



Finansēts no Zivju fonda līdzekļiem

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

Pētījuma Gala ziņojums

par dioksīnu un dioksīniem līdzīgo polihlordifenilu saturu
Baltijas jūras lašos, projekts Nr.1.10.

Apstiprināja:

V.Bartkevičs, dr.chem.

RĪGA
2011

SATURS

Ievads	3
1. Lašu bioloģisko rādītāju raksturojums.....	3
2. Dioksīnu satura un bioloģisko parametru saistības noteikšana	4
3. Atšķirības rezultātos pa gadiem.....	7
Secinājumi un rekomendācijas.....	8

Ievads

Dioksīni – hlorēto aromatisko savienojumu grupa, kas ietver sevī dibenzo-p-dioksīnus, dibenzofurānus un dioksīniem līdzīgos polihlorbifenīlus. Dioksīni ir ļoti stabilas un lēni sadalošas ķīmiskās vielas, kas uzkrājas galvenokārt dzīvo organismu taukaudos. Kopā ir iespējami 75 polihlorēti dibenzo-p-dioksīni, 135 polihlorēti dibenzofurāni un 209 polihlorēti bifenīli, kas atšķiras ar toksiskumu, no kuriem 17 komponenti tiek novērtēti kā vistoksiskākie. Dioksīni un dioksīniem līdzīgie polihlordifenili tiek uzskatīti par kancerogēnām vielām. Eiropas Savienības Regula Nr. 199/2006, kas ir spēkā no 2006.gada 6.novembra, nosaka maksimāli pieļaujamo dioksīnu līmeni pārtikas produktos. Zivīm tie ir 8 pg TEQ/g svaiga svara kopā dioksīniem un dioksīniem līdzīgiem polihlordifeniliem. Tā kā dioksīni pārsvarā uzkrājas taukaudos, augstākais dioksīnu līmenis Baltijas jūrā konstatēts zivju sugām ar paaugstinātu tauku saturu, piemēram, lasim un reņģei.

Saskaņā ar Pārtikas un veterinārā dienesta rīkojumu Nr.131 no 2005. gada 30.novembra Latvijā atļauts realizēt tirdzniecībā tikai lašus, kuru izmērs nepārsniedz 72 cm vai 4 kg svaru, bet filetētus lašus, kuru svars nepārsniedz 6 kg.

1. Lašu bioloģisko rādītāju raksturojums

Dioksīnu un dioksīniem līdzīgo polihlordifenilu satura analīzei 2011.gada oktobra beigās tika ievākti laši no rūpnieciskās zvejas Rīgas jūras līča piekrastes dienviddaļā (Daugavas populācijas laši nr.1- 8) un Ventas upē (Ventas populācijas laši nr.9- 12). Tā ir rūpnieciskā zveja, kas apzvejo lašus, kuri dodas upēs uz nārstu. Tātad visiem šiem lašiem gonādas (dzimumprodukti) bija pirmsnārsta attīstības stadijā. Analīzēm tika ievākti dažāda izmēra 8 laša tēviņi un 4 mātītes. Visi laši tika nomērīti un nosvērti, tiem tika atzīmēts dzimums, kā arī paņemtas zvīņas vecuma noteikšanai. Vecuma noteikšana tika veikta laboratorijā, izmantojot binokulāru. Visi lašu bioloģiskie parametri ir parādīti 1.tabulā.

1.tabula. Dioksīnu un dioksīniem līdzīgo polihlordifenilu satura analīzei izmantoto lašu bioloģiskie parametri (svars zivīm bez gonādām).

Nr.p.k.	Zvejas rajons	Dzimums	Garums (cm)	Svars (kg)	Vecums (jūras gadi)
1	Daugava	mātīte	107	12.4	3
2	Daugava	tēviņš	74	3.4	1
3	Daugava	tēviņš	66	3	1
4	Daugava	tēviņš	97	9.1	2
5	Daugava	mātīte	102	11.5	3
6	Daugava	mātīte	82	5.7	2
7	Daugava	tēviņš	89	7.3	2
8	Daugava	tēviņš	84	7.3	2
9	Venta	mātīte	96	10.7	3
10	Venta	tēviņš	61	2.7	1
11	Venta	tēviņš	66	3.3	1
12	Venta	tēviņš	67	2.4	1

Laša mātītes bija ievērojami lielākas par tēviņiem. Garums bija robežās no 82 līdz 107 cm, vidēji 98 cm, bet svars robežās no 5,7 līdz 12,4 kg, vidēji 10,1 kg. Mātīšu

jūras vecums bija 2-3 gadi, kas nozīmē, ka tās jūrā ir pavadījušas divus-trīs gadus. Tas ir raksturīgi Baltijas lasim, kam mātītes nobriest nārstam, sākot ar divu gadu vecumu.

Lašu tēviņu izmēri nozvejās pamatā bija nelieli un vidēji (61-97 cm). Vidējais tēviņu izmērs bija 76 cm, bet svars svārstījās robežās no 2,4 līdz 9,1 kg, vidēji 4,8 kg. Visi tēviņi bija 1- 2 gadus veci, tātad jūrā pavadījuši 1- 2 gadus. Arī tas ir raksturīgs Baltijas lasim, kuram lielākā daļa tēviņu nobriest jau no gada vecuma.

2. Dioksīnu satura un bioloģisko parametru saistības noteikšana

Dioksīnu noteikšana zivīs ietver parauga homogenizāciju, parauga alikvotas žāvēšanu ar bezūdens nātrija sulfātu un tauku ekstrakciju ar dihlormetāna/heksāna maisījumu. Lielmolekulāro savienojumu atdalīšana tiek veikta ar gēlfiltrācijas hromatogrāfiju un skāba silikagēla kolonnu. Dioksīni un dioksīniem līdzīgie polihlorētie bifenīli tiek atdalīti lietojot florisīla kolonnu. Papildus attīrīšanas stadijas tiek veiktas ar aktivēto ogli. Interesējošie analīti tiek detektēti ar gāzu hromatogrāfiju – augstās izšķirtspējas masspektrometriju.

2.1. Tauku ekstrakcija

Homogenizēta parauga iesvaru ievieto porcelānā pietā, pievieno b/u nātrija sulfātu un jūras smilti (parauga iesvars ir atkarīgs no matricas tauku satura, rezultātā jāiegūst ne mazāk par 5 g tauku), atkārtoti homogenizē un maisījumu atstāj uz 30 min. istabas temperatūrā.

Homogenizēto maisījumu ievieto stikla kolonnā ar diametru 35 mm (kolonnas apakšā jābūt 10 mm b/ū nātrija sulfāta slāņa) un eluē taukus ar 200 - 400 ml heksāna/metilēnhlorīda maisījumu (1/1). Eluentu ar ekstrahētiem taukiem savāc 500 ml apaļkolbā ar zināmu masu ($\pm 0,01$ g), ietvaicē rotācijas ietvaicētājā un, nosverot kolbu ar atlikumu pēc ietvaicēšanas, reģistrē atlikuma masu.

Tauku saturu nosaka pēc formulas:

$$X_t = \frac{m_{at}}{m_p} \times 100\%$$

kur: X_t – tauku saturs paraugā (%);

m_{at} – atlikuma masa (g);

m_p – parauga masa (g)

2.2. Ekstrakta attīrīšana un koncentrēšana

Gēlfiltrācijas hromatogrāfija:

Gēlfiltrācijas hromatogrāfa parametri

Plūsmas ātrums: 5 ml/min;

Injekcijas tilpums: 5 ml;

Režīms: izokrātiskais (cikloheksāna/etilacetāta maisījums (1/1));

Analīzes kopējais laiks: **60** minūtes

Gēlfiltrācijas hromatogrāfa programma:

Laiks, min	Operācija
0 – 27	Izvade
27 – 55	Savākšana
55 – 60	Kolonnas mazgāšana

PE stobriņā ievieto 5 g tauku, pievieno dioksīnu un PHB ¹³C marķētos analītus, un piepilda līdz 25 ml. Iegūto tauku šķīdumu ievada gelfiltrācija hromatogrāfā.

Iegūto eluenta frakciju ietvaicē rotācijas ietvaicētājā līdz sausam, atlikumu izšķīdina heksānā un attīra ar skābā silikagēla kolonnu.

2.3. Parauga attīrīšana ar skābā silikagēla kolonnu

Stikla kolonnā ar diametru 15 mm ieber 4 g skābā silikagēla (kolonnas apakšā jābūt 5 mm b/ū nātrija sulfāta slānim), kolonnu skalo ar 15 ml heksāna un pievieno paraugu. Eluē interesējošus analītus ar 1 ml toluola un 15 ml heksāna. Eluentu ietvaicē rotācijas ietvaicētājā līdz 0,5 ml tilpumam un attīra ar florisila kolonnu.

2.4. Parauga attīrīšana ar florisila kolonnu

Stikla kolonnā ar diametru 15 mm ieber 6,0 g florisila (kolonnas apakšā jābūt 5 mm b/ū nātrija sulfāta slānim), kolonnu skalo ar 20 ml heksāna un pievieno paraugu. Interesējošos analītus eluē vispirms ar 80 ml heksāna, pēc tam ar 120 ml toluola (heksāna frakcija – PHB, PHN; toluola frakcija – dioksīni un dibenzofurāni);

Toluola frakciju ietvaicē rotācijas ietvaicētājā līdz sausam, atlikumu izšķīdina 0,5 ml heksānā un attīra ar ogles kolonnu.

2.5. Parauga attīrīšana ar ogles kolonnu:

Pēc florisila kolonnas PHB un dioksīnu frakcijas iegūtos kstraktus kvantitatīvi pārnes 3,5 ml *Waters Total Recovery* pudelītēs un atšķaida līdz 1,8 ml.

Dioksīnu frakciju attīra uz kolonnas, kas satur 0,5 g *Carbopack B*. Ekstraktu uznes uz kolonnu, kolonnu mazgā 20 min. ar heksānu (plūsmas ātrums 1,5 ml/min.), pēc tam maina plūsmas virzienu un eluē PHDD/Fs 60 min. ar toluolu (plūsmas ātrums 2,0 ml/min.) Iegūto frakciju ietvaicē rotācijas ietvaicētājā līdz sausam un atlikumu izšķīdina 0,5 ml heksānā.

Polihlorēto bifenīlu frakciju sadala uz *mono-orto* aizvietotiem PHB un *non-orto* aizvietotiem PHB, izmantojot kolonnu, kas satur 4 g *Carbopack B/Celite-545* maisījumu 50/50. PHB frakcijas ekstraktu uznes uz kolonnu, *mono-orto* PHB eluē 45 min. ar heksānu ar plūsmas ātrumu 2 ml/min., *non-orto* PHB eluē 45 min. ar toluolu ar plūsmas ātrumu 2 ml/min.

Iegūtās trīs frakcijas ietvaicē uz rotācijas ietvaicētāja, atlikumu izšķīdina 0,5 ml heksāna un kvantitatīvi pārnes 1,5 ml mikropudelītēs bez ieliktņiem. Ekstraktiem pievieno 30 µl koncentrētās sērskābes, stipri samaisa un atstāj uz 20 min. Iegūto emulsiju cetrifugē 10 min pie 3400 apgr/min. Heksāna slāņus pakāpeniski pārnes 1,5 ml mikropudelītēs ar ieliktņiem, PHDD/F un PHB frakcijām pievieno attīrīšanas standartu šķīdumu. PHDD/F frakciju iztvaicē līdz 10 µl, PHB frakcijas līdz 20 µl. Paraugu analizē ar GH/AIMS metodi.

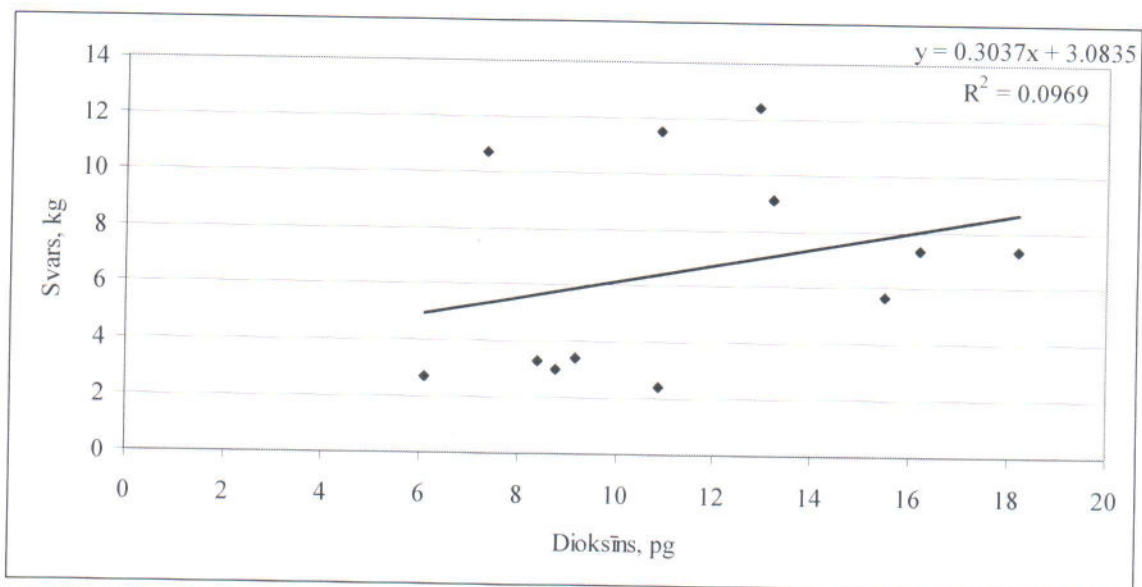
Noteiktais dioksīnu un dioksīniem līdzīgo polihlordifenilu (turpmāk dioksīni) saturs analizētajos lašos parādīts 2.tabulā.

2.tabula. Noteiktais dioksīnu un dioksīniem līdzīgo polihlordifenilu saturs analizētajos Baltijas lašos, pikogramos uz 1 kg svara (zivju numuri kā 1.tabulā)

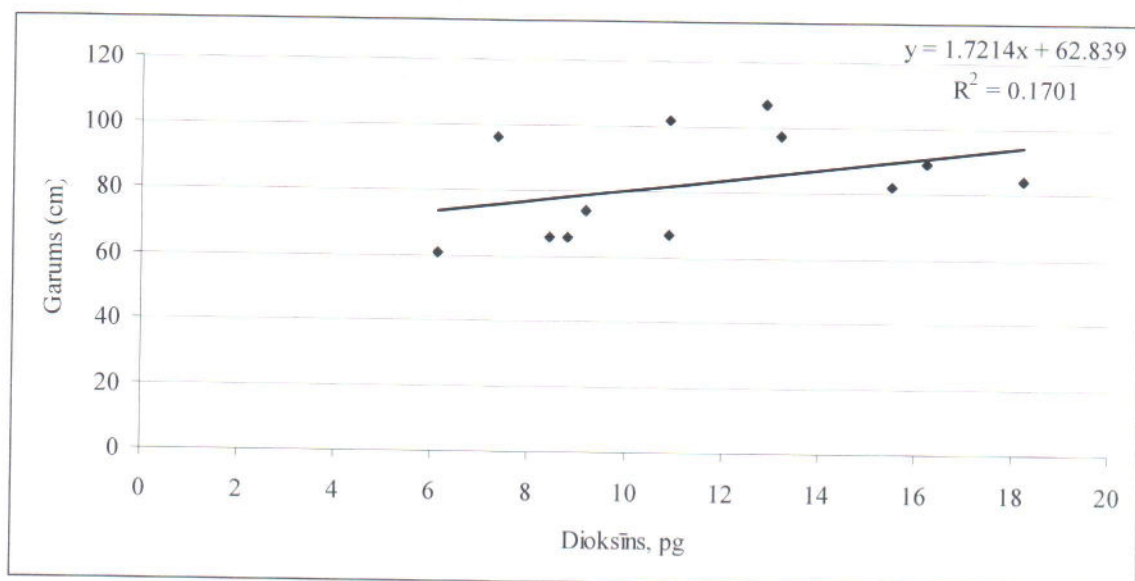
Nr.p.k.	Zvejas rajons	Dzimums	PVO-PHDD/F-TEK	PVO-PHB-TEK	PVO-PHDD/F-PHB-TEK
1	Daugava	mātīte	5.58	7.28	12.9
2	Daugava	tēviņš	3.84	5.33	9.17
3	Daugava	tēviņš	3.78	5.01	8.79
4	Daugava	tēviņš	5.76	7.46	13.2
5	Daugava	mātīte	4.76	6.16	10.9
6	Daugava	mātīte	6.42	9.13	15.5
7	Daugava	tēviņš	7.14	9.03	16.2
8	Daugava	tēviņš	7.93	10.3	18.2
9	Venta	mātīte	3.54	3.80	7.35
10	Venta	tēviņš	3.21	2.90	6.11
11	Venta	tēviņš	3.76	4.65	8.42
12	Venta	tēviņš	4.45	6.47	10.9

Pieļaujamais līmenis 8 pg/kg nav pārsniegts 2 lašos. Vidējais dioksīnu saturs analizētajos lašos bija 11,5 pg/kg, kas par 44% pārsniedz noteikto normu. Kopumā dioksīnu daudzums mātītēs bija nedaudz augstāks nekā tēviņos, kas izskaidrojams ar mātīšu lielākajiem izmēriem un ilgāku jūrā pavadītu laiku, kurā ar barību tika uzņemti dioksīni. Taču šie rādītāji statistiski būtiski neatšķīrās un bija attiecīgi 11,7 un 11,4 pg/g.

Regresijas analīze starp dioksīnu saturu lašos un tā bioloģiskajiem parametriem parādīja, ka labāka sakarība pastāv starp dioksīnu saturu un garumu (1. un 2.attēls). Determinācijas koeficients starp dioksīnu saturu lašos un lašu garumu ir $R^2=0.17$. Pēc regresijas vienādojumiem aprēķinātais zivju svars un garums, kurā dioksīnu līmenis sasniedz 8 pg, bija attiecīgi 5.5 kg un 76 cm, kas nedaudz pārsniedz lašu tirdzniecībā noteiktos ierobežojumus (4 kg un 72 cm).



1.attēls. Sakarība starp dioksīnu saturu lašos un lašu svaru.



2.attēls. Sakarība starp dioksīnu saturu lašos un lašu garumu

3. Atšķirības rezultātos pa gadiem

Veicot dioksīna analīzes 2010. un 2011.g. izmantotas atšķirīgas lašu grupas. Tā 2011.g. analīzēs izmantotajiem lašiem vidējais garums bija 82,6 cm, bet 2010.g. nedaudz mazāks- 81.3 cm. Atšķirās arī mātišu- tēviņu skaits analīzēs, zvejas rajoni, zivju minimālais izmērs u.c. parametri.

Taču datu statistiskā analīze (F tests un T- tests paraugkopām ar dažādām dispersijām) liecina, ka dioksīna vidējais saturs, kas 2010.g. bija 10,7, bet 2011.g.- 11,5 pg/g n, atšķiras būtiski pie $p=0,05$.

Secinājumi un rekomendācijas

Starp dioksīnu saturu lašos un lašu bioloģiskajiem parametriem nozīmīgākā sakarība, tāpat kā 2010. gadā veiktajos pētījumos, atrasta ar lašu garumu. Pēc regresijas vienādojuma atrasts, ka pieļaujamais dioksīnu līmenis 8 pg tiek pārsniegts, lašiem pārsniedzot 76 cm, kas ir tuvs pašreiz lietotajam lašu izmēram (72 cm), ar kuru ierobežo lašu tirdzniecību Latvijā. Tātad dotā pētījuma rezultāti nevar kalpot par pamatu esošo ierobežojumu pārskatīšanai.

Jāsecina, ka nav iegūti būtiski atšķirīgi rezultāti no 2010. gadā veiktajām analīzēm. Rezultātu atšķirības ticamāk nosaka atšķirības analīzēs izmantoto lašu izmēru un vecuma sastāva ziņā. Atšķirības ir statistiski būtiskas.

Jāatzīmē, ka Zviedrijā un Somijā lašu tirdzniecībai pašu valstu teritorijās nav ierobežojumu, bet abām valstīm ir pienākums veikt regulāru monitoringu, kā arī informēt patērētājus, ka lašos ir paaugstināts dioksīnu līmenis.

Domājams, svarīgi ir ņemt vērā ne tikai dioksīnu līmeni lašos, bet arī tā īpatsvaru kopējā pārtikas grozā. Ņemot vērā Baltijas laša zemās nozvejas Latvijā, to īpatsvars Latvijas iedzīvotāju pārtikas grozā ir ļoti zemā līmenī, tāpēc arī uzņemtais dioksīnu daudzums ir ļoti mazs. Pašlaik laša tirdzniecības ierobežojumu pārskatīšana būtu iespējama tikai no šī viedokļa, jo konstatētais dioksīnu līmenis joprojām saglabāties tajā pašā paaugstinātajā līmenī.