BIOR

PĀRTIKAS DROŠĪBAS, DZĪVNIEKU VESELĪBAS
UN VIDES ZINĀTNISKAIS INSTITŪTS

INSTITŪTA "BIOR"

ATSKAITE

LATVIJAS IZCELSMES MEDUS AUTENTISKUMA, KVALITĀTES UN NEKAITĪGUMA NOVĒRTĒJUMS

Izpildītājs:

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR"

RĪGA 2021

APSTIPRINU
Zemkopības ministrijas
Veterinārā un pārtikas departamenta direktore
Zanda Matuzale

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR"

Zemkopības ministrijas pasūtītais zinātniskais pētījums
Līgums Nr. 21-00-SOINV05-000010

LATVIJAS IZCELSMES MEDUS AUTENTISKUMA, KVALITĀTES UN NEKAITĪGUMA NOVĒRTĒJUMS

GALA ATSKAITE

Rīga

2021

SATURS

IEVADS 4
LITERATŪRAS APSKATS 6
Medus sastāva un uzturvērtības izvērtējums 6
Medus patēriņš 7
Medus viltošana 8
Zāļu lietošana biškopībā 9
Pesticīdu atliekvielu sastopamība medus paraugos 10
PIELIETOTĀS METODES 12
Medus kvalitātes novērtējuma metodes 12
Medus nekaitīguma novērtējuma metodes 12
Medus autentiskuma noteikšanas metode un datubāze 12
Nemērķēts skrīnings 16
REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS 21
Fizikāli-ķīmisko parametru izvērtējums medus paraugos 21
Pesticīdu atliekvielu sastopamība medus paraugos 23
Medus autentiskuma noteikšana, datu bāzes aprobēšana 24
SECINĀJUMI 29
IZMANTOTĀ LITERATŪRA 30
PIELIKUMS 33

IEVADS

Medus ir sarežģīta sastāva produkts, kas satur vairāk nekā 300 savienojumus no dažādām grupām, piemēram, cukurus (monosaharīdus un oligosaharīdus), organiskās skābes, aminoskābes, fermentus, flavonoīdus, vitamīnus, ēteriskās eļļas, sterīnus un fosfolipīdus. Medus ir svarīgs enerģijas avots, kas satur aptuveni 80g/100g ogļhidrātu un 20g/100g ūdens. Medū esošie flavonoīdi sastāv no flavanoniem, flavoniem un flavonoliem, bet fenola skābes ir aizvietotās kanēļskābes un benzoskābes. Šie savienojumi nosaka medus krāsu, garšu un aromātu.

Kā dabisks produkts ar salīdzinoši augstu cenu, medus jau ilgu laiku ir kļuvis par viltošanas objektu. Medus autentiskums ir ļoti svarīgs gan no komerciāliem, gan veselības aspektiem. Medus viltošanas atklāšana ir sarežģīta, jo šim produktam ir raksturīga dabiskā mainība atkarībā no augu sugas, vides, apstrādes un uzglabāšanas procedūrām. Medus viltošana var notikt, pievienojot neraksturīgas vielas, piemēram, melasi, cietes šķīdumu, glikozi, saharozi, ūdeni un invertētu cukuru, vai mainot fizikāli ķīmiskos parametrus. Pārmērīga siltuma izmantošana pasterizācijai un sašķidrināšanai var negatīvi ietekmēt medus kvalitāti, piem., izraisot gaistošo savienojumu zudumus un fermentu aktivitātes samazināšanos.

Medus var būt piesārņots ar pesticīdiem, kas produktā nonāk no lauksaimniecības darbībām, tāpēc ir nepieciešams uzraudzīt to atliekvielas. 2020. gada pētījumi uzrādīja, ka visos testētajos medus paraugos (n=15) tika konstatētas pesticīdu atliekvielas ar maksimālo skaitu divas dažādas pesticīdu atliekvielas vienā paraugā. Konstatētie pesticīdi pēc iedarbības veida pieder pie fungicīdiem (fluapirāms, karbendazīms), herbicīdiem (glifosāts) un insekticīdiem (tiakloprīds). Trīs gadījumos glifosāta atliekvielas pārsniedza maksimāli pieļaujamo normu (MRL), kas ir 0,05 mg/kg saskaņā ar Regulu (EU) 293/2013. Augu aizsardzības līdzekļu reģistrā tiakloprīds šobrīd vairs nav reģistrēts kā aktīvā viela nevienā no augu aizsardzības līdzekļiem. Vienīgo atļauto tiakloprīdu saturošo augu aizsardzības līdzekļi krājumi bija jāizlieto līdz 2020. gada beigām. Šo minēto pesticīdu un citu pesticīdu atliekvielu daudzumi tiks noteikti vismaz 50 medus paraugos ar nolūku izvērtēt pesticīdu atliekvielu izplatību medus paraugos un to daudzumu atbilstību maksimāli pieļaujamām normām.

Lai novērtētu konvencionāli iegūtā medus autentiskumu, kvalitāti un nekaitīgumu, kā arī lai identificētu Latvijas izcelsmes medus raksturlielumus, projekta ietvaros paredzēts veikt pētījumus vairāku ķīmisko komponentu noteikšanai. Medus autentiskuma noteikšana tiks veikta, veicot flavonoīdu daudzumu noteikšanu ar augstas izšķirtspējas masspektrometrijas metodi (Orbitrap-MS). Pesticīdu atliekvielu noteikšanai tiks pielietos divas multi-pesticīdu noteikšanas metodes ar AEŠH-MS/MS un GH-MS/MS un glifosāta noteikšanas metode ar AEŠH-MS/MS.

Darba uzdevumi:

1) Medus autentiskuma noteikšana, veicot medus sastāva esošo savienojumu skrīningu ar augstas izšķirtspējas masspektrometrijas metodi. Pētījuma rezultātā izveidotās datubāzes aprobēšana, izmantojot testēšanas algoritmu vismaz 30 ārzemju izcelsmes medus paraugu atšķiršanai no Latvijas medus paraugiem.
2) Medus kvalitātes parametru (HMF, cukuru satura, elektrovadītspējas, ūdens satura u.c.) noteikšanas paraugos.
3) Pesticīdu atliekvielu izplatības monitorings ar masspektrometrijas metodēm vismaz 50 paraugos.

LITERATŪRAS APSKATS

Medus sastāva un uzturvērtības izvērtējums

Medus ir dabīga, salda viela, ko bites ražo no augu nektāra, augu dzīvo daļu sekrēta vai sūcējinsektu izdalījumiem uz augu dzīvajām daļām, kurus tās ievāc, pārveido, nogulsnē, dehidrē, uzglabā un atstāj medus šūnās nobriest un nogatavoties. Pēc iegūšanas izcelsmes medu iedala: ziedu jeb nektāra medus, ko iegūst no augu nektāra, un lapu izsvīduma medus, ko iegūst no sūcējinsektu izdalījumiem uz augu dzīvajām daļām vai no augu dzīvo daļu sekrēta [1]. Medus aptuveni līdz 18. gadsimta beigām, kad to pakāpeniski sāka aizstāt ar rūpnieciski iegūtu cukuru, bija vienīgais plaši pieejamais saldinātājs [2].

Medus ķīmiskais sastāvs ir sarežģīts un ļoti atkarīgs no ievāktā augu nektāra, bišu barības, klimatiskajiem apstākļiem, bišu sugas un daudziem citiem faktoriem. Visbiežāk bišu barība ir dabisks ziedu nektārs, bet bites var tikt piebarotas arī mākslīgi, piemēram, ar cukura sīrupu vai kandiju – biezu, mīkstu cukura masu, kurai var būt pievienoti ziedputekšņi. Kopumā medus var saturēt vairāk nekā 200 dažādas vielas [3].

Medus enerģētiskā vērtība ir aptuveni 304 kcal/100 g [4], bet cukura, kuru mēdz aizstāt ar medu, enerģētiskā vērtība ir 400 kcal/100 g. Kā redzams tabulā medus galvenokārt sastāv no ogļhidrātiem un ūdens. Ogļhidrāti veido aptuveni 95 % no medus sausās masas. Galvenie ogļhidrāti medū ir monosaharīdi fruktoze un glikoze, kas sastāda līdz pat 75 % no kopējā ogļhidrātu satura. 100 gramos medus vidēji ir 38 grami fruktozes, 30 g glikozes un tikai 0,7 grami saharozes. Vēl no izplatītākajiem ogļhidrātiem medū ir jāatzīmē monosaharīds galaktoze (aptuveni 3 g) un disaharīds maltose (1,4 grami) [4]. Medū kopumā ir konstatēti aptuveni 25 dažādi oligosaharīdi. Lapu izsvīduma medū ir mazāks monosaharīdu, bet lielāks disaharīdu un oligosaharīdu, it īpaši melozitozes un rafinozes, daudzums nekā ziedu medū.

Olbaltumvielu saturs medū ir aptuveni 0,5%. Galvenokārt tie ir enzīmi un brīvās aminoskābes. No enzīmiem medū visvairāk ir amilāzes, invertāzes un glikozes oksidāzes. Medū kopumā ir 18 brīvās aminoskābes, bet to daudzums ir ļoti niecīgs. No tām visvairāk ir prolīns, asparagīnskābe, glutamīnskābe un neaizstājamā aminoskābe fenilalanīns [4].

Medus ķīmiskais sastāvs

	Ziedu medus		**Izsvīduma-lapu medus**	
	Vidēji, g/100 g	**Min – max, g/100 g**	**Vidēji, g/100 g**	**Min – max, g/100 g**
Ūdens	17,2	12–20	16,3	15–20
Monosaharīdi:				
fruktoze	38,2	30–45	31,8	28–40
glikoze	31,3	24–40	26,1	19–32
Disaharīdi:				
saharoze	0,7	0,7–4,8	0,5	0,1–4,7
citi	5,0	2–8	4,0	0,3–22,0
Trisaharīdi:				
melezitoze	0,8	0,5–6	4,0	0,3–22,0
citi	0,5		1,0	0,1–6
Oligosaharīdi:	3,1	0,5–1	10,1	0,1–6

Cukuri (kopā)	79,7		80,5	
Minerālvielas	0,2	0,1–0,5	0,9	0,6–2,0
Aminoskābes, olbaltumvielas	0,3	0,2–0,4	0,6	0,4–0,7
Organiskās skābes	0,5	0,2–0,8	1,1	0,8–1,5
pH	3,9	3,5–4,5	5,2	4,5–6,5

Vitamīnu un minerālvielu daudzums medū ir niecīgs. No uzturvērtības viedokļa, kā būtiskākās minerālvielas var minēt hromu, mangānu un selēnu, bet no vitamīniem visvairāk ir B grupas vitamīnu. Medus satur 0,3–25 mg/kg holīna un 0,06–5 mg/kg acetilholīna. Holīns ir nozīmīgs kardiovaskulārajām un smadzeņu funkcijām, kā arī šūnu membrānas sastāvdaļa, bet acetilholīns darbojas kā neirotransmiters [4].

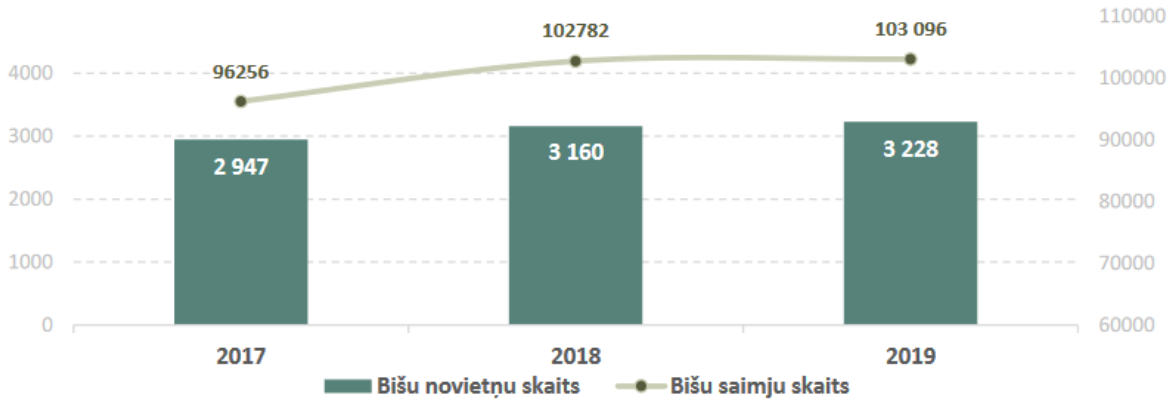
Polifenoli ir nozīmīga ķīmisko savienojumu grupa, jo tiem piemīt antioksidantu īpašības. Kopējais fenolu daudzums, kas variē dažāda veida medū ir no 56 līdz 500 mg/kg medus. Galvenokārt tie ir flavanoīdi (kvertecīns, luteolīns, apigenīns, galangīns, kaempferīds), fenolskābes un fenolskābju atvasinājumi. Flavanoīdu daudzums variē no 60 līdz 460 µg/100 g atkarībā no medus veida. Tumšākā medū ir lielāks antioksidantu daudzums nekā gaišākā medū [5,6]. Pētījumā, kur tika analizēts antioksidantu daudzums dažādas izcelsmes medus paraugos, Ilinoizas griķu medū, kas bija tumšākais no analizētajiem paraugiem, antioksidantu koncentrācija bija 20 reizes lielāka nekā gaišākajā analizētajā medū – Kalifornijas salviju medū. Ja daļu no ikdienā patērētājiem saldinātājiem aizvietotu ar medu, tas radītu antioksidantu pieaugumu cilvēku uzturā [6].

Latvijas ģeogrāfiskais stāvoklis ir labvēlīgs augstvērtīga medus iegūšanai. Mērenā klimata zonas jaukto koku meži, kas mijas ar plašiem siliem, dabiskajām un palieņu pļavām, krūmājiem, purviem un virsājiem, ir lieliska nektāraugu mājvieta. Nektāraugu daudzveidība un to kvalitāte ir galvenais priekšnosacījums ievāktā medus kvalitātei. Turklāt ziemeļu reģionos, arī Latvijā, nektāraugu īsajā ziedēšanas laikā nektārs izdalās koncentrētāks un bagātāks ar bioloģiski aktīvām vielām nekā dienvidu reģionos [7].

Medus patēriņš

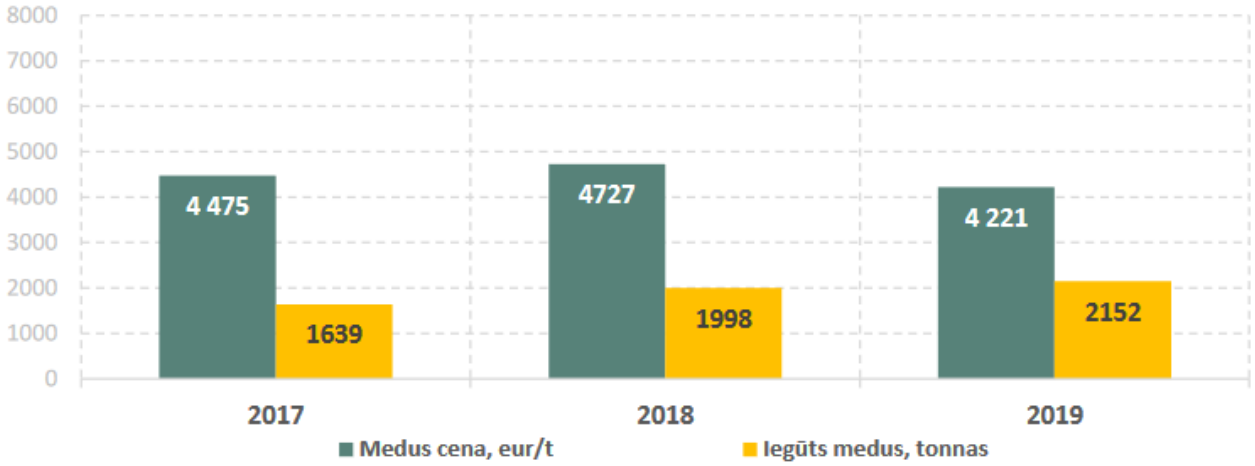
Eiropa ir otrais lielākais medus ražotājs pasaulē, taču saražotais apjoms nespēj pilnībā nodrošināt pieprasījumu, tāpēc 40 % no kopējā apjoma veido importa medus. Visvairāk medus tiek importēts no Ķīnas un Meksikas [8].

Pēc Lauksaimniecības datu centra (LDC) sniegtās informācijas 2019. gadā ir reģistrēti 3228 biškopji ar 103 096 bišu saimēm. Salīdzinājumā ar 2018. gadu var secināt, ka biškopju skaits ir palielinājies par 2,15 %, bet bišu saimju skaits tajās tikai nedaudz – par 0,30% [9].



1. attēls. Novietņu un tajās turēto bišu saimju skaits [9]

2019. gadā tika saražots 2152 tonnas medus, bet medus vidējā cena bija 4221 EUR par tonnu. Analizējot zemāk redzamā attēlā atspoguļotos datus, secināms, ka salīdzinājumā ar 2018. gadu saražotā medus daudzums 2019. gadā ir palielinājies par 7,71%, bet medus vidējā cena samazinājās par 10,67% [9].



2. attēls. Saražotā medus daudzums, cena un vidējā raža 2017-2019.gadā [9]

Biškopji no bišu saimēm ievāc dažādu ziedu medu, liepziedu medu, griķu medu, rapša medu, viršu un cita veida medu. Tirdzniecībā tiek piedāvāts dažāda veida saražotaismedus, piemēram, izsviestais medus, šūnu medus, krēmveida medus, spiestais medus un kupažētais medus. Lielāko daļu saražotās produkcijas biškopji realizē tiešā pārdošanā patērētājiem un vairumtirdzniecībā, undaļa nonākmazumtirdzniecības uzņēmumos (veikalos), pie pārtikas ražotājiem (konditorejās u.c.) un tiek eksportēta [9].

Medus viltošana

Tā kā medus ir unikāls dabīgs līdzeklis ar antibakteriālām īpašībām un patīkamu saldu garšu, arī tā vērtība tirgū ir salīdzinoši lielāka nekā citiem saldinātājiem, kā, piemēram, cukurniedru, cukurbiešu sīrupiem. Aizvien biežāk lētāku cukuru sīrupi medum tiek pievienoti rūpnieciski, tādējādi izmainot medus īpašības. Medus tik ātri nesacukurojas, ir mazāk viskozs, vizuāli patīkamāks patērētājiem [10].

Izplatītākie apzināti pievienotie piemaisījumi medum ražošanas gaitā ir glikozes, saharozes sīrupi no cukurbietēm vai cukurniedrēm, kā arī inverto cukuru sīrupi. Pievienojot medum inverto cukuru sīrupu, tiek panākts tuvākais pakaļdarinājums dabīgam medum, padarot šādu viltojumu grūtāk nosakāmu, izmantojot tautsaimniecības metodes un vienkāršākās laboratorijas metodes [11].

Vīnogu sīrups tiek pagatavots no svaigas vīnogu sulas, ietvaicējot to līdz 20-25% no sākotnējā tilpuma. Cukurniedru sīrupu pagatavo saberžot cukurniedres, uzsildot, dekantējot, filtrējot un atkārtoti sildot līdz tiek iegūts tumšam medum līdzīgs produkts, kura sastāvā ir apmēram 20% ūdens. Palmu sīrupu iegūst iegriežot palmai centrālajā mezglā stumbra galā, notecinot sulu, kuru ietvaicē līdz 12,5-20% no sākotnējā svara. Rezultātā iegūst brūnas krāsas sīrupu ar augstu viskozitāti un patīkamu aromātu. Šādus izstrādājumus mēdz dēvēt par invertcukura krēmiem. Sīrupus mēdz pievienot medum netieši, t.i., barojot bites jau ar gatavu sīrupu [12].

Dārgu medu mēdz viltot, pievienojot lētāku medu. Akācijas medus (*Robinia pseudoacacia*) ir dzelteni caurspīdīgs ar skābenu garšu, un tas vāji kristalizējas. Rapšu medus, kas iegūts no rapšu ziediem, ir salds, gaišas krāsas medus, kas viegli kristalizējas. Tā kā rapša medus krāsa ir līdzīga akācijas medus krāsai, tas ir izplatīts piemaisījums akācijas medus viltošanā. Šāda medus autentiskuma apstiprināšana ir visai sarežģīts process [13].

Tiek izmantotas dažādas metodes, kas ļauj izdarīt secinājumus par medus autentiskumu: vieglo stabilo izotopu attiecību masspektrometrija, gāzu hromatogrāfija, augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija, augstas izšķirtspējas anjonu apmaiņas hromatogrāfija, tuvā infrasarkanā spektra spektroskopija, kodolu magnētiskā rezonanse, Ramana spektroskopija, ultra augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija tandēmā ar kvadrupola lidojuma laika masspektru. Pēdējā desmitgadē visplašāk izmantotā metode ir IRMS, ar kuru iespējams noteikt medus viltošanu ar cukurniedru vai kukurūzas cukuriem. Lai izdarītu secinājumus par medus autentiskumu, izmantojot IRMS, ir nepieciešams medū esošos cukurus atdalīt no proteīniem un noteikt attīrītā proteīna un medus parauga $\delta^{13}C$ vērtības [14].

Zāļu lietošana biškopībā

Nozīmīgākās nepieciešamās zāles biškopībā var iedalīt – pretvarru līdzekļi (akaracīdi), antimikrobiālie līdzekļi (pret peru puvēm) un pretsēņu līdzekļi (pret kaļķu periem). Starp reģistrētiem zāļu līdzekļiem lielākoties ir pretvarru preparāti. Dažās valstīs lielu daļu reģistrēto preparātu sastāda dažādi organisko skābju (skudrskābes, skābeņskābes) izcelsmes preparāti. Darbīgo vielu, ko varētu izmantot pretvarru apkarošanai nemaz nav tik daudz, un sakarā ar varru rezistences (izturības) veidošanos pret šīm vielām, nez vai ir vērts ieguldīt laiku un līdzekļus meklējot arvien jaunas indes, ko ielikt bišu stropā, jo galu galā jebkurš pretvarru līdzeklis lielā devā var kļūt kaitīgs arī bitēm. Zāļu līdzekļi peru puvju, kaļķu peru un nozematozes ārstēšanai Eiropas valstīs nav reģistrēti, jo iedarbīgākie ir antibiotikas saturošie. Tetraciklīni, streptomicīns, sulfonamīdi, tilozīns, eritromicīns, linkomicīns, hlormafenikols, nitrofurāni, nitromidiazoli, fluohinolloni un fumagilīns ir visplašāk izmantotie antibakteriālie līdzekļi minēto slimību apkarošanā [15]. Tomēr jāmin, ka sakarā ar

pārtikas nekaitīguma kritērijiem, bišu produktos nav pieļaujamas antibiotiku atliekvielas. Līdz ar to šādu zāļu līdzekļu izmantošana ir aizliegta un lielākoties tos arī neizmanto, bet cīņai ar peru puvēm izmanto inficēto un slimo saimju likvidēšanu vai citas metodes. Latvijā sakarā ar ierobežoto un legāli pieejamo zāļu trūkumu, gan arī salīdzinoši lētākas cenas dēļ daudzi biškopji lieto gan legāli, gan nelegāli ievestus bišu ārstēšanas līdzekļus no Krievijas. Nereģistrētas zāles legāli var ievest un tirgot, saņemot vienreizējās ievešanas atļauju. Ja tās ievestas bez šādas atļaujas, tad uzskatāmas par nelegālām. Latvijas veterināro zāļu reģistrā ir tikai trīs zāļu nosaukumi, kuri ir oficiāli reģistrēti varru ierobežošanai bišu saimēs – Apistan (ražotājs Vita Europe, darbīgā viela fluvalināts), Apiquard (ražotājs Vita Europe, darbīgā viela timols), Bayvarol (ražotājs Bayer, darbīgā viela flumetrīns) [16].

Komisijas regulā (ES) Nr. 37/2010 par farmakoloģiski aktīvajām vielām un to klasifikāciju pēc to atlieku maksimāli pieļaujamā satura dzīvnieku izcelsmes pārtikas produktos norādītas tikai divu vielu – amitrāza un kumafosa – maksimāli pieļaujamās vērtības medū – 200 µg/kg un 100 µg/kg attiecīgi [17]. Abas aktīvās vielas izmanto bišu slimības varrozes apkarošanā [18]. Amitrāzs un kumafoss ir nepolāri organiskie savienojumi, tāpēc galvenokārt tie atrodami bišu vaskā, kuram, salīdzinājumā ar medu, likumdošana pašlaik nenosaka atliekvielu maksimāli pieļaujamās vērtības. Bišu vasku izmanto farmaceitiskos preparātos, pārtikas ražošanā un iepakošanā, kā arī kosmētikā. Praksē mēdz veikt bišu vaska pārkausēšanu un atkārtotu izmantošanu biškopībā, kas var izraisīt atliekvielu uzkrāšanos vaskā [19]. Kumafoss medū saglabājas vairāk nekā 30 dienas, bet bišu vaskā – vairāk nekā gadu pēc pretvarrozes līdzekļu lietošanas. Tā pussabrukšanas laiks medū ir 69 dienas, bet vaskā – no 115 līdz 346 dienām [20].

Divu gadu pētījuma ietvaros tika pārbaudīta tetraciklīnu, makrolīdu, sulfanilamīdu, cefalosporīnu, hinolonu, penicilīnu grupas un citu antibakteriālo līdzekļu atliekvielu klātbūtne dažādiem Latvijas izcelsmes medus paraugiem, kas ir pieejami lielveikalos. Analizētajos medus paraugos netika konstatēta neviena no 59 testētajām antibakteriālo līdzekļu atliekvielām virs metodes noteikšanas robežas, kas ir vērtībās no 9,4 līdz 20 µg/kg atkarībā no konkrētā savienojuma [21, 22]. Kā arī nevienā no analizētajiem medus paraugiem netika konstatētas aizliegto farmakoloģiski aktīvo vielu klātbūtne virs analītiskās metodes noteikšanas robežas (*LOQ*), kas ir 0,14 µg/kg hloramfenikolam un no 0,59 līdz 1,1 µg/kg nitroimidazoliem [21].

Šis fakts varētu būt saistīts ar to, ka biškopji tiek labi informēti un apmācīti alternatīvām bišu slimību apkarošanas metodēm un antibakteriālie līdzekļi netiek plaši pielietoti bišu saimju slimību apkarošanai. Piem., nozemozes ārstēšanai, kas ir otra izplatītākā sastopamā bišu slimība Latvijā pēc varrozes, tiek piedāvāta alternatīvā ārstēšana, kas ietver sevī saimju sašaurināšanu, bišu pārcelšanu tīrā dezinficētā stropā un bišu piebarošanu ar kandiju vai cukursīrupu ar ārstniecisko augu piedevu (mārsils, vērmeles), paskābinot barību ar citronskābi) [23].

Pesticīdu atliekvielu sastopamība medus paraugos

Divu gadu pētījuma rezultāti norādīja uz biežu pesticīdu atliekvielu sastopamību medus paraugos, piem., 2020. gada veiktajā pētījumā katrā no 15 testētajiem medus paraugiem tika konstatētas pesticīdu atliekvielas,

un trīs paraugos glifosāta atliekvielas pat pārsniedz maksimāli pieļaujamo normu (MRL), kas ir 0,05 mg/kg saskaņā ar Regula (EU) 293/2013 [22].

Rezultāti uzrādīja neonikotinoīdu grupas pesticīda klātbūtni - tiametoskāms, kura lietošana ir aizliegta saistībā ar palielinātu risku bitēm [21]. Jau no 2013. gada 30. novembra spēkā ir stājies aizliegums augu aizsardzības līdzekļiem, kas satur citu neonikotinoīdu grupas aktīvās vielas - klotianidīnu, tiametoksamu vai imidakloprīdu, izmantošanai sēklu apstrādei, augsnes apstrādei, kā arī kultūraugu apsmidzināšanai, izņemot izmantošanu siltumnīcās vai augu apsmidzināšanai pēc noziedēšanas.

Tika detektēts vēl viens neonikotinoīdu grupas pesticīds - tiakloprīds, kas bitēm būtiski ietekmē glutationa metabolismu un glicerofosfolipīdu metabolismu, kā arī izraisa uzvedības disregulāciju [24]. Augu aizsardzības līdzekļu reģistrā uz to brīdi nebija reģistrēta neviena augu aizsardzības līdzekļa ar aktīvo vielu tiakloprīds [25]. Saskaņā ar 2020. gada 12. marta lēmumiem Nr. 3543 un Nr. 3544 augu aizsardzības līdzekļu reģistrā anulēti vienīgie tiakloprīdu saturošie augu aizsardzības līdzekļi Biscaya OD un Proteus OD (Bayer AG) norādot, ka to darbība ir anulēta ar 04.08.2020. un krājumus atļauts izlietot līdz 31.12.2020. [26].

PIELIETOTĀS METODES

Medus kvalitātes novērtējuma metodes

Latvijas izcelsmes medus autentiskuma, kvalitātes un nekaitīguma novērtējumam tika pielietotas septiņas akreditētas analītiskās metodes:

- Fruktozes, glikozes un saharozes noteikšana ar augsti efektīvo šķidruma hromatogrāfiju (§ 64 LFGB L 40.00-7);
- Mitruma noteikšana ar refraktometrisko metodi (IHC 1:2009);
- Elektrovadītspējas noteikšana (IHC 2:2009);
- pH un brīvā skābuma noteikšana ar titrēšanu līdz pH 8,3 (IHC 4.1:2009);
- Diastāzes aktivitātes (skaitļa) noteikšana pēc Phadebas (IHC 6.2:2009);
- Ūdenī nešķīstošo vielu noteikšana (IHC 8:2009);
- 5-(Hidroksimetil)furfurola (HMF) noteikšana medū ar šķidruma hromatogrāfiju (BIOR-T-012-184-2016).

Detalizēti metožu paraksti ir atrodami 1. pielikumā.

Medus nekaitīguma novērtējuma metodes

Medus nekaitīguma novērtēšanai tika testētas pesticīdu atliekvielas. Testēšanai tika pielietotas sekojošas akreditētas metodes: pesticīdu noteikšanas multi-metode ar šķidruma un gāzu hromatogrāfiju – tandēma masspektrometriju (LVS EN 15662:2018) un vienatlieku metode glifosāta noteikšanai augu un dzīvnieku izcelsmes produktos ar šķidruma hromatogrāfiju – tandēma masspektrometriju (BIOR-T-012-145-2013).

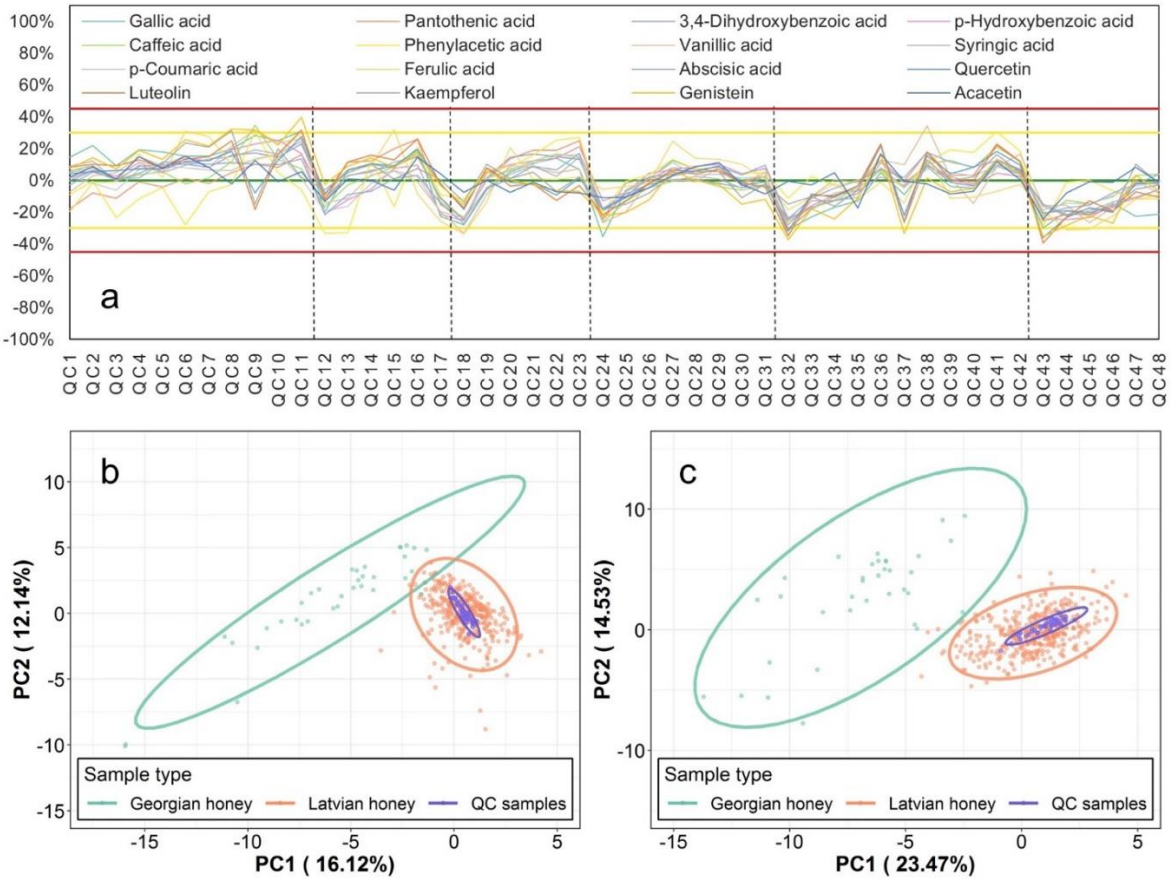
Detalizēti metožu paraksti ir atrodami 1. pielikumā.

Medus autentiskuma noteikšanas metode un datubāze

Pielietojot mērķa un nemērķēta fenolo savienojumu noteikšanas metodi ar augsti efektīvo šķidruma hromatogrāfiju – augstas izšķirtspējas masspektrometriju (AEŠH-AIMS) (skat. 1. pielikumu), tika izveidota datubāze, kuru var izmantot Latvijas reģiona medus izcelsmes identificēšanai. Kopumā tika analizēti 393 Latvijas izcelsmes medus paraugi un, metodes robustuma noteikšanas ietvaros, arī 35 Gruzijas izcelsmes medus paraugi.

Tika noteikts 29 dažādu polifenolu, 2 augu hormonu un 3 ūdenī šķīstošo vitamīnu saturs medus paraugos (visi savienojumi ir fenolie savienojumi ar antioksidantu iedarbību). 2. pielikumā ir pievienota datubāze .xslx formātā. Savienojumu koncentrācijas ir norādītas $\mu g\ kg^{-1}$ medus parauga. Datubāzē pievienota ir no biškopjiem iegūtā informācija par medus paraugu florālo izcelsmi, aptuvenās paraugu ievākšanas koordinātas, ievākšanas gads un sezona.

Kvalitātes kontroles paraugu analīze norādīja uz to, ka iegūtie dati ir augstas kvalitātes. Kvalitātes kontroles paraugs bija kopparaugs, kurš tika iegūts sajaucot ~ 5 g alikvotas no visiem analizētajiem Latvijas izcelsmes medus paraugiem (n = 393). Pēc paraugu analītiskajām sekvencēm gandrīz 7 diennakšu garumā, kvalitātes kontroles paraugos tika novērota ļoti zema izkliede starp analizētajiem savienojumiem – divas standartnovirzes 2σ (±30%) lielākajai daļai savienojumu un trīs standartnovirzes 3σ (±45%) visiem savienojumiem (3a. attēls). Iegūtajiem rezultātiem tika veikta arī principiālo komponentu analīze (3b. un 3c. attēli). Kvalitātes kontroles paraugi veido izteiktu un ciešu kopu starp Latvijas izcelsmes medus paraugiem, kas norāda uz augstu mērījumu precizitāti.



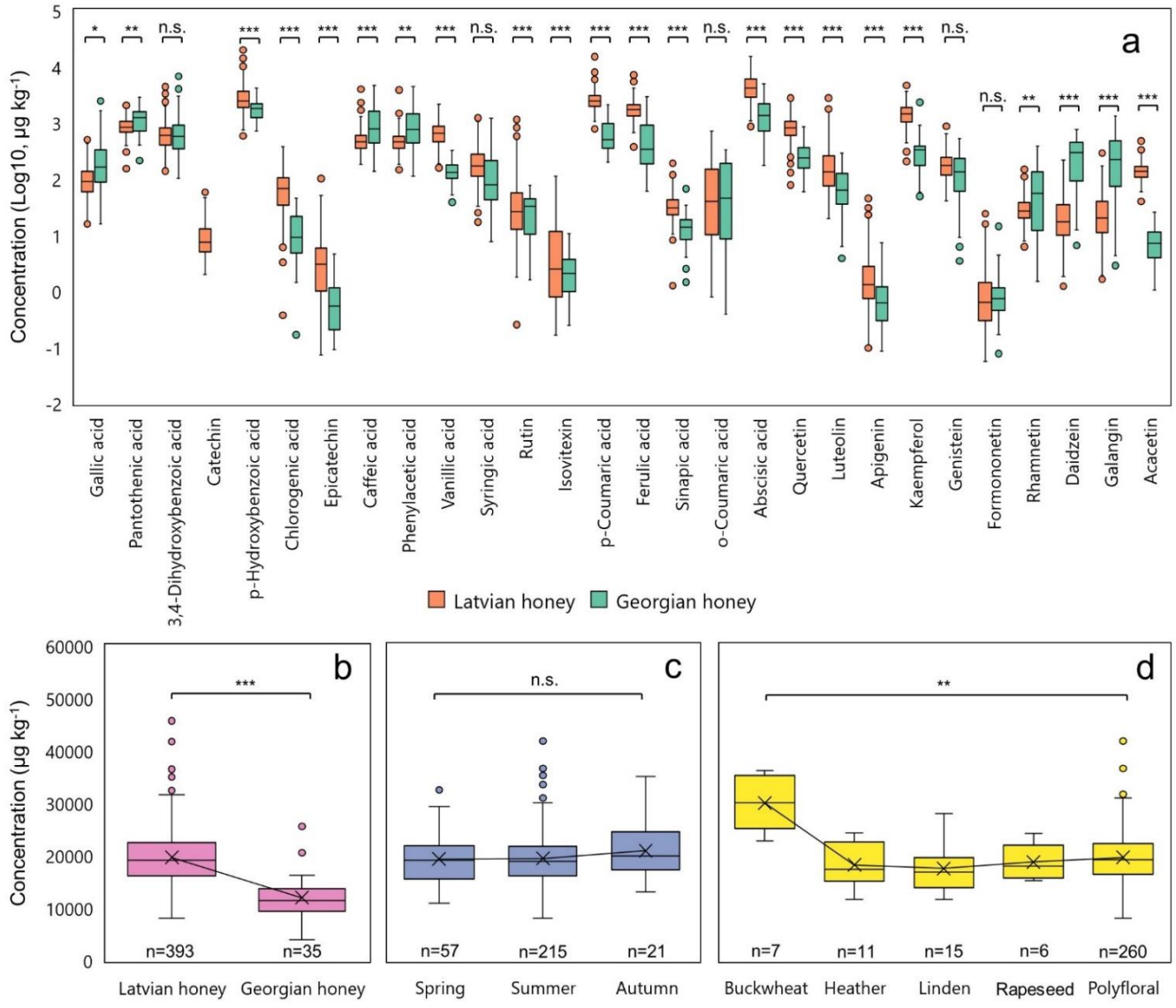
3. Attēls (a) Kontrolkartes noteiktajiem savienojumiem kvalitātes kontroles paraugos ar koncentrācijām lielākām par 100 µg kg^{-1}, attēloti attiecībā pret vidējo koncentrāciju visos paraugos. Vertikālās līnijas norāda dīkstāvi starp analīzes sekvencēm; (b) principiālo komponentu analīzes grafiks Latvijas un Gruzijas medus paraugiem un Latvijas kopparaugam un (c) LN pārveido datu grafiks.

Individuālo savienojumu saturs vizuāli attēlots 4a. attēlā. T-testi norādīja statistiski nozīmīgas atšķirības (norādītas kā * p-vērtībai < 0,05; ** p-vērtībai < 0,01; *** p-vērtībai < 0,001) vidējām koncentrācijām lielākajai daļai noteikto savienojumu starp Latvijas un Gruzijas paraugu kopām (Gruzijas medus paraugi šajā pētījumā tika izmantots metodes ticamības pārbaudei). Visu noteikto savienojumu kopējais saturs (4b. attēls) bija robežās no 8003 līdz 45635 µg kg^{-1} un no 3936 līdz 25519 µg kg^{-1} Latvijas un Gruzijas medus paraugiem attiecīgi. T-testi norādīja uz ļoti nozīmīgu atšķirību ($p < 0,001$) starp vidējām koncentrācijām visos Latvijas (n = 393, 19568 µg kg^{-1}, standartnovirze 5235 µg kg^{-1}) un Gruzijas medus

paraugos (n = 35, 11904 µg kg^{-1}, standartnovirze 4439 µg kg^{-1}). Latvijas medū, salīdzinājumā ar Gruzijas medu bija ievērojami vairāk fenolo savienojumu.

Latvijas medus paraugu ietvaros tika veikts salīdzinājums fenolo savienojumu koncentrācijas izmaiņām starp sezonām (4c. attēls). Tika novērota tendence palielināties vidējai fenolo savienojumu koncentrācijai līdz ar gadalaiku pārmaiņām. Rudenī ievāktajos paraugos bija lielāka polifenolu koncentrācija, bet tā nebija statistiski nozīmīga (p = 0,232, salīdzinājumā ar pavasarī ievākto medu).

Tika novērtēts fenolo savienojumu kopējais saturs dažādajiem monoflorālajiem medus veidiem (4d. attēls). Tika analizēts griķu (n = 7, *Fagopyrum esculentum*), viršu (n = 11*, Calluna vulgaris*), liepu (n = 15, *Tilia cordata*) un rapšu medus (n = 6, *Brassica napus*). Balstoties uz ražotāju sniegto informāciju, tika analizēti arī poliflorālā medus paraugi (n = 260). Tika novērots, ka rapšu medus paraugos bija būtiski lielāki fenolo savienojumu koncentrāciju līmeņi (p = 0,003, salīdzinājumā ar poliflorālo medu). Novērojumi saskan ar iepriekšējiem pētījumiem [27,28,29]. Galvenās atšķirība rapšu medus paraugiem bija lielā fenolo skābju koncentrāciju summa. Tā bija vidēji divas reizes augstāka (21745 µg kg^{-1}, SD 5794 µg kg^{-1}), salīdzinot ar citiem monoflorālo medus veidiem un poliflorālo medu (10254 µg kg^{-1}, SD 3980 µg kg^{-1}).



4. Attēls Kastveida diagrammas (a) individuālo savienojumu koncentrācijām medus paraugos, (b) kopējā fenolo savienojumu summa Latvijas un Gruzijas medus paraugos, (c) sezonālajos medus paraugos un (d) monoflorālajos medus paraugos.

Starp 34 pētītajiem savienojumiem visos paraugos tika noteikti 18 savienojumi virs metodes kvantifikācijas limita. Visaugstākās savienojumu koncentrācijas tika noteiktas p-hidroksilbenzoskābei un p-kumārskābei (19823 ± 1427 μg kg^{-1} and 7001 ± 434 μg kg^{-1} attiecīgi). Paraugā, kuram nav zināma florālā izcelsme, tika konstatēts visaugstākais p-kumārskābes līmenis (15043 ± 933 μg kg^{-1}). Vidējā p-hidroksilbenzoskābes un p-kumārskābes koncentrācija visos paraugos bija 3352 μg kg^{-1}, SD 2781 μg kg^{-1} un 2705 μg kg^{-1}, SD 1327 μg kg^{-1} attiecīgi.

No flavanoīdu grupas visaugstākie koncentrāciju līmeņi tika novēroti flavonolu un flavonu apakšklases savienojumiem. Lielākais kaempferola saturs 4818 ± 501 μg kg^{-1} tika noteikts poliflorālas izcelsmes paraugā, un kopējā paraugu kopā koncentrācija bija 1500 μg kg^{-1}, SD 683 μg kg^{-1}. Augstākais novērotais kvercetīna līmenis bija 2764 ± 580 μg kg^{-1} poliflorālas izcelsmes paraugā. Vidējā kvercetīna koncentrācija visā paraugu kopā bija 847 μg kg^{-1}, SD 391 μg kg^{-1}. Flavons luteolīns augstākajā koncentrācijā (3453 ± 262 μg kg^{-1}) bija detektēts nezināmas florālās izcelsmes paraugā, un vidējā koncentrācija bija 273 μg kg^{-1}, SD 406 μg kg^{-1}.

Augu hormons, abscīnskābe (*abscisic acid*) tika noteikts visos paraugos, koncentrāciju diapazonā no 853 līdz 15144 μg kg^{-1}. Vidējā savienojuma koncentrācija bija 4720 μg kg^{-1}, SD 2571 μg kg^{-1}. Līdzīgi feniletiķskābe tika konstatēta koncentrācijās no 145 līdz 3837 μg kg^{-1}, ar vidējo vērtību 503 μg kg^{-1}, SD 274 μg kg^{-1}.

Pantotēnskābe (vitamīns B5) tika konstatēta visos paraugos, koncentrāciju diapazonā no 152 līdz 2046 μg kg^{-1}, vidējā koncentrācija bija 890 μg kg^{-1}, SD 311 μg kg^{-1}. Citi ūdenī šķīstošie vitamīni bija konstatēti reti virs kvantificēšanas limita vērtībām. Folskābe (*folic acid*) tika konstatēta tikai 28 paraugos ar visaugstāko koncentrāciju tikai 18 μg kg^{-1} un vidējo 6 μg kg^{-1}, kas ir tieši virs kvantificēšanas limita folskābei (5 μg kg^{-1}). Biotīns tika konstatēts tikai 3 paraugos ar augstāko koncentrāciju 7 μg kg^{-1}, bet ar vidējo koncentrāciju zem kvantificēšanas limita.

Rezultāti sakrīt ar citiem pētījumiem un ir novērojamas zināmas tendences atsevišķiem noteiktajiem savienojumiem atšķirties koncentrāciju ziņā. Lielākajā daļā gadījumu tika novērots, ka Latvijas medus ir fenolo savienojumu daudzuma ziņā pielīdzināms ārzemēs iegūtam augstas kvalitātes medum. Piemēram, genisteina (*genistein*) koncentrācija visos Latvijas medus tipos bija augstāka nekā akācijas medū no Itālijas [27] un priežu izsvīduma medū no Turcijas [28]. Literatūras izpētē tika norādīts, ka noteiktie abscīnskābes vidējie un augstākie koncentrāciju līmeņi bija vieni no augstākajiem, kuri līdz šim ir ziņoti [29,30,31] un arī ievērojami augstāki nekā Gruzijas medū (4a. attēls).

Nemērķēts skrīnings

Nemērķēta skrīninga rezultātā, izmantojot UHPLC-AIMS, tiek iegūts parauga profils, kuru apraksta dažādas intensitātes hromatogrāfiskās joslas un masspektrometriskie spektri. Datu apstrādei ir pieejama programmatūra, kas spēj atsevišķos savienojumu spektrus un hromatogrāfijas joslas identificēt un asociēt ar paraugu grupām. Ar nosacījumu, ka ir pietiekoši liels paraugu skaits ar zināmu izcelsmi (florālo, ģeogrāfisko u.c.) ir iespējams izveidot statistiski nozīmīgas asociāciju grupas, un ir iespējams klasificēt paraugus ar nezināmu izcelsmi.

Lai veiktu patiešām precīzu medus autentiskuma noteikšanu, ir nepieciešams analizēt vairāk paraugus, lai precīzāk identificētu savienojumus un tās koncentrācijas, kuras atbilst konkrēta augu medus veidam. Iegūstot vairāk datus, būs iespējams izveidot matemātiskos un statistiskos modeļus jeb pielietot tā saucamos "mašīnmācīšanās" algoritmus, kas spēs klasificēt medus veidus, balstoties uz jau esošajiem datiem.

Izveidojot pietiekoši lielu sākotnējo datu matricu, ir iespējams izvērtēt atšķirības paraugu kopās un identificēt ķīmiskos savienojumus, kas diskriminē šīs kopas. Sākotnēji datu daudzumu ir nepieciešams samazināt, izmantojot nepārraudzītas datu samazināšanas metodes (piemēram, principālo komponentu analīze jeb PCA). Daudzos pētījumos interesējošie (diskriminējošie) savienojumi pirms analīzes veikšanas nav zināmi. Tādos gadījumos PCA analīze ir viens no populārākajiem veidiem, kā samazināt datu daudzumu un noskaidrot tās datu kopas dimensijas jeb diskriminējošos savienojumus, kuri ir atbildīgi par variāciju un lielākajām izmaiņām datu kopā.

PCA analīze ir piemērota sākotnējiem eksperimentiem, lai ieraudzītu datu sakarības paraugu kopā, bet var tikt viegli iespaidota ar dažādām novirzēm (*outliers*). Noviržu rezultātā paraugu grupu sadalījums ir sliktāks un datu punkti jeb paraugi saplūst kopā.

PCA analīzes rezultātā var vizuāli novērot atšķirības starp paraugiem, jo veidojas paraugu grupas. Lai identificētu konkrētos datu punktus jeb savienojumus, kuri ir atbildīgi par paraugu grupu radīšanu, var pielietot daļēji mazāko kvadrātu diskriminējošo analīzi (*partial least squares discriminant analysis* jeb PLS-DA).

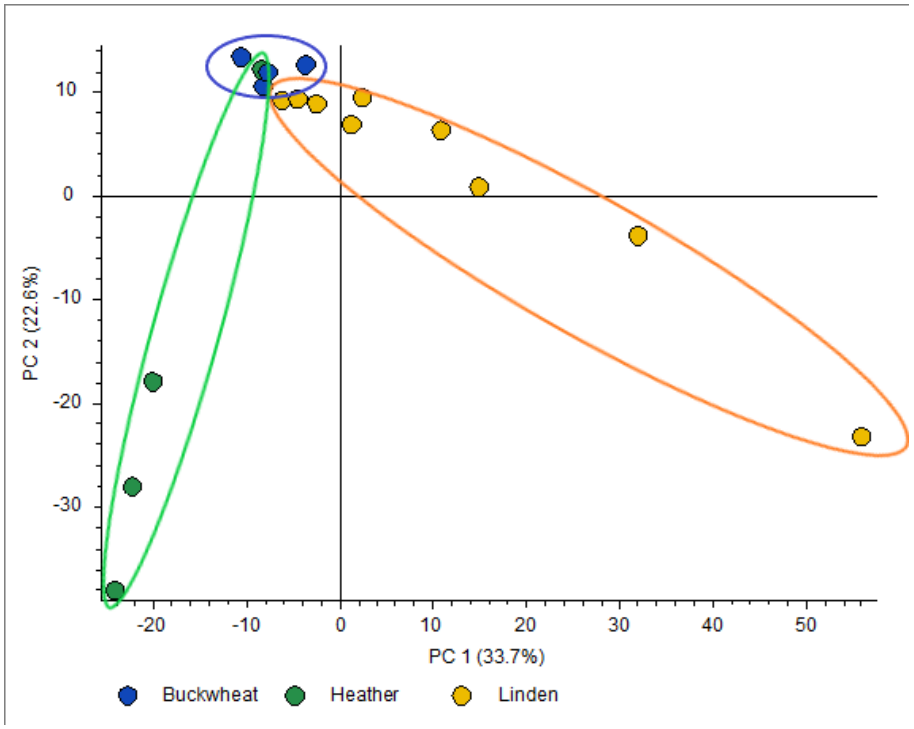
Tālāk ir apskatīti sākotnējie PCA un PLS-DA analīzes rezultāti. Rezultāti ir apstrādāti, izmantojot Compound Discoverer 2.1 (Thermo Scientific) programmatūru.

PCA analīzes rezultāti:

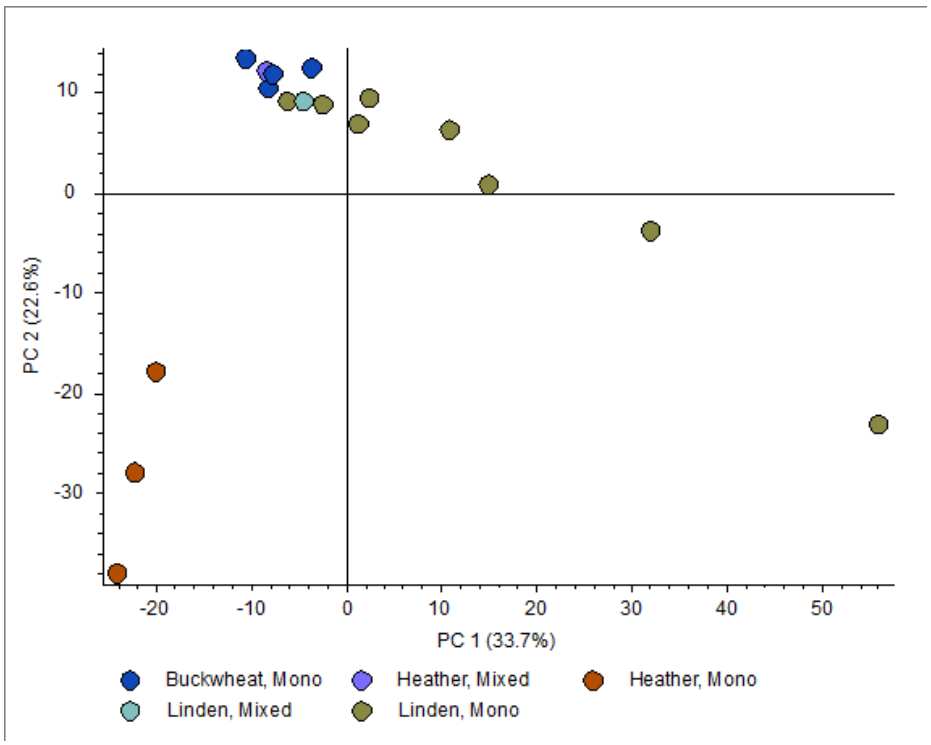
Pirmajā PCA grafikā ir aplūkojama atšķirība starp trīs veidu medus paraugiem – griķu, viršu un liepziedu. Ir novērojama grupu veidošanās, bet grupas nav izteiktas, jo atsevišķi paraugi ir jauktas florālās izcelsmes. Piemēram, viršu medus paraugs PCA grafikā 1., kurš pārklājas ar griķu izcelsmes medus grupu ir jauktas izcelsmes medus paraugs, kā tas ir ilustrēts PCA grafikā 2. Līdzīga sakarība ir novērojama arī liepziedu izcelsmes medus grupā (PCA grafiks 1.), jo viens paraugs ir bijis norādīts kā jaukts liepziedu medus (PCA grafiks 2.). Divi liepziedu medus paraugi ir novērojami ļoti tuvu griķu medus paraugu grupai, kas liecina par to, ka šie paraugi, visticamāk, ir jauktas izcelsmes, nevis tīri liepziedu medus paraugi. Griķu medus paraugi pieder

polifloras (dažādu veidu augu) medus izcelsmes paraugu grupai (dati nav parādīti), bet, ņemot vērā tikai monofloras izcelsmes medu, tie veido atsevišķu grupu.

PCA grafiks 1.



PCA grafiks 2.

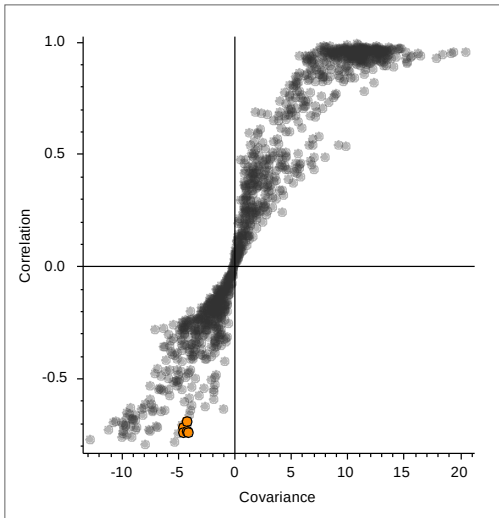


PLS-DA rezultāti:

Pēc sākotnējās PCA analīzes ir veikta PLS-DA analīze, kura palīdz identificēt savienojumus, kuri diskriminē savienojumu grupas. Tālāk seko piemēri atsevišķām, statistiski nozīmīgām PLS-DA komponentēm. Komponentes ir limitētas līdz 5 diskriminējošajiem savienojumiem. Pēc līdzīga piemēra tiek meklēti marķieri katram individuālajam florālās izcelsmes medum.

Sekojot PLS-DA analīzei ir nepieciešama atsevišķa metodoloģija, kas ļautu identificēt šos savienojumus, balstoties uz vielu hromatogrāfiskajiem izdalīšanās laikiem, molekulu fragmentācijas spektru salīdzinājumu ar spektrālajām bibliotēkām un fragmentācijas paredzēšanu, izmantojot specializētu programmatūru.

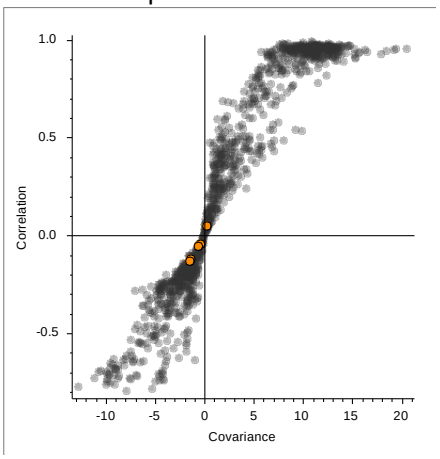
PLS-DA komponente 1:



Identificēts viens savienojums (molekulformula $C_{18}H_{24}N_4O_5$), kas ir atbilstošs monoflorā liepziedu un meža medus marķieris.

Formula	Molecular We	RT [min]	Area (Max.)	Group Areas											
				Field mixed, Mixed	Linden, Mono	Field and forest, Mixed	Linden, Mixed	Clover - amol, Mono	Clover, Mono	Field mixed, Mono	Forest, Mono	Forest, Mixed	Buckwheat, Mono	Heather, Mixed	Heather, Mono
C9 H14 O4	186.08913	8.283	43240	3.40e3	7.07e3	2.51e3	7.35e3	8.88e3	6.62e3	2.12e4	1.26e4	4.29e4	3.23e4	4.32e4	2.33e4
C10 H16 O5	216.09973	8.283	32310	2.39e3	5.22e3	3.32e3	3.19e3	7.46e3	5.42e3	1.80e4	8.79e3	3.23e4	2.11e4	3.00e4	1.85e4
C18 H24 N4 O5	376.17315	8.281	1120919	9.38e4	1.48e5	5.09e4	1.35e5	2.42e5	1.81e5	6.02e5	2.65e5	1.12e6	7.07e5	9.88e5	6.62e5
C17 H31 N O9	393.19995	8.283	209794	2.11e4	3.09e4	1.04e4	2.56e4	4.97e4	3.76e4	1.23e5	4.77e4	2.08e5	1.47e5	2.09e5	1.57e5
C14 H19 F2 N9 O3	399.15962	8.280	104147	8.53e3	1.68e4	6.00e3	1.39e4	2.65e4	1.98e4	5.24e4	2.24e4	1.04e5	7.86e4	1.04e5	7.08e4

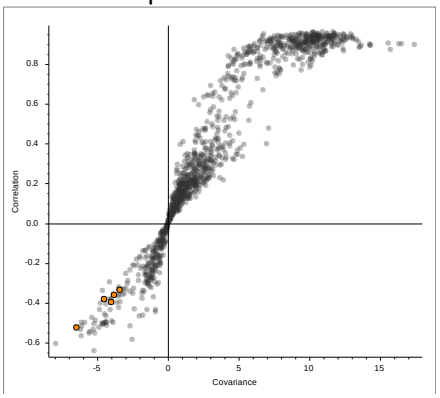
PLS-DA komponente 2:



Identificēts vairāki savienojumi ($C_{13}H_{18}O_2$, $C_{10}H_{12}O_2$, $C_{10}H_{14}O_5$), kas ir atbilstoši monoflorā viršu un meža medus marķieri.

Formula	Molecular We	RT [min]	Area (Max.)	Group Areas											
				Field mixed, Mixed *	Linden, Mono	Field and forest, Mixed	Linden, Mixed	Clover - amol, Mono	Clover, Mono	Field mixed, Mono	Forest, Mono	Forest, Mixed	Buckwheat, Mono	Heather, Mixed	Heather, Mono
C11 H14 O6	242.07866	7.179	78240	7.55e2	9.30e2	7.58e2	7.35e2	8.87e2	7.29e2	9.34e2	9.14e2	2.31e4	5.14e2	5.31e2	3.25e4
C13 H18 O2	206.13052	6.862	342883	8.60e3	9.47e3	6.76e3	8.43e3	7.61e3	4.61e3	7.28e3	7.43e3	1.86e5	4.26e3	3.46e3	2.51e5
C10 H12 O2	164.08368	7.566	237411	4.21e4	4.04e4	5.66e4	5.44e4	3.17e4	3.69e4	3.69e4	3.19e4	1.70e5	2.65e4	2.96e4	2.05e5
C10 H14 O5	214.08340	5.259	164339	9.56e2	1.68e3	1.12e3	1.38e3	1.90e3	1.38e3	9.77e2	1.56e3	6.11e4	9.32e2	1.05e3	1.02e5
C16 H29 F O3 P2	350.15794	6.516	43787	3.35e2	3.67e2	2.16e2	2.55e2	3.98e2	1.65e3	2.88e2	2.87e2	1.34e4	1.99e2	3.14e2	2.19e4

PLS-DA komponente 3:



Identificēts viens savienojums (molekulformula $C_{10}H_8N_2O$), kas ir atbilstošs kopīgais griķu un viršu medus marķieris.

Formula	Molecular Weight	RT [min]	Area (Ma	Group Areas											
				Field mixed, Mixed *	Linden, Mono	Field and forest, Mixed	Linden, Mixed	Clover - amol, Mono	Clover, Mono	Field mixed, Mono	Forest, Mono	Forest, Mixed	Buckwheat, Mono	Heather, Mixed	Heather, Mono
C10 H8 N2 O	172.06370	6.659	3374289	2.26e5	8.08e4	2.49e4	2.23e4	6.64e4	1.47e4	8.62e4	3.24e4	2.54e5	1.89e6	1.06e6	1.66e5
C10 H8 N2 O2	188.05856	7.278	260651	3.46e3	1.43e3	1.26e3	6.58e2	1.35e3	3.47e2	6.66e3	4.39e2	1.53e4	1.01e5	7.11e4	8.15e3
C16 H20 N2 O7	352.12724	5.327	214539	9.80e3	3.31e3	7.39e2	7.26e2	2.59e3	5.45e2	3.20e3	8.05e2	1.18e4	7.07e4	6.12e4	4.65e3
C17 H22 N2 O9	398.13273	5.327	151994	7.01e3	2.03e3	5.09e2	4.95e2	1.89e3	4.03e2	2.21e3	4.71e2	7.84e3	5.20e4	4.67e4	3.70e3
C10 H8 N2 O	172.06384	6.222	127662	7.73e3	3.59e3	4.15e2	4.92e2	1.71e3	4.49e2	3.04e3	5.98e2	9.58e3	6.22e4	3.92e4	5.04e3

REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Fizikāli-ķīmisko parametru izvērtējums medus paraugos

Pētījuma gaitā tika izvērtēti sekojoši medus kvalitātes rādītāji: pH, elektrovadītspēja, mitrums, brīvās skābes, diastāzes skaitlis, hidroksimetilfurfurols, ūdenī nešķīstošās vielas un cukuru saturs. Medus atbilstības izvērtēšanas kvalitātes rādītāji, kas norādīti MK noteikumos Nr. 251 "Kvalitātes, klasifikācijas un papildu marķējuma prasības medum" un medus testēšanas rezultāti ir apkopoti sekojošā tabulā.

1. tabula

Medus sastāva rādītāju apkopojums

Parametrs	pH	Mitrums	Diastāzes skaitlis	Saharoze	Reducējošie cukuri	Brīvais skābums	Hidroksi-metilfurfurols	Elektro-vadītspēja	Ūdenī nešķīstošas vielas
Mērvienība	-	%	*Schade* skalas vienības	%	%	mekv/kg	mg/kg	mS/cm	g/100g
N	63	269	254	146	110	118	195	79	41
N < LOQ	-	-	-	130	-	-	31	-	-
Maksimālais	6,1	21	91	3,5	78	34	1278	1,2	0,16
Minimālais	3,5	8,1	9,8	1,0	64	5,9	1,0	0,12	0,0028
Vidējais lielums	4,3	17	36	1,7	70	20	11	0,50	0,024
Mediāna	4,2	17	33	1,5	70	20	2,2	0,46	0,015
Norma	-	< 20%	> 8	< 5	> 60	< 80	< 40	< 0.8	< 0,1
Neatbilstošo paraugu skaits	**-**	**2**	**0**	**0**	**0**	**0**	**3**	**6**	**1**

Kopā 12 medus paraugi neatbilda noteiktajām prasībām, pārsniedzot mitruma saturu divos paraugos, sešos gadījumos elektrovadītspēju, trijos gadījumos HMF saturu un vienā gadījumā ūdenī nešķīstošās vielu daudzumu.

Analizētajos medus paraugos tika konstatēts vidēji 17 % ūdens saturs, minimālais mitruma rādītājs ir 8,1% un maksimālais – 21%. Piemērojot MK noteikumos Nr. 251 noteiktās prasības par pieļaujamo ūdens saturu medū, tika secināts, ka 2 paraugi neatbilst normai, kas ir 20%. Paaugstināts ūdens daudzums, veicina medus rūgšanu.

Diastāze ir viens no medus fermentiem, ko medus pagatavošanas procesā nektāram pievieno bites. Diastāzes skaitlis ir mazs, ja bites barotas ar cukursīrupu, medus ir pārkarsēts vai ilgi glabāts. Medu uzglabājot, pēc 3-4 gadiem tā fermentu aktivitāte samainās apmēram divas reizes. Fermentu aktivitāte kalpo kā medus svaiguma rādītājs un pārkarsēšanas indikators. Pētījumā analizēto medu raksturo plaša diapazona diastāzes

skaitlis – no 9,8 līdz pat 91 *Schade* jeb *Gotes* vienībām ar vidējo rādītāju 36, kas iekļaujas noteiktajās prasībās, norādot uz medus svaigumu un dabīgumu.

Saharoze ir disaharīds, kura daudzums dažādās medus šķirnēs var būt atšķirīgs, līdz pat 5% dabiskā medū. No 146 pētītajiem paraugiem 130 paraugos saharozes saturs bija zemāks par 1% un 16 medus paraugos tā saturs variēja no 1,0 līdz 3,5 %, iekļaujoties MK noteikumos Nr. 251 noteiktai prasībai par saharozes daudzumu līdz 5%.

Bišu siekalu dziedzera fermenta invertāzes ietekmē notiek saharozes inversija – tā sašķeļas glikozē un fruktozē, kurus apzīmē par reducējošiem cukuriem. Medum nogatavojieties, gandrīz visa saharoze pārvēršas glikozē un fruktozē. Parasti dabiskajā medū ir no 65 līdz 75% reducējošo cukuru. Glabāšanas procesā saharozes daudzums medū var samazināties pašinversijas rezultātā, ko veic medū esošie fermenti un organiskās skābes. Testētajos medus paraugos reducējošo cukuri tika konstatēti no 64 līdz 78%, ar vidējo vērtību 70%, kas atbilst medus kritērijam atbilstoši MK noteikumiem Nr. 251, kur norādīts, ka reducējošo cukuru daudzumam jābūt lielākam par 60%.

Medū atrodamas organiskās un neorganiskās skābes, kurām ir liela nozīme medus aromāta un garšas veidošanā. Medus paraugos konstatētais brīvo skābju daudzums ir no 5,9 līdz 34 mekv/kg ar vidējo vērtību 20 mekv/kg. Visi paraugi atbilst MK noteikumu Nr. 251 prasībām.

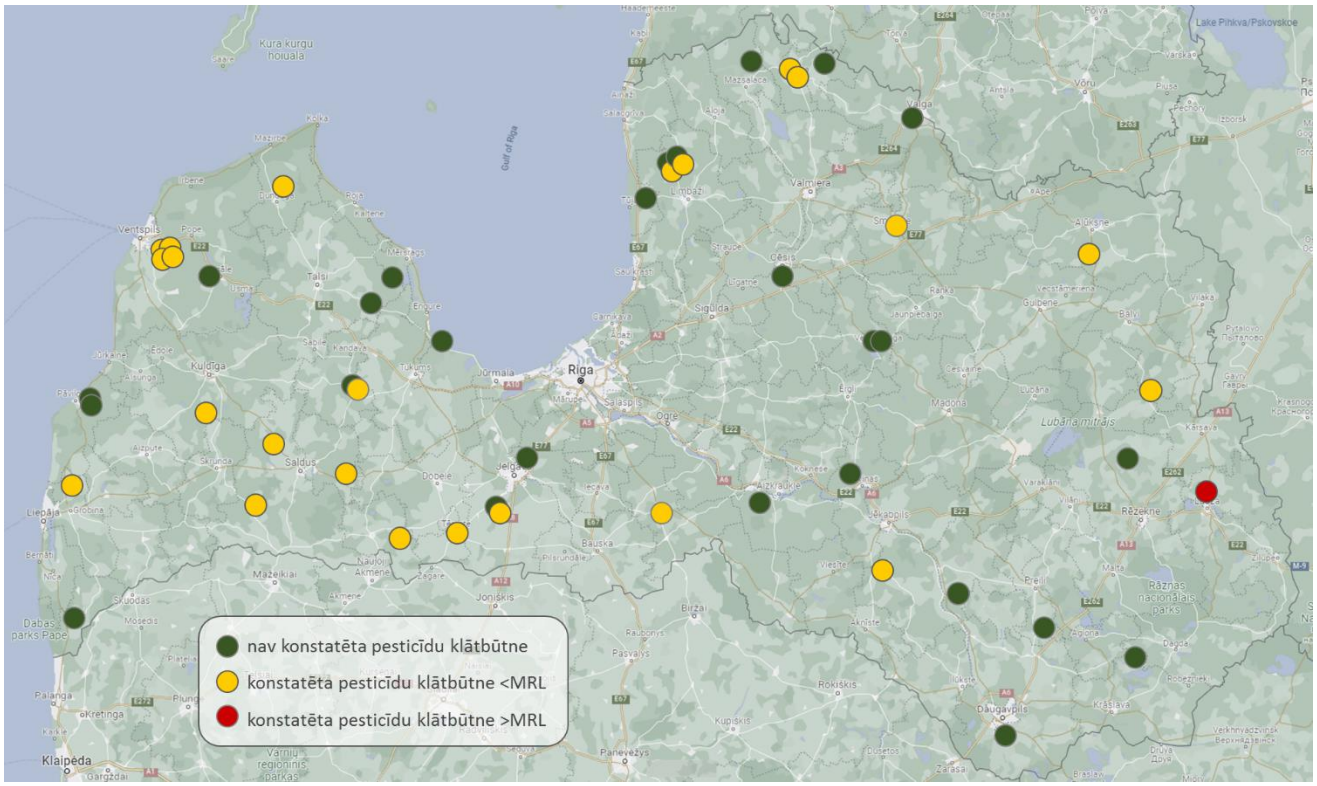
Medus elektrovadītspēju nosaka medū esošo minerālvielu koncentrācija. Pieļaujamā elektrovadītspēja ir līdz 0,8mS/cm. Pētījumā testētajos medu paraugos elektrovadītspēja ir no 0,12 līdz 1,2 mS/cm, vidējā vērtība 0,50 mS/cm. Sešu medus paraugu elektrovadītspēja pārsniedz MK noteikumos Nr. 251 noteikto prasību. Augsta elektrovadītspēja norāda, ka medus uzskatāms par lapu vai izsvīdumu medu.

Viens no 41 testētajiem medus paraugiem uzrādīja paaugstinātu ūdenī nešķīstošo vielu saturu, kurš atbilstoši MK noteikumiem Nr. 251 nedrīkst pārsniegt 0,1g/100g.

Hidroksimetilfurfurols jeb HMF ir cukuru termiskās šķelšanās produkts. HMF daudzums medū ir medus svaiguma un dabiskuma rādītājs. Tikko sviestā dabiskā medū HMF tikpat kā nav konstatējams. Augsts HMF saturs norāda uz augstā temperatūra sildītu vai ilgi glabātu medu. HMF svaigā medū pieaug atkarībā no pH vērtības un uzglabāšanas temperatūras – apmēram par 2-3 mg/kg gadā. Uzglabājot medu 21^{o}C temperatūrā, gada laikā HMF pieaug līdz 20 mg/kg. Augsts HMF saturs medū cilvēku veselībai nav vēlams un ir pat kaitīgs, tāpēc svarīgi, lai HMF saturs nepārsniedz normas. HMF ir konstatēts lielākai daļai testētajos medus paraugos no 1 līdz 29 mg/kg. Divos medus paraugos konstatēts palielināts HMF saturs 55 un 81 mg/kg un vienā izteikti liels HMF saturs 1278 mg/kg, kas pārsniedza MK noteikumos Nr. 251 noteikto prasību HMF saturam ne vairāk par 40 mg/kg. Paraugam ar izteikto lielu HMF saturu bija tumši brūna krāsa un nepatīkama deguma smaka, kas liecināja, ka medus tika pakļauts termiskai apstrādei.

Pesticīdu atliekvielu sastopamība medus paraugos

Pesticīdu atliekvielu sastopamībai tika testēti 50 Latvijas izcelsmes medus paraugi. 5. attēlā ir norādīta medus ievākšanas vietas pēc to novadiem un krāsu indikatori raksturo pesticīdu atliekvielu testēšanas rezultātu dotajā paraugā: i) zaļš - pesticīdu klātbūtne nav konstatēta, ii) dzeltens - pesticīdu klātbūtne ir konstatēta un iii) sarkans - konstatētā pesticīda daudzums pārsniedz maksimāli pieļaujamo līmeni.



5. attēls. Medus izcelsme pēc novadiem un pesticīdu atliekvielu konstatēšanas dati.

Kopumā 24 no 50 medus paraugiem tika detektēti 9 pesticīdu atliekvielas, no kurām septiņas pesticīdu atliekvielas ir ultra-zemu koncentrāciju līmenī, kas ir ng/kg parauga. Pārtikas drošības jomā šie detektētie daudzumi nekādā veidā nav kaitīgi patērētājiem, izņemot vienu medus paraugu, kurā glifosāta daudzums pārsniedz maksimāli pieļaujamo normu (MRL), kas ir 0,05 mg/kg saskaņā ar Regula (EU) 293/2013.

Konstatētie pesticīdi pēc iedarbības veida pieder pie fungicīdiem (fluapirāms, karbendazīms, tebukonazols, piraklostrobīns, protiokonazols), herbicīdiem (glifosāts) un insekticīdiem (tiakloprīds, dimetoāts, acetamiprīds). Neonikotinoīdu (tiakloprīds un acetamiprīds) gadījumā zemākā validētā kvantificēšanas robeža ir 0,001 mg/kg, pārējiem pesticīdiem – 0,01 mg/kg (skat. 2. tabulu). Pesticīdu klātbūtne, kas konstatēta zem zemākas validētās kvantificēšanas robežas, tika apstiprināta pēc sekojošiem kritērijiem: i) vielas aiztures laiks: 0,2 min no vielas aiztures laika paraugā ar standartpiedevu, ii) jonu attiecība: ±20% no jonu attiecības paraugā ar standartpiedevu, iii) signāla/trokšņa attiecība > 10.

2. tabula

Konstatēto pesticīdu atliekvielu daudzumu (mg/kg) apkopojums

Pesticīds	Konstatēšanas biežums	Maksimālais	Minimālais	Vidējais lielums	Mediāna	Norma (MRL, mg/kg)	**Neatbilstošo paraugu skaits**
Karbendazīms	1	0,0041	0,0041	0,0041	0,0041	1,00	**0**
Fluopirāms	9	0,011	0,001	0,0035	0,0028	0,05	**0**
Tiakloprīds	13	0,0085	0,0017	0,0038	0,0025	0,20	**0**
Dimetoāts	1	0,0022	0,0022	0,0022	0,0022	0,01	**0**
Tebukonazols	3	0,0054	0,0027	0,0043	0,0048	0,05	**0**
Acetamiprīds	1	0,038	0,038	0,038	0,038	0,05	**0**
Piraklostrobīns	1	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,05	**0**
Protiokonazols	2	0,0069	0,0017	0,0043	0,0043	0,05	**0**
Glifosāts	7	1,4	0,01	0,22	0,016	0,05	**1**

No detektējamiem pesticīdiem divi uz šo brīdi nav atļauti lietošanai – tiakloprīds un dimetoāts. Tiakloprīdu, kas ir neonikotinoīdu grupas insekticīds, plaši izmantoja lauksaimniecībā kukaiņu kaitēkļu apkarošanai. Tomēr vienlaikus tas arī nelabvēlīgi ietekmēja medus bišu veselību. Tiakloprīds bitēm būtiski ietekmē glutationa metabolismu un glicerofosfolipīdu metabolismu, kā arī izraisa uzvedības disregulāciju [24]. Saskaņā ar 2020. gada 12. marta lēmumiem Nr. 3543 un Nr. 3544 augu aizsardzības līdzekļu reģistrā anulēti vienīgie tiakloprīdu saturošie augu aizsardzības līdzekļi Biscaya OD un Proteus OD (Bayer AG) norādot, ka to darbība ir anulēta ar 04.08.2020. un krājumus atļauts izlietot līdz 31.12.2020. [26].

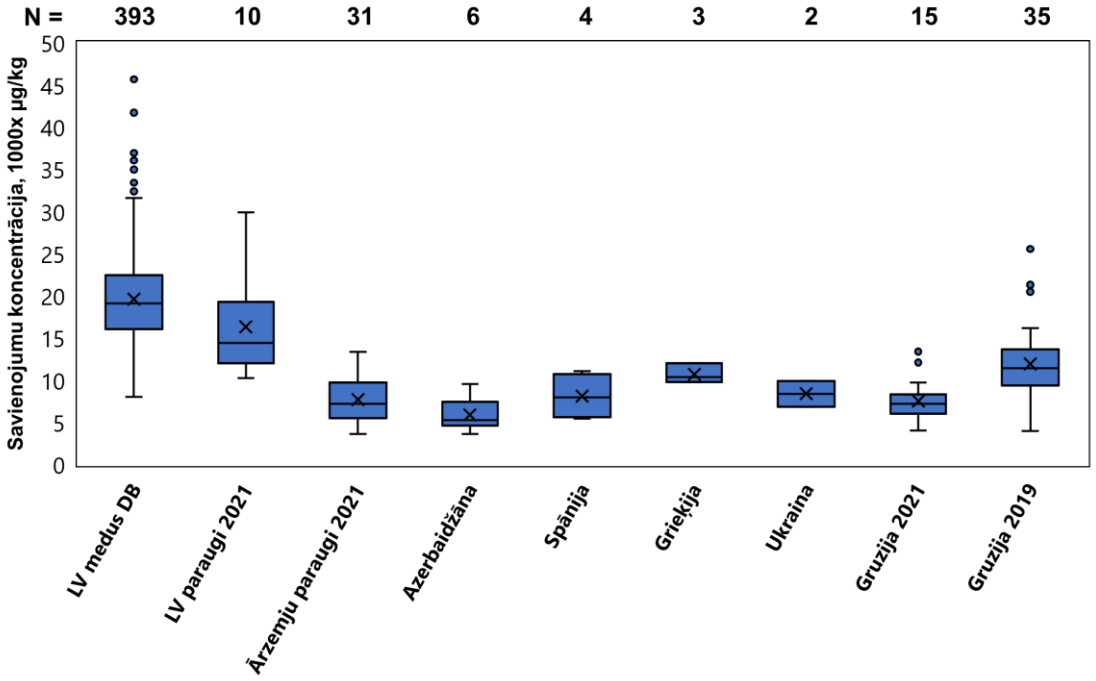
Līdzīga situācija ir arī ar dimetoātu, kura lietošana tika apstādināta ar Komisijas īstenošanas regulu (ES) 2019/1090 lēmumu un vēlākais līdz 2020. gada 17. janvārim bija jāatsauc tādu augu aizsardzības līdzekļu atļaujas, kas kā darbīgo vielu satur dimetoātu.

Medus autentiskuma noteikšana, datu bāzes aprobēšana

Pētījumā veikta medus autentiskuma pārbaudes algoritma izstrāde, balstoties uz iepriekš izveidotās flavonoīdu datubāzes vērtībām. Algoritma aprobācijas nolūkos tika veikta 31 ārzemju izcelsmes medus parauga, tai skaitā no Grieķijas (n=3), Ukrainas (n=2), Azerbaidžānas (n=6), Spānijas (n=4), Gruzijas (n=15) un Vācijas (n=1), kā arī 10 Latvijas izcelsmes medus paraugi. Papildus algoritma pārbaude veikta, izmantojot izlases kopas no iepriekš izveidotās datubāzes. 2. pielikumā ir pievienota datubāze .xlsx formātā ar datiem, kas izmantoti algoritma aprobācijai.

Tika veikta 34 fenolo savienojumu noteikšana, kam piemīt antioksidantu iedarbība, tai skaitā 29 dažādu polifenolu, 2 augu hormonu un 3 ūdenī šķīstošo vitamīnu. Līdzīgi iepriekš novērotajai tendencei, arī

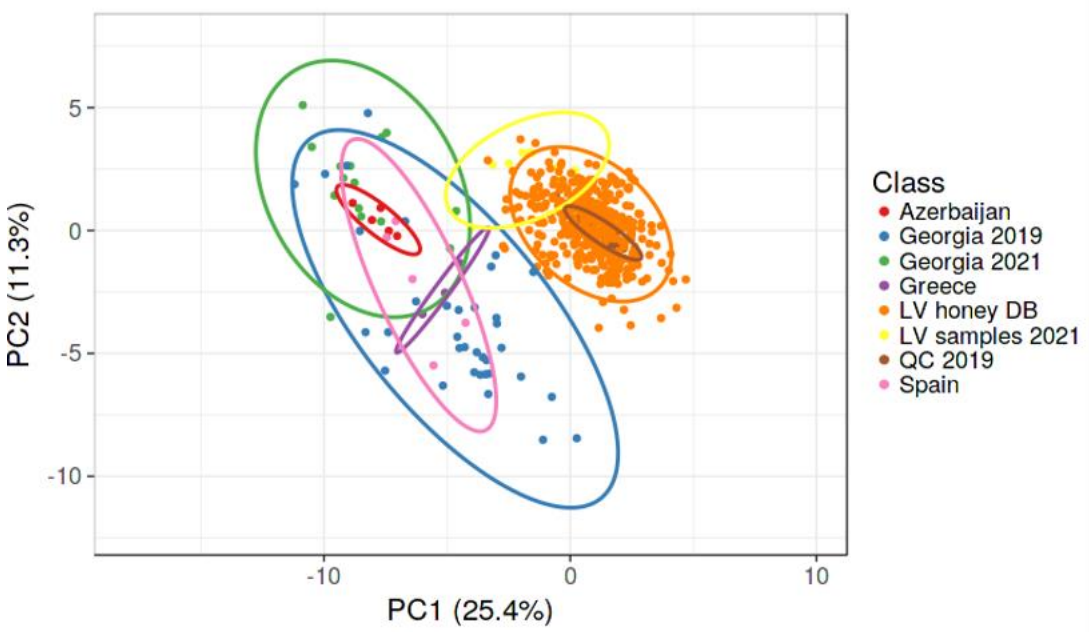
šajā pētījumā starp analizētajām paraugu kopām novērojamas būtiskas atšķirības kopējā fenolo savienojumu saturā (6. attēls). 2021. gadā analizētajos Latvijas izcelsmes medus paraugos kopējās fenolo savienojumu koncentrācijas ir izteikti augstākas nekā ārzemju izcelsmes medus paraugos, attiecīgi no 10208 līdz 29872 µg kg^{-1} un no 3573 līdz 13352 µg kg^{-1}.



6. attēls. Kopējais fenolo savienojumu saturs pētījumā iekļauto Latvijas un ārzemju izcelsmes medus paraugu kopās

Starp 34 pētītajiem savienojumiem visos paraugos tika noteikti 18 savienojumi virs metodes kvantificēšanas robežas. Gan Latvijas, gan ārzemju medus paraugos visaugstākās savienojumu koncentrācijas tika noteiktas augu hormona abscīnskābes un p-hidroksilbenzoskābes gadījumā (3519 ± 2036 µg kg^{-1} un 3426 ± 3091 µg kg^{-1} Latvijas medus paraugos un 1557 ± 1313 µg kg^{-1} un 1443 ± 531 µg kg^{-1} ārzemju medus paraugos).

Iegūtajiem rezultātiem tika veikta principiālo komponentu analīze, kas atspoguļo līdzības paraugu kopu ietvaros, balstoties uz fenolo savienojumu saturu (7. attēls). Grafikā attēloti gan iepriekš iegūtie, gan jaunie dati. Skaidri redzams, ka Latvijas medus paraugi veido kopas, kas ir būtiski atšķiramas no ārzemju paraugu kopām. Attiecībā uz ārzemju paraugiem, būtiskas atšķirības starp izcelsmes valstīm nav konstatētas.



7. attēls. Principiālo komponentu analīzes grafiks Latvijas un ārzemju medus paraugiem, kā arī Latvijas medus kopparaugam

Autentiskuma pārbaudes algoritma izstrāde veikta, pamatojoties uz iepriekš datubāzes izveidē noteiktajām individuālo flavonoīdu koncentrāciju diapazonu vērtībām. No pētījumā iekļautajiem 34 savienojumiem folskābe, katehīns, epikatehīns, biotīns, miricetīns, krizīns, un biohanīns A netika iekļauti algoritma izveidē, jo tie nav raksturīgi Latvijas izcelsmes medum, tomēr to klātbūtne var kalpot kā papildu indikators, ka medus ir ārvalstu izcelsmes. Tāpat algoritmā netika iekļauts procianidīns, jo tas nav sastopams medū. Algoritma izstrādei izmantotie katra savienojuma raksturlielumi apkopoti 3. tabulā.

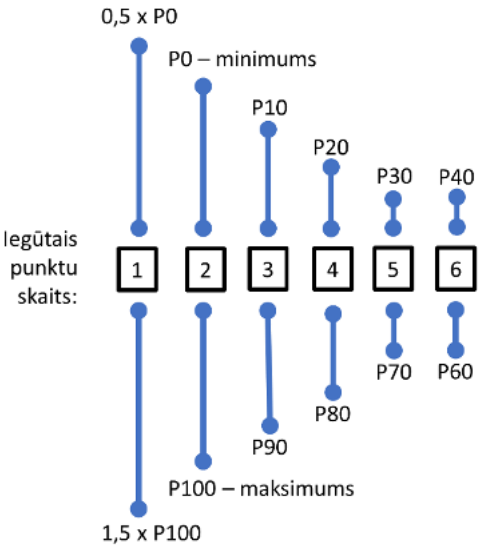
3. tabula

Algoritma izstrādei izmantotie savienojumu raksturlielumi

	Mediāna	Vidēji	Minimums	Maksimums	5P	95P
Gallic acid	90	113	16	506	33	261
Pantothenic acid (B5)	832	890	152	2046	486	1501
3,4-Dihydroxybenzoic acid	597	692	137	4348	207	1488
p-Hydroxybenzoic acid	2433	3352	583	19823	1167	8426
Chlorogenic acid	67	77	0	375	12	175
Caffeic acid	456	515	183	3949	247	909
Phenylacetic acid	453	504	145	3837	263	856
Vanillic acid	650	692	158	2118	255	1250
Syringic acid	169	227	17	1509	53	562
Rutin	26	65	0	1135	4	237
Isovitexin	2	10	0	112	0	50

p-Coumaric acid	2451	2705	774	15043	1422	4903
Ferulic acid	1704	1819	370	8807	938	3073
Sinapic acid	30	36	1	189	15	74
o-Coumaric acid	39	103	1	715	3	420
Abscisic acid	4100	4720	853	15144	1683	10008
Quercetin	802	847	77	2764	284	1515
Luteolin	132	273	19	3454	39	1147
Apigenin	1	3	0	49	0	11
Kaempferol	1426	1500	204	4818	574	2693
Genistein	172	196	40	877	73	413
Formononetin	1	2	0	26	0	6
Rhamnetin	27	32	6	181	12	72
Daidzein	17	28	1	216	4	86
Galangin	20	32	2	364	5	98
Acacetin	135	142	40	473	76	236

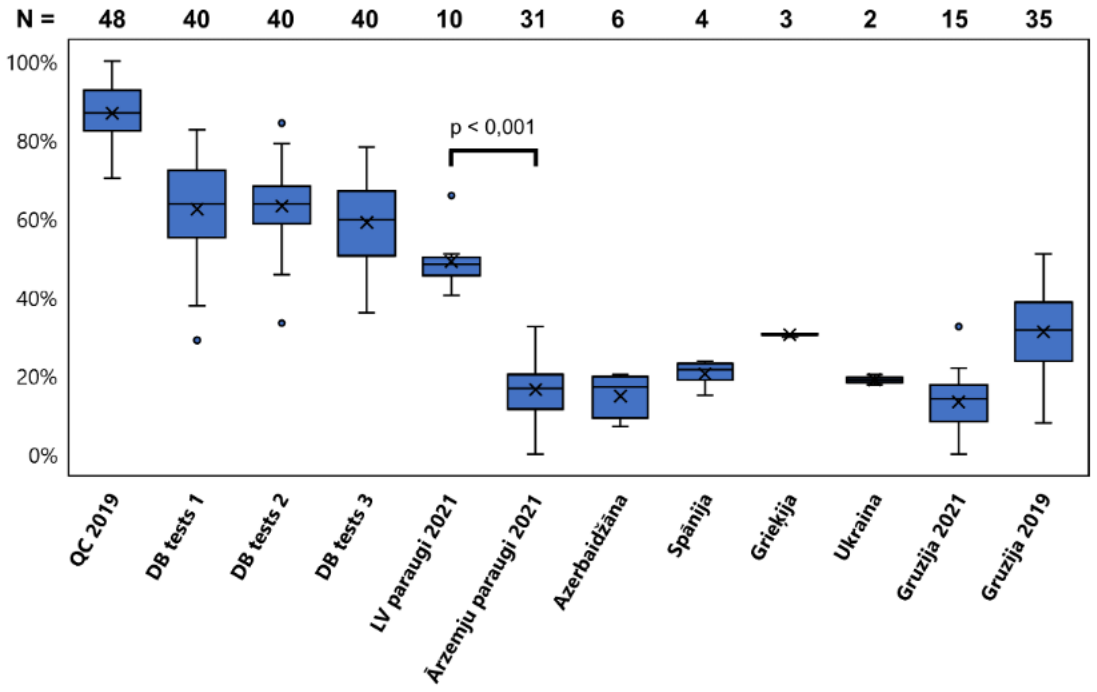
Autentiskuma pārbaudes pirmajā solī katram no 26 paraugā noteiktajiem savienojumiem tiek piešķirts vērtējums no 0 līdz 6 punktiem, atkarībā no tā, kurā procentiļu diapazonā tas iekļaujas (skatīt 8. attēlu).



8. attēls. Izstrādātās vērtējumu piešķiršanas sistēmas shematisks attēlojums

Augstākais vērtējums – 6 punkti tiek piešķirts, ja noteiktā koncentrācija iekļaujas starp 40. un 60. procentīli, tātad ir ļoti tuva vidējai datubāzes vērtībai, savukārt zemākais vērtējums – 0 punkti tiek piešķirts,

ja noteiktā koncentrācija ir ārpus intervāla starp 0,5 minimuma vērtībām un 1,5 maksimuma vērtībām. Nākamajā solī tiek noteikts parauga vidējais iegūtais vērtējums starp visiem analizētajiem savienojumiem. Attiecinot iegūto vērtību pret maksimāli iespējamo punktu skaitu, iegūst procentuāli izteiktu atbilstības vērtējumu. Pēdējā solī veic normalizēšanu pret minimālo-maksimālo vērtību diapazonu.



9. attēls. Iegūtie atbilstības vērtējumi dažādas izcelsmes medus paraugu kopām

9. attēlā redzami iegūtie procentuālie atbilstības vērtējumu rezultāti dažādām paraugu kopām, tai skaitā vairākkārtīgi analizētam Latvijas medus kopparaugam (*QC* 2019), kas iegūts sajaucot ~5 g alikvotas no 393 Latvijas izcelsmes medus paraugiem, tādējādi iespējami tuvu atspoguļojot vidējo flavonoīdu saturu Latvijas izcelsmes medū. Tāpat algoritma aprobācijai analizētas nejauši izvēlētas izlases datu kopas no datubāzes paraugiem (*DB tests 1, 2* un *3*). Papildus analizētajiem Latvijas (*LV paraugi*) un dažādu valstu ārzemju izcelsmes paraugiem (*Azerbaidžāna, Spānija, Grieķija, Ukraina, Gruzija 2021*) iekļauti arī iepriekš analizētie Gruzijas medus paraugi (*Gruzija 2019*). Iegūtie atbilstības vērtējumi Latvijas medus paraugiem ir robežās no 29 līdz 84 %, savukārt ārzemju izcelsmes paraugiem – no 0 līdz 51 %. Izvērtējot rezultātus, jāņem vērā, ka algoritmā nav iekļauta diferencēšana starp dažādas florālās izcelsmes paraugiem, tādēļ starp Latvijas izcelsmes paraugiem novērojami arī zemāki atbilstības vērtējumi. Tika veikts T-tests, lai salīdzinātu paraugkopu vidējos aritmētiskos un, lai noteiktu vai to starpība ir statistiski būtiska vai nē. Rezultātā tika noteikta statistiski ļoti nozīmīga atšķirība ($p < 0,001$) atbilstības vērtējumiem starp analizētajiem Latvijas izcelsmes paraugiem (*LV paraugi 2021*) un ārzemju izcelsmes paraugiem (*Ārzemju paraugi 2021*) pie 95% ticamības intervāla.

SECINĀJUMI

1. Veicot 1275 kvalitātes rādītāju testēšanu Latvijas izcelsmes medus paraugiem, tika secināts, ka 12 rādītāji neatbilst noteiktajām prasībām. Kopumā neatbilstību īpatsvars šajā pētījumā ir mazāks par 1%.
2. No pētījumā iegūtajiem rezultātiem par pesticīdu klātbūtni medū var secināt, ka medus var būt labs indikators neatļauto vai nereģistrēto augu aizsardzības līdzekļu lietošanai.
3. Glifosāta klātbūtne tika konstatēta 14% no visiem medus paraugiem, vienā paraugā pārsniedzot maksimāli pieļaujamo normu (MRL), kas ir 0,05 mg/kg saskaņā ar Regulu (EU) 293/2013.
4. Pētījuma ietvaros tika veiksmīgi pārbaudīts Latvijas medus autentiskuma noteikšanas algoritms, balstoties uz iepriekš izstrādāto fenolsavienojumu datubāzi. Datu bāzes un algoritma aprobācija, kas veikta analizējot Latvijas izcelsmes medus paraugus (n=10) un dažādu ārvalstu medus paraugus (n=31), uzrādīja statistiski nozīmīgu atšķirību ($p < 0,001$) atbilstības vērtējumiem starp analizētajiem Latvijas izcelsmes un ārzemju izcelsmes paraugiem.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Ministru kabinets; Kvalitātes, klasifikācijas un papildu marķējuma prasības medum. Apstiprināts ar LR MK rīkojumu Nr. 251 2015. gada 26. maijā. Pieejams: http://likumi.lv/ta/id/274304-kvalitates-klasifikacijas-un-papildu-markejuma-prasibas-medum [skatīts: 11.11.2021.]
2. Bogdanon, S.; Jurendic, T.; Sieber, R.; Gallmann, P. A. Rewiev: Honey for Nutrition and Health. J Am Coll Nutr. 2008, 27, 678–689
3. Vincēviča-Gaile, Z. Makro- un mikroelementu saturs medū. 2010, Latvijas Lauksaimniecības Universitātes Raksti, 56–66
4. USDA National Nutrient Database, Agricultural Research Service, atjaunota 2015. gada oktobrī. Full Report (All Nutrients): 19296, Honey"
5. Gheldof, N.; Wang, X. H.; Engeseth, N. J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. J Agric Food Chem., 2002, 50, 5870–5877
6. Schramm, D. D; Karim, M.; Schrader, H. R.; Holt, R. R.; Cardetti, M.; Keen, C. L. Honey with High Levels of Antioxidants Can Provide Protection to Healthy Human Subjects. J Agric Food Chem. 2003, 51, 1732–1735
7. Latvijas Republikas Zemkopības Ministrija; Latvijas Lauksaimniecība 2020. Pieejams: https://www.zm.gov.lv/public/files/CMS_Static_Page_Doc/00/00/01/89/03/2020_lauksaimnieciba s_gada_zinojums1.pdf [skatīts: 11.11.2021.]
8. Centre for the Promotion of Imports from developing countries. What is the demand for honey in Europe? **2016** Pieejams: https://www.cbi.eu/market-information/honey-sweeteners/trade-statistics/ [skatīts: 09.11.2021]
9. Latvijas biškopības programma 2020.–2022. gadam. Pieejams: http://www.lad.gov.lv/files/ladDocument/1832/LV_biskopibas_programma_2020-2022.pdf [skatīts: 11.11.2021.]
10. Amiry, S.; Esmaiili, M.; Alizadeh, M.; Classification of adulterated honeys by multivariate analysis. Food Chemistry. 2017, 224, 390-397
11. Siddiqui, A. J.; Musharraf, S. G.; Choudhary, M. I.; Rahman A.; Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. Food Chemistry. 2017, 217, 687-698
12. Ruiz-Matute, A.I.; Soria, A. C.; Sanz, M. L.; Martinez-Castro, I.; Characterization of tradicional Spanish edible plant syrups based on carbohydrate GC-MS analysis. Journal of Food Composition and Analysis. 2010, 23, 260-263
13. Kenjeric, D.; Mandic, M. L.; Primorac, L.; Bubano, D.; Perl, A.; Flavonoid profile of Robinia honeys produced in Croatia. Food Chemistry. 2007, 102, 683-690
14. Wu, L.; Du, B.; Heyden, Y. V.; Chen, L.; Zhao, L.; Wang, M.; Xue, X.; Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey – A challange. Trends in Analytical Chemistry. 2017, 86, 25-38

15. Reybroeck, W.; Daeseleire, E.; De Brabander, H. F.; Herman, L.; Antimicrobials in beekeeping. Veterinary Microbiology. 2012, 158, 1-11
16. Latvijas Biškopības biedrība; Par zāļu lietošanu biškopībā. Pieejams: https://www.strops.lv/index.php/raksti/slimibas-un-kaitekli/26-par-zalu-lietosanu-biskopiba [skatīts: 09.11.2021].
17. Komisijas Regula (ES) Nr. 37/2010 (2009. gada 22. decembris) par farmakoloģiski aktīvajām vielām un to klasifikāciju pēc to atlieku maksimāli pieļaujamā satura. Pieejams: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02010R0037-20200209 [skatīts: 11.11.2021].
18. Latvijas biškopības biedrība; Varrozes invāzijas ierobežošana dravā. Pieejams: http://www.strops.lv/attachments/article/66/varroze.pdf [skatīts: 11.11.2021.]
19. Wilmart, O.; Legreve, A. Residues in Beeswax: A Health risk for the Consumers of Honey and Beeswax? J. Agric. Food Chem., 2016, 64, 8425–8434
20. Martel, A. C.; Zeggane, S.; Auries, C.; et al. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar or Asuntol®50, Apidologie, 2007, 38, 534–544.
21. Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts BIOR; Latvijas izcelsmes medus autentiskuma, kvalitātes un nekaitīguma novērtējums un prasmes pārbaužu organizēšana. 2019. Pieejams:https://www.llu.lv/lv/projekti/apstiprinatie-projekti/2019/latvijas-izcelsmes-medus-autentiskuma-kvalitates-un [skatīts: 11.11.2021]
22. Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts BIOR; Latvijas izcelsmes medus autentiskuma, kvalitātes un nekaitīguma novērtējums un prasmes pārbaužu organizēšana. 2020. Pieejams: https://www.llu.lv/lv/projekti/apstiprinatie-projekti/2020/latvijas-izcelsmes-medus-autentiskuma-kvalitates-un [skatīts: 11.11.2021]
23. Latvijas biškopības biedrība; Bišu parazitārās slimības. Pieejams: https://www.strops.lv/index.php/raksti/slimibas-un-kaitekli/29-bisu-parazitaras-slimibas [skatīts: 09.11.2020]
24. Shi, T.; Burton, S.; Wang, Y.; Xu, S.; Zhang, W.; Yu, L.; Metabolomic analysis of honey bee, Apis mellifera L. response to thiacloprid. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2018, 152, 17-23
25. Valsts augu auzsardzības dienests; Augu aizsardzības līdzekļu reģistrs. Pieejams: http://www.vaad.gov.lv/sakums/testa-moduli/aal-registrs.aspx [skatīts: 09.11.2020.]
26. Latvijas Vēstnesis. Laidiens: 26.03.2020., Nr. 61 Oficiālās publikācijas Nr.: 2020/61.22 Pieejams: https://www.vestnesis.lv/op/2020/61.22 [skatīts: 11.11.2021.]
27. Pichichero, E., Canuti, L., Canini, A., 2009. Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. J. Sci. Food Agric. 89, 609–616. https://doi.org/10.1002/jsfa.3484
28. Kıvrak, Ş., Kıvrak, İ., 2017. Assessment of phenolic profile of Turkish honeys. Int. J. Food Prop. 20, 864–876. https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1188307

29. Jasicka-Misiak, I., Gruyaert, S., Poliwoda, A., Kafarski, P., 2017. Chemical Profiling of Polyfloral Belgian Honey: Ellagic Acid and Pinocembrin as Antioxidants and Chemical Markers. J. Chem. 2017. https://doi.org/10.1155/2017/5393158
30. Kečkeš, S., Gašić, U., Veličković, T.Ć., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž., 2013. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. Food Chem. 138, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.025
31. Silva, T.M.S., dos Santos, F.P., Evangelista-Rodrigues, A., da Silva, E.M.S., da Silva, G.S., de Novais, J.S., dos Santos, F. de A.R., Camara, C.A., 2013. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (Melipona subnitida) honey. J. Food Compos. Anal. 29, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.08.010

1. PIELIKUMS

2. Fruktozes, glikozes un saharozes noteikšana ar augsti efektīvo šķidruma hromatogrāfiju (*§ 64 LFGB L 40.00-7)*

Mērķis un darbības joma

Metode paredzēta fruktozes, glikozes un saharozes noteikšanai pārtikas produktos. Metode ietver parauga homogenizēšanu, ekstrakciju ar ūdeni un filtrēšanu caur papīra filtru. Kvantitatīvai cukuru noteikšanai izmanto augsti efektīvo šķidruma hromatogrāfu (AEŠH), kas savienots ar refraktometrisko (RI) detektoru.

Reaģenti un standartvielas

- Acetonitrils *(AEŠH tīrības pakāpe);*
- dejonizēts ūdens *(1. tīrības pakāpe, ūdens pretestība > 18 MΩ-cm);*
- fruktoze *(piem., Fluka, tīrība 99,0%);*
- glikoze *(piem., Fluka, tīrība 99,5%);*
- saharoze *(piem., Fluka, tīrība 99,5%).*

Aparatūra un trauki

- Mērkolbas un mērcilindri, A klase;
- analītiskie svari ar precizitāti ± 0,0001 g;
- automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu;
- polipropilēna stobriņi ar vāciņiem, 50 ml;
- stikla piltuves, d = 50 mm;
- papīra filtri, d = 90 mm;
- hromatogrāfijas stikla pudelītes (1,5 ml) ar vāciņiem.

Standartšķīdumu pagatavošana

Pamatšķīdumus pagatavo paraugu analīzes dienā. Pagatavojot pamatšķīdumus, ņem vērā standartvielu tīrību:

PŠ1: 2,02 g fruktozes atšķaida līdz 10 ml ar dejonizētu ūdeni. Iegūtā koncentrācija 20%.

PŠ2: 2,01 g glikozes atšķaida līdz 10 ml ar dejonizētu ūdeni. Iegūtā koncentrācija 20%.

PŠ3: 2,01 g saharozes atšķaida līdz 10 ml ar dejonizētu ūdeni. Iegūtā koncentrācija 20%.

Kalibrācijas šķīdumu pagatavošana

Kalibrācijas šķīdumus pagatavo atšķaidot šķīdumus 10 ml mērkolbās ar dejonizētu ūdeni kā norādīts tabulā:

Kalibrācijas šķīdums	Tilpums	Iegūtā koncentrācija, %	Iegūtā koncentrācija, pārrēķinot uz paraugu, %
KŠ1	2,5 ml PŠ	5	50
KŠ2	5 ml KŠ1	2,5	25
KŠ3	4 ml KŠ2	1,0	10
KŠ4	5 ml KŠ3	0,5	5
KŠ5	5 ml KŠ4	0,25	2,5
KŠ6	4 ml KŠ5	0,1	1

Kontrolparaugs

Katrā paraugu sērijā iekļauts kontrolparaugs, kam pievienota zināma cukuru koncentrācija. Paraugs ar 10% fruktoze, 10% glikoze un 1% saharoze: pie 5,00 g parauga pievieno 2,5 ml PŠ1, 2,5 ml PŠ2 un 0,25 ml PŠ3, tālāk rīkojas tāpat kā ar paraugu.

Darba gaita

- 5 g homogenizēta parauga iesver polipropilēna stobriņā.
- Stobriņu piepilda ar ~ 20 mL dejonizēta ūdens un samaisa.
- Stobriņa saturu pārnes 50 mL mērkolbā un uzpilda kolbu ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei.
- Kolbas saturu rūpīgi samaisa un ekstraktu filtrē caur papīra filtru.
- Attīrīto ekstraktu pārnes hromatogrāfijas pudelītē un 10 µL ievada šķidruma hromatogrāfā.

AEŠH-RI analīzes parametri

Šķidruma hromatogrāfs (piem., *Waters Alliance 2695*) ar RI detektoru (piem., *Waters 2414*).

- Kolonna: NH2 4,6 µm 150 mm, daļiņu izmērs 5 µm (piem., Phenomenex);
- kustīgā fāze: dejonizēta ūdens/acetonitrila maisījums (9/91, v/v);
- plūsmas ātrums: 1,5 mL/min;
- kolonnas temperatūra: 30 °C;
- injekcijas tilpums: 10 µL;
- analīzes laiks: 40 minūtes.

3. Mitruma noteikšana ar refraktometrisko metodi (IHC 1:2009)

Mērķis un darbības jomas

Metode paredzēta mitruma noteikšanu medus paraugos ar refraktometru.

Iekārtas un trauki.

- Žāvskapis;
- PP 15 ml stobriņi;

- Abbe vai digitālais refraktometrs (ar termostatu 20 °C un iespēju regulāri kalibrēt ar destilētu ūdeni vai citu sertificētu references materiālu).

Darba gaita

- Ja medus satur cukura kristālus – homogenizētu medu ievieto 15 mL PP stobriņos un ievieto žāvskapī pie temperatūras 50 °C (± 0,2) līdz cukura kristāli izkusuši. Atdzesē un vēlreiz samaisa. Veic mitruma satura noteikšanu.
- Ja medus kristālus nesatur, paraugu homogenizē samaisot un tālāk veic mitruma satura noteikšanu.
- Pārbauda refraktometru ar destilētu ūdeni (refrakcijas indeksam jābūt 1,3330).
- Uz sausas, tīras prizmas uzliek medus paraugu, aizver prizmas virsmu:
    - ja mērīšanu veic ar Abbes tipa refraktometru, tad nolasījumu veic pēc 2 min;
    - ja mērīšanu veic ar digitālo refraktometru, tad nolasījumu veic pēc 6 min.
- Pēc mērīšanas rūpīgi notīra prizmu ar destilētu ūdeni un pārliecinās, vai tā ir tīra, izmērot destilēta ūdens refrakcijas indeksu (tam jābūt 1,3330).
- Katram medus paraugam veic 2 atkārtotus mērījumus, pēc tam tabulā (skatīt standartu) atrod atbilstošo mitruma saturu mērījumiem.

Rezultāta aprēķināšana

Izrēķina vidējo rezultātu no 2 atkārtotajiem mērījumiem.

- ja medus mērījumi nav veikti 20 °C temperatūrā, tad veic refrakcijas koeficienta pārrēķinu atbilstoši medus temperatūrai;
- ja temperatūra virs 20 °C, tad pieskaita 0,00023 par katru grādu, ja zem 20 °C, tad atņem 0,00023.

Atkārtojamība: r = 0,093×W/(W−5,97)

Reproducējamība: R = 0,067×W/(W−9,20)

4. Elektrovadītspēja noteikšana (IHC 2:2009)

Mērķis un darbības jomas

Metode nosaka kārtību, kādā jāveic elektrovadītspējas noteikšana medus paraugos ar konduktometru. Metodi izmanto medus paraugiem, kuros elektrovadītspēja ir intervālā no 0,1 līdz 3 mS/cm.

Aprīkojums un materiāli

- Ūdens vanna vai termostats, kas nodrošina 20 ± 0,5 °C;
- mērkolbas un vārglāzes;
- termometrs ar iedaļu 0,1 °C, ja iekārtā nav temperatūras sensora;

- konduktometrs – zemākā noteikšanas robeža 10^{-7} S, ar specializētu elektrodu – šūnu elektrovadītspējas mērīšanai.

Reaģenti

Kālija hlorīda 0,1M šķīdums. Gatavo vienmēr svaigu. Nosver 7,4557 g izžāvētu pie 130 °C KCl un izšķīdina svaigā dejonizētā ūdenī 1000 ml mērkolbā.

Darba gaita

- Šūnas konstantes noteikšana: vārglāzītē ielej 40 ml svaigi pagatavotā kālija hlorīda šķīduma, tā šķīduma temperatūrai jābūt 20 °C, noskalo elektrodu ar mērāmo šķīdumu un iemērc elektrodu un nolasa elektrovadītspējas rādījumu mS pie 20 °C, noskalo elektrodu ar dejonizētu ūdeni.
  Šūnas konstanti K aprēķina pēc formulas:

  $$K = 11{,}691 \times 1/G, \text{ kur}$$

  11,649 – elektrovadītspēja vidējo vērtību summa, kuras mērīta svaigi destilētam ūdenim un 0,1 M kālija hlorīda šķīdumam pie 20 °C;

  K – šūnas konstante, cm^{-1};

  G- izmērītā elektrovadītspēja svaigi pagatavotajam kālija hlorīda 0,1 M šķīdumam, mS.
- Nosver 20,0 g bezūdens medus, lai to izdarītu ir jāzina, kāds ir ūdens saturs analizējamajā medū un pēc šī rezultāta veic iesvara pārrēķinu pēc formulas:

  $$X = W \times 100 / (100 - W), \text{ kur}$$

  W – ūdens saturs medus paraugā, %

  X – pārrēķinātais medus parauga iesvars, g
- Medus iesvaru izšķīdina dejonizētā ūdenī un kvantitatīvi pārnes 100 ml mērkolbā, uzpilda līdz atzīmei un samaisa.
- Ieteicamā parauga temperatūra pie mērīšanas ir 20 °C, lai nevajadzētu pārrēķināt rezultātu atbilstoši parauga šķīduma temperatūrai.
- Ar daļu no pagatavotā medus šķīduma noskalo konduktometra elektrodu, ielej vārglāzītē 40 ml pagatavotā medus šķīduma, pēc tam ievieto elektrodu un izmēra parauga elektrovadītspēju.

Rezultātu apstrāde

Medus parauga elektrovadītspēju $mS \times cm^{-1}$ aprēķina pēc formulas:

$$SH = K \times G, \text{ kur}$$

G – medus parauga šķīduma vadītspēja, mS,

K – šūnas konstante, cm^{-1}.

Ja mērījumi veikti atšķirīgā temperatūrā nekā pie 20 °C, tad jāveic rezultātu pārrēķins ņemot vērā temperatūru:

- ja temperatūra augstāka par 20 ^{o}C, tad rezultātam atņem 3,2% no rezultāta par katru grādu,
- ja temperatūra zemāka per 20 ^{o}C, tad rezultātam pieskaita 3,2 % no rezultāta par katru grādu.

Rezultātus aprēķina līdz 0,01 mS$\times cm^{-1}$.

5. pH un brīvā skābuma noteikšana ar titrēšanu līdz pH 8,3 (IHC 4.1:2009)

Mērķis un darbības jomas

Metode paredzēta pH un brīvā skābuma noteikšanas kārtību medū.

Iekārtas, trauki.

- pH-metrs ar precizitāti 0,01 vienības;
- magnētiskais maisītājs;
- birete 10ml, 25ml vai automātiskais titrators;
- vārglāze – 100 ml;
- analītiskie svari.

Reaģenti

- dejonizēts ūdens (*1. tīrības pakāpe, ūdens pretestība > 18 MΩ-cm)*;
- buferšķīdumi pH-metra kalibrēšanai (pH – 4.00, 7.00, 10.00);
- nātrija hidroksīda standartšķīdums 0,1 M.

Darba gaita

pH noteikšana

- Ieslēdz pH-metru un atbilstoši tā instrukcijai veic iekārtas kalibrēšanu;
- 100 ml vārglāzē nosver 10 g parauga un izšķīdina 75 ml destilēta ūdens.
- Vārglāzi ar izšķīdināto medus paraugu maisa ar magnētisko maisītāju un šķīdumā ievieto pH mērīšanas elektrodu, gaida līdz mērījums nostabilizējas un nolasa mērījumu.

Brīvā skābuma noteikšana

- Ieslēdz pH-metru un atbilstoši tā instrukcijai veic iekārtas kalibrēšanu (ja tāda jau nav veikta).
- 100 ml vārglāzē nosver 10 g parauga un izšķīdina 75 ml destilēta ūdens.
- Vārglāzi ar izšķīdināto medus paraugu maisa ar magnētisko maisītāju un šķīdumā ievieto pH mērīšanas elektrodu.
- Titrē ar 0,1M NaOH šķīdumu līdz pH vērtībai 8.3.
- Titrēšana jāveic 2 minūšu laikā, rezultātu nolasa līdz tuvākajai 0,2 ml iedaļai, ja titrē ar bireti, bet, ja titrē ar automātisko titratoru, tad līdz 0,01 ml.

Rezultātu aprēķināšana

- pH rezultātu nolasa un uzrāda ar divām decimālzīmēm.
- Brīvo skābumu, kuru izsaka miliekvivalentos vai milimolos skābes/kg medus, aprēķina pēc formulas:

$$X = V \times 10, \text{ kur}$$

V – izlietotā 0,1 M NaOH tilpums titrēšanā, ml

6. Diastāzes aktivitātes (skaitļa) noteikšana pēc Phadebas (IHC 6.2:2009)

Mērķis un darbības jomas

Metode paredzēta diastāzes skaitļa noteikšanai medus paraugos pēc Phadebas metodes.

Iekārtas, trauki.

- Spektrofotometrs;
- pH-metrs;
- ūdens vanna ar termostatu;
- svari ar precizitāti līdz 0,01 g;
- mēģenes ar piespīlētiem korķiem;
- PP 50 mL stobriņi
- automātiskās pipetes;
- kivetes
- filtrpapīrs;
- taimeris.

Reaģenti

- Phadeba tabletes;
- nātrija hidroksīda šķīdums 0,5M;
- acetāta buferšķīdums pH = 5,2 (nosver 13,6 g nātrija acetāta trihidrātu un izšķīdina ūdenī 1000 ml mērkolbā un, neuzpildot līdz atzīmei, pievieno ledus etiķskābi 1-2 ml ieregulējot pH = 5,2, pēc tam uzpilda līdz atzīmei).

Darba gaita (visas zemāk minētās procedūras jāveic vienas stundas laikā!)

- PP 50 mL stobriņā nosver 0,50 g medus parauga, šķīdina nelielā daudzumā (30 ml) acetāta buferšķīdumā, kad medus paraugs izšķīdis uzpilda PP stobriņu līdz atzīmei ar acetāta buferšķīdumu, samaisa.

- 5,0 ml sagatavotā medus šķīdumā ar pipeti iemēra pirmā mēģenē; otrā mēģenē iemēra 5 ml acetāta buferšķīduma (kontrolei).
- Mēģenes ievieto ūdens vannā pie 40 °C uz 5 minūtēm, pēc tam katrā mēģenē ar pinceti ievieto pa vienai Phadebas tabletei, uzliek korķīti un intensīvi sakrata 8 – 10 sekundes, līdz tablete izšķīst.
- Mēģenes ievieto ūdens vannā uz 30 minūtēm.
- Pēc šī laika katrā mēģenē ar pipeti pielej 1 ml 0,5 M nātrija hidroksīda šķīduma (reakcijas apstādināšanai)uzliek korķīti un sakrata 5 sekundes.
- Nekavējoties filtrē caur filtrpapīru (ietiecams par tiešo kivetē, ar kuru mērīs absorbciju) un atstāj uz piecām minūtēm. Izmēra absorbciju pie 620 nm, 1 cm kivetē, gan kontrolei, gan paraugam.

Rezultātu apstrāde

Diastāzes skaitli Shades vai Gotes vienībās aprēķina pēc formulas:

$$DSK = 28{,}2 \times \Delta A_{620} + 2{,}64$$

Ja diastāzes skaitlis ir no 0 līdz 6, tad izmanto sekojošu formulu:

$$DSK = 35{,}2 \times \Delta A_{620} - 0{,}46$$

Atkārtojamība: $r = 0{,}02 + 0{,}06 \times A_{620}$

Reproducējamība: $R = 0{,}04 + 0{,}32 \times A_{620}$

7. Ūdenī nešķīstošo vielu noteikšana (IHC 8:2009)

Mērķis un darbības jomas

Metode paredzēta ūdenī nešķīstošo vielu noteikšanai medū ar gravimetrisko metodi.

Iekārtas, trauki.

- Analītiskie svari ar precizitāti līdz 0,0001 g;
- filtrtīģelis ar poru izmēru no 15-40 mikroni;
- žāvskapis ar iespēju ieregulēt temperatūru 135 ± 1 °C.

Darba gaita

- Nosver aptuveni 20 g medus parauga un izšķīdina to 200 ml 80 °C karsta ūdens.
- Izkarsē filtrtīģeli žāvskapī un atdzesē līdz istabas temperatūrai eksikatorā.
- Izšķīdināto medus paraugu filtrē caur filtrtīģelī un mazgā ar siltu ūdeni, līdz tas nesatur cukurus (pārbauda ar 1 % florglucinola šķ. etilspirtā. To piepilina mēģenē ielietam filtrātam un gar mēģenes sieniņām piepilina pāris pilienus konc. sērskābi, ja filtrāts satur cukurus, veidojas krāsa).
- Žāvē filtrtīģeli vienu stundu žāvskapī pie 135 °C, atdzesē un nosver.
- Filtrtīģeli ievieto vēlreiz žāvē žāvskapī pie 135 °C 30 minūtes, atdzesē un nosver.
- Žāvēšanu turpina, līdz filtrtīģelis ir ar konstantu svaru.

Rezultātu apstrāde

Nešķīstošo vielu masu aprēķina pēc formulas:

$$\text{Nešķ.v. (\%)} = m \times 100 / m_1, \text{ kur}$$

m – nešķīstošo vielas masa, g

m_1 – parauga iesvars, g

8. 5-(Hidroksimetil)furfurola (HMF) noteikšana medū ar šķidruma hromatogrāfiju (BIOR-T-012-184-2016)

Analīzes mērķis un sfēra

Metode paredzēta 5-(hidroksimetil)furfurāla (HMF) noteikšanai medū ar šķidruma hromatogrāfiju. Metode ietver parauga atšķaidīšanu, attīrīšanu ar *Carrez* šķīdumiem, attīrīšanu ar cietfāžu ekstrakcijas kolonnām un HMF noteikšanu, izmantojot augsti efektīvo šķidruma hromatogrāfiju (AEŠH) ar C18 reversās fāzes kolonnu un UV detektoru.

Reaģenti un materiāli

- Kālija heksacianoferāta (II) trihidrāts ($K_4[Fe(CN)_6]$ 3 H_2O) (*ACS tīrības*);
- cinka acetāta dihidrāts ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2\ H_2O$) (*ACS tīrības*);
- metanols (*AEŠH tīrības pakāpe*);
- acetonitrils (*AEŠH tīrības pakāpe*);
- dejonizēts ūdens (*1. tīrības pakāpe, ūdens pretestība > 18 MΩ-cm*);
- cietfāžu ekstrakcijas kolonnas C18, 500 mg/6 mL (piem., *Phenomenex*);
- hromatogrāfijas kolonna C18, 100 mm x 2,0 mm, daļiņu izmērs 3 µm (piem., Phenomenex).

Aparatūra un trauki

- Mērkolbas (A klase);
- polipropilēna stobriņi, 15 mL un 50 mL;
- automātiskās pipetes ar maināmu diapazonu;
- hromatogrāfijas pudelītes;
- analītiskie svari ar precizitāti 0,00001 g un elektroniskie svari ar precizitāti 0,001 g;
- laboratorijas centrifūga;
- vakuuma manifolds un sūknis.

Šķīdumi

- *Carrez* šķīdums Nr. 1. 7,5 g kālija heksacianoferāta (II) trihidrāta ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3\ H_2O$) 50 mL polipropilēna stobriņā izšķīdina un atšķaida līdz 50 mL atzīmei ar dejonizētu ūdeni.
- *Carrez* šķīdums Nr. 2. 15,0 g cinka acetāta dihidrāta ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2\ H_2O$) 50 mL polipropilēna stobriņā izšķīdina un atšķaida līdz 50 mL atzīmei ar dejonizētu ūdeni.
- *Kustīgā fāze (A) – dejonizēts ūdens.*
- *Kustīgā fāze (B) – acetonitrils.* Degazē 10 min ultraskaņas vannā.
- *Kustīgā fāze (C) – metanols.* Degazē 10 min ultraskaņas vannā.
- *Adatas mazgāšanas šķīdums un eluēšanas šķīdums attīrīšanai ar C18 cietfāžu ekstrakcijas kolonnām – 20 % metanola šķīdums ūdenī.* 200 mL metanola atšķaida līdz 1000 mL ar dejonizētu ūdeni. Degazē 10 min ultraskaņas vannā.

Standarti un standartšķīdumi

5-(hidroksimetil)furfurāls (piem., *Sigma-Aldrich*).

- (A) Standartšķīdums ar HMF koncentrāciju ~ 1000 mg/L. ~ 10 mg tīra 5-(hidroksimetil)furfurāla 10 mL mērkolbā izšķīdina un atšķaida ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei. Standartšķīduma koncentrācijas aprēķinā ņem vērā precīzo iesvara masu, standartvielas tīrību un citus piemaisījumus. Standartšķīdums derīgs vismaz 9 mēnešus, glabājot +4 ºC temperatūrā.
- Standartšķīdumu atbilstošajam kalibrēšanas līmenim iepilda 50 mL polipropilēna stobriņā un sagatavo tāpat kā paraugu, izlaižot parauga iesvēršanu.

Kalibrācijas paraugu pagatavošana

Līmenis	Kalibrēšanas šķīduma koncentrācija, mg/kg	Koncentrācija paraugā (iesvars 5 g), mg/kg	Šķīdums "A" (1000 mg/L), µL
1.	0	0	0
2.	0,4	20	100
3.	1,2	60	300
4.	2	100	500

Darba gaita

- Iesver 5,00 g homogenizēta parauga 50 mL polipropilēna stobriņā.
- Paraugam stobriņā pievieno 30 mL dejonizēta ūdens un 1 mL *Carrez* šķīduma Nr. 1.
- Kontrolparaugam stobriņā pievieno standartpiedevu: 100 µL standartšķīduma (1000 mg/L), HMF koncentrācija paraugā 20 mg/kg.
- Stobriņu intensīvi krata līdz paraugs izšķīdis.
- Pievieno ekstraktam stobriņā 1 mL *Carrez* šķīduma Nr. 2 un intensīvi sakrata.
- Stobriņu centrifugē 5 minūtes pie 3500 apgr./min.
- Ekstraktu stobriņā atšķaida līdz 50 mL atzīmei ar dejonizētu ūdeni un sakrata.
- Stobriņu centrifugē 10 minūtes pie 4700 apgr./min.

- Paraugus filtrē, izmantojot C18 cietfāžu esktrakcijas kolonnas:
  - ✓ 2 mL parauga kvantitatīvi pārnes C18 cietfāžu ekstrakcijas kolonnā un pievieno 4 mL 20 % metanola dejonizētā ūdenī. Lēni izlaiž caur kolonnu līdz sorbenta malai, savācot 15 mL polipropilēna stobriņā.
  - ✓ Uznes papildus 4 mL 20 % metanola šķīduma un lēni izlaiž caur kolonnu līdz tā sausa, izmantojot vakuuma palīdzību.
- Ekstraktu no parauga ar HMF koncentrāciju virs 100 mg/kg atšķaida 5 reizes (piem., hromatogrāfijas pudelītē 200 µL ekstrakta pievieno 800 µL dejonizēta ūdens un samaisa).
- Šķīdumu iepilda hromatogrāfijas pudelītē un veic instrumentālo analīzi.

Instrumentālā metode

Šķidrumu hromatogrāfs *Waters Alliance 2695*, kas savienots ar *Waters 2996* UV detektoru.

<table>
<tr><td colspan="2">UV detektora parametri</td></tr>
<tr><td>Režīms</td><td>2D datu vākšana</td></tr>
<tr><td>Frekvenču joslas platums</td><td>1,2</td></tr>
<tr><td>Iztveršanas frekvence</td><td>2,0</td></tr>
<tr><td>Viļņa garums (λ)</td><td>284 nm</td></tr>
<tr><td colspan="2">AEŠH parametri</td></tr>
<tr><td>Kolonna</td><td>Luna C18 – 100 mm x 2,0 mm, daļiņu izmērs 3 µm (piem., Phenomenex)</td></tr>
<tr><td>Plūsmas ātrums</td><td>0,20 mL/min (gradienta režīms)</td></tr>
<tr><td>Injekcijas tilpums</td><td>7,5 µL</td></tr>
<tr><td>Analīzes laiks</td><td>25 min</td></tr>
<tr><td>Kolonnas temp.</td><td>30 °C</td></tr>
<tr><td>Gradienta programmas</td><td>

Kustīgā fāze “A”: dejonizēts ūdens
Kustīgā fāze “B”: acetonitrils
Kustīgā fāze “D”: metanols

Sekvences uzsākšanas režīms (iekļauj sekvences sākumā, 60 min)
<table>
<tr><td>A, %</td><td>D, %</td></tr>
<tr><td>90</td><td>10</td></tr>
</table>
Analīzes režīms (ievadīto paraugu šķīdumu analīzei, gradienta režīms)
<table>
<tr><td>Laiks</td><td>A, %</td><td>B, %</td><td>D, %</td><td>Līkne</td></tr>
<tr><td>0,00</td><td>90</td><td>0</td><td>10</td><td>-</td></tr>
<tr><td>2,00</td><td>90</td><td>0</td><td>10</td><td>6</td></tr>
<tr><td>2,01</td><td>10</td><td>90</td><td>0</td><td>6</td></tr>
<tr><td>7,00</td><td>10</td><td>90</td><td>0</td><td>6</td></tr>
<tr><td>7,01</td><td>90</td><td>0</td><td>10</td><td>6</td></tr>
<tr><td>25,0</td><td>90</td><td>0</td><td>10</td><td>6</td></tr>
</table>
Kolonnas skalošanas režīms (iekļauj sekvences beigās)
<table>
<tr><td>A, %</td><td>D, %</td><td>Ilgums, min</td></tr>
<tr><td>10</td><td>90</td><td>60</td></tr>
<tr><td>50</td><td>50</td><td>60</td></tr>
</table>
</td></tr>
</table>

Testēšanas iekārtu kalibrēšana un rezultātu izvērtēšana

Testēšanas iekārtas kalibrēšanu veic un HMF saturu paraugā aprēķina, konstruējot 4 punktu kalibrēšanas taisni. Par kalibrēšanas modeli izmanto lineāro funkciju. Kalibrēšanu veic vismaz reizi divās nedēļās vai pēc vajadzības.

Rezultāta aprēķināšana

Rezultāta aprēķinu veic (hromatogrāfa programmatūrā vai manuāli) pēc sekojošas formulas:

$$c_{HMF} = \frac{x \cdot d}{R \cdot 0{,}01}$$

, kur c_{HMF} – 5-(hidroksimetil)furfurāla koncentrācija paraugā, mg/kg;
x – koncentrācija hromatogrāfā ievadītajā šķīdumā, mg/kg;
d – atšķaidījums, ņemot vērā iesvara masu;
R – vidējā atgūstamība no kontrolkartes, %.

9. Glifosāta noteikšanas metode augu un dzīvnieku izcelsmes produktos ar šķidruma hromatogrāfiju – tandēma masspektrometriju (BIOR-T-012-145-2013)

Analīzes princips un pielietošanas sfēra

Metode paredzēta glifosāta atliekvielu noteikšanai augu izcelsmes pārtikas produktos un glifosāta noteikšanu dzīvnieku izcelsmes produktos. Metode ietver savienojumu ekstrakciju ar metanolu, dzīvnieku izcelsmes produktu ekstraktu attīrīšanu ar cietfāžu ekstrakciju un detektēšanu ar šķidruma hromatogrāfiju – tandēma masspektrometriju.

Reaģenti un materiāli

- Metanols (*AEŠH tīrības pakāpe*);
- acetonitrils (*AEŠH tīrības pakāpe*);
- dejonizēts ūdens (*1. tīrības pakāpe, ūdens pretestība > 18 MΩ-cm*);
- ledus etiķskābe (*ACS tīrības pakāpes*);
- centrifūgas filtri ar poru izmēru 0,2 µm;
- oktadecilsilikagela (*C18*) sorbents (*piem., Sigma-Aldrich*);
- papīra filtri, d=110.

Aparatūra un trauki

- Analītiskie svari ar precizitāti 0,0001g *(piem., Kern 770);*
- termostatējama centrifūga *(piem., Termo Multifuge-3L-R);*
- automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu;
- homogenizators vai mehāniskais maisītājs *(piem., Vortex, BioSan);*
- mērkolbas 1000 mL un 10 mL;

- polipropilēna strobriņi 50 mL.

Darba šķīdumi

Kustīgā fāze „A": 1% etiķskābes šķīdums. 1 L dejonizēta ūdens pievieno 10 mL ledus etiķskābes.

Standartvielas un sandartšķīdumi

Glifosāts un glifosāta $^{13}C2$ ^{15}N (iekšējais standars). Analīzēm tiek izmantoti analītiski tīras standartvielas (piem., no *Dr.Ehrenstorfer, AccuStandart Inc*., *Riedel-de Haën*).

Pagatavo standarta šķīdumus ar koncentrāciju ~1000 ng/µL. Iesver standarta masu, kas atbilst 10 mg, izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 10 mL. Šķīdumus glabā +4 ^{o}C temperatūrā 10 gadus.

Standartpiedevas pievienošanai izmanto standartšķīdumu ar koncentrāciju 10 ng/µL, ko pagatavo 10 mL mērkolbā, ņemot attiecīgo tilpumu standartšķīduma ar koncentrāciju 1000 ng/µL un atšķaidot ar ūdeni līdz atzīmei. Šķīdumu glabā +4 ^{o}C temperatūrā 1 gadu.

Iekšējā standarta pievienosanai izmanto standartšķīdumu ar koncentrāciju 10 ng/µL, ko pagatavo 10 mL mērkolbā, ņemot attiecīgo tilpumu standartšķīduma ar koncentrāciju 1000 ng/µL un atšķaidot ar ūdeni līdz atzīmei. Šķīdumu glabā +4 ^{o}C temperatūrā 1 gadu.

Analīzes veikšana

- 5 g homogenizētu parauga iesvaru ievieto 50 mL polipropilēna stobriņā un pievieno 10 mL ūdens.
- Pievieno iekšējo darba standrtšķīdumu (C=100 ng/g).
- Kontrolparaugiem pievieno darba standartšķīdumu (C=50 ng/g).
- Pievieno 10 mL dejonizēta ūdens un 10 mL metanola.
- 10 min krata uz mehāniskā maisītāja.
- Centrifugē 10 min 3500 apgr./min.
- Ekstraktu filtrē caur papīra filtriem jaunā 50 mL polipropilēna stobriņā.
- 2 mL ekstrakta pārnes 15 mL polipropilēna stobriņā, kas satur 100 mg C18 sorbentu un 2 mL acetonitrila.
- Samaisa un centrifūgē 5 min 3500 apgr./min.
- Nepieciešamības gadījumā filtrē caur centrifūgas filtriem.
- Pārnes autosamplera pudelītēs un analizē ar AEŠH-MS/MS.

Instrumentālā analīze

Šķidruma hromatogrāfs *Acquity UPLC* ar tandēma masspektrometrisko detektoru *QTrap 5500.*

Šķidruma hromatogrāfa parametri	
Kolonna	Thermo Hypercarb 100 x 2,1mm vai analoga
Kolonnas temperatūra	40°C
Temperatūra autosamplerī	10°C

Kustīgā fāze "A"	1% etiķskābes šķīdums (izokrātiskais režīms)				
Plūsmas ātrums	0,3 mL/min				
Injekcijas tilpums	10 µL				
Analīzes ilgums	10 min				
Masspektrometra parametri					
Jonizācijas veids	*ESI*, negatīvajā jonizācijas režīmā.				
Skenēšanas tips	*MRM*				
CUR	30 psi				
CAD	*Medium*				
IS	-4500 V				
TEM	700ºC				
GS1	40 psi				
GS2	60 psi				
Analīta skenēšanas parametri					
Savienojums	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Glifosāts	168	63	-50	-20	-17
	168	150	-50	-16	-17
Glifosāts 13C2 15N	171	63	-50	-20	-17

Testēšanas iekārtu kalibrēšana un rezultātu izvērtēšana

Testēšanas iekārtas kalibrēšanu, glifosāta satura aprēķināšanu paraugā veic, izmantojot paraugu ar attiecīgo standartpiedevu. Rezultātu izvērtēšanu veic atbilstoši SANTE 11813/2017 prasībām.

10. Pesticīdu noteikšana ar AEŠH-MS un GH-MS. QuEChERS metode. (LVS EN 15662:2018)

Mērķis un darbības joma

Metode paredzēta pesticīdu noteikšanai augu un dzīvnieku izcelsmes produktos. Metode ietver parauga homogenizēšanu, ekstrakciju ar acetonitrilu un attīrīšanu ar dispersīvu SPE, savienojumu noteikšanu, izmantojot šķidruma un gāzu hromatogrāfijas - masspektrometrijas metodes.

Reaģenti

- Acetonitrils (*AEŠH tīrības pakāpe*);
- etilacetāts (*Augstas tīrības organiskie šķīdinātāji*);
- QuEChERS sāļu maisījums (piem., *Phenomenex*). Saturs: 4 g ± 0,2 g bezūdens magnija sulfāta, 1 g ± 0,05 g nātrija hlorīda, 1 g ± 0,05 g trinātrija citrāta dihidrāta, 0,5 g ± 0,03 g dinātrija hidrogencitrāta seskvihidrāta;
- primāro sekundāro amīnu (PSA) maisījums (piem., *Phenomenex*). Saturs: 900 mg bezūdens magnija sulfāts, 150 mg PSA, 150 mg C18E, 15 ml centrifūgas stobriņā;
- dejonizēts ūdens (1. tīrības pakāpe, ūdens pretestība > 18 MΩ-cm);
- amonija formiāts (*ACS tīrības pakāpes*);
- ledus etiķskābe (*ACS tīrības pakāpes*).

Aparatūra un trauki

- Analītiskie svari ar precizitāti 0,0001 g;
- mērkolbas un mērcilindri, A klase;
- stikla centrifūgas stobriņi 10 mL;
- automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu;
- centrifūgas polipropilēna stobriņi 15 un 50 mL;
- sildīšanas iekārtas un slāpekļa ietvaicēšanas sistēma;
- hromatogrāfijas stikla 2mL mikropudeles ar ieliktņiem;
- kratītājs *(piem., BioSan, Vortex)*;
- termostatējama centrifūga*;*
- ultraskaņas vanna;
- centrifūgas filtri ar poru izmēru 0,22 µm (*piem., Ultrafree, Millipore)*;
- eppendorfa stobriņi 2 mL.

Šķīdumi

5mM amonija formiāta un 0,01% etiķskābes šķīdums. 1 L mērkolbā ielej 800 mL dejonizēta ūdens, pievieno 0,315 g amonija formiāta un 100 µL ledus etiķskābes, un uzpilda mērkolbu ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei.

Standarti

Analīzēm tiek izmantoti analītiski tīras standartvielas (piem., no *LGC Standard, AccuStandard Inc*., *SigmaAldrich u.c.*). Pagatavo pesticīdu standartšķīdumus ar koncentrāciju ~1000 ng/µL. 10 mL mērkolbā iesver ~10 mg standartvielas un atšķaida ar acetonitrilu vai toluolu līdz atzīmei. Pamatšķīduma precīzo koncentrāciju aprēķina, ņemot vērā vielas tīrību un veidu, kādā savienojums atrodas standartvielā. Šķīdumus glabā -18 ^{o}C temperatūrā 10 gadus.

Augu izcelsmes produktiem standartpiedevas pievienošanai izmanto pesticīdu standartšķīdumu maisījumu ar koncentrāciju 4 ng/µL, dzīvnieku izcelsmes produktiem – 10 ng/µL. Attiecīgus standartšķīdumu maisījumus pagatavo 25 vai 10 mL mērkolbās, ņemot attiecīgus standartšķidumu tilpumus ar koncentrāciju 1000 ng/µL un atšķaidot ar acetonitrilu līdz atzīmei. Šķīdumus glabā +4^{o}C temperatūrā 1 gadu.

Darba gaita

- Paraugus sagatavo sērijās, katrai matricai viens kalibrēšanas paraugs ar standartpiedevu beigās un viens kontroles paraugs ar standartpiedevu sākumā.
- Homogenizētu parauga iesvaru 5,0 ± 0,1 g ievieto polipropilēna stobriņā.
- Kontrolparaugiem pievieno darba standartšķīdumu līdz pesticīdu koncentrācijai paraugā 10 ng/g.
- Pievieno 5 mL ūdens.

- Pievieno 10 mL acetonitrila.
- Paraugu enerģiski krata ar rokām aptuveni 1 min.
- Pēc tam paraugam pievieno QuEChERS sāļu maisījumu.
- Pievienojot sāļu maisījumu paraugu enerģiski krata ar rokām 1 min vai 10 min uz automātiskā maisītāja.
- Paraugu centrifugē 5 min 3000 apgr/min istabas temperatūrā.
- Ja paraugs satur lielu lipīdu daudzumu, tad:
    - ✓ ekstraktu pārnes citā 15 mL PP centrifūgas stobriņā;
    - ✓ paraugu liek saldētavā -80 ^{o}C uz 10 minūtēm;
    - ✓ pēc tam paraugu centrifugē 10 min 3000 apgr/min istabas temperatūrā.
- 6 mL ekstrakta uznes uz PSA kolonnām
- Paraugu enerģiski sakrata un centrifugē 10 min 3000 apgr/min istabas temperatūrā
- 250 µL ekstrakta eppendorfa stobriņos sajauc ar 500 µL kustīgās fāzes „A" (vajadzības gadījumā ekstraktu filtrē caur centrifūgas filtriem)
- Kalibrēšanas paraugiem pievieno darba standartšķīdumu līdz pesticīdu koncentrācijai paraugā 10 ng/g (standartšķīduma daudzumu pārrēķina uz beigu acetonitrila daudzumu)
- Pārnes autosamplera pudelītēs un veic skrīninga analīzi ar AEŠH-AIMS vai apstiprinošu analīzi ar AEŠH-MS/MS.
- Pārējo ekstraktu pārnes 10 mL stikla stobriņos un ietvaicē 40 ^{o}C ūdens vannā slāpekļa plūsmā
- Sauso atlikumu izšķīdina 200 µL etilacetāta (vajadzības gadījumā ekstraktu filtrē caur centrifūgas filtriem)
- Kalibrēšanas paraugiem pievieno darba standartšķīdumu līdz pesticīdu koncentrācijai paraugā 10 ng/g (standartšķīduma daudzumu pārrēķina uz beigu acetonitrila daudzumu)
- Pārnes autosamplera pudelītēs un veic analīzi ar GH-MS/MS

AEŠH-MS/MS metode

Pesticīdu analīzei izmanto šķidruma hromatogrāfu *UltiMate 3000* ar tandēma masselektīvo detektoru *TSQ Quantiva.*

Šķidruma hromatogrāfa parametri

- Kolonna: *Kinetex C18 1,7u 100A, 50 x 3,00mm* vai analoga
- Injekcijas tilpums: 10 µL (AEŠH-MS/MS), 15 µL (AEŠH-AIMS)
- Temperatūra kolonnai: 30 ^{o}C
- Parauga temperatūra: 30 ^{o}C
- Plūsmas ātrums: 0,4 mL/min
- Gradienta režīms pēc programmas

Laiks, min	A, %	B, %	Slīpums
0	80	20	0
1	80	20	6
10	10	90	6
11	10	90	6
15	80	20	1

Tandēma masspektrometra parametri

- Lieto turboizsmidzināšanas interfeisu pozitīvajā un negatīvajā jonizācijas režīmā.
- IS: (-) 2500 V
- IS: (+) 3500 V
- *Sheath gas (Arb)*: 45
- *Aux gas (Arb)*: 25
- *Sweep gas (Arb):* 4
- Jonu pārneses caurules temperatūra: 320 ^{o}C
- Iztvaicētāja temperatūra: 450 ^{o}C
- Vielu skenēšanas pārejas un sadursmju enerģijas pozitīvajā jonizācijas režīmā

Pesticīds	Molekulārais jons, Da	Meitas jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
Acetamiprīds	223.1	90.2	36
	223.1	126.1	22
Aldikarba sulfoksīds	207.1	132.0	10
	224.1	132.0	11
Aldikarba sulfons	240.1	86.2	22
	240.1	148.0	12
Aldikarbs	208.1	89.2	19
	208.1	116.1	8
Azinfoss-etils	346.0	132.1	23
	346.0	160.1	15
Azinfoss-metils	318.1	77.0	39
	318.1	160.0	6
Azoksistrobins	404.0	344.0	35
	404.0	372.0	21
Benomils	291.0	160.0	19
	291.0	192.0	14
Bitertanols	338.0	99.0	16
	338.0	269.0	10
Boskalīds	343.2	271.0	34
	343.2	307.0	19
Bromukonazols	378.0	70.2	22
	378.0	159	32
Bupirimāts	317.3	108.1	27
	317.3	166.1	25
Buprofezīns	306.2	116.0	18
	306.2	201.0	12
Cimoksanils	199.0	111.0	20

	199.0	128.0	10
Ciprodinils	226.0	77.0	42
	226.0	93.0	38
Ciprokonazols	292.1	93.2	30
	292.1	125.0	30
Demeton-S-metils	231.1	61	43
	231.1	88.8	13
Demeton-S-metilsulfons	263.0	121.0	23
	263.0	169.0	23
Desmetil-pirimikarbs	225.0	72.0	20
	225.0	168.0	16
Diazinons	305.2	153.0	22
	305.2	169.0	22
Dietofenkarbs	268.2	180.1	18
	268.2	226.0	13
Difenokonazols	406.1	111.0	55
	406.1	251.0	25
Diflubenzurons	311.0	141.0	50
	311.0	158.0	20
Dihlorvoss	221.0	109.0	20
	223.0	109.0	20
Dimetoāts	230.1	125.1	23
	230.1	199.1	12
Dimetomorfs	388.1	165.0	34
	388.1	301.0	22
Dinikonazols	326.1	70.2	35
	328.0	70.0	35
Disulfotona sulfons	307.1	153.0	19
	307.1	171.0	17
Disulfotona sulfoksīds	291.1	157.0	31
	291.1	185.0	19
DMST	215.2	78.9	41
	215.2	215.2	19
Dodīns	228.0	57.0	24
	228.0	60.0	26
Epoksikonazols	330.0	101.0	63
	332.2	121.0	21
Etions	385.2	171.0	17
	385.2	199.1	12
Etirimols	210.0	98.0	40
	210.0	140.0	35
Etoprofos	243.0	97.0	33
	243.0	131.0	21
Fenamidons	312.2	236.2	16
	312.2	264.2	12
Fenamifosa sulfoksīds	320.0	171.0	24
	320.0	233.0	25
Fenamifosa sulfons	336.0	188.0	30
	336.0	266.0	23
Fenamifoss	304.1	202.0	36

	304.1	217.1	25
Fenarimols	331.1	81.0	31
	331.1	268.0	26
Fenbukonazols	337.0	70.0	33
	337.0	125.0	37
Fenheksamīds	302.0	55.0	36
	302.0	97.0	26
Fenoksikarbs	302.1	116.0	13
	302.1	256.0	14
Fenpiroksimāts	422.2	214.0	34
	422.2	366.0	15
Fenpropidīns	274.0	117.0	52
	274.0	147.0	31
Fensulfotions	309.1	173.0	33
	309.1	252.9	25
Fensulfotiona oksons	293.0	157.0	25
	293.0	265.0	13
Fensulfotiona oksona sulfons	309.0	175.0	25
	309.0	253.0	15
Fensulfotiona sulfons	325.1	191.0	37
	325.1	268.9	23
Fentiona oksona sulfoksīds	279.0	247.0	37
	279.0	264.0	25
Fentiona oksona sulfons	295.0	104.0	38
	295.0	217.0	31
Fentiona oksons	263.0	216.0	38
	263.0	231.0	20
Fentiona sulfoksīds	295.0	109.0	45
	295.0	280.0	25
Fentiona sulfons	311.0	109.0	25
	311.0	125.0	21
Fentoāts	321.0	79.0	42
	321.0	135.0	20
Fentions	279.0	169.0	21
	279.0	247.0	11
Flukvinkonazols	376.1	307.0	20
	376.1	349.2	21
Fluopikolīds	383.0	145.0	60
	383.0	173.0	25
Fluksapiroksads	382.0	342.0	20
	382.0	362.0	14
Fluopirāms	397.0	173.0	29
	397.0	208.0	24
Flusilazols	316.1	165.0	34
	316.1	247.1	19
Flutriafols	302.1	70.1	19
	302.1	123.0	33
Flutolanils	324.0	242.0	35
	324.0	262.0	25
Foksīms	299.0	77.0	20

	299.0	129.0	10
Formetanāts	222.0	120.0	37
	222.0	165.2	23
Fosalons	368.0	182.0	19
	368.0	184.0	21
Fosmeta oksons	302.0	160.0	20
	302.0	77.0	65
Fosmets	317.9	133.1	34
	317.9	160.1	12
Fostiazāts	284.0	104.0	23
	284.0	228.0	12
Heksakonazols	314.1	70.2	20
	314.1	159.0	29
Heksitiazokss	353.2	168.1	25
	353.2	228.2	18
Hinoksifēns	307.8	161.9	47
	307.8	196.8	33
Hlorantraniliprols	482.0	284.0	20
	484.0	453.0	20
Hlorfenvinfoss	359.0	99.0	39
	359.0	155.0	17
Imazalils	297.1	159.0	24
	297.1	201.0	18
Imidakloprīds	256.1	175.1	20
	256.1	209.1	18
Iprovalikarbs	321.1	119.0	20
	321.1	203.0	10
Isofenfoss-metils	332.0	121.0	40
	332.0	231.0	15
Isoprotialāns	291.0	145.0	49
	291.0	189.0	31
Karbarils	202.0	127.0	30
	202.0	145.0	12
Karbendazīms	192.1	132.1	33
	192.1	160.0	20
Karbofurāns	222.1	123.1	25
	222.1	165.0	14
Karbofurāns-3-hidroksi	238.0	181.0	11
	238.0	220.0	9
Karbosulfāns	381.0	118.0	21
	381.0	160.0	17
Klofentezīns	303.0	102.0	36
	303.0	138.0	18
Klotianidīns	250.1	132.1	18
	250.1	169.0	14
Krezoksim-metils	314.2	116.0	17
	314.2	222.0	14
Linurons	249.1	160.0	17
	249.1	182.0	18
Malaoksons	315.0	99.0	37

	315.0	127.0	19
Malations	331.1	99.0	21
	331.1	127.0	15
Mandipropamīds	412.1	327.9	15
	412.1	355.9	11
Mepanipirīms	224.1	77.0	40
	224.1	106.0	27
Metalaksils	280.1	192.1	16
	280.1	220.1	16
Metamidofoss	142.0	94.0	16
	142.0	125.0	16
Metidations	302.9	85.1	20
	302.9	145.1	10
Metiokarba sulfoksīds	242.0	122.0	41
	242.0	185.0	19
Metiokarba sulfons	258.0	122.0	25
	258.0	201.0	13
Metiokarbs	226.0	121.0	16
	226.0	169.0	10
Metoksifenozīds	369.0	133.0	10
	369.0	149.0	18
Metomils	163.0	88.1	10
	163.0	106.1	10
Metrafenons	409.0	209.0	19
	409.0	227.0	25
Miklobutanils	289.1	70.2	19
	289.1	125.0	31
Monokrotofoss	224.0	127.0	28
	224.0	193.1	19
Oksadiksils	279.0	132.0	41
	279.0	219.0	15
Oksamils	237.	72.0	15
	237.0	220.0	9
Oksidemetonmetils	247.0	109.0	39
	247.0	169.0	21
Ometoāts	214.0	155.0	18
	214.0	183.0	13
Paklobutrazols	294.1	70.0	20
	294.1	125.0	33
Pendimetalīns	282.0	194.0	27
	282.0	212.0	17
Penkonazols	284.1	70.1	17
	284.1	159.0	31
Pencikurons	329.0	125.0	30
	329.0	218.0	16
Pimetrozīns	218.0	51.0	25
	218.0	105.0	22
Piraklostrobīns	388.2	163.0	26
	388.2	194.0	14
Piridabēns	365.2	147.0	23

	365.2	309.1	13
Pirimetanils	200.0	82.0	30
	200.0	107.0	24
Pirimifoss-metils	306.1	108.1	33
	306.1	164.0	22
Pirimikarbs	239.0	72.0	21
	239.0	182.0	16
Piriproksifēns	322.2	96.0	16
	322.2	185.3	27
Prochlorazs	376.0	266.0	18
	376.0	308.0	14
Profenofoss	373.0	303.0	23
	375.0	305.0	21
Propamokarbs	189.0	102.1	19
	189.0	144.0	14
Propikonazols	342.2	69.2	21
	342.2	159.0	29
Propizamīds	256.0	173.0	24
	256.0	190.0	16
Prosulfokarbs	252.0	86.0	21
	252.0	91.0	31
Protiokonazols-destio	312.0	70.0	30
	312.0	125.0	35
Rotenons	395.0	192.0	26
	395.0	213.0	23
Spinozīns A	732.5	98.0	47
	732.5	142.0	35
Spinozīns D	746.5	98.0	47
	746.5	142.0	34
Spirodiklofēns	411.0	71.0	24
	411.0	313.0	12
Spiroksamīns	298.2	100.0	35
	298.2	144.0	21
Spiromesifēns	371.3	255.3	25
	371.3	273.3	15
Tebufenozīds	353.1	133.0	19
	353.1	297.0	10
Tebufenpirāds	334.2	117.0	36
	334.2	145.2	28
Tebukonazols	308.2	70.2	21
	308.2	125.0	34
Terbufosa sulfons	321.1	171.0	19
	321.1	115.0	33
Terbufosa sulfoksīds	305.1	159.0	29
	305.1	187.2	17
Terbutilazīns	230.0	174.0	16
	232.0	176.0	25
Tetrakonazols	372.1	70.0	24
	372.1	159.0	39
Tetrametrīns	332.0	135.0	22

	332.0	164.0	20
Tiabendazols	202.0	131.0	35
	202.0	175.0	28
Tiakloprīds	253.1	90.2	37
	253.1	126.1	22
Tiametoksāms	292.1	132.0	24
	292.1	211.1	14
Tiodikarbs	355.0	88.0	16
	355.0	108.0	16
Tiofanāt-metils	343.2	151.0	24
	343.2	311.2	12
Triciklazols	190.0	136.0	30
	190.0	163.0	24
Triadimefons	294.1	197.1	16
	294.1	225.1	16
Triadimenols	296.1	70.0	15
	296.1	99.0	17
Triazofoss	314.1	119.1	38
	314.1	162.0	17
Trifloksistrobīns	409.3	186.0	21
	409.3	206.1	16
Triflumurons	359.0	139.0	32
	359.0	156.0	17
Trihlorfons	257.0	109.0	27
	257.0	221.0	17
Tritikonazols	318.0	70.0	20
	318.0	125.0	30
Zoksamīds	336.0	159.0	59
	336.0	161.0	59

- Vielu skenēšanas pārejas un sadursmju enerģijas negatīvajā jonizācijas režīmā

Pesticīds	Molekulārais jons, Da	Meitas jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
Ametoctradīns	274.0	83.0	38
	274.0	121.0	38
Flubendiamīds	681.0	214.0	60
	681.0	254.0	40
Flufenoksurons	487.0	156.0	16
	487.0	467.0	10
Lufenurons	509.0	326.0	18
	509.0	339.0	17
Protiokonazols	342.0	100.0	32
	342.0	125.1	36
Teflubenzurons	379.0	196.0	22
	379.0	339.0	13

GH-MS/MS analīze

Masu selektīvais detektors *ThermoScientific TSQ Quantum XLS Ultra*

- Kolonna: *Zebron ZB-50 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm* vai analoga
- Injekcijas tilpums: 1 vai 2 µL
- Injektors: *PTV Splitless*
- Nesējgāze: hēlijs, plūsmas ātrums: 1,3 mL/min
- Temperatūra: 280 °C
- Jonu avota temperatūra 250 °C
- Injektora temperatūras programma:

	No temp. (ºC)	Līdz temp. (ºC)	Ātrums (ºC/sec)	Laiks (min)
Pārnese	70	280	14,0	10,00
Tīrīšana	280	300	10,0	25,00

- Gāzu hromatogrāfa termostata temperatūras programma:

No temp. (ºC)	Līdz temp. (ºC)	Ātrums (ºC/min)	Laiks (min)	Kopējais laiks (min)
65	65		1,50	
65	150	30,00	0,01	
150	290	5,00	0,00	
290	320	30,00	5,00	
				38,34

- Vielu skenēšanas pārejas un sadursmju enerģijas:

Pesticīds	Molekulārais jons, Da	Meitas jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
2-fenilfenols	170.0	115.0	20
	170.0	141.0	20
Acefāts	136.0	94.0	15
	136.0	112.0	10
Akrinatrīns	208.0	181.0	8
	181.0	152.0	23
Aldrīns	262.9	192.9	32
	264.9	229.9	26
Bifenils	153.0	152.0	15
	154.0	153.0	15
Bifentrīns	165.0	139.0	25
	181.0	141.0	22
Brompropilāts	154.9	75.9	20
	184.9	156.9	20
Ciflutrīns	206.0	151.0	20
	163.0	127.0	10
Cipermetrīns	181.0	152.0	25
	163.0	127.0	10
Deltametrīns	180.9	151.9	20
	252.9	93.0	18
DDD-p,p’	236.9	164.9	20
	234.9	164.9	20

Pesticīds	Molekulārais jons, Da	Meitas jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
DDE-p,p’	245.9	175.9	25
	247.9	175.9	20
DDT-o,p’	234.9	164.9	20
	236.9	164.9	20
DDT-p,p’	234.9	164.9	20
	236.9	164.9	20
Dieldrīns	262.9	192.9	26
	276.9	240.9	10
Difenilamīns	167.0	139.0	25
	169.0	77.0	25
Diklorāns	205.9	175.9	10
	207.9	177.9	10
Dikofols	138.9	110.9	15
	250.9	138.9	15
Endrīns	262.9	192.9	26
	280.9	244.9	12
Endosulfāna sulfāts	386.8	240.8	15
	421.8	386.8	5
Endosulfāns alfa	240.8	205.9	20
	264.8	192.9	22
Endosulfāns beta	271.8	236.8	18
	339.8	195.9	15
EPN	157.0	110.0	15
	157.0	139.0	15
Esfenvalerāts	167.0	125.0	10
	225.0	119.0	10
Etofēnprokss	163.0	107.0	16
	163.0	135.0	10
Famoksadons	330.1	224.0	10
	330.1	237.0	15
Fenazakvīns	145.0	117.0	15
	160.0	117.0	20
Fenitrotions	260.0	125.0	10
	277.0	109.0	20
Fenpropatrīns	181.0	152.0	23
	265.1	89.0	10
Fenpropimorfs	128.1	110.0	15
	303.2	128.1	15
Fentions sulfons	125.0	79.0	10
	310.0	246.0	10
Fenvalerāts	167.0	125.0	10
	225.0	119.0	10
Fipronila desulfinils	388.0	333.0	10
	333.0	281.0	10
Fipronila sulfons	255.0	228.0	25
	383.0	255.0	25
Fipronils	366.9	254.9	25
	369.9	214.9	30

Pesticīds	Molekulārais jons, Da	Meitas jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
Fludioksonils	248.0	127.0	50
	248.0	154.0	20
Flonikamīds	174.0	146.0	25
	174.0	69.0	25
Folpets	146.9	102.9	10
	259.9	94.9	20
Heksahlorbenzols	283.8	248.8	20
	285.8	250.8	20
Heksahlorcikloheksāns, alfa izomērs	180.9	144.9	15
	218.8	182.9	15
Heksahlorcikloheksāns, beta izomērs	180.9	144.9	15
	218.8	182.9	15
Heksahlorcikloheksāns, gamma izomērs	180.9	108.9	25
	182.9	146.9	15
Heptahlors	269.8	234.8	12
	271.8	236.8	15
Heptahlora epoksīds	352.8	262.8	15
	354.8	264.8	15
cis-Hlordāns	372.8	265.8	18
	409.8	374.8	5
trans-Hlordāns	372.8	265.8	18
	409.8	374.8	5
Hlorfenapirs	246.9	226.9	20
	248.9	228.9	20
Hlorpirifoss	196.9	168.9	15
	198.9	170.9	15
Hlorpirifoss-metils	124.9	78.9	10
	285.9	92.9	20
Hlorprofāms	213.0	127.0	15
	213.0	171.0	10
Indoksakarbs	203.0	106.0	20
	203.0	134.0	20
Iprodions	314.0	245.0	15
	314.0	271.0	10
Izokarbofoss	136.0	108.0	15
	230.0	212.0	10
Kadusafoss	159.0	97.0	20
	159.0	131.0	10
Kaptāns	116.9	82.0	25
	118.9	82.0	25
Kumafoss	226.0	163.0	20
	362.0	334.0	19
Lambda-cihalotrīns	197.0	141.0	15
	181.0	152.0	23
Metribuzīns	198.1	82.0	20
	198.1	89.0	16
Metoksihlors	227.0	212.0	15
	227.0	169.0	20

Pesticīds	Molekulārais jons, Da	Meitas jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
Nitrofēns	202.0	139.0	21
	283.0	253.0	15
Paraoksons metils	230.0	136.0	10
	230.0	200.0	10
Parations	109.0	81.0	10
	291.0	109.0	15
Parations metils	233.0	124.0	15
	263.0	109.0	15
Permetrīns	183.0	153.0	15
	183.0	168.0	15
Pirimifoss metils	290.0	125.0	15
	290.0	233.0	10
Procimidons	283.0	96.0	15
	283.0	255.0	10
Propargīts	135.0	107.0	15
	173.0	105.0	12
Tau-fluvalināts	181.0	152.0	20
	250.0	200.0	20
Teflutrīns	177.0	127.0	20
	197.0	141.0	15
Tetradifons	226.9	198.9	18
	353.8	158.9	15
Tolilfluanīds	137.0	91.0	20
	238.0	137.0	15
Tolkofoss-metils	264.9	92.9	20
	264.9	219.9	20
Vinklozilīns	212.0	172.0	15
	285.0	212.0	15

Testēšanas iekārtu kalibrēšana un rezultātu izvērtēšana

Testēšanas iekārtas kalibrēšanu un pesticīdu satura aprēķinu veic, izmantojot paraugu ar attiecīgo standartpiedevu. Rezultātu izvērtēšanu veic atbilstoši SANTE/12682/2019 prasībām.

10. Flavonoīdu, fenolo skābju un vitamīnu noteikšanas metode

Mērķis un darbības joma

Metode paredzēta dažādu mērķa un nemērķēta fenolo savienojumu noteikšanai medus paraugos. Metode ietver minimizētu paraugu sagatavošanu, iekļaujot ekstrakciju ūdens vidē, parauga attīrīšanu centrifugējot augstos apgriezienos un atšķaidīšanu, apvienojumā ar augsti efektīvo šķidruma hromatogrāfiju – augstas izšķirtspējas masspektrometriju (AEŠH-AIMS).

Reaģenti

- Acetonitrils (*AEŠH tīrības pakāpe*);

- dimetilsulfoksīds (*Augstas tīrības organiskie šķīdinātāji*);
- dejonizēts ūdens (1. tīrības pakāpe, ūdens pretestība > 18 MΩ-cm);
- skudrskābe (*ACS tīrības pakāpes*).

Aparatūra un trauki

- Analītiskie svari ar precizitāti 0,0001 g;
- mērkolbas un mērcilindri, A klase;
- automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu;
- eppendorfa stobriņi 2 mL;
- hromatogrāfijas stikla 2mL mikropudeles ar ieliktņiem;
- kratītājs (*piem., BioSan, Vortex*);
- termostatējama centrifūga;
- centrifūgas filtri ar poru izmēru 0,22 µm (*piem., Ultrafree, Millipore*).

Šķīdumi

- 0,1% skudrskābes ūdens (kustīgā fāze A) un acetonitrila (kustīgā fāze B) šķīdums. 1 L mērkolbā ielej 800 mL dejonizēta ūdens vai acetonitrila un pievieno 1 mL skudrskābes. Uzpilda līdz atzīmei.
- Mākslīgā medus paraugu (100 g) pagatavo izšķīdinot 45 g fruktozes un 35 g glikozes 20 mL dejonizētā ūdens. Šo paraugu izmanto kā no analītiem brīvo paraugu metodes izstrādes, validācijas un kalibrācijas nolūkos.
- Paraugu atšķaidīšanas šķīdums – 0,1% skudrskābes šķīdums dejonizētā ūdenī un acetonitrilā (98:2 tilpuma attiecībā). 50 mL mērkolbā pievieno 48 mL ūdens kustīgās fāzes (0,1% skudrskābe dejonizētā ūdenī) un atšķaida līdz atzīmei ar acetonitrila kustīgo fāzi (0,1% skudrskābe acetonitrilā).

Standarti

Analīzēm tiek izmantoti analītiski tīras standartvielas (no *LGC Standards, Santa Cruz Biotechnology, SigmaAldrich*). Standartu pamatšķīdumi tika pagatavoti uz svara bāzes, acetonitrilā vai dimetilsulfoksīdā (DMSO), koncentrāciju līmeņos ~1000 ng/µL. Standartiem sāļu veidā, tika pievienots ūdens. 10 mL mērkolbā iesver ~10 mg standartvielas un atšķaida ar acetonitrilu, vai DMSO līdz atzīmei. Pamatšķīduma precīzo koncentrāciju aprēķina, ņemot vērā vielas tīrību un veidu, kādā savienojums atrodas standartvielā. Šķīdumus glabā -18 °C, tumšos stikla traukos.

Tika pagatavoti divi standartu darba šķīdumi koncentrāciju līmenī 10 ng/µL, acetonitrilā atšķaidot standartu pamatšķīdumus. Viens darba šķīdumus saturēja savienojumus, kuru izšķīdināšanai tikai izmantots tīrs organisks šķīdinātājs, bet otrs – ūdeni saturošos pamatšķīdumus. Darba šķīdumi tika izmantoti standartpiedevas pievienošanai un kalibrācijas veidošanai. Darba šķīdumi tika uzglabāti 4 °C.

Fenolo skābju standarti: *Gallic acid, 3,4-Dihydroxybenzoic acid, Syringic acid, p-Hydroxybenzoic acid, Vanillic acid, p-Coumaric acid, Ferulic acid, o-Coumaric acid, Chlorogenic acid, Sinapic acid, Caffeic acid.*

Flavonoīdi un to atvasinājumi: *Catechin, Epicatechin, Isovitexin, Chrysin, Luteolin, Apigenin, Genistein, Daidzein, Formononetin, Acacetin, Biochanin A, Rhamnetin, Kaempferol, Galangin, Myricetin, Quercetin, Rutin, Procyanidin A2.*

Augu hormoni un vitamīni: *Abscisic acid, Phenylacetic acid, Pantothenic acid, Biotin, Folic acid.*

Darba gaita

- Homogenizētu paraugu iesvaru (kalibrācijas gadījumā – mākslīgā medus paraugu) 0,500 ± 0,01 g ievieto eppendorfa stobriņā;
- Kalibrācijas paraugiem pievieno darba standartšķīdumus nepieciešamajos koncentrāciju līmeņos;
- Pievieno 0,5 mL 10% NaCl šķīduma 0,01M HCl (pH = 2);
- Stobriņu maisa 1 minūti pie 2000 apgr./min istabas temperatūrā, vai kamēr paraugs ir pilnīgi izšķīdis;
- Stobriņā pievieno 1 mL acetonitrila un maisa 1 minūti pie 2000 apgr./min istabas temperatūrā;
- Paraugu centrifugē 1 minūti pie 15000 apgr./min;
- Augšējā slāņa (acetonitrila) alikvotu (~ 0,9 mL) pārnes 2 mL hromatogrāfijas pudelītē;
- Paraugam atkārtoti pievieno 1 mL acetonitrila, to maisa un centrifugē. Atkārtoti pārnes alikvotu (~ 0,9 mL) hromatogrāfijas pudelītē;
- Acetonitrilu ietvaicē istabas temperatūrā, zem slāpekļa plūsmas;
- Sausajam atlikumam pievieno 0,5 mL paraugu atšķaidīšanas šķīdumu (98:2 H_2O/acetonitrils ar pievienotu 0,1% skudrskābi);
- Hromatogrāfijas pudelītes aizkorķē un maisa, kamēr sausais atlikums ir izšķīdis;
- Veic analīzi ar AEŠH-AIMS.

AEŠH-AIMS metode

Analīzei izmanto šķidruma hromatogrāfu *UltiMate 3000* ar augstas izšķirtspējas masspektrometru *Q Exactive (Thermo Scientific)*.

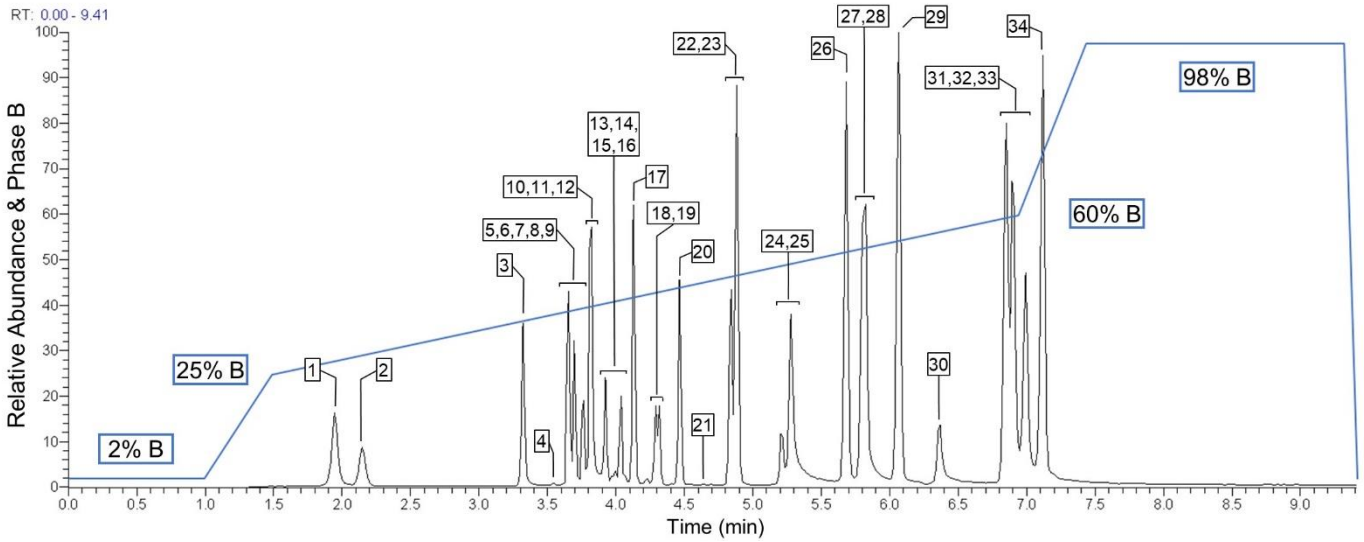
Šķidruma hromatogrāfa parametri:

- Kolonna *Kinetex PFP 1,7u 100A, 100 x 3,00 mm* vai analoga;
- Injekcijas tilpums 5 µL;
- Kolonnas temperatūra 40 °C;
- Plūsmas ātrums 0.6 mL min^{-1};
- Gradienta režīms pēc programmas:

Laiks, min	A, %	B, %	Slīpums
- 2,5 min (līdzsvarošana)	98	2	5
1	98	2	5

1,5	75	25	5
7	40	60	5
7,5	2	98	5
9,4	2	98	5
9,5	98	2	5

- Analizēto savienojumu hromatogramma un hromatogrāfijas kustīgās fāzes gradienta apstākļi:



Tandēma masspektrometra parametri

- Lieto apsildīto elektroizsmidzināšanas (H-ESI) interfeisu negatīvajā jonizācijā;
- Avota spriegums: -3,5 kV;
- *Sheath gas (Arb): 40;*
- *Aux gas (Arb): 10;*
- Jonu pārneses caurules temperatūra: 280 °C;
- Iztvaicētāja temperatūra: 420 °C;
- Datu iegūšanas metode: pilnā masu diapazona skenēšana, apvienojumā ar no datiem atkarīgo molekulu fragmentāciju (*Full scan – ddMS²*);
- Masas diapazons: 100 – 1200 *m/z*;
- Masu izšķirtspēja: 35000 (*Full scan*) un 17500 (*ddMS²*);
- Prekursoru izolācijas logs *ddMS²* režīmā: 1 *m/z*;
- Prekursori fragmentēti ar normalizēto kolīzijas enerģiju (NCE) 20%;
- Monoizotopās masas joni savienojumu kvantificēšanai izolēti ar 5 ppm lielu masas precizitāti;
- Informācija par analizētajiem mērķa savienojumiem, to molekulformulas, hromatogrāfiskie izdalīšanās laiki, prekursoru masas un attiecīgi fragmenti, ir apkopoti sekojošā tabulā:

Nr	Savienojums	Molekul-formula	Izdalīšanās laiks	Prekursoru precīzā masa* (*m/z*)	Produktu joni (*m/z*)	
				$[M-H]^-$	NCE	Galvenie savienojumu apstiprinošie fragmenti un relatīvās intensitātes
1	*Gallic acid*	$C_7H_6O_5$	1.95	169.0142	20	169.013 [59], 125.023 [100]
2	*Pantothenic acid*	$C_9H_{17}NO_5$	2.15	218.1034	20	218.103 [48], 146.081 [42], 88.039 [100], 71.012 [7]
3	*3,4-Dihydroxybenzoic acid*	$C_7H_6O_4$	3.34	153.0193	20	153.018 [28], 109.028 [100]
4	*Folic acid*	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	3.55	440.1324	20	440.133 [100], 422.124 [12], 396.144 [14], 311.091 [54]
5	*Catechin*	$C_{15}H_{14}O_6$	3.64	289.0718 [a]	20	289.072 [100], 245.082 [34], 205.05 [6], 203.071 [6], 179.034 [8], 125.023 [8]
6	*p-Hydroxybenzoic acid*	$C_7H_6O_3$	3.65	137.0244	20	137.023 [18], 93.033 [100]
7	*Chlorogenic acid*	$C_{16}H_{18}O_9$	3.66	353.0878	20	353.089 [2], 191.055 [100], 61.987 [5]
8	*Biotin*	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	3.70	243.0809	30	243.081 [100], 200.075 [64], 166.087 [50]
9	*Epicatechin*	$C_{15}H_{14}O_6$	3.76	289.0718 [a]	20	289.072 [100], 245.082 [34], 205.05 [6], 203.071 [6], 179.034 [8], 125.023 [8]
10	*Caffeic acid*	$C_9H_8O_4$	3.81	179.0350	20	179.034 [42], 135.044 [100]
11	*Phenylacetic acid*	$C_8H_8O_2$	3.81	135.0452	40	135.044 [100], 107.049 [12]
12	*Vanillic acid*	$C_8H_8O_4$	3.84	167.0350	20	167.034 [38], 152.01 [100], 123.044 [26], 108.02 [36]
13	*Syringic acid*	$C_9H_{10}O_5$	3.91	197.0455	20	197.045 [40], 182.021 [100], 152.894 [26]
14	*Rutin*	$C_{27}H_{30}O_{16}$	3.96	609.1461	40	301.036 [26], 300.028 [100], 271.025 [28], 255.03 [10], 163.002 [8], 151.003 [10]
15	*Isovitexin*	$C_{21}H_{20}O_{10}$	4.02	431.0984	20	431.099 [62], 413.088 [6], 341.067 [40], 311.056 [100]
16	*Procyanidin A2*	$C_{30}H_{24}O_{12}$	3.99	575.1195	20	575.119 [12], 539.098 [12], 449.089 [36], 423.073 [38], 289.072 [88], 285.041 [100], 125.023 [18]
17	*p-Coumaric acid*	$C_9H_8O_3$	4.12	163.0401 [b]	20	163.039 [17], 119.049 [100]
18	*Ferulic acid*	$C_{10}H_{10}O_4$	4.28	193.0506	20	193.05 [64], 178.026 [100], 149.06 [48], 134.036 [76]
19	*Sinapic acid*	$C_{11}H_{12}O_5$	4.30	223.0612	20	223.061 [82], 208.037 [100], 179.07 [20], 164.047 [96], 149.023 [30]
20	*o-Coumaric acid*	$C_9H_8O_3$	4.45	163.0401 [b]	20	119.049 [100], 163.039 [4]
21	*Myricetin*	$C_{15}H_{10}O_8$	4.65	317.0303	10	317.031 [78], 299.02 [50], 255.03 [40], 206.993 [74], 190.998 [96], 163.003 [100]
22	*cis,trans-Abscisic acid*	$C_{15}H_{20}O_4$	4.82	263.1289	10	263.129 [18], 219.139 [100], 204.115 [30], 201.128 [26], 151.075 [66], 139.075 [30]
23	*Chrysin*	$C_{15}H_{10}O_4$	4.87	253.0506 [c]	40	253.051 [100], 143.051 [14], 119.052 [6]
24	*Quercetin*	$C_{15}H_{10}O_7$	5.20	301.0354	10	301.036 [26], 273.041 [100], 257.046 [8], 245.045 [20], 206.993 [20]
25	*Luteolin*	$C_{15}H_{10}O_6$	5.26	285.0405 [d]	40	285.041 [100], 199.039 [6], 175.039 [8], 151.003 [16], 133.028 [18]
26	*Apigenin*	$C_{15}H_{10}O_5$	5.66	269.0455 [e]	40	269.046 [100], 151.003 [12], 117.033 [6]
27	*Kaempferol*	$C_{15}H_{10}O_6$	5.78	285.0405 [d]	40	285.041 [100], 229.05 [6], 185.06 [5]
28	*Genistein*	$C_{15}H_{10}O_5$	5.81	269.0455 [e]	40	269.046 [100], 181.066 [6], 133.03 [5]
29	*Formononetin*	$C_{16}H_{12}O_4$	6.04	267.0663	40	267.067 [18], 252.043 [100]
30	*Rhamnetin*	$C_{16}H_{12}O_7$	6.33	315.0510	40	315.051 [100], 300.028 [18], 165.044 [56], 121.03 [20]
31	*Daidzein*	$C_{15}H_{10}O_4$	6.82	253.0506 [c]	40	253.051 [100], 209.06 [6]
32	*Galangin*	$C_{15}H_{10}O_5$	6.88	269.0455 [e]	40	269.046 [100], 213.055 [6], 197.06 [5]
33	*Acacetin*	$C_{16}H_{12}O_5$	6.97	283.0612 [f]	40	283.061 [100], 268.038 [92]
34	*Biochanin A*	$C_{16}H_{12}O_5$	7.09	283.0612 [f]	40	283.061 [22], 268.038 [100], 267.03 [5]
* Burti pie masām norāda uz izomēru pāriem						

Testēšanas iekārtu kalibrēšana un rezultātu izvērtēšana

Testēšanas iekārtu kalibrēšanu un fenolo savienojumu satura aprēķinu veic, izmantojot kalibrāciju mākslīgā medus klātbūtnē. Metode ir validēta.