

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**ANTIBIOTIKU ATLIEKVIELU NOTEIKŠANA UN  
IZPLATĪBA ZIVĪS**

**BAKALAURA DARBS**

Autors: **Kristina Puzane**

Studenta apliecības Nr.: kp19089

Darba vadītāja: Dr. chem. Iveta Pugajeva

RĪGA

2022

## ANOTĀCIJA

**Antibiotiku atliekvielu noteikšana un izplatība zivīs.** Puzane K., zinātniskais vadītājs Dr. chem. Pugajeva I. Bakalaura darbs, 37 lappuses, 15 attēli, 6 tabulas, 46 literatūras avoti, 5 pielikumi. Latviešu valodā.

Akvakultūra mūsdienu pasaulē tiek uzskatīta par strauji augošu industriju, kur gandrīz puse no tās veido zivs, kuru lieto cilvēki savā uzturā. Ražošanā tiek izmantoti lieli zivju krājumi, tomēr bieži notiek slimību uzliesmojumi, kā rezultātā tiek pielietoti antibakteriālie līdzekļi, kas ir kļuvuši par ierastu praksi.

Antibiotikas ir medikamenti, kas nomāc baktēriju augšanu un izraisa to nāvi, tās tiek pielietotas gan cilvēku, gan arī veterinārmedicīnā pret bakteriālām infekcijām. Ir zināmi vairāk kā 100 savienojumi, un jauno savienojumu sintēze ir praktiski apstājusies. Šo savienojumu grupas atliekvielu izplatība rada rezistences pieaugšanu, ietekmējot apkārtējo vidi un sabiedrības veselības problēmas.

ANTIBIOTIKAS, ANTIBAKTERIĀLĀ REZISTENCE, HROMATOGRĀFIJA, MASSPEKTROMETRIJA.

## ABSTRACT

Determination and prevalence of antibiotic residues in fish. Puzane K., Dr. chem. Pugajeva I. Bachelor's thesis, 37 pages, 15 figures, 6 tables, 46 literature references, 5 appendices. In Latvian.

In today's world, aquaculture is considered to be a fast-growing industry, with almost half of it being fish for human consumption. Large stocks of fish are used in production, but outbreaks of disease often occur resulting in the use of antibacterial agents that have become common practice.

Antibiotics are drugs that inhibit the growth of bacteria and cause their death, they are used against bacterial infections. More than 100 compounds are known and the synthesis of new compounds has practically stopped. The spread of antibiotic residues leads to an increase in resistance of microorganisms, affecting the environment and public health problems.

ANTIBIOTICS, ANTIMICROBIAL RESISTANCE, CHROMATOGRAPHY, MASS SPECTROMETRY.

## SATURS

Apzīmējumu saraksts .....	4
Ievads .....	5
1. Literatūras apskats.....	6
1.1. Antibiotiku iedalījums .....	6
1.2. Antibiotiku lietošana zivīs .....	8
1.3. Antibiotiku atlieku izplatība zivīs .....	9
1.4. Antibiotiku ietekme .....	14
1.5. Antibiotiku atliekvielu kontrole .....	15
1.6. Antibiotiku atliekvielu noteikšanas metodes ar AEŠH .....	16
2. Eksperimentālā daļa .....	18
2.1. Materiāli un izejvielas .....	18
2.2. Paraugu sagatavošana .....	19
2.3. Instrumentālā analīze .....	19
3. Rezultāti un to izvērtējums .....	21
3.1. Optimizācija .....	21
3.2. Metodes validācija .....	22
3.2. Paraugu analīze .....	29
Secinājumi .....	34
Izmantotā literatūra .....	35
PIELIKUMI.....	38
1.pielikums. 2020.gadā Eiropā konstatētās AB atliekvielas akvakultūrā .....	38
2. pielikums. Multi AB noteikšanas metodes .....	40
3.pielikums. AB standartvielu šķīdība .....	41
4.pielikums. AB darba standartšķīduma pagatavošanai nepieciešamie tilpumi .....	44
5.pielikums. Analītu skenēšanas pārejas un sadursmju enerģijas.....	47

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AB	antibiotikas
ABL	antibakteriālie līdzekļi
ABR	antibakteriālā rezistence
AEŠH	augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfs
ACN	acetonitrils
CAC	Pārtikas Likumdošanas komisija
EK	Eiropas Komisija
ELISA	enzīmu imūnsorbcijas testi
ES	Eiropas Savienība
ESI	elektroizsmidzināšanas interfeiss
FCEK	fosfolipīdu cietfāzes ekstrakciju kolonnas
LOD	kvalitatīvā noteikšanas robeža
LOQ	kvantitatīvā noteikšanas robeža
MRL	maksimāli pieļaujamo atliekvielu daudzums
MS	masspektrometrija
MS/MS	tandēma masspektrometrija
OBV	olbaltumvielas
SPE	cietfāzes ekstrakcijas kolonnas
TCA	trihloretiķskābe

## IEVADS

Antibiotikas (AB) ir medikamenti, kas nomāc baktēriju augšanu vai arī iznīcina tās, tādā veidā ārstējot bakteriālās infekcijas. Pateicoties struktūras un iedarbības daudzveidībai, tās tiek iedalītas vairāk nekā 15 dažādās grupās.<sup>1</sup>

Baktēriju nomācošo un nāvi izraisošo savienojumu izmantošanai ir jāpievērš būtiska uzmanība, jo pārmērīga vai nepareiza AB lietošana noved pie antibakteriālās rezistences (ABR). ABR nozīmē baktēriju nejūtība pret antibiotikām, kā rezultātā tās izdzīvo, turpinot vairoties. Baktēriju spēju pretoties pret antibiotikām cilvēki var iegūt tiešā ceļā lietojot medikamentus, gan netiešā – uzņemot ar pārtiku no produktīviem dzīvniekiem. Lauksaimniecībā, lai pasargātu dzīvniekus no infekcijām un stimulētu to augšanu, tiek lietoti pretmikrobu līdzekļi, kas strukturāli saistīti ar cilvēku medicīnā izmantotajiem.<sup>1,2</sup>

Īpaša uzmanība tiek vērsta uz antibakteriālo līdzekļu lietošanu zivīs. Ir veikti pētījumi par globālo AB patēriņu zivīs, kuru rezultātā tika prognozēts, ka uz 2030.gadu medikamentu atliekvielas akvakultūrā varētu pieaugt līdz pat 33%. Tas ir liels apdraudējums gan cilvēka, gan dzīvnieka veselībai, jo rezistence pieaug, bet jaunās paaudžu antibiotikas ražošana praktiski ir apstājusies, kā rezultātā tiek prognozēta tuvākajā nākotnē lielākais nāves gadījumu skaits pasaulē rezistentu baktēriju izraisītas infekciju slimību dēļ.<sup>2,3</sup>

Svarīgi ir apzināties, ka ABR problēmas nav iespējams atrisināt, turpinot sintezēt jaunas grupas antibakteriālos līdzekļus, taču apdomāta lietošana un monitorings spēs parūpēties par veselīgāku nākotni.<sup>4</sup>

AB atliekvielu esamība produktīvajos dzīvniekos tiek uzraudzīta, stingri kontrolēta un regulēta, lai to maksimāli pieļaujamie līmeņi netiktu pārsniegti. Tomēr pēc Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestādes apkopotiem datiem par 2020.gada monitoringa veiktām analīzēm, tiek uzsvērts, ka Latvija ir viena no valstīm, kas monitoringā neanalizē vismaz vienu akvakultūras paraugu uz tonnu produkcijas kā tas ir rekomendēts saskaņā ar Direktīvu 96/23/EC.<sup>5</sup>

Darba mērķis: izpētīt antibiotiku atliekvielu izplatību zivīs, pielietojot optimizētu noteikšanas metodi.

Darba uzdevumi:

1. optimizēt un validēt šķidrums hromatogrāfijas masspektrometrijas metodi vismaz 78 antibiotiku atliekvielu noteikšanai;
2. veikt zivs paraugu analīzi antibiotiku atliekvielām.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

Antibiotikas kā spēcīgi medikamenti tiek izmantoti jau tūkstošiem gadu infekcijas ārstēšanai, neskatoties uz to, ka līdz pagājušajam gadsimtam cilvēki nemaz nezināja, ka infekcijas izraisītāji ir baktērijas. Civilizācija neapzināti infekciju ārstēšanai izmantoja dažāda pelējuma sēnītes un augu ekstraktus, kā piemērs ir senie ēģiptieši, kuri inficētas brūces dziedēja, uzsmērējot uz tās sapelējušu maizi. Tomēr 20.gadsimta attīstītajā pasaulē galvenais cilvēku nāves cēlonis bija mūsdienu vienkārši ārstējamās infekciju slimības, piemēram, pneimonija.<sup>6</sup> Tas turpinājās līdz 1928.gadam, kad tika atklāts penicilīns. Kopš šī nozīmīgā notikuma, sekoja jaunu savienojumu izstrāde, pateicoties kam samazinājās infekciju slimības mirstības līmenis.

Pārmērīgai un nepareizai antibakteriālo līdzekļu lietošanai ir negatīvas sekas, kas var novest atpakaļ pie 20.gadsimta notikumiem, kad infekcijas slimības nebija ārstējamas. Jaunās paaudzes antibiotikas pēdējā laikā netiek izstrādātas, bet baktēriju spēja pielāgoties esošām zālēm pieaug.

## 1.1. Antibiotiku iedalījums

Antibiotikas var iedalīt pēc dažādiem principiem, piemēram, balstoties uz to iegūšanu vai uz ķīmisko uzbūvi un līdzīgām īpašībām.

Pēc iegūšanas veida tiek iedalīti – dabīgi, pussintētiski un sintētiski iegūtās antibiotikas.<sup>7</sup>



1.1.1. att. Antibiotiku iedalījums pēc iegūšanas veida

ES Padomes regula EEK Nr. 2377/90<sup>8</sup> ir noteikusi antibiotiku iedalījumu pēc to ķīmiskās uzbūves un īpašību līdzības (skat. 1.1.1.tabulu).

## Antibiotiku grupas un aktīvās vielas piederība

Antibiotiku grupa	Farmakoloģiski aktīvā viela
<b>Penicilīni</b>	amoksicilīns, ampicilīns, benzilpenicilīns, kloksacilīns, dikloksacilīns, nafcilīns, oksacilīns, fenoksimetilpenicilīns.
<b>Cefalosporīni</b>	cefacetrils, cefaleksīns, cefalonījs, cefapirīns, cefazolīns, cefkvīnoms, cefoperazons, ceftiofūrs.
<b>Hinoloni</b>	danofloksacīns, difloksacīns, enrofloksacīns, flumekvīns, marbofloksacīns, oksolīnskābe, sarafloksacīns
<b>Makrolīdi</b>	eritromicīns, spiramicīns, tilmikozīns, tilozīns, tulatromicīns, tilvalozīns.
<b>Florfenikols un attiecīgie savienojumi</b>	florfenikols, tiamfenikols.
<b>Tetraciklīni</b>	hlortetracikolīns, doksiciklīns, oksitetraciklīns, tetraciklīns.
<b>Naftalīna gredzena ansamicīns</b>	rifaksimīns
<b>Pleiromutilīni</b>	tiamulīns, valnemulīns
<b>Linkozamīdi</b>	linkomicīns, pirlimicīns
<b>Aminoglikozīdi</b>	apramicīns, dihidrostreptomicīns, gentamicīns, kanamicīns, neomicīns, paromomicīns, spektinomicīns, streptomicīns.
<b>Citas antibiotikas</b>	novobiocīns
<b>Polipeptīdi</b>	bacitracīns
<b>β-laktamazes inhibitori</b>	klavulānskābe
<b>Polimiksīni</b>	kolistīns

Gandrīz visos izpētītajos zinātniskajos rakstos sulfonamīdus un diaminopirimidīna atvasinājumus, piemēram, bakviloprims, trimetoprims, pieskaita pie antibiotikām, bet iepriekš minētajā regulā<sup>8</sup> tās tiek iedalītas zem ķīmijterapeitiskiem līdzekļiem.

Eksistē gram – pozitīvās un gram – negatīvās baktērijas un to nomākšanai tiek pielietoti attiecīgie antibakteriālie līdzekļi (ABL), kas norāda uz zāļu iedarbības mehānismu:

- 1) baktericīdā iedarbība – baktērijas tiek iznīcinātas, traucējot to šūnas apvalka vai tā satura veidošanu. Par piemēru tiek minēti – ciprofloksacīns, norfloksacīns, nalidiksābe (fluorhinoloni), penicilīns;
- 2) bakteriostatiska iedarbība – baktēriju vairošanās tiek apstādināta, bloķējot olbaltumvielu (OBV) ražošanu ribosomā un DNS replikāciju.<sup>9</sup>

## 1.2. Antibiotiku lietošana zivīs

Akvakultūra mūsdienu pasaulē tiek uzskatīta par strauji augošu industriju, kur gandrīz puse no tās veido zivs, kuru lieto cilvēki savā uzturā. Ražošanā tiek izmantoti lieli zivju krājumi, tomēr bieži notiek slimību uzliesmojumi, kā rezultātā tiek pielietoti ABL, kas ir kļuvuši par ierastu praksi.<sup>4,10</sup>

Slimību uzliesmojumi ir cieši saistīti ar dzīvotnēm, kas pārsvarā ir viens no galvenajiem slimību ierosinātājiem. Jāņem vērā, kāda ir ūdenstilpņu vide un kvalitāte, kā tiek barots, kādi ir turēšanas nosacījumi. Tiklīdz sāk mainīties apstākļi, piemēram, temperatūra, ūdens kvalitāte u.c., dzīvotnes iemītnieki sāk izjust stresu, kā rezultātā tiek novājināta imūnsistēma un tie vieglāk paļaujas baktēriju iedarbībai – notiek inficēšanās.

Lielākā daļa baktēriju, kas inficē zivis, ir gram – negatīvās baktērijas (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Vibrio* un *Pseudomonas* sugas), no gram – pozitīvām – *Streptococcus*.<sup>11</sup>

Pirmais svarīgais solis bakteriālās slimības kontrolē ir pareiza antibiotiku izvēle, tomēr vienlīdz svarīgas ir zināšanas par to ieteicamo ievadīšanas biežumu, devu, laiku, kas nepieciešams pēc pēdējās antibiotikas devas ievadīšanas līdz izvadišanas no organisma (svarīga informācija, kas attiecas uz produktīvām zivīm pirms to nokļūšanai pārdošanā).

Farmakokinētika pēta par šiem mainīgiem lielumiem, balstoties uz zāļu absorbēšanos, izplatību, ķīmiskām izmaiņām organismā un uz to izvadišanu.

Antibiotikas tiek ievadītas trīs galvenajos veidos:

- 1) injekcijas;
- 2) ar barību;
- 3) pievienojot dzīvotnēs.

**Injekcijas.** Vistiešākā un efektīvākā metode antibiotiku ievadīšanai asinsritē. Tomēr process ir samērā darbietilpīgs un nepraktisks, ja zivis tiek audzētas lielos apjomos komerciāliem nolūkiem. Piemērota metode, lai ārstētu svarīgas un dārgas zivis, kas ir mazā skaitā.

**Barībā.** Tā ir visrentablākā un biežāk lietotā metode, ievadot iekšķīgi kopā ar barību. Tiek iemaisīta pareizā antibiotiku deva barības ražošanas laikā vai pēc tās. Par saistvielu izmanto eļļas – zivju vai rapšu. Pēc tam zivis tiek barotas noteiktu dienu skaitu. Perorālai antibiotiku ievadīšanai ir būtiski savlaicīgi konstatēt inficēšanos, lai zivīm nepazūd apetīte un tās ēd. Pretējā gadījumā smagi slimās zivis vairs neēd, kas noved pie šo zivju izmiršanas.<sup>11</sup> No 2022.gada 28.janvāra stājās spēkā jauni grozījumi Regulā (ES) 2019/6, kas attiecas uz ārstniecisko barību, kura nevar saturēt vairāk nekā vienu antibakteriālā līdzekļa substanci, un kuras iegādei ir nepieciešama recepte (derīguma termiņš 2 nedēļas).<sup>12,13</sup>

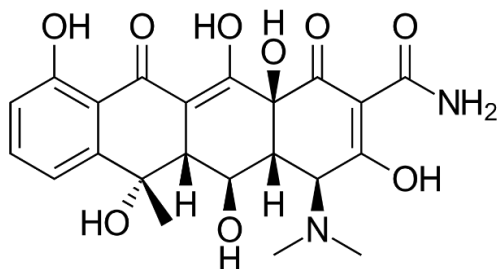
**Antibiotiku pievienošana dzīvotnēs.** Ļoti populārs antibiotiku ievadīšanas veids. Tomēr, lai sekmīgi zāles iedarbotos, tā ievadīšanai ir nepieciešami ļoti lieli daudzumi, salīdzinot ar perorālo vai injekciju ievadīšanas veidu. Ārstēšana netiek izvērtēta kā efektīva, jo pat lieli AB daudzumi ūdenī negarantē, ka tās nokļūs zivīs pietiekamā daudzumā. Un ir jāatceras, ka pārmērīgs antibiotiku daudzums ūdenī palielina ABR, kas ietekmē ūdenstīltnes kvalitāti un toksicitāti. Pēc katras zāļu ievadīšanas, vannā tiek nomainīts apmēram no 70% līdz 100% ūdens. Tādēļ ieteicams atsevišķas, smagi slimas zivis ārstēt atsevišķā tvertnē līdz brīdim, kad tās atsāk pastāvīgi ēst.

### 1.3. Antibiotiku atlieku izplatība zivīs

Zivis neefektīvi metabolizē antibiotikas, kā rezultātā aktīvā farmaceutiskā viela lielā mērā nonāk apkārtējā vidē<sup>14</sup>. Veikto pētījumu rezultāti liecina, ka aptuveni 70 – 80% akvakultūrā izmantotās antibiotikas piesārņo ūdens sistēmās.<sup>10</sup>

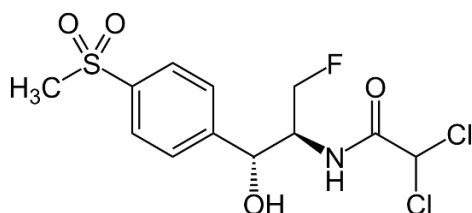
Atļautās antibiotikas akvakultūrā daudzās Eiropas valstīs atšķiras no ASV. Eiropā – oksitetraciklīns, florfenikols, sarafloksacīns, eritromicīns un sulfonamīdi (patentēti kopā ar trimetoprimu vai ormetoprimu)<sup>10</sup>, bet ASV iepriekš minēto aktīvo vielu skaits ir mazāks, tajā neietilpst sarafloksacīns, eritromicīns un no sulfonamīdu grupas tikai sulfadimetoksīns kopā ar ormetoprimu<sup>14</sup>.

**Oksitetraciklīns.** (sk. 1.2.1. att.) Uzskatāms par plaša spektra antibiotiku, efektīvāk darbojas kombinējot ar pārtiku. Ne visām sugām ir piemērotas, pievienojot dzīvotnēm. Kalcijijs un magnijs (ūdens cietības rādītājs), saistoties ar oksitetraciklīnu, to deaktivizē.



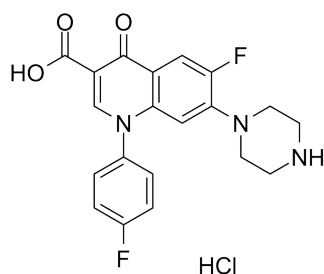
1.2.1. att. Oksitetraciklīns<sup>15</sup>

**Florfenikols.** (sk. 1.2.2. att.) Plaša spektra antibiotikas, kas tiek pievienotas barībai un tiek pārdotas ar recepti kā veterinārā barība. Apstiprināts lietošanai samiem, saldūdenī audzētiem lašveidīgajiem un citām zivīm, tostarp siltūdenī audzētām zivīm.



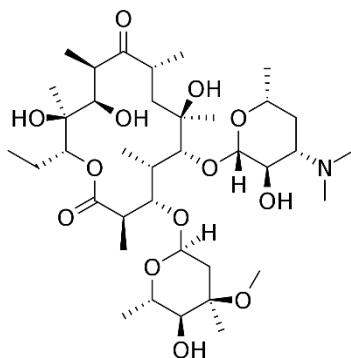
1.2.2. att. Florfenikols<sup>16</sup>

**Sarafloksacīns.** (sk. 1.2.3. att.) Pieskaitāms pie hinolonu grupas antibiotikām. Plaša spektra antibiotikas kā tetraciklīnu grupa, tiek iejaukta barībā.



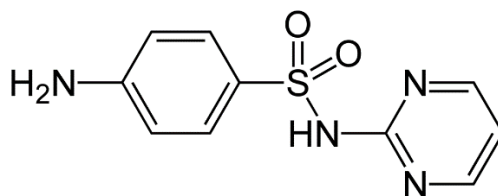
1.2.3. att. Sarafloksacīns<sup>17</sup>

**Eritromicīns.** (sk. 1.2.4. att.) Efektīvākais gram-pozitīvām baktērijām, tā lietošana ir rets gadījums, balstoties uz to, ka galvenie zivju slimības izraisītāji ir gram-negatīvās baktērijas, kā arī nav efektīvs pievienojot dzīvotnēm, to var ievadīt tikai injekciju veidā vai piejaucot barībai.



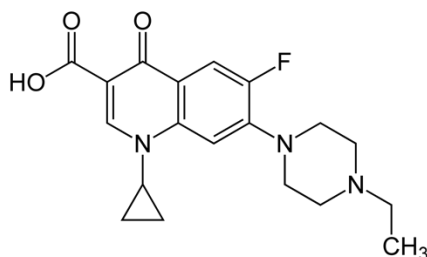
1.2.4. att. Eritromicīns<sup>18</sup>

**Sulfonamīdi.** (sk. 1.2.5. att.) Plaša spektra antibiotikas, ir daudz dažādu *sulfa*- zāļu veidu, tomēr tās vairs nav tik efektīvas kā kādreiz, nepareizas lietošanas dēļ. Parasti tiek kombinētas, piemēram, ar trimetoprimu.



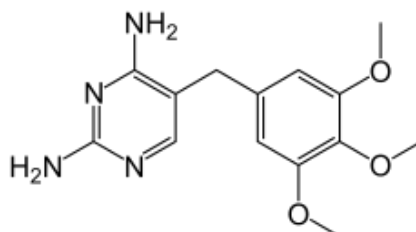
1.2.5. att. Sulfadiazīns<sup>19</sup>

**Enrofloksacīns.** (sk. 1.2.6. att.) Līdzīgi tetraciklīnu grupas antibiotikām, tiek uzskatītas par ļoti plaša spektra antibakteriāliem līdzekļiem. Visaktīvāk darbojas, kad ūdens vide ir skāba ( $\text{pH} \leq 6,9$ ), tomēr inhibējās cietā ūdenī.



1.2.6. att. Enrofloksacīns<sup>20</sup>

**Trimetoprimis.** (sk. 1.2.7. att.) Šī savienojuma aktīvā farmaceutiskā viela tiek kombinēta ar *sulfa*- grupas pārstāvi, kas pilnveido viena otru.



1.2.7. att. Trimetoprimis<sup>21</sup>

Zinātniskos pētījumos zivīs aizvien biežāk tiek meklētas visas antibiotiku grupas – hinoloni, makrolīdi, sulfonamīdi, tetraciklīni un pārējās grupas, jo zivju audzēšanā tiek izmantotas aizvien vairāk antibiotikas, kuras ir reģistrētas Eiropas Savienības valstīs kā antibakteriālie līdzekļi akvakultūrai<sup>22</sup>. Arī pēc Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestādes (EFSA) apkopotajiem datiem (1.pielikums), Eiropas valstīs tiek konstatētas vairākas AB atliekvielas, neskatoties uz to, ka vairumam koncentrācijas nepārsniedz maksimālo līmeni, tomēr tas norāda uz šo antibakteriālo medikamentu lietošanu akvakultūrā. Pārsvārā valstis, kuras nodarbojas ar akvakultūras produktu piesārņojuma izpēti, ir Brazīlija, Čīle, Argentīna (Dienvidamerika), Ķīna u.c. Āzijas valstis, piemēram, Vjetnama. Tas skaidrojams ar to, ka Āzijas valstīm pieder neapstrīdama pasaules

akvakultūras ražošanas līderpozīcija (89% no ražošanas apjoma), ko virza Ķīna, Indija, Indonēzija, Vjetnama, Bangladeša, kam seko citas Dienvidaustrumāzijas valstis.<sup>23</sup>

Par Eiropā audzēto zivju piesārņojumu ar antibiotiku atliekvielām ir daudz mazāk zinātnisko pētījumu, neskatoties uz to, ka varavīksnes forele ir vadošā saldūdens saimniecībā audzētā suga Eiropā.<sup>23</sup>

Izpētot vairākus rakstus par antibiotiku atliekvielu sastopamību Dienvidamerikā, Āzijā un Eiropā nozvejotajās zivīs, var pamanīt, ka gandrīz katrā atskaitē tiek pieminēts enrofloksacīns, tetraciklīnu grupas pārstāvji, trimetoprimis, retāk sulfanomīdi un florfenikols.<sup>24–29</sup>

Visbagātākie analizējamie objekti konstatēto analīžu skaitu ziņā izrādījās Dienvidamerikas valstu zivis – Čīles lašveidīgajos tika konstatēti 32 no 46 analīzēm, būtiski atzīmēt, ka visvairāk analīzi tika atrasti savvaļā audzētās zivīs, kas norāda jau uz citām būtiskām problēmām – apkārtējās vides piesārņojums. Argentīnā ezeros un ūdenskrātuvēs nozvejotās foreles, laši, pacu un paledes uzrādīja 42 no 46 savienojumiem, Brazīlijas tilapijā un forelēs tikai konstatēts tikai enrofloksacīns, kas saturēja 15% no visiem analizējamiem paraugiem.<sup>24</sup>

Mazāk savienojumu, tomēr daudz lielākas koncentrācijas, kuras arī pārsniedz MRL tika konstatētas Āzijas valstu audzētajās pangasijās, forelēs, zutīs, samos, tilapijās - 34 gadījumos tika ziņots par vērtībām attiecīgi diapazonā no 36–1340 un 138–830 µg/kg ciprofloksacīns un enrofloksacīns. Neomicīns, tetraciklīni, sulfonomīdi, trimetoprimis un amoksicilīns tika konstatēti koncentrācijās diapazonā attiecīgi no 656–1385, 110–365, 131–576, 76–790 un 394 µg/kg.<sup>27</sup>

No Eiropas valstīm – Norvēģijā audzētos, Portugālē pārdotos lašos 2019.gadā netika konstatētas nevienas antibiotiku atliekvielas, kas norāda uz Norvēģiju kā paraugvalsti akvakultūras ražošanā, kas spēj samazināt zāļu lietošanu līdzniecīgiem līmeņiem.<sup>27</sup>

Itālijas tirgū pieejamās zivīs 2018.gadā tika konstatēti tādi savienojumi kā enrofloksacīns (2 brekša paraugi), hlortetraciklīns (1 brekša paraugs), amoksicilīns (1 brekša paraugs), oksitetraciklīns (1 akmeņplekstes paraugs) un trimetoprimis (1 brekša un 1 foreles paraugs), to skaitliskais daudzums nav norādīts, bet tie atrodas zem MRL.<sup>30</sup>

Jūrā audzētajās zivīs, kuru izcelsme ir fermas no Grieķijas un Spānijas, 2011.gadā tika konstatētas tetraciklīna grupas atliekas. Oksitetraciklīna atlieku daudzums bija diapazonā 49 – 59 µg/kg, tetraciklīns 11,1 – 13,1 µg/kg. Sulfonomīdu grupas antibiotikas netika konstatētas.<sup>31</sup>

2016.gadā tika analizēti 20 zivju paraugi no dažādām Latvijas audzētavām, kur 12 paraugos tika konstatēts enrofloksacīns un trimetoprimis 0,33 – 12,2 µg/kg. Rezultāti nepārsniedz MRL, tādejādi nav kaitīgi cilvēku veselībai un nerada akūtu saindēšanos.<sup>28</sup>

Apkopojot iepriekš minēto – var secināt, ka Eiropas valstīs visas kvantificētās atliekvielas ir zemākas par Komisijas Regulas (ES) Nr. 37/2010 noteiktiem MRL (skat. 1.2.1.tabulu).

## (EK) Nr. 37/2010 noteiktie maksimāli pieļaujamie atliekvielu daudzumi zivīs

Farmaceutiski aktīvā viela	Marķieratliekas	Produktīvā dzīvnieka suga	MRL
<b>Amoksicilīns</b>	Amoksicilīns	Attiecībā uz zivīm minētais MRL attiecas uz “muskuļiem un ādu dabīgās proporcijās”.	50 µg/kg
<b>Enrofloksacīns</b>	Enrofloksacīna un ciprofloksacīna summa	Attiecībā uz zivīm minētais MRL attiecas uz “muskuļiem un ādu dabīgās proporcijās”.	100 µg/kg
<b>Hlortetraciklīns</b>	Pamatvielas un tās 4-epimēra summa	Attiecībā uz zivīm minētais MRL attiecas uz “muskuļiem un ādu dabīgās proporcijās”.	100 µg/kg
<b>Oksitetraciklīns</b>	Pamatvielas un tās 4-epimēra summa	Attiecībā uz zivīm minētais MRL attiecas uz “muskuļiem un ādu dabīgās proporcijās”.	100 µg/kg
<b>Tetraciklīns</b>	Pamatvielas un tās 4-epimēra summa	Attiecībā uz zivīm minētais MRL attiecas uz “muskuļiem un ādu dabīgās proporcijās”.	100 µg/kg
<b>Trimetoprimis</b>	Trimetoprimis	Attiecībā uz zivīm minētais MRL muskuļos attiecas uz “muskuļiem un ādu dabīgās proporcijās”.	50 µg/kg

Valstis, kuras eksportē dzīvnieku izcelsmes produktus uz Eiropas Savienību, katru gadu ir jāiesūta apstiprināšanai EK atliekvielu plāns kopā ar iepriekšējā gada atliekvielu uzraudzības programmu. Ja konkrētam produkta veidam atliekvielu plānu neapstiprina, tad produktu nevar eksportēt, neskatoties uz to, ka valsts un uzņēmums ir iekļauts atļauto valstu un uzņēmumu sarakstā.<sup>32</sup> EFSA kontrolē un apkopo monitoringa datus, katru gadu veicot atskaites. Akvakultūras ražošanas apjoms Eiropā no 2007.gada līdz 2019.gadam bija no 602,555 – 713,932 t. Būtiskas izmaiņas ir novērojamas 2020.gadā, jo tika saražots gandrīz trīs reizes lielāks produkcijas apjoms pēdējo 13 gadu laikā – 1868,224 t (skat. 1.2.6. att.).<sup>5,33</sup>

**Table 21:** Production of aquaculture and number of targeted samples over 2007–2020

Year	Production (t)	Targeted samples	% Samples tested/ 100 t <sup>(a)</sup>	Minimum 96/23/EC
2007 (EU 27)	602,555	9,257	1.50	
2008 (EU 27)	644,875	8,751	1.40	
2009 (EU 27)	627,109	8,606	1.30	
2010 (EU 27)	622,032	8,668	1.40	
2011 (EU 27)	655,772	8,241	1.30	
2012 (EU 27)	631,117	8,264	1.30	
2013 (EU 28)	614,191	7,971	1.30	
2014 (EU 28)	608,658	7,236	1.20	
2015 (EU 28)	633,541	7,246	1.20	1/100 t
2016 (MS 27) <sup>(b)</sup>	603,868	6,735	1.10	
2016 (EU 28)	645,068			
2017 (EU 28)	668,766	6,500	1.00	
2018 (EU 28)	692,821	6,482	0.97	
2018 (EU 27, IS) <sup>(c)</sup>	709,535			
2019 (EU 27, IS) <sup>(c)</sup>	713,932	6,759	0.95	
2020 (EU 27, IS, NO) <sup>(d)</sup>	1,868,224	8,177	0.44	

(a): in relation to the production of the previous year;

(b): data from France were not available for inclusion in the 2016 results report;

(c): data from Malta were not available for inclusion in the 2019 results report; IS: Iceland; NO: Norway;

(d): data from United Kingdom were not included in the 2020 results report; IS: Iceland; NO: Norway

#### 1.2.6. att. Akvakultūras produkcija un paraugu skaits 2007.-2020. gadam<sup>5</sup>

Salīdzinot 2019. un 2020.gada atskaites par akvakultūras monitoringa veiktām analīzēm, precīzāk par AB atliekvielu noteikšanu, abos dokumentos tiek uzsvērts, ka Latvija ir viena no valstīm, kas monitoringā neanalizē vismaz vienu akvakultūras paraugu uz tonnu produkcijas kā tas ir rekomendēts saskaņā ar Direktīvu 96/23/EC (2019. gadā – 0,87 paraugi/100 t, 2020. gadā 0,72 paraugi/100 t).

2020.gadā visās Eiropas valstīs kopumā no visiem analizētajiem paraugiem tika konstatēti neatbilstoši paraugi 0,19% gadījumā, konstatējot sulfadiazīnu, oksitetraciklīnu un tā 4-epimēra summu, trimetoprimu Itālijā un Francijā, savukārt, 2019.gadā tika konstatēts par vienu gadījumu mazāk un sastādīja – 0,11%, par rezultātiem ziņoja Bulgārija un Francija, uzrādot ciprofloksacīna un enrofloksacīna summas, florfenikola un tā metabolītu summas (izsaka ar florfenikolamīnu) neatbilstamību.

### 1.4. Antibiotiku ietekme

Aizvien biežāk tiek runāts, ka rezistentu baktēriju migrāciju no ūdens vides uz sauszemes vidi, kurā dzīvo cilvēki, var radīt kaitīgu ietekmi gan cilvēka, gan dzīvnieku veselību, kā arī uz ūdens ekosistēmu.<sup>10</sup>

Pārāk liela deva vai ilgs ārstēšanas laiks ar AB var novest pie toksicitātes riska, kā rezultātā tiek izraisītas galvenokārt aknu un nieru orgānu bojājumi, kas var novest pie neatgriezeniskām sekām. Svarīgi lietot svaigas un pareizi uzglabātas antibiotikas, jo pēc derīguma termiņa beigām vai nepareizas uzglabāšanas, tās kļūst mazāk efektīvas, vai pat pastāv toksicitātes iespējas. Kā arī ieteicams antibiotikas savā starpā nekombinēt, jo tās var traucēt viena otras iedarbībai, pavājināt vai pat to atcelt. Tāpēc daudzas bakteriālās infekcijas tiek ārstētas ar vienas antibiotikas ievadīšanu.<sup>11</sup>

Lietojot pārtiku, antibiotiku atliekvielas var būt potenciāls risks cilvēku veselībai. Lai izvērtētu cilvēka veselības risku, var ņemt vērā zivju ikdienas patēriņa daudzumu. Lai novērtētu veselības apdraudējumu, tiek izmantotas pieļaujamās dienas devas (ADI)<sup>26</sup>:

$$ADI = \frac{C \cdot IR}{EW} \quad (1.4.1.)$$

, kur  $C$  – atlasītās antibiotikas maksimālā koncentrācija zivju paraugā (slapjais svars), pieņemot “sliktāko scenāriju”,  $\mu\text{g/g}$ ;

$IR$  – atspoguļo zivju ikdienas patēriņu noteiktai vecuma grupai, ņemot vērā 150 g/dienā pieaugušajiem vai 75 g/dienā bērniem;

$BW$  – attiecas uz ķermeņa svaru, 70 kg pieaugušajiem un 20 kg septiņus gadus veciem bērniem (US EPA, 2011).

## 1.5. Antibiotiku atliekvielu kontrole

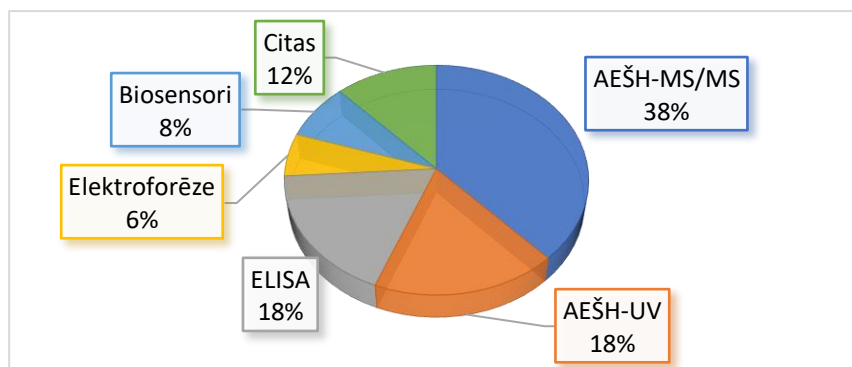
Garantija, ka dzīvnieku izcelsmes pārtikas produktos nav atliekvielu, kas kaitīgi ietekmē cilvēku veselību, ir viena no svarīgākajiem principiem, kas noteikts Eiropas Komisijas normatīvajos aktos. Lai pasargātu patērētāja veselību vairākas organizācijas, tādas kā Eiropas Komiteja (EK)<sup>22</sup>, Pārtikas Likumdošanas komisija (CAC)<sup>34</sup> un ASV Pārtikas un Zāļu pārvalde<sup>35</sup> ir noteikusi maksimāli pieļaujamos atlieku daudzumus veterinārajām zālēm dzīvnieku izcelsmes pārtikas produktos. Tie ir aplūkojami ES Regulā Nr. 37/2010/EK. Antibiotiku MRL ir ļoti atšķirīgi, tas arī ir atkarīgs no dzīvnieku sugas un izmeklējamās matricas.

Atjaunotajā Regulā (ES) 2019/6, sākot no 2022. gada 28. janvāra, paredz obligāto monitoringa sistēmu antibiotiku lietošanā lauksaimniecības jomā un obligāto valsts uzraudzību. Tomēr visām šīm noteiktām juridiskām prasībām ir maza praktiskā ietekme, ja nav izstrādātas atbilstošas analītiskās metodes, kuru pamatā ir selektivitāte, specifiskums, precizitāte, kā arī ātrs un efektīvs izpildes laiks.<sup>27</sup>

Latvijā par pārtikas drošību kontroli atbild Pārtikas un veterinārais dienests (PVD) sadarbībā ar Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātnisko institūtu “BIOR” kā nacionālo references laboratoriju, kur tiek veikti pārtikas produktu izmeklējumi.

## 1.6. Antibiotiku atliekvielu noteikšanas metodes ar AEŠH

Antibiotikas tiek noteiktas gan kvantitatīvi, gan kvalitatīvi. Ir vairākas noteikšanas metodes, tomēr viena no populārākajām un biežāk sastopamajām metodēm ir AEŠH-MS/MS, pateicoties automatizācijai, precīzai kvantitatīvai noteikšanai ar informāciju par analīta struktūru. Pārējās noteikšanas metodes ir AEŠH-UV, enzīmu imūnsorbcijas testi (ELISA), biosensori, elektroforēze.<sup>29,36</sup>



1.5.1.attēls. Antibiotiku atliekvielu noteikšanas metodes<sup>36</sup>

**Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija (AEŠH).** Unikāla analīzes metode, lai noteiktu ķīmiskos savienojumus, tostarp biopolimērus, mazas molekulas un polimērus. Metodes pamatā ir parauga izšķīdināšana, lai iegūtu šķīdumu, kurš tālāk tiek ievadīts kolonnā, kura satur sorbentu, kas mijiedarbojas ar paraugu. Pateicoties kolonnas sastāvam, tiek palēnināta parauga kustība caur to, un, paraugam izejot caur kolonnu, tas tiek atdalīts. Lai paraugs kustētos ir nepieciešama kustīgā fāze – šķīdinātājs, kurš nesīs paraugu un būs novērojams, ka dažādas molekulas paraugā izdalās dažādos aiztures laikos. Kolonnas galā ir jāatrodas detektoram, kurš, nosakot molekulu īpašības, uzrādīs hromatogrammu. Viens no detektora veidiem ir masspektrometrija (MS), kas mēra masas un lādiņa attiecību analizējamā parauga savienojumā.<sup>37,38</sup>

**Masspektrometrija.** Pateicoties šim detektoram, tiek noteikts arī masas fragments joniem, kas izveidojas jonizācijas un jonu atdalīšanas procesa gaitā – tiek noskaidrots, no kā sastāv paraugs. Kustīgā fāze no hromatogrāfa nonāk elektroizsmidzināšanas jonizācijas avotā, kur paaugstinātas temperatūras un sprieguma iedarbībā, solventa molekulas desolvatējas un analīta molekulas nonāk tālāk masas analizatorā. Mainoties pievadītai strāvas polaritātei, tiek iegūti vai nu pozitīvi, vai negatīvi joni. Pozitīvie joni – tiek piesaistītas pozitīvi lādētas daļiņas, kas ir  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_3^+$ , negatīvie joni – tiek atšķelts protons. Tandēma masspektrometrs (MS/MS) veic vairākkārtīgu masspektrometriju – sastāv no trim masu analizatoriem, kur pirmais izolē molekulāro jonu, otrais stabilizē un fragmentē molekulāros jonus, un trešais izolē visus iepriekš radītos savienojuma fragmentus.<sup>37</sup>

Šobrīd tiek pētītas paraugu sagatavošanas, lai noteiktu pēc iespējas vairāk savienojumu, apvienojot visas antibiotiku grupas vienā metodē, t. s. multi-metode.

Atsaucoties uz antibiotiku īpašību dažādību, ļoti grūti nonākt pie labas paraugu attīrīšanas metodes bez nosakāmo analītu zudumiem. Parasti tiek veikta ekstrakcija ar organisku šķīdinātāju, tālāk notiek attīrīšana un attīrītā ekstrakta iekonzentrēšana, pēc kuras paraugs tiek ievadīts AEŠH-MS/MS.

Salīdzinot vairākus zinātniskos rakstus (2.pielikums), var redzēt, ka pārsvarā tiek analizēti apmēram 40 – 42 analīti, optimālais iesvars ir 2 g. Nekur netiek izmantoti sāļu maisījumi paraugu sagatavošanas procesā, jo tie rada zudumus atsevišķām antibiotiku grupām.<sup>2,39</sup> Par ekstrakcijas šķīdumu vislabāk tiek izvēlēts acetonitrils, nav ieteicams lietot ekstrakcijas šķīdumu, kurš paskābināts ar trilhoretiķskābi (TCA), jo tālāk tas netiek neitralizēts vai netiek veikta attīrīšanas procedūra, piemēram, cietfāzes ekstrakcija.<sup>27</sup> Tādā veidā skābe tiek ievadīta pa tiešo iekārtā, kas var ietekmēt tālāko instrumentālo analīzi – TCA grūti izskalot no sistēmas un paātrina detaļu nodilšanu. Tā uzvedas kā jonu pāra reaģents, kas konkurē ar analītu par lādiņu, kā rezultātā MS jutība negatīvajā režīmā ievērojami pasliktinās. Piemērotākā attīrīšanas metode ir fosfolipīdu cietfāzes ekstrakcijas kolonnas(FCEK) vai izsaldēšana.<sup>14,40</sup> Ietvaicēšana būtu vēlams posms paraugu sagatavošanā, pirms paraugs tiek ievadīts iekārtā, jo tad tiek palielināta analītu koncentrācija un iespēja tikt pie intensīvākām smailēm.

**Optimizācija.** Nepieciešama, lai iegūtu pēc iespējas labāko risinājumu definētai problēmai. Galvenais mērķis ir maksimāli samazināt vai palielināt noteiktus metodes parametrus, piemēram, samazināt metodes izmaksas, paraugu sagatavošanas un instrumentālās metodes laiku, palielināt izmeklējamu analītu daudzumu un rezultātu atkārtojamību, precizitāti.<sup>37</sup>

## 2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Metode paredzēta antibiotiku atliekvielu noteikšanai zivs muskulatūras paraugos. Metode ietver savienojumu ekstrakciju ar acetonitrilu, ekstrakta attīrīšanu ar fosfolipīdu cietfāzes ekstrakcijas kolonnām, ietvaicēšanu, sausā atlikuma šķīdināšanu un detektēšanu ar šķidrums hromatogrāfiju – tandēma masspektrometriju.

### 2.1. Materiāli un izejvielas

Ekstrakcijai izmantots acetonitrils (AEŠH tīrības pakāpe), metanols (AEŠH tīrības pakāpe), dejonizēts ūdens (no Milli-Q attīrīšanas iekārtas), skudrskābe (ACS tīrības pakāpe), cietfāzes ekstrakcijas kolonnas Phree Phospholipid Removal 1 mL (Phenomenex).

Ekstrakciju filtrēšanai izmantoti centrifūgas filtri ar poru izmēru 0,22 μm. Sausā atlikuma šķīdināšanai izmantots metanols un dejonizēts ūdens (AEŠH tīrības pakāpe).

Standartpiedevas metodei izmantoti antibiotiku standartšķīdumi (vismaz 95% tīrība): 4-epitetraciklīns, amoksicilīns, ampicilīns, bakviloprimis, cefacetils, cefadroksils, cefaleksīns, cefalonijs, cefalotīns, cefapirīns, cefazolīns, cefkvinoms, cefoperazons, ceftiofūrs, cinka bacitracīns, cinoksacīns, ciprofloksacīns, danofloksacīns, desacetilcefapirīns, difloksacīns, dihlorizoevernīnskābe, dikloksacilīns, doksiciklīns, enfloksacīns, eritromicīns, florfenikols, flumekvīns, ftalilsulfatiazols, gamitromicīns, hlorfenikols, jozamicīns, kitasamicīns(leikomicīns), klindomicīns, kloksacilīns, linkomicīns, marbofloksacīns, nafcilīns, nalidiksskābe, natamicīns, neo spiramicīns, norfloksacīns, novobiocīns, oksacilīns, oksitetraciklīns, oksolīnskābe, oleandomicīns, orbifloksacīns, penicilīns G, penicilīns V, pirlimicīns, rifaksimīns, sarafloksacīns, spiramicīns, sulfacetamīds, sulfadiazīns, sulfadimetoksīns, sulfadimidīns, sulfadoksīns, sulfafurazols, sulfaguanidīns, sulfahloropiridazīns, sulfaklozīns, sulfakvinoksālīns, sulfamerazīns, sulfametiazols, sulfamonometoksīns, sulfapiridīns, sulfatiazols, tetraciklīns, tiamfenikols, tiamulīns, tildipirozīns, tilmikozīns, tilozīns, tilvalozīns, trimetoprimis, tulatromicīns A, valnemulīns.

Pamatšķīdumi tika pagatavoti ar koncentrāciju 1000 ng/μL 10 mL mērkolbās. Nepieciešamās standartvielas masas, kas tika aprēķinātas, ņemot vērā tās tīrības pakāpi, tika iesvērtas un izšķīdinātas atbilstošajos šķīdinātājos (3.pielikums) – acetonitrilā, metanolā, paskābinātā ūdenī, dimetilsulfoksīda un to maisījumos – līdz atzīmei. Šķīdumi ir derīgi 12 mēnešus, glabājot -20°C temperatūrā.

Paraugu sagatavošanā tiek izmantots AB darba standartšķīdums ar koncentrāciju atbilstoši katram savienojumam (4.pielikums). Attiecīgais pamatšķīduma tilpums tiek pievienots 10 mL mērkolbā un atšķaidīts līdz atzīmei ar acetonitrilu.

Nepieciešamie trauki paraugu sagatavošanā un analīzes veikšanā – analītiskie sviri ar precizitāti  $\pm 0,0001$  g (Kern 770), termostatējama centrifūga, sildīšanas iekārtas un slāpekļa ietvaicēšanas sistēma, mērkolbas 1000 mL un 10 mL (A klase), centrifūgas polipropilēna mēģenes 15 mL, automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu 20, 200, 1000 un 5000  $\mu$ L, cietfāzes ekstrakcijas kolonnas Phree Phospholipid Removal 1 mL (Phenomenex), centrifūgas filtri ar poru izmēru 0,22  $\mu$ m, mehāniskais kratītājs (BioSan un Vortex), ultraskaņas vanna, autosamplera stikla pudelītes.

## **2.2. Paraugu sagatavošana**

Pirms paraugu analizēšanas, tas tika homogenizēts viendabīgā masā un uzglabāts  $-18^{\circ}\text{C}$  temperatūrā PE maisiņos.

2 g homogenizēta parauga iesvēra 15 mL polipropilēna centrifūgas stobriņā. Kalibrēšanas paraugiem un kontrolparaugiem pievienoja 50  $\mu$ L darba standartšķīduma. Pievienoja 3 mL acetonitrila, vibrācijas režīmā maisīja 15 minūtes ar BioSan maisītāju un centrifugēja 10 minūtes 3500 apgr/min. Veica attīrīšanu ar cietfāzes ekstrakcijas kolonnām - aktivizējot kolonnu ar 500  $\mu$ L acetonitrila ar neliela vakuuma palīdzību, uznesa 2 ml iegūta ekstrakta filtrēšanai, mazgāja ar 300  $\mu$ L acetonitrila. Iegūto ekstraktu ietvaicēja līdz sausam  $50^{\circ}\text{C}$  slāpekļa plūsmā. Sauso atlikumu izšķīdināja 300  $\mu$ L kustīgās fāzes A un B maisījumā (9:1, v/v) un sajauca ar Vortex. Nepieciešamības gadījumā paraugi tika filtrēti, izmantojot centrifūgas filtrus ar poru izmēru 0,22  $\mu$ m.

## **2.3. Instrumentālā analīze**

Antibiotiku atliekvielu noteikšanu veica, injicējot filtrētos ekstraktus AEŠH Thermo Scientific Ultimate 3000, kas savienots ar masspektrometru Thermo Scientific TSQ Qunativa, kam ir apsildāms elektroizsmidzināšanas jonizācijas avots (sk. 2.3.1. tabulu).

## Instrumentālie parametri

Šķidrums hromatogrāfa instrumentālie parametri		
<b>Kolonna</b>	Hypersil GOLD 50x2,1 mm ar daļiņu izmēru 1,9 μm	
<b>Kolonnas temperatūra</b>	30 °C	
<b>Temperatūra paraugu nodalījumā</b>	10 °C	
<b>Kustīgā fāze A</b>	H <sub>2</sub> O + 0,1% skudrskābe	
<b>Kustīgā fāze B</b>	MeOH + 0,1% skudrskābe	
<b>Plūsmas ātrums</b>	0,3 mL/min	
<b>Injekcijas tilpums</b>	10,0 μL	
Gradients programma		
<b>Laiks, min</b>	<b>A, %</b>	<b>B, %</b>
<b>0,00</b>	90,0	10,0
<b>4,00</b>	70,0	30,0
<b>5,00</b>	70,0	30,0
<b>8,00</b>	5,0	95,0
<b>10,50</b>	5,0	95,0
<b>11,00</b>	90,0	10,0
<b>15,00</b>	90,0	10,0
Masspektrometra instrumentālie parametri		
<b>Jonizācijas veids</b>	Elektroizsmidzināšanas interfeiss pozitīvajā (ESI(+)) un negatīvajā (ESI(-)) jonizācijas režīmā	
<b>Skenēšanas tips</b>	MRM	
<b>Skenēšanas diapazons</b>	50-1000 m/z	
<b>Skenēšanas frekvence</b>	1 Hz	
<b>Kapilāra spriegums</b>	4500 V	
<b>Izsmidzinātāja spriegums</b>	2 bar	
<b>Iztvaicēšanas gāzes (N<sub>2</sub>) plūsmas ātrums</b>	10 L/min	
<b>Iztvaicēšanas gāzes (N<sub>2</sub>) temperatūra</b>	180°C	
<b>Jonu pārneses caurules temperatūra</b>	280°C	
<b>Iztvaicētāja temperatūra</b>	350°C	

Optimālai savienojumu atdalīšanai uz kolonnu tiek pievadītas kustīgās fāzes (0,1% skudrskābe dejonizētā ūdenī un metanolā) pēc gradienta programmas, kuras ilgums ir 15 min.

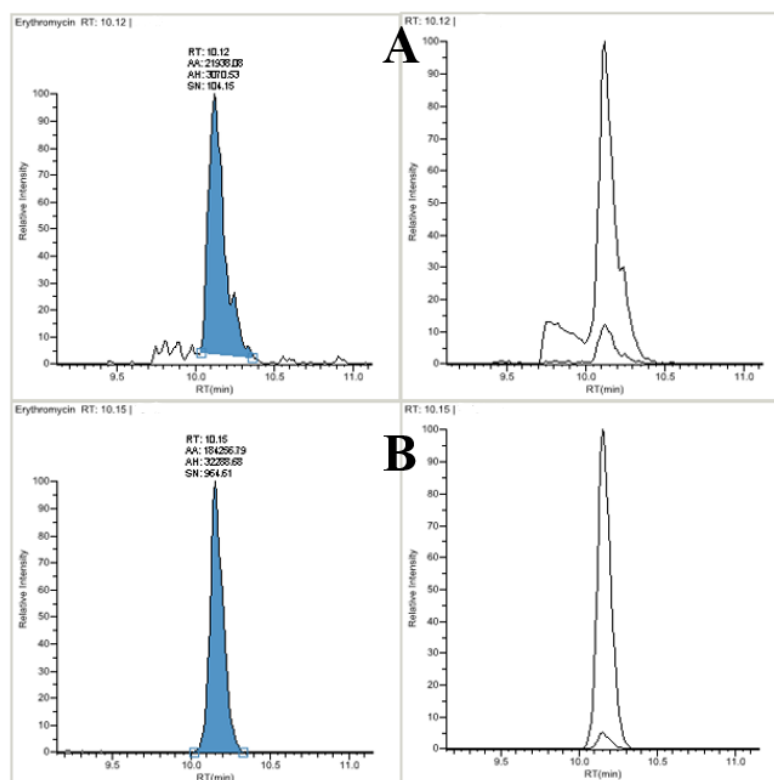
### 3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Iepriekš izstrādātā, optimizētā un validētā metode antibiotiku atliekvielu noteikšanai zivs paraugos<sup>14</sup>, tika paplašināta ar 37 jaunu savienojumu detektēšanu, kam tika piemeklētas attiecīgās pārejas un sadursmju enerģijas un tika pārbaudīta esošās metodes piemērotība jauno savienojumu noteikšanai. Kā rezultātā, tika iegūta optimizēta multi-antibiotiku atliekvielu noteikšanas metode zivīs, kas spēj noteikt 79 analītus, kas pārstāv 7 antibiotiku grupas.

#### 3.1. Optimizācija

Antibiotiku atliekvielu noteikšanas metode tika paplašināta ar 37 jaunu analītu noteikšanu – 4-epitetraciklīns, bakviloprimis, cefadroksils, cefalonijis, cefalotīns, cefapirīns, cefazolīns, cinoksačīns, ciprofloksačīns, desacetilcefapirīns, dihlorizoevernīnskābe, flumekvīns, ftalilsulfatiazols, gamitromicīns, klindomicīns, nafcilīns, natamicīns, neo spiramicīns, oksolīnskābe, oleandomicīns, penicilīns V, pirlimicīns, sulfacetamīds, sulfadiazīns, sulfadoksīns, sulfafurazols, sulfaguanidīns, sulfaklozīns, sulfakvinoksalīns, sulfamerazīns, sulfamonometoksīns, sulfapiridīns, tiamfenikols, tildipirozīns, tilvalozīns, tulatromicīns A, valnemulīns. Standartšķīdums ar koncentrāciju 10 ng/μL tika pagatavots no 37 jauniem savienojumiem. Pēc standartšķīduma pagatavošanas tika veikta analītu pāreju skenēšana un sadursmju enerģijas optimizēšana, ievadot šķīdumu pa tiešo masspektrometriskajā detektorā (5. pielikums).

Paraugu sagatavošana ir viens no galvenajiem faktoriem, kas var palielināt metodes jutību, tādēļ ir svarīgi paraugu pēc iespējas labāk attīrīt pirms instrumentālās analīzes. Antibiotiku atliekvielu multi-metodes paraugu sagatavošanā tika izmantotas FCEK attīrīšanai, jo zivs muskulatūra ir sarežģīta matrica, kura satur lielmolekulāros savienojumus – fosfolipīdus, lipīdus, lipoproteīnus, ogļhidrātus u.c. Šie traucējošie komponenti būtiski ietekmē metodes selektivitāti (sk. 3.1.1.att.) – hromatogrammās ir novērojami fona trokšņi un signāli, kas neatbilst meklējamiem analītiem, samazinās MS detektēšanas jutība. Rezultātā, neattīrot matricas ekstraktu paraugu sagatavošanas laikā, operators var saskarties ar grūtībām pareizas AB atliekvielu koncentrācijas aprēķināšanai. Izmantojot FCEK tika selektīvi atdalīti fosfolipīdi, izgulsnējot proteīnus, neradot analītu zudumu, kā tas varētu būt ar citām cietfāzes ekstrakcijas (SPE) kolonnām, un sasniegta optimālā efektivitāte analītu noteikšanai ar masspektrometrijas metodi.



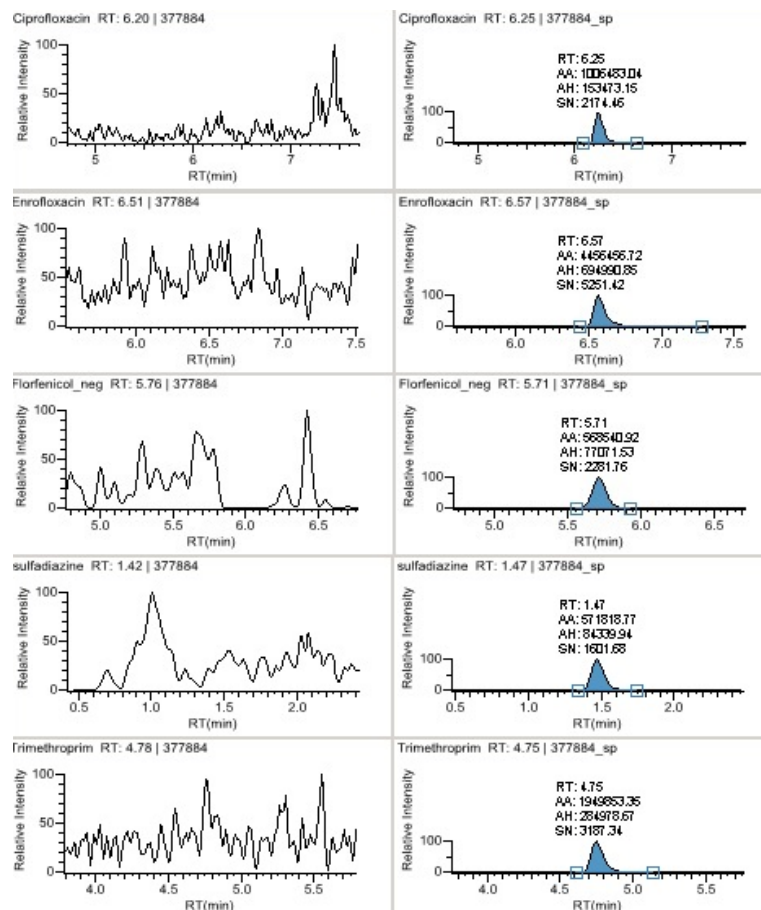
3.1.1.att. Eksperimentā iegūtās hromatogramma eritromicīna noteikšanai: A – bez ekstrakta attīrīšanas, B – attīrīšanai izmantotas FCEK.

## 3.2. Metodes validācija

Metodes validācija ir nepieciešama, lai ar objektīviem apliecinājumiem apstiprinātu metodes atbilstību paredzētajam lietošanas nolūkam. Metodes veikspējas parametru noteikšanas prasības ir norādītas Komisijas Īstenošanas regulā (ES) 2021/808<sup>41</sup>. Par galvenajiem parametriem tiek uzskatīta selektivitāte, lēmuma robeža  $CC\alpha$ , precizitāte, ticamība un robustums.

Validācijas eksperimentiem kā matrica tika izmantota zivs muskulatūra. Eksperimenta plāns tika sastādīts saskaņā ar konvenciālo metodi, kur trīs dažādās dienās tika mainīti tādi faktori kā eksperti, iztvaicēšanas gāzes, iztvaicēšanas temperatūras, lai pārbaudītu metodes veikspējas noturību dažādos eksperimenta apstākļos.

**Metodes selektivitāte.** Tā ir spēja atšķirt analizējamo vielu, no citām paraugā esošām vielām. Tika pagatavoti tukši matricas (zivs muskulatūras) paraugi un salīdzināti ar tās pašas matricas paraugu, kam pievienota AB standartpiedeve (skat.3.2.1. att.). Metode uzrādīja labu selektivitāti visiem nosakāmajiem savienojumiem, jo analītu raksturīgajā aiztures laikā netika novērotas traucējošās smailes no matricas.



### 3.2.1. att. Kvantificēto analītu hromatogrammu piemērs metodes selektivitātei

**Lēmuma un noteikšanas robežas.** Lēmuma robeža ( $CC\alpha$ ) ir robeža, pie kuras vai virs kuras ar 1% varbūtības kļūdu var secināt, ka paraugs ir neatbilstošs.

Kvantitatīvā noteikšanas robeža (LOQ) ir koncentrācija paraugā, pie kuras signāla un trokšņa attiecība  $\geq 10$ . Tā tika novērtēta analizējot tukšos paraugus ar standarpiedevas koncentrācijām no 0,1 līdz 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , par LOQ pieņemot mazāko koncentrāciju, kas atbilst minētai attiecībai.

Metodes lēmuma robežu noteikšanai tika analizēti paraugi ar standarpiedevām koncentrāciju diapazonā 0,1 MRL – 1,5 MRL, kas ir saskaņā ar jauno Komisijas Īstenošanas regulu (ES) 2021/808, ar izņēmumu, ja nevar detektēt 0,1 MRL, tiek ņemts no 0,1 līdz 0,5 MRL.<sup>41</sup>  $CC\alpha$  tika aprēķināta pēc 3.2.1. vienādojuma.

$$CC\alpha = MRL + 1,64 \cdot U_c \quad (3.2.1.)$$

, kur  $CC\alpha$  – lēmuma robeža,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;

$MRL$  – maksimāli pieļaujama līmenis,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;

$U_c$  – kopējā standarta mērījumu nenoteiktība MRL.

Maksimālo  $CC\alpha$  aprēķina pēc 3.2.2. vienādojuma

$$CC\alpha_{max} = MRL + 1,89 \cdot MRL \cdot (2^{1-0,5 \cdot \log C} / 100\%) \quad (3.2.2.)$$

, kur  $CC\alpha_{max}$  – maksimāli pieļaujamā  $CC\alpha$ ,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;

$MRL$  – maksimāli pieļaujamais līmenis,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;

$C$  – koncentrācijas, kas izteikta pakāpes formā,  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (piemēram,  $100 \cdot 10^{-9} \mu\text{g}/\text{kg}$ , kas atbilst  $MRL$ , kas ir  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Rezultāti ir salīdzināti un apkopoti 3.2.1.tabulā. Tie norāda uz metodes pieņemamu rezultātu ticamību un precizitāti, jo visas aprēķinātās  $CC\alpha$  robežvērtības ir tuvas  $MRL$  vērtībai.

3.2.1. tabula

Antibiotiku lēmuma, noteikšans un maksimālā lēmuma robežas

Savienojums	Kalibrācijas taisnes intervāls, $\mu\text{g}/\text{kg}$	LOQ, $\mu\text{g}/\text{kg}$	$CC\alpha$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$	Maksimālā $CC\alpha$ , $\mu\text{g}/\text{kg}$
<b>4-epi-tetraciklīns</b>	25 – 200	5,0	114	143
<b>Amoksicilīns</b>	12,5 – 100	25	59	74
<b>Ampicilīns</b>	12,5 – 100	15	57	74
<b>Bakviloprims</b>	15 – 120	15	31	88
<b>Cefacetrīls</b>	25 – 200	30	34	143
<b>Cefadroksils</b>	12,5 – 100	10	28	74
<b>Cefadroksils</b>	12,5 - 100	10	21	74
<b>Cefaleksīns</b>	50 - 400	10	225	277
<b>Cefalonijs</b>	10 - 80	8,0	15	60
<b>Cefalotīns</b>	12,5 - 100	10	22	74
<b>Cefapirīns</b>	12,5 - 100	5,0	56	74
<b>Cefazolīns</b>	25 - 200	5,0	33	143
<b>Cefkvinoms</b>	12,5 - 100	10	57	74
<b>Cefoperazons</b>	12,5 - 100	10	18	74
<b>Ceftiofūrs</b>	250 - 2000	10	1233	1302
<b>Cinka Bacitracīns</b>	25 - 200	30	53	210
<b>Cinoksacīns</b>	12,5 - 100	1,0	16	74
<b>Ciprofloksacīns</b>	25 - 200	0,1	114	143
<b>Danofloksacīns</b>	50 - 400	1,0	123	143
<b>Desacetilcefapirīns</b>	12,5 - 100	5,0	57	74
<b>Difloksacīns</b>	150 - 1200	1,0	401	409
<b>Dihlorizoevernīnskābe</b>	12,5 - 100	5,0	57	74
<b>Dikloksacilīns</b>	75 - 600	30	337	409
<b>Doksiciklīns</b>	25 - 200	10	125	143
<b>Enrofloksacīns</b>	25 - 200	0,1	119	143
<b>Ertitromicīns</b>	50 - 400	5,0	269	277

Savienojums	Kalibrācijas taisnes intervāls, µg/kg	LOQ, µg/kg	CCα, µg/kg	Maksimālā CCα, µg/kg
Flumekvīns	75 - 600	5,0	232	277
Florfenikols	75 - 600	0,1	329	450
Ftalilsulfatiazols	5,0 - 40	5,0	12	16
Gamitromicīns	25 - 200	5,0	59	74
Hlortetraciklīns	25 - 200	5,0	120	143
Josamicīns	25 - 200	5,0	34	143
Kitasamicīns	25 - 200	20	41	143
Klindomicīns	12,5 - 100	1,0	21	74
Kloksacilīns	75 - 600	10	346	409
Linkomicīns	25 - 200	1,0	106	143
Marbofloksacīns	37,5 - 300	1,0	164	210
Nafcilīns	75 - 600	10	339	409
Nalidikskābe	5,0 - 40	1,0	7,0	277
Natamicīns	12,5 - 100	10	21	74
Neo spiramicīns	50 - 400	10	232	277
Norfloksacīns	12,5 - 100	5,0	17	74
Novobiocīns	12,5 - 100	5,0	22	74
Oksacilīns	75 - 600	10	363	409
Oksitetraciklīns	25 - 200	5,0	125	143
Oksolīnskābe	25 - 200	5,0	112	143
Oleandomicīns	12,5 - 100	5,0	17	74
Orbifloksacīns	25 - 200	5,0	46	143
Penicilīns G	12,5 - 100	25	60	74
Penicilīns V	12,5 - 100	12,5	30	38
Pirlimicīns	25 - 200	5,0	118	143
Rifaksimīns	12,5 - 100	5,0	18	74
Sarafloksacīns	7,5 - 60	1,0	12	45
Spiramicīns	50 - 400	10	231	277
Sulfacetamīds	5,0 - 40	5,0	13	16
Sulfadiazīns	5,0 - 40	0,5	12	16
Sulfadimetoksīns	5,0 - 40	1,0	12	16
Sulfadimidīns	5,0 - 40	1,0	11	16
Sulfadoksīns	5,0 - 40	1,0	13	16
Sulfafurazols	5,0 - 40	1,0	12	16
Sulfaguanidīns	5,0 - 40	1,0	12	16
Sulfahlorpiridazīns	5,0 - 40	1,0	12	16
Sulfaklozīns	5,0 - 40	5,0	13	16
Sulfakvinoksalīns	5,0 - 40	1,0	12	16
Sulfamerazīns	5,0 - 40	1,0	11	16
Sulfametiazols	5,0 - 40	1,0	11	16
Sulfamonometoksīns	5,0 - 40	1,0	11	16
Sulfapiridīns	5,0 - 40	1,0	13	16

Savienojums	Kalibrācijas taisnes intervāls, µg/kg	LOQ, µg/kg	CCα, µg/kg	Maksimālā CCα, µg/kg
Sulfatiazols	5,0 - 40	1,0	12	16
Tetraciklīns	25 - 200	5,0	115	143
Tiamfenikols	12,5 - 100	10	55	74
Tiamulīns	25 - 200	1,0	114	143
Tildipirozīns	100 - 800	10	412	539
Tilmikozīns	12,5 - 100	5,0	60	74
Tilozīns	25 - 200	5,0	114	143
Tilvalozīns	12,5 - 100	5,0	64	74
Trimetroprīms	25 -200	0,1	59	74
Tulatromicīns A	125 - 1000	10	392	409
Valnemulīns	25 - 200	10	61	143

**Ticamība, atkārtojamība, reproducējamība.** Parametru noteikšanai tikai analizēti 45 paraugi ar standartpiedevām koncentrāciju diapazonā 0,1 MRL – 1,5 MRL. Aprēķini tika veikti pēc 3.2.3. un 3.2.4. vienādojumiem, apkopotie rezultāti redzami 3.2.2. tabulā.

$$u_{gadījuma} = \frac{Sn}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (3.2.3.)$$

, kur  $u_{gadījuma}$  - standartnenoteiktība gadījuma kļūdu dēļ (precizitāte), %;

$Sn$  – standartnovirze starp kvalitātes kontroles paraugiem, µg/kg;

$\bar{x}$  – kvalitātes kontroles parauga vidējā koncentrācija, µg/kg.

$$u_{sistemātiskās} = \left| \frac{\overline{C_{sp}} - \overline{C_{bl}}}{C_{sp}} - 1 \right| \cdot 100\% \quad (3.2.4.)$$

, kur  $u_{sistemātiskās}$  – standartnenoteiktība sistemātisko kļūdu dēļ (ticamība), %;

$C_{sp}$  – kvalitātes kontroles parauga teorētiskā koncentrācija, µg/kg;

$\overline{C_{sp}}$  – kvalitātes kontroles paraugu vidējā koncentrācija, µg/kg;

$\overline{C_{bl}}$  – vidējā koncentrācija kvalitātes kontroles paraugam bez standartpiedevas, µg/kg.

Metode ir ticama, jo tās ticamības diapazons ir no 81 līdz 134%. Reproducējamības diapazons no 3 līdz 26% norāda uz metodes precizitāti.

**Metodes nenoteiktība.** Tas ir nenegatīvs parametrs, kas ir saistīts ar mērījuma rezultātu un raksturo to vērtību izkliedi, kuras varētu saprātīgi attiecināt uz mērāmo lielumu, pamatojoties uz izmantoto informāciju. Paplašinātās mērījuma nenoteiktības novērtēšanai veic paraugu atkārtotus mērījumus ar standartpiedevu un aprēķina mērījumu relatīvo standartnovirzi (metodes precizitāte) un novirzi no pieņemtās teorētiskās vērtības (metodes ticamība). Pārklāšanās koeficients  $k$  ir vienāds ar

1,64 savienojumiem, kam ir noteikts MRL, un attiecīgi ar 2,34 – savienojumiem, kam nav noteikts MRL vai kuru izmantošana ir aizliegta.

Nonoteiktība tika aprēķināta pēc 3.2.5. vienādojuma. Rezultāti apkopoti 3.2.2. tabulā.

$$U_c = k \cdot \sqrt{u_{\text{gadījuma}}^2 + u_{\text{sistemātiskās}}^2} \quad (3.2.5.)$$

, kur  $U_c$ - metodes kombinētā paplašinātā nenoteiktība, %;

$k$  – pārklšanās koeficients;

$u_{\text{gadījuma}}$  - standartnenoteiktība gadījuma kļūdu dēļ (precizitāte), %;

$u_{\text{sistemātiskās}}$  – standartnenoteiktība sistemātisko kļūdu dēļ (ticamība), %.

3.2.2. tabula

Antibiotiku noteikšanas metodes ticamība un precizitāte

Savienojums	$U_{\text{sistemātiskā}}, \%$	$U_{\text{gadījuma}}, \%$	Atgūstamība, %	$U_c, \%$
<b>4-epi-tetraciklīns</b>	4,0	7,0	108	15
<b>Amoksicilīns</b>	9,0	9,0	99	20
<b>Ampicilīns</b>	3,0	6,0	103	7,0
<b>Bakviloprims</b>	9,0	27	134	82
<b>Cefacetrils</b>	8,0	9,0	102	19
<b>Cefadroksils</b>	14	14	100	33
<b>Cefaleksīns</b>	2,0	6,0	107	12
<b>Cefalonijs</b>	8,0	10	103	20
<b>Cefalotīns</b>	16	16	105	39
<b>Cefapirīns</b>	3,0	5,0	98	6,0
<b>Cefazolīns</b>	7,0	8,0	100	16
<b>Cefkvinoms</b>	2,0	7,0	100	3,0
<b>Cefoperazons</b>	10	10	101	24
<b>Ceftiofūrs</b>	3,0	11	99	5,0
<b>Cinka Bacitracīns</b>	16	16	105	39
<b>Cinoksacīns</b>	6,0	8,0	97	16
<b>Ciprofloksacīns</b>	2,0	7,0	109	15
<b>Danofloksacīns</b>	5,0	11	102	9,0
<b>Desacetilcefapirīns</b>	3,0	8,0	96	8,0
<b>Difloksacīns</b>	13	15	100	21
<b>Dihlorizoevernīnskābe</b>	4,0	7,0	100	7,0
<b>Dikloksacilīns</b>	3,0	5,0	104	8,0
<b>Doksiciklīns</b>	4,0	12	96	9,0
<b>Enrofloksacīns</b>	2,0	9,0	104	7,0
<b>Ertitromicīns</b>	5,0	16	90	18
<b>Flumekvīns</b>	4,0	8,0	106	12
<b>Florfenikols</b>	4,0	6,0	124	40
<b>Ftalilsulfatiazols</b>	6,0	11	97	19
<b>Gamitromicīns</b>	8,0	9,0	107	17
<b>Hlortetraciklīns</b>	3,0	10	102	6,0

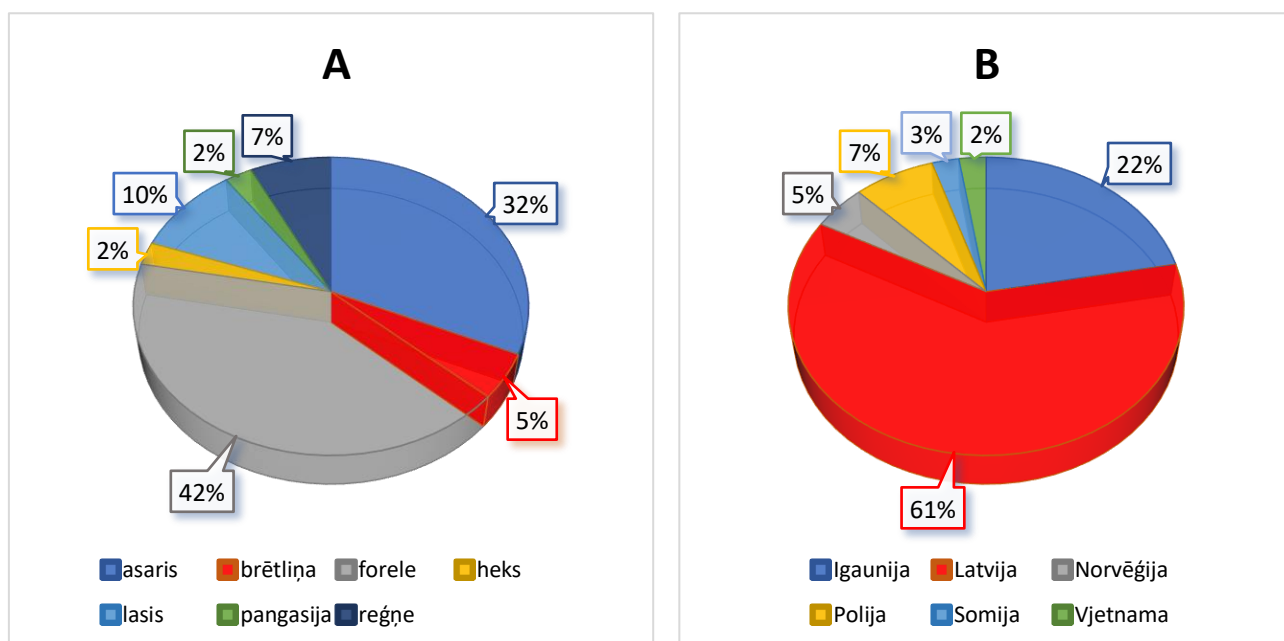
Savienojums	U <sub>sistemātiskā</sub> , %	U <sub>gadījuma</sub> , %	Atgūstamība, %	U <sub>c</sub> , %
Josamicīns	7,0	9,0	107	23
Kitasamicīns	14	14	108	38
Klindomicīns	14	14	101	33
Kloksacilīns	3,0	7,0	104	8,0
Linkomicīns	3,0	3,0	105	10
Marbofloksacīns	3,0	4,0	101	5,0
Nafcilīns	3,0	6,0	107	12
Nalidiksķābe	7,0	8,0	103	18
Natamicīns	12	12	108	34
Neo spiramicīns	2,0	8,0	107	12
Norfloksacīns	5,0	10	100	12
Novobiocīns	9,0	16	93	27
Oksacilīns	3,0	10	104	8,0
Oksitetraciklīns	3,0	12	109	16
Oksolīnskābe	2,0	5,0	105	9,0
Oleandomicīns	8,0	8,0	105	22
Orbifloksacīns	13	13	102	31
Penicilīns G	11	12	118	22
Penicilīns V	11	11	105	20
Pirlimicīns	4,0	8,0	107	13
Rifaksimīns	9,0	10	106	25
Sarafloksacīns	13	13	101	31
Spiramicīns	2,0	7,0	106	10
Sulfacetamīds	10	10	100	16
Sulfadiazīns	5,0	8,0	102	9,0
Sulfadimetoksīns	7,0	9,0	103	12
Sulfadimidīns	6,0	7,0	105	13
Sulfadoksīns	5,0	12	104	11
Sulfafurazols	10	12	105	18
Sulfaguanidīns	10	11	103	17
Sulfahlorpiridazīns	4,0	10	103	8,0
Sulfaklozīns	9,0	14	100	15
Sulfakvinoksalīns	9,0	10	106	18
Sulfamerazīns	5,0	7,0	104	11
Sulfametiazols	4,0	7,0	104	9,0
Sulfamonometoksīns	4,0	6,0	104	9,0
Sulfapiridīns	9,0	10	103	16
Sulfatiazols	7,0	8,0	104	13
Tetraciklīns	2,0	7,0	100	3,0
Tiamfenikols	3,0	5,0	106	11
Tiamulīns	4,0	7,0	106	12

Savienojums	U <sub>sistemātiskā</sub> , %	U <sub>gadījuma</sub> , %	Atgūstamība%	U <sub>c</sub> , %
Tildipirozīns	2,0	2,0	100	3,0
Tilmikozīns	3,0	10	104	8,0
Tilozīns	3,0	7,0	105	10
Tilvaloīns	4,0	13	100	7,0
Trimetoprimis	9,0	9,0	99	15
Tulatromicīns A	10	16	99	16
Valnemulīns	4,0	8,0	104	9,0

**Metodes robustums.** Visas validācijas gaitā tika pētīts metodes robustums, kad paraugi tika sagatavoti dažādās dienās, dažādu laboratorijas ekspertu uzraudzībā, iekoncetrēšanai izmantojot dažādas gāzes un temperatūras, kā arī paraugi tika mērīti ar 16 stundu noturi. Pēc rezultātiem varēja secināt, ka būtiskas izmaiņas atgūstamībā nav novērojamas.

### 3.2. Paraugu analīze

Pielietojot paplašināto un optimizēto antibiotiku atliekvielu noteikšanas metodi, tika testēti 41 dažādu sugu zivs paraugs no 6 dažādām izcelsmes valstīm – Igaunijas, Latvijas, Norvēģijas, Polijas, Somijas, Vjetnamas (sk. 3.3.1.att.)



3.3.1.att. Testēto zivs paraugu procentuālais sadalījums: A – pa sugām, B – pēc izcelsmes valsts

Galvenokārt tika analizēta forele, kas sastāda 42% no visiem paraugiem, kas izskaidrojams ar to, ka tā ir vadošā saldūdens saimniecībā audzētā suga Eiropā.<sup>23</sup> Tālāk tai sekoja asari, kas sastādīja 32%, jo tieši asaris Latvijā ir izplatītākā un atpazīstamākā saldūdens suga Latvijā.

Tā kā mērķis bija balstīts uz antibiotiku atlieku izplatību zivīs, kas ir pieejamas patērētājiem no Latvijas, tad paraugi tika ievākti no vairākām tirdzniecības vietām, piemēram, Rīgas Centrāltirgus, mazumtirdzniecības veikali “RIMI”, “LIDL”, kur produktu izcelsmes valsts bija mainīga, tomēr visbiežāk sastopamā izcelsmes valsts bija Latvija, kas sastāda 61% no pārējām 5 valstīm.

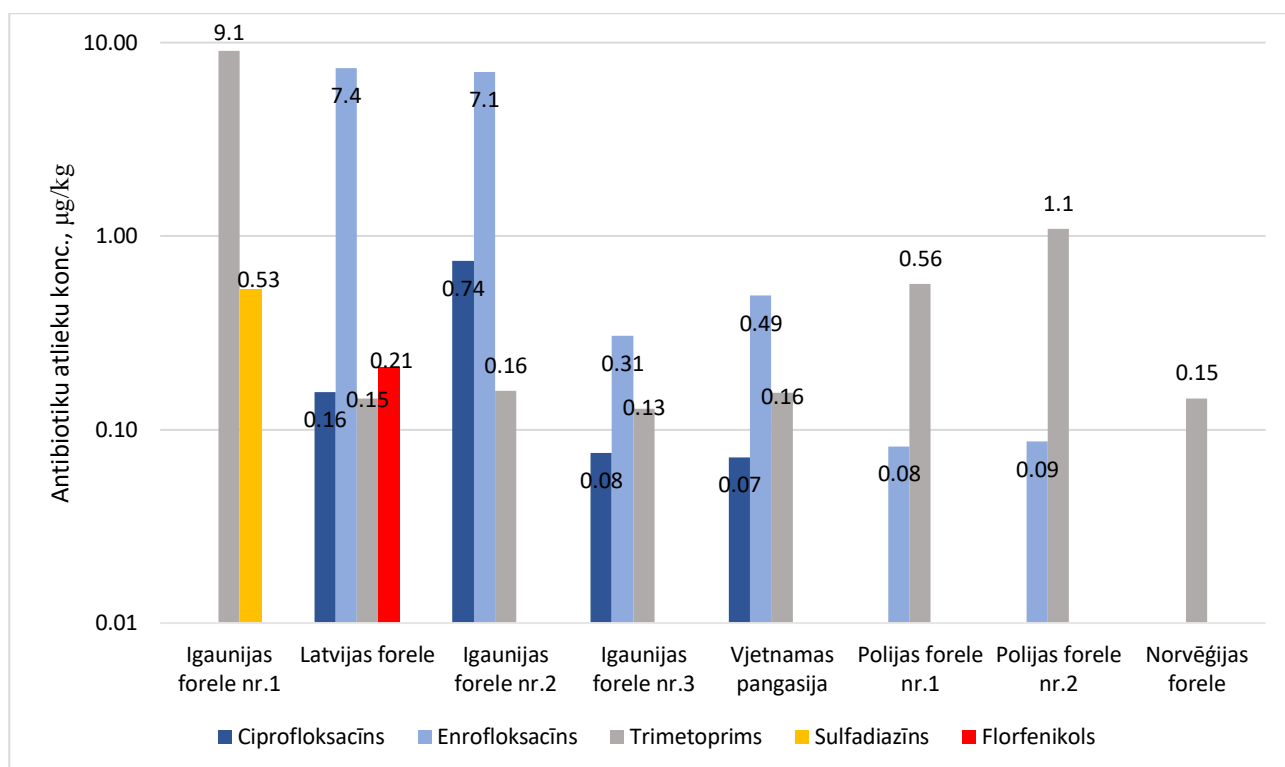
Katras sugas paraugs – asaris (n=13), brētliņa (n=2), forele (n=6), heks (n=1), reņģe (n=3) bija no Latvijas, izņemot lasi un pangasiju (sk. tabulu 3.3.1.). Visi testētie lašu (n=4) paraugi bija no Igaunijas, bet viens pangasijas paraugs bija no Vjetnamas. Vjetnama ir līderis pasaules akvakultūras ražošanā un tieši pangasijas audzēšanā.<sup>23</sup>

3.2.2. tabula

**Testēto zivs paraugu uzskaitē**

<b>Suga</b>	<b>Izcelsmes valsts</b>	<b>Paraugu skaits</b>
<b>Asaris</b>	Latvija	13
<b>Brētliņa</b>	Latvija	2
<b>Forele</b>	Latvija	6
	Igaunija	5
	Norvēģija	2
	Polija	3
	Somija	1
<b>Heks</b>	Latvija	1
<b>Lasis</b>	Igaunija	4
<b>Pangasija</b>	Vjetnama	1
<b>Reņģe</b>	Latvija	3

No visiem testētajiem paraugiem 19,5% paraugos (n=8) tika konstatētas antibiotiku atliekvielas (sk. 3.3.2.att.).

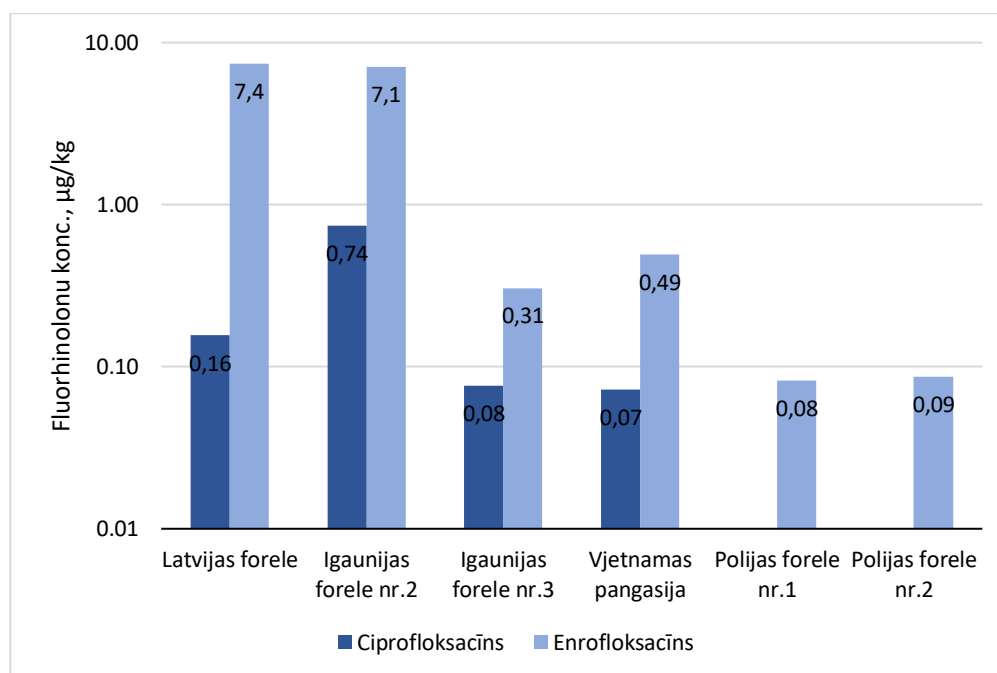


### 3.3.2.att. Konstatēto AB atliekvielu koncentrācijas paraugos

Visbiežāk detektētās antibiotiku atliekvielas starp 8 paraugiem bija trimetoprimis (100%) diapazonā no 0,13 – 9,1 µg/kg un vispazīstamākie fluorhinolonu grupas pārstāvji enrofloksacīns (87,5%) diapazonā no 0,04 – 7,4 µg/kg un tā metabolīts ciprofloksacīns (50%) diapazonā no 0,07 – 0,74 µg/kg. Florfenikols un sulfonamīdu grupas pārstāvis – sulfadiazīns tika konstatēti tikai vienā paraugā (12,5%) 0,21 µg/kg un 0,53 µg/kg attiecīgi.

Visbagātākā AB atliekvielu konstatēšanā bija Latvijas izcelsmes forele, kurai tika detektēta enrofloksacīna lielākā koncentrācija –  $7,4 \pm 0,5$  µg/kg un vienīgā florfenikola atliekviela –  $0,21 \pm 0,08$  µg/kg, vienā no Igaunijas forelēm tika konstatēta lielākā trimetoprima koncentrācija –  $9,1 \pm 1,4$  µg/kg, kā arī vienīgā sulfadiazīna atlieka –  $0,53 \pm 0,05$  µg/kg.

Latvijas un divas Igaunijas forelēs, kā arī Vjetnamas pangasijā tika konstatēti fluorhinoloni – enrofloksacīns un ciprofloksacīns. Ciprofloksacīns ir enrofloksacīna metabolīts, tomēr tas ir pieejams un tiek lietots cilvēku medicīnā un veterinārmedicīnā kā antibiotika.<sup>42</sup> Iegūtajos rezultātos ir novērojama tendence, ka ciprofloksacīna klātbūtne ir tikai tajos paraugos, kur ir lielāka enrofloksacīna koncentrācija (sk. 3.3.3.att.).



### 3.3.3.att. Konstatētās fluorhinolonu koncentrācijas zivs paraugos

Zinātniskajā literatūrā, tika pieminēts, ka enrofloksacīna un ciprofloksacīna koncentrācijām parasti ir novērojamas attiecības 10:1<sup>43</sup>, tomēr tās var svārstīties, jo ir atkarīgas no katras sugas metabolisma. Tas nozīmē, ka paraugos, kur enrofloksacīns ir konstatēts zem 0,31 µg/kg, nebūtu bijis iespējams detektēt ciprofloksacīnu, kuram būtu jābūt 10 reizes mazākā koncentrācijā. Tomēr iegūtie rezultāti liecina par to, ka zivis tika ārstētas ar enrofloksacīnu un tajos konstatētais ciprofloksacīns ir enrofloksacīna metabolīts.

Norvēģijas izcelsmes zivs paraugā tika konstatēta viena AB atliekviela – trimetoprims 0,15 µg/kg, apskatītajā zinātniskajā publikācijā Norvēģija tiek dēvēta par paraugvalsti akvakultūras ražošanā.<sup>27</sup>

Vienā no piecām forelēm, kuras izcelsmes valsts bija Igaunija, tika konstatēts trimetoprims kopā ar sulfadiazīnu – 9,1 µg/kg un 0,53 µg/kg attiecīgi. Kā jau tika minēts iepriekš, parasti trimetoprims tiek lietots kopā ar sulfonamīdiem<sup>10</sup>, it īpaši trimetoprims efektīvāk iedarbojas kombinācijā ar sulfadiazīnu vai sulfametoksazolu.<sup>44</sup> Tā kā pārējos paraugos trimetoprīma koncentrācija bija mazāka (0,13 – 1,1 µg/kg) var secināt, ka kāda no iepriekšminētajām sulfonamīdu pārstāvju atliekvielām ir bijusi vēl mazākas koncentrācijas vai arī to izvadīšanas laiks no organisma ir daudz ātrāks nekā trimetoprimam.

Visbagātākai Latvijas forelei AB atlieku ziņā, tika konstatēta arī nelielas koncentrācijas – 0,21 µg/kg florfenikola atlieka, kas literatūrā dažreiz arī tiek pieminēta.<sup>25,26</sup> Labākam rezultāta izvērtējumam būtu bijis nepieciešams florfenikolamīns, kas ir florfenikola metabolīts, tomēr šoreiz

tas netika analizēts. Salīdzinot metabolītu ar marķiervielu, tiek aprakstīts, ka ātrāk iesūcas, kā arī ātrāk izvadās tieši florfenikols nekā florfenikolamīns.<sup>45</sup>

Neskatoties uz to, ka tika konstatētas 5 dažādas antibiotiku atliekvielas, neviena no tām nepārsniedz MRL pēc Komisijas Regulas (ES) Nr. 37/2010<sup>22</sup>, tas nozīmē, ka patērētāja veselībai atrastās koncentrācijas nerada apdraudējumu. Tomēr pētījumā konstatētās atliekvielas norāda, ka akvakultūrā tiek lietotas antibakteriālās zāles un svarīgi būtu apzināt lietošanas praksi, vai tās tiek lietotas uzliesmojošas bakteriālās slimības ārstēšanai vai profilakses nolūkos, kas ir viens no svarīgākajiem antibakteriālas rezistences rašanās iemesliem.

## SECINĀJUMI

1. Optimizētā metode ir piemērota 78 antibiotiku atliekvielu noteikšanai zivs muskulatūrā, validācijā noteiktie metodes veikspējas rādītāji atbilst Komisijas Īstenošanas regulas (ES) 2021/808 uzstādītajiem kritērijiem.
2. Zivs paraugu testēšana uzrādīja, ka piektā daļa no paraugu uzrādīja antibiotiku atliekvielu klātbūtni, kas norāda uz antibakteriālo medikamentu lietošanu akvakultūras nozarē un tādā veidā nepieciešamību pēc zivs produkcijas pastiprinātas kontroles.
3. Visas konstatētās antibiotiku atliekvielas atradās zem MRL, tomēr, balsoties uz EFSA apkopotiem datiem par 2020.gada monitoringa veiktām analīzēm, ir nepieciešamība ierosināt pastiprinātu atliekvielu kontroli akvakultūrā, ievācot vairāk zivs paraugus monitoringa analīzēm.
4. Visas konstatētās antibiotiku atliekvielas ir atļautas lietošanai Eiropas Savienībā.
5. Zivs paraugs, kas uzrādīja trīs antibiotiku atliekvielu klātbūtni, liecina, ka ne visās zivs fermās varētu būt ievērota Regulas (ES) 2019/6 prasība par zivju ārstēšanu ar barību, kura nevar saturēt vairāk nekā vienu antibakteriālā līdzekļa substanci.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- (1) *Antibiotiku lietošana un antimikrobiālā rezistence | Slimību profilakses un kontroles centrs.* <https://www.spkc.gov.lv/lv/antibiotiku-lietosana-un-antimikrobiala-rezistence> (skatīts 02.12.2021).
- (2) Slimību profilakses un kontroles centr. “Vienas Veselības” Ziņojums - Antibiotiku Patēriņš Un Rezistence Cilvēkiem Un Dzīvniekiem Latvijā 2015. – 2019. Gadā.
- (3) Schar, D.; Klein, E. Y.; Laxminarayan, R.; Gilbert, M.; Van Boeckel, T. P. Global Trends in Antimicrobial Use in Aquaculture. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 21878. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>.
- (4) Outterson, K. *New Business Models for Sustainable Antibiotics*; SSRN Scholarly Paper 2397957; Social Science Research Network: Rochester, NY, 2014.
- (5) Authority, E. F. S.; Brocca, D.; Salvatore, S. Report for 2020 on the Results from the Monitoring of Veterinary Medicinal Product Residues and Other Substances in Live Animals and Animal Products. *EFSA Support. Publ.* **2022**, *19* (2), 7143E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7143>.
- (6) Society, M. *The history of antibiotics.* <https://microbiologysociety.org/members-outreach-resources/outreach-resources/antibiotics-unearthed/antibiotics-and-antibiotic-resistance/the-history-of-antibiotics.html> (skatīts 28.11.2021).
- (7) Purviņš, I.; Purviņa, S. *Praktiskā Farmakoloģija*, 3. Izdevums.; Farmservis: Rīga, 2008.
- (8) *Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 Laying down a Community Procedure for the Establishment of Maximum Residue Limits of Veterinary Medicinal Products in Foodstuffs of Animal Origin*; 1990; Vol. 224.
- (9) Yanong, R. P. Use of Antibiotics in Ornamental Fish Aquaculture: CIR 84/FA084, 1/2003. *EDIS* **2003**, *2003* (3). <https://doi.org/10.32473/edis-fa084-2003>.
- (10) Santos, L.; Ramos, F. Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Current Knowledge and Alternatives to Tackle the Problem. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *52* (2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>.
- (11) European Law on Veterinary Medicines: What’s New? – FVE – Federation of Veterinarians of Europe.
- (12) *EUR-Lex - 32019R0006 - EN - EUR-Lex.* <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj> (skatīts 28.03.2022).
- (13) Romero, J.; Gloria, C.; Navarrete, P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In *Health and Environment in Aquaculture*; Carvalho, E., Ed.; InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/28157>.
- (14) Reinholds, I.; Pugajeva, I.; Perkons, I.; Bartkevics, V. The Application of Phospholipid Removal Columns and Ultra-High Performance Liquid Chromatography—Tandem Quadrupole Mass Spectrometry for Quantification of Multi-Class Antibiotics in Aquaculture Samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *128*, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.002>.
- (15) Oxytetracycline. *Wikipedia*; 2022 (skatīts 02.04.2022).
- (16) Florfenicol. *Wikipedia*; 2022 (skatīts 02.04.2022).
- (17) Sarafloxacin. *Wikipedia*; 2020 (skatīts 02.04.2022).
- (18) Erythromycin. *Wikipedia*; 2022 (skatīts 02.04.2022).
- (19) Sulfadiazine. *Wikipedia*; 2022 (skatīts 02.04.2022).
- (20) Enrofloxacin. *Wikipedia*; 2022 (skatīts 02.04.2022).
- (21) Trimethoprim. *Wikipedia*; 2022 (skatīts 02.04.2022).
- (22) Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on Pharmacologically Active Substances and Their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin. No. 470, 72.

- (23) Guardone, L.; Tinacci, L.; Armani, A.; Trevisani, M. Residues of Veterinary Drugs in Fish and Fish Products: An Analysis of RASFF Data over the Last 20 Years. *Food Control* **2022**, *135*, 108780. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108780>.
- (24) Carrizo, J. C.; Griboff, J.; Bonansea, R. I.; Nimptsch, J.; Valdés, M. E.; Wunderlin, D. A.; Amé, M. V. Different Antibiotic Profiles in Wild and Farmed Chilean Salmonids. Which Is the Main Source for Antibiotic in Fish? *Sci. Total Environ.* **2021**, *800*, 149516. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149516>.
- (25) Zhang, L.; Du, S.; Liu, D.; Dong, D.; Zhang, W.; Guo, Z. Antibiotics in Fish Caught from Ice-Sealed Waters: Spatial and Species Variations, Tissue Distribution, Bioaccumulation, and Human Health Risk. *Sci. Total Environ.* **2022**, *821*, 153354. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153354>.
- (26) Griboff, J.; Carrizo, J. C.; Bonansea, R. I.; Valdés, M. E.; Wunderlin, D. A.; Amé, M. V. Multiantibiotic Residues in Commercial Fish from Argentina. The Presence of Mixtures of Antibiotics in Edible Fish, a Challenge to Health Risk Assessment. *Food Chem.* **2020**, *332*, 127380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127380>.
- (27) Gaspar, A. F.; Santos, L.; Rosa, J.; Leston, S.; Barbosa, J.; Vila Pouca, A. S.; Freitas, A.; Ramos, F. Development and Validation of a Multi-Residue and Multi-Class Screening Method of 44 Antibiotics in Salmon (*Salmo Salar*) Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry: Application to Farmed Salmon. *J. Chromatogr. B* **2019**, *1118–1119*, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.038>.
- (28) Guidi, L. R.; Santos, F. A.; Ribeiro, A. C. S. R.; Fernandes, C.; Silva, L. H. M.; Gloria, M. B. A. A Simple, Fast and Sensitive Screening LC-ESI-MS/MS Method for Antibiotics in Fish. *Talanta* **2017**, *163*, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.089>.
- (29) Guidi, L. R.; Santos, F. A.; Ribeiro, A. C. S. R.; Fernandes, C.; Silva, L. H. M.; Gloria, M. B. A. Quinolones and Tetracyclines in Aquaculture Fish by a Simple and Rapid LC-MS/MS Method. *Food Chem.* **2018**, *245*, 1232–1238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.094>.
- (30) *HPLC: Biochemical Analysis. A Step-By-Step Method Guide*. SciGene. <https://scigine.com/blog/hplc-analysis-method-guide/> (skatīts 28.03.2022).
- (31) Chiesa, L.; Panseri, S.; Pasquale, E.; Malandra, R.; Pavlovic, R.; Arioli, F. Validated Multiclass Targeted Determination of Antibiotics in Fish with High Performance Liquid Chromatography–Benchtop Quadrupole Orbitrap Hybrid Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *258*, 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.072>.
- (32) *Pamatprasības dzīvnieku izcelsmes produktu lietošanai pārtikā kontrolei*. <https://www.zm.gov.lv/partikas-un-veterinarais-dienests/statiskas-lapas/pamatprasibas-dzivnieku-izcelsmes-produktu-lietosanai-partika-kontrole?id=7592#jump> (skatīts 30.03.2022).
- (33) Authority, E. F. S. Report for 2019 on the Results from the Monitoring of Veterinary Medicinal Product Residues and Other Substances in Live Animals and Animal Products. *EFSA Support. Publ.* **2021**, *18* (3), 1997E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2021.EN-1997>.
- (34) *Guidelines / CODEXALIMENTARIUS FAO-WHO*. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/> (skatīts 02.12.2021).
- (35) *21 CFR Part 556 -- Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food*. <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-E/part-556> (skatīts 28.03.2022).
- (36) Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, Á.; Puchades, R. Fast Screening Methods to Detect Antibiotic Residues in Food Samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29* (9), 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>.
- (37) Alonso, G.; del Valle, E.; Ramirez, J. R. Optimization Methods. In *Desalination in Nuclear Power Plants*; Elsevier, 2020; pp 67–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820021-6.00005-3>.
- (38) by Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch. *Fundamentals of Analytical Chemistry 9th Edition*; Cengage, 2013.

- (39) Varenina, I.; Bilandžić, N.; Luburić, Đ. B.; Kolanović, B. S.; Varga, I. High Resolution Mass Spectrometry Method for the Determination of 13 Antibiotic Groups in Bovine, Swine, Poultry and Fish Meat: An Effective Screening and Confirmation Analysis Approach for Routine Laboratories. *Food Control* **2022**, *133*, 108576. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108576>.
- (40) Pugajeva, I.; Ikkere, L. E.; Judjallo, E.; Bartkevics, V. Determination of Residues and Metabolites of More than 140 Pharmacologically Active Substances in Meat by Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Orbitrap Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *166*, 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.024>.
- (41) *Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the Performance of Analytical Methods for Residues of Pharmacologically Active Substances Used in Food-Producing Animals and on the Interpretation of Results as Well as on the Methods to Be Used for Sampling and Repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC (Text with EEA Relevance)*; 2021; Vol. 180.
- (42) Troughon, T.; Lefebvre, S. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open J. Vet. Med.* **2016**, *6* (2), 40–58. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>.
- (43) Morales-Gutiérrez, F. J.; Barbosa, J.; Barrón, D. Metabolic Study of Enrofloxacin and Metabolic Profile Modifications in Broiler Chicken Tissues after Drug Administration. *Food Chem.* **2015**, *172*, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.025>.
- (44) Tuomisto, J.; Kasanen, A.; Renkonen, O. V. Sulfadiazine-Trimethoprim Combination in the Treatment of Urinary Tract Infections. *Chemotherapy* **1977**, *23* (5), 337–344. <https://doi.org/10.1159/000222003>.
- (45) Feng, J.-B.; Huang, D.-R.; Zhong, M.; Liu, P.; Dong, J.-D. Pharmacokinetics of Florfenicol and Behaviour of Its Metabolite Florfenicol Amine in Orange-Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*) after Oral Administration. *J. Fish Dis.* **2016**, *39* (7), 833–843. <https://doi.org/10.1111/jfd.12416>.
- (46) *Results from the monitoring of veterinary medicinal product residues in Europe in 2020 | EFSA*. <https://www.efsa.europa.eu/en/data-viz/results-monitoring-vmpr-2020> (skatīts 14.05.2022).

# PIELIKUMI

## 1.pielikums

Substance group	Compliant results	Non-compliant results
<b>B1: Antibacterial substances, including sulphonamides, quinolones</b>	<b>42 955</b>	<b>5</b>
4-Hydroxy-tetramisole	3	0
8-alpha-hydroxymutilin	175	0
Aminoglycosides	21	0
Aminosidin (Paromycin, Paromomycin)	137	0
Amoxicillin	778	0
Ampicillin	742	0
Antibacterials	4	0
Apramycin	280	0
Azithromycin	127	0
Bacitracin	12	0
Baquiloprim	143	0
Benzylpenicillin (Penicillin G)	762	0
Beta-lactams	21	0
Cefacetrile	94	0
Cefadroxil	8	0
Cefalexin	304	0
Cefalexin (Cefalexin Anhydrate)	301	0
Cefalonium	412	0
Cefapirin (Sum of cefapirin and desacetylcephapirin)	531	0
Cefazolin	409	0
Cefoperazon	302	0
Cefoperazone	192	0
Cefquinom	547	0
Cefuroxime	131	0
Cephalotin	12	0
Cinoxacin	16	0
Clindamycin	173	0
Cloxacillin	703	0
Colistin	14	0
Danofloxacin	750	0
Demeclocyclin	76	0
Dichloroisoeverminic acid	42	0
Dicloxacillin	690	0
Difloxacin	739	0
Dihydrostreptomycin	379	0
Doxycycline	862	0
Enoxacin	44	0
Erythromycin	723	0
Fleroxacin	4	0
Flumequine	1 237	0
Framycetin (Neomycin B)	39	0
Gamithromycin	318	0
Gentamicin	179	0
Josamycin	454	0
Kanamycin	330	0
Kitasamycin	7	0
Levofloxacin	7	0
Lincomycin	576	0
Lomefloxacin	70	0
Macrolides	21	0
Marbofloxacin	723	0
Methacylin	27	0
Nafcillin	635	0
Nalidixic acid	531	0
Na-penicillin-G	10	0
Neomycin	338	0
Norfloxacin	532	0
Novobiocin	167	0
Ofloxacin	217	0
Oleandomycin	52	0
Orbifloxacin	61	0
Ormetoprim	120	0
Oxacillin	672	0

1.att. EFSA apkopotie dati par 2020.gada Eiropā konstatētām AB atliekvielā akvakultūrā<sup>46</sup>

1.pielikuma turpinājums

Oxolinic Acid	792	0
Paromomycin	235	0
Pefloxacin	68	0
Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin)	516	0
Penicillins (group)	10	0
Piperacillin	30	0
Pirlimycin	317	0
Polymyxin B	6	0
Quinolones	26	0
Rifaximin	178	0
Roxithromycin	47	0
Sarafloxacin	586	0
Sodium Sulfaclozine	11	0
Spectinomycin	257	0
Spiramycin 1	68	0
Streptomycin	365	0
Sulfabenzamide	6	0
Sulfacetamide	209	0
Sulfachlorpyrazine	289	0
Sulfachlorpyridazine	597	0
Sulfaclozine	105	0
Sulfadiazine	745	1
Sulfadimethoxine	685	0
Sulfadimidine	296	0
Sulfadoxin	636	0
Sulfaethoxyypyridazin	77	0
Sulfaguanidine	300	0
Sulfamerazine	671	0
Sulfameter	72	0
Sulfamethazin (sulfadimidin)	277	0
Sulfamethizol	394	0
Sulfamethoxazole	547	0
Sulfamethoxyypyridazine	632	0
Sulfamonomethoxine	581	0
Sulfamoxol	198	0
Sulfanilamide	133	0
Sulfanitran	4	0
Sulfaphenazol	10	0
Sulfapyridin	338	0
Sulfaquinoxaline	554	0
Sulfathiazole	674	0
Sulfisomidin	3	0
Sulfisoxazol	343	0
Sulfonamides	514	0
Sum of all metabolites belonging to 8-alpha-Hydroxymutilin	2	0
Sum of all residues retaining the betalactam structure expressed as desfuroylceftiofur	611	0
Sum of bacitracin A, bacitracin B, and bacitracin C	168	0
Sum of chlortetracyclin and its 4-epimer	936	0
Sum of enrofloxacin and ciprofloxacin	920	0
Sum of florfenicol and its metabolites measured as florfenicol-amine	923	0
Sum of oxytetracycline and its 4-epimer	928	2
Sum of spiramycin and neospiramycin	553	0
Sum of tetracycline and its 4-epimer	864	0
Sum of tylvalosin and 3-O-acetyltylosin	389	0
Tetracyclines	21	0
Thiamphenicol	497	0
Tiamulin	287	0
Tildipirosin	314	0
Tilmicosin	657	0
Tobramycin	4	0
Trimethoprim	672	2
Troleandomycin	1	0
Tulathromycin	401	0
Tylon (Tylosin, Tylosin A)	716	0
Tylosine	14	0
Valnemulin	353	0

## 2. pielikums

## Multi AB noteikšanas metodes

Nr.	Iesvars, g	Iekšējais standarts	Ekstrakcija	Izsālišana	Attīrīšana	Iekoncentrēšana	Detektors	Kolonna	LOQ, µg/kg	LOD, µg/kg	Analizējamo savienojumu skaits
1.	2	+	ACN + 0,1 M EDTA	-	n-heksāns	+	TOF/MS Triple	Acquity HSS T3	½ MRL	-	44
2.	2	-	ACN	-	FCEK	+	quadrupole (Quantiva) Triple	Hypersil gold	300-9000	-	42
3.	2	+	5% TCA	-	-	-	quadrupole (API 5000 AbSciex)	Zobrax Eclipse XDB C18	½ MRL	0,19 – 119,60	40
4.	5	-	H2O:MeOH (70:30) + 0,1 M EDTA 1) 0,5% NA2EDTA + 80% ACN	-	-	-	Quattro Micro API	Mediterranean sea18	-	1,2-11	6
5.	2	+	2) 0,5% NA2EDTA + 80% ACN	1) - 2) QUECHERS	-	+	Q-TOF	Acquity HSS T3; Acuity BEH C18	-	-	91
6.	1	+	H2O:MeOH (70:30) + 0,1% HCOOH	-	0,1% HCOOH ACN	+	Q- Exactive Orbitrap	Synergi Hydro RP	½ MRL	29,5-37,1	24
7.	2	+	0,1% HCOOH ACN	-	Izsaldēšana	+	Q- Exactive Orbitrap	Kinetix C18, Luna Omega, Hypersil Gold	-	-	42

## AB standartvielu šķīdība

Nr.p.k.	Standartviela	Šķīdība
1	4-epi-tetraciklīns	Metanols
2	Amoksicilīns	Metanols
3	Ampicilīns	Ūdens/metanols
4	Bakviloprimis	DMSO/N,N-DMF
5	Cefacetrīls	Metanols
6	Cefadroksils	Ūdens/DMSO/metanols
7	Cefaleksīns	Metanols
8	Cefalonijs	DMSO/N,N-DMF
9	Cefalotīns	Ūdens/metanols
10	Cefapirīns	Metanols
11	Cefazolīns	Ūdens/metanols
12	Cefkvinoms	Ūdens/metanols
13	Cefoperazons	Ūdens/metanols
14	Ceftiofūrs	N,N-DMF
15	Cinka Bacitracīns	Metanols
16	Cinoksacīns	1M NaOH
17	Ciprofloksacīns	Metanols
18	Danofloksacīns	Ūdens/metanols
19	Desacetilcefapirīns	DMSO
20	Difloksacīns	Metanols
21	Dihlorizoevernīnskābe	Metanols
22	Dikloksacilīns	Ūdens/metanols
23	Doksiciklīns	Ūdens/metanols
24	Enrofloksacīns	Metanols
25	Eritromicīns	Metanols
26	Florfenikols	Metanols
27	Flumekvīns	Ūdens/metanols
28	Ftalilsulfatiazols	N,N-DMF

<b>Nr.p.k.</b>	<b>Standartviela</b>	<b>Šķīdība</b>
<b>29</b>	Gamitromicīns	Metanols
<b>30</b>	Hlortetraciklīns	Metanols
<b>31</b>	Jozamicīns	Metanols
<b>32</b>	Kitasamicīns (Leikomicīns)	Metanols
<b>33</b>	Klindomicīns	Metanols
<b>34</b>	Kloksacilīns	Ūdens/metanols
<b>35</b>	Linkomicīns	Metanols
<b>36</b>	Marbofloksacīns	Metanols + skudrskābe
<b>37</b>	Nafcilīns	Metanols
<b>38</b>	Nalidiksskābe	Ūdens/metanols
<b>39</b>	Natamicīns	Metanols
<b>40</b>	Neo spiramicīns	Metanols
<b>41</b>	Norfloksacīns	Ūdens/metanols
<b>42</b>	Novobiocīns	Metanols
<b>43</b>	Oksacilīns	Ūdens/metanols
<b>44</b>	Oksitetraciklīns	Metanols
<b>45</b>	Oksolīnskābe	Ūdens/metanols
<b>46</b>	Oleandomicīns	DMSO
<b>47</b>	Orbifloksacīns	Ūdens/metanols
<b>48</b>	Penicilīns G	Ūdens/metanols
<b>49</b>	Penicilīns V	Metanols
<b>50</b>	Pirlimicīns	Metanols
<b>51</b>	Rifaksimīns	Metanols
<b>52</b>	Sarafloksacīns	Metanols

<b>Nr.p.k.</b>	<b>Standartviela</b>	<b>Šķīdība</b>
<b>53</b>	Spiramicīns	Metanols
<b>54</b>	Sulfacetamīds	N,N-DMF
<b>55</b>	Sulfadiazīns	Metanols/NaOH
<b>56</b>	Sulfadimetoksīns	Metanols
<b>57</b>	Sulfadimidīns	Metanols
<b>58</b>	Sulfadoksīns	Metanols
<b>59</b>	Sulfafurazols	Metanols
<b>60</b>	Sulfaguanidīns	Metanols/DMSO
<b>61</b>	Sulfahloropiridazīns	Metanols
<b>62</b>	Sulfaklozīns	Metanols
<b>63</b>	Sulfakvinoksalīns	Ūdens/metanols/DFA
<b>64</b>	Sulfamerazīns	Metanols
<b>65</b>	Sulfametiazols	Metanols
<b>66</b>	Sulfamonometoksīns	Metanols
<b>67</b>	Sulfapiridīns	Ūdens/metanols
<b>68</b>	Sulfatiazols	Metanols
<b>69</b>	Tetraciklīns	Metanols
<b>70</b>	Tiamfenikols	Metanols
<b>71</b>	Tiamulīns	Metanols
<b>72</b>	Tildipirozīns	Metanols/DMSO
<b>73</b>	Tilmikozīns	Metanols
<b>74</b>	Tilozīns	Ūdens/metanols
<b>75</b>	Tilvalozīns	Metanols
<b>76</b>	Trimetoprimis	Metanols
<b>77</b>	Tulatromicīns A	Metanols
<b>78</b>	Valnemulīns	Metanols

## AB darba standartšķīduma pagatavošanai nepieciešamie tilpumi

Savienojums	LOQ, µg/kg	Pamatšķīduma tilpums, µL	Pamatšķīduma koncentrācija, ng/µl
<i>4-epitetraciklīns</i>	5,0	4200	1000
<b>Amoksilīns</b>	25	10,00	1000
<b>Ampicilīns</b>	15	6,00	1000
<b>Bacitracīns</b>	30	12,00	1000
<i>Bakviloprīns</i>	15	6,00	1000
<b>Cefacetrīls</b>	30	12,00	1000
<i>Cefadroksils</i>	10	4,00	1000
<b>Cefaleksīns</b>	10	4,00	1000
<i>Cefalonijs</i>	8,0	3,20	1000
<i>Cefalotīns</i>	10	4,00	1000
<i>Cefapirīns</i>	5,0	2,00	1000
<i>Cefazolīns</i>	5,0	2,00	1000
<b>Cefkvīnoms</b>	10	4,00	1000
<b>Cefoperazons</b>	10	4,00	1000
<b>Ceftiofūrs</b>	10	4,00	1000
<i>Cinoksacīns</i>	10	4,00	1000
<i>Ciprofloksacīns</i>	0,1	4,00	10
<b>Danofloksacīns</b>	1,0	4,00	100
<i>Desaceilcefapirīns</i>	5,0	2,00	1000
<b>Difloksacīns</b>	1,0	4,00	1000
<i>Dihlorizoevernīnskābe</i>	5,0	2,00	1000
<b>Dikloksacilīns</b>	30	12,00	1000
<b>Doksiciklīns</b>	10	4,00	1000
<b>Enrofloksacīns</b>	0,1	4,00	10
<b>Eritromicīns</b>	5,0	2,00	1000
<i>Florfenikols</i>	0,1	4,00	10
<b>Flumekvīns</b>	5,0	2,00	1000
<i>Ftalilsulfatiazols</i>	5,0	2,00	1000
<i>Gamitromicīns</i>	5,0	2,00	1000
<b>Hlortetraciklīns</b>	5,0	2,00	1000
<b>Josamicīns</b>	5,0	2,00	1000
<b>Kitasamicīns</b>	20	8,00	1000
<i>Klindomicīns</i>	1,0	4,00	100
<b>Kloksacilīns</b>	10	4,00	1000
<b>Linkomicīns</b>	1,0	4,00	100

Savienojums	LOQ, µg/kg	Pamatšķīduma tilpums, µL	Pamatšķīduma koncentrācija, ng/µl
<b>Marbofloksacīns</b>	1,0	4,00	100
<i>Nafcilīns</i>	10	4,00	1000
<b>Nalidiksskābe</b>	1,0	4,00	100
<i>Natamicīns</i>	10	4,00	1000
<i>Neo spiramicīns</i>	10	4,00	1000
<b>Norfloksacīns</b>	5,0	2,00	1000
<b>Novobiocīns</b>	5,0	4,00	1000
<b>Oksacilīns</b>	10	4,00	1000
<b>Oksitetraciklīns</b>	5,0	2,00	1000
<i>Oksolīnskābe</i>	5,0	2,00	1000
<i>Oleandomicīns</i>	5,0	2,00	1000
<b>Orbifloksacīns</b>	5,0	2,00	1000
<b>Penicilīns G</b>	25	10,00	1000
<i>Penicilīns V</i>	12,5	5,00	1000
<i>Pirlimicīns</i>	5,0	2,00	1000
<b>Rifaksimīns</b>	5,0	2,00	1000
<b>Sarafloksacīns</b>	1,0	4,00	100
<b>Spiramicīns</b>	10	4,00	1000
<i>Sulfacetamīds</i>	5,0	2,00	1000
<i>Sulfadiazīns</i>	0,5	2,00	100
<b>Sulfadimetoksīns</b>	1,0	4,00	100
<b>Sulfadimidīns</b>	1,0	4,00	100
<i>Sulfadoksīns</i>	1,0	4,00	100
<i>Sulfafurazols</i>	1,0	4,00	100
<i>Sulfaguanidīns</i>	1,0	4,00	100
<b>Sulfahloropiridazīns</b>	1,0	4,00	100
<i>Sulfaklozīns</i>	5,0	2,00	1000
<i>Sulfakvinoksālīns</i>	1,0	4,00	100
<i>Sulfamerazīns</i>	1,0	4,00	100
<b>Sulfametiazols</b>	1,0	4,00	100
<i>Sulfamonometoksīns</i>	1,0	4,00	100
<i>Sulfapiridīns</i>	1,0	4,00	100
<b>Sulfatiazols</b>	1,0	4,00	100
<b>Tetraciklīns</b>	5,0	2,00	1000
<i>Tiamfenikols</i>	10	4,00	1000
<b>Tiamulīns</b>	1,0	4,00	100

## 4.pielikuma turpinājums

<b>Savienojums</b>	<b>LOQ, µg/kg</b>	<b>Pamatšķīduma tilpums, µL</b>	<b>Pamatšķīduma koncentrācija, ng/µl</b>
<i>Tildipirozīns</i>	10	4,00	1000
<b>Tilmikozīns</b>	5,0	2,00	1000
<b>Tilozīns</b>	5,0	2,00	1000
<i>Tilvalozīns</i>	5,0	2,00	1000
<b>Trimetoprimis</b>	0,1	4,00	10
<i>Tulatromicīns A</i>	10	4,00	1000
<i>Valnemulīns</i>	10	4,00	1000

## Analītu skenēšanas pārejas un sadursmju enerģijas

Savienojums	Kvantificējošais jons, Da	Apstiprinošais jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
<i>4-epi-tetraciklīns</i>	445	201	35
	445	410	20
<b>Amoksicilīns</b>	366	114	22
	366	349	11
<b>Ampicilīns</b>	350	106	20
	350	160	15
<i>Bakviloprīns</i>	309	123	30
	309	187	25
<b>Cefacetrīls</b>	357,1	156	20
	357,1	280	13
<i>Cefadroksils</i>	364	114	20
	364	208	10
<b>Cefaleksīns</b>	380,1	106,1	18
	380,1	198	18
<i>Cefalonijs</i>	459	152	30
	459	337	14
<i>Cefalofīns</i>	419	248	25
	419	259	15
<i>Cefapirīns</i>	424	124	35
	424	292	20
<i>Cefazolīns</i>	455	156	30
	455	323	18
<b>Cefkvinoms</b>	265,3	134,2	15
	529,3	134,2	15
<b>Cefoperazons</b>	646	143	40
	646	530	20
<b>Ceftiofūrs</b>	524,3	210	25
	524,3	241,1	20
<b>Cinka Bacitracīns</b>	475,2	199,1	25
	712,1	199,1	35
<i>Cinoksacīns</i>	263	189	30
	263	245	15

Savienojums	Kvantificējošais jons, Da	Apstiprinošais jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
<i>Ciprofloksacīns</i>	332	288	22
	332	314	15
<b>Danofloksacīns</b>	358,1	255	42
	358,1	340	20
<i>Desacetilcefapirīns</i>	382	112	30
	382	152	23
<b>Difloksacīns</b>	400	356	20
	400	382	23
<i>Dihlorizoevernīnskābe</i>	249	190	30
	249	205	20
<b>Dikloksacilīns</b>	470	160	25
	470	311	20
<b>Doksiciklīns</b>	445	321	45
	445	428	20
<b>Enrofloksacīns</b>	360,1	245	26
	360,1	316	19
<b>Eritromicīns</b>	734,4	158	33
	734,4	576	20
<i>Florfenikols</i>	358	119	35
	358	185	22
<i>Flumekvīns</i>	262	202	10
	262	244	20
<i>Ftalilsulfatiazols</i>	402,2	196	30
	402,2	254	15
<i>Gamitromicīns</i>	619	116	40
	619	158	30
<b>Hlortetraciklīns</b>	479	444	21
	479	462	20
<b>Josamicīns</b>	828,4	109,1	34
	828,4	174	30
<b>Kitasamicīns</b>	805	109	45
	805	174	40

Savienojums	Kvantificējošais jons, Da	Apstiprinošais jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
<i>Klindomicīns</i>	425	126	25
	425	377	15
<b>Kloksacilīns</b>	468	160	25
	468	436	20
<b>Linkomicīns</b>	407	126	28
	407	359	17
<b>Marbofloksacīns</b>	363	276	14
	363	320	14
<i>Nafcilīns</i>	415	171	40
	415	199	20
<b>Nalidiksskābe</b>	233	187	26
	233	215	16
<i>Natamicīns</i>	666	485	20
	666	503	10
<i>Neo spiramicīns</i>	350	174	20
	366	174	20
<b>Norfloksacīns</b>	320	276	17
	320	302	15
<b>Novobiocīns</b>	613,4	189	25
	635,4	418,2	20
<b>Oksacilīns</b>	402	160	20
	402	243	15
<b>Oksitetraciklīns</b>	461	426	30
	461	443	20
<i>Oksolīnskābe</i>	263	217	35
	263	245	25
<i>Oleandomicīns</i>	814,6	98,4	45
	814,6	200,2	25
<b>Orbifloksacīns</b>	396	295,2	25
	396	352,2	20
<b>Penicilīns G</b>	335	128	32
	335	176	16

## 5.pielikuma turpinājums

Savienojums	Kvantificējošais jons, Da	Apstiprinošais jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
<i>Penicilīns V</i>	351	114	40
	351	160	20
<i>Pirlimicīns</i>	411	112	35
	411	363	26
<b>Rifaksimīns</b>	786,5	754,4	22
	787,5	755,4	22
<b>Sarafloksacīns</b>	386,1	299	28
	386,1	342	22
<b>Spiramicīns</b>	422,2	174,1	30
	422,2	350,5	12
<i>Sulfacetamīds</i>	213	108	26
	213	195	10
<i>Sulfadiazīns</i>	251	156	18
	251	92	30
<b>Sulfadimetoksīns</b>	311	108	33
	311	156	25
<b>Sulfadimidīns</b>	279,1	124	23
	279,1	186	19
<i>Sulfadoksīns</i>	311	156	20
	311	108	27
<i>Sulfafurazols</i>	268	156	14
	268	113	20
<i>Sulfaguanidīns</i>	215	156	15
	215	92	25
<b>Sulfahlorpiridazīns</b>	285	92	30
	285	156	16
<i>Sulfaklozīns</i>	283	155	30
	283	107	35
<i>Sulfakvinoksalīns</i>	301	156	17
	301	108	25
<i>Sulfamerazīns</i>	265	172	18
	265	156	20

Savienojums	Kvantificējošais jons, Da	Apstiprinošais jons, Da	Sadursmju enerģija, eV
<b>Sulfametiazols</b>	271	92	28
	271	156	14
<i>Sulfamonometoksīns</i>	281	156	20
	281	108	25
<i>Sulfapiridīns</i>	250	184	15
	250	108	25
<b>Sulfatiazols</b>	256	92	30
	256	156	15
<b>Tetraciklīns</b>	445,1	154	30
	445,1	410	25
<i>Tiamfenikols</i>	356	308	20
	356	229	30
<b>Tiamulīns</b>	494,1	119,2	35
	494,1	192	20
<i>Tildipirozīns</i>	637,6	464	35
	637,6	174	35
<b>Tilmikozīns</b>	435,5	99,2	25
	435,5	695,5	20
<b>Tilozīns</b>	916,5	174	35
	916,5	772,6	26
<i>Tilvaloziņš</i>	1042,2	174	40
	1042,2	109	45
<b>Trimetoprimis</b>	291	110	30
	291	123	30
<i>Tulatromicīns A</i>	806	577	20
	806	420	35
<i>Valnemulīns</i>	565	263	20
	565	147	40

Bakalaura darbs „**Antibiotiku atliekvielu noteikšana un izplatība zivīs**” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

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

Autors: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja, *Dr. chem.* Iveta Pugajeva: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (datums)

Recenzents, prof., *Dr. chem.* Vadims Bartkevičs: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: \_\_\_\_\_  
(datums)

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

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

\_\_\_\_\_ protokols Nr. \_\_\_\_\_ (ieraksta sekretārs)  
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)