

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**NO BIOMASAS IEGŪTA LEVOGLIKOZENONA UN TĀ
DEGRADĀCIJAS PRODUKTU NOTEIKŠANA ĀTRĀS PIROLĪZES
PRODUKTOS, IZMANTOJOT UHPLC-UV-QDA SISTĒMU**

MAĢISTRA DARBS

Autore: **Daniela Godiņa**

Studenta apliecības numurs: dg17055

Darba vadītāja: LVKĶI pētniece, *Dr. chem.* Kristīne Meile

Darba vadītājs: LU ĶF profesors, *Dr. chem.* Arturs Vīksna

RĪGA

2019

ANOTĀCIJA

No biomasas iegūta levoglikozenona un tā degradācijas produktu noteikšana ātrās pirolīzes produktos, izmantojot UHPLC-UV-QDa sistēmu. Godiņa D., zinātniskie vadītāji LV KĶI pētniece, *Dr. chem.* Kristīne Meile un LU ĶF profesors, *Dr. chem.* Arturs Vīksna, maģistra darbs, 75 lappuses, 32 attēli, 20 tabulas, 48 literatūras avoti, 2 pielikumi. Latviešu valodā.

Literatūras apskatā apkopota informācija par levoglikozenona potenciālajām izmantošanas iespējām, tā izdalīšanas un noteikšanas metodēm, kā arī tā stabilitāti un iespējamajiem degradācijas produktiem. Apkopota informācija par savienojumu stabilitātes noteikšanas metodiku.

Izmantojot UHPLC-UV sistēmu, izstrādāta metode levoglikozenona un tā degradācijas produktu identifikācijai, kā arī veikta metodes analītisko parametru noteikšana. Pēc izstrādātās UHPLC-UV metodes veikti levoglikozenona standartvielas un ātrās pirolīzes produktu – kondensātu un to ekstrakcijas frakciju – stabilitātes pētījumi dažādās šķīdinātāju sistēmās, divās temperatūrās un mainot šķīduma vides pH. Izmantojot UHPLC-MS sistēmu un veicot derivatizāciju ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu, izstrādāta metode levoglikozenona noteikšanai, kā arī veikta metodes analītisko parametru noteikšana.

LEVOGLIKOZENONS, STABILITĀTE, ULTRA AUGSTAS EFEKTIVITĀTES ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJA, DEGRADĀCIJAS KINĒTIKA, DERIVATIZĀCIJA, ANALĪTISKO PARAMETRU NOTEIKŠANA

ABSTRACT

Determination of biomass based levoglucosenone and its degradation compounds in fast pyrolysis products by UHPLC-UV-QDa. Godina D., scientific adviser from LSIWC: researcher, *Dr. chem.* Kristine Meile and scientific adviser from the University of Latvia: prof. *Dr. chem.* Arturs Viksna, Master's thesis, 75 pages, 32 figures, 20 table, 48 literature sources, 2 appendices. In Latvian.

Literature review summarizes information on potential uses of levoglucosenone, methods for its isolation and detection, as well as its stability and possible degradation products. Information on the methodology for determining the stability of compounds is also summarized.

Using a UHPLC-UV system a method for the identification of levoglucosenone was developed as well as determination of method analytical parameters. According to the developed UHPLC-UV method, studies of the levoglucosenone stability in standard solution and in fast pyrolysis products – condensates and their extraction fractions were carried out in various solvent systems at two temperatures and different pH levels. Using a UHPLC-MS system and derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine, a method for the determination of levoglucosenone was developed, as well as method analytical parameters were tested.

LEVOGLUCOSENONE, STABILITY, ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, DEGRADATION KINETIC, DERIVATIZATION, METHOD ANALYTICAL PARAMETER DETERMINATION

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS.....	6
1.LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. Levoglikozenona iegūšana	8
1.2. Levoglikozenona raksturojums un pielietojums.....	9
1.3. Stabilitātes pētījumi.....	10
1.4. Levoglikozenona noteikšanas metodes	13
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA.....	15
2.1. Izmantotā aparatūra un reaģenti	15
2.2. Ātrās pirolīzes produktu paraugi	16
2.3. Levoglikozenona noteikšanas metodes izstrāde un analītisko parametru noteikšana, izmantojot UHPLC-MS sistēmu	17
2.4. Levoglikozenona stabilitātes eksperimenti	20
2.5. Levoglikozenona noteikšanas metodes izstrāde un analītisko parametru noteikšana, veicot derivatizāciju ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu.....	22
3.REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	25
3.1. Levoglikozenona noteikšanas metodes izstrādes un analītisko parametru noteikšanas rezultāti, izmantojot UHPLC-MS sistēmu	25
3.2. Levoglikozenona stabilitāte standartšķīdumos un pirolīzes produktos	31
3.3. Levoglikozenona degradācijas kinētikas parametru noteikšanas rezultāti	35
3.4. Levoglikozenona noteikšanas metodes izstrādes un analītisko parametru noteikšanas rezultāti, veicot derivatizāciju ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu	39
3.5. Optimizēto levoglikozenona noteikšanas metožu salīdzinājums	46
SECINĀJUMI.....	49
IZMANTOTIE LITERATŪRAS AVOTI	50
1.pielikums.....	54
2.pielikums.....	72

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- AOAC – *Association of Analytical Communities* (Analītiskās komitejas asociācija)
- AVG – *Average* (vidējā vērtība)
- Da – daltoni
- DCM – *dichloromethane* (dihlormetāns)
- DMF – *dimethylformamide* (dimetilformamīds)
- DNPH – *2,4-dinitrophenylhydrazine* (2,4-dinitrofenilhidrazīns)
- EMA – *European Medicines agency* (Eiropas Medicīnas aģentūra)
- ESI – *electrospray ionization* (elektroizsmidzināšanas jonizācija)
- FA – *formic acid* (skudrskābe)
- FDA – *Food and Drug Administration* (Pārtikas un zāļu aģentūra)
- FID – *flame ionization detector* (liesmas jonizācijas detektors)
- furfural-DNPH – furfurola un 2,4-dinitrofenilhidrazīna atvasinājums
- GC/MS – *gass chromatography/masspectrometry* (gāzu hromatogrāfija masspektrometrija)
- hidroksi-LGO-DNPH – hidroksilevoglikozenona un 2,4-dinitrofenilhidrazīna atvasinājums
- HMF – *5-hydroxymethylfurfural* (5-hidroksimetilfurfuols)
- HPLC-PDA-MS – *high performance liquid chromatography-photodiode array-masspectrometry* (augstas efektivitātes hromatogrāfija tandēmā ar fotodiožu matricas detektoru un masspektrometrisko detektoru)
- QDa – *quadrupole massspectrometer* (kvadrupola masspektrometrs)
- LGO – levoglikozenons
- LGO-DNPH – levoglikozenona un 2,4-dinitrofenilhidrazīna atvasinājums
- NIST – *National Institute of Standards and Technology* (Nacionālais standartu un tehnoloģiju institūts)
- NMP – *N-methyl-2-pyrrolidone* (N-metil-2-pirolidons)
- SANTE/SANCO – *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed* (Metodes validācijas un kvalitātes kontroles vadlīnijas pesticīdu atlikumu analīzei pārtikā un augsnē)
- SIR – *single ion recording* (izdalītā jona detektēšana)
- THF – *tetrahydrofuran* (tetrahidrofurāns)
- tR – *retention time* (izdalīšanās laiks)
- UHPLC – *ultra high performance liquid chromatography* (ultra augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfija)

IEVADS

Strauji augošais fosilo enerģijas resursu patēriņš un kopējais naftas rezervju samazinājums ved uz globālu enerģētikas krīzi [1]. Fosilais kurināmais izraisa negatīvu ietekmi uz vidi, jo veicina siltumnīcas gāzu emisijas palielināšanos, kas savukārt rada globālo sasilšanu [1,2]. Šīs globālās problēmas veicina tādu atjaunojamo biomasas ķīmisko vielu iegūšanu un ražošanu, kuras iespējams plaši izmantot [3]. Fosilo enerģijas resursu aizstāšana ar atjaunojamiem biomasas resursiem ir biorafinēšanas principa pamatā [4]. Bioeļļa, kas iegūta biomasas pirolīzes procesā, tiek uzskatīta par daudzsološu atjaunojamo šķidrās degvielas avotu. Pirolīze ir termokīmiskās pārveides process, ko veic bezskābekļa vidē 350 – 650 °C temperatūrā. Bioeļļa ir komplekss savienojumu maisījums, kas satur alkēnus, aromātiskos savienojumus, fenolus, furānus, esterus, aldehīdus, ketonus, spirtus, cukurus un skābes [5–7]. Levoglikozenons (6,8-dioksabiciklo[3.2.1]okt-2-ēn-4-ons) jeb LGO ir viens no svarīgākajiem ogļhidrātiem biodegvielā [8]. Levoglikozenons ir 1,6-anhidrocukurs ar unikālu biciklisku struktūru. 1,6-anhidro- tilts nodrošina stabilu piranozes ¹C₄ konformāciju, kas apvienojumā ar diviem hirālajiem centriem (C₁ un C₅) padara LGO par īpaši pievilcīgu substrātu organiskai sintēzei [9]. No levoglikozenona atvasinātiem šķīdinātājiem ir potenciāls aizstāt pašlaik lietotos toksiskos šķīdinātājus, piemēram, dihlormetānu un nitrobenzolu [10]. Vispazīstamākais piemērs LGO pielietojumam ir *Cyrene*TM (dihidrolevogliskozenons), daudzsološa aprotiskā šķīdinātāja ražošana, ko veic “Circa” grupa Austrālijā [11]. Turklāt LGO var izmantot 1,6 - heksāndiola sintēzē, kas ir svarīga izejviela polimēru ražošanas nozarē un pat farmaceitisko vielu sintēzes procesā [12,13].

Lai arī Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūtā iegūtajos ātrās pirolīzes kondensāta paraugos levogliskozenons tiek noteikts ar GC/MS, bija nepieciešams izstrādāt rezultātu salīdzināšanai otru hromatogrāfisko metodi, izmantojot UHPLC-UV sistēmu, ar kuru būtu iespējams ātrāk noteikt LGO daudzumu no biomasas iegūtā paraugā, kā arī veikt šīs metodes parametru pārbaudi. Taču, lai kādu vielu varētu analizēt ar analītiskajām UHPLC procedūrām un izmantot dažādās nozarēs, tai ir jābūt stabilai vai jāapzina pareizi vielas uzglabāšanas apstākļi. Praktiskajā darbā tika novērota LGO molekulas noārdīšanās šķīdumos – vai nu kalibrēšanas standartšķīdumos, vai ūdeni saturošos paraugos. Tā var būt nozīmīga problēma analītiskajās UHPLC procedūrās, tāpēc viens no šī pētījuma uzdevumiem bija izpētīt LGO stabilitāti dažādās šķīdinātāju sistēmās, divās ātrās pirolīzes kondensātu uzglabāšanas temperatūrās (istabas un pazeminātā temperatūrā), skābā un bāziskā vidē un šo faktoru ietekmi uz LGO saturošo pirolīzes produktu UHPLC analīzes rezultātiem. Pēc sākotnējiem eksperimentiem, veicot LGO noteikšanu ar masspektrometrisko detektoru, tika secināts, ka

LGO elektroizsmidzināšanas režīmā bez derivatizācijas nejonizējas. Lai izveidotu otru neatkarīgu LGO kvantitatīvas noteikšanas metodi, LGO tika derivatizēts ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu un tika izmantota UHPLC-MS sistēma. Divas neatkarīgas hromatogrāfiskās metodes, kur tiek izmantoti dažādi detektori un analīzes tiek veiktas ar dažādām kolonnām, sniedz precīzāku informāciju par paraugā esošā LGO daudzumu, novēršot iespējamus traucējošos faktoros.

Maģistra darba mērķis: izstrādāt no biomasas iegūta levoglukozenona un tā degradācijas produktu noteikšanas metodes ātrās pirolīzes produktos, izmantojot UHPLC-MS sistēmu.

Mērķa īstenošanai izvirzīti sekojoši darba uzdevumi:

- 1) izstrādāt rutīnas analīzes metodi no biomasas iegūta levoglukozenona un tā degradācijas produktu noteikšanai ātrās pirolīzes produktos, izmantojot UHPLC-UV sistēmu; veikt šīs metodes parametru pārbaudi;
- 2) veikt LGO stabilitātes pētījumu standartvielai dažādos šķīdinātājos – ūdens/acetons, acetons, ūdens/acetons, divās temperatūrās – istabas temperatūrā (21 ± 3 °C) un pazeminātā temperatūrā (4 ± 3 °C), kā arī pārbaudīt skābas un bāziskas vides ietekmi;
- 3) veikt LGO stabilitātes pētījumu ātrās pirolīzes kondensātos un to frakcijās, kas atdalītas ar šķidrums-šķidrums ekstrakciju, pēc 2.darba uzdevumā minētā;
- 4) pēc hromatogrāfiskajiem datiem konstruēt LGO degradācijas kinētikas līknes (LGO relatīvā daudzuma procentos atkarībā no laika) un noteikt kinētiskos parametrus;
- 5) izstrādāt no biomasas iegūta levoglukozenona un tā degradācijas produktu noteikšanas metodi ātrās pirolīzes produktos, veicot derivatizāciju ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu un izmantojot UHPLC-MS sistēmu.

Levoglukozenona hromatogrāfiskās analīzes un stabilitātes pētījumi tika iesākti 2. kursa darbā, savukārt maģistra darbā tie būtiski papildināti.

Maģistra darbā iegūtie rezultāti tika prezentēti trīs stenda ziņojumos:

- Godina, D., Meile, K., Zhurinsh, A. Comparison of ionization (ESI) of different biomass based anhydrosugars. “Eurachem2019”, May 20-21, Estonia, Tartu
- Godina, D., Meile, K. Stability of biomass-based levoglucosenone in aqueous solutions. “EcoBalt 2018”, October 25-27, Lithuania, Vilnius
- Meile, K., Godina, D. Challenges of determining levoglucosenone by UHPLC in pyrolysis products. “EcoBalt 2018”, October 25-27, Lithuania, Vilnius

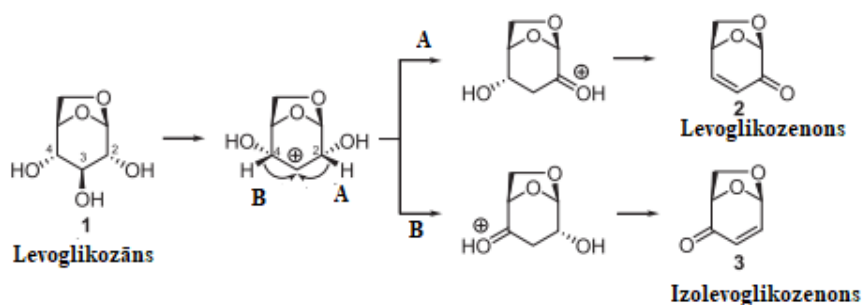
Publikācija žurnālā “Chemistry”: K. Meile, D. Godina, A. Zhurinsh. Aspects of Determining Biomass-Based Levoglucosenone by UHPLC-UV in Aqueous Samples.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Levoglikozenona iegūšana

Levoglikozenonu var ražot, izmantojot organiskās sintēzes ceļu [14], bet praktiskāka pieeja ir to iegūt no koksnes vai cita lignocelulozes materiāla [15]. LGO veidojas celulozes depolimerizācijas un dehidratācijas selektīvās katalītiskās pirolīzes procesā salīdzinoši zemā temperatūrā. Galvenā ietekme uz LGO iznākumu pirolīzes procesā ir katalizatoram [16]. No pirolīzes reaktora tiek iegūta šķidra frakcija – kondensāts vai pirolīzes eļļa –, kas satur arī daudzus blakusproduktus – citus anhidrocukurus, furānus, fenolus un organiskās skābes [17].

Ir labi zināms, ka pirolīzes procesā iegūto savienojumu sadalījumu ietekmē eksperimentālie apstākļi. Veicot neapstrādātas celulozes pirolīzi, tiek iegūts levoglikozāns (1,6-anhidro-β-D-glikopiranoze) ar aptuveni 60 % iznākumu. Lapu koku šķeldas tiek apstrādātas ar sērskābi un izturētas reaktorā pie paaugstinātas temperatūras, iegūtais cello lignīns tiek skalots, žāvēts un sasmalcināts. Pārkarsēta tvaika plūsmā cello lignīns tiek padots uz termoreaktoru, kur notiek pirolīzes process. Levoglikozāns veidojas pie 320 °C temperatūras. Pēc pirolīzes ogles atdala ciklonā, bet šķidros produktus – kondensatorā [18]. Ar skābi impregnētas celulozes pirolīzē iegūst levoglikozenonu ar daudz zemāku iznākumu (līdz 10 – 12 %) [8,9]. Jāmin, ka celulozes pirolīzes mehānismu joprojām nav izdevies pilnībā izprast, taču ir publicēti daudzi nozīmīgi atklājumi šajā jomā. Levoglikozenona veidošanās, formāli levoglikozāna divkārtēja dehidratācija, ir transformācijas piemērs, kuras mehānisms vēl nav pilnībā izskaidrots. Piemēram, pilnīgs transponētā enona izolevoglikozenona trūkums pirolizātos ir būtisks eksperimentāls novērojums, kas joprojām nav atrisināts. Galvenā transformācija, kas definē reakcijas selektivitāti, ietver 1,2-hidrīda pāreju no katjona, kas radies levoglikozenona dehidratācijā C-3 pozīcijā. Molekulas pseidosimetrija ļauj notikt divām iespējamām blakusreakcijām, 1.1. attēlā nosauktas A un B. Reakcijā A noris deprotonēšanās pie 2. pozīcijas, veidojas karbonilgrupa un iegūst levoglikozenonu, taču B reakcijā deprotonēšanās un karbonilgrupas veidošanās noris pie 4. oglekļa atoma un veidojas izolevoglikozenons [9].



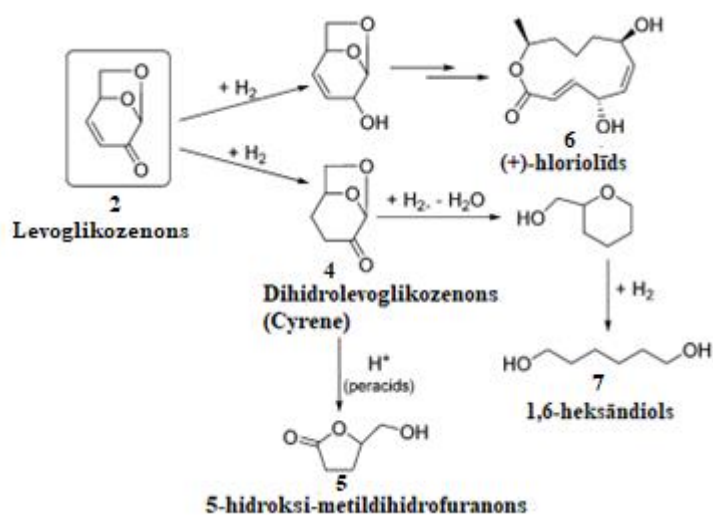
1.1.att. Levoglikozenona (2) un izolevoglikozenona (3) veidošanās mehānisms celulozes pirolīzes procesā no levoglikozāna (1) [9]

Lai celulozes vai biomasas pirolīzes procesā tiktu iegūts levoglukozenons jau lielākā iznākumā, ir nepieciešams veikt katalītisko pirolīzi [19]. Selektīvai LGO ieguvei kā potenciāls katalizators tiek izmantota ortofosforskābe (H_3PO_4). Taču pierādīts, ka arī sērskābi (H_2SO_4) un jonu šķīdumus [20,21] var izmantot kā katalizatorus. Šo katalizatoru pielietojumam ir arī negatīvie aspekti – šos katalizatorus nepieciešams impregnēt celulozē vai biomasā, kā arī nepieciešams veikt kompleksus priekšapstrādes procesus. Turklāt skābes un jonu šķīdumi ir termiski nestabili; ar sērskābi un ortofosforskābi pirolīzes procesā notiek termālās kondensācijas reakcijas, bet jonu šķīdumi degradējas, tā neļaujot tos reģenerēt. Līdz ar to cietie skābju katalizatori varētu būt potenciāla alternatīva šķidrajiem skābju katalizatoriem. Šobrīd tikai sulfonēti metāla oksīdi var tikt izmantoti LGO iegūšanai [22–24]. Turklāt šos katalizatorus ir viegli lietot – nepieciešams tikai mehāniski tos sajaukt kopā ar celulozi vai biomasu, kā arī tie ir termiski stabili un var tikt reģenerēti. Galvenokārt LGO ražošanai tiek izmantota celuloze, jo biomasā esošie blakuskomponenti var negatīvi ietekmēt LGO veidošanos. Pelnī jeb minerālvielas, kas atrodami biomasā, var inhibēt celulozes depolimerizācijas reakcijas, lai veidotu anhidrocukuru produktus [15]. Tādēļ ir būtiski attīstīt biomasas pielietojumu LGO pirolītiskai ieguvei, lai netiktu tērēti papildu resursi citas vielas ražošanai, bet tiktu izpildīts biorafinēšanas princips.

1.2. Levoglukozenona raksturojums un pielietojums

Levoglukozenons (6,8-dioksabicyklo[3.2.1]okt-2-ēn-4-ons) ir anhidrocukurs, kas satur divkāāršo saiti, kas konjugēta ar karbonilgrupu, aizsargātu aldehīdgrupu un divas aizsargātas hidroksilgrupas. 1,6-anhidro-tilts nodrošina stabili piranozes 1C_4 konformāciju, kas apvienojumā ar diviem hirālajiem centriem (C_1 un C_5) padara LGO par īpaši pievilcīgu substrātu organiskai sintēzei (1.2. attēls) [14]. Pēdējo gadu laikā LGO izmanto organiskajā sintēzē un dažādu farmaceitisko preparātu ražošanā. Kā galvenās no levoglukozenona iegūtās vielas minamas:

- (+)-hloriolīds ((+)-*chloriolide*)), kas ir pretvēža preparāts;
- hidrogenētā LGO forma – dihidrolevoglukozenons (*Cyrene*), kas ir no biomasas iegūts polārs aprotons šķīdinātājs ar līdzīgām īpašībām kā dimetilformamīdam (DMF), N-metil-2-pirolidonam (NMP) un sulfolānam;
- 5-hidroksi-metildihidrofuranons – nukleīnskābju prekursors;
- 1,6 heksāndiols – plaši izmanto polimēru ražošanā [25].



1.2.att. Levoglikozenona (2) pielietojuma shēma organiskajā sintēzē [14]

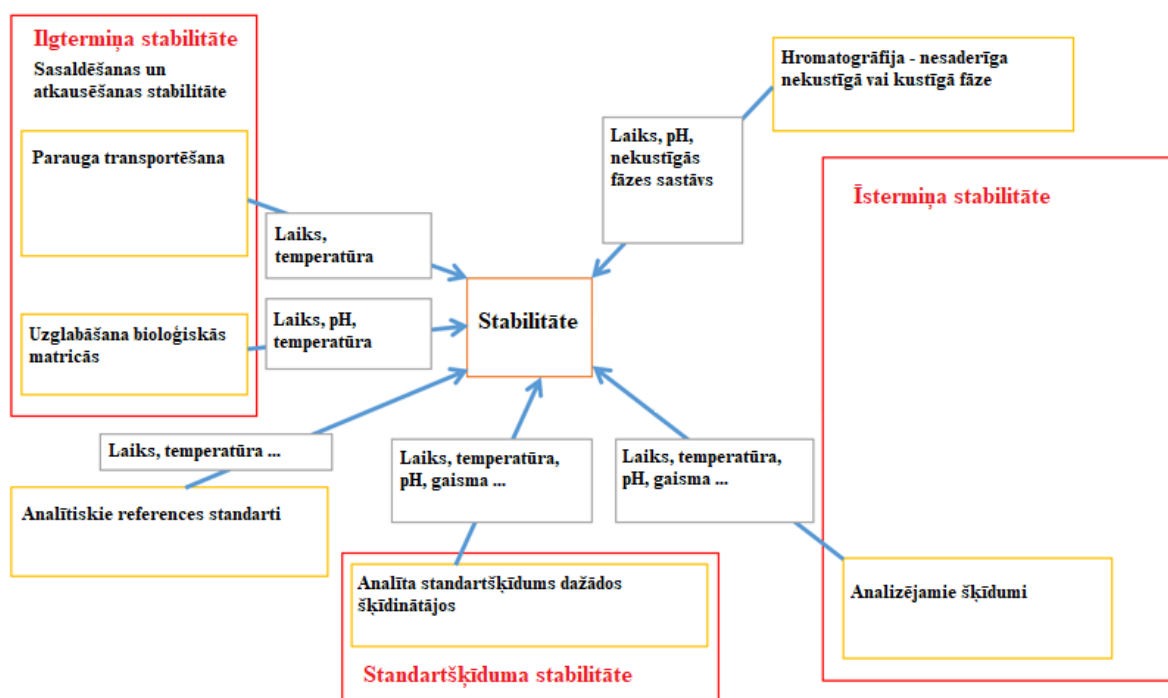
Visplašāko uzmanību izpelnījusies tieši LGO hidrogenētā forma – dihidrolevoglikozenons (*Cyrene*). Tas ir hirāls, dipolārs, aprotons šķīdinātājs, kuru iespējams izmantot organiskajā sintēzē un farmaceitisko vielu ražošanā. Dihidrolevoglikozenons ir no atjaunojamiem resursiem izdalīta alternatīva tādiem toksiskiem šķīdinātājiem kā dihlormetāns (DCM), dimetilformamīds (DMF) [10,11].

1.3. Stabilitātes pētījumi

Savienojumiem, kas ir reaģētspējīgi un līdz ar to nestabili, piemēram, α,β -nepiesātinātie karbonilsavienojumi, ir nepieciešams noteikt to stabilitāti dažādu faktoru ietekmē, lai varētu izvēlēties atbilstošus uzglabāšanas apstākļus, kā arī vielas degradācija neietekmētu kvantitatīvās noteikšanas rezultātus. Farmaceutiskajiem preparātiem stabilitātes noteikšanas metodika aprakstīta Eiropas farmakopejā [26]. Pēc Eiropas farmakopejas, veicot savienojuma (aktīvās vielas vai gatavās produkcijas) stabilitātes testēšanu, ir nepieciešams izvēlēties laika periodu, kas sniegtu pilnvērtīgu informāciju par savienojuma izmaiņām laika gaitā un būtu iespējams izvērtēt atļauto uzglabāšanas termiņu. Testēšanas biežums jāizvēlas tāds, lai iegūtu pietiekamu datu kopumu izvēlētajā laika periodā [26]. Analīta stabilitāte validācijas vadlīnijās netiek definēta kā atsevišķs parametrs, izņemot SANTE/SANCO [27], EMA [28], FDA [29], AOAC [30]. Tas skaidrojams ar faktu, ka analīta degradācija ietekmēs metodes precizitāti, ja analīts nav stabils. Neskatoties uz to, stabilitāte ir svarīgs parametrs, kuru nepieciešams izdalīt validācijas procesā, lai noskaidrotu, vai un cik nestabils ir savienojums, kā ir iespējams mainīt analīzes apstākļus, lai uzlabotu analīta stabilitāti, un kā ir iespējams iegūt pareizus rezultātus, ja savienojums ir nestabils. Analīta stabilitāte ir jānodrošina, sākot no parauga ņemšanas,

priekšapstrādes, uzglabāšanas, sagatavošanas līdz pat analīzei, lai iegūtu pareizus rezultātus. Līdz ar to stabilitātes testi ir vieni no laikietilpīgākajiem posmiem metodes validācijas procesā [30].

Šādas vadlīnijas ir attiecināmas uz farmācijas industriju, taču arī biorafinācijas industrijā ir svarīgi izvērtēt iegūto produktu stabilitāti, to noturību laika gaitā, kā arī izvērtēt dažādus faktorus, ar kuriem tiem varētu būt saskare, kā, piemēram, šķīdinātāja ietekme, temperatūra, vides pH utt. Stabilitāte tiek definēta kā analīta koncentrācijas samazināšanās noteiktā laika posmā. Jāņem vērā, ka iespējama ne tikai analīta degradācija paraugā, bet arī standartšķīdumā. Ja degradācija paraugā un standartšķīdumā noris ar vienādu ātrumu, tad tiek ietekmēta tikai metodes precizitāte. Ja degradācijas ātrums atšķiras, tad tiek ietekmēta gan metodes precizitāte, gan pareizība. Veicot stabilitātes pētījumus, izdala ilgtermiņa, standartšķīduma un īstermiņa stabilitāti un to ietekmējošos faktorus (laiks, temperatūra, pH utt.). Dažādi stabilitātes veidi attēloti 1.3. attēlā [30].



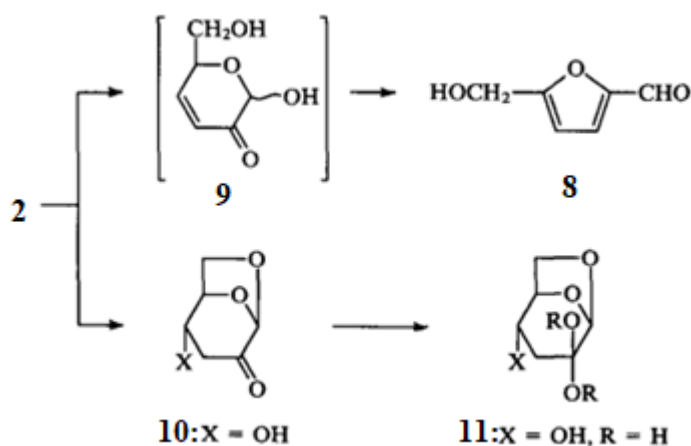
1.3.att. Stabilitātes veidi un to ietekmējošie faktori [30]

Savienojuma stabilitāte var tikt noteikta pēc hromatogrāfijas metodēm - joslas laukuma attiecības vai pēc koncentrāciju attiecības [30].

Savienojumu degradācija parasti atbilst pirmās jeb pseidopirmās pakāpes reakcijai, jo tās ātrums ir atkarīgs tikai no attiecīgās vielas koncentrācijas. Tas skaidrojams, ar to, ka, ja notiek, piemēram, savienojuma hidrolīze ūdens šķīdumā, ūdens ir lielā pārkumā pret aktīvo vielu. Tad var uzskatīt, ka ūdens koncentrācija laika gaitā nemainās un to var neņemt vērā [31].

Zinātniskajā literatūrā atsevišķi pētījumi par LGO stabilitāti un degradācijas kinētiku netika atrasti. Taču jāņem vērā, ka pēc EMA bioanalītisko metožu validācijas vadlīnijām [28] analīta stabilitāte nevar tikt pierādīta vai noliegta pēc literatūras datiem, ir nepieciešams veikt stabilitātes testēšanu [30]. Citi autori, pētot LGO iegūšanu ātrās pirolīzes procesā, secinājuši, ka atsevišķos gadījumos tiek iegūti pazemināti LGO iznākumi. Autoru grupa (C. Fei, *et al.*), pētot levoglikozenona iegūšanu no celulozes, nonākuši pie secinājuma, ka LGO iznākums ir atkarīgs no celulozes pirolīzes procesā izmantotā šķīdinātāja [25]. Ja pirolīzes procesā kā šķīdinātājs tiek izmantots ūdens, tad LGO iznākums ir mazāks, turpretī 5-hidroksimetilfurfurola (5-HMF) daudzums pieaug. Tika pārbaudīta arī polāra aprotone šķīdinātāja ietekme, attiecīgi ūdens vietā izmantojot tetrahidrofurānu (THF). Šajos apstākļos tika iegūts visaugstākais LGO iznākums [25]. Var secināt, ka polārs protondonors šķīdinātājs kā ūdens būtiski ietekmē LGO stabilitāti, šajos apstākļos noris LGO degradācija par 5-HMF.

Zinātniskajā literatūrā nav aprakstīti LGO degradācijas mehānismi. Ir izpētītas levoglikozenona organiskās sintēzes perspektīvas. Izpētot informāciju par organiskajām sintezēm, kur LGO izmanto kā izejvielu, un, salīdzinot reakciju apstākļus ar ātrās pirolīzes produktu iegūšanas un uzglabāšanas apstākļiem, var secināt potenciālos LGO degradācijas mehānismus. Levoglikozenonu karsējot neorganisku skābju ūdens šķīdumā, tiek iegūts 5-HMF (**8**) (skābes katalizēta heksožu dehidratācija) (1.4. attēls). Noris LGO molekulā esošā 1,6-anhidro tiltiņa šķelšanās un starpstāvokļa veidošanās (**9**). Var notikt arī ūdens pievienošanās LGO dubultsaitei un iegūts savienojumu **10**, kas var tikt atdalīts no LGO, veicot ekstrakciju ar hloroformu. Savienojuma **10** augstā šķīdība ūdenī skaidrojama ar molekulā esošās keto grupas hidratāciju un diola **11** veidošanos [32].

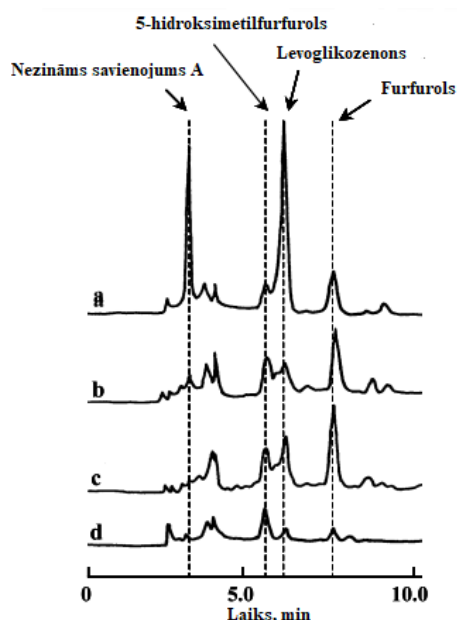


1.4.att. Levoglikozenona (2) skābju katalizētas reakcijas [32]

1.4. Levoglikozenona noteikšanas metodes

Visbiežāk pirolīzes produkti, kuri satur LGO, tiek analizēti, izmantojot gāzu hromatogrāfiju masspektrometriju (GC/MS). Būtiska priekšrocība, kas saistīta ar GC/MS, ir iespēja identificēt savienojumus, izmantojot NIST MS bibliotēku [19,33]. Kvantitatīvām analīzēm, lai uzlabotu analītiskos raksturlielumus – precizitāti un atkārtojamību kas iegūti ar gāzu hromatogrāfu ar liesmas jonizācijas detektoru (FID), nepieciešams izmantot iekšējo standartu – 1,2,4,5-tetrametilbenzolu [19].

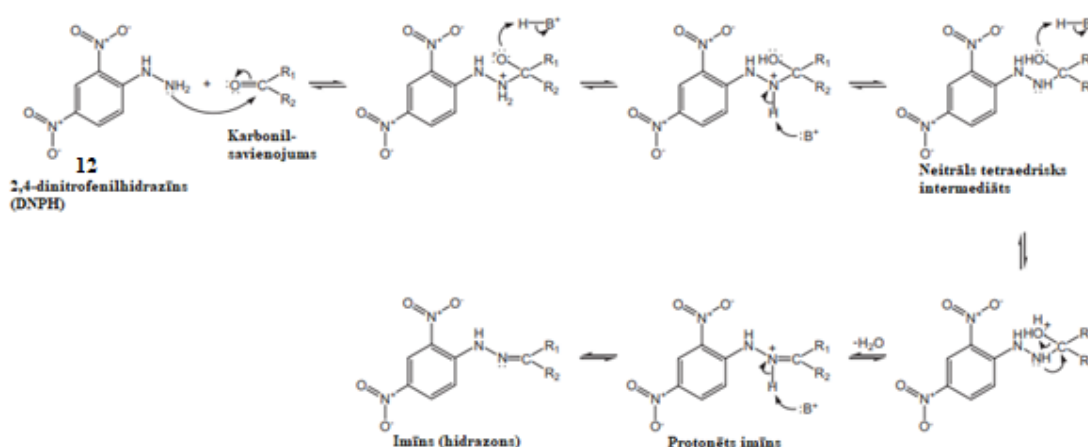
Šķidrums hromatogrāfija nav pirmā izvēle LGO saturošu pirolīzes produktu analīzēm, jo apgrieztās fāzes hromatogrāfijā LGO daļēji vai pilnībā pārklājas ar 5 - hidroksimetilfurfuroļu (HMF) (1.5.attēls) [8]. Ja analīzes tiek veiktas ar šķidrums hromatogrāfu, tad kā detektoru izmanto fotodiožu matricas detektoru (PDA) un izvēlas viļņu garumus 210 [34] vai 220 nm [8]. Literatūrā LGO jonizācija elektroizsmidzināšanas (ESI) režīmā nav aprakstīta. Taču, izmantojot elektrotriecienu jonizāciju gāzu hromatogrāfijā, kad LGO standartšķīdums ir svaigi pagatavots, novēro jonu ar masas lādiņa attiecību 126 Da. Ja standartšķīdums nav pagatavots tieši pirms analīzes veikšanas, tad masspektrā novēro jonu ar masas lādiņa attiecību 98 Da [35]. Tā kā pieejamā literatūra par LGO analīzēm ar HPLC-UV/MS ir minimāla, tad ir svarīgi veikt pētījumus šajā aspektā. Mūsdienās šķidrums hromatogrāfija ir ļoti izplatīta analīzes metode, un tā ir pieejama arvien lielākam skaitam laboratoriju. Ar šķidrums hromatogrāfiju LGO analīzes iespējams veikt īsākā laikā nekā ar gāzu hromatogrāfiju



1.5.att. HPLC-UV hromatogrammas pie viļņu garuma 254 nm dažādiem sulfonētiem pirolīzes pirolīzes paraugiem (a – celuloze (200 °C, 2 min), b – levoglikozāns (200 °C, 2 min), c – levoglikozenons (240 °C, 3 min), d – furfurols (200 °C, 3 min) [8]

Literatūrā nav pieejama informācija par noteikšanas metodēm, kur tiktu veikta LGO derivatizācija, lai uzlabotu tā jonizāciju elektroizsmidzināšanas (ESI) apstākļos. Pēc savas struktūras LGO ir α - β nepiesātināts ketons, kuram ir reaģētspējīga karbonylgrupa. Šo karbonylgrupu būtu iespējams derivatizēt. Kā viena no visbiežāk izmantotajām karbonylsavienojumu noteikšanas metodēm ir to derivatizācija ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu [36]. Eksistē standartmetode, kur šo derivatizējošo reaģentu izmanto, lai noteiktu aldehīdus un ketonus dzeramajā ūdenī [37]. DNPH tiek izmantots arī, lai noteiktu aldehīdus un ketonus asins plazmā [38,39], urīnā [40,41], gaisā [42] un dažādos ūdens paraugos [43].

Metode balstās uz 2,4-dinitrofenilhidrazīna reakciju ar karbonylsavienojumu skābā vidē (1.6. attēls).



1.6.att. Karbonylsavienojumu reakcijas shēma ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu (12) [44]

DNPH tā C=N dubultsaites dēļ novēro E- un Z-stereoizomērus. Attīrītam aldehīd-2,4-dinitrofenilhidrazonam novēro tikai E-stereoizomēru, bet UV radiācijas vai pievienotās skābes ietekmē veidojas abi izomēri [44,45]. Lai novērstu šo izomerizācijas problēmu, ir izstrādāta metode, kur karbonyl-2,4-dinitrofenilhidrazona C=N dubultsaite tiktu pārvērsta par C-N saiti, veicot reduktīvo aminēšanu ar 2-pikolīna borānu [46]. Iegūtos karbonylatvasinājumus analizē ar šķidrums hromatogrāfu, kur par detektoru izmanto diožu matricas un/vai masspektrometru, jo radušamies atvasinājumam raksturīga gan augsta absorbcija, gan izteikta jonizācija ESI un APCI apstākļos [44].

Literatūrā praktiski nav aprakstīta LGO noteikšana, izmantojot šķidrums hromatogrāfiju, pieejami daži avoti [8,34], kuros LGO nosaka ar UHPLC-UV sistēmu. LGO jonizācija ESI apstākļos līdz šim nav pētīta, līdz ar to maģistra darbā tika izstrādātas vairākas LGO noteikšanas metodes, izmantojot UHPLC-MS sistēmu, kā arī pētīta šīs vielas stabilitāte un degradācijas kinētika.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Izmantotā aparatūra un reaģenti

Izmantotās laboratorijas iekārtas un piederumi:

- Ultra augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfijas “Waters Acquity H-Class” iekārta ar kolonnas un paraugu termostatu, nepārtrauktu kustīgās fāzes degazēšanas iekārtu, automātisko paraugu injicēšanas iekārtu, fotodiožu matricas detektoru (PDA), kvadrupola masspektrometru (QDa) un šķidrums hromatogrāfijas augstspiediena sūkni “Waters Acquity H-Class Quaternary Solvent Manager” (Waters, ASV)
- Analītiskie svāri “Kern ABS” ($\pm 0,1$ mg; max masa 220 g)
- pH-metrs “HI-2002 Edge” ($\pm 0,01$ pH; mērīšanas diapazons: no – 2,00 līdz 16,00 pH)
- Biohit Proline automātiskā pipete 1000 – 5000 μ L ($\pm 0,00001$ μ L)
- Biohit Proline automātiskā pipete 100 – 1000 μ L ($\pm 0,000001$ μ L)
- Nylaflo™ Membrane neilona membrānas filtri (0,45 μ m, 47 mm)

Hromatogrāfiskās analīzes dati levogliskozenona degradācijas gaitas kontrolei, izmantojot UHPLC-UV sistēmu:

- Apgrieztās fāzes hromatogrāfijas kolonna “CSH Fluoro-Phenyl” (1.7 μ m, 2.1 x 100 mm) (Waters Corporation, Ireland)
- Kustīgās fāzes sastāvs: A kanāls – acetnitrils/dejonizēts ūdens (MilliQ) (40:60) ar 0,1 % NH₃ piedevu; izokrātiski apstākļi
- Parauga injekcijas tilpums: 2,00 μ L
- Kolonnas temperatūra: 30 °C
- Plūsmas ātrums: 0,150 mL·min⁻¹
- Analīzes laiks: 10 min
- UV/VIS spektru uzņemšanas diapazons: 210 – 400 nm

Hromatogrāfiskās analīzes dati levogliskozenona derivāta analīzei, izmantojot UHPLC-MS sistēmu:

- Apgrieztās fāzes hromatogrāfijas kolonna “CSH Phenyl-Hexyl” (1.7 μ m, 2.1 x 100 mm) (Waters Corporation, Ireland)
- Kustīgās fāzes sastāvs: A kanāls – dejonizēts ūdens (MilliQ) ar 0,1 % skudrskābes piedevu, B kanāls – ACN; gradienta apstākļi (2.1. tabula)

Gradianta apstākļi

Laiks, min	A, %	B, %
0,00	90	10
2,50	90	10
7,00	10	90
7,50	10	90
8,00	90	10
10,00	90	10

- Parauga injekcijas tilpums: 2,00 μL
- Kolonnas temperatūra: 30 $^{\circ}\text{C}$
- Plūsmas ātrums: 0,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
- Analīzes laiks: 10 min
- UV/VIS spektru uzņemšanas diapazons: 210 – 400 nm
- Elektronu izsmidzināšana negatīvajā režīmā (ESI-)
- Detektēšanas diapazons: m/z 50 – 500 Da
- Konusa spriegums: 3V
- Kapilārais spriegums: 0,8 kV
- Izdalītie joni: m/z 305, 95, 125 Da

Izmantotie ķīmiskie reaģenti:

- Levoglikozēns, tīrība $\geq 95\%$ (Merck, cat. No. 37112-31-5)
- Furfuols, tīrība 99 % (Merck, cat. No. 98-01-1)
- Acetonitrils LC-MS CHROMASOLV® (Merck, cat. No 34967)
- Acetons LC-MS CHROMASOLV® (Merck, cat. No 67-64-1)
- Amonija hidroksīda šķīdums LiChropur® (Merck)
- Skudrskābe LiChropur® (Merck, cat. No 64-18-6)
- 2,4-dinitrofenilhidrazīns, tīrība 97 % (Merck, cat. No. 119-26-6)
- Attīrīts ūdens, ūdens attīrīšanas sistēma Direct – Q 3UV 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ 25 $^{\circ}\text{C}$

2.2. Ātrās pirolīzes produktu paraugi

Ātrās pirolīzes produktu paraugus ieguva Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūta Biorafinēšanas laboratorijas levoglikozēna ražošanas pilotiekārtā. Pirolīzes šķīdros paraugus sagatavoja, izmantojot lignocelulozi, kas iegūta no hidrolizētām bērza (*Betula pendula*) skaidām. Samaltu bērza koksni (0,40 – 0,63 mm) piesūcināja ar fosforskābes ūdens šķīdumu (5

masas % uz sausu izejvielu), pēc tam piesūcināto materiālu žāvēja 103 °C temperatūrā un ievadīja Šneka reaktorā. Pirolīzes temperatūra bija 340 °C, katrā eksperimentā izmantoja 80 g izejvielas. Padeves ātrums bija 12 g·min⁻¹, vidējais uzturēšanās laiks reaktorā bija 1,3 min, slāpekļis kā nesējgāze ar plūsmas ātrumu 0,3 L·min⁻¹. Produktu tvaikus izvadīja caur Lībiga dzesinātāju, un šķīdros produktus savāca apaļkolbā. Eksperimenta provizoriskos ekstrahēšanas eksperimentus veica ar hloroformu, pēc tam veica šķīdinātāja aizvadīšanu, izmantojot rotācijas ietvaicēšanu.

2.3. Levoglukozenona noteikšanas metodes izstrāde un analītisko parametru noteikšana, izmantojot UHPLC-MS sistēmu

Levoglukozenona kvalitatīvās un kvantitatīvās noteikšanas metodes izstrādei testēja trīs apgrieztās fāzes hromatogrāfijas kolonnas, tām atbilstošas kustīgās fāzes, kā arī pozitīvu vai negatīvu jonizācijas režīmu (2.2. tabula). Pēc hromatogrāfijas datiem izvēlējās optimālāko LGO noteikšanas metodi un veica šīs metodes analītisko parametru noteikšanu. Tā kā no biomasas iegūtiem paraugiem nav izveidotas atsevišķas validācijas vadlīnijas, tad šajā darbā izstrādāto LGO noteikšanas metožu analītiskie parametri izvēlēti un noteikti balstoties uz farmaceitisko preparātu un pesticīdu noteikšanas metožu validācijas vadlīnijām [27,28,47], kā arī informāciju, kas iegūta no Tartu Universitātes organizētajiem kursiem “LC-MS Method Validation (P2AV.TK.829)” [30]. Analītisko parametru atbilstība noteikta pēc pesticīdu atlieku noteikšanas metožu validācijas prasībām [27].

2.2.tabula

Levoglukozenona noteikšanas metožu parametru apkopojums

Kolonna	Kustīgās fāzes saturs	Kolonnas temperatūra, °C	Jonizācijas režīms (ESI)
CSH Phenyl-Hexyl (1,7 μm, 2,1 x 100 mm)	A kanāls – dejonizēts ūdens (MilliQ) ar 0,1 % skudrskābes piedevu B kanāls – ACN; gradienta režīms (2.1.tabula)	30	Pozitīvs
BEH Amide (1,7 μm, 2,1 x 100 mm)	A kanāls – dejonizēts ūdens (MilliQ)/ACN (40/60) ar 0,1 % NH ₃ piedevu; izokrātiski apstākļi	60	Negatīvs
CSH Fluoro-Phenyl (1,7 μm, 2,1 x 100 mm)	A kanāls – dejonizēts ūdens (MilliQ)/ACN (40/60) ar 0,1 % NH ₃ piedevu; izokrātiski apstākļi	30	Negatīvs

Linearitāte

Pagatavoja LGO standartšķīdumus acetnitrila/ūdens maisījumā (50:50 (v/v)) diapazonā 1 – 150 % no iespējamā levoglukozenona satura ātrās pirolīzes kondensāta paraugā. Pagatavoja

LGO standartšķīdumus ar masas koncentrāciju 2; 0,2 un 0,05 mg/mL un no tiem atšķaidījumus ar masas koncentrāciju 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,08; 0,1; 0,12; 0,15 mg/mL (precīzās šķīdumu masas koncentrācijas apkopotas darba 2. pielikumā 2.1.tabulā).

Katru atšķaidījumu analizēja, izmantojot UHPLC-UV sistēmu jauktā secībā ar trīs atkārtotām injekcijām.

Kvantificēšanas un detektēšanas robežu noteikšana

Metodes detektēšanas robeža ir zemākā analīta koncentrācija paraugā, ko iespējams ticami atšķirt no nulles, bet metodes kvantificēšanas robeža ir analīta koncentrācija paraugā, ko ir iespējams noteikt ar pietiekamu atkārtojamību un pareizību [48]. Kvantificēšanas robeža (LOQ) tiek raksturota ar hromatogrāfiskās joslas signāla un trokšņa attiecību 10, bet detektēšanas robežas (LOD) attiecība ir 3.

Šīs vērtības aprēķināja pēc formulām 2.1. un 2.2., izmantojot kalibrēšanas grafika datus (joslu laukumu vidējo standartnovirzi un taisnes virziena koeficientu), kurš iegūts iepriekš aprakstītajā punktā – linearitāte. LOD un LOQ vērtības aprēķināja visā lineārajā koncentrāciju diapazonā, kā arī ņemot vērā tikai pirmos kalibrēšanas grafika punktus (no 0,001 līdz 0,01 mg/mL).

$$LOQ = \frac{10 \cdot AVG S_n}{a}, \quad (2.1.)$$

$$LOD = \frac{3 \cdot AVG S_n}{a}, \text{ kur} \quad (2.2.)$$

LOQ – kvantificēšanas robeža (*Limit of quantification*), mg/mL

LOD – detektēšanas robeža (*Limit of detection*), mg/mL

AVG S_n – vidējā standartnovirze no joslas laukuma vērtībām, AU·s

a – kalibrēšanas taisnes virziena koeficients

Joslu laukumu standartnovirzi aprēķina pēc formulas 2.3.

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum(x-x_{vid})^2}{n-1}}, \text{ kur} \quad (2.3.)$$

S_n – standartnovirze, AU·s

x – mērījuma vērtība

n – mērījumu skaits

Atgūstamība

Atgūstamības pārbaudi veica diapazonā no 80 līdz 120 % no 0,224 mg/mL levoglikozenona koncentrācijas, kas atbilst sagaidāmajai LGO masas koncentrācijai ātrās pirolīzes kondensātā. Ātrās pirolīzes kondensāta paraugu atšķaidīja ar acetonitrila/ūdens maisījumu (50:50 (v/v)) līdz masas koncentrācijai 0,8 mg/mL (pēc kalibrēšanas grafika aprēķinātā LGO masas koncentrācija paraugā dota darba 3.1. nodaļā 3.2. tabulā).

Šķīdumu sagatavošana atgūstamības noteikšanai attēlota 2.3. tabulā.

Šķīdumu sagatavošana LGO atgūstamības izvērtēšanai

Līmenis, %	80	100	120
Pievienotā LGO standartšķīduma masas koncentrācija, mg/mL	0,260	0,260	0,260
Pievienotais LGO standartšķīduma tilpums, mL	0,60	0,75	0,90
Pievienotais ātrās pirolīzes kondensāta parauga tilpums, mL	0,90	0,75	0,60
Teorētiskā LGO masas koncentrācija, mg/mL	0,217	0,224	0,231

Katru šķīdumu (ātrās pirolīzes kondensāta paraugs bez piedevas un ar LGO standartpiedevu) analizēja, izmantojot UHPLC-UV sistēmu jauktā secībā ar trīs atkārtotām injekcijām. Teorētisko LGO masas koncentrāciju aprēķināja pēc formulas 2.4.

$$\gamma_{teor} = \left(\gamma_{bez\ piedevas} \cdot \frac{V_{par}}{V_{kop}} \right) + \left(\gamma_{standartšķ} \cdot \frac{V_{stand}}{V_{kop}} \right), kur \quad (2.4.)$$

γ_{teor} – teorētiskā LGO masas koncentrācija, mg/mL

$\gamma_{bez\ piedevas}$ – LGO masas koncentrācija ātrās pirolīzes kondensāta paraugā (pēc kalibrēšanas datiem), mg/mL

V_{par} – pievienotā ātrās pirolīzes kondensāta tilpums, mL

V_{kop} – kopējais šķīduma tilpums, mL

V_{stand} – pievienotais LGO standartšķīduma tilpums, mL

Atgūstamību (R) aprēķināja pēc formulas 2.5.

$$R = \frac{\gamma_{apr}}{\gamma_{teor}} \cdot 100, kur \quad (2.5.)$$

R – atgūstamība (*recovery*), %

γ_{apr} – pēc kalibrēšanas datiem aprēķinātā LGO masas koncentrācija, mg/mL

Atkārtojamība

Sistēmas precizitāti noteica, veicot LGO standartšķīduma (ar masas koncentrāciju 0,1 mg/mL; šķīdums no linearitātes pārbaudes) sešas atkārtotās injekcijas. Metodes precizitāti noteica ātrās pirolīzes kondensāta paraugam, kuram pagatavoja sešus atsevišķus šķīdumus acetonitrila/ūdens maisījumā (50:50 (v/v)) ar masas koncentrāciju 0,8 mg/mL. Sistēmas precizitāte raksturo iekārtas precizitāti, bet metodes precizitāte papildus ņem vērā paraugu sagatavošanas procedūras ietekmi.

Atkārtojamība noteikta, aprēķinot joslu relatīvo standartnovirzi pēc 2.6. formulas.

$$ATKĀRTOJAMĪBA = \frac{S_{n\text{ joslas laukumiem}}}{AVG_{\text{joslas laukumiem}}} \cdot 100, kur \quad (2.6.)$$

$S_{n\text{ joslas laukumiem}}$ – standartnovirze no LGO joslas laukumu vērtībām, AU·s

$AVG_{\text{joslas laukumiem}}$ – LGO joslas laukumu vidējā vērtība, AU·s

2.4. Levoglikozenona stabilitātes eksperimenti

2,00 mg/mL LGO standartvielas izšķīdināja ūdenī, ūdenī/acetonitrilā (50:50 (v/v)), acetonitrilā, ūdenī/acetonā (50:50 (v/v)) un acetonā un filtrēja vairākās UHPLC hromatogrāfijas pudelītēs, kuras uzglabāja istabas temperatūrā (21 ± 3 °C) vai ledusskapī (4 ± 3 °C) līdz trim mēnešiem. Minētās temperatūras izvēlētas, lai izvērtētu, kāda ir atbilstoša ātrās pirolīzes kondensātu uzglabāšanas temperatūra, kurā nenotiktu LGO degradācija. Vides pH ietekmes izvērtēšanai pagatavoja divus LGO standartšķīdumus ūdenī/acetonitrilā (50:50 (v/v)) ($\gamma = 2,00$ mg/mL) un pievienoja skudrskābes vai amonija hidroksīda šķīdumu, līdz ieguva pH vērtību ~ 2 vai ~ 9 . Vides pH vērtība ~ 2 izvēlēta, jo analizējamā paraugā (ātrās pirolīzes kondensātā) ir skāba vide (pH 1,5 – 2,5). Vides pH ~ 9 izvēlēta kā maksimālā vērtība, kas nebojā izmantoto analītisko kolonnu (*CSH Fluoro-Phenyl*). Precīzās iegūto šķīdumu pH vērtības noteica ar pH-metru. Katru šķīdumu filtrēja UHPLC hromatogrāfijas pudelītēs un uzglabāja augstāk tekstā minētajās temperatūrās. Degradācijas kinētikas parametru aprēķiniem no LGO standartšķīduma ($\gamma = 2,00$ mg/mL) pagatavoja atšķaidījumu sēriju (šķīdumu precīzās masas koncentrācijas norādītas 1.1. – 1.4. tabulās, 1. pielikumā). Pēc vairāku dienu laika intervāla šķīdumus analizēja ar UHPLC-UV pēc 2.1. nodaļā aprakstītās metodes, izmantojot *CSH Fluoro-Phenyl* kolonnu, lai novērotu LGO hromatogrāfiskās joslas laukumu samazināšanos. Katra parauga uzglabāšanas laiks atšķiras, jo atšķiras arī LGO degradācijas ātrums; ja LGO relatīvais daudzums paraugā bija zem 10 %, tad turpmākas analīzes ar attiecīgo paraugu netika veiktas. Vai arī, ja LGO relatīvais daudzums procentos lielā laika periodā (2 mēneši) praktiski nemainījās, tad stabilitātes eksperiments tika pārtraukts. Ātrajā pirolīzē iegūtos kondensātus (P57; P75; P93), to ekstraktus un pēc ekstrakcijas iegūtos ūdens atlikumus (turpmāk tekstā, tabulās un attēlos ūdens slānis) (P75 un P93) atšķaidīja ar ūdeni/acetonitrilu (50:50 (v/v)) līdz masas koncentrācijai 10,5 mg/mL un uzglabāja abās temperatūrās, un analizēja, kā aprakstīts iepriekš (2.4. tabula). Paraugus bez atšķaidīšanas uzglabāja ledusskapī (2.4. tabulā norādīts kā neatšķaidīts kondensāts, ekstrakts vai ūdens slānis) un veica to atšķaidīšanu tikai pirms hromatogrāfiskās analīzes. Izveidotas kinētiskās līknes, lai attēlotu LGO relatīvā daudzuma samazināšanos laikā ($w(\text{LGO}), \% = f(\text{laiks})$) (1. pielikumā kinētikas līkņu datu tabulas).

Levoglukozenona stabilitātes eksperimentos izmantotie paraugi

Parauga veids	Šķīdinātājs	γ (šķīd.), mg/mL	Uzglabāšanas temperatūra, °C	Uzglabāšanas ilgums, dienas
LGO standartviela	H ₂ O/ACN (50:50 (v/v))	2,00	4 ± 3 °C; 21 ± 3 °C	76
	100 % ACN			67
	100 % acetons			
	Acetons/H ₂ O (50:50 (v/v))			
LGO standartviela (pH ~ 2)	H ₂ O/ACN (50:50 (v/v))			61
LGO standartviela (pH ~ 9)				
P 57 neatšķaidīts kondensāts	H ₂ O/ACN (50:50 (v/v))	10,5	4 ± 3 °C	73
P 57 kondensāts			4 ± 3 °C; 21 ± 3 °C	107
P 75 kondensāts				93
P 75 ekstrakts				
P 75 ūdens slānis			103	
P 93 neatšķaidīts kondensāts			4 ± 3 °C	49
P 93 kondensāts			4 ± 3 °C; 21 ± 3 °C	93
P 93 neatšķaidīts ekstrakts			4 ± 3 °C	61
P 93 ekstrakts			4 ± 3 °C; 21 ± 3 °C	93
P 93 neatšķaidīts ūdens slānis			4 ± 3 °C	49
P 93 ūdens slānis			4 ± 3 °C; 21 ± 3 °C	93

Pēc hromatogrāfijas datiem – joslas laukuma izmaiņas atkarība no laika, aprēķināja LGO relatīvo daudzumu katrā laika vienībā un konstruēja kinētiskas līknes. LGO relatīvo daudzumu katrā laika vienībā aprēķināja pēc 2.7. vienādojuma.

$$W_{(LGO),\%} = \frac{\text{joslas laukums}_t}{\text{joslas laukums}_{t_0}} \cdot 100, \text{ kur} \quad (2.7.)$$

$W_{(LGO),\%}$ - LGO relatīvais daudzums, %

Joslas laukums_{t0} – sākotnējais LGO joslas laukums, AU·s

Joslas laukums_t – LGO joslas laukums laika vienībā, AU·s

Relatīvo LGO samazinājumu diennaktī katrā laika intervālā aprēķināja pēc 2.8. vienādojuma un noteica vidējo vērtību.

$$W_{(LGO),\% \text{ samaz}} = \frac{W_{0(LGO),\%} - W_{(LGO),\%}}{t_0 - t}, \text{ kur} \quad (2.8.)$$

$W_{(LGO),\% \text{ samaz}}$ – LGO relatīvā daudzuma samazinājums, %

$W_{0(LGO),\%}$ – sākotnējais LGO relatīvais daudzums, %

t_0 – degradācijas sākotnējais laiks (0 dienas)

t – degradācijas laika vienība, dienas

No sākotnējās šķīduma masas koncentrācijas aprēķināja LGO sākotnējo molāro koncentrāciju (2.9. vienādojums).

$$C_{(LGO),\text{sākotn}} = \frac{\gamma(\text{šķīd})}{M(LGO)} \cdot 1000, \text{ kur} \quad (2.9.)$$

$C_{(LGO),\text{sākotn}}$ – levoglikozenona sākotnējā molārā koncentrācija, mmol/L

$\gamma(\text{šķīd})$ – analizējamā šķīduma masas koncentrācija, mg/mL

$M(LGO)$ – levoglikozenona molmasa, g/mol

Pēc iepriekš aprēķinātā procentuālā LGO relatīvā daudzuma laika vienībā (2.7. vienādojums) aprēķināja LGO molārās koncentrācijas samazinājumu katrā laika vienībā (2.10. vienādojums).

$$C_{(LGO),\text{samaz}} = (C_{(LGO),\text{sākotn}} \cdot (W_{(LGO),\% \text{ samaz}}/100)), \text{ kur} \quad (2.10.)$$

$C_{(LGO),\text{samaz}}$ – levoglikozenona molārās koncentrācijas samazinājums laika vienībā, mmol/L

2.5. Levoglikozenona noteikšanas metodes izstrāde un analītisko parametru noteikšana, veicot derivatizāciju ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu

Levoglikozenona derivatizācijas metode adaptēta, par pamatu izmantojot standartmetodi karbonilgrupu saturošu savienojumu noteikšanai ūdenī [37].

Pārbaudīta reaģentu pievienošanas secības, skābes daudzuma, temperatūras un reakcijas laika ietekme uz levoglikozenona derivatizāciju. Pagatavoja LGO standartšķīdumu acetonitrilā ar masas koncentrāciju 0,2 mg/mL, kā arī 2,4-dinitrofenilhidrazīna (DNPH) šķīdumu acetonitrilā ar masas koncentrāciju 3 mg/mL. Standartmetodē skābu vidi nodrošināja ar citrāta buferšķīdumu, taču darbā izmantoja koncentrētu skudrskābi (FA) kā gaistošu savienojumu.

Vispirms pārbaudīja reaģentu pievienošanas secību, kā arī izejvielas un reaģentu daudzuma attiecību. Tā kā ketonu un aldehīdu derivatizāciju ar DNPH ir nepieciešams veikt skābā vidē, noteica optimālo skābes daudzumu. LGO derivatizāciju veica sekojošās temperatūrās: 5; 20; 40; 60 °C. Reakcijas ilgums bija 10 min, 1 h, 2 h, 24 h. Pēc iegūtajiem datiem izvēlējās optimālāko temperatūru. Standartmetodē reakciju veic 1 stundu 40 °C temperatūrā. Veica reakcijas kinētikas mērījumus, kur parauga šķīdumu analizēja ar sešām atkārtotām injekcijām 1 stundas garumā.

Pēc iegūtajiem datiem izvēlējās optimālāko LGO derivatizācijas metodi, ko veica pēc 2.5. tabulā aprakstītajiem reakcijas parametriem un šādas izejvielas un reaģentu pievienošanas secības: LGO + FA + DNPH (1:1:1). Izveidoto metodi pārbaudīja ar ātrās pirolīzes kondensāta paraugu. Pagatavoja ātrās pirolīzes kondensāta paraugu acetonitrilā ar masas koncentrāciju 0,5 mg/mL.

2.5.tabula

Levoglikozenona derivatizācijas ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu reakcijas parametri

Pievienotais LGO standartvielas/ātrās pirolīzes kondensāta tilpums, mL	Pievienotais DNPH ($\gamma=3$ mg/mL) tilpums, mL	Pievienotais FA tilpums, mL	Reakcijas ilgums, min	Temperatūra, °C
0,5	0,5	0,5	10	5

Hromatogrāfiskās analīzes veica pēc 2.1. nodaļā aprakstītās metodes. Salīdzināja LGO derivāta jonizāciju elektroizsmidzināšanas pozitīvajā un negatīvajā režīmā. LGO noteikšanas metodes analītiskie parametri izvēlēti un noteikti balstoties uz farmaceitisko preparātu un pesticīdu noteikšanas metožu validācijas vadlīnijām [27,28,47], kā arī informāciju, kas iegūta no Tartu Universitātes organizētajiem kursiem “LC-MS Method Validation (P2AV.TK.829)” [30]. Analītisko parametru atbilstība noteikta pēc pesticīdu atlieku noteikšanas metožu validācijas prasībām [27].

Linearitāte

Pagatavoja LGO standartšķīdumus acetonitrilā diapazonā 1,25 – 150 % no iespējamā levoglikozenona satura ātrās pirolīzes kondensāta paraugā.

Pagatavoja LGO standartšķīdumus acetonitrilā ar masas koncentrāciju 1; 0,2; 0,05 mg/mL un no tiem atšķaidījumus ar masas koncentrāciju: 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 mg/mL (precīzās šķīdumu masas koncentrācijas apkopotas darba 3.4. nodaļā 3.6. tabulā). Pēc tam veica LGO derivatizāciju katram atšķaidījumam pēc 2.5. tabulā dotajiem reakcijas parametriem.

Katru atšķaidījumu analizēja, izmantojot UHPLC-MS sistēmu jauktā secībā ar trīs atkārtotām injekcijām. Katru šķīdumu sagatavoja tieši pirms konkrētās hromatogrāfiskās analīzes.

Kvantificēšanas un detektēšanas robežu noteikšana

Kvantificēšanas un detektēšanas robežu vērtības aprēķināja pēc 2.3. nodaļā aprakstītās metodikas un aprēķinu formulām.

Atgūstamība

Atgūstamības pārbaudi veica ar ātrās pirolīzes kondensāta paraugu, ko pagatavoja acetonitrilā ar masas koncentrāciju 0,5 mg/mL. Lai izvērtētu matricas ietekmi uz LGO derivatizācijas gaitu,

parauga šķīdumu atšķaidīja ar acetoniātrilu 4 un 10 reizes (sekojoši atšķaidījumi izvēlēti, lai iegūtās LGO joslas laukuma vērtības iekļautos kalibrācijas grafika smaguma centrā). Parauga šķīdumam, kuru atšķaidīja 4 reizes, pievienoja LGO standartšķīdumu ar masas koncentrāciju 0,05 mg/mL, bet parauga šķīdumam, kuru atšķaidīja 10 reizes, pievienoja LGO standartšķīdumu ar masas koncentrāciju 0,02 mg/mL (pievienoto LGO standartšķīdumu precīzās masas koncentrācijas dotas 2.6. tabulā). Pēc tam veica LGO derivatizāciju katram atšķaidījumam pēc 2.5. tabulā dotajiem reakcijas parametriem.

2.6. tabula

Šķīdumu sagatavošana LGO atgūstamības izvērtēšanai, veicot derivatizāciju ar DNPH

Ātrās pirolīzes kondensāta parauga ($\gamma=0,529$ mg/mL) atšķaidījums, reizes	Pievienotais ātrās pirolīzes kondensāta parauga tilpums, mL	Pievienotā LGO standartšķīduma masas koncentrācija, mg/mL	Pievienotais LGO standartšķīduma tilpums, mL	Teorētiskā LGO masas koncentrācija, mg/mL
4	0,5	0,0530	0,5	0,0542
10	0,5	0,0265	0,5	0,0243

Katru šķīdumu (ātrās pirolīzes kondensāta paraugs bez piedevas un ar LGO standartpiedevu) analizēja, izmantojot UHPLC-MS sistēmu jauktā secībā ar trīs atkārtotām injekcijām. Katru analizējamo šķīdumu pagatavoja tieši pirms konkrētās hromatogrāfiskās analīzes.

Teorētisko LGO masas koncentrāciju aprēķināja pēc formulas 2.4. Atgūstamību aprēķināja pēc formulas 2.5.

Atkārtamība

Sistēmas precizitāti noteica veicot LGO standartšķīdumu (ar masas koncentrāciju 0,15 un 0,01 mg/mL) sešas atkārtotas injekcijas. Metodes precizitāti noteica ātrās pirolīzes kondensāta paraugam, no kura pagatavoja sešus atsevišķus atšķaidījumus acetoniātrilā ar masas koncentrāciju 0,05 mg/mL. LGO derivatizāciju katram analizējamam šķīdumam veica pēc 2.5. tabulā dotajiem reakcijas parametriem. Katru analizējamo šķīdumu pagatavoja tieši pirms konkrētās hromatogrāfiskās analīzes.

Atkārtamību noteica, aprēķinot joslu relatīvo standartnovirzi pēc 2.6. formulas.

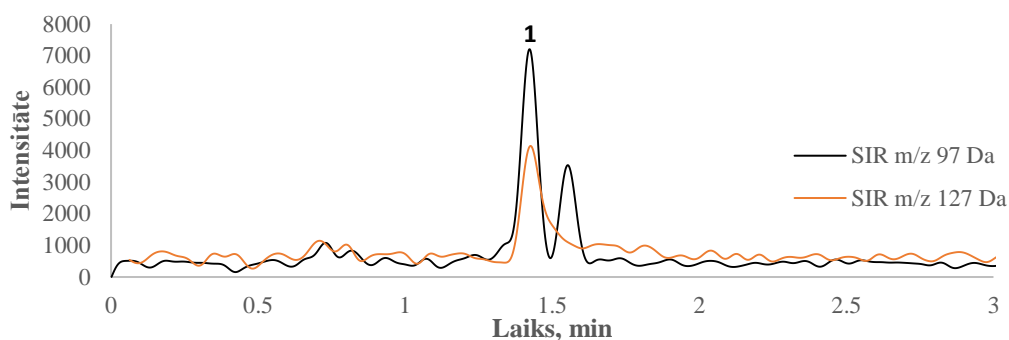
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1. Levoglikozenona noteikšanas metodes izstrādes un analītisko parametru noteikšanas rezultāti, izmantojot UHPLC-MS sistēmu

Lai Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūtā iegūtajos ātrās pirolīzes kondensāta paraugos tiktu kvalitatīvi un kvantitatīvi noteikts levoglikozenons, bija nepieciešams izstrādāt hromatogrāfisko metodi, ar kuru būtu iespējams ātri un precīzi noteikt LGO daudzumu no biomasas iegūtā paraugā, kā arī veikt šīs metodes analītisko parametru pārbaudi. Optimizētās metodes analītiskie parametri izvēlēti un noteikti balstoties uz farmaceitisko preparātu un pesticīdu noteikšanas metožu validācijas vadlīnijām [27,28,47], kā arī informāciju, kas iegūta no Tartu Universitātes organizētajiem kursiem “LC-MS Method Validation (P2AV.TK.829)” [30]. Analītisko parametru atbilstība noteikta pēc pesticīdu atlieku noteikšanas metožu validācijas prasībām [27]. Tika noteikta LGO linearitāte, atgūstamība, atkārtojamība, kvantitatīvā un detektēšanas robežvērtība, kā arī LGO stabilitāte un to ietekmējošie faktori. LGO stabilitāte sīkāk aprakstīta 3.2. nodaļā, bet levoglikozenona degradācijas kinētikas parametru aprēķins izklāstīts 3.3. nodaļā.

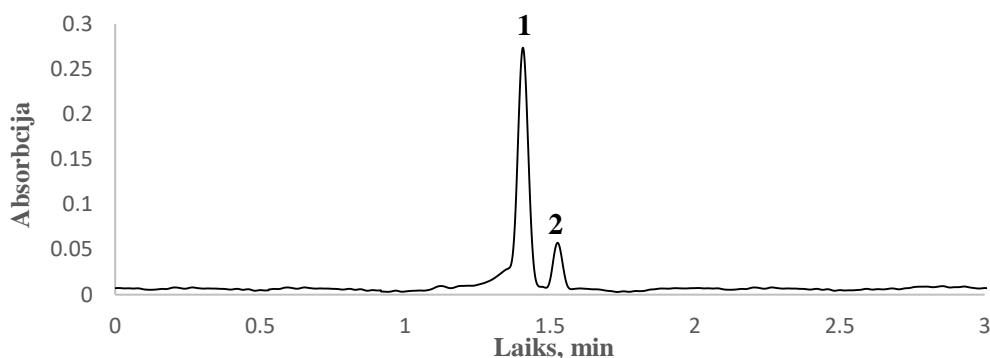
Literatūrā minēts, ka LGO iespējams noteikt, izmantojot UV detektoru, un detektēšanu veikt pie 220 nm viļņu garuma [8]. Taču, ja tiek izmantots tikai UV detektors, nav iespējams pilnīgi spriest par pirolīzes kondensātā esošajiem komponentiem, kā arī LGO potenciālajiem degradācijas produktiem. Tādēļ masspektrometriskais detektors kopā ar UV detektoru sniegtu pilnīgāku ainu.

Sākotnēji, veicot LGO analīzes ar *CSH C18 Phenyl-Hexyl* kolonnu, tika izmantots pozitīvs elektroizsmidzināšanas režīms (kā kustīgās fāzes piedeva izmantota skudrskābe). Furfūrola kā viena no LGO degradācijas produkta identitāte tika pierādīta pēc standartvielas izdalīšanās laika un UV spektra. Šajos apstākļos kopējās jonu strāvas hromatogrammā tika novēroti joni ar masas lādiņa attiecību (m/z) 97 un 127 Da. Jons ar m/z vērtību 127 Da teorētiski atbilst LGO molekulārajam jonam [$M+H^+ = 127$ Da], taču šī jona signāla intensitāte bija zemāka nekā jonam ar m/z vērtību 97 Da (3.1. attēls – izdalītā jona (SIR) hromatogrammas).



3.1.att. UHPLC-QDa izdalītā jona (SIR) hromatogrammas LGO standartšķīdumam acetnitrila/ūdens maisījumā (50:50 (v/v)) (josla nr. 1. tR = 1,43 min , josla nr. 2. tR = 1,56 min)

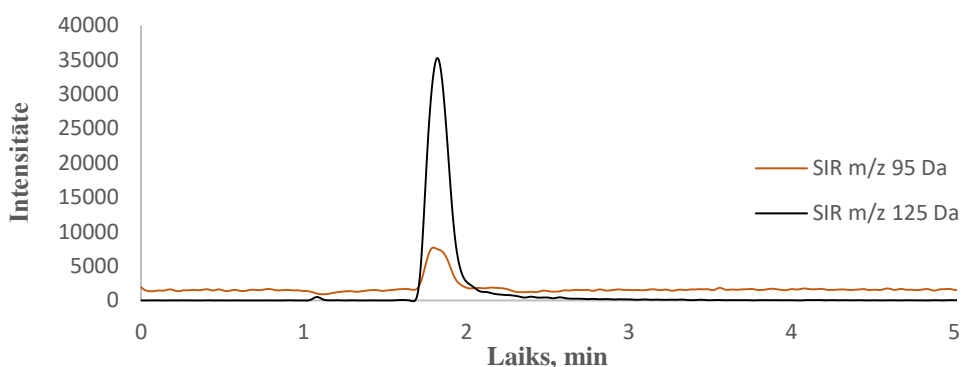
Starpība starp 127 un 97 Da ir 30 Da, kas var atbilst formaldehīda molekulas izšķelšanai. Pēc UV hromatogrammas (3.2. attēls) redzams, ka ar šo metodi tiek panākta pietiekama LGO un furfurola izšķiršana: izdalīšanās faktors (k) LGO un furfurolam ir 0,98; 1,15; bet selektivitāte (α) starp LGO un furfurolu ir 1,17.



3.2. att. UHPLC-UV hromatogramma LGO standartšķīdumam acetnitrila/ūdens maisījumā (50:50 (v/v)) (1 – LGO tR = 1,41 min; 2 – furfurols tR = 1,53 min)

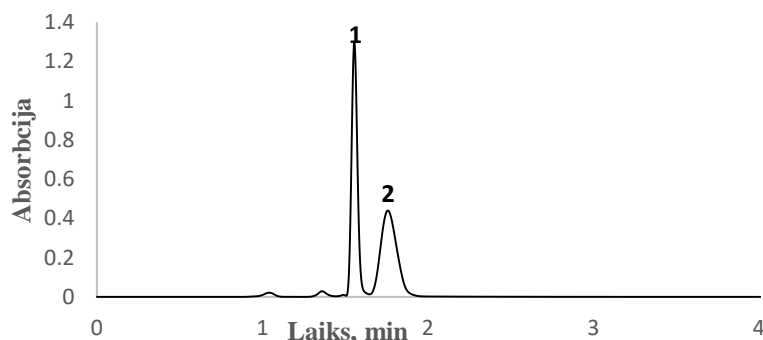
Furfurols šajos apstākļos jonizējas, un kopējā jonu strāvas hromatogrammā ir redzams jons ar m/z vērtību 97 Da. Pēc UV hromatogrammas redzama kāda polārāka komponenta neatdalīšanās no LGO (LGO degradācijas produkts) (3.2 attēls). Līdz ar to šajos apstākļos nav iespējams pilnīgi apgalvot, ka LGO jonizējas. Negatīvajā elektroizsmidzināšanas režīmā neviens no augstāk minētajiem joniem (m/z 95 un 125 Da) netika detektēts.

Tālāk analīzes tika veiktas ar hidrofilo mijiedarbību tipa (HILIC) BEH amide kolonnu, kā piedeva kustīgajai fāzei tika izmantots amonija hidroksīda šķīdums. Gan pozitīvajā, gan negatīvajā elektroizsmidzināšanas režīmā tika novēroti iepriekš minētie joni, tikai šajos apstākļos jons ar m/z vērtību 125 Da bija intensīvāks (3.3. attēls).



3.3.att. UHPLC-QDa izdalītā jona (SIR) hromatogrammas LGO standartšķīdumam acetnitrila/ūdens maisījumā (50:50 (v/v)); $t_R = 1,82$ min

Izmantojot *BEH amide* kolonnu, pēc UV hromatogrammas redzams, ka LGO un furfurols neatdalās, bet atdalās iepriekš minētais polārais savienojums, kas no LGO neatdalījās, izmantojot *CSH C18 Phenyl-Hexyl* kolonnu: izdalīšanās faktors (k) LGO, LGO degradācijas produktam ir 1,47; 1,19; selektivitāte (α) starp LGO un degradācijas produktu ir 1,24 (3.4. attēls).

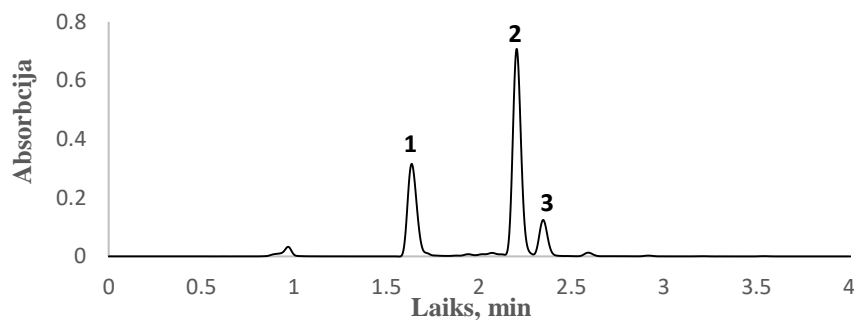


3.4.att. UHPLC-UV hromatogramma LGO standartšķīdumam acetnitrila/ūdens maisījumā (50:50 (v/v)) (1 – LGO degradācijas produkts $t_R = 1,56$ min; 2 – LGO + furfurols $t_R = 1,76$ min)

Ja kā piedeva tiek izmantota bāze un negatīvs elektroizsmidzināšanas režīms, tad furfurols nejonizējas. Pēc savienojumu izdalīšanās laikiem var secināt, ka šajos apstākļos jonizējas nevis LGO, bet gan tā degradācijas produkts. Šim savienojumam kopējās jonu strāvas hromatogrammā novēro jonus ar m/z vērtību 125 Da $[M-H]^-$, 95 Da $[M-CH_2O-H]^-$ un 143 Da, kas atbilst ūdens molekulas pievienošanai LGO.

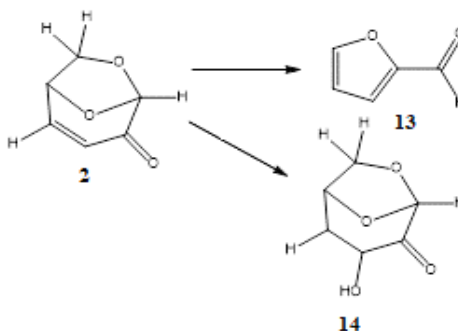
Tā kā iepriekšējā metodē, kur kā piedeva kustīgajai fāzei tika izmantota bāze (NH_3), tika panākta LGO degradācijas produkta jonizācija, tad arī šajā metodē tika veikta jonizācija negatīvajā elektroizsmidzināšanas režīmā un kā piedeva kustīgajai fāzei tika izmantota bāze.

Tika izmantota *C18 Fluoro-Phenyl* kolonna, lai panāktu LGO un furfuroļa pilnīgu atdalīšanos. Pēc UV hromatogrammas redzams, ka LGO un tā degradācijas produkti atdalās (3.5. attēls).



3.5.att. UHPLC-UV hromatogramma LGO standartšķīdumam acetnitrila/ūdens maisījumā (50:50 (v/v)) (1 – LGO degradācijas produkts $t_R = 1,64$ min; 2 – LGO $t_R = 2,25$ min; 3 – furfurols $t_R = 2,41$ min)

Pēc hromatogrāfiskajiem datiem secināts, ka LGO (2) galvenie degradācijas produkti ir furfurols (13) un hidroksilevoglukozenons (14). Hidroksilevoglukozenona struktūrformula ir pieņemta, balstoties uz masas starpību starp LGO un radušos degradācijas produktu.



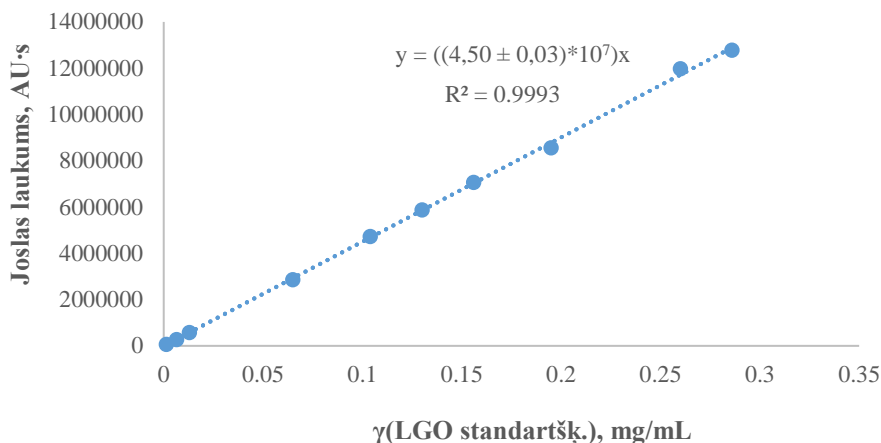
3.6.att. Levoglukozenona (2) galvenie degradācijas produkti: furfurols (13) un hidroksilevoglukozenons (14)

Izdalīšanās faktors (k) LGO, furfurolam un LGO degradācijas produktam ir 2,16; 2,38; 1,30. Selektivitāte (α) starp LGO un furfurolu ir 1,10, starp LGO un tā degradācijas produktu ir 1,66. Līdz ar to šī metode var tikt izmantota LGO degradācijas produktu hromatogrāfiskai atdalīšanai. Lai arī tika panākta LGO degradācijas produkta jonizācija, pats LGO nejonizējas nevienā no pārbaudītajām metodēm. Līdz ar to 3. metodē kvalitatīvās un kvantitatīvās analīzes ir ieteicams veikt, izmantojot UV detektoru. Šai metodei tika veikta arī analītisko parametru noteikšana pie viļņu garuma 220 nm.

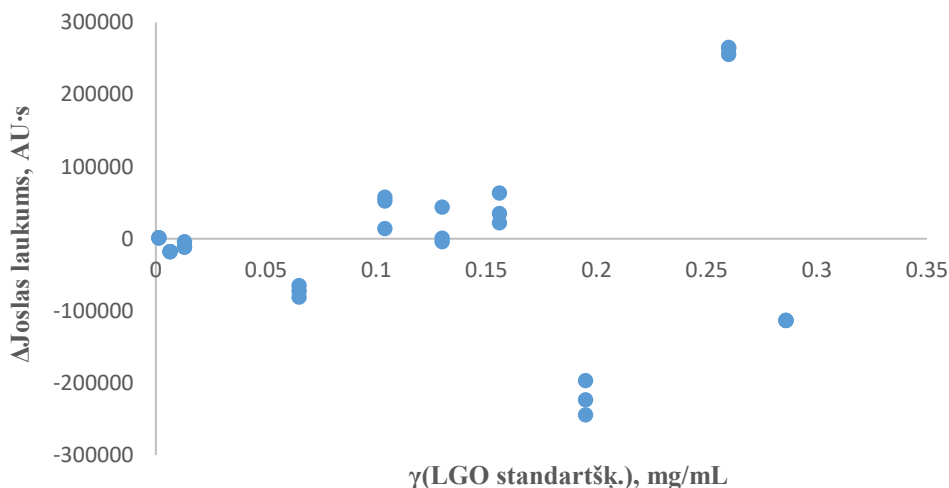
Linearitāte

Tika pagatavoti desmit LGO standartšķīduma atšķaidījumi acetnitrila/ūdens maisījumā (50:50 (v/v)) diapazonā 1 – 150 % no iespējamā levoglukozenona satura ātrās

pirolīzes kondensāta paraugā. Katrs atšķaidījums sistēmā tika ievadīts trīs reizes. Rezultāti apkopoti 2. pielikumā 2.1. tabulā un 3.7. attēlā.



3.7.att. LGO kalibrēšanas grafiks



3.8.att. Regresijas atlikuma diagramma

Pēc regresijas atlikuma diagrammas (3.8. attēls) redzams, ka LGO kalibrēšanas grafiks koncentrāciju diapazonā no 0,00130 līdz 0,286 mg/mL pakļaujas lineārai sakarībai un ir homoskedastisks.

Kvantificēšanas un detektēšanas robežu noteikšana

Kvantificēšanas un detektēšanas robežu vērtības tika aprēķinātas pēc formulām 2.1. un 2.2., izmantojot kalibrēšanas grafika datus. Aprēķiniem nepieciešamie dati doti 3.1. tabulā un 2. pielikuma 2.1. tabulā. Lineārajā koncentrāciju diapazonā (no 0,00130 līdz 0,286 mg/mL):

LOD = 0,0008 mg/mL

LOQ = 0,003 mg/mL

Ņemot vērā pirmos trīs kalibrēšanas grafika punktus (no 0,00130 līdz 0,0130 mg/mL):

LOD = 0,00010 mg/mL

LOQ = 0,0003 mg/mL

3.1.tabula

Kvantificēšanas un detektēšanas robežu vērtību noteikšanas dati

Atšķ. Nr.	γ (LGO standartšķ.), mg/mL	Sn joslas laukumam (UV, 275 nm), AU·s	Sn %
1.	0,00130	5	0,008
2.	0,00650	82	0,03
3.	0,0130	4346	0,8
4.	0,0650	7958	0,3
5.	0,104	23912	0,5
6.	0,130	26308	0,4
7.	0,156	21259	0,3
8.	0,195	23703	0,3
9.	0,260	5240	0,04
10.	0,286	52	0,0004
AVG Sn joslas laukumiem, AU·s		11287	

Atgūstamība

Atgūstamības pārbaude tika veikta diapazonā no 80 līdz 120 % no 0,224 mg/mL levoglukozenona koncentrācijas. Atgūstamība tika aprēķināta pēc formulas 2.4. un iegūtie rezultāti apkopoti 3.2. tabulā.

3.2.tabula

Levoglukozenona atgūstamības dati

Līmenis, %	Joslas laukums, AU·s	γ (LGO kal.), mg/mL	γ (LGO teor.), mg/mL	Atgūstamība, %	AVG atgūstamībai \pm Sn, %
Bez piedevas	8469104	0,1880	-	-	-
	8325414	0,1848	-	-	-
	8456971	0,1878	-	-	-
80	9261338	0,2056	0,217	94.8	94,5 \pm 0,5
	9180015	0,2038	0,217	94.0	
	9254356	0,2054	0,217	94.7	
100	9657807	0,2144	0,224	95.7	96,3 \pm 0,6
	9770851	0,2169	0,224	96.8	
	9716920	0,2157	0,224	96.3	
120	10172835	0,2258	0,231	97.6	97,5 \pm 0,2
	10134528	0,2249	0,231	97.3	
	10168742	0,2257	0,231	97.6	

Atkārtamība

Sistēmas precizitāte tika noteikta, veicot LGO standartšķīduma (ar masas koncentrāciju 0,130 mg/mL) sešas atkārtotas injekcijas. Metodes precizitāte tika noteikta ātrās pirolīzes

kondensāta paraugam, no kura pagatavoti seši atsevišķi atšķaidījumi acetonitrila/ūdens maisījumā (50:50 (v/v)).

Atkārtojamību aprēķināja pēc 2.5. formulas. Iegūtie dati apkopoti 3.3. tabulā.

3.3.tabula

Atkārtojamības (sistēmas un metodes precizitāte) rezultāti

	γ (šķīd.), mg/mL	Joslas laukums, AU·s	Sn joslas laukumam, AU·s	AVG joslas laukumam, AU·s	Atkārtojamība, %
LGO standartšķīdums (sistēmas precizitāte)	0,130	5899773	18300	5881249	0,3
		5862409			
		5895163			
		5858394			
		5875448			
		5896308			
Ātrās pirolīzes kondensāta paraugs (metodes precizitāte)	0,787	10176684	37377	10114557	0,4
		10114460			
		10128240			
		10101328			
		10103451			
		10063178			

3.2. Levoglikozenona stabilitāte standartšķīdumos un pirolīzes produktos

Sākotnēji tika analizēta LGO standartvielas stabilitāte dažādos šķīdinātājos, divās temperatūrās. Pēc hromatogrāfijas datiem – joslas laukuma izmaiņas atkarība no laika, tika aprēķināts LGO relatīvais daudzums katrā laika vienībā un konstruētas kinētikas līknes. LGO relatīvo daudzumu katrā laika vienībā aprēķināja pēc 2.7. vienādojuma.

Relatīvo LGO samazinājumu diennaktī katrā laika intervālā aprēķināja pēc 2.8. vienādojuma un noteica vidējo vērtību.

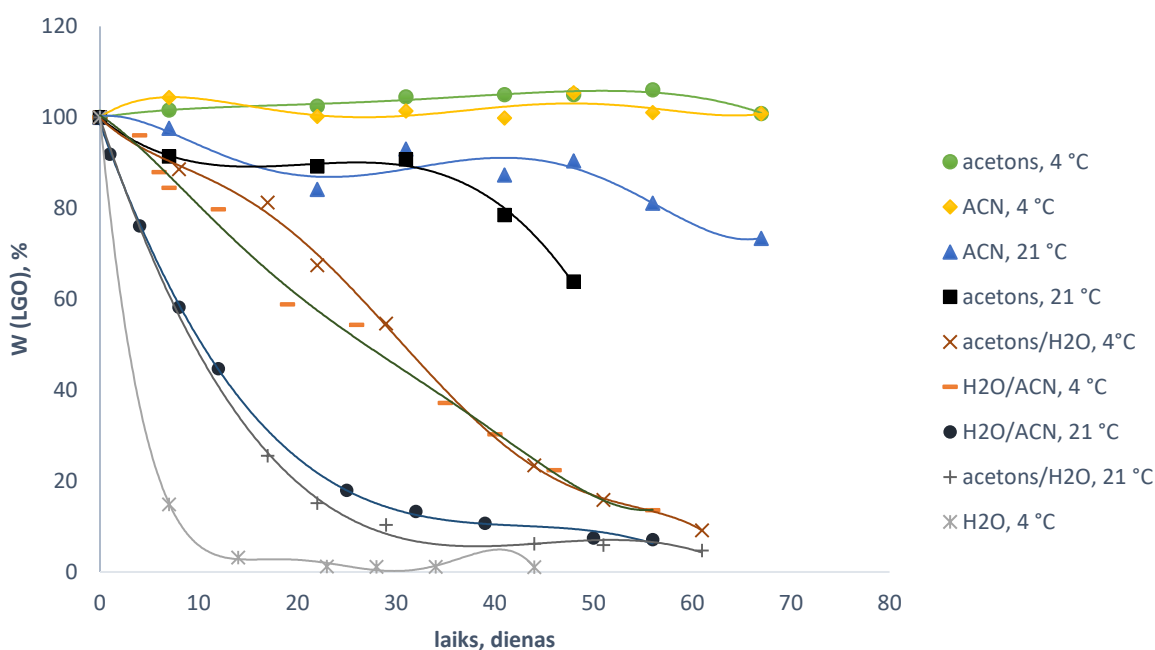
Aprēķinātie rezultāti apkopoti 1.1. – 1.13. tabulā, 1. pielikumā.

Pēc 3.9. attēla redzams, ka visstraujāk LGO degradācija noris, ja standartviela tiek šķīdināta un uzglabāta ūdenī, kas ir polārs protondonors šķīdinātājs. LGO relatīvā daudzuma samazinājums diennaktī, ja kā šķīdinātājs tiek izmantots ūdens, ir 4,66 %. Ja tiek izmantots polārs aprotons šķīdinātājs kā acetons vai acetonitrils un šķīdums tiek uzglabāts ledusskapī (4 ± 3 °C), LGO degradācija noris ļoti lēni. LGO relatīvā daudzuma samazinājums diennaktī acetnitrilā ir 0,21 %, bet acetonā 0,18 %. Izmantojot šos pašus šķīdinātājus, bet uzglabājot tos 21 °C temperatūrā, novēro lēnu LGO degradāciju. Attiecīgi acetnitrilā relatīvā daudzuma samazinājums diennaktī ir 0,40 %, bet acetonā 0,63 %. Izmantojot ūdens/acetnitrila (50:50

(v/v)) vai ūdens/acetona maisījumu (50:50 (v/v)), LGO degradācija noris jau ievērojami straujāk nekā, ja tiek izmantots 100 % ACN vai acetons. Attiecīgi 4 °C temperatūrā ūdens/acetona (50:50 (v/v)) vidē LGO relatīvā daudzuma samazinājums diennaktī ir 1,5 %; ūdens/acetonitrila (50:50 (v/v)) vidē ir 1,7 %, bet 21 °C temperatūrā ūdens/acetona (50:50 (v/v)) vidē - 3,5 %, bet ūdens/acetonitrila (50:50 (v/v)) vidē ir 4,19 %. Līdz ar to var secināt, ka degradācijas ātrumu būtiski ietekmē ūdens klātbūtne; šķīdumā esošie -OH joni paātrina LGO degradāciju, noris hidrolīze. Arī temperatūrai ir būtiska ietekme degradācijas ātruma palielināšanā: istabas temperatūrā (21 ± 3 °C) LGO degradējas straujāk nekā 4 °C.

Ja LGO standartviela tiek šķīdināta ūdenī/acetonitrilā (50:50 (v/v)) un ar skudrskābes šķīdumu tiek radīta skāba vide (pH = 2,10), 4 °C temperatūrā LGO relatīvā daudzuma samazinājums diennaktī ir 1,2 %, bet 21 °C temperatūrā – 2,3 %. Tātad skāba vide papildus neveicina LGO degradāciju.

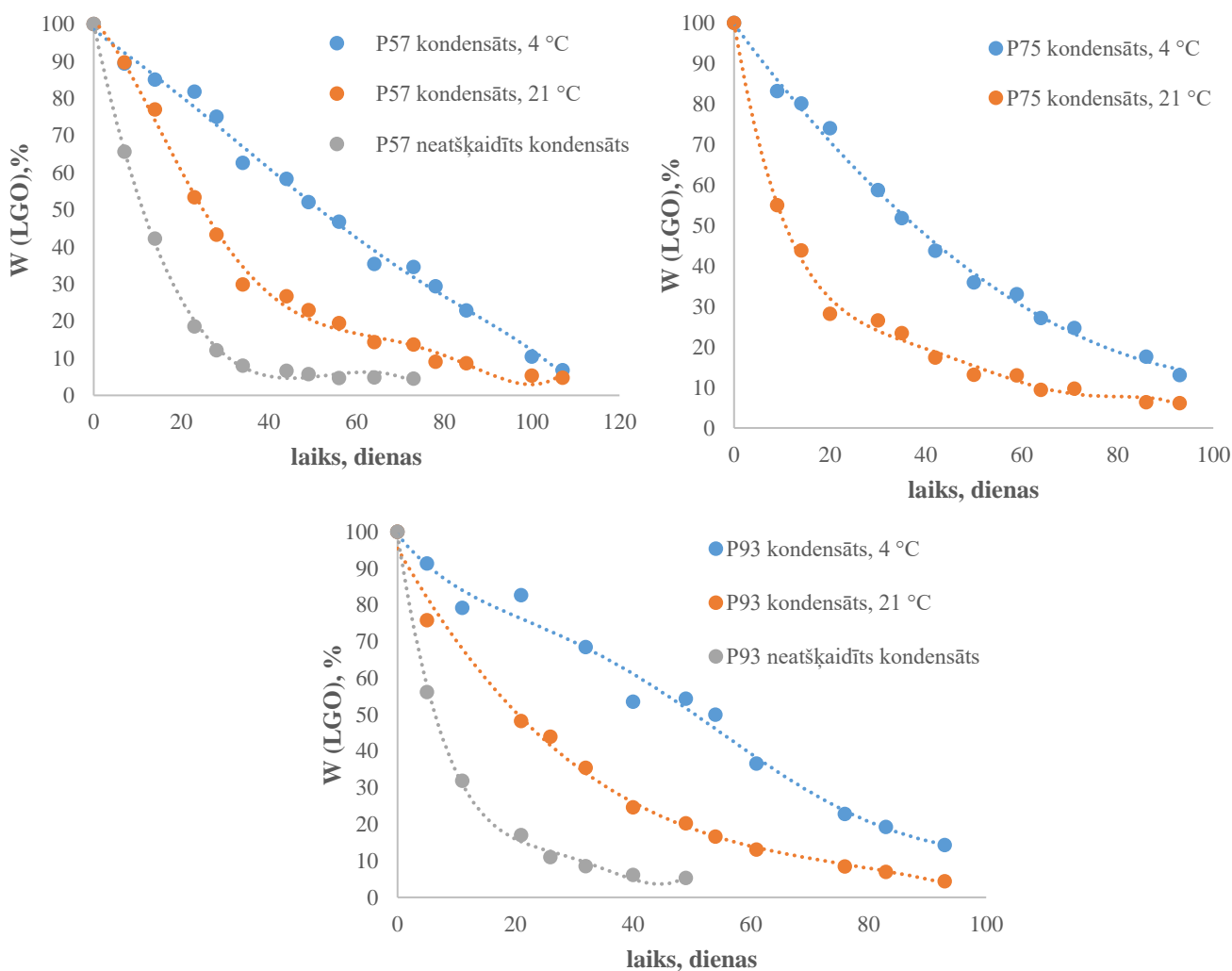
Bāziskā vidē (pH = 9,30) LGO degradācijas relatīvā daudzuma samazinājumu diennaktī nebija iespējams aprēķināt, jo pēc pirmās dienas hromatogrāfijas datiem LGO bija pilnībā degradējies. Var uzskatīt, ka šādos apstākļos LGO degradējas mazāk nekā stundas laikā.



3.9. att. Levoglikozenona standartvielas relatīvā daudzuma izmaiņas laika gaitā (w(LGO), % = f(laikā))

Pēc standartvielas degradācijas eksperimentiem tika veikts arī pirolīzes kondensātu, to ekstraktu un ūdens atlikumu (ūdens slāņu) stabilitātes pētījums (1.14. – 1.18; 1.23. – 1.25. tabula, 1. pielikumā aprēķinātie dati kondensātu paraugiem). Darba 2.4. nodaļā uzskaitīti izvēlētie paraugi. Pēc 3.10. attēla redzams, ka visstraujāk LGO degradējas neatšķaidītajā

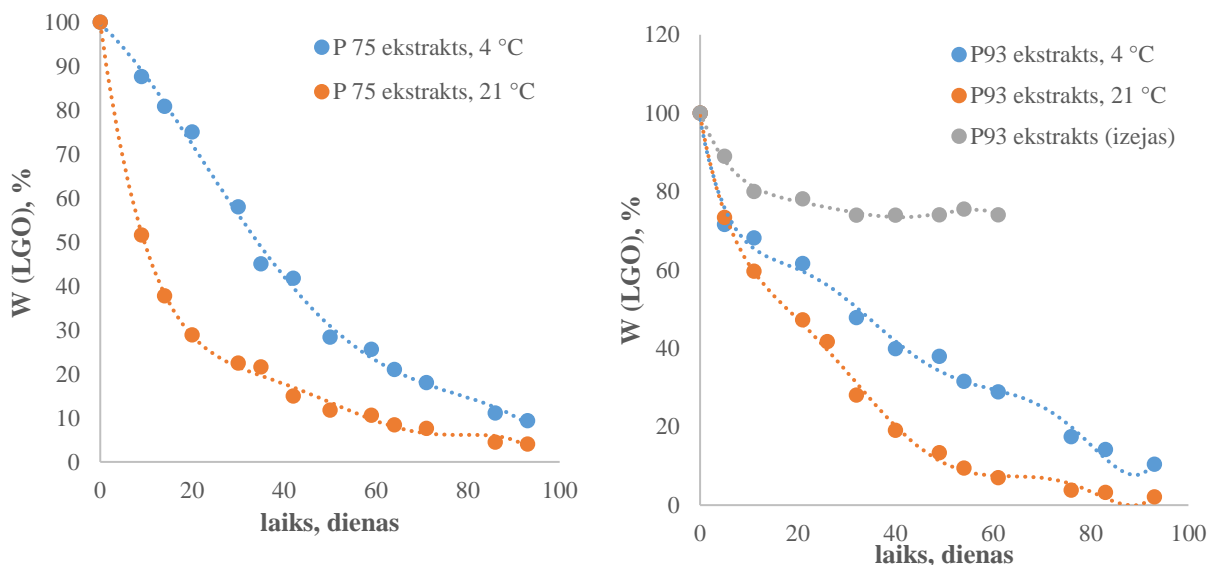
kondensātā, kurš tiek atšķaidīts tikai pirms hromatogrāfiskās analīzes. Neatšķaidītā kondensātā P57 LGO relatīvā daudzuma samazinājums diennaktī ir 2,7 %; P93 ir 4,2 %. Tas skaidrojams ar kondensātā jau esošo ūdeni, kas radies no skaidu impregnēšanas ar skābes šķīdumu. Kā arī neatšķaidītā kondensātā ir vislielākā LGO koncentrācija; un reakcijas ātrums ir tieši atkarīgs no vielas koncentrācijas. Atšķaidītajiem kondensātiem degradācijas ātrumu ietekmē uzglabāšanas temperatūra – visstraujāk noris istabas temperatūrā (21 °C). Attiecīgi istabas temperatūrā kondensātā P57 LGO degradējas diennaktī par 1,5 %, P75 – par 2,3 %, bet P93 – par 1,9 %. Kondensātiem, kas uzglabāti 4 °C temperatūrā, LGO diennaktī degradējas lēnāk, attiecīgi P57 – par 0,93 %, bet P75 – par 1,3 %; P93 – par 1,1 %.



3.10. att. Levoglikozenona degradācijas kinētikas līknes ātrās pirolīzes kondensātu paraugos – P57, P75 un P93 ($W(LGO), \% = f(\text{laikā})$)

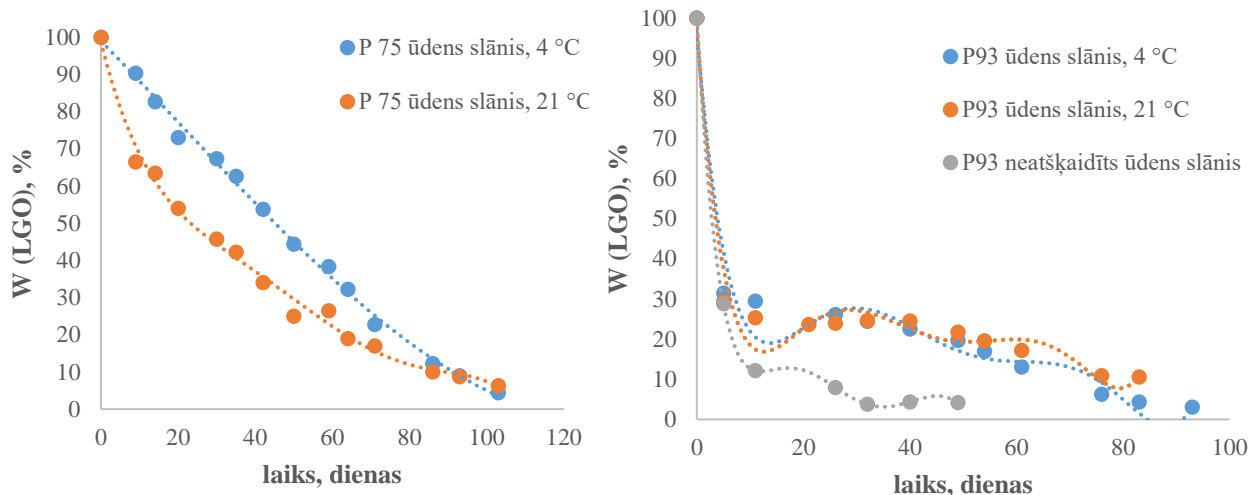
No kondensātiem ar hloroformu tika iegūti ekstrakti un veikti to stabilitātes eksperimenti (1. pielikumā 1.19. – 1.20; 1.26. – 1.28. tabula). Analizējot kondensātu ekstraktus (3.11. attēls), secināts, ka vislēnāk degradācija noris neatšķaidītā ekstraktā, attiecīgi neatšķaidītā ekstraktā P93 LGO relatīvā daudzuma samazinājums diennaktī ir 1,4 %.

Neatšķaidītā ekstraktā nav ūdens (papildus -OH jonu), kas varētu veicināt LGO degradāciju. Līdzīgi kā kondensātiem arī ekstraktos, kas uzglabāti istabas temperatūrā (21 °C), LGO sadalās straujāk. Ekstraktā P75 LGO diennaktī degradējas par 2,4 %; P93 – par 1,9 %.



3.11.att. Levoglikozenona degradācijas kinētikas līknes ātrās pirolīzes ekstraktu paraugos – P75 un P93 ($W(LGO), \% = f(\text{laikā})$)

Pēc ātrās pirolīzes kondensātu ekstrahēšanas ar hloroformu iegūtie ūdens atlikumi (tālāk tekstā, tabulās un attēlos ūdens slāņi) arī tika analizēti (1. pielikumā 1.21. – 1.22; 1.29. – 1.31. tabula). Pēc 3.12. attēla secināms, ka LGO degradācija strauji noris neatšķaidītā paraugā – jau pēc dažām dienām novēro strauju LGO relatīvā daudzuma kritumu. Neatšķaidītā ūdens slāņa paraugā P93 LGO dienā degradējas par 5,5 %. Skaidrojums līdzīgs kā neatšķaidītu kondensātu gadījumā. Ūdens slāņu gadījumā temperatūrai nav tik izteikta nozīme LGO degradācijas ātruma palielināšanā, kā tas bija kondensātu un ekstraktu gadījumā. Ūdens slāņa paraugam P75, kurš uzglabāts 4 °C temperatūrā, LGO degradējas diennaktī par 1,1 %, bet 21 °C temperatūrā par 1,7 %. Taču ūdens slāņa paraugam P93, kas uzglabāts 4 °C temperatūrā, LGO relatīvā daudzuma samazinājums diennaktī ir 3,2 %, bet 21 °C temperatūrā ir 3,3 %. Šiem paraugiem LGO degradāciju būtiski ietekmē palielinātā ūdens klātbūtne.



3.12. att. Levoglikozenona degradācijas kinētikas līknes ātrās pirolīzes kondensātu ekstrahcijā iegūto ūdens atlikumu (ūdens slāņu) paraugos – P75 un P93 ($W(LGO), \% = f(\text{laikā})$)

3.3. Levoglikozenona degradācijas kinētikas parametru noteikšanas rezultāti

Farmaceutiskajiem preparātiem ķīmisko stabilitāti nosaka ūdens šķīdumos. Kā jau literatūras apskatā 1.4. nodaļā minēts, lielākajai daļai no šo farmaceutiski aktīvo vielu degradācijas kinētiku apraksta pirmās kārtas ātruma konstantes vienādojums (3.1. vienādojums), jo noris reakcija ar ūdeni ūdens šķīdumā, līdz ar to var pieņemt, ka ūdens koncentrācija laika gaitā nemainās, ir konstanta. LGO degradācijas kinētikas ātruma konstantes rēķinātas tikai standartšķīdumiem, ne ātrās pirolīzes produktiem – kondensātiem, to ekstraktiem un ūdens slāņiem, jo paraugos esošie citi komponenti var ietekmēt levoglikozenona degradācijas gaitu un līdz ar to arī kinētiku.

$$-\frac{dC}{dt} = k[LGO], \text{ kur} \quad (3.1.)$$

[LGO] – pētāmās vielas koncentrācija, mmol/L

t – laiks, dienas.

k – ātruma konstante, 1/dienas.

dC/dt – ātrums, ar kādu vielas koncentrācija samazinās

Darbā LGO degradācijas ātruma konstantes tika noteiktas standartvielas ūdens šķīdumiem divās temperatūrās, kur attiecīgi LGO šķīdināts ūdenī (4 °C), ūdenī/acetona (4 un 21 °C) un ūdenī/ACN (4 un 21 °C). No ūdens/ACN standartšķīduma tika pagatavoti 5 atšķaidījumi ar sekojošām šķīdumu masas koncentrācijām (3.4. tabula un 1.1. – 1.4. tabulas, 1. pielikumā) un katram noteikta degradācijas ātruma konstante.

LGO standartšķīduma atšķaidījumu precīzās masas koncentrācijas

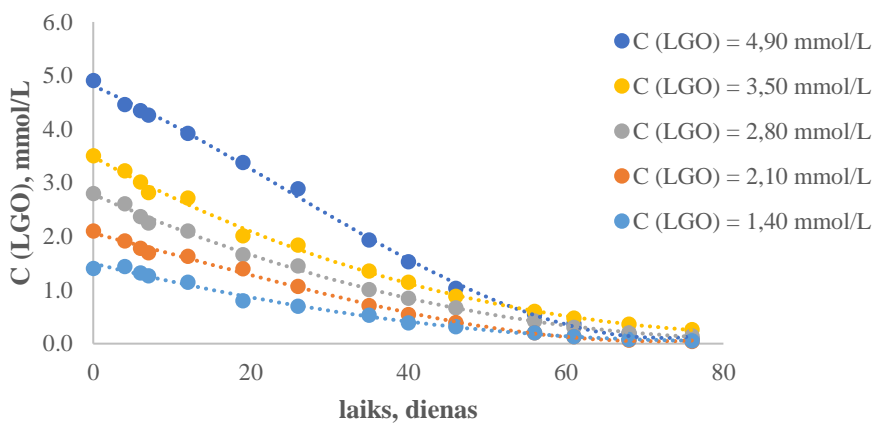
Atšķaidījums	Šķīdinātājs	γ (šķīd.), mg/mL	Uzglabāšanas temperatūra, °C
1.	ACN/H ₂ O	0,227	4
2.		0,341	
3.		0,454	
4.		0,568	
5.		0,795	
1.		0,103	21
2.		0,207	
3.		0,310	
4.		0,414	
5.		0,517	

No sākotnējās šķīduma masas koncentrācijas tika aprēķināta LGO sākotnējā molārā koncentrācija (2.9. vienādojums).

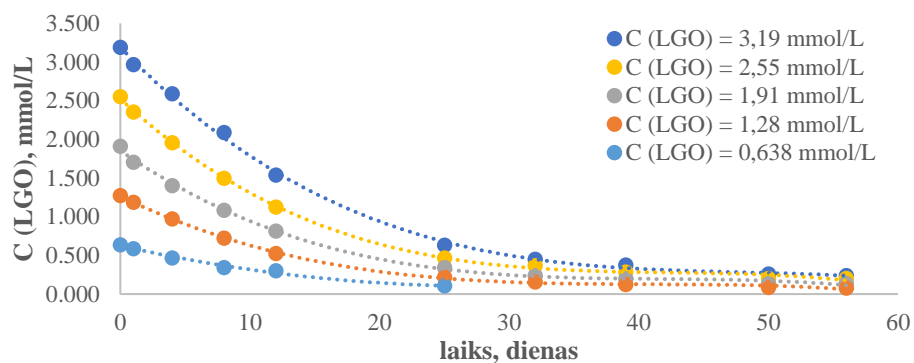
Pēc iepriekš aprēķinātā procentuālā LGO relatīvā daudzuma laika vienībā (2.7. vienādojums) aprēķināja LGO molārās koncentrācijas samazinājumu katrā laika vienībā (2.10. vienādojums).

Aprēķinātie dati attēloti 1. pielikumā 1.1. – 1.7. tabulā.

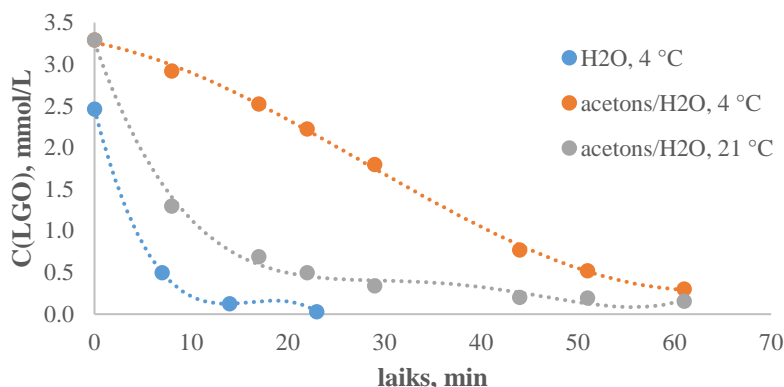
Pēc LGO molārās koncentrācijas samazinājuma tika konstruētas kinētikas līknes ($C_{(LGO),samaz} = f(\text{laikā})$) ūdens standartšķīdumiem (3.13. – 3.15. attēls).



3.13.att. Levoglikozenona molārās koncentrācijas samazinājums laika vienībā katrā no atšķaidījumiem, kas šķīdināti ūdenī/ACN (50:50 (v/v)) un uzglabāti 4 °C temperatūrā

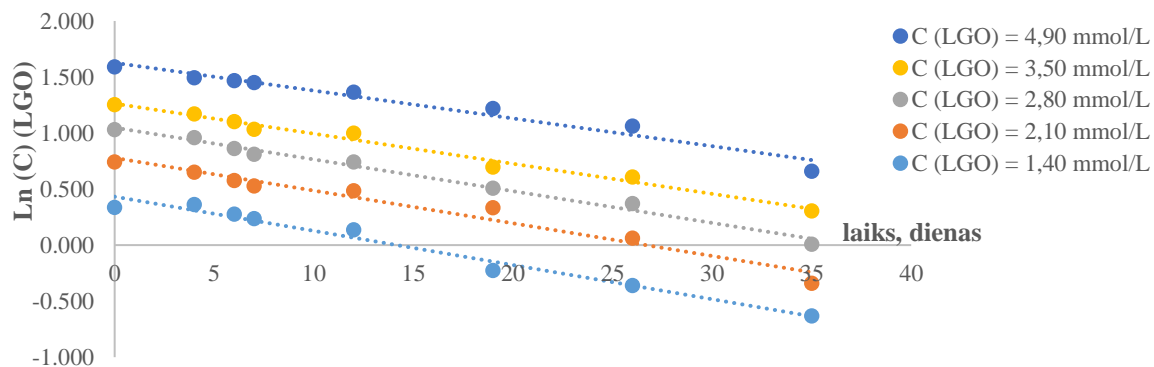


3.14.att. Levoglikozenona molārās koncentrācijas samazinājums laika vienībā katrā no atšķaidījumiem, kas šķīdināti ūdenī/ACN (50:50 (v/v)) un uzglabāti 21 °C temperatūrā

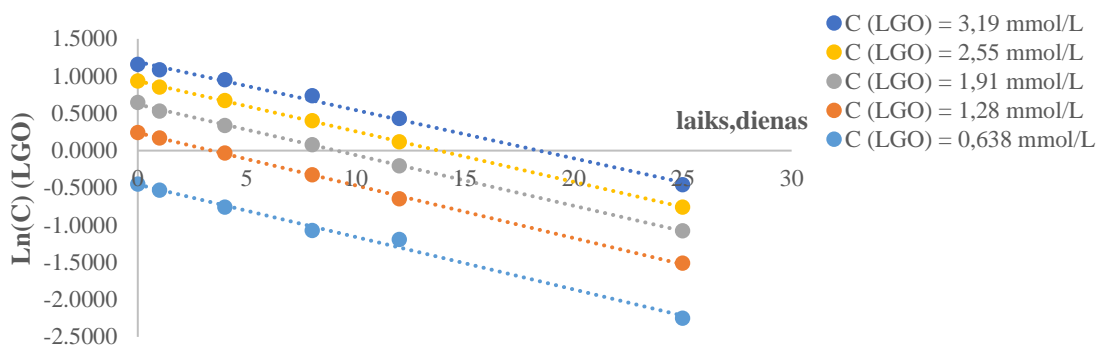


3.15.att. Levoglikozenona molārās koncentrācijas samazinājums laika vienībā ūdenī (4 °C) un ūdenī/acetona (50:50 (v/v)), kas uzglabāti 4 un 21 °C temperatūrā

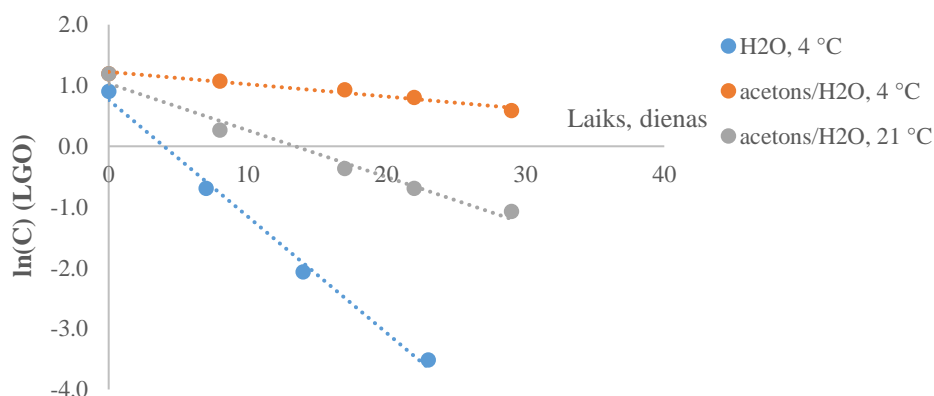
Lai noteiktu LGO degradācijas kinētikas ātruma konstanti, tika konstruētas līknes, kur atlikta LGO molārās koncentrācijas naturāllogaritma ($\ln(c)$ (LGO)) atkarība no laika (3.16. – 3.18. attēls). Kinētiskās līknes konstruētas un aprēķini veikti apgabalā, kur novērojama LGO koncentrācijas samazināšanās; atlikušās dienas, kad LGO molārā koncentrācija praktiski vairs nemainās, nav ņemtas vērā.



3.16.att. Levoglikozenona molārās koncentrācijas naturāllogaritma samazinājums laika vienībā katrā no atšķaidījumiem, kas šķīdināti ūdenī/ACN (50:50 (v/v)) un uzglabāti 4 °C temperatūrā



3.17.att. Levoglukozenona molārās koncentrācijas naturāllogaritma samazinājums laika vienībā katrā no atšķaidījumiem, kas šķīdināti ūdenī/ACN un uzglabāti 21 °C temperatūrā



3.18.att. Levoglukozenona molārās koncentrācijas naturāllogaritma samazinājums laika vienībā ūdenī (4 °C) un ūdenī/acetona (50:50 (v/v)), kas uzglabāti 4 un 21 °C temperatūrā

Pēc katras līknes taisnes vienādojuma (3.1. vienādojums) tika noteiktas reakcijas ātruma konstantes (3.5. un 3.6. tabulas).

3.5.tabula

Reakcijas ātruma konstantes 4 un 21 °C temperatūrā LGO standartšķīdumam ūdens/ACN maisījumā

γ (šķīd), mg/mL	Uzglabāšanas temperatūra, °C	k, 1/dienas
0,227	4 ± 3	0,031±0,002
0,341		0,029±0,002
0,454		0,0283±0,0013
0,568		0,0268±0,0013
0,795		0,025±0,002
AVG k, 1/dienas		0,028±0,002
0,103	21 ± 3	0,070±0,003
0,207		0,0706±0,0010
0,310		0,0680±0,0009
0,414		0,0677±0,0004
0,517		0,065±0,002
AVG k, 1/dienas		0,068±0,002

Reakcijas ātruma konstantes 4 un 21 °C temperatūrā levoglukozenona standartšķīdumam ūdenī un ūdens/acetona maisījumā

γ (šķīd), mg/mL	Šķīdinātājs	Uzglabāšanas temperatūra, °C	k, 1/dienas
0,399	Ūdens	4 ± 3	0,191±0,011
0,534	Ūdens/acetons	4 ± 3	0,020±0,002
		21 ± 3	0,077±0,007

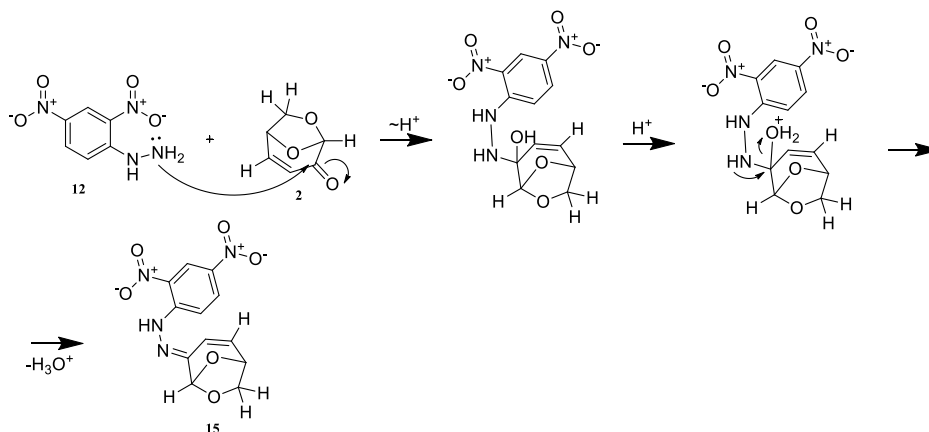
3.4. Levoglukozenona noteikšanas metodes izstrādes un analītisko parametru noteikšanas rezultāti, veicot derivatizāciju ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu

Levoglukozenona derivatizācija tika veikta, balstoties uz adaptētu ketonu un aldehīdu noteikšanas standartmetodi [37]. Par šķīdinātāju tika izvēlēts acetonitrils, jo pēc LGO stabilitātes pētījuma tika secināts, ka acetonitrilā LGO degradācijas kinētikas ātruma konstante ir vismazākā, līdz ar to LGO degradācijas produkti neietekmēja derivatizācijas gaitu.

Metodes optimizācijas laikā sākotnēji tika pārbaudīta reaģentu pievienošanas secības, izejvielas un reaģentu daudzuma attiecības ietekme uz LGO derivatizāciju:

- 1) LGO + DNPH + FA (1:1:0,5)
- 2) LGO + FA + DNPH (1:0,5:1)
- 3) LGO + FA + DNPH (1:1:1)

Tika secināts, ka reaģentu pievienošanas secībai nav būtiskas nozīmes, pat ja LGO sākotnēji reaģē ar DNPH, derivatizācija (vispār ketonu un aldehīdu derivatizācija ar DNPH) var notikt tikai skābā vidē. Lai reakcija notiktu līdz galam un viss LGO būtu izreaģējis, nepieciešams pievienot skābi lielā pārākumā (koncentrēta skudrskābe). Tādēļ tika izvēlēta 3. reaģentu pievienošanas secība un daudzumu attiecība. LGO derivatizācijas reakcija ar DNPH noris pēc sekojošas shēmas (3.19. attēls).



3.19.att. Levoglukozenona derivatizācijas reakcijas shēma (2 – LGO, 12 – DNPH, 15 – LGO atvasinājums)

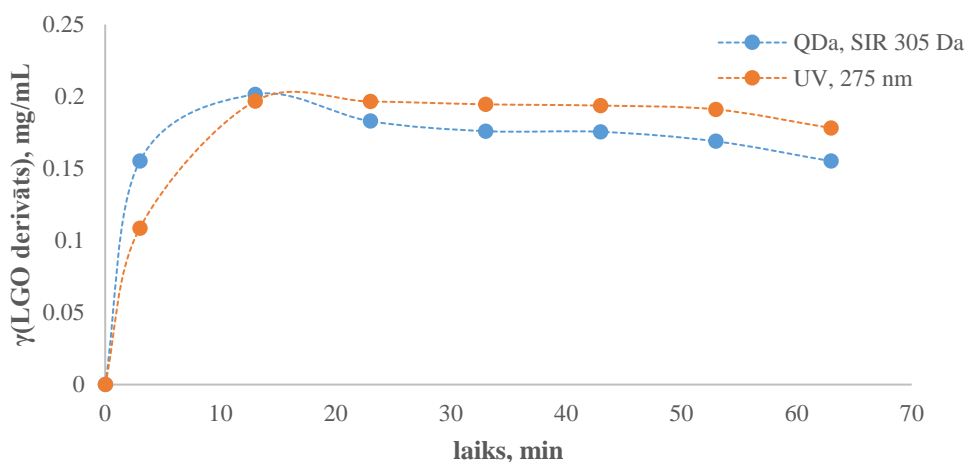
Pēc standartmetodes [37] derivatizāciju ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu veic 40 °C temperatūrā. Tika pārbaudīta reakcijas norises gaita 5; 20; 40; 60 °C temperatūrā, salīdzināts LGO derivāta joslas laukums (QDa, SIR 305 Da režīmā) katrā temperatūrā (3.7. tabula). Pēc iegūtajiem datiem secināts, ka 5 °C temperatūrā LGO derivāta joslas laukums ir vislielākais, līdz ar to šī temperatūra ir optimālākā.

3.7.tabula

Levoglikozenona derivāta joslas laukums atkarībā no reakcijas temperatūras

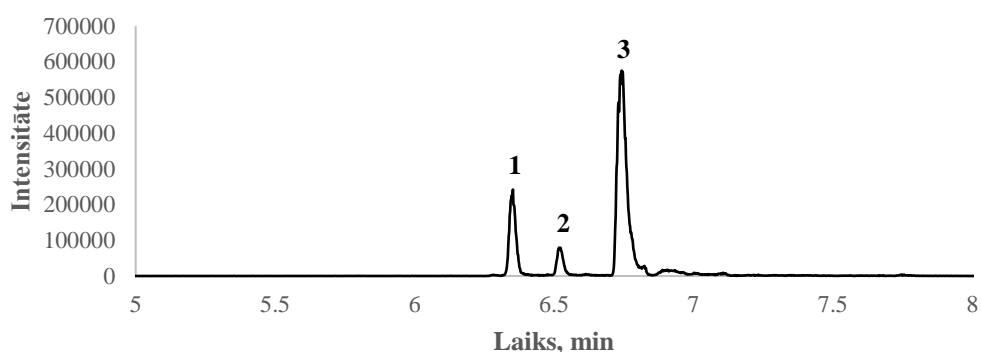
Temperatūra, °C	LGO derivāta joslas laukums, Intensitāte-s
5	1617613
	1609512
	1599874
20	1495032
	1493023
	1490417
40	1437158
	1436254
	1434521
60	1154327
	1153241
	1154217

Pēc tam, kad tika izvēlēta optimālākā reakcijas temperatūra, tika veikti kinētikas mērījumi, lai noteiktu optimālu reakcijas laiku. Tika ņemts vērā arī laiks, kāds nepieciešams hromatogrāfam, lai analizējamo šķīdumu ievadītu sistēmā un sāktos analīze (noteikts, ka tās ir 3 minūtes). Pēc iegūtajiem datiem (2. pielikumā 2.2. tabula un 3.20. attēls) secināts, ka LGO derivatizācijas reakcijas optimālais ilgums ir 10 minūtes.



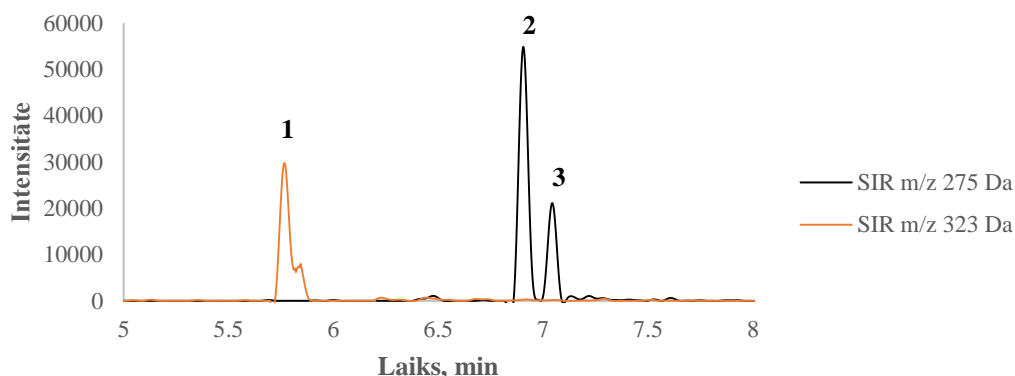
3.20. att. Levoglikozenona derivatizācijas reakcijas kinētikas dati (LGO derivāta masas koncentrācijas izmaiņa laikā)

Hromatogrāfiskās analīzes tika veiktas, izmantojot *CSH C18 Phenyl-Hexyl* kolonnu. Tā kā 2,4-dinitrofenilhidrazīnam un LGO derivātam piemīt izteikta UV absorbcija, analīzes tika veiktas arī ar diožu matricas detektoru (UV), ne tikai kvadrupola masspektrometru (QDa). Ar abiem detektoriem tika veikta metodes analītisko parametru noteikšana; ar UV detektoru pie 275 nm, bet ar QDa detektoru ESI režīmā pie izdalītā jona ar m/z vērtību 305 Da, kas atbilst LGO derivāta teorētiskajai masai $[M(\text{LGO-DNPH})\text{-H}]^-$ (3.21. attēls). Tika izvēlēts negatīvs elektroizsmidzināšanas režīms, kurā novēroja labāku LGO derivāta jonizāciju. 3.21. attēlā joslas nr. 1. un 2. veidojas no 2,4-dinitrofenilhidrazīna reaģenta derivatizācijas apstākļos. Šīs joslas novēro tukšajā paraugā.



3.21.att. UHPLC-QDa izdalītā jona (SIR) hromatogramma (m/z 305 Da) LGO standartšķīdumam acetonitrilā (1 un 2 – no DNPH; 3 – LGO atvasinājums $t_R = 6,74$ min)

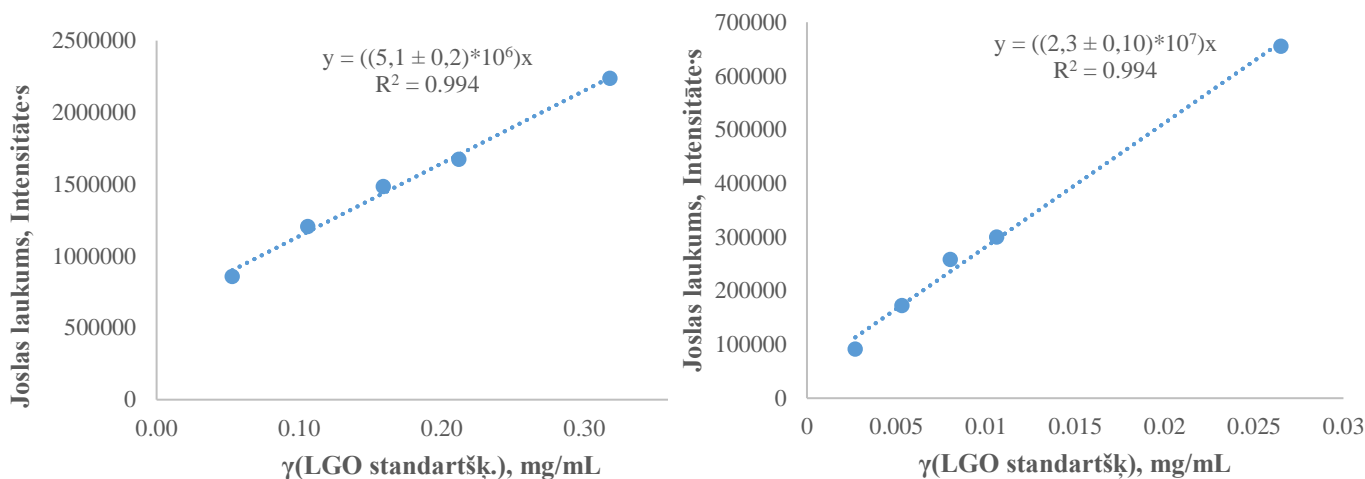
Tāpat novēro arī LGO degradācijas produktu (furfurola un hidroksilevoglikozēna) jonizāciju. Furfurolam novēro jonu ar m/z vērtību 275 Da, kas atbilst furfurola derivāta masai $[M(\text{Furfural-DNPH})\text{-H}]^-$, bet hidroksilevoglikozēnam novēro jonu ar m/z vērtību 323 Da, kas atbilst hidroksilevoglikozēna derivāta masai $[M(\text{Hidroksi-LGO-DNPH})\text{-H}]^-$ (3.22. attēls).



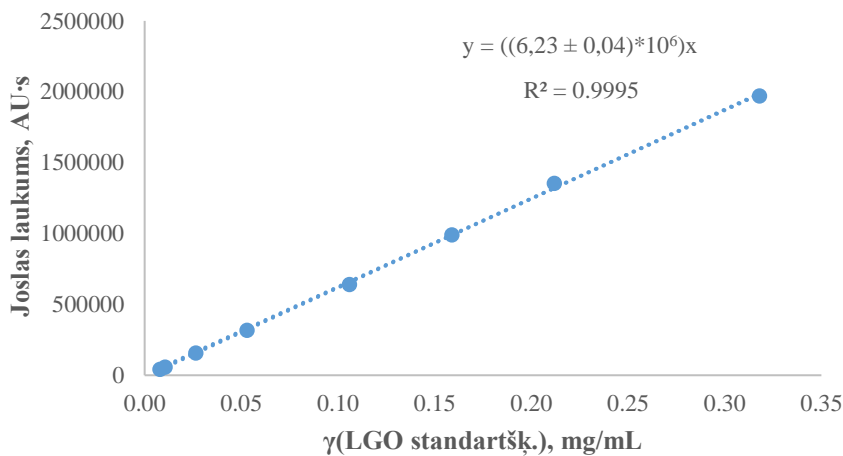
3.22.att. UHPLC-QDa izdalītā jona (SIR) hromatogrammas ātrās pirolīzes kondensāta paraugā, kas šķīdināts acetonitrilā (1 – hidroksilevoglikozēna atvasinājums $t_R = 5,77$ min; 2 un 3 – furfurola derivāta stereoizomēri $t_R = 6,91$ un $7,05$ min)

Linearitāte

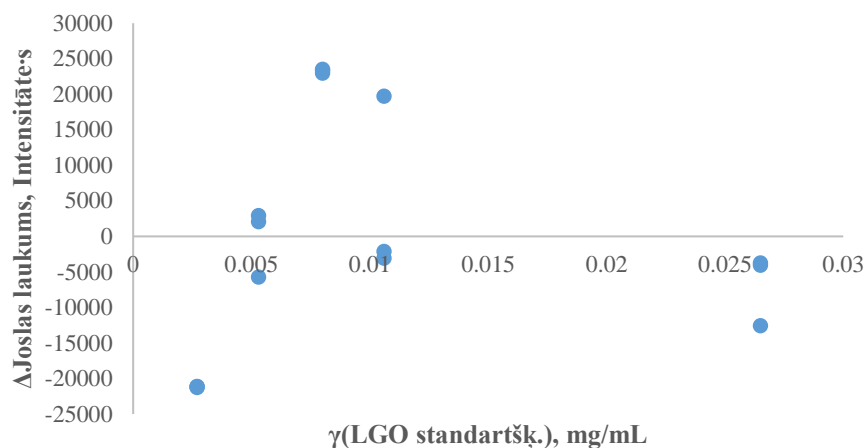
Tika pagatavoti LGO standartšķīdumi acetonitrilā diapazonā 1,25 – 150 % no iespējamā levoglukozenona satura ātrās pirolīzes kondensāta paraugā. Katrs atšķaidījums tika analizēts, izmantojot UHPLC-MS sistēmu jauktā secībā ar trim atkārtotām injekcijām. Ar kvadrupola maspektrometru iegūti divi lineāri koncentrāciju diapazoni. Iegūtie dati apkopoti 2. pielikumā 2.3. tabulā un 3.23., 3.24. attēlā.



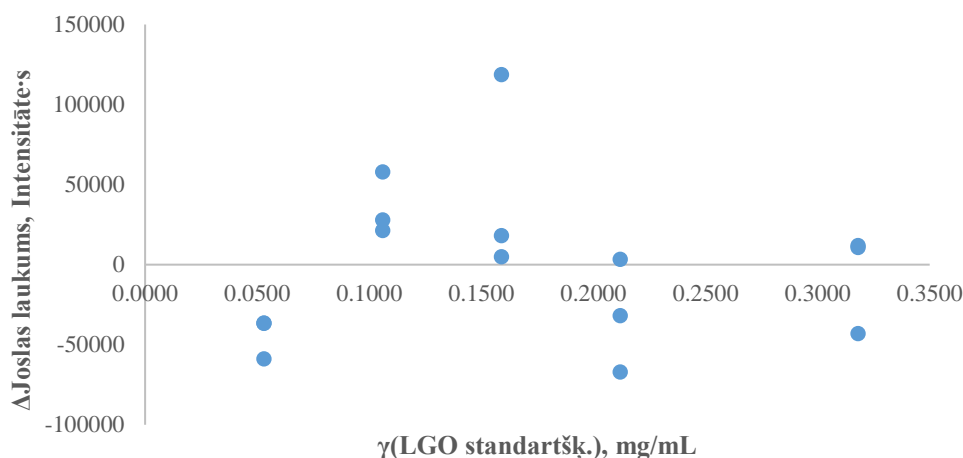
3.23. att. Levoglukozenona derivāta kalibrēšanas grafiki (pa labi – mazo koncentrāciju diapazonā; pa kreisi – lielo koncentrāciju diapazonā) (QDa, SIR 305 Da)



3.24. att. Levoglukozenona derivāta kalibrēšanas grafiks (UV, 275 nm)



3.25.att. Regresijas atlikuma diagramma mazo koncentrāciju diapazonā



3.26.att. Regresijas atlikuma diagramma lielo koncentrāciju diapazonā

Pēc regresijas atlikuma diagrammām (3.25. un 3.26. attēls) redzams, ka LGO kalibrēšanas grafiks abos koncentrāciju diapazonos (no 0,00265 līdz 0,0265 mg/mL; no 0,0530 līdz 0,318 mg/mL) pakļaujas lineārai sakarībai un ir homoskedastisks.

Kvantificēšanas un detektēšanas robežu noteikšana

Kvantificēšanas un detektēšanas robežu vērtības tika aprēķinātas pēc 2.3. nodaļā aprakstītās metodikas un aprēķinu formulām. Aprēķinu veikšanai nepieciešamie dati doti 3.8. tabulā. Kvantificēšanas un detektēšanas robežu vērtības ar QDa detektoru noteiktas mazo koncentrāciju diapazonā:

$$\text{LOD} = 0,0007 \text{ mg/mL}$$

$$\text{LOQ} = 0,002 \text{ mg/mL}$$

Ar UV detektoru noteikts, ka kvantificēšanas un detektēšanas robežu vērtības ir sekojošas:

$$\text{LOD} = 0,008 \text{ mg/mL}$$

$$\text{LOQ} = 0,02 \text{ mg/mL}$$

Kvantificēšanas un detektēšanas robežu vērtību noteikšanas dati

	Atšķ. Nr.	γ (LGO standartšķ.), mg/mL	Sn joslas laukumam, Intensitāte-s	Rel Sn %	Sn joslas laukumam, Intensitāte-s	Rel Sn %
Mazo koncentrāciju diapazons	1.	0,00265	83	0,09	673	5
	2.	0,00530	4778	3	1172	4
	3.	0,00795	281	0,11	3960	9
	4.	0,0106	12902	4	1027	2
	5.	0,0265	5004	0,8	4537	3
AVG Sn joslas laukumiem, Intensitāte-s			4609		15261	
Lielo koncentrāciju diapazons	6.	0,0530	12894	2	10135	3
	7.	0,106	19519	2	19956	3
	8.	0,159	62190	4	28226	3
	9.	0,212	35143	2	29298	2
	10.	0,318	31399	1,4	53630	3

Atgūstamība

Atgūstamības pārbaude tika veikta ar ātrās pirolīzes kondensāta paraugu, ko pagatavoja acetonitrilā ar masas koncentrāciju 0,5 mg/mL. Lai izvērtētu matricas ietekmi uz LGO derivatizācijas gaitu, parauga šķīdums tika atšķaidīts ar acetonitrilu 4 un 10 reizes.

Katrs šķīdums (ātrās pirolīzes kondensāta paraugs bez piedevas un ar LGO standartpiedevu) tika analizēts, izmantojot UHPLC-MS sistēmu jauktā secībā ar trim atkārtotām injekcijām.

Teorētiskā LGO masas koncentrācija tika aprēķināta pēc formulas 2.3.

Atgūstamība tika aprēķināta pēc formulas 2.4.

LGO atgūstamība pēc masspektrometra datiem dota 3.9. tabulā, bet pēc diožu matricas detektora dota 3.10. tabulā.

Levoglikozenona atgūstamības dati pēc kvadrupola masspektrometra rezultātiem

Ātrās pirolīzes kondensāta parauga atšķaidījums, reizes	Joslas laukums, Intensitāte-s	γ (LGO kal.), mg/mL	γ (LGO teor.), mg/mL	Atgūstamība, %	AVG atgūstamībai \pm Sn, %
4	812978	0,0371	0,0542	69	66 \pm 3
	811399	0,0368		68	
	797168	0,0341		63	
10	502320	0,0193	0,0243	79	76 \pm 3
	484220	0,0185		76	
	473347	0,0180		74	

Aprēķinātā atgūstamība pēc masspektrometra datiem abiem atšķaidījumiem ir zema (zem 80%), taču, veicot parauga atšķaidīšanu, atgūstamība uzlabojas. Tas skaidrojams ar

iespējamiem matricas traucējumiem, kas izdalās no kolonnas kopā ar LGO derivātu un traucē tā jonizāciju.

3.10.tabula

Levoglikozenona atgūstamības dati pēc diožu matricas detektora rezultātiem

Ātrās pirolīzes kondensāta parauga atšķaidījums, reizes	Joslas laukums, AU-s	γ (LGO kal.), mg/mL	γ (LGO teor.), mg/mL	Atgūstamība, %	AVG atgūstamībai \pm Sn, %
4	313670	0,0512	0,0542	94.5	95,0 \pm 0,5
	316820	0,0517		95.4	
	315566	0,0515		95.1	
10	112043	0,0192	0,0243	79	82 \pm 4
	124399	0,0212		87	
	113201	0,0194		80	

Atkārtojamība

Sistēmas precizitāte tika noteikta, veicot LGO standartšķīdumu (ar masas koncentrāciju 0,15 un 0,01 mg/mL) sešas atkārtotas injekcijas. Metodes precizitāte tika noteikta ātrās pirolīzes kondensāta paraugam, no kura pagatavoti seši atsevišķi atšķaidījumi acetonitrilā ar masas koncentrāciju 0,05 mg/mL.

Atkārtojamība noteikta, aprēķinot joslu relatīvo standartnovirzi pēc 2.5. formulas.

Aprēķinātās atkārtojamības pēc masspektrometra datiem dotas 3.11. tabulā, bet pēc diožu matricas detektora datiem dotas 3.12. tabulā.

3.11.tabula

Atkārtojamības rezultāti pēc kvadrupola masspektrometra datiem

	γ (šķīd.), mg/mL	Joslas laukums, Intensitāte-s	Sn joslas laukumam, Intensitāte-s	AVG joslas laukumam, Intensitāte-s	Atkārtojamība, %
LGO standartšķīdums (sistēmas precizitāte)	0,159	1468097	42639	1467198	3
		1491786			
		1439515			
		1514737			
		1491595			
		1397458			
LGO standartšķīdums (sistēmas precizitāte)	0,0106	865253	52534	767217	4
		778659			
		751641			
		758587			
		731814			
		717348			
Ātrās pirolīzes kondensāta paraugs (metodes precizitāte)	0,0529	481222	15288	486477	3
		493171			
		507830			
		483644			
		466516			
		481222			

Atkārtojamības rezultāti pēc diožu matricas detektora datiem

	γ (šķīd.), mg/mL	Joslas laukums, AU·s	AVG joslas laukumam, AU·s	Sn joslas laukumam, AU·s	Atkārtojamība, %
LGO standartšķīdums (sistēmas precizitāte)	0,159	960224	981603	27475	3
		1009943			
		1010764			
		996181			
		965365			
		947140			
LGO standartšķīdums (sistēmas precizitāte)	0,0106	259597	251489	8003	3
		256155			
		259227			
		248590			
		244833			
		240529			
Ātrās pirolīzes kondensāta paraugs (metodes precizitāte)	0,0529	125512	125326	4544	4
		132789			
		123352			
		124340			
		120635			
		125512			

3.5. Optimizēto levoglukozenona noteikšanas metožu salīdzinājums

Maģistra darbā izstrādātā levoglukozenona noteikšanas metode, izmantojot UHPLC-UV sistēmu, ir vienkārša un ātra metode, kur nav nepieciešams veikt ātrās pirolīzes kondensāta priekšapstrādi hromatogrāfiskai analīzei. Pēc metodes parametriem (3.13., 3.14. tabula) redzams, ka tā sniedz pareizus un ticamus rezultātus. Tā kā analizējamais paraugs (biomasas ātrās pirolīzes produkti) satur dažādus iespējamus traucējošos faktoros, ir būtiski iegūtos rezultātus salīdzināt savstarpēji starp divām neatkarīgām metodēm. No biomasas iegūtu produktu noteikšanas metodēm nav izvirzītas konkrētas validācijas vadlīnijas, kas aprakstītu, kādiem ir jābūt metodes analītiskajiem parametriem. Tā kā analizētā matrica (ātrās pirolīzes kondensāts) ir komplicēta, tad izveidoto metožu analītiskie parametri tika noteikti pēc pesticīdu atlieku noteikšanas metožu validācijas vadlīnijām (SANTE/SANCO), kur izvirzītie kritēriji ir plašākā diapazonā kā farmaceitisko preparātu noteikšanas metožu validācijā. Darbā izveidoto metožu analītisko parametru atbilstība izvirzītajiem kritērijiem apkopota 3.14. tabulā. Pēc UHPLC-MS metodes parametriem, kur veikta LGO derivatizācija, redzams, ka tās atgūstamība ir zema, taču tā palielinās, ja tiek veikta parauga atšķaidīšana. Līdz ar to var secināt, ka kāds no paraugā esošiem traucējošiem komponentiem hromatogrāfiski izdalās reizē ar LGO derivātu un

nomāc tā jonizāciju (jonu supresija). Izmantojot UV detektoru, atgūstamība ir optimāla un metodi var izmantot LGO kvantitatīvai noteikšanai ātrās pirolīzes produktos. Kvantificēšanas robežvērtība visās izstrādātajās metodēs ir pietiekama, lai noteiktu LGO ruftinas paraugos, jo metožu jutība ir par vairāk kā 100 reizēm lielāka nekā reālā ātrās pirolīzes kondensāta paraugā esošā LGO koncentrācija. Galvenie trūkumi LGO noteikšanai, izmantojot UHPLC-MS sistēmu, ir paaugstinātās metodes izmaksas un ilgāks parauga sagatavošanas laiks hromatogrāfiskajai analīzei, kas saistīts ar LGO derivatizāciju ar DNPH.

3.13.tabula

Optimizēto levoglizozenona noteikšanas metožu salīdzinājums

Nr.	Metode		R ²	LOD; LOQ	Atgūstamība	Sistēmas precizit.	Metodes precizit.
1.	UHPLC-UV		0,9993 (0,00130–0,286 mg/mL)	LOD = 0,00010 mg/mL LOQ = 0,0003mg/mL	Līmenis 1*: 94,5±0,5 mg/mL Līmenis 2: 96,3±0,6 mg/mL Līmenis 3: 97,5±0,2 mg/mL	0,3 %	0,4 %
2.1.	UHPLC-MS (LGO deriv. ar DNPH)	QDa	0,991 (0,00265–0,0265 mg/mL) 0,994 (0,0530–0,318 mg/mL)	LOD = 0,0007 mg/mL LOQ = 0,002 mg/mL	4x atšķaidīts paraugs: 66 ± 3 mg/mL 10 x atšķaidīts paraugs: 76 ± 3 mg/mL	γ(šķīd.)=0,159 mg/mL: 3 % γ(šķīd.)=0,0106 mg/mL: 7 %	3 %
2.2.		UV	0,9998 (0,00265–0,3180 mg/mL)	LOD = 0,008 mg/mL LOQ = 0,02 mg/mL	4x atšķaidīts paraugs: 95,0 ± 0,5 mg/mL 10 x atšķaidīts paraugs: 82 ± 4 mg/mL	γ(šķīd.)=0,159 mg/mL: 3 % γ(šķīd.)=0,0106 mg/mL: 3 %	4 %

* Līmenis 1 atbilst 80 % no iespējamās LGO koncentrācijas ātrās pirolīzes kondensāta paraugā; līmenis 2 atbilst 100 %, bet līmenis 3 – 120 %.

Optimizēto LGO noteikšanas metožu analītisko parametru atbilstība izvirzītajam kritērijam pēc SANTE/SANCO validācijas vadlīnijām

Analītiskais parametrs	Izvirzītais kritērijs	Metodes Nr.	Noteiktā vērtība	Atbilst izvirzītajam kritērijam Jā/Nē
Linearitāte	Izvērtē pēc regresijas atlikuma diagrammas	1.	Dati ir lineāri, homoskedastiski (0,0013 – 0,2860 mg/mL)	Jā
		2.1.	Dati ir lineāri, homoskedastiski (0,0027 – 0,0265 mg/mL) (0,0530 – 0,3180 mg/mL)	Jā
		2.2.	Dati ir lineāri, homoskedastiski (0,0027 – 0,3180 mg/mL)	Jā
LOQ	Virš MRL*	1.,2.1.,2.2.	Noteiktā LOQ vērtība > 100 reizes zem sagaidāmās LGO koncentrācijas	Jā
Atgūstamība	70 – 120 %	1.	Līmenis 1: 94,5±0,5 mg/mL Līmenis 2: 96,3±0,6 mg/mL Līmenis 3: 97,5±0,2 mg/mL	Jā
		2.1.	4x atšķaidīts paraugs: 66 ± 3 mg/mL 10 x atšķaidīts paraugs: 76 ± 3 mg/mL	Nē Jā
		2.2.	4x atšķaidīts paraugs: 95,0 ± 0,5 mg/mL 10 x atšķaidīts paraugs: 82 ± 4 mg/mL	Jā Jā
Sistēmas precizitāte	≤20 %	1.	0,3 %	Jā
		2.1.	γ(šķīd.) = 0,159 mg/mL: 3 % γ(šķīd.) = 0,0106 mg/mL: 7 %	Jā Jā
		2.2.	γ(šķīd.) = 0,159 mg/mL: 3 % γ(šķīd.) = 0,0106 mg/mL: 3 %	Jā Jā
Metodes precizitāte	≤20 %	1.	0,4 %	Jā
		2.1.	3 %	Jā
		2.2.	4 %	Jā

* MRL – *maximum residue level* (maksimālais pesticīdu atlieku līmenis)

SECINĀJUMI

1. Maģistra darbā izstrādātas un savstarpēji salīdzinātas literatūrā neaprašītas LGO noteikšanas metodes, izmantojot UHPLC-MS sistēmu. Kā optimālākā noteikšanas metode rutīnas analīzēm ir izmantojot UHPLC-UV sistēmu, jo šī metode ir ātrāka un nav nepieciešama papildus pirolīzes parauga sagatavošana. Metodei, kurā izmanto derivatizāciju ar 2,4-dinitrofenilhidrazīnu, ir zemāka noteikšanas robeža, kas ļauj noteikt LGO kā piemaisījumu mazos daudzumos, taču metodei ir garāka pirolīzes parauga sagatavošana. Metožu parametri atbilst SANTE/SANCO validācijas vadlīnijās noteiktajām prasībām.
2. Pēc levoglikozenona standartvielas stabilitātes pētījumiem ūdenī, ūdenī/ACN, ACN, ūdenī/acetona un acetona divās temperatūrās (4 un 21 °C) secināts, ka LGO stabilitāti būtiski ietekmē ūdens klātbūtne un standartšķīdumu uzglabāšanas temperatūra.
3. Ātrās pirolīzes produktiem – kondensātiem, to ekstraktiem un ūdens atlikumiem, kas satur LGO, novēro tādas pašas degradācijas tendences kā LGO standartšķīdumiem – stabilitāti ietekmē ūdens klātbūtne, degradācija straujāk noris istabas temperatūrā (21 °C).
4. Levoglikozenona stabilitātes nodrošināšanai nepieciešams izmantot bezūdens katalizatorus biomasas pirolīzes procesā, kā arī veikt iegūtā kondensāta ekstrakciju. Hromatogrāfiskajām analīzēm nav ieteicams izmantot organiskā šķīdinātāja (ACN vai acetona) un ūdens maisījumu.

IZMANTOTIE LITERATŪRAS AVOTI

1. Piver, W. T. Global Atmospheric Changes. *Environ. Health Perspect.* **1991**, *96*, 131–137.
2. Sheth, R. H. Solid Waste Management. *Int. J. Sci. Res. Dev.* **2014**, *6*, 112–119.
3. Räsänen, T.; Athanassiadis, D. Basic Chemical Composition of the Biomass Components of Pine, Spruce and Birch. *Forest Refine.* **2013**, *4*.
4. Ed de Jong, A.H., Patrick Walsh, M. W. Bio-Based Chemicals. Value Added Products from Biorefineries. *IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery* 33. **2012**, 1-36.
5. Brownsort, P. A. *Biomass Pyrolysis Processes: Performance Parameters and Their Influence on Biochar System Benefits.*; **2009**, 1-93.
6. Balat, M. Mechanisms of Thermochemical Biomass Conversion Processes. Part 1: Reactions of Pyrolysis. *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.* **2008**, *30* (7), 620–635.
7. Hammer, N. L.; Garrido, R. A.; Starcevich, J.; Coe, C. G.; Satrio, J. A. Two-Step Pyrolysis Process for Producing High Quality Bio-Oils. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2015**, *54* (43), 10629–10637.
8. Kawamoto, H.; Hatanaka, W.; Saka, S. Thermochemical Conversion of Cellulose in Polar Solvent (Sulfolane) into Levoglucosan and Other Low Molecular-Weight Substances. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.* 2003, pp 303–313.
9. Sarotti, A. M. Theoretical Insight into the Pyrolytic Deformylation of Levoglucosenone and Isolevoglucosenone. *Carbohydr. Res.* **2014**, *390*, 76–80.
10. Alves Costa Pacheco, A.; Sherwood, J.; Zhenova, A.; McElroy, C. R.; Hunt, A. J.; Parker, H. L.; Farmer, T. J.; Constantinou, A.; De bruyn, M.; Whitwood, A. C.; et al. Intelligent Approach to Solvent Substitution: The Identification of a New Class of Levoglucosenone Derivatives. *ChemSusChem* **2016**, *9* (24), 3503–3512.
11. Sherwood, J.; De bruyn, M.; Constantinou, A.; Moity, L.; McElroy, C. R.; Farmer, T. J.; Duncan, T.; Raverty, W.; Hunt, A. J.; Clark, J. H. Dihydrolevoglucosenone (Cyrene) as a Bio-Based Alternative for Dipolar Aprotic Solvents. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (68), 9650–9652.
12. Ostermeier, M.; Schobert, R. Total Synthesis of (+)-Chloriolide. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (9), 4038–4042.
13. Teixeira, A. R. S.; Flourat, A. L.; Peru, A. A. M.; Brunissen, F.; Allais, F. Lipase-Catalyzed Baeyer-Villiger Oxidation of Cellulose-Derived Levoglucosenone into (S)- γ -Hydroxymethyl- α,β -Butenolide: Optimization by Response Surface Methodology. *Front. Chem.* **2016**, *4*.

14. Shibagaki, M.; Takahashi, K.; Kuno, H.; Honda, I.; Matsushita, H. Synthesis of Levoglucosenone. *Chem. Lett.* **1990**, *19* (2), 307–310.
15. Zhang, Z.; Lu, Q.; Ye, X.; Wang, T. Selective Production of Levoglucosenone from Catalytic Fast Pyrolysis of Biomass Mechanically Mixed with Solid Phosphoric Acid Catalysts. **2015**, 1263-1274.
16. Lu, Q.; Ye, X.; Zhang, Z.; Dong, C.; Zhang, Y. Catalytic Fast Pyrolysis of Cellulose and Biomass to Produce Levoglucosenone Using Magnetic SO₄²⁻/TiO₂-Fe₃O₄. *Bioresour. Technol.* **2014**, *171*, 10–15.
17. Zhang, L.; Bao, Z.; Xia, S.; Lu, Q.; Walters, K. Catalytic Pyrolysis of Biomass and Polymer Wastes. *Catalysts* **2018**, *8* (12), 659.
18. Maduskar, S.; Maliekkal, V.; Neurock, M.; Dauenhauer, P. J. On the Yield of Levoglucosan from Cellulose Pyrolysis. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (5), 7017–7025.
19. Sui, X.; Wang, Z.; Liao, B.; Zhang, Y.; Guo, Q. Preparation of Levoglucosenone through Sulfuric Acid Promoted Pyrolysis of Bagasse at Low Temperature. *Bioresour. Technol.* **2012**, *103* (1), 466–469.
20. Kudo, S.; Zhou, Z.; Norinaga, K.; Hayashi, J. Efficient Levoglucosenone Production by Catalytic Pyrolysis of Cellulose Mixed with Ionic Liquid. *Green Chem.* **2011**, *13* (11), 3306.
21. Kudo, S.; Goto, N.; Sperry, J.; Norinaga, K.; Hayashi, J. Production of Levoglucosenone and Dihydrolevoglucosenone by Catalytic Reforming of Volatiles from Cellulose Pyrolysis Using Supported Ionic Liquid Phase. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5* (1), 1132–1140.
22. Kawamoto, H.; Saito, S.; Hatanaka, W.; Saka, S. Catalytic Pyrolysis of Cellulose in Sulfolane with Some Acidic Catalysts. *J. Wood Sci.* **2007**, *53* (2), 127–133.
23. Kawamoto, H.; Saito, S.; Hatanaka, W.; Saka, S. Correction to: Catalytic Pyrolysis of Cellulose in Sulfolane with Some Acidic Catalysts. *J. Wood Sci.* **2018**, *64* (6), 880–880.
24. Wang, Z.; Lu, Q.; Zhu, X.-F.; Zhang, Y. Catalytic Fast Pyrolysis of Cellulose to Prepare Levoglucosenone Using Sulfated Zirconia. *ChemSusChem* **2011**, *4* (1), 79–84.
25. Cao, F.; Schwartz, T. J.; McClelland, D. J.; Krishna, S. H.; Dumesic, J. A.; Huber, G. W. Environmental Science Dehydration of Cellulose to Levoglucosenone Using Polar Aprotic Solvents. *Energy Environ. Sci.* **2015**, (8), 1808-1815.
26. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; Ženěva, 1999. Pieejams:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42424/WHO_TRS_902.pdf;jsessionid=B1E2B32818E73295F5405ED088B1F13C?sequence=1 [Skatīts: 14.03.2019]
27. The European Commission: Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.

- http://www.crlpesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727&LabID=100&Lang=EN. Pieejams: http://www.eurlpesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727 [Skatīts: 03.2019.]
28. Guidance on bioanalytical method validation, European Medicines Agency, 2011. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Pieejams: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf [Skatīts: 03.2019.]
29. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry, 2018. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf>. Pieejams: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> [Skatīts: 15.03.2019.]
30. Krueve, A.; Rebane, R.; Kipper, K.; Oldekop, M.-L.; Evard, H.; Herodes, K.; Ravio, P.; Leito, I. Tutorial Review on Validation of Liquid Chromatography–mass Spectrometry Methods: Part I. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *870*, 29–44.
31. Tincstad, J.; Dudzinski, J.; Lachman, L. Drug Substances in Pharmaceutical Suspensions. **1973**, *62* (8), 1361–1363.
32. M S Miftakhov, F A Valeev, I. N. G. Levoglucosenone: The Properties, Reactions, and Use in Fine Organic Synthesis. *Russ. Chem. Rev.* **1994**, *63* (10), 869–882.
33. Zhang, H.; Meng, X.; Liu, C.; Wang, Y.; Xiao, R. Selective Low-Temperature Pyrolysis of Microcrystalline Cellulose to Produce Levoglucosan and Levoglucosenone in a Fixed Bed Reactor. *Fuel Process. Technol.* **2017**, *167* (January), 484–490.
34. Kudo, S.; Zhou, Z.; Yamasaki, K.; Norinaga, K.; Hayashi, J. Sulfonate Ionic Liquid as a Stable and Active Catalyst for Levoglucosenone Production from Saccharides via Catalytic Pyrolysis. *Catalysts* **2013**, *3* (4), 757–773.
35. Halpern, Y.; Hoppesch, J. P. A Mass Spectrometry Study of Levoglucosenone. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (9), 1556–1557.
36. Leeuwen, S.; Hendriksen, L.; Karst, U. Determination of aldehydes and ketones using derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine and liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1058*, 107–112.
37. James W. Eichelberger. *Determination of Carbonyl Compounds in Drinking Water by Dinitrophenylhydrazine Derivatization and HPLC*; CINCINNATI, OHIO, 1992. Pieejams: <https://www.accustandard.com/assets/554.pdf> [Skatīts: 16.03.2019.]
38. Lucas, D.; Ménez, J. F.; Berthou, F.; Pennec, Y.; Floch, H. H. Determination of Free Acetaldehyde in Blood as the Dinitrophenylhydrazone Derivative by High-Performance

- Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **1986**, 382, 57–66.
39. Cordis, G. A.; Das, D. K.; Riedel, W. High-Performance Liquid Chromatographic Peak Identification of 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivatives of Lipid Peroxidation Aldehydes by Photodiode Array Detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, 798 (1–2), 117–123.
 40. Deng, Y.; Yu, P. H. Simultaneous Determination of Formaldehyde and Methylglyoxal in Urine: Involvement of Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase-Mediated Deamination in Diabetic Complications. *J. Chromatogr. Sci.* **1999**, 37 (9), 317–322.
 41. Deng, Y.; Boomsma, F.; Yu, P. H. Deamination of Methylamine and Aminoacetone Increases Aldehydes and Oxidative Stress in Rats. *Life Sci.* **1998**, 63 (23), 2049–2058.
 42. Agency, U. S. E. P. Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air Second Edition Compendium Method TO-11A Determination of Formaldehyde in Ambient Air Using Adsorbent Cartridge Followed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC. *EPA/625/R-96/010b* **1999**, No. January.
 43. Pietrzyk, D. J.; Chan, E. P. Determination of Carbonyl Compounds by 2-Diphenylacetyl-1,3-Indandione-1-Hydrazone. *Anal. Chem.* **1970**, 42 (1), 37–43.
 44. Uchiyama, S.; Inaba, Y.; Kunugita, N. Derivatization of Carbonyl Compounds with 2,4-Dinitrophenylhydrazine and Their Subsequent Determination by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B* **2011**, 879 (17–18), 1282–1289.
 45. Uchiyama, S.; Ando, M.; Aoyagi, S. Isomerization of Aldehyde-2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivatives and Validation of High-Performance Liquid Chromatographic Analysis. *J. Chromatogr. A* **2003**, 996 (1–2), 95–102.
 46. Pelter, A.; Rosser, R. M.; Mills, S. Reductive Aminations of Ketones and Aldehydes Using Borane–pyridine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 717–720.
 47. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem* **2002**, 74 (5), 835–855.
 48. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem* 2002, 74 (5), 835–855.

1.pielikums

Levoglikozenona degradācijas kinētikas likņu konstruēšanas un reakcijas ātruma konstantes
aprēķināšanas dati

1.1.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā standartšķīduma atšķaidījumos 4 °C temperatūrā

Dienas	γ(šķīd), mg/mL					w(LGO) rel, %				
	0,227	0,341	0,454	0,568	0,795					
	Joslas laukums, au·s									
0	3302850	4533951	6342313	7550759	9539163	100	100	100	100	100
4	3386708	4620511	5906622	6946759	8671777	103	102	93	92	91
6	3107961	4308505	5358802	5867905	8452087	94	95	84	78	89
7	2987615	3820860	4761082	6494747	8295091	90	84	75	86	87
12	2706237	3663431	4999147	5858450	7625148	82	81	79	78	80
19	1880199	2349596	3757783	4330719	6576554	57	52	59	57	69
26	1843019	2400502	3284077	3963595	5622460	56	53	52	52	59
35	1213560	1601151	2280563	2925620	3758251	37	35	36	39	39
40	1011328	1219660	1916291	2464134	2970743	31	27	30	33	31
46	743414	884412	1514754	1897821	2004680	23	20	24	25	21
56	483743	451433	961964	1297579	1066615	15	10	15	17	11
61	310830	296425	690208	1034284	719482	9	7	11	14	8
68	186389	153133	454932	783633	362108	6	3	7	10	4
76	119285	91173	320674	565042	183981	4	2	5	7	2

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā standartšķīduma atšķaidījumos 4 °C temperatūrā

Dienas	γ (šķīd), mg/mL					γ (šķīd), mg/mL					γ (šķīd), mg/mL				
	0,227	0,341	0,454	0,568	0,795	0,227	0,341	0,454	0,568	0,795	0,227	0,341	0,454	0,568	0,795
	w(LGO), % samaz					C(LGO), mmol/L					ln(c) (LGO)				
0	-	-	-	-	-	1,40	2,10	2,80	3,50	4,90	0,337	0,743	1,03	1,25	1,59
4	0,6	2,2	1,7	2,0	2,3	1,44	1,92	2,61	3,22	4,46	0,362	0,651	0,959	1,17	1,50
6	1,0	2,6	2,6	2,3	1,9	1,32	1,78	2,37	3,01	4,35	0,277	0,577	0,862	1,10	1,47
7	1,4	2,8	2,8	2,8	1,9	1,27	1,70	2,25	2,82	4,27	0,237	0,529	0,812	1,04	1,45
12	1,5	1,9	2,1	1,9	1,7	1,15	1,63	2,10	2,72	3,92	0,138	0,487	0,744	1,00	1,37
19	2,3	1,8	2,1	2,2	1,6	0,798	1,40	1,66	2,01	3,38	-0,226	0,335	0,507	0,698	1,22
26	1,9	1,9	1,9	1,8	1,6	0,697	1,07	1,45	1,84	2,89	-0,361	0,064	0,372	0,609	1,06
35	1,8	1,9	1,8	1,8	1,7	0,532	0,711	1,01	1,36	1,93	-0,631	-0,341	0,008	0,306	0,659
40	1,8	1,9	1,7	1,7	1,7	0,387	0,542	0,847	1,14	1,53	-0,950	-0,613	-0,166	0,134	0,424
46	1,7	1,8	1,7	1,6	1,7	0,315	0,393	0,669	0,881	1,03	-1,15	-0,935	-0,402	-0,127	0,030
56	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	0,205	0,200	0,425	0,602	0,548	-1,58	-1,61	-0,856	-0,508	-0,601
61	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	0,132	0,132	0,305	0,480	0,370	-2,03	-2,03	-1,19	-0,734	-0,995
68	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	0,079	0,068	0,201	0,364	0,186	-2,54	-2,69	-1,60	-1,01	-1,68
76	1,3	1,3	1,2	1,2	1,3	0,0506	0,0405	0,142	0,262	0,0946	-2,98	-3,21	-1,95	-1,34	-2,36

Levoglukozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā standartšķīduma atšķaidījumos 21 °C temperatūrā

Dienas	γ(šķīd), mg/mL					w(LGO) rel, %				
	0,103	0,207	0,310	0,414	0,517					
	Joslas laukums, au·s									
0	1495851	3183327	4465324	6042781	7790493	100	100	100	100	100
1	1378922	2965827	3978249	5572248	7246479	92	93	89	92	93
4	1097553	2421582	3268980	4639675	6330148	73	76	73	77	81
8	804342	1802812	2531283	3543260	5104830	54	57	57	59	66
12	711426	1307752	1902410	2665743	3758726	48	41	43	44	48
25	248156	550613	796075	1109275	1547356	17	17	18	18	20
32		394163	556805	872808	1103011		12	12	14	14
39		303266	463500	673956	922661		10	10	11	12
50		210866	317884	480618	633875		7	7	8	8
56		192310	320057	481244	581935		6	7	8	7

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā standartšķīduma atšķaidījumos 21 °C temperatūrā

Dienas	γ (šķīd), mg/mL					γ (šķīd), mg/mL					γ (šķīd), mg/mL				
	0,103	0,207	0,310	0,414	0,517	0,103	0,207	0,310	0,414	0,517	0,103	0,207	0,310	0,414	0,517
	w(LGO), % samaz					C(LGO), mmol/L					ln(c) (LGO)				
0	-	-	-	-	-	0,638	1,28	1,91	2,55	3,19	-0,450	0,243	0,649	0,936	1,16
1	7,8	6,8	10,9	7,8	7,0	0,588	1,19	1,70	2,35	2,97	-0,531	0,173	0,533	0,855	1,09
4	6,7	6,0	6,7	5,8	4,7	0,468	0,970	1,40	1,96	2,59	-0,760	-0,0302	0,337	0,672	0,952
8	5,8	5,4	5,4	5,2	4,3	0,343	0,722	1,09	1,50	2,09	-1,07	-0,325	0,0811	0,403	0,737
12	4,4	4,9	4,8	4,7	4,3	0,303	0,524	0,815	1,13	1,54	-1,19	-0,646	-0,205	0,118	0,431
25	3,3	3,3	3,3	3,3	3,2	0,106	0,221	0,341	0,468	0,633	-2,25	-1,51	-1,08	-0,759	-0,457
32	3,1	2,7	2,7	2,7	2,7		0,158	0,239	0,368	0,452		-1,85	-1,43	-0,999	-0,795
39	5,2	2,3	2,3	2,3	2,3		0,122	0,199	0,285	0,378		-2,11	-1,62	-1,26	-0,974
50		1,9	1,9	1,8	1,8		0,0845	0,136	0,203	0,259		-2,47	-1,99	-1,60	-1,35
56		1,7	1,7	1,6	1,7		0,077	0,137	0,203	0,238		-2,56	-1,99	-1,59	-1,44

1.5.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā ūdens standartšķīdumā 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz	C (LGO), mmol/L	ln (C) (LGO)
0	5190663	100	-	2,46	0,901
7	1053464	20	11,4	0,500	-0,694
14	266217	5	2,2	0,126	-2,07
23	62681	1	0,4	0,0297	-3,52

1.6.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā ūdens/acetona standartšķīdumā 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz	C (LGO), mmol/L	ln (C) (LGO)
0	6498572	100	-	3,29	1,19
8	5759137	89	1,4	2,92	1,07
17	4982319	77	1,4	2,53	0,926
22	4386653	68	1,5	2,22	0,799
29	3551223	55	1,6	1,80	0,588
44	1523324	23	1,7	0,772	-0,259
51	1033682	16	1,6	0,524	-0,647
61	598128	9	1,5	0,303	-1,19

1.7.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā ūdens/acetona standartšķīdumā 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz	C (LGO), mmol/L	ln (C) (LGO)
0	6498572	100	-	3,293	1,192
8	2565147	39	7,6	1,300	0,2624
17	1362904	21	4,6	0,6907	-0,3700
22	984926	15	3,9	0,4992	-0,6948
29	675536	10	3,1	0,3424	-1,072
44	405595	6	2,1	0,2056	-1,582
51	387200	6	1,8	0,1962	-1,628
61	307689	5	1,6	0,1559	-1,858

1.8.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā acetona standartšķīdumā 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz	C (LGO), mmol/L	ln (C) (LGO)
0	7732600	100	-	6,587	1,885
7	7861337	102	0,24	6,697	1,902
22	7925618	102	0,11	6,751	1,910
31	8083997	105	0,15	6,886	1,930
41	8481091	110	0,24	7,224	1,977

1.9.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā acetona standartšķīdumā 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz	C (LGO), mmol/L	ln (C) (LGO)
0	7732600	100	-	6,587	1,885
7	7067755	91	1,2	6,021	1,795
22	6900180	89	0,49	5,878	1,771
31	7020113	91	0,30	5,980	1,788
41	6073490	79	0,52	5,174	1,644

1.10.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā acetonitrila standartšķīdumā 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz	C (LGO), mmol/L	ln (C) (LGO)
0	7718668	100	-	6,538	1,878
7	8057746	104	0,63	6,825	1,921
22	7536480	98	0,11	6,383	1,854
31	7427829	96	0,12	6,291	1,839
41	7711380	100	0	6,531	1,877

1.11.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā acetonitrila standartšķīdumā 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz	C (LGO), mmol/L	ln (C) (LGO)
0	7718668	100	-	6,538	1,878
7	7534182	98	0,34	6,381	1,853
22	6498605	84	0,72	5,504	1,706
31	7179500	93	0,23	6,081	1,805
41	6742750	87	0,31	5,711	1,742

1.12.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturāllogaritma izmaiņa laika gaitā ūdens/acetonitrila standartšķīdumā (pH = 2,10) 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz	C (LGO), mmol/L	ln (C) (LGO)
0	9750501	100	-	12,34	2,512
8	8754297	90	1,3	11,07	2,405
17	8263228	85	0,90	10,45	2,347
22	7346539	75	1,1	9,294	2,229
29	6532551	67	1,1	8,264	2,112
44	4356458	45	1,3	5,511	1,707
51	3364672	35	1,3	4,257	1,448
61	2325059	24	1,2	2,941	1,079

1.13.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma samazinājuma, LGO molārās koncentrācijas un tās naturālogaritma izmaiņa laika gaitā ūdens/acetnitrila standartšķīdumā (pH = 2,10) 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz	C (LGO), mmol/L	ln (C) (LGO)
0	9750501	100	-	12,34	2,512
8	7238650	74	3,2	9,157	2,215
17	5123793	53	2,8	6,482	1,869
22	3837537	39	2,8	4,855	1,580
29	2976805	31	2,4	3,766	1,326
44	1764355	18	1,9	2,232	0,803
51	1843921	19	1,6	2,333	0,847
61	1649777	17	1,4	2,087	0,736

1.14.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā neatšķaidītā kondensātā P57 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	γšķīd, mg/mL	Koriģētais joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	7163157	10,54	679616	100	-
7	4869932	10,92	445964	66	4,9
14	2973154	10,36	286984	42	4,1
23	1349181	10,71	125974	19	3,5
28	882510	10,74	82170	12	3,1
34	564980	10,46	54013	8	2,7
44	478479	10,68	44801	7	2,1
49	414680	10,68	38828	6	1,9
56	334429	10,67	31343	5	1,7
64	342591	10,55	32473	5	1,5
73	316810	10,48	30230	4	1,3

*Koriģēto joslas laukumu iegūst joslas laukumu dalot ar šķīduma masas koncentrāciju.

1.15.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
kondensātā P57 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	7163157	100	-
7	6398296	89	1,5
14	6734522	85	0,4
23	5858732	82	0,8
28	5695616	75	0,7
34	4484766	63	1,1
44	4172645	58	0,9
49	3352743	52	1,1
56	3346711	47	1,0
64	2533544	35	1,0
73	2474354	35	0,9
78	2104247	29	0,9
85	1637732	23	0,9
100	744249	10	0,9
107	482002	7	0,9

1.16.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
kondensātā P57 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	7163157	100	-
7	6420614	90	1,5
14	5513867	77	1,6
23	3820492	53	2,0
28	3098832	43	2,0
34	2135363	30	2,1
44	1912237	27	1,7
49	1639503	23	1,6
56	1389280	19	1,4
64	1023469	14	1,3
73	976505	14	1,2
78	645698	9	1,2
85	618146	9	1,1
100	378527	5	0,9
107	336258	5	0,9

1.17.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
kondensātā P75 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	1956107	100	-
9	1626360	83	1,9
14	1566432	80	1,4
20	1147571	74	2,1
30	1149125	59	1,4
35	1012575	52	1,4
42	855204	44	1,3
50	702810	36	1,3
59	645938	33	1,1
64	530839	27	1,1
71	483200	25	1,1
86	343474	18	1,0
93	254952	13	0,9

1.18.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
kondensātā P75 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	1956107	100	-
9	1076154	55	5,0
14	856951	44	4,0
20	551302	28	3,6
30	518573	27	2,4
35	457209	23	2,2
42	340391	17	2,0
50	257024	13	1,7
59	254316	13	1,5
64	183113	9	1,4
71	190020	10	1,3
86	124106	6	1,1
93	120079	6	1,0

1.19.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
ekstraktā P75 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	1806976	100	-
9	1583791	88	1,4
14	1460622	81	1,4
20	846267	75	2,7
30	996438	58	1,5
35	934421	45	1,4
42	753804	42	1,4
50	512951	28	1,4
59	462125	26	1,3
64	379178	21	1,2
71	325513	18	1,2
86	200491	11	1,0
93	168350	9	1,0

1.20.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
ekstraktā P75 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	1806976	100	-
9	931434	52	5,4
14	682481	38	4,4
20	522086	29	3,6
30	405168	22	2,6
35	390524	22	2,2
42	270083	15	2,0
50	212791	12	1,8
59	190927	11	1,5
64	151960	8	1,4
71	136873	8	1,3
86	80409	4	1,1
93	72644	4	1,0

1.21.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
ūdens slānī P75 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	536324	100	-
9	484588	90	1,1
14	443607	83	1,2
20	336244	73	1,9
30	361029	67	1,1
35	335880	63	1,1
42	288393	54	1,1
50	238007	44	1,1
59	205664	38	1,0
64	172825	32	1,1
71	122236	23	1,1
86	65841	12	1,0
93	47955	9	1,0
103	23540	4	0,9

1.22.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
ūdens slānī P75 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	536324	100	-
9	356446	66	3,7
14	340574	64	2,6
20	249871	54	2,7
30	245526	46	1,8
35	226161	42	1,7
42	182509	34	1,6
50	134170	25	1,5
59	141711	26	1,2
64	101678	19	1,3
71	90943	17	1,2
86	53782	10	1,0
93	46830	9	1,0
103	33843	6	0,9

Levoglukozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā neatšķaidītā kondensātā P93 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	γšķīd, mg/mL	Koriģētais joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	2413377	1,86	1297515	100	-
5	1217706	1,67	729165	56	8,8
11	455631	1,1	414210	32	6,2
21	254292	1,15	221123	17	4,0
26	164257	1,15	142832	11	3,4
32	146926	1,32	111308	9	2,9
40	126019	1,59	79257	6	2,3
49	99383	1,43	69499	5	1,9

1.24.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
kondensātā P93 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	2413377	100	-
5	2204759	91	1,7
11	1912413	79	1,9
21	1995783	83	0,8
32	1652485	68	1,0
40	1292768	54	1,2
49	1312317	54	0,9
54	1205312	50	0,9
61	883745	37	1,0
76	550317	23	1,0
83	465622	19	1,0
93	346332	14	0,9

1.25.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
kondensātā P93 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	2413377	100	-
5	1830002	76	4,8
21	1163489	48	2,5
26	1061184	44	2,2
32	856366	35	2,0
40	594700	25	1,9
49	489973	20	1,6
54	401073	17	1,5
61	316656	13	1,4
76	204159	8	1,2
83	167490	7	1,1
93	106680	4	1,0

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā neatšķaidītā ekstraktā P93 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	γšķīd, mg/mL	Koriģētais joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	2422748	0,58	4148541	100	-
5	2222746	0,68	3259158	79	4,3
11	1243060	0,44	2818730	68	2,9
21	2005147	0,62	3239333	78	1,0
32	1263940	0,41	3067816	74	0,8
40	1570745	0,51	3067861	74	0,7
49	1391436	0,42	3336777	80	0,4
54	1277391	0,41	3130860	75	0,5
61	1950871	0,56	3496185	84	0,3

1.27.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
ekstraktā P93 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	934476	100	-
5	669009	72	5,7
11	636709	68	2,9
21	575923	62	1,8
32	446637	48	1,6
40	372605	40	1,5
49	354522	38	1,3
54	294917	32	1,3
61	269973	29	1,2
76	162773	17	1,1
83	132034	14	1,0
93	97650	10	1,0

1.28.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā
ekstraktā P93 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	934476	100	-
5	685948	73	5,3
11	557254	60	3,7
21	441756	47	2,5
26	389616	42	2,2
32	262256	28	2,2
40	177939	19	2,0
49	124731	13	1,8
54	87737	9	1,7
61	65525	7	1,5
76	35750	4	1,3
83	30242	3	1,2
93	19612	2	1,1

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā neatšķaidītā ūdens slānī P93 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	γšķīd, mg/mL	Koriģētais joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	1279751	59,33	21570	100	-
5	375678	60,37	6223	29	14,2
11	146389	55,99	2615	12	8,0
26	100547	58,52	1718	8	3,5
32	47354	58,55	809	4	3,0
40	55393	58,65	944	4	2,4
49	51645	56,97	907	4	2,0

1.30.tabula

1.31.tabula

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā ūdens slānī P93 4 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	1279751	100	-
5	402837	31	13,7
11	377003	29	6,4
26	334152	26	2,8
32	312351	24	2,4
40	288469	23	1,9
49	251310	20	1,6
54	217035	17	1,5
61	167252	13	1,4
76	80263	6	1,2
83	55222	4	1,2
93	39438	3	1,0

Levoglikozenona relatīvā daudzuma izmaiņa laika gaitā ūdens slānī P93 21 °C temperatūrā

Dienas	Joslas laukums, au·s	w(LGO), %	w(LGO), % samaz
0	1279751	100	-
5	376419	29	14,1
11	324506	25	6,8
21	302152	24	3,6
26	394478	31	2,7
32	314799	25	2,4
40	314179	25	1,9
49	277737	22	1,6
54	250176	20	1,5
61	220041	17	1,4
76	139126	11	1,2
83	135407	11	1,1
93	91362	7	1,0

Levoglikozenona noteikšanas metožu analītisko parametru noteikšanas dati, izmantojot UHPLC-MS sistēmu

2.1.tabula

Linearitātes izvērtēšanas dati

Atšķaidījuma Nr.	γ (šķīd.), mg/mL	Joslās laukums, AU·s	R ²
1.	0,0013	59873	0,9993
		59864	
		59871	
2.	0,0065	275148	
		274987	
		275045	
3.	0,0130	581609	
		574189	
		573977	
4.	0,0650	2863129	
		2847215	
		2855419	
5.	0,1040	4698687	
		4737221	
		4742485	
6.	0,1300	5899773	
		5856855	
		5851954	
7.	0,1560	7090640	
		7061943	
		7049122	
8.	0,1950	8539733	
		8560587	
		8587030	
9.	0,2600	11977224	
		11967458	
		11975632	
10.	0,2860	12769551	
		12769457	
		12769542	

Levoglikozenona derivatizācijas reakcijas kinētikas dati 5 °C temperatūrā

Laiks, min	Joslas laukums (QDa, SIR 305 Da), Intensitāte·s	γ (LGO atvasinājums), mg/mL	Joslas laukums (UV, 275 nm), AU·s	γ (LGO atvasinājums), mg/mL
0	0	0	0	0
3	1434125	0.1551	674888	0.1086
13	1678558	0.2015	1229726	0.1968
23	1580404	0.1829	1228430	0.1966
33	1544027	0.1760	1216038	0.1946
43	1541455	0.1755	1210501	0.1937
53	1506680	0.1689	1193739	0.1911
63	1434125	0.1551	1112448	0.1781

Linearitātes izvērtēšanas dati

	Atšķaidījuma Nr.	γ (šķīd.), mg/mL	Joslas laukums, Intensitāte·s	R^2	Joslas laukums, AU·s	R^2
Mazo koncentrāciju diapazons	1.	0,0027	92064	0,991	13332	0,9998
			91916		13965	
			92054		12619	
	2.	0,0053	176119		28954	
			167446		26738	
			175259		27186	
	3.	0,0080	258997		38467	
			258879		43936	
			258463		46162	
	4.	0,0106	293401		55605	
			315252		57627	
			292441		56308	
	5.	0,0265	658741		151667	
			658425		159592	
			649921		159458	
Lielo koncentrāciju diapazons	6.	0,0530	841245	0,994	325104	0,9998
			863615		320270	
			863541		305639	
	7.	0,1060	1190040		617287	
			1196576		654279	
			1226639		648761	
	8.	0,1590	1442170		963584	
			1455408		990000	
			1555894		1019999	
	9.	0,2120	1673985		1384528	
			1709106		1326586	
			1638820		1347994	
	10.	0,3180	2254871		1941045	
			2253671		1938982	
			2199896		2032886	

Maģistra darbs „No biomasas iegūta levoglukozenona un tā degradācijas produktu noteikšana ātrās pirolīzes produktos, izmantojot UHPLC-UV-QDa sistēmu.” izstrādāts Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūtā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti.

Autors: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja no LVKĶI: pētniece, *Dr. chem.* Kristīne Meile: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs no LU: prof., *Dr. chem.* Arturs Vīksna: _____
(personīgais paraksts) (datums)

Recenzents: *Dr. chem.* Dzintars Začs _____
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Vija Gutāne
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

_____ protokols Nr. _____ (ieraksta sekretārs)
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)