასახელება	Rf-ის მნიშვნელობა ქლოროფორმი : მეთანოლი : წყალი 30:20:4	შეფერილობა H_2SO_4-ით დამუშავების შემდეგ
სტევიას ფოთოლი:	0,75	მუქი
	0,8	მუქი
რებაუდიოზიდი A	0,8	მუქი
სტევიოზიდი	0,75	მუქი

შესხურების შემდეგ ფირფიტას ვაცხელებდით 110^0 C-ზე და შემდგომ ვახდენდით დენსიდომეტრირებას 395 ნმ-ზე. ცხრილში მოცემულია ნაერთთა Rf-ის მნიშვნელობები და სხვა ქრომატოგრაფიული მახასიათებელი. ტკბილი დიტერპენოიდური გლიკოზიდების იდენტიფიკაცია შესაძლებელი გახდა ლიტერატურული მონაცემების და ავთენტურ ნივთიერებათა (სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდი) მახასიათებლების შეჯერებით. სტევიოზიდისათვის Rf –ის მნიშვნელობა 0,75, ხოლო რებაუდიოზიდის კი 0,80. გოგირდმჟავას შესხურება იწვევს

ქრომატოგრამაზე მუქი ლაქის წარმოქმნას. ამ ნაერთებისათვის ულტრაიისფერ არეში შთანთქმის მაქსიმუმი 210 ნმ-ს ფარგლებშია.



ნახ. № 8. თხელფენოვანი მაღალეფექტური ქრომატოგრამის სქემატური გამოსახულება, გამხსნელთა სისტემა: ქლოროფორმი : მეთანოლი : წყალი (30:20:4).

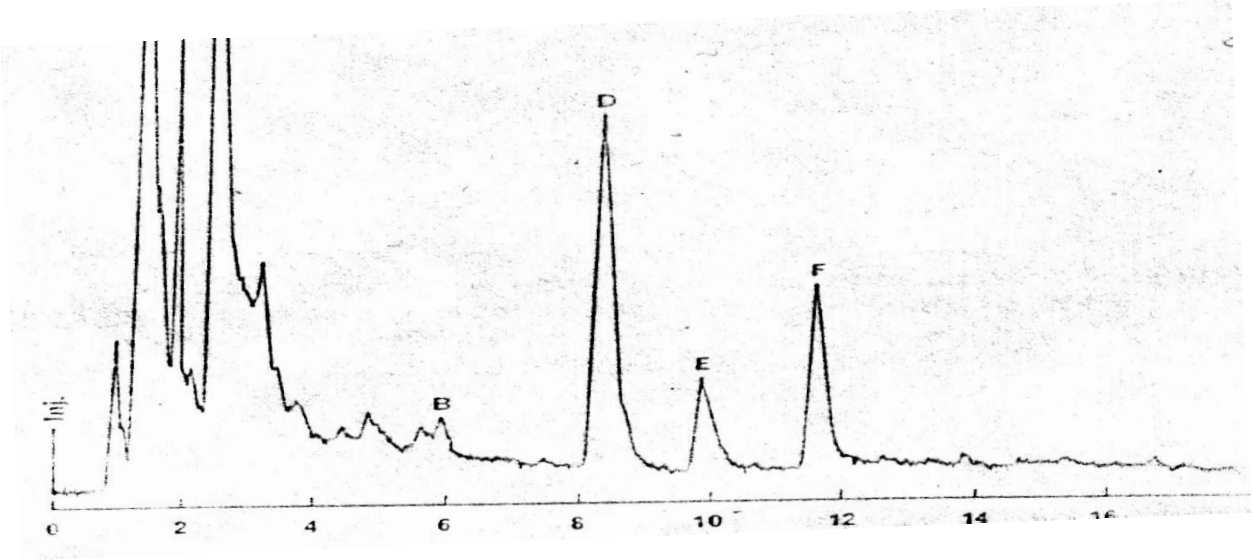
1. სტევიას სპირტიანი ექსტრაქტი
2.სტევიოზიდისა და რებაუდიოზიდის ნარევი
3. სტევიოზიდი: 4. რებაუდიოზიდი A

სტევიას ფოთლიდან სქემის მიხედვით გამოკრისტალებული პრეპარატი მაღალი წნევის ქრომატოგრაფირებისას, ქრომატოგრაფიური სვეტი : Bondapac NH_2, აცეტონიტრილი – წყალი (84 %), დეტექტირება 210 ნმ –ზე, იძლევა სულ მცირე ოთხი მკვეთრად გამოხატულ პიკს (ნახ. 3.1.4). ქრომატოგრამაზე მიღებული ნაერთების პიკების ავთენტიკურ დიტერპენული გლიკოზიდის პიკებთან და შეკავების დროთა შედარება (ნახ. №8, ცხრ. №.2) გვაძლევს საშუალებას პიკი B მივიჩნიოთ - დულკოზიდად A, პიკი C – სტევიოლად, პიკი E – რებაუდიოზიდად C, ხოლო პიკი F – რებაუდიოზიდად A.

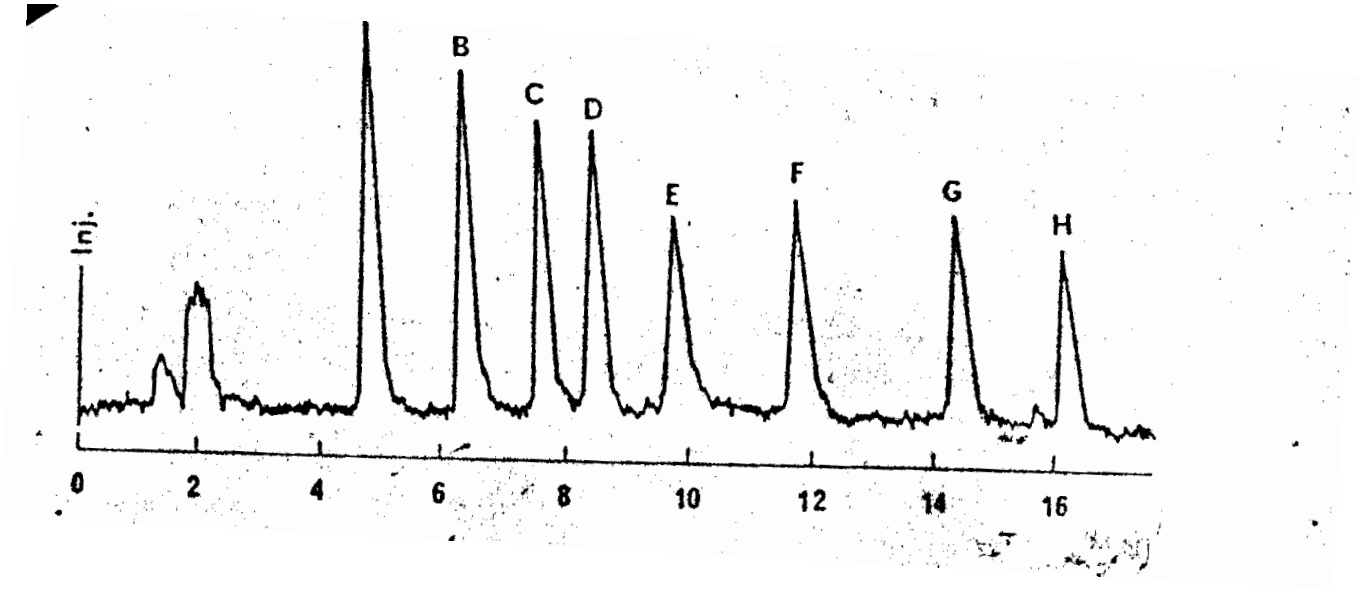
ცხრილი №.2

სტევიას დიტერპენული გლიკოზიდების ქრომატოგრაფიული დახასიათება (შეკავების დრო წუთებში)

№	ნივთიერება	ავთენტიკური ნივთიერება	სტევიას ფოთლის ექსტრაქტი	ჯამური პრეპარატი
1	სტევიოლბიოზიდი	4,5	-	-
2	დულკოზიდი A	6,5	6,6	6,5
3	რებაუდიოზიდი B	7,4	-	-
4	სტევიოზიდი	8,8	8,9	8,9
5	რებაუდიოზიდი C	10,1	10,0	10,2
6	რებაუდიოზდი A	11,9	11,8	11,8
7	რებაუდიოზდი E	14,2	-	-
8	რებაუდიოზიდი D	16,5	-	-



ნახ. №9 სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური ნაერთების ქრომატოგრამა, გამხსნელი სისტემა: აცეტონიტრილი – წყალი (84%), ქრომაროგრაფიული სვეტი Bondapac NH_2, დეტექტირება 210 ნმ-ზე.



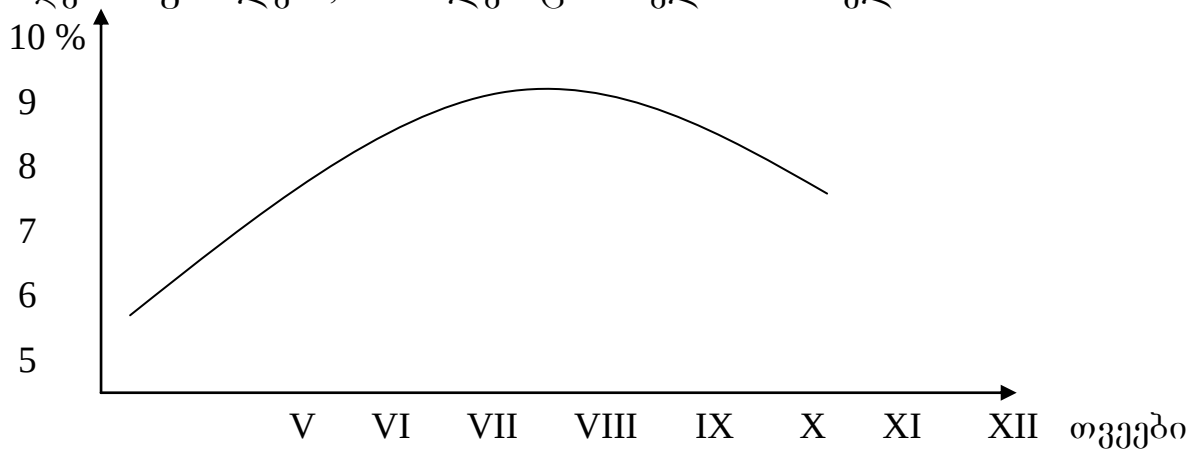
ნახ. №10 ავთენთიკური ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ქრომატოგრამა, A-სტევიობიოზიდი, B-დულკოზიდი A, C-რებაუდიოზიდი B, D-სტევიოზიდი; E-რებაუდიოზიდი C, F-რებაუდიოზიდი A, G-რებაუდიოზიდი E, H-რებაუდიოზიდი D.

100გ სტევიას ფოთლიდან შესაძლებელია 6,5-დან 7,5 გ-მდე ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის მიღება. დომინირებადი ნაერთები ასეთ პრეპარატში სტევიოზიდი და რებაუდიოზიდია. ერთ ჰა-ზე გადაანგარიშებით ეს შეადგენს 100 – 115 კგ – ს. პრეპარატის საქაროზაზე სულ მცირე 250 – ჯერ ტკბილი მაჩვენებლის შემთხვევაში შედეგი 25 – 30 ტონა საქაროზას ექვივალენტია.

სტევიას ტკბილი დიტერპენური ნაერთების განსაზღვრის ეფექტური მეთოდი - მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფირების მეთოდია, რომელიც იძლევა საშუალებას ჩატარდეს მათი თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზი.

7. ტკბილი დიტერპენული ნაერთების შემცველობა მცენარის სხვადასხვა ნაწილში და მათი ცვალებადობა ვეგეტაციის დროს

სტევიას დარგვა საქართველოს პირობებში ხდება აპრილში. ერთ ჰა-ზე ირგვება 50-70 ათასი ნერგი. სტევიას ფოთლის აღების ოპტიმალური პერიოდის განსაზღვრა მნიშვნელოვანია, რათა მიღებული მოსავალი და მასში ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების შემცველობა იყოს მაქსიმალური. მოსავლის აღების პერიოდში მცენარიდან აიღება 185 გ მიწისზედა მასა, რომლის 65 – 69 % ფოთლის მასაზე მოდის, დარჩენილი 31 -35 % კი ღეროა. ფოთლის გაშრობის შემდეგ რჩება 38 გ – ზე მეტი მშრალი მასა. სტევიას სხვადასხვა ნაწილში ტენის შემცველობა 65 – დან 80 - %-მდეა (ცხრ. 3.). ფოთლოვანი მასის ძირითადი მასა მე-7 და ქვედა ფოთლებითაა წარმოდგენილი. მოსავლის აღების პერიოდში მცენარის ზრდა – განვითარების ყველა ეტაპზე ფოთოლში გვხვდება ტკბილი გლიკოზიდები. მათი შემცველობა იზრდება ყვავილობის დაწყებამდე, შემდგომ კი ოდნავ კლებულობს (ნახ. №10), კლების ძირითადი მიზეზი მცენარეზე ხმობადი ფოთლებია, რომლებშიც ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების შემცველობა მნიშვნელოვნად მცირდება. ფოთლის ხმობა (გამუქება) იწყება მიწის ზედაპირთან ახლოს მდებარე ფოთლებიდან. ასეთი ფოთლების შემცველობა საბოლოო პროდუქტში მკაცრად განსაზღვრულია. ამიტომაც მოსავლის აღების ოპტიმალურ პირობად მცენარის ბუტონიზაციის პერიოდი შეიძლება ჩაითვალოს, რომელიც ემთხვევა ჩვენს პირობებში სექტემბერს. სექტემბრის შემდეგ მცენარეზე კვლავ ვითარდება ფოთლები, რომლებიც მთელი მოსავლის 20 – 30 %-ს



ნახ. № 11. სტევიას ფოთოლში ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ცვალებადობა ვეგეტაციის დროს.

ცხრილი №3.

სტევიას მიწისზედა მასის ტექნიკური მახასიათებლები

დასახელება	ნედლი ფოთლის წილი		მშრალი ფოთლის წილი		ნედლი ფოთლის ტენიანობა %-ში	ექსტრაქტულ ნივთიერება %-ში, მშრალ მასა გადაანგარ.
	გ - ში	%-ში მთელი მასიდან	გ-ში	%-ში მთელი მასიდან		
ყლორტი	4,5	2,4	0,95	1,9	79,9	53,8
მე-2-3 ფოთოლი	8,5	4,6	2,6	5,1	69,5	52,1
მე-4-6 ფოთოლი	18,5	10	5,3	10,4	71,4	49,8
მე-7-10 ფოთოლი	23,5	12,7	7,5	14,7	69,0	53,4
მე-10 და ქვედ ფოთოლი	14,5	7,8	5,2	10,2	65,0	53,5
გვერდითი ზედა ყლორტი	17	9,2	4,3	8,4	75,0	51,7
გვერდითი ქვედა ყლორტი	41,5	22,4	12,3	24,1	70,0	51,7
ღერო	57	30,8	12,8	25,1	78,0	19,5

შეადგენს და მასში ტკბილი ნაერთების შემცველობა თავდაპირველთან შედარებით 80 % - ს არ აღემატება.

მცენარე სტევიას სხვადასხვა ნაწილში ტკბილი ნაერთები არათანაბრადაა განაწილებული. მისი ძირითადი ნაწილი ზრდასრულ ფოთლებშია, რომლებიც მცენარის ბუტონიზაციის დროს მთელი მასის 35 %-მდეა. (ცხრილი № 3.). მასში ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების შემცველობა 14 – 15 %-ის ფარგლებშია. მცენარის ნაზი ფოთლები ამ ნაერთებს ნაკლები რაოდენობით შეიცავენ და ის 8,0 – 9,0 % - ის ფარგლებში მერყეობს, ხოლო ნაზი ღუყები ტკბილ დიტერპენულ გლუკოზიდებს უფრო ნაკლები 1,1 – 3,5 %-ის ოდენობით შეიცავენ. ფესვებში ტკბილი დიტერპენული გლუკოზიდების შემცველობა პრაქტიკულად ნულის ტოლია.

ცხრილი №4

ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების განაწილება მცენარის სხვადასხვა ნაწილში

ნივთიერება მცენარის ნაწილი	წილი მთელ მასაში				საერთო შემცველობა % მშ მას. გადაან.
	დულკოზიდი	რებაუდიოზიდი	რებაუდიოზიდი ჩ	სტევიოზიდი	
დუყი და პირველი ფოთოლი	-	0,38	0,05	0,57	1,1
მე – 2 – მე – 4 ფოთოლი	0,01	0,39	0,05	0,55	11,0
მე -5 – მე – 8 ფოთოლი	0,01	0,41	0,05	0,53	10,5
გვერდითი ზრდასრული ფოთლები	–	0,42	0,03	0,55	11,0
მე – 9 – მე -11 ფოთოლი	0,1	0,4	0,03	0,47	14,8
მე – 12 და ქვევითა ფოთოლი	-	0,3	0,01	0,49	14,6
ღერო	-	0,42	0,02	0,56	0,2
ფესვი	-	-	-	-	0

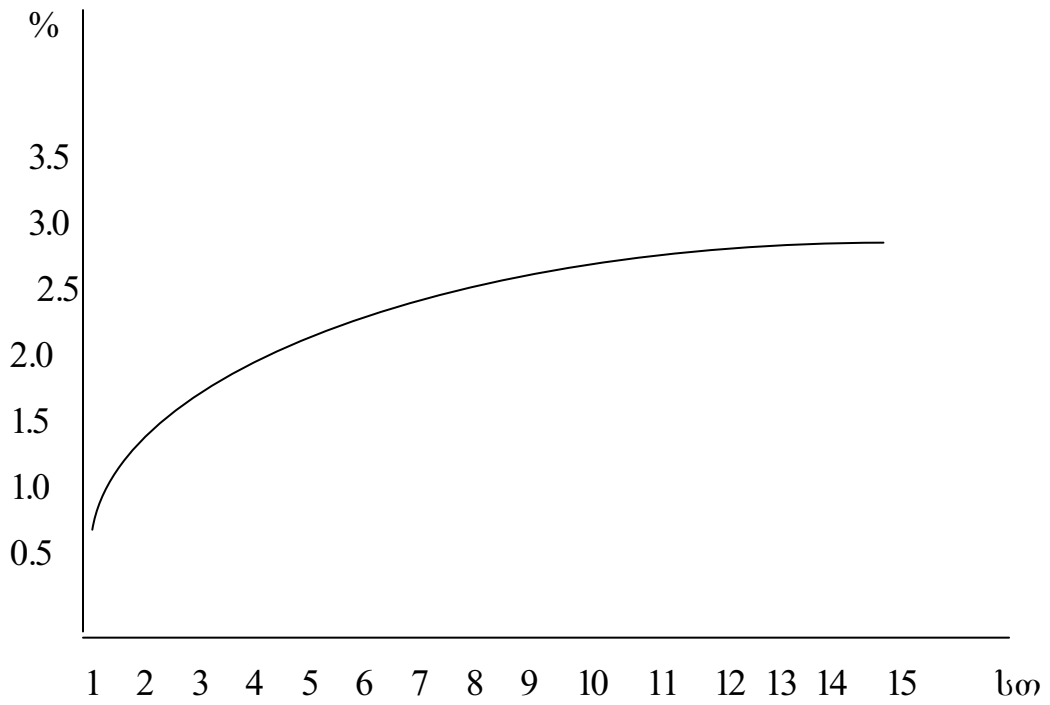
ღეროებში დაბალია ტკბილი გლიკოზიდების კონცენტრაცია, ამიტომაც ღეროები მათი შემდგომი გადამუშავებისათვის არ გამოიყენება (ღეროების მთლიანი მასა 40 %-მდეა). სტევიას ფოთლებში ექსტრაქტულ ნივთიერებათა რაოდენობასა და ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების შემცველობას შორის გარკვეული კორელაცია არსებობს, თუმცა ის ვერ გამოდგება ამ ნაერთთა ტესტირებისათვის. მაგალითად ღეროში ექსტრაქტულ ნაერთთა რაოდენობა 19, 5 %-ია, მაშინ როდესაც ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების შემცველობა კვალის სახითაა. ფოთლებში ექსტრაქტული ნივთიერებანი 49,0 – 54,0 %-მდეა, თუმცა ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების შემცველობა 1,1-დან 14,8 %-მდეა. სტევიას ტკბილი დიტერპენური ნაერთების მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფირების მეთოდით იძლევა საშუალებას

ჩატარდეს მათი თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზი. კვლევისას შესაძლებელი გახდა ინდივიდუალური ნაერთების რაოდენობები დაგვედგინა. ინტერესი ამ საკითხისადმი გაზრდილია იმით, რომ რებაუდიოზიდი A სტევიოზიდზე ტკბილია და ამავე დროს სიტკბოს უფრო სასიამოვნო აღქმას იწვევს. ტკბილი დიტერპენური ნაერთები მცენარეში არათანაბრადაა განაწილებული. მცენარის ყველა ნაწილში დომინირებადია სტევიოზიდი. იგი თითქმის ორჯერ მეტია ვიდრე რებაუდიოზიდი A. რაც შეეხება რებაუდიოზიდი C –ს და დულკოზიდს მათი შემცველობა ტკბილი დიტერპენური ნაერთების საერთო მასის 5 %-ს არ აღემატება.

სტევიას მოსავლის აღების მეთოდი, როდესაც კრეფენ ნაზ დუყებს არაა გამართლებული, რადგანაც ამით მართალია ნაწილობრივ იზრდება მოსავლის რაოდენობა, მაგრამ მცირდება ტკბილი დიტერპენური ნაერთების საერთო რაოდენობა, რაც უარყოფითად მოქმედებს მიღებული პროდუქციის ხარისხზე, გამოსავლიანობაზე და საბოლოო ჯამში წარმოებული პროდქციის თვითღირებულებაზე და კონკურენტუნარიანობაზე.

8. სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის მიღება

მთელს მსოფლიოში სტევიასადმი ინტერესი გამოწვეულია მასში ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების შემცველობით. ეს ნაერთები წყალში და სპირტში კარგად ხსნადები არიან. სტევიას ფოთლის ტკბილი ტერპენოიდური გლუკოზიდების ჯამური პრეპარატის მისაღებად სტევიას ფოთლის ექსტრაქცია ხდება წყლით (130,259), ასევე შესაძლებელია ორგანული გამხსნელებით. სტევიას ტკბილი დიტერპენური გლუკოზიდების ექსტრაგირება ფოთლიდან ხდება თბილი (40-45 ^{0}C) წყლით, წყალი -ნედლეული თანაფარდობა 10 : 1. ექსტრაქციის ხანგძლივობა 14-15 სთ-ია (ნახ. №12). თანაფარდობის და ტემპერატურის შემდგომი გაზრდა არ იწვევს რაიმე მნიშვნელოვან ცვლილებებს ხსნარში ექსტრაქტულ ნივთიერებათა კონცენტრაციის გაზრდის თვალსაზრისით. ექსტრაქცია უფრო ეფექტურია თუ ნედლეული წინასწარ დაქუცმაცდება 1-1,5 მმ ზომის ნაწილაკებად. ექსტრაქცია უფრო ეფექტურია თუ მას ე.წ. ბატარეული სისტემით ჩავატარებთ.



ნახ. №12. ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების გამოწვლილვაზე ნედლეულის ექსტრაქციის პირობების დამოკიდებულება.

ასეთ პირობებში შესაძლებელია ტკბილი ნაერთების მაქსიმალური გამოწვლილვა. სტევიასაგან მიღებული ექსტრაქტი შეიცავს განსხვავებული კლასის ნივთიერებებს, რომლებიც განსხვავდებიან როგორც მოლეკულური მასით და ზომებით, ასევე მოლეკულის ფიზიკური და ქიმიური თვისებებით.

დღეისათვის ძალზე დიდი გავრცელება ჰპოვა ტექნოლოგიებმა მემბრანული ულტრაფილტრაციის გამოყენებით. განსაკუთრებით გავრცელდა ასეთი ტექნოლოგიები ბიოლოგიურად აქტიური, თერმოლაბილური ნაერთების წარმოების დროს როგორც კვების მრეწველობაში, ასევე ფარმაცევტულ წარმოებაში. ულტრაფილტრაცია წარმოადგენს ნახევრად გამტარი მემბრანების მეშვეობით ჭეშმარიტი და კოლოიდური ხსნარების დაყოფასა და კონცენტრირებას შედარებით დაბალი წნევის პირობებში (1 მპა-მდე). როგორც ცნობილია ულტრაფილტრაცია არ მიმდინარეობს ფაზური ცვლილებების პირობებში, ამიტომაც მიღებული ნაერთების ბუნებრივი თვისებების ცვლილება პრაქტიკულად მინიმუმამდეა დაყვანილი. განსაკუთრებული გავრცელება ცელულოზის აცეტატისაგან დამზადებულმა მემბრანებმა ჰპოვეს (აცეტილირების სხვადასხვა ხარისხით).

როგორც წესი ულტრაფილტრაცია გამოიყენება არაერთგვაროვანი ხსნარების გასაფილტრავად, რომლებიც შეიცავენ, როგორც დაბალმოლეკულურ, ასევე მაღალმოლეკულურ ნაერთებს (300).

ულტრაფილტრაცია ხორციელდება გამდინარე რეჟიმში, როდესაც გასაფილტრ ხსნარზე მოქმედებს ოსმოსურ წნევაზე (P_0) ჭარბი წნევა (P). თუ ნახევრად გამტარი მემბრანე მაღალმოლეკულური ნაერთის მიმართ აბსოლუტურად სელექტიურია, მაშინ დაყოფის პროცესი წარიმართება ჭარბი წნევისა და ოსმოსური წნევის სხვაობის ხარჯზე. მემბრანები არ არიან იზოტროპულები ზედაპირზე ფორების ზომებით და ამიტომაც გახსნილი ნივთიერებების ნაწილი გადის ფილტრში. მაშინ ფილტრაცია წარიმართება შემდეგი ძალით:

$$P = P_1 - \Delta P \quad (127)$$

მემბრანის გამტარიანობა განისაზღვრება:

$$G = G_0 (P - \Delta P)$$

სადაც: G_0 - გამტარიანობის კონსტანტაა, ლ/მ^2

P_1 - ფილტრაციის წნევა, ატმ.

ΔP- ფილტრატისა და ხსნარის ოსმოსურ წნევებს შორის სხვაობა, ატმ.

დაყოფის პროცესის სელექტიურობის გაანგარიშება ხდება შემდეგნაირად:

$$F = \frac{C_1 - C_2}{C_1} 100\%$$

სადაც: C_1 - ხსნარში გახსნილი ნივთიერების კონცენტრაციაა, %-ში

C_2-გახსნილი ნივთიერების კონცენტრაციაა ფილტრატში, %-ში

ჩათვლილია, რომ ხსნარების ულტრაფილტრაციული მემბრანებით დაყოფისას, მემბრანის ფორებზე მეტი ზომის მოლეკულები რჩებიან ხსნარში, ე.ი. მათი კონცენტრაცია მატულობს, ხოლო ნაკლები ზომის მოლეკულები გადიან გამხსნელის ჭავლთან ერთად ფილტრატში.

ულტრაფილტრაციისას სელექტურობას და გამტარიანობის ძირითადი განსაზღვრელი ფაქტორებია ჰიდროდინამიკური პირობები, გასაფილტრი ხსნარების ტემპერატურა, ასევე გასაფილტრი ნაერთების ბუნება და კონცენტრაცია.

ულტრაფილტრაციით ხსნარების დაყოფის დროს შეკავებული ნაერთების დაგროვება ხდება მემბრანა-ხსნარი საზღვარზე. ეს მოვლენა ცნობილია კონცენტრაციული პოლარიზაციის სახელწოდებით და უარყოფითად მოქმედებს ნაერთთა გასუფთავებაზე. სასაზღვრო შრიდან ნაერთთა მოცილება ხდება ხსნარის მოძრავი ჭავლის მეშვეობით.

პრაქტიკულად ყველა მემბრანისათვის დადგენილია, რომ მემბრანის ზედაპირზე ჭავლის სიჩქარის გადიდება იწვევს გამტარიანობისა და

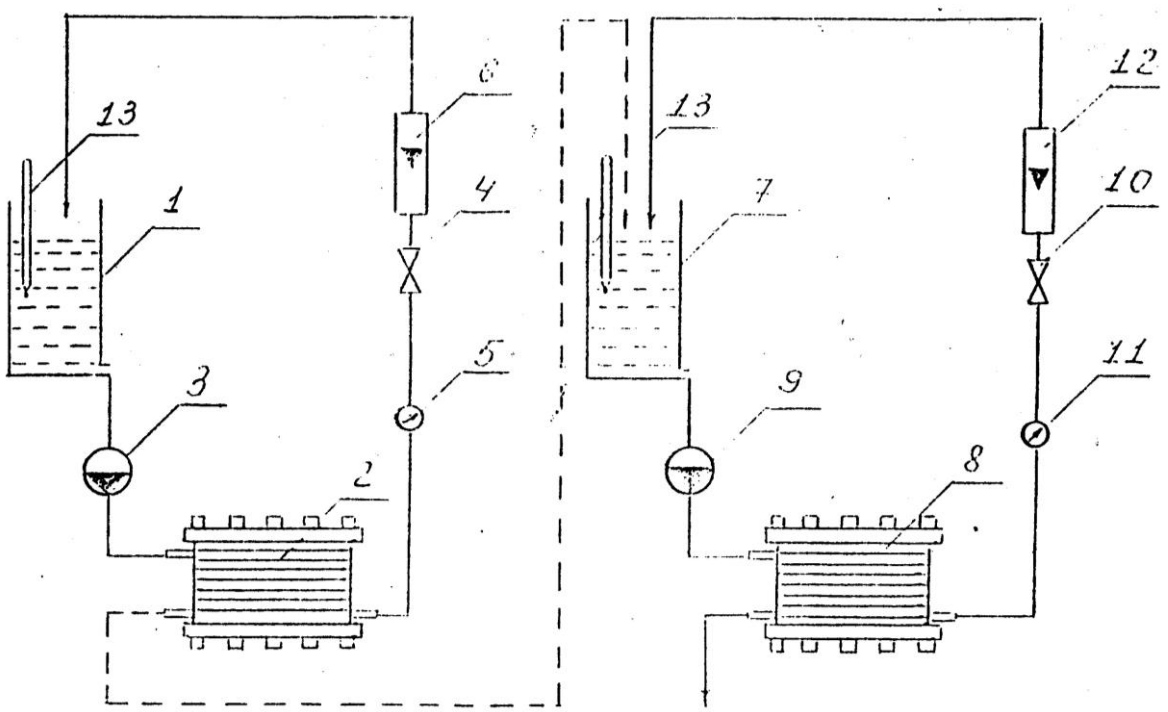
სელექტურობის გაზრდას. ეს კანონზომიერება ტურბულენტურობის გარკვეულ დონემდეა შენარჩუნებული.

ულტრაფილტრაციის დროს ერთ-ერთი განმსაზღვრელი პარამეტრი სამუშაო წნევაა. მუდმივი წნევის დროს გამტარიანობა თანდათანობით კლებულობს, ხდება მემბრანის შემჭიდროება. წნევის მატება იწვევს გამტარიანობის გაზრდას და ხშირ შემთხვევაში სელექტურობის შემცირებას, ამ უკანასკნელის მიზეზი კონცენტრაციული პოლარიზაციის ეფექტის გაზრდაა. ულტრაფილტრაციული მემბრანებრანისათვის 17-57 C^0 ტემპერატურულ დიაპაზონში გასაფილტრი ხსნარის გამტარიანობა იზრდება, ხოლო სელექტურობა უცვლელი რჩება. ხსნარის მაღალი კონცენტრაცია (54) ან მისი გაზრდა ფილტრაციის პროცესში უარყოფითად მოქმედებს უკუოსმოსური და ულტრაფილტრაციული მემბრანების გამტარიანობაზე. შემცირება გამოწვეულია ოსმოსური წნევის გაზრდის გამო გაყოფის მამოძრავებელი ძალების შემცირებით. ასეთ პირობებში სელექტურობა კონცენტრაციული პოლარიზაციის ეფექტის გაზრდის გამო მცირდება.

სტევიას ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების გამოსაყოფად საჭიროა ხსნარს ულტრაფილტრაციის პირველ საფეხურზე ჯერ მოსცილდეს ნივთიერებები, რომელთა მოლეკულური მასა მათ მოლეკულურ მასას აღემატება, ხოლო მეორე საფეხურზე კი ის ნივთიერებები, რომელთა მოლეკულური მასა ნაკლებია ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების მასაზე.

ექსპერიმენტები ჩავატარეთ ბრტყელ მოდულზე 0,04 $მ^2$ მუშა ფართობით. მემბრანის შესარჩევად გამოვიყენეთ პოლიმერები სხვადასხვა საფუძველზე: აცეტატცელულოზა, პოლისულფონამიდი, პოლიამიდი, პოლიკარბონატი და სხვა.

ნახაზზე წარმოდგენილია ლაბორატორიული ორსაფეხურიანი ულტრაფილტრაციული დანადგარი (ნახ. №13). ავზიდან (1) ექსტრაქტი ხვდება მოდულებში (2) ტუმბო-დოზატორების (3) მეშვეობით.

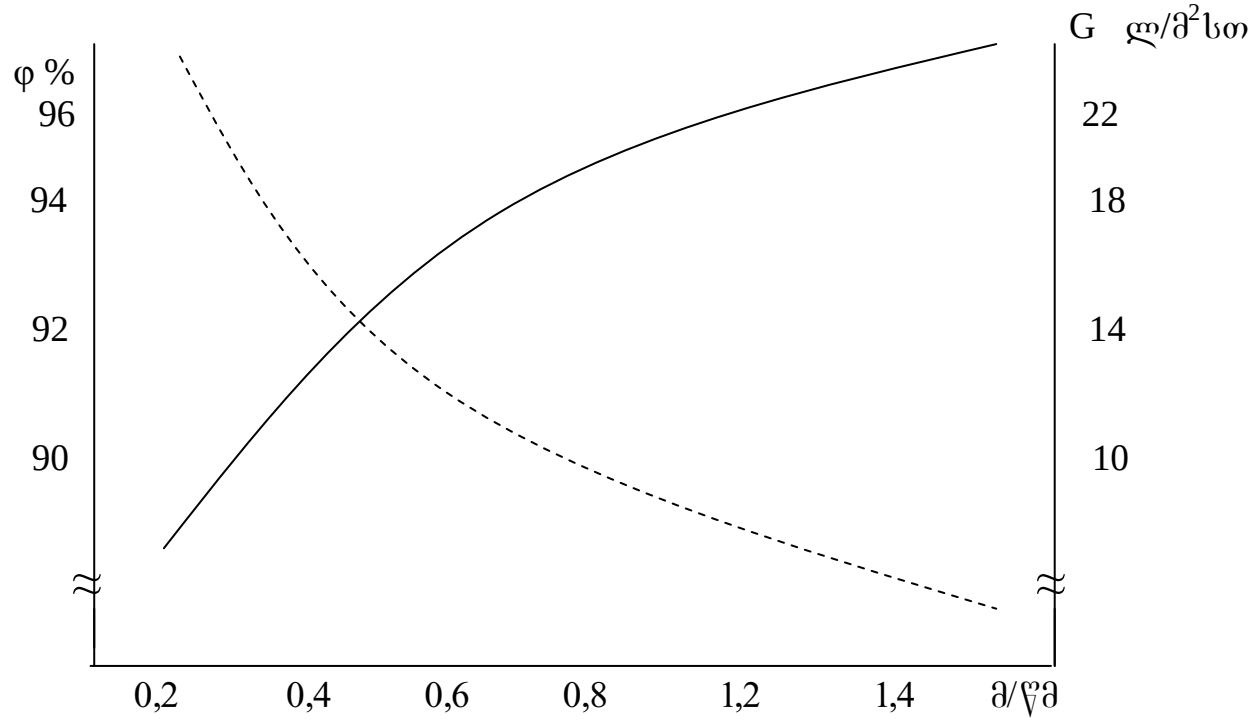


ნახ. №13. ლაბორატორიული ორსაფეხურიანი ულტრაფილტრაციული დანადგარის სქემა.

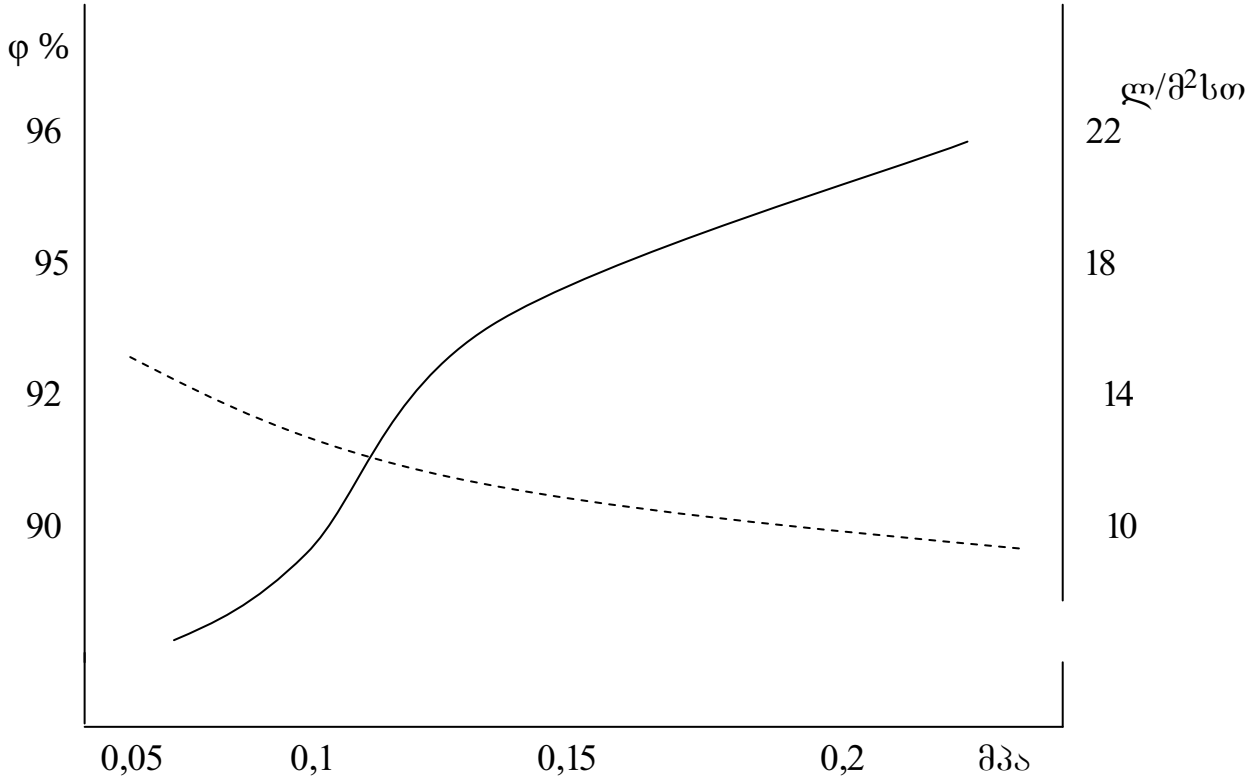
1,7 - ჭურჭელები; 2,8 - საფილტრაციო მოდულები; 3,9 - ტუმბოები; 4,10 - ვენტილები; 5,11 - მანომეტრები; 6,12 - როტატომეტრები; 13 – თერმომეტრი.

მემბრანის ზედაპირზე წნევის და ექსტრაქტის ტემპერატურის გაზომვა ხდებოდა შესაბამისად მანომეტრებით (4) და თერმომეტრებით (5). წნევის რეგულირება ხდებოდა ვენტილების (6) მეშვეობით. ფილტრატი გროვდება მიმღებებში (7,8). მემბრანათა მწარმოებლობის დადგენას ვახდენდით წამზომითა და ნიშანდებული ჭურჭლით, ხოლო სელექტურობის დადგენა ხდებოდა ფილტრატისა და კონცენტრატის ქიმიური ანალიზით.

ულტრაფილტრაციისათვის ერთერთი მნიშვნელოვანი მაჩვენებლის ჭავლის სიჩქარის გაზრდა (0,2 მ/წმ-დან 0,5 მ/წმ-მდე) დადებითად მოქმედებს მემბრანის მწარმოებლობაზე (თითქმის ორჯერ იზრდება), შემდგომი ზრდა მხოლოდ უმნიშვნელო ცვლილებებს იწვევს. ულტრაფილტრაციის მეორე სტადიაზეც მსგავსი სურათი გვაქვს. რაც შეეხება სელექტურობას ჭავლის სიჩქარის გაზრდა იწვევს ამ მაჩვენებლის შემცირებას. ჩვენს მიერ შერჩეულ იქნა ჭავლის სიჩქარის ოპტიმალური ინტერვალი 0,5-0,6მ/წმ, მეორე სტადიაზე კი 0,6-0,7მ/წმ. ჭავლის სიჩქარეზე სელექტურობისა და მწარმოებლობის დამოკიდებულება გამოხატულია ნახ. №14.



ნახ. № 14. ულტრაფილტრაციული მემბრანის გამტარიანობასა და სელექტურობაზე სტევიას ექსტრაქტის ჭავლის სიჩქარის დამოკიდებულება. —— გამტარიანობა, -----სელექტურობა



ნახ. № 15. სტევიას ექსტრაქტის წნევის დამოკიდებულება ულტრაფილტრაციული მემბრანის გამტარიანობასა და სელექტურობაზე. ——ამტარიანობა, ----სელექტურობა

ცნობილია, რომ ულტრაფილტრაციის დროს მემბრანაზე მომქმედი წნევის გაზრდა იწვევს სელექტურობის და ასევე მწარმოებლობის გაზრდასაც. სტევიას ექსტრაქტის ულტრაფილტრაციისათვის ოპტიმალური წნევა მიჩნეულია ინტერვალი 0,1-0,2 მპა, ფილტრაციის მეორე სტადიაზე კი წნევის მომატება უკეთეს შედეგებს იძლევა. ნახ. № 15 ნაჩვენებია მემბრანაზე მომქმედი წნევის დამოკიდებულება მწარმოებლობასა და სელექტურობაზე.

ნახევრად გამტარ მემბრანებში ულტრაფილტრაციის პროცესში მწარმოებლობაზე და სელექტურობაზე განსაკუთრებულ გავლენას ახდენს გასაფილტრი ხსნარის ტემპერატურა და კონცენტრაცია. სტევიას ექსტრაქტისათვის ფილტრაციის პირველ სტადიაზე ოპტიმალურ ტემპერატურად მიჩნეულია 18-20 ^{0}C, ხოლო მეორე სტადიაზე 20-22^{0}C. ხსნარის კონცენტრაციის მატება იწვეს როგორც მწარმოებლობის ასევე სელექტურობის შემცირებას.

ცხრილი № 5

სტევიას ფოთლის ექსტრაქტის ტკბილი დიტერპენული ნაერთები და მათი ცვალებადობა ულტრაფილტრაციის დროს
(% -ში მშრალ მასაზე განგარიშებით)

№	ნიმუშები ნივთიერება	სტევიას ექსტრაქტი	ულტრაფილტრაციის საფეხური	
			I საფეხური 1100A^0	II საფეხური 550A^0
1	სტევიოზიდი	1,9	6,9	24,1
2	რებაუდიოზიდი - A	1,1	3,9	12,7
3	რებაუდიოზიდი - C	0,15	0,5	2,0
4	დულკოზიდი	0,05	0,2	0,9
5	ჯამური შემცველობა	3,3	11,7	40,2

პირველი ფილტრაციისათვის შევარჩიეთ ფილტრები 1100 A^0 ფორის ზომებით, ხოლო მეორე ფილტრაციისათვის 550 A^0. პირველი ფილტრაციის შემდეგ მემბრანაში გარდა ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდებისა გადის სხვა დაბალმოლეკულური ნაერთებიც, თუმცა ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდები მაინც კონცენტრირდებიან 3,5 – 4 - ჯერ (ცხრ. № 5.) მეორე ფილტრაცია საშუალებას იძლევა ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდები დავაკონცენტრიროთ 50-80 %-მდე.

ცხრილი № 6.

სტევიას ექსტრაქტის ულტრაფილტრაციის პარამეტრები

ულტრაფილტრაციის საფეხური	ჭავლის სიჩქარე მ/წმ	წნევა მპა	ტემპერატურა, ^0C	ხსნარის კონცენტრაცია გ/ლ
ულტრაფილტრაციის პირველი საფეხური	0,5-0,6	0,1-0,2	18-20	<100
ულტრაფილტრაციის მეორე საფეხური	0,6-0,7	0,15-0,25	20-22	<200

სტევიას ექსტრაქტის ორსაფეხურიანი ულტრაფილტრაციის პარამეტრები მოცემულია ცხრილში №6, ხოლო მემბრანის დახასიათება მოცემულია ცხრილში №7.

ცხრილი № 7.

ულტრაფილტრაციული მემბრანის მახასიათებლები

ულტრაფილტრაციის საფეხური	ფორების ზომები A^0	კუთრი მწარმოებლობა ლ/მ^2. სთ	სელექტურობა %	დასაშვები ტემპერატურა ^0C
ულტრაფილტრაციის პირველი საფეხური	1100	15-17	90-95	5 – 40
ულტრაფილტრაციის მეორე საფეხური	550	15-17	4-5	5 – 40

სტევიას კონცენტრატი, რომელიც მიიღება ორსაფეხურიანი ულტრაფილტრაციის შედეგად შეიცავს ნივთიერებებს მოლეკულური მასით 550-1100 ნახშირბად ერთეული. ამ ნაერთებიდან ძირითადი წილი (45-80 %), სტევიას ტკბილ დიტერპენურ ნაერთებზე მოდის.

მისი შემდგომი გასუფთავება შესაძლებელი გახდა წარმოდგენილი სქემის მიხედვით (სქემა №3). კონცენტრატი საჭიროებს შემდგომ გასუფთავებას, გაუფერულებას და ნაერთთა გამოკრისტალებას, რისთვისაც ექსტრაქტს ვატარებდი კათიონიტსა და ანიონიტში. გასუფთავებულ ექსტრაქტს ვაკონცენტრირებდი ვაკუუმის პირობებში ან ვაშრობდი მფრქვევანა საშრობზე. ე.წ. „თეთრი

ცხრილი. № 8

სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის ორგანოლეპტიკური და ფიზიკო-ქიმიური დახასიათება

მაჩვენებლები	ნორმა	რეალურად
ფერი	თეთრი	თეთრი
გემო	ტკბილი	ტკბილი
სუნი	გარეშე დაუშვებელია	არა აქვს
სიტკბოს ინტენსივობა (გ საქაროზასთან შედარებით)	არა ნაკლებ 220	250
ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური რაოდენობა (%) არა ნაკლებ	90	95
წყალი % არა უმეტეს	5	4
სპირტის ნარჩენი რაოდენობა	არ დაიშვება	არ არის
წყალში ხსნადობა	სრული	სრული

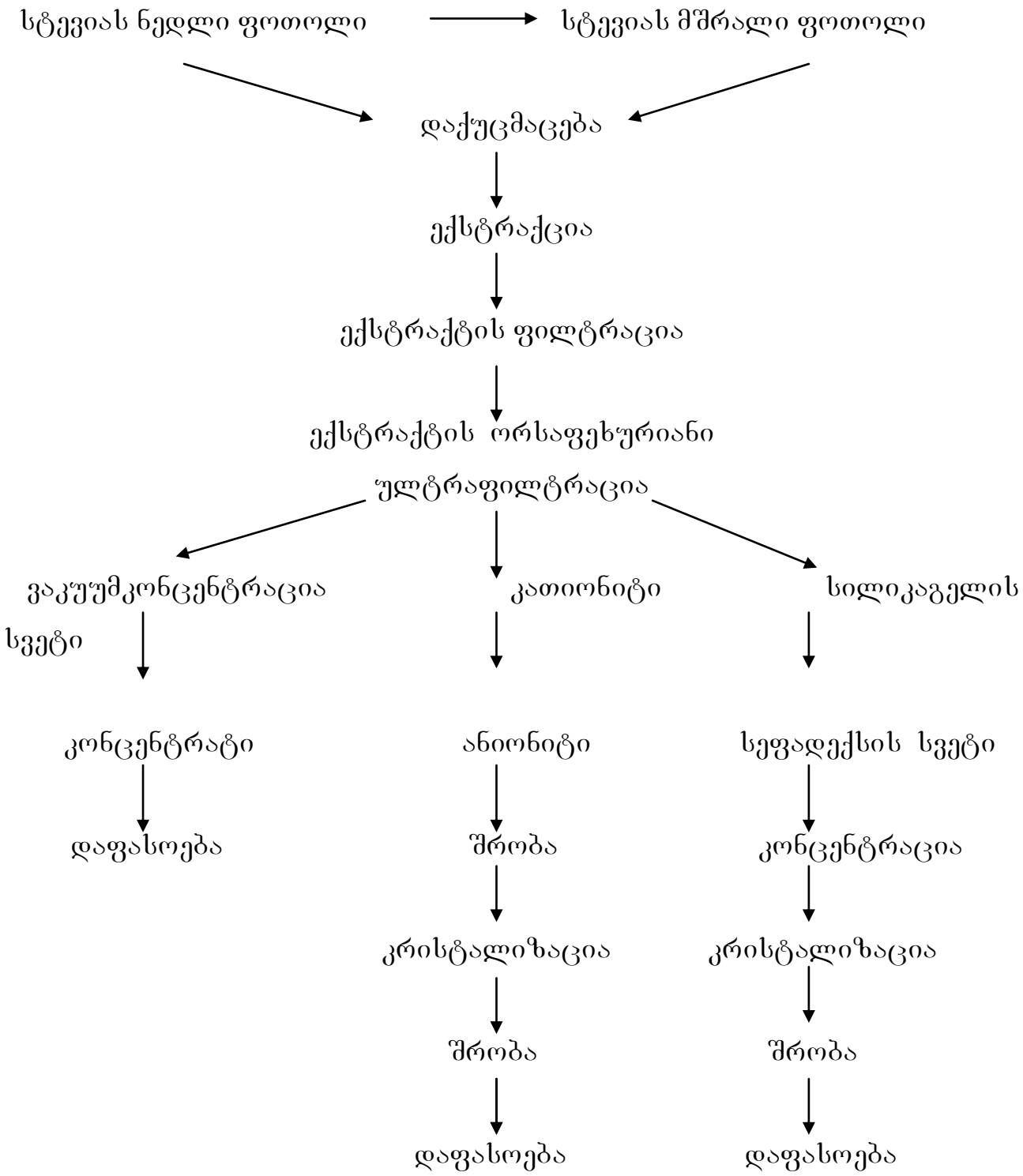
ცხრილი № 9

სტევიას მშრალი ფოთლის და მისგან მიღებული პროდუქტების თვითღირებულების გაანგარიშება

დანახარჯის დასახელება	ერთეულის ღირებულება (ლარი)	დანახარჯი 1 ჰა – ზე (ლარი)
ნერგის ღირებულება	0,10	6000
მოვლა – მოყვანა	2,0	3000
გაშრობა	0,10	150
მოსავლის ღირებულება	7,0	10500
დახარისხება	0,5	750
დაფასოება	0,5	750
დაფასოებული პროდუქცის ღირებულება	8,0	12000
1კგ ექსტრაქტის მისაღებად საჭირო ნედლეულის ღირებულება	28	
მშრალი ექსტრაქტის მიღება და გაშრობა	25	8750
მშრალი ექსტრაქტის საბითუმო ფასი	60	21000
თეთრი სტევიოზიდის ღირებულება	220	28600

სქემა № 3

სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის მიღების ტექნოლოგიური სქემა

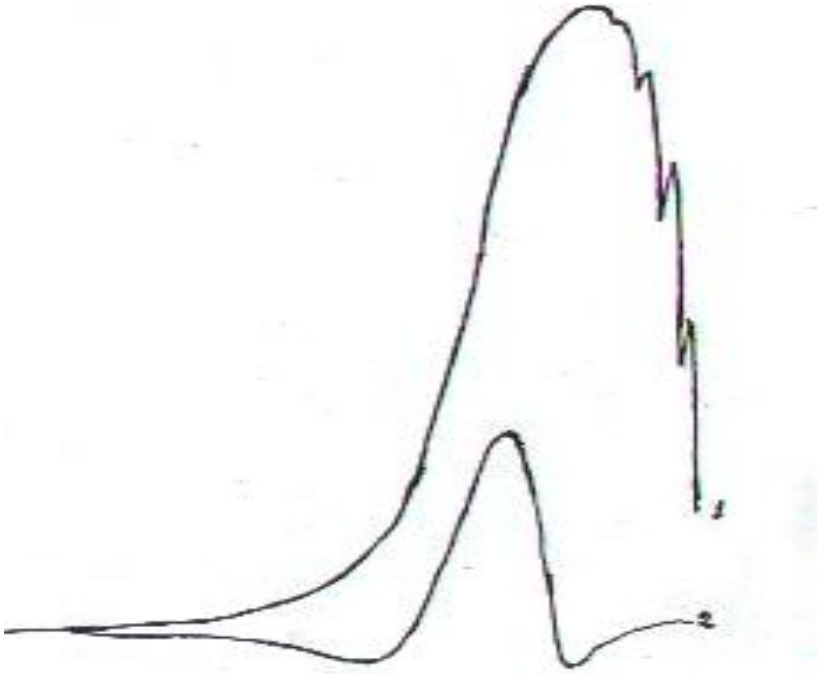


სტევიოზიდის“ მისაღებად საჭიროა პრეპარატის გადაკრისტალება სპირტში. მიღებულ კრისტალებს ვაშრობდი 60-70 ^{0}C ტემპერატურის პირობებში. სტევიას ფოთლისაგან მიღებული ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატი წარმოადგენს თეთრ კრისტალურ ნივთიერებას, ინტენსიურად ტკბილი გემოთი (ცხრ. № 9).
სილიკაგელის და სეფადექსი LH-20 სვეტზე ელუირებას ვახდენდით სპირტით. მე-3 და მე-4 ფრაქციებიდან კრისტალდება ინტენსიურად ტკბილი გემოს მქონე ნაერთები – ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამი (8, 10).
სტევიას ფოთლის და მისგან მიღებული პროდუქტების გამოყენება შესაძლებელია, როგორც ტკბილი დანამატისა.
სტევიას ფოთლისგან შესაძლებელია მივიღოთ 60 -70 % ექსტრაქტი. ე.ი. 3,3 -3,5კგ სტევიას მშრალი ფოთლისაგან შესაძლებელია 1კგ მშრალი ექსტრაქტის მიღება, რომელიც 80 – 90 –ჯერ ტკბილია ვიდრე საქაროზა. 1კგ ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის მიღება შესაძლებელია 12 - 14კგ მშრალი ფოთლისაგან. დღევანდელი ფასებით სტევიას მშრალი ფოთლის, მშრალი ექსტრაქტის და ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის თვითღირებულების გაანგარიშება გახდა შესაძლებელი (ცხრ. №9). საერთაშორისო ფასების გათვალისწინებით ჩვენში წარმოებული პროდუქცია კონკურენტუნარიანი იქნება. დღევანდელი ფასები 50 %-ით ნაკლებია.
ჩვენს მიერ მიღებული შედეგების შედარება ლიტერატურულ მონაცემებთან, ჰარაგვაიში, ჩინეთში და სხვა ქვეყნებში მოყვანილი სტევიას ქიმიურ მაჩვენებლებთან გვიჩვენებს, რომ საქართველოში ინტროდუცირებით სტევიას პრაქტიკულად არ დაუკარგავს თვისებები. ფოთოლში ტკბილი დიტერპენური ნაერთების შემცველობით ის ახლოსაა ჩინეთში მოყვანილ მოსავალთან. სტევია და მისგან მიღებული პროდუქტები შეიძლება გამოვიყენოთ სხვა დამატკბობელებთან კომპოზიციაში (91).

9. ტკბილი დიტერპენური ნაერთების განსაზღვრის ექსპრეს მეთოდი

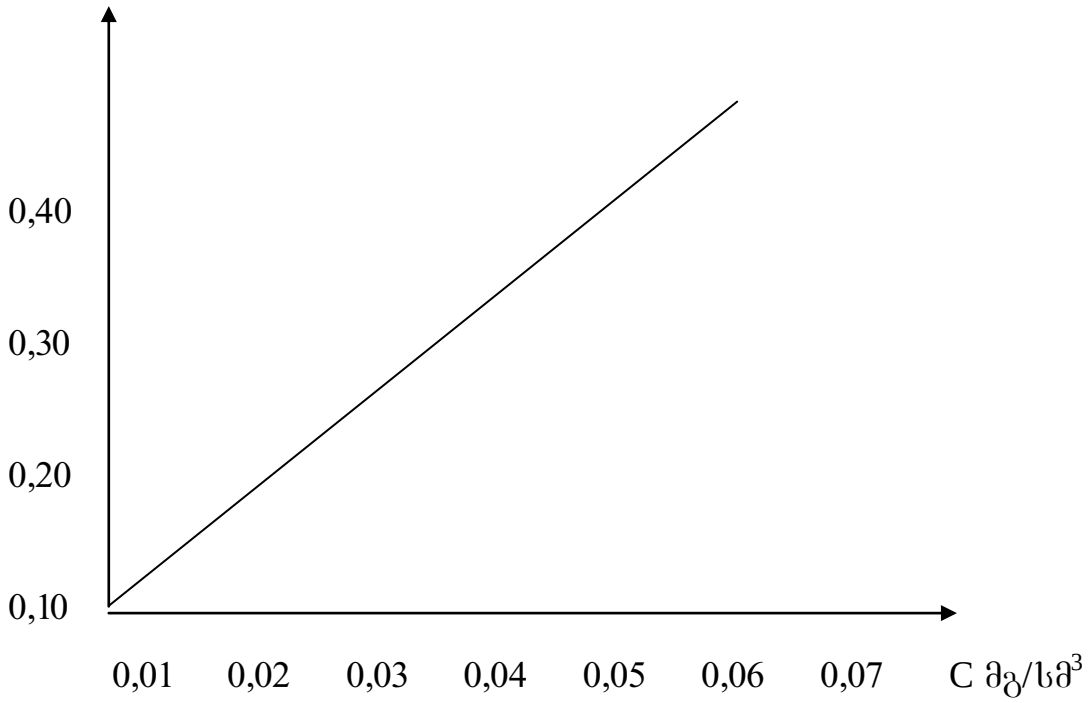
ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების განსაზღვრის ზუსტი მეთოდი ქრომატოგრაფირებაა, მაგრამ ეს მეთოდი მოითხოვს ძვირადღირებულ ტექნიკას და მაღალკვალიფიცირებულ სპეციალისტებს. საწარმოოს პირობებში ნედლეულის წინასწარი შეფასებისათვის მეთოდი მოუხერხებული იქნება, ამიტომაც შევეცადეთ გაგვემარტივებინა მეთოდი, განსაზღვრის სიზუსტის დონის შენარჩუნებით და ნიმუშის შემოწმების დროის შემცირებით. ყოველივე საშუალებას იძლევა ანგარიშწორება ფერმერთან ოპერატიულად მოხდეს.

სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების მასური წილის განსაზღვრის საფუძვლად ავიღეთ ის გარემოება, რომ მასში შემავალი ნაერთების შთანთქმის მაქსიმუმები უი. შუქის არეში 210 ნმ-ია (ნახ. № 15). საკვლევი ნიმუშებიდან ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების მოცილების შემდეგ ნარჩენი პრაქტიკულად არ შთანთქავს 210 ნმ-ზე.



ნახ. № 16. სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის ულტრაიისფერი სპექტრი.
1. + მეთანოლი; 2. + წყალი.

დიტერპენური გლიკოზიდების მასური წილის განსაზღვრისათვის საანალიზო ნიმუშს ვაქუცმაცებდით ისე, რომ დაქუცმაცებული ნაწილაკები გადიოდეს 1მმ დიამეტრის მქონე საცერში. ვიღებდით 1გ (ზუსტი მასა) საანალიზო ნიმუშს, ვათავსებდით 100 სმ^3 ტევადობის მრგვალძირა კოლბაში, ვამატებდით 50 სმ^3 წყალს (4). კოლბას ვაერთებდით უკუმაცივარს და ვაჩერებდით მადუღარა წყლის აბაზანაზე 2 საათს, გამონაწვლილს ფილტრავდით. ექსტრაქციას ვიმეორებდით 3-ჯერ თითო–საათის განმავლობაში. გაფილტრულ ექსტრაქტებს ვაერთიანებდით, ვაცენტრიფიგურებდით. მიგვყავდა ნიშანხაზამდე (200 სმ^3). ვიღებედით სინჯს (20-50 სმ^3), ვამატებდით ნატრიუმის ქლორიდს ან კალიუმის ჰიდროქსიდს (4-5გ) და ვამუშავებდით ბუთანოლით (10-10სმ^3) 3-ჯერ 5-5 წუთის განმავლობაში. ბუთანოლიან გამონაწვლილს ვაერთიანებდით და სრულად ვაშრობდით ვაკუუმის პირობებში. ნარჩენს გადავაკრისტალებდით მეთანოლით 3-ჯერ. ვხსნიდით წყალში (5 სმ^3) და ვსაზღვრავდით ოპტიკურ სიმკვრივეს 210 ნმ-ზე (კონტროლი წყალი).



ნახ. № 17. სტევიოზიდის და რებაუდიოზიდის მიხედვით აგებული გრადუირებული საკალიბრო გრაფიკი.

დიტერპენური გლიკოზიდების მასურ წილს ვსაზღვრავდით გრადუირებული გრაფიკის მიხედვით. გრადუირებული გრაფიკის

ასაგებად სტევიოზიდის და რებაუდიოზიდის პრეპარატის 0,1 გ (ზუსტი მასა) ვხსნიდით 10 სმ^3 წყალში. ამ ხნარიდან შესაბამისად ვიღებდით 1 სმ^3 (10 მგ); 2 სმ^3 (20მ გ); 3 სმ^3 (30 მგ); 5 სმ^3 (50 მგ). . . 8 სმ^3 (80 მგ) ვავსებდით 10 სმ^3 დისტირებული წყლით და ოპტიკურ სიმკვრივეს გავზომავდით სპექტროფოტომეტრზე.

გრადუირებული გრაფიკის ასაგებად აბცისის ღერძზე გადაითვლება სტევიოზიდის და რებაუდიოზიდის რაოდენობა მგ-ში, ხოლო ორდინატის ღერძზე ოპტიკური სიმკვრივის მნიშვნელობები.

დიტერპენური გლიკოზიდების მასურ წილს (X) პროცენტებში ვანგარიშობდით ფორმულით:

$$X = \frac{cV}{mv} 100$$

სადაც, c – დიტერპენური გლიკოზიდების მასური წილის განსაზღვრა გრაფიკის მიხედვით მგ /სმ^3.

v - სინჯის მოცულობა, სმ^3.

V – ექსტრაქტის საერთო მოცულობა, სმ^3.

m - ნიმუშის მასა გ.

სპექტროფოტომეტრის არ ქონის შემთხვევაში გაერთიანებულ წყლიან ექსტრაქტს ვაორთქლებდით ვაკუუმის პირობებში მშრალ ნარჩენამდე, ნარჩენს ვამუშავებდით 10-10 სმ^3 ბუთანოლით 30-30 წთ. 3-ჯერ მადუღარ წყლიან აბაზანაზე უკუმაცივრით. ბუთანოლიან ექსტრაქტებს ვაერთიანებდით და ვაორთქლებდით ვაკუუმის პირობებში მშრალ ნარჩენამდე. ნარჩენს გადავაკრისტალებდით მეთანოლით და გავაშრობდით მუდმივ წონამდე 90 - 100 ^{0}C-ზე.

დიტერპენური გლიკოზიდების მასურ წილ (x) პროცენტებში ვანგარიშობდით ფორმულით:

$$X = \frac{a-b}{m} 100$$

სადაც, a - ნალექიანი ჯამის მასა, გ.

b –ცარიელი ჯამის მასა, გ.

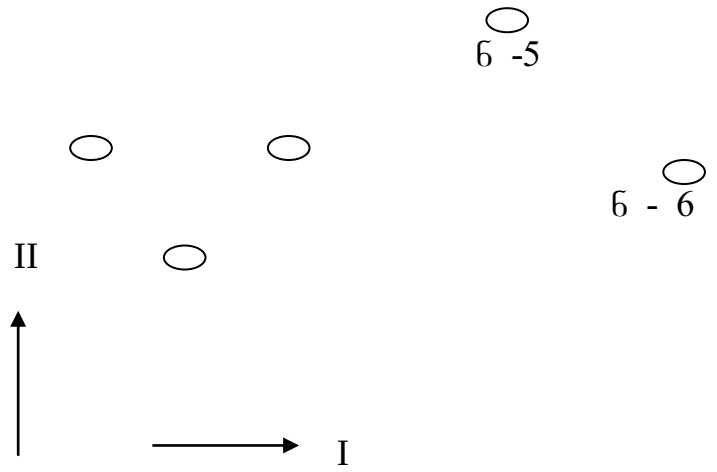
m – ნიმუშის მასა მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით, გ.

მეთოდი უზრუნველყოფს ტკბილი დიტერპენური ნაერთების სწრაფად განსაზღვრას საწარმოო პირობებისათვის დასაშვები ცდომილებით. მეთოდი შეიძლება გამოყენებული იქნას ნედლი და მშრალი ფოთლის, ექსტრაქტის, კონცენტრატის და მშრალი ექსტრაქტის შესაფასებლად.

10. სტევიას ფოთლის ფენოლკარბონმჟავები

მცენარეთა სამყაროში ფართოდ გავრცელებული ნაერთები - ფენოლკარბომჟავებიდან სტევიაში მინიშნებულია ქლოროგენის მჟავას შემცველობის შესახებ (42).

სტევიას ფენოლკარბონმჟავათა შესასწავლად ნიმუშს დაქუცმაცების შემდეგ ვუკეთებდით 3-ჯერ ექსტრაქციას 80 %-იანი სპირტით 30-30წთ – ის განმავლობაში. მიღებული ექსტრაქტების გაერთიანების შემდეგ ვაკონცენტრირებდით (ვაკუუმი 45^0 C) წყლიან ნარჩენამდე, რომელსაც პიგმენტებისა და სხვა ლიპოფილური ნაერთების მოსაცილებლად რამოდენიმეჯერ ქლოროფორმით ვამუშავებდით. პოლიამიდის სვეტზე ელუირებულ ფენოლკარბონმჟავათა ფრაქციას, რომლის ელუაციასაც ვახდენდით წყლისა და სპირტის მზარდი კონცენტრაციით წყლიან ნარჩენამდე, ვაკონცენტრირებდით (ვაკუუმის პირობებში) და დიეთილის ეთერით ვამუშავებდით. თავისუფალი კარბონმჟავები როგორც წესი ეთერში გადადის. ბმული ნაერთების ჰიდროლიზს ვახდენდით 2N HCI-ით. ჰიდროლიზის შემდეგ ხსნარს კვლავ ვამუშავებდით ეთერით, რომელშიც გადადის გამონთავისუფლებული ნაერთები. ეთერიან გამონაწვლილებს ვაკონცენტრირებდით ცალ - ცალკე. მიღებული კონცენტრატების ქრომატოგრაფირებას ვახდენდით ორმხრივად ქაღალდზე: I - მიმართულება: n – ბუთანოლი –ძმარმჟავა – წყალი (4:1:5), II- 2 % -იანი ძმარმჟავა (ნახ.№.18). მიღებულ ქრომატოგრამას გაშრობის შემდეგ ვამჟღავნებდით დიაზოტირებული სულფანოლის მჟავათი და Na_2CO_3 – ის ხსნარით (ცხ. №10)



ნახ. №18. სტევიას ფოთლის ფენოლკარბონმჟავათა ქრომატოგრამა.
I მიმართულება –ნ -ბუთანოლი –ძმარმჟავა –წყალი (4:1:5).
II მიმართულება 2 %-იანი ძმარმჟავა.

გამჟღავნებამდე და გამჟღავნების შემდეგ ქრომატოგრამებს ვათვალიერებდით უი. შუქზე ამიაკის ორთქლში ან მის გარეშე. ლაქების მახასიათებლები მოცემულია ცხრილში. ნივთიერება 5 მიჩნეულია p - კუმარის მჟავად, ხოლო ნივთიერება 6 – ყავის მჟავად.

ნივთიერება ნ -5 თავისუფალი სახით და ჰიდროლიზატიდან უი. შუქზე იძლევა იისფერ ფლუორესცენციას, რომელიც ამიაკის ორთქლში გადადის მოლურჯო – იისფერში, რკინის ქლორიდის შესხურებით იძლევა ვარდისფერ შეფერილობას, დიაზოტირებულ სულფანოლის მჟავასთან -ნარინჯისფერს, უი. შუქის არეში შთანთქმის ორი მაქსიმუმი გააჩნია 254 და 309 ნმ – ზე, KOH-ის დამატებით იძლევა ბატოქრომულ გადახრას 30 ნმ (ნახ. №19).

ნივთიერება ნ – 6 უ.ი. შუქზე იძლევა ასევე იისფერ შეფერილობას, რომელიც ამიაკის ორთქლში გადადის ლურჯში, დიაზოტირებულ სულფანოლის მჟავას შესხურებით წარმოიქმნება იისფერი

ცხრილი № 11

სტევიას ფოთლის და ავთენტიკურ ფენოლკარბონმჟავათა ქრომატოგრაფიული დახასიათება

ნიმუში ნივთიერება	**Rfx100** მნიშვნელობა			შეფერილობა ქრომატოგრამაზე			
	ბუთან. ძმარ-მჟავა წყალი **4:1:5**	**2 %** ძმარ-მჟავა	ბენზოლი ძმარ-მჟავა წყალი **10:7:3**	უ.ი. შუქი	უ.ი. შუქი + **NH_4**	**$FeCI_3$**	დიაზოტირებული სულფანილის მჟავა
ჰიდროლიზატი ნივ-ბა 5	88	46	73	იისფერი	მოლურჯო - იისფერი	ვარდისფერი	ნარინჯის-ფერი
ჰიდროლიზატი ნივ-ბა 6	59	78	14	„	ლურჯი	„	იისფერი
ნივ-ბა 5	89	47	72	„	მოლურჯო - იისფერი	„	ნარინჯის-ფერი
ნივ-ბა 6	60	77	14	„	ლურჯი	„	იისფერი
ყავის მჟავა	60	78	14	„	ლურჯი	„	იისფერი
P- კუმარის მჟავა	89	47	73	„	ოლურჯო იისფერი	„	ნარინჯის-ფერი

შეფერილობა. შთანთქმის ორი მაქსიმუმი უი. შუქის არეში 250 და 335 ნმ –ზე, KOH-ის დამატებით იძლევა ბატოქრომულ გადახრას (ნახ. № 17).

მიღებული მონაცემების შეჯერებით, Rf-ის მნიშვნელობათა შედარებით ავთენტიკურ ნაერთთა შესაბამის მაჩვენებლებზე

p-კუმარისა და ყავის მჟავავები სტევიას ფოთოლში გხვდება, როგორც თავისუფალი, ასევე ბმული ნაერთების სახით. ფენოლკარბონმჟავები გადადის სტევიას ექსტრაქტში. ისი ულტრაფილოტრაციული გაფილტვრის დროს ამ ნაერთების მხოლოდ მცირე ნაწილი გვხვდება სტევიას კონცენტრატში და მშრალ ექსტრაქტში. რაც შეეხება ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამურ პრეპარატს, მასში ფენოლკარბონმჟავები არ შეიმჩნევა.

შტევიას ფენოლკარბონმჟავათა მაღალი წნევით სითხური ქრომატოგრაფირება ჩატარდა შებრუნებულ ფაზიან სვეტზე (Bondapac C_{18}), მოძრავი ფაზით 5%-ინაი ძმარმჟავა, დეტექტირება 254 ნმ-ზე, ქრომატოგრაფირების წნევა 1100 pSI. ქრომატოგრამაზე მიიღება შავი პიკი. ავთენთიკურ ნაერთთა გამოყენებით შესაძლებელი გახდა გარდა p-კუმარისა და ყავის მჟავას, ქლოროგენისა და ქინაქინის მჟავების იდენტიფიკაცია. ნივთიერებათა იდენტიფიკაციას ვახდენდით ნაერთთა ქრომატოგრამაზე შეკავების დროის მიხედვით.

ცხრილი №12

ფენოლკარბონმჟავათა შეკავების დრო

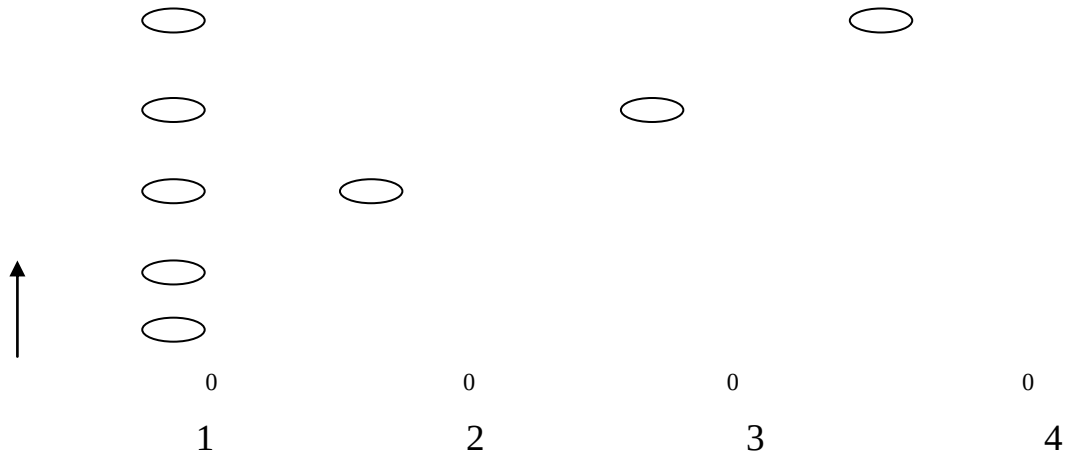
ნივთიერება	პიკის №	შეკავების დრო, წუთი		
		ავთენტიკური ფენოლკარბონმჟავა	სტევიას ფოთოლი	სტევიას ფოთლის ჰიდროლიზატი
ყავის მჟავა	3	9,16	9,2	9,17
p – კუმარის მჟავა	4	10,30	10,30	10,33
ქლოროგენის მჟავა	6	11,2	11,23	11,21
ქინაქინის მჟავა	7	26,10	26,2	26,18

ამრიგად, დადგენილია რომ სტევიას ფოთლები თავისუფალი და ბმული სახით შეიცავენ შემდეგ ფენოლკარბონმჟავებს: ყავის, p – კუმარის, ქლოროგენის და ქინაქინის მჟავას. სტევიას ექსტრაქტის ულტრაფილტრაციის, ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის მიღების შემთხვევაში ფენოლკარბონმჟავები მასში პრაქტიკულად არ რჩება.

11. სტევიას ნახშირწყლები

სტევიას ფოთლის გამოყენება მასში არსებული დაბალკალორიული ნაერთებითაა განპირობებული, რომლებიც თავიანთი ბუნებით სტევიოლის გლიკოზიდები არიან. ფოთლებში ნახშირწყლების, განსაკუთრებით გლუკოზას არსებობა ფოთოლს და მისგან მიღებულ ექსტრაქტებს კალორიულს ხდის.

სტევიას ფოთლის ნახშირწყლების განსაზღვრა ჩატარდა იგივე მეთოდით, როგორც კივის შემთხვევაში. 1 - წინასწარ დაფიქსირებულ სტევიას ფოთლებს გავუკეთედ 3-ჯერადი ექსტრაქცია 80%-იანი ეთანოლის ხსნარით. ექსტრაქტი დავაკონცენტრირეთ, მოვახდინეთ მისი აღმავალი ქაღალდის ქრომატოგრაფირება გამხსნლთა სისტემაში: 1-ბუთანოლი : ძმარმჟავა : წყალი, 2 – ბუთანოლი : პირიდინი : წყალი. ქრომატოგრამას ანილინფტალატის რეაქტივით ვახურებდით 105^0C და ვამჟღავნებდით, რის შედეგადაც სტევიას ფოთლიდან გამოვყავით ნახშირწყლოვანი ბუნების ნაერთები, რომელთაგან სამი ალდოზაა, ხოლო ორი კეტოზა (ცხრილი №13, ნახ. №19). ავთენტიკური ნიმუშების Rf – თან შედარება მიღებული მონაცემების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ სტევიას ფოთოლი შეიცავს: გლუკოზას, რამნოზას და არაბინოზას. სტევიას ფოთოლში ჩვენს მიერ შენიშნული დანარჩენი ორი ნახშირწყალი კეტონური ბუნების არიან. ინდივიდულური ნაერთების რაოდენობრივი ანალიზი ჩატარდა აირთხევადი ქრომატოგრაფიის მეთოდით. როგორც მონაცემებიდან ჩანს, მონოსაქარიდებიდან ყველაზე მეტი რაოდენობა სტევიას ფოთოლში გვხვდება გლუკოზა (0,3-0,7%). რაც შეეხება მონოსაქარიდების ჯამურ რაოდენობას ის უმნიშვნელოა - 0,5-1 %-ის ფარგლებში, ხოლო პოლისაქარიდებიდან ძირითადად წარმოდგენილია ცელულოზა (10 %-ის ფარგლებში), მიღებული ექსტრაქტის შემდგომი გასუფთავების ტექნოლოგია საშუალებას იძლევა მიღებული პროდუქტები განთავისუფლდეს ნახშირწყლებისაგან. გასუფთავებულ ექსტრაქტში მონოსაქარიდების რაოდენობა შედარებული იქნა თავდაპირველთან, რაც საგრძნობლად ნაკლებია. (ცხრილი №13).



ნახ. № 19 სტევიას ფოთლის ნახშირწყლების ქრომატოგრამა. გამხსნელთა სისტემა n-ბუთანოლი –პირიდინი –წყალი (6:4:3)

1. სტევიას ფოთლის ექსტრაქტი, 2. გლუკოზა, 3. არაბინოზა, 4. რამნოზა

ცხრილი №13.

სტევიას ფოთლის ნახშირწყლების რაოდენობრივი ცვალებადობა (% მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით)

დასახელება	მონოსაქარიდები	გლუკოზა	პოლისაქარიდები (ცელულოზა)
სტევიას ფოთოლი	0,8	0,4	9,5
სტევიას ექსტრაქტი	0,5	0,3	-
მშრალი ექსტრაქტი	0,2	0,1	-
ჯამური პრეპარატი	-	-	-

ცხრილი №14.

სტევიას ფოთლის ნახშირწყლების ქრომატოგრაფიული დახასიათება.

ნივთიერება	Rf –ის მნიშვნელობა		შეფერილობა ქრომატოგრამაზე	
	n–ბუთანოლი -ძმარმჟავა - -წყალი (4:1:5)	n- ბუთანოლი -პირიდენი - - წყალი (6:4:3)	ანილინფტალატით შესხურება	შარდოვანათი შესხურება
ნივთიერება 7	18	30	ვარდისფერი	
ნივთიერება 8	30	41	ვარდისფერი	
ნივთიერება 9	15	27		ლურჯი
ნივთიერება 10	12	24		ლურჯი
ნივთიერება 11	37	59	ვარდისფერი	
გლუკოზა	18	30	ვარდისფერი	
ფრუქტოზა	23	34		ლურჯი
არაბინოზა	30	41	ვარდისფერი	
რამნოზა	37	59	ვარდისფერი	

მიღებული მონაცემების მიხედვით შეიძლება დავასკვნათ, რომ სტევიას ფოთოლი შეიცავს: გლუკოზას, რამნოზას და არაბინოზას. სტევიას ფოთლის გადამუშავებისას პროდუქტში მონოსაქარიდების რაოდენობა მნიშვნელოვნად მცირდება

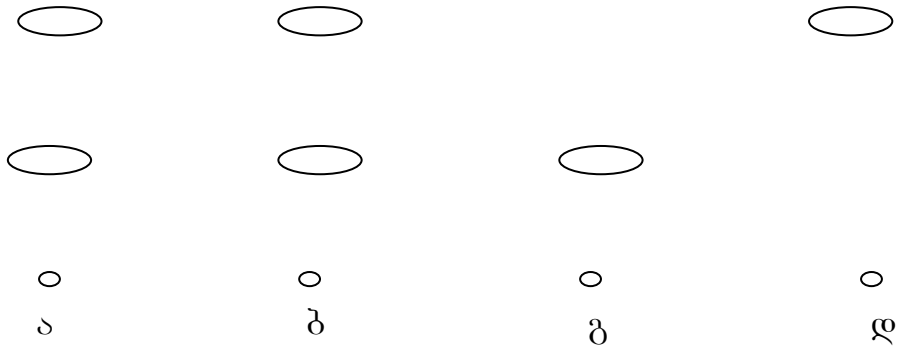
12. სტევიას ვიტამინები და მინერალური ნივთიერებანი

სტევიას ფოთლისადმი ინტერესი განპირობებულია არა მარტო ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების შემცველობით, არამედ მასში მრავლადაა სხვა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები. როგორც წესი ვიტამინების მნიშვნელოვანი რაოდენობაც წარმოდგენილია სუბტროპიკულ ხილში და მცენარეებში

სუბტროპიკულ ხილში არსებულ ვიტამინებს შორის ყველაზე მნიშვნელოვანი ადგილი ვიტამინ C-ს (L –ასკორბინის მჟავა) უკავია. იგი ანტისკორბუტული ვიტამინია და მისი არსებობა ან ნაკლებობა ადამიანის ორგანიზმში იწვევს უაღრესად მძიმე დაავადებას – ცინგას. ეს ვიტამინი დაბალმოლეკულური ნაერთია, იგი კარგი აღმდგენელია.

L –ასკორბინის მჟავის დაგროვება მცენარეებში დამოკიდებულია მრავალ ფაქტორზე: მოყვანის პირობები, გეოგრაფიული მდებარეობა, ნიადაგობრივ კლიმატური პირობები და სხვა. L –ასკორბინის მჟავა უჯერი ნაერთია, ენოლური ჯგუფებით, რაც აადვილებს მის გადასვლას დეჰიდროფორმაში.

ჩვენს მიზანს შეადგენდა შეგვესწავლა სტევიას ფოთლის ვიტამინების შემცველობა. სტევიას ფოთოლში თიამინის აღმოჩენა მოვახდინეთ ფლუორომეტრიული მეთოდით. სტევიას ფოთლიდან თიამინის გამოწვლილვას
ვახდენდით 0,1ნ გოგირდმჟავას წყალხსნარით. მისი ადსორბირება ხდებოდა კათიონიტზე, შემდეგ ელუირებულ თიამინს ვჟანგავდით სისხლის წითელი მარილით (ტუტე გარემოში) და ვახდენდით ფლუორომეტრირებას ულტრაიისფერი სხივის არეში. მიიღებოდა თიამინისათვის დამახასიათებელი ლურჯი ფლუორესცენცია.



ნახ. № 19 სტევიას ფოთლის და მისგან მიღებული პრეპარატების ვიტამინების ქრომატოგრამის სქემატური გამოსახულება, გამხსნელი სისტემა – პირიდინი – წყალი – ძმარმჟავა (10:40:1). ა - სტევიას ფოთოლი, ბ - სტევიას მშრალი ექსტრაქტი, გ – თიამინი, დ – რიბოფლავინი.

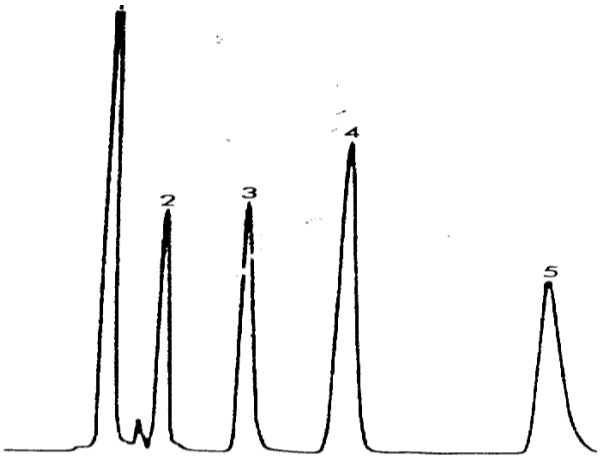
რიბოფლავინის გამოწვლილვა ხდებოდა ფოსფატური ბუფერით. გამონაწვლილში რიბოფლავინის დაჟანგვა კი კალიუმის პერმანგანატით (4 % -იანი). ხსნარს გააუფერულებენ და რიბოფლავინს აღადგენენ. რიბოფლავინისათვის დამახასიათებელია ყვითელი ფლუორესცენცია. თიამინისა და რიბოფლავინის არსებობა სტევიას ფოთოლში ასევე დასტურდება მაღალეფექტური ქრომატოგრაფირებით (ნახ. № 19).

სტევიას ფოთოლში ასკორბინის მჟავას არსებობის დასადასტურებლად წყლიან გამონაწვლილებს ვტიტრავდით ტილმანსის რეაქტივით.

დადებითი რეაქცია მიგვანიშნებს ვიტამინი C – ს არსებობაზე. ვიტამინების შემდგომი შესწავლა შესაძლებელი იქნება მაღალი წნევის სითხური ქრომატოგრაფირების გამოყენებით, რამდენადაც ჩვენ შევძელით მოგვეხდინა ზოგიერთი ავთენტიკური ვიტამინის ქრომატოგრაფირება (ნახ. № 20).

ისევე, როგორც ნებისმიერი მცენარე სტევიას ფოთოლში მაღალეფექტური თქხელფენოვანი ქრომატოგრაფირებით შესაძლებელი გახდა კაროტინის იდენტიფიცირება.

სტევია მდიდარია მინერალური ნივთიერებებითაც. საქართველოში მოყვანილი სტევიას ფოთლოში მინერალური ნივთიერებენი 9 – 10%-ის ფარგლებშია. სტანდარტით განსაზღვრულია მინერალურ ნაერთთა ზღვრული რაოდენობა.



ნახ.20 ავთენტიკური ვიტამინების ქრომატოგრამა. რომატოგრაფიული სვეტი Bondapak C_{18}, გამხსნელი სისტემა: მეთანოლი:წყალი: (75:25)
1. ასკორბინის მჟავა; 2. იაცინამიდი; 3. ღიბოფლვინი; 4. თიამინი.

ატომურ-ადსორბციური მეთოდის გამოყენებით შესაძლებელი გახდა სტევიას ფოთოლში აგმოგვეჩინა ალუმინი, კალციუმი, ქრომი, კობალტი, რკინა, მაგნიუმი, მანგანუმი, ფოსფორი, კალიუმი, სელენი, სილიციუმი, ნატრიუმი, თუთია. სტევიას ფოთოლში მინერალური ნივთიერებანი წარმოდგენილია როგორც წყალში ხსნადი, ასევე უხსნადი ფორმით. სტევიას ფოთლის ექსტრაქტს ან მშრალი ექსტრაქტის მოხმარების შემთხვევაში ადამიანის ორგანიზმში ხვდება მინერალური ნაერთების წყალში ხსნადი ფორმები. სტევიას ფოთლიდან მიღებული ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამურ პრეპარატში მინერალური ნივთიერებანი პრაქტიკულად არაა.

13. სტევიას და მისგან მიღებული პროდუქტების აქროლადი კომპლექსი.

სტევიას ღეროები, ფოთლები და მისგან მიღებული ექსტრაქტი თუ პრეპარატები ხასიათდებიან სპეციფიკური გემოთი და არომატით. მიუჩვეველ მომხმარებლისათვის რამდენადმე არასასიამოვნო სუნით. ჩვენს ხელთ არსებული ინფორმაციით პირველი შრომები, რომლებიც მიეძღვნა სტევიას ეთერზეთის შესწავლას, გამოქვეყნებულია იაპონელი მეცნიერების მიერ. (123) შესწავლის ობიექტი იყო როგორც მცენარის სამშობლოში (პარაგვაი), ასევე თვით იაპონიაში., მოყვანილი სტევიას ფოთლიდან მიღებული ეთერზეთი. ეთერზეთის ძირითადი კომპონენტი აღმოჩნდა სესკვიტერპენული ბუნების სპირტი. მოგვიანებით იტალიელი მეცნიერების გამოკვლევებით (184) დადგინდა, რომ ეს ნაერთი წარმოადგენს სპატულენოლს. უკრაინაში მოყვანილი სტევიას ფოთლის აქროლადი კომპლექსი შესწავლილი იქნა ქართველი მეცნიერების მიერ (15,16), მათვე შეისწავლეს ცვალებადობა, რომელსაც განიცდიდა სტევიას ფოთლის ეთერზეთი გადამუშავების ხერხის მიხედვით (16).

ჩვენი ნაშრომის მიზანი იყო შეგვესწავლა სტევიას ნედლი ფოთლის, გამხმარი ფოთლის და მისგან მიღებული პროდუქტების აქროლადი კომპლექსი, რათა დაგვედგინა კორელაცია აქროლადი კომპლექსის ქიმიურ შედგენილობისა და არომატს შორის. დაგვედგინა ტექნოლოგიური პირობები, რომლებიც საშუალებას იძლევა შევარბილოდ სტევიას არასასიამოვნო არომატი.

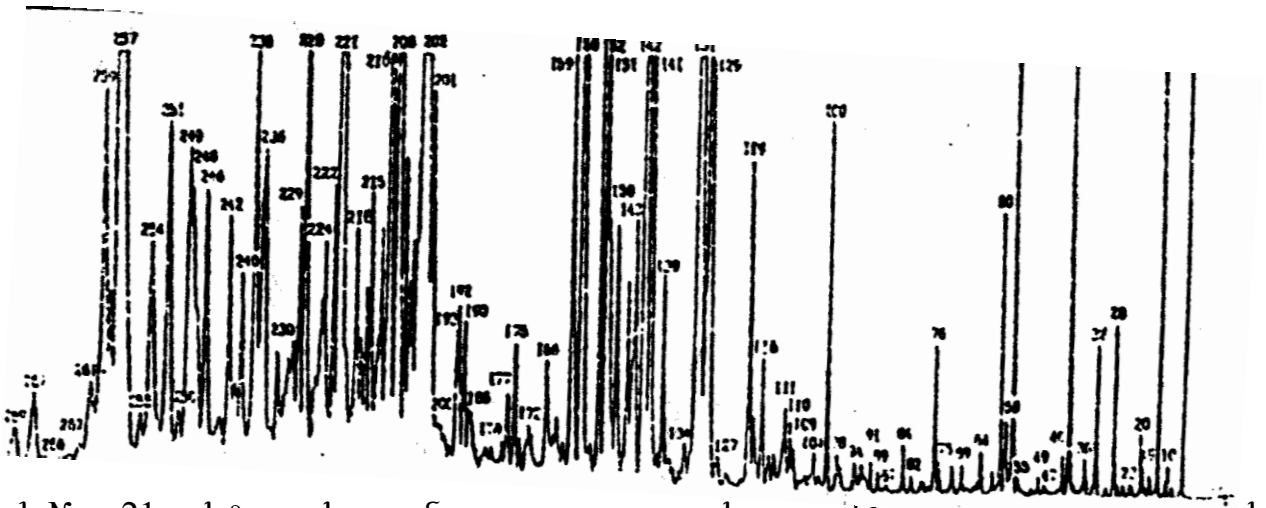
საკვლევი ნიმუშის აღებას ვახდენთ ხობის რაიონის სოფელ პატარა ფოთში მსოფლიო ბანკის ფინანსური მხარდაჭერით გაშენებულ პლანტაციაში.

ნედლეულს ვყოფდით ხუთ ნაწილად. პირველი ნაწილისაგან, უშუალოდ ნედლი ფოთლისაგან ვღებულობთ ეთერზეთს, მეორე ნაწილს ვაშრობთ ხელოვნურ პირობებში (50^0C-ზე), მესამე ნაწილს ვამუშავებთ შავი ჩაის ტექნოლოგიით. (გრეხა-ფერმენტაცია-შრობა). მეოთხე ნაწილისაგან ბუნებრივი შრობის შემდეგ ვღებულობთ წყლიან ექსტრაქტს, რომელსაც ვაკონცენტრირებდით და ვაშრობდით. მეხუთე ნაწილისაგან კი ვღებულობთ ტკბილ დიტერპენურ გლიკოზიდების ჯამს.

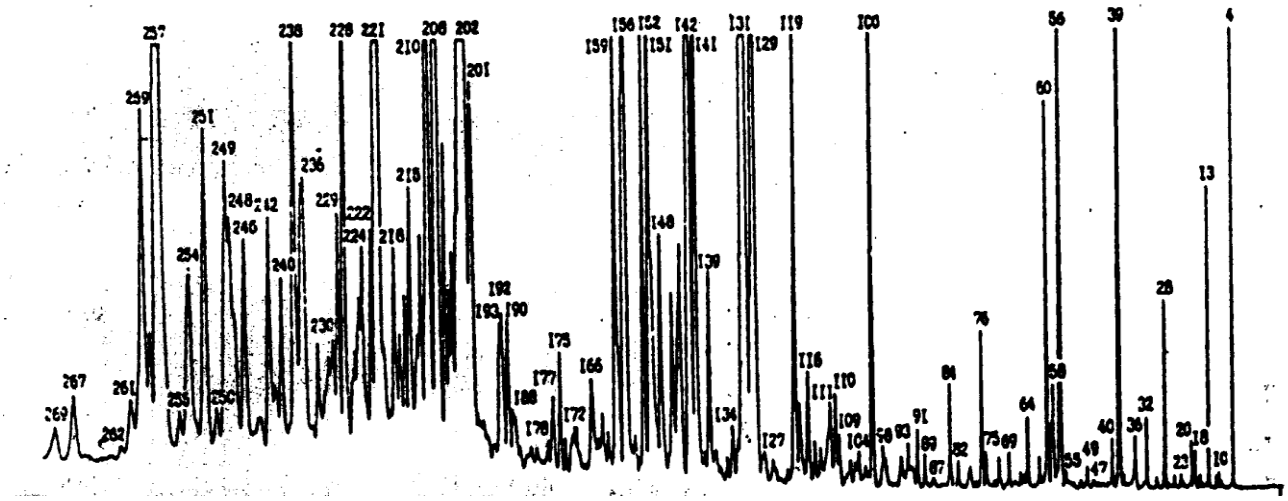
სტევიას ფოთლის ეთეროვანი ზეთის (აქროლადი კომპლექსი) მიღებას ვახდენთ მინის ჭურჭელში ჰიდროდისტილაციის მეთოდით (7). ორსაათიანი გამოხდის შემდეგ მიღებული დისტილატის გაცივების შემდეგ, ვახდენდით ერთჯერად ექსტრაგირებას ქლორეთილით. ორგანულ ნაწილს ვაშრობდით ნატრიუმის სულფატზე და ვაკონცენტრირებდით

გამხსნელის პრაქტიკულად მოცილებამდე. სტევიას ფოთლისაგან ამ გზით მიღებული აქროლადი კომპლექსი წარმოადგენს ყვითელი ფერის, ნედლეულისათვის დამახასიათებელ სპეციფიკურ სუნის მქონე სქელ გამჭვირვალე სითხეს. (რაც მოწმობს ამ სუნის შემქმნელი აქროლადი ნივთიერების პროპორციულობიდან გადმოდენაზე). აქროლადი კომპლექსი მიღებული იყო სტევიას ნედლი, მშრალი ფოთლიდან (ხელოვნურად 80^0C-ზე გამშრალი), სტევიას ფოთლის წყლით მიღებული (შემდგომ გამშრალი) ექსტრაქტისაგან, ტკბილი დიტერპენული გლუკოზიდების ჯამური პრეპარატისაგან. აქროლადი კომპლექსის კვლევისათვის გამოვიყენეთ გაზურ-სითხური ქრომატოგრაფირების მეთოდი. ანალიზისათვის გამოყენებული იქნა პოლიეთილენგლიკოლიანი და მეთილსილიკონიანი მინის კაპილარული სვეტები. კაპილარული სვეტის ზომა 50მ/ 0,5მმ, ამაორთქლებლის და დეტექტორის ტემპერატურა 250^0 C. ჰელიუმის (გაზის გადამტანი) წნევა კაპილარის შესასვლელთან 0,07 მპა .ნიმუში 0,2მკლ, დაყოფის ტემპერატურა იცვლებოდა 60^0C-დან 200^0C-მდე 2^0C/წთ –ში მატებით, შემდგომი დაყოფა წარმოებდა იზოთერმულ რეჟიმში. რაოდენობრივი ანალიზი ტარდებოდა ციფრული ინტეგრატორის (И-02) გამოყენებით, ხელის რეჟიმში ($K_ь$=1,0 ყველა კომპონენტისათვის). პიკების იდენტიფიკაციას ვახდენდით ნივთიერებათა შეკავების კოვაჩის ინდექსის გამოყენებით. მოწმეთა არსებობის შემთხვევაში საკვლევი ნაერთების იდენტიფიკაცია ხდებოდა მათი გამოყენებით. არაპოლარული სვეტი ნაკლებად ეფექტური აღმოჩნდა სტევიას აქროლადი კომპლექსის კვლევისათვის, რადგან ეთერზეთის კომპონენტების აბსოლუტური უმრავლესობა აქ შედარებით ვიწრო დიაპაზონში ელუირდებოდა, რომელიც განთავსებულია კოვაჩის შეკავების ინდექსის 1400-დან 1700-მდე მნიშვნელობაზე (ელუირებული კომპონენტის 500-დან 2400-მდე საერთო დიაპაზონისათვის). სურათზე წარმოდგენილია შესწავლილი აქროლადი კომპლექსის დამახასიათებელ ქრომატოგრამათა ასლი. ქრომატოგრამებით თუ ვიმსჯელებთ სვეტის ეთერზეთი 300-მდე კომპონენტს შეიცავს, რაც მიუთითებს ეთერზეთის სირთულეზე. ეთერზეთების კომპონენტებს შორის მრავლადაა ტერპენოიდები.

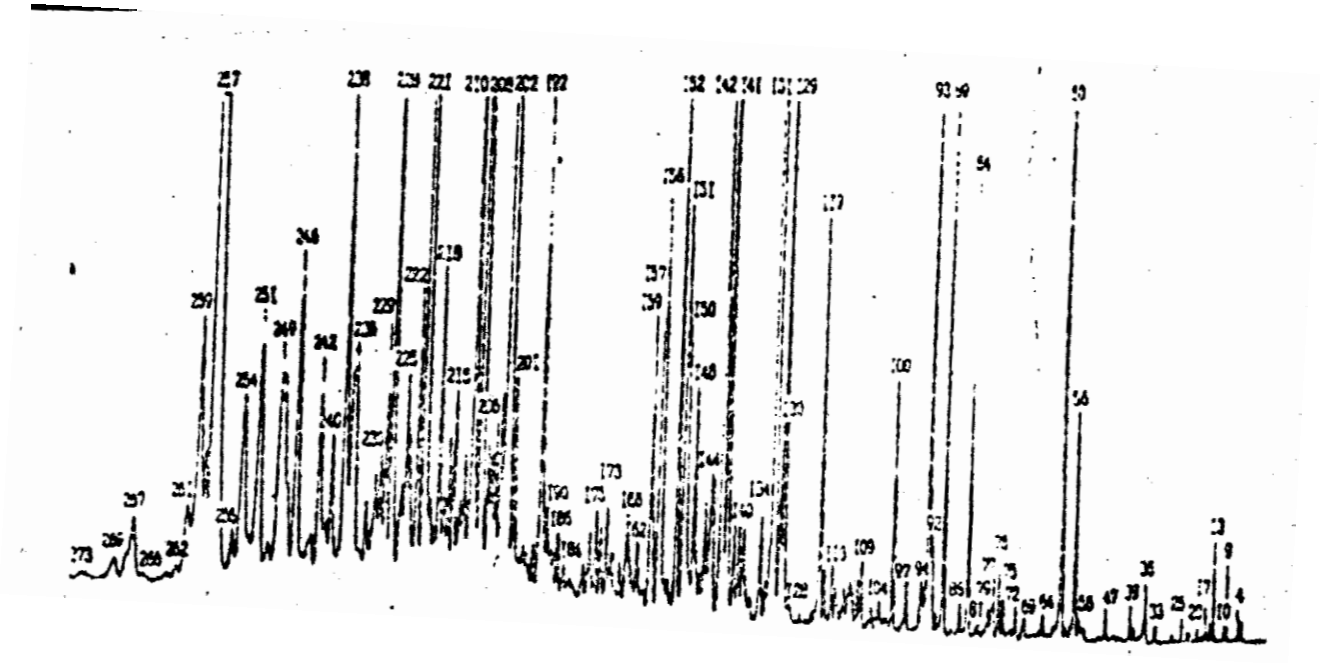
ჩვენს მიერ შესწავლილი სტევიას ფოთლის ეთერზეთში ძირითადი კომპონენტი კარიოფილენოქსიდია (3.202). ამ ნაერთის მაღალი კონცენტრაცია დაფიქსირებულია ნედლ ფოთოლში. გადამუშავებისას მისი კონცენტრაცია მცირდება. ტკბილი დიტერპენული გლიკზიდების ჯამურ პრეპარატში კარიოფილენოქსიდი პრაქტიკულად არაა. ამ ნაერთის



ნახ.№ 21. სტევიას ნედლი ფოთლის აქროლადი [illegible]ის ქრომატოგრამა.



ნახ. № 22. სტევიას ხელოვნურად გამშრალი ფოთლის აქროლადი კომპლექსის ქრომატოგრამა.



ნახ. №23. სტევიას ხელოვნურად გამშრალი ფოთლის აქროლადი კომპლექსის ქრომატოგრამა.

მაღალი კონცენტრაციაა ასევე ბრაზილიაში და პარაგვაიში მოყვანილ სტევიას ეთერზეთში. მაშინ, როდესაც იაპონიისა და იტალიის პირობებში მოყვანილი სტევიას ფოთლის ეთერზეთში კარიოფილენოქსიდის შემცველობა არც თუ ისე მაღალია. სესკვიტერპენული სპირტის- სპატულენოლის კონცენტრაცია მაღალია ნედლ ფოთოლში, ხელოვნურად გამშრალ ფოთოლში 9%-მდეა, წყლიან ექსტრაქტში კლებულობს, ხოლო პრეპარატში პრაქტიკულად არაა.

უნდა აღინიშნოს, რომ ამ ორი ძირთადი კომპონენტის კონცენტრაციის კლება იწვევს სტევიას ფოთლისათვის დამახასიათებელ რამდენიმე არასასიამოვნო სუნის დაკარგვას ან ნაწილობრივ მოცილებას. მეორეს მხრივ მრავალი კომპონენტი, რომელიც სტევიას ან მისგან მიღებული პროდუქტების შემადგენლობაში შედის, უცვლელი რჩება გადამუშავების დროს.

სტევიას ფოთლის გადამუშავების დროს ცვლილებებს განიცდის კლების ან მატების მიმართულებით ეთერზეთში შემავალი მრავალი ნივთიერება, რაც საბოლოო ჯამში, შედეგად იძლევა სასიამოვნო ორგანულეპტიკური თვისებების მქონე პროდუქტს , რაც შეეხება ტკბილ დიტერპენული გლიკოზიდების ჯამურ პრეპრატს, იგი პრაქტიკულად კარგავს სტევიას ფოთლისათვის დამახასიათებელ სპეციფიკურ სუნს.

ცხრილი № 15

სტევიას ფოთლის აქროლადი კომპლექსის კომპონენტები

ნაერთი	კოვაჩის ინდექსი	აქროლადი კომპლექსის კომპონენტი	სტვიას ნედლი ფოთოლი	სტევიას ხელოვ. გამხმარი ფოთოლი	სტევიას ჩაი	სტევიას ექსტრაქტი მშრალი
1	2	3	4	5	6	7
28	1019	ალფა-პინენი$^{+}$	0,02	-	0,01	-
32	1053	კამფენი$^{+}$	0,02	0,01	–	-
36	1076	I-ჰექსანალი+	0,2	-	0,09	-
39	1106	ბეტა-პინენი+	0,02	0,03	0,05	0,02
40	1118	საბინენი+	0,01	-	–	-
49	1156	მირცენი+	0,01	-	–	-
55	1186	ალფა-ტერპინენი	0,07	0,05	0,04	0,02
56	1195	ლიმონენი+	0,8	0,5	0,31	0,1
58	1205	1,8-ცინეოლი+	0,01	-	–	-
60	1214	2-პენტინფურანი+	-	-	2,19	-
64	1240	გამა-ტერპინენი+	0,1	0,08	0,03	-
65	1244	ტრანს-ბეტა-ოციმენი+	0,07	0,05	–	-
69	1263	პარა-ციმოლი+	0,06	0,04	0,03	-
72	1278	ტერპინოლენი+	0,03	0,04	0,05	0,01
76	1300	ცის-3-ჰექსენილაცეტატი+	0,4	0,3	0,19	0,08
89	1371	ცის-3-ჰექსენოლი+	1,1	0,5	1,02	-
91	1380	ტრანს-2-ჰექსენოლი	0,01	-	0,03	-
94	1400	3-ოქტანოლი	-	-	0,11	0,05
97	1418	1-ოქტენ-3-ოლ	0,05	0,07	0,08	-
100	1435	ლინალოლის ოქსიდი I^{+}	-	-	0,36	0,1
106	1463	ლინალოლის ოქსიდი II^{+}	-	0,02	0,07	0,03

1	2	3	4	5	6	7
111	1487	ალფა-კოპაენი	0,09	0,08	0,06	-
114	1500	კამფორა$^{+}$	0,05	0,04	0,03	-
119	1532	ლინალოლი+	0,8	0,7	0,60	0,3
129	1583	ბეტა-ელემენი	0,5	0,6	1,38	0,8
130	1588	ტერპინენი-4-ოლი+	2,0	1,8	0,31	0,2
131	1596	ბეტა-კარიოფილენი	10,1	9,0	3,87	1,1
139	1640	ტრანს-ბეტა-ფარნეზენი	0,1	0,11	0,19	0,05
142	1665	ალფა-გუმულენი	5,0	4,6	1,96	0,8
145	1686	ალფა-ტერპინეოლი$^{+}$	0,1	0,12	0,20	0,1
148	1701	გერმაკრენი D	4,2	3,35	0,39	0,2
150	1714	ბეტა-სელინენი	0,92	0,9	0,66	0,2
152	1726	დელტა-კადინენი	11,7	10,5	0,96	0,3
159	1766	ჰუმინის ალდეჰიდი$^{+}$	0,6	0,53	0,46	0,1
166	1799	ანეტოლი+	0,17	0,17	0,18	0,05
172	1824	გერანიოლი$^{+}$	0,01	0,01	0,03	-
190	1914	2,6-ეპოქსი-ბეტა-იონონი	0,1	0,16	0,18	0,05
202	1982	კარიოფინელის ოქსიდი	0,5	0,79	9,07	2,0
204	1991	მეთილევგენოლი+	0,05	0,1	0,36	0,1
208	2021	ბეტა-ნეროლიდოლი+	1,3	1,6	4,95	1,0
215	2035	ოქტანის მჟავა+	0,1	0,2	1,72	0,5
221	2106	სპატულენოლი	0,6	0,7	4,93	1,0
246	2256	კარვაკროლი+	0,5	0,7	0,90	0,2
251	2293	ტრანს,ცის-ფარნეზოლი	0,6	0,65	0,91	0,1
257	2329	ტრანს,ტრანს-ფარნეზოლი	3,5	4,0	7,06	2,0

14. სტევიას კომპლექსური გადამუშავება

სტევიას მოსავალი ფოთლია, რომლის აღება სასურველია მოხდეს მაშინ, როდესაც მასში ტკბილი დიტერპენური ნაერთების შემცველობა მიაღწევს მაქსიმალურს (197,200,290). ჩვენს პირობებში ეს მაჩვენებელი 9-დან 10 %-მდეა (35). სტევიას მიწისზედა ნაწილის აღება ხდება ნებისმიერი მჭრელი ხელსაწყო–მოწყობილობით, რომელიც უზრუნველყოფს მის მოჭრას ნიადაგიდან 10 სმ სიმაღლეზე, მცენარის დაუზიანებლად. მოსავლის აღების ასეთი წესი უზრუნველყოფს ახალი დუყების მაქსიმალური რაოდენობის ამოყრას და მცენარეზე რჩება ცხოველმყოფისათვის აუცილებელი ფოთლების ოპტიმალური რაოდენობა. სტევიას ნედლი ფოთოლი უნდა პასუხობდეს სოსტ სრ 15903044-001-02 მოთხოვნებს (ცხრ. №16.)

გადაჭრის შემდეგ სასურველია მცენარეზე სპილენძის იონების შემცველი სუსტი ხსნარის შესხურება, რათა მცენარე დავიცვად გადაჭრის ადგილებიდან მიკრობიოლოგიური დასენიანებისაგან, რაც ხშირად მცენარის დაღუპვის მიზეზიც ხდება (33,99,179).

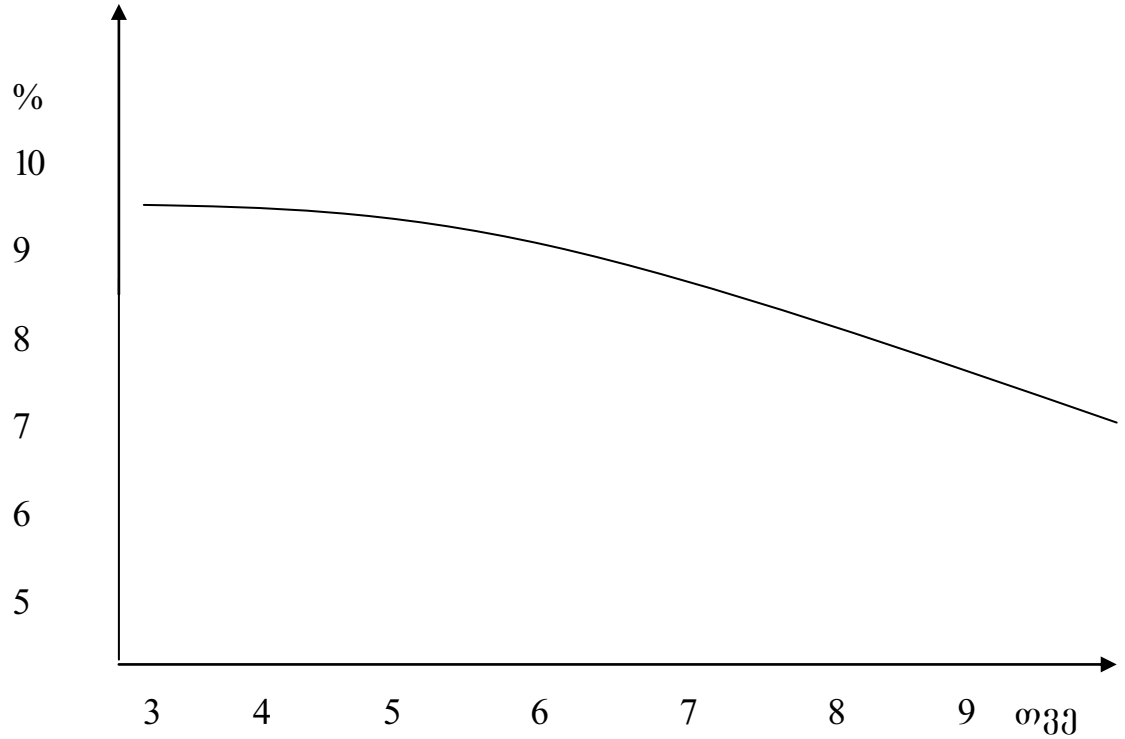
სტევიას ნედლი ფოთოლი 2-3სთ – ის შემდეგ შენახვას პრაქტიკულად არ ემორჩილება, ამიტომ საჭიროა მისი გადამუშავება ექსტრაქტად, კონცენტრატად, ფხვნილად ან ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამურ პრეპარატად (თავი №3.3). სტევიას ნედლი ფოთლის სქელი ფენის სახით ხანგრძლივად შენახვა იწვევს ფოთოლში მიმდინარე ინტენსიური

ცხრილი №16

სტევიას ნედლი ფოთლის ფიზიკო – ქიმიური და ორგანოლეპტიკური მაჩვენებლები

მაჩვენებლის დასახელება	დახასიათება და ნორმა
გარე სახე	ნედლი ფოთლების, ნორჩი ვეგეტატიური ყლორტების ბოლოში ბუტონებით ან ყვავილით (უხეში, გახევებული ღეროების გარეშე), აგრეთვე ცალკეული ფოთლებისა და ყვავილის ბუტონებით. ფოთლები მკვრივი შუბისებრი ფორმის მრავალგვარი ვარიაციების სიგანეში და ფორმაში (ფართო ან ვიწრო შუბისებრი, მოგრძო ელიფსისებრი, კვერცხისებრი, მოგრძო რომბისებრი). ფოთლის ზედა ნახევარი და ორივე მხარე ოდნავ დაშვებულია.

ფერი სუნი და გემო გაუხეშებული, გახევებული ღეროების მასური წილი, %, არა უმეტეს. გაყვითლებული, გამუქებული ფოთლების მასური წილი, %, არა უმეტეს. გარეშე მინარევების მასური წილი, %, არა უმეტეს ორგანული (სხვა არაშხამიანი მცენარეები) მინერალური მინარევები (მიწა, სილა, კენჭები) ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური შემცველობა (მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით), %, არანაკლებ.	ღია მწვანე ან მწვანე სპეციფიკური, ტკბილი, დამახასიათებელი. 10,0 1,5 1,5 7,0



ნახ. № 21 სტევიას ნედლი ფოთლის შენახვისას ტკბილი გლიკოზიდების რაოდენობრივი ცვალებადობა.

ბიოქიმიური პროცესების შედეგად „ჩახურებას“. ამ პროცესის ყველაზე უარყოფითი შედეგი იმაში მდგომარეობს, რომ საგრძნობლად მცირდება ტკბილი ტერპენოიდური ნაერთების შემცველობა (ნახ. №17). სტევიას ფოთლის ხანგრძლივად შენახვა ხდება მშრალ მდგომარეობაში (37,200,267).

სტევიას მშრალი ფოთოლის წარმოება ხდება ჩვენს მიერ შემუშავებული ტექნოლოგიური ინსტრუქციის მიხედვით (ტი სრ 15903044-002-02). სტევიას ფოთლის აღების შემდეგ ახდენენ ინსპექციას, ფოთლის შრობა წარმოებს ჩრდილში ან ნებისმიერ საშრობ დანადგარში 35-დან 90^0 ჩ-მდე (სქემა № 4).

სქემა №4

მშრალი სტევიას ფოთლების წარმოების ტექნოლოგიის სქემა.

სტევიას ფოთლის აღება

↓

სტევიას ფოთლის ინსპექცია

↓

სტევიას ფოთლის შრობა

↓

სტევიას ღეროების მოცილება

↓

სტევიას ფოთლების შეფუთვა

↓

სტევიას ფოთლის შენახვა

სტევიას ფოთლის შრობის ტემპერატურური რეჟიმების ცვლა მნიშვნელოვნად აუმჯობესებს მშრალი ფოთლის ორგანოლეპტიკურ მაჩვენებლებს. ტემპერატურის მატება 55^0C–ს ზევით იწვევს არასასიამოვნო სუნის ნაწილობრივ გაქრობას (284).

სტევიას ღეროები, ჩაყვითლებული და გამუქებული ფოთლები უმნიშვნელო რაოდენობით შეიცავს ტკბილ ნივთიერებებს (0,5-1,0 %) (84), ამიტომაც საჭიროა მათი მოცილება ფოთლის საერთო მასიდან გაშრობამდე ან გაშრობის შემდეგ. სტევიას მშრალ ფოთოლში, ჩვენს მიერ შემუშავებული სტანდარტის (სოსტ სრ 15903044-001-02) მიხედვით დაშვებულია ღეროები 10 %-მდე, ტენიანობა 15 %-მდე (ცხრილი № 17).

ცხრილი №17.

სტევიას მშრალი ფოთლის ფიზიკო-ქიმიური და ორგანოლეპტიკური მაჩვენებლები

მაჩვენებლის დასახელება	დახასიათება და ნორმა
გარე სახე	დაქუცმაცებული ფოთლების, საყვავილე ყლორტები ცალკეული ჩამოცვენილი ბუტონების ნარევი.
ფერი	ფოთლები – ღია მწვანე ან მწვანე. ყვავიები – მოიისფერი – თეთრი.
გემო	ტკბილი, მსუყე.
სუნი	თივის – სპეციფიკური.
ტენის მასური წილი, %, არა უმეტეს	15,0
საერთო ნაცრის მასური წილი, %, არა უმეტეს	15,0
დიტერპენური გლიკოზიდების მასური წილი, %, არა უმეტეს	7,0
გაყვითლებული და გამუქებული ფოთლების მასური წილი, % არა უმეტეს	12,0
ღეროების მასური წილი (გამერქნებული ღეროები), არა უმეტეს	15,0
გარეშე მინარევების შემცველობა, %, არა უმეტეს	1,0
ორგანული (სხვა არაშხამიანი მცენარეების ნაწილები), %	1,0
მინერალური (მიწა, სილა), %	1,0

დიტერპენური გლიკოზიდების მასა არ უნდა იყოს 7 %-ზე ნაკლები, ხოლო მინერალური და ორგანული მინარევები დასაშვებია არაუმეტეს ერთი პროცენტისა.

ცხრილი № 18

სტევიას მშრალი ფოთლის შენახვისას მიმდინარე ცვლილებების ორგანოლეპტიკური და ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლები

მაჩვენებლის დასახელება	შენავის ხანგრძლივობა		
	1 წელი	2 წელი	3 წელი
ფერი: ფოთლები ყვავილები	ღია მწვანე მოიისფრო	ღია მწვანე თეთრი	მწვანე - მონაცრისფრო თეთრი
გემო	თივის	თივის	თივის
სუნი	სპეციფიკური დამახასიათებელი	სპეციფიკური დამახასიათებელი	სპეციფიკური დამახასიათებელი
ტენის მასური წილი, %	12,0	12,5	13,0
დიტერპენული გლიკოზიდების მასური წილი, %, არა უმეტეს	9,0	8,8	8,7
გაყვითლებული და გამუქებული ფოთლების მასური წილი, %	8,5	9,0	9,5

სტევიას მშრალი ფოთლის შენახვისას მიმდინარე ქიმიური ცვლილებების შესწავლამ გვიჩვენა, რომ ორგანოლეპტიკური და ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლები პრაქტიკულად უცვლელი რჩება მისი სულ მცირე სამი წლით

შენახვის განმავლობაში (ცხრილი № 18). შენახვის გარანტირებულ ვადად რეკომენდირებულია ორი წელი.

რადგანაც სტევიას ფოთლის არა მთლიანი მასა, არამედ მასში შემავალი ტკბილი დიტერპენური ნაერთებია ხარისხის შეფასების განმსაზღვრელი, ნედლეულის ჩასათვლელი რაოდენობის გაანგარიშება ხდება შემდეგი ფორმულით:

$$M = \frac{(100 - W)X}{(100 - 15)7} m_1 \qquad (კგ)$$

სადაც, W -არის ჩასათვლელი ნედლეულის რეალური ტენიანობა.

15-სტევიას მშრალი ფოთლის დასაშვები ტენიანობა (მაქსიმალური) %.

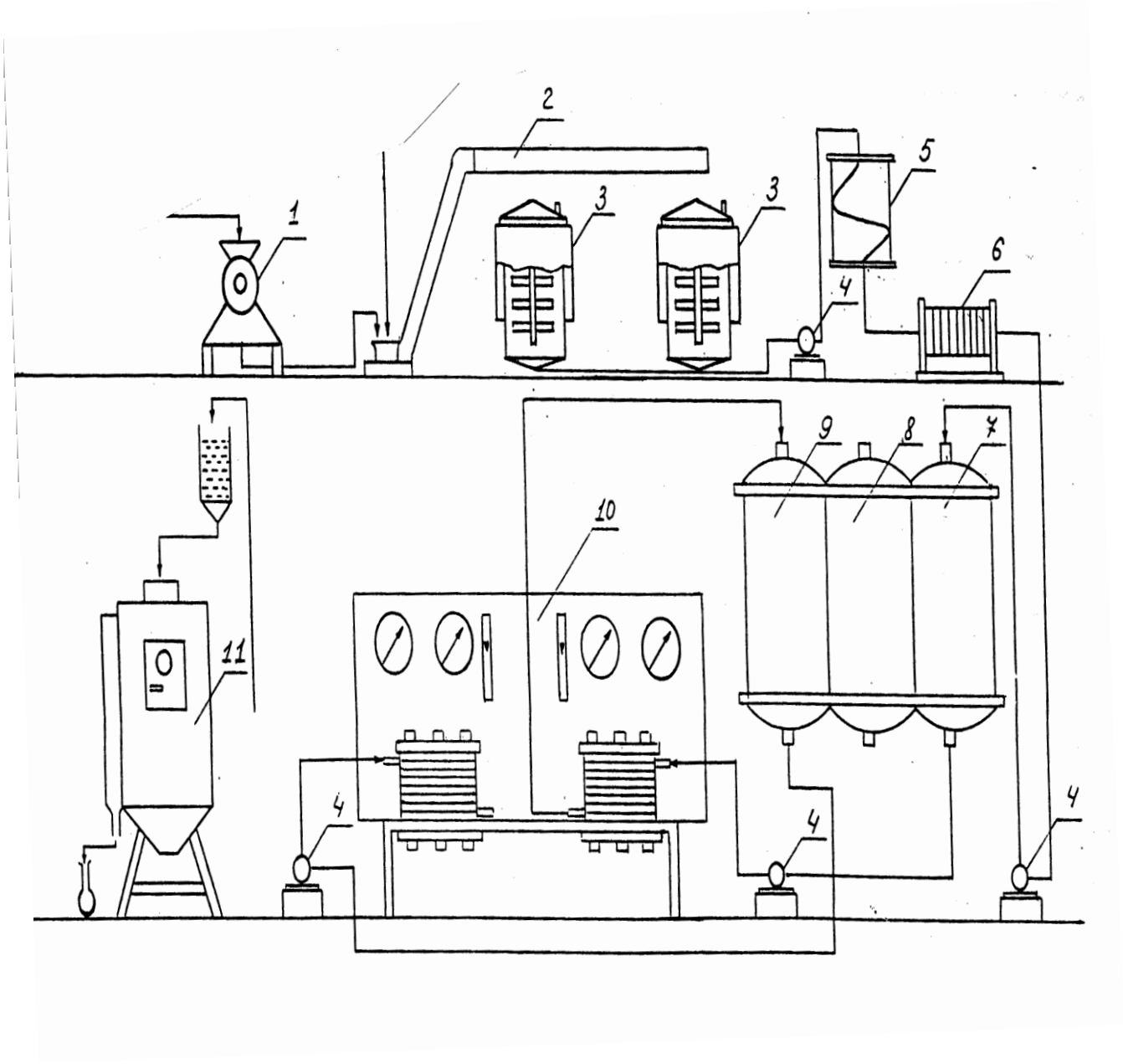
X-ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური შემცველობა (რეალური) %
7-ტკბილი გლიკოზიდების მინიმალურად დასაშვები (ჩასათვლელი) ჯამური რაოდენობა.
m_1 – ჩასათვლელი წარმოდგენილი პროდუქციის რეალური რაოდენობა კგ.

სტევიას ფოთლის შეფუთვა ხდება ქსოვილისაგან დამზადებულ ტომრებში. მცირე პარტიები შეიძლება დაფასოვდეს მუყაოს ან პოლიეთილენის პარკებში, ხოლო 1 გ-იანი ე.წ. ერთჯერად პაკეტებში დაფასოება უზრუნველყოფს ერთი ჭიქა ჩაის დატკბობას. სტევიას ფოთლის დაფასოება შესაძლებელია სხვა ბიოაქტიური ნაერთებით მდიდარ მცენარეთა ნაყოფებთან ან ფოთლებთან ერთად.

ცხრილი № 19.

სტევიას ექსტრაქტის, კონცენტრატისა და მშრალი ექსტრაქტის ორგანოლეპტიკური და ფიზიკო-ქიმიური დახასიათება

მაჩვენებლების დასახელება	სტევიას ექსტრაქტი	სტევიას კონცენტრატი	მშრალი ექსტრაქტი
ფერი	მოყავისფრო	ყავისფერი	ყავისფერი
გემო	ტკბილი - სპეციფიკური	ტკბილი – სპეციფიკური	ტკბილი - სპეციფიკური
სუნი	დამახასიათებელი	დამახასიათებელი	დამახასიათებელი
წყლის შემცველობა %	90 - 95	35 -55	3
ტკბილი დიტერპენური გლკოზიდები, %	3 - 4	10 - 14	25 -30
სიტკბოს მახასიათებელი (გ. საქაროზა)	10 - 15	40 - 60	100 - 180



ნახ. № 22. სტევიას მშრალი ექსტრაქტის წარმოების აპარატურულ – ტექნოლოგიური სქემა.

1. დამქუცმაცებელი, 2. ელევატორი, 3. ექსტრაქტორი, 4. ტუმბოები, 5. ექსტრაქტის გამაგრილებელი, 6. ფილტრ - წნეხი, 7. ავზი ექსტრაქტის გასაცივებლად, 8. ავზი 9. ავზი რეგენერაციის ხსნარის მოსამზადებლად, 10. ორსაფეხურიანი ულტრაფილტრაციული აპარატი, 11. მფრქვევანა საშრობი.

სტევიას ფოთლის ძირითადი ნაწილი მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში გადამუშავდება ექსტრაქტად. სტევიას ტკბილი

ექსტრაქტის, კონცენტრატის საწარმოო გადამუშავება ჩვენი გამოკვლევებით შესაძლებელია როგორც მშრალი, ასევე ნედლი ფოთლისაგან (ნახ. № 22.).

მიღებული კონცენტრატი უშუალოდ გამოყენება როგორც დაბალკალორიული დამატკბობელი დანამატი ან მისგან იწარმოება მშრალი ექსტრაქტი კონცენტრატის მფრქვევანა საშრობ დანადგარზე გაშრობით. შრობისათვის გამოიყენება შემდეგი რეჟიმი: ჰაერის ტემპერატურა კამერაში შესვლისას – 200 – 220 ^{0}C , კამერიდან გამოსვლისას – 100-120 ^{0}C. გასაშრობ პროდუქტში მშრალი ნივთიერების შემცველობა 20-დან 75- %-მდე. გამშრალ პროდუქტში ტენის შემცველობა არ უნდა აღემატებოდეს 3 %-ს (ცხრ.№19). წარმოებული პროდუქტი ძალზე ჰიგროსკოპულია და საჭიროებს ჰერმეტულად შენახვას (36).

სტევიას მშრალი ფოთლის ერთი გრამი, რომელშიც ტკბილი ტერპენოიდების ჯამური შემცველობა 9-10 %-ია პრაქტიკულად 20-25 გრამი საქაროზას სიტკბოს ექვივალენტურია, კონცენტრატი 35-55 % შემცველობით 35-55 გ –ისა, ხოლო მშრალი ექსტრაქტი 35-65 % შემცველობით 100-180 გ-ისა.

ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების ჯამური პრეპარატის მიღება წარმოებს როგორც სტევიას ნედლი, ასევე მშრალი ფოთლიდან, კონცენტრატიდან და მშრალი ექსტრაქტიდან (თავი № 3.3.)

სტევიას ფოთლის გადამუშავებისას მხოლოდ 10 – 45 %-ია გამოყენებული, დანარჩენი მასა კარგი - ბიოტექნოლოგიური ნედლეულია. ჩვენი გამოკვლევებით წარმოების ნარჩენი წარმატებით შეიძლება გამოვიყენოთ სოკოს სუბსტრატად.

დ ა ს კ ვ ნ ე ბ ი

1. შესწავლილია საქართველოში ინტროდუცირებული მცენარეების სტევიასა *(Stavia rebaudiana Bertoni)*და კივის *(Actinidia deliciosa)*ტერპენოიდები, ფენოლური ნაერთები, ორგანული მჟავები, ნახშირწყლები, ფენოლკარბონმჟავები, ვიტამინები, მინერალური ნივთიერებანი და არომატული ნაერთები.

2. საქართველოში კულტივირებულ სტევიას ფოთოლში იდენტიფიცირებულია სტევიოზიდი (13-0-β-D-გლუკოპირანოზილ (1 - 2)-β- D-გლუკოპირანოზილ, 19-ოქსო-0-β- D-გლუკოპირანოზილ, ენტ-კაურენ-16) და რებაუდიოზიდი A (13-0-β- D-გლუკოპირანოზილ (1 - 2)-0-β- D-გლუკოპირანოზილ (1-3)-0-β-D-გლუკოპირანოზილ, 19 ოქსო-0-β-D-გლუკოპირანოზილ, ენტ-კაურენ-16), რებაუდიოზიდი C, დულკოზიდი, p-კუმარის მჟავა, ყავის მჟავა.

3. მაღალი წნევის ითხური ქრომატოგრაფირების მეთოდით დადგენილია სტევიას ფოთლის ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდების რაოდენობრივი შემცველობა, რომელიც საშუალოდ 8,5-10%-ს შეადგენს მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით, აქედან სტევიოზიდი 5,5-6%, რებაუდიოზიდი A -2,8-3,7%, რებაუდიოზიდი C -0,3-0,5%, დულკოზიდი 0,1%-ია.

4. დადგენილია, რომ სტევიას სხვადასხვა ნაწილში ტკბილი დიტერპენური გლიკოზიდები არათანაბრადაა განაწილებული. მათი ძირითადი ნაწილი ზრდასრულ ფოთლებშია 14,6%-მდე. ფესვი და ღერო ამ ნაერთებს პრაქტიკულად არ შეიცავს. ცენარის ზრდა-განვითარების სხვადასხვა ეტაპზე მათი შემცველობა განსხვავებულია. აქსიმალური რაოდენობა გროვდება მცენარის ბუტონიზაციის პერიოდში.

5. დამუშავებულია ტკბილი დიტერპენური ნაერთების საწარმოო მიღების ტექნოლოგია ექსტრაქტის ულტრაფილტრაციული მემბრანული

ტექნოლოგიის გამოყენებით, რაც უზრუნველყოფს საქაროზაზე 100-300-ჯერ ტკბილი პრეპარატის მიღებას.

6. შემუშავებულია სტევიას ფოთლის ტკბილი ნაერთების ჯამური რაოდენობის განსაზღვრის ექსპრეს მეთოდი.

7. შესწავლილია სტევიას ფოთლის ნახშირწყლები, იდენტიფიცირებულია გლუკოზა, არაბინოზა და რამნოზა, მონოსაქარიდების შემცველობა 0,5 – 1%-ია, პოლისაქარიდებიდან ძირითადად გვხვდება ცელულოზა (10% - მდე).

8. შესწავლილია სტევიას ფოთლის ვიტამინები და აღმოჩენილია ასკორბინის მჟავა, რიბოფლავინი, თიამინი, პროვიტამინი და მინერალური ნივთიერებანი (ალუმინი, კალციუმი, ქრომი, კობალტი, რკინა, მაგნიუმი).

9. შესწავლილია სტევიას ფოთლის აქროლადი კომპლექსი და მისი ცვალებადობა ფოთლის გადამუშავების დროს. დადგენილია, რომ სტევიას ფოთლის და მისგან მიღებული პროდუქტების აქროლადი კომპლექსის ძირითადი კომპონენტებია კარიოფილენოქსიდი, სპატულენოლი, დელტა-კადინენი, ტერპენენ-4-ოლი, ცის-3-ჰექსენოლი, ლიმონენი, ალფა-გუმულენი, გერმაკრენი, ბეტა-ნერლადოლი. სტევიას ნედლი ფოთლის საწარმოო გადამუშავების ყველა ეტაპზე ხდება ამ ნაერთების რაოდენობრივი კლება. ტკბილი ტერპენოიდების ჯამურ პრეპარატში კი ეს ნაერთები კვალის სახით რჩებიან.

10. შემუშავებულია სტევიას ფოთლის კომპლექსური გადამუშავების ტექნოლოგიური სქემები და რეჟიმები მშრალი ფოთლის, ექსტრაქტის, კონცენტრატის, მშრალი ექსტრაქტის და ტკბილი დიტერპენული გლუკოზიდების ჯამური პრეპარატის მისაღებად.

12. რეკომენდირებულია უალკოჰოლო და ალკოჰოლიანი სასმელების, საკონდიტრო ნაწარმის წარმოების ტექნოლოგოური სქემები სტევიასაგან მიღებული დამატკბობელის გამოყენებით.

13. საქართველოში ინტროდუცირებული სტევიას ფოთლის ბოიტექნოლოგიური კვლევის შედეგები იმის საშუალებას იძლევა, რომ ეს ახალი ჩვენი ქვეყნისათვის არატრადიციული ნედლეული გამოყენებული იქნას მაღალი კვებითი და ორგანოლეპტიკური თვისებების მქონე კვების პროდუქტებისა და ნახევარფაბრიკატების დასამზადებლად.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. გვასალია ვ.პ., კოვალენკო ნ.ვ., გარგულია მ.ჩ. /აფხაზეთის პირობებში ტკბილი ორფოთოლას (თაფლოვანი ბალახი, ბაა-ხე) მოყვანის შესაძლებლობის შესწავლა // სუბტროპიკული კულტურები №5. 1990. გვ. 151-158.
2. ხვიჩია გ., გაბისონია დ. /აქტინიდია კულტურა და მისი განვითარების შესაძლებლობანი საქართველოში. // სუბტროპიკული კულტურები №3. 1990. გვ. 125-130.
3. გოლიაძე შ.კ., სარჯველაძე გ.პ. /ბიოქიმიური მაჩვენებლების ცვალებადობა აქტინიდიას ოჯახობრივი სელექციისას. // სუბტროპიკული კულტურები 1989წ.
4. გოლიაძე შ.კ. /აქტინიდია ანასეულში. // სუბტროპიკული კულტურები №5 1989წ.
5. კვესიტაძე გ., კვესიტაძე ე. /ბიოტექნოლოგია //თბილისი 1999წ.
6. ონიანი ო., მარგტველაშვილი გ. /მცენარის ქიმიური ანალიზი // თბილისი. განათლება 1978წ.
7. პაპუნიძე გ., კალანდია ა., პაპუნიძე მ. / საქართველოში მოყვანილი სტევიას აქროლადი კომპლექსის გაზურ – სითხური ქრომატოგრაფირება. // საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის „მოამბე“. 2002წ. ტომი 166 №2.
8. პაპუნიძე გ., კალანდია ა., ვანიძე მ. / სტევიას ტკბილი დიტერპენური გლუკოზიდები // საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის „მოამბე“ . ტომი 166, № 2, 2002წ.
9. სარჯველაძე გ ., კალანდია ა ., ვანიძე მ., პაპაშვილი მ. / მატონიზირებელ - პროფილაქტიკური სასმელის წარმოების ხერხი. // პრიორიტეტი №2629/ 01-99.
10. სარჯველაძე გ., კალანდია ა. / შაქრის დაბალკალორიული შემცვლელი ორფოთოლა ტკბილის ფოთლებიდან. //ბათუმის სეი-ის სამეცნიერო კონფერენციის მასალები. ბათუმი 1996წ.
11. ჩხაიძე გ. / სუპტროპიკული კულტურები // ტომი I I I . თბილისი 1996წ.
12.ჩაის სუპტროპიკულ კულტურათა და ჩაის მრეწველობის სამეცნიერო –კვლებითი ინსტიტუტის დროებითი ინსტრუქცია. // 1990წ.
13. ჩხაიძე გ. / სასარგებლო კულტურა. // აგრარული მეცნიერების „მაცნე“ №115 1998წ.
14. ჩხაიძე გ. / სუპტროპიკული კულტურები. // თბილისი. „მეცნიერება“ 1996წ

15. ცანავა ვ. ა., სარჯველაძე გ. პ., ხარებავა ლ. გ. / ტკბილი ორფოთოლას აქროლადი კომპლექსის შესწავლა // სუპტროპკული კულტურები 1989წ. №3. გვ. 73 -77.
16. ცანავა ვ.ა., სარჯველაძე გ. პ., ხარებავა ლ. გ. / ზოგიერთი ტექნოლოგიური პროცესის გავლენა ტკბილი ორფოთოლას აქრლადი კომპლექსის შემადგენლობაზე // სუპტროპიკული კულტურები №3. 1989წ. გვ. 64-70.
17. Алексеева В.П. / Медовая трава каа-хе // Бюллетень ВНИИЧ и СК. 1956г. №1. ст. 168-169.
18. Боровиков В. – Статистика, искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов - Санкт – Петербург, „ Питер “ 2001г.
19.Ванидзе М.Р. / Флавоноидные соединения листьев и плодов фейхоа // Автореф. Дис… уч. Ст. канд. Биол. Наук. Тбилиси 1992г.
20. Вигоров Л. И. / Сад лечебных культур // Свердловск. Средне –уральское издательство. 1979г.
21.Володин Ю.Ю. Соколова И.А. Клестнова-Надеева Е.А. Шашкина М. Я. Толкачев В.П. / определение аскорбиновой кислоты в пищевых добавках вольтамперометрическим методом // 3Междун. Симр. << Экол. Человека:пробл. и состояние лечебно-профилак. питания >>, 26-30сент., 1994:Тез. Докл.ч.2-М. 1994г.
22. Георгевский В.П. и др./ Биологически активные вещества лекарственных растении //Новосибирск. Наука. 1990г.
23. Гогия В.П./ Биохимия субтропических растении // М.Колос 1984г.
24.Головач А.Г., – Лианы, их биология и использование, <<Наука>>, Ленинград. 1973
25. Гудвин Т. Марсер Э. – Введение в биохимию растении. Москва. Мир 1986г.
26.Дурмишидзе С.В., Шалашвили А.Г. /Флавоноиды и оксикоричневые кислоты некоторых представителей дикорастущей флоры Грузии // Тбилиси 1981г.
27.Ермаков Е. И. Кочетов А. А. / Особенности роста и развития растении стевии при разных световых режимом в регулируемых условиях // Доклады РАСХН. 1996г. №1. ст. 8-9.
28.Ермаков С.А. / Методы биохимического исследования растении //М: 1987г. ст 111.
29.Запрометов М.Н. / Биохимия катехинов // М:1964г.
30. Запрометов М.Н. / Основы биохимии фенольных соединении // М : высокая школа 1974г.
31. Запрометов М.Н. /Фенольные соединения растении и их биосинтез // Биологическая химия Т 27. М.1988г.
32. Зубенко В.Ф. Чудновский Б. Д. / Влияние облиственности черенков и светового дня на укореняемость и рост рассады стевии // Физиология и биохимия культурные растений. 1991г. Том №23. №24. Ст. 407-411.

33. Зубенко В.Ф. Чудновский Б. Д. / Рождения новой отрасли // Сахарная свекла. 1990г. №5 Ст. 49-50.
34. Ивановская Е.А., Феличкина О.Г., Слепченко Г.Б., Пикула Н.П./Экспресс-анализ детское питания на содержание витамина С и токсичных металлов // Междун. науч. Конф. << Прогресс. Техноло. И техн. В пищевой промышл.>>-Краснодар. 1994г.
35. Каландия А. Г., Ванидзе М. Р., Папунидзе С. Г. / Стевия – источник экологически чистого подсластителя научные труды международный ,,Экология человека и проблемы воспитания молодых ученых“ Одесская государственная академия пищевые технологий. //Одесса 1997г. Ст. 227-228.
36. Каландия А. Г., Сарджвеладзе Г. П., Цанава В. П., Салдадзе К. М., Гоциридзе Р.С., Чхеидзе Н.В., Зоидзе А. М. / Метод очистки экстракта из растения - Stevia rebaudiana Bertoni.// Приоритет №4861523/13 (064908).
37. Каландия А. Г. /Способ получения сушеного продукта из лисьтев растения – Stevia rebaudiana Bertoni // Авторское свидетельство № 1792625 8 октября 1992г.
38. Каландия А.Г. / Способ производства цитрусового лечебно-тонизирующего напитка // Авторское свидетельство № 1813400 11октября 1992г.
39. Кацериков Н.В. / методы определения тиамина, рибофлавина, ниацина и аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах << Хранение и переработка сельхозсыръя >>, №9,2000г.
40. Кемертелидзе Э.П., Георгивский В.П. / Физико-химические методы анализа некоторых биологических активных веществ растительного происхождения //Тбилиси. Мецниереба 1977г.
41. Ким Ю. М. Галалова Е. Е. / Интродукция стевии в Узбекистане // Сб. научных трудов по прикл. Ботанике, генетике и селекции. 1991г. Том №144. Ст. 186-191.
42. Крутошикова А. Угер М. – Подслащивающие вещество в пищевой промышленности М. ,, Агропромиздат “ 1988г.
43. Ленинджер А. / Основы биохимии // М : Мир 1985 г.
44. Литвененко В.И. и др. /Химические исследования промышленных видов солодки.// М : Наука 1966 г.
45. Ловкова М.Я., Рабинович А.М. и др. / Почему растения лечат. // М : Наука 1990г. 256с.
46. Ляховкин А. Г. Николаев А. П. Учитель В. Б. / Стевия –медовая трава „Весь“ // Санкт-Петербург – 96с. 1996г.
47. Маргна У.В./ Взаимосвязь биосинтеза флавоноидов с первичным метаболизмом растении // Итоги, наука и техника ВИНИТИ. 1990 №33.
48. Методические материалы по высокоэффективной жидкостной хроматографии// г.Орел.1990г.
49. Наместников А.Ф./ Технология консервирования тропических и субтропических фруктов и овощей // Киев- Одесса <<Высшая школа>>1989г. с352.

50. Папунидзе Г. Р. , Каландия А. Г. / Стевия в Грузии // Пищевая промышленность, № 2002г.
51. Препаративная жидкостная хроматография // М.Мир.1990г.
52. Прохозка Ж. /Фенолы и ароматические кислоты. Хроматография на бумаге // М : Иностр. Лит. 1962г
53. Плешков Б.П./Биохимия сельскохозяйственных растении.//М.: Агропроиздат 1987г, 404.
54. Сарджвеладзе Г.П., Ванидзе М. Р., Чхиквишвили И.Д., Гиркелидзе А. В., Каландия А. Г. /Способ получения экстракта из растительного сырья // Приоритет №4934021/13 (038901).
55. Сухерелли Г.Д. - << Актинидия >>. Перевод с испанского – Мадрид: Мунди- пренса, 1987г.
56. Федерович Н.А. / Технология консервирование тропических и субтропических фруктов и овощей //Одесса 1989г.
57. Харборн Дж. / Биохимия фенольных соединении // М : Мир 1968. ст436.
58. Химический состав пищевых продуктов. Под редакции д-ра техн. Наук И.М. Скурихина // Москва. Пищевая промышленность. 1979г.
59. Чаховский А.А., Шапиро Д.К., Чекалинская И.И., Боберко Е.З. / Черноплодная рябина, облепиха и другие перспективные плодово- ягодные растения. // Минск << Уражай>>, 1976.
60. Чхиквишвили И.Д. / Изучение состава комплекса минорных флавоноидов Грузинского чайного растения // Автореферат. дис. Уч. ст. канд. биол. наук. М.1985г.
61. Ahmed, M. S. and Dobberstein, R. H. 1982a. *Stevia rebaudiana.* II. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of stevioside, rebaudioside A and rebaudioside C. J. Chromatogr. 236: 523-526.
62. Ahmed, M. S. and Dobberstein, R. H. 1982b. *Stevia rebaudiana.* III. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of rebaudiosides B, D, and E, dulcoside A, and steviolbioside. J. Chromatogr. 245: 373-376.
63. Ahmed, M. S., Dobberstein, R. H. and Farnsworth, N. R. 1980. *Stevia rebaudiana.* I. Use of *p*-bromophenacyl bromide to enhance ultraviolet detection of water-soluble organic acids (steviolbioside and rebaudioside B) in high-performance liquid chromatographic analysis. J. Chromatogr. 192: 387-393.
64. Akasawa, A., L. S. Hsieh, et al. (1996). A novel acidic allergen, Hev b 5, in latex. Purification, cloning and characterization. Journal of Biological Chemistry 271(41): 25389-25393. {a} HFM-422, Div. Allergenic Products Parasitol., CBER, FDA, 1401 Rockville Pike, Rockville, MD 20852, USA
65. Akashi, H. & Yokoyama, Y. "Dried leaf extracts of stevia. Toxicological test." Shokuhin Kogyo, 18(20), 34-43, 1975.
66. Ali, K., M. Ando, et al. (1999). Changes in chlorophyll fluorescence in leaves of deciduous fruit trees after application of different amounts of nitrogen fertilizer. Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Meijo University. March(35): 29-36. {a} Faculty of Agriculture, Meijo University, Nagoya, Japan

67. Alvares, M., et.al., Abstract Pap., Semin. Bras. Stevia Rebaudiana Bertoni 1st, 1981, p. XIII.I.
68. Alvarez, M. "Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni: Toxicological aspects." Third Brazilian Seminar on Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni, (Summaries), Angelucci, E. (Coordinator), July 1986, p. 4-7.
69. Alvarz, M. and I. T. Kusumoto (1987). Quantitative analysis of glycosidic sweeteners from Stevia rebaudiana and its hydrolysis products by high performance liquid chromatography (HPLC). Arquivos De Biologia E Tecnologia 30(2): 337-348.
70. Aquino, R. P., I. Behar, et al. (1247). Isolation of glycosides from Stevia rebaudiana. Bollettino Societa Italiana Biologia Sperimentale 61(9): 1247-1252.
Arthur O. Tucker and Sharon S. Tucker. / Catnip and the catpin response.
71. Avent, A. G., J. R. Hanson, et al. (1990). Hydrolysis of the diterpenoid glycoside, stevioside. Phytochemistry 29(8): 2712-2715.
72. Badulovie M., Plamenak M. / Spitivante Mogucnosti oriljavanja relih i relemh rermca aktimdije u prirodum uslovimal Poljoprivreda i sumaistvo, 1987, 33 №4,
73. Bennett, R. D., Lieber, E. R., and Heftmann, E. 1967. Biosynthesis of steviol from (-)-kaurene. Phytochemistry 6: 1107-1110.
74. Bertoni, M.S. "Caa-hee (stevia rebaudiana Bertoni)." Bol. Est. Agr. Puerto Bertoni Paraguay, V(2), 54, 1911.
75. Bertoni, M.S. "El Caa-ehe (Eupatorium rebaudianum, species nova)". Rev. Agr., Ascunion 1: 35-37, 1899.
76. Bertoni, M.S. "Le Kaa He-e. Sa nature et ses properietes." Ancient. Paraguayos, 1(5), 1-14, 1905.
77. Bespalhok, F. J. C. and K. Hattori (1997). Embryogenic callus formation and histological studies from Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni floret explants. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 9(3): 185-188. {a} Dep. Genetic Plant Breeding, Sch. Agricultural Sci., Nagoya Univ., Chikusa ku, Nagoya 464-01, Japan
78. Boeckh, E.M.A., "Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni: clinical evaluation of its acute action on cardio-circulatory, metabolic and electrolitic parameters in 60 healthy individuals." Third Brazilian Seminar on Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni, (Summaries), Angelucci, E. (Coordinator), July, 1986, pp. 22-23.
79. Bondarev, N. I., A. M. Nosov, et al. (1998). Effect of exogenous growth regulators on callogenesis and growth of cultured cells in Stevia rebaudiana. Fiziologiya Rastenii Moscow. Nov. Dec. 45(6): 888-892.
80. Bonvie, L., Bonvie, B., and Gates, D. 1997. The stevia story, a tale of incredible sweetness and intrigue. B.E.D. Publications, Atlanta.
81. Bovanova, L., E. Brandsteterova, et al. (1998). HPLC determination of stevioside in plant material and food samples. Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung A 207(5): 352-355. {a} Dep. Analytical Chem., Fac. Chem. Technol., Slovak Tech. Univ., Radlinskeho 9, SK-812 37 Bratislava, Slovenia
82. Brandle, J. (1999). Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, Stevia rebaudiana. Canadian Journal of Plant Science 79(1):

85-92. {a} Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 1391 Sandford St., London, ON, N5V 4T3, Canada
83. Brandle, J. E., A. N. Starratt, et al. (1998). Stevia rebaudiana; Its agricultural, biological, and chemical properties. Canadian Journal of Plant Science 78(4): 527-536. Agric. and Agri-Food Can., South. Crop Prot. and Food Res. Cent., 1391 Sandford St., London, ON N5V 4T3, Canada
84. Brandle, J.E., and Rosa, N. 1992. Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. Can. J. Plant Sci. 72: 1263-1266.
85. Bridel, M. & Lavielle, R. "Sur le principe sucre des feuilles de kaa-he-e (stevia rebaundiana B)." Compt. Rend., Acad. Sci., Parts 192, 1123-1125, 1931.
86. Bridel, M. and Lavieille, R. 1931a. Le principe a saveur sucrйe du Kaa-hк-й (*Stevia rebaudiana)* Bertoni. Bull. Soc. Chim. Biol. 13: 636-655.
87. Bridel, M. and Lavieille, R. 1931b. Le principe sucrй du Kaa-hк-й (*Stevia rebaudiana* Bertoni). II. L'hydrolyse diastasique du stйvioside. III. Le stйviol de l'hydrolyse diastasique et l'isostйviol de l'hydrolyse acide. Bull. Soc. Chim. Biol. 13: 781-796.
88. Bratus T.N. Kozlova M. Sbornik Sensornye sistemy. Red. Gusuni G. V. Nauka 1978 p. 138.
89.Cabrera, C., Y. Madrid, et al. (1994). Determination of lead in wine, other beverages and fruit slurries by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry with on-line microwave digestion. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 9(12): 1423-1426. {a} Departamento de Quimica Analitica, Facultad de Quimicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
90. Callaghan, P. T., C. J. Clark, et al. (1994). Use of static and dynamic NMR microscopy to investigate the origins of contrast in images of biological tissues. Biophysical Chemistry 50(1-2): 225-235. {a} Dep. Physics and Biophys., Massey Univ., Private Bag 11222, Palmerston North, New Zealand
91. Cardello, H., S. M. Da, et al. (1999). Measurement of the relative sweetness of stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. Plant Foods for Human Nutrition Dordrecht 54(2): 119-130. {a} Department of Food and Nutrition, FCF-UNESP, CEP 14801-902, Araraquara, SP, Brazil
92. Carneiro, J. W. P., A. Bertonha, et al. (1989). The influence of crop age after cutting on some agronomic characteristics of Stevia rebaudana Bertoni. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 24(2): 211-216.
93. Carneiro, J. W. P., A. S. Muniz, et al. (1997). Greenhouse bedding plant production of Stevia rebaudiana (Bert) Bertoni. Canadian Journal of Plant Science 77(3): 473-474. {a} Univ. Estadual Maringa, Dep. Agron., Av. Colombo 5790, Maringa, Parana 87020-900, Brazil
94. Carneiro, J.W.P. 1990. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, production of seed. M.Sc Thesis, State University of Maringa, Brazil (English abstr.).

95. Chalapathi, M. V., B. Shivaraj, et al. (1997). Nutrient uptake and yield of Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) as influenced by methods of planting and fertilizer levels. Crop Research Hisar 14(2): 205-208. Dep. Agron., Univ. Agric. Sci., Bangalore-560 065, India
96. Chalapathi, M. V., S. Thimmegowda, et al. (1999). Influence of fertilizer levels on growth, yield and nutrient uptake of ratoon crop of stevia (Stevia rebaudiana). Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences. Dec. 21(4): 947-949. {a} Department of Agronomy, University of Agricultural Sciences, Bangalore, 560065, India
97. Chalapathi, M. V., S. Thimmegowda, et al. (1999). Vegetative propagation of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) under field conditions. Crop Research Hisar. Sept. 18(2): 319-320. {a} Department of Agronomy, University of Agricultural Sciences, Bangalore, 560 065, India
98. Chan, P., D. Y. Xu, et al. (1998). The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. Life Sciences 63(19): 1679-1684. {a} Div. Cardiovasc. Med., Taipei Med. Coll. Affiliated Taipei Wan Fang Hosp., No. 111, Hsin Lung Rd., Sect. 3, Wen Shan, Taipei 117, Taiwan
99. Chang, K.F., Howard, R.J. and Gaudiel R.G. 1997. First report of stevia as a host for *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 81: 311.
100. Chang, S. S. and Cook, J. M. 1983. Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages. J. Agric. Food Chem. 31: 409-412.
101. Chappell, J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 521-547.
102. Constantin, J., I. E. L. Ishii, et al. (1991). Sensitivity of ketogenesis and citric acid cycle to stevioside inhibition of palmitate transport across the cell membrane. Brazilian Journal Of Medical And Biological Research 24(8): 767-772.
103. Cook, I. F. and Knox, J. R. 1970. A synthesis of steviol. Tetrahedron Lett. 4091-4093.
104. Crammer, B. and Ikan, R. 1986. Sweet glycosides from the stevia plant. Chem. Brit. 22: 915-916.
105. D'Agostino, M., S. F. De, et al. (1984). Sterols from Stevia rebaudiana. Bollettino Societa Italiana Biologia Sperimentale 60(12): 2237-2240.
106. Darise, M., Kohda, H., Mizutani, K., Kasai, R. and Tanaka, O. 1983. Chemical constituents of flowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Agric. Biol. Chem. 47: 133-135.
107. Das, S., A. K. Das, et al. (1992). Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. Caries Research 26(5): 363-366. {a} Dep. Pediatric Dentistry, Coll. Dentistry, University Illinois at Chicago, 801 South Paulina, Chicago, Ill. 60612
108. Djerassi, C., Quitt, P., Mosettig, E., Cambie, R. C., Rutledge, P. S. and Briggs, L. H. 1961. Optical rotatory dispersion studies. LVIII. The complete absolute

configurations of steviol, kaurene and the diterpene alkaloids of the garryfoline and atisine groups. J. Amer. Chem. Soc. 83: 3720-3722.
109. Dolder, F., Lichti, H., Mosettig, E. and Quitt, P. 1960. The structure and stereochemistry of steviol and isosteviol. J. Amer. Chem. Soc. 82: 246-247.
110. Donalisio, M.G.R., Duarte, F.R., Pinto, A.J.D.A., and Souza, C.J. 1982. *Stevia rebaudiana*. Agronomico 34: 65-68.
111. DuBois, G.E. and Stephenson, R.A. 1984. Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogues with improved organoleptic properties. J. Med. Chem 28:93-98.
112. Dzyuba, O. O. (1998). Stevia rebaudiana (Bertoni) Hemsley: A new source of natural sugar substitute for Russia. Rastitel'nye Resursy 34(2): 86-95. {a} N. I. Vavilov All-Russ. Res. Inst. Plant Breed., St. Petersburg, Russia
113. Ermakov, E. I. and A. A. Kochetov (1996). Specific features in growth and development of Stevia plants under various light regimes in regulated conditions. Doklady Rossiiskoi Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk(1): 8-9. Agrophys. Inst., 194354 St. Petersburg, Russia
114. Ferraresi, M. D. L., A. M. K. Bracht, et al. (1985). Hydrolysis of Stevia rebaudiana glycosides with the gastric juice of Megalobulimus paranaguensis. Arquivos De Biologia E Tecnologia 28(3): 399-412.
115. Flachsland, E., L. Mroginski, et al. (1996). Regeneration of plants from anthers of Stevia rebaudinana Bertoni (Compositae) cultivated in vitro. Biocell 20(1): 87-90. {a} Inst. Bot. Nordeste, Fac. Ciencias Agrarias, Casilla Correo 209, 3400 Corrientes, Argentina
116. Flores, R. Z., S. T. Z. Cechin, et al. (1987). Absence of mutagenesis induced by stevioside from Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. Ciencia E Cultura 39(4): 417-418.
117. Food Chemistry Division, Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare. "Toxicological effect of a sugar alternative, stevia products." January 1981.
118. Fors, A. 1995. A new character in the sweetener scenario. Sugar J. 58: 30.
119. Frederico, A.P., Ruas, P.M., Marinmorlaes, M.A., Ruas, C.F. and Nakajima, J.N. 1996. Chromosome studies in some *Stevia* (Compositae) species from southern Brazil. Braz. J. Genet. 19: 605-609.
120. Fujino, A. 1960. Chemical components in matatabi. III. The structure of actinidine [in Japanese] . J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect. 81;1327-1332.
121. Fujinuma, K., Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Ibe, A. and Nishima, T. 1986. Thin layer chromatographic detection and liquid chromatographic determination of stevioside and rebaudioside A in beverages and foods following reverse phase column chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69: 799-802.
122. Fujita, H. & Edahiro, T. "Safety and utilization of stevia sweetener." The Food Industry. 22(22), 1-8, 1979.
123. Fujita, S., Taka, K. and Fujita, Y. 1977. Miscellaneous contributions to the essential oils of the plants from various territories. XLI. The components of the

essential oil of *Stevia rebaudiana*. Yakugaku Zasshi 97: 692-694; Chem. Abstr. 87: 122621v (1977).
124. Fukaya, T., Y. Ishiguro, et al. (1993). Appearance of 2,6-dichlorophenol in carrot treated with sodium hypochlorite. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology 40(4): 244-249. {a} United Graduate Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., 1-1 Yanagido, Gifu-shi, Gifu 501-11, Japan
125. Fullas, F., Kim, J., Compadre, C. M. and Kinghorn, A. D. 1989. Separation of natural product sweetening agents using overpressured layer chromatography. J. Chromatogr. 464: 213-219.
126. Gagliardi, L., A. Amato, et al. (1986). Determination of stevioside in Stevia rebaudiana by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Annali Di Chimica 76(1-2): 39-44.
127. Goenadi, D. H. (1317). Effect of slope position on the growth of stevia in Indonesia. Communications In Soil Science And Plant Analysis 18(11): 1317-1328.
128. Goenadi, D.H. 1983. Water tension and fertilization of *Stevia rebaudiana* Bertoni on Oxic Tropudalf (English abstr.). Menara Perkebunan. 51: 85-90.
129. Gonzalez, M. V., M. A. Lage, et al. (1995). Time-dependence of physico-chemical characteristics of kiwifruit between fruitset and harvest in Galicia (N.W. Spain). Journal of Horticultural Science 70(2): 297-301. Area Nutr. Bromatol., Fac. Farmacia, Univ. Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain
130. Haebisch, E. M. A. B. (1992). Pharmacological trial of a concentrated crude extract of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni in healthy volunteers. Arquivos de Biologia e Tecnologia Curitiba 35(2): 299-314. Dep. Farmacol., Inst. Ciencias Biomed., Univ. Sao Paulo, 05508, Sao Paulo, SP, Brazil
131. Haga, T., Ise, R., and Kobayashi, T. 1976. A method for purifying stevioside (English abstr.). Jap. Patent 51-131900.
132. Hallauer, A.R. and Miranda, J.B. 1981. Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State Univ. Press, Ames.
133. Handro, W., C. M. Ferreira, et al. (1993). Chromosomal variability and growth rate in cell suspension cultures of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. Plant Science Limerick 93(1-2): 169-176. {a} Plant Cell Biology Lab., Dep. Botany, Inst. Biosciences, Univ. Sao Paulo, C.P. 11461, 05422-970 Sao Paulo, Brazil
134. Hanson, J. R. and De Oliveira, B. H. 1993. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. Nat. Prod. Rep. 10: 301-309.
135. Hanson, J.R., and White, A.F. 1968. Studies in terpenoid biosynthesis II. The biosynthesis of steviol. Phytochemistry 7: 595-597.
136. Harborne, J.B. and Williams, C.A. (1988) in The Flavonoids: Advances in
137. Hedden, P., and Kamiya, Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 431-460.
138. Higashi, S., M. Abe, et al. (1994). Conversion of Stevioside to Rebaudioside A by Stevia-Glucosyltransferase. Reports of the Faculty of Science Kagoshima

University Earth Sciences and Biology(27): 199-207. {a} Dep. Biol., Fac. Sci., Kagoshima Univ., 1-21-35 Korimoto, Kagoshima 890, Japan
139. Hodge, J.e. & Inglett, G.E. "Structural aspects of glycosidic sweeteners containing (1'2)-linked disaccharides." In Inglett, G.E. (ed.) Symposium Sweeteners. The Avi Publishing Company, Inc. Conn., 1974, pp. 216-234.
140. Huang, Y. S. and A. G. Guo (1996). Investigation and production on the type R-A steviosides. Journal of Plant Resources and Environment 5(4): 29-32. Inst. Bot., Jiangsu Province and Chinese Acad. Sci., Nanjing 210014, China
141. Huang, Y. S., A. G. Guo, et al. (1995). Studies on the variation of steviosides content and selection of type R-A in Stevia rebaudiana. Journal of Plant Resources and Environment 4(3): 28-32. {a} Inst. Botany, Jiangsu Province Chinese Acad. Sci., Nanjing 210014, China
142. Huebler, M. O., A. Bracht, et al. (1994). Influence of stevioside on hepatic glycogen levels in fasted rats. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 84(1): 111-118. Lab. Liver Metabolism, Univ. Maringa, 87020900 Maringa, Brazil
143. Ishii, E. L. and A. Bracht (1986). Stevioside, the sweet glycoside of Stevia rebaudiana, inhibits the action of atractyloside in the isolated perfused rat liver. Research Communications In Chemical Pathology And Pharmacology 53(1): 79-92.
144. Ishii, I. E. L. A. A. B. (1995). Stevioside is not metabolized in the isolated perfused rat liver. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology 87(2): 167-175. Lab. Liver Metabolism, Univ. Maringa, 87020900 Maringa, Brazil
145. Ishit,p. 9. E.I. & Bracht, A. "Stevioside inhibits the toxic action of actractiloside on the liver,," Third Brazilian Seminar on Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni, (Summaries), Angelucci, E. (Coordinator), July 1986,
146. Itagaki K., and Ito, T. 1979. Purification of stevioside (English abstr.). Jap. Patent 54-041898.
147. Jeppesen, P. B., S. Gregersen, et al. (2000). Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K+-channel activity. Metabolism Clinical and Experimental. Feb. 49(2): 208-214. {a} Department of Endocrinology and Metabolism, Aarhus University Hospital, Tage-Hansens gade 2, DK-8000, Aarhus C, Denmark
148. Johnson R.L., Steeke R.J., Len S.C./Recombined kiwifruit products//Csiro food res quart-1990-50 №4 pi 04-110.
149. Kamm,J.J.; Dashman,T.; Conney,A.; Burns,J.J. / N-Nitroso componds in the Environment, IARC Scientific Publication №9; Bogovski,P.;Walker, E.A., Eds., International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1974; pp 199-212.
150. Kaneda, N., Kasai, R., Yamasaki, K. and Tanaka, O. 1977. Chemical studies on sweet diterpene-glycosides of *Stevia rebaudiana*: conversion of stevioside into rebaudioside-A. Chem. Pharm. Bull. 25: 2466-2467.

151. Karg J.E./ Die kiwi, eine neue frucht und ihr aroma.// Riechst., Aromen, Kosmet., 1976,26(3-4), 80-83.
152. Kasai, R., Yamaguchi, H. and Tanaka, O. 1987. High-performance liquid chromatography of glycosides on a new type of hydroxyapatite column. J. Chromatogr. 407: 205-210.
153. Katayama O., Sumida, T, Hayashi, H. and Mitsuhashi H. 1976. The practical application of Stevia and research and development data (English translation). I.S.U. Company, Japan. 747 pp.
154. Kim, K. K. and H. Shibata (1997). Characterization of ent-kaurenoic acid 13-hydroxylase in steviol biosynthesis of Stevia rebaudiana Bertoni. Agricultural Chemistry and Biotechnology 40(6): 501-507. {a} Dep. Agricultural Chem., Gyeongsang Natl. Univ., Chinju, Gyeongnam 660-701, South Korea
155. Kim, K.K., Sawa, Y., and Shibata, H. 1996a. Hydroxylation of *ent*-kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni- Purification and partial characterization of the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 332: 223-230.
156. Kim, K.K., Yamashita, H., Sawa, Y., and Shibata, H. 1996b. A high activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in chloroplasts of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 685-686.
157. Kinghorn, A. D. (1999). Biologically active compounds from plants with reputed medicinal and sweetening properties. Journal Of Natural Products 50(6): 1009-1024.
158. Kinghorn, A. D. and N. C. Kim (1997). Discovery of highly sweet substances from plants. Revista de Farmacia e Bioquimica da Universidade de Sao Paulo 33(2): 63-75. {a} Program Collaborative Res. Pharm. Sci., Coll. Pharm., Univ. Illinois Chicago, 833 S. Wood St., Chicago, IL 60612, USA
159. Kinghorn, A. D. and Soejarto, D. D. 1985. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. Pages 1-52 *in* H. Wagner, H. Hikino and N. R. Farnsworth, eds. Economic and medicinal plant research. Academic Press, London.
160. Kinghorn, A. D., Nanayakkara, N. P. D., Soejarto, D. D., Medon, P. J. and Kamath, S. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. I. Purification of *Stevia rebaudiana* sweet constituents by droplet counter-current chromatography. J. Chromatogr. 237: 478-483.
161. Kinghorn, A. D., Soejarto, D. D., Nanayakkara, N. P. D., Compadre, C. M., Makapugay, H. C., Hovanec-Brown, J. M., Medon, P. J. and Kamath, S. K. 1984. A phytochemical screening procedure for sweet *ent*-kaurene glycosides in the genus *Stevia*. J. Nat. Prod. 47: 439-444.
162. Kinghorn, A.D. 1987. Biologically active compounds from plants with reputed medical and sweetening properties. J. Nat. Prod. 50:1009-1024.
163. Kinghorn, A.D. 1992. Food ingredient safety review: *Stevia rebaudiana* leaves. Herb Research Foundation, Boulder.
164. Kinghorn,, D.a. & Soejarto, D.D. "Stevioside," in Economic and Medical Plant Research, Vol. 7, Academic Press, 1991, pp. 157-171.

165. Kitada, Y., Sasaki, M., Yamazoe, Y. and Nakazawa, H. 1989. Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside A, and C and dulcoside A in foods by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 474: 447-451.
166. Klongpanichpak, S., P. Temcharoen, et al. (1997). Lack of mutagenicity of stevioside and steviol in Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100. Journal of the Medical Association of Thailand 80(Suppl. 1): S121-S128. {a} Dep. Physiol., Mahidol Univ., Bangkok 10400, Thailand
167. Kobayashi, M., Horikawa, S., Degrandi, I. H., Ueno, J. and Mitsuhashi, H. 1977. Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 16: 1405-1408.
168. Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K. and Tanaka, O. 1976. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 15: 981-983.
169. Komissarenko, N. F., A. I. Derkach, et al. (1994). Diterpenic glycosides and phenylpropanoids of leaves of Stevia rebaudiana Bertoni (Asteraceae). Rastitel'nye Resursy 30(1-2): 53-64. Ukr. State Drug Res. Cent., Kharkov, Ukraine
170. Lee, J.I., Kang, K.H., Park, H.W., and Ham, Y.S. 1982. New high rebaudioside - A stevia variety "Suweon 11" (English abstr.). Res. Rep. ORD 24: 186-188.
171. Lee, J.I., Kang, K.K., and Lee, E.U. 1979. Studies on new sweetening resource plant stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) in Korea. I. Effects of transplanting date shifting by cutting and seeding dates on agronomic characteristics and dry leaf yields of stevia (English abstr.). Res. Rep. ORD 21: 171-179.
172. Levy, N. M., A. Bracht, et al. (1994). Effects of Stevia rebaudiana natural products on the mitochondrial L-glutamate dehydrogenase. Arquivos de Biologia e Tecnologia Curitiba 37(3): 673-680. Dep. Biochem., Univ. Maringa, 87020900-Maringa, Brazil
173. Lewis, W.H. 1992. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. Econ. Bot. 46: 336-337.
174. Leyhausen, P. 1973. Addictive behavior in free ranging animals. Pages 58-65 in L. Goldberg and F. Hoffmeister, eds., Psychic dependence. Definition, assessment in animals and man. Theoretical and clinical implications. Springer-verlag, New York.
175. Liberty Hyde Bailey Hortorium, stall of the 1976. Hortus third. Macmillan Publ.Co, New York.
176. Lima, F. O. F. and E. Malavolta (1997). Nutritional interactions in stevia (Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni). Arquivos de Biologia e Tecnologia Curitiba 40(2): 351-357. {a} Dep. Recursos Nat. e Prot. Ambiental, DRN, Cent. Cienc. Agrarias, CCA, UFSCar, Via Anhanguera, Km. 174, C.P. 153, 13600-000 Araras, SP, Brazil
177. Lindsay, R.C.; Reddy, M.C.; Bill, D.P./ Ester production by Preudomonas fragi III. Synergistic interaction of esters at subthreshold concentrations.// J.Dairy Sci. 1969,52,1198.

178. Liu, J. and Li, S. F. Y. 1995. Separation and determination of Stevia sweeteners by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. J. Liq. Chromatogr. 18: 1703-1719.
179. Lovering, N.M. and Reeleder, R.D. 1996. First report of *Septoria steviae* on stevia (*Stevia rebaudiana*) in North America. Plant Disease 80: 959.
180. Luh B.S., Wang Z. Kiwifruit. Adv. Food Res., 1984,29,279-309.
181. Lurie L.S. and Wittwer S.D. /HPLC in Forensic Chemistry // 1983 by courtesy of Marsel Dekker.
182. Machado, E., Chagas, A.M. & Reis, D.S. "Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni in the arterial presure of the dog." Third Brazilian Seminar on Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni, (Summaries), Angelucci, E. (Coordinator), July 1986, p. 11.
183. Makapugay, H. C., Nanayakkara, N. P. D. and Kinghorn, A. D. 1984. Improved high-performance liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. J. Chromatogr. 283: 390-395.
184. Martelli, A., Frattini, C. and Chialva, F. 1985. Unusual essential oils with aromatic properties-I. Volatile components of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Flav. Frag. J. 1: 3-7.
185. Mateck-Egelke U, Galensa R, Herrman K/ Identifirierung von exotishei Fruchten in Fruchtyroducten mittels HPLC//Flussing.Objst- 1991, 58 №2 p 659-663.
186. Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., Sawada, M., Hayashi, M., Nohmi, T., Yoshihira, K., Ishidate, M., Jr, and Sofuni, T. 1996. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six *in vitro* and one *in vivo* mutagenicity assays. Mutagenesis 11: 573-579.
187. Matsushita, K., and Kitahara, T. 1981 Separation of stevioside and rebaudioside A by crystallization (English abstr.). Jap. Patent 56-121454.
188. Mauri, P., Catalano, G., Gardana, C. and Pietta, P. 1996. Analysis of *Stevia* glycosides by capillary electrophoresis. Electrophoresis 17: 367-371.
189. Melis, M. S. (1992). Stevioside effect on renal function of normal and hypertensive rats. Journal Of Ethnopharmacology 36(3): 213-217.
190. Melis, M. S. (1995). Chronic administration of aqueous extract of Stevia rebaudiana in rats: Renal effects. Journal of Ethnopharmacology 47(3): 129-134. Dep. Biol., Setor Fisiol., Fac. Filosofia, Ciencias Letras Univ. Sao Paulo, Ribeirao Preto, CEP 14049-901, Brazil
191. Melis, M. S. (1999). Effects of chronic administration of Stevia rebaudiana on fertility in rats. Journal of Ethnopharmacology. Nov. 67(2): 157-161. {a} Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia, Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras, Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto, Cep 14049-901, Brazil
192. Metivier, J. and Viana, A. M. 1979. Determination of microgram quantities of stevioside from leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. by two-dimensional thin layer chromatography. J. Exp. Bot. 30: 805-810.

193. Miyagawa, H., N. Fujioka, et al. (1986). Studies on the tissue culture of Stevia rebaudiana and its components: II. Induction of shoot primordia. Planta Medica(4): 321-323.
194. Miyazaki, Y., and Watanabe, H. 1974. Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni; On the propogation of the plant (English abstr.). Jap. J. Trop. Agric. 17: 154-157.
195. Mizukami, H., Shiiba, K. and Ohashi, H. 1982. Enzymatic determination of stevioside in *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 21: 1927-1930.
196. Mori, K., Nakahara, Y. and Matsui, M. 1972. Diterpenoid total synthesis-XIX. (±)-Steviol and erythroxydiol A: rearrangements in bicyclooctane compounds. Tetrahedron 28: 3217-3226.
197. Morita, T. 1987. Dried leaves (English abstr.). Jap. Patent 62-96025
198. Mosettig, E. and Nes, W. R. 1955. Stevioside. II. The structure of the aglucone. J. Org. Chem. 20: 884-899.
199. Mosettig, E., Beglinger, U., Dolder, F., Lichti, H., Quitt, P. and Waters, J. A. 1963. The absolute configuration of steviol and isosteviol. J. Amer. Chem. Soc. 85: 2305-2309.
200. Murai, N. 1988. Stevia drying system (English abstr.) Jap. Patent 63-258553.
201. Murai,F. 1960. Chemical components in matatabi.II. The structure of matatabilactone [in Japanese]. J.Chem.Soc.Japan, Pure Chem. Sect. 81: 1324-1326.
202. Muramatsu, N., N. Sakurai, et al. (2000). Remote sensing of fruit textural changes with a laser Doppler vibrometer. Journal of the American Society for Horticultural Science. [print] January 125(1): 120-127. {a} Department of Breeding, National Institute of Fruit Tree Science, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Tsukuba, Ibaraki, 305-8605, Japan
203. Nabeta, K., Kasai, T. and Sugisawa, H. 1976. Phytosterol from the callus of *Stevia rebaudiana*. Agric. Biol. Chem. 40: 2103-2104.
204. Nakahara, Y., Mori, K. and Matsui, M. 1971. Diterpenoid total synthesis. Part XVI. Alternative synthetic routes to (±)-steviol and (±)-kaur-16-en-19-oic acid. Agric. Biol. Chem. 35: 918-928.
205. Nakamura, S. and Tamura, Y. 1985. Variations in the main glycosides of stevia. Jap. J. Trop. Agric. 29:109-115.
206. Nepovim, A. and T. Vanek (1998). In vitro propagation of Stevia rebaudiana plants using multiple shoot culture. Planta Medica 64(8): 775-776. {a} Inst. Org. Chem. Biochem. AS CR, Flemingovo nam. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic
207. Nepovim, A., H. Drahosova, et al. (1998). The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in Stevia rebaudiana Bertoni plants cultivated in the Czech Republic. Pharmaceutical and Pharmacological Letters 8(1): 19-21. {a} Dep. Plant Tissue Cultures, Inst. Organic Chem. Biochem., Acad. Sci. Czech Republic, Flemingovo nam. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic
208. Nikolova-Damyanova, B., Bankova, V. and Popov, S. 1994. Separation and quantitation of stevioside and rebaudioside A in plant extracts by normal-phase

high performance liquid chromatography and thin-layer chromatography: a comparison. Phytochem. Anal. 5: 81-85.
209. Nishiyama, P., Alvarez, M. and Vieira, L. G. E. 1992. Quantitative analysis of stevioside in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. J. Sci. Food Agric. 59: 277-281.
210. Nishiyama, P., I. T. Kusumoto, et al. (1991). Correlation between the contents of total carbohydrates and steviosides in leaves of Stevia rebaudiana. Arquivos De Biologia E Tecnologia 34(3-4): 425-434.
211. Nishiyama, P., M. Alvarez, et al. (1991). Determination of soluble stevioside and carbohydrates in leaves of Stevia rebaudiana by near infra-red reflectance spectroscopy. Arquivos De Biologia E Tecnologia 34(2): 361-374.
212. Normal Lodge& Conrad O.Perera-Hort Research, Mount Albert Research Centre, Auckland. 1992.
213. Ogawa, T. 1980. Decolorization and purification of a stevia sweet component (English abstr.). Jap. Patent 55-111768.
214. Ogawa, T., Nozaki, M. and Matsui, M. 1980. Total synthesis of stevioside. Tetrahedron 36: 2641-2648.
215. Ohtani, K., Y. Aikawa, et al. (1991). Solubilization of steviolbioside and steviolmonoside with gamma-cyclodextrin and its application to selective syntheses of better glycosides from stevioside and rubusoside. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 39(12): 3172-3174.
216. Oliveira-Filho, R.M. Valle, L.B.S. Minetti, C.A.S.A. & Uchara, O.A. "Evaluation of the effects of raw stevia rebaudiana extract in the endocrinous sphere; study on rats." Third Brazilian Seminar on Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni, (Summaries), Angelucci, E. (Coordinator), July 1986, p. 20.
217. Oshima, Y., Saito, J. and Hikino, H. 1986. Sterebins A, B, C and D, bisnorditerpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. Tetrahedron 42: 6443-6446.
218. Oshima, Y., Saito, J. and Hikino, H. 1988. Sterebins E, F, G and H, diterpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. Phytochemistry 27: 624-626.
219. Oviedo, C.A., et.al., "Accion hipoglicemiante de la stevia rebaudiana Bertoni (Kaa-he-e)." Excerpta Medica, 208, 92-93, 1971. (International Congress Series).
220. Patil, V., K. S. Ashwini, et al. (1996). In vitro multiplication of Stevia rebaudiana. Current Science Bangalore 70(11): 960. Dep. Crop Physiol., Univ. Agric. Sci., GKVK Campus, Bangalore 560 065, India
221. Pezzuto, J. M., N. P. D. Nanayakkara, et al. (1986). Characterization of bacterial mutagenicity mediated by 13-hydroxy-ent-kaurenoic acid (steviol) and several structurally-related derivatives and evaluation of potential to induce glutathione S-transferase in mice. Mutation Research 169(3): 93-104.
222. Pezzuto, J.M., Compadre, C.M., Swanson, S.M., Nanayakkara, N.P.D., and Kinghorn, A.D. 1985. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2478-2482.
223. Pham-Delegue, M.M.; Etievant,P.; Masson, C./ Mplecular and chemical approach, //ochimic 1987,69,661-670.

224. Phillips, K.C. 1989. Stevia: steps in developing a new sweetener. Pages 1-43 in T.H. Grenby ed. Developments in sweeteners, Volume 3. Elsevier Applied Science, London.
225. Piheiro, C.E. & Gasparini, O.T. Abstr. Pap., Semin. Bras. Stevia rebaudiana, 1st, 1981, pp. XV.I-XV.IV.
226. Planas, G.M. & Kuc,J. "Contraceptive properties of stevia rebaudiana." Science, Washington, 162, 1007, 1968.
227. Pomaret, M. Lavieille, R. "Le principe & saveur sucree du Kaa-he-e (stevia rebaundiana bertoni), IV. Quelques proprietes physiologiques du stevioside." Bull, Soc. Chim, Biol., 13, 1248-1252, 1931.
228. Procinska, E., Bridges, B.A., and Hanson, J.R. 1991. Interpretation of results with the 8-azaguanine resistance system in *Salmonella typhimurium*: no evidence for direct acting mutagenesis by 15-oxosteviol, a possible metabolite of steviol. Mutagenesis 6: 165-167.
229. Rajbhandari, A. and Roberts, M. F. 1983. The flavonoids of *Stevia rebaudiana*. J. Nat. Prod. 46: 194-195.
230. Reeleder, R. (1999). Septoria leaf spot of Stevia rebaudiana in Canada and methods for screening for resistance. Journal of Phytopathology Berlin. Oct. 147(10): 605-613. {a} Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Delhi, ON, Canada
231. Research since 1980. (Harborne, J.B. ed.), P 303. Chapman & Hall, London.
232. Reviewed by Kinghorn, A.D. & Soejarto, D.D. "Current status of stevioside as a sweetening agent for human use." Economic and Medicinal Plant Research, Volume 1, Wagner, H., Hikino, H. and Farnsworth, N.R. (eds.) Academic Press, New York, 1985, pp. 1-51.
233. Richardson, A. C., K. J. McAneney, et al. (1997). Carbohydrate dynamics in kiwifruit. Journal of Horticultural Science 72(6): 907-917. Horticulture Food Res. Inst. New Zealand, Kerikeri Res. Cent., P.O. Box 23, Kerikeri, New Zealand
234. Richman, A. S., M. Gijzen, et al. (1999). Diterpene synthesis in Stevia rebaudiana: Recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. Plant Journal. Aug. 19(4): 411-421. {a} Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 1391 Sandford Street, London, ON, N5V 4T3, Canada
235. Ruddat, M., Heftmann, E., and Lang, A. 1965. Biosynthesis of steviol. Arch. Biochem. Biophys. 110: 496-499.
236. Sakamoto, I., Yamasaki, K. and Tanaka, O. 1977a. Application of ^{13}C NMR spectroscopy to chemistry of natural glycosides: rebaudioside-C, a new sweet diterpene glycoside of *Stevia rebaudiana.* Chem. Pharm. Bull. 25: 844-846.
237. Sakamoto, I., Yamasaki, K. and Tanaka, O. 1977b. Application of ^{13}C NMR spectroscopy to chemistry of plant glycosides: rebaudiosides-D and -E, new sweet diterpene-glucosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Chem. Pharm. Bull. 25: 3437-3439.

240. Sakan,T., Isoe,S., Hyeon,B., Katsumura,R., Maeda,T., Wolinsky, J., Dickerson,D., Slabaugh,M. And Nelson,D. 1965. The exact nature of matatabilactone and the terpenes of Nepeta cataria. Tetrahedron Lett. 1965: 4097—4102.
241. Saxena, N.C., and Ming, L.S. 1988. Preliminary harvesting characteristics of stevia. Phys. Prop. Agric. Mat. Prod. 3: 299-303.
242. Schiffman, S.S., Booth, B.J., Carr, B.T., Losee, M.L., Sattely-Miller, E., and Graham, B.G. 1995. Investigation of synergism in binary mixtures of sweeteners. Brain Res. Bull. 38: 105-120.
243. Schiffman, S.S., Pecore, S.D., Booth, B.J., Losee, M.L., Carr, B.T., Sattely-Miller, E., Graham, B.G., and Warwick, Z.S. 1994. Adaptation of sweeteners in water and in tannic acid solutions. Phys. Behavior 55: 547-559.
244. Schock, C.C. 1982. Experimental cultivation of Rebaudi's stevia in California. University of California Agronomy Progress Report No. 122.
245. Schreier,P. / In chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles, Verlag: Heidelberg, 1984.
246. Shaffert, E.E. and Chetobar, A.A. 1992. Development of the male gametophyte in *Stevia rebaudiana* (English abstr.). Buletinul Academiei de Schtintse A Republica Moldava 6: 3-9.
247. Shaffert, E.E. and Chetobar, A.A. 1994a. Development of the female gametophyte in *Stevia rebaudiana* (English translation). Buletinul Academiei de Schtintse A Republica Moldava 6: 10-18.
248. Shaffert, E.E. and Chetobar, A.A. 1994b. Structure, topography and onogeny of *Stevia rebaudiana* (English abstr.). Botanicheskii Zhurnal 79: 38-48.
249. Shibata, H., Sawa, Y., Oka, T., Sonoke, S., Kim, K.K. and Yoshioka, M. 1995. Steviol and steviol-glycoside. Glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Purification and partial characterization. Arch. Biochem. Biophys. 321: 390-396.
250. Shibata, H., Sonoke, S., Ochiai, H., Nishihashi, H., and Yamada, M. 1991. Glycosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Physiol. 95: 152-156.
251. Shizhen, S. 1995. A study on good variety selection in *Stevia rebaudiana.* Scientia Agricultura Sinica 28: 37-41.
252. Shock, C.C. 1982. Experimental cultivation of Rebaudi's Stevia in California. University of California Agronomy Progress Report No. 122.
253. Sholichin, M., Yamasaki, K., Miyama, R., Yahara, S. and Tanaka, O. 1980. Labdane-type diterpenes from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 19: 326-327.
254. Shuping, C., and Shizhen, S. 1995. Study on storage technique of *Stevia rebaudiana* seed (English abstr.). Acta Agronomica Sinica 21: 102-105.
255. Shyu, YT, Liu, S.Y., Lu, H.Y., Wu, W.K. Su, C.G. 1994. Effects of harvesting dates on the charateristics, yield and sweet components of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) lines. J. Agric. Res. China 43:29-39.

256. Sikach, V. O. (1998). Effect of nutrient media on physiological peculiarities of Stevia rebaudiana Bertoni plants cultivated in vitro. Fiziologiya i Biokhimiya Kul'turnykh Rastenii 30(4): 294-299. {a} Inst. Sugar Beet Res., Ukr. Acad. Agrar. Sci., vul. Klinichna 25, Kyiv 252010, Ukraine
257. Silva, A.R., Saldanha, C.M., Boelter, R. & Chagas, A.M. "Fertility of rats: Aqueous extract of stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni and stevioside, " Third Brazilian Seminar on Stevia Rebaudiana (Bert.) Bertoni, (Summaries), Angelucci, E. (Coordinator), July 1986, p. 19.
258. Sincholle, D. and Marcorelles, P. 1989. Study of the anti-androgenic activity of extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni (English abstr.). Med. Plants and Phytotherapy 23: 282-287.
259. Smolyar, V. I., E. D. Karpilovskaya, et al. (1992). Influence of saccharol, a new sweetener from Stevia rebaudiana, on an animal's body. Voprosy Pitaniya(1): 60-63. Res. Inst. Ind. Hyg., Minist. Health Ukr., Kiev, Ukraine
260. Soejarto, D.D., Compadre, C.M., Medon, P.J., Kamath, S.K., and Kinghorn, A.D. 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting Stevia species. Econ. Bot. 37: 71-79.
261. Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D., and Farnsworth, N.R. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of stevia leaf herbarium samples for sweetness. J. Nat. Prod. 45: 590-599.
262. Sole P.R., 1983 - Kiwifruit culture (Williams D.A.). Wellington, New Zealand governemenl printer, pagg. 95.
263. Striedner, J., Czygan, F.-C. and Braunegg, G. 1991. Contributions to the biotechnological production of sweeteners from Stevia rebaudiana Bertoni. I. A method for the serial analysis of diterpene glycosides by HPLC. Acta Biotechnol. 11: 495-499.
264. Striedner, J., E. Gutjahr, et al. (1991). Contributions to the biotechnological production of sweeteners from Stevia rebaudiana Bertoni: II. Induction of stevioside accumulation in cell cultures by variation of the nutrient medium and the analysis of small amounts of stevioside. Acta Biotechnologica 11(5): 501-504.
265. Striedner, J., S. Geissler, et al. (1991). Contributions to the biotechnological production of sweeteners from Stevia rebaudiana Bertoni: III. Accumulation of secondary metabolites by means of a precursor and by elicitation of cell cultures. Acta Biotechnologica 11(5): 505-509.
266. Sumida, T. 1968. Reports on *Stevia rebaudiana* Bertoni M. introduced from Brazil as a new sweetness resource in Japan. Misc. Pub. Hokkaido Natl. Exp. Sta. 2: 69-83.
267. Sumida, T. 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a new possible crop for sweetening resource in Japan (English summary). J. Cent. Agric. Exp. Stn. 31: 1-71.
268. Suttajit, M., U. Vinitketkaumnuen, et al. (1993). Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from Stevia rebaudiana Bertoni.

Environmental Health Perspectives 101(Suppl. 3): 53-56. {a} Dep. Biochm., Chiang Mai Univ., Chiang Mai, Thailand
269. Suzuki, H., et.al., "Influence of oral administration of stevioside on levels of blood glucose and liver glycogen of intact rats." Nippon Nopei Kagaku Kaishi, Tokyo, 51(3), 171-173, 1977.
270. Swain T., Hillis W.E. The phenolic contituends of Prunus domestica. 1. The quantitative analysis of phenoliss constituents. // J.Sci. Food Agric. 1959. 10. 63.
271. Swanson, S. M., G. B. Mahady, et al. (1992). Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot cultures in vitro. Plant Cell Tissue And Organ Culture 28(2): 151-157.
272. Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H., and Tabata, M. 1984. Comparison of Stevia plants grown from seeds, cuttings and stem tip cultures for growth and sweet diterpene glycosides. Plan Cell Rep. 3:180-182.
273. Tan, S., and Ueki, H. 1994. Method for extracting and separating sweet substances of *Stevia rebaudiana* Bertoni (English abstr.). Jap. Patent 06-007108.
274. Tanaka, O. 1982. Steviol-glycosides: new natural sweeteners. Trends Anal. Chem. 1: 246-248.
275. Tanaka, O. 1997. Improvement of taste of natural sweeteners. Pure Appl. Chem. 69:675-683
276. Tateo, F., M. L. E. Sanchez, et al. (1999). Stevioside content of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni grown in East Paraguay. Italian Journal of Food Science 11(3): 265-269. {a} Dipartimento di Fisiologia delle Piante Coltivate e Chimica Agraria, Universita di Milano, Via Celoria 2, 20133, Milano, Italy
277. Tateo, F., M. Mariotti, et al. (1998). Stevioside content and morphological variability in a population of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni from Paraguay. Italian Journal of Food Science 10(3): 261-267. {a} Dip. Fisiol. Piante Colt. Chim. Agraria, Univ. Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy
278. Tomita, T., N. Sato, et al. (1997). Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from Stevia rebaudiana Bertoni towards enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. Microbiology and Immunology 41(12): 1005-1009. {a} Fac. Agric., Tohoku Univ., 1-1 Tsutsumi-dori Amamiya-machi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981, Japan
279. Toskulkao, C., M. Sutheerawattananon, et al. (1995). Inhibitory effect of steviol, a metabolite of stevioside, on glucose absorption in everted hamster intestine in vitro. Toxicology Letters Shannon 80(1-3): 153-159. {a} Dep. Physiol., Fac. Sci., Mahidol Univ., Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
280. Totte, N., L. Charon, et al. (2000). Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from Stevia rebaudiana Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. Tetrahedron Letters. [print] 41(33): 6407-6410. {a} Laboratorium Plantenfysiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Kard. Mercierlaan 92, 3001, Leuven, Belgium

281. Toyoda, K., H. Matsui, et al. (1997). Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. Food and Chemical Toxicology 35(6): 597-603. Div. Pathol., Natl. Inst. Health Sci., 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan
282.Valio, I.F.M. and Rocha, R.F. 1966. Effect of photoperiod and growth regulators on growth and flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Jap. J. Crop Sci. 46:243-248.
283. Van Calsteren, M.-R., Bussиre, Y. and Bissonnette, M. C. 1993. Spectroscopic characterization of two sweet glycosides from *Stevia rebaudiana*. Spectroscopy 11: 143-156.
284. Van Hooren, D.L., and Lester, H.R. 1992. Stevia drying in small scale bulk tobacco kilns. *In* Methods to utilize tobacco kilns for curing, drying and storage of alternate crops, final report. Ontario Ministry of Agriculture and Food, Delhi.
285. Vial Celine. Gwilbeit S. Caq J./Osmotic dehydration of kiwifruits in fenerce of process variables on the coler and ascorbic acid //Sc.alim-1991-1 1 №1 p.64-84.
286. Viana, A.M. & Metivier, J. "Changes in the levels of total soluble proteins and sugars during leaf ontogeny in stevia rebaudiana Bert." Annals of Botany, 45, 469-474, 1980.
287. Vis, E. and Fletcher, H. G. 1956. Stevioside. IV. Evidence that stevioside is a sophoroside. J. Amer. Chem. Soc. 78: 4709-4710.
288. Wood, H. B., Allerton, R., Diehl, H. W. and Fletcher, H. G. 1955. Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. J. Org. Chem. 20: 875-883.
289. Xi, Y., T. Yamaguchi, et al. (1998). Antioxidant mechanism of Stevia rebaudiana extract and antioxidant activity of inorganic salts. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 45(5): 317-322. {a} Fac. Agric., Tohoku Univ., 1-1 Tsutsumidori-Amaniya, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 981-8555
290. Xiang, Z.P. 1983. Stevia (partial English translation). General Bureau of State Farms, Heilongjiang, China.
291. Xie, S., X. Ouyang, et al. (1998). The growth and differentiation of callus cultures of Stevia rebaudiana in relation to the stevioside accumulation. Journal of Tropical and Subtropical Botany 6(1): 8-14. {a} Zhongshan Coll., Zhongshan 528403, China
292. Xili, L., Chenggjiany, B.C., Eryi, X., Reiming, S., Yuengming, W., Haodong, S., and Zhiyan, H. 1992. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. Food Chem. Tox. 30: 957-965.
293.Yabu, M., et.al., "Studies on stevioside, natural, sweetener." Hiroshima Daigaku Shigaku Tasshi, 9(1), 12-17, 1977.
294. Yamasaki, K., Kohda, H., Kobayashi, T., Kasai, R. and Tanaka, O. 1976. Structures of stevia diterpene-glycosides: application of ^{13}C NMR. Tetrahedron Lett. 1005-1008.
295. Yamazaki, T., H. E. Flores, et al. (1991). Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of Stevia rebaudiana. Journal Of Natural Products 54(4): 986-992.
296. Yao, Y., M. Ban, et al. (1999). A genetic linkage map for Stevia rebaudiana. Genome . Aug. 42(4): 657-661. {a} Southern Crop Protection and Food Research

Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 1391 Sandford Street, London, ON, N5V 4T3, Canada
297. Yodyingyuad, V., and Bunyawong, S. 1991. Effects of stevioside on growth and reproduction. Human Reprod. 6: 158-165.
298. Yoshida, S. (1986). Studies on the production of sweet substances in Stevia rebaudiana: 1. Simple determination of sweet glucosides in Stevia plant by thin layer chromato-scanner and their accumulation patterns with plant growth. Japanese Journal Of Crop Science 55(2): 189-195.
299. Zaidan, L.B.P., Dietrich, S.M.C., and Felippe, G.M. 1980. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Jap. J. Crop Sci. 49: 569-574.
300. Zhang, S. Q., A. Kumar, et al. (2000). Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves. Food Research International. [print] 33(7): 617-620. {a} Institute for Chemical Process and Environmental Technology, National Research Council of Canada, M-12 Montreal Road Campus, Ottawa, ON, K1A 0R6, Canada
301. Ziegler, F. E. and Kloek, J. A. 1977. The stereocontrolled photoaddition of allene to cyclopent-1-ene-1-carboxaldehydes. A total synthesis of (±)-steviol methyl ester and isosteviol methyl ester. Tetrahedron 33: 373-380.
302. Zubenko, V. F., S. V. Rogovskii, et al. (1991). Effect of cutting leafiness and light day duration on the rooting ability and growth of Stevia reabudiana Bertoni seedlings. Fiziologiya I Biokhimiya Kul'Turnykh Rastenii 23(4): 407-411.
303. Zubenko, V. F., S. V. Rogovskii, et al. (1991). Phytohormone-induced stimulation of the rooting of stevia cuttings and growth of its seedlings. Doklady Vsesoyuznoi Ordena Lenina I Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni Akademii Sel'Skokhozyaistvennykh Nauk Imeni: 16-18.