

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**MIKOTOKSĪNU NOTEIKŠANA KAĶU BARĪBĀ
IZMANTOJOT AEŠH-MS/MS**

MAGISTRA DARBS

Autors: **Ruta Ilze Bite**

Studenta apliecības Nr.: rb15029

Darba vadītājs: Prof. Vadims Bartkevičs

Darba konsultants: Mg. Chem., Zane Bērziņa

RĪGA

2021

ANOTĀCIJA

Mikotoksīnu noteikšana kaķu barībā izmantojot AEŠH-MS/MS. Maģistra darbs uzrakstīts latviešu valodā, tā apjoms ir 43 lappuses. Darbs satur 20 attēlus, 7 tabulas, 49 literatūras avotus, 7 pielikumus.

Literatūras apskatā veikts novērtējums par ergota alkaloidu un citu plašāk izplatīto mikotoksīnu klasifikāciju, to ietekmi uz cilvēku un dzīvnieku organismu. Apskatītas vairākas analīzes metodes mikotoksīnu noteikšanai, padziļināti izpētīta šķidrums hromatogrāfijas un masspektrometrijas metodes. Eksperimentālajā daļā veikta 20 sausās kaķu barības paraugu analīze, noteiktas 8 ergota alkaloidu un 8 citu mikotoksīnu koncentrācijas. Paraugi analīzei ir veikti, izmantojot AEŠH-MS/MS metodi.

ERGOTA ALKALOĪDI, MIKOTOKSĪNI, HROMATOGRĀFIJA,
MASSPEKTROMETRIJA, KAĶU BARĪBA

ABSTRACT

Mycotoxin determination in cat food using HPLC-MS/MS. The master's thesis is written in Latvian, it consists of 43 pages. It contains 20 figures, 7 tables, 49 references, 7 attachments.

The theoretical part of the master's thesis contains information about the classification of ergot alkaloids and other mycotoxins, their impact on human and animal health and some pharmaceutical uses. A review of multiple mycotoxins analysis methods with a focus on chromatographic and mass spectrometric methods was performed. In the experimental part 20 samples of dry cat food were analysed with the HPLC-MS/MS method, 8 ergot alkaloids and 8 other mycotoxins were determined.

ERGOT ALKALOID, MYCOTOXINS, CHROMATOGRAPHY, MASS SPECTROMETRY, CAT FOOD

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS	5
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Kaķu barības klasifikācija	7
1.2. Mikotoksīnu un EA iedalījums	8
1.3. Mikotoksīni mājdzīvnieku barībā	14
1.4. EA noteikšanas metodes	18
1.5. Mikotoksīnu noteikšanas metodes	20
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	22
2.1. Izmantotā aparatūra un reaģenti:	22
2.2. Materiāli un izejvielas, šķīdumu pagatavošana	23
2.3. Paraugu sagatavošana	25
2.4. AEŠH-MS/MS metodes apstākļi	26
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	28
SECINĀJUMI	38
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	39
PIELIKUMI	45

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

EA	Ergota alkaloidi;
DON	Deoksinivalenols;
OTA	Ohratoksīns A;
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe;
RNS	Ribonukleīnskābe;
ZEA	Zearalenons;
EFSA	Eiropas Pārtikas Nekaitīguma iestāde;
TDI	Pieļaujamā dienas deva;
TWI	Pieļaujamā nedēļas deva;
PMTDI	Provizoriskā pieļaujamā dienas deva;
LD ₅₀	Letālā doza;
NOAEL	Augstākā deva pie kuras nav novērojama nelabvēlīga ietekme;
LSD	Lizergīnskābes dietilamīds;
AEŠH-MS/MS	Šķidrumu hromatogrāfija – tandēma masspektrometrija;
PSH	Plānslāņa hromatogrāfija;
AEŠH	Augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija;
UAEŠH	Ultra augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija;
AEŠH-MS	Šķidrumu hromatogrāfija – masspektrometrija;
GH-MS	Gāzu hromatogrāfija – masspektrometrija;
C18	Oktadecilsilikagels;
ELISA	Enzīmu saistītais imūnsorbcijas tests;
TOF	Nolidojuma laika masspektrometrija;
LOD	Zemākā detektēšanas robeža;
FB1	Fumonizīns B ₁ ;
FB2	Fumonizīns B ₂ ;
AEŠH-FD	Augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija ar fluorescences detektoru.

IEVADS

Termins “mikotoksīns” radās 1962. gadā, pēc krīzes netālu no Londonas, kur bojā gāja vairāk kā 100000 tītaru. Šī masveida izmiršana tika sasaistīta ar zemesriekstu miltiem, kuri bija piesārņoti ar *Aspergillus flavus* sēnes sekundārajiem metabolītiem. Tas lika pētniekiem sākt apspriest arī citu sēņu metabolītu potenciālo bīstamību veselībai.¹

Kaķis ir viens no populārākajiem mājdzīvniekiem Eiropā. 2020.gadā bija noteikts, ka ap 110000 kaķu tiek turēti kā mājdzīvnieki, tas nozīmē, ka kaķis dzīvoja katrā trešajā ģimenē.² Lielākā daļa mājas kaķu ikdienā tiek baroti ar sauso barību, Latvijā ir pieejamas daudz, dažādas kvalitātes un cenu kategorijas sausās barības. Tā kā dzīvnieku barība bieži tiek pirktā lielākos iepakojumos mājdzīvnieki no vienvēidīgas barības pārtiek ilgāku laiku, ja konkrētajā barības sērijā vai iepakojumā ir paaugstināts mikotoksīnu saturs, dzīvnieks ir pakļauts hroniskai intoksikācijai, kas var novest pie ilgtermiņa veselības problēmām vai pat nāves. Mājdzīvnieku barības galvenās sastāvdaļas parasti ir graudaugi vai kukurūza un to blakusprodukti un rieksti, kas rada bažas par plaša spektra mikotoksīnu klātbūtni. Attiecīgi mikotoksīnu saturs dzīvnieku barībā var izraisīt nopietnas veselības problēmas mājdzīvniekiem, kas rada emocionālus pārdzīvojumus dzīvnieka saimniekam.

Šajā maģistra darbā ergota alkaloidu un citu mikotoksīnu noteikšanai kaķu sausajā barībā tika pielietota AEŠH metode ar tandēma kvadrupola masspektrometriju.

Darba mērķis: izpētīt ergota alkaloidu un citu mikotoksīnu izplatību kaķu barības paraugos.

Darba uzdevumi:

- Iepazīties ar ergota alkaloidu un citu mikotoksīnu klasifikāciju un izplatību
- Iepazīties ar paraugu sagatavošanas un analīzes metodēm
- Veikt eksperimenta plānošanu
- Veikt 20 kaķu barības paraugu analīzi

1. LITERATŪRAS APSKATS

Literatūras apskatā apkopota informācija par ergota alkaloidu un citu mikotoksīnu ietekmi uz cilvēku un dzīvnieku veselību, kā arī apskatītas vairākas to noteikšanas metodes.

1.1. Kaķu barības klasifikācija

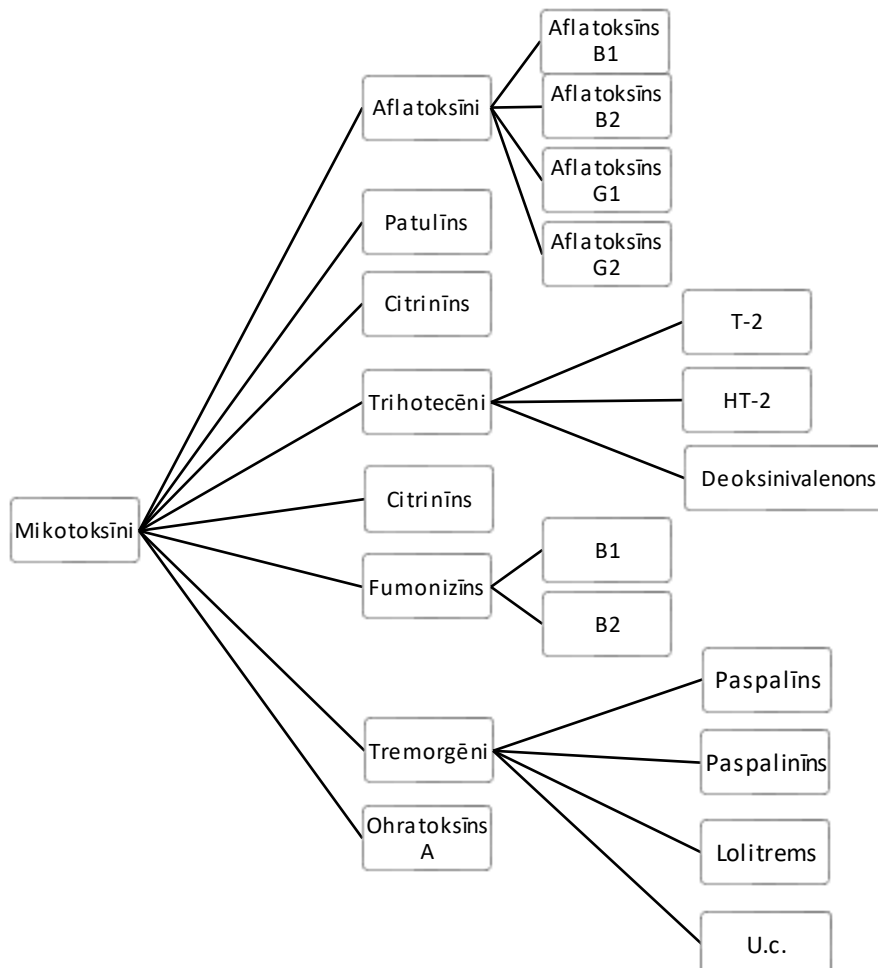
Lielākā daļa dzīvnieku barības ražotāju veic izejvielu analīzes, un gala produktu termiski apstrādā vai iepakoj labi noslēgtā iepakojumā, kā arī veic stabilitātes pētījumus, lai pārliecinātos par saražotā produkta kvalitāti. Mājdzīvnieku barība iedalās 3 grupās – sausā barība, mitrā barība un daļēji mitrā barība. Sausās barības sastāvdaļas tiek homogenizētas, samaisītas, apstrādātas ar tvaiku, spiedienu (34 -37 atm) un temperatūru (100 – 200 °C) un tālāk tiek sadalītas noteiktas formas un izmēra gabalos. Gala produkta mitruma saturs ir 8 līdz 10 %.³

Mitrā barība jeb konservi satur no 60 līdz 87 % mitruma. Mitrās barības izejvielas tiek samaltas, samaisītas, termiski apstrādātas un hermētiski iepakotas. Tālāk šie iepakojumi tiek sterilizēti augstā temperatūrā.³ Mitrās barības kā dzīvnieku izcelsmes izejvielas tiek izmatotas dzīvnieku daļas, kas paliek pāri no cilvēku pārtikas produktu ražošanas, piemēram, aknas, nieres vai plaušas. Mitrās barības ražošanai mēdz izmantot arī dzīvnieku muskuļu gaļu. Dzīvnieku barības ražotnēs šīs sastāvdaļas parasti piegādā svaigā vai saldētā veidā. Tālāk šīs sastāvdaļas tiek sasmalcinātas, tiek pievienoti augu izcelsmes produkti, piemēram, kukurūza, kvieši, zirņi, tiek pievienotas arī eļļas, vitamīni, minerālvielas, dārzeņi un ūdens. Iegūtā masa tiek samaisīta un formēta noteiktas formas un lieluma gabalos. Tālāk barība tiek iepakota un karsēta, pēc karsēšanas produkts tiek atdzesēts un marķēts.⁴

Daļēji mitrā barība satur 25 līdz 35 % mitruma, tādēļ šāda veida barībā ir lielāka iespēja veidoties pelējumam. Optimālie pelējuma veidošanās apstākļi iekļauj pēc iespējas augstāku gaisa mitrumu. Temperatūra ir atkarīga no pelējuma tipa, piemēram, optimālā *Aspergillus* augšanas temperatūra ir 24-35 °C, *Penicillium* 18-32 °C savukārt *Fusarium* augšanas un mikotoksīnu augstākais temps novērojams 4-15 °C.⁵ Daļēji mitrās barības ražošanas process ir līdzīgs sausās barības ražošanas norisei. Izejvielas dzīvnieku barībai tiek izvēlētas tā, lai gala produkts spētu nodrošināt minimālās uzturvielu prasības dzīvnieku fizioloģiskajam stāvoklim un dzīves posmam.⁵

1.2. Mikotoksīnu un EA iedalījums

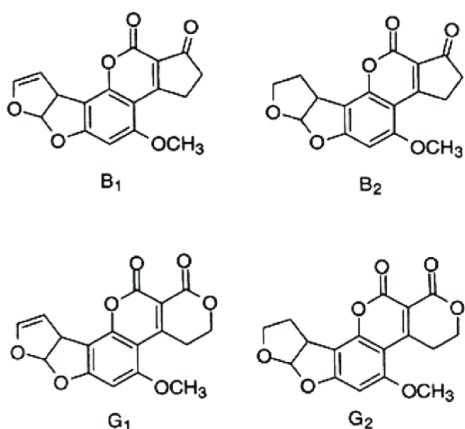
Mikotoksīni ir dabīgi dažādu pelējuma sēņu sekundārie metabolīti, kas var kaitēt gan cilvēku, gan dzīvnieku veselībai tos apēdot. 1.1 attēlā redzams mikotoksīnu iedalījums.



1.1.att. Mikotoksīnu iedalījums ⁶

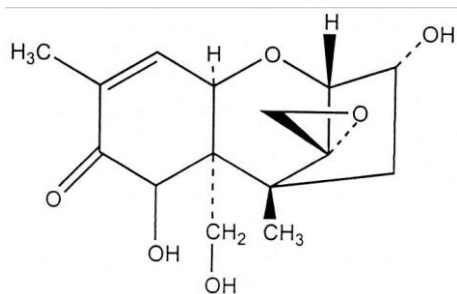
Aflatoksīni ir indīga substance, ko rada pelējuma sēnītes. Šie toksīni var radīt nopietnas veselības problēmas cilvēkiem un dzīvniekiem. Pasaulē gada laikā aptuveni 25 % no kultūraugiem iznīcina aflatoksīnu dēļ.

Divas radniecīgas sēnes galvenokārt rada aflatoksīnus – *Aspergillus flavus* un *A. Parasiticus*. Dabā ir sastopami vairāk kā 14 veidu aflatoksīnu, taču 4 no tiem - B₁; B₂; G₁; G₂ (skat. 1.2. att.) ir atzīti par veselībai bīstamiem cilvēkiem un dzīvniekiem. Aflatoksīni ir potenciāli kancerogēni un ilgtermiņa vai hroniska ekspozīcija var ietekmēt visu orgānu sistēmas, īpaši aknas un nieres, genotoksiski. Lielās devās var izraisīt akūtu saindēšanos.⁷



1.2.att. Aflatoksīnu B₁, B₂, G₁, G₂ struktūrformulas ⁸

DON (skat. 1.3. att.) galvenokārt rodas no *Fusarium graminearum* sēnes, kas bieži inficē kukurūzu, kviešus, auzas, miežus, rīsus un citus graudaugus to augšanas vai glabāšanas laikā. DON dzīvniekiem un cilvēkiem izraisa akūtu īslaicīgu nelabumu, vemšanu, caureju, sāpes vēderā, galvassāpes, reiboni un drudzi. Viena no galvenajām DON īpašībām ir tā stabilitāte augstās temperatūrās (170 - 350°C), tāpēc no tā nav iespējams atbrīvoties karsējot. DON ir ūdenī šķīstošs un tā koncentrāciju var nedaudz samazināt pārtikas produktus vārot, jo daļa izšķīst un paliek ūdenī. Lielas DON devas var izraisīt šoka veida nāvi, LD₅₀ pelēm svārstās no 49 līdz 70 mg/kg.⁹ TDI cilvēkiem ir pielīdzināts TDI pelēm, kas ir 1 µg/kg ķermeņa svara, NOAL kaķiem noteikts 6 mg DON/kg barības.¹⁰

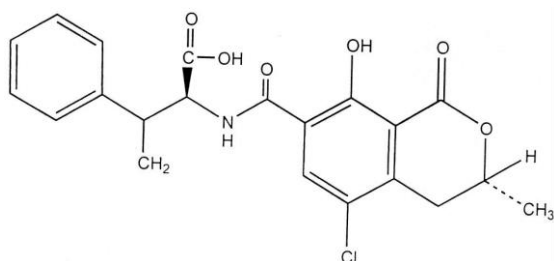


1.3.att. DON struktūrformula ⁶

Fumonizīni ir dabīgi toksīni, kas rodas no vairāku sugu *Fusarium* sēnēm, galvenokārt no *Fusarium verticillioides* un *Fusarium proliferatum* sēnēm. Ir zināmi vairāki veidi šo mikotoksīnu, bet fumonizīni B₁, B₂ un B₃ ir biežāk sastopami pārtikā. Fumonizīns B₁ tiek saistīts ar nelabvēlīgu ietekmi uz dzīvnieku aknām un nierēm, ir novērota ietekme uz reproduktīvo sistēmu cūkām un trušiem un jaundzimušo kropļības pelēm.¹¹ TDI pelēm ir 1 µg/kg ķermeņa svara.¹²

OTA (skat. 1.4. att.) galvenokārt rodas no *Aspegillus ochraceus*, *Aspegillus niger*, *Aspegillus carbonarius* un *Penicillium verrucosum* sēnēm, un to var atrast dažādos produktos, sākot ar kukurūzas izstrādājumiem, žāvētiem augļiem līdz vīnam un kafijai. OTA izraisa nefrotoksicitāti un nieru audzējus dažādām dzīvnieku sugām. Toksiskā iedarbība uz cilvēka

organismu nav pietiekami izpētīta, taču ir pierādīta OTA toksicitāte un kancerogenitāte dzīvniekiem. OTA ir ķīmiski stabils savienojums, tādēļ parasta pārtikas apstrāde nemazina tā daudzumu pārtikā un dzērienos.¹³ TWI noteikts 120 ng/kg ķermeņa svara.¹⁴



1.4.att. OTA ķīmiskā struktūrformula ⁶

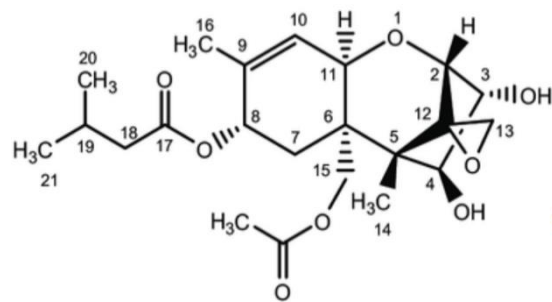
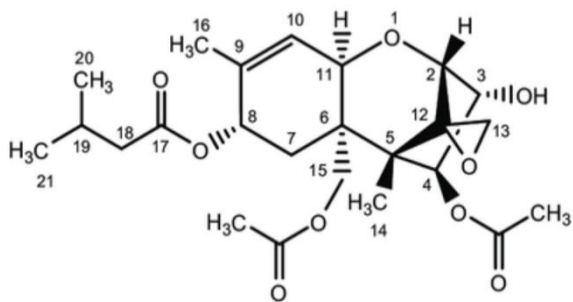
Tremorgēnu mikotoksīni iedalās divās apakšklasēs, kas iedarbojas uz centrālo nervu sistēmu. Pirmā apakšklase ir mikotoksīni, kas izraisa paralīzi un elpošanas apstāšanos, piemēram, citreoviridīns. Otrā tremorgēnu mikotoksīnu apakšklase izraisa trīci. Tremogēni ir indola – diterpēna alkaloidi.

Citreoviridīns ir atrodams Āzijas rīsos un ASV kukurūzā, ir aizdomas, ka tas Japānā un Ķīnā cilvēkiem izraisa līdzīgu saslimšanu beriberi slimībai, kas ir tiamīna jeb B1 vitamīna trūkums, kas izraisa gremošanas metabolisma un nervu sistēmas traucējumus.¹⁵

Citrinīnu producē vairākas sēņu *Penicillium* un *Aspergillus* sugas. Citrinīnu saista ar dzeltenu rīsu kaiti Japānā. Citrinīns ir nefrotoksisks visiem dzīvniekiem ar kuriem ir veikti eksperimenti, tā akūtā toksicitāte katrai dzīvnieku sugai ir atšķirīga. LD₅₀ pīļiem ir 57 mg/kg, vistām – 95 mg/kg un trušiem – 134 mg/kg. Citrinīns kopā ar OTA darbojas sinerģiski un nomāc RNS sintēzi peļu aknās.⁶

ZEA ir nesteroidāls estrogēniskais mikotoksīns, ko rada vairākas *Fusarium* sēņu sugas. Kukurūzā un graudaugos augšanas laikā šis mikotoksīns ir sastopams mazos daudzumos, taču tā koncentrācija pieaug glabāšanas laikā, ja gaisa mitrums ir 30 – 40 %. Pētījumos, kas veikti ar cūkām pierādīts, ka zearalenons vairāk ietekmē sieviešu reproduktīvo sistēmu, nekā vīriešu.¹⁶ Ir noteikts TDI cūkām, kas tiek attiecināts arī uz cilvēkiem - 0,25 μg/kg ķermeņa svara.¹⁷

T-2 un HT-2 toksīni pieder pie trihotecēnu savienojumu grupas (skat. 1.5. att.). Šie savienojumi var samazināt ķermeņa svaru, izraisīt reproduktīvās sistēmas problēmas gan cilvēkiem, gan dzīvniekiem, var radīt dermatītu tiešā saskarē ar ādu. Kaķi ir ļoti jutīgi pret šiem toksīniem ¹⁸, tomēr nav noteiktas NOAEL vai TDI kaķiem. EFSA ir noteikusi TDI cilvēkiem T-2 un HT-2 toksīnu summai – 100 ng/kg ķermeņa svara.¹⁸



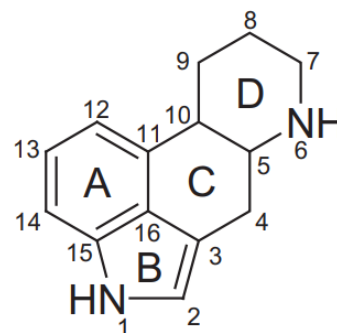
1.5. att. T-2 un HT-2 toksīnu struktūrformulas ¹⁹

Patulīns rodas no vairāku veidu sēnēm, lai gan tam piemīt antibakteriālas īpašības tas ir toksisks augiem un dzīvniekiem. Patulīnu var atrast nefermentētās ābolu sulās. Mūsdienās nav informācijas par saindēšanās gadījumiem, kas būtu tieši saistīti ar patulīnu. PMTDI noteikts 0,4 μg/kg ķermeņa svara.¹⁴

EA raksturojumi. EA ir mikotoksīni, ko ražo sēnes no *Claviceps* ģints. Eiropā visizplatītākā ir *Claviceps purpurea* suga, šīs sēnes parasti skar kultivējamās graudzāles, piemēram, rudzus kviešus, tritikāli, miežus, prosu un auzas.²⁰ Šīs sēnes aizvieto graudu sēklas veidojumu - sklerociju ar cietu sēņu micēliju, ko sauc par ergotu jeb melno graudu. Ergoti var būt brūnā vai violeti melnā krāsā un satur EA (skat. 1.6. att.). Sēnes augā nokļūst no augsnes ar vēja un lietus palīdzību. Sēnes no auga iegūst uzturvielas, lai nodrošinātu augšanu un izplatītos tālāk. Melnie graudi tiek novākti kopā ar ražu un, ja tie netiek atlasīti, nonāk cilvēku un dzīvnieku pārtikā.²¹



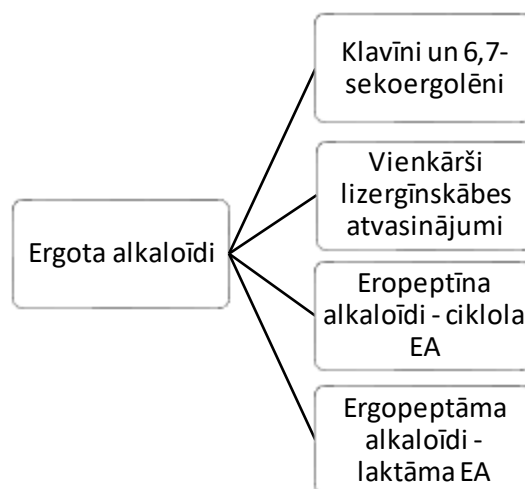
1.6. att. Rudzu vārpa ar ergotiem ²¹



1.7. att. Ergolīna struktūrformula ²⁰

EA ir indola savienojumi, kas ir biosintētiski atvasināti no L-triptofāna un pārstāv lielāko dabā, atrodamo slāpekļa sēnīšu metabolītu grupu. Graudu ergoti satur apmēram 0,15 % - 0,5 %

alkaloīdu, no kuriem medicīniski lietderīgos alkaloīdus iedala 2 grupās: ūdenī šķīstošo aminoskābju atvasinājumi (aptuveni 20% no visu alkaloīdu satura) un ūdenī nešķīstošo peptīdu atvasinājumi. Liela daļa ergota alkaloīdi ir tetracikliska gredzenu sistēma (skat. 1.7. att.) ar triviālo nosaukumu ergolīns. EA iedala 4 apakšgrupās (skat. 1.8. att).²¹



1.8. att. Ergota alkaloīdu strukturālais sadalījums ²¹

EA ietekme uz cilvēku un dzīvnieku organismu. Saindēšanos ar ergotiem sauc par ergotismu. Ergotisms ir viens no visnenāk novērotajām mikotoksikozēm. Pirmā dokumentētā ergotisma epidēmija notika 944. – 945. gadā pirms mūsu ēras, aptuveni 20000 cilvēku Francijā nomira no saindēšanās ar ergotiem, 50 gadus vēlāk vēl 40000 cilvēku gāja bojā šī paša iemesla dēļ.²¹

Vēsturiski smagākā saindēšanās ar EA tiek saistīta ar ekstremitāšu gangrēnu vai savādu uzvedību, kas saistīta ar lizergīnskābes diamīdiem līdzīgām vielām. Kā arī aborti, nedzīvu bērnu dzimšana, nespēja ražot pienu jaundzimušo mātēm (agalaktija) ir novērota pēc saindēšanās ar EA, kas speciāli vai dzīves apstākļu dēļ ir spiestas ēst sliktākas kvalitātes pārtiku.²²

Viduslaikos saindēšanos ar EA dēvēja par “Sv. Antonija uguns slimību”, šīs slimības simptomi atbilst EA saindēšanās simptomiem, piemēram, degošas ādas sajūta, sajūta ka zem ādas ir kukaiņi, roku un kāju gangrēna. 1690. gados iespējama saindēšanās ar ergota alkaloīdiem tiek saistīta ar raganām un raganu tiesāšanu Salemā, Masačūsetsā. Ergotamīns ir daļa no lizergīnskābes dietilamīda jeb LSD.²³

Saindēšanās ar EA biežāk notiek pēc vēsām, mitrām ziemām, kam seko silts pavasaris. Saindēšanās ar EA, kas izraisa gangrēnu, biežāk ir sastopama Eiropas rietumu daļas valstīs. Mūsdienās ir samazinājies risks cilvēkiem saindēties ar EA, tomēr dzīvniekiem saindēšanās risks vēl joprojām ir augsts.²⁴

In vivo pētījumos attiecībā uz akūtu toksiskumu LD₅₀ vērtība ir svārstīga atkarībā no dzīvnieku sugas un EA. Žurkām, pelēm un trušiem LD₅₀ ir robežās no 0,9 līdz 275 mg/kg ķermeņa svara, truši ir visuzņēmīgākie pret EA, LD₅₀ ir 0,9 līdz 3,2 mg/kg. Saindēšanās ar EA izraisa neirotoksicitāti, muskuļu vājumu, trīci un stīvumu, žurkām tika novērota gangrēna astēs pēc ergokristīna, ergokriptīna un ergokornīna injicēšanas.²⁴

Mājlopiem smags ergotisms izpaužas kā audu nekroze ausu galos, astē, kas bieži noved līdz astes zaudēšanas, sliktākos gadījumos var sākties nagu audu nekroze, kas noved pie nagu zaudēšanas, un visbiežāk arī ar nāves. EA ietekmē arī asinsriti, saindēšanās ar EA var izraisīt asinsrites samazināšanos ekstremitātēs, kas var izraisīt tūsku vai trombozi, kas tālāk var novest līdz audu zaudēšanas ja mājlops netiek pārvests uz citu barošanās vietu, kur nav sastopami EA. Ergotisms var izraisīt arī hipertermiju jeb pārkaršanu, samazinātu ķermeņa svaru, samazinātu reproduktīvā perioda ilgumu, prolaktīna samazināšanos.²⁵

EA izplatība un atļautās normas. Mūsdienās saindēšanās risks ar EA ir salīdzinoši mazs pateicoties dažādiem attīrīšanas procesiem un noteiktajiem maksimāli pieļaujamajiem līmeņiem graudaugos (skat. 1.1. tabulu). Pagaidām ES noteiktie limiti sklerocijas daudzumam graudos, kas tiek izmantoti cilvēku pārtikā ir 0,05 % un dzīvnieku pārtikā – 0,1%. Tomēr tiek paredzēts, ka no 2022. gada šīs robežvērtības tiks samazinātas līdz 0,02 %.¹⁰ Pētījumā par EA izplatību Eiropā aptuveni 50 % - 100% no 372 analizēto rudzu un rudzu produktu paraugu saturēja 61 līdz 1231 µg/kg EA. Arī miežu un tritikāles paraugi saturēja līdzīgas EA koncentrācijas.²⁶ Paraugos kas ievākti no 2011. līdz 2016. gadam 15 Eiropas valstīs visaugstākā EA koncentrācija tika atrasta rudzos un rudzus saturošos produktos, it sevišķi produktos kuros ir malti rudzi. EA koncentrācija šajos paraugos tika noteikta 198 – 239 µg/kg. Pārstrādātā pārtikā lielākās EA koncentrācijas tika atrastas jauktu kviešu un rudzu maizē: 33 – 82 µg/kg.¹

No 654 dzīvnieku (mājlopu) barības paraugiem, kas tika ievākti Čehijā, Nīderlandē, Slovēnijā, Horvātijā un Apvienotajā Karalistē laikā no 2011. līdz 2016. gadam tikai 28 % paraugos tika kvantificēti EA. Šajā pētījumā tika analizēti arī mājdzīvnieku barība, EA koncentrācija tajā tika noteikta 60 µg/kg.²⁶

MK noteikumi par atļauto melno graudu klātbūtni graudos ²⁷

Nr. p. k.	Produkts	Rādītājs	Rādītāja lielums
1.	Kvieši	Melno graudu (<i>Claviceps purpurea</i>) klātbūtne, %	Ne vairāk kā 0,05
2.	Rudzi	Melno graudu (<i>Claviceps purpurea</i>) klātbūtne, %	Ne vairāk kā 0,05

1.1. tabulā redzamas ES direktīvas noteiktās robežvērtības ergota jeb melno graudu atļautā klātbūtne pārtikā izmantojamiem graudaugiem masas procentos.²⁷ 2012. gada 15. martā tika pieņemts ieteikums par monitoringu attiecībā uz melno graudu alkaloīdu klātbūtni dzīvnieku barībā un pārtikā. Šajā ieteikumā ir aprakstīts, ka melno graudu monitorings ir jāveic graudaugu produktiem, kas paredzēti lietošanai pārtikā vai dzīvnieku barībā, kā arī ganību/lopbarības zālaugos. Analizējot šos paraugus ir jāpārbauda vairākus savienojumus (ergokristīns/ergokristinīns, ergotamīns/ergotaminīns, ergokriptīns/ergokriptīns, ergometrīns/ergometrinīns, ergozīns/ergozinīns un ergokornīns/ergokorninīns). Vienlaicīgi būtu jānosaka arī sklerociju jeb melno graudu saturs paraugā, lai varētu gūt vairāk informācijas par saistību ar sklerociju saturu un atsevišķu EA līmeni.²⁸

1.3. Mikotoksīni mājdzīvnieku barībā

Svarīga dzīvnieku barības sastāvdaļa ir kukurūza un graudaugi. Graudaugus sausajai mājdzīvnieku barībai pievieno, lai uzlabotu barības konsistenci un palielinātu uzturvērtību.

Mikotoksīnu klātbūtne mājdzīvnieku barībā rada satraukumu par dzīvnieku veselību, raisot emocionālas un ekonomiskas bažas arī mājdzīvnieku saimniekiem. Kaķu, suņu, putnu, zivju, reptiļu un grauzēju barībā galvenās sastāvdaļas bieži ir kukurūzas blakusprodukti un rieksti, kas tiek pārstrādāti par barību un var saturēt mikotoksīnus.²⁹

Lielākā daļa dzīvnieku barības ražotāju veic izejvielu analīzes, un gala produktu termiski apstrādā vai iepakoj labi noslēgtā iepakojumā, kā arī veic stabilitātes pētījumus, lai pārliecinātu tos par saražotā produkta kvalitāti. Izejvielas dzīvnieku barībai tiek izvēlētas tā, lai gala produkts spētu nodrošināt minimālās uzturvielu prasības dzīvnieku fizioloģiskajam stāvoklim un dzīves posmam.³ Lai gan potenciāli dzīvnieku barība var būt piesārņota ar ļoti plaša spektra mikotoksīniem, šobrīd nekaitīguma prasības dzīvnieku barībā ir noteiktas tikai dažiem no mikotoksīniem.

Dzīvnieku barības nekaitīguma prasības ³⁰

Nr.p.k.	Piesārņojums	Barība vai tās sastāvdaļas	Maksimāli pieļaujama is daudzums barībā, mg/kg
1.	Deoksinivalenols	Labība un labības produkti, izņemot kukurūzas blakusproduktus	8
		Kukurūzas blakusprodukti	12
2.	Zearalenons	Labība un labības produkti, izņemot kukurūzas blakusproduktus	2
		Kukurūzas blakusprodukti	3
3.	Ohratoksīns A	Labība un labības produkti	0,25
4.	Fumonizīns B ₁ + B ₂	Kukurūza un kukurūzas produkti	60
5.	T-2 un HT-2 toksīns	Barības maisījums kaķiem	0,05

1.2. tabulā redzamas ES direktīvas noteiktās robežvērtības mikotoksīnu daudzuma m dzīvnieku barībā vai barības sastāvdaļās.³⁰ Kā redzams, mājdzīvnieku barībai, kā gatavam produktam nav noteiktas mikotoksīnu robežvērtības, izņemot T-2 un HT-2 toksīnu daudzumu barības maisījumā kaķiem.

1,7% mājdzīvnieku saindējas ar mikotoksīniem no ēdiena, lai gan šāda veida saindēšanās ir salīdzinoši reta, tā ir pietiekami nopietna.³¹ Atšķirībā no cilvēkiem, kas uzņem dažāda veida pārtiku no vairākiem ražotājiem ar atšķirīgu uzturvērtību, tādējādi atšķaidot mikotoksīnu potenciālo diennakts devu, mājdzīvnieki pārsvarā pārtiek no viena veida barības, vismaz kamēr iegādātais iepakojums ir tukšs. Tādējādi, ja iegādātā barība tomēr ir piesārņota ar mikotoksīniem, mājdzīvniekam nav iespējas izvairīties no regulāras intoksikācijas.

Visbiežāk mājdzīvnieku saindēšanās notiek ar DON vai aflatoksīniem. Suņi un kaķi ir īpaši jutīgi pret aflatoksīniem, eksperimentāli noteiktā LD₅₀ orāli suņiem ir no 0,5 līdz 1,5 mg/kg, bet kaķiem LD₅₀ orāli ir 0,55 mg/kg. Suņiem pat ar subakūtu aflatoksikozi ir novērojama tauku deģenerācija, holeostsāze un audu nekroze, bieži ar izteiktu tūsku un nepilnīgas audu

reģenerācijas pazīmēm. Hronisku aflatoksikozi raksturo zemāka tauku deģenerācija, lokalizēta fibroze un aknu formas anomālijas (skat. 1.9. att.).³¹



1.9.att. Suņa aknas ar aflatoksikozi ⁽³¹⁾

Nav iespējams konkrēti noteikt cik daudz mājdzīvnieku saindēšanās ir saistīta ar mikotoksīniem, jo bieži mikotoksīnu izraisītās saindēšanās tiek saistītas ar citām akūtām slimībām, piemēram, ar aknu un nieru fibrozi, infekcijām un vēzi.

Saindēšanās ar OTA var izraisīt anoreksiju, svara zudumu, vemšanu, asiņainu caureju, un paaugstinātu ķermeņa temperatūru. Šie simptomi suņiem parādās uzņemot vien 0,2 līdz 3,0 mg OTA/kg ķermeņa svara.²⁹

Reālos apstākļos dzīvnieki tiek pakļauti riskam saindēties ar vairākiem mikotoksīniem vienlaicīgi. Vienlaicīgi vairāku mikotoksīnu ekspozīciju iedala 4 grupās pēc to mijiedarbības:

- Aditīvisms – kombinēto mikotoksīnu iedarbība ir vienāda ar summu no katra mikotoksīna
- Sinerģija – mikotoksīnu kombinētā iedarbība ir daudz lielāka nekā katra mikotoksīna iedarbības summa
- Potenciācija – vienam mikotoksīnam nav toksiskas ietekmes uz kādu orgānu, bet kopā ar citu mikotoksīnu tas kļūst daudz toksiskāks
- Antagonisms – divi mikotoksīni kas traucē viens otram, samazinot toksisko efektu

Piemērs sinerģijai ir DON un T-2 toksīna kopējā iedarbība vistām, barojot šo toksīnu kombināciju jaunām vistām tika novērota samazināta ķermeņa masa. Uzņemot šos toksīnus atsevišķi ķermeņa masas samazinājums netika novērots.²⁹

2019. gadā tika veikts pētījums par mikotoksīnu izplatību suņu un kaķu sausajā barībā, tika analizētas 60 kaķu barības un 62 suņu barības dažādās cenu kategorijās. Sākotnēji tika pieņemts, ka dzīvnieku barībā, kuru cena ir augstāka mikotoksīnu saturam būtu jābūt mazākam. Lai veiktu mikotoksīnu analīzi tika izmantota AĒŠH – MS/MS metode ar zemām kvantificēšanas robežām - LOQ vērtības atkarībā no mikotoksīna bija robežās no 0,025 ng/g līdz 5 ng/g. Visos paraugos tika konstatēti mikotoksīni, 100 % visos paraugos tika konstatēts DON, fumonisīni, OTA un aflatoksīns B₁. Kaķu barībā mikotoksīnu koncentrācijas tika

noteiktas augstākas nekā suņu barībā. Negaidīti tika secināts, ka kaķu barībās, kas bija dārgākas, T2 un HT2 toksīnu koncentrācija bija augstāka.³² Laikā no 2011. līdz 2014. gadam Polijā tika veikts pētījums par mikotoksīnu saturu dzīvnieku barībā, šī pētījuma ietvaros tika pārbaudīti 1384 paraugi, no kuriem 295 bija kukurūza, 143 - kukurūzas zaļās masas, 466 graudu pārslu un 480 dzīvnieku barības paraugi. DON tika atrasts 95 % paraugu, T-2 toksīns – 79 %, HT-2 toksīns – 85 %, ZEA – 96 %; OTA – 47 %. Vislielākās mikotoksīnu koncentrācijas tika atrastas kukurūzā un gatavā dzīvnieku barībā.³³

Itālijā veiktā pētījumā par mikotoksīniem kaķu barībā konstatēts ZEA 75 % no analizētajiem 64 paraugiem, augstākā noteiktā koncentrācija – 20,8 µg/kg, vairāk augstas klases barībā. Eiropā noteiktās vadlīnijas ZEA koncentrācijai kaķu barībā kaķiem, kas tiek izmantoti pavairošanai un kaķēniem – 100 µg/kg, pieaugušiem kaķiem ko neizmanto pavairošanā - 200 µg/kg.³⁴ DON konstatēts 62 % augstas klases barībās un 100 % standarta klases analizētajās barībās, augstākā noteiktā koncentrācija – 209 µg/kg, iegūtās koncentrācijas nepārsniedz Eiropas noteikto ieteicamo maksimālo DON koncentrāciju mājlopu barībā – 5000 µg/kg, suņiem 2000 µg/kg.³⁴ Noteiktās aflatoksīnu koncentrācijas bija salīdzinoši zemas, lielākajā daļā paraugu aflatoksīni tika identificēti, bet netika kvantificēti, augstākā noteiktā koncentrācija – 18,4 µg/kg. Eiropā noteiktā ieteicamā maksimālā koncentrācija – 10 µg/kg. Fumonizīni tika kvantificēti 95 % paraugu, 2 analizētajos paraugos fumonizīnu koncentrācija pārsniedza ieteiktās maksimālās normas (5000 µg/kg), noteiktās augstākās koncentrācijas - 7494 un 7933 µg/kg. OTA tika identificēts tikai 7 paraugos, no kuriem 2 tika kvantificēts – 5,1 un 14 µg/kg. Eiropas vadlīnijas par ieteicamo maksimālo OTA koncentrāciju kaķu un suņu barībā - 10 µg/kg.³⁴ T-2 un HT-2 toksīni kopā tika identificēti, bet netika kvantificēti vairākos paraugos, bet T-2 toksīns atsevišķi tika kvantificēts 5 paraugos ar augstāko noteikto koncentrāciju – 69,6 µg/kg. Vadlīnijas T-2 un HT-2 toksīnu summai kaķu barībā – 50 µg/kg.³⁵

2014. gadā tika veikts pētījums par mikotoksīnu saturu Polijas veikalos pieejamā suņu un kaķu barībā. Šī pētījuma ietvaros tika analizēti 49 sausās barības paraugi. DON un ZEA tika detektēti visos analizētajos paraugos, augstākā DON noteiktā koncentrācija – 206 µg/kg, ZEA - 123 µg/kg, T-2 toksīnam augstākā noteiktā koncentrācija – 11,5 µg/kg, HT-2 toksīnam – 12,0 µg/kg, OTA – 3,0 µg/kg.³⁶

Lai gan tiek uzskatīts ka barībai ar augstāku cenu būtu jābūt kvalitatīvākai ne vienmēr tas izpildās. Vairākos pētījumos noteiktā mikotoksīnu koncentrācija dārgākās barībās ir augstāka kā lētākās barībās.

1.4. EA noteikšanas metodes

Hromatogrāfija. EA noteikšanai var izmantot apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfiju, lielākajā daļā analīžu metožu kā kustīgās fāzes sistēmu izmanto ūdens un acetoniātrila vai ūdens un metanola maisījumus ar pievienotu amonija sāls vai trietilamīna buferšķīdumu, lai nodrošinātu sārmainu pH. Sārmainas mobilās fāzes tiek izmantotas, lai saglabātu epimēru stabilitāti un lai uzlabotu atdalīšanos. *C. purpurea* alkaloidus un to epimērus var atdalīt ar AEŠH. AEŠH parasti apvieno ar masspektrometriju, jo ar MS metodēm ir vieglāk identificēt un kvantificēt EA, ar AEŠH palīdzību var atdalīt α un β izomērus.³⁷

Ir vairākas paraugu sagatavošanas metodes, kuru pamatā tiek ņemts 5,0 g paraugs, tam tiek pievienots organisks šķīdinātājs un ūdens vai amonija buferšķīdums, tālāk paraugu krata un centrifugē, centrifugātu attīra ar QuEChERS metodi vai tam pievieno amonija sāļus, paraugu tālāk atkal krata un centrifugē, centrifugātu atdala, ietvaicē un pēc tam sauso atlikumu izšķīdina organisko šķīdinātāju maisījumā, piemēram, ūdens, acetoniātrils un metanols, filtrē un analizē.^{37,38}

Ergota alkaloidu noteikšanai var izmantot AEŠH-MS/MS elektroizsmidzināšanas jonizācijas režīmā. Kā stacionāro fāzi iesaka C18 tipa kolonnas, piemēram, Waters XBridge C18 150 x 2,1 mm, 3,5 μ m kolonnas ar XBridge priekškolonnas. Kolonnas temperatūra – 30 °C, kā mobilā fāze A: ūdens: 0,2M amonija karbonāts pH = 10: metanols (85:5:10) un mobilā fāze B: ūdens: 0,2M amonija karbonāts pH = 10: metanols (5:5:90). Plūsmas ātrums 0,15 mL/min, gradients. Izmantojot šādu analīzes metodi ir iespējams noteikt 6 EA.¹⁷ LOQ un LOD ŠH-MS/MS metodēm var svārstīties no 0,01 μ g/kg līdz 0,5 μ g/kg atkarībā no nosakāmā EA un izmantotās metodes.¹ Ir daudz dažādu EA analīžu metožu ar AEŠH-MS kas paredzētas farmācijas, kriminālistikas un lauksaimniecības nozarēm. Izmantojot AEŠH-MS/MS, EA var noteikt dažādās paraugu matricās, dažādos graudos, graudu produktos, mājlopu fermentētā un nefermentētā barībā, cilvēku un dzīvnieku pārtikas produktos, kompleksajās barībā. AEŠH-MS/MS metodēs ir jāpievērš uzmanība parauga matricai. Matrica var ietekmēt jonizācijas efektivitāti, radot jonu nomākšanu vai pastiprināšanu. Matricas efektus parasti novērš kalibrēšanai izmantojot standartus, kas pagatavoti paraugam pievienojot standartšķīdumus attiecīgajās koncentrācijās, bet paraugi tik un tā ir jāattīra un ja ir iespējams, jāizmanto iekšējais standarts.²⁴

Ergopeptīdu un ergopetīnu absorbcijas maksimumi izmantojot UV detektoru ir pie viļņa garuma 310 nm, ar fluorescences detektoru pie viļņa garuma 310, 410 nm.³⁷ Izmantojot fluorescences detektoru, EA var detektēt arī pie viļņu garumiem 330 nm un 420 nm. Kā kustīgo fāzi var izmantot acetoniātrila un amonija karbonāta buferšķīdumu gradienta režīmā. Analīzes

laiks – 34 min. LOD un LOQ mainās atkarībā no EA, piemēram, ergotamīnam LOD var sasniegt 3,23 µg/kg un LOQ – 6,53 µg/kg, bet ergokristīnam LOD – 11,78 µg/kg un LOQ – 13,06 µg/kg.³⁹ Ar ŠH-MS/MS metodēm EA LOQ var sasniegt līdz par 0,1 – 1 µg/kg, LOD robežas bieži ir tuvas LOQ robežām. Analīzes laiks ir īsāks salīdzinot ar AEŠH-FD metodēm, parasti 15 - 20 min.^{39, 40}

Ergopeptīdi nav gaistoši un uzņēmīgi pret karstumu, tādēļ gāzu hromatogrāfiju nevar izmantot tiešai ergota alkaloīdu noteikšanai, bet šo metodi var lietot lizergīnskābes amīdu un zemu molmasu klavīnu noteikšanai, izmantojot paraugu derivatizāciju, lai uzlabotu to gaistamību un stabilitāti, bloķējot polārās grupas. Trifluoracetil atvasinājumi no LSD un *iso*-LSD tiek iegūti, sausu paraugu karsējot ar trifluoracetāta anhidrīdu 70 -80 °C temperatūrā 30 minūtes. Klavīnu derivatizācija notiek pēc līdzīga principa. Šādas derivatizētas paraugu šķīdumus var uzreiz ievadīt gāzu hromatogrāfā. Gāzu hromatogrāfiju bieži izmanto kombinācijā ar MS vai MS/MS. GH-MS metodes iekļauj elektronu triecienu jonizāciju un GH-MS/MS metodes – ķīmisko jonizāciju pozitīvā vai negatīvā režīmā.³⁷

ELISA. ELISA metodes pamatā ir antigēna – antivielas reakcija, šo metodi var izmantot ātrai un salīdzinoši lētai analīzei. Lai gan ar šo metodi var kvantitatīvi noteikt EA saturu, šīs metodes LOD ir diezgan augsts salīdzinot ar citām metodēm, ELISA metode ir labāk piemērota paraugu skrīningam.²⁶

ELISA metodi biežāk pielieto, lai noteiktu kopējo EA koncentrāciju augos, ko izmanto lopbarībai. Paraugu sagatavošana ir ļoti vienkārša, augu izzāvē, homogenizē, atšķaida ar fosfāta buferšķīdumu, samaisa, ļauj paraugam nostāties un analīzei izmanto šķīduma daļu. Vairāku plaši pieejamu ELISA testu komplektu LOD ir ap 2 µg/kg. Šos testus var izmantot arī lai noteiktu kopējo EA koncentrāciju dzīvnieku urīnā. Lielākā daļa ELISA metodes nav specifiskas un ar tām var noteikt tikai kopējo EA koncentrāciju, lai noteiktu kādu specifisku EA nepieciešams pielietot ŠH-MS metodi.

Šo analīzes metodi mūsdienās plaši izmanto savienojumu detektēšanai bioloģiskos šķīdumos, lai gan var gadīties, ka rezultāts ir viltus pozitīvs vai viltus negatīvs, tādējādi, parasti pēc pozitīva rezultāta iegūšanas paraugs tiek atkārtoti pārbaudīts ar apstiprinošajām metodēm.²⁴

Kapilārā elektroforēze. Kapilārās elektroforēzes priekšrocības salīdzinot ar AEŠH ir īsāks analīzes laiks, augsta precizitāte, mazs parauga un reaģentu daudzums.

Kapilāro elektroforēzi EA noteikšanai izmanto salīdzinoši reti. Mūsdienās vairāk izmanto kapilārās zonas elektroforēzi, lai noteiktu EA un to epimērus parasti izmanto fosfātu buferšķīdumu ar pH=2,5 kurā ir β- un γ-ciklodekstrīni, urīnviela un spirti, ar kausēta silīcija kapilāru pie 25 kV. Šo metodi var izmantot, lai noteiktu lizergīnskābi, izo-lizergīnskābi un

saistītās paspalīnskābes. Šo metodi var apvienot ar TOF vai UV detektoru. LOD TOF metodei ir 0,1 mg/L un UV – 0,5 mg/L.³⁷

EFSA ir noteikusi LOQ vērtību ergota alkaloidu noteikšanas metodēm pārtikas produktos - 20 µg/kg.⁴¹

1.5. Mikotoksīnu noteikšanas metodes

Mikotoksīnu toksiskums parādās pie nelieliem to uzņemšanas daudzumiem, tādēļ ir nepieciešamas jutīgas un precīzas metodes to noteikšanai pārtikas produktos. Analīzes metodes ir jāspēj pielāgot plaša spektra paraugu veidiem – ne tikai augu un dzīvnieku izcelsmes produktiem, bet arī to pārstrādes produktiem un dažādiem vides paraugiem.

Hromatogrāfija. Plānslāņa hromatogrāfija kādreiz bija plaši izplatīta metode mikotoksīnu noteikšanai. Mūsdienās PSH metodi izmanto, lai noteiktu mikotoksīnu klātbūtni, ne to kvantitatīvo saturu. Tomēr apvienojot PSH metodi ar gaismu jutīgiem materiāliem, piemēram, izmantojot plāksnīti, kura noklāta ar fluorescējošu silikagelu var noteikt vairāku mikotoksīnu koncentrāciju līdz 0,01 ppm. Mūsdienās izmanto arī silikagelu, kas papildināts ar organisku skābi, ko izmanto mikotoksīnu noteikšanai.

AEŠH ir viena no visplašāk izmantotajām metodēm kvantitatīvai mikotoksīnu noteikšanai. Mikotoksīnus var noteikt gan ar tiešās fāzes, gan ar apgrieztās fāzes hromatogrāfiju. Paraugu ekstrakti tiek injicēti hromatogrāfiskajā sistēmā, kur analītiskajā kolonnā tie tiek atdalīti. Kā signālu detektēšanai var izmantot ultravioletās vai infrasarkanās gaismas detektoru. Vairākiem mikotoksīniem piemīt fluorescences īpašības, tādēļ nav nepieciešams matricas modifikators un var izmantot fluorescences detektoru.

AEŠH-MS metodes ir piemērotas vairāku mikotoksīnu noteikšanai vienlaicīgi. Ar šādām metodēm var noteikt tik pat kā visus mikotoksīnus, piemēram, aflatoksīnus B₁, B₂, G₁, G₂, DON, OTA, fumonizīnus B₁, B₂ un B₃, kā arī HT-2 un T-2 toksīnus.

Ja mikotoksīni ir pietiekami gaistoši vai tos var pārveidot gāzes stāvoklī, to kvantitatīvai noteikšanai var izmantot GH-MS. Šī metode netiek plaši izmantota.⁴²

Pamatā mikotoksīnu noteikšanai AEŠH analīzēs izmanto UV detektoru vai fluorescences detektoru, kura darbība balstās uz hromofora klātbūtni molekulā. Vairākiem toksīniem ir dabīgi novērojama fluorescences īpašība OTA, taču daudziem toksīniem šāda īpašība nepiemīt. Šiem savienojumiem ir plaši aprakstītas metodes fluorescentu atvasinājumu iegūšanai.^{43, 44}

Aflatoksīnu B₁, OTA un zearalenonu iespējams noteikt, izmantojot AEŠH metodi ar ultravioletās gaismas detektoru, kā kustīgo fāzi A pielietojot acetoniitrila un metanola

maisījumu, kustīgo fāzi B izmantojot di-kālija hidrogēnfosfāta buferšķīdumu un kā kustīgo fāzi C izmantojot etilacetātu. Analīzei izmanto hromatogrāfu, ar kuru iespējams kustīgās fāzes gradients ar 3 kanāliem, detektoru, ar kuru iespējams vienlaicīgi reģistrēt absorbciju pie 4 dažādiem viļņu garumiem un kolonnu C18, 150 x 4,6 mm ar daļiņu diametru 3 μm kopā ar priekškolonnu C18 10 x 4,6 mm. Izmantojot šādu sistēmu aflatoksīna B ultravioletās gaismas absorbcijas maksimums ir pie viļņa garuma 326 nm, OTA pie 215 nm un zearalenona pie 236 nm, iekšējā standarta absorbcijas maksimums pie viļņa garuma 245 nm. Plūsmas ātrums 1 mL/min un kolonnas temperatūra 25° C.⁴⁵

Lai noteiktu OTA, fumonisīna B1 un B2, zearalenona un deoksinivalenola var izmantot arī hromatogrāfu ar diožu matricas detektoru un fluorescences detektoru, Zorbax SB C18 250 x 4,6 mm, 5 μm kolonnu ar Zorbax C18 12,5 x 4,6 mm, 5 μm priekškolonnu. Kā kustīgo fāzi izmantojot buferšķīdumu, ko pagatavo 8,0 g nātrija hlorīdu, 1,2 g di-nātrija fosfātu, 0,2 g kālija dihidrogēnfosfātu un 0,2 g kālija hlorīda izšķīdinot aptuveni 990 mL ūdens, ieregulējot pH 7,4 ar sāļsskābi un pievienojot ūdeni līdz 1000 mL. Standartšķīdumus pagatavojot no standartvielām, kuru kvantitatīvais saturs ir vismaz 97 %.⁴⁶

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Analīzei tika izvēlēti kaķu barības paraugi, kuru sastāvā ir augu valsts izcelsmes produkti. Paraugi tika iegādāti Rīgā veikalos Maxima, DinoZoo, Pet City un Zoocentrs (paraugu aprakstu un numerāciju skat. 1. pielikumā). Tika iegādāta gan sveramā barība, gan 250 g – 1 kg iepakojumos. Paraugi neatvērti tika uzglabāti istabas temperatūrā līdz analīzei.

Paraugu analīzei tika izmantotas Institutā "BIOR" izstrādātās un validētās metodes mikotoksīnu un ergota alkaloidu noteikšanai graudaugu izcelsmes produktos un barībā ar šķidrums hromatogrāfiju un masspektrometriju. Metodes ietver parauga ekstrakciju ar ūdeni un acetonitrilu, izsālīšanu ar QuEChERS sāļu maisījumu, izsaldēšanu, iekonzentrēšanu, filtrēšanu un ergota alkaloidu un mikotoksīnu noteikšanu ar šķidrums hromatogrāfiju un elektroizmidzināšanas jonizācijas augstas izšķirtspējas masspektrometriju, izmantojot standartpiedevu metodi.

Lai arī EA metode validēta graudaugu produktu analīzei, tā ir derīga arī kaķu barības analīzei. To pierādīja izmantojot kontroles paraugus, ko iekļāva paraugu sērijās. Iegūtie kontroles rezultāti iekļāvās kontrolkartes drošības intervālos (skat. 2. pielikumu), kontroles grafiki veidoti izmantojot 17 punktus no metodes validācijas.

2.1. Izmantotā aparatūra un reagenti:

- Analītiskie svāri, Satorius, sēr. nr. BP110, 110 g ± 0,0101 g
- Acetonitrils, Supelco, gradient grade for liquid chromatography
- Milli-Q ūdens (Milli-Q attīrīšanas iekārta, sēr. nr. F0KB83738, 18,2 M Ω.cm),
- Skudrskābe BDH Chemicals sēr. nr. AL654459, ≥ 99 %;
- Amonija karbonāts, Sigma-Aldrich sēr. nr. MKCG6510, ≥ 30 % NH₂ basis;
- QuEChERS EN 15562 sāļu maisījums (4,0 g bezūdens magnija sulfāts, 1,0 g nātrija hlorīds, 1,0 trinātrija citrāta dihidrāts, 0,5 g dinātrija citrāta seskvihidrāts), sēr. nr. AH0-9041
- Kratītājs Multi-Rotator, Biossa, sēr. nr. 010118-1212-0163
- Centrifūga, Eppendorf, sēr. nr. 5811IQ590000
- Saldētava, Heto Ultra Freeze sēr. nr. 1225001358
- Ultraskaņas vanna, Lauda AL12 sēr. nr. LCB0725
- Centrifūga, Sigma 3K30 sēr. nr. 120078

- Orbitālās vibrācijas kratītājs, Heidolph sēr. nr. 2000611840216
- Paraugu filtri, Durapore 0,22 μm sēr. nr. R9MA78097
- Thermo Scientific Ultimate 3000 hromatogrāfs
- Thermo Scientific TSQ Quantiva MS/MS
- Phenomenex Kinetex C18 100 x 2,1mm, 2,6 μm kolonna
- Phenomenex Kinetex C18 1,7μm, 100 A, 50 x 3,0 mm kolonna
- Ergosīns, Biopure, sēr. nr. 1000002811
- Ergosinīns, Biopure, sēr. nr. 1000002801
- α-ergokriptīns, Biopure, sēr. nr. 1000004371
- Ergokripinīns, Biopure, sēr. nr. L18442G
- Ergokornīns, Biopure, sēr. nr. L18442E
- Ergokorminīns, Biopure, sēr. nr. L19041A
- Ergokristīns, Biopure, sēr. nr. L18215T
- Ergokristinīns, Biopure, sēr. nr. L18513E
- Aflatoksīns B1, Biopore, sēr. nr. S17273B
- DON, Biopore, sēr. nr. S18071D
- ZEA, Biopore, sēr. nr. S17285Z
- T-2 toksīns, Biopore, sēr. nr. S17052T
- OTA, Biopore, sēr. nr. S18471Z
- FB1, Biopore, sēr. nr. S20041F
- FB2, Biopore, sēr. nr. 1000002463
- HT-2 toksīns, Biopore, sēr. nr. L19453H

2.2. Materiāli un izejvielas, šķīdumu pagatavošana

Ekstrakcijai izmantots acetoneitrils, dejonizēts ūdens, skudrskābe, QuEChERS EN 15562 sāļu maisījums.

Ekstraktu rekonstruēšanas šķīdumu – 0,4% skudrskābes šķīdums ūdens - metanola maisījumā (v:v, 6:4) pagatavoja sajaucot 60mL dejonizēta ūdens ar 40 mL metanola un pievienojot 400 μL skudrskābes. Šķīdumu ievietoja ultraskaņas vannā uz 10 min.

Ekstraktu filtrēšanai izmantoja PVDF centrifūgas membrānas filtrus ar 0,22 μm poru izmēru.

Paraugu sagatavošanas gaitā standartpiedevas pievienošanai izmanto darba šķīdumu. EA darba šķīdumu ar koncentrāciju 0,1 µg/mL pagatavo 10 mL mērkolbā, pievienojot atbilstoša tilpuma standartšķīdumus un atšķaidot līdz atzīmei ar acetonitrilu.

Mikotoksīnu noteikšanai darba šķīdumu sagatavo atbilstoši kalibrēšanas līmeņu pakāpēm. Gala koncentrācijas darba šķīdumā – deoksinivalenols, fumonizīns B1 un B2 25,0 µg/mL, zearalenons 5 µg/mL, HT-2 toksīns, T-2 toksīns un ohratoksīns A – 2,5 µg/mL un aflatoksīns B1 0,25 µg/mL.

Kustīgās fāzes A pagatavošana EA noteikšanai. 10 mM amonija karbonāta šķīdums ūdenī pagatavoja 1L mērkolbā iesverot 0,96 g amonija karbonāta un pēc izšķīdināšanas uzpildot līdz atzīmei. pH novērtēja izmantojot pH metru un nepieciešamības gadījumā, lai iegūtu pH=8 pievienoja vai nu skudrskābi vai amonjaka šķīdumu. Šķīdumu uzglabāja istabas temperatūrā un tas ir derīgs 3 mēnešus.⁴⁷

Kustīgās fāzes A pagatavošana mikotoksīnu noteikšanai. 1L mērkolbā pievienoja 800 mL dejonizēta ūdens, 0,02g amonija acetāta un 0,5 mL sudrskābes. Maisījumu sajauc un uzpildīja līdz atzīmei ar dejonizētu ūdeni. Vienmērīgi sajauc un degazē 10 min ultraskaņas vannā. Kustīgās fāzes B pagatavošanai atkārtoja šo pašu procedūru, bet ūdens vietā izvēlējās metanolu.

Kalibrēšanai ar standartpiedevu metodi izmantoja darba standartšķīdumus, kas pagatavoti no tīrām vielām (ar vismaz 95% tīrību): ergozīns, ergokornīns, ergokristīns, ergozinīns, ergokorninīns, ergokristinīns, α-ergokriptīns, ergokriptinīns, deoksinivalenols, zearalenons, HT-2 toksīns, T-2 toksīns, fumonizīns B1 un B2, aflatoksīns B1 un ohratoksīns A. Standartšķīdumi pagatavoti viena parauga 6 paralēli pagatavotiem iesvariem pievienojot standartvielas, lai iegūtu gala koncentrācijas paraugā kā norādīts 2.1. tabulā. Tikai EA noteikšanai tika izmantota sešu punktu kalibrēšana, pārējo mikotoksīnu noteikšanai izmantoja 5 punktu kalibrēšanu. Fumonizīna gadījumā tika sagatavoti tikai trīs no kalibrēšanas punktiem, standartvielas taupīšanas nolūkā.

Kalibrēšanas šķīdumu koncentrācijas

Analīts	Kalibrēšanas līmenis, gala koncentrācija paraugā µg/kg					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Deoksinivalenols	50	100	250	500	1000	-
Zearalenons	10	20	50	100	200	-
HT-2 toksīns	5	10	25	50	100	-
T-2 toksīns	5	10	25	50	100	-
Fumonizīns B1	50	100	250	500	1000	-
Fumonizīns B2	50	100	250	-	-	-
Aflatoksīns B1	0,5	1	2,5	5	10	-
Ohratoksīns A	5	10	25	50	100	-
Ergota alkaloidi	0,050	0,10	0,50	1,0	2,5	5,0

2.3. Paraugu sagatavošana

Visus paraugus homogenizēja un iesvēra 50 mL polipropilēna stobriņā $5,00 \pm 0,05$ g, katrā paraugu sērijā ietverot viena parauga atkārtotus 6 iesvarus kalibrēšanas taisnes konstruēšanai un 4 dažādus paralēlos kontrolparaugus. Kalibrēšanas taisnes konstruēšanai pievienoja darba šķīdumu dažādos līmeņos (skat. 2.1. tabulu). Ja paraugā sagaidāmas augstas koncentrācijas, tad attiecīgi tām pielāgoja kalibrēšanas līmeņus. Kontrolparaugiem pievienoja 50µL EA darba šķīduma, lai gala koncentrācija kontrolparaugā būtu 1,0 µg/kg, bet pārējo mikotoksīnu noteikšanai pievienoja 1.līmeņa kalibrēšanas piedevu - 10 µL.

Visiem iesvāriem pievienoja 10 mL dejonizēta ūdens, kas paskābināts ar skudrskābi (0,2%) un 10 mL acetonitrila. Paraugus ievietoja mehāniskajā kratītājā uz 10 min un pēc tam ultraskaņas vannā uz 10 min. Ekstraktiem pievienoja QuEChERS EN 15562 sāļu maisījumu un ievietoja mehāniskajā kratītājā uz 10 min. Pēc tam ekstraktus centrifugēja pie 4500 apgr./min. 8 mL ekstrakta augšējo šķidro slāni pārnesa tīros 15 mL polipropilēna stobriņos un ievietoja saldētavā (-80 °C) uz 30 min. Saldētos ekstraktus ievietoja centrifūgā 15 °C, un centrifugēja 15 min pie 4000 apgr./min. 4 mL augšējā šķidrā slāņa pārnesa 15 mL stikla stobriņos un iztvaicēja zem slāpekļa plūsmas pie 40 °C līdz sausam atlikumam.

Iztvaicētos sausos atlikumus izšķīdināja 300 µL 0,4% skudrskābes dejonizēta ūdens un metanola (6:4, v:v) šķīdumā. Stobriņus ievietoja rotācijas maisītājā(1255 apgriezieni/min) uz

10 min un pēc tam filtrēja ar PVDF centrifūgas membrānas filtriem (0,22 μm). Filtrātus iepildīja stikla pudelītēs hromatogrāfijai.

2.4. AEŠH-MS/MS metodes apstākļi

Instrumentālo analīzi veica ar šķidrums hromatogrāfu Thermo Scientific Ultimate 3000, kas ir savienots ar Thermo Scientific TSQ Quantiva MS/MS. Lai panāktu labu hromatogrāfisko atdalīšanos, kas EA ir svarīgi to epimēru vienādo molmasu dēļ, ir jāizmanto bāziskas fāzes sistēma (pH~8). Šī sistēma nav piemērojama pārējo mikotoksīnu analīzei, tāpēc izmantota cita instrumentālā analīze.

ŠH un MS detektora parametri optimizēti metožu izstrādes laikā, apkopoti 2.2 un 2.3 tabulās. Analizējamo savienojumu skenēšanas parametri ir iegūti veicot individuālu mikotoksīnu standartšķīdumu skenēšanu un sadursmes enerģijas optimizēšanu, iegūtie dati apkopoti 3. pielikumā.

2.2. tabula

Šķidrums hromatogrāfijas metodes parametri EA un mikotoksīnu noteikšanai

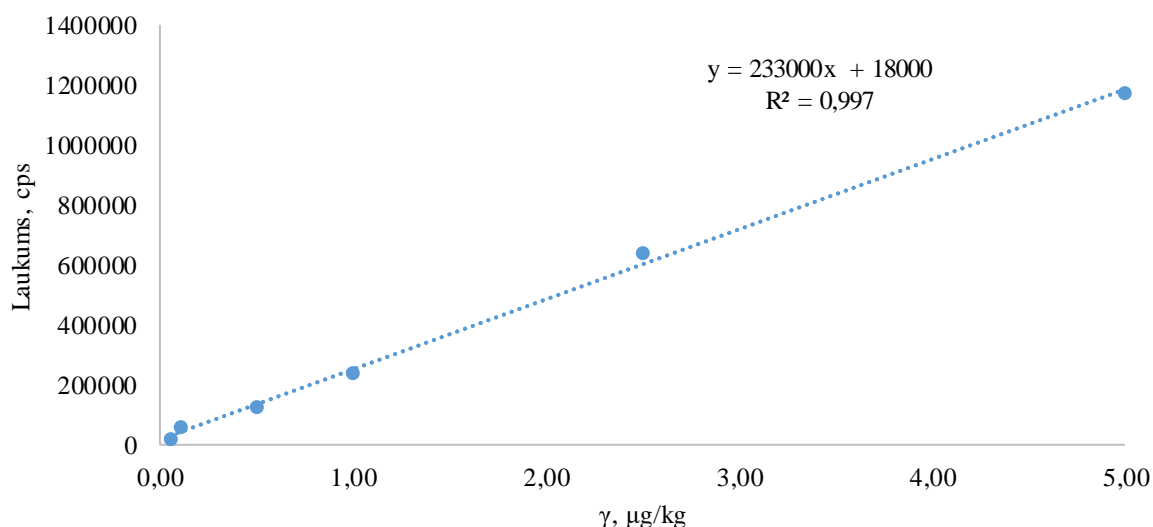
	EA noteikšanai	Pārējo mikotoksīnu noteikšanai			
Kolonnas temperatūra	50 °C	50 °C			
Paraugu temperatūra	15 °C	15 °C			
Kustīgā fāze A	10 mM (NH ₄) ₂ CO ₃ šķīdums ūdenī	0,5mM amonija acetāta un 0,1%skudrskābes šķīdums ūdenī			
Kustīgā fāze B	Acetonitrils	0,5mM amonija acetāta un 0,1%skudrskābes šķīdums metanolā			
Kolonna	Kinetex C18 1,7μm, 100 A, 100 x 3,0 mm, Phenomenex	Kinetex C18 1,7μm, 100 A, 50 x 3,0 mm, Phenomenex			
Plūsmas ātrums	0,50 mL/min	0,35 mL/min			
Injekcijas tilpums	10 μL	15 μL			
Gradianta programma					
<i>Laiks, min</i>	<i>Fāze A, %</i>	<i>Fāze B, %</i>	<i>Laiks, min</i>	<i>Fāze A, %</i>	<i>Fāze B, %</i>
-4,0	95	5	0,0	85	15
0,00	95	5	2,0	85	15
12,0	1	99	6,0	2	98
15,0	1	99	7,0	2	98
			8,0	90	10
			11,0	90	10
			12,0	85	15
			14,0	85	15

Masspektrometra detektora parametri

Jonizācijas veids	Elektroizsmidzināšanas interfeiss pozitīvajā un negatīvajā jonizācijas režīmā
Skenēšanas tips	SRM
<i>Sheath Gas</i> (N ₂)	55 arb
<i>Aux Gas</i> (N ₂)	25 arb
<i>Sweep Gas</i> (N ₂)	5 arb
Kapilāra spriegums	3500 V (H-ESI(+)); 2500 V (H-ESI(-))
Sadursmju gāzes (N ₂) spiediens	1,5 mTorr
Jonizācijas temperatūra	300°C
Ietvaicēšanas temperatūra	350°C

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

EA saturs kaķu barībā kvantificēšanai izmantoja standartpiedevu metodi. Kalibrēšanas taisnes tika iegūtas pievienojot standartpiedevu 6 koncentrāciju līmeņos paraugam Nr.1 un Nr.11. Datu apstrādes laikā izvēlējās kalibrēšanas taisni ar kuru ieguva labāku atgūstamību kontrolparaugiem (skat. 3.1. att.). No visiem līmeņu signālu iegūtajiem laukumiem atņēma kalibrēšanas parauga bez standartpiedevas signāla laukumu jeb matricas piesārņojuma signālu.

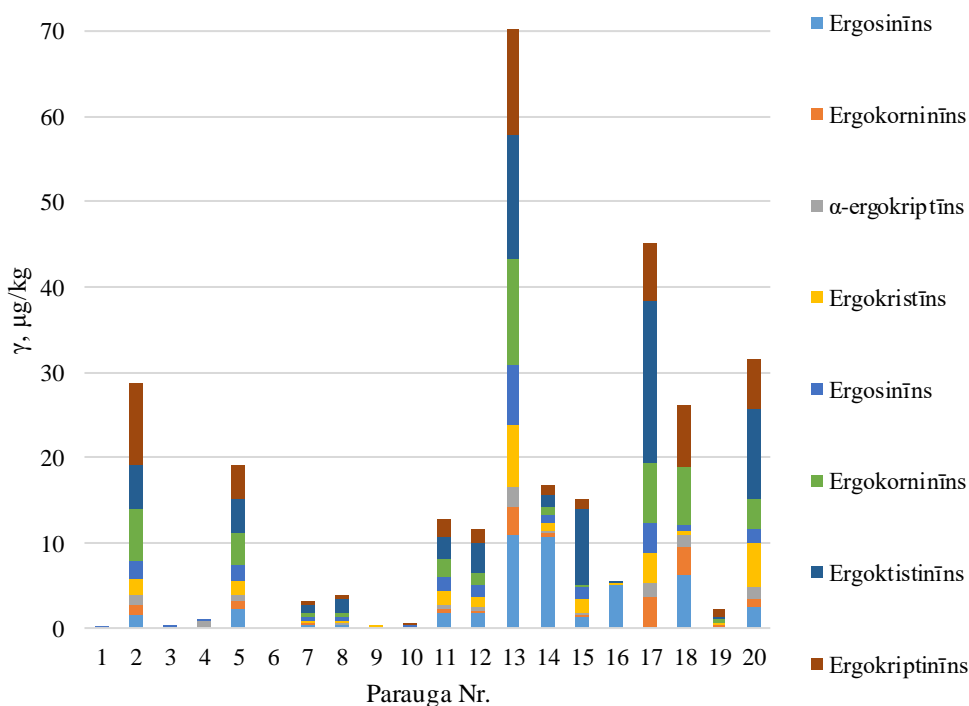


3.1.att. Kalibrēšanas līkne ergosīnam

Izmantojot koriģēto kalibrēšanas taisnes vienādojumu un iegūtos signālu laukumus ieguva EA koncentrācijas. Koriģētā kalibrēšanas taisne iegūta kalibrēšanas šķīdumiem atņemot matricas radītos signālus. Iegūtas kalibrēšanas taisnes atbilstību citiem paraugiem pamato iegūtās atgūstamības no kontrolparaugiem. Kalibrēšanas taisnes katram noteiktajam EA skat. 4. pielikumā. Paraugus, kuru EA koncentrācija tika konstatēta ārpus kalibrēšanas līknes, atšķaidīja un analīzi atkārtoja.

Paraugi tika iegādāti 4 dažādos veikalos, no kuriem 3 bija zooveikali. Kaķu barības paraugi tika iegādāti cenu diapazonā, sākot no 0,89 Eur/kg līdz 14,98 Eur/kg. Lai būtu lielāka paraugu daudzveidība tika iegādāta barība jau gatavos iepakojumos, kā arī sveramā barība no lielākiem iepakojumiem, kas stāvējuši atvērti. 19 no 20 analizētajiem paraugiem ražoti ES (Lietuvā, Polijā, Ungārijā, Čehijā, Francijā, Vācijā un Nīderlandē). Vairākiem paraugiem kā izcelsmes valsts tika norādīta tikai ES. Viens analizētais paraugs bija ražots Apvienotajā Karalistē. Daļai barību sastāvā norādīts tikai kopējo graudaugu sastāvs, citām barībām sastāvā norādīts konkrēts augu izcelsmes produkta veids. Analizētās kaķu barības sastāvā neskaitot

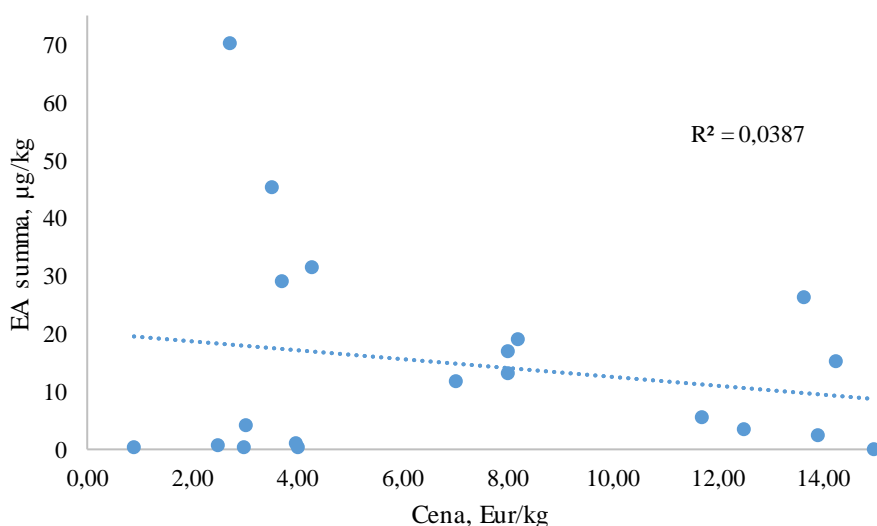
dzīvnieku izcelsmes produktus salīdzinoši lielu procentuālo sastāvu sastādīja kukurūza, zirņi, kvieši, rīsi, lēcas un mieži.



3.2.att. EA koncentrācija kaķu barības paraugos

3.2. attēlā attēlota EA koncentrācija 20 kaķu barības paraugos, kā redzams tikai vienā paraugā netika konstatēti EA. Kopējās noteiktās EA koncentrācijas ir diapazonā no $0,075 \pm 0,03 \mu\text{g/kg}$ līdz $70 \pm 26 \mu\text{g/kg}$ (skat. 3.1.tab.). Apskatot šo attēlu var secināt, ka visdārgākajā analizētajā paraugā Nr. 14 EA netika atrasti, bet vislētākajā kaķu barības paraugā – Nr. 1 EA kopējā koncentrācija ir mazākā noteiktā. Tātad var secināt, ka EA koncentrācija barības paraugos nav atkarīga no cenas (skat. 3.3. att.). Katra noteiktā EA koncentrāciju skatīt 5. pielikumā. Ergokristinīns, ergokorninīns un ergokriptinīns kaķu barības paraugos tika konstatēti lielākās koncentrācijās nekā citi noteiktie EA.

Barības paraugā, kas ražots Holandē EA, koncentrācija ir visaugstākā – $70 \pm 26 \mu\text{g/kg}$, EA netika konstatēti paraugā, kas ražots Čehijā, taču jāņem vērā fakts, ka šajā barībā dzīvnieku izcelsmes produkti sastāda vairāk kā 50 % no barības sastāva. Otrs zemākais noteiktais EA saturs ir barībā, kas ražota Lietuvā – $0,07 \pm 0,03 \mu\text{g/kg}$. Paraugos Nr. 8., 9., 17., 18., kas ražoti Vācijā, EA kopējā koncentrācija ir no $0,37 \pm 0,14 \mu\text{g/kg}$ līdz $26 \pm 10 \mu\text{g/kg}$, tātad īsti nav arī korelācijas starp EA saturu un produkta izcelsmes valsti.



3.3.att. EA kopējā koncentrācija kaķu barībā atkarībā no tās cenas

3.3. attēlā redzams, ka nav korelācijas starp kaķu barības cenu un EA kopējo koncentrāciju. Barībā, kuras cena par kg bija visaugstākā, EA netika atrasti, taču vislētākajā barībā EA kopējā koncentrācija ir otra zemākā uzreiz aiz dārgākās barības. Visaugstākā EA summas koncentrācija ir paraugā, kura cena bija 2,70 Eur/kg, jeb trešā lētākā barība.

3.1. tabula

Noteiktās EA koncentrācijas paraugos

Savienojums	LOQ, µg/kg	Paplašinātā nenoteiktība, %	Analizēto paraugu skaits	Mediāna	Diapazons: Min-max vērtība	Vidējā vērtība
Ergosīns	0,05	30	20	0,87	<LOQ -11	2,3
Ergokornīns		29		0,16	<LOQ -3,6	0,7
α-ergokriptīns		32		0,27	<LOQ -2,2	0,6
Ergokristīns		38		0,45	<LOQ -7,2	1,3
Ergosinīns		35		0,45	<LOQ -7,2	1,2
Ergokorninīns		29		0,49	<LOQ -12	2,3
Ergokristinīns		33		1,16	<LOQ -19	3,6
Ergokriptinīns		26		1,03	<LOQ -12	2,7

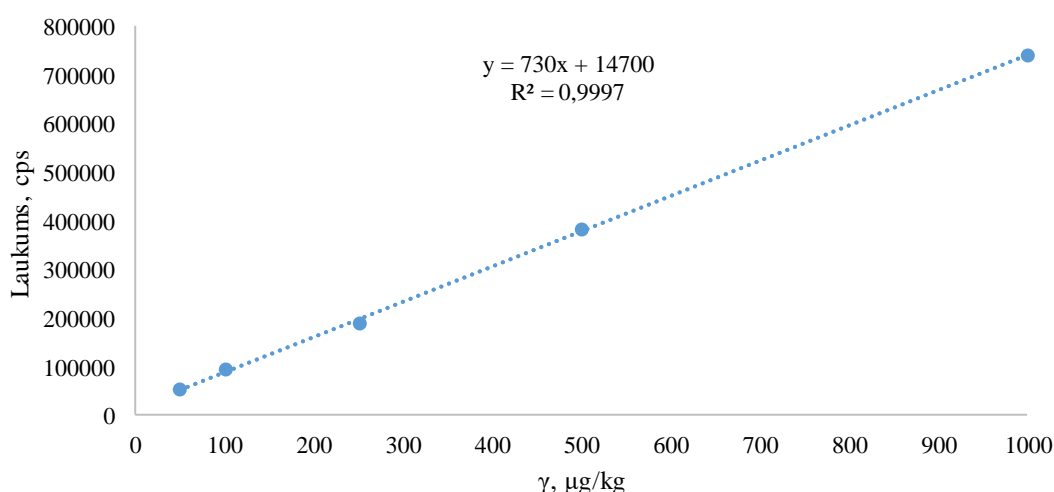
Pēc 3.1. tabulā apkopotajiem datiem var secināt, ka EA ir sastopami gandrīz katrā kaķu barībā. Nav novērota korelācija starp EA kopējo saturu un produktu sastāvu, paraugā ar visaugstāko EA kopējo koncentrāciju sastāvā ir norādīts, ka tas satur graudus, nav precizēts kādus un cik daudz, otrā visaugstākā EA koncentrācija ir paraugā, kas satur 17 % kviešus, 3 visaugstākā koncentrācija ir paraugā, kura sastāvā ir 14 % rīsi un ceturtā visaugstākā noteiktā koncentrācija ir paraugā, kas satur 14 % zirņu cietes un 19 % kartupeļu cietes, 8% kaltētu zirņu.

Barība kuras sastāvā kā augu valsts izcelsmes produkti norādīti tikai zirņi, dārzeņi, augļi un ogas EA netika konstatēti (paraugs nr. 6). Apkopojot visus iegūtos datus var secināt, ka būtu jāveic padziļināti pētījumi, lai varētu spriest par kādas konkrētas kaķu barības kvalitāti. Veicot tālākus pētījumus būtu arī jāpievērš uzmanība laikam, kad produkts ir ražots un jāievāc informācija par izejvielu ievākšanu, jo EA koncentrācija kultūraugos var mainīties atkarībā no laikapstākļiem - iepriekš minēts, ka EA koncentrācija palielinās pēc vēsām, mitrām ziemām un siltiem pavasariem.

Vidēji parastam kaķim, kas ir vecāks par gadu un netiek izmantots pavairošanai uz katru 1 kg ķermeņa masas būtu jāuzņem 60 -70 kcal.⁴⁸ Atkarībā no barības var izrēķināt ieteicamo dienas devu kaķiem, piemēram, ja uz iepakojuma enerģētiskā vērtība norādīta 3500 kcal/kg un pieņemot, ka vidējs mājas kaķis sver 4 kg, kaķim dienas laikā būtu jāapēd 69-80 g ar sauso barību. Ja noteikto ergota alkaloīdu TDI žurkām, kas ir 0,6 µg/kg ķermeņa svara⁴⁹ var pieņemt par atbilstošu arī kaķiem, 4 kg smags kaķis dienā var uzņemt ne vairāk kā 2,4 µg EA. To pārreķinot uz vienā dienā apēsto porciju 69-80 g, maksimāli pieļaujamā EA koncentrācija kaķu barībā būtu 30-35 µg/kg.

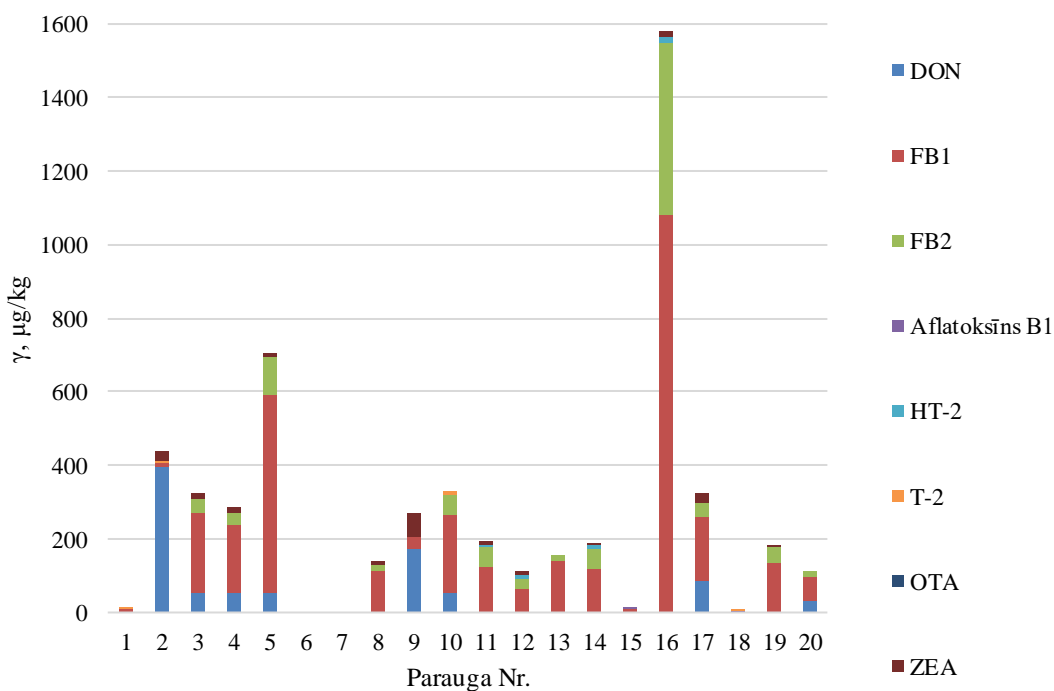
Lai gan tikai divi no analizētajiem paraugiem pārsniedz šo teorētiski aprēķināto koncentrāciju, EA monitorings kaķu barībai būtu ieteicams.

Pārējo mikotoksīnu noteikšanai kalibrēšanas līmeņi pielāgoti mikotoksīnu potenciālā satura apmēriem un maksimāli pieļaujamo līmeņu apmēriem, piemēram, pieļaujamie fumonizīna līmeņi barībā ir vairākas reizes augstāki nekā aflatoksīna, tādēļ arī kalibrēšanas diapazons ir atšķirīgs.



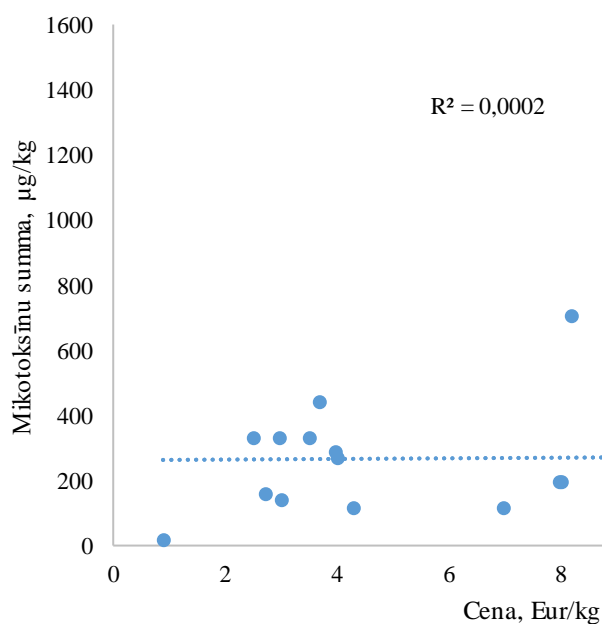
3.4.att. Kalibrēšanas līkne DON

3.4. att. redzama iegūtā kalibrēšanas līkne DON. Pārējo noteikto mikotoksīnu kalibrēšanas līknes skat. 6 pielikumā.



3.5.att. Mikotoksīnu koncentrācija kaķu barības paraugos

3.5. attēlā attēlota mikotoksīnu koncentrācija 20 kaķu barības paraugos, 2 no analizētajiem paraugiem mikotoksīni netika konstatēti – paraugā nr.6 un paraugā nr.7, to sastāvā atšķirībā no citiem paraugiem nav graudaugu vai kukurūzas. Kopējās noteiktās mikotoksīnu koncentrācijas ir diapazonā no $7,0 \pm 2,5 \mu\text{g/kg}$ līdz $1582 \pm 570 \mu\text{g/kg}$ (skat. 3.2.tab.). 40% no analizētajiem paraugiem, jeb 8 barībās tika kvantificēts DON, robežās no $31 \pm 7 \mu\text{g/kg}$ līdz $394 \pm 95 \mu\text{g/kg}$. FB1 tika noteikts 85 % paraugu, mazākā noteiktā koncentrācija – $10 \pm 3 \mu\text{g/kg}$, augstākā koncentrācija – $1080 \pm 292 \mu\text{g/kg}$, FB2 tika konstatēts 65% paraugu, robežās no 15 ± 3 līdz $469 \pm 89 \mu\text{g/kg}$. Aflatoxīns B1 noteikts 30% analizētās barības robežās no $0,5 \pm 0,2$ līdz $1,9 \pm 0,6 \mu\text{g/kg}$. 20% paraugos tika noteikts HT-2 toksīns ar augstāko noteikto koncentrāciju $15 \pm 5,4 \mu\text{g/kg}$, T-2 toksīns tika kvantificēts 40 % paraugu ar augstāko noteikto koncentrāciju $6,7 \pm 1,6 \mu\text{g/kg}$. OTA tika konstatēts 4 paraugos noteikto koncentrāciju diapazons – $0,6 \pm 0,2 \mu\text{g/kg}$ līdz $1,0 \pm 0,3 \mu\text{g/kg}$. ZEA tika noteikts 60 % paraugu, zemākā noteiktā koncentrācija – $5,8 \pm 1,8 \mu\text{g/kg}$, augstākā – $62 \pm 19 \mu\text{g/kg}$. MK noteikumos vienīgā robežvērtība kaķu barībai ir noteikta T-2 un HT-2 toksīniem kas ir $0,5 \text{ mg/kg}$, tātad visa kaķu barība atbilst valstī noteiktajām prasībām.³⁰ Bet ņemot vērā, ka 90 % no analizētajiem paraugiem mikotoksīni tika noteikti, būtu jāizvērtē vai dzīvnieku barībai nevajadzētu pielāgot stingrākas prasības paplašinot kontrolējamo toksīnu skaitu.



3.6.att. Mikotoksīnu kopējā koncentrācija kažu barībā atkarībā no tās cenas

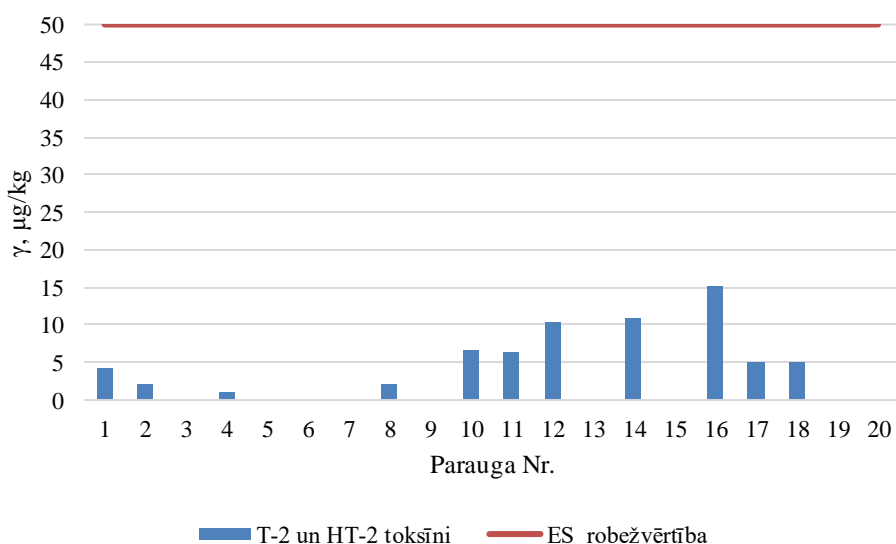
3.6 att. redzams ka līdzīgi kā EA iegūtajiem rezultātiem arī mikotoksīnu koncentrācijai kažu sausajā barībā nav korelācijas ar cenu. Lai gan dārgākajā paraugā mikotoksīni netika konstatēti, paraugā, kas cenu kategorijā ierindojas kā otrs dārgākais, mikotoksīni un EA tika atrasti.

3.2. tabula

Noteiktās mikotoksīnu koncentrācijas paraugos

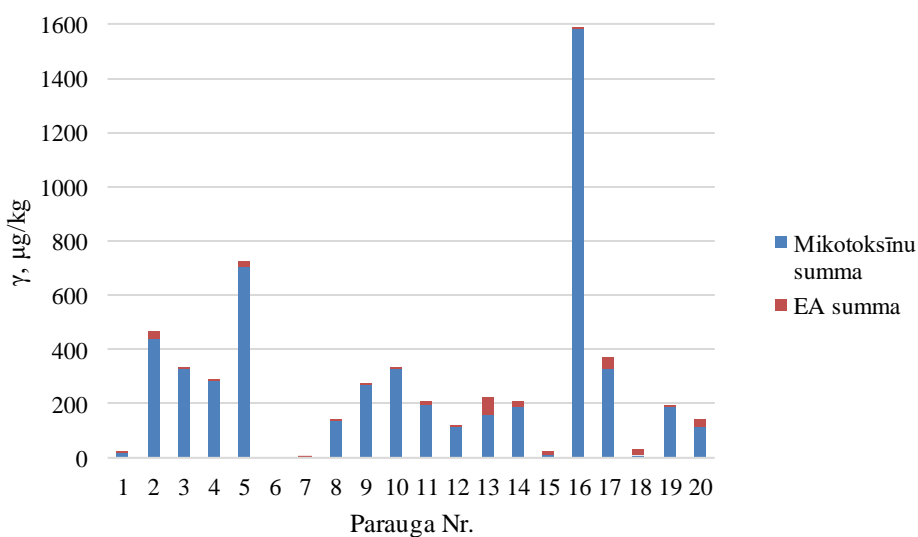
Savienojums	LOQ, µg/kg	Paplašinātā ne noteiktība, %	Analizēto paraugu skaits	Mediāna *	Diapazons: Min-max vērtība	Vidējā vērtība
DON	25	24	20	54,01	<LOQ-394	46
FB1	10	27		121,36	<LOQ -1080	161
FB2	10	19		38,10	<LOQ -469	48
Aflatoksīns B1	0,5	34		0,75	<LOQ -1,9	0,3
HT-2	5	36		9,84	<LOQ -15	2
T-2	1	24		3,31	<LOQ -7	1
OTA	0,5	26		0,70	<LOQ -1,0	0,15
ZEA	5	31		12,17	<LOQ -62,41	11

* Mediāna aprēķināta ņemot vērā tikai kvantificētos rezultātus



3.7.att. **T-2 un HT-2 toksīnu koncentrācija kaķu barībā**

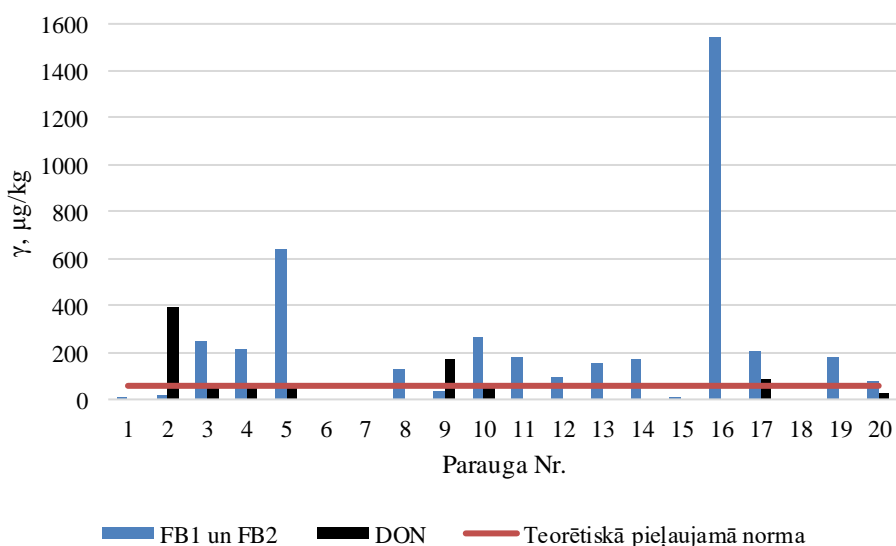
3.7. att. attēlota noteiktā T-2 un HT-2 toksīnu koncentrācija salīdzinot ar MK noteikumiem. Apskatot šo attēlu var secināt, ka visa analizētā kaķu barība atbilst Latvijā noteiktajām normām.



3.8.att. **Mikotoksīnu kopējā koncentrācija**

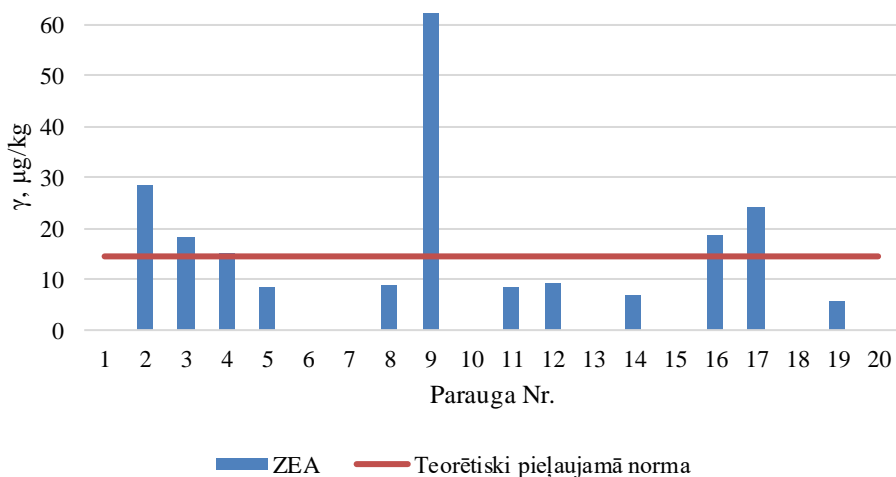
3.8. att. attēlota noteikto EA un citu mikotoksīnu summa. 13. paraugā EA koncentrācija bija visaugstākā – 70 ± 26 µg/kg citu mikotoksīnu summa ir salīdzinoši maza – 157 ± 57 µg/kg. Paraugā nr. 16 EA koncentrācija ir $5,4 \pm 2,0$ µg/kg citu mikotoksīnu summa ir 1582 ± 570 µg/kg. Var secināt, ja barībā ir augstāka EA koncentrācija nenozīmē, ka citu mikotoksīnu koncentrācija arī būs augsta. Ņemot vērā, ka EA koncentrācijai barībā nevajadzētu palielināties uzglabāšanas laikā, tad pēc šī parametra var vairāk spriest par izmatoto izejvielu kvalitāti.

Ne vienam mikotoksīnam nav noteiktas TDI normas kaļiem, bet pieņemot, ka EFSA noteiktās vērtības ir attiecināmas arī uz kaļiem, var aprēķināt maksimālo pieļaujamo mikotoksīnu koncentrāciju kaļu barībā.^{10,12,14,17,18} Izmantojot iepriekš aprakstītos apstākļus par barības enerģētisko vērtību – 3500 kcal/kg, pieņemto vidējo kaļa svaru – 4kg un kaļa vidējo ieteicamo diennakts barības patēriņu atbilstoši 4 kg svaram – 69-80 g var secināt, ka DON sausajā kaļu barībā var būt 50,0–57,9 µg/kg (TDI pelēm – 1 µg/kg ķermeņa svara), OTA – 0,9 – 1,0 µg/kg (TWI – 0,12 µg/kg ķermeņa svara, no kā izriet TDI – 0,017 µg/kg ķermeņa svara), ZEA noteiktais TDI cūkām ir 0,25 µg/kg, tātad kaļu barība tā koncentrācijai nevajadzētu pārsniegt 12,5 – 14,5 µg/kg. T-2 un HT-2 toksīnu summai TDI cilvēkiem ir noteikts 0,1 µg/kg ķermeņa svara, attiecīgi pieņemot šo vērtību par atbilstošu arī kaļiem, šo toksīnu summa barībā nedrīkstētu pārsniegt 5,0 – 5,8 µg/kg. FB1 un FB2 TDI pelēm noteikts 1,0 µg/kg ķermeņa svara, FB1 un FB2 nevajadzētu pārsniegt 50,0 - 57,9 µg/kg.



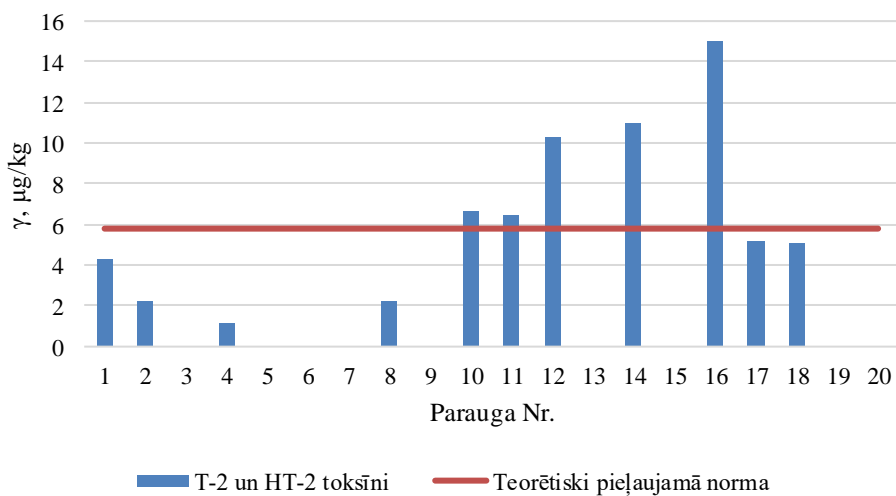
3.9.att. FB1, FB2 un DON koncentrācija kaļu barībā attiecībā pret teorētiski aprēķināto pieļaujamo normu

3.9. att. attēlotas noteiktās FB1, FB2 un DON koncentrācijas attiecībā pret teorētiski aprēķināto pieļaujamo maksimālo mikotoksīnu koncentrāciju barībā. 13 barībās FB1 un FB2 summa pārsniedz šo normu, 3 barībās DON koncentrācija pārsniedz teorētiski noteikto normu.



3.10.att. ZEA koncentrācija kaķu barībā attiecībā pret teorētiski aprēķināto pieļaujamo normu

3.10. att. attēlotas noteiktā ZEA koncentrācija attiecībā pret teorētiski aprēķināto pieļaujamo maksimālo koncentrāciju barībā. Var secināt ka 6 barībās jeb 30% no analizētajiem paraugiem ZEA koncentrācijas ir pārāk augstas un var radīt risku dzīvnieka veselībai.



3.11.att. T-2 un HT-2 toksīnu koncentrācija kaķu barībā attiecībā pret teorētiski aprēķināto pieļaujamo normu

3.11. att. attēlotas noteiktā T-2 un HT-2 toksīnu koncentrācija attiecībā pret teorētiski aprēķināto pieļaujamo maksimālo koncentrāciju barībā. 25% no analizētajiem paraugiem T-2 un HT-2 toksīnu koncentrācija ir augstāka par aprēķināto normu.

Jāņem vērā, ka aprēķinos izmantotais TDI ir noteikts pelēm, cūkām vai cilvēkiem nevis kaķiem, kā rezultātā iegūtā teorētiski pieļaujamā koncentrācija ir aptuvena. Jāņem vērā arī tas, ka katra kaķa ēšanas paradumi un vielmaiņa ir atšķirīga, tādēļ aprēķini raksturo tikai vidēji

teorētisko gadījumu. Teorētiskais aprēķins neietver starpsugu un starpindivīdu koeficientus, kas parasti tiek izmantoti dažādu robežvērtību pieņemšanai, tāpēc iegūtās vērtības ir vairākas kārtas zemākas nekā tās, kas ir pieņemtas normatīvajos dokumentos kā maksimāli pieļaujamās vērtības. Aprēķina mērķis ir izprast risku, kas varētu rasties kaķim pārtiekot ar mikotoksīniem piesārņotas barības. No iegūtajiem datiem var spriest, ka mikotoksīnu saturs mājdzīvnieku barībā ir vērā ņemamos līmeņos un var kaitēt dzīvnieku veselībai, tāpēc būtu vēlams noteikt maksimāli pieļaujamās mikotoksīnu koncentrācijas dzīvnieku barībā arī mājdzīvniekiem pirms tam veicot precīzus aprēķinus un laboratoriskos pētījumus. Šo pētījumu varētu turpināt papildinot ar cita veida savienojumu analīzi, piemēram, smago metālu, pesticīdu u.c. piesārņotāju analīzi, kā arī paplašinot analizējamo paraugu skaitu, tad būtu iespējams meklēt korelācijas un izteikt pieņēmumus par novērotajām likumsakarībām barības kvalitātei.

SECINĀJUMI

1. Izmantotā analīzes metode ir piemērota kvantitatīvai EA satura noteikšanai kaķu barībā, jo iegūtie kvalitātes kontroles rezultāti iekļaujas metodes validācijas laikā izstrādāto kontrolgrafiku noteiktajos drošības apgabalos.
2. Mikotoksīni tika atrasti 19 no 20 paraugos un mikotoksīnu saturs paraugos bija diapazonā no $7,0 \pm 2,5 \mu\text{g/kg}$ līdz $1582 \pm 570 \mu\text{g/kg}$, EA koncentrācijas - $0,075 \pm 0,03 \mu\text{g/kg}$ līdz $70 \pm 26 \mu\text{g/kg}$, visas analizētās barības atbilst MK noteikumiem, tomēr jāpievērš uzmanība tam, ka MK noteikumos tikai T-2 un HT-2 toksīniem ir precizēti maksimāli pieļaujamie līmeņi kaķu barībā.
3. Kaķu barībai būtu ieteicams regulārs mikotoksīnu monitorings, lai pārliecinātos par barības kvalitāti un tās nekaitīgumu, jo mikotoksīnu saturs konstatēts 95% barību un daļa no iegūtajām koncentrācijām pārsniedz teorētiski aprēķināto maksimāli pieļaujamo vērtību barībā.
4. Mikotoksīnu saturs pētījumā iekļautajos kaķu barības paraugos nav atkarīgs no barības cenas, kā arī nav iespējams novērot korelāciju starp mikotoksīnu saturu un ražotāju un graudaugu procentuālo saturu, tāpēc iepriekš nav iespējams paredzēt, kura no barībām būs mazāk kontaminēta ar mikotoksīniem.

IZMANTOTĀ LITERĀTŪRA

- (1) Zain, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. **2011**. 129-144. DOI: 10.1016/j.jscs.2010.06.006
- (2) Number of pet animals in Europe in 2020, by animal type. Statista <https://www.statista.com/statistics/453880/pet-population-europe-by-animal/> (skatīts 27.07.2021.)
- (3) Zicker, S. C. Evaluating pet foods: how confident are you when you recommend a commercial pet food? *Top Companion Anim Med*. **2008**. DOI: 10.1053/j.tcam.2008.04.003
- (4) How pet food is made. Global Alliance of Pet Food Associations https://www.gapfa.org/files/download/9_GAPFA_Factsheet_How_pet_food_is_made.pdf (skatīts 27.04.2021.)
- (5) Rokette, S. Molds in feed: Know hoe to prevent them. All About Feed. <https://www.allaboutfeed.net/animal-feed/raw-materials/moulds-in-feed-know-how-to-prevent-them/> (skatīts 15.06.2021.)
- (6) Bennett, J. W.; Klitch, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. **2003**. 16. 497-516. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003
- (7) World Health Organization, *Food Safety Digest: Aflatoxins*, Department of Food Safety and Zoonoses, 2018. https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_EN.pdf (skatīts 11.07.2021.)
- (8) Attia, S. M.; Harisa, G. I. *Risks of Environmental Genotoxicants* – IntechOpen **2016**. DOI: 10.5772/61472
- (9) Sobrova, P.; Adam, V.; Vasatkova, A.; Beklova, M.; Zeman, L.; Kizek, R. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisc Toxicol*. **2010**, 94-99. DOI: 10.2478/v10102-010-0019-x
- (10) Knutsen, H. K.; Alexander, J.; Barregård, L.; Bignami, M.; Bruschweiler, B.; Ceccatelli, S.; Cottrill, B.; Dinovi, M.; Grasl-Kraupp, B.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L.; Nebbia, C. S.; Oswald, I. P.; Petersen, A.; Rose, M.; Roudot, A. C.; Schwerdtle, T.; Vleminckx, C.; Vollmer, G.; Wallace, H.; Saeger, S.; Eriksen, G. S.; Farmer, P.; Fremy, J. M.; Gong, Y. Y.; Meyer, K.; Naegeli, H.; Parent-Massin, D.; Rietjens, I.; Egmond, H.; Altieri, A.; Eskola, M.; Gergelova, P.; Bordajandi, L. R.; Benkova, B.; Dorr, B.; Gkrillas, A.; Gustavsson, N.; Manen,

- M.; Edler, L. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal*. **2017**. *15*. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4718
- (11) World Health Organization, *Food Safety Digest: Fumonisin*, Department of Food Safety and Zoonoses, 2018. https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Fumonisin_EN.pdf (skatīts 11.07.2021.)
- (12) Knutsen, K. H.; Barregård, L.; Bignami, M.; Brüschweiler, B.; Ceccatelli, S.; Cottrill, B.; Dinovi, M.; Edler, L.; Grasl-Kraupp, B.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L.; Nebbia, C. S.; Oswald, I.; Petersen, A.; Rose, M.; Roudot, A.; Schwerdtle, T.; Vleminckx, C.; Vollmer, G.; Wallace, H.; Dall'Asta, C.; Gutleb, H.; Galli, C.; Metzler, M.; Oswald, I. P.; Parent-Massin, D.; Binaglia, M.; Steinkellner, H.; Alexander, J. Appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms. *EFSA Journal*. **2018**, *16*. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5172
- (13) Bui-Klimke, T. R.; Wu, F. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2014**. 1860-1869. DOI: 10.1080/10408398.2012.724480
- (14) Commission regulation (EC) No 1881/2006. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20140701> (skatīts 27.07.2021.)
- (15) Tremorgens - Global Indoor Health Network. <https://www.globalindoorhealthnetwork.com/tremorgens> (skatīts 03.08.2019.)
- (16) Gupta, R. C. *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles* – Academic Press, 2018.
- (17) EFSA Journal. *Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms*. **2016**. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4425> (skatīts 23.07.2021.)
- (18) Arcella, D.; Gergelova, P.; Innocenti, m. L.; Steinkellner, H. Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA Journal*. **2017**, *15*. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4972
- (19) Knutsen, K. H.; Barregård, L.; Bignami, M.; Brüschweiler, B.; Ceccatelli, S.; Cottrill, B.; Dinovi, M.; Edler, L.; Grasl-Kraupp, B.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L.; Nebbia, C. S.; Oswald, I.; Petersen, A.; Rose, M.; Roudot, A.; Schwerdtle, T.; Vleminckx, C.; Vollmer, G.; Wallace, H.; Dall'Asta, C.; Gutleb, A.; Metzler, M.;

- Parent-Massin, D.; Binaglia, M.; Steinkellner, H.; Alexander, J. Appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms. *EFSA Journal*. **2017**, *15*. DOI: doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4655
- (20) Arcella, D.; Gomez Ruiz, J. A.; Innocenti, M. L.; Roldan, R. Human and animal dietary exposure to ergot alkaloids. *EFSA Journal*. **2017**, *7*. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4902
- (21) Paul L., Schiff Jr., Ergot and Its Alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education*. **2006**, *98*. DOI: 10.5688/aj700598
- (22) Evans, T. J. *Reproductive and Developmental Toxicology*; Academic Press, 2011; 873-891.
- (23) Schmale III, D. G.; Munkvold, G. P. Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Animal Health. The American Phytopathological Society. <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Mycotoxins/Pages/ErgotAlkaloids.aspx> (skatīts 22.04.2021.)
- (24) Arroyo-Manzanares, N.; Gámiz-Gracia, L; García-Campaña A. M.; Di Mavungu, J. D.; De Saeger, S. *Fungal Metabolites*; SpringerLink, 2017; 887-929.
- (25) Klotz, J. L. Activities and Effects of Ergot Alkaloids on Livestock Physiology and Production. *Toxins*. **2015**, *7*. 2801-2821. DOI: 10.3390/toxins7082801
- (26) Kodisch, A.; Oberforster, M.; Raditschnig, A.; Rodemann, B.; Tratwal, A.; Danielewicz, J.; Korbas, M.; Schmiedchen, B.; Eifler, J.; Gordillo, A.; Siekmann, D.; Fromme, F. C.; Wuppermann, F. N.; Wiese, F.; Zechner, E.; Niewinska, M.; Miedaner, T. Covariation of Ergot Severity and Alkaloid Content Measured by HPLC and One ELISA Method in Inoculated Winter Rye across Three Isolates and Three European Countries. *Toxins*. **2020**, *12*. DOI: 10.3390/toxins12110676
- (27) Ministru kabineta 2014. gada 12. augusta noteikumi Nr. 461 <https://likumi.lv/ta/id/268347-prasibas-partikas-kvalitates-sheamam-to-ieviesanas-darbibas-uzraudzibas-un-kontroles-kartiba> (skatīts 19.04.2021.)
- (28) Eiropas Savienības Oficiālais Vēstnesis <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:077:0020:0021:LV:PDF> (skatīts 19.04.2021.)
- (29) Boermans, H. J.; Leung, M. C. K. Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*. **2007**, *119*, 95-102. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.063
- (30) Ministru kabineta 2009. gada 29.septembra noteikumi Nr. 1111. <https://likumi.lv/doc.php?id=198620> (skatīts 10.07.2021.)

- (31) Bischoff, K.; Rumbelha, W. K. Pet Food Recalls and Pet Food Contaminants in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **2018**, *48*, 917-931. DOI: 10.1016/j.cvsm.2018.07.005
- (32) Macías-Montes, A.; Rial-Berriel, C; Acosta-Dacal, A; Alberto Henríquez-Hernández, L.A.; Almeida-González, M.; Rodríguez-Hernández, A.; Zumbado, M.; Boada, L.D.; Zaccaroni, A.; Luzardo, O.P. Risk assessment of the exposure to mycotoxins in dogs and cats through the consumption of commercial dry food. *Science of the Total Environment*. **2020**, *708*. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134592
- (33) Kosicki, R.; Błajet-Kosicka, A.; Grajewski, J.; Twaruzek, M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. **2016**, *215*, 165-180. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2016.03.012
- (34) Commission recommendation (EU) 2016/1319 of 29 July 2016 amending Recommendation 2006/576/EC <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016H1319&from=EN> (skatīts 02.08.2021.)
- (35) Grandi, M.; Vecchiato, C. G.; Biagi, G.; Zironi, E.; Tondo, M. T.; Pagliuca, G.; Palmonari, A.; Pinna, C.; Zaghini, G.; Gazzotti, T. Occurrence of Mycotoxins in Extruded Commercial Cat Food. *ACS Omega*. **2019**, *4*, 14004-14012 DOI: 10.1021/acsomega.9b01702
- (36) Błajet-Kosicka, A.; Kosicki, R.; Twaruzek, M.; Grajewski, J. Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Food Additives & Contaminants*. **2014**, *4*, 302-308 DOI: 10.1080/19393210.2014.933269
- (37) Crews C., Analysis of Ergot Alkaloids *Toxins*. **2015**, 2024-2050. DOI: 10.3390/toxins7062024
- (38) Di Mavungu, J. D.; Malyshev, S. V.; Sanders, M.; Larionova, D.; Robbins, J.; Dubruel, P.; Van Peteghem, C.; De Saeger, S. Development and validation of a new LC-MS/MS method for the simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their corresponding epimers. Application to some food and feed commodities. *Food Chemistry*. **2012**, *135*, 292-303. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.04.098
- (39) Kowalczyk, E.; Patyra, E.; Grelik, A.; Kwiatek, K. Development and validation of an analytical method for determination of ergot alkaloids in animal feedingstuffs with high performance liquid chromatography-fluorescence

- detection. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. **2016**, 3, 559-565. DOI: 10.1515/pjvs-2016-0070
- (40) Krska, R.; Crews, C. HPLC/MS/MS method for the determination of ergot alkaloids in cereals <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/C03057.pdf> (skatīts 15.06.2021.)
- (41) Compilation of agreed monitoring recommendations as regards the presence of mycotoxins and plant toxins in food https://ec.europa.eu/food/system/files/2016-10/cs_contaminants_catalogue_mycotoxins_monitoring_recommendations_en.pdf (skatīts 28.07.2021.)
- (42) Kharayat, B. S.; Singh, Y. *Microbial Contamination and Food Degradation*, Academic Press **2018**, 395-421. DOI: 10.1016/B978-0-12-811515-2.00013-5
- (43) Galaverna, G.; Dall'Asta, C. Sampling Techniques for the Determination of Mycotoxins in Food Matrices. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. **2012**, 381-403. DOI: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00140-X
- (44) Turner, N.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A. *Analytical methods for determination of mycotoxins: A review*. *Analytica chimica acta*. **2009**. 632. 168-180. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.010
- (45) Curticapean, A.; Toma, F.; Tarcea, M.; Curticapean, M.; Samarghitan, V.; Pop, I. A.; Gulea, A. HPLC Method for Simultaneous Determination of Three Mycotoxins from Corn Seeds. *CROATICA CHEMICE ACTA*. **2011**. 84. 413-417. DOI: 10.5562/cca1788
- (46) Belajova, E. Single laboratory-validated HPLC methods for determination of ochratoxin A, fumonisin B1 and B2, zearalenone and deoxynivalenol in cereal-based foods I. *Journal of Food and Nutrition Research*. **2010**. 49. 57-68.
- (47) Determination of ergot alkaloids in cereal-based food and feed by LC-MS/MS https://www.wur.nl/en/show/EURL-MP-method_003-Ergot-alkaloids-by-LC-MSMS-v2.pdf.htm (skatīts 27.04.2021.)
- (48) F.E.D.I.A.F. Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs [https://www.pfma.org.uk/_assets/docs/FEDIAF%20Nutritional%20Guidelines%20-%20September%202008\(1\).pdf](https://www.pfma.org.uk/_assets/docs/FEDIAF%20Nutritional%20Guidelines%20-%20September%202008(1).pdf) (skatīts 28.07.2021.)
- (49) Maruo, V. M.; Bracarense, A. P.; Metayer, J.; Vilarino, M.; Oswald, I. P.; Pinton, P. Ergot Alkaloids at Doses Close to EU Regulatory Limits Induce Alterations of the Liver and Intestine. *Toxins*. **2018**, 10. DOI: 10.3390/toxins10050183

PATEICĪBAS

Izsaku pateicību Zanei Bērziņai par palīdzību AEŠH-MS/MS analīžu veikšanā, rezultātu apstrādē un paraugu sagatavošanā. Vēlos pateikties arī darba vadītājam Vadimam Bartkevičam par ieguldīto laiku darba vadīšanā un norādījumu sniegšanā visā darba garumā.

Pielikumi

1.pielikums

1.tabula

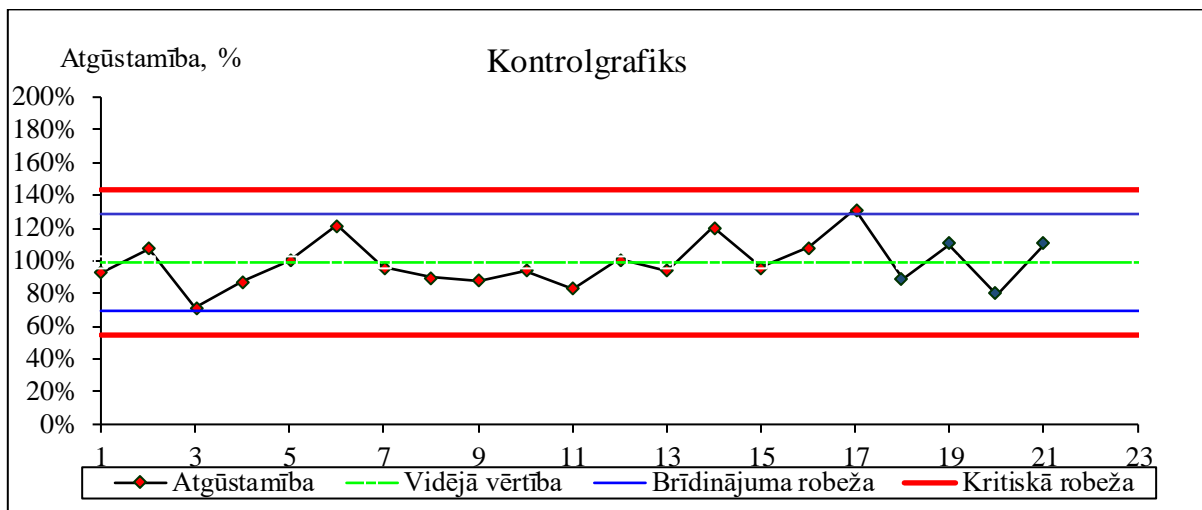
Kaķu barības paraugi, to izcelsmes valstis un norādītais sastāvs

Nr. p. k.	Ražotājs	Nosaukums	Izcelsmes valsts	Cena, Eur/kg	Sastāvs
1.	Murka	With beef and poultry	Lietuva	0,89	Graudaugi – 43%, gaļa un dzīvnieku izcelsmes blakusprodukti 15%, augu izcelsmes blakusprodukti, eļļas un tauki, minerālvielas, raugs 0,1%, dārzeņi
2.	Kitekat	Ar vistu	Polija	3,70	Graudaugi, gaļa un tās pārstrādes produkti 26%, dārzeņu pārstrādes produkti, eļļas un taukvielas, minerālvielas, dārzeņi (tajā skaitā kaltēti burkāni 0,5%), 1% kaltēti zirņi, dārzeņu olbaltumvielu ekstrakti
3.	Purina	Friskies	Ungārija	2,97	Graudaugi, gaļa un dzīvnieku blakusprodukti 10%, augu olbaltumvielu ekstrakti, eļļas un tauki, augu izcelsmes blakusprodukti, minerālvielas, dārzeņi 0,6%, raugi.
4.	Whiskas	1+ years	Ungārija	3,97	Labība, gaļa un tās pārstrādes produkti 29%, eļļas un taukvielas, dārzeņu olbaltumvielu ekstrakti, minerālvielas, dārzeņi (tostarp kaltēti burkāni 0,5%, kaltēti zirņi 1%), dārzeņu pārstrādes produkti.
5.	Purina	One	ES	8,20	Vistas gaļa 17%, kaltētas mājputnu gaļas olbaltumvielas, pilngraudu kvieši 16 %, kukurūza, sojas milti, kviešu glutēns, cūkas tauki, kukurūzas proteīnu milti, kaltēta cigoriņu sakne 2%, kukurūzas putraimi, hidrolizāts, raugi
6.	Carnilove	Lamb & wild boar	Čehija	14,98	Mežacūkas gaļas milti 35%, jēra gaļas milti 24%, dzeltenie zirņi 17%, vistas tauki (koservēti ar tokoferoliem) 6%, āboli 4%, vistu aknas 1%, linsēklas 1%, zirņi 1%, hidrolizēti vēžveidīgie 0,026%, skirmšļa ekstrakts 0,016%, alus raugs 0,016%, cigoriņu sakne 0,012%, juka šidigera 0,01%, alģes 0,01%, ceļteka 0,01%, timiāns 0,01%, rozmarīns 0,01%, oregano 0,01%, dzērvenes, avenes, mellenes (katrs 0,0008%)
7.	Ontario	Sensitive Duck & Lamb	Francija	12,48	Dehidrēta pīle 22%, svaiga jēra gaļa 15%, brūnie rīsi 15%, zirņi 10% šķeltie zirņi 10%, visats tauki 9%, kartupeļu proteīns, linsēklas, hidrolizēts zivju proteīns, svaiga laša eļļa 2%, žāvēti āboli, kaltēti burkāni, minerālvielas, kaltēti cigoriņi,

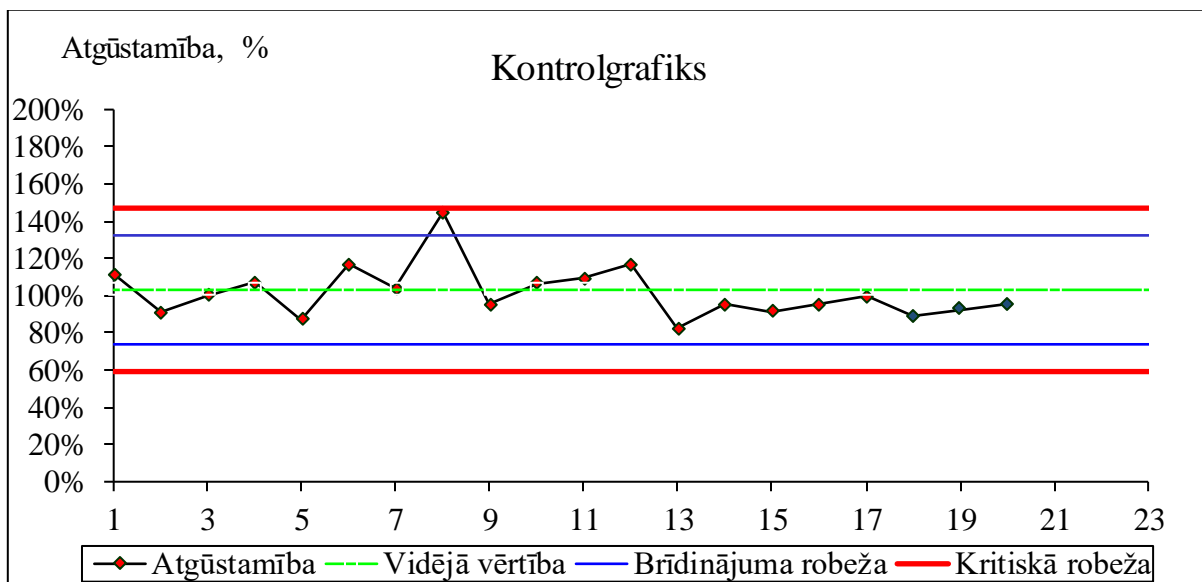
					mannānoligosaharīdi, kaltātas dzērvenes, kaltētas mellenes, kaltēti spināti, kaltēti brokoļi.
8.	Josera *	JosiCat Duck & Fish	Vācija	2,99	Labība, gaļa un dzīvnieku blakusprodukti (pīles gaļas milti 4%), augu izcelsmes blakusprodukti, zivis un to blakusprodukti 4%, eļļas un tauki, minerāli
9.	Josera *	JosiCat Sterilised Classic	Vācija	3,99	Pilngraudu kukurūza, kaltēts mājputnu proteīns, rīsi, biešu grauzījumi, dradži, kaltēts lasis, mājputnu tauki, hidrolizēts dzīvnieku izcelsmes proteīns, hidrolizēts putnu gaļas proteīns, lignocelulozes, cigoriņu saknes pulveris, minerāli
10.	Araton *	Adult after sterilization	ES	2,49	Graudaugi, gaļa, subprodukti, dārzeņi, tauki un eļļa, dārzeņu olbaltumvielu ekstrakts, cukurbiešu mīkstsūms, vitamīni, minerālvielas, atļauti antioksidanti E320 (BHA), E321 (BHT), konservanti E202 (kālija sorbāts)
11.	Purina *	Pro Plan Sterilised Salmon	ES	7,99	Lasis 20%, kukurūzas glutēna milti, rīsi 14%, dehidrētas tunča olbaltumvielas, kukurūza, dehidrēta tunča milti 4%, dārzeņu šķiedrvielas, zirņu olbaltumvielu koncentrāts, kviešu glutēna milti, olu pulveris, dzīvnieku tauki, hidrolizāts, raugs, minerālvielas
12.	Purina *	Pro Plan Adult Chicken & Rice	ES	6,99	Vista 21%, rīsi 16%, kukurūzas līpekļa milti, dehidrētas mājputnu olbaltumvielas, kukurūza, kvieši, dzīvnieku tauki (konservēti ar tokoferolu maisījumu), hidrolizēts olu pulveris, cigoriņu sakne 2%, raugs, pākšaugu olbaltumvielu koncentrāts, zivju eļļa, KCl, kalcija karbonāts, minerālvielas, holīna hlorīds, L-arginīns, L-līfīns, NaCl, DL-mentionīns
13.	Kis-Kis *	Super premium quality	Holande	2,70	Graudi, gaļa un gaļas produkti, augu valsts produkti, eļļas un tauki, zivs (siļķe), un zivju produkti (siļķe), minerālvielas
14.	Purina *	Pro Plan Sterilised adult	ES	8,00	Tītara gaļa 20%, dehidrētas mājputnu gaļas olbaltumvielas, rīsi, kukurūzas glutēna milti, kukurūza, kviešu glutēna milti, kviešu šķiedras, celuloze, olu pulveris, minerāli, zivju eļļa, dzīvnieku izcelsmes tauki, hidrolizāts, raugi
15.	Applaws	Adult cat Ocean fish with salmon	Apvienotā Karaliste	14,26	Svaigi gatavotas baltās zivis 18%, zirņi, siļķes maltā gaļa 12%, zirņu milti, lēcas, svaigi gatavota laša maltā gaļa 8%, balto zivju gaļa 5%, linsēklas, alus raugs, laša eļļa 3%, lucerna, laša gaļa 2,5%, dehidrēts zivju proteīns 2,5%, žāvētas dzērvenes, vitamīni,

					minerālvielas, kokosriekstu eļļa, žāvēti āboli, žāvēti bumbieri, citrona ekstrakts, rozmarīna ekstrakts
16.	Unica Natura	Unico indoor	Itālija	11,69	Dehidrēts jēra gaļas proteīns 15,12%, kukurūzas glutēns, kukurūzas klijas, rīsi 12,9%, hidrolizēts dzīvnieku proteīns, dehidrēts cūkgaļas proteīns, vistas tauki, zaļo zirņu šķiedra un proteīns, zaļie zirņi 4,03%, dehidrēts laša proteīns, kaltēts raugs, linsēklas 1,01%, olas, kaltētas ceļmalas sēklas 0,5%, kaltētas aļģes, juka 0,13%
17.	Perfecto Gold	Adult	Vācija	3,49	Vistas gaļa 17%, mājputnu izcelsmes olbaltumvielas, pilngraudu kvieši 17%, kviešu mannas putraini, kukurūza, sojas milti, dzīvnieku tauki, kukurūzas lipekļa milti, cigoriņu sakne 0,2%, minerālvielas, raugs.
18.	Kattovit	Sensitive	Vācija	13,63	Mājputnu gaļas proteīns(kaltēts) 23%, lasis (kaltēts) 14%, zirņu ciete 14%, kartupeļu ciete 19.14%, eļļas un tauki, kaltēti zirņi 8%, kaltēts bie20.šu mīkstums, zivju gaļas proteīns 2%, olu pulveris 2%, alus raugs, minerālvielas, cigoriņu inulīns, oligofruktoze, mohave juka
19.	Royal Canin	Reguar Sensible	ES	13,89	Dehidrēts mājputnu proteīns, rīsi, dzīvnieku tauki, kukurūza, augu proteīna izolāts, dehidrēts cūkgaļas proteīns, kviešu milti, kvieši, hidrolizēti dzīvnieku proteīni, kukurūzas lipekļi, raugi un to daļas, bietes mīkstums, zivju eļļa, dārzeņu šķiedras, sojas eļļa, frukto-oligo-saharīdi
20.	Fokker	Steri-Fit	Nīderlande	4,28	Kaltēta mājputnu gaļa (min. 14% vista), dzīvnieku proteīna ekstrakts, rīsi 14%, zirņi, mieži, mājputnu tauki, celuloze, kukurūza, kukurūzas lipekļi, lašu eļļa, linsēklas, žāvēts lasis, olu pulveris, alus raugs, inolīns (FOS avots), dzērvenes

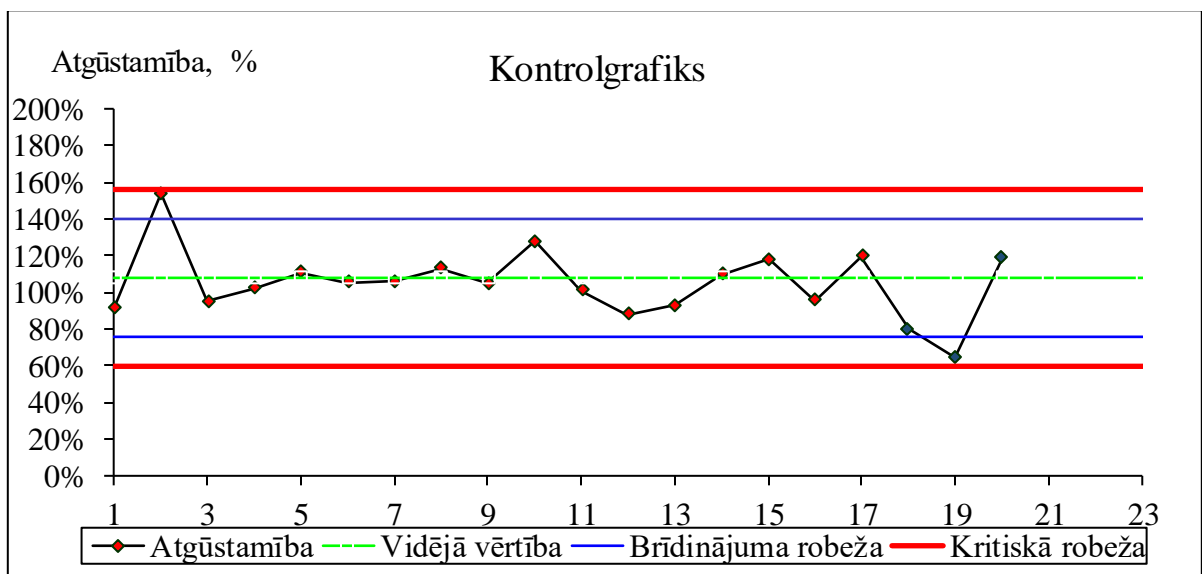
* Sveramā barība



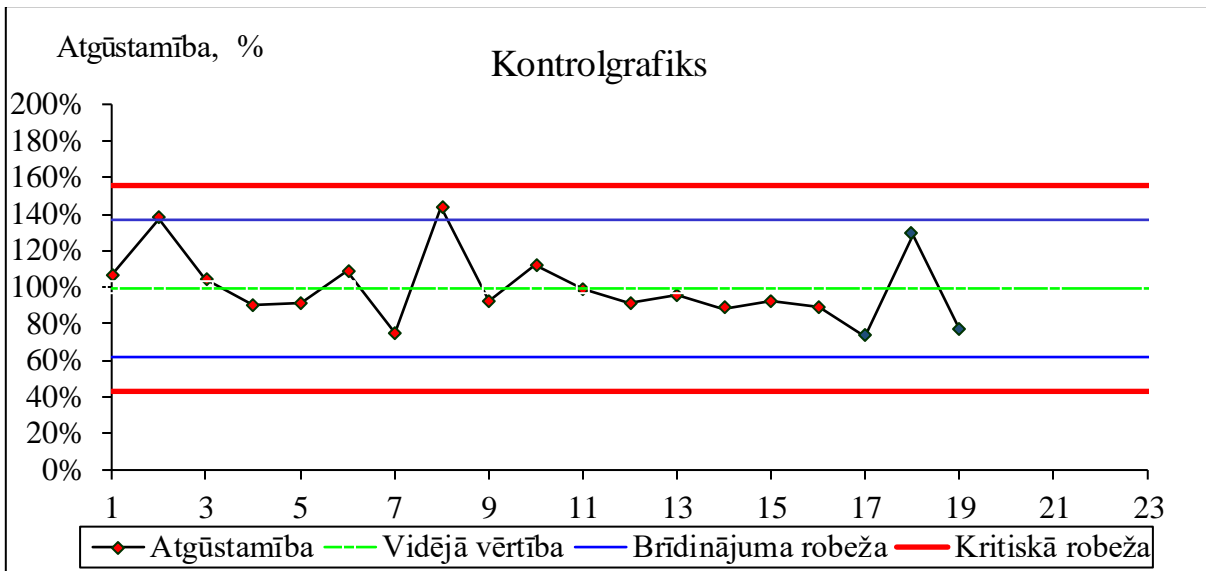
1.att. Kontrolgrafiks ergosīnam



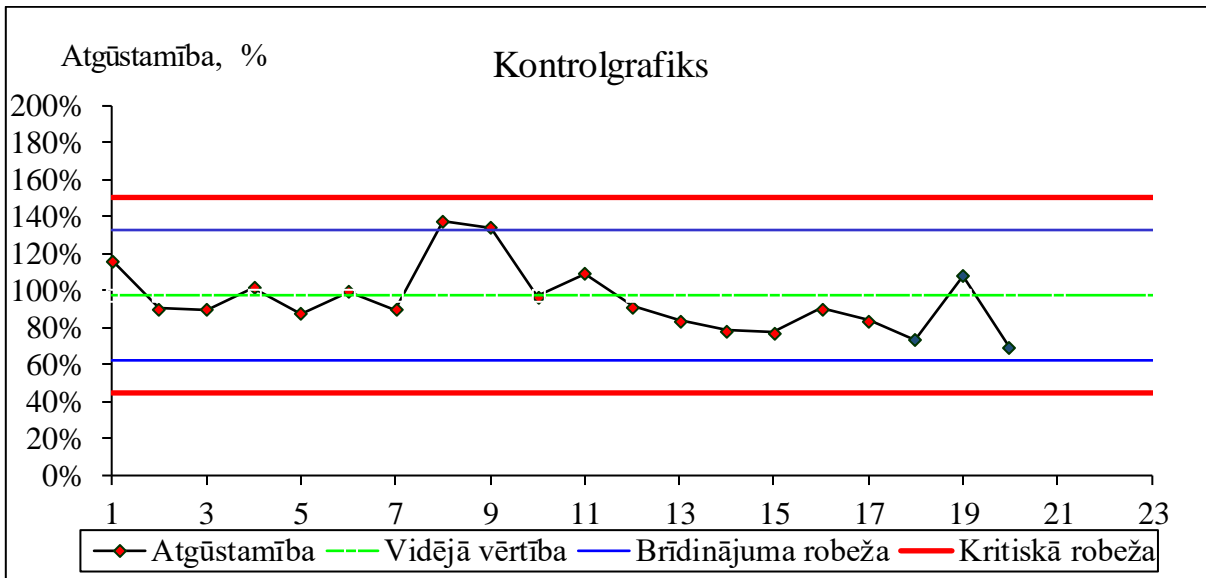
2.att. Kontrolgrafiks ergokornīnam



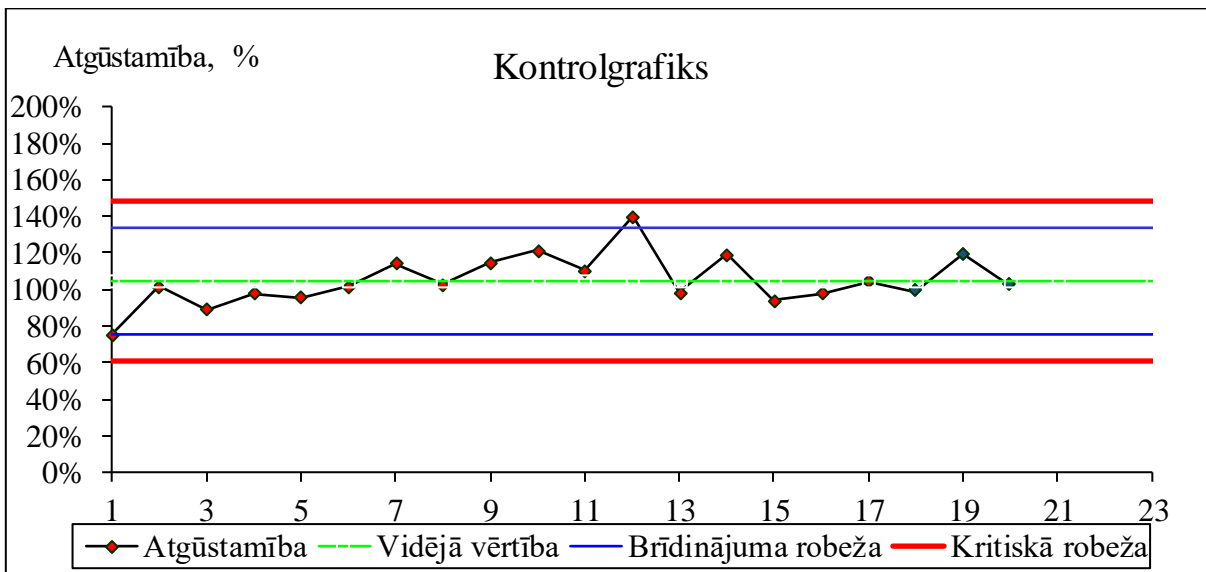
3.att. Kontrolgrafiks α -ergokriptīnam



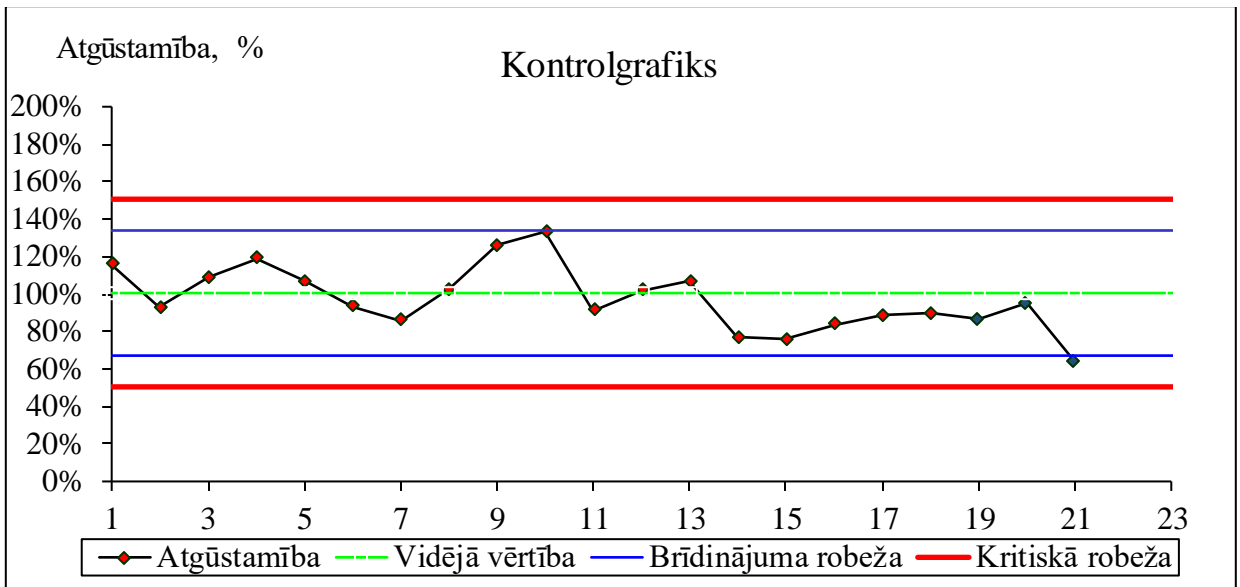
4.att. Kontrolgrafiks ergokristīnam



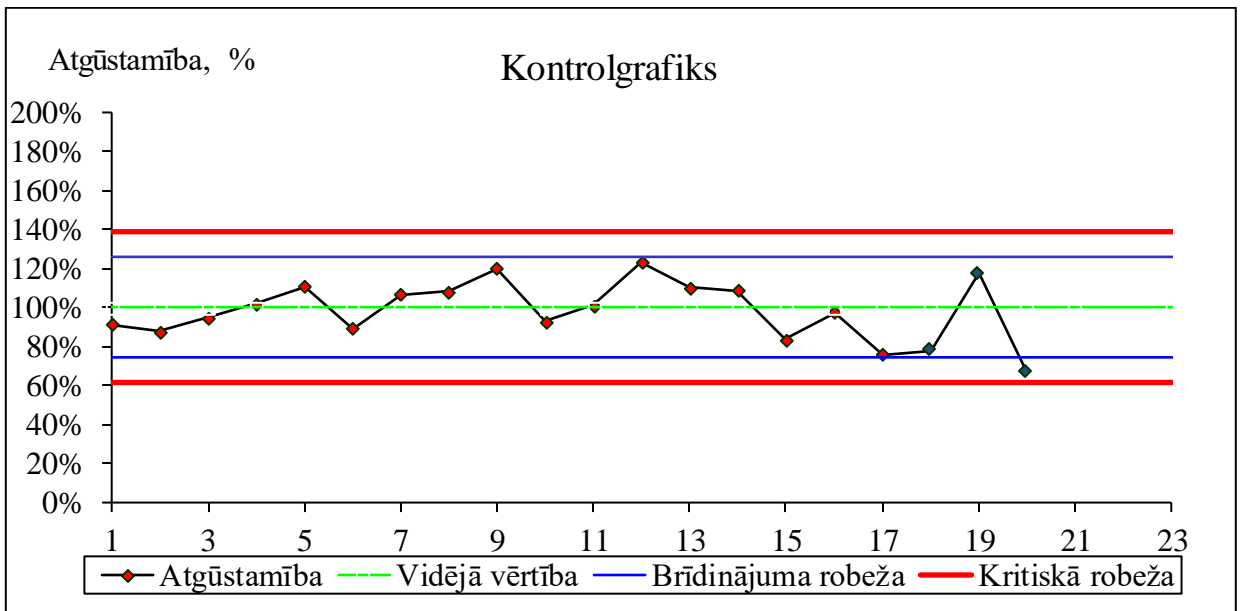
5.att. Kontrolgrafiks ergosinīnam



6.att. Kontrolgrafiks ergokorninīnam



7.att. Kontrolgrafiks ergokristinīnu



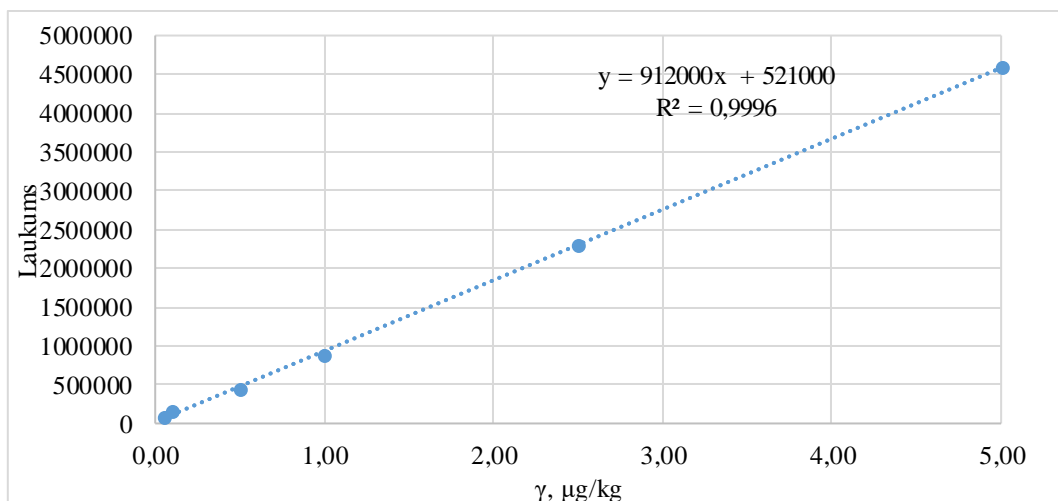
8.att. Kontrolgrafiks ergokriptinīnam

Izolēto prekursora jonu un galveno detektēto fragmenta jonu m/z

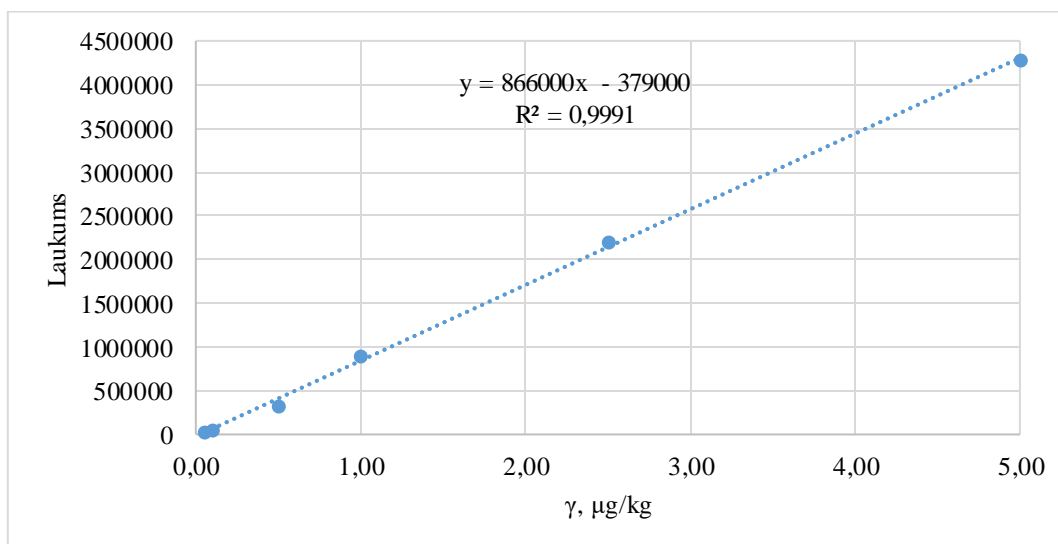
Nosaukums	Prekursora jona m/z	Fragmenta jona m/z	Kolīzijas enerģija
Ergozīns	548	223	32
		268	23
Ergozinīns	548	208	45
		223	29
Ergokornīns	562	223	34
		268	24
Ergokorninīns	562	277	26
		305	27
α -Ergokriptīns	576	208	44
		223	34
Ergokriptinīns	576	291	24
		304	28
Ergokristīns	610	223	35
		305	26
Ergokristinīns	610	223	32

Analizējamo savienojumu raksturojošie parametri SEM režīmā

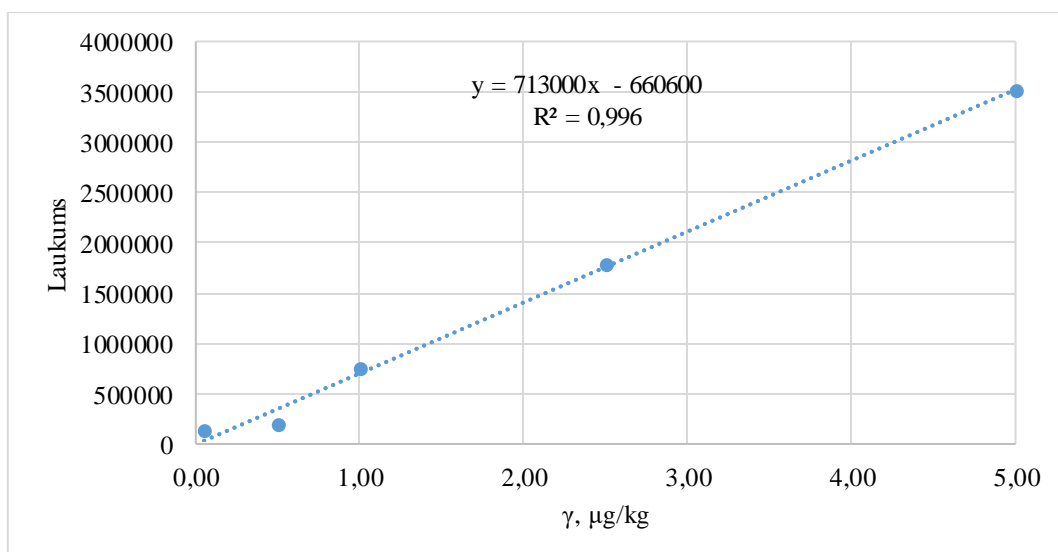
Savienojums	Izdalīšanās laiks, min	Prekursora jons, m/z	Jonizācija	Produkta jons, m/z	Savienojuma enerģija
DON	2,0	297,0	+	231,0	12
		249,0		249,0	11
Aflatoksīns B1	5,0	313,0	+	213,0	43
		313,0		241,0	37
		313,0		285,0	23
HT-2 toksīns	6,5	448,0	+	268,1	20
		448,0		346,1	20
Fumonizīns B1	6,0	722,5	+	334,25	40
		722,5		352,25	35
T-2 toksīns	6,0	489,0	+	327,0	23
		489,0		387,0	21
ZEA	6,0	317,15	-	131,0	28
		317,15		175,0	23,5
		317,15		273,0	18
OTA	6,0	404,0	+	102,0	50
		404,0		239,0	25
		404,0		358,0	13
Fumonizīns B2	7,0	706,5	+	318,25	38
		706,5		336,2	36
		706,5		354,2	33



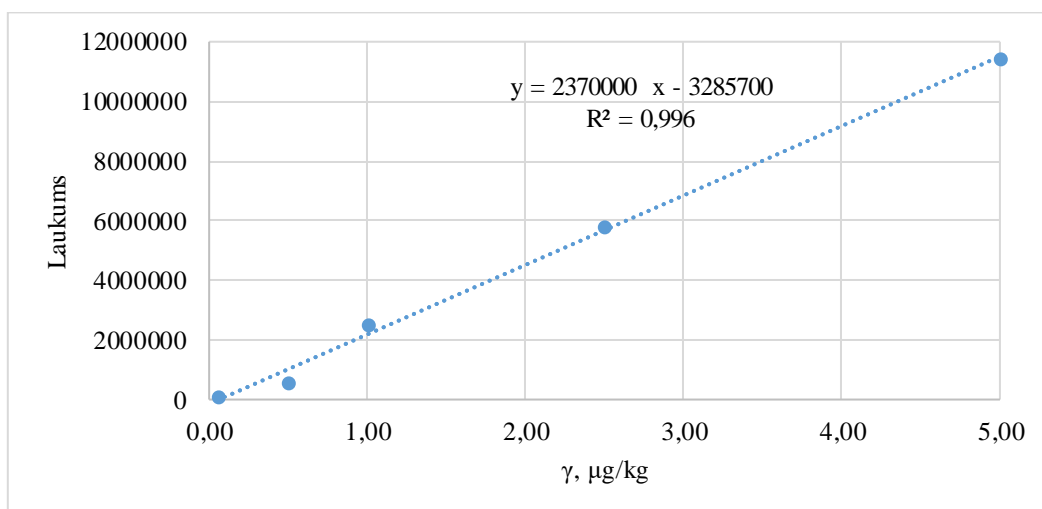
1.att. Kalibrēšanas taisne ergokornīnam



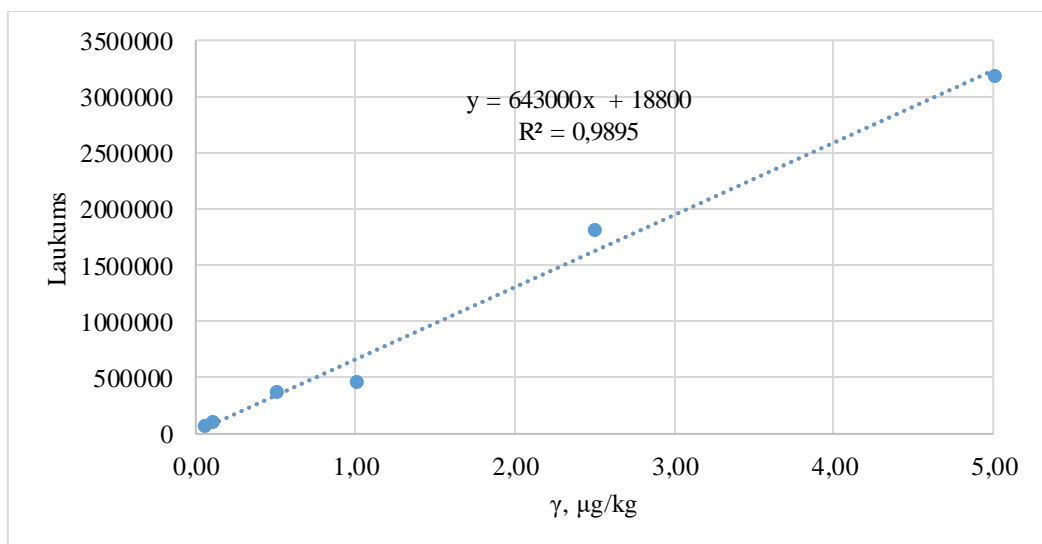
2.att. Kalibrēšanas taisne alfa-ergokriptīnam



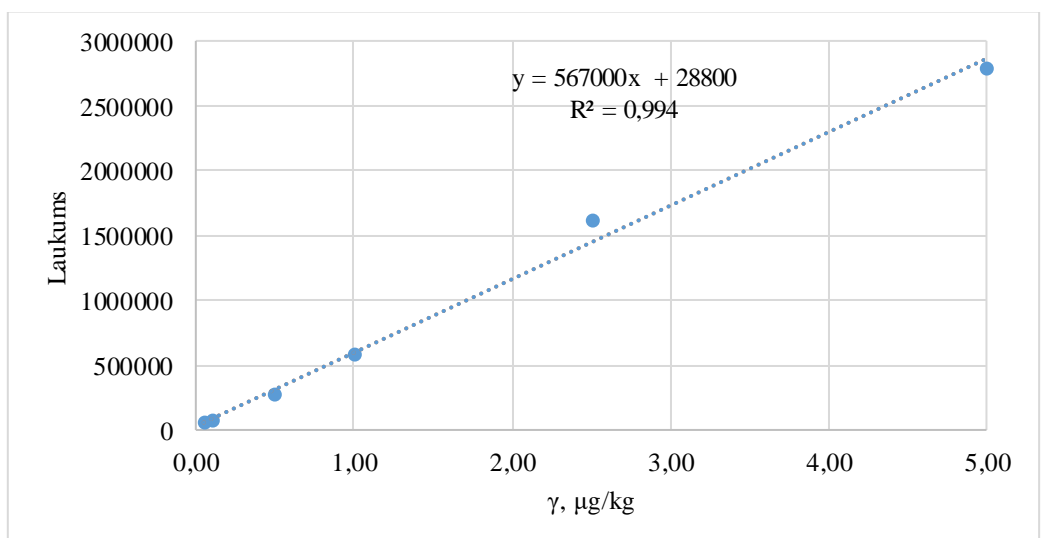
3.att. Kalibrēšanas taisne ergokristīnam



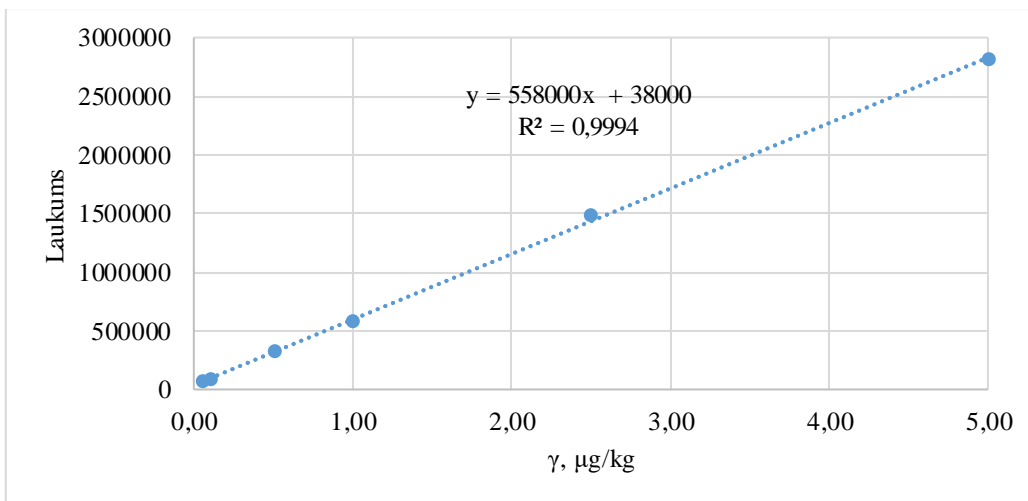
4.att. Kalibrēšanas taisne ergosinīnam



5.att. Kalibrēšanas taisne ergokornīnam



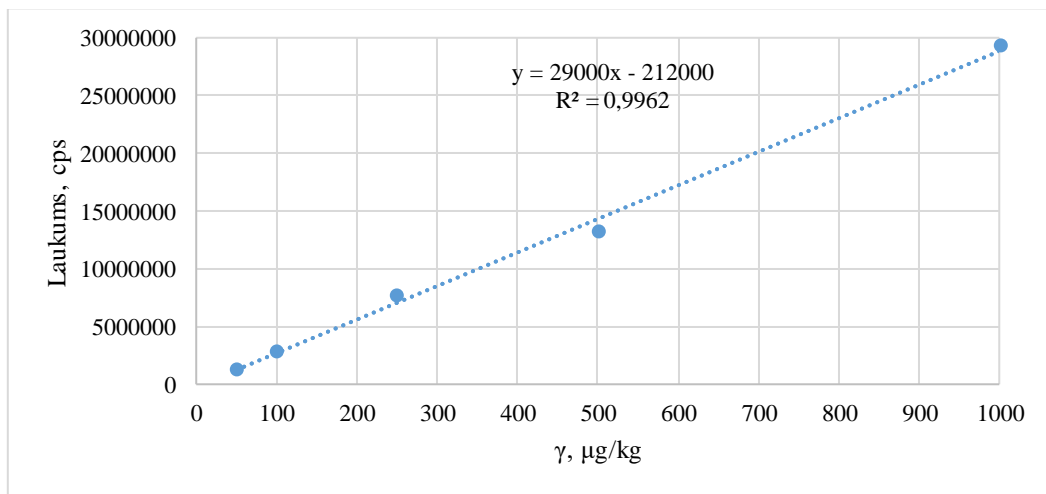
6.att. Kalibrēšanas taisne ergokristīnam



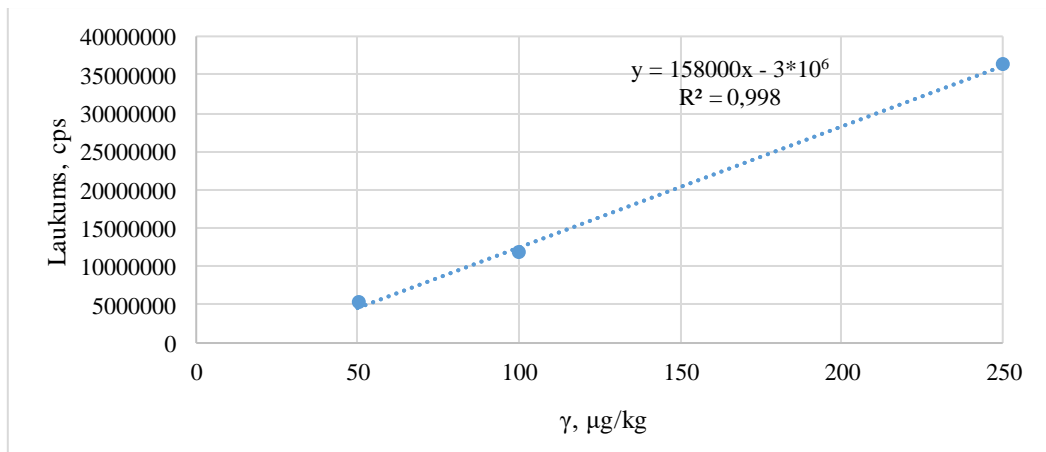
7.att. Kalibrēšanas taisne ergokriptinīnam

EA koncentrācija kaķu barības paraugos

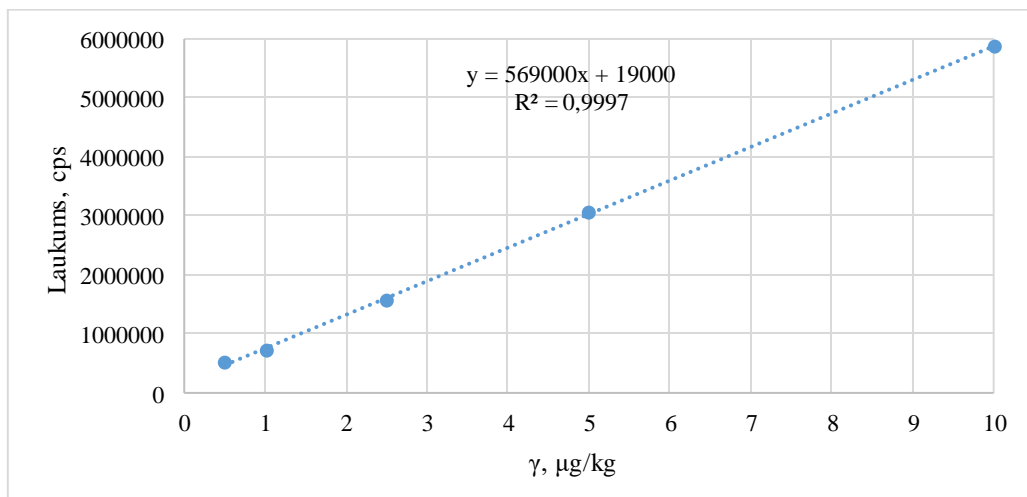
Parauga Nr.	Ergosinīns, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Ergokorninīns, $\mu\text{g}/\text{kg}$	α -ergokriptīns, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Ergokristīns, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Ergosinīns, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Ergokorninīns, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Ergoktistinīns, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Ergokriptinīns, $\mu\text{g}/\text{kg}$
1.	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	$0,08 \pm 0,03$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2.	$1,55 \pm 0,02$	$1,23 \pm 0,07$	$1,16 \pm 0,03$	$1,85 \pm 0,03$	$1,97 \pm 0,03$	$6,16 \pm 0,02$	$5,28 \pm 0,03$	$9,58 \pm 0,02$
3.	$0,07 \pm 0,02$	<LOQ	$0,05 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,03$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
4.	<LOQ	<LOQ	$0,80 \pm 0,03$	<LOQ	$0,08 \pm 0,03$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
5.	$2,21 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,07$	$0,72 \pm 0,03$	$1,75 \pm 0,03$	$1,75 \pm 0,03$	$3,81 \pm 0,02$	$4,03 \pm 0,03$	$3,89 \pm 0,02$
6.	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
7.	$0,43 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,07$	$0,07 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,02$
8.	$0,33 \pm 0,02$	<LOQ	$0,15 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,02$	$1,66 \pm 0,03$	$0,49 \pm 0,02$
9.	<LOQ	<LOQ	<LOQ	$0,37 \pm 0,03$	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
10.	<LOQ	<LOQ	$0,05 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,02$	<LOQ	$0,12 \pm 0,02$
11.	$1,71 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,07$	$0,49 \pm 0,03$	$1,60 \pm 0,03$	$1,60 \pm 0,03$	$2,18 \pm 0,02$	$2,57 \pm 0,03$	$2,25 \pm 0,02$
12.	$1,78 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,07$	$0,31 \pm 0,03$	$1,32 \pm 0,03$	$1,32 \pm 0,03$	$1,51 \pm 0,02$	$3,44 \pm 0,03$	$1,54 \pm 0,02$
13.	$10,88 \pm 0,02$	$3,37 \pm 0,07$	$2,24 \pm 0,03$	$7,20 \pm 0,03$	$7,20 \pm 0,03$	$12,44 \pm 0,02$	$14,54 \pm 0,03$	$12,34 \pm 0,02$
14.	$10,73 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,02$	$1,34 \pm 0,03$	$1,20 \pm 0,02$
15.	$1,30 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,03$	$1,56 \pm 0,03$	$1,56 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,02$	$8,83 \pm 0,03$	$1,15 \pm 0,02$
16.	$5,15 \pm 0,02$	<LOQ	<LOQ	$0,11 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,03$	<LOQ	$0,06 \pm 0,03$	<LOQ
17.	$0,06 \pm 0,02$	$3,55 \pm 0,07$	$1,69 \pm 0,03$	$3,52 \pm 0,03$	$3,52 \pm 0,03$	$6,94 \pm 0,02$	$19,00 \pm 0,03$	$6,85 \pm 0,02$
18.	$6,11 \pm 0,02$	$3,28 \pm 0,07$	$1,57 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,03$	$6,82 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,03$	$7,18 \pm 0,02$
19.	$0,18 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,07$	$0,10 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,02$
20.	$2,43 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,07$	$1,36 \pm 0,03$	$5,07 \pm 0,03$	$1,75 \pm 0,03$	$3,47 \pm 0,02$	$10,53 \pm 0,03$	$5,86 \pm 0,02$



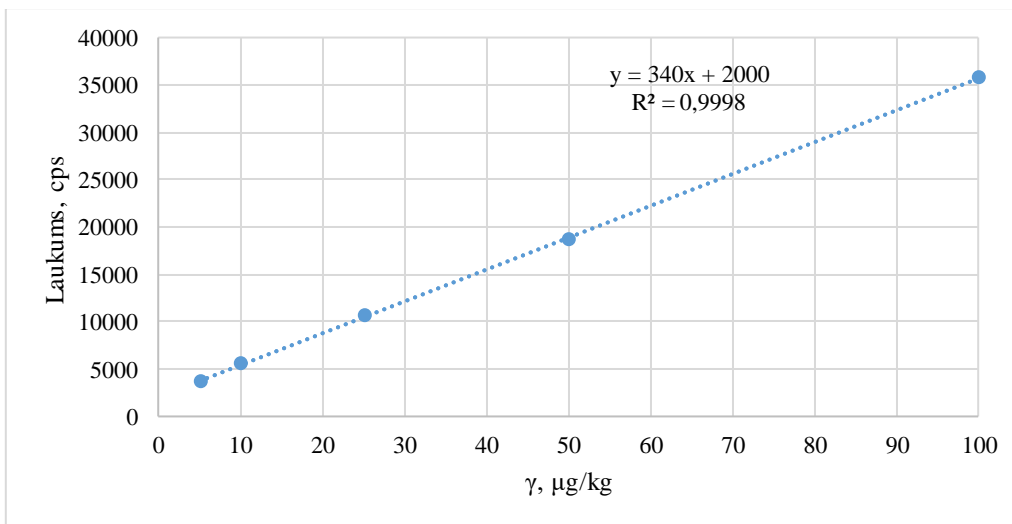
1.att. Kalibrēšanas taisne FB1



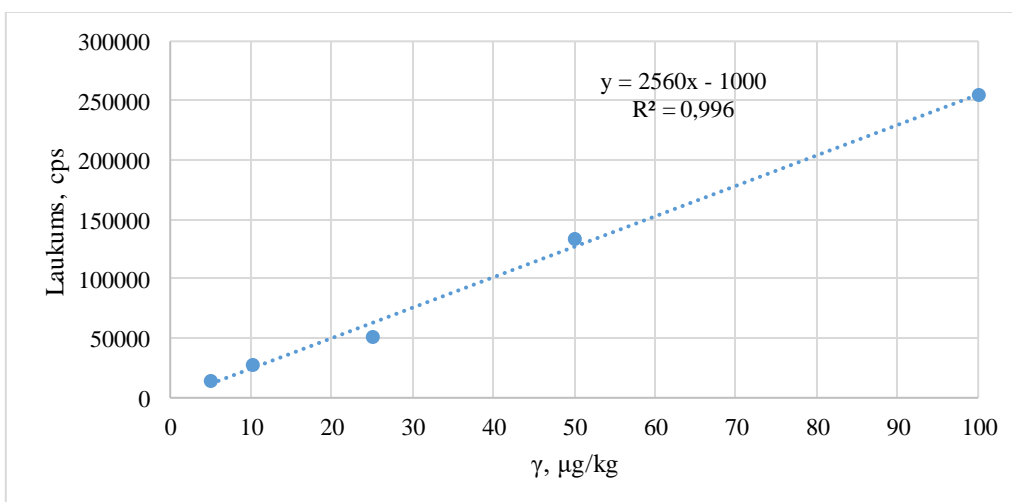
2.att. Kalibrēšanas taisne FB2



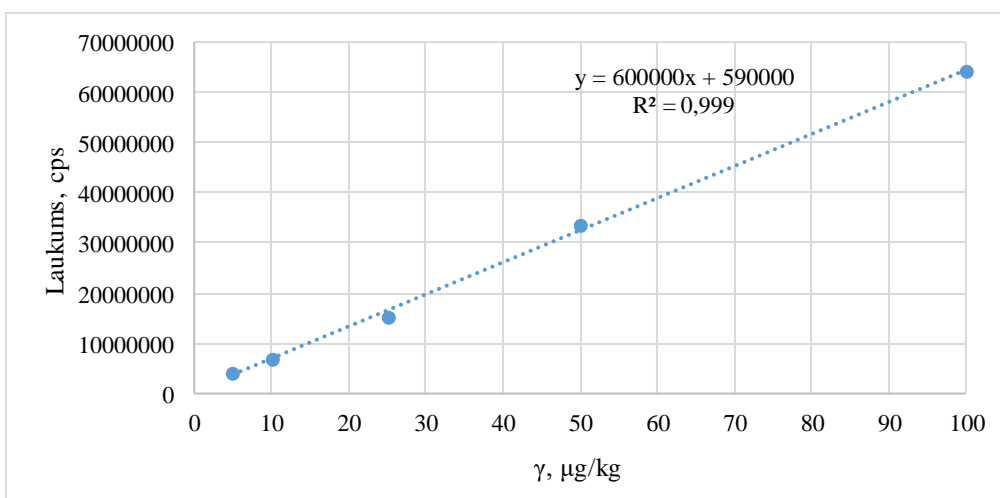
3.att. Kalibrēšanas taisne aflatoksīnam B1



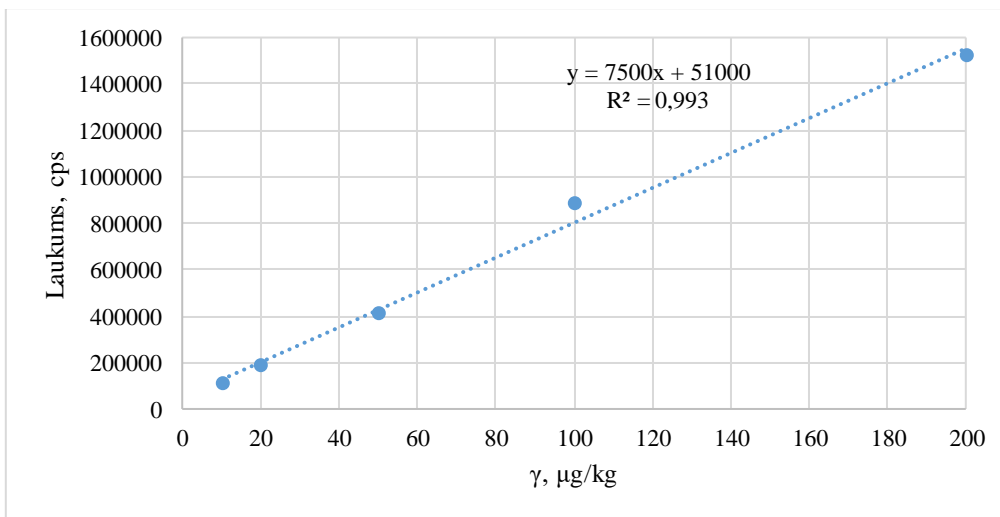
4.att. Kalibrēšanas taisne HT-2 toksīnam



5.att. Kalibrēšanas taisne T-2 toksīnam



6.att. Kalibrēšanas taisne OTA



7.att. Kalibrēšanas taisne ZEA

