

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

ქიმიის დეპარტამენტი



ქაფის ნაყოფის ბიოაქტიური ნაერთების შესწავლა ოფთალმოლოგიური გამოყენების მალამოს მისაღებად და მისი
თვალის ზედაპირული პოსტტრავმული ნაწიბურების რეგენერაციისთვის გამოცდა

ლანა დათუაშვილი

(წარდგენილია ქიმიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად)

სპეციალობა: ბუნებრივ ნაერთთა ანალიზი

ანოტაცია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: პროფესორი

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი

ალეკო კალანდია

თანახელმძღვანელი: პროფესორი,

ქიმიის მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი

ინგა ბოჭოიძე

ბათუმი-2025

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

დისერტაციის კვლევითი ნაწილი შესრულდა პროექტის ფარგლებში, რომელიც განხორციელდა შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის ფინანსური ხელშეწყობით (გრანტი AP/96/13; FR 22-4236)

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

ლანა დათუაშვილი

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:
ალეკო კალანდია

პროფესორი
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი

თანახელმძღვანელი: პროფესორი,
ინგა ბოჭოიძე

ქიმიის მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი

უცხოელი რეცენზენტი:
Dr Dimitrios Katsantonis

Director of Research
Hellenic Agricultural Organization - DIMITRA
Institute of Plant Breeding and Genetic Resources

შემფასებლები:

1. ელენე გამყრელიძე

ქიმიის აკადემიური დოქტორი, აკაკი წერეთლის
სახელმწიფო უნივერსიტეტის ქიმიური და
გარემოსდაცვითი ტექნოლოგიების დეპარტამენტის
ასოცირებული პროფესორი.

2. ნატალია კუპატაშვილი

ქიმიის აკადემიური დოქტორი, აკაკი წერეთლის სახელმწიფო
უნივერსიტეტის ქიმიის დეპარტამენტის ასოცირებული პროფესორი.

3. მზია დიასამიძე -

ქიმიის აკადემიური დოქტორი, ბათუმის შოთა რუსთაველის
სახელმწიფო უნივერსიტეტის ქიმიის დეპარტამენტის მოწვეული
მასწავლებელი.

სადისერტაციო ნაშრომის დაცვა შედგება 2025 წლის ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის სადისერტაციო საბჭოს სხდომაზე. მისამართი: ბათუმი ნინოშვილის ქ. № 35 აუდიტორია

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

შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის სადისერტაციო საბჭოს მდივანი:

ეთერი ჯაყელი

შესავალი

თემის აქტუალობა - ქაცვის (*Hippophae*) ველური თუ კულტურული ნარგავები მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში გავრცელებული, განსაკუთრებით საინტერესოდ მიიჩნევა მთიანი რეგიონის და შედარებით ცივი კლიმატის პირობებში მოყვანილი ნაყოფი. საქართველოს ნიადაგობრივ-კლიმატური პირობები ძალიან კარგი მასპინძელი აღმოჩნდა ქაცვისათვის. იგი საქართველოში პრაქტიკულად ყველგან იზრდება. ქაცვი იზრდება მდინარის ნაპირებზე, მთის ფერდობებზე, ტენიან ადგილებში, სადაც ხშირად ქმნის მწელადმისადგომ აღმონაცენს. ქაცვი განსაკუთრებით ფართოდაა გავრცელებული მდინარეების რიონის, აჭარისწყალი, ჭოროხი და ცხენისწყლის ხეობებში, სადაც შესაძლებელია მისი მასიურად დამზადება. ქაცვის ნაყოფი ფართო გამოყენებით გამოირჩევა, მისგან ამზადებენ როგორც საკვებ პროდუქტებს, ასევე სამკურნალო პრეპარატებს. საქართველოში რამდენიმე კომპანია ამზადებს ქაცვის ნაყოფს, აშრობს და ახდენს რეალიზაციას. მათ შორისაა ჩვენს რეგიონში მოღვაწე ჩვენი პარტნიორი კომპანიებიც. ქაცვის მიმართ ინტერესი სამეცნიერო ლიტერატურაში ძალიან მაღალია. ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა ბოლო 10 წელში სამეცნიერო კვლევების ტენდენციები და გეოგრაფიული არეალი. გეოგრაფიული არეალი მრავალფეროვანია, განვითარებადი ქვეყნები და მაღალტექნოლოგიური სამხრეთ კორეა. მცენარის ნაყოფში პირველ რიგში სწავლობენ ქიმიურ შედგენილობას. შესწავლილია ქაცვის ნაყოფის ორგანული ნაერთების წარმოებულები [1; 69], იდენტიფიცირებულია ფოთლის ბიოაქტიური პოლიფენოლები და მქროლავი ნაერთები [82] ჩატარებულია *Hippophae rhamnoides* L. ნაყოფის და ფოთლის UHPLC-ESI-QTOF-MS და დადგენილია მისი Anti-Inflammatory აქტიურობა [148]. ჩატარებულია ყლორტების, ფოთლების და ანაწეხის ფიტოქიმიური კვლევა და დადგენილია მისი ანტიმიკრობული აქტიურობა [96] შესწავლილია ყინვაგამძლე ფორმების ანტიფრიზული პროტეინები [108] შესწავლილია ნაყოფის პოლისაქარიდების ნაწლავის დამცავი თვისებები [88]. შესწავლილია პენტაციკლური ტრიტერპენები [109]. დახასიათებულია ქაცვის პოლიფენოლების შესაძლებლობა მოახდინონ ნიტრიტების დეგრადაცია [10]. შესწავლილია სხვადასხვა მეთოდით მიღებული ექსტრაქტების ანტიოქსიდანტური აქტიურობა [97]. შესწავლილია ქაცვის ანაწეხის ქიმიური შედგენილობა და შემოთავაზებულია მისი ვალორიზაციის საშუალებები [71]. კომპლექსურად არის შესწავლილი ნაყოფის შედგენილობა (ნახშირწყლები, მჟავები, ვიტამინები) [122; 73; 69]. გამოყოფილია და იდენტიფიცირებულია აურინლიგნანები და დადგენილია მათი ჰეპატოპროტექტორული და ჰიპილიპიდემური აქტიურობები [74]. ჩატარებულია ქაცვის ნაყოფის პროანტოციანების კვლევა ნაყოფის მოყვანის ადგილის და გენეტიკური წარმოშობის მიხედვით [140]. სიღრმისეულადაა შესწავლილი ქაცვის ნაყოფის ფლავონოლ გლიკოზიდები [100]. შესწავლილია ლიპოფილური ექსტრაქტების ანტიოქსიდანტური აქტიურობა და მათში კაროტინოიდების და ტოკოფეროლის შემცველობა [92]. ეს ბუნებრივია არასრული ჩამონათვალი.

ბოლო წლებში, განსაკუთრებული ინტერესი გამოიკვეთა ქაცვის ნაყოფის ბიოაქტიური ნაერთების ოფთალმოლოგიური გამოყენების მიმართ. თვალის ზედაპირული პოსტტრავმული ნაწიბურები, რომლებიც ხშირად იწვევენ მხედველობის გაუარესებასა და დისკომფორტს, მნიშვნელოვან სამედიცინო პრობლემას წარმოადგენს. მიუხედავად თანამედროვე მედიცინის მნიშვნელოვანი მიღწევებისა, პარალელურად მიმდინარეობს კვლევები, რომლებიც მიმართულია ბუნებრივი წარმოშობის სამკურნალო საშუალებების გამოყენების პოტენციალის შესწავლაზე. ბუნებრივი ნაერთების გამოყენებამ, როგორც დამხმარე ან ალტერნატიულმა თერაპიამ, შესაძლოა მნიშვნელოვანი წვლილი შეიტანოს თვალის ზედაპირული დაზიანებების რეგენერაციაში და გააუმჯობესოს პაციენტების ცხოვრების ხარისხი. ამ მხრივ, განსაკუთრებით საინტერესოა ქაცვის ზეთის ცხიმოვანი მჟავები. ქაცვის ზეთში არსებული პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავებია: α -ლინოლენის მჟავა (ω -3) C18:3, γ -ლინოლენის მჟავა (ω -6) C18:3, ლინოლენის მჟავა (ω -6) C18:2; ხოლო მონოუჯერი ცხიმოვანი მჟავებია: ოლეინის მჟავა (ω -9) C18:1 და ეიკოზანოინის მჟავა (ω -9) C20:1 [61; 36; 142; 152; 17; 56; 46; 58; 93; 94; 19].

ბოლო წლების ლიტერატურის შესწავლა ადასტურებს, რომ ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მისაღებად უპირატესობას ანიჭებენ ე.წ. მწვანე და ციკლურ ეკონომიკაზე ორიენტირებულ ტექნოლოგიებს, მხოლოდ ულტრაბგერითი ზონდის გამოყენებით ექსტრაქციის რამდენიმე ათეული სრულფასოვანი კვლევა, სხვადასხვა მცენარესთან მიმართებაში, წარმოდგენილი მაღალრეიტინგულ ჟურნალებში (მაგალითისათვის-[96; 3; 128; 42; 102; 111; 78]). სუპერ კრიტიკული ფლუიდური ექსტრაქცია Supercritical Fluid Extraction (SFE) ტრადიციულ ექსტრაქციებთან შედარებით გააჩნია გარკვეული უპირატესობა. მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია ზეკრიტიკული წყლის გამოყენებით ექსტრაქციას (Subcritical pressure and temperature Water Extraction-SWE) როგორც კვლევებში ასევე პრეპარატების მიღებისათვის [59; 146; 62; 33; 104; 21; 28; 118; 95].

პრობლემის ფორმულირება - ჩვენს მიერ შესწავლილი რამდენიმე ასეული სამეცნიერო პუბლიკაციიდან, სამწუხაროდ არ იმეზნება არც ერთი კვლევა საქართველოში გავრცელებული ენდემური მცენარეების ან წარმოების ანარჩენების შესახებ, არც ერთი ავტორი არ არის ქართული სამეცნიერო წრიდან. სამეცნიერო ტექნიკის სიმწირის გამო სრულად შეუსწავლელია ქვეყნის სინამდვილეში, მცენარეული ნედლეულის გადამამუშავებელ საწარმოთა ანარჩენების გამოყენების შესაძლებლობები (გამონაკლისი ჩვენი სამეცნიერო გუნდის რამდენიმე კვლევა მცენარე სტევიაზე, ციტრუსის გამონაწნეზე, ყურძნის წიპწაზე). სრულად შეუსწავლელია ბიოაქტიური ნაერთების შემცველი მცენარეებიდან მიღებული პრეპარატები და მათი გამოყენების პერსპექტივები. მეორეს მხრივ ჩვენს მიერ გაცნობილი ლიტერატურა მოწმობს (რამდენიმე ათეული უახლესი პუბლიკაცია), რომ მცენარეული ნედლეულისა და გადამამუშავების ანარჩენების ვალორიზაციის საკითხი ინოვაციური ტექნოლოგიების გამოყენებით, გარემოზე უარყოფითი ზემოქმედების შესუსტების მიზნით ციკლური ეკონომიკის პრინციპების გამოყენება პრიორიტეტული საკითხია. დღეისათვის შექმნილი სასურსათო და მედიკამენტოზული უსაფრთხოების საკითხების

გათვალისწინებით, განსაკუთრებით აქტუალური გახდა ისეთი მცენარეული ნედლეულის და წარმოების ანარჩენების გამოყენების საკითხი, რომელიც მდიდარია საკვებად ვარგისი ბიოპოლიმერებით და პროფილაქტიკური თუ სამკურნალო დანიშნულების მქონე ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთებით. აუცილებელია საქართველოს სინამდვილეში განსაკუთრებით ენდემური მცენარეების ექსტრაქციის მეთოდების ოპტიმიზაცია, ბიოაქტიური პრეპარატების მიღების ტექნოლოგიების შემუშავება, მათი ქიმიური შედგენილობის კვლევა თანამედროვე მეთოდების მეშვეობით და მათი გამოყენების პერსპექტივების დადგენა.

სამწუხაროდ ქართულ სინამდვილეში არა თუ ბოლო 10 წლის განმავლობაში, არამედ საერთოდ არ იმეზნება რამდენადმე სერიოზული სამეცნიერო ნაშრომი (გამონაკლისი რამდენიმე დისერტაციაა, სადაც ქაცვის ქიმიური შედგენილობა ზედაპირულადაა შესწავლილი). სანედლეულო ბაზა საკმაოდ დიდია, ინფორმაციის სიმცირის გამო, ნაყოფის მოხმარება ხდება არა რაციონალურად. ძირითადად საოჯახო მეურნეობებში მზადდება მურაბები და ჯემები. მცირე რაოდენობით შრება და ჩირის სახით რეალიზდება. ქაცვის ნაყოფის ქიმიური შედგენილობის სიღრმისეული კვლევა, სახეობრივი და რეგიონული გავრცელების მიხედვით ქიმიური შედგენილობის თავისებურებების გათვალისწინება, მცენარეული ნედლეულისა და გადამამუშავების ანარჩენების ვალორიზაციის ინოვაციური ტექნოლოგიების შემუშავება გარემოზე უარყოფითი ზემოქმედების შესუსტების მიზნით ციკლური ეკონომიკის პრინციპების გამოყენებით საშუალებას მოგვცემს მცენარეული ნედლეულის რეალიზაციის ნაცვლად წარმოებული იქნას საბოლოო პროდუქცია. ქაცვის საფუძველზე დამზადებული პროდუქტებისა და პრეპარატების იმპორტის ნაცვლად შესაძლებელი გახდება მათი ექსპორტირება. ეს კი საშუალებას მოგვცემს ნაბიჯ-ნაბიჯ გადაიჭრას მცენარეული ნედლეულის ნაცვლად სანდო და მაღალტექნოლოგიური პროდუქციის რეალიზაცია განხორციელდეს, შემცირდეს ქვეყნის სასურსათო და ფარმაცევტული უსაფრთხოების რისკები.

კვლევის მიზანი და ამოცანები - საქართველოში გავრცელებული ქაცვის ნაყოფის ქიმიური შედგენილობის შესწავლა, ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების იდენტიფიკაცია, ნედლეულისა და გადამამუშავების ანარჩენების ვალორიზაციის და გარემოზე უარყოფითი ზემოქმედების შესუსტების მიზნით ციკლური ეკონომიკის პრინციპების გამოყენებაზე დაფუძნებული სუბსტანციების და პრეპარატების მიღების ინოვაციური ტექნოლოგიების ოპტიმიზაცია; ბიოაქტიური ნაერთების მხოლოდ „მწვანე“ ექსტრაგენტების ციკლურ გამოყენებაზე დაფუძნებული- სუპერკრიტიკული ფლუიდური (supercritical fluids extraction-SFE), ულტრაბგერითი (Ultrasonic Extraction -USE), სუბკრიტიკული წნევისა და ტემპერატურის წყლით (Subcritical pressure and temperature Water Extraction-SWE) ექსტრაქციის, ულტრაფილტრაციის, სორბციის, დესორბციის, დიალიზის და სხვა მეთოდების პარამეტრების ოპტიმიზაცია; ნედლეულისა და მიღებული პრეპარატების შესწავლა UPLC-PDA-MS, HPLC, GC მეთოდების გამოყენებით; ბიოლოგიურად აქტიური ინდივიდუალური ნაერთების იდენტიფიცირება და რაოდენობრივი შემცველობის შესწავლა; მათი ბიოაქტიურობის სკრინინგი (ანტიოქსიდანტური აქტივობა) და გამოყენების პერსპექტივების განსაზღვრა.

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა დასავლეთ საქართველოში ველურად მოზარდი ქაცვის ნაყოფი, ფოთოლი და ნაყოფის გადამამუშავების პროდუქტები (გამონაწენი და თესლი).

კვლევის მეთოდოლოგია - კვლევაში გამოყენებული იქნა შემდეგი ხელსაწყოები: მაღალი ეფექტურობის თხევადი ქრომატოგრაფი (HPLC) - Waters, აღჭურვილი UV, Vis და რეფრაქციული ინდექსის (RI) დეტექტორებით (Binary HPLC Pump 1525), და Waters 432 კონდუქტომეტრული დეტექტორით. ასევე გამოყენებული იქნა ულტრა-მაღალი ეფექტურობის თხევადი ქრომატოგრაფი (UPLC) - Waters Acquity H Class, ფოტო-დიოდური მასივის (PDA) და მას-სპექტრომეტრიული (MS) დეტექტორებით; pH-მეტრი და კონდუქტომეტრი - Mettler Toledo pH/Ion meter S220 და S230 Conductivity; Mettler Toledo UV5 UV/Vis სკანირებადი სპექტროფოტომეტრი.

სამეცნიერო სიახლე - საქართველოს სინამდვილეში პირველად იქნება შესწავლილი ქაცვის ნაყოფის ქიმიური შედგენილობა (კომპლექსური კვლევა ქრომატოგრაფიებით-HPLC-UV,Vis,RI, UPLC-MS,PDA GC, სპექტრალური ანალიზი და კვლევის კლასიკური ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდებით) ქაცვის ბიოაქტიური ნაერთების თვისობრივი და რაოდენობრივი შედგენილობა. შესაძლებელი გახდება ნაყოფის კომპლექსური გადამამუშავების და გადამამუშავების ანარჩენების ვალორიზაციის და გარემოზე უარყოფითი ზემოქმედების შესუსტების მიზნით ციკლური ეკონომიკის პრინციპების გამოყენებაზე დაფუძნებული ინოვაციური ტექნოლოგიების შემუშავება. სხვადასხვა თანამედროვე ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდების გამოყენებით ქაცვის ნაყოფისა და გადამამუშავების პროდუქტებიდან გამოყოფილი და იდენტიფიცირებული იქნა 3 ორგანული მჟავა, 35 ფლავონოიდი, 1 ტერპენოიდი, 23 ცხიმოვანი მჟავა. მწვანე ტექნოლოგიების გამოყენებით მიღებულ იქნა რამდენიმე პრეპარატი

ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა - შესწავლილია ფოთლის, ნაყოფის, მისი გადამამუშავებისას მიღებული პროდუქტების ბიოაქტიური ნაერთების შედგენილობა და მათი ბიოლოგიური აქტივობა. შერჩეულია ტექნოლოგიური მეთოდები, რომლებიც უზრუნველყოფენ ბიოაქტიური ნაერთების მაქსიმალურად შენარჩუნებას. წარმოების ანარჩენების ვალორიზაციის მეთოდები მეწარმეებს საშუალებას მისცემს აწარმოონ ბაზარზე მოთხოვნილი ბიოლოგიურად აქტიური პროდუქტები და პრეპარატები.

სამუშაოს აპრობაცია - კვლევის შედეგები ასახულია 3 სამეცნიერო სტატიაში და 1 საერთაშორისო სამეცნიერო კონფერენციის მასალაში:

1. Lana Datuashvili, Maia Vanidze, Indira Japaridze, Nona Surmanidze, Inga Kartsivadze, Ruslan Davitadze, Aleko Kalandia Chemical Composition Analysis of Sea Buckthorn (Hippophae) in Georgia and Development of Innovative Valorization Technologies Food Science & Nutrition 2025

2. Lana Datuashvili; Maia Vanidze; Indira Japaridze; Nona Surmanidze; Inga Kartsivadze; Nona Abashidze; Maia Kharadze; Meri Khakhutaishvili; Ruslan Davitadze and Aleko Kalandia; Inga Bochoidze; Study of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Leaves by UPLC-MS and HPLC Methods International Journal of Life Sciences (ISSN: 2277- 193x) 14 (2) (2025) 27-35

3. Lana Datuashvili; Maia Vanidze; Indira Japaridze (Indira Djafaridze); Nona Surmanidze; Aleko Kalandia; Inga Bochoidze; Green Approaches to Carotenoid Extraction from Sea Buckthorn Fruit and Their Role in Ophthalmology Georgian Scientists 7, N2, 2025, <https://doi.org/10.52340/g.s.2025.07.02.11>

4. Lana Datuashvili; Maia Vanidze; Indira Japaridze; Inga Kartsivadze; Nona Surmanidze; Ruslan Davitadze; Aleko Kalandia; Chemical Composition Analysis of Sea Buckthorn (*Hippophae*) in Georgia and Development of Innovative Valorization Technologies for Plant Materials and Processing Waste Published: 25 October 2024 by MDPI in The 5th International Electronic Conference on Foods session Chemistry and Physicochemical Properties of Foods <https://sciforum.net/paper/view/19451>

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა – დისერტაცია შედგება 145 ნაბეჭდი გვერდისაგან, დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაციის გაფორმების ინსტრუქციის მიხედვით და მოიცავს სატიტულო და ხელმოწერების გვერდებს, შინაარსს, სურათს 57, ცხრილის ნუსხას 21, დიაგრამას 10, გამოყენებული ლიტერატურის ნუსხას 151 ერთეულს. ძირითადი ტექსტის შემადგენლობაშია: შესავალი, ლიტერატურული მიმოხილვა, ექსპერიმენტული ნაწილი, შედეგების განსჯა, დასკვნა და გამოყენებული ლიტერატურის ჩამონათვალი.

1. ექსპერიმენტული ნაწილი

1.1. კვლევის ობიექტი

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა დასავლეთ საქართველოში ველურად მოზარდი ქაცვის ნაყოფი, ფოთოლი და ნაყოფის გადამუშავების პროდუქტები ანაწილები და თესლი). ნიმუშები აღებული იქნა საქართველოს 3 სხვადასხვა რეგიონში: სამცხეთ-ჯავახეთი (ახალციხე - 41 ° 38'20.0 "N 42 ° 59'10.0" E), აჭარა (ერგე - 41°33'41.0"N 41°41'48.0"E, თბილისი - 41°33'49.0"N 41°39'11.0"E) და იმერეთი (თერჯოლა - 42 ° 11'00.0 "N 42 ° 58'38.0" E). ნიმუშების ნაწილი ინახებოდა საყინულეში (-25 ° C) შემდგომი კვლევებისთვის. ნედლი ნაყოფის ნაწილი პირდაპირი გადამუშავდა პრეპარატების მისაღებად. ნიმუშები ასევე იყო ლიოფილიზებული და შენახული მაცივარში 4 ° C ტემპერატურაზე გამოყენებამდე. ნაყოფებს ვიღებდით 2021-2024 წლებში სამომხმარებლო სიმწიფის პერიოდში.

ქაცვი (*Hippophae rhamnoides*) არის ხშირტოტებიანი ბუჩქოვანი, ეკლიანი მცენარე, რომელიც სიმაღლით 2-4 მ-ს აღწევს. ტოტები სიმეტრიულია და ხშირად ბოლოებზე მომრგვალებული ფორმა აქვს. ქაცვის ტოტებს აქვს ყვავიფერი ან მოშავო ფერის ქერქი და მონაცრისფრო- მომწვანო ყლორტები. ტოტები ეკლებით ბოლოვდება. მტვრიანებიანი და ბუტკოიანი ყვავილები ფოთლებამდე გამოდის. ფოთლები მორიგეობითაა, სიგრძით 4-6 სმ, ლანცეტისებური ფორმის და მოვერცხლისფრო-ნაცრისფერი შეფერილობის. ყვავილის კვირტები უმეტესად 2 წლის მცენარეზე ჩნდება. მდედრობითი ყვავილების დამტკვრვა მაისის შუა პერიოდში ხდება და სრულად არის დამოკიდებული ქარზე. ნაყოფი მწიფდება დამტკვრვიდან დაახლოებით 100 დღეში (სექტემბერ-ოქტომბერში). ქაცვის ნაყოფი შესაძლოა იყოს განსხვავებული ფორმისა და ფერის, მაგრამ უმეტესწილად არის მრგვალი ან ოვალური ფორმის და ყვითელი ან ნარინჯისფერი შეფერილობის. ქაცვის ნაყოფის ფორმის და ზომის კომბინაცია მისი ფოთლებისა და ნაყოფის ფერების კონტრასტთან ერთად ქმნის ამ მცენარის არაჩვეულებრივ დეკორატიულ მახასიათებელს. ქაცვი ბუნებრივად ფართოდ არის გავრცელებული ზომიერი სარტყლის ქვეყნებში: ჩინეთი, რუსეთი, დიდი ბრიტანეთი, საფრანგეთი, დანია, ნიდერლანდები, გერმანია, პოლონეთი, ფინეთი, შვედეთი და ნორვეგია. საქართველოში ქაცვი მთელი ქვეყნის მასშტაბით გვხვდება ზღვის დონიდან 2500 მეტრამდე. ჩვეულებრივ იგი ხარობს ფერდობებზე, მდინარის და ზღვის სანაპიროებზე.

2.3. ქაცვის წვენში ნახშირწყლების კვლევა HPLC რეფრაქტომეტრული დეტექტორების მეთოდით

ნახშირწყლები წარმოადგენენ ქაცვის ნაყოფის ერთ-ერთ ძირითად კომპონენტს, რაც მნიშვნელოვანია მისი ენერგეტიკული ღირებულებისა და გემოვნური თვისებების განსაზღვრისთვის. ნახშირწყლების შემადგენლობა და კონცენტრაცია შეიძლება მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდეს ნაყოფის სიმწიფის სტადიის, ჯიშისა და ზრდის პირობების მიხედვით. ამიტომ, მათი რაოდენობრივი და თვისობრივი ანალიზი წარმოადგენს მნიშვნელოვან ამოცანას ქაცვის ნაყოფის კვებითი და სამკურნალო თვისებების შესწავლისთვის[69; 115]

არსებული ლიტერატურის მიხედვით, ქაცვის ნაყოფში ძირითადად გვხვდება მონო- და დისაქარიდები, როგორცაა გლუკოზა, ფრუქტოზა, საქაროზა და არაბინოზა. თუმცა, მათი ზუსტი რაოდენობრივი შემცველობა და თანაფარდობა შეიძლება განსხვავდებოდეს სხვადასხვა წყაროში მოცემული მონაცემების მიხედვით [116] .

ნახშირწყლების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის გამოყენებული იქნა მაღალი ეფექტურობის ~~ნახშირწყლების~~ სითხური ქრომატოგრაფია (HPLC) – Waters, რომელიც აღჭურვილი იყო რეფრაქციული ინდექსის (RI) დეტექტორით და Binary HPLC Pump 1525 ტუმბოთი. ქრომატოგრაფიული დაყოფა განხორციელდა ამიდურ ქრომატოგრაფიულ სვეტზე (250 მმ x 4.5 მმ) და ნახშირწყლების სვეტზე. სვეტის ტემპერატურა შენარჩუნებული იყო 40°C-ზე. მოძრავ ფაზად გამოყენებული იქნა აცეტონიტრილი/წყლის 85:15 (v/v) ნარევი, 1,2 მლ/წთ ნაკადის სიჩქარით.

ნიმუშების მომზადება ქრომატოგრაფიული ანალიზისთვის განხორციელდა შემდეგი სქემის მიხედვით: პექტინისა და სხვა კოლოიდური ნაერთების დასაღეჭად, წვენს ემატებოდა 96% ეთანოლი 1:1 მოცულობით თანაფარდობით.

ნაყოფის შემთხვევაში 10 გრამიანი ნიმუში დაექვემდებარა ცენტრიფუგირებას 12,000 ბრუნ/წუთში სიჩქარით, 2 წუთის განმავლობაში, 4 °C ტემპერატურაზე. ყველა ნიმუშის შემთხვევაში ცენტრიფუგირების შემდეგ, მიღებულ სუპერნატანტს ემატებოდა 80% აცეტონიტრილის ხსნარი 1:1 მოცულობით თანაფარდობით. სუპერნატანტი გაფილტრულ იქნა მყარი ფაზის ექსტრაქციის (SPE) SEP-PAK C18 კარტრიჯის გამოყენებით და გადატანილ იქნა ანალიზისთვის განკუთვნილ ეპენდორფში [116].

რაოდენობრივი ანალიზი განხორციელდა სტანდარტული შაქრის ხსნარების (გლუკოზა, ფრუქტოზა, არაბინოზა და საქაროზა) გამოყენებით (ცხრილი 1) (იხ. დანართი 1) .

ქაცვის ნაყოფის წვეწმინდაში გამოვლენილი იქნა სამი დომინანტური ნახშირწყალი (სურათი 1) (იხ. დანართი 1): არაბინოზა, გლუკოზა და საქაროზა. ასევე, გამოვლინდა ფრუქტოზის მცირე კონცენტრაცია. წვეწმინდაში მშრალი ნივთიერების საერთო შემცველობა აღემატებოდა 20°Brix-ს, რომლის 85%-მდე ნახშირწყლებს შეადგენდა. გლუკოზის კონცენტრაცია წვეწმინდაში 8%-ს აღემატებოდა, ხოლო საქაროზის კონცენტრაცია 3%-მდე იყო (ცხრილი 2) (იხ. დანართი 1). ეს მონაცემები მიუთითებს ქაცვის ნაყოფის წვეწმინდაში ნახშირწყლების მაღალ შემცველობაზე, რაც მნიშვნელოვანია მისი კვებითი ღირებულებისა და პოტენციური გამოყენების კუთხით.

2.4. ქაცვის ფოთოლსა და ნაყოფში კატიონების თვისობრივი და რაოდენობრივი კვლევა HPLC

კონდუქტომეტრული დეტექტირების მეთოდის გამოყენებით

კატიონები, როგორიცაა კალიუმი, ნატრიუმი, კალციუმი და მაგნიუმი, აუცილებელია ადამიანის ორგანიზმის ნორმალური ფუნქციონირებისთვის. ისინი მონაწილეობენ ელექტროლიტური ბალანსის რეგულირებაში, ნერვული იმპულსების გადაცემაში, კუნთების შეკუმშვაში და სხვა სასიცოცხლო პროცესებში. ქაცვის ფოთოლსა და ნაყოფში კატიონების შემცველობის განსაზღვრა მნიშვნელოვანია მათი კვებითი და სამკურნალო ღირებულების შესაფასებლად.

ამ კვლევის მიზანია ქაცვის ფოთოლში, ნაყოფსა და წვეწმინდაში კატიონების თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრა მაღალი ეფექტურობის თხევადი ქრომატოგრაფიის (HPLC) კონდუქტომეტრული დეტექტირების მეთოდის გამოყენებით. HPLC არის მაღალი მგრძნობელობისა და სელექტიურობის მქონე ანალიტიკური მეთოდი, რომელიც იძლევა კატიონების ზუსტი და სანდო განსაზღვრის საშუალებას. კონდუქტომეტრული დეტექტირება გამოიყენება იონების კონცენტრაციის განსაზღვრისთვის. სტანდარტული კატიონების ხსნარების გამოყენებით მომზადდა საკალიბრო მრუდები, რომლიც საჭიროა გამოყენებულ იქნა კატიონების რაოდენობრივი ანალიზისთვის (ცხრილი 3) (იხ. დანართი 1).

ქაცვის ფოთოლსა და ნაყოფში იდენტიფიცირებულ იქნა ნატრიუმის (Na^+), კალიუმის (K^+), მაგნიუმის (Mg^{2+}) და კალციუმის (Ca^{2+}) იონები (სურათი 2) (იხ. დანართი 1). ფოთოლში დაფიქსირდა კატიონების მაღალი კონცენტრაცია, რაც მიუთითებს მცენარის ამ ნაწილის მინერალურ სიმდიდრეზე. განსაკუთრებით მაღალი იყო მაგნიუმის (Mg^{2+} - 577,6 ppm) და კალიუმის (K^+ - 415.4 ppm) შემცველობა, რაც შეიძლება დაკავშირებული იყოს ფოტოსინთეზის და სხვა ფიზიოლოგიური პროცესების ინტენსიურ მიმდინარეობასთან. შედარებით დაბალი იყო კალციუმის (Ca^{2+} - 26.2 ppm) და ნატრიუმის (Na^+ - 177.2 ppm) კონცენტრაცია (ცხრილი 4) (იხ. დანართი 1).

ნაყოფებში კატიონების კონცენტრაცია მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდა ტერიტორიების მიხედვით, რაც მიუთითებს ნიადაგის შემადგენლობის და კლიმატური პირობების გავლენაზე. ერგეს ნაყოფი ხასიათდება კატიონების შედარებით მაღალი შემცველობით, განსაკუთრებით მაგნიუმის (Mg^{2+} - 65.17 ppm) და კალიუმის (K^+ - 48.02 ppm). თხილნარის ნაყოფი აჩვენებს კატიონების დაბალ კონცენტრაციას, რაც შეიძლება მიუთითებდეს ნიადაგის სიღარიბეზე ან სხვა გარემო ფაქტორებზე. ახალციხის ნაყოფი გამოირჩევა კალიუმის (K^+ - 266.04 ppm) და კალციუმის (Ca^{2+} - 34.08 ppm) შედარებით მაღალი შემცველობით, რაც შეიძლება მიუთითებდეს ამ ტერიტორიის ნიადაგის სპეციფიკურ მინერალურ შემადგენლობაზე. თერჯოლის ნაყოფი აჩვენებს მაგნიუმის (Mg^{2+} - 53.46 ppm) და კალიუმის (K^+ - 40.77 ppm) შედარებით მაღალ შემცველობას, რაც ასევე შეიძლება მიუთითებდეს ამ რეგიონის ნიადაგის სიმდიდრეზე.

მიღებული შედეგებით ფოთლებში კატიონების საერთო კონცენტრაცია მნიშვნელოვნად აღემატება ნაყოფებში დაფიქსირებულ მაჩვენებლებს. ნაყოფებში კატიონების კონცენტრაციის ცვალებადობა მიუთითებს გეოგრაფიული ფაქტორების გავლენაზე.

კალიუმის (K^+) და მაგნიუმის (Mg^{2+}) მაღალი შემცველობა ფოთლებში და ზოგიერთ ნაყოფში მიუთითებს მათ მნიშვნელოვან როლზე მცენარის ფიზიოლოგიურ პროცესებში.

კვლევის შედეგები ხაზს უსვამს ქაცვის ფოთლისა და ნაყოფის მინერალურ სიმდიდრეს, რაც მნიშვნელოვანია მათი კვებითი და სამკურნალო ღირებულების შეფასებისთვის.

2.5. ქაცვის ნაყოფისა და ფოთლის ფენოლური ნაერთების იდენტიფიკაცია ულტრა მაღალეფექტური (წნევის)

სითხური UPLC-PDA, MS მეთოდებით

ფენოლური ნაერთების შემადგენლობა და კონცენტრაცია ქაცვის ნაყოფსა და ფოთოლში შეიძლება მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდეს ნაყოფის ჯიშის, სიმწიფის სტადიის, ზრდის პირობებისა (კლიმატი, ნიადაგი) და გეოგრაფიული არეალის მიხედვით. აქედან გამომდინარე, მათი ზუსტი იდენტიფიცირება და რაოდენობრივი განსაზღვრა წარმოადგენს მნიშვნელოვან ამოცანას ქაცვის ნაყოფისა და ფოთლის ანტიოქსიდანტური და სხვა ბიოლოგიური აქტივობების შეფასებისათვის.

ქრომატოგრაფირებისათვის ნიმუშების (ქაცვის ფოთოლი, ნაყოფი, თესლი) ექსტრაქციას ვახდენდით 50% ეთანოლით, ულტრაბერითი აბაზანის გამოყენებით (ჯერადად, სრულ ექსტრაქციამდე). მიღებული ექსტრაქტის გაფილტვრის შემდეგ ვახდენდით ფილტრატების კონცენტრირებას ვაკუუმის პირობებში მშრალ მასამდე. შემდეგ მიღებულ კონცენტრატს ვამუშავებდით ჰექსანით ცხიმის, ქლოროფილისა და კაროტინოიდების მოსაცილებლად. კოლბაში დარჩენილ მშრალ მასას ვხსნიდით 1-5 მლ მოცულობის მეთანოლში. მეთანოლიან ფრაქციას ვფილტრავდით 0,45 მიკრონის მემბრანულ ფილტრში და ვახდენდით ქრომატოგრაფირებას.

ნივთიერებათა იდენტიფიკაციისა და რაოდენობრივი ანალიზისთვის გამოყენებული იქნა არსებული სტანდარტული ნაერთები (ქლოროგენის მჟავა, კოფეინის მჟავა, გალის მჟავა, კვერცეტინი, (+) კატეჩინის ჰიდრატი), რომლებიც ხშირად გვხვდება ქაცვის ნაყოფში და გამოირჩევა ბიოლოგიური აქტივობით, ნივთიერებათა მასის მონაცემთა ღია ბაზა ("https://metlin.scripps.edu") და რეგენზირებული სამეცნიერო პუბლიკაციებიდან მოპოვებული სპექტრული მონაცემები. ეს მიდგომა შესაძლებლობას იძლეოდა, განხორციელებულიყო რამდენიმე ნაერთის ზუსტი იდენტიფიკაცია.

მას-სპექტრომეტრიული ანალიზი განხორციელდა უარყოფით იონიზაციის რეჟიმში, რის შედეგადაც თითოეული ნივთიერებისთვის განისაზღვრა დეპროტონირებული მოლეკულური იონის $[M-H]^-$ m/z მნიშვნელობა, რაც გვამლევს პირველად წარმოდგენას ნაერთის შესაძლო სტრუქტურაზე. შემდეგი ნაბიჯი იყო ქრომატოგრაფიული მონაცემების ანალიზი. ქრომატოგრაფიიდან განისაზღვრა თითოეული ნივთიერების ქრომატოგრაფიული პიკის შეკავების დრო, რაც წარმოადგენდა დამატებით მახასიათებელს ნაერთის იდენტიფიკაციისთვის. UV-Vis სპექტრიდან განისაზღვრა თითოეული ნივთიერების მაქსიმალური შთანთქმის ტალღის სიგრძე, ასევე სპექტრის ფორმა და ინტენსივობა. ინტენსივობა პროპორციულია ნივთიერების კონცენტრაციისა ხსნარში, რაც გამოიყენება რაოდენობრივი ანალიზისთვის. ყველა მიღებული მონაცემის შედარება და ვალიდაცია საბოლოო ეტაპი იყო იდენტიფიკაციის პროცესში. მას-სპექტრომეტრიული, ქრომატოგრაფიული და UV-Vis მონაცემები შედარებულ იქნა ერთმანეთთან, ასევე სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან. შედარების შედეგები, რომელიც მოიცავს სპექტრულ და ქრომატოგრაფიულ მონაცემებს, წარმოდგენილია გრაფიკულად.

ქაცვის ნაყოფის შედგენილობაში იდენტიფიცირებულია შემდეგი ნაერთები (ცხრილი 5) (იხ. დანართი 1):

ნივთიერება 1-ის მას-სპექტრომეტრიული ანალიზის შედეგად გამოვლინდა დეპროტონირებული მოლეკულური იონი $[M-H]^-$ m/z 191.03 მასით. ქრომატოგრაფიული შეკავების დრო შეადგენდა 2.379 წუთს, ხოლო ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტრი აჩვენებდა მაქსიმალურ შთანთქმას 222.8 და 273.7 ნმ ტალღის სიგრძეზე. მიღებული მონაცემების შედარება სტანდარტულ ნაერთთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან მიუთითებს, რომ ნივთიერება 1 შეესაბამება ქინაქინის მჟავას (Quinic acid) (სურათი 3) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 2-ის უარყოფითი იონიზაციის რეჟიმში მას-სპექტრომეტრიული ანალიზის შედეგად გამოვლინდა $[M-H]^-$ იონი m/z 132.95-ზე. ქრომატოგრაფიული პიკის შეკავების დრო შეადგენდა 2.819 წუთს, ხოლო UV-Vis დეტექტორის მიერ დაფიქსირდა მაქსიმალური შთანთქმა 260.8 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთთან (ვაშლის მჟავა, Sigma-Aldrich) და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან მიღებული სპექტრული მონაცემების შედარების შედეგად ნივთიერება 2 იდენტიფიცირებულ იქნა როგორც ვაშლის მჟავა (სურათი 4) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 3 და 4-ის მას-სპექტრომეტრიული ანალიზის შედეგად გამოვლინდა დეპროტონირებული მოლეკულური იონები $[M-H]^-$ m/z 304.79 და m/z 304.78 მასით, შესაბამისად. ქრომატოგრაფიული შეკავების დრო შეადგენდა 7.781 და 8.473 წუთს, ხოლო ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტრი აჩვენებდა მაქსიმალურ შთანთქმას 271.2 ნმ ტალღის სიგრძეზე ორივე ნივთიერებისთვის. მიღებული მონაცემების შედარება სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან მიუთითებს, რომ ნივთიერება 3 შეესაბამება გალოკატეჩინს (Gallocatechin) (C15H14O7), ხოლო ნივთიერება 4 ეპიგალოკატეჩინს (Epigallocatechin) (C15H14O7) (სურათი 5) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 5-ის მას-სპექტრომეტრიული ანალიზის შედეგად გამოვლინდა დეპროტონირებული მოლეკულური იონი $[M-H]^-$ m/z 609.27-ზე, ფრაგმენტაციის ანალიზით კი დაფიქსირდა ფრაგმენტური იონი m/z 314.91-ზე. ქრომატოგრაფიული შეკავების დრო შეადგენდა 9.269 წუთს, ხოლო ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტრი აჩვენებდა მაქსიმალურ შთანთქმას 352.2 ნმ ტალღის სიგრძეზე (სურათი 6) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 6-ის მას-სპექტრომეტრიული ანალიზის შედეგად გამოვლინდა დეპროტონირებული მოლეკულური იონი $[M-H]^-$ m/z 314.84-ზე, ფრაგმენტაციის ანალიზით კი დაფიქსირდა ფრაგმენტური იონი m/z 299.82-ზე. ქრომატოგრაფიული შეკავების დრო შეადგენდა 11.950 წუთს, ხოლო ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტრი აჩვენებდა მაქსიმალურ შთანთქმას 370.2 ნმ ტალღის სიგრძეზე (სურათი 6) (იხ. დანართი 1).

მიღებული მონაცემების შედარება სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან მიუთითებს, რომ ნივთიერება 5 შეესაბამება იზორამნეტინის წარმოებულს (Isorhamnetin derivative) (C16H12O7), ხოლო ნივთიერება 6 - იზორამნეტინს (Isorhamnetin) (C16H12O7) (სურათი 6) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 7-ის მას-სპექტრომეტრიული ანალიზის შედეგად გამოვლინდა დეპროტონირებული მოლეკულური იონი $[M-H]^-$ m/z 623.15 მასით. ქრომატოგრაფიული შეკავების დრო შეადგენდა 9.177 წუთს, ხოლო ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტრი აჩვენებდა მაქსიმალურ შთანთქმას 351.0 ნმ ტალღის სიგრძეზე. მიღებული მონაცემების შედარება სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან მიუთითებს, რომ ნივთიერება 7 შეესაბამება იზორამნეტინ-3-O-გლუკოზიდ-რამნოზიდს (Isorhamnetin-3-O-glucose-rhamnoside) (C28H32O16) (სურათი 7) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 8-ის დეპროტონირებული მოლეკულური იონი გამოვლინდა m/z 623.01-ზე. ქრომატოგრაფიული პიკის შეკავების დრომ შეადგინა 9.592 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიული ანალიზის შედეგად, ნივთიერება 8-ის შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 335.4 ნმ ტალღის სიგრძეზე. იდენტიფიკაციის დასადასტურებლად, მიღებული სპექტრული და ქრომატოგრაფიული მონაცემები შედარდა სტანდარტულ ნაერთთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან. შედეგად, დადგინდა, რომ ნივთიერება 8 იდენტიფიცირებულ იქნა როგორც იზორამნეტინ-3-*O*-რუტინოზიდი (Isorhamnetin-3-*O*-rutinoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{28}H_{32}O_{16}$ (სურათი 8) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 9-ის მას-სპექტრომეტრიული ანალიზის შედეგად, უარყოფითად დამუხტული მოლეკულური იონი გამოვლინდა m/z 288.88-ზე, რაც შეესაბამება $[M-H]^-$ იონს. პიკის შეკავების დრომ შეადგინა 8.857 წუთი. დადგინდა, რომ ეს ნივთიერება წარმოადგენს m/z 577.13-ზე გამოვლენილი იონის ფრაგმენტაციის პროდუქტს. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიული ანალიზის შედეგად, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 273.7 ნმ-ზე. მიღებული მონაცემებით ნივთიერება 9 შეესაბამება კატეჩინს (Catechin), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{15}H_{14}O_6$ (სურათი 9) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 10-ის ანალიზისას, მას-სპექტრომეტრიამ აჩვენა დეპროტონირებული იონი m/z 609.15-ზე, რაც მიუთითებს $[M-H]^-$ იონზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის შედეგად, ამ ნივთიერების შეკავების დრო დაფიქსირდა 8.732 წუთზე. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი გამოვლინდა 347.2 ნმ-ზე. შედარების საფუძველზე, რომელიც მოიცავდა სტანდარტულ ნაერთებსა და METLIN-ის მონაცემთა ბაზას, ნივთიერება 10 იდენტიფიცირდა როგორც კვერცეტინ-3-*O*-ჰექსოზა-7-*O*-დჰექსოზა (Quercetin-3-*O*-Hexose-7-*O*-dHexose) (სურათი 10) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 11-ის მას-სპექტრული ანალიზის შედეგად, დეპროტონირებული მოლეკულური იონი გამოვლინდა m/z 609.27-ზე, რაც შეესაბამება $[M-H]^-$ იონს. პიკის შეკავების დრო დაფიქსირდა 9.323 წუთზე. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 352.2 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 11 იდენტიფიცირდა როგორც კვერცეტინ-3-*O*-რუტინოზიდი (Quercetin-3-*O*-rutinoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{27}H_{30}O_{16}$ (სურათი 11) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 12-ის მას-სპექტრული ანალიზის შედეგად, უარყოფითად დამუხტული მოლეკულური იონი დაფიქსირდა m/z 300.83-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, პიკის შეკავების დრომ შეადგინა 11.411 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი გამოვლინდა 367.7 ნმ-ზე. სტანდარტული ნაერთების და METLIN მონაცემთა ბაზის მონაცემებთან შედარების შედეგად დადგინდა, რომ ნივთიერება 12 შეესაბამება ელაგის მჟავას (Ellagic acid), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{14}H_6O_8$ (სურათი 12) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 13-ის მას-სპექტრულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ დეპროტონირებული მოლეკულური იონი გამოვლინდა m/z 476.99-ზე, ხოლო ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოიქმნა იონი m/z 301-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 9.909 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 352.8 ნმ-ზე. სტანდარტული ნაერთების და METLIN-ის მონაცემთა ბაზის შედარების საფუძველზე, ნივთიერება 13 იდენტიფიცირდა როგორც იზორამნეტინ-3-*O*-გლუკოზიდი (Isorhamnetin-3-*O*-glucoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{22}H_{22}O_{12}$ (სურათი 13) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 14-ის მას-სპექტრული ანალიზის შედეგად, დეპროტონირებული იონი დაფიქსირდა m/z 593.03-ზე, ხოლო ფრაგმენტაციის შედეგად გამოვლინდა იონი m/z 461.26-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 10.914 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 370.2 ნმ-ზე. შედარების შედეგად, რომელიც მოიცავდა სტანდარტულ ნაერთებსა და METLIN-ის მონაცემთა ბაზას, ნივთიერება 14 იდენტიფიცირდა, როგორც იზორამნეტინ-პენტოზა-რამნოზიდი (Isorhamnetin-pentose-rhamnoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{27}H_{30}O_{15}$ (სურათი 14) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 15-ის მას-სპექტრული ანალიზის შედეგად, უარყოფითად დამუხტული მოლეკულური იონი გამოვლინდა m/z 168.82-ზე, რომელიც წარმოგვს m/z 576.95-ზე გამოვლენილი იონის ფრაგმენტაციის პროდუქტს. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 8.980 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 273.0 ნმ-ზე. სტანდარტული ნაერთების და METLIN-ის მონაცემთა ბაზის მონაცემებთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 15 იდენტიფიცირდა როგორც გალის მჟავა (Gallic acid), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_7H_6O_5$ (სურათი 15) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 16-ის მას-სპექტრული ანალიზის შედეგად, დეპროტონირებული მოლეკულური იონი გამოვლინდა m/z 576.80-ზე. ფრაგმენტაციის პროცესში წარმოიქმნა იონი m/z 289-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 8.766 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 274.3 ნმ-ზე. სტანდარტული ნაერთების და METLIN მონაცემთა ბაზის შედარების შედეგად, ნივთიერება 16 იდენტიფიცირდა როგორც პროციანიდინი 1 (Procyanidin 1), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{30}H_{26}O_{12}$ (სურათი 16) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 17-ის მას-სპექტრული ანალიზის შედეგად, დეპროტონირებული მოლეკულური იონი გამოვლინდა m/z 576.95-ზე, რაც მიუთითებს ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოქმნილ იონზე m/z 168.84-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 8.993 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 273.0 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN მონაცემთა

ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 17 იდენტიფიცირდა როგორც პროციანიდინი 2 (Procyanidin 2), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{30}H_{26}O_{12}$ (სურათი 17) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 18-ის მას-სპექტრული ანალიზის შედეგად, დეპროტონირებული იონი გამოვლინდა m/z 462.80-ზე, ხოლო ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოიქმნა იონი m/z 285-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 9.507 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 354.8 ნმ-ზე. სტანდარტული ნაერთებისა და METLIN მონაცემთა ბაზის შედარების საფუძველზე, ნივთიერება 18 იდენტიფიცირდა როგორც ჰიპეროსიდი (Hyperoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{21}H_{20}O_{12}$ (სურათი 18) (იხ. დანართი 1).

ქაცვის ფოთლის შედგენილობაში იდენტიფიცირებულია:

ნივთიერება, რომელიც იდენტიფიცირებული იყო ქაცვის ნაყოფში, გამოვლინდა ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 190.99-ზე, ფრაგმენტაციის შედეგად კი დაფიქსირდა პიკი m/z 111-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 2.460 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმები დაფიქსირდა 216.7 და 263.8 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად დადასტურდა, რომ ნივთიერება 1 შეესაბამება ქინაქინის მჟავას (Quinic acid) (სურათი 19) (იხ. დანართი 1). ნივთიერება, რომელიც იდენტიფიცირებული იყო ქაცვის ნაყოფში, გამოვლინდა ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 133.00-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 2.646 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 260.8 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთთან (ვაშლმჟავა, Malic acid) და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად დადასტურდა, რომ ნივთიერება 2 შეესაბამება ვაშლმჟავას (Malic acid) (სურათი 20) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 19, რომელიც პირველად იდენტიფიცირდა ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად, გამოვლინდა მას-სპექტრული ანალიზის დროს, სადაც დეპროტონირებული მოლეკულური იონი დაფიქსირდა m/z 330.97-ზე. ფრაგმენტაციის შედეგად ფრაგმენტები არ გამოვლინდა. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 3.577 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 271.5 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 19 იდენტიფიცირდა როგორც გალის მჟავას ჰექსოსიდი (Gallic acid hexoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{13}H_{16}O_{10}$ (სურათი 21) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება, რომელიც იდენტიფიცირებული იყო ქაცვის ნაყოფში, გამოვლინდა ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 304.92-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 7.396 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 271.2 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 3 შეესაბამება გალოკატეჩინს (Gallocatechin), რომლის ემპირიული ფორმულა არის $C_{15}H_{14}O_7$ (სურათი 22) (იხ. დანართი 1).

ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად გამოვლენილი რიგით მე-5 ნივთიერება შეესაბამება ქაცვის ნაყოფში ადრე იდენტიფიცირებულ ნივთიერება 6-ს. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 314.91-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 7.396 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 271.2 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება იდენტიფიცირდა როგორც იზორამნეტინი (Isorhamnetin), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{16}H_{12}O_7$ (სურათი 23) (იხ. დანართი 1).

ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად გამოვლენილი რიგით მე-6 ნივთიერება შეესაბამება ქაცვის ნაყოფში ადრე იდენტიფიცირებულ ნივთიერება 8-ს. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 623.01-ზე. შეკავების დრომ შეადგინა 8.920 წუთი. შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 351.6 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 4 იდენტიფიცირდა როგორც იზორამნეტინ-3-O-რუტინოზიდი (Isorhamnetin-3-O-rutinoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{28}H_{32}O_{16}$ (სურათი 24) (იხ. დანართი 1).

ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად გამოვლენილი რიგით მე-7 ნივთიერება შეესაბამება ქაცვის ნაყოფში ადრე იდენტიფიცირებულ ნივთიერება 7-ს. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 623.01-ზე. შეკავების დრომ შეადგინა 9.587 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 354.7 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება იდენტიფიცირდა როგორც იზორამნეტინ-3-O-გლუკოზიდ-რამნოზიდი (Isorhamnetin-3-O-glucose-rhamnoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{28}H_{32}O_{16}$ (სურათი 25) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 20 იდენტიფიცირდა ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად, რომლის მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 934.31-ზე, ხოლო ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოიქმნა იონი m/z 632.79-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 8.288 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 270 ნმ-ზე. სტანდარტულ

ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება იდენტიფიცირდა როგორც კასუარიქტინი (Casuarictin), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{41}H_{28}O_{26}$ (სურათი 26) (იხ. დანართი 1).
ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად გამოვლენილი რიგით მე-9 ნივთიერება შეესაბამება ქაცვის ნაყოფში ადრე იდენტიფიცირებულ ნივთიერება 11-ს. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 609.12-ზე, ხოლო ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოიქმნა იონი m/z 314.89-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 9.211 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 347.2 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 4 იდენტიფიცირდა როგორც კვერცეტინ-3-O-რუტინოზიდი (Quercetin-3-O-rutinoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{27}H_{30}O_{16}$ (სურათი 27) (იხ. დანართი 1).

ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად გამოვლენილი რიგით მე-10 ნივთიერება მსგავსია ქაცვის ნაყოფში ადრე იდენტიფიცირებული ნივთიერება 12-ის. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 300.91-ზე. შეკავების დრომ შეადგინა 9.686 წუთი. შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 271.2 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 4 იდენტიფიცირდა როგორც ელაგის მჟავა (Ellagic acid), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{14}H_6O_8$ (სურათი 28) (იხ. დანართი 1).

ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად გამოვლენილი რიგით მე-11 ნივთიერება მსგავსია ქაცვის ნაყოფში ადრე იდენტიფიცირებული ნივთიერება 13-ის. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 476.93-ზე, ხოლო ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოიქმნა იონი m/z 301-ზე. შეკავების დრომ შეადგინა 9.931 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 352.2 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 4 იდენტიფიცირდა როგორც იზორამნეტინ-3-O-გლუკოზიდი (Isorhamnetin-3-O-glucoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{22}H_{22}O_{12}$ (სურათი 29) (იხ. დანართი 1).

ნივთიერება 21 ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად გამოვლინდა, რომლის მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 592.95-ზე, ხოლო ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოიქმნა იონი m/z 285-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 7.995 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 272.2 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 21 იდენტიფიცირდა როგორც კემპფეროლ-3-O-რუტინოზიდი (Kaempferol-3-O-rutinoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{28}H_{32}O_{16}$ (სურათი 30) (იხ. დანართი 1).

ქაცვის ფოთლის ანალიზის შედეგად გამოვლენილი რიგით მე-12 ნივთიერება შეესაბამება ქაცვის ნაყოფში ადრე იდენტიფიცირებულ ნივთიერება 18-ს. მისი მას-სპექტრული მახასიათებლები მოიცავს დეპროტონირებულ მოლეკულურ იონს m/z 462.80-ზე, ხოლო ფრაგმენტაციის შედეგად წარმოიქმნა იონი m/z 285-ზე. ქრომატოგრაფიული ანალიზის დროს, შეკავების დრომ შეადგინა 9.507 წუთი. ულტრაიისფერ-ხილული (UV-Vis) სპექტროსკოპიის გამოყენებით, შთანთქმის მაქსიმუმი დაფიქსირდა 272.2 ნმ-ზე. სტანდარტულ ნაერთებთან და METLIN-ის მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად, ნივთიერება 4 იდენტიფიცირდა როგორც ჰიპეროზიდი (Hyperoside), რომლის ემპირიული ფორმულაა $C_{21}H_{20}O_{12}$ (სურათი 31) (იხ. დანართი 1).

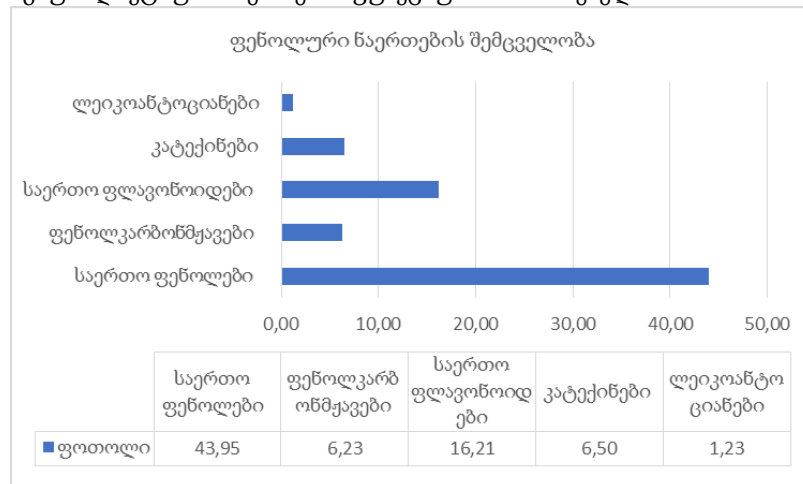
დადგინდა, რომ ქაცვის ნაყოფი და ფოთლი წარმოადგენს ბიოაქტიური ნაერთების მდიდარ წყაროს, ულტრა მაღალეფექტური (წნევის) სითხური UPLC-PDA, MS მეთოდით ქაცვის ფოთოლსა და ნაყოფში იდენტიფიცირებულ იქნა 21 ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთი: 1 ორგანული მჟავა, 3 ფენოლკარბონმჟავა და 17 ფლავონოიდი. მიღებული მონაცემები ავლენს მნიშვნელოვან განსხვავებებს ნაყოფისა და ფოთლის ფიტოქიმიურ შემადგენლობაში: ვაშლის მჟავა (m/z 132.95) გამოვლინდა ორივე ნიმუშში. ფენოლკარბონმჟავებიდან: ქინაქინის (m/z 191.03) და ელაგის მჟავა (m/z 300.83) ორივე ნაწილში დაფიქსირდა. გალის მჟავა (m/z 168.82) მხოლოდ ნაყოფში იდენტიფიცირებულ იქნა. ფლავონოიდური ნაერთებიდან: გალოკატექინი (m/z 304.89) და იზორამნეტინი (m/z 314.85) ორივე ნიმუშში იყო წარმოდგენილი. ეპიგალოკატექინი (m/z 304.78), კატექინი (m/z 288.88) და პროციანიდინები (m/z 476.80, 576.95) მხოლოდ ნაყოფში გამოვლინდა. ფოთლი გამოირჩეოდა გალის მჟავას ჰექსოზიდისა და კასუარიქტინის შემცველობით. განსაკუთრებით აღსანიშნავია იზორამნეტინის გლიკოზიდების (m/z 476.99, 593.03, 623.01, 623.15) დომინირება ნაყოფში, ხოლო კემპფეროლ-3-O-რუტინოზიდი (m/z 593.03) მხოლოდ ფოთოლში იდენტიფიცირებულ იქნა. ეს შედეგები მნიშვნელოვანია ქაცვის სამკურნალო და კვების პროდუქტებში გამოყენების პერსპექტივის შესაფასებლად, განსაკუთრებით ანტიოქსიდანტური და ფარმაცოლოგიური თვისებების გათვალისწინებით.

2.6. ქაცვის ნაყოფისა და ფოთლის ფენოლური ნაერთების რაოდენობრივი ანალიზი

ქრომატოგრაფიული ანალიზის შედეგები გვიჩვენებს რომ მცენარის ნაყოფი და ფოთლი განსაკუთრებით მდიდარია ბიოლოგიურად აქტიური ფენოლური ნაერთებით.

ფენოლური ნაერთები და ფლავონოიდები ცნობილია თავისი ანტიოქსიდანტური, ანთების საწინააღმდეგო და ანტიმიკრობული თვისებებით. კატექინები და ლეიკოანტოციანები, რომლებიც ფლავონოიდების ქვეჯგუფებს წარმოადგენენ, ასევე გამოირჩევიან მაღალი ბიოლოგიური აქტივობით. ამ ნაერთების რაოდენობრივი განსაზღვრა ქაცვის ფოთოლსა და ნაყოფში აუცილებელია მათი კვებითი და სამკურნალო ღირებულების შესაფასებლად.

ამ კვლევის მიზანია სპექტრული მეთოდების გამოყენებით განისაზღვროს საერთო ფენოლების, ფენოლკარბონმჟავების, საერთო ფლავონოიდების, კატექინების და ლეიკოანტოციანების რაოდენობა ქაფის ფოთოლსა და ნაყოფში. გარდა ამისა, კვლევის ფარგლებში განისაზღვრება ანტიოქსიდანტური აქტივობა, რომელიც წარმოადგენს ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ფუნქციურ მახასიათებელს.



დიაგრამა 1. ქაფის ფოთოლში ფენოლური ნაერთების შემცველობა

ქაფის ფოთოლში საერთო ფენოლები წარმოდგენილია 43,95 მგ/გ, ფენოლკარბონმჟავები 6,23 მგ/გ, საერთო ფლავონოიდები 16,21 ერთეულით. ფლავონიდებუდან კატექინები არის 6,50 და ლეიკოანტოციანები 1,23 მგ/გ ერთეულით. ფლავონოიდებში წარმოდგენილი სხვაობა 8,48 მგ/გ -ის რაოდენობით ეკუთვნის ფოთოლში იდენტიფიცირებულ სხვა ფლავონოიდებს (დიაგრამა 1).

საერთო ფენოლების შემცველობა სხვადასხვა ტერიტორიაზე აღებულ ნაყოფში მერყეობს 19,90 – 30,58 მგ/გ ფარგლებში, მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით, შედარებით მაღალი მაჩვენებელი დაფიქსირდა ახალციხის ნიმუშში 34,94 მგ/გ. საერთო ფენოლებიდან ფენოლკარბონმჟავები შემცველობა 2,24-დან 3,43 -მდეა მგ/გ, ფლავონოიდების კონცენტრაცია დაახლოებით 10-ჯერ უფრო მეტია 16,72 – 27,01 მგ/გ, ვდრე ფენოლკარბონმჟავების.

სხვადასხვა გეოგრაფიული წარმოშობის ქაფის ნაყოფში ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების რაოდენობრივი ანალიზით გამოავლინდა მნიშვნელოვანი ვარიაციები საერთო ფენოლების, ფენოლკარბონმჟავების, ფლავონოიდების, კატექინებისა და ლეიკოანტოციანების შემცველობაში.

საერთო ფენოლების კონცენტრაცია ნაყოფებში მერყეობდა 19.90-დან 30.58 მგ/გ-მდე მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით. გამოწვევის წარმოადგენდა ახალციხის ნიმუში, სადაც დაფიქსირდა მნიშვნელოვნად მაღალი მაჩვენებელი - 34.94 მგ/გ. რაც შეიძლება გამოწვეულ იყოს ახალციხის რეგიონის ნიადაგისა და კლიმატური პირობების პოტენციურ გავლენაზე ფენოლური ნაერთების სინთეზში. ფენოლკარბონმჟავების შემცველობა ნაყოფებში მნიშვნელოვნად დაბალი იყო და მერყეობდა 2.24-დან 3.43 მგ/გ-მდე. ფლავონოიდების კონცენტრაცია ნაყოფებში დაახლოებით 10-ჯერ აღემატებოდა ფენოლკარბონმჟავების შემცველობას და მერყეობდა 16.72-დან 27.01 მგ/გ-მდე. რაოდენობის ასეთი მაჩვენებლები მიუთითებს ფლავონოიდების დომინირებაზე ქაფის ნაყოფში და მნიშვნელოვან წილად განსაზღვრავს მათ ანტიოქსიდანტურ თუ სხვა ბიოლოგიურ აქტივობას.

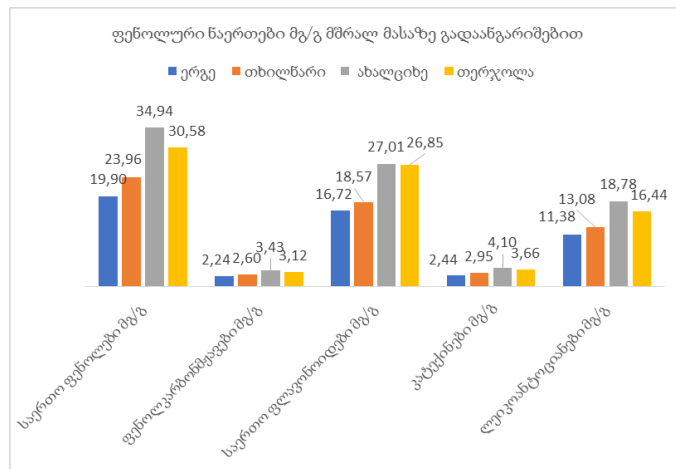
ფლავონოიდების ქვეჯგუფებიდან იდენტიფიცირდა კატექინები (2.44-4.10 მგ/გ) და ლეიკოანტოციანები (11.38-18.78 მგ/გ). კატექინების შემცველობა მცირედით განსხვავდებოდა ნიმუშებს შორის, შედარებით მაღალი მაჩვენებლები დაფიქსირდა თერჯოლისა (3.66 მგ/გ) და ახალციხის (4.10 მგ/გ) ნიმუშებში. ლეიკოანტოციანების შემთხვევაშიც მსგავსი ტენდენცია გამოვლინდა: ერგე (11.38 მგ/გ), თხილნარი (13.08 მგ/გ), ახალციხე (18.78 მგ/გ) და თერჯოლა (16.44 მგ/გ) (ცხრილი 6 და 7) (იხ. დანართი 1)

ანტიოქსიდანტური აქტივობა შეფასდა DPPH რადიკალის ინჰიბირების მეთოდით და წარმოდგენილია ორი ფორმით: პირველი, DPPH რადიკალის 50%-იანი ინჰიბირებისთვის საჭირო ნიმუშის მასა (მგ), და მეორე, ფარდობითი ანტიოქსიდანტური აქტივობა, რომელიც გამოხატავს პირველი მაჩვენებლის უკუპროპორციულ დამოკიდებულებას. შედეგებმა აჩვენა, რომ ახალციხის ნიმუშს, რომელიც გამოირჩეოდა საერთო ფენოლების მაღალი შემცველობით, ჰქონდა ყველაზე მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობა. ამ ნიმუშისთვის DPPH რადიკალის 50%-იანი ინჰიბირებისთვის საჭირო იყო მხოლოდ 2.881 მგ ნიმუში. ეს მიუთითებს, რომ ახალციხის ქაფის ნაყოფი შეიცავს ანტიოქსიდანტების მაღალ კონცენტრაციას. სხვა ნიმუშებთან შედარებით, თერჯოლის ნიმუშისთვის DPPH რადიკალის 50%-იანი ინჰიბირებისთვის საჭირო იყო 3.702 მგ ნიმუში, თხილნარისთვის - 4.188 მგ, ხოლო ერგესთვის - 6.15 მგ. ეს მონაცემები მიუთითებს, რომ ამ ნიმუშებს ჰქონდათ შედარებით დაბალი ანტიოქსიდანტური აქტივობა, რაც შეესაბამება მათში ფენოლური ნაერთების დაბალ შემცველობას (ცხრილი 8) (იხ. დანართი 1).

ზოგადად, რაც უფრო მაღალია ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების, განსაკუთრებით ფენოლური ნაერთების, კონცენტრაცია ნიმუშში, მით უფრო ნაკლები ნიმუშის მასაა საჭირო DPPH რადიკალის 50%-იანი ინჰიბირებისთვის. ეს მიუთითებს უკუპროპორციულ დამოკიდებულებაზე ნაერთების კონცენტრაციასა და ინჰიბირებისთვის საჭირო ნიმუშის მასას შორის. ფარდობითი ანტიოქსიდანტური აქტივობის მაჩვენებელი

გამოყენებულ იქნა იმისთვის, რომ ნათლად წარმოჩენილიყო პირდაპირპროპორციული დამოკიდებულება საერთო ფენოლების კონცენტრაციასა და ანტიოქსიდანტურ აქტივობას შორის. ფარდობის მაჩვენებელი აადვილებს მონაცემების ინტერპრეტაციას.

დიაგრამა 2 ნათლად ასახავს სხვადასხვა ტერიტორიაზე აღებული ნაყოფებში საერთო ფენოლების, ფენოლკარბონმჟავების, ფლავონოიდების, კატექინებისა და ლეიკოანტოციანების შემცველობას.



დიაგრამა 2. საქართველოს სხვადასხვა ტერიტორიაზე აღებული ქაცვის ნაყოფში ფენოლური ნაერთების შემცველობა

სპექტრული მეთოდებით ჩატარებულმა რაოდენობრივმა ანალიზმა გამოავლინა მნიშვნელოვანი განსხვავებები ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების შემცველობაში ქაცვის ფოთოლსა და სხვადასხვა გეოგრაფიული წარმოშობის ნაყოფებში (დიაგრამა 2. კვლევამ აჩვენა, რომ ქაცვის ფოთოლი და ნაყოფი წარმოადგენს ფენოლური ნაერთებით, განსაკუთრებით ფლავონოიდებით, მდიდარ ნედლეულს. ფოთოლი გამოირჩევა ფენოლური ნაერთების უფრო მაღალი კონცენტრაციით, ვიდრე ნაყოფი. ნაყოფში ფენოლური ნაერთების შემცველობა მნიშვნელოვნად ცვალებადობს გეოგრაფიული წარმოშობის მიხედვით, რაც მიუთითებს გარემო ფაქტორების გავლენაზე მათ სინთეზზე. ახალციხის ნიმუში გამოირჩევა ფენოლური ნაერთების მაღალი შემცველობით და ანტიოქსიდანტური აქტივობით.

2.7. ქაცვის ნაყოფის ლიპიდური ნაერთების ინოვაციური კვლევები და მათი გამოყენება ოფთალმოლოგიურ მალამოებში

ქაცვის ნაყოფის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მოპოვების მეთოდებს მნიშვნელოვანი გავლენა აქვს ექსტრაქტის ხარისხსა და შემადგენლობაზე, წინამდებარე კვლევის მიზანია ქაცვის ნაყოფის ლიპიდური ბუნების ნაერთების ოპტიმიზირებული და ეკოლოგიურად სუფთა ("მწვანე") ექსტრაქციის მეთოდის შემუშავება და მიღებული ექსტრაქტის შემადგენლობის შესწავლა აირ-სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდით. ეს მიდგომა ხელს შეუწყობს ქაცვის ნაყოფის ლიპიდური ფრაქციის, როგორც პოტენციური ოფთალმოლოგიური სამკურნალო საშუალების, შემდგომ შესწავლასა და დახასიათებას. ქაცვის ნაყოფის ლიპიდური კომპონენტების შესწავლა განხორციელდა აირ-სითხური ქრომატოგრაფიის (GC) მეთოდით.

ცხიმოვანი მჟავების GC ანალიზისთვის, მოვახდინეთ მათი წინასწარი დამუშავება, ეთერიფიკაცია, რაც ზრდის მათ აქროლადობას და აუმჯობესებს დაყოფის ეფექტურობას. ეთერიფიცირებული ცხიმოვანი მჟავების მეთილის ეთერები შევიყვანეთ GC-ში, სადაც ხდება მათი ჯამდაყოფა და დეტექტირება ალური იონიზაციის დეტექტორის (FID) გამოყენებით.

ქაცვის ნაყოფის ლიპიდური კომპონენტების დეტალური ანალიზი აირ-სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდით ხელს შეუწყობს ნაყოფის ბიოლოგიური აქტივობის სრულყოფილად შესწავლას და ახალი ფუნქციური საკვები და ფარმაცევტული პროდუქტების შემუშავებას.

კარბონმჟავების შემადგენლობის განსაზღვრა განხორციელდა აირ-სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდით, TRACETM 1310 Gas Chromatograph (Thermo Scientific)-ის გამოყენებით. ქრომატოგრაფიული დაყოფა განხორციელდა კაპილარულ სვეტზე Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME GC Column/CP7489, რომლის პარამეტრები იყო: სიგრძე 100 მ, შიდა დიამეტრი 0.25 მმ და უძრავი ფაზის ნაწილაკების ზომა 0.20 მკმ.

ლიპიდური ბუნების ნაერთების გაზურ-სითხური ქრომატოგრაფიისთვის საჭიროა ნიმუშების ეთერიფიკაცია. ამ მიზნით, ნიმუშები წინასწარ გაიფილტრა მექანიკური მინარევების მოსაშორებლად. შემდეგ, 1 მლ ნიმუში გადატანილ იქნა ცენტრიფუგის სინჯარაში, სადაც დაემატა 0.5 მლ 2 ნორმალური KOH-ის 96% სპირტსხნარი (შესაძლებელია ეთანოლის ან მეთანოლის გამოყენება). ამის შემდეგ, დაემატა 10 მლ ჰექსანი (საერთო მოცულობა 11.5 მლ). ნარევი ინტენსიურად იქნა შერეული სრულ გახსნამდე (მინიმუმ 30 წამის განმავლობაში) და დაცენტრიფუგირდა 1 წუთის განმავლობაში 13500 ბრ/წთ-ზე. საკვლევი ნიმუშის 1.0 მკლ ინჟექტირება

განხორციელდა SGE Analytical Science-ის 10 მკლ მიკროშპრიცის გამოყენებით ნიმუშის ზედა ფრაქციიდან. ინჟექტორის ტემპერატურა შენარჩუნებული იყო 260°C-ზე. ნიმუშის სვეტში შეყვანისას, ჰელიუმის ნაკადში განხორციელდა დაყოფა თანაფარდობით 1/20. მოძრავი ფაზის, ჰელიუმის, ნაკადის სიჩქარე შეადგენდა 5.21

ქრომატოგრაფიული დაყოფა განხორციელდა ტემპერატურული გრადიენტის გამოყენებით, რომელიც სამ ეტაპად იყო დაყოფილი. პირველ ეტაპზე, ტემპერატურა შენარჩუნებული იყო 120°C-ზე 8 წუთის განმავლობაში. მეორე ეტაპზე, ტემპერატურა გაიზარდა 180°C-მდე 8°C/წთ სიჩქარით და შენარჩუნდა 18 წუთის განმავლობაში. მესამე ეტაპზე, ტემპერატურა გაიზარდა 230°C-მდე 3°C/წთ სიჩქარით და შენარჩუნდა აღნიშნულ ტემპერატურაზე 13 წუთის განმავლობაში. ქრომატოგრაფიული ანალიზის საერთო ხანგრძლივობამ შეადგინა 61.17 წუთი.

ქრომატოგრაფიული დაყოფის შედეგად მიღებული კარბონმჟავების მეთილის ეთერების დეტექტირება განხორციელდა ალური იონიზაციის დეტექტორის გამოყენებით. დეტექტორის ტემპერატურა შენარჩუნებული იყო 300°C-ზე. წყალბადის მიწოდება შეადგენდა 40 მლ/წთ-ს, ჰაერის მიწოდება 400 მლ/წთ-ს, ხოლო გამომავალი აირების განდევნა ხორციელდებოდა ჰელიუმის ნაკადით 25 მლ/წთ სიჩქარით.

კომპონენტების იდენტიფიკაცია, რომლებიც გამოვლინდა ქრომატოგრაფიული ანალიზის შედეგად, განხორციელდა სტანდარტული ნიმუშის, Supelco 37 Component FAME Mix (პროდუქტის ნომერი: CRM47885, პარტიის ნომერი: LRAD3869), გამოყენებით, რომლის შემადგენლობაც წინასწარ იყო ცნობილი.

კვლევის მიზანი იყო ქაცვის ნაყოფიდან მიღებული ზეთის ცხიმოვანი მჟავების ექსტრაქციის ოთხი განსხვავებული მეთოდის შედარებითი ანალიზი: სოქსლეტის ექსტრაქცია (მეთოდი 1, ექსტრაგენტი ჰექსანი) (სურათი 32) (იხ. დანართი 1), ულტრაბგერითი ზონდირება (მეთოდი 2, ექსტრაგენტი 50% ეთანოლი) (სურათი 32), ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქცია (მეთოდი 3) (სურათი 33) და ცივი დაწნეხა (მეთოდი 4) (სურათი 33) (იხ. დანართი 1). კვლევის ფარგლებში განხორციელდა ცხიმოვანი მჟავების იდენტიფიკაცია და რაოდენობრივი განსაზღვრა. თითოეული მეთოდით მიღებული ზეთი გამოირჩეოდა განსხვავებული ცხიმოვანი მჟავების მრავალფეროვნებით. სულ იდენტიფიცირებულია 28 კომპონენტი, აქედან 5 უცნობი ნაერთია. იდენტიფიცირებულია ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავები: Butyric acid methyl ester (4:0), Caproic acid methyl ester (6:0), Caprylic acid methyl ester (8:0), Capric acid methyl ester (10:0), Undecanoic acid methyl ester (C11:0), Lauric acid methyl ester (C12:0), Myristic acid methyl ester (C14:0), Pentadecanoic acid methyl ester (C15:0), Palmitic acid methyl ester (C16:0), Stearic acid methyl ester (C18:0), Heptadic acid methyl ester (C17:0), Arachidic acid methyl ester (C20:0). ტრანს-უჯერი ცხიმოვანი მჟავა Elaidic acid methyl ester (C18:1n9t) და მონოუჯერი ცხიმოვანი მჟავა: Myristic acid methyl ester (C14:1), Palmitoleic acid methyl ester (C16:1) და Oleic acid methyl ester (C18:1n9c). პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავა Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c), α-Linolenic acid methyl ester (C18:3n3c) (ცხრილი 9).

მონაცემების ანალიზით დადგინდა, რომ დაბალმოლეკულური ცხიმოვანი მჟავები (ბუტირის, კაპრონის, კაპრილის, კაპრინის, უნდეკანოინის, ლაურილის) მხოლოდ სოქსლეტის ექსტრაქციით მიღებულ ზეთში გამოვლინდა, რაც მიუთითებს ამ მეთოდის უნიკალურ ექსტრაქციის ხერხზე. მირისტინის მჟავა სოქსლეტის ექსტრაქციით მიღებულ ზეთში ყველაზე მაღალი კონცენტრაციით იყო წარმოდგენილი (4.371), ხოლო ცივ დაწნეხვის ზეთში მცირე რაოდენობით (0.200).

პალმიტინის მჟავა ცივი დაწნეხვის ზეთში ყველაზე მაღალი კონცენტრაციით იყო წარმოდგენილი (29.102 %), ხოლო სხვა მეთოდებით მიღებულ ზეთებში შედარებით ნაკლები (10.121-16.317 %). პალმიტოლეინის მჟავა ცივი დაწნეხვის ზეთში ყველაზე მაღალი კონცენტრაციით იყო წარმოდგენილი (12.844%), ხოლო სოქსლეტის ექსტრაქციით მიღებულ ზეთში ყველაზე დაბალი (1.024%). სტეარინის მჟავა სოქსლეტის ექსტრაქციით მიღებულ ზეთში ყველაზე მაღალი მაჩვენებლით გამოირჩეოდა (25.808), ხოლო ცივ დაწნეხვის ზეთში ყველაზე დაბალი (1.192%). ოლეინის მჟავას კონცენტრაცია ცივი დაწნეხვის ზეთში ყველაზე მაღალი იყო (48.127%), ხოლო სოქსლეტის ექსტრაქციით მიღებულ ზეთში შედარებით დაბალი (20.359%). ლინოლეინის მჟავა ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქციით მიღებულ ზეთში ყველაზე მაღალი შემცველობით იყო (48.335%) და ცივ დაწნეხვის ზეთში უმნიშვნელო რაოდენობით გვხვდებოდა (1.998%). ალფა-ლინოლენის მჟავა ულტრაბგერითი ზონდირებით მიღებულ ზეთში ყველაზე მაღალი კონცენტრაციით იყო წარმოდგენილი (14.740%), ხოლო ცივ დაწნეხვის ზეთში შედარებით ნაკლები რაოდენობით (10.106%). ელაიდინის მჟავა (ტრანს-ცხიმი) მხოლოდ სოქსლეტის ექსტრაქციით მიღებულ ზეთში გამოვლინდა (0.537%). ბეჰენატი (Behenate) ყველაზე მაღალი მაჩვენებლით ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქციით მიღებულ ზეთში დაფიქსირდა (0.192%) (ცხრილი 9) (იხ. დანართი 1).

სოქსლეტის ექსტრაქცია იძლევა ცხიმოვანი მჟავების ყველაზე მრავალფეროვან სპექტრს, მაგრამ შეიცავს ტრანს-ცხიმებს და დაბალმოლეკულურ მჟავებს. სოქსლეტის მეთოდს გააჩნია მნიშვნელოვანი ნაკლოვანებები, მათ შორის ხანგრძლივი ექსტრაქციის დრო (18 საათი) და ტოქსიკური ორგანული გამხსნელის (ჰექსანის) გამოყენება, რაც არ შეესაბამება მწვანე ქიმიის პრინციპებს. ულტრაბგერითი ზონდირების მეთოდი გამოირჩევა ომეგა-3 და ომეგა-6 ცხიმოვანი მჟავების მაღალი გამოსავლიანობით. ულტრაბგერითი ზონდირების მეთოდი წარმოადგენს მწვანე ექსტრაქციის მეთოდს, რომელიც იყენებს შედარებით ნაკლებად ტოქსიკურ გამხსნელს, 50% ეთანოლს, და მნიშვნელოვნად ამცირებს ექსტრაქციის დროს (30 წუთი). ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქცია ეფექტურია ომეგა-6-ის ექსტრაქციისთვის და ეკოლოგიურად სუფთაა. ცივი დაწნეხვის მეთოდი იძლევა ოლეინის მჟავას მაღალ კონცენტრაციას, მაგრამ ომეგა-3-ის გამოსავლიანობა დაბალია.

ქაცვის ნაყოფის ბიოაქტიური ნაერთების შემცველი მალამოს დამზადებისათვის ექსტრაქციის მეთოდის შერჩევა უნდა ეფუძნებოდეს კონკრეტულ მიზანს - მაქსიმალურად გაიზარდოს ისეთი ცხიმოვანი მჟავების შემცველობა,

რომლებსაც გააჩნიათ გამოხატული რეგენერაციული და ანთების საწინააღმდეგო მოქმედება თვალის ზედაპირულ პოსტტრავმულ ნაწიბურებზე.

ქაცვის ნაყოფის ბიოაქტიური ნაერთების ოფთალმოლოგიური გამოყენების მიზნით მალამოს ფორმულირებისა და მისი თვალის ზედაპირული პოსტტრავმული ნაწიბურების რეგენერაციაზე ზემოქმედების შესწავლის ფარგლებში ჩატარებულმა ექსტრაქციის მეთოდების შედარებითმა ანალიზმა ცხადყო, რომ თითოეული მეთოდი (სოქსლეტის ექსტრაქცია, ულტრაბგერითი ზონდირება, ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქცია და ცივი დაწნეხა) მნიშვნელოვნად განსხვავდება მიღებული ცხიმოვანი მჟავების შემცველობის მიხედვით.

კვლევამ აჩვენა, რომ ულტრაბგერითი და ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქციის მეთოდები უზრუნველყოფს ანთების საწინააღმდეგო და რეგენერაციული თვისებების მქონე - Oleic acid methyl ester (C18:1n9c), α-Linolenic acid methyl ester (C18:3n3c) (ომეგა-3) და Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c) (ომეგა-6) მაღალ შემცველობას. ეს კი გადამწყვეტია თვალის ზედაპირული პოსტტრავმული ნაწიბურების სამკურნალოდ.

ცივი დაწნეხის მეთოდით მიღებული ექსტრაქტი ასევე ხასიათდება α-Linolenic acid methyl ester (C18:3n3c) (ომეგა-3), Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c) (ომეგა-6) და Oleic acid methyl ester (C18:1n9c) მნიშვნელოვანი კონცენტრაციით. აღნიშნული ცხიმოვანი მჟავების კომბინაცია შესაძლოა ხელი შეუწყოს დაზიანებული ქსოვილების აღდგენასა და ნაწიბურების წარმოქმნის შემცირებას.

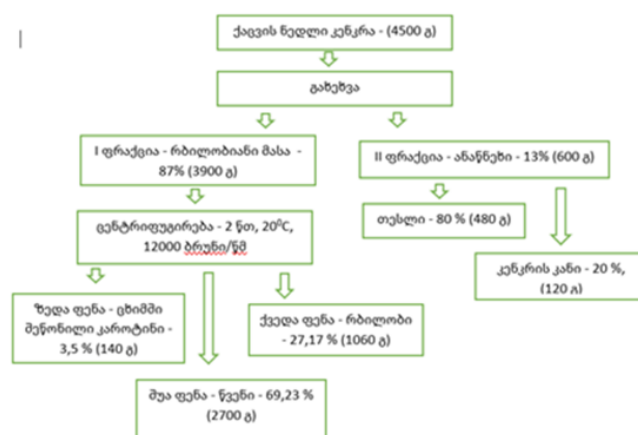
მიუხედავად იმისა, რომ სოქსლეტის ექსტრაქცია გვთავაზობს ფართო სპექტრის ცხიმოვანი მჟავების მიღების შესაძლებლობას, ტრანს-ცხიმების წარმოქმნისა და ეკოლოგიური ასპექტების გათვალისწინებით, მისი გამოყენება მალამოს დასამზადებლად შეიძლება იყოს ნაკლებად სასურველი.

შესაბამისად, ულტრაბგერითი ზონდირებისა და ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქციის მეთოდებით მიღებული ექსტრაქტები, ისევე როგორც ცივი დაწნეხის ზეთი, პერსპექტიულია შემდგომი კვლევებისთვის, რომლებიც მიმართული იქნება მათ ეფექტურობაზე თვალის ზედაპირული დაზიანებების რეგენერაციის პროცესში.

3. ქაცვის ნაყოფის კომპლექსური გადამამუშავება და ანარჩენების ვალორიზაცია

კვების მრეწველობის ნარჩენები, რომლებიც მოიცავს ორგანულ და არაორგანულ მასალებს, წარმოადგენს სერიოზულ პრობლემას, როგორც ეკოლოგიური, ასევე ეკონომიკური თვალსაზრისით. კვების მრეწველობაში ნარჩენები წარმოიქმნება პროცესის სხვადასხვა ეტაპზე, ნედლეულის წარმოებიდან პროდუქციის შეფუთვამდე. ძირითადი წყაროებია: სასოფლო-სამეურნეო და სასმელების წარმოების ნარჩენები. მსოფლიო სამეცნიერო კვლევები ნარჩენების მართვის სხვადასხვა მიდგომას გვთავაზობს, რომლებიც შემდეგნაირად შეიძლება დაჯგუფდეს: ნარჩენების პრევენცია (წარმოების პროცესების ოპტიმიზაცია ნარჩენების წარმოქმნის შესამცირებლად), პროდუქტის ვარგისიანობის ვადის გახანგრძლივება, შეფუთვის ოპტიმიზაცია და მომხმარებელთა ცნობიერების ამაღლება საკვების ნარჩენების შემცირების შესახებ. ასევე, ნარჩენების ღირებულ პროდუქტებად, მათ შორის სხვადასხვა დანიშნულების პრეპარატებად გარდაქმნა მნიშვნელოვან მიდგომას წარმოადგენს. აღნიშნული ნარჩენები მდიდარია ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთებით, როგორიცაა ფენოლური ნაერთები, ვიტამინები და ცხიმოვანი მჟავები. კვლევის მიზანს ქაცვის ნარჩენებიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების დადგენა და ნაერთების იდენტიფიკაცია წარმოადგენდა. ნაყოფის გადამამუშავება წარმოებდა ლაბორატორიაში, ნახევრად საწარმოო პირობებთან მიახლოებულ გარემოში (სურათი 34). გადასამუშავებლად აღებულ იქნა 4500 გ ქაცვის კენკრა (ნედლი). სახეში (პომიდვრის გასახეხად განკუთვნილი სახეხი) გატარების შემდეგ მიღებულ იქნა 2 ფრაქცია: რბილობიანი მასა - 3900 გ (კენკრის საერთო მასის 87%), რომელიც ძირითადად შედგება მეზოკარპისა და ენდოკარპისაგან, და ანაწნები - 600 გ (კენკრის საერთო მასის 13%). იგი ძირითადად შეიცავს კენკრის კანსა და თესლს (სურათი 46).

ნაერთების იდენტიფიკაცია განხორციელდა ქრომატოგრაფიული და სპექტროსკოპული მეთოდების გამოყენებით. კვლევის ფარგლებში გამოყენებული იქნა მწვანე ტექნოლოგიები, მათ შორის ულტრაბგერითი ზონდით და ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქცია, ასევე განხორციელდა მათი შედარება კლასიკურ ექსტრაქციის მეთოდთან (მაცერაცია).



სურათი 34. ქაცვის ნაყოფის გადამამუშავების სქემა

რბილობიანი ნაწილის (3900გ) შემდგომი დაყოფისა და ფრაქციონირებისთვის განხორციელდა ცენტრიფუგირება 12000 ბრუნი/წუთში სიჩქარით, 20°C ტემპერატურაზე, 2 წუთის განმავლობაში. ცენტრიფუგირების პროცესი ეფუძნებოდა ფრაქციების კომპონენტების სიმკვრივისა და ხსნადობის სხვაობას. შედეგად, რბილობიანი ფრაქცია დაექვემდებარა ფაზურ დაყოფას და გამოვლინდა სამი მკაფიოდ გამოჩენილი ფენა (სურათი 35) (იხ. დანართი 1)

ზედა ლიპოფილური ფენა (140 გ, რბილობიანი ფრაქციის 3.59%): ეს ფენა ძირითადად შედგებოდა ცხიმში შეწონილი კაროტინოიდებისგან. კაროტინოიდები, როგორც ტეტრატერპენოიდული ლიპოფილური პიგმენტები, ხასიათდებიან მაღალი ხსნადობით არაპოლარულ გამხსნელებში, როგორიცაა ცხიმები, რამაც განაპირობა მათი კონცენტრირება ზედა ფაზაში (სურათი 35).

შუა წყალში ხსნადი ფენა (2700 გ, რბილობიანი ფრაქციის 69.23%): ეს ფენა წარმოადგენდა წყალხსნარს, რომელიც შეიცავდა ჰიდროფილურ კომპონენტებს, როგორიცაა შაქრები, ორგანული მჟავები და სხვა წყალში ხსნადი ნაერთები (სურათი 35).

ქვედა ნალექი (1060 გ, რბილობიანი ფრაქციის 27.17%): ეს ფენა შედგებოდა მექანიკური ნაწილაკებისა და უხსნადი კომპონენტებისგან, როგორიცაა უჯრედის კედლის ფრაგმენტები, ბოჭკოები და სხვა მყარი ნაწილაკები, რომელთა სიმკვრივე აღემატებოდა წყალს (სურათი 36).

შეწონილი კაროტინის ფრაქცია, 2) შუა ფენა - წყალში ხსნადი და 3) ქვედა ფენა - ნალექი

შემდგომ ეტაპზე კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ქაფვის კენკრის გადამუშავების შედეგად წარმოქმნილი ნარჩენების (რბილობი, ანაწეხი) ვალორიზაცია, მათგან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების დადგენა და ნაერთების იდენტიფიკაცია, რათა შემდგომში ამ ნაერთების გამოყენებით შეგვექმნა ანტიოქსიდანტებით მდიდარი პრეპარატები.

3.1. ქაფვის რბილობიდან ულტრაბგერითი ზონდის გამოყენებით ბიოლოგიურად აქტიური პრეპარატების მიღება და მისი გამოყენების პერსპექტივები ოფთალმოლოგიური მალამოებში

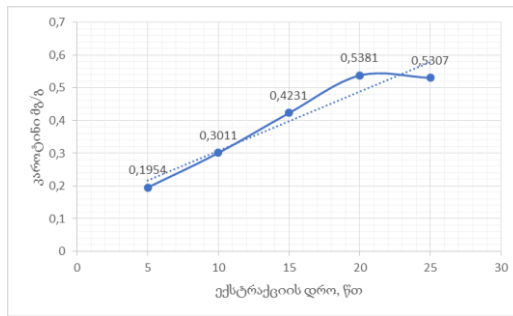
კაროტინოიდების რაოდენობრივი ანალიზის შედეგად დადგინდა, რომ ნედლეულ ქაფვის კენკრაში მათი შემცველობა 3.051 მგ/გ-ს შეადგენს მშრალ მასაზე გადანაზრდობით. კაროტინოიდების უმეტესი ნაწილი (2.745 მგ/გ) კონცენტრირდება რბილობიან ფრაქციაში, ხოლო ანაწეხის ფრაქციაში მათი შემცველობა 0.236 მგ/გ-ია (ცხრილი 10). რბილობში არსებული კაროტინოიდების თითქმის ორი მესამედი (1.817 მგ/გ) წარმოდგენილია ზედა ცენტრიფუგირებულ ფენაში, რომელიც ცხიმთან შეწონილ ლიპოფილურ ფრაქციას (პრეპარატი 1) წარმოადგენს. მიღებულ პრეპარატში ცხიმის შემცველობა ნედლეულის 3%-ია. კაროტინოიდების უმნიშვნელო რაოდენობა (0.046 მგ/გ) რჩება წვეწმში, ხოლო 0.868 მგ/გ - ცენტრიფუგირებულ რბილობის მასაში (ცხრილი 11) (იხ. დანართი 1). ცენტრიფუგირებული რბილობის მასიდან კაროტინოიდების მაქსიმალური ექსტრაქციისთვის გამოყენებულ იქნა ულტრაბგერითი ექსტრაქცია "მწვანე" ექსტრაგენტების გამოყენებით. ულტრაბგერითი ზონდის მეთოდით რბილობის ექსტრაქცია განხორციელდა მცენარეული ცხიმისა და სხვადასხვა კონცენტრაციის ეთანოლის გამოყენებით. ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების შესარჩევად შესწავლილ იქნა შემდეგი პარამეტრები: მყარი მასისა და ექსტრაგენტის თანაფარდობა, ექსტრაქციის ტემპერატურა, ხანგრძლივობა და ექსტრაგენტის ტიპი.

ექსტრაქციის ეფექტურობა განისაზღვრა ცხიმში ექსტრაგირებული კაროტინოიდების სკანირებით ულტრაიისფერ და ხილულ არეში ექსტრაქციის ყოველ 5 წუთში (სურათი 48). ექსტრაქციის პირველ 20 წუთში კაროტინოიდების შემცველობა 0.1954-დან 0.5381-მდე გაიზარდა, ხოლო შემდგომ 5 წუთში პიგმენტების კონცენტრაციის ზრდა არ დაფიქსირდა (დიაგრამა 3). ექსტრაქციის დასრულების შემდეგ ექსტრაგირებული მასა ცენტრიფუგირებულ იქნა 2 წუთის განმავლობაში 20°C-ზე და 8000 ბრუნი/წუთში სიჩქარით. ცენტრიფუგირების შედეგად ცხიმი გამოეყო რბილობიან მასას, მასში ექსტრაგირებული კაროტინოიდების შედეგად ზეთის შეფერილობა მკვეთრი ნარიწისფერი იყო, ხოლო რბილობიანი მასა - გაუფერულებული (სურათი 38 (გ))(იხ. დანართი 1).

მცენარეული ცხიმის გამოყენებით ულტრაბგერითი ზონდის მეთოდით ექსტრაქციის ოპტიმალურ პირობებად განისაზღვრა: მყარი მასისა (ქაფვის ცენტრიფუგირებული რბილობი - ნედლეული მასა) და მზესუმზირის ზეთის თანაფარდობა 1:1, ტემპერატურა 30-35°C (ტემპერატურის რეგულირება ხდებოდა ყინულოვანი აბაზანის გამოყენებით), ამპლიტუდა 50%, ექსტრაქციის ხანგრძლივობა 20 წუთი (დიაგრამა 3) (სურათი 49) (იხ. დანართი 1).



სურათი 37. კაროტინის სკანირება



დიაგრამა 3. ქაფის ცენტრიფუგირებული რბილობიდან ულტრაბერითი ზონდით კაროტინების ექსტრაქციის მრუდი

კაროტინოიდებით გამდიდრებულ მზესუმზირის ზეთსა და მზესუმზირის ზეთის საწყის ნიმუშში განისაზღვრა ხარისხობრივი მაჩვენებლები: თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების შემცველობა, ზეჟანგური რიცხვი, n-ანიზიდინის მაჩვენებელი, კაროტინოიდების შემცველობა და ანტიოქსიდანტური აქტივობა.

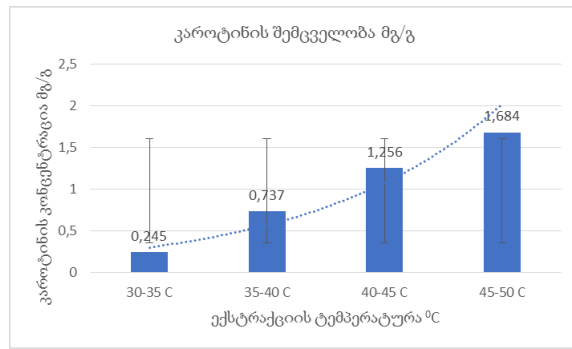
საკონტროლო მზესუმზირის ზეთის ნიმუშთან შედარებით, მჟავიანობა სტაბილური იყო, ზეჟანგური და n-ანიზიდინის რიცხვები შემცირდა, კერძოდ, მჟავიანობის მაჩვენებელი 0.05% (საკონტროლო ზეთი) და 0.06%-ია (გამდიდრებულ ზეთში). ზეჟანგური რიცხვი 2.8-დან 2.56-მდე, ხოლო n-ანიზიდინის რიცხვი 3.73-დან 3.22-მდე შემცირდა (ცხრილი 12). ეს მიუთითებს იმაზე, რომ კაროტინოიდებით გამდიდრებულ ზეთში აღდგენილი ნაერთებისა და პეროქსიდების რაოდენობა ნაკლებია საკონტროლო ზეთის ნიმუშთან შედარებით, რაც გაზრდის ზეთის ოქსიდაციურ სტაბილურობას.

ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრის შედეგად დადგინდა, რომ კაროტინოიდებით გამდიდრებული ზეთი ხასიათდებოდა 3.5-ჯერ უფრო მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობით საკონტროლო ნიმუშთან შედარებით. კერძოდ, 0.1 მმოლ/ლ DPPH რადიკალის 50%-იანი ინჰიბირებისთვის საჭირო იყო 0.33 მგ კაროტინოიდებით გამდიდრებული ზეთი, ხოლო საკონტროლო ზეთის შემთხვევაში - 1.17 მგ (ცხრილი 2). აღნიშნული შედეგები მიუთითებს იმაზე, რომ ქაფის რბილობიდან ზეთში ექსტრაქტირებული კაროტინოიდები (საშუალოდ 0.5941 მგ/გ მშრალ მასაზე) მნიშვნელოვნად ზრდის ზეთის ანტიოქსიდანტურ აქტივობას (ცხრილი 12) (იხ. დანართი 1).

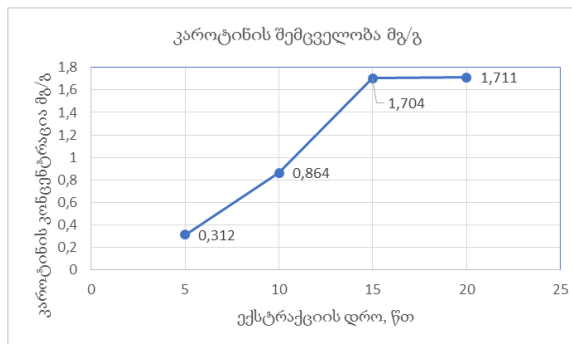
მოცემული მონაცემებით შეიძლება დავასკვნათ, რომ კაროტინოიდების დამატებამ გამოიწვია ზეთის ხარისხის გარკვეული გაუმჯობესება. მჟავიანობისა და ზეჟანგური რიცხვის შემცირება მიუთითებს იმაზე, რომ კაროტინოიდებმა გამოავლინეს გარკვეული ანტიოქსიდანტური აქტივობა და შეანელებს ზეთის დაჟანგვის პროცესს. ქაფის რბილობიდან ფენოლური ნაერთების ექსტრაქციისათვის ულტრაბერითი ზონდის მეთოდით ასევე გამოყენებულ იქნა სხვადასხვა კონცენტრაციის ეთანოლი. საწყის ეტაპზე დაიტესტა ექსტრაგენტის ეფექტურობა, კერძოდ ექსტრაგენტად აღებულ იქნა: წყალი, 25%, 50% და 75% ეთანოლი. ასევე დადგენილ იქნა, მყარი მასისა და ექსტრაგენტის თანაფარდობა, ოპტიმალურად განისაზღვრა 1:20-თან თანაფარდობა. საექტრაქციო მასა ექსტრაგენტთან ერთად ექვემდებარებოდა ჰომოგენიზაციას 7000 ბრუნზე 1 წთ-ის განმავლობაში. ექსტრაქციისათვის ასევე შერჩეულ იქნა 4 ტემპერატურული რეჟიმი: 30 – 35°C, 35 – 40°C, 40 – 45°C და 45 – 50°C.

პირველ ეტაპზე განსაზღვრულ იქნა ოპტიმალური ექსტრაგენტის ტიპი, ექსტრაქტრაგირებული ნივთიერებების, ანტიოქსიდანტური აქტიურობის, კაროტინისა და ჯამური ფენოლური ნაერთების შემცველობის მიხედვით. ეთანოლის კონცენტრაციის მატებასთან ერთად ექსტრაგირებული ნივთიერებების შემცველობა არ იზრდება, მაგრამ მატულობს კაროტინებისა და ფენოლების რაოდენობა, შესაბამისად მაღალია ანტიოქსიდანტური აქტიურობაც. უმაღლესი შედეგები მიღებულ იქნა 75% ეთანოლის გამოყენებისას, სადაც კაროტინების კონცენტრაცია შეადგენდა 1.684 მგ/გ-ს, ხოლო ფენოლების - 8.213 მგ/გ-ს. კაროტინების შემცველობა თითქმის 2-ჯერ ნაკლებია 50% ეთანოლის ექსტრაქტში (0.703 მგ/გ) და გაცილებით ნაკლებია 25% ეთანოლის (0.282 მგ/გ) და წყლიანი ექსტრაქტის (0.121 მგ/გ) შემთხვევაში. საერთო ფენოლების შემცველობა მატულობს ეთანოლის კონცენტრაციის პარალელურად (2,324 -დან 8,213 მგ/გ-მდე) (ცხრილი 13). შესაბამისად მაღალია ანტიოქსიდანტური აქტიურობის მახასიათებელიც, კერძოდ ნიმუშის 0.163 მგ-ია (75% ეთანოლის ექსტრაქტის შემთხვევაში) საკმარისი DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირებისათვის, მაშინ როცა სხვა ექსტრაქტების შემთხვევაში ინჰიბირებისათვის საჭირო ნიმუშის მასა იზრდება 0.239 მგ-დან 0.547 მგ-მდე. ეს მონაცემები მიუთითებს იმაზე, რომ 75% ეთანოლი არის ოპტიმალური ექსტრაგენტი ქაფის რბილობიდან ბიოაქტიური ნაერთების მისაღებად (ცხრილი 13).

კაროტინების თერმოლაბილური ბუნების გათვალისწინებით, ექსტრაქციის ოპტიმალური ტემპერატურის დასადგენად ჩატარდა ექსპერიმენტები სხვადასხვა ტემპერატურულ რეჟიმში. შედეგად დადგინდა, რომ კაროტინების მაქსიმალური ექსტრაქცია მიიღწევა 45-50°C ტემპერატურაზე. ტემპერატურის ზრდასთან ერთად კაროტინების ექსტრაქცია მნიშვნელოვნად გაიზარდა 0.245 მგ/გ-დან (30-35°C) 1.684 მგ/გ-მდე (45-50°C) (დიაგრამა 4) (იხ. დანართი 1).



დიაგრამა 4. ულტრაბგერითი ზონდით კაროტინის ექსტრაქციის ოპტიმალური ტემპერატურული რეჟიმის დადგენა



დიაგრამა 5. ულტრაბგერითი ზონდით კაროტინის ექსტრაქციის ოპტიმალური დროის დადგენა

ოპტიმალური ექსტრაქციის პირობების დასადგენად, განისაზღვრა როგორც ტემპერატურის, ასევე დროის გავლენა ექსტრაქციის ეფექტურობაზე. ექსტრაქციის დროის ოპტიმიზაციისთვის ჩატარდა ექსპერიმენტები სხვადასხვა დროის ინტერვალებში. შედეგად დადგინდა, რომ კაროტინების მაქსიმალური გამოსავალი მიიღწევა 15 წუთიანი ულტრაბგერითი დამუშავებისას. მომდევნო 5 წუთის განმავლობაში კაროტინების რაოდენობა აღარ გაზრდილა (დიაგრამა 5). შედეგად დადგინდა, რომ 75% ეთანოლით ულტრაბგერითი ექსტრაქცია 45-50°C ტემპერატურაზე 15 წუთის განმავლობაში უზრუნველყოფს კაროტინების მაქსიმალურ გამოსავალს. უფრო ხანგრძლივი ექსტრაქცია არ იწვევს კაროტინების შემცველობის მნიშვნელოვან ზრდას, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ექსტრაქციის პროცესი დასრულებულია.

მიღებული ექსტრაქტიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების გამოსაყოფად, ჩატარდა ფრაქციონირების პროცესი. კერძოდ, კაროტინების იზოლირებისათვის ექსტრაქტი გაცივდა 4°C ტემპერატურაზე 24 საათის განმავლობაში (სურათი 39), რის შედეგადაც მოხდა კაროტინების გამოლექვა (სურათი 39). ფორმირებული ნალექის გამოსაყოფად ექსტრაქტი ცენტრიფუგირებული იქნა 12,000 ბრ/წთ სიჩქარით 4°C -ზე 2 წუთის განმავლობაში. მიღებული ნალექი, რომელიც შეიცავდა კაროტინებს, ლიოფილიზირებულ იქნა და მივიღეთ კაროტინების შემცველი პრეპარატი 2 (პრეპარატის მასა 15 მგ).

კაროტინების ექსტრაქციის პარალელურად 75% ეთანოლი ოპტიმალური აღმოჩნდა ფენოლური ნაერთების ექსტრაქციისათვის, კერძოდ წყლით ექსტრაქციის შემთხვევაში ფენოლების შემცველობა 6,324 მგ/გ, ეთანოლის კონცენტრაციასთან ერთად ექსტრაგირებული ფენოლების რაოდენობა პროპორციულად მატულობს 25% ეთანოლის შემთხვევაში - 9,805 მგ/გ, 50% ეთანოლის შემთხვევაში - 13,661 მგ/გ და 75% ეთანოლის შემთხვევაში 24,213 მგ/გ მშრალ მასაზე გადანაგარიშებით. ექსტრაგირებული ფენოლების კონცენტრაციამ შეადგენა ნაყოფში არსებული ფენოლების (ნაყოფში ფენოლების კონცენტრაცია 30,58 მგ/გ) დაახლოებით 80 % (ცხრილი 13).

ფენოლური ნაერთებით მდიდარი პრეპარატის მისაღებად, ცენტრიფუგირების შემდეგ მიღებული სუპერნატანტი კონცენტრირებული იქნა როტაციული ვაკუუმის აპარატში 40°C ტემპერატურაზე. კონცენტრატი ლიოფილიზირებული იქნა და მივიღეთ ფენოლური ნაერთებით მდიდარი პრეპარატი. 100 გ ნედლი რბილობის ექსტრაგირების შემდეგ მიღებულ იქნა 2 გ მშრალი მასა (პრეპარატი 3), რომელშიც ფენოლების კონცენტრაცია იყო 250 მგ/გ და ანტიოქსიდანტური განისაზღვრა როგორც 0,011 მგ (კერძოდ პრეპარატის 0,011 მგ იყო სავარისი რადიკალის 50% ინჰიბირებისათვის) (ცხრილი 14) (იხ. დანართი 1).

ქაცვის ნაყოფის გადამუშავების შედეგად დარჩენილი 100 გ ცენტრიფუგირებული რბილობიდან მიღებულ პრეპარატი (2 გ მშრალი პრეპარატი) შეიცავს 500 მგ ფენოლურ ნაერთებს, 0,69 გ ცილას, 0,102 გ პექტინს და 0,708 გ ნახშირწყლებს (ნახშირწყლების შემცველობა გამოთვლილ იქნა სხვაობით) (ცხრილი 14).

ქაცვის რბილობიდან მიღებულ იქნა ოთხი სხვადასხვა სახის პრეპარატი, რომლებიც განსხვავდებიან შემადგენლობითა და მიღების მეთოდით:

პრეპარატი 1: ლიპოფილური კაროტინოიდების კონცენტრატი (ქაცვის ზეთი), რომელიც მიღებულია ცენტრიფუგირებული ნედლი ქაცვის რბილობისგან და წარმოადგენს ცხიმთან შეწონილ ლიპოფილურ ფრაქციას (კაროტინოიდების კონცენტრაცია: 1.817 მგ/გ და ცხიმის შემცველობა 3% (ნედლი ნაყოფის)).

პრეპარატი 2: კაროტინოიდების ფხვნილი, რომელიც მიღებულ იქნა ულტრაბგერითი ექსტრაქციის მეთოდით (75% ეთანოლით), რომელიც წარმოადგენს კაროტინოიდების წყაროს ფარმაცევტული და კოსმეტიკური მრეწველობისათვის. 100 გ ნედლი რბილობიდან მიღებულ იქნა 15 მგ კაროტინი.

პრეპარატი 3: ფენოლური ნაერთების ფხვნილი, რომელიც მიღებულ იქნა ულტრაბგერითი ექსტრაქციის მეთოდით (75% ეთანოლით), 100 გრ ნედლი რბილობიდან მიღებულ იქნა 2 გრ მშრალი მასა რომელიც 500 მგ ფენოლურ ნაერთებს, 0,69 გ ცილას, 0,102 გ პექტინს და 0,708 გ ნახშირწყლებს. შეიძლება გამოყენებულ იქნეს ფარმაცევტულ და კოსმეტიკურ მრეწველობაში, როგორც ფენოლური ნაერთების კონცენტრირებული წყარო.

ულტრაბგერითი ექსტრაქციის მეთოდით ასევე მიღებულ იქნა, კაროტინოიდებით გამდიდრებული მცენარეული ზეთი (კაროტინოიდების კონცენტრაცია: 0.5941 მგ/გ მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით), გაუმჯობესებული ხარისხობრივი მაჩვენებლები (მჟავიანობის, ზეჟანგური და α -ნაიზიდინის რიცხვების შემცირება) და 3.5-ჯერ უფრო მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობით საკონტროლო ზეთთან შედარებით. იგი შეიძლება გამოყენებულ იქნეს კვების მრეწველობაში, როგორც კაროტინოიდებით გამდიდრებული ზეთი.

კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ ქაცვის კენკრის გადამუშავების შედეგად წარმოქმნილი ნარჩენები (რბილობი) წარმოადგენს კაროტინოიდებისა და ფენოლური ნაერთების მდიდარ წყაროს. ულტრაბგერითი ზონდირების მეთოდით და "მწვანე" ექსტრაგენტების (მცენარეული ზეთი, ეთანოლი) გამოყენებით მიღებულ იქნა კაროტინოიდებითა და ფენოლური ნაერთებით გამდიდრებული პრეპარატები. კაროტინოიდების ანტიოქსიდანტური და ანთების საწინააღმდეგო მოქმედება ხელს უწყობს ოქსიდაციური სტრესისა და ანთებითი პროცესების შემცირებას თვალის ზედაპირზე, რასაც გადაწყვეტი მნიშვნელობა აქვს ნაწიბურების ფორმირების პრევენციისა და რეგენერაციის პროცესის სტიმულირებისთვის. ფენოლური ნაერთების პრეპარატი, შეიძლება იყოს ერთ-ერთი ფუნქციური კომპონენტი ოფთალმოლოგიური მალამოს შემადგენლობაში, რომელიც ანტიოქსიდანტური თვისებების გამო, ხელს შეუწყობს უჯრედების დაცვას დაზიანებისგან და რეგენერაციას.

„მწვანე ტექნოლოგიების“ გამოყენება უზრუნველყოფს ეკოლოგიურად სუფთა და ეფექტურ მიდგომას ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მისაღებად. მიღებული შედეგები ქმნის მყარ საფუძველს შემდგომი *in vitro* და *in vivo* კვლევებისთვის, რათა შეფასდეს მიღებული პრეპარატების ეფექტურობა თვალის ზედაპირული პოსტტრავმული ნაწიბურების რეგენერაციაში და დასაბუთდეს მათი გამოყენების შესაძლებლობა პრაქტიკაში.

3.2. ქაცვის ანაწნებიდან „მწვანე“ ტექნოლოგიებით ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ექსტრაქცია და მისი გამოყენების პერსპექტივები ოფთალმოლოგიაში

ქაცვის წვენი წარმოების შემდგომ დარჩენილი ანაწნები წარმოადგენს ცხიმებისა და ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების, მათ შორის ფენოლური ნაერთების, მნიშვნელოვან წყაროს (ცხრილი). ჩვენი კვლევის შედეგების თანახმად, ქაცვის ნედლი ანაწნები, რომელიც დაახლოებით 80% თესლისა და 20% ნაყოფის კანისგან შედგება (ცხაურის გამოყენებით - 0.5 - 1.0 მმ ზომის) (სურათი 40) (ცხრილი 15), შეიცავს 11.95%-დან 13.22%-მდე ცხიმს (ცხრილი 16) (მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით) და 0.140-დან 0.583 მგ/გ-მდე კაროტინს (მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით) (ცხრილი 15) (იხ. დანართი 1).

კაროტინების რაოდენობრივი ანალიზის შედეგად დგინდება, რომ ანაწნების ცალკეულ ფრაქციაში კაროტინების შემცველობა თითქმის ერთნაირია თესლში 0,112 მგ/გ (80%-ან გამოსავალზე გადაანგარიშებით) და 0,117 მგ/გ კანში (20%-ან გამოსავალზე გადაანგარიშებით) მშრალ მასაში (ცხრილი 15) (იხ. დანართი 1).

ფენოლური ნაერთების სპექტრალური ანალიზის შედეგად დგინდება, რომ ნედლი ანაწნების საერთო ფენოლური ნაერთების შემცველობა შეადგენს 89,41 მგ/გ, საიდანაც 16,95 მგ/გ მოდის ფენოლკარბონმჟავებზე და 64,71 მგ/გ - ფლავონოიდებზე. ფლავონოიდებიდან ძირითადად წარმოდგენილია კატექინები (25,90 მგ/გ) და ლეიკოანტოციანინები (44,45 მგ/გ). ქაცვის ანაწნების ექსტრაქტის ანტიოქსიდანტური აქტივობა საკმაოდ მაღალია, კერძოდ ანაწნების 0,766 მგ-ია საკმარისი DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირებისათვის (ცხრილი 17) (იხ. დანართი 1).

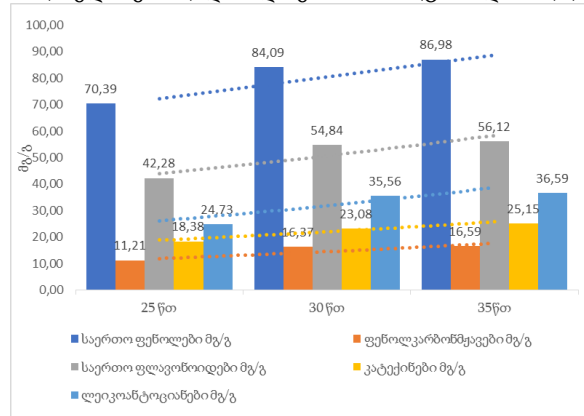
მიღებული შედეგების გათვალისწინებით, ჩვენი მიზანია გახდეს ქაცვის ანაწნების ნარჩენების მინიმუმამდე შემცირება და მისი ღირებული კომპონენტების მაქსიმალური გამოყენება მწვანე ტექნოლოგიების საშუალებით. ამ მიზნით, ჩვენ გამოვიყენეთ ულტრაბგერითი ზონდით ექსტრაქცია და სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქცია, რომლებიც გამოირჩევიან მაღალი ეფექტურობით, სელექტიურობით და ეკოლოგიური სიწმინდით.

ექსპერიმენტის ეფექტურობა განისაზღვრა ექსტრაქციის გამოსავლიანობით, რომელიც გამოითვალა ცხიმების, კაროტინების და ფენოლური ნაერთების შემცველობის მიხედვით. ორივე მეთოდით მიღებული ექსტრაქტები დაექვემდებარა შემდგომ დამუშავებას, მათ შორის ცენტრიფუგირებას, ცხიმის გამოყოფას, კონცენტრირებას და ლიოფილიზაციას, რათა მიღებულიყო სტაბილური და კონცენტრირებული პრეპარატები.

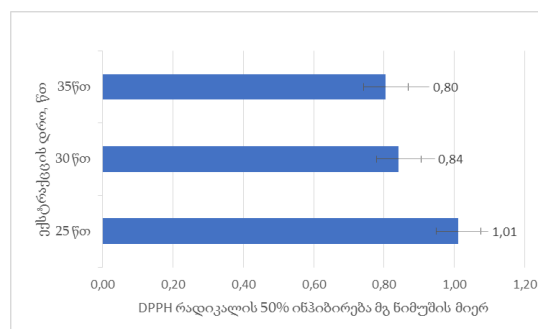
საწყის ეტაპზე ნიმუში ექსტრაგენტთან ერთად ექვემდებარებოდა ჰომოგენიზაციას 2 წთ-ის განმავლობაში ნედელის გაჯირჯებისა და ჰიდრატაციის ხარისხის გასაუმჯობესებლად (15000 RPM - ბრუნის რაოდენობა ერთ წუთში, WITEG -ის ფირმის ჰომოგენიზატორი). ექსტრაქციისათვის ოპტიმალურად განისაზღვრა მყარი მასისა და სითხის თანაფარდობა 1: 20 - თან, ამპლიტუდა 50%, იმპულსური სამუშაო ციკლი და გამხსნელი 75 % ეთანოლი.

ექსტრაქციიდან 25 წუთზე ექსტრაქტირებულ იქნა საერთო ფენოლები 70,39 მგ/გ, ფენოლკარბონმჟავები 11,21 მგ/გ, ფლავონოიდები 42,28 მგ/გ, კატექინები 18,38 მგ/გ და ლეიკოანტოციანები 24,73მგ/გ (მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით) (დიაგრამა 6). მომდევნო 5 წუთის განმავლობაში, ექსტრაქციიდან 30-ე წუთზე ამ ნაერთების შემცველობა გაიზარდა 4-დან 12-ერთეულამდე (ფენოლები 70,39-დან 84,09-მდე). ექსტრაქციის დროის შემდგომი გახანგრძლივება არ იწვევდა ექსტრაქციის გამოსავლიანობის მნიშვნელოვან ზრდას, რის გამოც ოპტიმალური დრო განისაზღვრა 30 წუთი (დიაგრამა 6). შემდგომ ეტაპზე მოვახდინეთ ექსტრაქტის ცენტრიფუგირება 20 C ტემპერატურის პირობებში 7 000 ბრუნზე 2 წთ-ის განმავლობაში (დიაგრამა 6). პარალელურად განსაზღვრულ იქნა ექსტრაქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობა და გამოვლინდა კორელაციური დამოკიდებულება ფენოლური ნაერთების კონცენტრაციასა და ანტიოქსიდანტურ აქტივობას შორის (დიაგრამა 7).

მიღებული ექსტრაქტი დავაყოვნეთ ოთახის ტემპერატურაზე (24 საათით) და მოხდა ცხიმის განშრევა. მიღებული ცხიმის რაოდენობამ შეადგინა 7,365 %, რაც ცხიმის თეორიულ გამოსავალს (კლასიკური, სოქსლეტის მეთოდით მიღებულ მაჩვენებელთან (11,95%) შედარებით) დაახლოებით 62% (ცხრილი 16) (იხ. დანართი 1).



დიაგრამა 6. ქაგვის ნედლი ანაწიხის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ექსტრაქცია ულტრაბგერითი ზონდის გამოყენებით

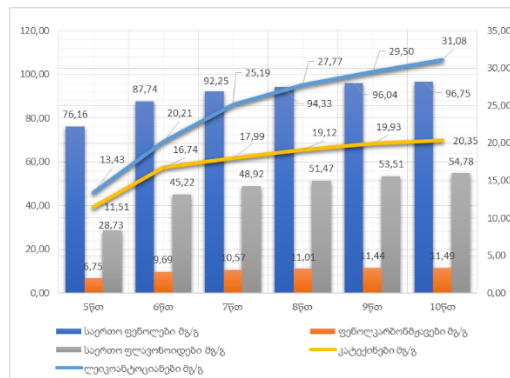


დიაგრამა 7. ქაგვის ნედლი ანაწიხიდან ულტრაბგერითი ზონდის გამოყენებით მიღებული ექსტრაქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობა

ცხიმის მოცილების შემდეგ მოვახდინეთ ექსტრაქტის დაკონცენტრირება ვაკუუმის პირობებში 45C ტემპერატურაზე, მიღებული კონცენტრატი გავაშრეთ ლიოფილურად. 100 გ ნედლი ანაწიხიდან მიღებულ იქნა 6,72 გ ლიოფილიზირებული პრეპარატი, რომელშიც ფენოლების შემცველობა იყო 4 გ, კერძოდ 71,4 მგ/გ მშრალ მასაში.

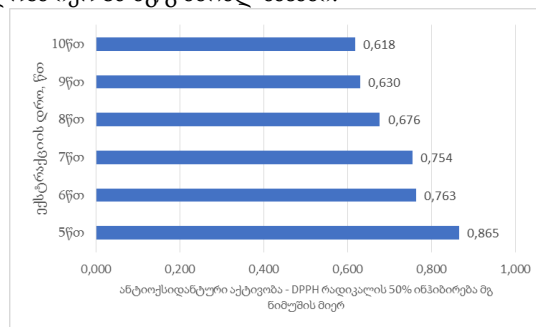
ზევრიტიკული წყლის ექსტრაქციის პროცესში მყარი ნიმუშისა და წყლის თანაფარდობა შენარჩუნდა 1:20, რაც წინა ექსპერიმენტში გამოყენებული თანაფარდობის ტოლია. ექსტრაქციის ეფექტურობა შეფასდა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების გამოსავლიანობით. ულტრაბგერითი ექსტრაქციისგან განსხვავებით, სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქციით 5 წუთში მიღებულ ექსტრაქტში საერთო ფენოლების შემცველობა შეადგენდა 76,16 მგ/გ (ფენოლკარბონმჟავები - 6,75 მგ/გ, ფლავონოიდები - 28,73 მგ/გ, მათ შორის კატექინები 11,51 მგ/გ და ლეიკოანტოციანინები 13,43 მგ/გ). ექსტრაქციის დროის გაზრდით 6 წუთამდე, საერთო ფენოლების შემცველობა გაიზარდა და შეადგინა 87,74 მგ/გ, ხოლო 7 წუთზე მიაღწია 92,25 მგ/გ მნიშვნელობას (დიაგრამა 8). შედეგები მიუთითებს, რომ სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქციის ოპტიმალური დრო ფენოლური ნაერთების მაქსიმალური გამოსავლიანობის მისაღებად შეადგენს 7 წუთს. ექსტრაქციის მომდევნო 3 წუთის განმავლობაში უნიშვნელოდ მატულობს ჯამური ფენოლების რაოდენობა, დაახლოებით 5 ერთეულით (92,25-დან 96,75-მდე მგ/გ). შედეგები აჩვენებს, რომ სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქცია 7 წუთის განმავლობაში უზრუნველყოფს ფენოლური ნაერთების მაქსიმალურ გამოსავლიანობას (დიაგრამა 8). პარალელურად განსაზღვრულ იქნა ექსტრაქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობა და გამოვლინდა კორელაციური დამოკიდებულება ფენოლური ნაერთების კონცენტრაციასა და ანტიოქსიდანტურ აქტივობას შორის (დიაგრამა 9). მიღებული წყლიანი ექსტრაქტის გაფიტვის შემდეგ დავაყოვნეთ ოთახის ტემპერატურაზე (24 საათით) და მოხდა ცხიმის განშრევა. მიღებული

ცხიმის რაოდენობამ შეადგინა 10,27 %, რაც ცხიმის თეორიულ გამოსავალს (კლასიკური, სოქსლეტის მეთოდით მიღებულ მაჩვენებელთან (11,95%) შედარებით) დაახლოებით 86% (ცხრილი 16). მაგრამ კაროტინების შემცველობის მიხედვით სუპერკრიტიკული წყლით ექსტრაქციით მიღებულ ცხიმში არ ფიქსირდება კაროტინების შემცველობა, მაშინ როცა ულტრაბერითი ზონდით ექსტრაგირებულ ცხიმში 0,105 მგ/გ-ში მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით.



დიაგრამა 8. ქაფის ნედლი ანაწიხის (თესლი/კანი) ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქციის პირობები და ფენოლური ნაერთების შემცველობა

შემდგომ ეტაპზე განხორციელდა წყლიანი ექსტრაქტის კონცენტრირება ვაკუუმის პირობებში (55 C ტემპერატურის პირობებში) და მოვახდინეთ მიღებული კონცენტრატის ლიოფილიზაცია. 100 გ ნედლი ანაწიხიდან ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქციის მიღებულ იქნა თითქმის მსგავსი მასა 5,2 გ ლიოფილიზირებული პრეპარატი, რომელშიც ფენოლების შემცველობა იყო 80 მგ/გ მშრალ მასაში.



დიაგრამა 9. ქაფის ნედლი ანაწიხის (თესლი/კანი) ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქტების ანტიოქსიდანტური აქტივობა

მიღებულ პრეპარატებში ფენოლური ნაერთების თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრის შედეგად, სულ იდენტიფიცირებულ იქნა 28 ნივთიერება, საიდანაც 4 იდენტიფიცირებული არ არის. ნივთიერებათა იდენტიფიკაციის და რაოდენობრივი ანალიზისთვის გამოყენებული იქნა ჩვენს ხელთ არსებული სტანდარტული ნაერთები ნივთიერებათა მასის მონაცემთა ღია ბაზა ("https://metlin.scripps.edu") და რეცენზირებული სამეცნიერო პუბლიკაციებიდან მოპოვებული სპექტრული მონაცემები [7; 46; 64; 141].

იდენტიფიცირებული ნივთიერებები მიეკუთვნებიან ორგანული მჟავების, ტერპენოიდების და ფლავონოიდების კლასებს. ფლავონოიდები წარმოდგენილია ფლავონოლებისა და ფლავანოლების ქვეჯგუფებით. კერძოდ, იდენტიფიცირებულ იქნა: ორგანული მჟავები: კვინის მჟავა (Quinic acid), ვაშლის მჟავა (Malic acid), ლიმონის მჟავა (Citric acid). ფლავონოლები: კვერცეტინი (Quercetin), კვერცეტინ-3-O-რამნოზილ გლუკოზიდი (Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid), იზოკვერცეტინი (Isoquercitrin), კაემფეროლ-3-O-ჰექსოზიდ-7-O რამნოზიდი (Kaempferol-3-O-hexoside-7-O rhamnoside), კვერცეტინ-3-O-სოფოროზიდ-7-O რამნოზიდი (Quercetin-3-O-sophoroside-7-O rhamnoside), კვერცეტინ-3-O-რამნოზილ გლუკოზიდ-7-O-რამნოზიდი (Quercetin-3-O-rhamnosyl glucoside-7-O-rhamnoside), კაემფეროლ-3-O-რუტინოზიდი (Kaempferol-3-O-rutinoside), კაემფეროლ 3-O გლუკოზიდი (Kaempferol 3-O glucoside), იზორამნეტინ-3-O ნეოჰესპერიდოზიდი (Isorhamnetin-3-O neohesperidoside), რუტინი (Rutin), იზორამნეტინ-3-O-(6 რამნოზილ)ჰექსოზიდი (Isorhamnetin-3-O-(6 rhamnosyl)hexoside (Narcissin)), იზორამნეტინ-3-O-დიჰექსოზიდი (Isorhamnetin-3-O-dihexoside), იზორამნეტინი (Isorhamnetin) და ტანშინლაქტონის წარმოებული (Tanshinlactone derivative). ფლავანოლები (კატეცინები): ეპიგალკატეცინი (Epigallocatechin), გალოკატეცინი (Gallocatechin), (ე)კატეცინი-(ე)კატეცინი ((e)Catechin-(e)Catechin) და კატეცინი (Catechin). ქაფის ფოთოლსა და ნაყოფისაგან განსხვავებით თესლში იდენტიფიცირებულ იქნა 16 ახალი ნივთიერება: Citric acid (ნივთიერება 22), Tanshinlactone derivative (ნივთიერება 23), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid (ნივთიერება 24), Isoquercitrin (ნივთიერება 25), Kaempferol-3-O-hexoside-7-O rhamnoside (ნივთიერება 26), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid (ნივთიერება 27), Quercetin-3-O-sophoroside-7-O rhamnoside (ნივთიერება 28), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucoside-7-O-rhamnoside (ნივთიერება 29), Kaempferol-3-O-rutinoside (ნივთიერება 30), (e)Catechin-(e)Catechin

(ნივთიერება 31), Kaempferol 3-O-glucoside (ნივთიერება 32), Isorhamnetin-3-O neohesperidoside (ნივთიერება 33), Rutin (ნივთიერება 34), Isorhamnetin-3-O-(6 rhamnosyl)hexoside (Narcissin) (ნივთიერება 35), Isorhamnetin-O-dihexoside (ნივთიერება 36), Kaempferol-3-O-rutinoside (ნივთიერება 37) და Quercetin (ნივთიერება 38).

ქავეის ანაწიხიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ექსტრაქციისთვის შეფასდა "მწვანე" ექსტრაქციის ორი მეთოდი: ულტრაბგერითი ზონდით ექსტრაქცია და სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქცია. ულტრაბგერითი ზონდით ექსტრაქციისთვის, გამხსნელად გამოყენებულ იქნა წყალი და სხვადასხვა კონცენტრაციის ეთანოლი (25%, 50%, და 75%), რათა ოპტიმიზაცია მომხდარიყო პოლარობის გრადიენტის მიხედვით, რაც კრიტიკულია სხვადასხვა პოლარობის მქონე ნაერთების (ფენოლური ნაერთები, კაროტინოიდები) ეფექტური ექსტრაქციისთვის. შედეგებმა აჩვენა, რომ როგორც 75% ეთანოლით ულტრაბგერითი ექსტრაქცია, ასევე სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქცია, იძლეოდა მსგავს მაჩვენებლებს როგორც იდენტიფიცირებული, ისე ცალკეული ნაერთების შემცველობის მიხედვით. ეს მიუთითებს, რომ ორივე მეთოდი ეფექტურია ქავეის ანაწიხიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ექსტრაქციისთვის.

75% ეთანოლით ულტრაბგერითი ექსტრაქციის ეფექტურობა შეიძლება აიხსნას ეთანოლის პოლარობით, რაც ოპტიმალურია ფენოლური ნაერთების ექსტრაქციისთვის. ულტრაბგერითი ზონდირება ხელს უწყობს უჯრედის კედლების მექანიკურ რღვევას, რაც აძლიერებს ექსტრაქციის პროცესს. სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქცია, რომელიც ეფუძნება წყლის უნიკალურ თვისებებს მაღალ ტემპერატურასა და წნევაზე, ასევე ეფექტური აღმოჩნდა. სუპერკრიტიკული წყლის ცვალებადი პოლარობა და მაღალი ხსნადობა საშუალებას იძლევა ექსტრაგირებულ იქნას როგორც პოლარული, ისე არაპოლარული ნაერთები. პრეპარატების გამოსავლიანობისა და მიღებული მონაცემების შედარებით ულტრაბგერითი ზონდის მეთოდით (75% ეთანოლი, 35 წუთი) 100 გ ნედლი ანაწიხიდან მიღებულ იქნა 6.72 გ ლიოფილიზირებული პრეპარატი, რომელშიც ფენოლების შემცველობა იყო 4 გ, კერძოდ 71.4 მგ/გ მშრალ მასაში, ხოლო სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქციით (წყალი, 7 წუთი) 100 გ ნედლი ანაწიხიდან მიღებულ იქნა 5.2 გ ლიოფილიზირებული პრეპარატი, რომელშიც ფენოლების შემცველობა იყო 80 მგ/გ მშრალ მასაში.

მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ როგორც ულტრაბგერითი ზონდით ექსტრაქცია 75% ეთანოლით, ასევე სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქცია, წარმოადგენს ეფექტურ და ეკოლოგიურად სუფთა მეთოდს ქავეის ანაწიხიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მისაღებად. სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქციის უპირატესობა არის ნაკლები დრო და წყლის გამოყენება. ეს მეთოდები შეიძლება გამოყენებულ იქნას კვების კოსმეტიკურ და ფარმაცევტულ მრეწველობაში ბიოლოგიურად აქტიური დანამატების შესაქმნელად.

3.3. ქავეის თესლიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების თანმიმდევრული ექსტრაქცია სუპერკრიტიკული ნახშირორჟანგის (scCO₂) გამოყენებით

ტრადიციული ექსტრაქციის მეთოდები, როგორიცაა ორგანული გამხსნელებით ექსტრაქცია, ხშირად იწვევს ნაერთების დეგრადაციას, შესაბამისად პროდუქტის ხარისხის დაქვეითებას და გარემოს დაბინძურებას. ამიტომ, ბოლო წლებში აქტიურად მიმდინარეობს კვლევები ინოვაციური და ეკოლოგიურად სუფთა ექსტრაქციის მეთოდების შემუშავებაზე.

SFE-ს პარამეტრები, როგორიცაა წნევა, ტემპერატურა, ექსტრაქციის დრო და ნახშირორჟანგის ნაკადის სიჩქარე, მნიშვნელოვნად მოქმედებს ექსტრაქციის ეფექტურობაზე. ამიტომ, კონკრეტული ნაერთის ექსტრაქციისთვის საჭიროა პარამეტრების ოპტიმიზაცია. სამეცნიერო ლიტერატურაში არსებობს მრავალი კვლევა აღნიშნულ საკითხზე SFE-ს გამოყენებით, თუმცა ოპტიმალური პარამეტრები განსხვავდება კვლევის მიზნებისა და გამოყენებული ნედლეულის მიხედვით (პირველადი (ნაყოფი) და მეორადი ნედლეული (აგროსამრეწველო ანარჩენები)).

მიუხედავად იმისა, რომ საერთაშორისო სამეცნიერო ლიტერატურაში არსებობს მრავალი კვლევა აღნიშნულ საკითხზე SFE-ს გამოყენებით, საქართველოში მსგავსი კვლევები არ ჩატარებულა.

ქავეის თესლიდან ლიპიდური, კაროტინოიდური და ფენოლური ფრაქციების თანმიმდევრული ექსტრაქცია განხორციელდა სუპერკრიტიკული ნახშირორჟანგის გამოყენებით. თითოეული ექსტრაქციის ეტაპი ოპტიმიზირებულ იქნა სამიზნე ნაერთების მაქსიმალური გამოსავლიანობისა და სელექტიურობის მისაღწევად. ექსტრაქციის საერთო ხანგრძლივობამ შეადგინა 180 წუთი, ხოლო ექსტრაქციის პროცესის დინამიკის მონიტორინგი ხორციელდებოდა ყოველ 15 წუთში ფრაქციების ულტრაიისფერ-ხილულ არეში სპექტრული ანალიზით. მიღებული 12 ფრაქციის თითოეულ ნიმუშში რაოდენობრივად განისაზღვრა ნაერთების შემცველობა.

პირველ ეტაპზე, ლიპიდური ფრაქციის ექსტრაქციისთვის გამოყენებულ იქნა ოპტიმიზირებული პარამეტრები: წნევა 350 ბარი, ტემპერატურა 50°C, ნაკადის სიჩქარე 20 გ/წთ და ექსტრაქციის ხანგრძლივობა 60 წუთი. ფრაქციების 1-4 აწონვით დადგინდა ლიპიდური ფრაქციის გამოსავლიანობა (ცხრილი 18).

მეორე ეტაპზე, კაროტინოიდების ექსტრაქცია განხორციელდა (ფრაქცია 5-8), ოპტიმიზირებული პარამეტრებით: წნევა 500 ბარი, ტემპერატურა 50°C, ნაკადის სიჩქარე 30 გ/წთ და ექსტრაქციის ხანგრძლივობა 60 წუთი (ცხრილი 18).

მესამე ეტაპზე, ფენოლური ნაერთების ექსტრაქცია განხორციელდა (ფრაქცია 9-14), კო-სოლვენტის სახით ეთანოლის გამოყენებით. ექსტრაქციის წნევა 380 ბარი, 60°C ტემპერატურა, ნახშირორჟანგის ნაკადის სიჩქარე 30 გ/წთ, ეთანოლი 10%- 20% და ექსტრაქციის ხანგრძლივობა 30 - 60 წთ (ცხრილი 18) (იხ. დანართი 1).

SFE-ის შედეგად ექსტრაგირებული ზეთის რაოდენობამ შეადგინა თესლის 20,75% მშრალ მასაზე გადაანგარიშით, რაც 1,5%-ით აღემატება ჰექსანით ექსტრაგირებული ცხიმის რაოდენობას (19,25%) (ცხრილი 19) (იხ. დანართი 1). მიღებულ ზეთში ლიპიდური კომპონენტების იდენტიფიკაცია, რომლებიც გამოვლინდა ქრომატოგრაფიული

ანალიზის შედეგად, განხორციელდა სტანდარტული ნიმუშის, Supelco 37 Component FAME Mix (პროდუქტის ნომერი: CRM47885, პარტიის ნომერი: LRAD3869), გამოყენებით, რომლის შემადგენლობაც წინასწარ იყო ცნობილი. ქრომატოგრაფიის შედეგებმა გამოავლინა მნიშვნელოვანი განსხვავებები სოქსლეტით და სუპერკრიტიკული ნახშირორჟანგით (SFE) ექსტრაგირებულ ქაფვის თესლის ზეთის ცხიმოვანი მჟავების შემადგენლობაში (სურათი 41 (ა, ბ)) (ცხრილი 20) (იხ. დანართი 1). იდენტიფიცირებულია 8 ნივთიერება, როგორც ნაჯერი, მონოუჯერი და პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავები. ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავებიდან პალმიტინის მჟავას მეთილის ეთერის (C16:0) შემცველობა SFE-ით მიღებულ ზეთში (39.019%) 1.955%-ით მეტია ჰექსანით ექსტრაგირებულ ზეთთან (37.064%) შედარებით, რაც მიუთითებს SFE-ს შედარებით მაღალ სელექტიურობაზე ამ ნაერთის მიმართ (ცხრილი 20). სტეარინის მჟავას მეთილის ეთერი (C18:0) გვხვდება მხოლოდ სოქსლეტით ექსტრაგირებულ ზეთში 1.096% კონცენტრაციით და არ გამოვლინდა SFE-ით ექსტრაგირებულ ზეთში. მონოუჯერი ცხიმოვანი მჟავებიდან ოლეინის მჟავას მეთილის ეთერის (C18:1n9c) შემცველობა სოქსლეტით მიღებულ ზეთში (44.236%) 5.979%-ით მეტია (ცხრილი 20) (იხ. დანართი 1).

პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავებიდან ლინოლენის მჟავას მეთილის ეთერის (C18:2n6c) იდენტიფიცირებულია ორივე მეთოდით მიღებულ ზეთში, SFE-ით მიღებულ ზეთში 1.521%-ით მეტია (6.488% და 4.967%). α -ლინოლენის მჟავას მეთილის ეთერის (C18:3n3c) შემცველობა SFE-ით მიღებულ ზეთში 9.096%-ით მეტია (11.158% და 2.062%), რაც მნიშვნელოვანი სხვაობაა. ცის-11,14-ეიკოსადიენის მჟავას მეთილის ეთერის (C20:2) შემცველობა SFE-ით მიღებულ ზეთში 3.679%-ით მეტია (3.89% და 0.211%) (ცხრილი 20).

SFE-ით ექსტრაგირებული ზეთი ხასიათდება პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავების მნიშვნელოვნად მაღალი შემცველობით, რაც მას უფრო ღირებულს ხდის კვების და ფარმაცევტული თვალსაზრისით. სოქსლეტის ექსტრაქცია იძლევა ოლეინის მჟავას უფრო მაღალ გამოსავლიანობას.

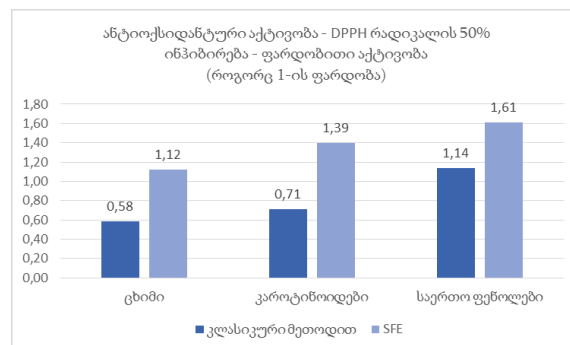
ქაფვის თესლიდან ზეთის გამოყოფის შემდეგ წნევის მომატებით 500 ბარამდე და 30 გ/წთ CO₂ მიწოდების პირობებში, 60° C-ზე 30 წუთის განმავლობაში ექსტრაგირებულ იქნა კაროტინოიდების ფრაქცია (ფრაქცია 5 – 8) (სურათი 42) (იხ. დანართი 1). კაროტინოიდების თვისობრივი ანალიზი განხორციელდა UPLC-PDA, MS მეთოდით (სურათი 43 და 44) (იხ. დანართი 1).

მიღებულ კაროტინოიდულ ფრაქციაში კაროტინების შემცველობამ 1,24 მგ/გ მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით შეადგინა, რაც 30 ერთეულით აღემატება ჰექსანით ექსტრაგირებულ ცხიმში კაროტინების შემცველობას (0,95 მგ/გ). ეს შედეგები ადასტურებს SFE-ს უპირატესობას კაროტინოიდების ექსტრაქციისთვის. SFE-ს გამოყენებამ უზრუნველყო კაროტინოიდების უფრო მაღალი კონცენტრაციის მიღება, რაც განპირობებულია CO₂-ის სუპერკრიტიკული მდგომარეობის უნიკალური გამხსნელი თვისებებით და ექსტრაქციის დაბალი ტემპერატურით, რაც ამცირებს თერმული დეგრადაციის რისკს. ჰექსანი, ასევე არაპოლარული გამხსნელი, მაგრამ მაღალი დუღილის ტემპერატურის გამო იწვევს კაროტინოიდების უფრო მეტ დეგრადაციას.

ექსტრაქციის მესამე ეტაპზე ქაფვის თესლიდან ფენოლური ნაერთების ექსტრაქცია განხორციელდა სუპერკრიტიკული ნახშირორჟანგის (CO₂) გამოყენებით და კო-სოლვენტის სახით ეთანოლის დამატებით. პირველ 30 წუთში (ფრაქცია 9-10), ექსტრაქცია მიმდინარეობდა 300 ბარი წნევის, 30 გ/წთ CO₂ მიწოდების სიჩქარის და 10% ეთანოლის პირობებში. ამ ეტაპზე ექსტრაგირებულ იქნა 23.44 მგ/გ ფენოლური ნაერთები მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით. მომდევნო 30 წუთში (ფრაქცია 11-12) წნევა გაიზარდა 380 ბარამდე, ხოლო ეთანოლის კონცენტრაცია 20%-მდე. ამ ცვლილებამ მნიშვნელოვნად გაზარდა ექსტრაგირებული ფენოლების რაოდენობა 93.76 მგ/გ-მდე. ჯამში, ფრაქციებიდან 9-12 ექსტრაგირებულ იქნა 117.2 მგ/გ ფენოლური ნაერთები (ცხრილი 21). ფენოლური ნაერთების ფრაქცია დაკონცენტრირებულ იქნა ვაკუუმის პირობებში, მიღებული კონცენტრატი დაექვემდებარე ლიოფილურ შრობას და შედეგად მიღებულ იქნა მშრალი პრეპარატი - ქაფვის თესლის ფენოლები. სუპერკრიტიკული (ფლუიდური) ნახშირორჟანგით ქაფვის თესლის ექსტრაქციის დროს ეთანოლის, როგორც კო-სოლვენტის გამოყენება, ეფექტური მეთოდია ქაფვის თესლიდან ფენოლური ნაერთების ექსტრაქციისთვის. პროცესის პარამეტრების ოპტიმიზაცია, როგორიცაა წნევა (380 ბარი) და კო-სოლვენტის კონცენტრაცია (20%), მნიშვნელოვნად ზრდის ექსტრაქციის ეფექტურობას.

სუპერკრიტიკული CO₂ ექსტრაქციის შედეგად ქაფვის თესლიდან მიღებულ იქნა სამი პრეპარატი: პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავებით გამდიდრებული ზეთი, კაროტინოიდების კონცენტრატი და ფენოლური ნაერთების კონცენტრატი. მიღებული პრეპარატების ანტიოქსიდანტური აქტივობის შეფასებით დგინდება, რომ მწვანე ტექნოლოგიით მიღებული პრეპარატები ავლენენ მაღალ ანტიოქსიდანტურ აქტივობას. ანტიოქსიდანტური აქტივობა შეფასდა 0.1 მმოლი DPPH რადიკალის 50%-იანი ინჰიბირების მეთოდით და წარმოდგენილია ორი ფორმით: პირველი, რადიკალის ინჰიბირებისთვის საჭირო ნიმუშის მასა განსაზღვრული მგ-ში, და მეორე, როგორც ფარდობითი აქტივობა (როგორც 1-თან ფარდობა) (დიაგრამა 10). ზოგადად, რაც უფრო მაღალია ანტიოქსიდანტურად, ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების კონცენტრაცია ნიმუშში, მით უფრო ნაკლები ნიმუშის მასა არის საჭირო DPPH რადიკალის 50%-იანი ინჰიბირებისთვის. ეს მიუთითებს უკუპროპორციულ დამოკიდებულებაზე ნაერთების კონცენტრაციასა და ინჰიბირებისთვის საჭირო ნიმუშის მასას შორის. ხოლო ფარდობითი ანტიოქსიდანტური აქტივობის მაჩვენებელი გამოყენებულ იქნა იმისთვის, რომ ნათლად წარმოჩენილიყო პირდაპირპროპორციული დამოკიდებულება ნაერთსა და ანტიოქსიდანტურ აქტივობას შორის. ფარდობის მაჩვენებელი აადვილებს მონაცემების ინტერპრეტაციას. ცხრილში წარმოდგენილი მონაცემით დგინდება რომ SFE მიღებული პრეპარატები ხასიათდებიან მაღალი აქტივობით, ვიდრე კლასიკური მეთოდით მიღებული ნაერთები: SFE-ით მიღებული ზეთის 0,89 მგ-ია საჭირო რადიკალის 50 % ინჰიბირებისათვის, ხოლო

ჰექსანით მიღებულ ზეთის თიოქმის 2 ჯერ მეტი რაოდენობა (1,72 მგ). შესაბამისად, კაროტინების შემთხვევაში: SFE-ის შემთხვევაში 0,717 მგ და კლასიკურში 1,411 მგ, ანალოგიური შედეგია ფენოლების შემთხვევაშიც 0,881 მგ და 0,622 მგ კლასიკურში (ცხრილი 21).



დიაგრამა 10. ქაფის თესლიდან მიღებული პრეპარატების ანტიოქსიდანტური აქტივობის ამსახველი დიაგრამა მაქსიმალური გამოსავლიანობის მისაღწევად, ოპტიმიზირებულ იქნა scCO_2 ექსტრაქციის პარამეტრები: წნევა, ტემპერატურა, ნახშირორჟანგის ნაკადის სიჩქარე და ექსტრაქციის ხანგრძლივობა. ოპტიმალური პირობები განისაზღვრა შემდეგნაირად: კაროტინოიდებისთვის - 350 ბარი, 50°C , 20 გ/წთ და 60 წთ; ლიპიდებისთვის - 500 ბარი, 50°C , 30 გ/წთ და 60 წთ; ფენოლური ნაერთებისთვის - 380 ბარი, 60°C , 30 გ/წთ, 10-20% ეთანოლი და 30-60 წთ. აირად-თხევადი ქრომატოგრაფიის ანალიზმა აჩვენა მნიშვნელოვანი განსხვავებები სოქსლეტით და scCO_2 -ით ექსტრაგირებული ქაფის თესლის ზეთის ცხიმოვანი მჟავების შემადგენლობაში. scCO_2 -ით ექსტრაგირებული ზეთი ხასიათდება პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავების მნიშვნელოვნად მაღალი შემცველობით. scCO_2 ექსტრაქციის შედეგად მიღებული ზეთის გამოსავლიანობამ შეადგინა 20.75%, რაც 1.5%-ით აღემატება ჰექსანით ექსტრაგირებული ზეთის გამოსავლიანობას (19.25%). scCO_2 ექსტრაქციამ უზრუნველყო კაროტინოიდების უფრო მაღალი კონცენტრაციის მიღება (1.24 მგ/გ) სოქსლეტის ექსტრაქციასთან შედარებით (0.95 მგ/გ). ეთანოლის კო-სოლვენტად გამოყენება ეფექტური აღმოჩნდა ფენოლური ნაერთების ექსტრაქციისთვის (scCO_2 - 117.2 მგ/გ, სოქსლეტი - 90.11 მგ/გ). მიღებული პრეპარატები ავლენენ ძლიერ ანტიოქსიდანტურ აქტივობას, ტრადიციულ ექსტრაქციის მეთოდებთან შედარებით.

ქაფის თესლიდან სუპერკრიტიკული ნახშირორჟანგის (scCO_2) თანმიმდევრული ექსტრაქციის გამოყენება იძლევა შესაძლებლობას, მიღებულ იქნას სამი განსხვავებული ფრაქცია: პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავებით გამდიდრებული ლიპიდური ექსტრაქტი, კაროტინოიდული კონცენტრატი და ფენოლური ნაერთების კონცენტრატი. აღნიშნული ფრაქციები ხასიათდება ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მნიშვნელოვნად მაღალი გამოსავლიანობით, რაც განაპირობებს მათ ძლიერ ანტიოქსიდანტურ აქტივობას, ტრადიციულ ექსტრაქციის მეთოდებთან შედარებით.

4. თვალის ზედაპირული პოსტტრაგმული ნაწიბურების რეგენერაციისთვის „ქაფის თვალის მალამო“-ს ფარმაცოლოგიური თვისებების გამოცდა

ოფთალმოლოგიური მალამოები წარმოადგენენ ნახევრად მყარ ფარმაცევტულ ფორმებს, რომლებიც განკუთვნილია თვალის ზედაპირზე სამკურნალო ნივთიერებების ადგილობრივი გამოყენებისთვის. მათი ფარმაცოლოგიური თვისებების შესწავლა უმნიშვნელოვანესია ეფექტური და უსაფრთხო ოფთალმოლოგიური მკურნალობის შესაძლებლად (<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104867>).

ფარმაცოლოგიური პრეპარატის პრაქტიკაში გამოყენებამდე და შემდგომ კლინიკურ კვლევამდე, აუცილებელია შეფასდეს მისი უსაფრთხოება ორგანიზმზე - ქსოვილებზე ზემოქმედების თვალსაზრისით. ეს უზრუნველყოფს, რომ პოტენციური გვერდითი მოვლენები იყოს მინიმუმამდე დაყვანილი (<https://www.fda.gov/>). ექსპერიმენტული პროცედურები უნდა შეესაბამებოდეს ფარმაცოპეის დადგენილ მოთხოვნებს და საერთაშორისოდ აღიარებულ სტანდარტებს, კარგი ლაბორატორიული პრაქტიკის პრინციპებს (https://www.oecd.org/en/publications/1998/01/oecd-principles-on-good-laboratory-practice_g1gh32e8.html).

პრეკლინიკურ კვლევებს შორის უპირველეს მნიშვნელობა ენიჭება ტოქსიკოლოგიურ კვლევებს, რომლებიც მოიცავს როგორც ზოგადი ტოქსიკურობის, ასევე სპეციფიკური ტიპის ტოქსიკურობის შესწავლას (DOI: 10.1007/s11948-006-0014-y).

ოფთალმოლოგიური პრეპარატის ტოქსიკოლოგიური კვლევები ჩატარდა აკაკი წერეთლის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიოლოგიის დეპარტამენტის ფიზიოლოგიის სასწავლო-ექსპერიმენტულ ლაბორატორიაში, პროფესორ რენიკო საკანდელიძის ხელმძღვანელობით. კვლევისთვის შეირჩენ სქესობრივად მომწიფებული, ჯანმრთელი თეთრი ვირთაგვები (სურათი 45) (იხ. დანართი 1).

საექსპერიმენტო ცხოველების მოვლა წარმოებდა სტანდარტულ სანიტარულ პირობებში, სადაც მაქსიმალურად იყო დაცული ექსპერიმენტზე სხვა გარეშე ფაქტორების (ტემპერატურა, ტენიანობა, განათება, სათავსოს ქსენობიოტიკებით დაბინძურება და სხვ.) ზემოქმედება. საკვლევ ცხოველებთან ერთად ანალოგიურ პირობებში მოთავსებული იყო საკონტროლო ცხოველებიც.

შესწავლილ იქნა პრეპარატის მწვავე ტოქსიკურობა კანზე. ექსპერიმენტისათვის შერჩეულ ვირთაგვებზე ხდებოდა

პრეპარატის ზედაპირულად წასმას/დატანას 4 სთ-ის ინტერვალით, ჯამში 6-ჯერ 24 საათის მანძილზე. ექსპერიმენტის პირობები და შედეგი წარმოდგენილია ცხრილი 22-ში (იხ. დანართი 1).

ფარმაკოპეას მოთხოვნათა გათვალისწინებით საწყის დოზად ავიღეთ 0.01 მგ ერთჯერადი წასასმელი დოზა. ექსპერიმენტის შედეგად არც ერთი თეთრი ვირთაგვა არ დაღუპულა, კანის მდგომარეობა ყველასთან იყო კარგი. ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ექსპერიმენტმა აჩვენა, რომ ოფთალმოლოგიური მალამო არის პრაქტიკულად არატოქსიკური თეთრი ვირთაგვებისთვის გამოყენებულ დოზებში. პრეპარატის გამოყენებამ არ გამოიწვია სიკვდილიანობა, რაც Hodge and Sterner-ის კლასიფიკაციის მიხედვით, ნივთიერების უვნებლობის მაჩვენებელია. როგორც კვლევის შედეგები გვიჩვენებს ოფთალმოლოგიური პრეპარატის 'ქაცვის თვალის მალამოს' გამოყენება საკვლევ ვირთაგვეში 0,06 მგ დღე/დამური დოზა კანზე წასასმელად არ იწვევს ცხოველთა კანის გაღიზიანებას.

დასკვნა:

- დადგინდა, რომ ქაცვის ნაყოფი და ფოთოლი წარმოდგენს ბიოაქტიური ნაერთების მდიდარ წყაროს, ულტრა მაღალეფექტური (წნევის) სითხური UPLC-PDA, MS მეთოდით ქაცვის ფოთოლსა და ნაყოფში იდენტიფიცირებულ იქნა 21 ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთი: 1 ორგანული მჟავა, 3 ფენოლკარბონმჟავა და 17 ფლავონოიდი. მიღებული მონაცემები ავლენს მნიშვნელოვან განსხვავებებს ნაყოფისა და ფოთლის ფიტოქიმიურ შემადგენლობაში: ვაშლის მჟავა (m/z 132.95) გამოვლინდა ორივე ნიმუშში. ფენოლკარბონმჟავებიდან: ქინაქინის (m/z 191.03) და ელაგის მჟავა (m/z 300.83) ორივე ნაწილში დაფიქსირდა. გალის მჟავა (m/z 168.82) მხოლოდ ნაყოფში იდენტიფიცირებულ იქნა. ფლავონოიდური ნაერთებიდან: გალოკატეჟინი (m/z 304.89) და იზორამნეტინი (m/z 314.85) ორივე ნიმუშში იყო წარმოდგენილი. ეპიგალოკატეჟინი (m/z 304.78), კატეჟინი (m/z 288.88) და პროცანიდინები (m/z 476.80, 576.95) მხოლოდ ნაყოფში გამოვლინდა. ფოთოლი გამოირჩეოდა გალის მჟავას ჰექსოზიდისა და კასუარიქტინის შემცველობით. განსაკუთრებით აღსანიშნავია იზორამნეტინის გლიკოზიდების (m/z 476.99, 593.03, 623.01, 623.15) დომინირება ნაყოფში, ხოლო კემფეროლ-3-O-რუთინოზიდი (m/z 593.03) მხოლოდ ფოთოლში იდენტიფიცირებულ იქნა. ეს შედეგები მნიშვნელოვანია ქაცვის სამკურნალო და კვების პროდუქტებში გამოყენების პერსპექტივის შესაფასებლად, განსაკუთრებით ანტიოქსიდანტური და ფარმაკოლოგიური თვისებების გათვალისწინებით.
- დადგინდა, რომ ქაცვის ფოთოლი და ნაყოფი გამოირჩევა ფენოლური ნაერთების მნიშვნელოვანი შემცველობით. ფოთოლში დაფიქსირდა: საერთო ფენოლები 43.95 მგ/გ, ფენოლკარბონმჟავები 6.23 მგ/გ და ფლავონოიდები 16.21 მგ/გ მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით. ნაყოფში ფენოლური ნაერთების შემცველობა ცვალებადია გეოგრაფიული წარმოშობის მიხედვით (19.90-34.94 მგ/გ), ახალციხის ნიმუშში დაფიქსირდა ყველაზე მაღალი მაჩვენებლები. ფლავონოიდების კონცენტრაცია ნაყოფებში (16.72-27.01 მგ/გ) დაახლოებით 10-ჯერ აღემატებოდა ფენოლკარბონმჟავების შემცველობას. ანტიოქსიდანტური აქტივობის კვლევამ აჩვენა, რომ ახალციხის ნიმუში (2.881 მგ) გამოირჩეოდა ყველაზე მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობით, რაც კორელაციაშია მასში ფენოლური ნაერთების მაღალ კონცენტრაციასთან. ქაცვის (*Hippophae rhamnoides* L.) ნაყოფსა და ფოთოლს გააჩნია მნიშვნელოვანი ბიოლოგიური პოტენციალი, როგორც ბუნებრივი ანტიოქსიდანტების მდიდარ წყაროს.
- ქაცვის ფოთოლსა და რბილობისაგან განსხვავებით თესლში იდენტიფიცირებულ იქნა 16 ახალი ნივთიერება: Citric acid (ნივთიერება 22), Tanshinlactone derivative (ნივთიერება 23), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid (ნივთიერება 24), Isoquercitrin (ნივთიერება 25), Kaempferol-3-O-hexoside-7-O rhamnoside (ნივთიერება 26), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid (ნივთიერება 27), Quercetin-3-O-sophoroside-7-O rhamnoside (ნივთიერება 28), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucoside-7-O-rhamnoside (ნივთიერება 29), Kaempferol-3-O-rutinoside (ნივთიერება 30), (e)Catechin-(e)Catechin (ნივთიერება 31), Kaempferol 3-O-glucoside (ნივთიერება 32), Isorhamnetin-3-O neohesperidoside (ნივთიერება 33), Rutin (ნივთიერება 34), Isorhamnetin-3-O-(6 rhamnosyl)hexoside (Narcissin) (ნივთიერება 35), Isorhamnetin-O-dihexoside (ნივთიერება 36), Kaempferol-3-O-rutinoside (ნივთიერება 37) და Quercetin (ნივთიერება 38).
- დადგინდა, რომ ქაცვის წვენი შეიცავს ნახშირწყლების მნიშვნელოვან რაოდენობას, იდენტიფიცირებულია არაბინოზა, გლუკოზა და საქაროზა. ქაცვის ფოთოლში დადგინდა Na^+ , K^+ , Mg^{2+} და Ca^{2+} კატიონების მაღალი კონცენტრაცია, განსაკუთრებით Mg^{2+} (577.6 ppm) და K^+ (415.4 ppm). ნაყოფში კატიონების შემცველობა მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდა გეოგრაფიული რეგიონის მიხედვით: ერგეს ნაყოფში დომინირებდა Mg^{2+} (65.17 ppm) და K^+ (48.02 ppm), ახალციხეში - K^+ (266.04 ppm) და Ca^{2+} (34.08 ppm), ხოლო თერჯოლის ნაყოფი გამოირჩეოდა Mg^{2+} (53.46 ppm) და K^+ (40.77 ppm) შემცველობით. მიღებული მონაცემები ადასტურებს ქაცვის მინერალურ სიმდიდრეს და მისი გამოყენების პოტენციალს კვებისა და ფარმაცევტული დანიშნულებით.
- ქაცვის თესლის ზეთის ცხიმოვანი მჟავების შემადგენლობაზე ექსტრაქციის მეთოდის (სოქსლეტის ექსტრაქცია, ულტრაბგერითი, ზონდირება ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქცია და ცივი დაწნევა) გავლენის შესწავლის შედეგები აჩვენებს მნიშვნელოვან განსხვავებებს: თითოეული მეთოდით მიღებული ზეთი გამოირჩეოდა განსხვავებული ცხიმოვანი მჟავების მრავალფეროვნებით. სულ იდენტიფიცირებულია 28 კომპონენტი, აქედან 5 უცნობი ნაერთია. იდენტიფიცირებულია 12 ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავები, 3 მონოუჯერი ცხიმოვანი მჟავა, 2 პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავა და ტრანს-უჯერი ცხიმოვანი მჟავა.
- დადგინდა, რომ ულტრაბგერითი და ზეკრიტიკული წყლით ექსტრაქციის მეთოდები უზრუნველყოფს ანთების საწინააღმდეგო და რეგენერაციული თვისებების მქონე - Oleic acid methyl ester ($C18:1n9c$), α -Linolenic acid methyl

ester (C18:3n3c) (ომეგა-3) და Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c) (ომეგა-6) მაღალ შემცველობას. რაც მნიშვნელოვანია თვალის ზედაპირული პოსტტრაფემული ნაწიბურების სამკურნალოდ. ცივი დაწნების მეთოდით მიღებული ექსტრაქტი ასევე ხასიათდება α -Linolenic acid methyl ester (C18:3n3c) (ომეგა-3), Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c) (ომეგა-6) და Oleic acid methyl ester (C18:1n9c) მნიშვნელოვანი კონცენტრაციით. აღნიშნული ცხიმოვანი მჟავების კომბინაცია ხელს უწყობს დაზიანებული ქსოვილების აღდგენასა და ნაწიბურების წარმოქმნის შემცირებას. მიუხედავად იმისა, რომ სოქსლეტის ექსტრაქცია გვთავაზობს ფართო სპექტრის ცხიმოვანი მჟავების მიღების შესაძლებლობას, ტრანს-ცხიმების წარმოქმნისა და ეკოლოგიური ასპექტების გათვალისწინებით, მისი გამოყენება მაღამოს დასამზადებლად შეიძლება იყოს ნაკლებად სასურველი.

7. კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ ქაცვის რბილობი წარმოადგენს ღირებულ ნედლეულს ოფთალმოლოგიური მაღამოს დასამზადებლად. „მწვანე ტექნოლოგიების“ გამოყენება უზრუნველყოფს ეკოლოგიურად სუფთა და ეფექტურ მიდგომას ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მისაღებად. ქაცვის რბილობიდან მიღებულ იქნა ოთხი სხვადასხვა სახის პრეპარატი, რომლებიც განსხვავდებიან შემადგენლობითა და მიღების მეთოდით: ლიპოფილური კაროტინოიდების კონცენტრატი (ქაცვის ზეთი), კაროტინოიდების მშრალი ექსტრაქტი, ფენოლური ნაერთების მშრალი ექსტრაქტი.
8. ულტრაბგერითი ექსტრაქციის მეთოდით ასევე მიღებულ იქნა, კაროტინოიდებით გამდიდრებული მცენარეული ზეთი (კაროტინოიდების კონცენტრაცია: 0.5941 მგ/გ მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით), გაუმჯობესებული ხარისხობრივი მაჩვენებლები (მჟავიანობის, ზეჟანგური და n-ანიზიდინის რიცხვების შემცირება) და 3.5-ჯერ უფრო მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობით საკონტროლო ზეთთან შედარებით. იგი შეიძლება გამოყენებულ იქნეს კვების მრეწველობაში, როგორც კაროტინოიდებით გამდიდრებული ზეთი.
9. დადგენილ იქნა, რომ ქაცვის ნედლი ანაწიხები, რომელიც დაახლოებით 80% თესლისა და 20% ნაყოფის კანისგან შედგება, შეიცავს 11.95%-დან 13.22%-მდე ცხიმს (მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით) და 0.140-დან 0.583 მგ/გ-მდე კაროტინს (მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით); ფენოლური ნაერთების სპექტრალური ანალიზის შედეგად დგინდება, რომ ნედლი ანაწიხის საერთო ფენოლური ნაერთების შემცველობა შეადგენს 89,41 მგ/გ, საიდანაც 16,95 მგ/გ მოდის ფენოლკარბონმჟავებზე და 64,71 მგ/გ - ფლავონოიდებზე. ფლავონოიდებიდან ძირითადად წარმოდგენილია კატეჩინები (25,90 მგ/გ) და ლეიკოანტოციანინები (44,45 მგ/გ). ქაცვის ანაწიხის ექსტრაქტის ანტიოქსიდანტური აქტივობა საკმაოდ მაღალია, კერძოდ ანაწიხის 0,766 მგ-ია საკმარისი DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირებისათვის.
10. დადგინდა, რომ ულტრაბგერითი ზონდით ექსტრაქცია 75% ეთანოლით, ასევე სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქცია, წარმოადგენს ეფექტურ და ეკოლოგიურად სუფთა მეთოდს ქაცვის ანაწიხიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მისაღებად. პრეპარატების გამოსავლიანობისა და მიღებული მონაცემების შედარებით ულტრაბგერითი ზონდის მეთოდით (75% ეთანოლი, 35 წუთი) 100 გ ნედლი ანაწიხიდან მიღებულ იქნა 6.72 გ ლიოფილიზირებული პრეპარატი, რომელშიც ფენოლების შემცველობა იყო 4 გ, კერძოდ 71.4 მგ/გ მშრალ მასაში, ხოლო სუპერკრიტიკული წყლის ექსტრაქციით (წყალი, 7 წუთი) 100 გ ნედლი ანაწიხიდან მიღებულ იქნა 5.2 გ ლიოფილიზირებული პრეპარატი, რომელშიც ფენოლების შემცველობა იყო 80 მგ/გ მშრალ მასაში.
11. სუპერკრიტიკული CO₂ ექსტრაქციის შედეგად ქაცვის თესლიდან მიღებულ იქნა სამი პრეპარატი: პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავებით გამდიდრებული ზეთი, კაროტინოიდების კონცენტრატი და ფენოლური ნაერთების კონცენტრატი. მაქსიმალური გამოსავლიანობის მისაღწევად, ოპტიმიზირებულ იქნა scCO₂ ექსტრაქციის პარამეტრები: წნევა, ტემპერატურა, ნახშირორჟანგის ნაკადის სიჩქარე და ექსტრაქციის ხანგრძლივობა. ოპტიმალური პირობები განისაზღვრა შემდეგნაირად: კაროტინოიდებისთვის - 350 ბარი, 50°C, 20 გ/წთ და 60 წთ; ლიპიდებისთვის - 500 ბარი, 50°C, 30 გ/წთ და 60 წთ; ფენოლური ნაერთებისთვის - 380 ბარი, 60°C, 30 გ/წთ, 10-20% ეთანოლი და 30-60 წთ.
12. აირად-თხევადი ქრომატოგრაფიის ანალიზმა აჩვენა მნიშვნელოვანი განსხვავებები სოქსლეტით და scCO₂-ით ექსტრაგირებული ქაცვის თესლის ზეთის ცხიმოვანი მჟავების შემადგენლობაში. scCO₂-ით ექსტრაგირებული ზეთი ხასიათდება პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავების მნიშვნელოვნად მაღალი შემცველობით. scCO₂ ექსტრაქციის შედეგად მიღებული ზეთის გამოსავლიანობამ შეადგინა 20.75%, რაც 1.5%-ით აღემატება ჰექსანით ექსტრაგირებული ზეთის გამოსავლიანობას (19.25%). scCO₂ ექსტრაქციამ უზრუნველყო კაროტინოიდების უფრო მაღალი კონცენტრაციის მიღება (1.24 მგ/გ) სოქსლეტის ექსტრაქციასთან შედარებით (0.95 მგ/გ). ეთანოლის კო-სოლვენტად გამოყენება ეფექტური აღმოჩნდა ფენოლური ნაერთების ექსტრაქციისთვის (scCO₂ - 117.2 მგ/გ, სოქსლეტი - 90.11 მგ/გ). მიღებული პრეპარატები ავლენენ ძლიერ ანტიოქსიდანტურ აქტივობას, ტრადიციულ ექსტრაქციის მეთოდებთან შედარებით.
13. ოფთალმოლოგიური პრეპარატის 'ქაცვის თვალის მაღამოს' გამოყენება საკვლევ ვირთაგვეში 0.06 მგ. დღე/ღამური დოზა 14 დღის განმავლობაში კანზე წასასმელად არ იწვევს ცხოველთა კანის გაღიზიანებას, კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის, ღვიძლის, თირკმლების და ელენთის დისტრუქციას. არ ვითარდება შინაგანი ორგანოების პარენქიმური უჯრედების დისტროფიული, სკლეროტიზებული თუ სკლეროზული ცვლილებები.

Batumi Shota Rustaveli State University
Faculty of Natural Sciences and Healthcare

Department of Chemistry



Study of biologically active compounds of sea buckthorn fruits for the preparation of an ointment for ophthalmological use and its testing for the regeneration of superficial post-traumatic scars of the eye

(Submitted for the degree of Doctor of Chemical Sciences)

Specialty: Analysis of natural compounds

Supervisor: Professor
Doctor of Biological Sciences

Aleko Kalandia

Co-supervisor: Professor,
Academic Doctor of Chemical Sciences

Inga Bochoidze

The dissertation was completed at the Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Health, Batumi State University named after Shota Rustaveli.

Batumi 2025

The present dissertation was carried out at the Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Health, Batumi Shota Rustaveli State University.

The research part of the dissertation was conducted within the framework of a project funded by the Shota Rustaveli National Science Foundation (Grant No. AP/96/13; FR 22-4236).

"As the author of this dissertation, I declare that the work presented is my original research and does not include material that has been previously published, accepted for publication, or submitted for defense by other authors, unless properly referenced or cited in accordance with academic standards."

Lana Datuashvili

Scientific Supervisor:

Professor Aleko Kalandia

Doctor of Biological Sciences

Co-supervisor:

Professor Inga Bochoidze

Doctor of Chemical Sciences

Foreign Reviewer:

Dr. Dimitrios Katsantonis

Director of Research

Hellenic Agricultural Organization – DIMITRA
Institute of Plant Breeding and Genetic Resources

Reviewers:

1. Elene Gamkrelidze

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

2. Natalia Kupatashvili

Doctor of Chemical Sciences, Associate Professor,
Department of Chemistry,
Akaki Tsereteli State University

3. Mzia Diasamidze

Doctor of Chemical Sciences, Invited Lecturer,
Department of Chemistry,
Batumi Shota Rustaveli State University

The dissertation defense will take place in 2025 at the session of the Dissertation Council of the Faculty of Natural Sciences and Health, Batumi Shota Rustaveli State University.

Venue: Batumi, 35 Ninoshvili Street, Auditorium No.

The dissertation is available for review at the library of Batumi Shota Rustaveli State University and on the university website: www.bsu.edu.ge

Secretary of the Dissertation Council of the Faculty of Natural Sciences and Health:
ETERI JAYELI

Introduction

Relevance of the topic: The wild and cultivated sea buckthorn plant (*Hippophae*) is widespread in many countries of the world, with the fruits growing in mountainous regions and relatively cold climates being of particular interest. The soil and climatic conditions of Georgia turned out to be very favorable for the growth of sea buckthorn. It grows almost everywhere in Georgia. Sea buckthorn grows along river banks, mountain slopes, and in damp places, where it often forms hard-to-reach thickets. Sea buckthorn is especially widespread in the valleys of the Rioni, Adjara, Chorokhi, and Tskhenistskali rivers, where it can be grown on a large scale. Sea buckthorn fruits are widely used, being both a food and a medicinal product. Several companies in Georgia are engaged in the procurement, drying, and sale of sea buckthorn fruits. Among them are our partner companies operating in our region. The interest in sea buckthorn in scientific literature is very high. We examined the trends and geographic coverage of scientific research over the past 10 years. The geographic locations are varied, from developing countries to high-tech South Korea. First, the chemical composition of the plant's fruits is studied. Derivatives of organic compounds from sea buckthorn fruit have been studied [2], bioactive polyphenols and volatile compounds from the leaves have been identified [3], and UHPLC-ESI-QTOF-MS of *Hippophae rhamnoides* L. fruit and leaves has been performed, and its anti-inflammatory activity has been determined [4]. Phytochemical studies of shoots, leaves, and bracts were conducted, and their antimicrobial activity was determined [5]. Antifreeze proteins of frost-resistant forms were studied [6]. Protective properties of fruit polysaccharides for the intestines were studied [7]. Pentacyclic triterpenes have been studied [8]. The ability of sea buckthorn polyphenols to decompose nitrites has been characterized [9]. The antioxidant activity of extracts obtained by various methods was studied [10]. The chemical composition of sea buckthorn pulp has been studied and methods for its processing have been proposed [11]. The composition of fruits (carbohydrates, acids, vitamins) has been studied comprehensively [12,14]. Aurin lignans were isolated and identified, and their hepatoprotective and hypolipidemic activities were established [15]. The study of proanthocyanidins in sea buckthorn fruits was conducted taking into account the place of cultivation of the fruits and their genetic origin [16]. Flavonol glycosides from sea buckthorn fruits have been studied in detail [17]. The antioxidant activity of lipophilic extracts and their content of carotenoids and tocopherols have been studied [18]. Of course, this is not a complete list.

In recent years, the use of biologically active compounds from sea buckthorn fruits in ophthalmology has attracted particular interest. Superficial post-traumatic scars of the eye, which often cause visual impairment and discomfort, represent a serious medical problem. Despite the significant advances in modern medicine, research is being conducted in parallel to study the potential of using natural remedies. The use of natural compounds as adjuvant or alternative therapy can make a significant contribution to the regeneration of superficial ocular lesions and improve the quality of life of patients. In this regard, the fatty acids of sea buckthorn oil are of particular interest. Polyunsaturated fatty acids present in sea buckthorn oil are: α -linolenic acid (ω -3) C18:3, γ -linolenic acid (ω -6) C18:3, linoleic acid (ω -6) C18:2; and monounsaturated fatty acids are: oleic acid (ω -9) C18:1 and eicosanoic acid (ω -9) C20:1 [19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29]. A study of the literature of recent years confirms that so-called green and cyclical economy-oriented technologies are preferred for obtaining biologically active compounds, with only a few dozen full-fledged studies of extraction using an ultrasonic probe, in relation to various plants, presented in highly rated journals (for example, [30; 31; 32; 33; 34; 35; 36]. Supercritical Fluid Extraction (SFE) has certain advantages over traditional extractions. Subcritical pressure and temperature Water Extraction (SWE) plays an important role both in research and for the preparation of drugs [37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45].

Problem statement: Unfortunately, out of several hundred scientific publications we reviewed, not a single study was found on endemic plants or industrial waste common in Georgia, and none of the authors are representatives of the Georgian scientific community. Due to the lack of scientific equipment, the possibilities of using waste from plant processing plants in the country have not been fully studied (with the exception of several studies by our research group on plant stevia, citrus pomace and grape seeds). Preparations obtained from plants containing biologically active compounds and the prospects for their use have not been sufficiently studied. On the other hand, the literature we reviewed (several dozen recent publications) indicates that the issue of valorization of plant materials and waste from their processing using innovative technologies, the application of circular economy principles in order to reduce the negative impact on the environment is a priority. Given the modern problems of food and drug safety, the issue of using plant materials and production waste rich in food biopolymers and biologically active compounds for preventive or therapeutic purposes is becoming especially relevant. It is necessary to optimize the methods of plant extraction, especially those endemic to Georgia, develop technologies for obtaining biologically active preparations, study their chemical composition using modern methods and determine the prospects for their use. Unfortunately, in Georgian reality, not only in the last 10 years, but in general, there has not been a single serious scientific work (the exception is a few dissertations, where the chemical composition of sea buckthorn was studied superficially). The

resource base is quite large, but due to lack of information, consumption of fruits is irrational. Jams and preserves are mainly produced on family farms. It is dried in small quantities and sold as dried fruits. An in-depth study of the chemical composition of sea buckthorn fruits, taking into account the characteristics of the chemical composition depending on the species and regional distribution, as well as the development of innovative technologies for the valorization of plant materials and processing waste in order to reduce the negative impact on the environment using the principles of a circular economy will allow us to produce finished products instead of selling plant materials. Instead of importing sea buckthorn-based products and preparations, they can be exported. This will allow a gradual transition from plant-based raw materials to reliable and high-tech products, reducing the risks to the country's food and pharmaceutical security.

The purpose and objectives of the study. The objectives of the study are to study the chemical composition of sea buckthorn forms (*Hippophae*) common in Georgia (Chorokhi Valley, Imereti, Kartli), identify biologically active compounds, optimize innovative technologies for the production of substances and preparations based on the principles of a circular economy in order to increase the value of raw materials and processing waste, as well as reduce the negative impact on the environment; Optimization of parameters of supercritical fluid extraction (SFE), ultrasonic extraction (UGE), subcritical barotemperature water extraction (SBE), ultrafiltration, sorption, desorption, dialysis and other methods based on the cyclic use of only "green" extractants for biologically active compounds; Study of raw materials and obtained preparations using UPLC-PDA-MS, HPLC, GC methods; Identification of individual biologically active compounds and study of their quantitative content; Screening of their biological activity (antioxidant activity) and determination of application prospects.

The object of the study was the fruits, leaves, and processed fruit products (extract and seeds) of wild sea buckthorn growing in Western Georgia. Samples were collected in three different regions of Georgia: Samtskhe-Javakheti (Akhaltsikhe - 41°38'20.0"N 42°59'10.0"E), Adjara (Erge - 41°33'41.0"N 41°41'48.0"E, Tkhillnari - 41°33'49.0"N 41°39'11.0"E) and Imereti (Terjola - 42°11'00.0"N 42°58'38.0"E). Some samples were stored in a freezer (-25°C) for further studies. Some of the raw fruits were directly processed to produce preparations. Samples were also lyophilized and stored in a refrigerator at 4°C until use. We will harvest the crop during the consumer maturity period in 2021–2024. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) is a widely branched, thorny shrub reaching a height of 2–4 m. The branches are symmetrical and often have rounded ends. Sea buckthorn branches have brown or blackish bark and grayish-green twigs. The branches end in thorns. Flowers with stamens and pistils appear before the leaves. The leaves are alternate, 4–6 cm long, lanceolate, silvery-gray in color. Flower buds most often appear on biennial plants. Pollination of female flowers occurs in mid-May and is entirely dependent on the wind. The fruits ripen approximately 100 days after pollination (September–October). Sea buckthorn berries can vary in shape and color, but are most often round or oval in shape and yellow or orange in color. The combination of the shape and size of the sea buckthorn fruits, as well as the contrasting colors of the leaves and fruits, create an unusual decorative feature of this plant. Sea buckthorn is widely distributed in nature in countries with a temperate climate: China, Russia, Great Britain, France, Denmark, the Netherlands, Germany, Poland, Finland, Sweden and Norway. In Georgia, sea buckthorn is found throughout the country at altitudes up to 2,500 meters above sea level. It usually grows on slopes, river banks and seas.

Research Methodology - The following instruments were used in the study: Waters high performance liquid chromatograph (HPLC) equipped with UV, visible and refractometric detectors (HPLC 1525 binary pump) and a Waters 432 conductivity detector. An ultra-high-performance liquid chromatograph (UPLC) - Waters Acquity H Class, with photodiode array (PDA) and mass spectrometric (MS) detectors, pH-meter and conductivity meter - Mettler Toledo pH/Ion meter S220 and S230 Conductivity, and Mettler Toledo UV5 UV/Vis scanning spectrophotometer were also used.

Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates, cations and phenolic compounds was carried out using high-pressure and ultra-high-pressure liquid chromatography methods (a detailed description of the methods is given in the relevant chapters) [46, 47, 48, 49].

For chromatographic analysis of carbohydrates, HPLC - Waters (refractometric detector, binary pump HPLC 1525) was used, column temperature 40°C, eluent - 80% acetonitrile (Merck; Sigma-Aldrich), detection - refractometric detector.

Determination of cations - Cation analysis was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with conductometric detection (Waters 432) on an IC-Pak Cation MD column. A solution of 3 mmol/l nitric acid and 0.1 mmol/l EDTA was used as an eluent.

Identification of phenolic compounds - (Waters, UPLC Acquity, QDa Detectore). Identification of phenolic compounds was performed by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) using a photodiode array (PDA) and mass spectrometric (MS) detection (Waters, UPLC Acquity, QDa detector). Separation of compounds was performed using an Acquity UPLC BEH C18 chromatographic column (particle size 1.7 µm). The solvent system consisted of 0.2% formic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B).

The analysis of the composition of carboxylic acids was carried out by gas chromatography (GC) using a Thermo Scientific TRACE™ 1310 gas chromatograph. Chromatographic separation was performed on an Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME GC capillary column (CP7489) with a length of 100 m, an inner diameter of 0.25 mm, and a stationary phase thickness of 0.20 µm.

Quantitative determination of β-carotene - spectral method. The sample was extracted with a mixture of acetone and hexane (4:6) until the sample became decolorized (complete extraction), then the optical density was determined on a spectrophotometer at 455 nm.

Quantitative determination of total phenols - This was carried out spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent, converted to chlorogenic acid [50].

Quantitative determination of flavonoids was carried out using a spectrophotometric method with aluminum chloride (AlCl₃) [51].

Quantitative determination of phenolic acids was carried out by the spectrophotometric method at a wavelength of 320 nm.

Quantitative determination of leucoanthocyanins by a spectral method using leucoanthocyanidin reagent at 550 nm.

Antioxidant activity was determined by the DPPH free radical scavenging method. DPPH is a stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical [52].

Statistical analysis: Standard error was calculated for each data point using Excel. The significance level was defined as $p \leq 0.05$.

Scientific news: Scientific innovation: For the first time in Georgia, the chemical composition of sea buckthorn fruits will be studied (a comprehensive study using chromatography - HPLC-UV, Vis, RI, UPLC-MS, PDA GC, spectral analysis and classical physicochemical research methods), as well as the qualitative and quantitative composition of biologically active compounds of sea buckthorn. It will be possible to develop innovative technologies based on the application of circular economy principles for the integrated processing of fruits, increasing the efficiency of processing waste, and reducing the negative impact on the environment. Using various modern physical and chemical methods, 3 organic acids, 35 flavonoids, 1 terpenoid, and 23 fatty acids were isolated and identified from sea buckthorn fruits and their processed products. Several preparations were developed using green technologies.

Theoretical and practical significance of the work - The composition of biologically active compounds and their biological activity of leaves, fruits, and their processed products were studied. Technological methods have been selected that ensure maximum preservation of biologically active compounds. Methods for recycling industrial waste will allow entrepreneurs to produce biologically active products and drugs that are in demand on the market.

Testing of the work - the results of the research are reflected in 3 scientific articles and the materials of 1 international scientific conference.

Published scientific works:

5. Lana Datuashvili; Maia Vanidze; Indira Japaridze; Nona Surmanidze; Inga Kartsivadze; Ruslan Davitadze; Aleko Kalandia Chemical Composition Analysis of Sea Buckthorn (*Hippophae*) in Georgia and Development of Innovative Valorization Technologies Food Science & Nutrition 2025.

6. Lana Datuashvili; Maia Vanidze; Indira Japaridze; Nona Surmanidze; Inga Kartsivadze; Nona Abashidze; Maia Kharadze; Meri Khakhutaishvili; Ruslan Davitadze and Aleko Kalandia; Inga Bochoidze; Study of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Leaves by UPLC-MS and HPLC Methods International Journal of Life Sciences (ISSN: 2277- 193x) 14 (2) (2025) 27-35

7. Lana Datuashvili; Maia Vanidze; Indira Japaridze (Indira Djafaridze); Nona Surmanidze; Aleko Kalandia; Inga Bochoidze; Green Approaches to Carotenoid Extraction from Sea Buckthorn Fruit and Their Role in Ophthalmology Georgian Scientists 7, N2, 2025, <https://doi.org/10.52340/gs.2025.07.02.11>

8. Lana Datuashvili; Maia Vanidze; Indira Japaridze; Inga Kartsivadze; Nona Surmanidze; Ruslan Davitadze; Aleko Kalandia; Chemical Composition Analysis of Sea Buckthorn (*Hippophae*) in Georgia and Development of Innovative Valorization Technologies for Plant Materials and Processing Waste Published: 25 October 2024 by MDPI in The 5th International Electronic Conference on Foods session Chemistry and Physicochemical Properties of Foods <https://sciforum.net/paper/view/19451>

TScope and structure of the dissertation: The dissertation consists of 145 printed pages, by the formatting guidelines for a dissertation presented for the degree of Doctor of Philosophy, and includes the title and signature pages, table of contents, 45 images, a list of 22 tables, 10 diagrams, and a list of 151 references. The main text comprises: introduction, literature review, experimental section, discussion of results, conclusion, and a list of references.

1. Experimental part:

1.1. Analysis of carbohydrates in sea buckthorn juice by refractometric detection HPLC

Carbohydrates are one of the main components of sea buckthorn fruits, which are important for determining their energy value and taste properties. The composition and concentration of carbohydrates can vary significantly depending on the stage of maturity of the fruit, variety, and growing conditions. Therefore, their quantitative and qualitative analysis is an important task for studying the nutritional and medicinal properties of sea buckthorn fruits.[53; 54]

According to existing literature, sea buckthorn fruits mainly contain mono and disaccharides, such as glucose, fructose, sucrose, and arabinose. However, their exact quantitative content and ratio may vary depending on the data presented in different sources. [55; 56]

For quantitative determination of carbohydrates, Waters high-performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a refractometric detector (RD) and a Binary HPLC Pump 1525 was used. Chromatographic separation was performed on an amide chromatographic column (250 mm x 4.5 mm) and a carbohydrate chromatographic column. The column temperature was maintained at 40°C. A mixture of acetonitrile and water in a ratio of 85:15 (v/v) with a flow rate of 1.2 ml/min was used as the mobile phase.

Samples for chromatographic analysis were prepared according to the following scheme: 96% ethanol was added to the juice in a volume ratio of 1:1 to precipitate pectin and other colloidal compounds. In the case of fruits, a 10-gram sample was centrifuged at 12,000 rpm for 2 minutes at 4 °C. In all samples, after centrifugation, 80% acetonitrile solution was added to the resulting supernatant in a 1:1 volume ratio. The supernatant was filtered using a SEP-PAK C18 solid phase extraction (SPE) cartridge and transferred to an Eppendorf tube for analysis. [55].

Quantitative analysis was performed using standard solutions of sugars (glucose, fructose, arabinose, and sucrose) (Table 1) (see appendix 1).

Three dominant carbohydrates were found in sea buckthorn juice: arabinose, glucose, and sucrose. A small concentration of fructose was also found. The total dry matter content of the juice exceeded 20°Brix, of which up to 85% was carbohydrates. The glucose concentration in the juice exceeded 8%, and the sucrose concentration reached 3%. The obtained data indicate a high carbohydrate content in sea buckthorn juice, which is important in terms of its nutritional value and potential uses.

1.2. Qualitative and quantitative study of cations in sea buckthorn leaves and fruits by conductometric detection HPLC

Cations such as potassium, sodium, calcium, and magnesium are essential for the normal functioning of the human body. They are involved in regulating electrolyte balance, transmitting nerve impulses, facilitating muscle contraction, and other vital processes. Determining the cation content in sea buckthorn leaves and fruits is crucial for evaluating their nutritional and medicinal value.

The aim of this study is the qualitative and quantitative determination of cations in sea buckthorn leaves, fruits, and juice using conductometric detection by high-performance liquid chromatography (HPLC). HPLC is an analytical method with high sensitivity and selectivity, allowing for accurate and reliable determination of cations. Conductometric detection is used to determine the concentration of ions. Calibration curves were prepared using standard cation solutions, which are necessary for the quantitative analysis of the cations involved in the study (Table 3) (see appendix 1).

Sodium (Na⁺), potassium (K⁺), magnesium (Mg²⁺), and calcium (Ca²⁺) ions have been found in sea buckthorn leaves and fruits. The leaf contained a high concentration of cations, indicating that this part of the plant was rich in minerals.

The content of magnesium (Mg²⁺ - 577.6 ppm) and potassium (K⁺ - 415.4 ppm) was especially high, which may be associated with the intensive flow of photosynthesis and other physiological processes. The concentrations of calcium (Ca²⁺ - 26.2 ppm) and sodium (Na⁺ - 177.2 ppm) were relatively low.

The concentration of cations in fruits varies significantly depending on the region, indicating the influence of soil composition and climatic conditions. Erge fruits are characterized by a relatively high content of cations, especially magnesium (Mg²⁺ - 65.17 ppm) and potassium (K⁺ - 48.02 ppm). Tkhilnari have a low concentration of cations, which may indicate poor soil or other environmental factors. Akhaltsikhe fruits are characterized by a relatively high content of potassium (K⁺ - 266.04 ppm) and calcium (Ca²⁺ - 34.08 ppm), which may indicate the specific mineral composition of the soils of this area. Terjola fruits have relatively high levels of magnesium (Mg²⁺ - 53.46 ppm) and potassium (K⁺ - 40.77 ppm), which may also indicate the richness of the soil in this region.

According to the obtained results, the total concentration of cations in leaves significantly exceeds the values observed in fruits. The change in the concentration of cations in fruits indicates the influence of geographical factors. The high content of

potassium (K⁺) and magnesium (Mg²⁺) in leaves and some fruits indicates their important role in the physiological processes of plants.

The results of the study highlight the richness of mineral substances in sea buckthorn leaves and fruits, which is important for assessing their nutritional and medicinal value.

1.3. Qualitative analysis of phenolic compounds in sea buckthorn fruits and leaves using ultra-high performance liquid chromatography (UPLC-PDA) and mass spectrometry(MS) methods

The composition and concentration of phenolic compounds in sea buckthorn fruits and leaves can vary significantly depending on the fruit variety, stage of maturity, growing conditions (climate, soil) and geographic region. Therefore, their accurate identification and quantitative assessment are an important task for assessing the antioxidant and other biological activities of sea buckthorn fruits and leaves.

For chromatography, samples (leaves, fruits, seeds) were extracted with 50% ethanol using an ultrasonic bath (once, until complete extraction). After filtering the resulting extract, we concentrated the filtrates under vacuum to dry mass. We then treated the resulting concentrate with hexane to remove lipids, chlorophyll, and carotenoids. The dry mass remaining in the flask was dissolved in 1–5 ml of methanol. The methanol fraction was filtered through a 0.45 µm membrane filter and chromatographed.

For the identification and quantitative analysis of substances, existing standard compounds (chlorogenic acid, caffeic acid, gallic acid, quercetin, (+) catechin hydrate), which are often found in sea buckthorn fruits and are distinguished by their biological activity, were used, an open-source database of masses of substances (<https://metlin.scripps.edu>) and spectral data obtained from peer-reviewed scientific publications. This approach allowed the accurate identification of several compounds. Mass spectrometric analysis was performed in negative ionization mode, resulting in the determination of the [M-H]⁻ m/z value of the deprotonated molecular ion for each substance, which provides a first indication of the possible structure of the compound. The next step was the analysis of the chromatographic data. The retention time of the chromatographic peak of each substance was determined from the chromatogram, which provided an additional characteristic for identifying the compound. UV-Vis The spectrum was used to determine the maximum absorption wavelength of each substance, as well as the shape and intensity of the spectrum. The intensity is proportional to the concentration of the substance in the solution used for quantitative analysis. The final stage of the identification process was the comparison and verification of all received data. Mass spectrometry, chromatography, and UV-vis data were compared with each other as well as with standard compounds and the METLIN database. The comparison results, including spectral and chromatographic data, are presented graphically.

The following have been identified in the composition of sea buckthorn fruits (Table 5) (see appendix 1):

Substance 1 - Mass spectrometric analysis revealed a deprotonated molecular ion [M-H]⁻ with a mass of m/z 191.03. The chromatographic retention time was 2.379 min, and the UV-Vis spectrum showed maximum absorption at wavelengths of 222.8 and 273.7 nm. Comparison of the obtained data with the reference compound and the METLIN database shows that substance 1 corresponds to quinic acid.(Fig.3) (see appendix 1)

Substance 2 - Mass spectrometric analysis in negative ionization mode revealed the [M-H]⁻ ion at m/z 132.95. The retention time of the chromatographic peak was 2.819 minutes, and the maximum absorbance was recorded by a UV-visible detector at 260.8 nm. By comparing the spectral data obtained using a standard compound (malic acid, Sigma-Aldrich) and the METLIN database, substance 2 was identified as malic acid. (Fig.4) (see appendix 1)

Substance 3 and 4 - Mass spectrometric analysis revealed deprotonated molecular ions [M-H]⁻ with masses m/z 304.79 and m/z 304.78, respectively. The chromatographic retention times were 7.781 and 8.473 minutes, and the UV-Vis spectra showed maximum absorbance at 271.2 nm for both substances. Comparison of the obtained data with standard compounds and the METLIN database shows that substance 3 corresponds to gallocatechin (C₁₅H₁₄O₇), and substance 4 to epigallocatechin (C₁₅H₁₄O₇).

Substance 5 Mass spectrometric analysis revealed a deprotonated molecular ion [M-H]⁻ at m/z 609.27, and fragmentation analysis revealed a fragment ion at m/z 314.91The chromatographic retention time was 9.269 minutes, and the ultraviolet-visible spectrum showed a maximum absorbance at a wavelength of 352.2 nm. (see appendix 1)

Substance 6 - Mass spectrometric analysis revealed a deprotonated molecular ion [M-H]⁻ at m/z 314.84, and fragmentation analysis revealed a fragment ion at m/z 299.82. The chromatographic retention time was 11.950 minutes and the UV-Vis spectrum showed a maximum absorbance at 370.2 nm (fig.6). Comparison of the obtained data with standard compounds and

the METLIN database shows that substance 5 corresponds to a derivative of isorhamnetin (C₁₆H₁₂O₇), and substance 6 to isorhamnetin (C₁₆H₁₂O₇). (Fig.6) (see appendix 1)

Substance 7 Mass spectrometric analysis revealed a deprotonated molecular ion [M-H]⁻ with m/z 623.15. The chromatographic retention time was 9.177 min, and the UV-Vis spectrum showed maximum absorption at 351.0 nm. Comparison of the obtained data with standard compounds and the METLIN database shows that substance 7 corresponds to isorhamnetin-3-O-glucoside rhamnoside (C₂₈H₃₂O₁₆) (Fig.7) (see appendix 1).

Substance 8 - The deprotonated molecular ion was detected at m/z 623.01. The retention time of the chromatographic peak was 9.592 minutes. As a result of spectroscopic analysis in the ultraviolet-visible region (UV-Vis), the absorption maximum of substance 8 was observed at a wavelength of 335.4 nm. The obtained spectral and chromatographic data were compared with the standard compound and the METLIN database to confirm the identification. As a result, it was established that substance 8 was identified as isorhamnetin-3-O-rutinoside, the empirical formula of which is C₂₈H₃₂O₁₆ (Fig.8) (see appendix 1).

Substance 9 - Mass spectrometric analysis revealed a negatively charged molecular ion with m/z 288.88, corresponding to the [M-H]⁻ ion. The peak retention time was 8.857 minutes, and this material was found to be a fragmentation product of the ion found at m/z 577.13. As a result of spectroscopic analysis in the ultraviolet-visible region (UV-Vis), the absorption maximum was observed at 273.7 nm. According to the data obtained, substance 9 corresponds to catechin, the empirical formula of which is C₁₅H₁₄O₆.(Fig.9) (see appendix 1).

Substance 10 Mass spectrometric analysis revealed the presence of a deprotonated ion with m/z 609.15, indicating an [M-H]⁻ ion. Chromatographic analysis revealed a retention time of 8.732 minutes for this substance. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) revealed an absorption maximum at 347.2 nm. Based on a comparison of standard compounds and the METLIN database, substance 10 was identified as quercetin-3-O-hexose-7-O-dehexose. (Quercetin-3-O-Hexose-7-O-dHexose).(Fig.10) (see appendix 1)

Substance 11 Mass spectral analysis revealed a deprotonated molecular ion at m/z 609.27, corresponding to [M-H]⁻. The peak retention time was 9.323 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 352.2 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, compound 11 was identified as quercetin-3-O-rutinoside with the empirical formula C₂₇H₃₀O₁₆ (Fig.11) (see appendix 1).

Substance 12 Mass spectral analysis revealed a negatively charged molecular ion at m/z 300.83. Chromatographic analysis revealed a peak retention time of 11.411 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), an absorption maximum was found at 367.7 nm. Comparison with standard compounds and METLIN database data showed that compound 12 corresponds to ellagic acid, the empirical formula of which is C₁₄H₆O₈ (Fig.12) (see appendix 1).

Substance 13 Mass spectral analysis revealed that the deprotonated molecular ion was detected at m/z 476.99, while fragmentation yielded an ion at m/z 301. Chromatographic analysis showed a retention time of 9.909 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 352.8 nm. Based on comparisons with standard compounds and the METLIN database, compound 13 was identified as isorhamnetin-3-O-glucoside with the empirical formula C₂₂H₂₂O₁₂.(Fig.13) (see appendix 1).

Substance 14 Mass spectral analysis revealed a deprotonated ion at m/z 593.03, while fragmentation revealed an ion at m/z 461.26. Chromatographic analysis showed a retention time of 10.914 minutes. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) showed an absorption maximum at 370.2 nm. As a result of a comparison involving standard compounds and the METLIN database, compound 14 was identified as Isorhamnetin-pentose-rhamnoside with the empirical formula C₂₇H₃₀O₁₅ (Fig.14) (see appendix 1).

Substance 15 Mass spectral analysis revealed a negatively charged molecular ion at m/z 168.82, which is a fragmentation product of the ion detected at m/z 576.95. Chromatographic analysis showed a retention time of 8.980 minutes. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) showed an absorption maximum at 273.0 nm. As a result of comparison with standard compounds and METLIN database data, substance 15 was identified as gallic acid with the empirical formula C₇H₆O₅.(Fig.15) (see appendix 1).

Substance 16 Mass spectral analysis revealed a deprotonated molecular ion with m/z 576.80. Fragmentation yielded an ion with m/z 289. Chromatographic analysis showed a retention time of 8.766 minutes. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) showed an absorption maximum at 274.3 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 16 was identified as Procyanidin 1, the empirical formula of which is C₃₀H₂₆O₁₂. (Fig.16) (see appendix 1).

Substance 17-ob Mass spectral analysis revealed a deprotonated molecular ion at m/z 576.95, indicating a fragmentation ion at m/z 168.84. Chromatographic analysis yielded a retention time of 8.993 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 273.0 nm. As a result of comparison with standard compounds and the

METLIN database, substance 17 was identified as Procyanidin 2, the empirical formula of which is $C_{30}H_{26}O_{12}$ (Fig.17) (see appendix 1).

Substance 18 Mass spectral analysis revealed a deprotonated ion at m/z 462.80, while fragmentation gave an ion at m/z 285. During chromatographic analysis, the retention time was 9.507 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 354.8 nm. Based on comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 18 was identified as hyperoside with the empirical formula $C_{21}H_{20}O_{12}$ (Fig.18) (see appendix 1).

The following were found in the composition of sea buckthorn leaves:

Substance 1, which was found in sea buckthorn fruits, was also detected during the analysis of sea buckthorn leaves. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 190.99, as well as a peak at m/z 111 observed due to fragmentation. Chromatographic analysis showed a retention time of 2.460 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), absorption maxima were observed at 216.7 and 263.8 nm. Comparison with standard compounds and the METLIN database confirmed that substance 1 corresponds to quinic acid (Fig.19) (see appendix 1).

Substance 2, which was found in sea buckthorn fruits, was also detected during the analysis of sea buckthorn leaves. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 133.00. Chromatographic analysis showed a retention time of 2.646 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 260.8 nm. Comparison with a standard compound (malic acid) and the METLIN database confirmed that substance 2 corresponds to malic acid (Fig.20) (see appendix 1).

Substance 19, first identified in the analysis of sea buckthorn leaves, it was detected by mass spectral analysis, where a deprotonated molecular ion was found at m/z 330.97. No fragments were detected as a result of fragmentation. Chromatographic analysis yielded a retention time of 3.577 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 271.5 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 19 was identified as gallic acid hexoside with the empirical formula $C_{13}H_{16}O_{10}$ (Fig.21) (see appendix 1).

Substance 3, which was identified in sea buckthorn fruits, was also detected in sea buckthorn leaves. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 304.92. Chromatographic analysis showed a retention time of 7.396 minutes. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) showed an absorption maximum at 271.2 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 3 corresponds to galocatechin, the empirical formula of which is $C_{15}H_{14}O_7$ (Fig.22) (see appendix 1).

The fifth substance identified during the analysis of sea buckthorn leaves corresponds to substance 6, previously identified in sea buckthorn fruits. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 314.91. Chromatographic analysis showed a retention time of 7.396 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 271.2 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, the substance was identified as Isorhamnetin, the empirical formula of which is $C_{16}H_{12}O_7$ (Fig.23) (see appendix 1)

The sixth substance identified during the analysis of sea buckthorn leaves corresponds to substance 8, previously identified in sea buckthorn fruits. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 623.01. The retention time was 8.920 minutes. The absorption maximum was observed at 351.6 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 4 was identified as Isorhamnetin-3-O-rutinoside, the 7th substance identified in the empirical analysis of sea buckthorn leaf, which corresponds to substance 7 previously identified in sea buckthorn fruit formula is $C_{28}H_{32}O_{16}$ (Fig.24) (see appendix 1).

The seventh substance identified during the analysis of sea buckthorn leaves corresponds to substance 7, previously identified in sea buckthorn fruits. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 623.01. The retention time was 9.587 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 354.7 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, the substance was identified as Isorhamnetin-3-O-glucose-rhamnoside, the empirical formula of which is $C_{28}H_{32}O_{16}$ (Fig.25) (see appendix 1).

Substance 20 Compound 20 was identified by analysis of sea buckthorn leaves, the mass spectral characteristics of which include a deprotonated molecular ion with m/z 934.31, and fragmentation yielded an ion with m/z 632.79. Chromatographic analysis showed a retention time of 8.288 minutes. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) showed an absorption maximum at 270 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, the substance was identified as casuarictin, the empirical formula of which is $C_{41}H_{28}O_{26}$ (Fig.26) (see appendix 1).

The ninth substance identified during the analysis of sea buckthorn leaves corresponds to substance 11, previously identified in sea buckthorn fruits. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 609.12, and fragmentation yielded an ion at m/z 314.89. Chromatographic analysis showed a retention time of 9.211 minutes. Ultraviolet-visible

spectroscopy (UV-VIS) showed an absorption maximum at 347.2 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 4 was identified as quercetin-3-O-rutinoside with the empirical formula $C_{27}H_{30}O_{16}$ (Fig.27) (see appendix 1).

The tenth substance, identified during the analysis of sea buckthorn leaves, is similar to substance 12, previously identified in sea buckthorn fruits. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 300.91. The retention time was 9.686 minutes. The absorption maximum was observed at 271.2 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 4 was identified as ellagic acid, the empirical formula of which is $C_{14}H_6O_8$ (Fig.28) (see appendix 1).

Substance 11, identified during the analysis of sea buckthorn leaves, is similar to substance 13, previously identified in sea buckthorn fruits. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 476.93, and fragmentation yielded an ion at m/z 301. The retention time was 9.931 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 352.2 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 4 was identified as isorhamnetin-3-O-glucoside with the empirical formula $C_{22}H_{22}O_{12}$ (Fig.29) (see appendix 1).

Substance 21 was identified from sea buckthorn leaf analysis, the mass spectral characteristics of which include a deprotonated molecular ion at m/z 592.95, and fragmentation yielded an ion at m/z 285. Chromatographic analysis showed a retention time of 7.995 minutes. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) showed an absorption maximum at 272.2 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 21 was identified as kaempferol-3-O-rutinoside, the empirical formula of which is $C_{28}H_{32}O_{16}$ (Fig.30) .

The 12th substance identified during the analysis of sea buckthorn leaves corresponds to substance 18, previously identified in sea buckthorn fruits. Its mass spectral characteristics include a deprotonated molecular ion at m/z 462.80, and fragmentation yielded an ion at m/z 285. Chromatographic analysis yielded a retention time of 9.507 minutes. Using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), the absorption maximum was observed at 272.2 nm. As a result of comparison with standard compounds and the METLIN database, substance 4 was identified as Hyperoside with the empirical formula $C_{21}H_{20}O_{12}$ (Fig.31) (see appendix 1).

1.4. Quantitative analysis of phenolic compounds in sea buckthorn fruits and leaves

The results of chromatographic analysis show that the fruits and leaves of the plant are particularly rich in biologically active phenolic compounds.

Phenolic compounds and flavonoids are known for their antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties. Catechins and leucoanthocyanins, which are subgroups of flavonoids, are also characterized by high biological activity. Quantitative determination of these compounds in sea buckthorn leaves and fruits is important for assessing their nutritional and medicinal value.

The aim of this study is to determine the amount of total phenols, phenolic acids, total flavonoids, catechins, and leucoanthocyanins in sea buckthorn leaves and fruits using spectral methods. In addition, the study will determine antioxidant activity, which is a functional characteristic of biologically active compounds.

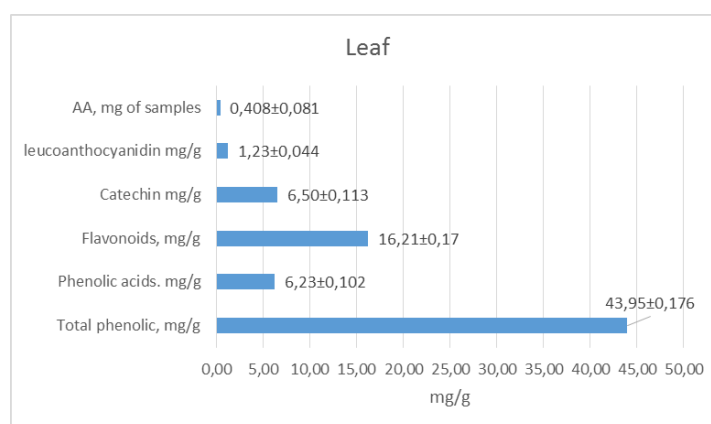


Diagram1. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Sea Buckthorn Leaves

Sea buckthorn leaves contain 43.95 mg/g total phenols, 6.23 mg/g phenolic acids, and 16.21 units of total flavonoids. Among flavonoids, catechins account for 6.50, and leucoanthocyanins for 1.23 mg/g units. The difference in flavonoid content (8.48 mg/g) is due to the other flavonoids found in the leaf.

The content of total phenols in fruits collected in different regions ranges from 19.90 to 30.58 mg/g based on dry weight, with a relatively high value of 34.94 mg/g recorded in the sample from Akhaltsikhe. Of the total phenols, the content of phenolic acids ranges from 2.24 to 3.43 mg/g, while the concentration of flavonoids is approximately 10 times higher than phenolic acids and is 16.72–27.01 mg/g.

Quantitative analysis of biologically active compounds in sea buckthorn fruits of different geographical origins revealed significant differences in the content of total phenols, phenolic acids, flavonoids, catechins, and leucoanthocyanins.

The concentration of total phenols in fruits varied from 19.90 to 30.58 mg/g dry weight. The exception was the Akhaltsikhe sample, where a significantly higher value was recorded – 34.94 mg/g. This may be associated with the potential influence of soil and climatic conditions of the Akhaltsikhe region on the synthesis of phenolic compounds. The content of phenolic acids in the fruits was significantly lower and ranged from 2.24 to 3.43 mg/g. The concentration of flavonoids in the fruits was approximately 10 times higher than the content of phenolic acids and ranged from 16.72 to 27.01 mg/g. Such quantitative indicators indicate the dominance of flavonoids in sea buckthorn fruits and largely determine their antioxidant or other biological activity.

Among the subgroups of flavonoids, catechins (2.44–4.10 mg/g) and leucoanthocyanins (11.38–18.78 mg/g) were identified. The content of catechins varied somewhat among samples, with relatively high levels observed in samples from Terjola (3.66 mg/g) and Akhaltsikhe (4.10 mg/g). A similar trend was observed in the case of leucoanthocyanins: Erge (11.38 mg/g), Tkhilnari (13.08 mg/g), Akhaltsikhe (18.78 mg/g), and Terjola (16.44 mg/g) (Tables 6 and 7) (see appendix 1)..

Antioxidant activity was assessed by the DPPH radical inhibition method and is presented in two forms: Firstly, the sample mass (mg) required for 50% inhibition of the DPPH radical, and secondly, the relative antioxidant activity, which expresses the inverse relationship of the first indicator. The results showed that the sample from Akhaltsikhe, which was characterized by a high content of total phenols, had the highest antioxidant activity. For this sample, only 2.881 mg of sample was required to achieve 50% inhibition of DPPH radical. This indicates that the fruits of Akhaltsikhe sea buckthorn contain a high concentration of antioxidants. Compared with other samples, 3.702 mg of sample was required for 50% inhibition of DPPH radical in Terjoli sample, 4.188 mg in Tkhilnar sample, and 6.15 mg in Erge sample. These data indicate that these samples had relatively low antioxidant activity, which is consistent with their low content of phenolic compounds.

In general, the higher the concentration of bioactive compounds, especially phenolic compounds, in a sample, the lower the sample mass required for 50% inhibition of the DPPH radical. This indicates an inverse relationship between the concentration of compounds and the sample mass required for inhibition. The relative antioxidant activity index was used to demonstrate the direct proportional relationship between the concentration of total phenols and antioxidant activity. The ratio facilitates the interpretation of the data.

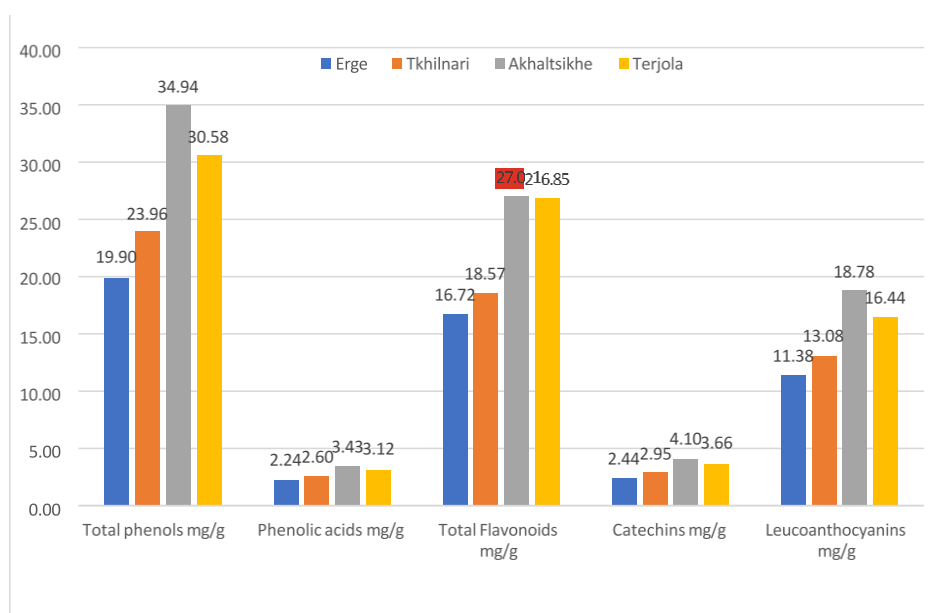


Diagram 2. clearly illustrates the content of total phenols, phenolic acids, flavonoids, catechins, and leucoanthocyanins in fruits collected from different regions.

Quantitative analysis using spectral methods revealed significant differences in the content of biologically active compounds in the leaves and fruits of sea buckthorn of different geographical origins. Studies have shown that sea buckthorn leaves and fruits are raw materials rich in phenolic compounds, especially flavonoids. The leaf has a higher concentration of phenolic compounds than the fruit. The content of phenolic compounds in fruits varies significantly depending on their geographical origin, indicating the influence of environmental factors on their synthesis. The Akhaltsikhe sample is distinguished by its high content of phenolic compounds and antioxidant activity.

1.5. Study of lipid compounds in sea buckthorn fruits by gas-liquid chromatography

Sea buckthorn fruits are distinguished by their rich lipid composition, which determines their multifaceted biological activity and use in both medicinal and food products. Lipid components include fatty acids, sterols, and carotenoids, the identification and quantification of which are important for assessing the therapeutic potential of the fetus.

The study of the lipid composition of sea buckthorn fruits is carried out using gas chromatography (GC). Chromatography (GC) method. GC is a highly effective analytical method based on the separation of mixture components based on different distribution coefficients between the mobile and stationary phases. Chromatography method (GC). GC is a highly efficient analytical method based on the separation of mixture components based on different distribution coefficients between the mobile and stationary phases.

GC analysis of fatty acids typically requires pre-treatment, including esterification, which increases their volatility and improves separation efficiency. The esterified fatty acid methyl esters are injected into the GC, where they are separated and detected using a flame ionization detector (FID).

Detailed analysis of the lipid composition of sea buckthorn fruits using gas-liquid chromatography will facilitate a comprehensive study of the biological activity of the fruits and the development of new functional food and pharmaceutical products.

The composition of carboxylic acids was determined by gas chromatography using a TRACE™ 1310 gas chromatograph (Thermo Scientific). Chromatographic separation was performed on an Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME GC Column/capillary column CP7489 with the following parameters: length 100 m, internal diameter 0.25 mm, and stationary phase 0.20 µm particle size.

For gas-liquid chromatography of lipid compounds, samples need to be esterified. For this purpose, the samples were pre-filtered to remove mechanical impurities. Then, 1 ml of the sample was transferred to a centrifuge tube, where 0.5 ml of 2 normal KOH 96% alcohol solution was added (ethanol or methanol can be used). After this, 10 ml of hexane was added (total volume 11.5 ml). The mixture was vigorously stirred until completely dissolved (at least 30 seconds) and centrifuged for 1 minute at 13,500 rpm. 1.0 µL of the test sample was injected using a 10 µL microsyringe from SGE Analytical Science from the top fraction of the sample.

The injector temperature was maintained at 260°C. When the sample was injected into the column in a helium flow, separation was performed in a ratio of 1/20. The flow rate of the mobile phase, helium, was 5.21 ml/min.

Chromatographic separation was performed using a temperature gradient divided into three stages. In the first stage, the temperature was maintained at 120°C for 8 minutes. In the second stage, the temperature was increased to 180°C at a rate of 8°C/min and maintained for 18 minutes. In the third stage, the temperature was increased to 230°C at a rate of 3°C/min and maintained at this temperature for 13 minutes. The total duration of the chromatographic analysis was 61.17 min.

Detection of methyl esters of carboxylic acids obtained as a result of chromatographic separation was carried out using an AI-ionization detector. The detector temperature was maintained at 300°C. The hydrogen supply was 40 ml/min, the air supply was 400 ml/min, and the exhaust gases were purged with a helium flow at a rate of 25 ml/min.

Identification of the components detected by chromatographic analysis was performed using a Supelco 37 Component FAME Mix standard sample (product number: CRM47885, lot number: LRAD3869), the composition of which was known in advance. The study aimed to conduct a comparative analysis of four different methods for extracting fatty acids from sea buckthorn fruit oil: Soxhlet extraction (method 1, extractant hexane) (Figure 32), ultrasonic probing (method 2, extractant 50% ethanol) (Figure 32), supercritical water extraction (method 3) (Figure 33) and cold pressing (method 4) (Figure 33). The study involved the identification and quantification of fatty acids. The oil obtained by each method was characterized by the presence of different fatty acids. A total of 28 components were identified, of which 5 were unknown compounds. Saturated fatty acids were identified: Butyric acid methyl ester (4:0), Caproic acid methyl ester (6:0), Caprylic acid methyl ester (8:0), Capric acid methyl ester (10:0), Undecanoic acid methyl ester (C11:0), Lauric acid methyl ester (C12:0), Myristic acid methyl ester (C14:0),

Pentadecanoic acid methyl ester (C15:0), Palmitic acid methyl ester (C16:0), Stearic acid methyl ester (C18:0), Heptadec acid methyl ester (C17:0), Arachidic acid methyl ester (C20:0). Trans Unsaturated Fatty Acids Elaidic acid methyl ester (C18:1n9t) and monounsaturated fatty acids: Myristic acid methyl ester (C14:1), Palmitoleic acid methyl ester (C16:1) and Oleic acid methyl ester (C18:1n9c). Polyunsaturated fatty acids: Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c), α -Linolenic acid methyl ester (C18:3n3c) (Table 9) (see appendix 1).

Data analysis showed that low molecular weight fatty acids (Butyric, Caproic, Caprylic, Capric, Undecanoic, Lauric) were found only in the oil obtained by Soxhlet extraction, which indicates the uniqueness of this extraction method. Myristic acid was present in the highest concentration in Soxhlet extracted oil (4.371) and in small amounts in cold pressed oil (0.200).

Palmitic acid was present in the highest concentration in cold-pressed oil (29.102), whereas it was relatively lower in oils obtained by other methods (10.121–16.317). The highest concentration of palmitoleic acid was found in cold-pressed oil (12.844) and the lowest in Soxhlet-extracted oil (1.024). The highest content of stearic acid was found in Soxhlet-extracted oil (25.808) and the lowest in cold-pressed oil (1.192). The oleic acid concentration in cold-pressed oil was the highest (48.127), whereas in Soxhlet-extracted oil it was relatively low (20.359). Linoleic acid was found in the highest concentration in supercritical water extracted oil (48.335) and in trace amounts in cold pressed oil (1.998). Alpha-linolenic acid was present in the highest concentration in the ultrasonic-extracted oil (14.740), whereas in relatively lower amounts in the cold-pressed oil (10.106). Elaidic acid (trans fat) was detected only in the oil obtained by Soxhlet extraction (0.537). The highest concentration of behenate was found in oil obtained by supercritical water extraction (0.192) (Table 9).

Soxhlet extraction produces a wide range of fatty acids but contains trans fats and low molecular weight acids. The Soxhlet method has significant disadvantages, including a long extraction time (18 hours) and the use of a toxic organic solvent (hexane), which does not comply with the principles of green chemistry. The ultrasonic probing method is characterized by a high yield of omega-3 and omega-6 fatty acids. The ultrasonic probing method is an environmentally friendly extraction method that uses a relatively less toxic solvent, 50% ethanol, which significantly reduces the extraction time (30 minutes). Supercritical water extraction is effective in extracting omega-6 and is environmentally friendly. The cold pressing method produces a high concentration of oleic acid, but the yield of omega-3 is low.

The choice of extraction method for the preparation of an ointment containing biologically active compounds of sea buckthorn fruits should be based on a specific goal - the maximum content of fatty acids that have a pronounced regenerative and anti-inflammatory effect on superficial post-traumatic scars of the eye.

A comparative analysis of extraction methods conducted as part of a study of the formulation of an ointment for ophthalmological use of bioactive compounds of sea buckthorn fruits and its effect on the regeneration of superficial post-traumatic scars of the eye revealed that each of the methods (Soxhlet extraction, ultrasonic probing, supercritical water extraction and cold pressing) differs significantly in the content of the fatty acids obtained.

Research has shown that ultrasonic and supercritical water extraction methods provide high levels of Oleic acid methyl ester (C18:1n9c), α -Linolenic acid methyl ester (C18:3n3c) (omega-3), and Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c) (omega-6) with anti-inflammatory and regenerative properties. This is of critical importance in the treatment of superficial post-traumatic ocular scars.

The cold-pressed extract is also characterized by significant concentrations of methyl ester of alpha-linolenic acid (C18:3n3c) (omega-3), methyl ester of linoleic acid (C18:2n6c) (omega-6), and methyl ester of oleic acid (C18:1n9c). The combination of these fatty acids may help repair damaged tissue and reduce scar formation.

Although Soxhlet extraction allows the production of a wide range of fatty acids, its use for ointment preparation may be less desirable due to the formation of trans fats and environmental concerns.

Accordingly, the extracts obtained by ultrasonic probing and supercritical water extraction methods, as well as cold-pressed oil, are promising for further research aimed at studying their effectiveness in the process of regeneration of superficial eye lesions.

1. Complex processing of sea buckthorn fruits and waste disposal

The food industry is one of the most important sectors of the global economy; however, its operation is associated with significant environmental challenges, in particular, waste generation. Food industry waste, which includes organic and inorganic materials, represents a serious problem from both an environmental and economic point of view. In the food industry, waste is generated at different stages of the technological process: from the production of raw materials to the packaging of products. The main sources are agricultural waste and beverage production. Worldwide scientific research

suggests various approaches to waste management, which can be grouped as follows: Waste prevention (optimizing production processes to reduce waste generation), extending product shelf life, optimizing packaging, and raising consumer awareness on reducing food waste. Another important approach is the recycling of waste into valuable products, including medicinal products for various purposes. These wastes are rich in biologically active compounds such as phenolic compounds, vitamins, and fatty acids. The study aimed to determine the optimal conditions for extracting biologically active compounds from sea buckthorn waste and their identification. The fruits were processed in laboratory conditions close to semi-industrial ones. 4500 g of sea buckthorn berries (raw) were collected for processing. After passing through a chopper (a chopper designed for chopping tomatoes), 2 fractions were obtained: pulp weight - 3900 g (87% of the total seed weight), which mainly consists of mesocarp and endocarp, and pulp - 600 g (13% of the total seed weight) (Figure 35 and 36) (see appendix 1).. It mainly contains the skin and seeds of berries (in the photo).

Identification of compounds was performed using chromatographic and spectroscopic methods. The study used green technologies, including an ultrasonic probe and supercritical water extraction, and compared them with the classical extraction method (maceration).

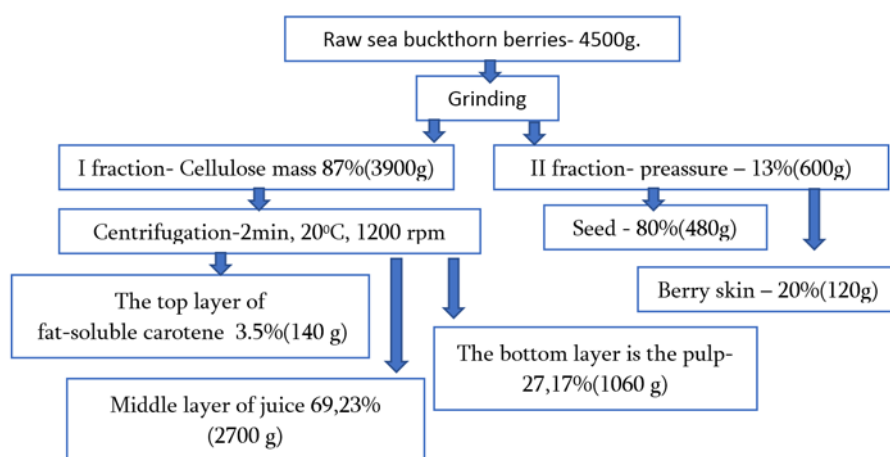


Figure 34. Sea buckthorn fruit processing scheme

For further separation and fractionation of the pulp (3900g), centrifugation was performed at 12,000 rpm at 20°C for 2 minutes. The centrifugation process is based on the difference in density and solubility of the components of the fractions. As a result, the pulp fraction underwent phase separation, and three separated layers were identified: Upper lipophilic layer (140 g, 3.59% pulp fraction): This layer consisted mainly of carotenoids suspended in fat. Carotenoids, as tetraterpenoid lipophilic pigments, are characterized by high solubility in non-polar solvents such as fats, which determines their concentration in the upper phase. Middle water-soluble layer (2700 g, 69.23% cellulose fraction): This layer was an aqueous solution containing hydrophilic components such as sugars, organic acids, and other water-soluble compounds. Bottom sediment (1060 g, 27.17% pulp fraction): This layer consisted of mechanical particles and insoluble components such as cell wall fragments, fibers, and other solid particles whose density was higher than the density of water (FIGURE 36) (see appendix 1).

The next stage of research aimed to valorize waste (pulp, cake) generated as a result of processing sea buckthorn berries, determine the optimal conditions for extracting biologically active compounds from them, and identify the compounds for subsequent use in creating preparations rich in antioxidants.

2.1. Extraction of biologically active compounds from sea buckthorn pulp using “green technologies” (ultrasound) to produce an eye ointment

Quantitative analysis of carotenoids showed that their content in raw sea buckthorn berries is 3.051 mg/g, calculated on a dry weight basis. The main part of carotenoids (2.745 mg/g) is concentrated in the pulp fraction, while in the pressed fraction their content is 0.236 mg/g (Table 1). Almost two-thirds of the carotenoids in the pulp (1.817 mg/g) are present in the upper centrifuged layer, which is a fat-weighted lipophilic fraction (substance 1). The resulting preparation contains 3% of the fat

content of raw fruits. The juice contains an insignificant amount of carotenoids (0.046 mg/g), and the centrifuged pulp contains 0.868 mg/g (Table 11) (see appendix 1)..

To maximize the extraction of carotenoids from the centrifuged pulp mass, ultrasonic extraction was used with “green” extractants. Extraction of the pulp was carried out using vegetable fat and ethanol of various concentrations using an ultrasonic probe. To select the optimal extraction conditions, the following parameters were studied: the ratio of solid mass to extractant, extraction temperature, duration, and type of extractant.

Extraction efficiency was determined by scanning the extracted carotenoids in the fat in the ultraviolet-visible region every 5 minutes of extraction. During the first 20 minutes of extraction, the carotenoid content increased from 0.1954 to 0.5381, whereas no increase in pigment concentration was observed during the next 5 minutes (Figure 1). After completion of the extraction, the extracted mass was centrifuged for 2 minutes at 20°C and 8000 rpm. As a result of centrifugation, the fat separated from the pulp, and as a result of the release of carotenoids from it, the oil turned bright orange, while the pulp became discolored (Figure 38) (see appendix 1)..

The optimal conditions for the extraction of vegetable fat using the ultrasonic probe method were determined: the ratio of solid mass (centrifuged pulp of the cake - raw mass) and sunflower oil was 1:1, the temperature was 30-35°C (the temperature was regulated using an ice bath), the amplitude was 50%, and the duration of extraction was 20 minutes. (Fig.38) (see appendix 1).

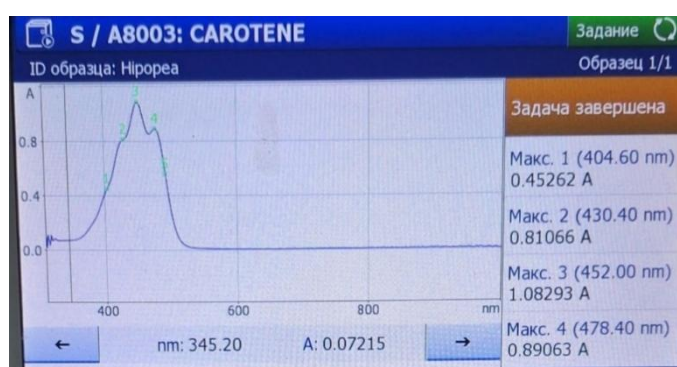


Fig. 37. Carotenoids scanning

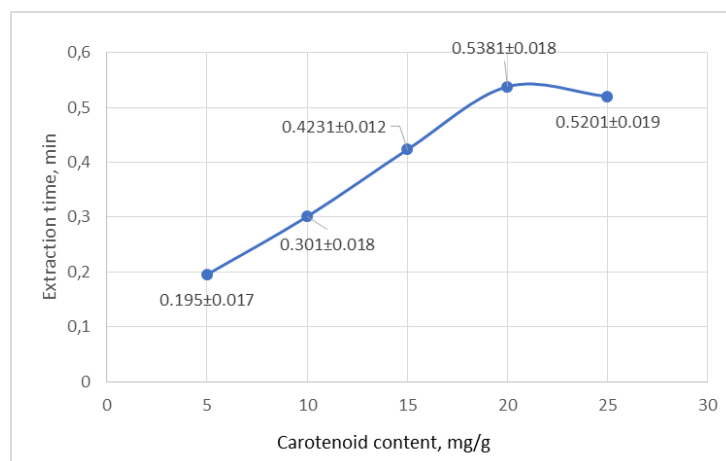


Diagram 3. Curve showing the extraction of carotenoids from centrifuged sea buckthorn pulp using an ultrasonic probe

The following quality indicators were determined in sunflower oil enriched with carotenoids and the original sunflower oil sample: free fatty acid content, peroxide value, n-anisidine index, carotenoid content, and antioxidant activity.

Compared with the control sample of sunflower oil, the acidity was stable, the peroxide and n-anisidine values decreased, namely, the acidity index was 0.05% (control oil) and 0.06% (enriched oil). The peroxide value decreased from 2.8 to 2.56, and the n-anisidine value decreased from 3.73 to 3.22 (Table 12). This indicates that the amount of aldehyde compounds and peroxides in the carotenoid-enriched oil is lower compared to the control oil sample, which increases the oxidative stability of the oil.

As a result of determining the antioxidant activity, it was found that the oil enriched with carotenoids was characterized by 3.5 times higher antioxidant activity compared to the control sample. In particular, 0.33 mg of carotenoid-enriched oil was required for 50% inhibition of the DPPH radical at a concentration of 0.1 mmol/L, whereas 1.17 mg was required for the control oil. The results obtained indicate that carotenoids extracted from sea buckthorn pulp into oil (on average 0.5941 mg/g dry weight) significantly increase the antioxidant activity of the oil (Table 12) (see appendix 1)..

From the data presented, it can be concluded that the addition of carotenoids led to some improvement in the quality of the oil. The decrease in acidity and peroxide value indicates that carotenoids showed some antioxidant activity and slowed down the oxidation process of the oil.

Ethanol of various concentrations was also used to extract phenolic compounds from sea buckthorn pulp using the ultrasonic probing method. At the initial stage, the efficiency of the extractant was tested, namely, the following extractants were used: water, 25%, 50%, and 75% ethanol. The ratio of solid mass to extractant was also determined; the optimal ratio was 1:20. The extracted mass, together with the extractant, was homogenized at 7000 rpm for 1 min. Four temperature modes were also selected for extraction: 30–35° C, 35–40° C, 40–45° C, and 45–50° C.

At the first stage, the optimal type of extractant was determined based on the content of extracted substances, antioxidant activity, carotenoids, and the amount of phenolic compounds. With an increase in the concentration of ethanol, the content of extractable substances does not increase, but the amount of carotenoids and phenols increases, and therefore, the antioxidant activity is also high. The highest results were obtained using 75% ethanol, where the concentration of carotenoids was 1.684 mg/g, and phenols – 8.213 mg/g. The content of carotenoids is almost 2 times less in 50% ethanol extract (0.703 mg/g) and significantly less in 25% ethanol (0.282 mg/g) and aqueous extracts (0.121 mg/g). The total phenol content increases in parallel with the ethanol concentration (from 2324 to 8213 mg/g) (table). Accordingly, the antioxidant activity characteristic is also high: 0.163 mg of sample is sufficient for 50% inhibition of the DPPH radical (in the case of 75% ethanol extract), whereas in the case of other extracts, the sample mass required for inhibition increases from 0.239 mg to 0.547 mg. The obtained data indicate that the optimal extractant for obtaining biologically active compounds from sea buckthorn pulp is 75% ethanol. (Table 13) (see appendix 1)..

Considering the thermolability of carotenoids, experiments were conducted at different temperature conditions to determine the optimal extraction temperature. As a result, it was established that the maximum extraction of carotenoids is achieved at a temperature of 45-50°C. With an increase in temperature, the extraction of carotenoids increased significantly from 0.245 mg/g (30-35°C) to 1.684 mg/g (45-50°C).

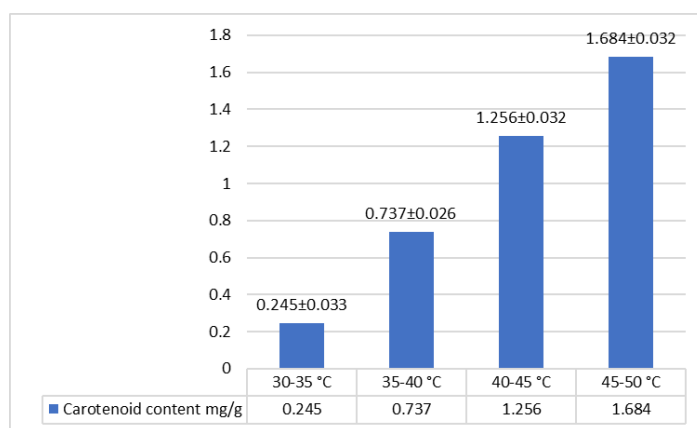


Diagram 4. Determining the optimal temperature regime for carotenoids extraction using an ultrasonic probe

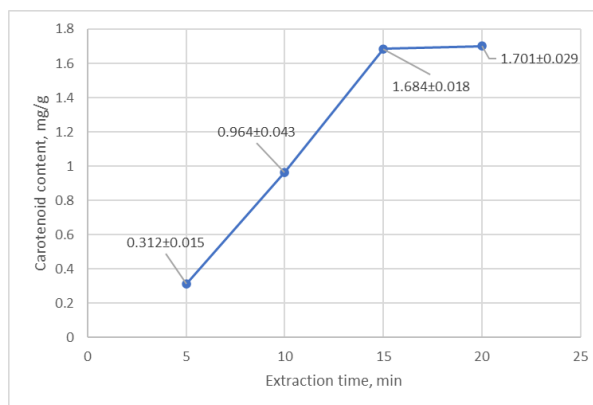


Diagram 5: Determining the optimal time for carotenoids extraction using an ultrasonic probe

To determine the optimal extraction conditions, the effect of temperature and time on extraction efficiency was determined. Experiments were conducted at different time intervals to optimize extraction time. As a result, it was established that the maximum yield of carotenoids is achieved with 15-minute ultrasonic treatment. Over the next 5 minutes, the amount of carotenoids did not increase. As a result, it was established that ultrasonic extraction with 75% ethanol at a temperature of 45-50°C for 15 minutes provides the maximum yield of carotenoids. Longer extraction does not result in a significant increase in carotenoid content, indicating that the extraction process is complete.

To isolate biologically active compounds from the obtained extract, a fractionation process was carried out. In particular, to isolate carotenoids, the extract was cooled to 4°C for 24 hours, which led to the precipitation of carotenoids. To separate the resulting precipitate, the extract was centrifuged at 12,000 rpm at 4°C for 2 minutes. The resulting precipitate containing carotenoids was lyophilized to obtain carotenoids-containing preparation 2 (preparation weight 15 mg).

In addition to the extraction of carotenoids, 75% ethanol was found to be optimal for the extraction of phenolic compounds, in particular, in the case of aqueous extraction, the phenol content was 6.324 mg/g. The amount of extracted phenols increases proportionally to the concentration of ethanol: in the case of 25% ethanol - 9.805 mg/g, in the case of 50% ethanol - 13.661 mg/g and in the case of 75% ethanol - 24.213 mg/g, calculated on a dry weight basis. The concentration of extracted phenols was approximately 80% of the phenols present in the fruits (phenolic concentration in fruits 30.58 mg/g), about 80%. (Table 13) (see appendix 1).

To obtain a preparation rich in phenolic compounds, the supernatant obtained after centrifugation was concentrated in a rotary vacuum apparatus at a temperature of 40°C. The concentrate was lyophilized to obtain a preparation rich in phenolic compounds. After extraction of 100 g of raw pulp, 2 g of dry mass (preparation 3) was obtained, in which the concentration of phenols was 250 mg/g, and the antioxidant activity was determined as 0.011 mg (in particular, 0.011 mg of the preparation is sufficient for 50% inhibition of radicals). (Table 14) (see appendix 1).

The preparation obtained from 100 g of centrifuged pulp remaining after processing sea buckthorn fruits (2 g of dry preparation) contains 500 mg of phenolic compounds, 0.69 g of protein, 0.102 g of pectin and 0.708 g of carbohydrates (the carbohydrate content was calculated by the difference) (Table 14).

The study resulted in four different types of drugs(preparations), differing in composition and method of administration:

Preparation 1: Lipophilic carotenoid concentrate (sea buckthorn oil) obtained from centrifuged raw sea buckthorn pulp and representing a fat-weighted lipophilic fraction (carotenoid concentration: 1.817 mg/g and fat content 3% (raw fruits)).

Preparation 2: Carotenoid powder obtained by ultrasonic extraction (with 75% ethanol), which is a source of carotenoids for the pharmaceutical and cosmetic industries. 15 mg of carotenoids is obtained from 100 g of raw pulp.

Preparation 3: Powder of phenolic compounds obtained by ultrasonic extraction (with 75% ethanol), from 100 g of raw pulp 2 g of dry mass was obtained, which contains 500 mg of phenolic compounds, 0.69 g of protein, 0.102 g of pectin and 0.708 g of carbohydrates. It can be used in the pharmaceutical and cosmetic industries as a concentrated source of phenolic compounds. The ultrasonic extraction method also made it possible to obtain vegetable oil enriched with carotenoids (carotenoid concentration: 0.5941 mg/g dry weight), Improvement of quality indicators (reduction of acidity, peroxide, and n-anisidine numbers), and an increase in antioxidant activity by 3.5 times compared to the control oil. It can be used in the food industry as a carotenoid-enriched oil.

The study showed that the waste (pulp) generated during the processing of sea buckthorn berries is a rich source of carotenoids and phenolic compounds. Preparations enriched with carotenoids and phenolic compounds were obtained using the method

of ultrasonic probing and "green" extractants (vegetable oil, ethanol). Sunflower oil enriched with carotenoids. Notably, the study used raw materials, eliminating the need for traditional drying methods. This approach represents a significant advantage for the following reasons: Energy efficiency and cost effectiveness, Environmental benefits.

2.2. Extraction of biologically active compounds from sea buckthorn pulp using "green" technologies (ultrasonic probe and supercritical water) for the production of eye ointment

The pomace remaining after the production of sea buckthorn juice is an important source of fats and biologically active compounds, including phenolic compounds (table). According to our research results, raw sea buckthorn pulp, consisting of approximately 80% seeds and 20% fruit peel, contains from 11.95% to 13.22% fat (Table 16) (see appendix 1). (in terms of dry weight) and from 0.140 to 0.583 mg/g carotenoids (in terms of dry weight) (Table 15) (see appendix 1)..

Quantitative analysis of carotenoids shows that the carotenoids content in individual fractions of the pomace is almost the same and is 0.112 mg/g in seeds (calculated for a yield of 80%) and 0.117 mg/g in the peel (calculated for a yield of 20%) in dry weight (table 15) (see appendix 1)..

Spectral analysis of phenolic compounds shows that the total phenol content in raw pulp is 89.41 mg/g, of which 16.95 mg/g are phenolic acids and 64.71 mg/g are flavonoids. Flavonoids are mainly represented by catechins (25.90 mg/g) and leucoanthocyanins (44.45 mg/g). The antioxidant activity of sea buckthorn extract is quite high: 0.766 mg of sea buckthorn extract is sufficient to inhibit 50% of DPPH radicals. (Table 17) (see appendix 1)..

Taking into account the obtained results, our goal was to minimize the waste of sea buckthorn pressing and to maximize the use of its valuable components through green technologies. For this purpose, we used ultrasonic probe extraction and supercritical water extraction, which are characterized by high efficiency, selectivity, and environmental friendliness.

The efficiency of the experiment was determined by the extraction yield, which was calculated based on the content of fats, carotenoids, and phenolic compounds. The extracts obtained by both methods were subjected to further processing, including centrifugation, fat separation, concentration, and lyophilization, to obtain stable and concentrated preparations.

At the initial stage, the sample was homogenized with an extractant for 2 minutes to improve the quality of the pulp and hydration (15,000 rpm - the number of revolutions per minute, WITEG homogenizer). The optimal extraction ratio was 1:20 solid to liquid, 50% amplitude, pulse duty cycle, and 75% ethanol solvent. After 25 minutes of extraction, the total amount of phenols was 70.39 mg/g, phenolic acids – 11.21 mg/g, flavonoids – 42.28 mg/g, catechins – 18.38 mg/g, and leucoanthocyanins – 24.73 mg/g. (based on dry weight). Over the next 5 minutes, 30 minutes after extraction, the content of these compounds increased from 4 to 12 units (phenols from 70.39 to 84.09). Further increase in extraction time did not lead to a significant increase in extraction yield, therefore, 30 minutes was considered the optimal time (Diagram 6). In the next step, we centrifuged the extract at 7000 rpm for 2 minutes at 20°C. The resulting extract was left at room temperature (24 hours), and the fat dissolved. The amount of fat obtained was 7.365%, which is approximately 62% of the theoretical fat yield (compared to the value obtained by the classical Soxhlet method (11.95%)) (Diagram 7).

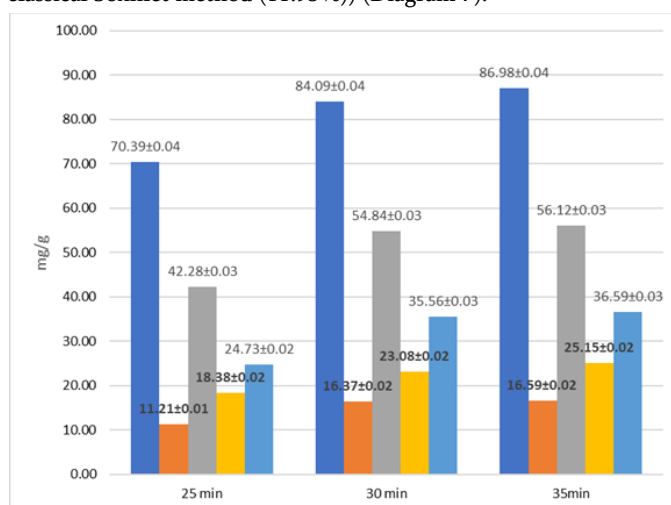


Diagram 6. Extraction of biologically active compounds from raw sea buckthorn pulp using an ultrasonic probe

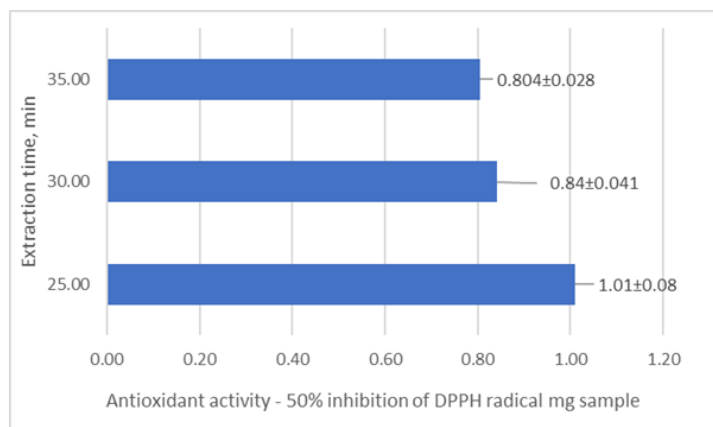


Diagram 7. Antioxidant activity of extracts obtained from raw sea buckthorn pulp using an ultrasonic probe After defatting, the extract was concentrated under vacuum at 45°C, and the resulting concentrate was lyophilized. From 100 g of raw extract, 6.72 g of lyophilized preparation was obtained, in which the phenol content was 4 g, namely 71.4 mg/g of dry weight.

During the supercritical water extraction process, the solid sample to water ratio was maintained at 1:20, which is consistent with the ratio used in the previous experiment. The extraction efficiency was assessed by the yield of biologically active compounds. In contrast to ultrasonic extraction, the total phenol content in the extract obtained by supercritical water extraction for 5 minutes was 76.16 mg/g (phenolic acids – 6.75 mg/g, flavonoids – 28.73 mg/g, including catechins – 11.51 mg/g and leucoanthocyanins – 13.43 mg/g). With an increase in the extraction time to 6 minutes, the total phenol content increased to 87.74 mg/g, and after 7 minutes it reached 92.25 mg/g. The results show that the optimal supercritical water extraction time to obtain the maximum yield of phenolic compounds is 7 minutes. During the next 3 minutes of extraction, the total phenolic content increases slightly, by about 5 units (from 92.25 to 96.75 mg/g). The results show that supercritical water extraction for 7 minutes provides the highest yield of phenolic compounds. After decanting the resulting aqueous extract, we left it at room temperature (24 hours), and the fat dissolved. The amount of fat obtained was 10.27%, which is approximately 86% of the theoretical fat yield (compared to the value obtained by the classical Soxhlet method (11.95%)) (Diagram 9). However, in the fat obtained by supercritical water extraction, carotenoids content was not detected, whereas in the fat extracted using an ultrasonic probe, it was 0.105 mg/g based on dry weight. In the next step, the aqueous extract was concentrated under vacuum (at a temperature of 55 C) and the resulting concentrate was lyophilized. Supercritical water extraction from 100 g of raw material yielded a virtually identical mass of 5.2 g of lyophilized preparation with a phenol content of 80 mg/g dry weight.

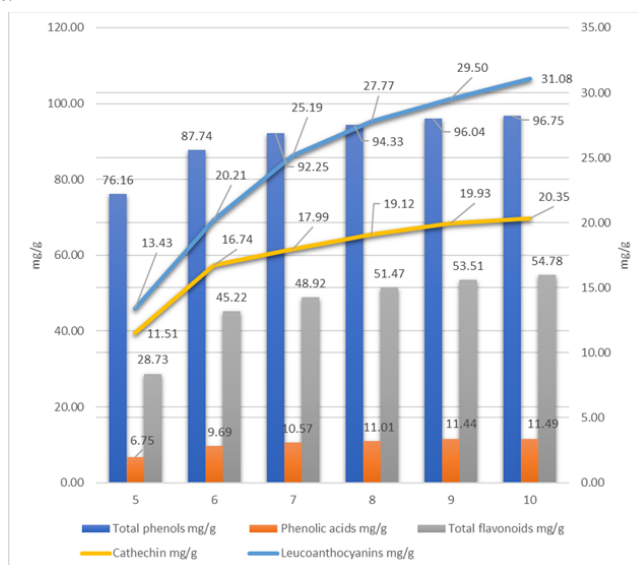


Diagram 8. Conditions of supercritical water extraction of raw sea buckthorn pulp (seed/skin) and the content of phenolic compounds

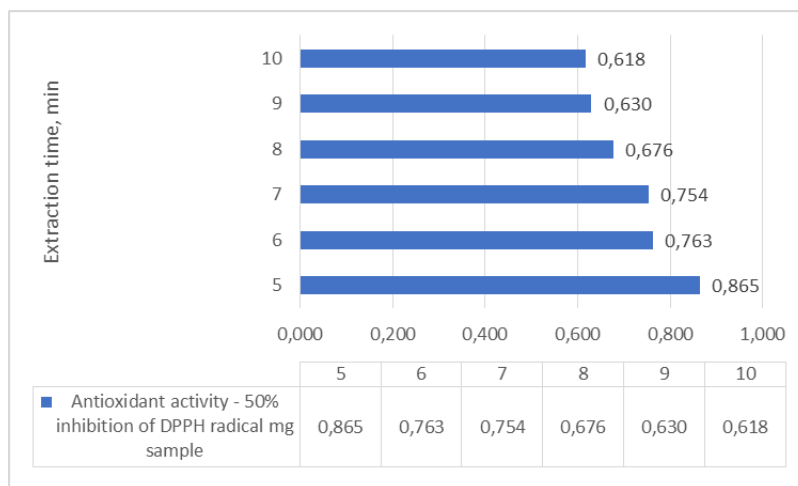


Diagram 9. Antioxidant activity of supercritical water extracts of crude sea buckthorn (seeds/skin)

As a result of the qualitative and quantitative determination of phenolic compounds in the obtained preparations, a total of 28 substances were identified, of which 4 were not identified. For substance identification and quantification, we used standard compounds available in our open mass database (<https://metlin.scripps.edu>) and spectral data obtained from peer-reviewed scientific publications.

The substances identified belong to the classes of organic acids, terpenoids, and flavonoids. Flavonoids are represented by subgroups of flavonols and flavanols. In particular, the following organic acids were identified: Quinic acid, Malic acid, and Citric acid. **Terpenoids:** Tanshinlactone derivative. **Flavonoids:** Quercetin, Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid, Isoquercitrin, Kaempferol-3-O-hexoside-7-O rhamnoside, Quercetin-3-O-sophoroside-7-O rhamnoside, Quercetin-3-O-rhamnosyl glucoside-7-O-rhamnoside, Kaempferol-3-O-rutinoside, Kaempferol 3-O glucoside, Isorhamnetin-3-O neohesperidoside), Rutin, Isorhamnetin-3-O-(6 rhamnosyl)hexoside (Narcissin), Isorhamnetin-O-dihexoside, Isorhamnetin.

Flavonoids (catechins): Epigallocatechin, Gallocatechin, (e)Catechin, (e)Catechin, and Catechin. Unlike the leaves and fruits of sea buckthorn, 16 new substances were found in the seeds: Citric acid (Substance 22), Tanshinlactone derivative (Substance 23), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid (Substance 24), Isoquercitrin (Substance 25), Kaempferol-3-O-hexoside-7-O rhamnoside (Substance 26), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid (Substance 27), Quercetin-3-O-sophoroside-7-O rhamnoside (Substance 28), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucoside-7-O-rhamnoside (Substance 29), Kaempferol-3-O-rutinoside (Substance 30), (e)Catechin-(e)Catechin (Substance 31), Kaempferol 3-O-glucoside (Substance 32), Isorhamnetin-3-O neohesperidoside (Substance 33), Rutin (Substance 34), Isorhamnetin-3-O-(6 rhamnosyl)hexoside (Narcissin) (Substance 35), Isorhamnetin-O-dihexoside (Substance 36), Kaempferol-3-O-rutinoside (Substance 37) and Quercetin (Substance 38).

Two "green" extraction methods were evaluated for the extraction of biologically active compounds from sea buckthorn pulp: ultrasonic probe extraction and supercritical water extraction. For the ultrasonic probe extraction, water and ethanol of different concentrations (25%, 50%, and 75%) were used as solvents to optimize the polarity gradient, which is crucial for the extraction of compounds with different polarities (phenolic compounds, carotenoids) for efficient extraction. The results showed that both ultrasonic extraction with 75% ethanol and supercritical water extraction gave similar results in terms of both identified and individual compound contents. This demonstrates the effectiveness of both methods of extracting biologically active compounds from sea buckthorn pulp. The efficiency of ultrasonic extraction with 75% ethanol is explained by the polarity of ethanol, which is optimal for the extraction of phenolic compounds. For extraction. Ultrasonic probing promotes mechanical destruction of cell walls, which improves the extraction process. Supercritical water extraction, based on the unique properties of water at high temperatures and pressures, has also proven its effectiveness. The variable polarity and high solubility of supercritical water allow the extraction of both polar and non-polar compounds. Comparing the yield of the preparations and the data obtained by ultrasonic probing (75% ethanol, 35 minutes), 6.72 g of lyophilized preparation were obtained from 100 g of raw squeezed juice, in which the phenol content was 4 g, namely 71.4 mg/g dry weight, Using the method of supercritical water extraction (water, 7 minutes) from 100 g of raw pressed leaves, 5.2 g of a lyophilized preparation was obtained, in which the phenol content was 80 mg/g of dry weight.

The obtained results indicate that both ultrasonic probe extraction with 75% ethanol and supercritical water extraction are effective and environmentally friendly methods for obtaining biologically active compounds from sea buckthorn pulp. These methods can be used to create biologically active additives in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries.

2.3 Sequential extraction of bioactive compounds from sea buckthorn seeds using supercritical carbon dioxide (scCO₂)

Traditional extraction methods, such as organic solvent extraction, often result in degradation of compounds, resulting in reduced product quality and environmental pollution. Therefore, in recent years, research has been actively conducted to develop innovative and environmentally friendly extraction methods.

The parameters of the SFE, such as pressure, temperature, extraction time, and carbon dioxide flow rate, significantly affect the extraction efficiency. Therefore, to extract a specific compound, optimization of parameters is required. There are many studies in the scientific literature on this issue using SFE, although the optimal parameters vary depending on the objectives of the study and the raw materials used (primary (fruits) and secondary raw materials (agro-industrial waste)).

Although there are many studies on this issue using SCE in the international scientific literature, no such studies have been conducted in Georgia.

Sequential extraction of lipid, carotenoid, and phenolic fractions from sea buckthorn seeds was carried out using supercritical carbon dioxide. Each extraction step was optimized to achieve maximum yield and selectivity of target compounds. The total duration of the extraction was 180 minutes; the dynamics of the extraction process were monitored every 15 minutes using spectral analysis of fractions in the ultraviolet-visible region. The content of compounds in each sample from the 12 fractions obtained was quantitatively determined.

At the first stage, optimized parameters for lipid fraction extraction were used: pressure 350 bar, temperature 50°C, flow rate 20 g/min, extraction duration 60 minutes. The yield of the lipid fraction was determined by weighing fractions 1–4 (Table 18) (see appendix 1)..

In the second stage, carotenoids (fraction 5-8) were extracted under optimized parameters: pressure 500 bar, temperature 50°C, flow rate 30 g/min, and extraction duration 60 minutes (Table 18) (see appendix 1).

In the third stage, the extraction of phenolic compounds (fractions 9-14) was carried out using ethanol as a co-solvent. Extraction pressure was 380 bar, temperature was 60°C, carbon dioxide flow rate was 30 g/min, ethanol was 10% to 20%, and extraction duration was 30 - 60 min (Table 18) (see appendix 1)..

The amount of oil extracted by the SFE method was 20.75% of the dry weight of the seeds, which is 1.5% more than the amount of fat extracted by the hexane method (19.25%) (Table 19). Identification of the lipid components in the obtained oil, detected by chromatographic analysis, was carried out using a standard sample Supelco 37 Component FAME Mix (Product Number: CRM47885, Batch Number: LRAD3869), the composition of which was known in advance.

The results of chromatography revealed significant differences in the fatty acid composition of sea buckthorn seed oil extracted by the Soxhlet method and supercritical carbon dioxide (SCE) (Figure 41 (a, b)) (Table 20). Eight substances were identified as saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids. The content of palmitic acid methyl ester (C16:0) from saturated fatty acids in the oil obtained by the SFE method (39.019%) is 1.955% higher than in the oil extracted with hexane (37.064%), which indicates a relatively high selectivity of SFE concerning this compound (Table 20). Methyl stearate (C18:0) was found only in Soxhlet extracted oil at a concentration of 1.096% and was not detected in SFE extracted oil. The content of oleic acid methyl ester (C18:1n9c) from monounsaturated fatty acids in oil obtained by Soxhlet extraction (44.236%) is 5.979% higher (Table 20). Among the polyunsaturated fatty acids in the oil obtained by both methods, the methyl ester of linoleic acid (C18:2n6c) was identified, while in the oil obtained by the SFE method, it was 1.521% higher (6.488% and 4.967%). The content of methyl ester of alpha-linolenic acid (C18:3n3c) in oil obtained by the SFE method is 9.096% higher (11.158% and 2.062%), which is a significant difference. The content of methyl ester of cis-11,14-eicosadienoic acid (C20:2) in oil obtained by the SFE method is 3.679% higher (3.89% and 0.211%) (Table 20).

Oil extracted using the SFE method is characterized by a significantly higher content of polyunsaturated fatty acids, which makes it more valuable from a food and pharmaceutical point of view. Soxhlet extraction provides a higher yield of oleic acid. After separation of the oil from the sea buckthorn seeds, the carotenoid fraction (fraction 5–8) was extracted at a temperature of 600 °C for 30 minutes with an increase in pressure to 500 bar and a CO₂ supply of 30 g/min (Figure 42). Qualitative analysis of carotenoids was performed using the UPLC-PDA, MS method (Figures 43 and 44) (see appendix 1)..

The carotenoid content in the obtained carotenoid fraction was 1.24 mg/g dry weight, which is 30 units higher than the carotenoid content in lipid extracted with hexane (0.95 mg/g). These results confirm the superiority of the SCE method for carotenoid extraction. The use of SCE ensured the extraction of higher concentrations of carotenoids, which is due to the unique solvent properties of the supercritical state of CO₂ and the low extraction temperature, which reduces the risk of

thermal degradation. Hexane is also a non-polar solvent, but due to its high boiling point, it causes more pronounced degradation of carotenoids.

In the third extraction step, phenolic compounds were extracted from sea buckthorn seeds using supercritical carbon dioxide (CO₂) and the addition of ethanol as a co-solvent. During the first 30 minutes (fractions 9-10), extraction was carried out at a pressure of 300 bar, a CO₂ flow rate of 30 g/min, and 10% ethanol. At this stage, 23.44 mg/g phenolic compounds were extracted on a dry weight basis. Over the next 30 minutes (fraction 11-12), the pressure increased to 380 bar and the ethanol concentration to 20%. This change significantly increased the amount of extracted phenols to 93.76 mg/g. A total of 117.2 mg/g phenolic compounds were extracted from fractions 9–12 (Table 21). The fraction of phenolic compounds was concentrated under vacuum conditions, the resulting concentrate was lyophilized, resulting in a dry preparation – sea buckthorn seed phenols.

The use of ethanol as a co-solvent in supercritical (fluid) carbon dioxide extraction of sea buckthorn seeds is an effective method for extracting phenolic compounds from sea buckthorn seeds. Optimization of process parameters such as pressure (380 bar) and co-solvent concentration (20%) significantly increases extraction efficiency.

Three preparations were obtained from sea buckthorn seeds using the supercritical CO₂ extraction method: oil enriched with polyunsaturated fatty acids, a concentrate of carotenoids, and a concentrate of phenolic compounds. Evaluation of the antioxidant activity of the obtained preparations shows that preparations obtained using green technology exhibit high antioxidant activity. Antioxidant activity was assessed by the 50% inhibition method of 0.1 mmol DPPH radical and was presented in two forms: firstly, as the mass of sample required to inhibit the radical, determined in mg, and secondly, as relative activity (as a ratio to 1) (Figure 10). In general, the higher the concentration of antioxidant bioactive compounds in a sample, the lower the sample mass required for 50% inhibition of the DPPH radical. This indicates an inverse relationship between the concentration of compounds and the sample mass required for inhibition. To demonstrate the directly proportional relationship between the compound and antioxidant activity, the relative antioxidant activity index was used. The ratio makes it easier to interpret the data. Interpretation: The data presented in the table show that the preparations obtained by the SFE method are characterized by higher activity than the compounds obtained by the classical method: for 50% inhibition of the radical, 0.89 mg of oil obtained by the SFE method is required, while almost twice as much (1.72 mg) is required for the oil obtained by the hexane method. Accordingly, in the case of carotenoids in the case of ESF it is 0.717 mg, and in the classical one, 1.411 mg. A similar result was obtained in the case of phenols: 0.881 mg and 0.622 mg in the classical version (Table 21) (see appendix 1)..

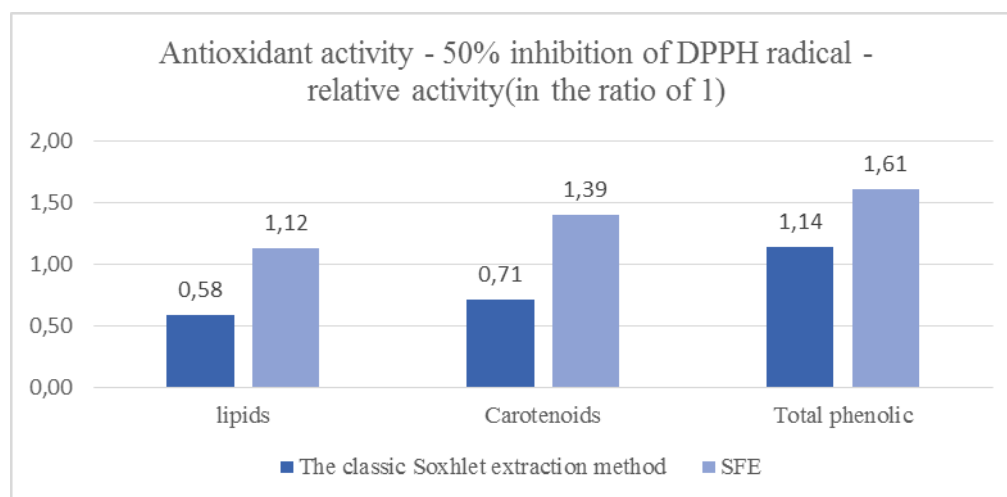


Diagram 10. Diagram of the antioxidant activity of preparations obtained from sea buckthorn seeds

(a)lipids; b)carotenoids) total phenols – classical Method, SFE)

To achieve maximum yield, scCO₂ extraction parameters were optimized: pressure, temperature, carbon dioxide flow rate, and extraction duration. The optimal conditions were determined as follows: for carotenoids - 350 bar, 50°C, 20 g/min and 60 min; For lipids - 500 bar, 50°C, 30 g/min and 60 min; For phenolic compounds - 380 bar, 60°C, 30 g/min, 10-20% ethanol and 30-60 min. Gas chromatography analysis revealed significant differences in the fatty acid composition of sea buckthorn seed oil extracted using Soxhlet and scCO₂. Oil extracted using scCO₂ is characterized by a significantly higher content of polyunsaturated fatty acids. The oil yield obtained by scCO₂ extraction was 20.75%, which was 1.5% higher than the oil yield

extracted with hexane (19.25%). scCO₂ extraction provided a higher concentration of carotenoids (1.24 mg/g) compared to Soxhlet extraction (0.95 mg/g). The use of ethanol as a co-solvent was found to be effective for the extraction of phenolic compounds (scCO₂ - 117.2 mg/g, Soxhlet - 90.11 mg/g). The obtained preparations exhibit stronger antioxidant activity compared to traditional extraction methods.

The use of sequential extraction with supercritical carbon dioxide (scCO₂) from sea buckthorn seeds allows to obtaining of three different fractions: Lipid extract enriched with polyunsaturated fatty acids, carotenoid concentrate, and phenolic compound concentrate. These fractions are characterized by a significantly higher yield of biologically active compounds, which determines their strong antioxidant activity, compared to traditional extraction methods.

3. Testing the pharmacological properties of "Sea Buckthorn Eye Ointment" for the regeneration of superficial post-traumatic eye scars

Eye ointments are semi-solid dosage forms intended for local application of medicinal substances to the surface of the eye. The study of their pharmacological properties is of crucial importance for the development of effective and safe methods of treating ophthalmological diseases. (<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104867>).

Before using a pharmacological drug in practice and conducting further clinical trials, it is necessary to assess its safety in terms of its impact on body tissues. This ensures that possible side effects are minimized. (<https://www.fda.gov/>). Experimental procedures must comply with the requirements of the Pharmacopoeia and internationally recognized standards, principles of good laboratory practice. (https://www.oecd.org/en/publications/1998/01/oecd-principles-on-good-laboratory-practice_g1gh32e8.html).

Among preclinical studies, toxicological studies are of primary importance, including the study of both general toxicity and specific types of toxicity. (DOI: 10.1007/s11948-006-0014-y).

Toxicological studies of the ophthalmological drug were conducted in the educational and experimental laboratory of physiology of the biological faculty of the Akaki Tsereteli State University under the supervision of Professor Reniko Sakandelidze. For the study, sexually mature, healthy white rats were selected. The experimental animals were cared for under standard sanitary conditions, where the impact of other external factors on the experiment (temperature, humidity, lighting, contamination of the storage room with xenobiotics, etc.) was maximally excluded. Control animals were also kept under similar conditions, together with the study animals.

The acute toxicity of the drug when applied to the skin was studied. The rats selected for the experiment were given the drug locally at intervals of 4 hours, a total of 6 times over 24 hours. The experimental conditions and results are presented in Table 20 (see appendix 1)..

Considering the pharmacopoeia requirements, we adopted a single oral dose of 0.01 mg as the initial dose. As a result of the experiment, not a single white rat died, and the skin condition of all of them was good. Our experiment showed that the eye ointment is practically non-toxic to white rats in the doses used. The use of the drug did not result in any fatalities, which is an indicator of the safety of the substance according to the Hodge and Sterner classification. As the results of the study show, the use of the ophthalmological drug "Sea Buckthorn Eye Ointment" at a dose of 0.06 mg daily/at night when applied to the skin of experimental rats does not cause skin irritation in animals.

Conclusion:

1. It has been established that the fruits and leaves of sea buckthorn are a rich source of biologically active compounds. Using the ultra-high performance liquid chromatography (UPLC-PDA)-MS method, 21 biologically active compounds were found in the leaves and fruits of sea buckthorn: 1 organic acid, 3 phenolic acids, and 17 flavonoids. The obtained data reveal significant differences in the phytochemical composition of fruits and leaves: malic acid (m/z 132.95) was detected in both samples. Of the phenolic acids, quinacrine (m/z 191.03) and ellagic acid (m/z 300.83) were detected in both parts. Gallic acid (m/z 168.82) was detected only in fruits. Of the flavonoid compounds, galocatechin (m/z 304.89) and isorhamnetin (m/z 314.85) were present in both samples. Epigallocatechin (m/z 304.78), catechin (m/z 288.88), and procyanidins (m/z 476.80, 576.95) were detected only in fruits. The leaf was distinguished by the content of gallic acid hexoside and casuaricin. Of particular note was the predominance of isorhamnetin glycosides (m/z 476.99, 593.03, 623.01, 623.15) in the fruits, while kaempferol-3-O-rutinoside (m/z 593.03) was found only in the leaves. The obtained results are important for assessing the prospects for the use of sea buckthorn in medicinal and food products, especially considering its antioxidant and pharmacological properties.

2. It has been established that sea buckthorn leaves and fruits contain a significant content of phenolic compounds. The leaf contains: total phenols 43.95 mg/g, phenolic acids 6.23 mg/g and flavonoids 16.21 mg/g, calculated on dry weight. The content

of phenolic compounds in the fruits varies depending on the geographical origin (19.90–34.94 mg/g), with the highest levels observed in the sample from Akhaltsikhe. The concentration of flavonoids in fruits (16.72–27.01 mg/g) was approximately 10 times higher than the content of phenolic acids. The study of antioxidant activity showed that the Akhaltsikhe sample (2.881 mg) had the highest antioxidant activity, which correlates with the high concentration of phenolic compounds in it. Sea buckthorn fruits and leaves (*Hippophae rhamnoides* L.) have significant biological potential as a rich source of natural antioxidants.

3. Unlike the leaves and pulp of sea buckthorn, 16 new substances were found in the seeds: Citric acid (Substance 22), Tanshinlactone derivative (Substance 23), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid (Substance 24), Isoquercitrin (Substance 25), Kaempferol-3-O-hexoside-7-O rhamnoside (Substance 26), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucosid (Substance 27), Quercetin-3-O-sophoroside-7-O rhamnoside (Substance 28), Quercetin-3-O-rhamnosyl glucoside-7-O-rhamnoside (Substance 29), Kaempferol-3-O-rutinoside (Substance 30), (e)Catechin-(e)Catechin (Substance 31), Kaempferol 3-O-glucoside (Substance 32), Isorhamnetin-3-O neohesperidoside (Substance 33), Rutin (Substance 34), Isorhamnetin-3-O-(6 rhamnosyl)hexoside (Narcissin) (Substance 35), Isorhamnetin-O-dihexoside (Substance 36), Kaempferol-3-O-rutinoside (Substance 37) და Quercetin (Substance 38).

4. Sea buckthorn juice has been found to contain a significant amount of carbohydrates, including arabinose, glucose and sucrose. Sea buckthorn leaves showed high concentrations of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} cations, especially Mg^{2+} (577.6 ppm) and K^+ (415.4 ppm). The cation content of the fruit varied significantly depending on the geographical region: The fruits of the Erge variety are dominated by Mg^{2+} (65.17 ppm) and K^+ (48.02 ppm), in Akhaltsikhe - K^+ (266.04 ppm) and Ca^{2+} (34.08 ppm), and the fruits of the Terjola variety are distinguished by the content of Mg^{2+} (53.46 ppm) and K^+ (40.77 ppm). The obtained data confirm the mineral value of sea buckthorn and the potential for its use in food and pharmaceutical purposes.

5. The results of the study of the influence of extraction methods (Soxhlet extraction, ultrasound, supercritical water extraction, cold pressing) on the fatty acid composition of sea buckthorn seed oil show significant differences: The oil obtained by each method was characterized by the presence of different fatty acids. The oil obtained by each method was characterized by the presence of different fatty acids. 12 saturated fatty acids, 3 monounsaturated fatty acids, 2 polyunsaturated fatty acids, and one trans unsaturated fatty acid were identified.

6. It was found that ultrasonic and supercritical water extraction methods provide high content of Oleic acid methyl ester (C18:1n9c), α -Linolenic acid methyl ester (C18:3n3c) (omega-3), and Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c) (omega-6) with anti-inflammatory and regenerative properties. What is important for the treatment of superficial post-traumatic scars of the eye. The cold-pressed extract is also characterized by significant concentrations of methyl ester of alpha-linolenic acid (C18:3n3c) (omega-3), methyl ester of linoleic acid (C18:2n6c) (omega-6), and methyl ester of oleic acid (C18:1n9c). This combination of fatty acids helps repair damaged tissue and reduce scar formation. Although Soxhlet extraction allows the production of a wide range of fatty acids, its use for ointment preparation may be less desirable due to the formation of trans fats and environmental concerns.

7. The research found that sea buckthorn pulp is a valuable raw material for the production of ophthalmic ointment. The use of “green technologies” provides an environmentally friendly and efficient approach to obtaining biologically active compounds. Four different types of medicinal preparations have been obtained from sea buckthorn pulp, differing in composition and method of application: Lipophilic carotenoid concentrate (safflower oil), dry extract of carotenoids, and dry extract of phenolic compounds.

8. The ultrasonic extraction method was also used to obtain carotenoid-rich vegetable oil (Carotenoid concentration: 0.5941 mg/g dry weight), improved quality indicators (reduced acidity, peroxide, and n-anisidine values), and 3.5 times higher antioxidant activity compared to the control oil. It can be used in the food industry as a carotenoid-enriched oil.

9. It has been established that the raw pulp of sea buckthorn, consisting of approximately 80% seeds and 20% fruit peel, contains from 11.95% to 13.22% fat (calculated on a dry weight basis) and from 0.140 to 0.583 mg/g carotenoids (calculated on a dry weight basis); Spectral analysis of phenolic compounds shows that the total phenol content in raw pulp is 89.41 mg/g, of which 16.95 mg/g are phenolic acids and 64.71 mg/g are flavonoids. Flavonoids are mainly represented by catechins (25.90 mg/g) and leucoanthocyanins (44.45 mg/g). The antioxidant activity of sea buckthorn extract is quite high: 0.766 mg of sea buckthorn extract is sufficient to inhibit 50% of DPPH radicals.

10. It has been established that ultrasonic probe extraction with 75% ethanol, as well as supercritical water extraction, are effective and environmentally friendly methods for obtaining biologically active compounds from sea buckthorn pulp. Comparing the yield of the preparations and the obtained data, from 100 g of crude extract by the ultrasonic probe method (75% ethanol, 35 minutes) 6.72 g of lyophilized preparation were obtained, in which the phenol content was 4 g, namely 71.4

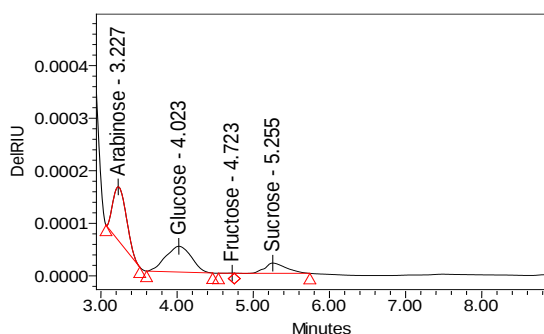
mg/g dry weight, whereas with supercritical water extraction (water, 7 minutes) from 100 g of crude extract 5.2 g of lyophilized preparation were obtained, in which the phenol content was 80 mg/g dry weight.

11. Three preparations were obtained from sea buckthorn seeds using the supercritical CO₂ extraction method: The oil is enriched with polyunsaturated fatty acids, carotenoid concentrate, and phenolic compound concentrate. To achieve maximum yield, the scCO₂ extraction parameters were optimized: Pressure, temperature, carbon dioxide flow rate and extraction duration. The optimal conditions were determined as follows: for carotenoids - 350 bar, 50°C, 20 g/min and 60 min; for lipids - 500 bar, 50°C, 30 g/min and 60 min; for phenolic compounds - 380 bar, 60°C, 30 g/min, 10-20% ethanol and 30-60 min.

12. Gas chromatography analysis showed significant differences in the fatty acid composition of sea buckthorn seed oil extracted using Soxhlet and scCO₂. Oil extracted using scCO₂ is characterized by a significantly higher content of polyunsaturated fatty acids. The oil yield obtained by scCO₂ extraction was 20.75%, which was 1.5% higher than the oil yield extracted with hexane (19.25%). scCO₂ extraction provided a higher concentration of carotenoids (1.24 mg/g) compared to Soxhlet extraction (0.95 mg/g). The use of ethanol as a co-solvent was found to be effective for the extraction of phenolic compounds (scCO₂ - 117.2 mg/g, Soxhlet - 90.11 mg/g). The obtained preparations exhibit stronger antioxidant activity compared to traditional extraction methods.

13. The ophthalmological drug "Sea Buckthorn Eye Ointment" at a dose of 0.06 mg daily/at night, when applied to the skin of experimental rats, does not cause skin irritation in animals.

დანართი 1
Appendix 1



სურათი 1. ქაგვის ნაყოფის წვენი ნახშირწყლების ქრომატოგრამა
Fig 1. Chromatography of carbohydrates of sea buckthorn fruit juice

ნახშირწყლების საკალიბრო მრუდების აღწერა
Description of carbohydrate calibration curves

ცხრილი 1 Table 1.

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

ქაგვის ნაყოფის წვენი ნახშირწყლების ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები
Chromatographic characteristics of carbohydrates in sea buckthorn juice

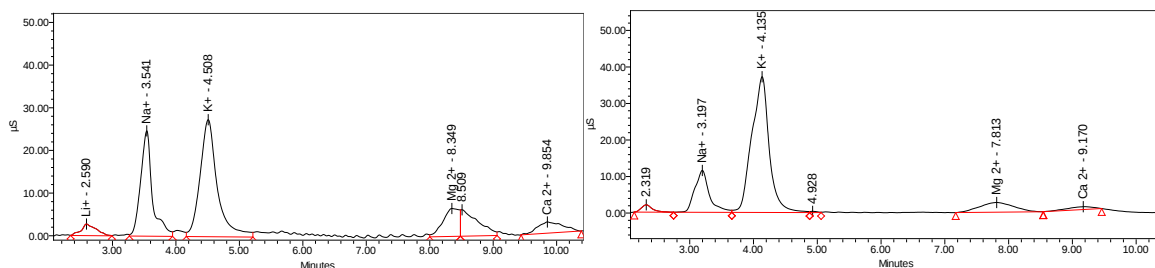
ცხრილი 2 Table 2

	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Int Type	Amount
1	Arabinose	3,227	1018478	45,25	81577	BB	4,664
2	Glucose	4,023	921615	40,95	39297	BB	8,235
3	Fructose	4,723	1606	0,07	266	BV	0,16
4	Sucrose	5,255	308894	13,73	15621	VB	2,98

სტანდარტულ კატიონთა გამოსათვლელი ფორმულები
Formulas for calculating standard cations

ცხრილი 3 Table №3

სტანდარტულ ნაერთთა საკალიბრო მრუდები Calibration curves of standard compounds	
ნატრიუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა Sodium calibration curve formula	$Y = 1.44e+005 X + 9.50e+004$
კალიუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა Potassium calibration curve formula	$Y = 7.79e+004 X + 6.01e+004$
მაგნიუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა Magnesium calibration curve formula	$Y = 2.97e+005 X + 2.76e+005$
კალციუმის საკალიბრო მრუდის ფორმულა Calcium calibration curve formula	$Y = 1.28e+005 X + 2.28e+005$



სურათი 2. ფოთლისა და ნაყოფის კატიონების ქრომატოგრამა

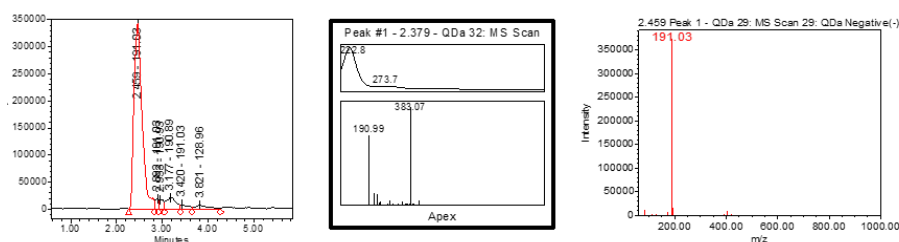
Figure 2. Chromatogram of leaf and fruit cations

კატიონების შემცველობა ქაფვის ფოთლისა და ნაყოფში

Cation content in sea buckthorn leaves and berries

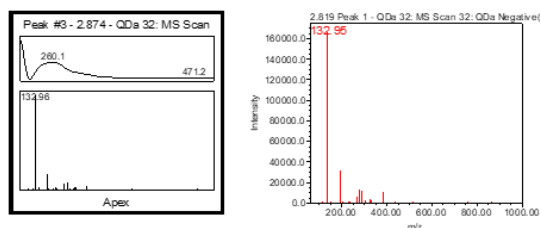
ცხრილი 4 Table 4

ნიმუში-ქაფვი Sea buckthorn sample	კატიონების შემცველობა, Cation content, ppm			
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
ფოთოლი Leaf	177.2±0.419	415.4±0.623	577.6±0.552	26.2±0.166
ნიმუშის აღების ადგილი Sampling location	ნაყოფი			
ერგე Erge	7.2±0.096	48.02±0.192	65.17±0.207	3.07±0.065
თხილნარი Tkhilnari	5.05±0.102	28.43±0.143	24.64±0.169	0.4±0.074
ახალციხე Akhaltsikhe	14.62±0.168	266.04±0.301	21.6±0.175	34.08±0.133
თერჯოლა Terjola	5.34±0.096	40.77±0.158	53.46±0.182	2.04±0.035



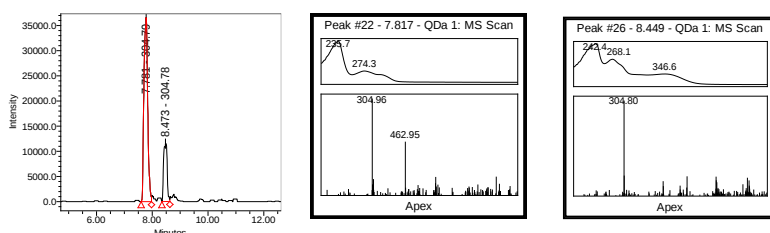
სურათი 3. ნივთიერება 1-ის UPLC-PDA-MS სპექტრი m/z 191.03

Figure 3. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 1, m/z 191.03



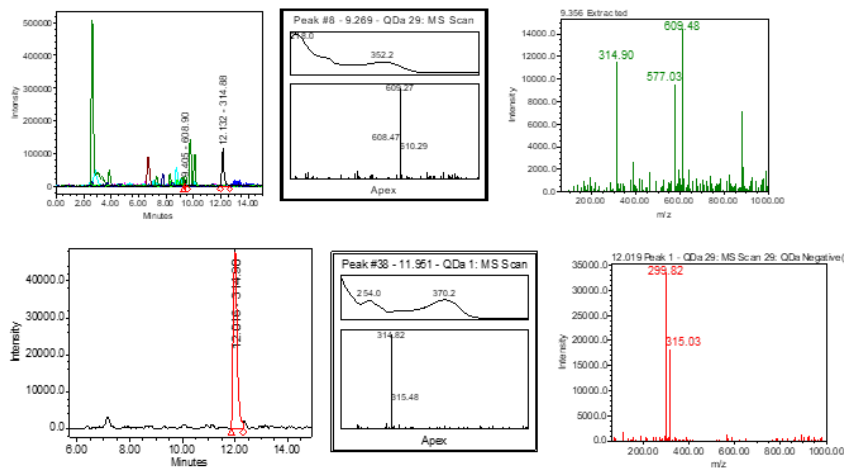
სურათი 4. ნივთიერება 2-ის UPLC-PDA-MS სპექტრი m/z 133.00

Figure 4. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 2, m/z 133.00

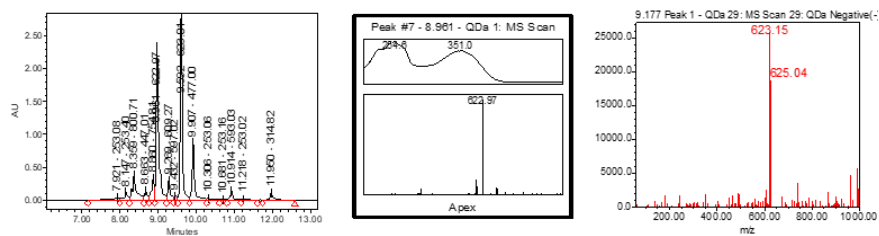


სურათი 5. ნივთიერება 3 და 4-ის UPLC-MS სპექტრი

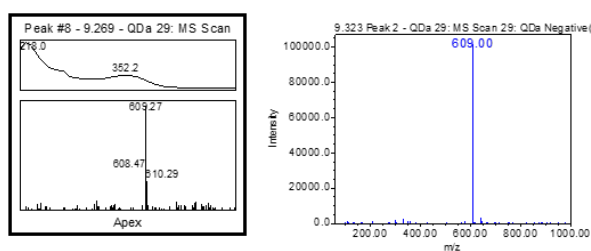
Figure 5. UPLC-MS spectrum of compounds 3 and 4



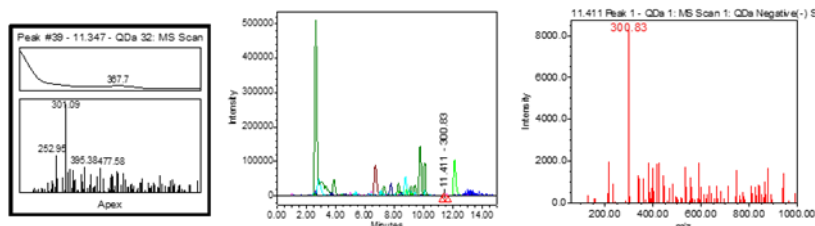
სურათი 6. ნივთიერება 5 და 6-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 6. UPLC-MS spectrum of compounds 5 and 6



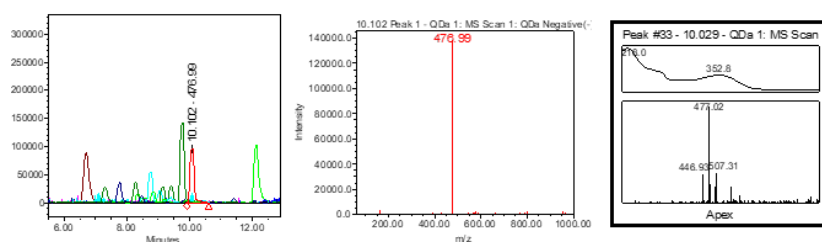
სურათი 10. ნივთიერება 10-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 10. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 10



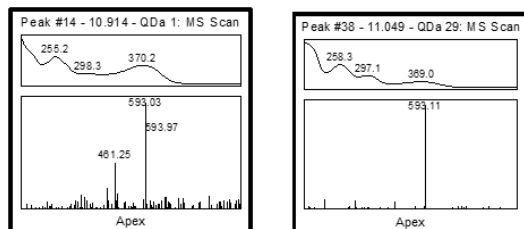
სურათი 11. ნივთიერება 11-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 11. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 11



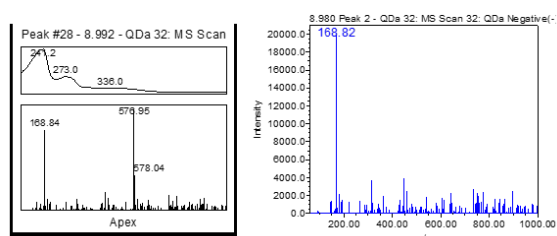
სურათი 12. ნივთიერება 12-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 12. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 12



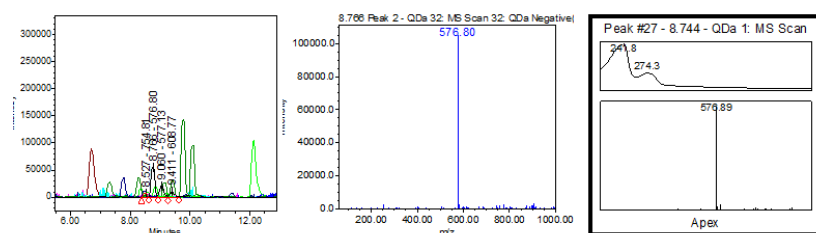
სურათი 13. ნივთიერება 13-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 13. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 13



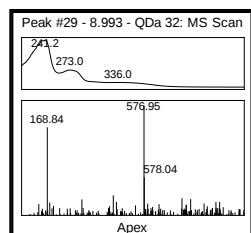
სურათი 14. ნივთიერება 14-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 14. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 14



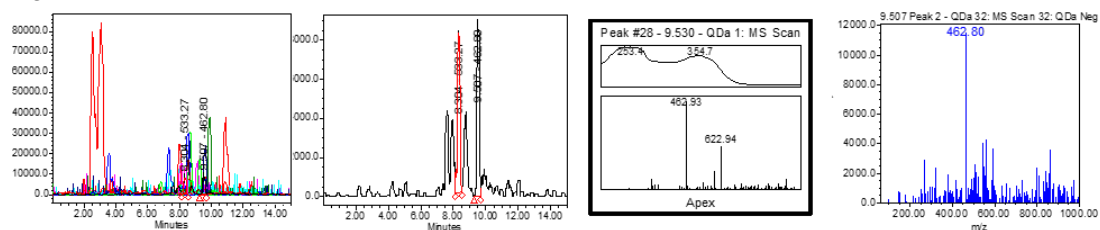
სურათი 15. ნივთიერება 15-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 15. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 15



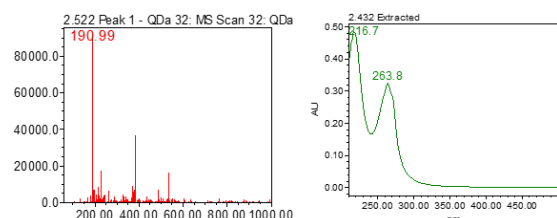
სურათი 16. ნივთიერება 16-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 16. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 16



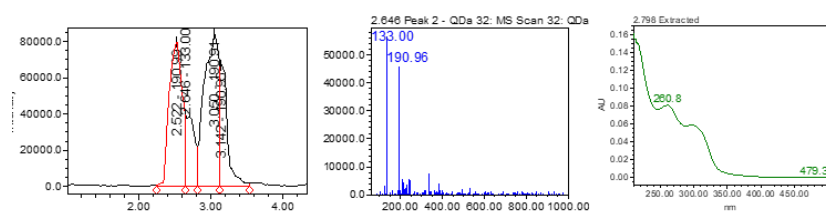
სურათი 17. ნივთიერება 17-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 17. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 17



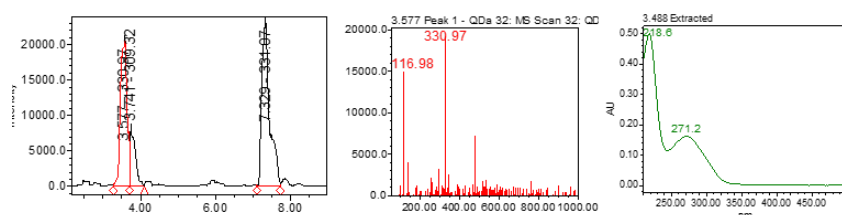
სურათი 18. ნივთიერება 18-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 18. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 18



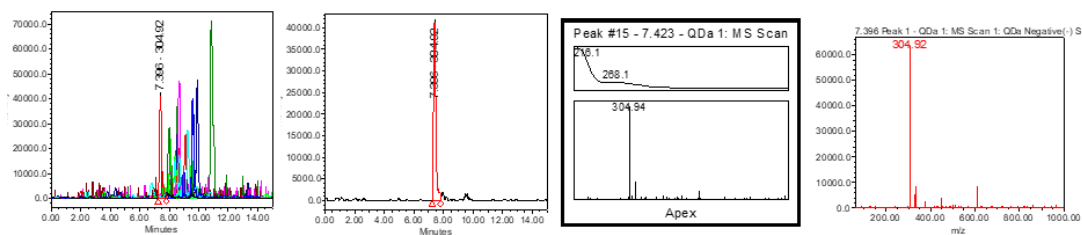
სურათი 19. ნივთიერება 1-ის UPLC-PDA-MS სპექტრი m/z 190.99
Figure 19. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 1, m/z 190.99



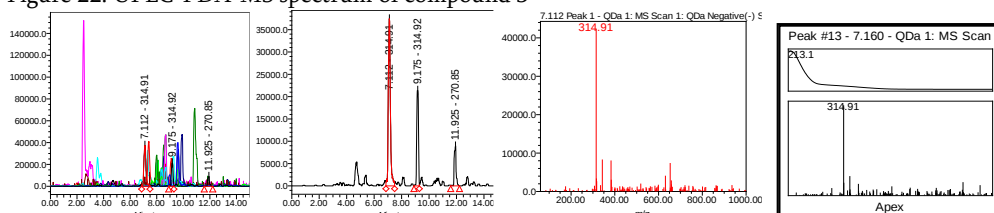
სურათი 20. ნივთიერება 2-ის UPLC-PDA-MS სპექტრი m/z 133.00
Figure 20. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 2, m/z 133.00



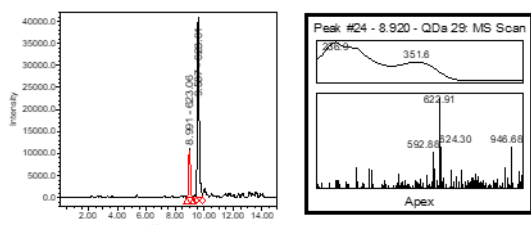
სურათი 21. ნივთიერება 19-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 21. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 19



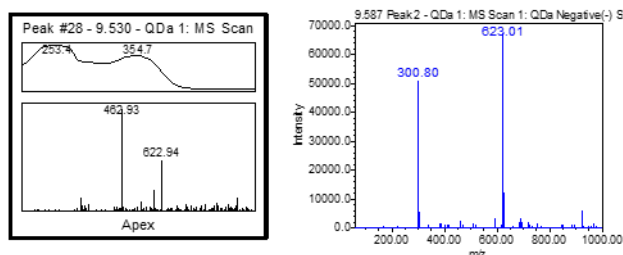
სურათი 22. ნივთიერება 3-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 22. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 3



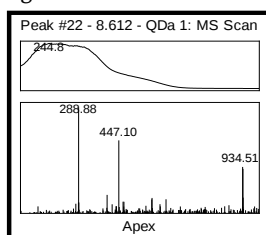
სურათი 23. ნივთიერება 6-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 23. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 6



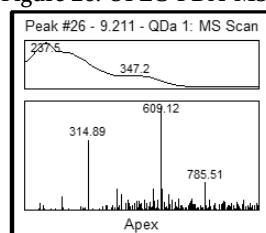
სურათი 24. ნივთიერება 8-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 24. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 8



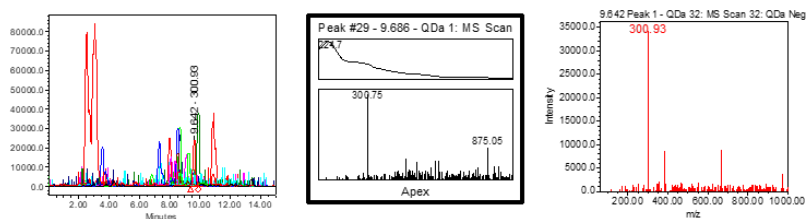
სურათი 25. ნივთიერება 7-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 25. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 7



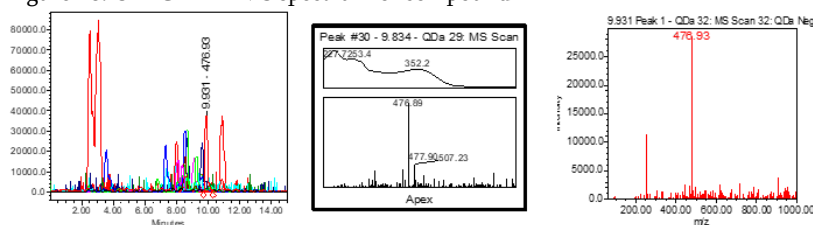
სურათი 26. ნივთიერება 20-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 26. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 20



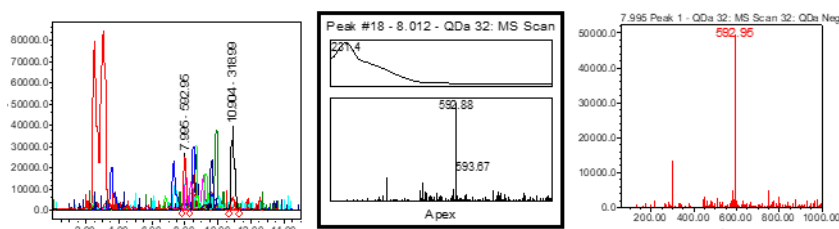
სურათი 27. ნივთიერება 11-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 27. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 11



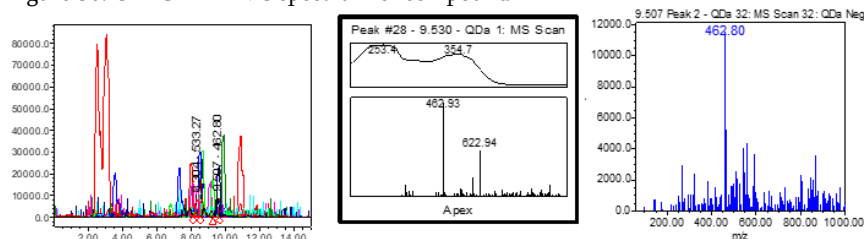
სურათი 28. ნივთიერება 12-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 28. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 12



სურათი 29. ნივთიერება 13-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 29. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 13



სურათი 30. ნივთიერება 21-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 30. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 21



სურათი 31. ნივთიერება 18-ის UPLC-MS სპექტრი
Figure 31. UPLC-PDA-MS spectrum of compound 22

ქაფვის ფოთლისა და ნაყოფის ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები
Quantitative analysis of phenolic compounds in sea buckthorn fruits and leaves

ცხრილი 5 Table 5

№	ნივთიერება Substance	ფორმულა Formule	m/z [M – H]⁻	ნაყოფი fruit	ფოთლი Leaf
ორგანული მჟავები Organic acids					
1	ვამლის მჟავა Malic acid	C ₄ H ₆ O ₆	132,95	+	+
ფენოლკარბონმჟავები Phenolic acids					
2	ქინაქინის მჟავა Quinacinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,03	+	+
3	ელაგის მჟავა Ellagic acid	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,83	+	+
4	გალის მჟავა Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	168,82	+	-
ფლავონოიდები Flavonoids					
5	გალოკატექინი Gallocatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	304,89	+	+
6	ეპიგალოკატექინი Epigallocatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	304,78	+	-
7	იზორამნეტინის წარმოებული Isorhamnetin derivative	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	609,27	+	-
8	იზორამნეტინი Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	314,85	+	+

9	იზორამნეტინს -3-O- გლუკოზიდ-რამნოზიდი Isorhamnetin -3-O-glucoside rhamnoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623,15	+	+
10	იზორამნეტინის -3-O- რუთინოზიდი Isorhamnetin-3-O-rutinoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623,01	+	+
11	კატექინი Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	288,88	+	-
12	კვერცეტინის-3-O-ჰექსოზიდ-7-O-d ჰექსოზიდი Quercetin-3-O-hexose-7-O-d hexose		609,15	+	-
13	კვერცეტინ-3-O-რუთინოზიდი Quercetin-3-O-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,27	+	+
14	იზორამნეტინ-3- O -გლუკოზიდი Isorhamnetin-3-O-glucoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	476,99	+	+
15	იზორამნეტინ-პენტოზა-რამნოზიდი Isorhamnetin-pentose-rhamnoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,03	+	-
16	პროციანიდინი 1 Procyanidin 1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	476,80	+	-
17	პროციანიდინი 2 Procyanidin 2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	576,95	+	-
18	ჰიპეროზიდი Hyperoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	462,8	+	+
19	გალის მჟავას ჰექსოზიდი Gallic acid hexose	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	330,97	-	+
20	კასუარიქტინი Casuarictin	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	934,31	-	+
21	კემფეროლ-3-O-რუთინოზიდი Kaempferol-3-O-rutinoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	592,95	-	+

ქაჯვის ნედლ ნაყოფში ფენოლების რაოდენობრივი შემცველობა
Quantitative content of phenols in raw sea buckthorn fruits

ცხრილი 6 Table 6

ნიმუშის ადგილის ადგილი Sampling location	საერთო ფენოლები მგ/გ (მშრალზე); Common phenols mg/g (dry weight)	ფენოლკარბონმჟავები მგ/გ (მშრალზე; Phenolic acids, mg/g (dry weight)	საერთო ფლავონოიდები მგ/გ (მშრალზე); Common Flavonoids, mg/g (dry weight)
ერგე Erge	19.90±0.117	2.24±0.089	16.72±0.165
თხილნარი Tkhilnari	23.96±0.123	2.60±0.101	18.57±0.177
ახალციხე Akhaltsikhe	34.94±0.202	3.43±0.144	27.01±0.2
თერჯოლა Terjola	30.58±0.188	3.12±0.174	26.85±0.245

ქაჯვის ნედლ ნაყოფში კატექინებისა და ლეიკოანთოციანინების შემცველობა
Quantitative content of catechins and leucoanthocyanins in raw sea buckthorn fruits

ცხრილი 7 Table 7

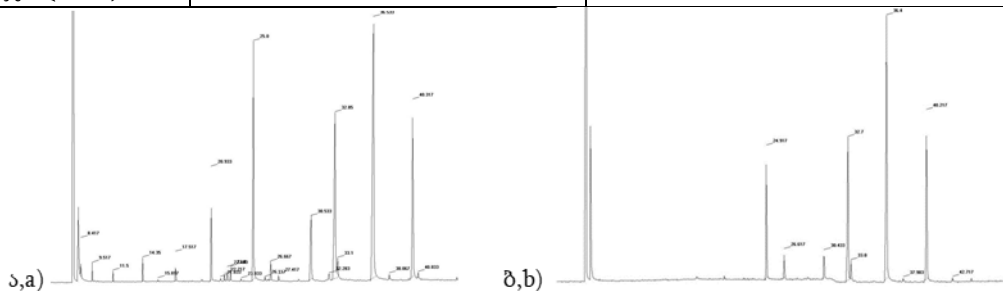
ნიმუშის ადგილის ადგილი Sampling location	კატექინები მგ/გ (მშრალზე); Catechins, mg/g (dry weight)	ლეიკოანთოციანინები მგ/გ (მშრალზე); Leucoanthocyanins, mg/g (dry weight)
ერგე Erge	2.44±0.062	11.38±0.045
თხილნარი Tkhilnari	2.95±0.052	13.08±0.047
ახალციხე Akhaltsikhe	4.10±0.075	18.78±0.061
თერჯოლა Terjola	3.66±0.066	16.44±0.032

ქაჯვის ნაყოფის ანტიოქსიდანტური აქტივობა
Antioxidant activity of sea buckthorn fruits

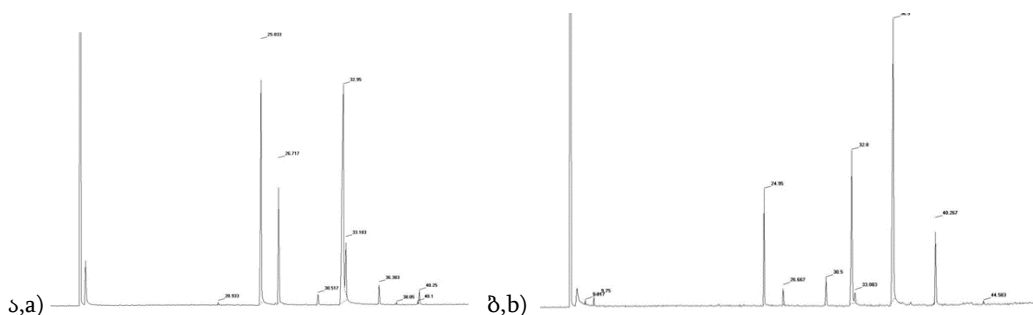
ცხრილი 8 Table 8

ნიმუშის ადგილის ადგილი Samling Location	DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირება მგ ნიმუშის მიერ; Antioxidant activity - 50% inhibition of DPPH radical per mg sample	DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირება - ფარდობითი აქტივობა (როგორც 1-ის ფარდობა); Antioxidant activity - 50% inhibition of DPPH radical - relative activity (in the ratio of 1)
---	--	---

ერგე Erge	6.15±0.032	0.16
თხილნარი Tkhilnari	4.188±0.05	0.24
ახალციხე Akhaltsikhe	2.881±0.041	0.35
თერჯოლა Terjola	3.702±0.026	0.27



სურათი 43. ქაცვის ნაყოფიდან სოქსლეტის მეთოდითა (ა) და ულტრაბჟერითი ზონდით (ბ) მიღებული ზეთის ცხიმოვანი მჟავების ქრომატოგრამა; Figure 32. From sea buckthorn berries by the Soxhlet method (a) and fatty acid chromatography of oil obtained using the Eutrabakter probe (b).



სურათი 44. ქაცვის ნაყოფიდან ცივი დაწნეხითა (ა) და ზეკრიტიკული წყლით (ბ) მიღებული ზეთის ცხიმოვანი მჟავების ქრომატოგრამა; Figure 33. Chromatogram of fatty acids of oil obtained from sea buckthorn fruits by cold pressing (a) and in supercritical water (b).

ქაცვის ნაყოფიდან სხვადასხვა მეთოდით მიღებული ზეთის ცხიმოვანი მჟავები

Component composition of carboxylic acids

ცხრილი 9 Table 9

ცხიმოვანი მჟავების შემცველობა % Content of fatty acids (%)						
№	ნივთიერების დასახელება; Name of the substance	შეკავების დრო (წთ); Retention time (min)	სოქსლეტის მეთოდი; Soxhlet method	ულტრაბჟერითი ზონდი; Ultrasonic probe	ზეკრიტიკული წყლით; With supercritical water	ცივი დაწნეხით; Cold pressed
1	Butyric acid methyl ester (4:0)	8.417	1.038±0.01	1.005±±0.01	0	0
2	Caproic acid methyl ester (6:0)	9.750	0.612±0.01	0.817±0.01	0.764	0
3	Caprylic acid methyl ester (8:0)	11.500	0.337±0.005	0.361±0.004	0	0
4	Capric acid methyl ester (10:0)	14.350	0.747±0.01	0.853±0.01	0	0
5	Undecanoic acid methyl ester (C11:0)	15.817	0.069±0.001	0	0	0
6	Lauric acid methyl ester (C12:0)	20.933	0.966±0.01	0.836±0.01	0	0
7	Myristic acid methyl ester (C14:0)	20.917	4.371±0.04	0.090	0	0.200

8	Unknown	21.833	0.086±0.001	0	0	0
9	Unknown	22.217	0.203±0.004	0	0	0
10	Myristic acid methyl ester (C14:1)	22.483	0.471±0.005	0	0	0
11	Pentadecanoic acid methyl ester (C15:0)	22.800	0.506±0.01	0	0	0
12	Unknown	23.833	0.064±0.001	0	0	0
13	Palmitic acid methyl ester (C16:0)	25.000	16.317±0.04	10.164	10.121	29.102
14	Unknown	26.117	0.105±0.001	0	0	0
15	Palmitoleic acid methyl ester (C16:1)	26.667	1.024±0.01	2.121	1.605	12.844
16	Heptadic acid methyl ester (C17:0)	27.417	0.280±0.003	0	0	0
17	Stearic acid methyl ester (C18:0)	30.500	5.808±0.04	2.948	3.038	1.192
18	Elaidic acid methyl ester (C18:1n9t)	32.283	0.537±0.01	0	0	0
19	Oleic acid methyl ester (C18:1n9c)	32.800	20.359±0.04	21.377	25.498	48.127
20	Unknown	33.083	0.960±0.01	1.558	1.116	5.137
21	Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c) ω6	36.400	30.724±0.04	46.512	48.335	41.998
22	Arachidic acid methyl ester (C20:0)	38.067	0.228±0.005	0.229	0	0.113
23	cis-11-Eicosenoic acid methyl ester (C21:1)	40.100	0	0	0	0.181
24	α-Linolenic acid methyl ester (C18:3n3c) ω3	40.300	13.871	14.740	9.331	10.106
25	Unknown	40.833	0.317	0	0	0
26	cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester (C20:2)	42.800	0	0.127	0	0
27	Behenate	44.567	1.038±0.01	0.133	0.192	0
28	acid methyl ester (C24:0)	49.900	0.612±0.01	0.817±0.01	0	0



სურათი 35. გადასამუშავებლად აღებული ქაყვის კენკრა (ა) და კენკრის გადამუშავება (ბ): 1 - რბილობიანი ფრაქცია და 2 - ანაწნები (თესლი და კენკრის კანი) Figure 35. Berry grinding process: 1 - pulp fraction and 2 - the remaining solids (seeds and berry skin)



სურათი 36. რბილობიანი ფრაქციის ცენტრიფუგირებული მასის ა) ზედა ფენა - ცხიმში შეწონილი კაროტინის ფრაქცია, 2) შუა ფენა - წყალში ხსნადი და 3) ქვედა ფენა - ნალექი Figure 36. Centrifuged mass of pulp fraction: A) The top layer is a fraction of carotenoids, weighted by fat. B) The middle layer is water-soluble. C) The bottom layer is sediment.

ქაცვის ნედლი ნაყოფის გადამუშავება - სახეხ მანქანაში ფრაქციონირება
Processing of raw sea buckthorn fruits - fractionation in a grinding machine

ცხრილი 10 Table 10

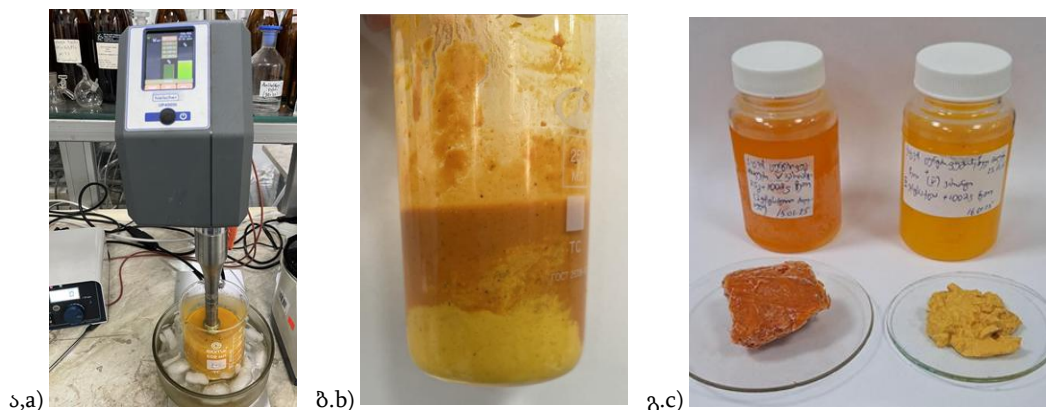
ნიმუში Sample	ფრაქციები % გამოსავლიანობის მიხედვით Fractions by % yield	კაროტინების შემცველობა carotenoid content		კაროტინების შემცველობა თითოეული ფრაქციის გამოსავლიანობის გათვალისწინებით C მგ/გ მშრალ მასაზე carotenoid content, taking into account the yield of each fraction C mg/g dry weight
		C მგ/გ ნედლზე C mg/g of raw weight	C მგ/გ მშრალზე C mg/g of dry weight	
კენკრა Berries	100	0.704±0,02	3.051±0,031	3.051±0,031
რბილობი Pulp	87	0.728±0,018	3.155±0,033	2.745±0,028
ანაწნები ნედლი - კენკრის კანი და თესლი Raw pressed - berry skins and seeds	13	1.431±0,024	1.817±0,022	0.236±0,01

რბილობიანი ფრაქციის ცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული ფრაქციების %-ული გამოსავლიანობა და კაროტინების შემცველობა % yield and content of carotenoids in fractions obtained by centrifugation of the pulp fraction
ცხრილი 11 Table 11

I ფრაქცია - რბილობი Fraction I - Pulp	ფრაქციები %-ული გამოსავლიანობის მიხედვით Fractions by % yield	კაროტინების შემცველობა carotenoid content	
		C მგ/გ ნედლ მასაზე C mg/g of raw weight	C მგ/გ მშრალ მასაზე C mg/g dry weight
ცენტრიფუგირებული - ზედა ფენა - კაროტინი და ცხიმი Centrifugation - top layer - carotenoids and lipids	3.58±0,038	1.431±0,022	1.817±0,03
ცენტრიფუგირებული - შუა ფენა - წვენი Centrifuged - middle layer - juice	69.23±0,354	0.004±0,0008	0.046±0,0009
ცენტრიფუგირებული - ქვედა ფენა - ნალექი რბილობით Centrifugation - bottom layer - sediment with pulp	27.17±0,235	0.205±0,004	0.868±0,01



სურათი 37. კაროტინის სკანირება Fig. 37. Carotenoids scanning



სურათი 38. ქაცვის ცენტრიფუგირებული რბილობიდან კაროტინების ექსტრაქცია ულტრაბგერითი ზონდის მეთოდით მზესუმზირის ზეთის გამოყენებით: ა) ულტრაბგერითი ზონდით ექსტრაქცია, ბ) ექსტრაქციის შემდეგ ცენტრიფუგირებული მასა, გ) ექსტრაქციამდე და ექსტრაქციის შედეგად მიღებული სხვაობა; Fig. 38. Extraction of carotenoids from centrifuged sea buckthorn pulp by the ultrasonic probe method using sunflower oil: a) extraction by ultrasonic probe, b) centrifuged mass after extraction, c) difference before and after extraction.

კაროტინით გამდიდრებული მზესუმზირის ზეთის ხარისხობრივი მაჩვენებლები
Quality indicators of sunflower oil enriched with carotenoids

ცხრილი 12 Table 12

ხარისხობრივი მაჩვენებლები Quality indicators	მზესუმზირის ზეთის საკონტროლო ნიმუში A control sample of sunflower oil	კაროტინით გამდიდრებული მზესუმზირის ზეთი Sunflower oil enriched with carotenoids
თავისუფალი მჟავები Free Fatty Acid (as Oleic acid, MW 282)	0,05±0.003	0,06±0.003
პეროქსიდის რიცხვი Peroxide Value	2,80±0.047	2,56±0.03
ანიზიდინის რიცხვი Anisidine value	3,73±0.041	3,22±0.04
კაროტინი მგ/გ carotenoids %	-	0,05941±0.001
ანტიოქსიდანტური აქტივობა, 0.1 მმოლ/ლ DPPH რადიკალის 50%-იანი ინჰიბირება მგ ნიმუშის მიერ antioxidant activity, 50% inhibition of DPPH radical, 0.1 mmol/L per mg sample	1,17±0.018	0,33±0.005

ქაცვის რბილობიდან ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ულტრაბგერითი ზონდით ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების დადგენა Determination of optimal conditions for ultrasonic probe extraction of biologically active compounds from sea buckthorn pulp

ცხრილი 13 Table 13

ექსტრაგენტი extragent	ექსტრაქტული ნივთიერებები % extractive substances %	კაროტინი მგ/გ მშრალ მასაზე გადაანგარიშებით carotenoids in mg/g dry weight	ექსტრაგირებული ფენოლები მგ/გ მასაზე გადაანგარიშებით extracted phenols in mg/g by weight	ანტიოქსიდანტური აქტივობა - მგ ნიმუშის მიერ DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირება antioxidant activity - 50% inhibition of DPPH radical per mg sample
წყალი Water	6.61±0.111	0,121±0.015	6,324	0,647
25% ეთანოლი 25% Ethanol	7.31±0.121	0,282±0.01	9,805	0,470
50% ეთანოლი 50% Ethanol	7.29±0.081	0,703±0.02	13,661	0,239
75% ეთანოლი 75% Ethanol	7.21±0.123	1.684±0.054	24.213	0,163



სურათი 39. ეთანოლიანი ექსტრაქტიდან 4°C ტემპერატურაზე გამოლეული კაროტინის მასა

Figure 39. Mass of carotenoids precipitated from the ethanol extract at 4°C

ქაფვის რბილობიდან მიღებული პრეპარატის შემადგენლობა
Composition of the preparation obtained from sea buckthorn pulp

ცხრილი 14 Table 14

100 გ ნედლი რბილობიდან მიღებული 2 გ პრეპარატის შემადგენლობა Composition of 2 g of the drug obtained from 100 g of raw (23 g of dry pulp) sea buckthorn pulp				
ფენოლები მგ/გ Phenols mg/g	ანტიოქსიდანტური აქტივობა - მგ ნიმუშის მიერ DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირება Antioxidant activity - 50% inhibition of DPPH radical per mg sample	ცილა, გ Protein, g	პექტინი, გ Pectin, g	ნახშირწყლები, გ Carbohydrates, g
500±6.009	0,011±0.01	0,69±0.055	0,102±0.035	0,708±0.089



სურათი 40. ანაწნების ფრაქცია, რომელიც წარმოადგენს კენკრის საერთო მასის 13% შედგება კენკრის კანისა (20%) და თესლისაგან (80%) Figure 40. The pulp, which makes up 13% of the total mass of the berries, consists of the skin of the berries (20%) and seeds (80%)

ქაცვის ანაწნების მექანიკურად დაყოფა - ფრაქციონირება
Mechanical separation of sea buckthorn pulp – fractionation

ცხრილი 15 Table 15

II ფრაქცია - ანაწნები Fraction II - Pressing	ფრაქციები %-ი გამოსავლიანობის მიხედვით Fractions by % yield	კაროტინების შემცველობა carotenoids content		კაროტინების შემცველობა თითოეული ფრაქციის გამოსავლიანობის გათვალისწინებით C მგ/გ მშრალ მასაზე carotenoids content, taking into account the yield of each fraction, C mg/g dry weight
		C მგ/გ ნედლ მასაზე With mg/g wet weight	C მგ/გ მშრალ მასაზე With mg/g dry weight	
თესლი	80	0.130±0.012	0.140±0.012	0.112
კენკრის კანი	20	0.566±0.019	0.583±0.019	0.117

ცხიმის შემცველობა ქაცვის ანაწნებში სხვადასხვა მეთოდის გამოყენებით lipid content in sea buckthorn pulp using different methods

ცხრილი 16 Table 16

ნიმუში samples	კლასიკური მეთოდი - ჰექსანით ექსტრაქცია Classic method - hexane extraction	ულტრაბგერითი ზონდით ექსტრაქცია extraction with an ultrasonic probe	სუპერკრიტიკული წყლით ექსტრაქცია Supercritical water extraction
თესლი/კანი seeds/skin	11,95±0.214	7,365±0.231	10,27±0.218
თესლი Seeds	13,22±0.261	8,097±0.157	11,73±0.222

ქაცვი ანაწნების ბიოლოგიურად აქტიური ნერთები და ანტიოქსიდანტური აქტივობა Biologically active compounds and antioxidant activity

ცხრილი 17 Table 17

ნერთები და ანტიოქსიდანტური აქტივობა Chemical compounds	ქაცვის ანაწნები (თესლი/კანი) Sea Buckthorn Extract (Seeds/Skin)	
	ნედლი Raw	გამშრალი ვაკუუმში Vacuum dried
საერთო ფენოლები მგ/გ Total phenols mg/g	91.67±0.333	89.41±0.401
ფენოლკარბონმჟავები მგ/გ Phenolic acids mg/g	18.38±0.122	16.95±0.117
საერთო ფლავონოიდები მგ/გ Total flavonoids mg/g	70.88±0.203	64.71±0.225
კატექინები მგ/გ Catechins mg/g	29.86±0.132	25.90±0.108
ლეიკოანტოციანინები მგ/გ Leucoanthocyanins mg/g	40.56±0.2	44.45±0.195
ანტიოქსიდანტური აქტივობა - DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირება მგ ნიმუშის მიერ Antioxidant activity - 50% inhibition of DPPH radical per mg sample	0.638±0.038	0.766±0.036

ქაცვის თესლიდან ლიპიდური, კაროტინოიდური და ფენოლური ფრაქციების სუპერკრიტიკული
ნახშირორჟანგით ექსტრაქციის პარამეტრები Parameters of supercritical carbon dioxide extraction of lipid, carotenoid,
and phenolic fractions from sea buckthorn seeds

ცხრილი 18 Table 18

სუპერკრიტიკული ფლუიდური (CO ₂ + კო-სოლვენტი) ექსტრაქციის პარამეტრები Supercritical fluid extraction parameters (CO ₂ + co-solvent)					
ფრაქცია Fraction	წნევა, ბარი Pressure, bar	ტემპერატურა, °C Temperature, °C	CO ₂ მიწოდების სიჩქარე გ/წთ CO ₂ feed rate g/min	ექსტრაქციის დრო, წთ Extraction time, min	კო - სოლვენტი ეთანოლი % Co- solvent Ethanol %

ზეთის მიღება Oil Consumption					
1 - 4	350	50	20	60	-
კაროტინოიდების მიღება Consumption of Carotenoids					
5 - 8	500	50	30	60	-
ფენოლური ნაერთების მიღება Consumption of Phenolic Compounds					
9 - 10	300	60	30	30	10
11 - 12	380	60	30	30	20

კლასიკური და სუპერკრიტიკული CO₂ ექსტრაქციით მიღებული ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები Biologically active compounds obtained by classical and supercritical CO₂ extraction

ცხრილი 19 Table 19

ნაერთების გამოსავლიანობა Yield of Compounds	კლასიკური მეთოდით Classical method	SFE
ცხიმი % lipids %	19,25±0.159	20,75±0.154
კაროტინოიდები მგ/გ carotenoids mg/g	0,95±0.081	1,24±0.002
საერთო ფენოლები მგ/გ total Phenols mg/g	90,11±0.355	117,2±0.545

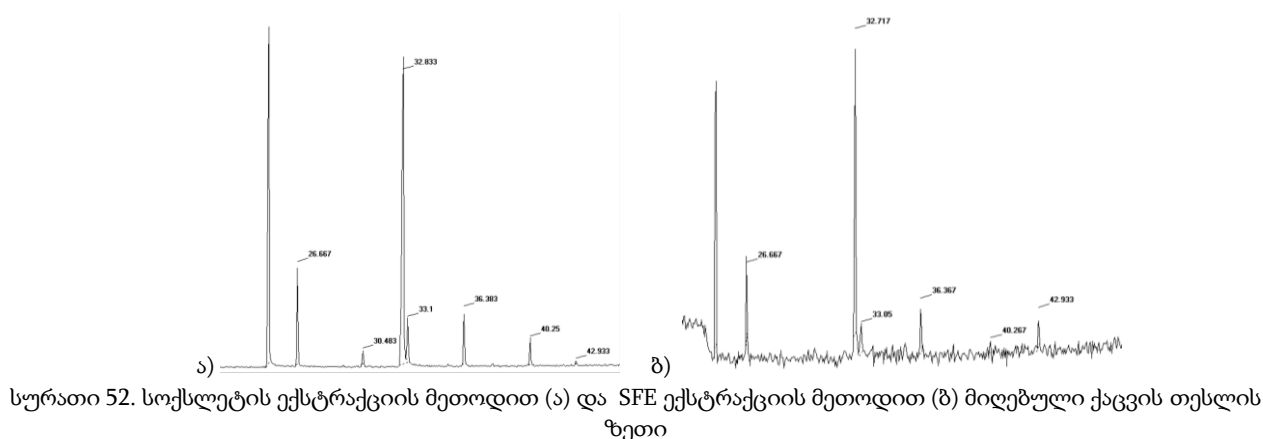


Figure 41. Sea buckthorn seed oil obtained by Soxhlet extraction (a) and SFE extraction (b).

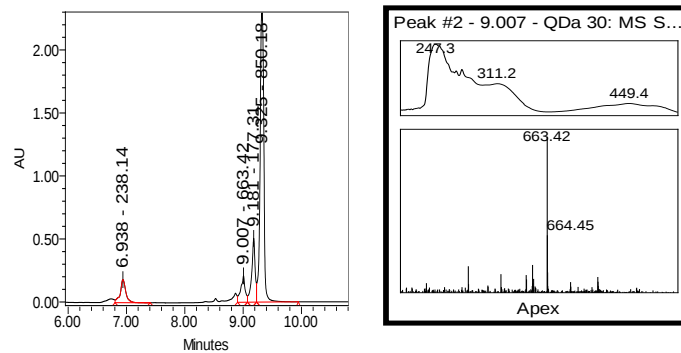
სოქსლეტით და ზეკრიტიკული ნახშირორჟანგით (SFE) ექსტრაგირებულ ქაგვის თესლის ზეთის ცხიმოვანი მჟავების შემადგენლობაში Fatty acid composition of sea buckthorn seed oil obtained by Soxhlet and supercritical carbon dioxide (SCE) methods

ცხრილი 20 Table 20

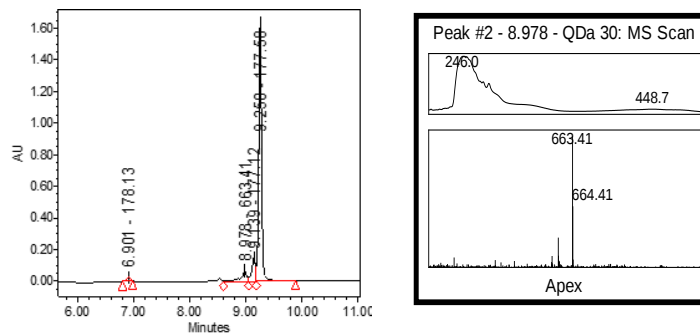
№	კომპონენტის დასახელება Component name	შეკავების დრო (წთ) Retention time (min)	ზეთი სოქსლეტით ექსტრაგირებული % Oil extracted by the Soxhlet method %	ზეთი CO ₂ ექსტრაგირებული % CO ₂ extracted from oil %
1	Palmitic acid methyl ester (C16:0)	24.967	37.064±0.301	39.019±0.327
2	Palmitoleic acid methyl ester (C16:1)	26.667	7.013±0.153	6.915±0.158
3	Stearic acid methyl ester (C18:0)	30.500	1.096±0.025	0
4	Oleic acid methyl ester (C18:1n9c)	32.800	44.236±0.455	38.257±0.411
5	უცნობი	33.083	3.351±0.089	4.273±0.099
6	Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c)	36.400	4.967±0.112	6.488±0.146
7	α-Linolenic acid methyl ester (C18:3n3c)	40.267	2.062±0.045	1.158±0.037
8	cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester (C20:2)	42.933	0.211±0.005	3.89±0.054



სურათი 42. კაროტინოიდების ფრაქცია (ფრაქცია 5 – 8)
Figure 42. Carotenoid fraction (fraction 5 – 8)



სურათი 43. SFE - ის ფრაქცია 5 – 8, β კაროტინის ქრომატოგრამა
Figure 43. Fraction 5 – 8 SFE, chromatogram of β -carotene



სურათი 44. ჰექსანით ექსტრაგირებულ ფრაქციაში β კაროტინის ქრომატოგრამა
Figure 44. Chromatogram of β -carotene in the fraction extracted with hexane

ქაცვის თესლიდან მიღებული პრეპარატების ანტიოქსიდანტური აქტივობა
Antioxidant activity of preparations obtained from sea buckthorn seeds

ცხრილი 21 Table 21

ანტიოქსიდანტური აქტივობა - მგ ნიმუშის მიერ 0.1 მმოლი DPPH რადიკალის 50% ინჰიბირება Antioxidant activity - 50% inhibition of DPPH radical 0.1 mmol/mg sample			
ექსტრაქციის მეთოდი Extraction method	ცხიმები lipids	კაროტინოიდები carotenoids	საერთო ფენოლები total phenols
კლასიკური მეთოდით Classical method	1.72±0.049	1.411±0.057	0.881±0.04
SFE	0.89±0.021	0.717±0.018	0.622±0.02



სურათი 45. კვლევისათვის შერჩეული თეთრი ვირთაგვები
Figure 45. White rats were selected for the study

თეთრ ვირთაგვებში მაღამოს დატანის მახასიათებლები
Features of using ointment for white rats

ცხრილი 22 Table 22

#	ვირთაგვის სქესი Rat gender	პრეპარატის დოზა, კანზე წასასმელად Dosage of the drug for application to the skin		პრეპარატის დღიური დოზის გამოყენების შემდგომ, კანის მდგომარეობა After using the daily dose of the drug, the skin condition	თეთრი ვირთაგვები White rats	
		ერთჯერადი მგ, Single mg,	დღე/ღამური მგ. Day/night mg.		ცოცხალი Alive	დაღუპული Deceased
1	მამრი Male	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-
2	მდედრი Female	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-
3	მამრი Male	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-
4	მდედრი Female	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-
5	მამრი Male	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-
6	მდედრი Female	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-
7	მამრი Male	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-
8	მდედრი Female	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-
9	მამრი Male	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-
10	მდედრი Female	0.01	0.06	კარგი Good	ცოცხალი Alive	-