

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

რუსლან დავითაძე

სტევიას ახალი ინტროდუცირებული ჯიშების ბიოლოგიურად
აქტიური ნივთიერებები

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

ა ნ ო ტ ა ც ი ა

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის ქიმიის დეპარტამენტში.

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:

ალეკო კალანდია

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი: ა. კალანდია

უცხოელი რეცენზენტი:

როზანა ტროია

პროფესორი დოქტორი სამრეწველო ქიმიის
დეპარტამენტის ხელმძღვანელი.

საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტე-
ტი. ტირანას უნივერსიტეტი. ბულევარდი ZOG
I ტირანა. ალბანეთი

ელფოსტა: rozana.troja@fshn.edu.al rozitroja@yahoo.com

ტელ: +355684057778

შემფასებლები:

რუსუდან ხუხუნაიშვილი

პროფესორი, ბიოლოგიის მეცნიერებათა
აკადემიური დოქტორი, ბათუმის შოთა
რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტი.

ელენე გამყრელიძე

ასოცირებული პროფესორი, ქიმიის
მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი, ქიმიური
და გარემოსდაცვითი ტექნოლოგიების
დეპარტამენტი, აკაკი წერეთლის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი.

ნანა ბარბაქაძე

ქიმიის აკადემიური დოქტორი, თბილისის
სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის
იოველ ქუთათელაძის ფარმაცოქიმიის
ინსტიტუტის მეცნიერ თანამშრომელი.

სადისერტაციო ნაშრომის დაცვა შედგება 2019 წლის

ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო
მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის სადისერტაციო საბჭოს სხდომაზე.

მისამართი: ბათუმი ნინოშვილის ქ. № 35

.....

სადისერტაციო ნაშრომის გაცნობა შესაძლებელია ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო
უნივერსიტეტის ბიბლიოთეკაში, ასევე უნივერსიტეტის ვებ გვერდზე www.bsu.edu.ge.

შესავალი

თემის აქტუალობა

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

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

რომელსაც გააჩნია უნიკალური სამკურნალო-პროფილაქტიკური და გამაჯანსაღებელი თვისება.

ტკბილი გლიკოზიდების გარდა, სტევას ფოთლები შეიცავს ადამიანის ორგანიზმისათვის სასარგებლო სხვა ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთს. სამწუხაროდ, საქართველოში ძირითადად გვხდება სხვადასხვა სახის ხელოვნური დამატკბობელი და სტევია მასიურად არ გამოიყენება, რადგანაც ის ნაკლებად არის ცნობილი და შედარებით ძვირია, როგორც უცხოეთიდან იმპორტირებული პროდუქტი (კონკურენტებთან შედარებით).

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

მეცნიერული სიახლე - საქართველოში პირველად შესწავლილ იქნა ინტროდუცირებული სტევას უცნობი ჯიშების ფოთლების ბიოაქტიური ნაერთების თვისობრივი და რაოდენობრივი შემცველობა HPLC-UV, RI, Conductometry და UPLC-PDA, MS მეთოდების გამოყენებით, პრეპარატიული და ანალიზური სვეტების, სხვადასხვა სორბენტის და გამხსნელის მეშვეობით, ასევე სხვა თანამედროვე ფიზიკო-ქიმიური მეთოდების გამოყენებით გამოყოფილი და იდენტიფიცირებული იქნა 27 ნაერთი და ჩატარდა მათი იდენტიფიკაცია. დადგინდა მათი რაოდენობრივი შემცველობა. სხვადასხვა მეთოდების, მათ შორის სუპერ კრიტიკული წნევის

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

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

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

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

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

თესლის აღმოცენება მოხდა დახურულ გრუნტში (სათბური აღჭურვილი იქნა გრანტის მეშვეობით) და მიღებული სტანდარტული ნერგებით გაშენდა საცდელი ნაკვეთი. ნერგების გამოყვანა მოხდა თესლით (ინტროდიცირებული ჯიშები) და ტრადიციული დაკალმების მეთოდით (ნერგების უწყვეტად და მომავალში საწარმოო რაოდენობის მისაღებად).



სურ 1. სტევიას სტანდარტული მოსავალი

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

კვლევისათვის გამოყენებული იქნა შემდეგი ფიზიკო-ქიმიური მეთოდები:

1. ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების პრეპარატების მიღება სუპერკრიტიკული წნევის ფლუიდური ექსტრაქციით.
2. ინდივიდუალური ნაერთების მიღება პრეპარატული ქრომატოგრაფიებით.

3. ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების იდენტიფიკაცია მაღალეფექტური და ულტრა მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფირების HPLC-UV, RI, UPLC-PDA, MS მეთოდით.
4. ფენოლურ ნაერთთა გამოყოფა და იდენტიფიკაცია მოვახდინეთ HPLC-UV, RI, UPLC-PDA, MS მეთოდით.
5. დიტერპენული გლიკოზიდების და ფენოლური ნაერთების რაოდენობრივი შესწავლა HPLC-UV, RI, UPLC-PDA, MS ქრომატოგრაფიის მეთოდით.
6. კათიონების თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრა HPLC—Conductivity methods.
7. ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა (2,2-დიფენილ-1-პიკრილ
8. იდრაზილისსტაბილური რადიკალის გამოყენებით) DPPH მეთოდით.
9. ფლავონოიდების რაოდენობრივი განსაზღვრასპექტრალური მეთოდით ($AlCl_3$ -ის რეაქტივი, რუთინზე გადაანგარიშებით).
10. საერთო ფენოლების რაოდენობის განსაზღვრა ფოლინ-სიოქალტეუსმეთოდით (Folin-Ciocalteu) (გალის მჟავაზე გადაანგარიშებით);
11. წყლისა და მშრალი ნივთიერების განსაზღვრარეფრაქტომეტრული მეთოდით.
12. აქროლადი კომპლექსის განსაზღვრა აირ-ქრომატოგრაფიული (GC)მეთოდით (GC Thermo).

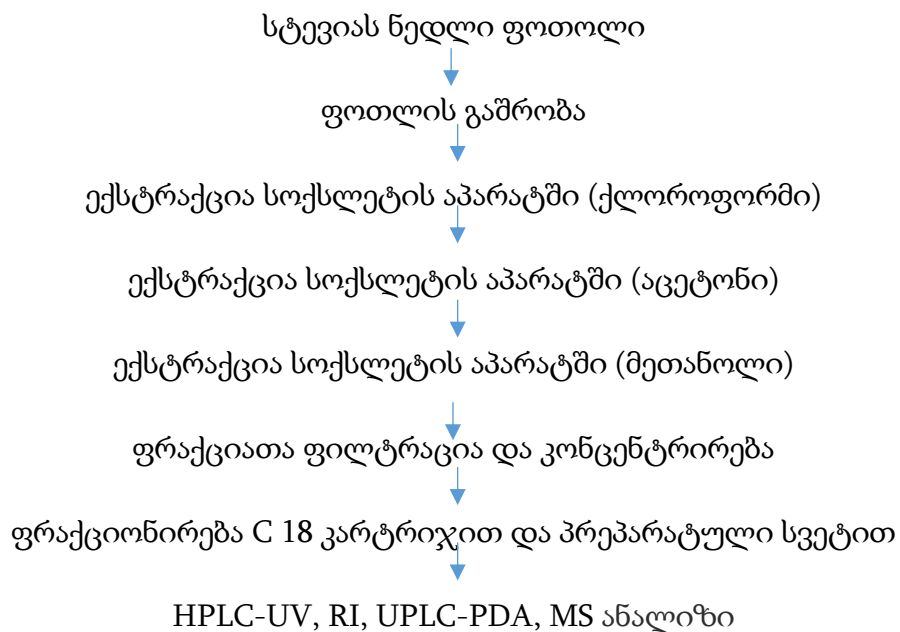
სამუშაოს აპრობაცია - კვლევის შედეგები ასახულია 3 სამეცნიერო სტატიასა და 5 საერთაშორისო სამეცნიერო კონფერენციის მასალებში.

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა - დისერტაცია შედგება 118 ნაბეჭდი გვერდისაგან, დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაციის გაფორმების ინსტრუქციის მიხედვით და მოიცავს სატიტულო და ხელმოწერების გვერდებს, რეზიუმეს ქართულ და ინგლისურ ენაზე, შინაარსს, სურათებს 96, ცხრილების ნუსხას 15, გრაფიკს 2, სქემებს 4, გამოყენებული ლიტერატურის ნუსხას - 154 ერთეულს და საილუსტრაციო მასალებს დანართი 1. ძირითადი ტექსტის შემადგენლობაშია: შესავალი, ლიტერატურული მიმოხილვა, შედეგების განსჯა, ექსპერიმენტული ნაწილი, დასკვნა, გამოყენებული ლიტერატურის ჩამონათვალი და დანართი.

ლიტერატურული მიმოხილვა - ნაშრომის პირველ თავში განხილულია მცენარე სტევია, მისი ბიოაქტიური ნაერთები, ტკბილი დიტერპენოიდული გლიკოზიდები, ფენოლური ნაერთების გავრცელება მცენარეებში, მათი ფიზიოლოგიური აქტივობა და დასავლეთ საქართველოში ინტროდუცირებული სტევია ფორმების ბიოლოგიური დახასიათება. დისერტაციას თან ახლავს გამოყენებული ლიტერატურის სია.

თავი 1. სტევიას ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების გამოყოფა და იდენტიფიკაცია

სტევიას ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების გამოყოფისა და იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებული იქნა შემდეგი სქემა:



1.1. სტევიოლ გლიკოზიდების HPLC-UV, IR, UPLC-PDA, MS ანალიზი

ნაერთების დაყოფას ვაწარმოებდით მაღალ ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფირების მეთოდით, ულტრაიისფერი, რეფრაქტომეტრული ინდექსის დეტექტორების მეშვეობით, ხოლო იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებული იქნა ულტრა ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფირება (UPLC) მას (MS) და პდა (PDA) დეტექტორი. ნივთიერებათა იდენტიფიკაციას ვახდენდით სტანდარტული

ნაერთების გამოყენებით და ნივთიერებათა მასის <https://metlin.scripps.edu> თავისუფალი ბაზის გამოყენებით, ასევე რეცენზირებული ლიტერატურული გამოცემების მონაცემების შედარებით.

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

Waters Acuity UPLC-PDA, MS, column BEN HSS (100x2.1 mm 1.7 μm). mobile phase 0.1% Formic acid in DW (A), 0.1% Formic acid in Acetonitrile (B), gradient solvent B gradient elution from 5% B for 1.5 min to reach 15% B at 4 min, 25% B at 25 to 16 min 65% B and 100% at 18,5-19.0%, 0% B 19.0 to 20 min. Flow 0.3 ml min⁻¹, column temp 40°C, MS- scan 40-1200 da, Probe 600°C, Positive 0,8kV, Capillary 1,5kV, CV-40, PDA scan 210-500 nm.

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

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

თავი 2. შემადგენლობის UPLC მასდეტექტორის მეთოდით კვლევა

ნაერთების კვლევა, იდენტიფიკაცია და რაოდენობრივი ანალიზი ჩატარდა UPLC-PDA-MS მეთოდის გამოყენებით. მეთოდი საშუალებას იძლევა ერთდროულად ჩატარდეს რამდენიმე ნაერთის კვლევა, მათი იდენტიფიკაციის სარწმუნოება

გაცილებით მაღალია. დგინდება, როგორც ნაერთის ქრომატოგრაფიული, ასევე სპექტრალური და მას-სპექტრალური მახასიათებლები.

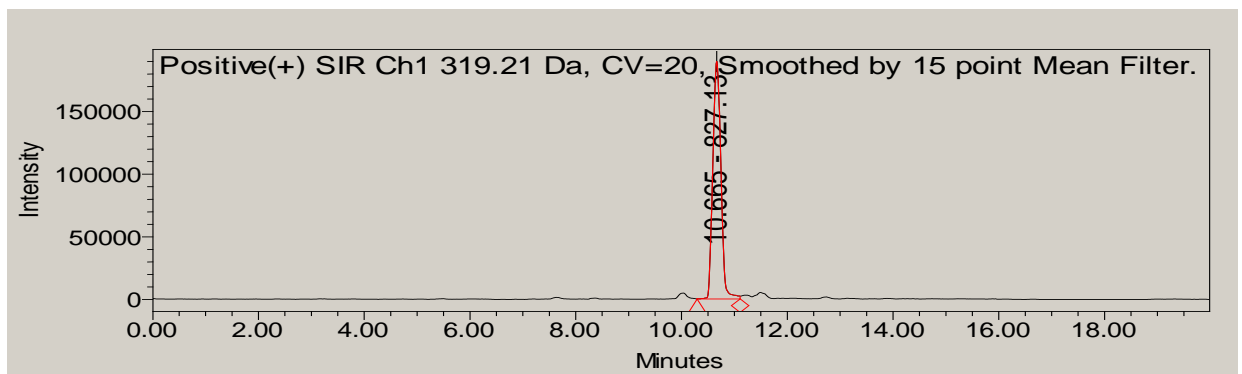
SPE მეთოდით სხვადასხვა გამხსნელით მიღებული ექსტრაქტების კონცენტრირების შემდეგ ხდებოდა ქრომატოგრაფირება პრეპარატიული ამინური სვეტით (NH₂, 5 μm, 250 x 10mm). ასევე ქრომატოგრაფირებისათვის გამოყენებული იქნა პრეპარატიული სვეტი (C18, 5 μm, 250 x 10mm). მიღებული იქნა ფრაქციები (31 ფრაქცია). SPE კარტრიჯი მზადდებოდა (კონდენცირდება) წყლით (1მლ) და 3 მლ ACN/წყალი (90:10). 1მლ სტევიას ექსტრაქტი ტარდებოდა კარტრიჯში. სტევიას გლიკოზიდები ელუირდებოდა 2მლ ACN/წყალი (90:10). მიღებული ნიმუშის 3მ ლ ინჟექტირდებოდა LC-MS-PDA სისტემაში. ფლავონოიდური გლიკოზიდების ჰიდროლიზისათვის პრეპარატის 5 მგ იხსნებოდა 2 მლ 2M HCl და ცხელდებოდა 90 ° C 40 წთ-ის განმავლობაში. ყველა შემთხვევაში მიღებული საანალიზო ექსტრაქტი იფილტრებოდა 0.45 μm ფილტრში. ნაერთების იდენტიფიკაციისათვის მნიშვნელოვანია მათი ფრაგმენტაცია და ასევე მათი მასების ცვლილება (იონთა მიმატების ხარჯზე) და შთანთქმის მაქსიმუმების მნიშვნელობა UV არეში.

დიტერპენული გლიკოზიდების LC-MS-PDA კვლევამ საშუალება მოგვცამოგვცხდინა შემდეგი ნაერთების იდენტიფიკაცია:

ნივთიერება 1 - [M-H +] - m/z 319, [M-H -] - m/z 317, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე რამდენიმე ადგილზე (სულ მცირე 9 ნაერთთან მიმართებაში, ყველა ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდის შესაბამისად), METLIN

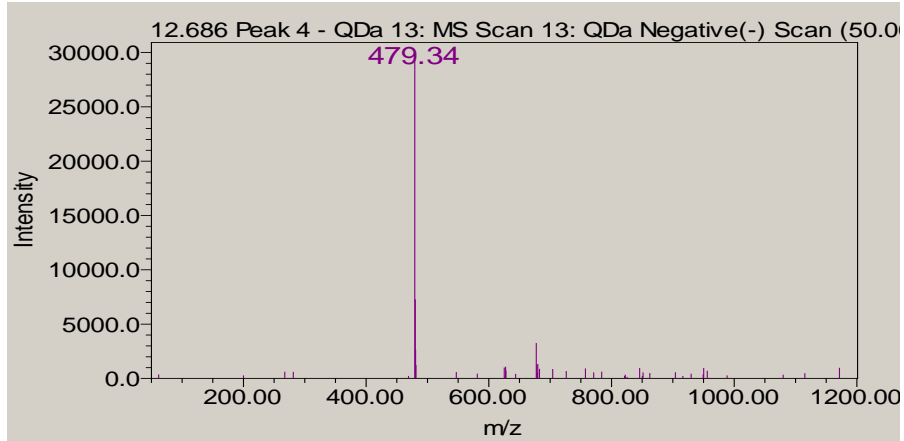
(<https://metlin.scripps.edu>) ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად (დანართი)

ნივთიერება 1 შეესაბამება აგლიკონ სტევიოლს და მის იზომერს -იზოსტევიოლს (C₂₀H₃₀O₃).



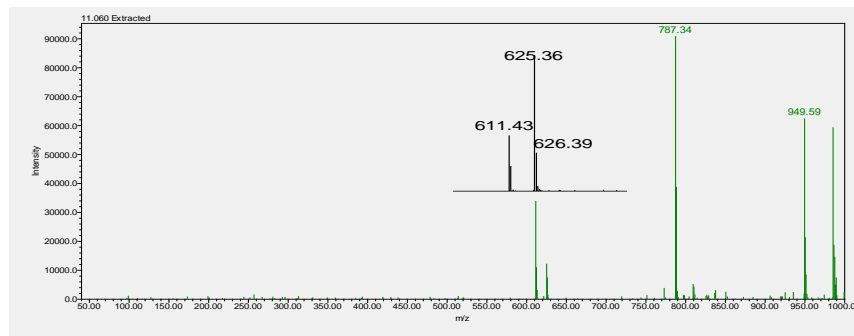
სურ. 1 სტევიოლის UPLC-MS სპექტრი

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



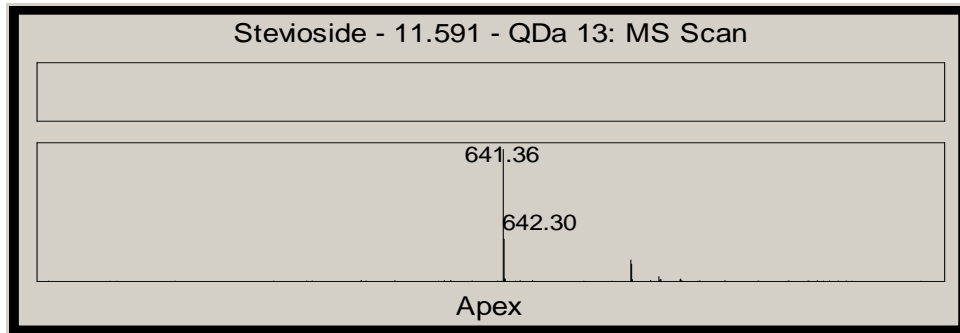
სურ. 2 სტევიოლ გლუკოზიდის UPLC-MS სპექტრი

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



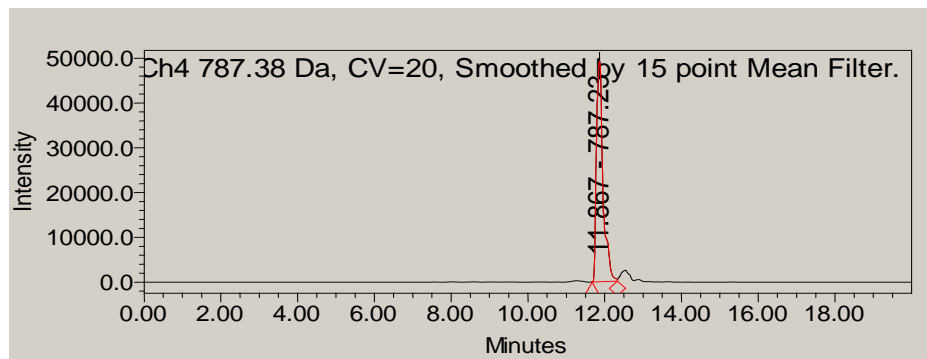
სურ. 3. სტევიოლ დი-გლუკოზიდის UPLC-MS სპექტრი

ნივთიერება 4-[M-H -] - m/z 641, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z 803, 965 ერთად. შეკავების დრო 11.591 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.7 nm. METLIN ნაერთებისმასების ბაზის შესაბამისად (დანართი 1) ნივთიერება 4 შეესაბამება სტევიოლბიოზიდს ($C_{32}H_{50}O_{10}$).



სურ. 4 სტევიოლბიოზიდის UPLC-MS სპექტრი

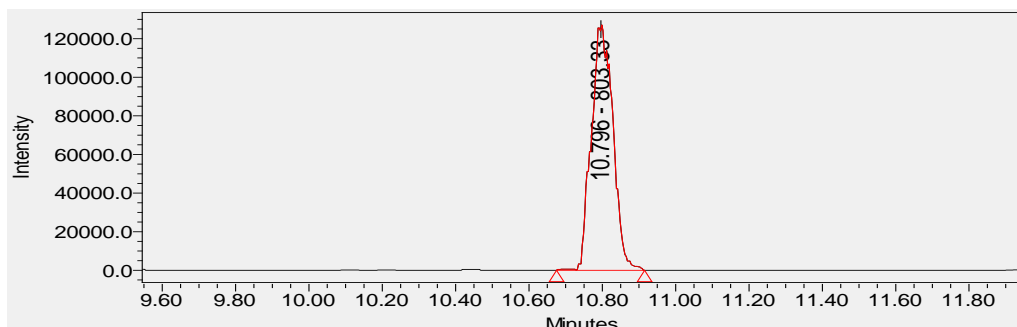
ნივთიერება 5-[M-H -] - m/z 787, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z 803, 965 ერთად. შეკავების დრო 11.867 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.3 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად (დანართი 1) ნივთიერება 5 შეესაბამება სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდს [M-16] ($C_{38}H_{62}O_{19}$).



სურ. 5. სტევიოლ ტრი-გლუკოზიდი UPLC-MS სპექტრი

ნივთიერება 6-[M-H-] - m/z 803, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z, 935,949, 965 ერთად ან ცალკე. ფრაგმენტაციის MS2-ს შედეგია m/z 787([M-H + -2glc] -), ხოლო გლუკოზის მოლეკულების შემდგომი ჩამოხლეჩით MS3 შედეგია m/z 317 პიკები (სტევიოლი). შეკავების დრო 10.796 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.2 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად (დანართი 1) ნივთიერება 6-ს შეესაბამება სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდს ანუ სტევიოზიდს (**Stevioside** $C_{38}H_{60}O_{18}$) ([M-H +] - m/z 805.4). სტევიოზიდის ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოიქმნება ([M-H -] - m/z 641), ხოლო ([M-H +] - m/z 643). ასევე m/z 803, რომელიც ჩვეულებრივ ჩანს ქლორის იონის დამატებით ნეგატიური (negative) და კალიუმის იონის დამატებით პოზიტიური (positive), შესაბამისად წარმოიქმნება ([M-H⁺ +K⁺] - m/z 841) და ([M-H -Cl⁻] - m/z 839).[M-H⁺ -3glc] შესაბამისად. სტევიოზიდისაგან ფრაგმენტაციის MS2-ს შედეგი m/z 639 პიკია

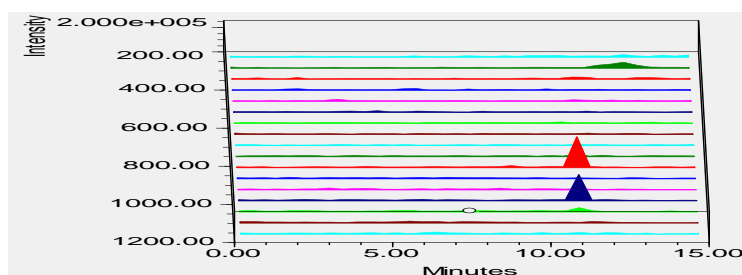
[M-H- -glc+ K⁺], - გლუკოზა ([M-H₂O]- m/z 162). ეს მოსაზრება დოკუმენტალურადაც დასტურდება.

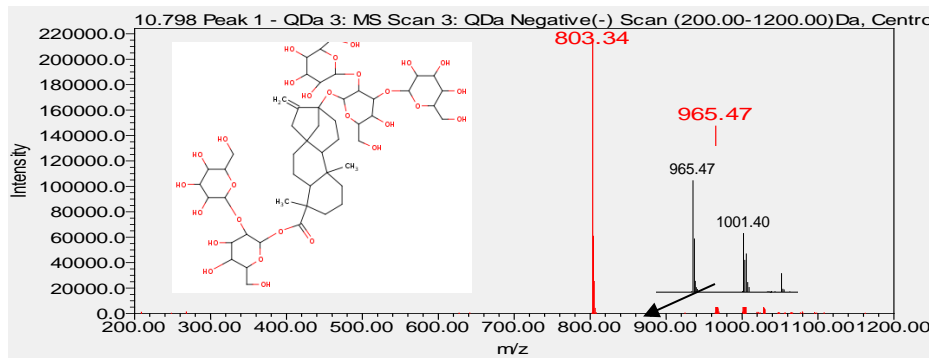


სურ. 6. სტევიოზიდის UPLC-MS სპექტრი

ნივთიერება 7-[M-H -] - m/z 965 ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z 803, 1001 ერთად. შეკავების დრო 10.798 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.2nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 7 შეესაბამება სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდს ანუ რებაუდიოზიდი A (**C₄₄H₇₀O₂₃**). რებაუდიოზიდი A-ს (rebaudioside A ([M-H +] - m/z 965), ფრაგმენტაცია MS2-ს შედეგად m/z 803 პიკია [M-H + -glc], - გლუკოზა ([M-H₂O]- m/z 162) რებაუდიოზიდი A-საგან. შემდგომი ფრაგმენტაციით m/z 641 ([M-H + -2glc] -), ხოლო რებაუდიოზიდი A გლუკოზის მოლეკულების შემდგომი ჩამოხლეჩით MS3 და MS4 შედეგად m/z 479 და m/z 317 პიკები (სტევიოლი), [M-H + -3glc]- და [M-H + -4glc]- იონი შესაბამისად. ქლორის იონის დამატებით ნეგატიური (negative) და კალიუმის იონის დამატებით პოზიტიური (positive), შესაბამისად წარმოიქმნება ([M-H⁺ +K⁺] - m/z 1005) და ([M-H⁺ -Cl⁻] - m/z 1001).

სტანდარტული რებაუდიოზიდი A-ს (Sigma-Aldrich) ქრომატოგრაფიული შესწავლის დროსაც, მას-სპექტრომეტრზე ფიქსირდება რამდენიმე პიკი-[M-H⁺]- m/z 803, -[M-H⁺]- m/z 965, -[M-H⁺]- m/z 1001, ასევე მაღალი (20 ვოლტზე მეტი) მუხტის შემთხვევაში -[M-H⁺] - m/z 317 ან [M-H⁺]⁺ m/z 319.

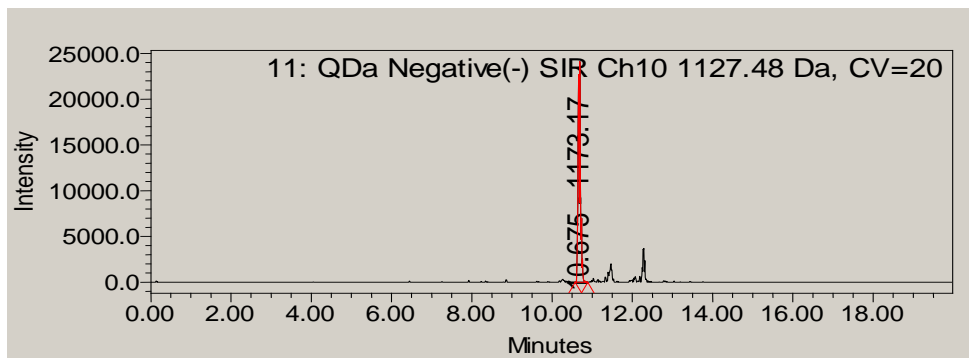




სურ. 7. რეზუდუიზიდი A UPLC-MS სპექტრი

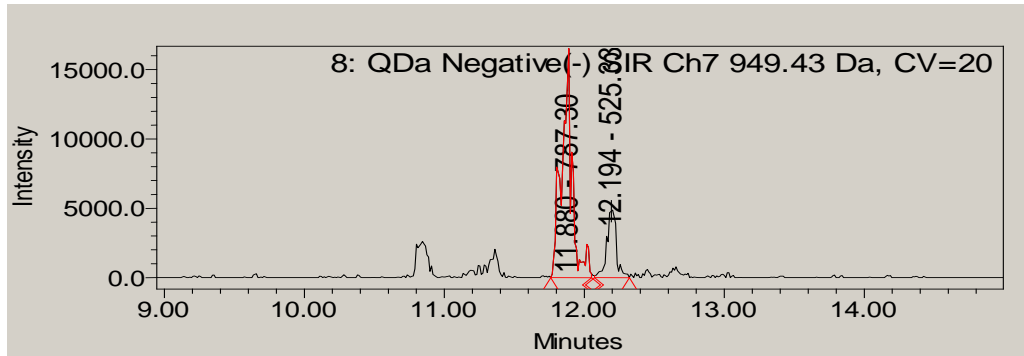
ნივთიერება 8-[M-H -] - m/z 1127 ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z 803, 965 ერთად. შეკავების დრო 10.675 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.3 nm. METLIN ნაერთებისმასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 8 შეესაბამება სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდს ანუ რეზუდუიზიდი D ($C_{50}H_{80}O_{28}$).

რეზუდუიზიდი D-დანერტი მოლეკულა გლუკოზის [M-H+-glc] მოწყვეტის შედეგად ([M-H₂O] - m / z 162) რჩება m / z 787, ხოლო 2 მოლეკულა გლუკოზის მოწყვეტით [M-H+-2glc]-c m/z 625. რეზუდუიზიდი D კარგავს გლუკოზის 2 და რამნოზის 1 მოლეკულას ([MH₂O]- m/z 146), [M-H+-2glc-rham] და ნეგატიურ რეჟიმში ვლებულობთ m / z 479. ნაერთზე ქლორის იონის მიერთებით ვლებულობთ ([M-H⁺ -Cl⁻] - m/z 1127).



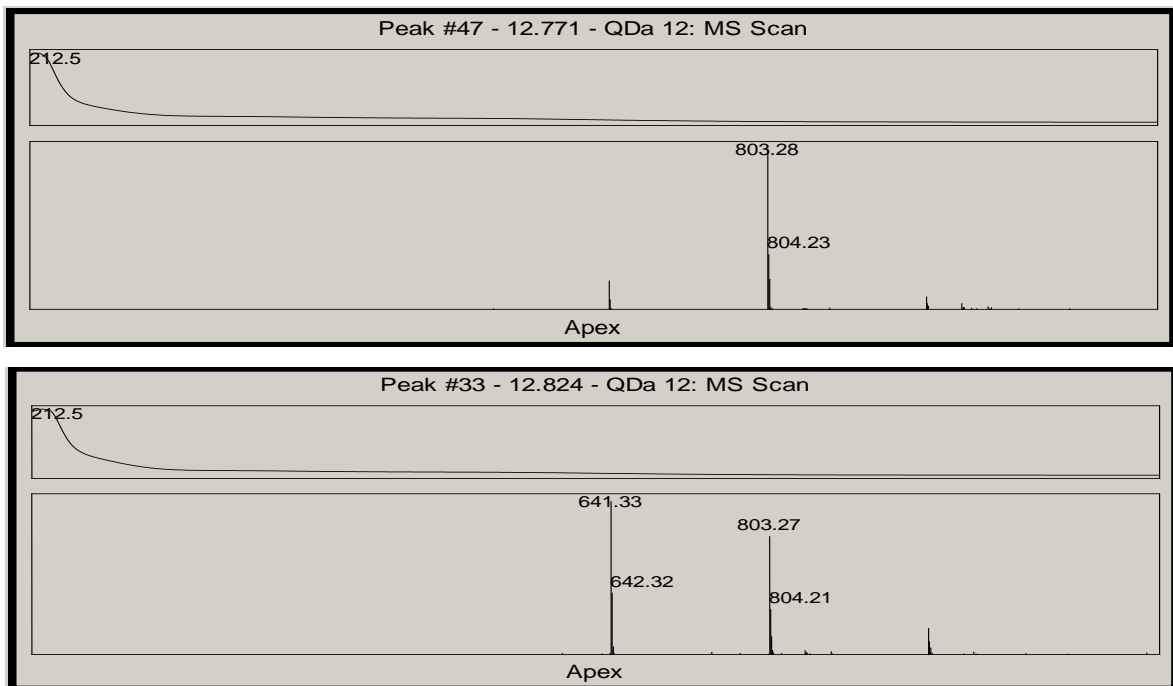
სურ. 8. რეზუდუიზიდი D UPLC-MS სპექტრი

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



სურ. 9. რეზაუდიოზიდი C UPLC-MS სპექტრი

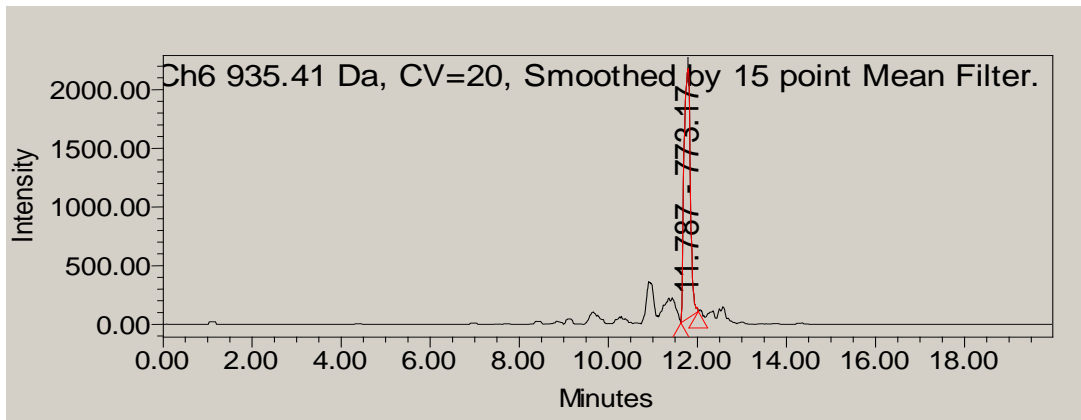
ნივთიერება 10-[M-H -] - m/z 641,33, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z 803, 1001 ერთად. შეკავების დრო 12.771 და 12.824 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.5nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 10 შეესაბამება სტევიოლის დი-გლუკოზიდს ანუ რუბუსოზიდს ($C_{32}H_{50}O_{13}$).



სურ. 10. რუბუსოზიდის UPLC-MS სპექტრი

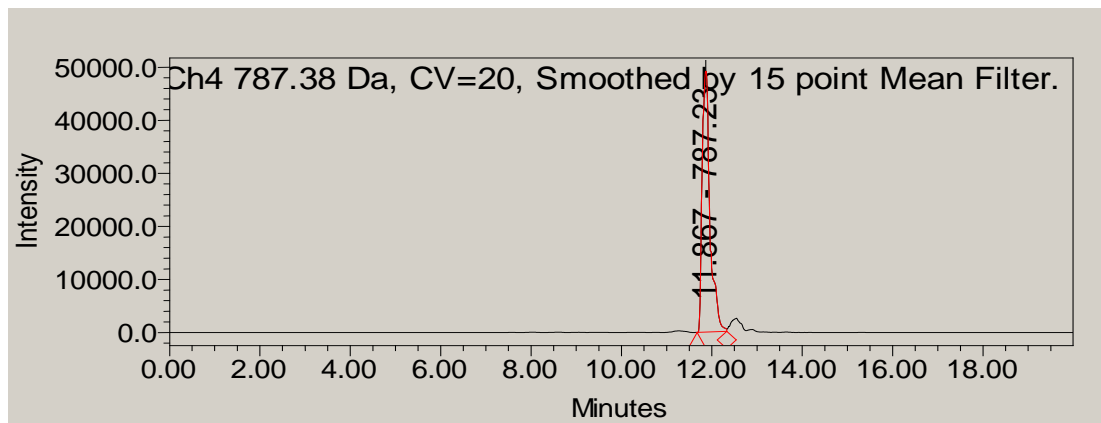
ნივთიერება 11-[M-H -] - m/z 935 ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე ფრაგმენტის -[M-H-] - m/z 773.17-ს სახით, რადგანაც კარგავს 1 მოლეკულა გლუკოზას. შეკავების დრო 11.787 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.5 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის

შესაბამისად ნივთიერება 11 შეესაბამება სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდს ანუ რებაუდიოზიდი F ($C_{43}H_{68}O_{22}$).



სურ. 11. რებაუდიოზიდი F UPLC-MS სპექტრი

ნივთიერება 12-[M-H -] - m/z 787, ფიქსირდება ქრომატოგრამაზე -[M-H -] - m/z 803, 965 ერთად, რადგანაც მათი ფრაგმენტაციის პროდუქტია. შეკავების დრო 11.867 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 212.1 nm. METLIN ნაერთების მასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 12 შეესაბამება სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდს ანუ დულკოზიდი A ($C_{38}H_{60}O_{17}$).



სურ. 12. დულკოზიდი A UPLC-MS სპექტრი

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

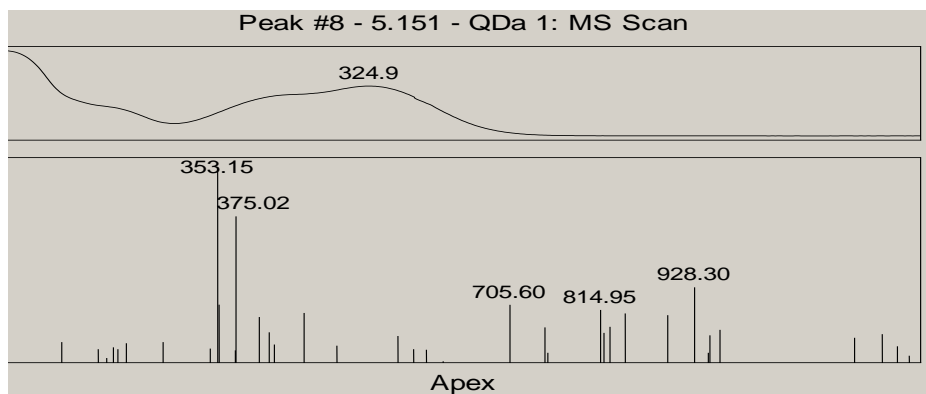
ცხრილი 1. სტევიას ფოთლის დიტერპენული გლიკოზიდების UPLC-MS მახასიათებლები იონის negative LC-ESI MS ანალიზისას

ნივთი ერება	ნაერთი	მოლეკულის ფორმულა	m/z (M-H) ⁻	m/z (M-H) ⁺
1	სტევიოლი	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.24	319.2
2	სტევიოლ -GLC	C ₂₆ H ₄₀ O ₈	479.12	481.2
3	სტევიოლ-2GLC [M-16]	C ₃₂ H ₄₉ O ₁₃	625.13	627.12
4	სტევიოლ-2GLC	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	641.33	643.21
5	სტევიოლ-3GLC დეოქსიგლუკოზიდი [M-16]	C ₃₈ H ₅₉ O ₁₈	787.17	789.13
6	სტევიოლბიოზიდი	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	641.34	643.33
7	სტევიოზიდი, სტევიოლ-3GLC	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	803.31	805.37
8	რებაუდიოზიდი A, სტევიოლ-4GLC	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	965.52	967.42
9	რებაუდიოზიდი C	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	949.46	951.42
10	რებაუდიოზიდი D	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	1127.47	1129.47
11	რებაუდიოზიდი F	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	935.41	937.42
12	დულკოზიდი A	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	787.38	789.37

თავი 3. სტევიას ფოთლის ფენოლური ნაერთების კვლევა მაღალ ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფირების (HPLC) და UPLC მეთოდი

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

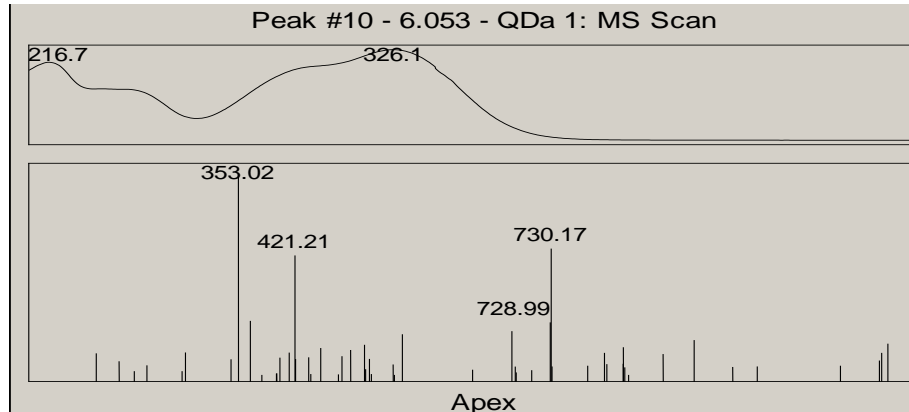
ნივთიერება 13-[M-H⁻] - m/z 353, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 191 პიკია. შეკავების დრო 5.151 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 324.9 nm. METLIN ნაერთებისმასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 13 შეესაბამება Mono-caffeoylquinic acid (mono-CQA).



სურ. 13. Mono-caffeoylquinic acid (mono-CQA) UPLC-MS სპექტრი

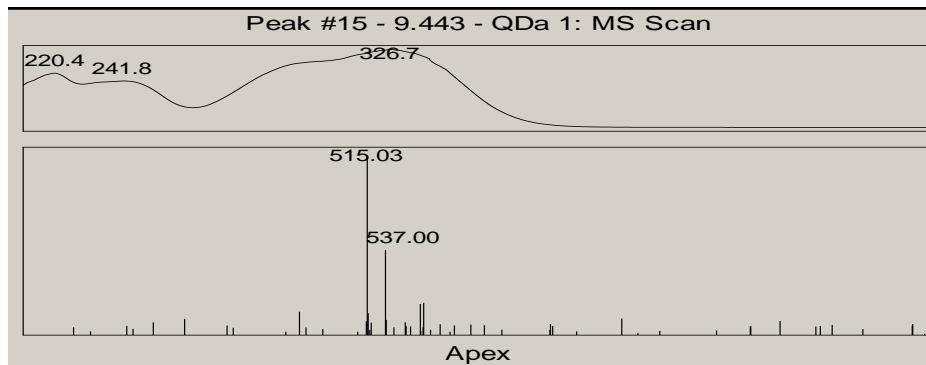
ნივთიერება 14-[M-H⁻] - m/z 353, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 191 და m/z 173 პიკია. შეკავების დრო 5.151 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV-324.9 nm. METLIN

ნაერთებისმასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 14 შეესაბამება Caffeoylquinic acids (CQAs).



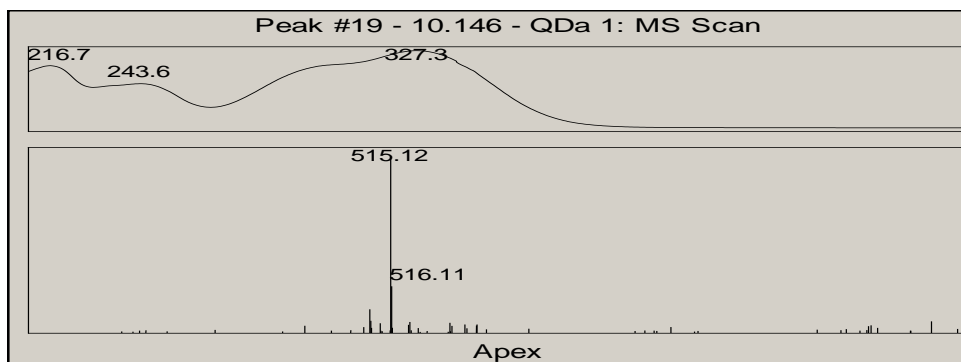
სურ. 14. Caffeoylquinic acids (CQAs) UPLC-MS სპექტრი

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



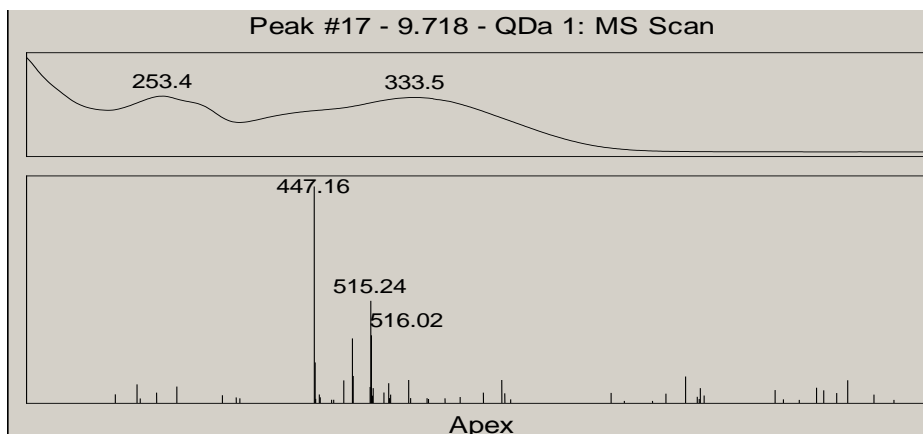
სურ. 15. 3-5- Dicaffeoylquinic acid UPLC-MS სპექტრი

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



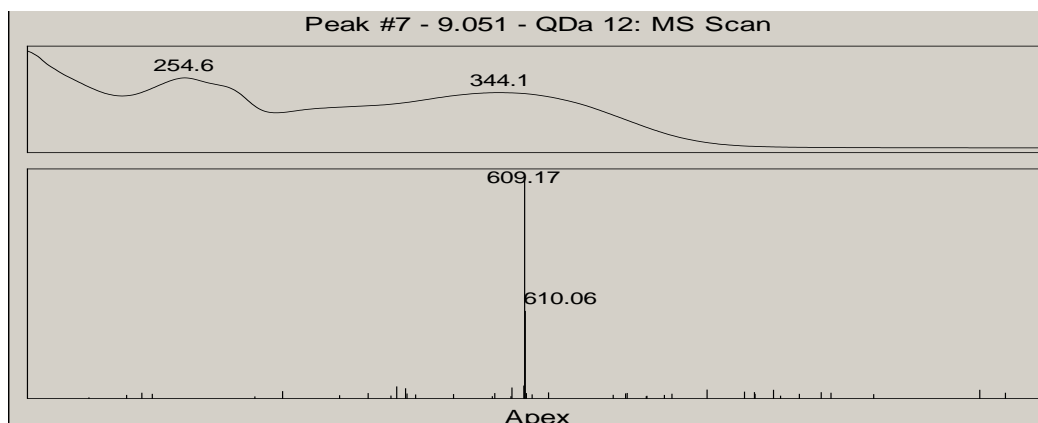
სურ. 16. 3,4- Dicafeoylquinic acid UPLC-MS სპექტრი

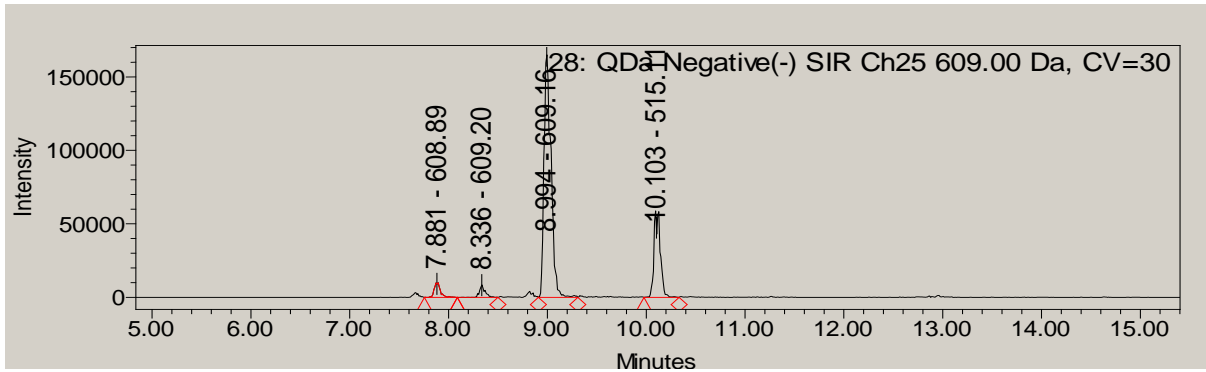
ნივთიერება 17 - [M-H⁻] - m/z 463, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 301. შეკავების დრო 9.718 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 333.5 nm. METLIN ნაერთებისმასების ბაზის შესაბამისად ნივთიერება 17 იდენტიფიცირებულია, როგორც კვერცეტინის-გალაქტოზიდი.



სურ. 17. კვერცეტინის-გალაქტოზიდი UPLC-MS სპექტრი

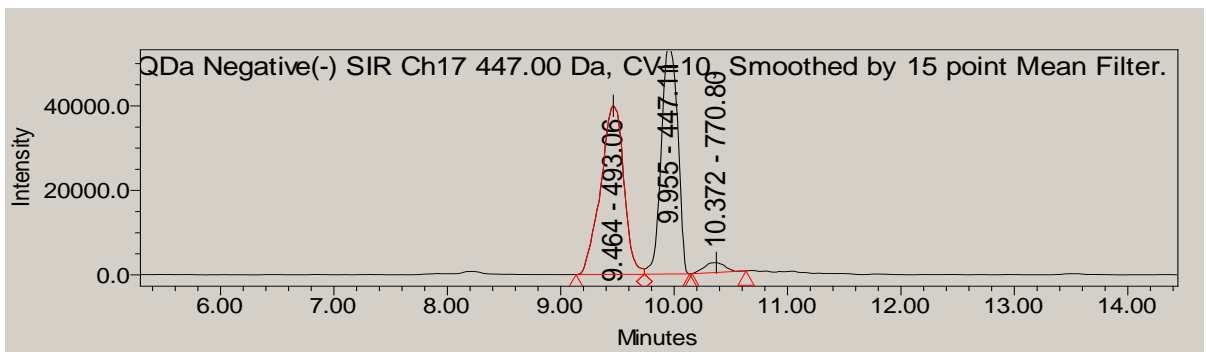
ნივთიერება 18 - [M-H⁻] - m/z 609, ფრაგმენტაციის შედეგი m/z 301. შეკავების დრო 9.051 წთ, შთანთქმის მაქსიმუმი UV- 344.1 nm. სტანდარტული ნაერთის და METLIN ნაერთებისმასების ბაზის, ასევე სტანდარტულ ნაერთთან შედარებით ნივთიერება 18 იდენტიფიცირებულია, როგორც რუთინი (Rutin).





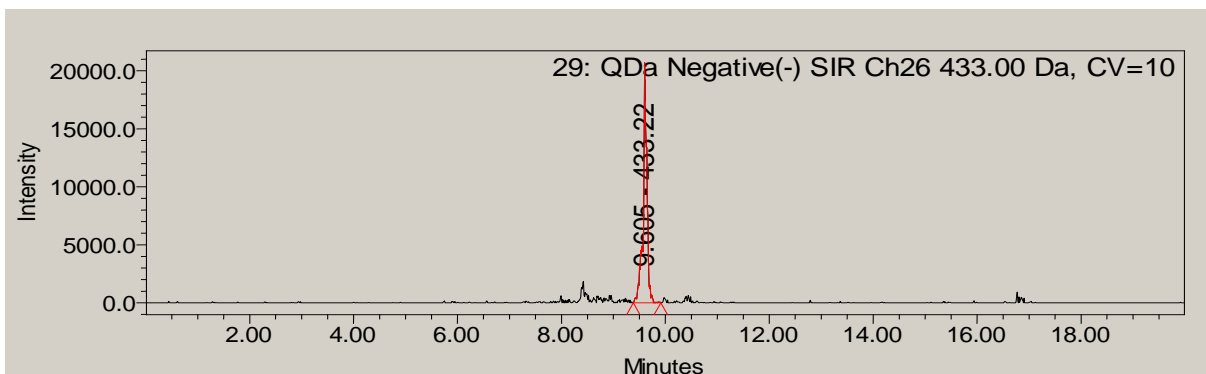
სურ. 18. Rutin UPLC-MS სპექტრი

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



სურ. 19. Quercetin- rhamnoside UPLC-MS სპექტრი

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



სურ. 20. Quercetin- pentoside UPLC-MS სპექტრი

ცხრილი 2. სტევიას ფენოლური ნაერთების UPLC-MS მონაცემები კომპონენტების negative იონიზაციით LC-ESI MS ანალიზისას

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

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

სტევიოლ გლიკოზიდების რაოდენობრივი კვლევა წარმოებდა სტანდარტული სტევიოზიდისა და რეზუდუიზიდის გამოყენებით აგებული საკალიბრო მრუდების მეშვეობით. მრუდის ასაგებად გამოყენებული იქნა ინდივიდუალურად ექსტრაგირებული იონური SIR 803 (რეზუდუიზიდი) და SIR 641 (სტევიოზიდი) ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები. სხვა ტკბილი გლიკოზიდების გაანგარიშება ხდებოდა სტევიოზიდთან მიმართებაში.

ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების რაოდენობრივი ანალიზის ჩასატარებლად შედარებული იქნა შეძენილი ჯიშები ადგილობრივ (სპონტანური) ფორმასთან. სტევიას ფოთოლში დომინანტი ყველა შემთხვევაში სტევიოზიდი, ამერიკა #3 11.03 %, ფოთოლი ამერიკა #4 12.34 %, ადგილობრივ სპონტანური სახეობის გვერდითი ფოთოლი 10.24 %, ფოთოლი სპონტანური ძირითადი ფოთოლი 11.41 %-ია. რაოდენობრივად სტევიოზიდი ჭარბობს სხვა გლიკოზიდების შემცველობას. ყველა ვარიანტში მათი შემცველობა ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების საერთო შემცველობის 55-60%-მდეა. რეზუდუიზიდი A-ს შემცველობა შესაბამისად შედარებით ნაკლებია (30-38%), დანარჩენი სხვა მინორული ნაერთებია, რომელთა შორის შედარებით მეტი რეზუდუიზიდი C (5,4-დან 8,2 %-მდე). აღსანიშნავია ის გარემოებაც, რომ მცენარის ცენტრალური ფოთლები, გვერდითთან შედარებით უმნიშვნელოდ მეტი რაოდენობით შეიცავენ ტკბილ ნაერთებს (10,2 გ/100გ-ში და 11,4 გ/100გ-ში შესაბამისად).

ცხრილი 3. ტკბილი დიტერპენილი გლიკოზიდების შემცველობა სტევიას ფოთოლში (მგ/100 გ მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით)

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

ცხრილი 4. ტკბილი დიტერპენილი გლიკოზიდების შემცველობა სტევიას ფოთლის ექსტრაქტებში (მგ/ლ)

ნომერი/ Sampler	m/z 641	m/z 803	Total
საწყისი ექსტრაქტი	3819±114.6	3016±90.5	6935±208.1
ფილტრირებული 2000 Dal	4217±126.5	3062±91.9	7279±218.4
კონცენტრირებული 2000 Dal	3764±112.9	2927±87.8	6691±200.7
ფილტრირებული 1000 Dal	4540±136.2	3030±90.9	7570±227.1
კონცენტრირებული 1000 Dal	3660±109.8	2823±84.7	6483±194.5

ცხრილი 5. ტკბილი დიტერპენილი გლიკოზიდების შემცველობა სტევიას ფოთლის SFE ექსტრაქტებში (მგ/50 მლ)

ნომერი/ფრაქცია Sampler/fraction	m/z 641	m/z 803	total
SFE20	31.77±1.0	37.36±1.1	69.13±2.1
SFE21	38.29±1.1	37.7±1.1	75.99±2.3
SFE22	32.45±1.0	37.72±1.1	70.17±2.1
SFE23	26.41±0.8	31.21±0.9	57.62±1.7
SFE24	25.72±0.8	33.27±1.0	58.99±1.8
SFE25	23.35±0.7	29.02±0.9	52.37±1.6
SFE 26	19.05±0.6	25.63±0.8	44.68±1.3
SFE 27	17.39±0.5	24.92±0.7	42.31±1.3
SFE 28	24.25±0.7	28.95±0.9	53.20±1.6
SFE 29	28.56±0.9	30.86±0.9	59.42±1.8

სტევიას ფოთლის ექსტრაქტის რაფინირების დროს გარკვეული ცვლილებები შეინიშნება. ექსტრაქტის გაფილტვრა 2000 Dal ფილტრში იწვევს ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდების რაოდენობის მატებას, შესაბამისად კონცენტრატში მათი შემცველობა მცირდება (6935მგ/ლ-დან 6691 მგ/ლ-მდე), ხოლო ფილტრატში

მატულობს (7279 მგ/ლ). შესაბამისი ცვლილებაა 1000 Dal ფორების ფილტრშიც. ფილტრატში მატულობს (7570 მგ/ლ), ხოლო კონცენტრატში კლებულობს (6483 მგ/ლ). მემბრანების ფორების ცვლილებით შესაძლებელი ხდება სტევიას ექსტრაქტის რაფინირება.

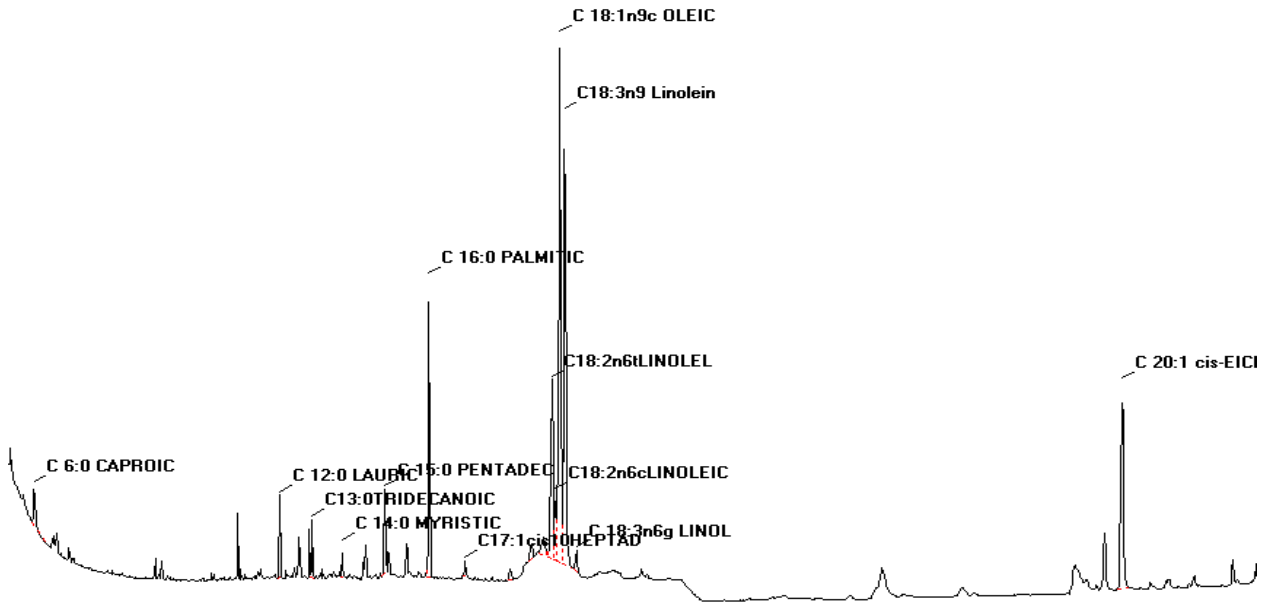
სტევიას ფოთლის SFE ექსტრაქცია კოსოლვენტად ეთანოლის გამოყენებით იძლევა შესაძლებლობას მოვახდინოთ პრეპარატების მიღება სტევიოზიდისა და რებაუდიოზიდის მაღალი შემცველობით (76 მგ/50მლ-ში).

თავი 5. სტევიას ფოთლის ლიპიდური ბუნების ნაერთები

სტევიას ფოთლებისაგან ცხიმის მისაღებად აღებული იქნა 10 გრამი ჰაერზე გამშრალი ფოთოლი, რომლის დაქუცმაცდა Bosh-ის ფორმის საფქვავეში და მოთავსდა წინასწარ ჰექსანში გარეცხილ და მუდმივ წონამდე მიყვანილ ფილტრის ქალაღში. პაკეტი ნიმუშთან ერთად საექსტრაქციოდ მოთავსებული იქნა სოქსლეტის აპარატში 48 საათის განმავლობაში. ექსტრაქცია მიმდინარეობდა ჰექსანით ცხიმოვანი და პიგმენტური ნაერთების სრულ მოცილებამდე. მიღებული მასა გაშრა საშრობ კარადაში 100°C -ზე მუდმივ წონამდე. დადგინდა, რომ ლიპიდები შეადგენს მასის 3,23%-ს.

ნიმუშის აირ-სითხური ქრომატოგრაფირებისათვის აუცილებელია მათი ეთერიფიკაცია, რისთვისაც ისინი მექანიკური მინარევეებისაგან გასაწმენდად წინასწარ გაიფილტრა. შემდგომ 1 მლ გადატანილ იქნა ცენტრიფუგის სინჯარაში, დაემატა 0.5 მლ 2N KOH-ის 96% სპირტხსნარი (შესაძლებელია ეთანოლის ან მეთანოლის გამოყენება). შემდეგ დაემატა 10 მლ ჰექსანი (საერთო მოცულობა 11,5 მლ). შეინჯღრა სრულ გახსნამდე (მინიმუმ 30 წამის განმავლობაში) და დაცენტრიფუგირდა 10 წუთის განმავლობაში 1000 ბრ/წთ-ზე. ნიმუშის ზედა ფრაქციიდან 1 მკლ შეტანილ იქნა ქრომატოგრაფის ინჟექტორში. ქრომატოგრაფირება განხორციელდა ტემპერატურულ გრადიენტით სამ ეტაპად. კერძოდ, ქრომატოგრაფირება იწყება 140°C -ზე, რომელიც მიმდინარეობდა 4 წუთის განმავლობაში. მეორე ეტაპზე 20 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 220°C-მდე და ქრომატოგრაფირება გრძელდებოდა 16 წუთი. მესამე ეტაპზე 7 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 300°C-მდე და გრძელდებოდა აღნიშნულ ტემპერატურაზე 7 წუთის განმავლობაში. ქრომატოგრაფირების სრული დრო

შეადგენდა 42,43 წუთს. კარბონმჟავების რაოდენობრივი შემცველობა ისაზღვრება პიკის ფართობის მიხედვით პროცენტებში 0,01%-ის სიზუსტით.



სურათი № 21 ლიპიდების ესტერების აირ-სითხური ქრომატოგრამა

ცხრილი №6. კარბონმჟავათა კომპონენტური შემადგენლობა

პიკი	კომპონენტის დასახელება	შეკავების დრო (წთ)	ფართობი %
1	Caproic acid methyl ester (C6:0)	3.373	0.069±0.002
2	Undecanoic acid methyl ester (C11:0)	9.540	0.018±0.001
3	Tridecanoleic acid methyl ester (C13:1)	11.307	0.338±0.01
4	Tridecanoic acid methyl ester (C13:0)	11.390	0.337±0.01
5	Myristoleic acid methyl ester (C14:1)	11.968	0.152±0.005
6	Myristic acid methyl ester (C14:0)	12.228	0.025±0.001
7	Pentadecanoic acid methyl ester (15:0)	13.317	0.118±0.004
8	Palmitolenic acid methyl ester (C16:2)	13.643	0.792±0.024
9	Palmitoleic acid methyl ester (C16:1)	14.243	9.339±0.28
10	Palmitic acid methyl ester (C16:0)	14.558	0.535±0.016
11	cis-10-Heptadecenoic acid methyl ester (C17:1)	15.408	10.535±0.316

12	Heptadecanoic acid methyl ester (C17:0)	15.623	0.099±0.003
13	gamma-Linolenic acid methyl ester (C18:3n6)	17.575	6.065±0.182
14	Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c)	17.733	6.571±0.197
15	Oleic acid methyl ester (C18:1n9c)	18.137	37.425±1.123
16	Elaidic acid methyl ester (C18:1n9t)	18.318	0.362±0.011
17	Stearic acid methyl ester (C18:0)	18.520	1.743±0.052
18	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester (C20:3n3)	19.573	7.266±0.218
19	Arachidic acid methyl ester (C20:0)	19.772	12.801±0.384
20	Heneicosanoic acid methyl ester (C21:0)	20.508	2.357±0.071

ქრომატოგრაფირების მეშვეობით მიღებული კომპონენტების იდენტიფიკაცია განხორციელდა ცნობილი შედგენილობის მქონე ნიმუშის და ლიტერატურულ მონაცემებთან შედარებით. დადგინდა სტევიას ზეთში კარბონმჟავების სპეციფიკური შედგენილობა. ანალიზის შედეგები მოყვანილია ქრომატოგრამაზე სურათ №21.

ქრომატოგრაფიულმა კვლევამ აჩვენა, რომ სტევიას ფოთლებისაგან მიღებული ზეთი შეიცავს C 6-დან C22-მდე თითქმის ყველა ცხიმმჟავას, კერძოდ C16 -პალმიტინის მჟავა, C18- ლინოლენის მჟავა (C18:2n6c) ცის-ლინოლის მჟავა (ომეგა-6), gamma-Linolenic acid (C18:3n6) გამა-ცის-ლინოლენის მჟავა (ომეგა-6), Alpha-Linolenic acid (C18:3n3) ალფა-ლინოლენის მჟავა (ომეგა-3). დასკვნის სახით შეიძლება ითქვას, რომ სტევიას ფოთლისაგან მიღებული ზეთის შემადგენლობაში C18 კარბონმჟავები დომინანტია, მათი შემცველობა ცხიმის საერთო შემცველობის 50%-ზე მეტს შეადგენს.

თავი 5. სტევიას ფოთლისა და მისგან მიღებული პროდუქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობის კვლევა DPPH მეთოდით

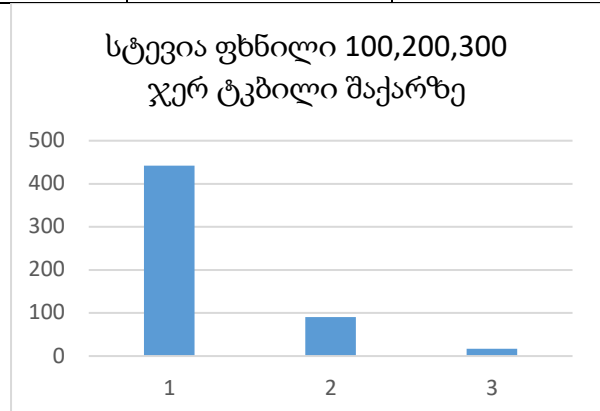
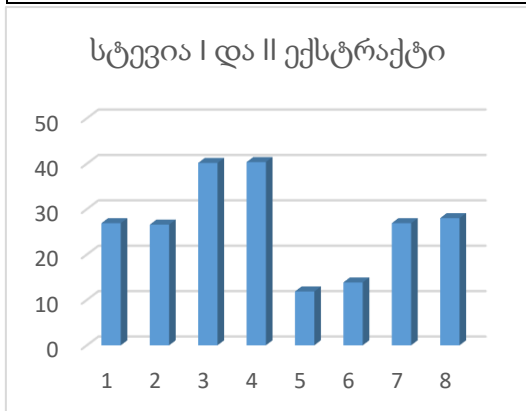
Stevia rebaudiana ექსტრაქტს გააჩნია ანტიოქსიდანტური აქტივობა, რაც განპირობებულია ფენოლური ნაერთების მთელი კომპლექსით.

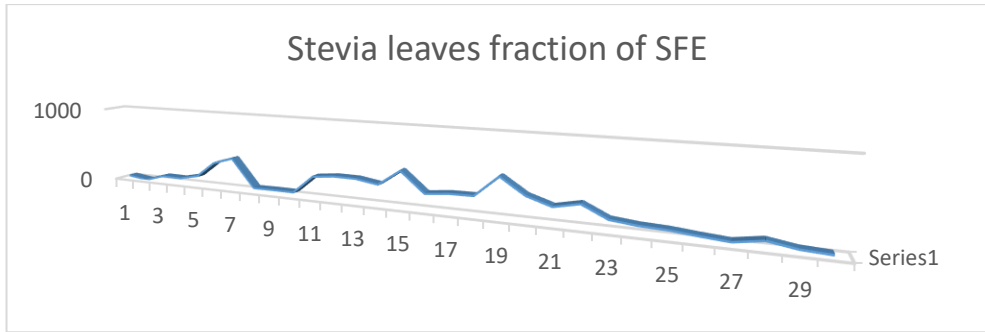
სხვადასხვა ჯიშის ინტროდუცირებული მცენარეებიდან ოდნავ უფრო აქტიურია პარაგვაიდან ინტროდუცირებული მცენარის ფოთლისაგან მიღებული ექსტრაქტი, რომლის 0.341 მგ ახდენს 0.1 mM DPPH-ის 50 %-იან ინჰიბირებას. ადგილობრივი სპონტანური პოპულაცია შედარებით ნაკლებ აქტიურია. მეორე ექსტრაქტები

(სპირტის ექსტრაქტი) თითქმის ყველა შემთხვევაში საკმაოდ აქტიურია და დაახლოებით 0.1 მგ ახდენს ინჰიბირებას. სტევიას ანტიოქსიდანტური აქტივობა გადამუშავების პროცესში მნიშვნელოვნად იცვლება. მნიშვნელოვანი განსხვავებებია ექსტრაქტის რაფინირების დონის მიხედვით. საქაროზაზე 100-ჯერ ტკბილი პრეპარატი განსაკუთრებით აქტიურია (მხოლოდ 0.015 მგ ახდენს ინჰიბირებას), 200-ჯერ ტკბილში ეს მახასიათებელი თითქმის 7-ჯერ მცირდება (0.107 მგ), ხოლო სრულად რაფინირებული პრეპარატის (300-ჯერ ტკბილი) მნიშვნელოვნად კარგავს (45-ჯერ) ანტიოქსიდანტურ აქტიობას.

ცხრილი 7. სტევიას ფოთლის და პროდუქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობა

ნიმუშის დასახელება	მგ ნიმუშის DPPH-ის 0,1 mM-ს IC 50%-ი	ანტიოქსიდანტური აქტივობა, %
სტევია, ამერიკა 3. I ექსტრაქტი	0.364	27±0.8
სტევია ამერიკა, 4. I ექსტრაქტი	0.341	27±0.8
სტევია სპონტანური I ექსტრაქტი ძირითადი ფოთოლი	0.460	40±1.2
Stevia სპონტანური I ექსტრაქტი გვერდითი ფოთოლი	0.454	40±1.2
სტევია, ამერიკა 3. II ექსტრაქტი	0.102	12±0.4
სტევია ამერიკა, 4. II ექსტრაქტი	0.100	14±0.4
სტევია სპონტანური II ექსტრაქტი ძირითადი ფოთოლი	0.116	27±0.8
სტევია სპონტანური II ექსტრაქტი გვერდითი ფოთოლი	0.115	28±0.8
სტევია 100-ჯერ ტკბილი ვიდრე საქაროზა	0.015	442±13.3
სტევია 200 -ჯერ ტკბილი ვიდრე საქაროზა	0.107	91±2.7
სტევია 300 -ჯერ ტკბილი ვიდრე საქაროზა	0.698	17±0.5
ფილტრატი 2000 დალტონის მემბრანულ ფილტრში	0.045	134±4.0
ფილტრატი 1000 დალტონის მემბრანულ ფილტრში	0.085	87±2.6
კონცენტრატი 1000 დალტონის მემბრანულ ფილტრში	0.075	77±2.3



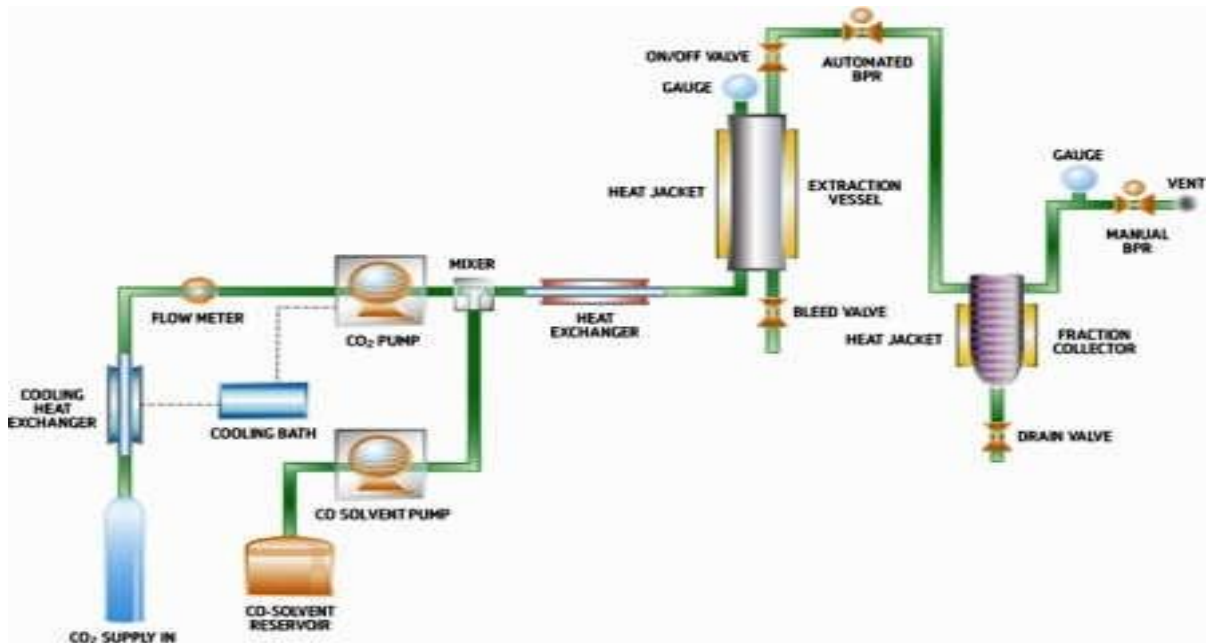


სურ. 22. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) რადიკალის ინჰიბირება Stevia ფოთლის ექსტრაქტის მიერ

სტევიას ფოთლის გამოყენების პერსპექტიულობას, გარდა მისგან პრაქტიკულად ნულოვანი კალორიულობის დამატკობელის წარმოებისა, მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტიობა კიდევ უფრო მეტად პერსპექტიულს ხდის.

თავი 6. სტევიას ფოთლის გადამუშავება სუპერ კრიტიკული წნევის ფლუიდური ექსტრაქციის (SFE) მეთოდით

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



სურ.23. SFE 500 ხელსაწყო სქემა

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

პირველი საექსტრაქციო მეთოდით ვახორციელებდით სტევიას ფოთლებიდან დიტერპენოიდული გლიკოზიდების გამოყოფას. ხოლო მეორე მეთოდი ეფუძვნება სტევიას ფოთლიდან სხვა ნივთიერებების (მათ შორის ფენოლური) მოცილებას, რაც საშუალებას იძლევა დიტერპენოიდულ გლიკოზიდთა ჯამური პრეპარატის მიღებას.

პირველი რეჟიმი მოიცავს ოთხ ეტაპს:

პირველი ეტაპი - 30 წუთი CO₂ 500 ბარი 40°C-ზე 20 გრ/წუთში სიჩქარით.

მეორე ეტაპი - 20 წუთი CO₂ 500 ბარი 60°C-ზე 20 გრ/წუთში სიჩქარით.

მესამე ეტაპი - 20 წუთი CO₂ 500 ბარი 80°C-ზე 20 გრ/წუთში სიჩქარით.

მეოთხე ეტაპი - 1-2 საათი CO₂ 350 ბარი 80°C-ზე 20 გრ/წუთში სიჩქარით და 10%-ი კო-სოლვენტის დამატებით (40%-ნი ეთანოლი).

პირველი მეთოდით კვლევების ჩასატარებლად საკვლევ ობიექტად აღებული იქნა 20 გრამი სტევიას მშრალი ფოთოლი (წინასწარ დაქუცმაცებული).

და სქემატურად გამოსახულია სურათი №8-ზე.

მეორე მეთოდით კვლევას ვახორციელებდით სტევიას ნედლ ფოთოლზე, წინასწარი დაქუცმაცების და დამუშავების გარეშე. საექსტრაქციოდ აღებული იქნა 25 გრამი ნიმუში რომლის ფლუიდური ექსტრაქცია ჩატარდა ეტაპობრივად.

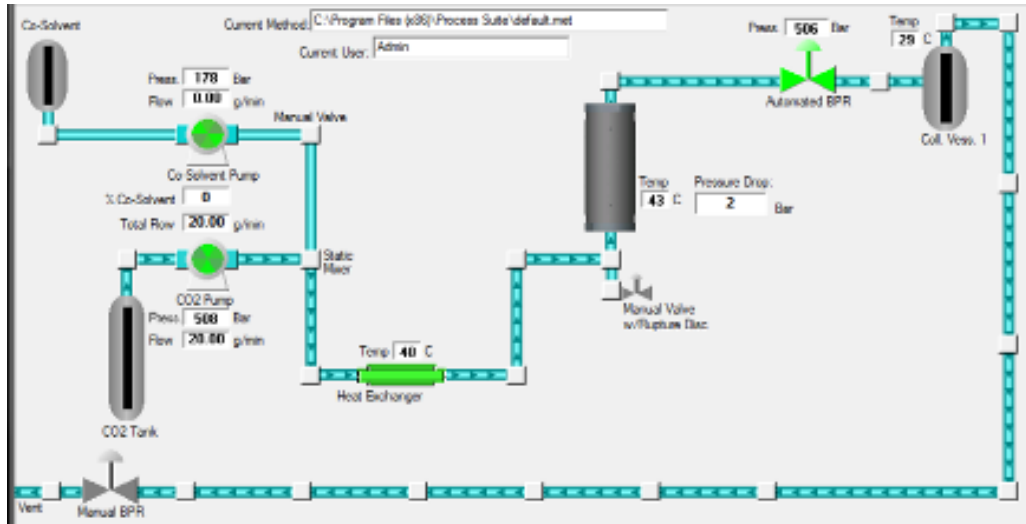
პირველი ეტაპი - 40 წუთი 500 ბარი 60°C-ზე 20 გრ/წუთში სიჩქარით.

მეორე ეტაპი - 30 წუთი 350 ბარი 60°C-ზე 22 გრ/წუთში სიჩქარით და 10%-ი აცეტონი

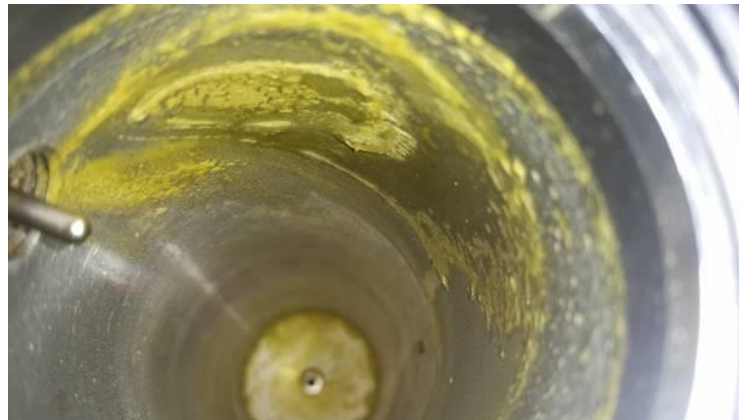
მესამე ეტაპი - 40 წუთი 350 ბარი 80°C-ზე 22 გრ/წუთში სიჩქარით და 10%-ი აცეტონი

მეოთხე ეტაპი - 40 წუთი 350 ბარი 80°C-ზე 30 გრ/წუთში სიჩქარით და 20%-ი ქლოროფორმი.

მეხუთე ეტაპი - 20 წუთი 500 ბარი 80°C-ზე 20 გრ/წუთში სიჩქარით.



სურ. 24 პროცესის სქემა

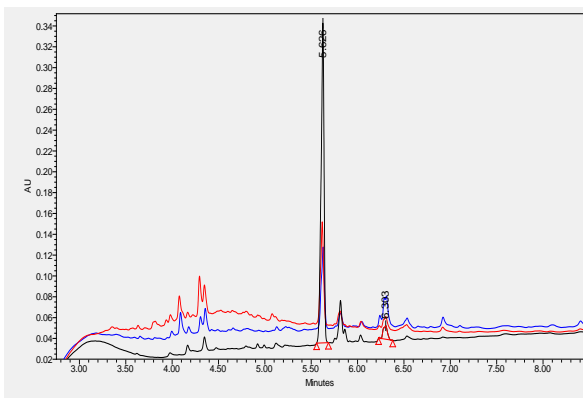


სურ 25. SFE პრაპარატი

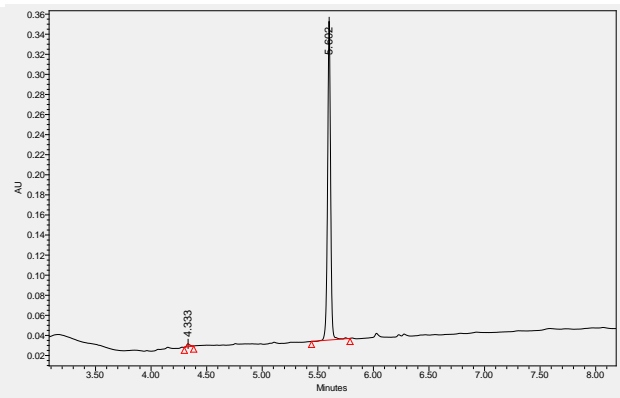
SFE მეთოდით სტევიას ფოთლის დამუშავების პირველ ეტაპზე ექსტრაგირდებოდა ორგანულ გამხსნელში ხსნადი ლიპოფილური ნაერთები. ამიტომაც ბუნებრივია ფრაქციებში 1-8 ჭარბობს ქლოროფილი A and B (37.54-1.96 mg/g, 24.16-0.427 mg/g შესაბამისად) და კაროტინი 19.1-1.0 mg/g. ფოთოლში არსებული წყლის ხარჯზე ხდება ფენოლკარბონმჟავების,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

განსხვავებული შედგენილობის ორგანულ გამხსნელებში. 1-დანმე-8 ფრაქციამდე ექსტრაქტი მდიდარია მშრალი ნივთიერებებით. იგი მერყეობს 7.75%-დან 0.27 %-მდე დიაპაზონში. მე-9-დან მე-15 ფრაქციამდე მათი შემცველობა კლებულობს, შესაბამისად ნაკლებია საკვლევი ნივთიერებებიც. მე-16 ფრაქციიდან იწყება და მე-20-მდე მატულობს როგორც ექტრაქტული, ასევე კატეჩინების, ფენოლკარბონმჟავებისა და ფლავონოიდების შემცველობა. 21-დან 31-ე ფრაქციამდე ექსტრაქტულ ნაერთთა შემცველობა თანდათან მცირდება, ხოლო ფენოლური ბუნების ნაერთების ცალკეული კომპონენტთა ცვლილების საერთო რაოდენობა შენარჩუნებულია. საკვლევი ფრაქციებიდან ტკბილი ტერპენოიდული გლიკოზიდი მიღებული იქნა მე-20-დან 29-ე ფრაქციამდე (სტევიოზიდისა და რებაუდიოზიდის ჯამი 12000- 7000 ppm შესაბამისად). ხოლო 31 ფრაქციაში ის 500 ppm-ია. საბოლოო პროდუქტის სახით მიღებული იქნა შაქარზე 100-ჯერ და 300-ჯერ ტკბილი ორი პრეპარატი, რომელშიც სტევიოზიდისა და რებაუდიოზიდის ჯამური შემცველობა შესაბამისად 29% და 93 %-ია.

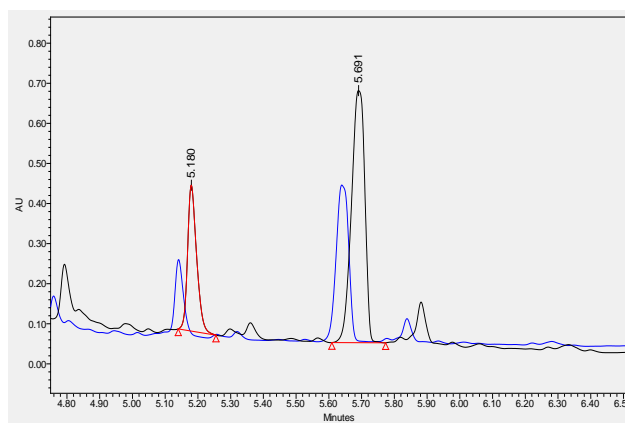
UPLC-PDA მეთოდით იგივე ფრაქციებიდან (20, 29) და ორივე პრეპარატიდან იდენტიფიცირებული და რაოდენობრივად განსაზღვრული იქნა ჯამური გლიკოზიდები. განისაზღვრა მიღებული ფრაქციებისა და პრეპარატების ანტიოქსიდანტური აქტიობა, რომელიც სხვადასხვა კლასის ფენოლური ნაერთთა სუმარული რაოდენობის ზრდასთან ერთად (ფრაქციები 8-23) მნიშვნელოვნად იზრდება.



სურ.26,27 სტევიას პრეპარატი 100,300 UPLC-PDA-214 nm



სურ.28 Rebaudioside A UPLC-PDA -214 nm



სურ. 29 სტევიას ფრაქცია 20, 29 UPLC-PDA -214 nm

ცხრილი 8. ტკბილი დიტერპენული გლიკოზიდები SFE ფრაქციებში

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

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

ნედლეულის შემდგომი კვლევისა და მისგან სხვადასხვა პროდუქტის მისაღებად გამოყენებული და ადაპტირებული იქნა ექსტრაქციის რამოდენიმე ტექნოლოგიური რეჟიმი. ექსტრაქტის გასასუფთავებლად გამოყენებული იქნა მემბრანული ულტრაფილტრაციის ტექნოლოგია (აღნიშნული მიზნისათვის შემენილი იქნა 0,1µმ ულტრაფილტრაციული და 0,2 µმ მიკროფილტრაციული მემბრანები (ფილტრები). მათი გამოყენებით შესაძლებელი გახდა ექსტრაქტებში ტკბილი დიტერპენული

ნაერთების კონცენტრაციის გაზრდადა მათი პრეპარატული სახით მიღება. ასევე გამოიკადა ხსნარის გაუფერულობის სხვა ხერხები.

**თავი 7. სტევიას ფოთლების კათიონების კვლევა ქრომატოგრაფიით
კონდუქტომეტრული დეტექტორის დამოყენებით**

სტევიას ფოთლის და მისგან მიღებული პრეპარატების ზოგიერთი კათიონის კვლევა ჩატარდა ქრომატოგრაფიული მეთოდით, კონდუქტომეტრული დეტექტორით. სტანდარტები ლითიუმის ჰიდროქსიდის მონო ჰიდრატი (Li^+), ნატრიუმის ქლორიდი (Na^+), ამონიუმის ქლორიდი (NH_4^+), კალიუმის ქლორიდი (K^+), მაგნიუმის ჰიდრატი (Mg^{2+}), კალციუმის ნიტრატი ტეტრაჰიდრატი (Ca^{2+}), სტრონციუმის ნიტრატი ტეტრაჰიდრატი (Sr^{2+}), ბარიუმის ქლორიდი დიჰიდრატი (Ba^{2+}) (FisherScientific), EDTA (Serva). იზოკრატული ტუმბო (Isocratic HPLC pump -Waters 1515), დეტექტორი (Waters 432 -Conductivity), ქრომატოგრაფიული სვეტი IC-PakCationMD, ელუენტი 3mM $HNO_3/0.1$ mM EDTA, ელუენტის გამტარებლობა $1250 \pm 50 \mu S$, საბაზო მგრძნობელობა $2000 \mu S$, ინტეგრატორის მგრძნობელობა $0.01 \mu S$, სვეტის ტემპერატურა $35^\circ C$, პოლარობა-negative.

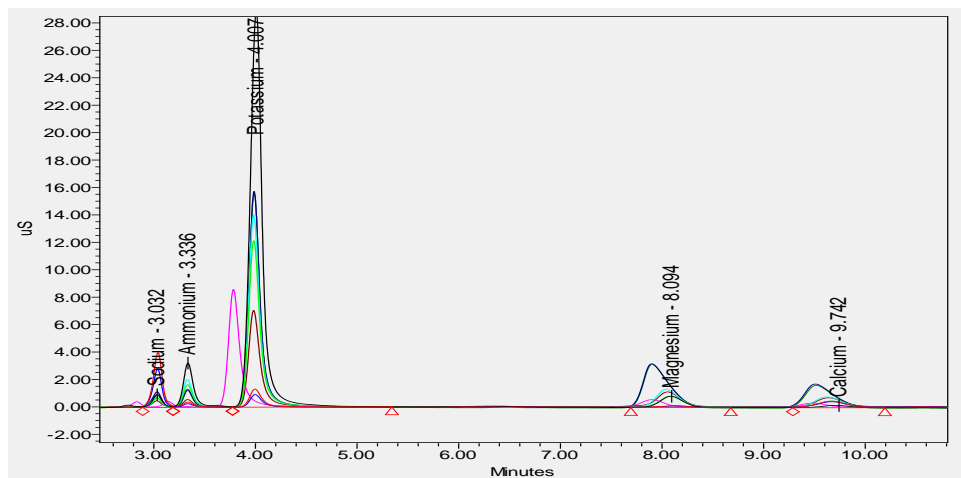
სტევიას ფოთლის ძირითადი კათიონების საერთო რაოდენობა დაახლოებით 5 %-მდეა. სტევიასგან მიღებულ პრეპარატში ბუნებრივია წყალში ხსნადი კათიონებია და მათი შემცველობა პრეპარატში, რომელიც შექარზე 100-ჯერ მეტია 5 %-ზე ოდნავ მეტია. პრეპარატის შემდგომი რაფინაცია პირველ ეტაპზე იწვევს კათიონების რაოდენობის მკვეთრ მომატებას,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

ცხრილი 9. სტევიას ფოთლის და პრეპარატების კათიონების შემცველობა

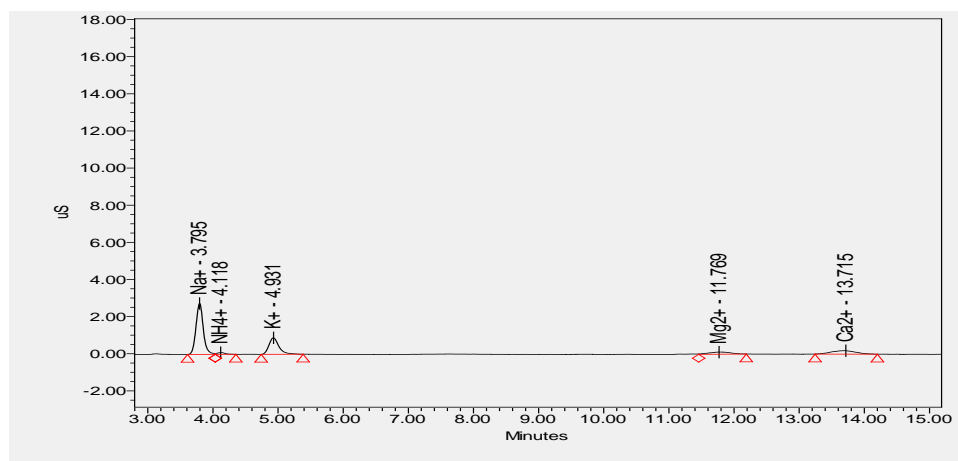
რაოდენობა PPM	Na+	NH4+	K+	Mg2+	Ca2+	total mass %
სტევიასცენტრალური ფოთლები	895,2±27	2431,6±73	46139,6±1384	1276,4±38	1485,5±45	5,227±0.2
სტევიასგვერდითი ფოთლები	928,0±28	2441,6±73	42795,1±1283	1845,0±55	2520,5±76	5,059±0.2
სტევია ამერიკა 4	447,8±13	158,9±4.8	23169,0±695	675,2±20	612,2±18	2,506±0.1
სტევია ამერიკა3	579,4±17	784,3±23	25914,7±777	1961,6±59	2371,5±71	3,161±0.1

სტევია 100	1261,6±38	1414,9±42	39163,7±1174	4413,7±132	5189,4±156	5,147±0.2
სტევია 200	967,8±29	3413,7±102	75024,5±2250	939,4±28	234,5±7.0	8,058±0.2
სტევია 300	1335,1±40	126,8±3.8	1210,3±36.3	0,0	382,0±12	0,305±0.01

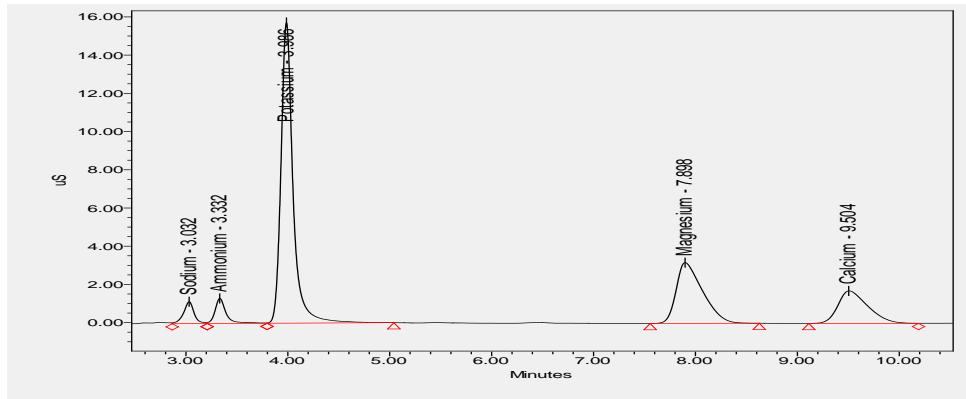
სტევიას ფოთლი განსაკუთრებით დიდი რაოდენობით აგროვებს კალიუმის იონებს, რომლის შემცველობა მთელი კათიონების 80%-ზე მეტია. განსაკუთრებით საინტერესოა ის გარემოება, რომ პრეპარატის გასუფთავების გარკვეულ ეტაპზე ხდება კალიუმის იონების კონცენტრირება. მიღებული პრეპარატი განსაკუთრებით საინტერესოა კალიუმის მაღალი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



სურ. 29. სტევიას ფოთლისა და პრეპარატების ქრომატოგრამები



სურ. 30. შაქარზე 300-ჯერ ტკბილი პრეპარატის ქრომატოგრამა



სურ.31 შაქარზე 100-ჯერ ტკბილი პრეპარატის ქრომატოგრამა

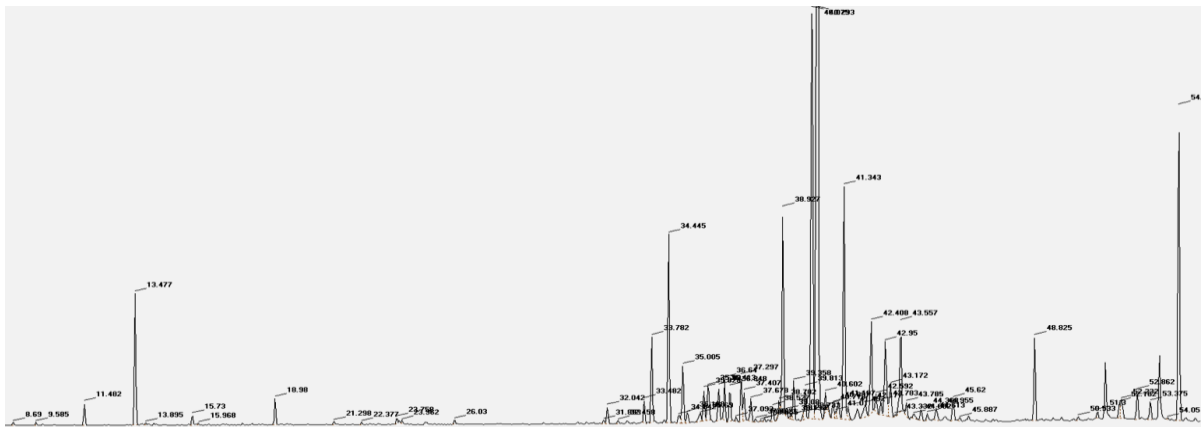
თავი 8. სტევიას ფოთლების ეთერზეთის კვლევა გაზური ქრომატოგრაფიით
 ჰიდროდისტილიაციით მიღებული სტევიას ფოთლის ეთერზეთის კვლევა განხორციელდა გაზური ქრომატოგრაფის (TRACE™ 1310 Gas Chromatograph - Thermo Scientific) საშუალებით. ქრომატოგრაფირება მიმდინარეობდა ქრომატოგრაფიულ კაპილარულ სვეტზე - SGE BPX5 Capillary GC Column 30 მ სიგრძის, 0,25 მმ დიამეტრის და 0,25 მკმ უძრავი ფაზის ნაწილაკების ზომით. უძრავ ფაზას წარმოადგენდა **5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane**.

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

ინჟექტორის ტემპერატურული რეჟიმი 280°C-ია, ხოლო, სვეტში შესაყვანი ნიმუშის ჰელიუმის ნაკადში დაყოფა ხორციელდებოდა 1/100 თანაფარდობით. ქრომატოგრაფირება ხორციელდებოდა ტემპერატურულ გრადიენტში ოთხ ეტაპად. კერძოდ, ქრომატოგრაფირება იწყებოდა 50°C -ზე, რომელიც 3 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 250°C-მდე (მეორე ეტაპი) და ქრომატოგრაფირება გრძელდებოდა 10 წუთი. მესამე ეტაპზე 10 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 270°C-მდე და გრძელდებოდა აღნიშნულ ტემპერატურაზე 3 წუთის განმავლობაში. მეოთხე ეტაპზე 21,4 (°C/წუთში) სიჩქარით იზრდებოდა 320°C-მდე და გრძელდებოდა აღნიშნულ ტემპერატურაზე 5 წუთის განმავლობაში. ქრომატოგრაფირების სრული დრო შეადგენდა 89,0 ქრომატოგრაფირების მეშვეობით დაყოფილი ეთერზეთების დეტექტირება ხდებოდა ალურ-იონიზაციურ დეტექტორზე. ეთერზეთის

რაოდენობრივი შემცველობა ისაზღვრებოდა პიკის ფართობის მიხედვით პროცენტებში 0,01%-ის სიზუსტით.

სტევიას ფოთოლის არომატული კომპლექსის მიღება ხდებოდა ჰიდროდისტილაციის მეთოდით. 100 გრამი გამშრალი ფოთოლი (დაქუცმაცებული) 3 ლიტრ წყალთან ერთად თავსდებოდა კოლბაში. დისტილაცია მიმდინარეობდა კლევენჯერის ტიპის აპარატით 3 საათის განმავლობაში. კონდენსირება მიმდინარეობდა ცირკულაციური თერმოსტატით აღჭურვილ მაცივართ რომლის ტემპერატურა შეადგენდა 0,0° C. მიღებული ეთერზეთი ექსტრაგირებული იქნა ჰექსანით, რომლის ორგანული ნაწილის 0,5 მკლ ცენტრიფუგირების (2 წუთი 1350 ბრ/წთ) ინჟექტირდა ქრომატოგრაფში. ქრომატოგრაფირების მეშვეობით მიღებული კომპონენტების იდენტიფიკაცია განხორციელდა ცნობილი შედგენილობის მქონე ნიმუშის მონაცემებთან შედარებით და დადგენილი იქნა სტევიას ეთერზეთში სპეციფიკური ტერპენოიდური შედგენილობა. ანალიზის შედეგები მოყვანილია ქრომატოგრამაზე სურათი №32



სურ.32. სტევიას ეთერზეთის ქრომატოგრამა ცხრილი №10. ეთერზეთის კომპონენტური შემადგენლობა

Peak №	Component Name	Peak Time, (min)	Area, %	Peak №	Component Name	Peak Time, (min)	Area, %
1	a-Thujene	8.753	0.056±0.002	34	Peak 21	39.032	4.085±0.123
2	Peak 1	9.643	0.052±0.002	35	Peak 22	39.462	0.831±0.025
3	a-Pinene	11.570	0.424±0.013	36	Peak 23	39.887	0.742±0.022
4	Peak 2	13.588	2.613±0.078	37	Silphinene	40.163	11.685±0.351
5	γ-Terpinene	13.970	0.043±0.001	38	a-Longipinene	40.500	30.73±0.922
6	Nonanal	15.812	0.210±0.006	39	Peak 24	40.815	0.068±0.002
7	1, 8-eucalypto	16.022	0.032±0.001	40	Peak 25	40.965	0.386±0.012
8	Peak 3	19.073	0.528±0.016	41	Peak 26	41.210	0.495±0.015

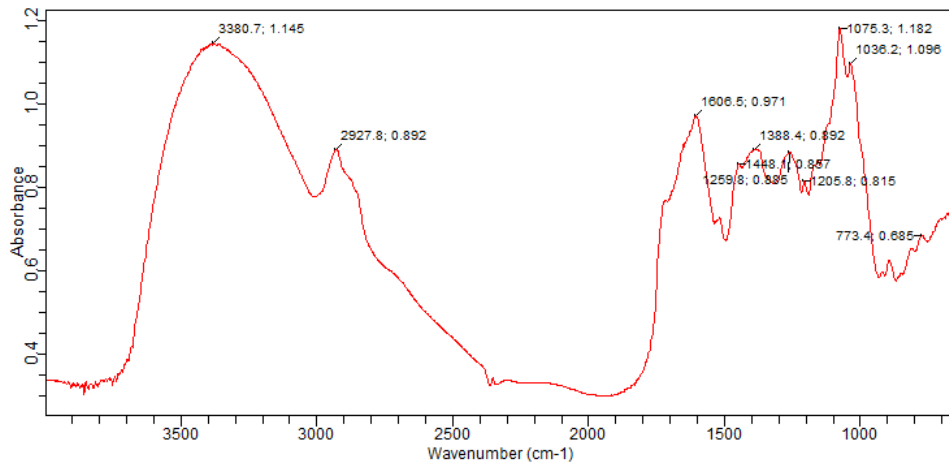
9	Peak 4	21.372	0.077±0.002	42	Modheph-2-ene	41.633	5.757±0.173
10	Peak 5	22.442	0.056±0.002	43	Peak 27	41.637	0.218±0.007
11	Perilaldehyde	23.815	0.108±0.003	44	Peak 28	42.282	0.592±0.018
12	Undecanal	26.107	0.100±0.003	45	a-Isocomene	42.487	2.366±0.071
13	2,6-Dodecadien	32.122	0.394±0.012	46	Peak 29	42.703	0.418±0.013
14	a-Humulene	32.518	0.071±0.002	47	Peak 30	42.857	0.361±0.011
15	a-Sellnene	33.575	0.502±0.015	48	Peak 31	43.267	1.003±0.030
16	Peak 6	33.863	1.763±0.053	49	Z-Caryophyllen	43.390	0.046±0.001
17	Thymol methyl	34.552	3.891±0.117	50	Peak 32	44.480	0.290±0.009
18	(E,E)-a-Farnes	34.927	0.271±0.008	51	Peak 33	44.688	0.142±0.004
19	Peak 7	35.087	1.326±0.040	52	Peak 34	45.122	0.349±0.010
20	b-Cadinene	35.290	0.317±0.010	53	Peak 35	45.713	0.570±0.017
21	Peak 8	35.900	0.680±0.020	54	E-Caryophyllen	48.917	1.694±0.051
22	Peak 9	36.105	1.077±0.032	55	Peak 36	50.605	0.081±0.002
23	Peak 10	36.497	0.782±0.023	56	Peak 37	51.377	0.149±0.004
24	Peak 11	36.727	0.937±0.028	57	Peak 38	52.950	0.663±0.020
25	Peak 12	36.950	0.766±0.023	58	Peak 39	53.465	0.425±0.013
26	Peak 13	37.355	1.002±0.030	59	Peak 40	54.615	7.197±0.216
27	Peak 14	37.495	0.631±0.019	60	Peak 41	55.982	0.039±0.001
28	Peak 15	37.778	0.538±0.016	61	Peak 42	57.553	0.154±0.005
29	Peak 16	37.923	0.063±0.002	62	Peak 43	58.212	0.130±0.004
30	Peak 17	38.138	0.036±0.001	63	Peak 44	63.865	0.188±0.006
31	Peak 18	38.268	0.061±0.002	64	Peak 45	65.250	0.158±0.005
32	Peak 19	38.638	0.361±0.011	65	Peak 46	67.870	0.186±0.006
33	Peak 20	38.828	0.158±0.005				

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

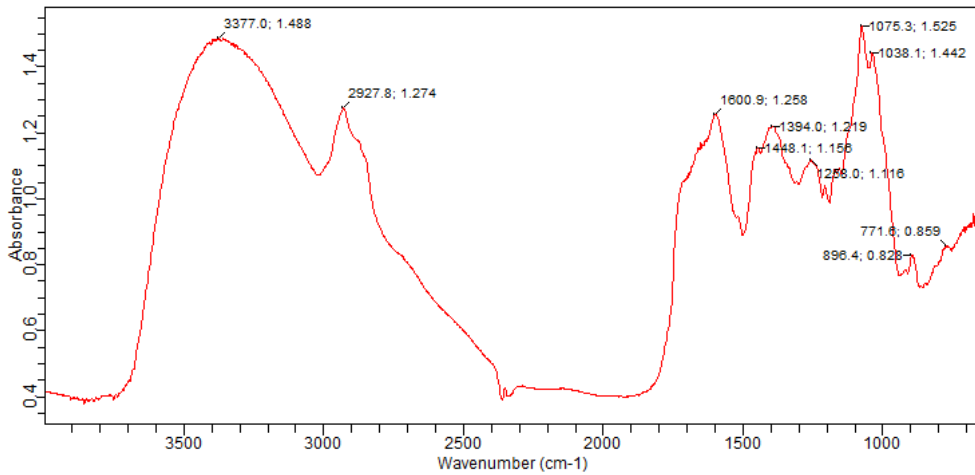
თავი 9. სტევიას პრეპარატების კვლევა ინფრაწითელი სპექტროსკოპიის მეთოდით.

სტევიას ინფრაწითელ სპექტრის არეში კვლევას ვატარებდით 700-დან 4000-ს ნმ-ზე. კვლევისათვის გამოყენებული იქნა Agilent-ს ფირმის ხელსაწყო Cary 630 FTIR. სტევიას პრეპარატების კვლევისას დაფიქსირებული იქნა რამდენიმე შთანთქმის მაქსიმუმი.

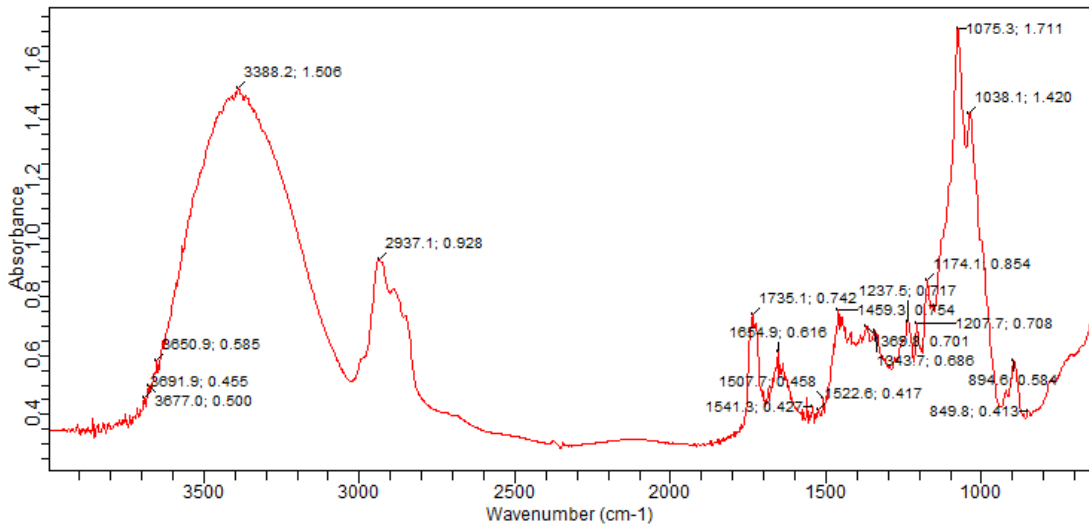
კერძოდ: 3377,0-3388,2 cm^{-1} რომელიც შეესაბამება ჯგუფს; 2927,8-2937,1 cm^{-1} რომელიც შეესაბამება -CH და სპირტებში -OH ჯგუფს; 1654,9-1735,1 cm^{-1} რომელიც შეესაბამება $\text{C} = \text{O}$ ჯგუფს; 1600,9-1606,5 cm^{-1} რომელიც შეესაბამება - $\text{C} = \text{C}$ - ჯგუფს; 1388,4-1459,3 cm^{-1} ; 1075,3- 1036,2 cm^{-1} რომელიც შეესაბამება - $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ - ს რთული ეთერის ჯგუფს; 894,6- 896,4 cm^{-1} რომელიც შეესაბამება (R)₂- $\text{C} = \text{C}-\text{H}$ ჯგუფს;



სურ. №33 სტევია 100-ის ახლო დიაპაზონის ინფრაწითელი სპექტრი



სურ. №34 სტევია 200-ის ახლო დიაპაზონის ინფრაწითელი სპექტრი



სურ.№35 სტევია 300-ის ახლო დიაპაზონის ინფრაწითელი სპექტრი

სტევია სპექტრის კვლევის პროცესში შედარებული იქნა ჩვენს მიერ მიღებული სხვადასხვა სისუფთავის სპექტრები, რომელთა მიღებული იყო გასუფთავების სხვადასხვა ეტაპზე და იდენტიფიცირებული იქნა სიტკოს მიხედვით, როგორც შაქარზე 100, 200 და 300 ჯერ ტკბილი სპექტრი. სპექტრი სტევია 300 წარმოადგენს თეთრ დიტერპენოიდული გლიკოზიდების ჯამს, მინარევების გარეშე.

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

თავი 10. სტევიასგან მიღებული პროდუქტების ტაბლეტირება.

იმისათვის, რომ ჩვენს მიერ მიღებული სხვადასხვა სისუფთავის პრეპარატებისათვის მიგვენიჭებინა სამომხმარებლო სახე, ჩვენს მიერ შემუშავებული იქნა ტაბლეტების წარმოების სხვადასხვა ტექნოლოგია (მათ შორის შუშხუნა ტაბლეტის დასამზადებლად). ტაბლეტირებას ვახორციელებდით LFA Tablet Press ფირმის TDP-6s Desktop Tablet Press სატაბლეტე მოწყობილობით.



სურ.№36 TDP-6s Desktop Tablet Press სატაბლეტე მოწყობილობა

ტაბლეტირებისათვის აუცილებელი ხელსაწყოები და მასალები შეძენილი იქნა „ა(ა)იპ განათლების, მეცნიერებისა და ტექნოლოგიების განვითარების თს ფონდი ხვალინდელი წარმატებისთვის,, დაფინანსებული გრანტის „დაბალკალორიული ტკბილი ტაბლეტები” SIG/23/1/2015 მეშვეობით. მიღებული იქნა 0.1 გ მასის ტაბლეტები რომელთა სიტკბო 1 კოვზი შაქრის ექვივალენტურია.

დასკვნები

1. შესწავლილია საქართველოში ინტროდუცირებული 4 განსხვავებული ჯიშის სტევიას ფოთლის ქიმიური შედგენილობა. მიღებული იქნა პრეპარატი და HPLC-UV, IR და UPLC-PDA, MS მეთოდების გამოყენებით იდენტიფიცირებული იქნა 12 დიტერპენული გლიკოზიდი: აგლიკონი-[M-H +] - m/z 319, [M-H -] - m/z 317 სტევიოლი; სტევიოლ-გლუკოზიდი -[M-H -] - m/z 479; სტევიოლ-დი-გლუკოზიდი -[M-H -] - m/z 625; სტევიოლბიოზიდი -[M-H -] - m/z 641; სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდი [M-16][M-H -] - m/z 787; სტევიოზიდი-[M-H -] - m/z 803; სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდი ანუ რებაუდიოზიდი A -[M-H -] - m/z 965; სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდს ანუ რებაუდიოზიდი D -[M-H -] - m/z 1127; სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდის-მონო რამნოზიდი ანუ რებაუდიოზიდი C -[M-H -] - m/z 949; სტევიოლის გი-გლუკოზიდი ანუ რუბუსოზიდი -[M-H -] - m/z 641; სტევიოლის ტეტრა-გლუკოზიდი ანუ რებაუდიოზიდი F -[M-H -] - m/z 935; სტევიოლის ტრი-გლუკოზიდი ანუ დულკოზიდი A -[M-H -] - m/z 787.
2. 8 ფენოლური ნაერთი: 3-caffeoylquinic acid (3CQA)-[M-H-]-m/z 353; 4-caffeoylquinic acid (4CQA)-[M-H-]-m/z 353; 3,5-di-caffeoylquinic acid (3,5diCQA) -[M-H-]-m/z 515; 4,3,4-dicaffeoylquinic acid(3,4 diCQA)-[M-H-]-m/z 515; კვერცეტინის-გალაქტოზიდი -[M-H-]-m/z 463; რუთინი-[M-H-] - m/z 609; კვერცეტინ-რამნოზიდი-[M-H-]-m/z 447; კვერცეტინ-პენტოზიდი - m/z 433;
3. შესწავლილი იქნა სტევიას ფოთლისაგან მიღებული ზეთის შემადგენლობა და დააგენილი იქნა C18 კარბონმჟავების დომინანტობა, ისინი ცხიმის საერთო შემცველობის 50%-ზე მეტს შეადგენს. ზეთიდან იდენტიფიცირებული იქნა შემდეგი მჟავები: C 18-Linolenic acid (C18:2n6c), Cis-Linolic Acid (ω-6), gamma-Linolenic acid (C18:3n6) γ-cis-Linolenic acid (ω -6), α-Linolenic acid C18:3n3) α -Linolenic acid (ω -3)
4. შესწავლილია სტევიოლ-გლიკოზიდების რაოდენობრივი შემცველობა სხვადასხვა ჯიშის სტევიას ფოთლსა და მისგან წარმოებულ პრეპარატებში. დადგენილია, რომ საქართველოში გავრცელებული სტევიას (*Stevia rebaudiana*) ფოთლის ტკბილი გლიკოზიდების დომინირებადი ნაერთი სტევიოზიდი, რომელიც 6-7 %-მდე გროვდება ფოთლებში. ზრდასრული ფოთლები ტკბილ ნაერთებს მეტი რაოდენობით აგროვებენ.
5. სტევიას ფოთლებისაგან მიღებული იქნა ეთერზეთი და მის შემადგენლობაში დაფიქსირებული 65 კომპონენტიდან იდენტიფიცირებული იქნა 19. ამათგან 6 არის დომინანტური: Thymol methyl (3.891%), Silphinene (11.685%), α-Longipinene (30.730%),

Modheph-2-ene(5.757%), a-Isocomene (2.366%), E-Caryophyllen (1.694%), a-Thujene, a-Pinene, y-Terpinene, Nonanal, 1,8-eucalyptol, Perilaldehyde, Undecanal, 2.6-Dodecadien, a-Humulene, a-Sellnene, (E,E)-a-Farnes, b-Cadinene, Z-Caryophyllen.

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

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

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

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

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

გამოქვეყნებული სტატიები:

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

კონფერენციებში მონაწილეობა:

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

Batumi Shota Rustaveli State University
Faculty of Natural Sciences and Health
Department of Chemistry

Ruslan Davitadze

Biologically active ingredients of new introducing varieties of stevia.

(Submitted for the academic degree of
Doctor of Chemical Sciences
Specialty: Bioorganic Chemistry)

A N N O T A T I O N

Batumi - 2019

*The dissertation has been carried out at the Faculty of Natural Science and Health,
Department of Chemistry, Batumi State University. Shota Rustaveli,*

Scientific adviser: Aleko Kalandia

Professor, Doctor of Biological Sciences,
Batumi Shota Rustaveli State University

Foreign Reviewer: Rosana TROJA

Faculty of Natural Sciences. University of Tirana
Bulevardi ZOGI
Tirana ALBANIA
Email: rosana.trojia@fshn.edu.al, rozitroja@yahoo.com

Head of the Department of Industrial Chemistry

Cel: +355684057778

Dissertation Experts: :Rusudan Khukhunaishvili

Professor, Doctor of Biology Sciences,
Batumi Shota Rustaveli State University.

Elene Gamkrelidze

Associate Professor, Academic Doctor of Chemistry,
Department of Chemical and Environmental
Technologies, Akaki Tsereteli State University.

Nana Barbakadze

Academic Doctor of Chemistry, Scientific Worker of
Iovel Kutateladze Institute of Pharmacochemistry
at Tbilisi State Medical University

The defense of the thesis will be held on 2019 at the meeting of the dissertation council of the Faculty of Natural Sciences and Public Health of Batumi Shota Rustaveli State University.

Address: Batumi, 35 Ninoshvili Str.

The dissertation work can be found in the library of Batumi Shota Rustaveli State University, as well as on the university website - www.bsu.edu.ge.

INTRODUCTION

The relevance of the thesis.

Georgia is a small country, therefore, the effective use of the special possibilities of natural and climatic conditions for growing local or introduced plants is especially important for the country. Today, unfortunately, in many cases, the soil is not used properly. It is cultivated with plants that are not studied or not suitable for environmental conditions. Crop production (leaf, fruit, etc.) is cost-effective when studying its chemical composition using modern physico-chemical methods. The research is particularly relevant when it comes to plants containing biologically active compounds. Therefore, there should be established qualitative and quantitative content, as well as the chemical structure and biological activity of a plant. There should also be studied the optimal period of accumulation of these compounds and, accordingly, the harvest time of raw material. It is important to adapt the most optimal (chemical composition, yield and other) varieties in this region. It is necessary to develop processing technology and pay attention to monitoring of biologically active compounds during the processing and in the obtained product. Early studies have shown that the Stevia plant of South American origin is particularly effective for soil and climatic conditions of western Georgia.

Plant Stevia (*Stevia rebaudiana*) is a perennial herb 30-60 cm tall, originally from South America. There are many synonyms for *Stevia*. In the language of the Guarani - the famous tribe of American Indians, this plant is called, Ca-a jhee, Caa-a yupl, Caa-jhe-he . what can be translated as "honey grass", "sweet plant"; it has been used in traditional dishes for over 1500 years. The leaves of Stevia contain 300 times sweeter than sugar low-calorie sweeteners - diterpenoid glycosides (steviazide, rebaudioside, etc.). Stevia is a natural non-carbohydrate sweetener with unique therapeutic and recreational properties.

In addition to the sweet glycosides, Stevia leaves contain many other substances that are beneficial to the human body. Unfortunately, artificial sweeteners are most common in Georgia, and Stevia is rarely used because it is less well known. In addition, the product imported from abroad, is relatively more expensive compared to other competitors.

Agro-environmental conditions of Georgia are well suited for the adaptation of Stevia, so its first plants appeared in the 80s of the 20th century.

The objectives and goals of the research are the following: to identify and study the biologically active compounds of plants obtained from the seeds of a new breed of Stevia, as well as the chemical analysis of the leaves of plants at all stages of growth-development; to determine the optimal period of harvesting; to develop the optimal conditions for drying and processing the leaves with the maximum preservation of the content of biologically active compounds; to develop a technology for the production of bioactive natural low-calorie sweeteners; to improve the technology of food production, with the resulting sweeteners; to choose technological regimes; to breed new Stevia varieties on small trial plantations (according to known agro-methods).

Scientific novelty. For the first time in Georgia, the qualitative and quantitative content of bioactive compounds contained in the leaves of unknown varieties of introduced Stevia, was studied using HPLC-UV, RI, Conductometry UP UPLC-PDA, MS, preparative and analytical columns, various sorbents and solvents, as well as other modern physical and chemical methods. As a result of the study, there have been isolated and identified 27 compounds and their quantitative content was determined. Using various methods, including super critical high pressure fluid extraction, preparations of various sweetness were obtained, and the technology for the production of consumer tablets was developed as well.

The practical significance of the work. There has been developed a technology for the production of low-calorie, vegetable sweetener with various sweetness and biological activity; the chemical composition of the plant material and the product derived from it, has been established as well. The possibilities of obtaining and drying the superfluid extract, the technological parameters of drying, using a spray dryer, have been studied.

The preparations and sweet tablets, which are 100, 200 and 300 times sweeter than sucrose (the so-called white Stevia), have been obtained. Their chemical composition was studied using HPLC and UPLC methods and various detectors.

Object, Material and Methods of Study: The research object is the various forms of leaves of the Stevia variety (*Stevia Rebaudiana Bertoni*), introduced in western Georgia, as well as preparations and tablets obtained after processing. The homeland of Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) is South America (Argentina, Bolivia, Brazil, Paraguay). This variety of

Stevia was first described by the botanist Bertoni in 1899. Stevia belongs to the Asteracea family.

Within the framework of grant DO / 124 / 6-470 / 13 of the educational doctoral program for 2013–2014, there were acquired theseeds of various plant varieties(from Poland, Paraguay, Canada and other manufacturers), characterized by a high content of diterpene glycosides and high yield,

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

The seeds were grown indoors (the greenhouse was equipped in accordance with the grant requirements), and the experimental plot was planted with standard seedlings. The seedlings were obtained from germinated seeds (introduced varieties) and by traditional grafting (for continuous and profitable production of seedlings in the future).



Pic. 1. Standard Stevia Crop

Harvesting, storage and further study of raw material Stevia occurred in different periods of the growing season, namely 2 months, 6 months of vegetation and flowering period (ripening). Various technological modes of drying of raw materials, including natural and artificial drying processes (natural, convection, combined, etc.) have been studied.

The possibilities of drying leaves under artificial conditions were identified and selected, and the temperature and duration of drying process were optimized, what made it possible to excludee degradation changes in sweet diterpene glycosides when drying raw Stevia leaves.

The following physic-chemical methods have been used for the research:

1. the preparations of biologically active compounds have been obtained by fluid extraction of spercritical pressure;
2. the individual compounds have been obtained by preparative chromatography;
3. The sweet diterpene glycosides have been identified with high efficiency and ultra high efficiency liquid chromatograph by HPLC-UV, RI, UPLC-PDA, MS method;
4. The phenolic compounds have been allocated and identified with HPLC-UV, RI, UPLC-PDA, MS method.
5. The quantitative content of diterpene glycosides and phenolic compounds with HPLC-UV, RI, UPLC-PDA, MS chromatography method.
6. The qualitative and quantitative content of cations has been determined with HPLC-conductivity methods.
7. The antioxidant activity has been determined (using stable radicals 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine) using DPPH method.
8. The quantitative content of flavonoids was determined by a spectral method (AlCl_3 - reactivate, based on routine calculation).
9. The number of common phenols was defined by Folin-Ciocalteu method (based on gallic acid calculation);
10. Water and dry substance were determined by refractometer-method.

11. The volatilization complex was defined by the gas chromatographic method (GC Thermo).

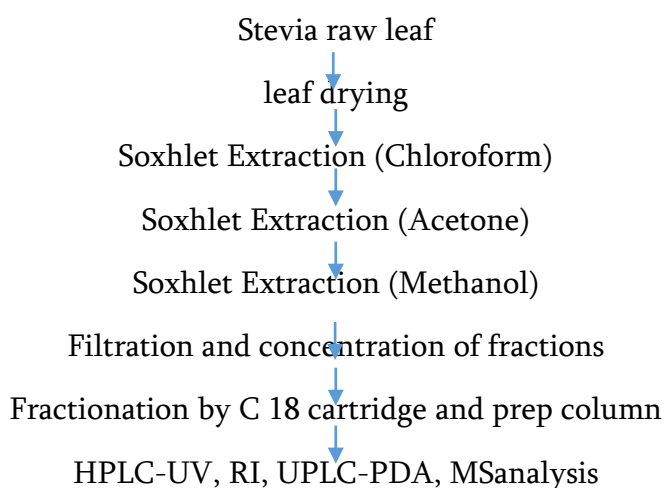
The approbation of research work. The results of the research are presented in 3 scientific articles and 5 international scientific conferences.

The volume and structure of the thesis. The dissertation consists of 118 printed pages, in accordance with the instructions of the dissertation submitted for the academic degree of Doctoral, and includes a title page and pages with signatures, resume in Georgian and English, content, a list of 96 pictures, 15 graphs, 4 scheme, 2 table, a list of references - 154 titles. The main text includes: introduction, literature review, analysis of the results, experimental part, conclusion, list of literature references and appendix.

Literature review - In the first chapter of the work deals with the Stevia plant, its bioactive compounds, sweet diterpene glycosides, the distribution of phenolic compounds in plants, their physiological activity and biological characteristics of forms of the Stevia plant, introduced to western Georgia. The dissertation is accompanied by a list of used literature references.

CHAPTER 1. Extraction and identification of Stevia's sweet diterpene glycosides

There has been used the following scheme for the extraction and identification of sweet diterpene glycosides of Stevia:



1.1. Steviol glycosides HPLC-UV, IR, UPLC-PDA, MS analysis

The compounds have been extracted using high-performance liquid chromatography method and ultraviolet refractometry index detection, while their identification has been performed

by ultra-efficient liquid chromatography UPLC and MS and PDA detectors. Substances were identified using standard compounds and the free data base <https://metlin.scripps.edu> of substance masses, as well as comparing data from peer-reviewed literary publications.

High pressure liquid chromatography (HPLC)- Waters (UV/Visible Detector 2489, Binary HPLC Pump 1525) chromatography column Symmetry C18, 3,5 μm 4,6 x 75 mm , detecting 210 nm, solvent systems: Methanol (a), water (b) (4; 1), (Merck; Sigma-Aldrich) in linear gradient. Chromatography column amide (250 mm 4,5 mm), column temperature 40°C eluent 80% acetonitrile, RI detection.

Waters Acuity UPLC-PDA, MS, column BEN HSS (100x2.1 mm 1.7 μm). mobile phase 0.1 % Formic acid in DW (A), 0.1 % Formic acid in Acetonitrile (B), gradient solvent B gradient elution from 5% B for 1.5 min to reach 15% B at 4 min, 25% B at 25 to 16 min 65% B and 100% at 18,5-19.0 %, 0% B 19.0 to 20 min . Flow 0.3 ml min⁻¹, column temp 40 °C, MS-scan 40-1200 da, Probe 600 °C, Positive 0,8 kV, Capillary 1,5 kV, CV -40, PDA scan 210-500 nm.

The calibration curve of standard diperpene glycosides is constructed with 1.0, 2.0, 3.0 mg / ml concentration of 80% ACN / aqueous solvent of stevioside and rebaudioside (Sigma-Aldrich).

In order to construct the caliber curve of the injected sample of 3 μl , there have been used peak areas, formed for an individual compound, of the UPLC-MS system.

For sustained phase extraction (SPE) of Stevia's glycosides, 1.0 g of crushed leaves, pre-treated with chloroform in Soxhlet's device according to the scheme, were extracted by heating in an ultrasonic bath for 15 minutes, the extractant 50 ml ACN / water (70 : 30 volume). The obtained extract was filtered through 0.45 μm filter. SPE cartridges were filled with C18 sorbents

CHAPTER 2. The study of composition by the UPLC mass detector method

The research, identification and quantitative analysis have been carried out using UPLC-PDA-MS method. The method allows to investigate several compounds simultaneously; at the same time the reliability of their identification is quite high. There have been established chromatographic, spectral and mass spectral characteristics of the compound.

After concentrating the extracts, obtained by different solvent by SPE method, there was carried out chromatography using an amine preparation column (NH₂, 5 μm, 250 × 10 mm).

A preparatory column was also used for chromatography (C18, 5 μm, 250 × 10 mm). There have been obtained 31 fractions. SPE cartridge was prepared (condensed) with water (1 ml) and 3 ml ACN / water (90:10); 1 ml of Stevia extract was passed through a cartridge; then Stevia glycosides were eluted with 2 ml of ACN / water (90:10). The obtained sample volume of 3 μl was injected into the LC-MS-PDA system. For hydrolysis of flavonoid glycosides, 5 mg of the preparation were dissolved in 2 ml of 2 M HCl and heated at 90 ° C for 40 minutes. In all cases, the analyzed extract was filtered through a 0.45 μm filter.

The fragmentation of compounds, as well as the change of their masses (at the expense of ions increase) and the maximum value of absorption in the UV area are very important for their identification.

The LC-MS-PDA study of diterpene glycosides allowed us to identify:
the following compounds:

Substance 1 - [M-H +] - m/z 319, [M-H -] - m/z 317, is observed on chromatogram in several places (at least 9 compounds, in accordance with all sweet diterpene glycosides), according to the compounds mass database METLIN (<https://metlin.scripps.edu>) (Appendix); the substance 1 corresponds to Aglikon Steviol and its isomer – isosteviol(C₂₀H₃₀O₃).

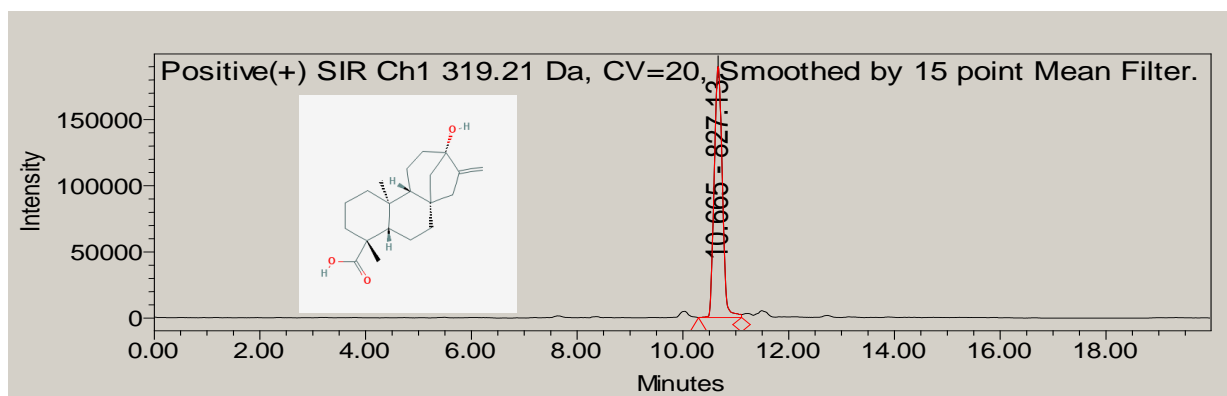


Fig. 1. Steviol UPLC-MS spectrum

Substance 2-[M-H -] - m/z 479, is observed on chromatogram -[M-H -] together with m/z 479. Retention time - 12.686 min, the maximum absorption - UV-211.9 nm. According to the compounds mass database METLIN, the substance 2 corresponds to steviol glycoside (C₂₆H₄₀O₈).

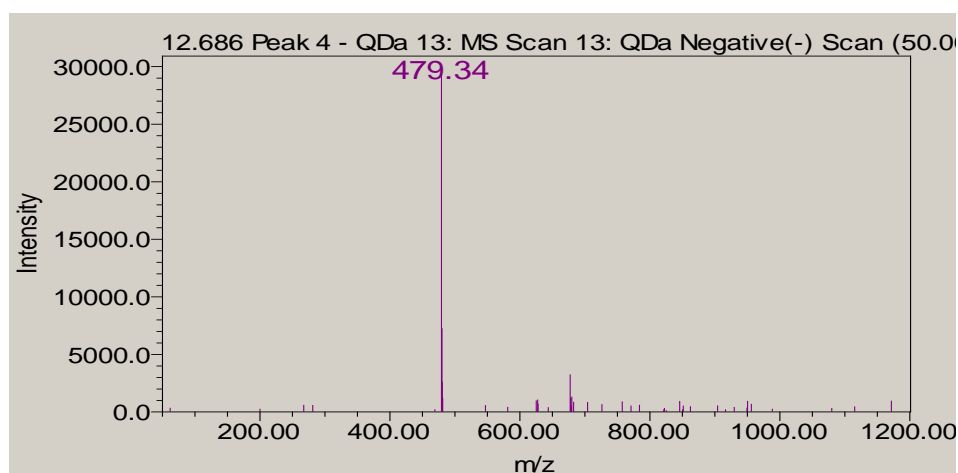


Fig. 2. Steviol glycosideUPLC-MS spectrum

Substance 3-[M-H⁻] - m/z 625, is observed on chromatogram -[M-H⁻] with m/z 787, 949. Retention time - 12.686 min, the maximum absorption - UV- 212.4 nm. According to the compounds mass database METLIN, the substance 3 corresponds to steviol diglycoside [M-16](C₃₂H₅₂O₁₄).

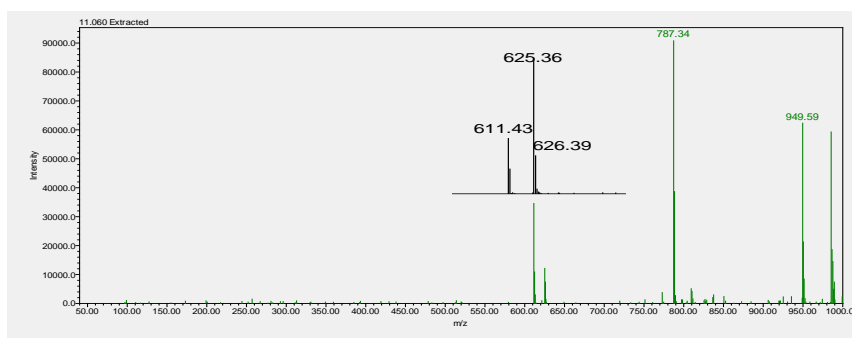


Fig. 3. steviol diglycosideUPLC-MS spectrum

Substance 4-[M-H⁻] - m/z 641, is observed on chromatogram -[M-H⁻] with m/z 803, 965. Retention time - 11.591 min, the maximum absorption - UV- 212.7 nm. According to the compounds mass database METLIN, the substance 4 corresponds to steviol bioside(C₃₂H₅₀O₁₀).

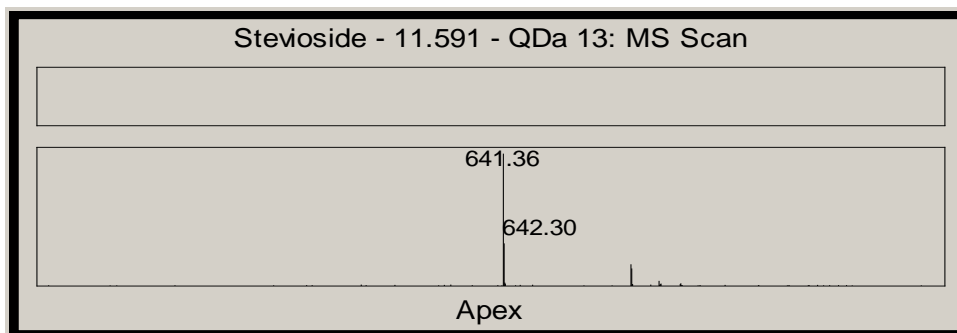


Fig. 4. Steviol bioside UPLC-MS spectrum

Substance 5-[M-H -] - m/z 787, is observed on chromatogram -[M-H -] with m/z 803, 965. Retention time - 11.867 min, the maximum absorption - UV- 212.3 nm. According to the compounds mass database METLIN, the substance 5 corresponds to steviol triglycoside ($C_{38}H_{62}O_{19}$).

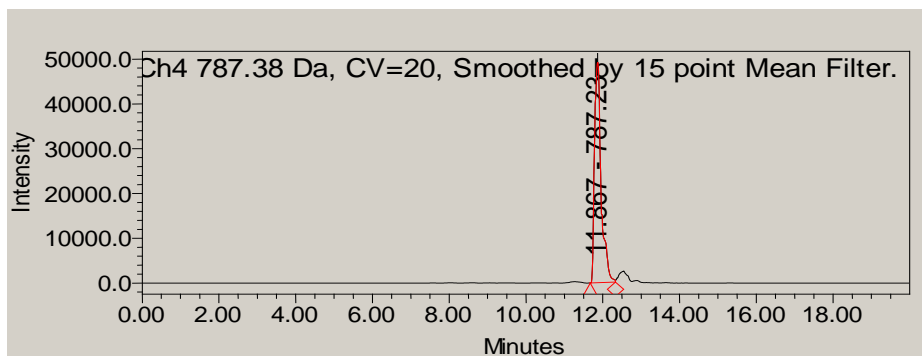


Fig. 5. Steviol triglycoside UPLC-MS spectrum

Substance 6-[M-H -] - m/z 803, is observed on chromatogram -[M-H -] with m/z, 935,949, 965 or separately. The result of MS2 fragmentation is m/z 787([M-H + -2glc] -), while the result of the subsequent cleavage of glucose molecules MS3 is m / z 317 peaks (steviol). Retention time - 10.795 min, the maximum absorption - UV- 211.9 nm. According to the compounds mass database METLIN, the substance 6 corresponds to steviol triglycoside or stevioside (stevioside $C_{38}H_{60}O_{18}$) ([M-H +] - m/z 805.4). The result of stevioside fragmentation -([M-H -] - m/z 641), while([M-H +] - m/z 643). Also m/z 803, which is usually seen when chlorine ions (negative) and potassium ions (positive) are added; ([M-H⁺ +K⁺] - m/z 841), ([M-H -Cl] - m/z 839) and [M-H⁺ -3glc] are formed respectively. The result of MS2 fragmentation from stevioside is the peak m / z 639 [M-H - -glc + K⁺], the glucose ([M-H₂O] - m/z 162). This view has been documented as well

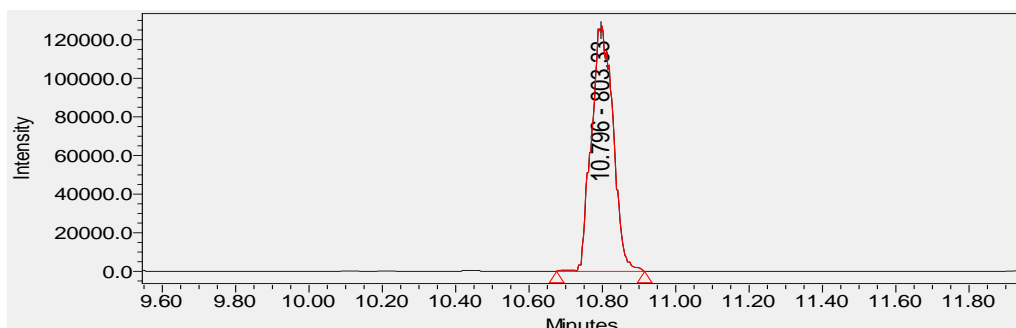


Fig. 6. Stevioside UPLC-MS spectrum

Substance 7-[M-H -] - m/z 965, is fixed on chromatogram-[M-H -] with m/z 803, 1001. Retention time - 10.798 min, the maximum absorption - UV- 212.9 nm. According to

the compounds mass database METLIN, the substance 7 corresponds to steviol tetra-glycoside or rebaudioside A ($C_{44}H_{70}O_{23}$). Rebaudioside A ($[M-H]^-$ - m/z 965, the result of fragmentation MS2 is m/z 803, peak - $[M-H]^- - \text{glc}$, - glucose ($[M-H_2O]^-$ - m/z 162) from rebaudioside A. With the following fragmentation m/z 641 ($[M-H]^- - 2\text{glc}$ -).

While rebaudioside A with the subsequent splitting of glucose molecules MS3 and MS4 is resulting into m/z 479 and m/z 317 peaks (steviol), $[M-H]^- - 3\text{glc}$ and $[M-H]^- - 4\text{glc}$ ions respectively. The addition of chlorine ions forms negative $[M-H]^- + \text{Cl}^-$ - m/z 1005, while the addition of potassium ions forms positive $[M-H]^- - \text{Cl}^-$ - m/z 1001.

During the chromatographic study of the standard rebaudioside A (Sigma-Aldrich), a few peaks are observed on the mass-spectrometer, - $[M-H]^-$ - m/z 803, - $[M-H]^-$ - m/z 965, - $[M-H]^-$ - m/z 1001, as well as at a higher (more than 20 volt) charge - $[M-H]^-$ - m/z 317 and $[M-H]^-$ - m/z 319.

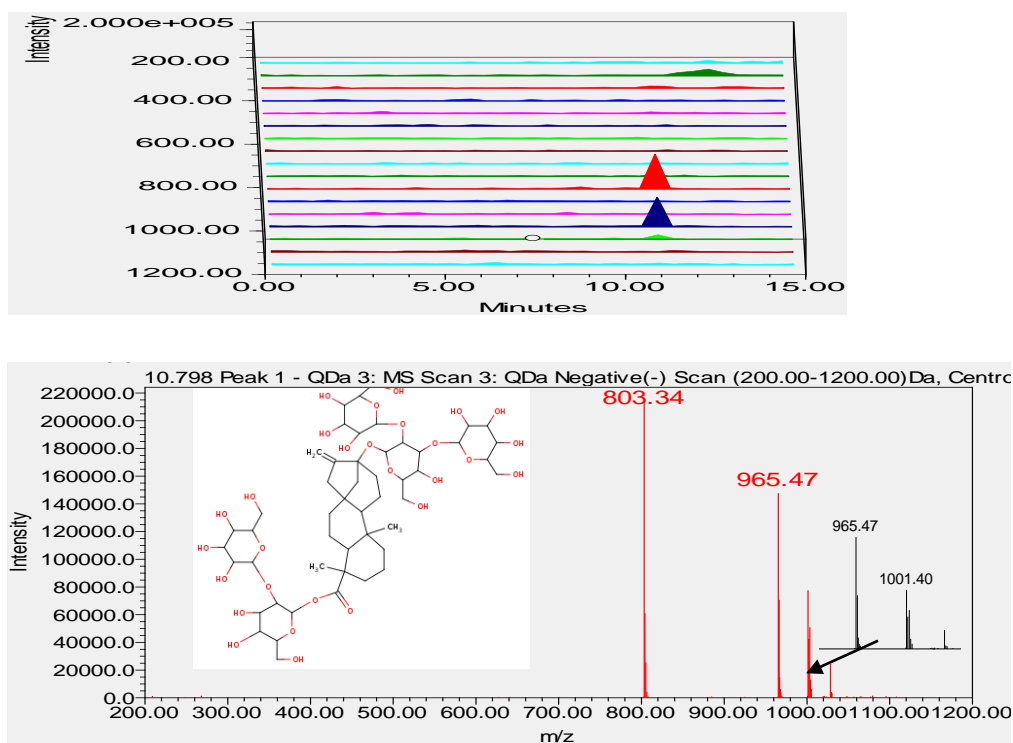


Fig. 7. Rebaudioside A UPLC-MS spectrum

Substance 8 - $[M-H]^-$ - m/z 1127, has been fixed on chromatograph - $[M-H]^-$ with m/z 803, 965. Retention time - 10.675 min, maximum absorption - UV - 211.9 nm. According to the base of METLIN compound masses, substance 8 corresponds to steviol tri-glucoside-mono rhamnoside, i.e. rebaudioside D ($C_{50}H_{80}O_{28}$).

A molecule from the Rebaudioside D (M-H₂O) - m / z 162) is a molecule that is m / z 787. As a result of [M-H+-glc] glucose cleavage ([M-H₂O] - m / z 162) from rebaudioside D, one molecule remains- m / z 787, while 2 molecules remain after glucose cleavage[M-H+-2glc] - c m / z 625. Rebaudioside D loses 2 molecules of glucose and one molecule of rhamnose([MH₂O] - m / z 146), [M-H+-2glc - rham] and in negative mode m / z 479 is received. We get chlorine ion on the compound ([M-H⁺ -Cl⁻] - m/z 1127).

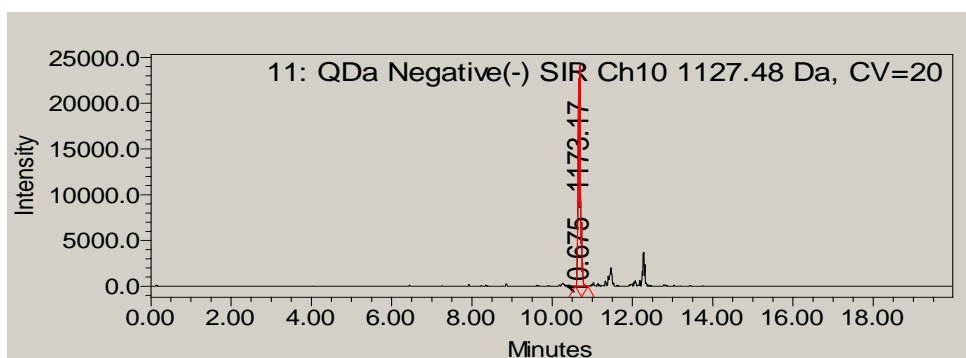


Fig. 8. RebaudiosideDUPLC-MS spectrum

Substance9-[M-H -] - m/z 949 is fixed on the chromatogram as a fragment - [M-H -] - m / z 787. Retention time - 11.880 min, maximum absorption - UV-211.9 nm. According to the base of METLIN compound masses, the substance 9 corresponds to a steviol tetra-glucoside-mono rhamnoside, ie RebaudiosideC (C₄₄H₇₀O₂₃).

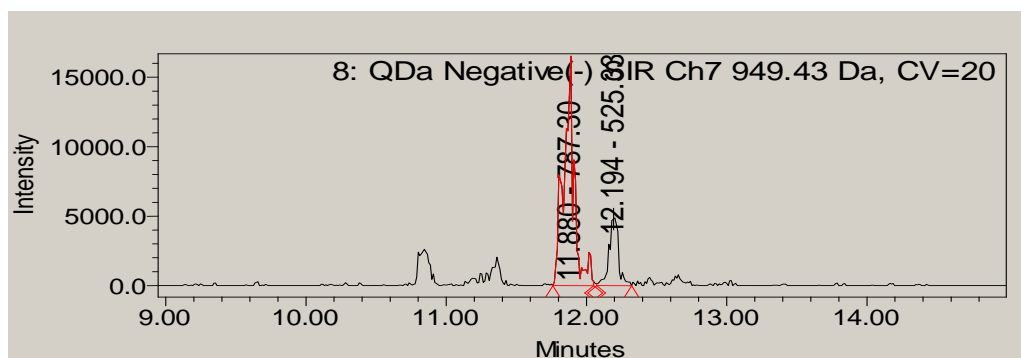


Fig. 9. RebaudiosideCUPLC-MS spectrum

Substance10-[M-H -] - m/z 641.33 is fixed on the chromatogram -[M-H -] with m/z 803, 1001. Retention time - 12.771 and 12.824min, maximum absorptionUV- 212.5nm. According to the base of METLIN compound masses, the substance 10 corresponds to a steviol di-glucoside, ie Rubusosid(C₃₂H₅₀O₁₃).

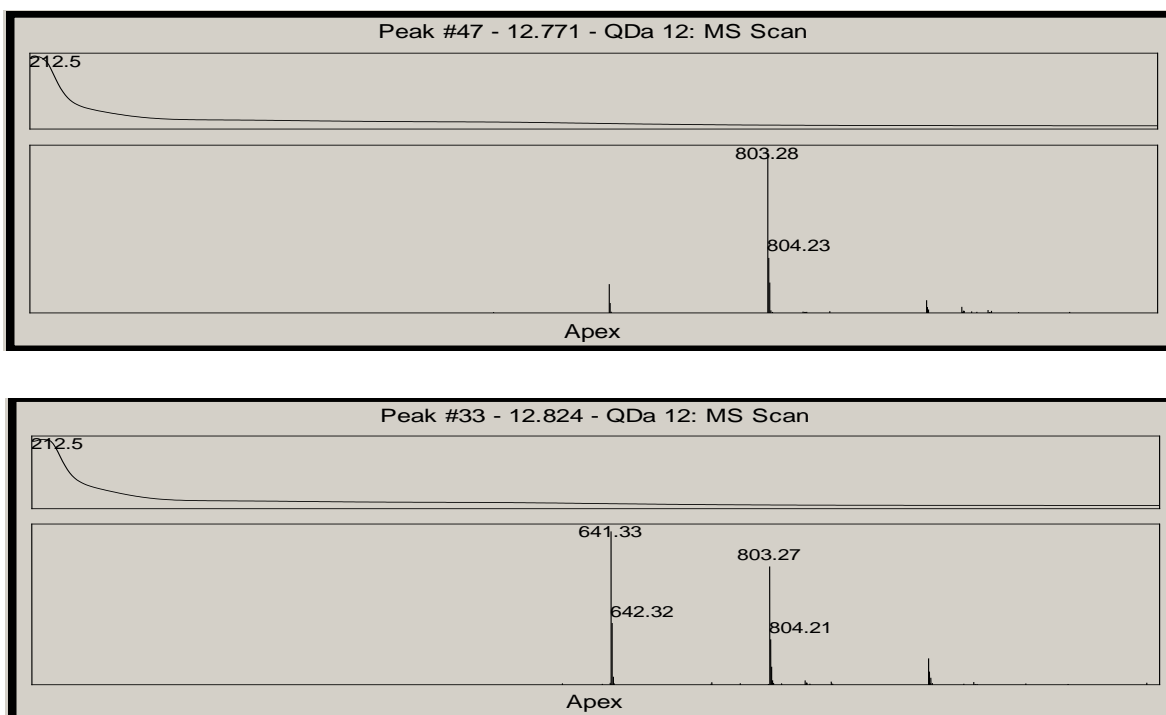


Fig. 10. Rubusosid UPLC-MS spectrum

Substance 11-[M-H -] - m/z 935 is fixed on the chromatogram-[M-H -] as a fragment m/z 773.17, as it loses 1 molecule of glucose. Retention time - 11.787 min, maximum absorption UV- 211.9 nm. According to the base of METLIN compound masses, the substance 11 corresponds to a steviol tetra-glucoside, ie rebaudioside F ($C_{43}H_{68}O_{22}$).

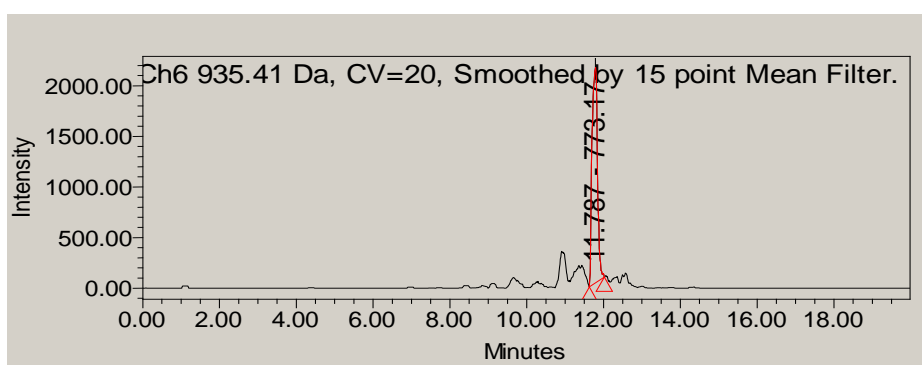


Fig. 11. Rebaudioside F UPLC-MS spectrum

Substance 12-[M-H -] - m/z 787 is fixed on the chromatogram-[M-H -] with m/z 803, 965, as a product of their fragmentation. Retention time - 11.867 min, maximum absorption UV- 212.3 nm. According to the base of METLIN compound masses, the substance 12 corresponds to a steviol tri-glucoside, ie duglucoside A ($C_{38}H_{60}O_{17}$).

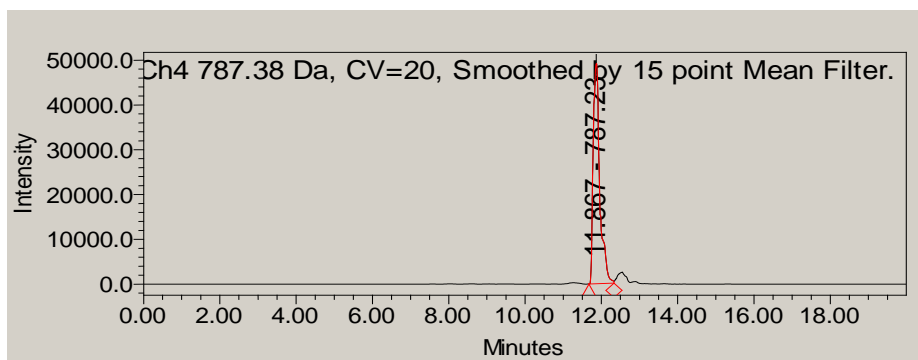


Fig. 12. Dulucoside AUPLC-MS spectrum

Some compounds fragmentation ends with m/z 479 and m/z 317 (steviol), resulting from glucose 3 and 4 respectively $[M-H+-3glc]$ and $[M-H+-4glc]$.

Table 1. UPLC-MS data of stevia terpene glycosides in negative ion mode from LC-ESI MS analysis

Comp.	Name	Molecule Formule	m/z (M-H) ⁻	m/z (M-H) ⁺
1	Steviol	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.24	319.21
2	Steviol-GLC	C ₂₆ H ₄₀ O ₈	479.12	481.2
3	Steviol -2GLC [M-16]	C ₃₂ H ₄₉ O ₁₃	625.13	627.12
4	Steviol -2GLC	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	641.33	643.21
5	Steviol -3GLC Deoxiglukoside [M-16]	C ₃₈ H ₅₉ O ₁₈	787.17	789.13
6	Steviolbioside	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	641.34	643.33
7	Stevioside Steviol -3GLC	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	803.31	805.37
8	Rebaudioside A Steviol-4GLC	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	965.52	967.42
9	Rebaudioside C	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	949.46	951.42
10	Rebaudioside D	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	1127.47	1129.47
11	Rebaudioside F	C ₄₃ H ₆₉ O ₂₃	935.41	937.4235
12	Dulcoside A	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	787.38	789.3758

CHAPTER 3. Study of Stevia leaf phenolic compounds with high performance liquid chromatography HPLC and UPLC method

The following phenolic compounds have been identified in the composition of Stevia leaf and its extract:

Substance 13-[M-H⁻] - m/z 353, the result of fragmentation is m/z 191 peak. Retention time - 5.151 min, maximum absorption - UV-324.9 nm. According to the base of METLIN compound masses, the substance 13 corresponds to Chlorogenic acids Mono-caffeoylquinicacids (mono-CQA).

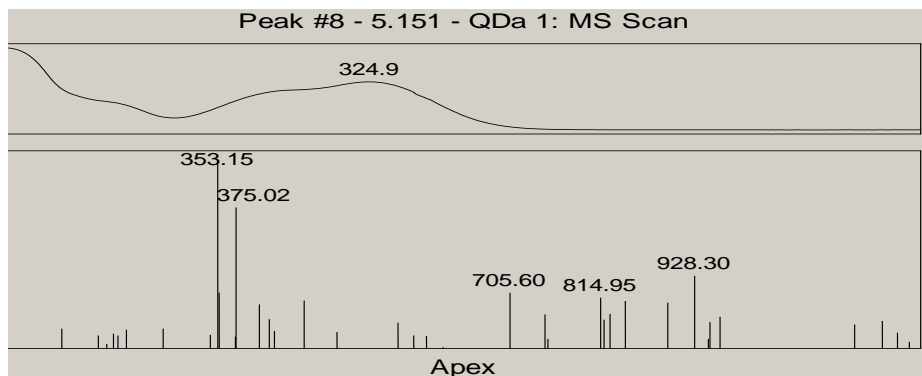


Fig. 13. Mono-caffeoylquinicacidsUPLC-MS spectrum

Substance 14-[M-H⁻] - m/z 353, the result of fragmentation is m/z 191 and m/z 173 peaks. Retention time - 5.151 min, maximum absorption - UV-324.9 nm. According to the base of METLIN compound masses, the substance 14 corresponds to caffeoylquinicacids (CQAs).

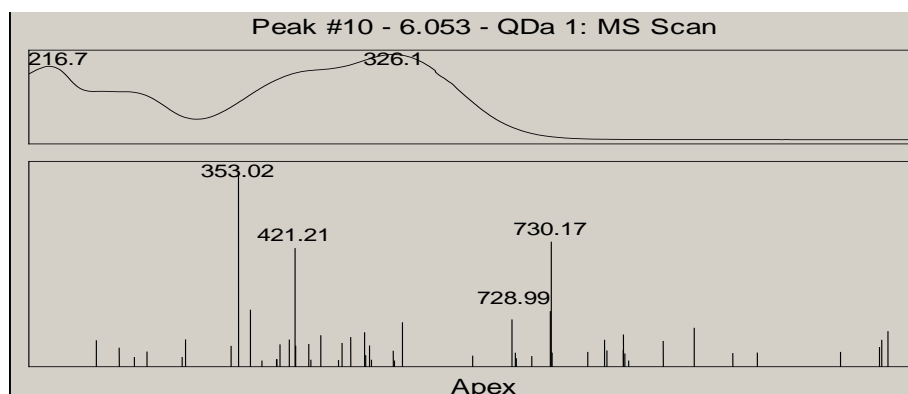


Fig. 14. caffeoylquinicacidsUPLC-MS spectrum

Substance 15-[M-H⁻] - m/z 515, the result of fragmentation - m/z 353. Retention time - 5.151 min, maximum absorption - UV-324.9 nm. According to the base of METLIN compound masses, the substance 15 corresponds to 3,5-Dicaffeoylquinicacid (3,5diCQA).

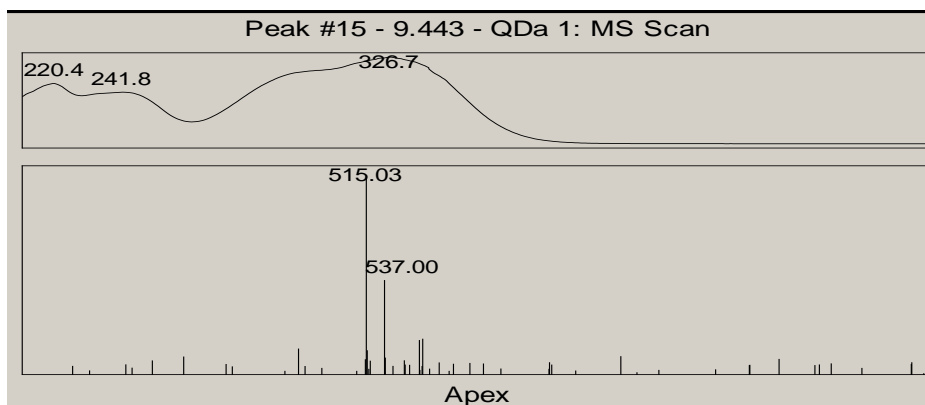


Fig. 15. 3-5- Dicafeoylquinic acid UPLC-MS spectrum

Substance16 $[-M-H^-]$ - m/z 515, the result of fragmentation is m/z 353. Retention time - 10.146min, maximum absorption - UV-327.3 nm. According to the base of METLIN compound masses, the substance 16 corresponds to 3,4- Dicafeoylquinic acid (3,4diCQA)

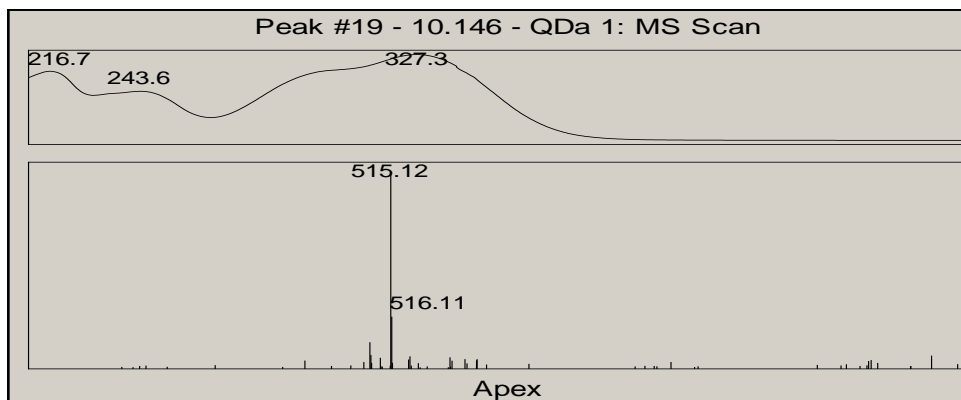


Fig. 16. 3,4- Dicafeoylquinic acid UPLC-MS spectrum

Substance17 $[-M-H^-]$ - m/z 463, the result of fragmentation is m/z 301. Retention time - 9.051 min, maximum absorption - UV-344 nm. According to the base of METLIN compound masses, the substance 17 corresponds to quercetin-galactoside.

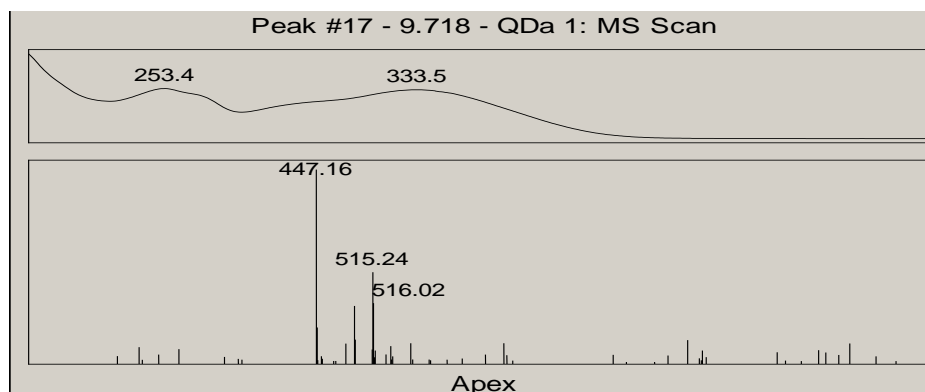


Fig. 17. Quercetin-galactoside UPLC-MS spectrum

Substance18-[M-H⁻] - m/z 609, the result of fragmentation is m/z 301. Retention time -9.051 min, maximum absorption - UV-344 nm. According to the base of standard compounds and METLIN compounds masses,as well as compared to the standard compound,the substance 17 corresponds to Rutin.

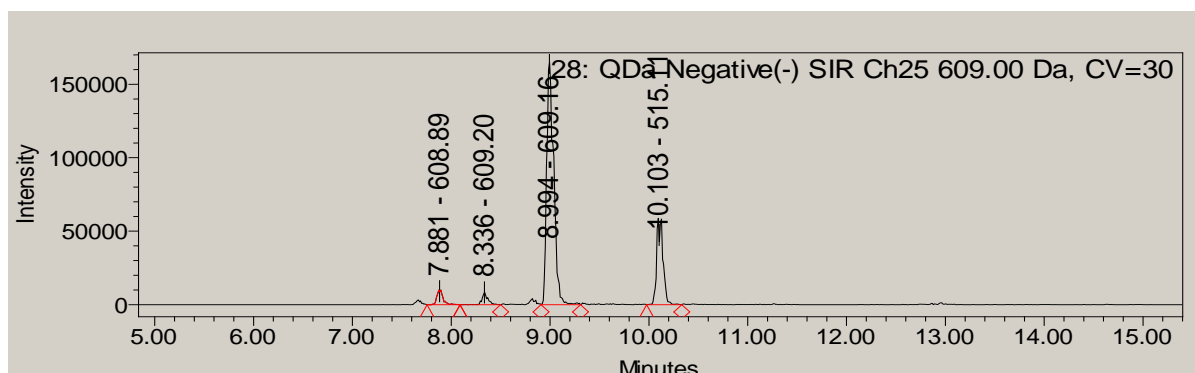
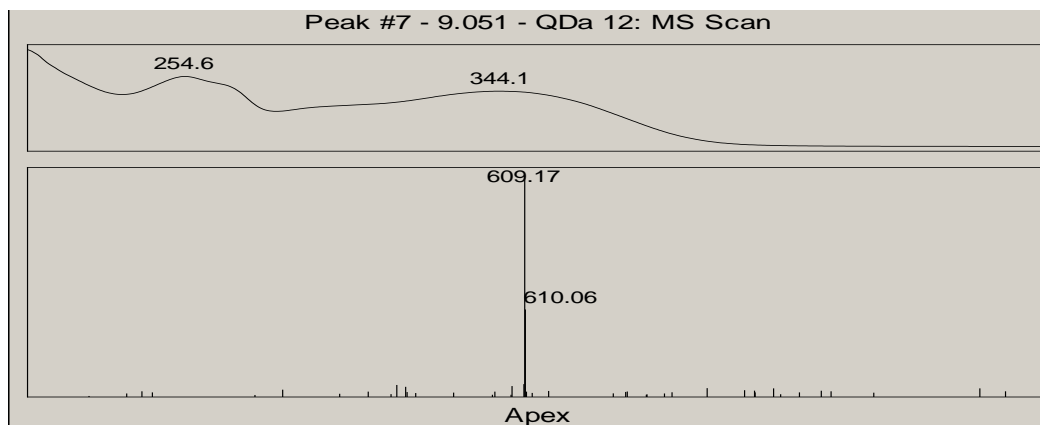


Fig. 18. RutinUPLC-MS spectrum

Substance19-[M-H⁻] - m/z 447, the result of fragmentation is m/z 301. Retention time - 9.955 (in MS, PDA) min, maximum absorption - UV-360 nm. According to the base of standard compounds and METLIN compounds masses,the substance 19 corresponds to quercetin-rhamnoside.

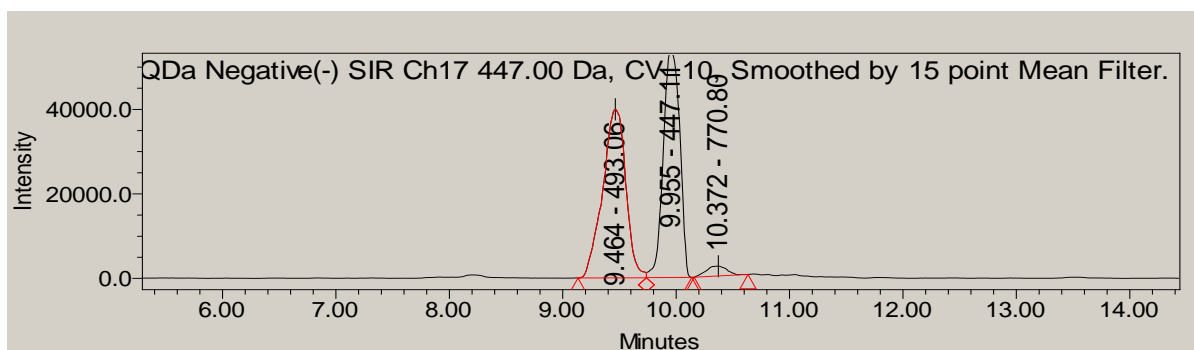


Fig. 19. Quercetin- rhamnosideUPLC-MS spectrum

Substance20-[M-H -] - m/z 433, the result of fragmentation is m/z 301. Retention time - 9.605 min, maximum absorption - UV-360 nm. According to the base of standard compounds and METLIN compounds masses, the substance 20 corresponds to quercetin- pentoside.

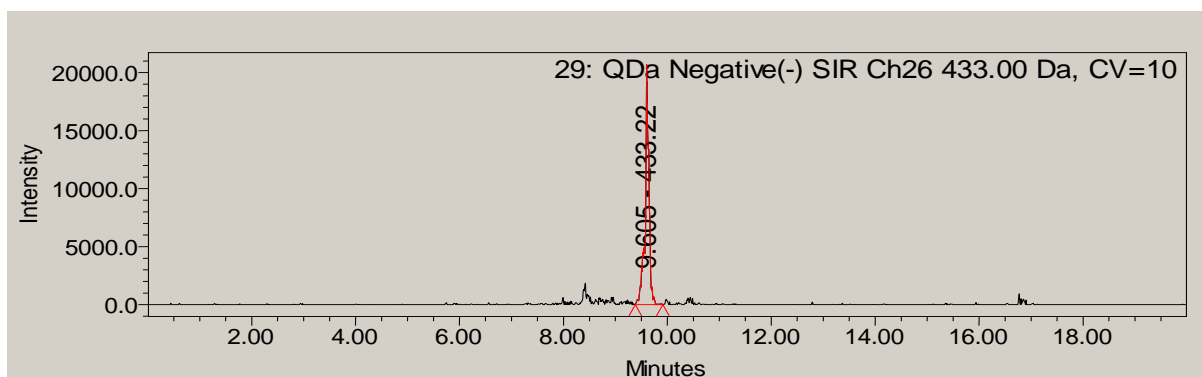


Fig. 20. Quercetin- pentosideUPLC-MS spectrum

Table 2.UPLC-MS data of stevia phenolic compounds in negative ion mode from LC-ESI MS analysis

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

**CHAPTER 4. The content of steviol glycosides in various raw materials
and the preparations obtained from them**

A quantitative study of steviol glycosides has been performed on the basis of calibration curves, constructed using standard stevioside and rebaudioside. Individually extracted ionic SIR 803 (rebaudioside) and SIR 641 (stevioside) chromatographic characteristics have been used for the curve construction. Calculations of other sweet glycosides were made with respect to stevioside.

For the quantitative analysis of sweet diterpene glycosides, the acquired varieties were compared with the local (spontaneous) forms. In *Stevia* leaves, stevioside is the dominant in all cases: America № 3 - 11.03%, America № 4 - 12.34%, local spontaneous variety side leaf - 10.24%, main spontaneous leaf - 11.41%. By quantitative indicators, stevioside prevails over the content of other glycosides. In any case, their content is up to 55-60% of the total content of sweet diterpene glycosides. The content of rebaudioside A, respectively, is relatively less (30-38%), the rest are minor compounds, among which there is a relatively large amount of rebaudioside C (from 5.4 to 8.2%). It is noteworthy that the central leaves of the plant, compared with the side leaves, contain a relatively small amount of sweet compounds (10.2 g / 100 g and 11.4 g / 100 g, respectively).

Table 3. The content of sweet diterpene glycosides in the leaves of *Stevia* (per mg / 100 g dry weight)

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

Table 4. The content of sweet diterpene glycosides in the extracts of *Stevia* leaves (mg/l)

Sampler	m/z 641	m/z 803	Total
initial extract	3819±114.6	3016±90.5	6935±208.1
Filtrate 2000 Dal	4217±126.5	3062±91.9	7279±218.4
Concentrate 2000 Dal	3764±112.9	2927±87.8	6691±200.7

Filtrate 1000 Dal	4540±136.2	3030±90.9	7570±227.1
Concentrate 1000 Dal	3660±109.8	2823±84.7	6483±194.5

Table 5. The content of sweet diterpene glycosides in SFE extracts of Stevia leaves (mg /50 ml)

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

Some changes were observed during the refining of the Stevia leaf extract. Distillation of the extract in the filter 2000 Dal leads to an increase in sweet diterpene glycosides; respectively, their content decreases in the concentrate (from 6935 mg / l to 6691 mg / l), and increases in the filtrate (7279 mg / l). The corresponding changes occur in the pore filter 1000 Dal: in the filtrate it increases (7570 mg / l), and in the concentrate it decreases (6483 mg / l). Due to the modification of membrane pores, it becomes possible to refine the extract of Stevia.

SFE extraction of Stevia leaves into cosolvent, using ethanol, allows to obtain preparations with a high content of stevioside and rebaudioside (76 mg / 50 ml).

CHAPTER 5. Stevia Lipid Analysis

10 g of a dry leaf of Stevia was extracted with chloroform in a Soxhlet apparatus until complete removal of pigments and other lipid compounds (8 hours). The solvent was evaporated under vacuum and the total amount of lipids was measured gravimetrically.

For methyl ester, the lipid extract was dissolved in 10 ml of chloroform. The obtained from the extract 1 ml of the substance was added by 200 µl of methyl potassium hydroxide solution (2 Molars) and 1 g of sodium hydrofluoride monohydrate (NaHSO₄), which resulted in the GC-analysis of the obtained Stevia methyl esters of lipids.

The studied sample was filtered from mechanical impurities. 1 ml of the filtered sample was transferred to a centrifuge tube by adding 0.5 ml of 2 normal 96% KOH alcohol (ethanol can be used). Then 10 ml of hexane (total volume 11.5 ml) was added, agitated until complete dissolution (at least 30 seconds) and centrifuged for 10 minutes at 1000 revolutions / min. Then from the upper organic fraction of the sample was taken 1 µl and injected into the chromatograph with an injector. Chromatography was performed with a temperature gradient in three stages. In particular, chromatography began at 140 ° C and lasted 4 minutes. In the second stage, at a speed of 20 ° C / min, the temperature increased to 220 ° C and the chromatography was carried out for 16 minutes. At the third stage, at a speed of 7 ° C / min and a temperature of up to 300 ° C, chromatography continued for 7 minutes. The total chromatography time was 42.43 minutes. The quantitative content of carbon dioxide was determined by the peak area in percent with an accuracy of 0.01%.

Identification of components obtained, using chromatographs, was carried out by comparison with the data of a sample of known content, as well as on the basis of literature data. The results of the analysis are shown in Table 1.

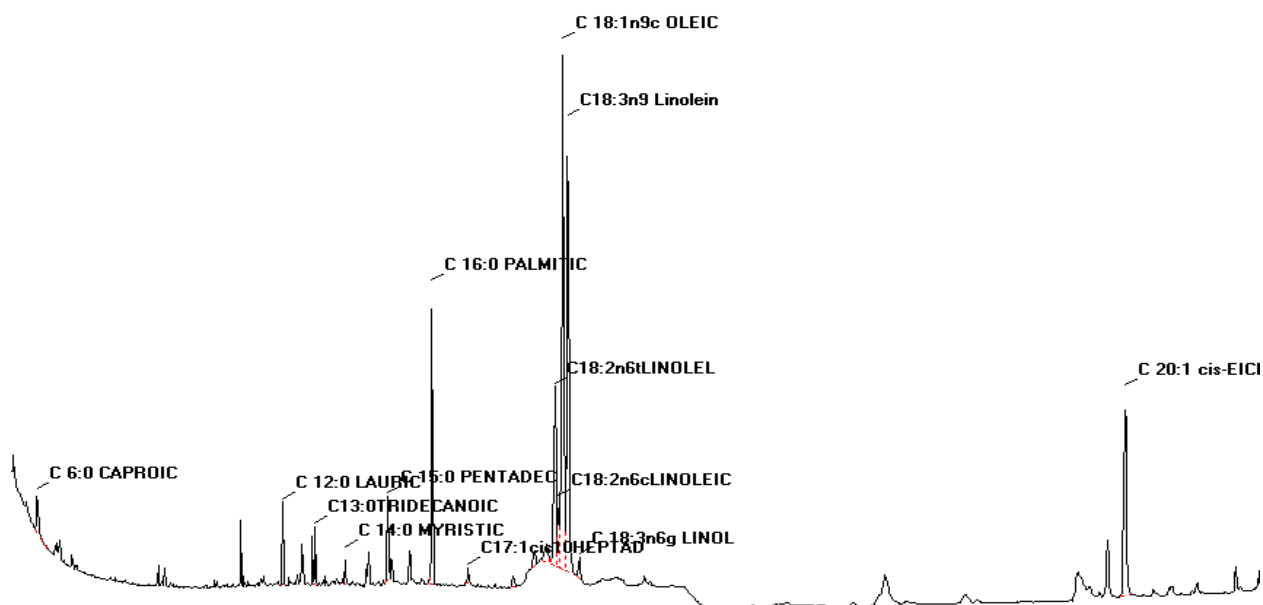


Fig. 21GC Chromatogramstevia lypides

TableN°6. Component composition of carbonic acid

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

Chromatographic research has demonstrated that the oil, obtained from Stevia leaves, contains C 16, C17, C18 and C20 with dominant C 18 carboxylic acid, which contains 37,425% of total fat content.

**CHAPTER 6. Study of antioxidant activity of Stevia leaf and its derivative products
using DPPH method**

Stevia rebaudiana extract has antioxidant activity, which is caused by a complex of phenolic compounds. Among the different varieties of introduced plants, the most active one is an extract obtained from the leaves of plants introduced from Paraguay, 0.341 mg of which can produce 0.01 mM DPPH 50% inhibition. Local spontaneous populations are less active. The second extract (20% alcohol extract) is almost in all cases active and can inhibit about 0.1 mg. The antioxidant activity of Stevia significantly varies during processing. The main difference is based on the level of extract refining. A preparation, which is 100 times sweeter than sucrose, is especially active (only 0.015 mg can be inhibited); this indicator is reduced by almost 7 times in the preparation which is 200 times sweeter (0.107 mg), and a completely refined preparation (300 times sweeter) significantly (45 times) loses its antioxidant activity.

Table No 7. Antioxidant activity of Stevia leaves and products

Sampler name	IC50 mg of sample	Antioxidant activity
# 3. Stevia Rebaudiana Bertoni, South America I extract	0.364	27±0.8
#4. Stevia Rebaudiana Bertoni, from Paraguay I extract	0.341	27±0.8
Stevia of Introduced in Georgia outer leaves I extract	0.460	40±1.2
Stevia of Introduced in Georgia internal leaves I extract	0.454	40±1.2
# 3. Stevia Rebaudiana Bertoni, South America II extract	0.102	12±0.4
#4. Stevia Rebaudiana Bertoni, from Paraguay II extract	0.100	14±0.4
Stevia of Introduced in Georgia outer leaves II extract	0.116	27±0.8
Stevia of Introduced in Georgia internal leaves II extract	0.115	28±0.8
Stevia powder Sweeter than 100 times sugar	0.015	442±13.3
Stevia powder Sweeter than 200 times sugar	0.107	91±2.7

Stevia powder Sweeter than 300 times sugar	0.698	17±0.5
Filtrate 2000 dalton in membrane filter	0.045	134±4.0
Filtrate 1000 dalton in membrane filter	0.085	87±2.6
Concentrate 1000 dalton in membrane filter	0.075	77±2.3

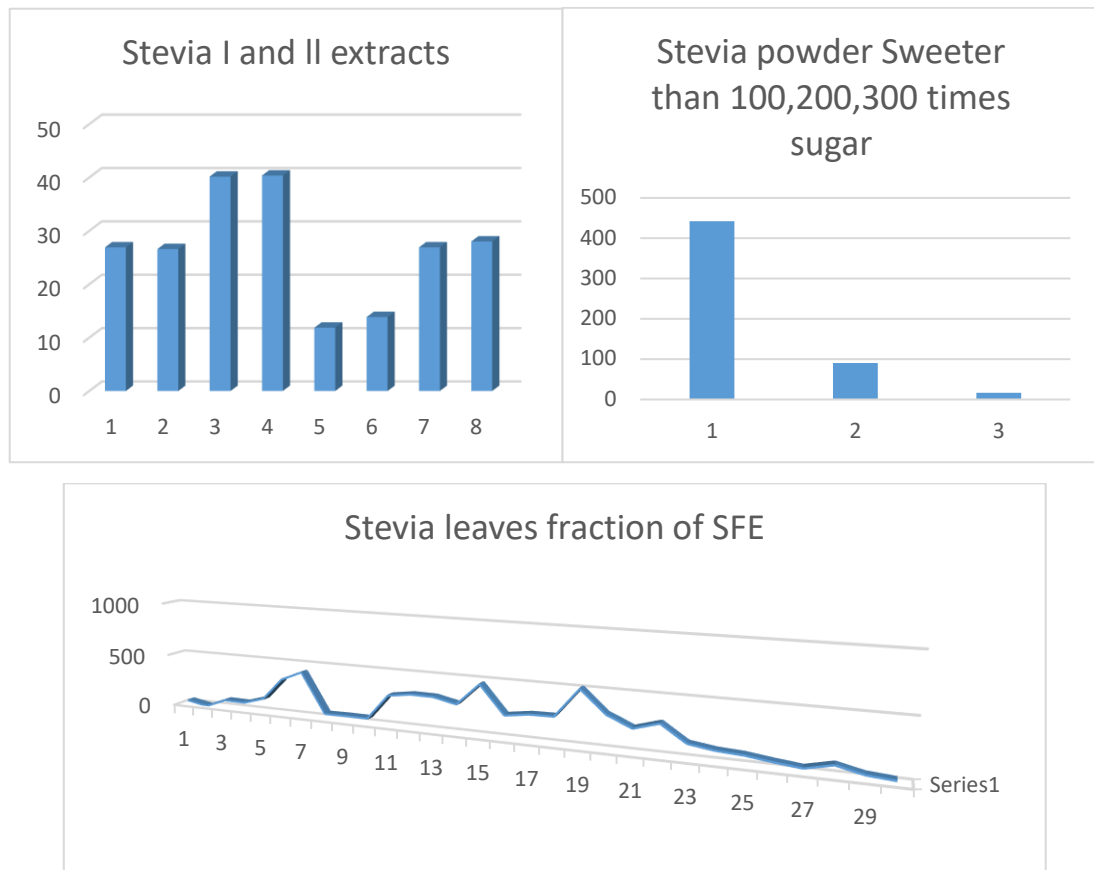


Fig. 21. The percent inhibition of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical with different extracts of Stevia leaves

Stevia leaves are becoming more promising, not only due to the use in the production of virtually calorie-free sweeteners, but also because of its high antioxidant activity.

CHAPTER 6. Stevia leaf SFE (Supercritical Fluid Extraction)

The processing of Stevia's pre-dried leaf was carried out by fluid (inert gases-carbon dioxide and co-solvent-ethanol) extraction of supercritical pressure (Waters SFE -100-2-C10).

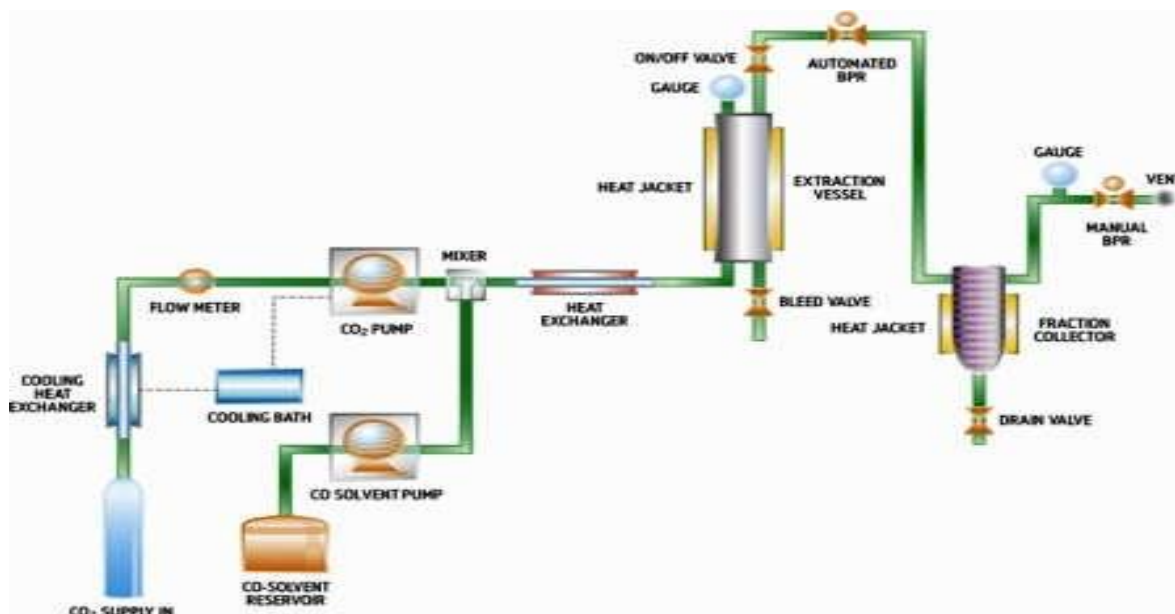


Fig. 22. General view of SFE 500 equipment.

The apparatus consists of the following main components: carbon dioxide reservoir, solvent (pH) pump, co-solvent pump, co-solvent reservoir, mixer, extractor, evaporator-cyclone and other controlling equipment which is managed by a computer.

Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Stevia leaf. There have been selected two methods of Fluid Extraction. The first extraction method was used to produce diterphenoidal glycosides from Stevia leaves, while the purpose of the second method is the removal of the obstructive substances (including colored ones) from the Stevia leaves, what allows us to obtain the total preparation of diterphenoidal glycosides by hot extraction of leaves (ethyl alcohol / water mixture). 31 fractions have been obtained from 10 grams of green dried Stevia leaf, extracted by the SFE method.

The mode of conducting the SFE method consisted of four stages; the following fractions were obtained:

First stage -extraction by carbonate dioxide of supercritical pressure;

Fraction 1 -30 min, 500 bar at 40°C at speed of carbon dioxide 20 g / min;

Fraction 2 - 20 min, 500 bar at 60°C at speed of carbon dioxide 20 g / min;

Fraction 3 -20 min, 500 bar at 80°C at speed of carbon dioxide 20 g / min;

At the second stage, there was added 5% co-solvent (96% ethanol)

Fractions 4-7-350 bar at 60°C at speed of carbon dioxide 20 g / min;

Third stage -10% co-solvent was added (96% ethanol)

Fractions 8-16- 350 bar at 60°C at speed of carbon dioxide 20 g / min;

Fourth stage - 5% co-solvent was added (50% ethanol/water)

Fractions 16-24-350 bar at 60°C at speed of carbon dioxide 20 g / min;

Fifth stage - 5% co-solvent was added (96% ethanol/water);

Fractions 24-31- 350 bar at 60°C at speed of carbon dioxide 20 g / min.

The equipment is depicted in Fig. 23, while the first stage is graphically illustrated in Fig. 2,3

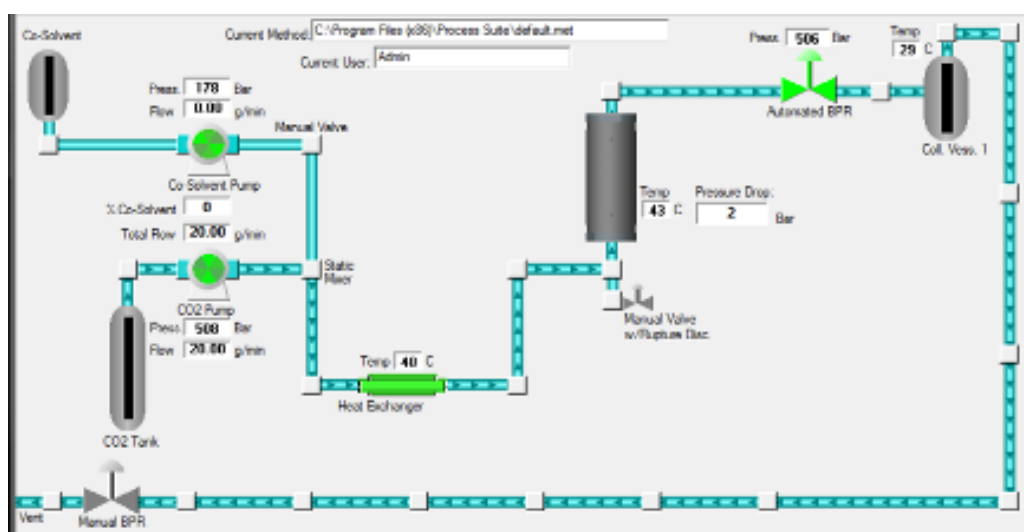


Fig. 23 Processing Scheme



Fig24. SFE Preparat in the recycler

At the first stage of Stevia leaf processing through SFE method, soluble lipophilic compounds were extracted in organic solvents. Therefore, naturally, chlorophyll A and B (37.54-1.96 mg / g, 24.16-0.427 mg / g respectively) and carotene 19.1-1.0 mg / g prevail in fractions 1-8. The extraction of phenol carbonate acids, catechins and flavonoids (1-8 Fractions -150-7.6 mg / g respectively) was carried out at the water flow in the leaf.

There are almost no pigments in fraction 8. The amount of pigments after the addition of co-solvent to the fractions (31- 9) is in the form of a trace, while in fractions 17- 19 it exceeds 3 mg / g. The number of all phenolic compounds increases from fraction 17. The exception is phenolcarbonate acid, which content varies without any regularity. This can be explained by various compounds of organic solvents in different solutions of phenol carbonate acid. The extract is rich in dry substances in fractions 1-8. It varies from 7.75% to 0.27%. Their content reduces in fractions 9 - 15 and, therefore, the number of analyzed substances also decreases. The content of extracted substances, as well as catechins, phenol carbonate acids and common flavonoids increases in fractions 16-20. The composition of extracted compounds gradually decreases in fractions 21-31, while the total number of individual components of phenolic natural compounds is preserved.

The sweet terpenoidal glycoside was obtained from the analyzed fractions 20-29 (total amount of steviosides and rebaudiosides 12000- 7000 ppm respectively)(Fig. 5). However, its amount is 500 ppm in fraction 31. As a final product, two preparations (sweeter than sugar in 100 times and 300 times respectively) were obtained. The total amount of steviosides and rebaudiosides in them was 29% and 93 % respectively.

The total glycosides have been identified and quantified in the same fractions (20,29) and the both preparations by UPLC-PDA method.

The antioxidant activity of the obtained fractions and preparations was determined, which increases with the total growth of phenolic compounds of different types (fractions 8-23) (Table 8).

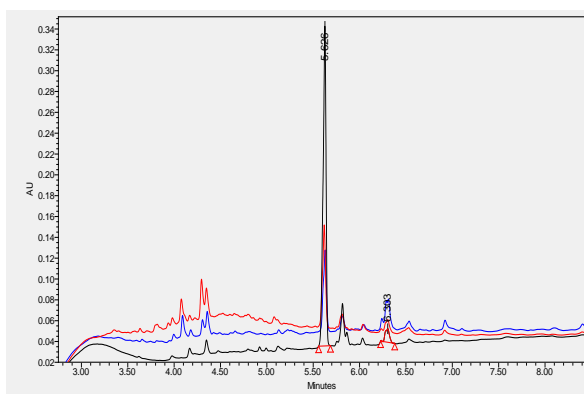


Fig. 25. stevia 100,300 UPLC-PDA -214 nm

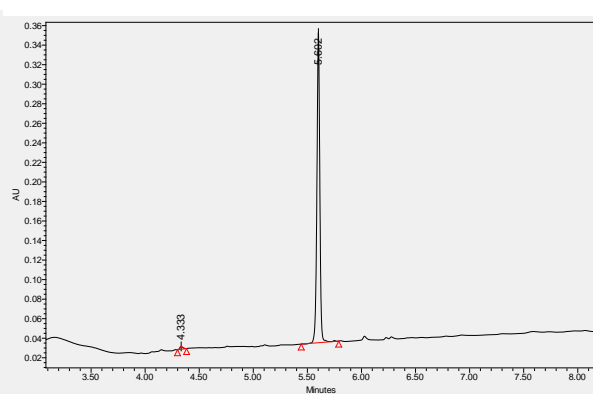


Fig. 26 Rebaudioside A UPLC-PDA -214 nm

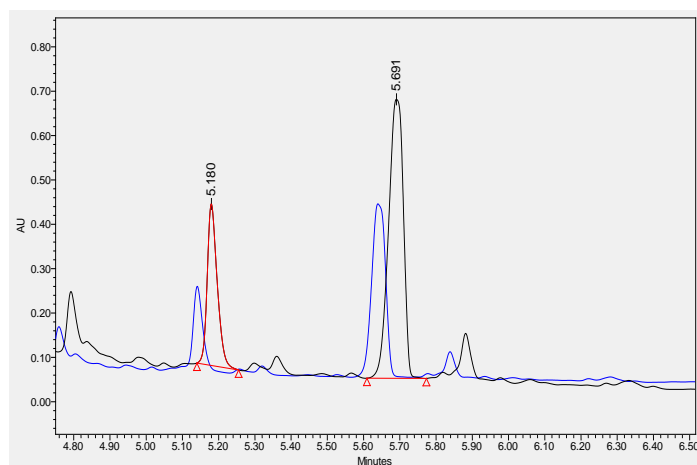


Fig. 27. stevia fraction 20, 29 UPLC-PDA -214 nm

Table 8 Sweet diterpene glycoside in SFE fractions

	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	rebaudioside A +stevioside	5.602	594316	99.04	317392	2000±60	ppm
2	Fraction 29	5.640	1052679	76.29	388070	7084,98±212	ppm
3	Fraction 20	5.640	1789435	71.92	388070	12043,66±361	ppm
4	Stavia 100	5.619	225691	77.26	98311	29,00±0.9	%
5	Stevia 300	5.626	688461	94.38	306916	93,64±2.8	%

Using the SFE method, we have fractionated the components of Stevia leaf and identified chlorophyll A and B, common carotenes, common flavonoids, catechins and phenol carbonate acids for each fraction. Two preparations, containing different quality of sweetness, have been obtained; the quantitative content of glycosides in them was determined as well. The antioxidant activity has been established both for fractions and preparations.

CHAPTER 7. Study of Stevia leaves cations with a chromatograph using a conductometric detector

Some of the cations of Stevia leaf and its preparations have been analyzed by the chromatographic method, using conductometric detector.

Standards lithium hydroxide monohydrate (Li^+), sodium chloride (Na^+), ammonium chloride (NH_4^+), potassium chloride (K^+), magnesium hydrate (Mg^{2+}), calcium nitrate tetrahydrate (Ca^{2+}), strontium nitrate tetrahydrate (dihydrate sodium barium + sodium (Sr^{2+}), barium chloride dihydrate (Ba^{2+}) (Fisher Scientific, EDTA (Serva). Isocratic HPLC pump- Waters 1515), IC-Pak Cation MD chromatographic column, eluent 3 mM HNO_3 / 0.1 mM EDTA, eluent conductivity $1250 \pm 50 \mu\text{s}$, basic sensitivity 2000 μs , integrator sensitivity 0.01 μs , column temperature 350°C , polarity-negative. The total amount of the main cations of stevia leaves is about 5%. The preparation obtained from stevia naturally contains water-soluble cations, which are 100 times higher than the sugar content and make up a little more than 5%. Subsequent refining of the drug in the first stage causes a sharp increase in the number of cations; in the preparation, which is 200 times sweeter than sugar, there are more than 8%. And in the preparation of Stevia, which is 300 times sweeter than sugar, the total cation content is up to 0.3%.

Table 9. The content of cations in stevia leaves and preparations

Amaunt PPM	Na^+	NH_4^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	total mass %
Stevia central leaves	895,2 \pm 27	2431,6 \pm 73	46139,6 \pm 1384	1276,4 \pm 38	1485,5 \pm 45	5,227 \pm 0.2
Stevia Side leaves	928,0 \pm 28	2441,6 \pm 73	42795,1 \pm 1283	1845,0 \pm 55	2520,5 \pm 76	5,059 \pm 0.2
Stevia America 4	447,8 \pm 13	158,9 \pm 4.8	23169,0 \pm 695	675,2 \pm 20	612,2 \pm 18	2,506 \pm 0.1
Stevia America3	579,4 \pm 17	784,3 \pm 23	25914,7 \pm 777	1961,6 \pm 59	2371,5 \pm 71	3,161 \pm 0.1
Stevia 100	1261,6 \pm 38	1414,9 \pm 42	39163,7 \pm 1174	4413,7 \pm 132	5189,4 \pm 156	5,147 \pm 0.2
Stevia200	967,8 \pm 29	3413,7 \pm 102	75024,5 \pm 2250	939,4 \pm 28	234,5 \pm 7.0	8,058 \pm 0.2
Stevia300	1335,1 \pm 40	126,8 \pm 3.8	1210,3 \pm 36.3	0,0	382,0 \pm 12	0,305 \pm 0.01

Stevia leaf collects potassium ions in particularly large quantities. Their content is 80% more than that of all cations. It is interesting that at a certain stage of purification of the drug, there can be observed the concentration of potassium ions. The resulting preparation is of particular interest because of the high content of potassium.

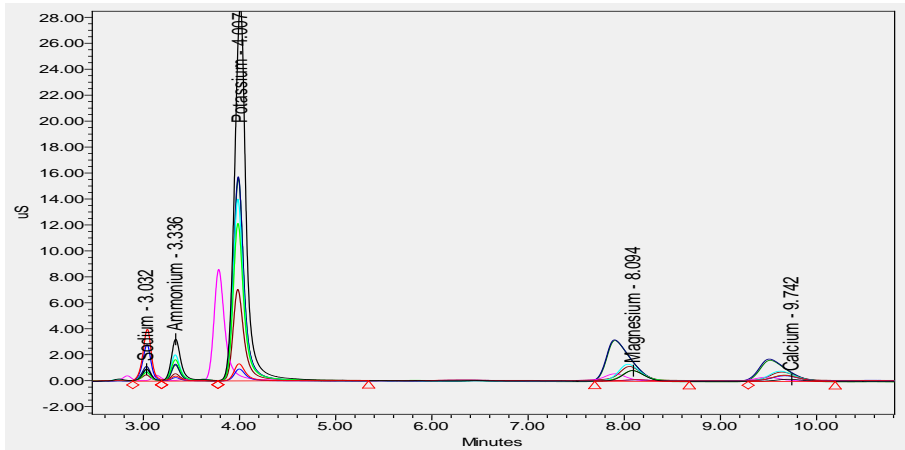


Fig. 28 Chromatograms of Stevia leaves and preparations

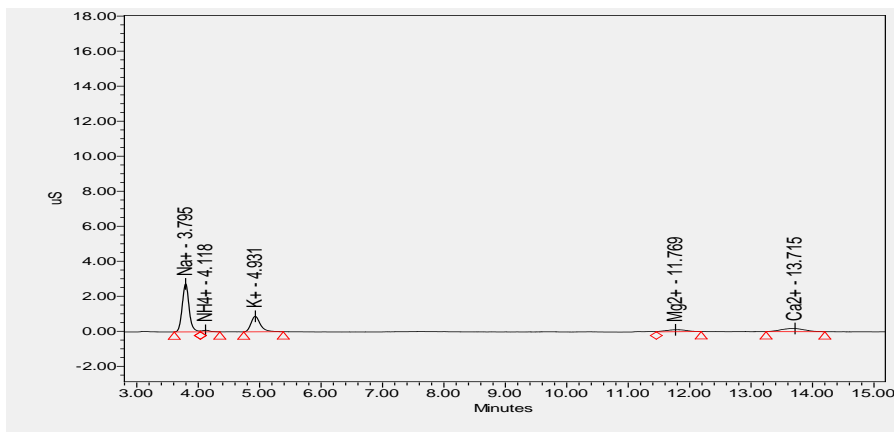


Fig. 29 Chromatogram of the drug, which is 300 times sweeter than sugar

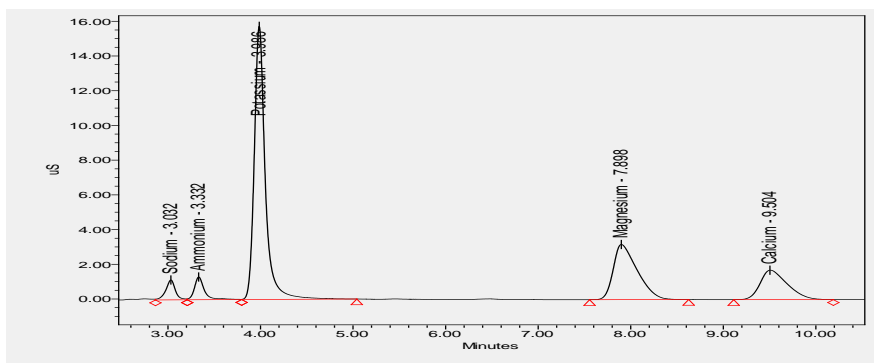


Fig. 30 Chromatogram of the drug, which is 100 times sweeter than sugar

CHAPTER 8. Study of stevia leaf essential oils using gas chromatography

The study of Stevia leaf essential oils, obtained by hydrodistillation, was carried out using a gas chromatograph (TRACE™ 1310 Gas Chromatograph - Thermo Scientific) on a SGE BPX5 Capillary GC Column chromatographic capillary column 30 m long, 0.25 mm in diameter and with a stationary phase particle size of 0.25 µm. The stationary phase was represented by 5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane.

During chromatography a mobile phase is represented by helium, which speed of movement is 0,700 ml / min. The research sample was injected through the SGE Analytical Science using a 10 µl microsyringe.

The ratio of sample injected into the column to helium emission in the stream was 1/100. Chromatography was carried out at a temperature gradient in four stages. In particular, the chromatography was started at a temperature of 50 ° C and brought to 250 ° C at a speed of 3 ° C / min (second stage); the chromatography lasted 10 minutes. At the third stage, at a speed of 10 ° C / min and a temperature that increased to 270 ° C, chromatography was continued for 3 minutes. At the fourth stage, at a speed of 21.4 (° C / min), the temperature reached 320 ° C and lasted for 5 minutes. The whole chromatographic implementation time was 89.0 minutes. The essential oils recovered by chromatography were detected on an alu-ionization detector. The quantitative content of essential oils was determined with an accuracy of up to 0.01% in percentage according to the peak area.

Aromatic foliage complex of Stevia was obtained by hydrodistillation. 100 g of dried leaf (crushed) together with 3 liters of water was placed in a flask. Distillation was carried out using a Cleverger-type apparatus (Fig. 6) for 3 hours. Condensation occurred in a refrigerator at temperature - 0.0 ° C. The obtained essential oil was extracted with hexane, 0.5 µl of the organic part of which was centrifuged (2 minutes at 1350 revolutions / min) injected on the chromatograph.

The identification of the components obtained by chromatography was carried out by comparing sample data of a well-known content; the specific terpenoid composition of Stevia essential oils was established. The results of the analysis are given in chromatogram No. 1.

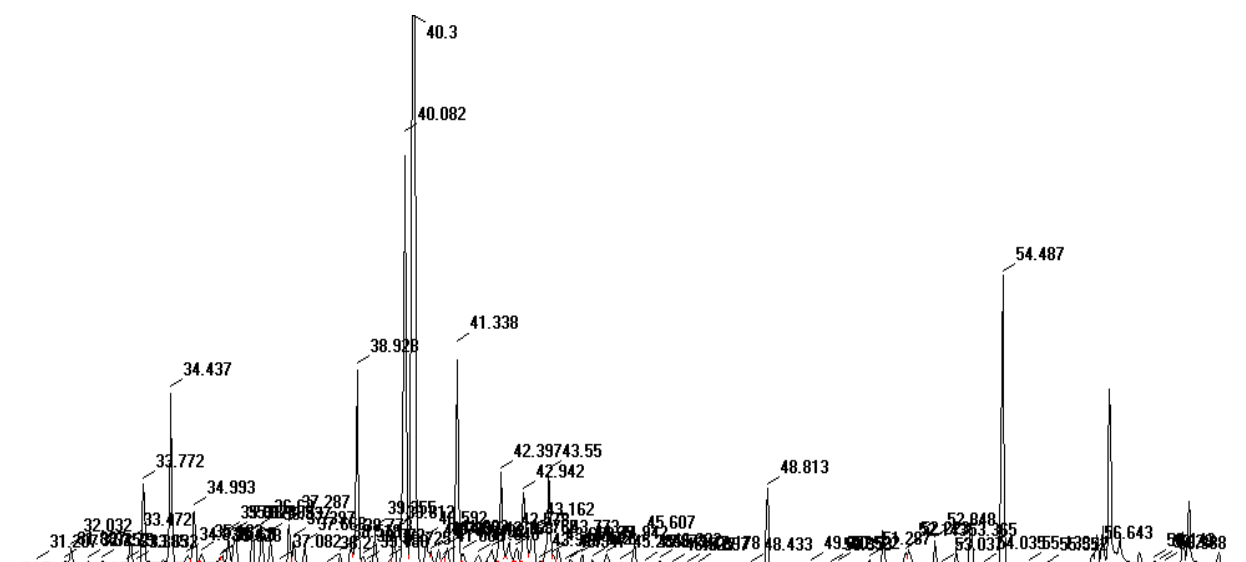


Fig. 31 Essential oils Chromatogram

Table №10.Component composition of essential oils.

Peak №	Component Name	Peak Time, (min)	Area, %	Peak №	Component Name	Peak Time, (min)	Area, %
1	a-Thujene	8.753	0.056±0.002	34	Peak 21	39.032	4.085±0.123
2	Peak 1	9.643	0.052±0.002	35	Peak 22	39.462	0.831±0.025
3	a-Pinene	11.570	0.424±0.013	36	Peak 23	39.887	0.742±0.022
4	Peak 2	13.588	2.613±0.078	37	Silphinene	40.163	11.685±0.351
5	γ-Terpinene	13.970	0.043±0.001	38	a-Longipinene	40.500	30.73±0.922
6	Nonanal	15.812	0.210±0.006	39	Peak 24	40.815	0.068±0.002
7	1, 8-eucalypto	16.022	0.032±0.001	40	Peak 25	40.965	0.386±0.012
8	Peak 3	19.073	0.528±0.016	41	Peak 26	41.210	0.495±0.015
9	Peak 4	21.372	0.077±0.002	42	Modheph-2-ene	41.633	5.757±0.173
10	Peak 5	22.442	0.056±0.002	43	Peak 27	41.637	0.218±0.007
11	Perilaldehyde	23.815	0.108±0.003	44	Peak 28	42.282	0.592±0.018
12	Undecanal	26.107	0.100±0.003	45	a-Isocomene	42.487	2.366±0.071
13	2.6-Dodecadien	32.122	0.394±0.012	46	Peak 29	42.703	0.418±0.013
14	a-Humulene	32.518	0.071±0.002	47	Peak 30	42.857	0.361±0.011
15	a-Sellnene	33.575	0.502±0.015	48	Peak 31	43.267	1.003±0.030
16	Peak 6	33.863	1.763±0.053	49	Z-Caryophyllen	43.390	0.046±0.001
17	Thymol methyl	34.552	3.891±0.117	50	Peak 32	44.480	0.290±0.009

18	(E,E)-a-Farnes	34.927	0.271±0.008	51	Peak 33	44.688	0.142±0.004
19	Peak 7	35.087	1.326±0.040	52	Peak 34	45.122	0.349±0.010
20	b-Cadinene	35.290	0.317±0.010	53	Peak 35	45.713	0.570±0.017
21	Peak 8	35.900	0.680±0.020	54	E-Caryophyllen	48.917	1.694±0.051
22	Peak 9	36.105	1.077±0.032	55	Peak 36	50.605	0.081±0.002
23	Peak 10	36.497	0.782±0.023	56	Peak 37	51.377	0.149±0.004
24	Peak 11	36.727	0.937±0.028	57	Peak 38	52.950	0.663±0.020
25	Peak 12	36.950	0.766±0.023	58	Peak 39	53.465	0.425±0.013
26	Peak 13	37.355	1.002±0.030	59	Peak 40	54.615	7.197±0.216
27	Peak 14	37.495	0.631±0.019	60	Peak 41	55.982	0.039±0.001
28	Peak 15	37.778	0.538±0.016	61	Peak 42	57.553	0.154±0.005
29	Peak 16	37.923	0.063±0.002	62	Peak 43	58.212	0.130±0.004
30	Peak 17	38.138	0.036±0.001	63	Peak 44	63.865	0.188±0.006
31	Peak 18	38.268	0.061±0.002	64	Peak 45	65.250	0.158±0.005
32	Peak 19	38.638	0.361±0.011	65	Peak 46	67.870	0.186±0.006
33	Peak 20	38.828	0.158±0.005				

As a result of our chromatographic research, 65 components have been found in the essential oils of Stevia leaves. Among them there were identified 19 components, six of which are dominant. In particular:

Thymol methyl(3.891%), Silphinene(11.685%), a-Longipinene(30.730%), Modheph-2-ene(5.757%), a-Isocomene(2.366%), E-Caryophyllen(1.694%), a-Thujene, a-Pinene, γ -Terpinene, Nonanal, 1,8-eucalyptol, Perilaldehyde, Undecanal, 2,6-Dodecadien, a-Humulene, a-Sellnene, (E,E)-a-Farnes, b-Cadinene, Z-Caryophyllen,

CHAPTER 9. Research of the Stevia Infrared spectrum

We have examined from 700 to 4000 nm of the infrared spectrum of Stevia. During the research there was used equipment *Cary 630 FTIR* of *Agilent* company. The study revealed the maximum amount of absorption. Namely: 3377.0-3388.2 cm^{-1} , which corresponds to the group; 2927.8-2937.1 cm^{-1} , which corresponds to -CH and alcohol group OH; 1654.9-1735.1 cm^{-1} , which corresponds to the group C =

O; 1600.9-1606.5 cm^{-1} , which corresponds to the C = C-group; 1388.4-1459.3 cm^{-1} ; 1075.3-1036.2 cm^{-1} , which corresponds to the complex group C – O – C; 894.6-896.4 cm^{-1} , which corresponds to the group (R)₂- C = C-H;

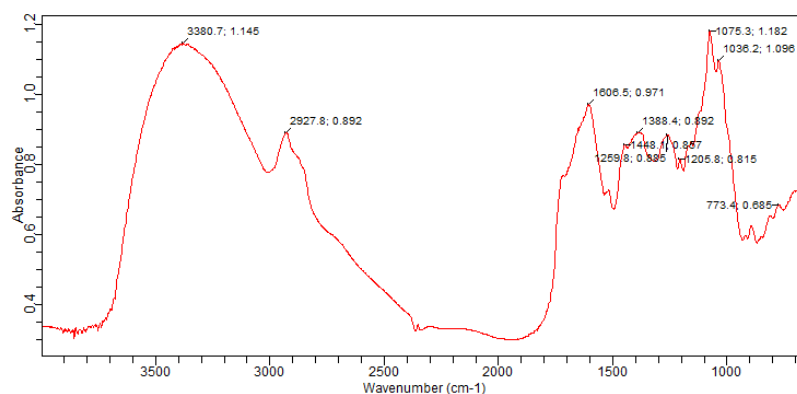


Fig. №32 Stevia 100

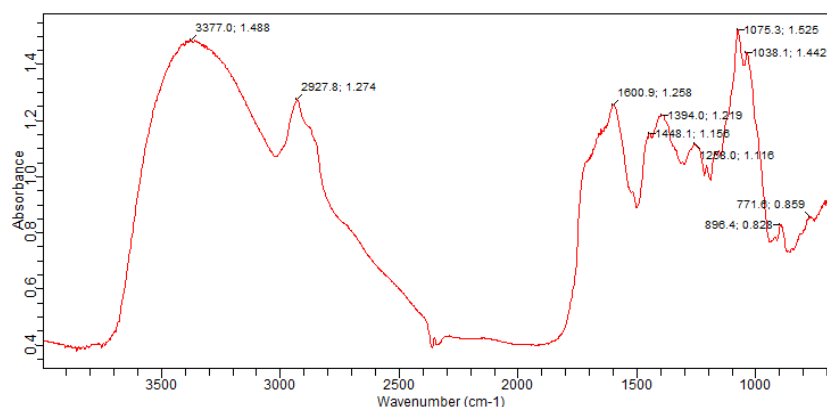


Fig. №33 Stevia 200

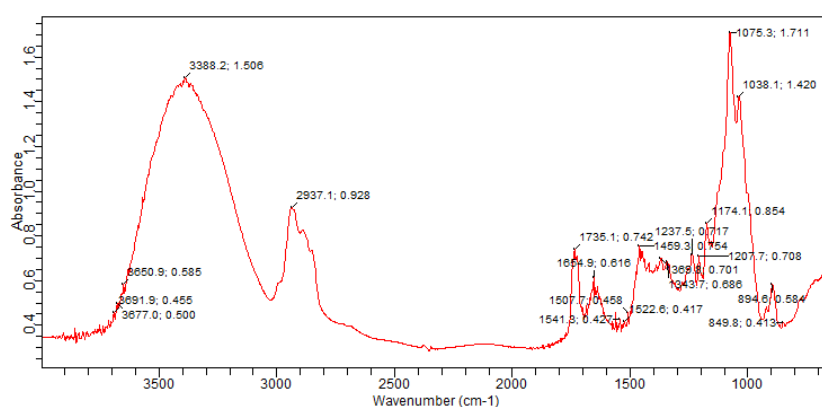


Fig. №34 Stevia 300

During the processing of Stevia preparations, we compared various preparations obtained at different stages of purification from the mixtures and identified them according to the level of sweetness,

which is 100, 200 and 300 times sweeter than sugar. The Stevia preparation 300 is a white diterpenoid glycoside without impurities.

The research of the preparation has shown that Stevia 100 and 200 are characterized by almost the same absorption, and the difference is in the level of intensity; Stevia 300 has a change in the background of absorption, what allowed us to conduct a study in the infrared spectrum to determine the purity of the preparation obtained from Stevia. In particular, $2350-3200\text{ cm}^{-1}$, $1150-1800\text{ cm}^{-1}$, $950-700\text{ cm}^{-1}$, the intensity of the absorption spectrum was reduced almost 2 times. Stevia 300 also contained waves with an absorption background: $1075.3-1036.2\text{ cm}^{-1}$, what corresponds to the complex ester group C-O-C, the complex ester group $1735.1\text{ cm}^{-1}\text{C}=\text{O}$ and $3377.0-3388, 2\text{ cm}^{-1}$, which corresponds to the OH group, clearly indicating a higher content of diterpenoid glycosides in this preparation.

CHAPTER 10. Production of tablets from the products obtained from Stevia.

In order to give a consumer view to preparations of various purities, obtained during the processing of Stevia leaves, we have developed some technologies for the production of tablets (including effervescent tablets).



Fig.№35LFA Tablet Press of TDP-6s company Desktop Tablet Presswith tablet equipment

Equipment and materials necessary for tableting were purchased with funds allocated by the grant “Low-calorie sweet tablets” SIG / 23/1/2015 sponsored by the “Education, Science and

Technological Development Foundation for Tomorrow's Success". There have been obtained tablets weighing 0.1 g, the sweetness of which is equivalent to 1 teaspoon of sugar.

CONCLUSIONS

1. There have been studied the chemical composition of 4 different varieties(species) of Stevia leaves, introduced in Georgia. A preparation has been obtained from Stevia leaves and 12 diterpene glycosides have been identified using HPLC-UV, RI and UPLC-PDA, MS methods: aglycone - [M-H +] - m / z 319, [M-H -] - m / z 317 steviol; steviol-glucoside - [M-H -] - m / z 479; steviol di-glucoside - [M-H -] - m / z 625; steviol biozid - [M-H -] - m / z 641; treviol triglucoside [M-16] [M-H -] - m / z 787; stevioside - [M-H -] - m / z 803; tetra-glucoside steviol, i.e. rebaudioside A - [M-H -] - m / z 965; mono-rhamnoside-triglucoside steviol, i.e. rebaudioside D - [M-H -] - m / z 1127; C - [M-H -] - m / z 949; steviol tetra-glucoside, i.e. rebaudioside D - [M-H -] - m / z 965; steviol tetra-glucoside, i.e. rebaudioside F - [M-H -] - m / z 935; tri-glucoside steviol, i.e. Dulcid A - [M-H -] - m / z 787; 8 phenolic compounds: mono-caidoyl quina chlorogen acid - [M-H -] - m / z 353; mono-caidoyl quina acid - [M-H -] - m / z 353; 3,5-di-capoyl-quina acid - [M-H -] - m / z 515; 4,5-di-capoyl-quina acid - [M-H -] - m / z 515; quercetin-galactoside - [M-H -] - m / z 463; rutin - [M-H -] - m / z 609; Quercetin-rhamnoside - [M-H -] - m / z 447; Quercetin-Pentoside - m / z 433; Quercetin-galactoside - m / z 463;
2. The oil composition of Stevia leaf has been studied and the dominance of C18 carboxylic acid has been determined; it accounted for more than 50% of total fat content. The following acids have been identified from the oil: C 18- Linolenic acid (C18:2n6c), Cis-Linolic Acid (ω -6), gamma-Linolenic acid (C18:3n6) γ -cis-Linolenic acid (ω -6), α -Linolenic acid C18:3n3) α -Linolenic acid (ω -3)
3. The quantitative content of steviol-glycosides of Stevia leaves of different varieties, as well as the preparations, obtained from them, have been studied. It has been established that a dominant compound of sweet glycosides of Stevia rebaudiana leaves is stevioside, which is up to 6-7% in leaves.
4. The essential oils have been obtained from Stevia leaves; among the found 65 components there have been identified 19 and 6 of them were defined as dominant ones: Thymol methyl(3.891%), Silphinene(11.685%), α -Longipinene(30.730%), Modheph-2-

ene(5.757%), α -Isocomene(2.366%), E-Caryophyllen(1.694%), α -Thujene, α -Pinene, γ -Terpinene, Nonanal, 1,8-eucalyptol, Perilaldehyde, Undecanal, 2,6-Dodecadien, α -Humulene, α -Selinene, (E,E)- α -Farnes, β -Cadinene, Z-Caryophyllen.

5. The antioxidant activity of Stevia leaves and the products, obtained from them, was determined by the DPPH method. It has been established that the antioxidant activity of Stevia leaves is almost the same for different varieties, however, it varies significantly during processing. The preparation, which is 100 times sweeter than sucrose, is the most active (only 0.015 mg exhibits DPPH inhibition); the antioxidant activity of the preparation, which is 200 times sweeter, is reduced by almost 7 times (0.107 mg), and in a completely purified preparation (300 times sweeter) antioxidant activity is 45 times less than at the beginning.
6. There has been developed a method of supercritical pressure fluid extraction (SFE) treatment of Stevia leaves. It became possible to fractionate the leaves of biologically active compounds of different composition.
7. A study, using the conductometric detector of cationic chromatography of Stevia leaves, has shown that the total amount of basic cations of Stevia leaves is about 5%, and in the preparation, which is 100 times sweeter than sugar, their amount is slightly more than 5%. The subsequent refining of the preparation at the first stage causes a sharp increase in the number of cations; their number is 8% higher in the preparation, which is 200 times sweeter than sugar; and in the preparation of Stevia, which is 300 times sweeter than sugar, the total amount of cations is up to 0.3%. The dominant cation is potassium, the content of which is 80% more than all cations.
8. Studies of infrared spectroscopy of various preparations, obtained from Stevia leaves, have shown that Stevia 100 and 200 are actually similar in composition, while Stevia 300 has an excellent absorption spectrum, which indicates that it is the most purified of impurities. In particular, 2350-3200 cm^{-1} , 1150-1800 cm^{-1} , 950-700 cm^{-1} , the intensity of the absorption spectrum decreases by almost 2 times. In addition, in Stevia 300 the absorption intensity increases on waves: 1075.3-1036.2 cm^{-1} , which corresponds to the group of complex esters of C-O-C, the group of complex esters of 1735.1 cm^{-1} C = O and

3377.0-3388.2 cm⁻¹, which corresponds to the OH group, this characteristic is directly proportional to the content of diterpenoid glycosides.

9. Technological modes of tableting the obtained products have been developed. There has been carried out chemical analysis of preparations.

The works published on the basis of Dissertation:

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

Participation in International Scientific Conferences:

1. **R. Davitadze**, A. Kalandia Antioxidant activity of stevia products. IX International Conference „Bioantioksidant". Moscow 2015
2. **R. Davitadze**, A. Kalandia Stevia (Stevia Rebaudiana) antioxidant activity of leaf. International scientific-practical conference. Kutaisi 2014

3. **R. Davitadze**, A. Kalandia Stevia - safe sweetener. International scientific-practical conference. Kutaisi. 2014
4. **R. Davitadze**, M. Vanidze, A. Kalandia Sweet tea. Association of Professional Chemists. Third International Conference of Young Chemists ICYC-2012. Tbilisi. 2013
5. **R. Davitadze**, A. Kalandia, M. Vanidze. Stevia - the future of the sugar. The Technical University of Professional Chemists Association. Second International Conference of Young Chemists ICYC-2012. Tbilisi, 2012