

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**MEDUS SEKUNDĀRO METABOLĪTU NOTEIKŠANA
IZMANTOJOT KODOLU MAGNĒTISKO REZONANSI**

BAKALaura DARBS

Autors: **Marina Šalajeva**

Studenta apliecības Nr.: ms18103

Darba vadītājs: Mg.chem. Krišs Dāvids Labsvārds

RĪGA

2021

ANOTĀCIJA

Medus sekundāro metabolītu noteikšana izmantojot kodolu magnētisko rezonansi.

Šalajeva M., zinātniskais vadītājs Mg.chem. Labsvārds K. D. Bakalaura darbs, 35 lappuses, 10 attēli, 3 tabulas, 38 literatūras avoti, 3 pielikumi. Latviešu valodā.

Medus ir ne tikai pārtikas produkts, bet arī tiek uzskatīts par terapeitisku līdzekli, tāpēc ir svarīgi noteikt sastāvā esošos cukurus, fermentus, mikro un makro elementus, kuri ir labvēlīgi cilvēka organismam. Darbā apkopota zinātniskā literatūra par medū sastopamajiem sekundārajiem metabolītiem, īpaši pievēršot uzmanību alkaloīdiem, flavonoīdiem un fenolajām skābēm. Aplūkota informācija par kvantitatīvu kodolu magnētisko rezonansi pielietojumu. Izpētītā literatūra par hemometriju un galveno komponentu analīzi. Darbā veikta NMR analīze medum. Eksperimentā tiek izmantots deiterēts ūdens kā šķīdinātājs, saturošs fosfāta buferšķīdumu. Deiterētā ūdenī izšķīdinātu medus paraugu ¹H-NMR spektrs ietver izteiktus dominējošus metabolītus, organiskās skābes, aminoskābes u.c. organisko savienojumu grupas. Veicot hloroforma ekstrakciju izmantots 1,4-dinitrobenzols kā iekšējais standarts. Iegūtie rezultāti apstrādāti izmantojot statistiskās apstrādes metodes.

MEDUS, FENOLĀS SKĀBES, FLAVONOĪDI, DEITERĒTS ŪDENS, KODOLU MAGNĒTISKĀ REZONANSE, GALVENO KOMPONENTU ANALĪZE

ABSTRACT

Detection of secondary honey metabolites using nuclear magnetic resonance.

Šalajeva M., scientific adviser Mg.chem. Labsvārds K. D. Bachelor thesis, 35 pages, 10 figures, 3 tables, 38 literature sources, 3 annexes. In Latvian.

Honey is not only a food but is also considered a therapeutic tool, so it is important to identify the ingredients of sugars, enzymes, micro and macro that are beneficial to the human body. The work summarises the scientific literature on secondary metabolites in honey, with a particular focus on alkaloids, flavonoids and phenolic acids. The scientific literature on the secondary metabolites present in honey is summarized in the thesis with a particular focus on alkaloids, flavonoids and phenolic acids. The information on quantitative using of nuclear magnetic resonance is reviewed. As part of this work, NMR analysis of honey has been conducted. In the experiment deuterated water was used as a solvent that contained phosphate buffer solution. The ^1H -NMR spectrum of honey samples solved in deuterated water comprises expressed dominant metabolites, organic acids, amino acids and other groups of organic compounds. In the case of chloroform extraction, 1,4-dinitrobenzene has been used as an internal standard. The results obtained have been processed using statistical processing methods.

HONEY, PHENOLIC ACIDS, FLAVONOIDS, DEUTERATED WATER,
NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE, PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. Dabīga medus veidošanās, sastāvs un īpašības	8
1.2. Medū sastopamie sekundārie metabolīti	11
1.3. Kodolu magnētiskās rezonanses spektroskopijas darbības princips, priekšrocības un trūkumi	14
1.4. Organisko savienojumu kvantitatīva noteikšana medū izmantojot ¹ H-NMR	15
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	18
2.1.1. Darbā izmantotā aparatūra	18
2.1.2. Darbā izmantotie reaģenti	18
2.2. Medus paraugu raksturojums	18
2.3. Medus NMR analīze deiterētā buferšķīdumā	19
2.4. Medus hloroforma ekstraktu NMR analīze	20
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	21
3.1. Kodolu magnētisko rezonanses spektra analīze	21
3.2. Medus sekundāro metabolītu spektru analīze	22
3.3. Galveno komponentu analīze	26
3.4. Hloroforma ekstrakcijas kvalitatīvais izvērtējums	29
3.5. Galveno komponentu analīze nepolāriem savienojumiem	30
SECINĀJUMI	31
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	32
PATEICĪBAS	35
PIELIKUMI	36
1. pielikums. PCA attiecības tabula	36

2. pielikums. Hloroforma ekstrakcijas NMR spektrs.....	37
3. pielikums. Loading plot.....	38

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

ASV - Amerikas Savienotās Valstis;

A_w – zema ūdens aktivitāte;

D₂O - deiterēts ūdens;

DNB – dinitrobenzols;

¹H-NMR – protonu kodolu magnētiskā rezonanse;

HPLC – augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija;

IS - infrasarkanā Furje spektroskopija;

NMR - kodolu magnētiskā rezonanse;

LC-MS – šķidrums hromatogrāfija-masspektrometrija;

MAS – maģiskā leņķa rezonances spins (*Magical-angle spinning*);

MBC – minimālā baktericīdā koncentrācija;

MIC – minimālā inhibitoriālā koncentrācija;

MRI – magnētiskās rezonances attēldiagnostika;

PA – pirolizidīna alkaloidi;

PANO – pirolizidīna alkaloidu-N-oksīdi;

PCA – galveno komponentu analīze;

PHBA - 4-hidroksibenzoskābe;

QSAR – struktūras un aktivitātes kvantitatīvā attiecība;

RF – radiofrekvence;

TOCSY – korelācijas spektroskopija;

USFDA - ASV pārtikas un zāļu pārvalde;

IEVADS

Medus ir dabīgs sīrups, kura organoleptiskās īpašības (krāsa, garša un tekstūra) ir kompleksa fizikāli ķīmisko parametru funkcija, ko galvenokārt nosaka botāniskā un ģeogrāfiskā izcelsme. Būtībā tas ir koncentrēts cukuru ūdens šķīdums.¹ Medus ir bagāts ar fenolām skābēm un flavonoīdiem, kuriem piemīt bioloģiskā iedarbība un tie darbojas kā dabīgie antioksidanti. Antioksidanti cilvēka organismā palīdz atbrīvoties no brīvajiem radikāļiem, kuri izraisa šūnu bojājumus, novājinot imūnsistēmu un veicinot infekciju, un dažādu slimību attīstīšanos, tādēļ būtu vērts plašāk pētīt antioksidantu saturu medū izmantojot ķīmiskās analīzes, jo tas ir pakārtots patērētāju interesēm. Ja daļu no ikdienā patērētajiem saldīnātājiem aizvietotu ar medu, tas radītu antioksidantu pieaugumu cilvēku uzturā.² Kodolmagnētiskās rezonanses spektroskopija ir viena no precīzākajām analīzes metodēm pētniecībā. Pēdējos gados NMR ir ieguvusi lielāku atzinību kā iedarbīga metode, kas spējīga pārraudzīt dažādus ķīmiskos savienojumus viena eksperimenta ietvaros īsā laikā un kvantitatīvi noteikt molekulāro grupu relatīvo daudzumu.³⁻⁴

Darba mērķis: izpētīt kvalitatīvas medus sekundāro metabolītu noteikšanas iespējas izmantojot kodolu magnētisko rezonansi dažādas botāniskās izcelsmes paraugiem.

Darba uzdevumi:

- Aplūkot zinātnisko literatūru par medū sastopamajiem sekundārajiem metabolītiem;
- pielāgot paraugu sagatavošanu polāru/nepolāru savienojumu pētīšanai;
- veikt kvalitatīvās analīzes medus paraugiem;

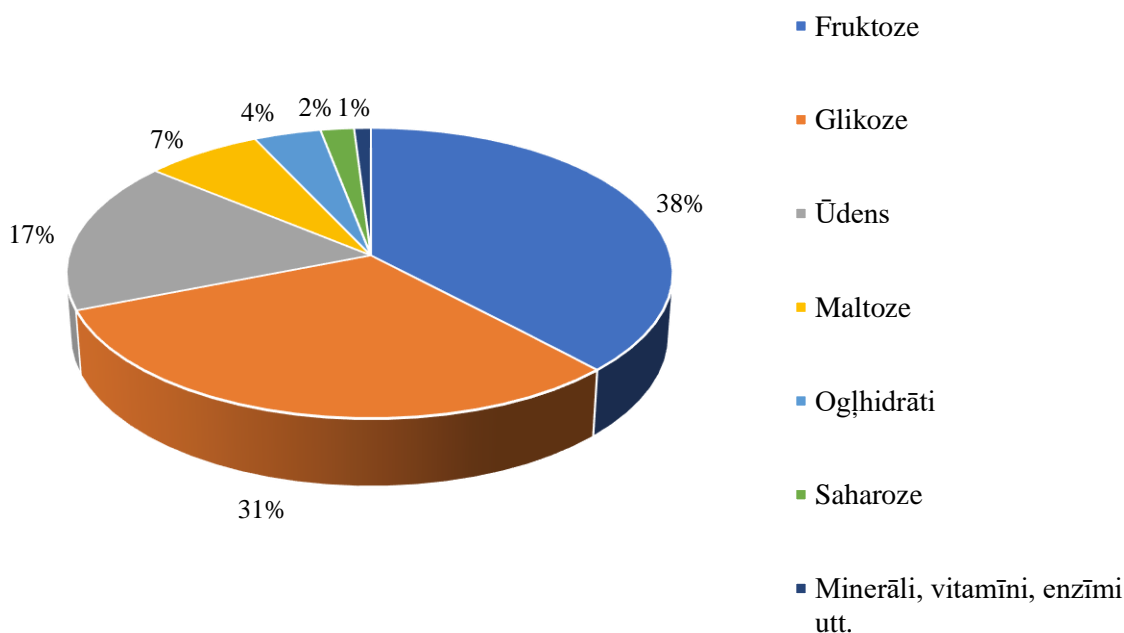
1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Dabīga medus veidošanās, sastāvs un īpašības

Medus ir salds, viskozs pārtikas produkts, ko ražo medus bites un daži tiem radniecīgi kukaiņi. Bites ražo medu no augu cukuru saturošiem sekrētiem (ziedu nektāra) vai no citu kukaiņu sekrētiem (tādiem kā medus rasa), veicot regurgitāciju, iedarbojoties ar fermentiem un iztvaicējot ūdeni. Bites glabā medu vaska konstrukcijās, ko dēvē par medus kārēm. Medus bišu (*Apis ģints*) ražotā medus daudzveidība ir ļoti labi zināma tā komerciālās pieejamības un patēriņa dēļ. Medus tiek ievākts no savvaļas bišu kolonijām vai no domesticētu bišu stropiem, šī prakse ir zināma kā biškopība jeb dravniecība.⁵

Barības meklēšanas laikā bites piekļūst daļai no savāktā nektāra, lai nodrošinātu lidošanas muskuļiem metabolisko aktivitāti, savukārt lielākā daļa no savāktā nektāra ir paredzēta regurgitācijai, sagremošanai un uzglabāšanai medus veidā. Aukstā laikā vai tad, kad citi barības avoti izsīkst, pieaugušās bites un to kāpuri izmanto pārtikā medus krājumus.⁶

Medus ķīmiskā sastāva lielāko daļu veido dažādi cukuri, kas arī veido lielāko daļu no enerģētiskās vērtības. Parasti medus sastāvu veido fruktoze, glikoze, ūdens, maltoze.⁷



1.1.att. Medus sastāva diagramma

Ogļhidrāti. Veido lielāko medus daļu – ap 82 %. Tajā esošie ogļhidrāti ir monosaharīdi: fruktoze (38,2 %) un glikoze (31 %); un disaharīdi (~9 %) – saharoze, maltoze, izomaltoze, maltuloze, turanoze un kojibioze. Ir arī nedaudz oligosaharīdu (4,2 %), ieskaitot erlozi, teanderozi un panozi, kas veidojas nektārā un medus rasā esošo augstāko saharīdu nepilnīgas sašķelšanās rezultātā.⁸

Olbatumvielas un aminoskābes. Medus satur vairākus fermentus, ieskaitot invertāzi, kas pārvērš saharozi glikozē un fruktozē; amilāzi, kas sašķeļ cieti mazākos fragmentos; glikozes oksidāzi, kas pārvērš glikozi glikonolaktonā, kurš savukārt dod rezultātā glikonskābi un ūdeņraža peroksīdu; katalāzi, kas sašķeļ glikozes oksidāzes veidoto peroksīdu ūdenī un skābeklī; un skābo fosforilāzi, kas atšķeļ neorganiskos fosfātus no organiskajiem fosfātiem. Medus satur 18 brīvas aminoskābes, no kurām visvairāk ir prolīna.⁸

Vitamīni, minerālvielas un antioksidanti. Medus satur B vitamīnu (riboflavīna, niacīna, folskābes, pantotēnskābes un B6 vitamīna). Tas satur arī askorbīnskābi (C vitamīnu) un tādas minerālvielas kā kalcijs, dzelzs, cinks, kālijs, fosfors, magnijs, selēns, hroms un mangāns. Galvenā antioksidantu grupa medū ir flavonoīdi, viens no kuriem, pinocembrīns, ir unikāls medum un bišu propolisam. Askorbīnskābe, katalāze un selēns ir arī antioksidanti. Kopumā ņemot, jo tumšāks ir medus, jo labākas ir tā antioksidanta īpašības.⁸

Citi savienojumi. Medus arī satur tādas organiskās skābes kā etiķskābe, butānskābe, skudrskābe, citronskābe, dzintarskābe, pienskābe, ābolskābe, piroglutamīnskābe un glikonskābe, kā arī vairākas aromātiskās skābes. Galvenā medū esošā skābe ir glikonskābe, kas veidojas, glikozes oksidāzei sašķeļot glikozi. Medus satur arī hidroksimetilfurfurolu – dabīgos cukuros, ja pH zem 5.⁸

Medus ir populārs tautas medicīnas līdzeklis pret apdegumiem un citiem ādas bojājumiem. Pētījumu rezultāti liecina, ka tas palīdz otrās pakāpes apdegumu dziedināšanā 4-5 dienas ātrāk nekā citi līdzekļi apsējiem, un pēcoperācijas infekcijas, kas apstrādātas ar medu, sadzīst ātrāk un ar mazākiem nelabvēlīgiem efektiem kā ārstējot ar marles pārsējiem ar antiseptiskiem līdzekļiem. Medus izmantošanai dažādu citu brūču ārstēšanā rezultātiem ir zema kvalitāte, un viennozīmīgus secinājumus izdarīt nevar. Pētījumu rezultāti neliecina, ka medus produktus vajadzētu izmantot venozā stāze radīto čūlu vai ieaugušu īkšķa nagu ārstēšanai.⁹ Dažus lietošanai medicīnā paredzētus medus produktus Amerikas Savienotās Valstis (ASV) pārtikas un zāļu pārvalde (UFSDA) apstiprināja lietošanai mazu brūču un apdegumu ārstēšanā.¹⁰

Medus kopš Senajiem laikiem tiek lietots kā antibiotikām pielīdzināts līdzeklis, kuru mūsdienās šādam nolūkam izmanto arī tradicionālās medicīnas un fitoterapijas praktizētāji. Medus antibakteriālo iedarbību pirmoreiz demonstrēja Nīderlandes zinātnieks Bernardus Adrianus van Ketels 1892. gadā. Kopš tā laika vairāki pētījumi ir pierādījuši, ka medum piemīt plaša antibakteriāla aktivitāte pret grampozitīvām un gramnegatīvām baktērijām, kaut gan šī spēja plaši mainās dažādiem medus veidiem. Antibiotiku rezistentu baktēriju izplatīšanās dēļ pēdējās vairākās desmitgadēs interese par medus antibakteriālo īpašību izpēti ir atjaunojusies. Medus sastāvdaļas saskaņā ar provizoriskiem pētījumiem, kas potenciāli izmantojamas kā antibiotikas, iekļauj metilglioksālu, ūdeņraža peroksīdu un rojalizīnu (dēvēts arī par defenzīnu-1).¹¹

Medus kā antibakteriāla līdzekļa izmantošana ir zināma kopš seniem laikiem. Ir vairāki pētījumi saistībā ar medus antibakteriālo iedarbību,¹² kas, kā šķiet, iedarbojas gan uz grampozitīvajām, gan uz gramnegatīvajām baktērijām, kaut gan pirmās ir jutīgākas. Visi 1.1. tabulā apkopotie pētījumi tika veikti, izmantojot agara diska difūzijas testu un novērtējot dažāda veida medus minimālo inhibējošo koncentrāciju (MIC) un minimālo baktericīdo koncentrāciju (MBC) dažādām baktērijām. Kopumā monofloram (vienas ziedu sugas) medum ir lielāks antibakteriāls efekts nekā dažādu ziedu medum.¹³ Šo spēju lielākoties nosaka dažas tā matricas fizikālās īpašības, piemēram, mazā ūdens aktivitāte (A_w), lielais osmotiskais spiediens, zemais pH un mazais olbaltumvielu saturs, kas kavē baktēriju augšanu. Papildus šīm fizikālajām īpašībām medus antibakteriālo iedarbību nosaka arī glikozes oksidāze, H_2O_2 un daži fenolu savienojumi, piemēram, pinocembrīns, ceriņskābe un daži citi savienojumi.¹⁴ Neseni pētījumi koncentrējas uz metilglioksāla klātbūtnes un lomas, it sevišķi tējas koka (*Leptospermum scoparium*) medū, jo to uzskata par vislielākā mērā atbildīgu par medus neperoksīdu pretbakteriālo iedarbību.¹⁵

1.1. tabula

Daži medus antibakteriālo iedarbības piemēri

Baktēriju celms	Klīniskā nozīme
<i>Helicobacter pylori</i>	Peptiska čūla, ļaundabīgi kuņģa audzēji, hronisks gastrīts
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Diabētiskās pēdas čūlas, brūču infekcija, urīnceļu infekcijas
<i>Escherichia coli</i>	Urīnceļu infekcijas, caureja, septicēmija, brūču infekcijas
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberkuloze
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sadzīve iegūtās un nozokomiālās infekcijas
<i>Proteus spp.</i>	Septicēmija, urīnceļu infekcijas, brūču infekcijas
<i>Salmonella enterica</i>	Zarnu infekcija, drudzis
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Inficēšanās caur valējām brūcēm, katetrām un elpošanas caurulītiem
<i>Vibrio cholerae</i>	Holēra

1.2. Medū sastopamie sekundārie metabolīti

Pirolizīna alkaloidi (PA). Tie ir augu sekundārie metabolīti. Ir ziņots, ka PA piemīt hepatotoksiska, mutagēna un kancerogēna iedarbība; tā ir ievērojama dabīgu toksīnu grupa, kas iedarbojas uz mājlopiem, savvaļas dzīvniekiem un cilvēkiem. Līdz šim brīdim pasaulē ir paziņots par vairāk nekā 10 000 PA saindēšanās gadījumiem. Vairākos rakstos ir ziņota informācija par PA konstatēšanu dažādos pārtikas produktos, ieskaitot medu, pienu, gaļu, olas, tēju un salātus. Pārskata rakstā tika apkopota PA piesārņojums pārtikā, jaunākās atklāšanas metodes un regulējošās normas un iestādes dažādās valstīs, cerot piedāvāt efektīvus risinājumus, lai minimizētu PA patērēšanu kopā ar ēdienu.¹⁶

Tiek uzskatīts, ka medū esošie PA varētu iekļūt tajā ar ziedputekšņiem, ko nejauši ienes nektāru vācošas bites.¹⁷ Biškopji arī var tīšām vai netīšām nogādāt ziedputekšņus medū tā izņemšanas laikā vai pēc tam. PA un pirolizidīna alkaloidu-N-oksīdu (PANO) koncentrācijas, kas atrasti daudzos medus veidos, saskaņā ar publicētiem riska novērtējumiem, varētu izraisīt tādas hroniskas slimības kā aknu ciroze, plaušu hipertensija un vēzis, ja šādi medus veidi regulāri tiek patērēti ieteicamajās 15-25 g porcijās vai augstākos patēriņa līmeņos, par kādiem ziņoja medus patērētāji daudzās valstīs. Piemēram, Austrālijā lielākie medus patērētāji 2-4 gadus vecu personu grupā ēd 28,6 g medus dienā, savukārt vecāki patērētāji, 5-65 gadus veci, ēd 40-65 g dienā. Tika ziņots, ka sieviete, kas grūtniecības laikā patērēja 20-30 mg PA dienā, t. i., daudzumā, līdzīgā tam, kāds ir sastopams *Echium* medū, dzemdēja bērnu, kas sirga ar letālu aknu bojājumu.¹⁸

Bišu savākto ziedputekšņu granulas uztura bagātinātajos satur nektāru (ko bites izmanto kā saistvielu) un ziedputekšņu graudiņus. Nesens pētījums, kas pētīja PA bišu produktos Eiropā, atklāja, ka 11 no 12 ziedputekšņu produktiem saturēja PA vidējā koncentrācijā 576,0 µg/kg, savukārt 0,6 un 15,5 µg/kg tika noteikti propolisā un peru piena produktos.¹⁹

Polifenoli. Fenola savienojumi jeb polifenoli ir viena no svarīgākajām savienojumu grupām, kas rodas augos, kuros tie ir plaši izplatīti. Polifenoli ir arī augu sekundārās vielmaiņas produkti. Flavonoīdi un fenolskābes (gan benzoskābes, gan solonskābes atvasinājumi) ir svarīgākās polifenola klases un pašlaik ir jau aprakstīti vairāk nekā 5000 savienojumu. Uztura ziņā flavanoīdus var klasificēt kā flavonolus. Tiem piemīt plaša mēroga bioloģiskās iedarbības, tādas kā antibakteriālas, pretiekaisuma, antialerģiskas un antitrombotiskas. Epidemioloģiskie pētījumi norāda uz to iespējamo nozīmi sirds un asinsvadu slimību un infekcijas slimību. Flavonoīdi darbojas kā antioksidanti dažādos veidos.² Medū izplatītāko organisko savienojumu koncentrācijas apkopotas 1.2. tabulā.⁴

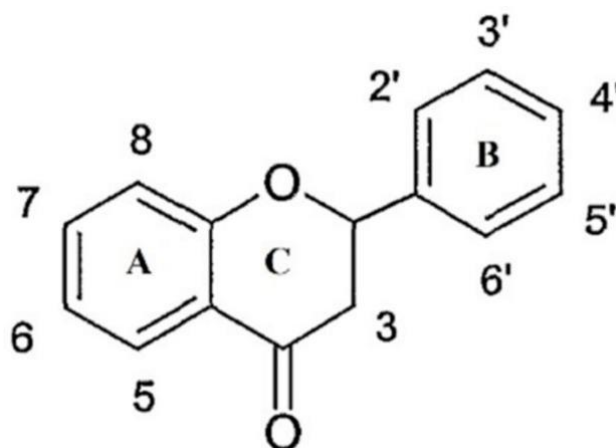
1.2.tabula

Medū flavanoīdu, fenolo skābju koncentrācijas

Flavonoīdi	Koncentrācija, µg/kg	Fenolās skābes	Koncentrācija, µg/kg
Apigenīns	8	Vanilīnskābe	4
Kampferols	5	Kofeīnskābe	2
Kvercetinīns	5	Sīringkābe	6
Rufīns	5	Ferolskābe	1226
Muricetinīns	2	Hlorgenskābe	2
Galangīns	0,4	Galluskābe	4

Tika atzīts, ka šīs vielas izdara galveno ieguldījumu medus antioksidanta iedarbībā, kas lielākoties ir saistīta ar brīvo radikāļu likvidētāju spēju veidot stabilākas un mazāk toksiskas molekulas. Fenolu savienojumi stabilizē brīvos radikāļus, kad tie atšķēļ ūdeņradi no kādas to hidroksilgrupas; aktivitātes pakāpe ir saistīta ar to hidroksilgrupu skaitu.²⁰ Flavonoīdi ir dabīgi ķīmiskie savienojumi ar nelielu molekulmasu, lielākoties tie šķīst ūdenī. Tie ir veidoti no diviem benzola gredzeniem ar trīs oglekļa atomu lineāru ķēdi tiem pa vidu (C6-C3-C6); šī

struktūra bieži vien pārkārtojas, veidojot trīs gredzenus ar 15 oglekļa atomiem, kas tiek apzīmēti ar A, B un C. (Skat. 1.2. attēlu)



1.2.att. Tipisko flavonoīdu struktūra

Parasti šiem savienojumiem ir vismaz divas fenolgrupas (OH), un tie ir bieži saistīti ar cukuriem (glikozīdi), galvenokārt glikozi kopā ar ksilozi, galaktozi, ramnozi, arabinozi, rutinozīdu un glikoramnozi; kad flavonoīdi nav saistīti ar cukuriem, tos dēvē par aglikoniem. Flavonoīdi tiek klasificēti pēc C gredzena oksidēšanas līmeņa: flavanoli, flavoni, flavanonoli, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, antociānīni un antociānidīni. Medū visvairāk ir flavonu, flavanolu un flavanolu.²¹ Flavonoīdu apakšklases piemēri tiek apkopoti 1.3. tabulā.

1.3.tabula.

Flavonoīdu apakšklases un piemēri

Flavonoīdu apakšklase	Savienojumi
Flavonoli	Kvercetīns, Kampferols
Flavoni	Apigenīns, Luteolīns
Flavanoli	Epikatehīns, Gallokatehīns
Flavanonoli	Naringenīns, Hesperidīns
Izoflavoni	Daidzeīns, Genisteīns
Antociānidīni	Cianidīns

Fenolskābes (fenolkarbonskābes) satur fenola gredzenu un vismaz vienu organiskās karbonskābes funkcionālo grupu; tās var iedalīt pēc struktūras: C6-C3 (piem., p-kumarskābe, ferulskābe un kafijskābe), C6-C2 (piem., acetofenoni un feniletīnskābes) un C6-C1 struktūra (piem., cerīnskābe, vanilīnskābe un gallusskābe). Parasti lielākā daļa no šiem savienojumiem ir

savienoti ar auga strukturālajām sastāvdaļām (celulozi, lignīnu), bet var būt arī ar citiem organisko molekulu veidiem, piemēram, glikozi, citiem cukuriem vai flavonoīdiem.²²

1.3. Kodolu magnētiskās rezonanses spektroskopijas darbības princips, priekšrocības un trūkumi

Kodolu magnētiskās rezonanses spektroskopija (NMR) ir spektroskopijas metode lokālu magnētisko lauku novērošanai ap atomu kodoliem. Paraugs tiek novietots magnētiskajā laukā, un tiek ģenerēts NMR signāls, notiekot parauga atomu ierosmei ar radioviļņiem kodolu magnētiskajā rezonansē, kas tiek detektēta ar jutīgiem radiouztvērējiem. Molekulu iekšējais magnētiskais lauks ap atomu molekulā maina rezonances frekvenci, ļaujot piekļūt molekulas un tās atsevišķo funkcionālo grupu elektroniskās struktūras detaļām. Tā kā lauki ir unikāli vai ļoti raksturīgi atsevišķiem savienojumiem, mūsdienu organiskās ķīmijas praksē NMR spektroskopija ir noteicoša metode monomolekulāru organisko savienojumu identificēšanai.²³

NMR princips parasti iekļauj trīs secīgus soļus. Magnētisko kodola spinu izlīdzināšana (polarizācija), konstants magnētiskais lauks B_0 . Šīs kodola spinu izlīdzināšanas izjaukšana ar vāju svārstīgu magnētisko lauku, ko parasti dēvē par radiofrekvences (RF) impulsu. Izjaukšanas rezultātā parauga kodolu raidīto elektromagnētisko viļņu detektēšana un analīze.²³

Līdzīgi tam bioloģiskās ķīmijas speciālisti izmanto NMR olbaltumvielu un citu sarežģītu molekulu identificēšanai. Papildu identifikācijai NMR spektroskopija sniedz detalizētu informāciju par molekulu struktūru, dinamiku, reakcijas stāvokli un ķīmisko vidi. NMR izplatītākie veidi ir protonu un oglekļa-13 NMR spektroskopija, bet tā ir piemērota jebkāda veida paraugiem, kas satur kodolus, kuriem ir spins.²³

Mūsdienu augsta lauka NMR iekārtās tiek izmantoti elektromagnēti ar supervadītspējas vadiem, kam ir nepieciešama kriogēna dzesēšana, toties tie rada viendabīgus un stabilus magnētiskos laukus ar indukciju līdz pat 23,5 T un ^1H -NMR spektroskopijai frekvencēs līdz pat 1 GHz. Tie ir instrumenti ar ārkārtīgi zemu jutību. Izmantojot augsta lauka kodola magnētiskā rezonanses spektrometrus, ir iespējams atšifrēt bioloģisko makromolekulu konformāciju. Augsta lauka magnētiskās rezonanses attēldiagnostika (MRI) iekārtas atklāj arvien smalkākas smadzeņu struktūras. Lai atrastu vietu apjomīgajiem magnētiem un izpildītu drošības prasības, augsta lauka kodola magnētiskā rezonanses iekārtas darbojas aizsargātās telpās. Piemēram, augsta lauka NMR spektrometri parasti nav atrodami strādājošā ķīmiskajā laboratorijā blakus gāzes hromatogrāfam vai infrasarkanajam spektrometram. Līdz ar to laiks no parauga sagatavošanai līdz NMR spektra iegūšanai pagarinās, jo reālajai mērīšanai nāk klāt parauga nogādāšana līdz spektrometram.²³

NMR spektri ir unikāli, labi izšķirami, analītiski izsekojami un bieži vien ļoti labi prognozējami mazām molekulām. Dažādas funkcionālās grupas ir acīmredzami atšķiramas, un identiskas funkcionālās grupas ar dažādiem aizvietotājiem blakus tāpat raida atšķirīgus signālus. NMR ir lielā mērā aizstājusi tradicionālās “slapjās” ķīmiskās analīzes, piemēram, krāsu reakcijas vai hromatogrāfiju. Trūkums ir tas, ka ir vajadzīgs relatīvi liels attīrītas vielas daudzums – 2-50 mg, kaut gan to var atgūt. Vēlams, lai paraugs būtu izšķīdināts šķīdinātājā, jo cietvielu NMR analīzei ir nepieciešama atvēlētā maģiskā leņķa rezonanses spina(MAS), un tās var nedot vienādi labi izšķirtus spektrus. NMR ilgums ir relatīvi liels un gaidīšana rindā pirms mērīšanas, un līdz ar to tā nav piemērota ātri notiekošu parādību novērošanai, jo veido tikai vidēju spektru. Kaut gan lieli piemaisījumu daudzumi ir redzami NMR spektrā, pastāv labākas metodes piemaisījumu detektēšanai, piemēram augstsefektīvā šķidruma hromatogrāfija. NMR sākotnēji nav ļoti jutīga – tomēr lielākās frekvencēs jutība ir augstāka.²³

1.4. Organisko savienojumu kvantitatīva noteikšana medū izmantojot ¹H-NMR

Kvantitatīvās metodes tiek veiksmīgi izmantotas kodolu magnētiskās rezonanses (NMR) spektroskopijā. Metode, kas izmanto ¹H-NMR spektroskopiju, tika izstrādāta, lai vienlaikus noteiktu 13 analizējamās vielas medū bez iepriekšējiem atdalīšanas vai koncentrēšanas soļiem. Metode veiksmīgi tika izmantota, lai noteiktu karbonskābes (etiķskābi, skudrskābi, pienskābi, ābolskābi un dzintarskābi), aminoskābes (alanīnu, fenilalanīnu, prolīnu un tirozīnu), ogļhidrātus (α - un β -glikozi un fruktozi), etanolu un hidroksimetilfurfuroļu eikalīptu, viršu, lavandas, apelsīnu ziedu, māršila un rozmarīna medū. Kvantitatīvā analīze tika veikta, izmantojot katras analizējamās vielas signāla apgabalu medus spektros kopā ar ārējiem standartiem. Signāla apgabalu regresijas analīze salīdzinājumā ar koncentrācijas grafikiem, kas tika izmantoti katras analizējamās vielas kalibrēšanai, norāda uz labu lineāro atkarību virs medū atrodamajiem koncentrācijas diapazoniem, ar korelācijas koeficientiem, lielākiem par 0,990, 13 kvantitatīvi noteiktajām analizējamajām vielām.²⁴

Tā kā NMR spektri satur visu savienojumu rezonanses, kuru koncentrācija ir lielāka par noteikšanas sliekšni, tos var veiksmīgi izmantot kvantitatīvajai analīzei, ja tiek ņemti vērā noteikti tehniskie un instrumentālie parametri; vēl jo vairāk, lai iegūtu precīzus kvantitatīvos rezultātus, signāli varētu nepārklāties un būtu pareizi integrēti. Kā tika pierādīts daudziem dabīgiem produktiem, ¹H-NMR spektroskopija dod labu vispārīgu ainu visiem organisko savienojumu tipiem paraugā. Plašāk publicētās metodes izmanto iekšējos standartus, kaut gan ir piemēri, kad tika piemēroti ārējie standarti.²⁴

Pēdējos gados augstas izšķirtspējas NMR tehniku izmantošana medus izpētē ir ieinteresējusi vairākas pētnieku grupas, un rezultātā tika veikti viendimensijas un divdimensiju

NMR eksperimenti, lai raksturotu un klasificētu lielu medus veidu daudzumu. Augstas izšķirtspējas NMR spektroskopija kombinācijā ar daudzfaktoru datu analīzi tika izmantota, lai analizētu metabolītus, atklātu medus sastāva variācijas, atrastu biomarķierus un nepārprotami izskaidrotu medus veidu atšķirībām svarīgāko savienojumu molekulāro struktūru.²⁵

Tika veikta arī kvantitatīvā analīze. Izmantoja selektīvus korelācijas spektroskopija NMR eksperimentus, lai iegūtu piecu aminoskābju un etanola relatīvās koncentrācijas medū. Pētījums norādīja uz problēmām, kas parādījās šim paraugu veidam; vienu izraisīja ļoti lielā koncentrāciju atšķirība starp galvenajām un mazākuma sastāvdaļām, un otru – cukuru nelabvēlīgā ietekme uz viskozitāti un NMR relaksācijas īpašībām. Lielāku medus koncentrāciju gadījumā tika novērota ievērojama jutības samazināšanās pret dažām aminoskābēm, tas tika izskaidrots medus paraugu lielās viskozitātes dēļ un no tā izrietošās relaksācijas ātruma palielināšanās, izmantojot TOCSY spinu bloķēšanu.²⁶

Pētījuma mērķis bija izstrādāt eksperimentālu procedūru, balstoties uz ¹H-NMR spektroskopiju, lai kvalitatīvi noteiktu metabolītus medū, kas ļautu iegūt labāko signālu izšķirtspēju, precīzi veikt kvantitatīvo analīzi un saīsināt tās laiku.²⁶

NMR spektroskopijai ir vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar citām metodēm, piemēram, tās spēja sniegt informāciju par plašu sastāvdaļu klāstu vienā analīzē, tās neinvazīvā pieeja un relatīvi ātrā datu iegūšana. NMR mērījumi kombinācijā ar hemometriskajām metodēm jau tika ieteikti kā efektīvi rīki tādu pārtikas produktu autentiskuma novērtējumos kā, piemēram, safrāns, grauzdēta kafija, pārtikas eļļas, piens un medus.²⁷

1.5. Hemometrija, galveno komponentu analīze

Hemometrija apvieno matemātiku, statistiku un loģiku, lai noformētu vai izvēlētos optimālas mērīšanas procedūras un eksperimentus. Tā ļauj iegūt ķīmisko informāciju, analizējot ķīmiskos datus, un palīdz izprast ķīmiskās sistēmas. Pēdējos gados hemometrija ir kļuvusi par svarīgu analītiskās ķīmijas sastāvdaļu. Pateicoties tās metodēm, tiek dota iespēja efektīvi analizēt datus, kas iegūti no dažādiem instrumentiem. Citā gadījumā šādu lielu datu analīze ir laikietilpīgs process, un tas var beigties ar nepārdomātu interpretāciju vai secinājumiem.²⁸ Lielākā daļa analītiķu saprot nepieciešamību lietot statistiku ķīmiskajā analīzē un izmanto to, lai aprēķinātu vidējas noteikšanas robežas un to novirzes hipotēžu pārbaudes. Bieži tieši šos vienkāršos paņēmienus sauc par hemometrisku pieeju analītiskajā ķīmijā, un tikai neliels daudzums pētnieku izvēlās izmantot hemometriju datu analīzei. Hemometrija ir atradusi daudzus pielietojumus visdažādākajās ķīmijai tuvās un tālās jomās. To lieto fizikālajā ķīmijā kinētiskas izpētei,²⁹ organiskajā ķīmijā, lai prognozētu savienojumu aktivitāti pēc to struktūras (QSAR),³⁰ polimēru ķīmijā, teorētiskajā un kvantu ķīmijā.³¹ Hemometrija tiek izmantota plašā

nozaru diapazonā – no alus darītavas līdz pat astronomijai. To piemēro tiesu strīdu risināšanai par vides aizsardzību³² un pusvadītāju razošanas kvalitātes kontrolei.³³

Ķīmijā prasība pēc datu analīzes izpētes bieži vien saistīta analizējot sarežģītus paraugus, piemēram, vides paraugus kā arī ar struktūru un īpašību attiecību jomā. Hemometrijas disciplīna paredz vairākas metodes šādu problēmu risināšanai. Pēdējo gadu laikā daudzas no šīm metodēm kļuva pieejamas personālajiem datoriem, izmantojot statistikas programmatūras pakotnes vai īpašu programmatūru, ko izstrādājuši ķīmijas nozares speciālisti. Tagad ātrai piekļuvei atrodas visdažādākās hemometrijas metodes, kuras ir nepieciešams izmantot, jo ir sarežģījušās aktuālās problēmas ķīmijā. Galveno komponentu analīze (PCA) ir lieliska metode datu analīzei ķīmijā. Klasteru analīze pēta objektu dabisko grupu esamību. Kad klasteri var tikt atrasti ir jāatrod to līdzības starp visiem dalībniekiem. Vissvarīgākā metode daudznozaru datu analīzes izpētei ir datu dimensijas un grafiskā attēlojuma samazināšana. Metode, kas būtībā ir koordinātu sistēmas rotācija, tiek saukta arī par “Eigenvektora-projekciju”.³⁴

Galveno komponentu analīze ir daudzveidīgā statistiskās analīzes tehnoloģija, ko izmanto, lai samazinātu telpas izmēru lielumu ar minimālo lietderīgās informācijas zudumu. To piedāvāja K. Pīrsons 1901. gadā, bet pēc tam detalizēti to tālāk izstrādāja amerikāņu ekonomists un statistiķis G. Hottelings. No matemātiskā skata punkta galveno komponentu analīze ir ortogonāla lineāra pārveidošana, kas atspoguļo datus no sākotnējās telpas uz jaunu mazākas dimensijas telpu. Turklāt jaunās koordinātu sistēmas pirmā ass tiek veidota tā, lai datu dispersija gar to būtu maksimāla. Otrā ass tiek veidota ortogonāli pirmajai tā, lai datu dispersija gar to būtu maksimāla to atlikušajiem iespējamiem. Pirmā ass tiek saukta par pirmo galveno komponentu, otro – otro utt.³⁵ PCA ir visiecinātākā metode hemometrijā. Tā samazina datu kopu izmērus un vienkāršo datus, lai tos vāretu viegli un jēgpilni interpretēt.³⁶

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1.1. Darbā izmantotā aparātūra

- Kodolu magnētiskās rezonanses spektrometrs **Fourier300**. Ražotājs: *Bruker*;
- Analītiskie svāri **KERN & Sohn**, s/n WB0810231, precizitāte $\pm 0,1$ mg;
- Rotācijas ietvaicētājs **Rotavapor R – 300**, Ražotājs: *Buchi*, $t_{\max} - 220$ °C;
- Vakuumpumpis. Ražotājs: *VACUUBRAND*, s/n 31514001 – 313078;
- Laboratorijas centrifūga **LMC – 3000**. Ražotājs: *Biosan*, s/n 01020817050053;
- Analītiskie svāri **BOECO Germany**, s/n WL083345, precizitāte $\pm 0,1$ mg;
- Svāri **KERN 440-33**, s/n WCO299684, precizitāte $\pm 0,01$ g;
- Žāvēšanas skapis. Ražotājs: *Memmert*, $t_{\max} - 220$ °C, , precizitāte $\pm 0,5$ °C;
- pH-metrs **AM1605**. Ražotājs: *Adrona*, s/n 10320002, precizitāte $\pm 0,01$ pH;
- Datorprogramma: *MestReNova*, versija 14.2.1;
- Datorprogramma: *Minitab*. versija 17.1.0;

2.1.2. Darbā izmantotie reaģenti

- D₂O MagniSolv™, NMR $\geq 99,9$ % (*Sigma Aldrich*, cat. N^o 151882);
- Konc. H₃PO₄ (ACS reagent, ≥ 85 %) (*Sigma Aldrich*, N^o 695017);
- KH₂PO₄ (ACS reagent, $\geq 99,0$ %) (*Redi-Dri™*, cat. N^o 795488);
- NaN₃ (ReagentPlus®, $\geq 99,5$ %) (*Sigma Aldrich*, N^o S2002);
- CHCl₃ (Honeywell, $\geq 99,0$ %) (*Sigma Aldrich*, cat. N^o 32211);
- CDCl₃ (Eurisotop, $\geq 99,5$ %) (*Sigma Aldrich* N^o 151823);

2.2. Medus paraugu raksturojums

Medus paraugu ievākšana veikta 2019. gada intervālā no marta līdz 2020. gada decembrim. Medus paraugi tika ievākti Latvijā, kā arī Lietuvā un klasificēti kā dabīgi medus paraugi. Pētījumā tika izmantoti 110 medus paraugi. 84 paraugi ir no Valsts zinātniskā institūta ‘BIOR’, 20 no Latvijas Biškopības biedrības, 4 paraugi no Lietuvas komerciāli pieejamajiem veikaliem un 2 – komerciālie paraugi no Latvijas. Zināms, ka 32 no tiem ir monoflorāla veida, 36 poliflorāla veida, 23 jaukta veida. Informācija par medus paraugiem apkopota 2.1. tabulā.

Medus paraugu skaits un apzīmējumi

Veids	Apzīmējums	Skaits
Griķu ziedu medus	G	16
Viršu ziedu medus	V	19
Rapšu ziedu medus	R	12
Liepu ziedu medus	L	15
Dažādu ziedu medus	K	8
Bišu amoliņa ziedu medus	B	5
Āboliņa ziedu medus	ĀB	6
Pieneņu ziedu medus	P	9
Pļavas ziedu medus	PĻ	11
Meža ziedu medus	M	9

2.3. Medus NMR analīze deiterētā buferšķīdumā

NMR pudelītē izšķīdināja 200 ± 3 mg analizējamā medus parauga 1 mL D₂O buferšķīdumā. Pārnesa pagatavoto šķīdumu NMR mēģenē un uzņēma ¹H-NMR spektru. Tika uzņemts viens NMR spektrs katram paraugam.

D₂O buferšķīduma pagatavošana

Vārglāzē izšķīdināja 2,04 g KH₂PO₄ un 1,92 mg NaN₃ un 40 mL D₂O. Pievienoja 85% H₃PO₄ līdz buferšķīduma pD sasniedza 4,4.

Analīzes parametri NMR spektrometram

- Laika domēns: 64 000 punktu;
- Manekena skenējumi: 8;
- Miksēšanas laiks: 125 ms;
- Relaksācijas aizture: 1 – 2 s;
- Spektra platums: 6103 Hz;
- Vienas skenēšanas ilgums: 5,37 s ;

- Priekšpiesātināšanas sprieguma līmenis cikla aizkavēšanās un miksēšanas laikā: -40 dbW;

¹H-NMR spektrus apstrādāja ar *MestReNova* programmatūru (versija 14.2.0). Izmantoja Vitakera metodi (*Whittaker smoother*) automātiskā bāzes līnijas korekcijai. α -glikopiranozes dubleta signāls ($\delta = 5,320$ ppm) tika izmantots par atsauci ķīmiskajām nobīdēm. Spektrālais reģions zem 0 ppm un virs 10 ppm, ūdens reģions no 4,75 līdz 5,05 ppm tika izņemti no apstrādes. Izmantoja signāla intensitātes integrāļa summu no 0,01 līdz 0,005 ppm.⁴

2.4. Medus hloroforma ekstraktu NMR analīze

Centrifūgas mēģeni ar magnētisko maisītāju iesvēra manuāli sajauktu medu $12,0 \pm 0,1$ g, pievienoja ar Mora pipeti ūdeni 10 mL. Centrifūgas mēģeni manuāli sakratīja līdz medus izšķīda, pievienoja ar Mora pipeti hloroformu 10 mL. Abus slāņus maisīja uz magnētiskā maisītāja pie 1100 rpm 15 minutes. Augšējo ūdens slāni uzmanīgi dekantēja, hloroformu pārnesa dalāmajā piltuvē. 7,0 mL hloroforma pārnesa apaļkolbā un ietvaicēja pazeminātā spiedienā 100 mbar pie 30 °C 10 minutes uz rotācijas ietvaicētāja. Atlikuma izšķīdināja 550 μ L CDCl₃, tad ar Hamilton šļirci pievienoja 50 μ L 13,2 mM koncentrēta 1,4 – DNB šķīduma (beigu 1,4 – DNB koncentrācija bija 1,20 mM). Iegūto šķīdumu samaisīja un pārnesa NMR pudelītē.

Iekšējā standarta šķīduma pagatavošana

Iesvēra 11,10 mg 1,4 – dinitrobenzola un izšķīdināja 3 mL CDCl₃. Tad piepildīja ar CDCl₃ līdz atzīmei un ieguva 13,2 mM koncentrēta 1,4 – DNB šķīduma.

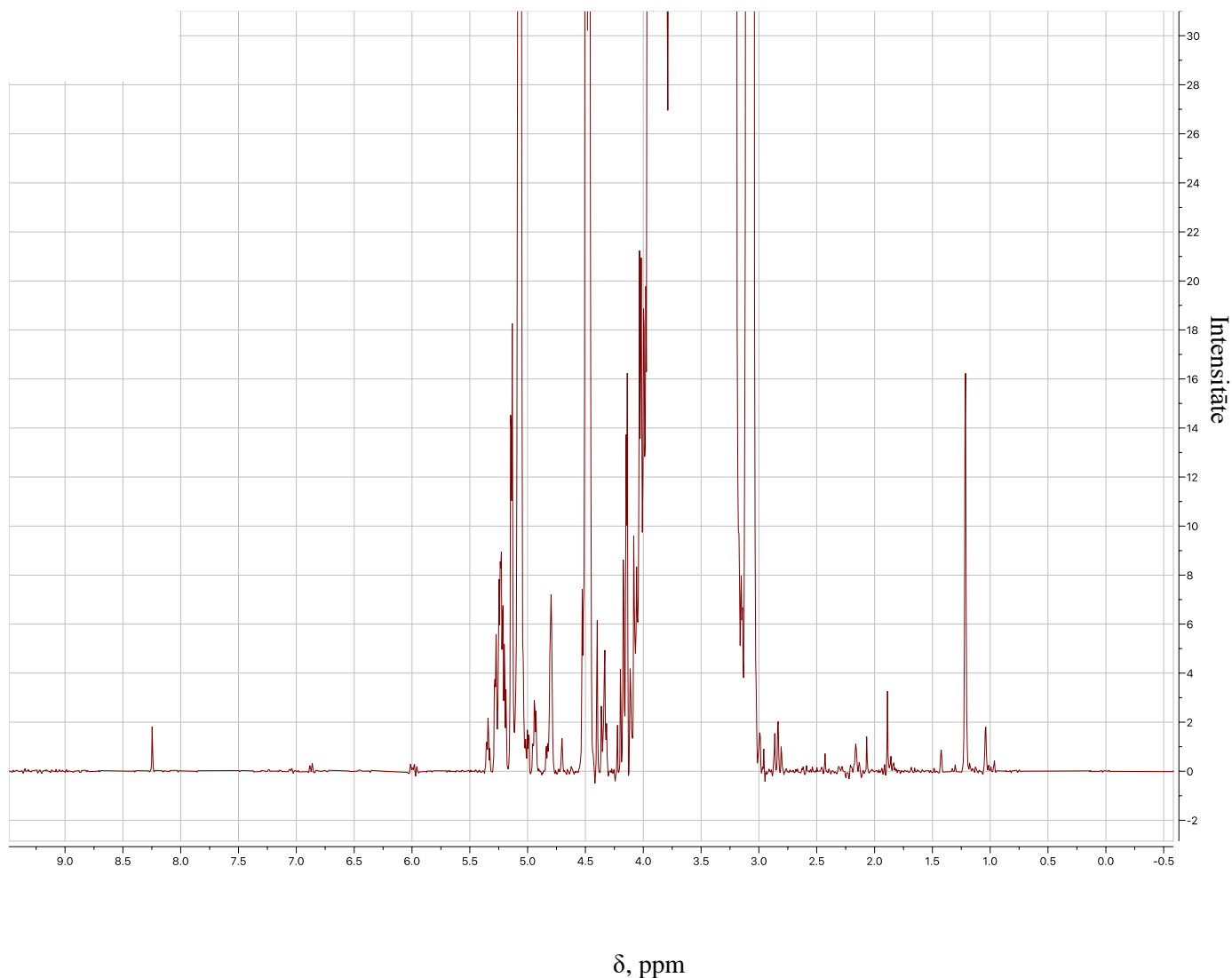
NMR spektra uzņemšanas parametri hloroforma ekstrakcijas metodei

Atlikušais CHCl₃ signāls tika izmantots kā atsauce uz ķīmisko nobīdi ($\delta = 7,2600$ ppm), eksponenciāla apodizācija ar LB = 0,3 Hz, nulles tika aizpildītas 128 000 punktu, manuālas/automātiskas fāzes korekcijas, bāzes līnijas korekcija ar Vitakera metodi (*Whittaker smoother*). 1,4-DNB iekšējā standarta signāls (singlets, $\delta = 8,43$ ppm, integrālis $\Delta\delta/2 = 30$ Hz) tika izmantots savienojuma apskaitīšanai. Skenējuma skaits (NS) = 256 un relaksācijas aizture ir 15 sekundes.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1. Kodolu magnētisko rezonanses spektra analīze

Kodolu magnētiskās rezonanses spektri varētu nodrošināt medus informāciju par dažādu medus sastāvdaļu dabiskajām devām. Eksperimenta mērķis ir iegūt piemērotu ^1H -NMR spektru, lai identificēt organiskos savienojumus. Medus parauga ^1H -NMR spektrs parādīts 3.1. attēlā.



3.1. att. ^1H -NMR spektrs deiterēta ūdens buferšķīdumā (pD 4.4) medus paraugam L

Uzņemtajos NMR spektros zems ķīmiskās nobīdes intervāls no 0,75 līdz 3,00 ppm atbilst alifātiskiem savienojumiem. Ķīmiskās nobīdes centrālais reģions no 3,00 līdz 5,90 ppm ir raksturīgs cukuriem, ogļhidrātiem. Augstākajā ķīmiskās nobīdes intervālā sākot no 6,00 līdz 8,50 ppm ir aromātiskie savienojumi, t.i. polifenolu signālu apgabals. Visas šīs vērtības tika apstriprinātas individuāli uzņemot katram savienojumam savu NMR spektru un salīdzinot ar

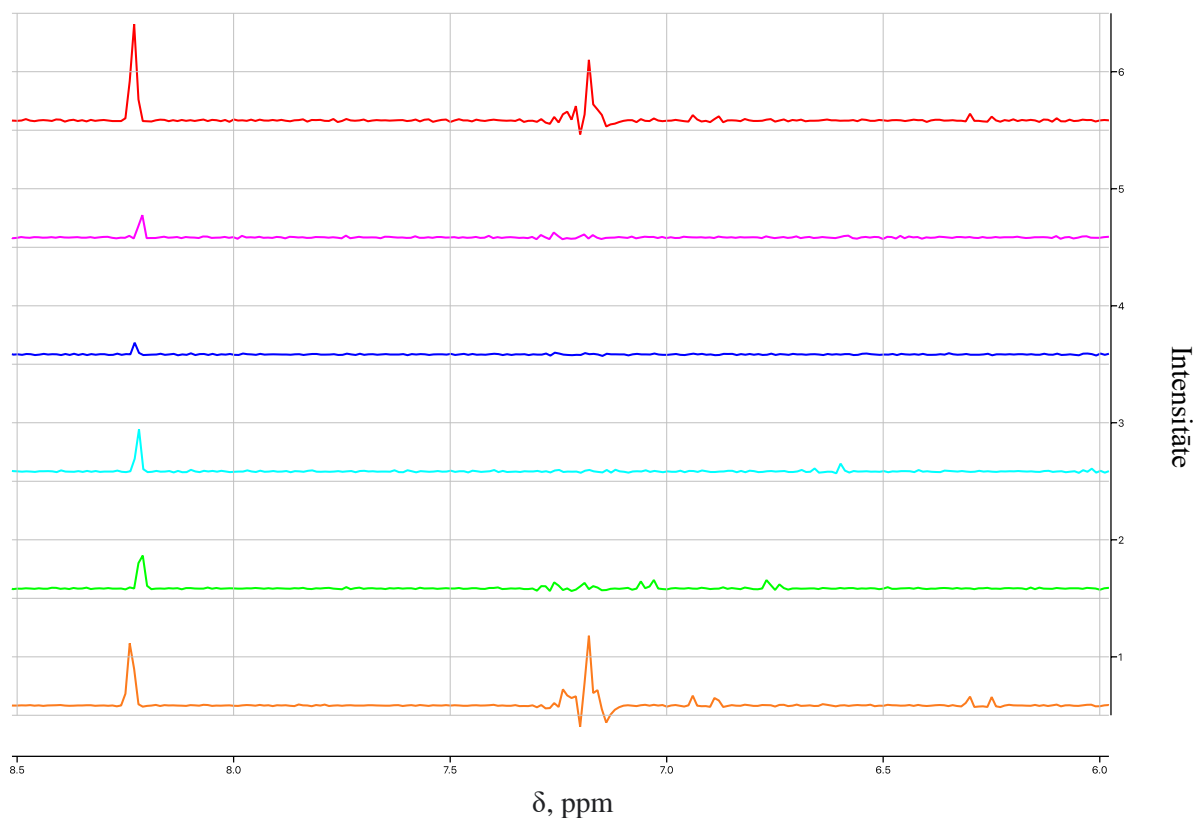
literatūrā apskatītajiem datiem par savienojumu ķīmisko nobīdi. Tomēr organisko savienojumu piederīgo signālu ķīmiskās nobīdes var atšķirties no teorētiskās, tādēļ ir jānovērtē signāls, pēc kā var mēģināt izteikt minējumus par tā piederību attiecīgajam savienojumam.

Kodolu magnētiskās rezonanses medus spektrā ir signāls ar 1,20 ppm ķīmisko nobīdi, kas varētu atbilst etilspirtam. Spektrā skaidri redzami un visintensīvākie signāli intervālā no 3,49-3,96 ppm atbilst fruktozei, no 4,75-5,05 ppm pieder eksperimentā lietojamam buferšķīdumam - deiterētajam ūdenim, duplets, kurš redzams pie 5,05 ppm pieder vienam no izplatītākajiem cukuriem medū - α -glikozei. Kā arī signāls no 6,87 līdz 6,92 ppm provizoriski atbilst tirozīnam vai 2-amino-3-(4-hidroksilfenil)-propānskābei. Signāls ar ķīmisko nobīdi 8,24 ppm ir raksturīgs skudrskābei. Medus paraugu ūdens ekstraktu $^1\text{H-NMR}$ spektrus raksturo galveno šķīstošo metabolītu klātbūtne, starp tiem dominējošā loma ir ogļhidrātiem, savukārt citiem komponentiem, piemēram, organiskajām skābēm un aminoskābēm ir mazāks saturs.³⁷

3.2. Medus sekundāro metabolītu spektru analīze

$^1\text{H-NMR}$ normalizēta spektra paraugu fragmenti parādīti 3.2 un 3.3. attēlos. Visi spektri tiek apstrādāti un negatīvās vērtības noņemtas un izmantota integrāļa intervāla platums ar 0,01 ppm lielu platumu. Polifenolu signālu iespējamais ķīmiskās nobīdes diapazons ir parādīts 3.2 attēlā. Sekundārie metabolīti, t.i. flavonoīdi un fenolās skābes tika identificēti ar NMR. Alifātiskais reģions parādīts 3.3. attēlā. Šajās spektra fragmentu ainās tiek attēlotas uzskatāmas atšķirības starp dažādiem medus paraugiem.

-Virši -Bišu amoliņš -Liepu -Āboliņš -Griķu -Jauktais



3.2. att. Normalizēta $^1\text{H-NMR}$ spektra reģions no 6,00 līdz 8,50 ppm ar atšķirīgu bāzes līniju par 1,20 no signāla intensitātes

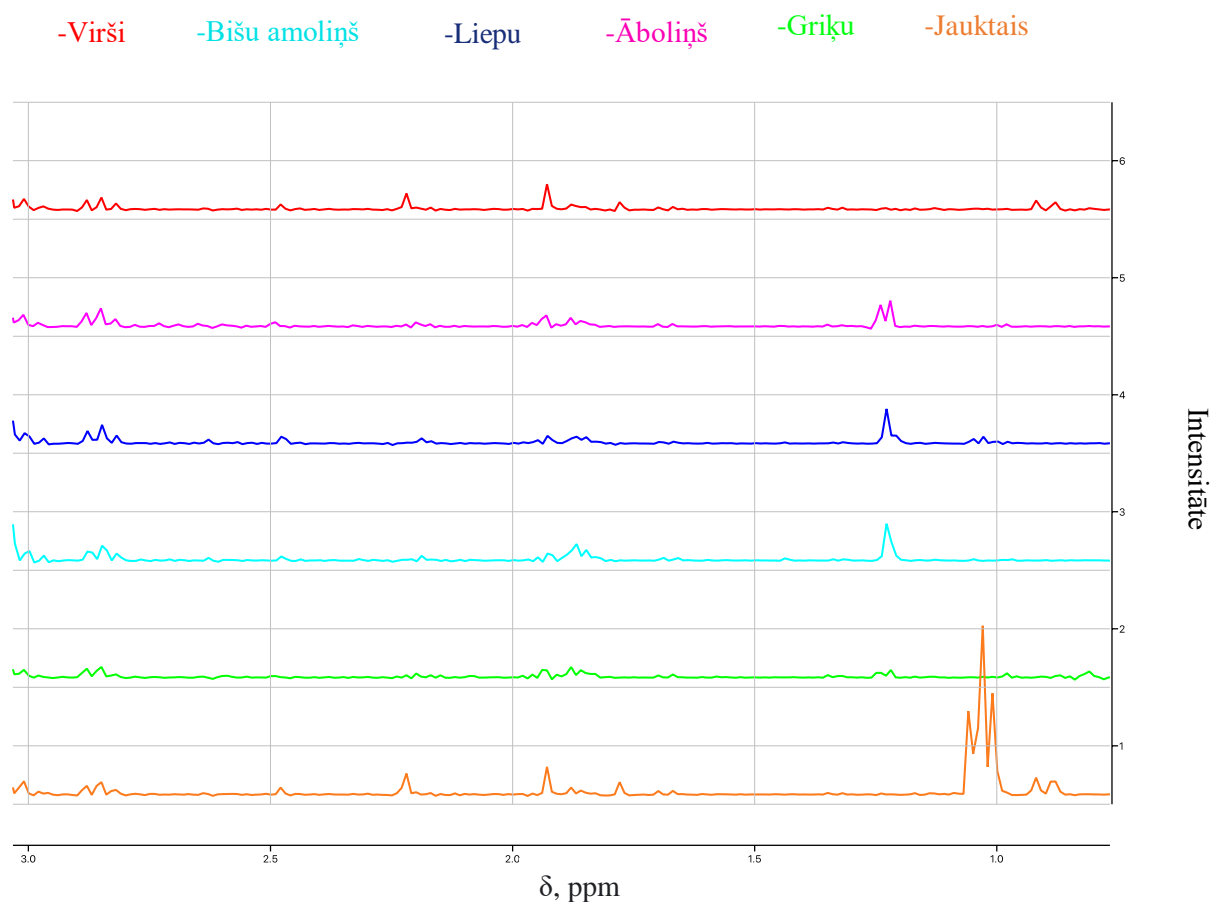
Tika uzņemti 110 medus paraugu spektri ar dažādām florālām un ģeogrāfiskām izcelsmēm. Visiem apvienotiem un binnotiem medus paraugu spektriem ar ķīmisko nobīdi 6,00 – 8,50 ppm ir atklāta līdzība, kas varētu uzrādīt iespējamās ķīmiskā sastāva līdzības. (Skat. 3.2. attēlu). Ķīmiskās nobīdes intervāls no 6,00 līdz 8,50 ppm ir polifenolu signālu apgabals.

Uzņemot spektru deiterēta ūdens šķīdinātājā gandrīz visiem medus paraugiem ir signāls pie $\sim 8,20$ ppm, bet ar atšķirīgām intensitātēm. Viršu un jauktā medū, kurš sastāv no purva un viršu medus, ir līdzīgi un intensīvi signāli no apmēram 7,00 ppm – 7,23 ppm. Duplets pie 7,05 ppm varētu būt kofeīnskābe, kurš ir redzams griķu medum. Āboliņa un griķu medum ir identiski signāli ar ķīmisko nobīdi no 7,14 – 7,26 ppm. Jauktā medū ar lielu koncentrāciju ir atbilstošā fenolās skābe – 4-hidroksibenzoskābe (PHBA) ar signāla ķīmisko nobīdi 6,75 līdz 6,80 ppm. Griķu medū ir signāls pie 6,00 ppm, kurš raksturīgs epikatehīnam, bet tā intensitāte ir ar zemu signāla attiecību.

Liepu medū polifenolu savienojumi nav identificēti. Paraugā ir maz metabolītu vai to vispār nav, jo intervālā no 6,00 - 8,00 ppm nav saskatāms neviens signāls. Kā arī bišu amoliņa medum ir ļoti niecīga sekundāro metabolītu koncentrācija, kura nav novērtējama izmantojot $^1\text{H-NMR}$ spektru deiterēta ūdens buferšķīdumā (pD 4,4). Diemžēl NMR spektrā neizdevās noteikt pirolizidīna alkaloidus(PA) to vāju koncentrāciju dēļ.

NMR signāls ir atkarīgs no katra konkrētā kodolu veida atrašanās vietas molekulā, jo pārējie molekulas atomi un ķīmiskās saites var samazināt magnētiskā lauka iedarbību uz atomu, ko sauc par signāla ķīmisko nobīdi. Lai ķīmiskās nobīdes varētu savstarpēji salīdzināt nepieciešama iekšējo standartu pārbaude. Par standartvielu var izmantot tādu šķīdinātāju kā dekstrāna sulfāta nātrija sāls. Protams, lai iegūtu precīzākus rezultātus būtu ieteicams lietot citas metodes, piemēram, infrasarkanā Furje spektroskopija(IS), šķidrums hromatogrāfija – masspektrometrija(LC-MS).

Tālākiem pētījumiem var veikt kvantitatīvu analīzi medus paraugiem. NMR metode sniedz informāciju par parauga sastāvu, kas ir uzskatāma par kvalitatīvo analīzi, tomēr plašākai informācijai ir nepieciešams veikt kvantitatīvo analīzi. Līdz šim tika izskatīts gadījums, kad maisījums ar visām komponentēm atrodas vienā ampulā, kā rezultātā ir iespējams noteikt maisījuma sastāvdaļu attiecību. Absolūtā kvantitatīvā analīzes metode - tiek sagatavoti paraugi ar zināmu koncentrāciju, tiek veidota kalibrēšanas līkne(NMR signāla amplitūda – vielas koncentrācija paraugā). Pamatprasības: ampulas ir pilnīgi vienādas vai kalibrētas, kā arī spektrometram jābūt stabilā darba stāvoklī.



3.3. att. Normalizēta ^1H -NMR spektra reģions no 0,75 līdz 3,00 ppm ar atšķirīgu bāzes līniju par 1,20 no signāla intensitātes

3.3. attēlā tiek parādīts alifātiskais apgabals medus paraugiem ar dažādu ziedu izcelsmi. Lai uzzinātu par pārējo paraugu sastāvu, tika paņemts jauktais medus paraugs kā salīdzinājuma medus, jo tā sastāvā ir citu ziedu piemaisījumi, pēc kuriem var izvērtēt un veikt minējumus par viršu, bišu amoliņa, liepu, āboliņa, griķu un jaukto medu. Katram medus paraugam ir izveidota sava atšķirīga NMR spektra aina.

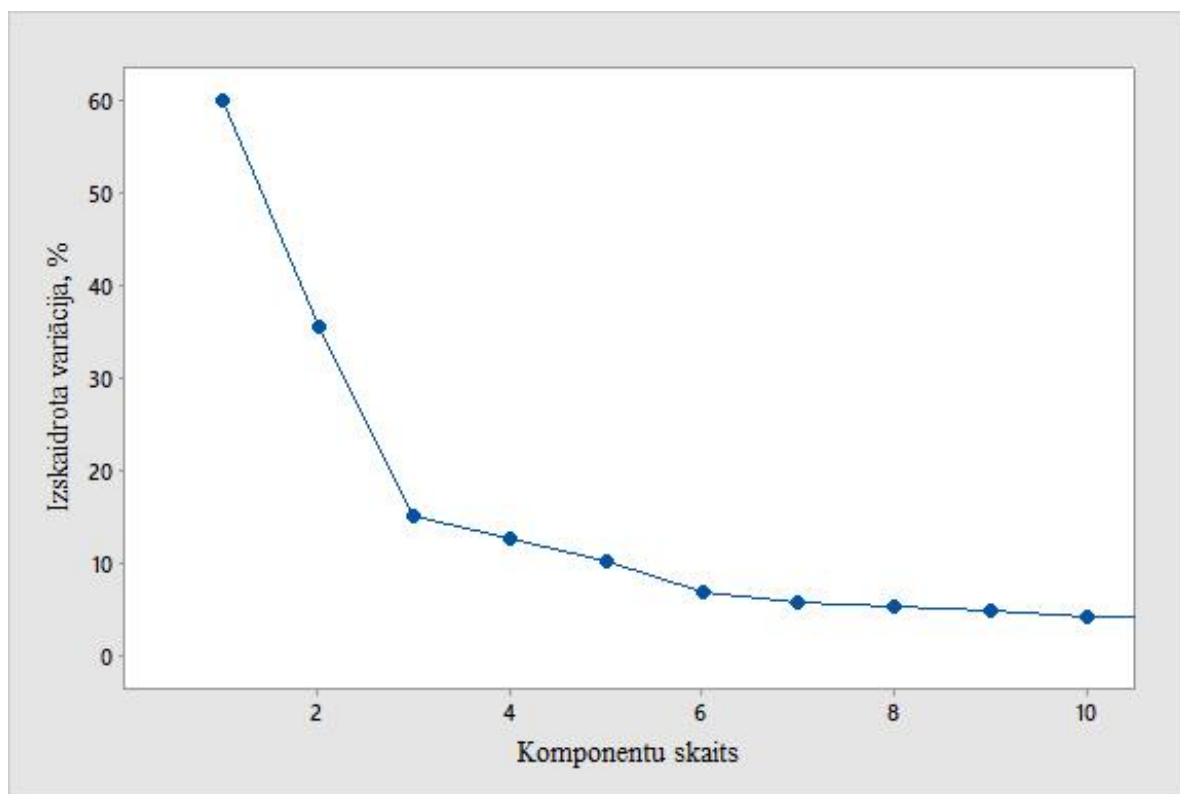
Divos medus paraugos – bišu amoliņa un liepu ir viens ļoti identisks signāls pie $\sim 1,16$ ppm. Jauktam medum ir skaidri redzams triplets ķīmiskās nobīdes intervāla no 0,94 ppm līdz 1,00 ppm. Āboliņam medū ir signāls ar ķīmisko nobīdi 1,21 ppm līdz 1,24 ppm, kurš atbilst 5,6-dihidrotimīnam. Liepu un bišu amoliņam medus paraugiem ir izteikts metilglioksāla signāls pie $\sim 1,23$ ppm, kā arī ir iespējama etiķskābes signāla veidošanās pie 1,92 ppm viršu un jauktam medum. Griķu medum nav izteikts neviens skaidri saredzams signāls reģiona no 0,75 – 3,00 ppm. Visiem medus paraugiem ir signāli intervālā no 2,75 līdz 2,83 ppm.

Tika pārbaudīts alifātiskais reģions medus paraugiem. NMR spektra rezultāti uzrādīja atšķirības dažu metabolītu saturā. Dažus metabolītus grūti identificēt to zemā satura dēļ, izrādot spektrā vājas intensitātes signālus, kā arī trokšņa dēļ. Lai uzlabotu precīzu metabolītu

iedalījumu var izmantot atbilstošo metodi - augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija(HPLC) apvienojot ar NMR, lai atdalītu dažādas polaritāšes ekstraktus.

3.3. Galveno komponentu analīze

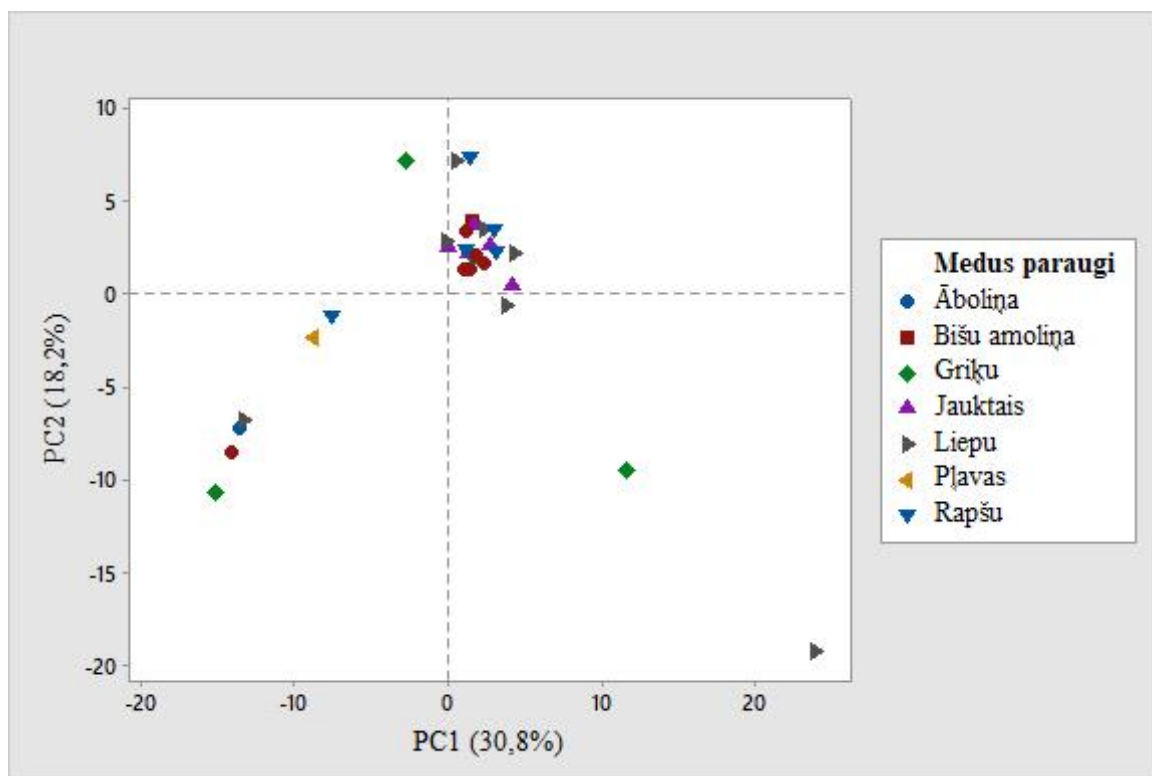
Galveno komponentu analīze (PCA) tika izmantota rezultātu vizualizācijai un kā instruments dažādu medus veidu diferencēšanai. Galveno komponentu analīze veikta izmantojot *Minitab* datorprogrammu. Katrs NMR spektrs tiek projicēts un kā rezultātā tiek iegūta īpašvērtības un galveno komponentu vērtības. Eksperimentā tika pārbaudīti spektrālie apgabali, lai aprēķinātu δ 0,75 – 8,50 ppm $^1\text{H-NMR}$.



3.4. att. PCA grafiks (*scree plot*)

3.4. attēlā tiek parādīts īpašvērtības grafiks (*scree plots*). *Scree plot* grafiks attēlots dīlstošā secībā, komponentu skaits tika samazināts līdz 10 komponentēm, jo nebija novērojamas būtiskas atšķirības. Balstoties uz statistiku pirmie divi vai trīs komponenti rada vislielāko pienesumu. Saskaņā ar 3.4. attēlu tiek pieņemts, ka komponenti ar noteiktu vērtību ir lielāki par 1 atkarībā no galvenajām komponentēm. Pirmais galvenais komponents ietver 30,8% dispersijas un otrs galvenais komponents 18,2% dispersijas no datiem. Kopumā divi galvenie komponenti veido 49%.

Parasti biežāk lietotie daudzmainīgo statistikas rīki un rezultāti tiek parādīti galveno komponentu vērtību grafika (*score plot*). Galveno komponentu vērtību grafiks ir medus karte, kas parāda tuvuma pakāpi kvadrātveida gabalā, norādot cik līdzīgi vai atšķirīgi ir saistītie dati par $^1\text{H-NMR}$ intensitāti no 0,75 ppm līdz 8,50 ppm. Galveno komponentu grafiks tiek parādīts 3.5. attēlā.

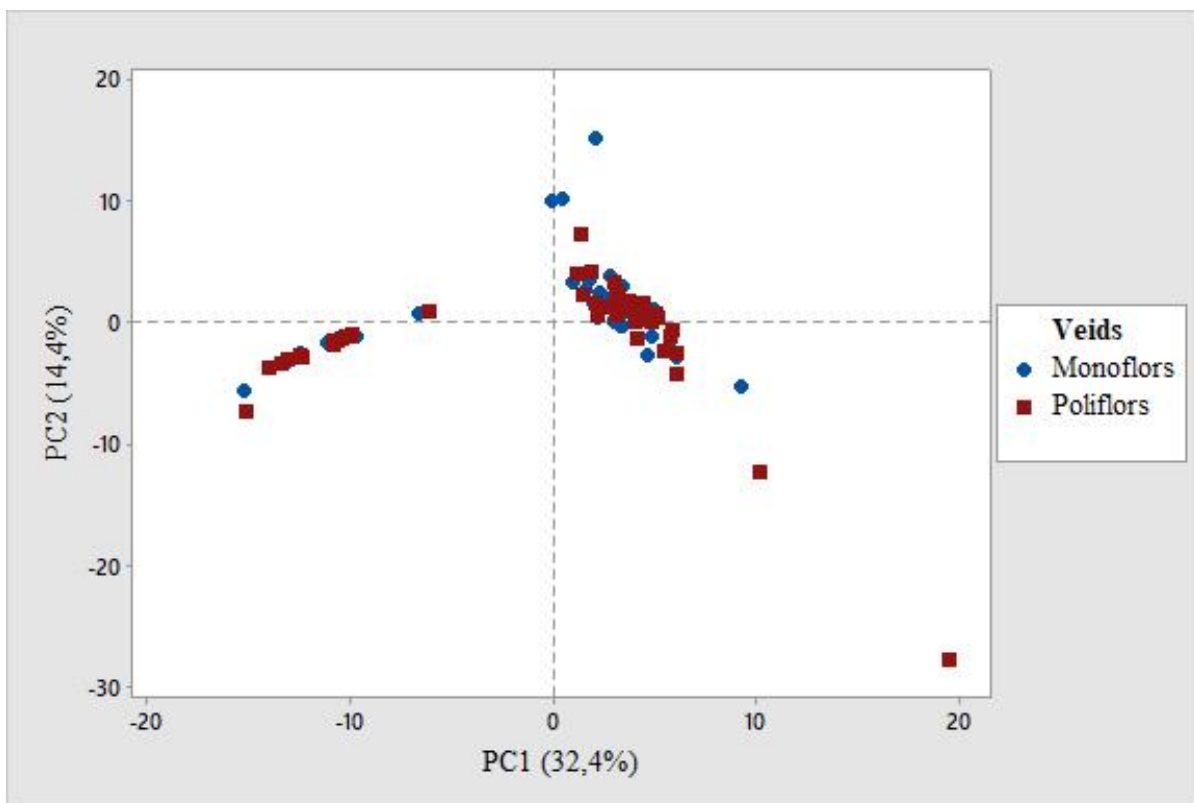


3.5. att. PCA grafiks (*score plot*)

Tika analizēti 30 medus paraugi. 3.5. attēlā tika attēlots divdimensionāls PCA grafiks, kur PC1 uz x ass ir pirmā galvenā komponente un uz y ass PC2 – otrā galvenā komponente. PCA grafika konstruēšanai izmantots *bin width* 0,04 ppm.

Medus paraugi tiek iedalīti 7 grupās, katrs punkts pārstāv vienu medus paraugu. 3.5. attēlā parādīti 6 vienveidīga zieda medus paraugi– āboliņa, bišu amoliņa, griķu, liepu, pļavas un rapšu. PCA grafikā ir arī jauktais medus, kura sastāva maisījumā ir arī citi ziedi. Jauktais, bišu amoliņa, rapšu un liepu medus ir izvietoti vienā diapazonā, tuvu viens otram un tikai pļavas, griķu un āboliņa ir redzami sporādiski. Dažu medus veidu pārklāšanās iemesls var būt biškopības tehnoloģijas, piemēram, kolonijas uzsākšana, strādāšana ar bites koloniju, savākšana utt. Attiecībā uz migrējošajām bitēm ir iespējams sajaukt dažādu biškopju izgatavoto medu.³⁸ Ir izveidojies viens klasteris, kur jauktais, bišu amoliņa un rapšu atrodas tuvu centram un tas nozīmē, ka paraugs atspoguļo vidējo vērtību.

Saskaņā ar 3. pielikumu, kur ir parādīts ieguldījumu grafiks (*loading plot*) var secināt, ka tie medus paraugi, kuri ir pa labi no centra ir pozitīva korelācija, jo dažiem vektoriem sakrīt virziens un viņi atrodas blakus viens otram.



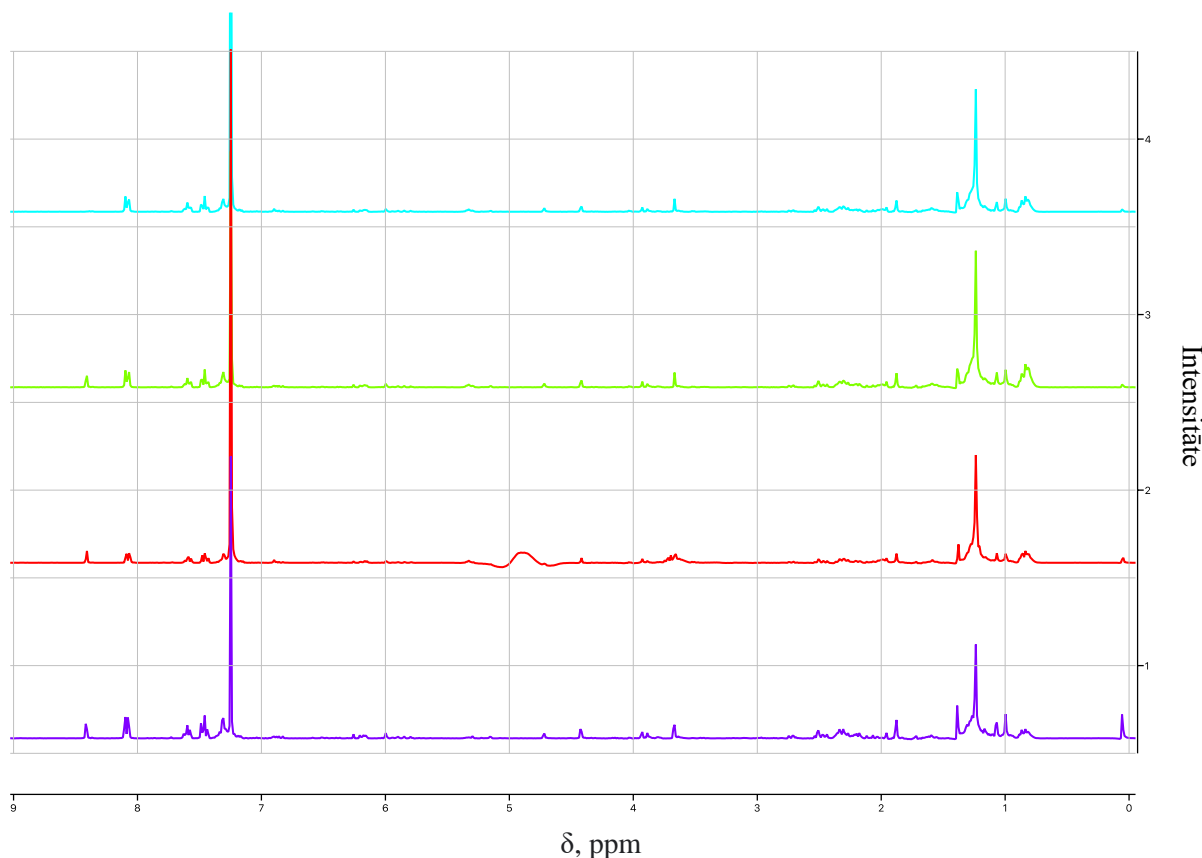
3.6. att. PCA grafiks $^1\text{H-NMR}$ skaitļa formāta spektriem ar *bin width* 0,05 ppm

3.6. attēlā parādīti pētījumā analizēti 84 medus paraugi. Tika izmantota PCA grafika konstruēšana izmantojot no $^1\text{H-NMR}$ spektra iegūtos rezultātus. Salīdzinājuma ar 3.5. attēlu tiek izmantots integrētā intervāla platuma (*bin width*) 0,05 ppm. Kopumā divie galvenie komponenti veido 46,8%.

PCA grafikā ir izveidojušās 2 grupas, t.i. klasteri. Rezultātā iegūtais grafiks ļauj izveidot klasterus, tādām grupām kā monoflorie un poliflorie medus paraugi. Poliflorie un monoflorie medus paraugi atrodas blakus asu krustpunktam. Ir dažādu ziedu medus paraugi, kuri ir cieši viens otram un strap tiem ir cits medus veids. Grafikā redzams, ka ir 4 medus veidi, kam ir pozitīvs PC2 un ~ 60 medus paraugi ar izteikti pozitīvu PC1, turklāt tie veido līdzīgu paraugu kopu. 20 medus veidi ar negatīvām PC1 - PC2 vērtībām izskatās lineāri.

3.4. Hloroforma ekstrakcijas kvalitatīvais izvērtējums

Tika apstrādāti 22 medus paraugi, no tiem ir replikantie mērījumi. Pētījuma mērķis ir iegūt NMR spektrus, lai veiktu kvalitatīvu izvērtējumu. Liepu medu replikanta $^1\text{H-NMR}$ mērījuma spektra piemērs tiek parādīts 3.7. attēlā.



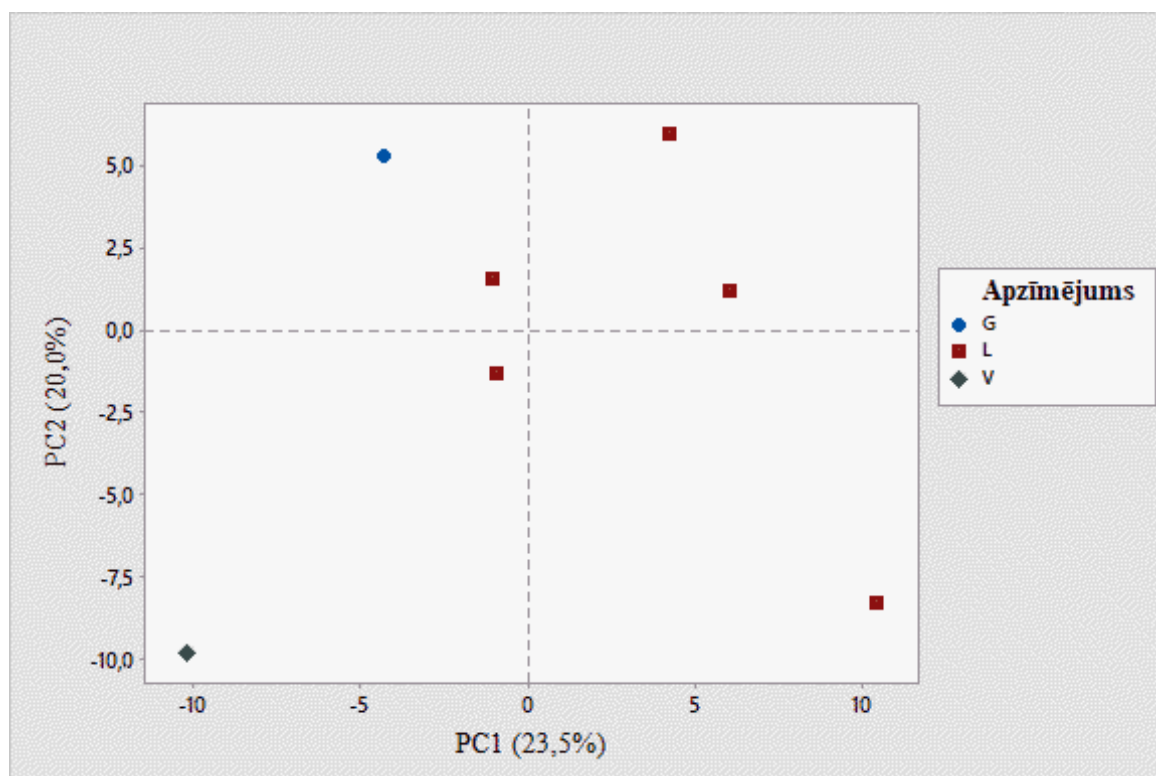
3.7. att. Normalizēta $^1\text{H-NMR}$ spektrs ar spektra reģions no 0,75 līdz 9,00 ppm ar atšķirīgu bāzes līniju par 1,20 no signāla intensitātes

Liepu ziedu medus paraugs tiek atkārtots 4 reizes. Skatoties uz spektru var secināt, ka visiem mērījumiem ir līdzīgie signāli, bet ar atšķirīgu intensitāti. ar Vienam mērījumam nav izteikts iekšēja standarta, t.i 1,4-DNB signāls pie 8,43 ppm, tas varētu būt maza koncentrācijas dēļ. $^1\text{H-NMR}$ spektra aina mainās, iekšējā standarta dēļ, salīdzinot ar $^1\text{H-NMR}$ spektru deiterēta buferšķīdumā.

Lai iegūtu precīzus un pareizus rezultātus, tiek izmantotas tīras mēģenes un vāciņi, obligāti pirms un pēc noskaloti ar acetonu. Pārnest visus paraugus NMR mēģenēs vienādā daudzumā, t.i. vienā līmenī, apmēram 5 cm no mēģenes sākuma. Izmantot iekšējo standartu.

3.5. Galveno komponentu analīze nepolāriem savienojumiem

Tika konstruēts PCA no medus hloroforma ekstraktu NMR spektriem ciparu formātā. Lai izveidotu PCA grafiku, kas sastāvēja no NMR spektra intensitātes, tika paņemts intergētā intervāla platums (*bin width*) 0,04 ppm 7 medus paraugiem. PCA grafiks (*score plot*) parādīts 3.8.attēlā.



3.8. att. PCA grafiks ¹H-NMR skaitļa formāta spektriem ar *bin width* 0,04 ppm

PCA grafikā analizēti 3 veidu medus paraugi – griķu, liepu un viršu medus. Eksperimentā tika izmantoti medus paraugi no Latviešu bīskopības biedrības, kā arī Lietuvas un Latvijas komerciāli pieejams medus. Iegūtajam grafikam nav iespējams noteikt veidojošos klāsterus. Krustpunkti asīm atrodas grafika centrā, dati vienmērīgi izkliedēti. Griķu un viršu medus paraugu skaits ir pārāk mazs, lai apzīmētu par vienu grupu un atrodas ļoti tālu no viens otra. Liepu medus paraugi ir tuvāk viens otram, bet nav izveidojusies grupa. Viens viršu medus paraugs, kurš atrodas kreisajā pusē no centrā var uzskatīt par izskrītošo paraugu.

Sekmīgai dažāda veida medus paraugu pētīšanai un analizēšanai, izmantojot PCA metodi, būtu vēlams lietot pēc iespējas vairāk viena veida medus paraugu, par kuriem ir apkopota informācija, veicot anketēšanu. Kā arī iespējama variants apstrādāt datus ir izmantot parciālo mazāko kvadrātu diskriminantu analīzi.

SECINĀJUMI

1. $^1\text{H-NMR}$ spektrā neizdodas ieraudzīt pirolizidīna alkaloidus(PA) to zemo koncentrāciju dēļ.
2. Medus paraugos ir sastopami sekundāro metabolītu signāli no 6,50 līdz 7,50 ppm. Tika atrasts kofeīnskābe, epikatehīns, 4-hidroksibenzoskābe(PHBA).
3. Apstiprinošiem rezultātiem nepieciešama iekšējo standartu pārbaude izmantojot DSS vai TSP, kā arī salīdzināt ar citām metodēm (IS un LC – MS).
4. Veiksmīgiem PCA rezultātiem nepieciešams izmantot pēc iespējas lielāka skaita viena veida medus paraugus, anketēšanu un kā arī izmantot mazāko kvadrātu diskriminantu analīzi.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- (1) J. W. White. Composition of honey. *Honey Compr. Surv.* **1975**, 157–206.
- (2) Anklam, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **1998**, *63*, 549–562. DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00057-0.
- (3) Cervellati, C.; Paetz, C.; Dondini, L.; Masia, A.; Schneider, B. Quantitative nmr and secondary metabolites: a new frontier of phenotyping. *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 475–476. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.717.
- (4) Labsvārds K. D. Dažādu ziedu izcelsmes medus autentiskuma novērtējums. Maģistra darbs, Latvijas Universitāte, Rīga, **2020**, 11.
- (5) Crane, E. Honey from honeybees and other insects. *Ethol. Ecol. Evol.* **1991**, *3*, 100–105. DOI: 10.1080/03949370.1991.10721919.
- (6) Crane, E. *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*; **1999**; Vol. 1.
- (7) Baltess V. *Pārtikas Ķīmija*; **1998**, 239-350.
- (8) Chemical composition of honey. <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/loveridge/index-page3.html> (skatīts 16.12.2020.)
- (9) Ovington LG, Martyn-St James M, Richardson R. Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*, **2014**.
- (10) Saikaly, S. K.; Khachemoune, A. Honey and wound healing: an update. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2017**, *18*, 237–251. DOI: 10.1007/s40257-016-0247-8.
- (11) S. Zaat. Antibacterial components of honey. *IUBMB Life.* **2012**, 48–55.
- (12) Mandal, M. D.; Mandal, S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2011**, *1*, 154–160. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60016-6.
- (13) Kumar P. Honey collected from different floras of Chandigarh tricity: a comparative study involving physicochemical parameters and biochemical activities. *Diet Suppl.* **2010**, 202–313.
- (14) Agbaje E.O. Conventional use of honey as antibacterial agent. *Ann Afr Med.* **2006**, 79–81.
- (15) Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. **2008**, 483–489.
- (16) Suparmi, S.; Mulder, P. P. J.; Rietjens, I. M. C. M. Detection of pyrrolizidine alkaloids in jamu available on the Indonesian market and accompanying safety assessment for human consumption. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *138*, 111230. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111230.

- (17) Boppré, M.; Colegate, S. M.; Edgar, J. A. Pyrrolizidine alkaloids of echium vulgare honey found in pure pollen. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 594–600. DOI: 10.1021/jf0484531.
- (18) Rasenack, R.; Müller, C.; Kleinschmidt, M.; Rasenack, J.; Wiedenfeld, H. Veno-occlusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. *Fetal Diagn. Ther.* **2003**, *18*, 223–225. DOI: 10.1159/000070799.
- (19) Mulder, P. P. J.; López, P.; Castelari, M.; Bodi, D.; Ronczka, S.; Preiss-Weigert, A.; These, A. Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal- and plant-derived food: results of a survey across europe. *Food Addit. Contam. Part A.* **2018**, *35*, 118–133. DOI: 10.1080/19440049.2017.1382726.
- (20) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 790–795. DOI: 10.1042/bst0240790.
- (21) Moniruzzaman, M.; Yung An, C.; Rao, P. V.; Hawlader, M. N. I.; Azlan, S. A. B. M.; Sulaiman, S. A.; Gan, S. H. Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey from bangladesh by high performance liquid chromatography: determination of antioxidant capacity. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 737490. DOI: 10.1155/2014/737490.
- (22) Padayachee, A.; Netzel, G.; Netzel, M.; Day, L.; Zabaras, D.; Mikkelsen, D.; Gidley, M. J. Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – part 2: phenolic acids. *Food Chem.* **2012**, *135*, 2287–2292. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.07.004.
- (23) Teng Q. *Structural Biology: Practical NMR Applications*; **2012**.
- (24) Burton, I. W.; Quilliam, M. A.; Walter, J. A. Quantitative 1h nmr with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3123–3131. DOI: 10.1021/ac048385h.
- (25) Beretta, G.; Caneva, E.; Regazzoni, L.; Bakhtyari, N. G.; Maffei Facino, R. A solid-phase extraction procedure coupled to 1h nmr, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, *620*, 176–182. DOI: 10.1016/j.aca.2008.05.025.
- (26) Sandusky, P.; Raftery, D. Use of selective tocsy nmr experiments for quantifying minor components in complex mixtures: application to the metabonomics of amino acids in honey. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2455–2463. DOI: 10.1021/ac0484979.
- (27) Petrakis, E. A.; Cagliani, L. R.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G.; Consonni, R. Sudan dyes in adulterated saffron (*crocus sativus* l.): identification and quantification by 1h nmr. *Food Chem.* **2017**, *217*, 418–424. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.078.
- (28) Massart, D. L. Handbook of chemometrics and qualimetrics. Part A Part A., **1997**.

- (29) Родионова. *Об Одном Методе Решения Обратной Кинетической Задачи По Спектральным Данным При Неизвестных Спектрах Компонент*, Кинетика и катализ.; **2004**.
- (30) Koh, H.-L.; Yau, W.-P.; Ong, P.-S.; Hegde, A. Current trends in modern pharmaceutical analysis for drug discovery. *Drug Discov. Today*. **2003**, 8, 889–897. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02846-0.
- (31) Varmuza, K.; Werther, W.; Krueger, F. R.; Kissel, J.; Schmid, E. R. Organic substances in cometary grains: comparison of secondary ion mass spectral data and californium-252 plasma desorption data from reference compounds. *Int. J. Mass Spectrom.* 1999, 189, 79–92. DOI: 10.1016/S1387-3806(99)00069-X.
- (32) Johnson, G. W.; Ehrlich, R. State of the art report on multivariate chemometric methods in environmental forensics☆. *Environ. Forensics*. **2002**, 3, 59–79. DOI: 10.1080/713848317.
- (33) Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Martin, E. B. Application of parafac2 to fault detection and diagnosis in semiconductor etch. *J. Chemom.* **2001**, 15, 285–298. DOI: 10.1002/cem.689.
- (34) 3 Principal Component Analysis of Chemical Data. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0922348708700327>. (skatīts 03.02.2021.)
- (35) Метод главных компонент (Principal component analysis). <https://wiki.loginom.ru/articles/principal-component-analysis.html>. (skatīts 03.05.2021.)
- (36) Principal Component Analysis: Most Favourite Tool in Chemometrics. <https://www.ias.ac.in/public/Volumes/reso/022/08/0747-0759.pdf>. (skatīts 03 05 2021.)
- (37) del Campo, G.; Zuriarrain, J.; Zuriarrain, A.; Berregi, I. Quantitative determination of carboxylic acids, amino acids, carbohydrates, ethanol and hydroxymethylfurfural in honey by ¹H nmr. *Food Chem.* 2016, 196, 1031–1039. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.10.036.
- (38) Determination of Floral Origin Common Honey in Khorasan Razavi Province Based on Color Characteristics, Salinity, Electrical Resistance and TDS using Chemometrics Methods. https://journals.rifst.ac.ir/article_82967_ec67ebba5c8562f75feccb7a8c86944a.pdf. (skatīts 31.05. 2021.)

PATEICĪBAS

Izsaku pateicību par sadarbību un palīdzību bakalaura darba izstrādei LU Ķīmijas fakultātes Organiskās ķīmijas katedras pasniedzējam Mg. Chem., Rihardam Klūgam par $^1\text{H-NMR}$ spektru uzņemšanu.

PIELIKUMI

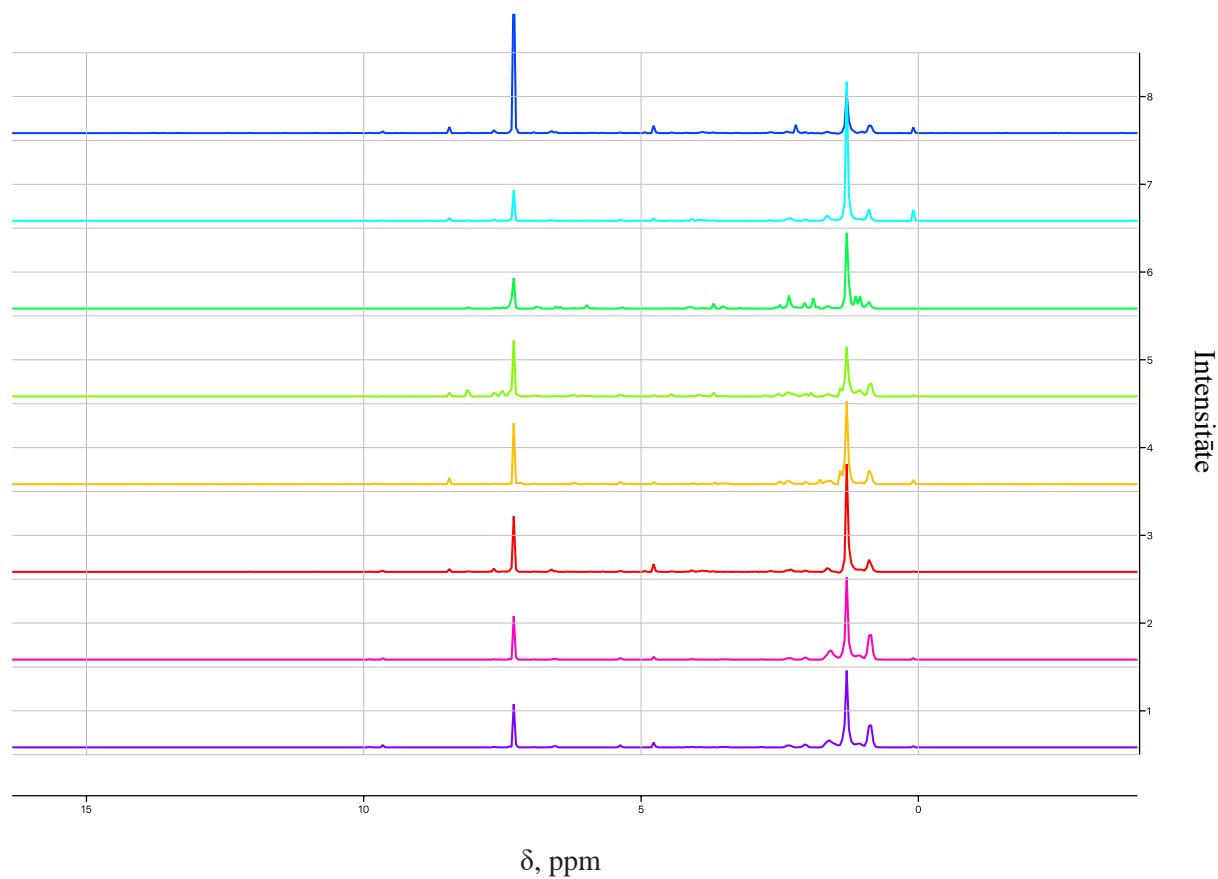
1. pielikums. PCA attiecības tabula

Galveno komponentu analīze : 0,770058; 0,810091; 0,850124; 0,890156; 0,930189; 0,970221; 1,0

Īpašvērtības	60,029	35,491	15,046	12,756	10,287	6,948	5,639	5,377	4,762	4,289	4,097
Proporcija	0,308	0,182	0,077	0,065	0,053	0,036	0,029	0,028	0,024	0,022	0,021
Kumulatīva	0,308	0,490	0,567	0,632	0,685	0,721	0,750	0,777	0,802	0,824	0,845
Īpašvērtības	3,932	3,741	3,184	2,956	2,706	2,522	2,177	1,877	1,417	1,191	1,114
Proporcija	0,020	0,019	0,016	0,015	0,014	0,013	0,011	0,010	0,007	0,006	0,006
Kumulatīva	0,865	0,884	0,900	0,916	0,929	0,942	0,954	0,963	0,970	0,977	0,982
Īpašvērtības	1,037	0,914	0,801	0,638	0,051	0,021	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
Proporcija	0,005	0,005	0,004	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Kumulatīva	0,988	0,992	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

1.att. Galveno komponentu analīze attiecības tabula

2. pielikums. Hloroforma ekstrakcijas NMR spektrs



2.att. Hloroforma ekstrakcijas NMR spektrs

Bakalaura darbs „Medus sekundāro metabolītu noteikšana izmantojot kodolu magnētisko rezonansi” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____ Marina Šalajeva
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs, Mg. chem. Krišs Dāvids Labsvārds: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Recenzents pētniece, Mg. chem. Lauma Buša: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Ilze Gaile
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

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

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