

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ “ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА

КАТЕДРА ХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на Томислав Николаев Ризов

**ПОЛИХЛОРИРАНИ БИФЕНИЛИ В ХРАНИ ОТ ЖИВОТИНСКИ
ПРОИЗХОД**

**за придобиване на образователно-научна степен “доктор”
по Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни
вещества, 01.05.10**

**Научен ръководител
доц. Мона Станчева, дх**

**Рецензенти
проф. Георги Антоф, дхн
доц. Бистра Галунска, дб**

Варна, 2011

Дисертационният труд се състои от 138 страници, 19 фигури и 28 таблици.
Цитирани са 353 литературни източника.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ПХБ (РСВ) - полихлорирани бифенили

Σ ПХБ - сума от концентрацията на 14-те броя определени полихлорирани бифенили

ДДТ - дихлоро-дифенил-трихлороетан

ХОП - хлорорганични пестициди

ГХ - газова хроматография

ЕУД - електронулавящ детектор

МС - масспектрометър

НPLC - високоефективна течна хроматография

СОП - стандартна оперативна процедура

$X_{\bar{r}}$ – средна геометрична стойност

t - критерий - критерий на Стюdent-Фишер

P - статистическа достоверност

У В О Д

През първата половина на миналия век започва бурното развитие на химическата индустрия. Слага се началото на синтеза и промишленото производство на пестициди, торове, препарати за промишлено и битово използване, лекарства, биологичноактивни вещества (хранителни добавки и хранителни суплементи), козметика и пр. Положителният им ефект в световен мащаб по отношение на здравето и икономическото развитие е много сериозен. Разпространението на редица болести, които причиняваха епидемии със стотици хиляди смъртни случаи, се сведе до минимум. Развитието на селското стопанство във всичките му направления се ускори. Същият ефект се получи и по отношение развитието на индустрията, подобряване битовите условия и др. За съжаление не много дълго след масовото внедряване на голям брой от химическите препарати се появиха първите сигнали за вредното им въздействие върху човешкия организъм. Класически пример в това отношение са хлорорганичните пестициди и преди всичко ДДТ и неговите метаболити, което наложи забрана за производство и употреба.

Аналогична ситуация се получи и с полихлорираните бифенили (ПХБ). Тяхното промишлено производство започва след 1930 г и поради широкото им приложение нараства относително бързо. По приблизителни данни общият обем произведени ПХБ е няколко милиона тона. В средата на миналия век се публикуват първите сведения за тяхното вредно влияние върху околната среда и човешкия организъм. Редица известни учени провеждат широки епидемиологични и токсикологични изследвания. Получените от тях резултати категорично доказват, че около 10 от общо 209-те броя ПХБ, имат сериозна токсичност. Естествено този факт предизвиква първоначално ограничаване на производството и приложението им, а в последствие води до пълната им забрана. Най-напред те биват забранени в Швеция през 1972, в САЩ – 1977г, в Норвегия – 1980, във Финландия – 1985, в Дания – 1986 г. и пр. Въпреки забраната, изхвърлянето им в околната среда от стари електрически съоръжения и домакински електроуреди продължава, а поради тяхната резистентност, дълъг период на полуразпад и способността им да се натрупват в различните компоненти на околната среда, животните и хората, те още дълги години ще бъдат сериозна потенциална опасност за здравето на хората. За да се намали реално съществуващия риск от замърсяване с тези устойчиви органични замърсители, е въведена Стокхолмската конвенция /2001г/, в ЕС бяха приети редица директиви, свързани с извеждането от

употреба и правилното съхранение и обезвреждане на стари съоръжения, съдържащи ПХБ, управление и контрол на процесите по изгаряне на отпадъци, ограничения за съдържанието на ПХБ в различни храни.

Редица проучвания показват, че тези устойчиви органични замърсители се натрупват в храни от животински произход, включително в риба и морски организми. Необходимостта от мониторинг на тези замърсители в околната среда и храните произтича от високата им устойчивост и натрупване в живите организми и човека. Въздействието върху човека може да се осъществи по различни начини, но храната е основен източник за попадането им в организма.

В момента след хлороорганичните пестициди и тежките метали, най-изследваната група замърсители са полихлорираните бифенили, диоксини и фурани, които се наричат съкратено „диоксини”. Има публикувани много научни разработки относно токсичните им свойства, методите за определяне, разпространението в околната среда, експозицията на населението, мониторингови процедури и др. Независимо от сериозното развитие на аналитичната химия на „диоксините”, все още в малко лаборатории се извършват пълни анализи на различни видове храни, няма разработен автоматизиран метод, който да се използва като рутинна аналитична процедура.

В България все още не е въведен контрол на храни за наличие на ПХБ и няма изследвания за съдържанието им в храни, което определя целта и задачите на дисертацията.

Целта е изследване на храни от животински произход за наличие на полихлорирани бифенили и поставяне основите на мониторинг за устойчиви органични замърсители на тези храните у нас.

За постигане на целта ще бъдат реализирани следните **задачи**:

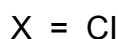
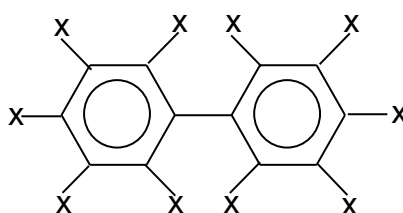
1. Разработване на стандартна оперативна процедура и валидиране на метод за определяне на основните ПХБ в храни, богати на мазнини, който да послужи като база за определяне на диоксини, фурани и хлороорганични пестициди в една и съща проба.

2. Анализиране на различен вид храни от животински произход от България и щата Мичиган (САЩ) и използване на резултатите за приблизителна оценка на замърсяването на тези храни с ПХБ у нас в сравнение с щата Мичиган, както и с други страни.

3. Анализирани в динамика на няколко основни видове риба от българското Черноморие за наличие на ПХБ, оценка на безопасността на рибата като храна и като индикатор за замърсяването на Черно море в района на българското крайбрежие.

ОБЩИ СВЕДЕНИЯ ЗА ПХБ

Полихлорираните бифенили (ПХБ) са синтетични хлорирани ароматни въглеводороди с обща формула $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, където n е броят на хлорните атоми в молекулата. Структурата е следната:



Общият брой ПХБ е 209. При тях броят и позицията на хлорните атоми са различни. Според номенклатурата на УРАС те са подредени по номера в нарастващ ред и по степента на хлориране от 1 до 209.

Индивидуалните чисти ПХБ са безцветни вискозни течности или кристални съединения, докато търговските препарати са течни смеси от различни представители с цвят от светложълт до тъмнокафяв. ПХБ са устойчиви на киселини и основи, както и на различни окислителни. Имат висока точка на възпламеняване (140 - 380°C). Парите им са по-тежки от въздуха, без да формират експлозивни смеси с него. Тяхната висока термична проводимост и температурна устойчивост са причина за широката им употреба като охлаждащи/загриващи течности в затворени системи (трансформатори, кондензатори, промишлени съоръжения, домакински електроуреди и др.), хидравлични масла, суровини за производството на пестициди, мастила, пластмаси, а също така в хартиената и текстилната индустрия. През 1881 е първия синтез на ПХБ, а през 1929 г. е началото на тяхното промишлено производство. Търговските наименования се различават в зависимост от фирмата и страната - производител: Aroclor, Pyranol, Pyroclor (USA); Phenochlor, Pyralene (Франция), Clopehu, Elaol (Германия), Renchlor, Apirolio (Италия).

Първите данни за вредното им въздействие върху организма се появяват в научната литература през 40-те години на миналия век. В следващите години се извършват и публикуват резултатите на голям брой токсикологични и

епидемиологични изследвания. Установено е, че при високите температури на използване се образуват химически съединения, някои от които са по-токсични от ПХБ (като диоксини и фурани). Особено високи са концентрации на ПХБ се образуват при горене на различни видове отпадъци.

Независимо от многото научни разработки, все още има нерешени фундаментални въпроси, по които няма консенсус между експертите. Няма единен подход при анализа на храни и още по-малко при използването и представянето на получените резултати. Някои автори определят седем индикаторни ПХБ, а други определят всички съдържащи се ПХБ в пробата. По-известните и с по-големи възможности лаборатории правят анализи на “диоксините” и представят резултатите по различни начини, така че да могат да служат и за оценка на безопасността на дадена храна, и за оценка (мониторинг) на замърсеността на околната среда. Има дискусия и за избора на храни, които могат да се използват като индикаторни за оценка на замърсяването в даден район. Безспорно е, обаче, че рибите и останалите водни животни са най-често използвани като индикатори.

За качествената идентификация и количественото определяне на ПХБ има разработени и публикувани редица методи, като газова хроматография (ГХ), високоефективна течна хроматография (HPLC), тънкослойна хроматография и др.), но най-подходящ се оказва газовата хроматография с електронноулавящ (ЕУД) или масспектрометричен детектор (МС). Изборът на хроматографска колона не е труден, тъй като в това отношение има редица проучвания и на този етап почти единодушно е мнението, че подходящи колони са капилярните RTX-5, OV-5, DB-5, SPB-5 и други подобни, които са неполярни и разликата в означаването им е свързана повече с фирмите, които ги произвеждат, а не със съществени различия в химическия състав на неподвижната фаза. Оптимизацията, т.е. определяне на условията за най-добро разделяне е свързана основно с прецизиране на температурната програма на колоната.

От общо 209 ПХБ, 135 се установяват в различните видове проби. Независимо, че практически важни са индикаторните (28, 52, 101, 138, 153, 170, 180) и диоксиноподобните (77, 105, 118, 126, 156, 167, 169, 180), хроматографските условия следва да осигурят възможно най-добро разделяне, за да се избегне припокриване на пикове, респективно допускането на качествени и количествени грешки.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

РАЗРАБОТВАНЕ НА СТАНДАРТНА ОПЕРАТИВНА ПРОЦЕДУРА (СОП) И ВАЛИДИРАНЕ НА МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПХБ

Стандартната оперативна процедура включва следните етапи:

1. Пробовземане
2. Съхранение на пробите и изготвяне на средна лабораторна проба и проба за анализ.
3. Извличане на мазнината и определяне на общото количество
4. Пречистване на екстракта.
5. Качествено и количествено определяне на ПХБ.
6. Валидиране на метода.
7. Разработване и внедряване на система за осигуряване качеството на извършваните анализи.

1. Пробовземане

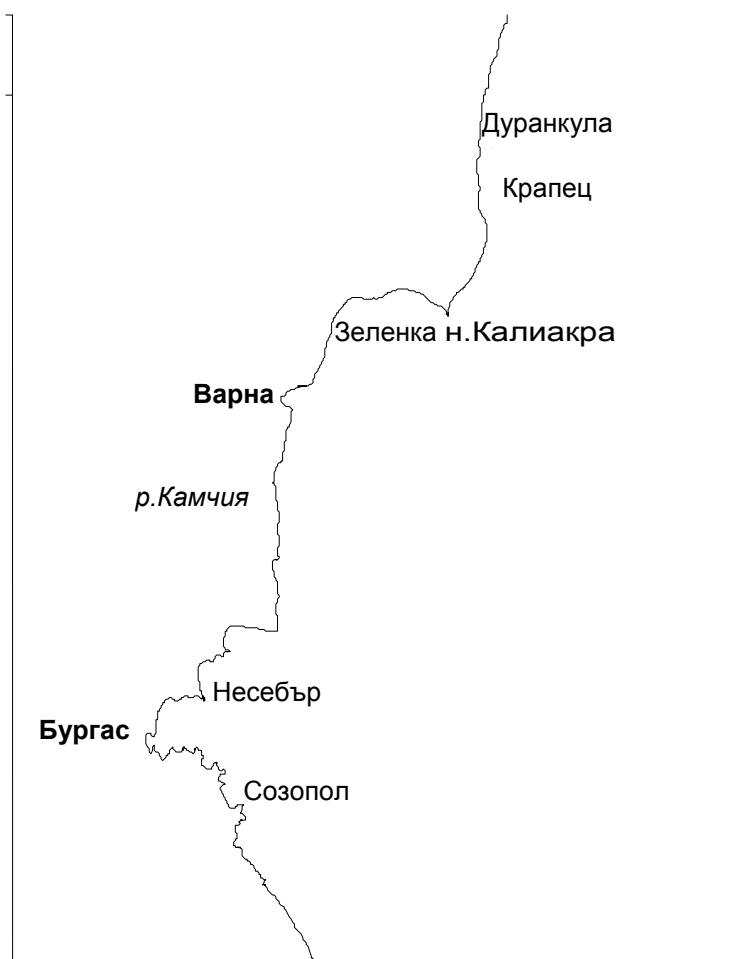
Пробовземането е организирано така, че с възможно най-малък брой проби да се постигне оптимално реализиране на поставената цел. Всички проби са набрани на случаен признак. Една част от тях са закупени от търговската мрежа и от производители - млека и млечни продукти, месни продукти и яйца. Рибите са закупвани от съответните рибни борси и директно от рибарите.

Във връзка с изследването на динамиката на замърсяване при рибите, пробите са набрани в три последователни години (2003, 2004 и 2005) и от три района на Черноморието – Север, Варна, Юг (фиг. 1).

2. Съхранение на пробите и изготвяне на средна лабораторна проба, и проба за анализ

Съхраняването на пробите до тяхното анализиране е съобразено със съответните изисквания за всеки конкретен хранителен продукт. Анализите са извършвани в срока на годност. Рибите са транспортирани до лабораторията в хладилни чанти, след което са съхранявани при температура не по-висока от -10°C. Изготвянето на средната лабораторна проба по групи продукти е съобразено с препоръките в някои нормативни документи и огромния световен опит. За млякото,

като лабораторна проба е използвано съдържанието в оригиналните опаковки. Пробата за анализ е аликвотна част съответно отчитана в ml или g. За изготвяне на пробата яйца се вземат по 5 броя от всяка партида. След отстраняване на черупките, целите яйца се хомогенизират много добре и веднага след това се взема част от сместа около 15 – 20g за анализ. Ако се наложи да се вземе проба за анализ от вече анализирана лабораторна проба тя се хомогенизира отново.



Фиг. 1

Карта на българското черноморие

Район Север – Калиакра, Зеленка, Крапец

Район Варна – Варненски залив, Камчия, Варненско езера

Район ЮГ – Несебър, Бургас

При изготвяне на лабораторна проба от “твърдите” проби (сирена, месо, колбаси) се вземат по около 200g от три проби от една и съща партида, след което се

хомогенизират в миксер или мелачна машина. От така изготвената лабораторна проба се вземат 10 – 20g за анализ.

Средната проба за дребната риба (сафрид, трицона) е около 500 g, а за едрата (карагьоз, кая и лефер) е около 1 kg. За приготвяне на пробата за анализ се използва ядивната тъкан, само при трицоната се вземат цели рибки, пробата се хомогенизира много добре. За анализ се претеглят с точност до mg между 10 – 20g в зависимост от очакваното съдържание на мазнина.

Лабораторните проби се съхраняват при подходящи условия до успешно приключване на анализа, обработка на резултатите и сравняването им.

3. Извличане на липидите (екстракция) и определяне на общото липидно съдържание

Екстрахирането на липидите се извършва със Сокслет апаратура. За изсушаване и привеждане на пробата за анализ в подходящо е използван безводен натриев сулфат. Оптимизацията на извличащия разтвор е извършена чрез използване на различно съотношение на разтворителите в следните двойки: хексан/ацетон и хексан/дихлорметан. За целта по една проба от мляко, месо и риба с добавка на ПХБ са екстрахирани с различна смес от споменатите разтворители в продължение на 24 часа. Най-удачна се оказва комбинацията хексан/дихлорметан. По същия начин е оптимизирано времето за екстракция. Изпитани са 15, 18 и 24 часа. При 18 часа извличането практически е пълно. Извлекът се довежда до точно определен обем, от който се вземат аликвотни части за анализ и за определяне на съдържанието на мазнина. Количеството на екстрахираните липиди (мазнини) се определя тегловно по стандартизиран метод.

От 10 до 20g от пробата, в зависимост от очаквания процент мазнини се претеглят с точност до втория знак и се смесват с безводен натриев сулфат до получаване на хомогенна суха смес. Сместта се прехвърля в патрона за Сокслет, прибавя се вътрешният стандарт (ПХБ № 30 и 204), след което патронът се затваря с тампон от стъклена вата. Екстракцията се извършва с 300ml дихлорметан:хексан в съотношение 3:1 об/об в продължение на 18 часа. Екстрактът се изпарява на ротационен вакуумизпарител при 55° C до около 5 ml. Концентрираният разтвор се прехвърля в мерителен цилиндър от 10ml. Колбата се промива двукратно с 1-2 ml хексан, след което цилиндърът се допълва до марката с хексан.

4. Пречистване на екстракта

Пречистването на екстрактите се явява най-важния и съответно най-трудния за оптимизация процес. Най-използваната техника за пречистване на екстрактите е колонната хроматография. Най-подходящи са стъклените колони с диаметър 0.5 – 1 см и 30 см дължина, адсорбентите флоризил, силикаген, алуминиев окис, активен въглен или комбинация от някои от тях и елуентите хексан, ацетон, метиленхлорид, метилов алкохол, ацетонитрил и др. Самият процес включва два етапа. Елуиране при “чисти” условия, т.е. определяне на адсорбента, елуента, броя и обема на фракциите чрез използване на стандартни разтвори на ПХБ и ХОП. При вторият етап се проверява доколко при установените в първия етап условия се отстраняват пречещите вещества. На елуиране се подлагат екстракти от различните проби, към които се добавят стандартни разтвори от ПХБ и ХОП. Всяка от фракциите се инжектира в газовия хроматограф. Оптимизация по отношение елуента и събираните фракции се извършва при реални условия.

Направени са опити с флоризил и силикагел. По-ефикасен се оказва силикагелът и то в комбинация - нормален и подкислен силикагел. Използването на подкисленият силикагел е с цел елиминиране на мазнините в пробата. При по-високо количество мазнини, количеството подкислен силикагел може да бъде удвоено, при което се избягва предварителното изгаряне на мазнините в пробите чрез киселина, което води до съответни загуби на определяемите вещества. Като най-подходящ за елуент бе избран хексана.

Аликвотна част, отговаряща на около 0.5g мазнини се пречиства на колона. Колоната се затапва със стъклена вата. При затворен кран се вливат 50ml хексан, след което се добавят последователно 2g силикагел, 2g подкислен силикагел, 2g силикагел. След утаяване на адсорбентите кранът на колоната се отваря докато нивото на хексана достигне около 2-3mm над сулфата. Аликвотната част от пробата се влива в колоната през фуния с поставен безводен натриев сулфат. Кранът се отваря докато се достигне същото ниво. Вливат се последователно две порции по 2-3ml хексан и след като нивото достигне наново 2-3 mm над сулфата се вливат 50ml хексан и се провежда елюирането със скорост приблизително 1 капка на секунда. Събират се 50ml, които първоначално се изпаряват на ротационен вакуумизпарител до около 1ml при 45°C, след което се концентрира почти до сухо чрез издухване с азот.

5. Качествено и количествено определяне на ПХБ

При настоящата разработка основно е използван ГХ/ЕУД, а за допълнителна идентификация - ГХ/МС. Използвана е капилярна колона DB-5 с дължина 60m, вътрешен диаметър 0.25mm и дебелина на филма 0.25µm.

Изпареният почти до сухо елуент се разтваря до 0.5ml с хексан и 1µl се инжектират при следните хроматографски условия:

- температура на инжектора – 250o C, разделяне на потока – около 1:50
- носещ газ хелий със скорост 30 ml/min.
- температурна програма на колоната: първоначална 120°C, повишаване до 320°C със скорост 2°C/min и задържане 15min. Времето за една хроматограма е около 100min.

6. Валидиране на метода

Валидирането на метода е задължително условие, за да е ясно какви са неговите възможности в количествено отношение и доколко може да се прилага за постигане на поставената цел. По същество валидирането е свързано с определяне на основните аналитични параметри на метода. Като метод е обособена частта от СОП от пробата за анализ до изчисляване на резултатите.

Валидирането е осъществено съгласно изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025:2005 по следните параметри: **линейност (линеен диапазон), граница на откриване, граница на определяне, аналитичен добив и повторемост.**

Линейност (линеен диапазон) е концентрационния интервал, в който е спазена линейната зависимост: инжектирано количество/отговор на детектора, като височина или площ на съответния пик. Определят се чрез инжектиране на различни количества от даденото вещество и проверка на линейната зависимост. Линейността е определена за всички 14 ПХБ, обект на изследването, както и за ПХБ № 30 и 204, които са използвани като вътрешен стандарт. Долната граница на линейния диапазон е газохроматографската граница на определяне, а горната е най-голямото количество от даден ПХБ, след което не се спазва линейния отговор на детектора. Линейността се изразява чрез съотношението горна към долна граница на линейния диапазон.

За ЕУД линейността по принцип не е голяма, тя зависи и от качеството на разделянето на колоната. За ПХБ линейността варира между 10 и 25 ppb при установените газохроматографски условия. Сравнително ниската линейност изисква

да се преценява при всеки отделен случай и ако има съмнение, че концентрациите са високи, разтворената за инжектиране проба да се разрежи няколкократно, за да е сигурно, че е спазен линейния диапазон.

Линейността и линейният диапазон се определят по следния начин:

$$L_x = \frac{C_M}{C_0} \quad \text{ЛД} = C_M - C_0$$

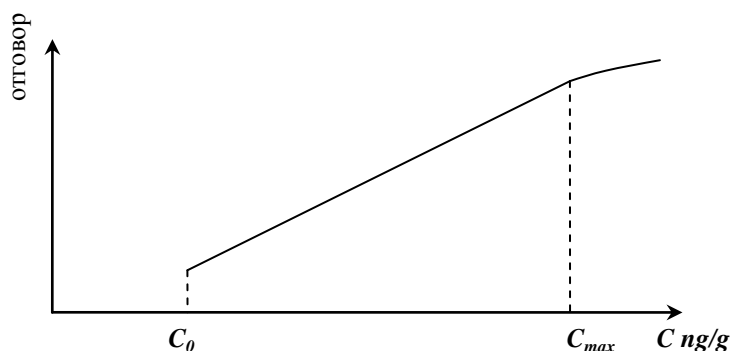
където:

Лх – линейност; ЛД – линеен диапазон

См - максималното количество, при което „отговорът” е линеен;

Со - минималното количество (чувствителността);

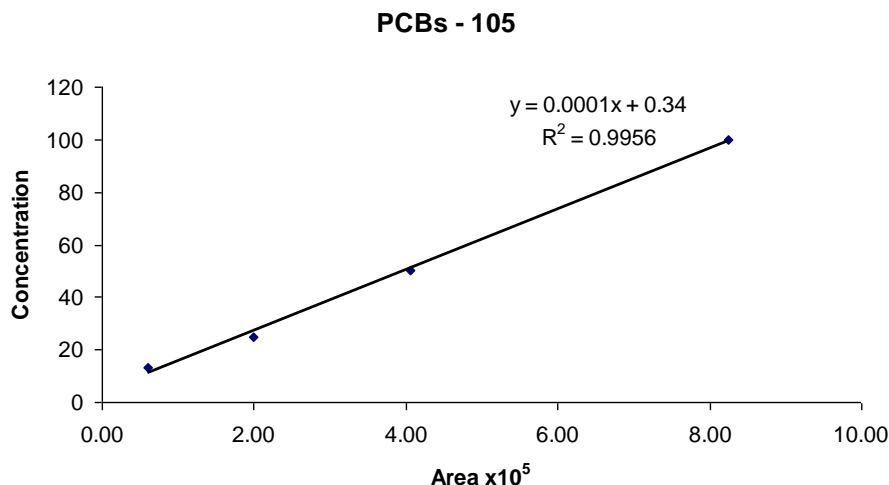
На фиг.2 е дадена принципната схема за установяване на линейния диапазон, а на фиг.3 - линейната зависимост за ПХБ № 105.



Фиг. 2

Линеен диапазон на метода

Граница на откриване е най-ниската концентрация в дадена проба, която при максимална чувствителност на газовия хроматограф и минимален обем на разреждане преди инжектиране дава пик, чиято височина е три пъти по-голяма от амплитудата на фоновия шум. Пикът е индикация за наличие или отсъствие на съответното вещество, но не подлежи на количествена оценка. Границата на откриване на различните ПХБ варира от 0.2 до 0.5 ng/g мазнина.



фиг. 3

Линейна зависимост за ПХБ №105

Граница на определяне(чувствителност) е най-ниската концентрация в дадена проба, която при максимална чувствителност на газовия хроматограф и минимален обем на разреждане преди инжектиране, дава пик с височина около девет пъти амплитудата на фоновия шум. Пикът подлежи на качествена и количествена оценка. Границата на определяне е по същество долната граница на линейния диапазон. За изчисляване на чувствителността са използвани данните, получени при определяне на линейния диапазон и отнесени към 0.5g мазнина и 0.5 ml обем на разреждане преди инжектиране. Установените граници на определяне (чувствителност) за определяните ПХБ варира от 0.7 до 1.2 ng/g мазнина.

Аналитичният добив е мярка за наличието или отсъствието на системна грешка. За изчисляване на аналитичния добив е използван методът на стандартната добавка. Като стандартна добавка са използвани ПХБ № 30 и 204. От една страна те имат същите хроматографски отнасяния както и останалите ПХБ, които се определят, а от друга безспорно е доказано, че те не присъстват в произвежданите смеси от ПХБ, не са разпространени в околната среда и не се съдържат в храните. Към пробите преди смесването им с безводния натриев сулфат се добавя стандартен разтвор на ПХБ № 30 и 204, така че в различните проби да се получи концентрация от около 5 ng/g мазнина. Общо от всички анализирани проби, резултатите за ПХБ № 30 и 204 за първите анализирани 36 проби мляко, млечни продукти, месо, месни, риба, яйца са използвани за изчисляване на статистическите параметри.

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n} \quad S = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X}^2 - X_i^2)}{n-1}}$$

$\bar{X} \pm \frac{S.t}{n}$ - доверителен интервал на средната аритметична

$$AD = 100 - \frac{M - \bar{X}}{M} 100 \%$$

\bar{X}_i - единично определение (концентрации);

X - средна аритметична;

n - брой определения;

M - точно добавеното количество;

N - степени на свобода;

S - стандартно отклонение;

$$t = f(P = 95\%, N = n - 1) - \text{коэффициент на Стюdent - Фишер}$$

Установените аналитични добиви за ПХБ № 30 и 204 са съответно 65 и 60%. Независимо че аналитичните добиви не са близко до 100%, те са напълно приемливи, като се има предвид много ниските концентрации.

Повтаряемост е степен на съвпадение на резултати от последователни измервания на една и съща измервана величина, извършени при едни и същи условия на измерване (една и съща процедура на измерване; един и същ оператор; един и същ измервателен уред, използван при едни и същи условия; една и съща лаборатория; за максимално кратък период от време). Повтаряемостта по принцип е прието да се представя като относително стандартно отклонение (RSD%), наричано в повечето случаи коефициент на вариации (KB).

$$KB = \frac{S}{X} 100\% \text{ (RSD)}$$

RSD - относително стандартно отклонение

KB - коефициент на вариации

За изчисляване на повтаряемостта са използвани данните от същата серия 36 проби, с които е изчислен аналитичният добив. RSD (KB) за № 30 е $\pm 26.2\%$, а за № 204 е $\pm 23.6\%$.

Установените параметри на метода, усреднени от резултатите за ПХБ 30 и 204 са:

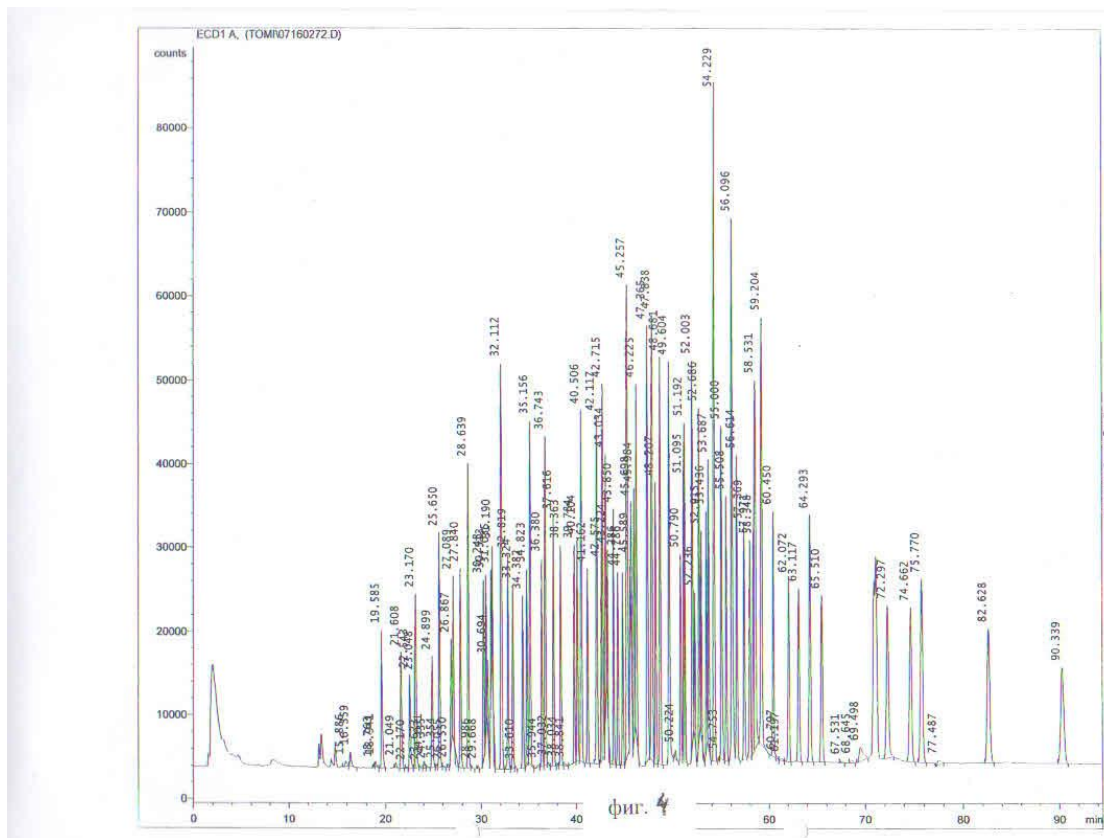
- Линеиност - от 10 до 25ppb;
- Граница на откриване от 0.2 до 0.5 ng/g мазнина;
- Граница на определяне (чувствителност) от 0.7 до 1.2 ng/g мазнина;
- Аналитичен добив - 63%;
- Повтаряемост (КВ) - $\pm 25\%$.

7. Система за осигуряване качеството на извършаните анализи

Съгласно изискванията за лабораториите, определящи замърсители в храни и отразени в БДС/EN/ISO 17025 разработването и внедряването на системи за вътрешен лабораторен контрол на качеството (АQA) е задължително. Внедрената от нас система се базира на използването на вътрешен стандарт. В случая ПХБ № 30 и № 204 са не само близки по свойства, но са от същия клас и осигуряват ефикасен контрол на качествена идентификация и количественото определение. Към всяка проба се добавя точно количество от двете съединения. Те са включени и в стандартния разтвор на 14-те ПХБ, които се определят. Същите съединения и подход е използван и при валидиране на метода. Въведена е система за вътрешнолабораторно периодично калибриране на газовия хроматограф, чрез разработване на специализирана процедура и документирането ѝ.

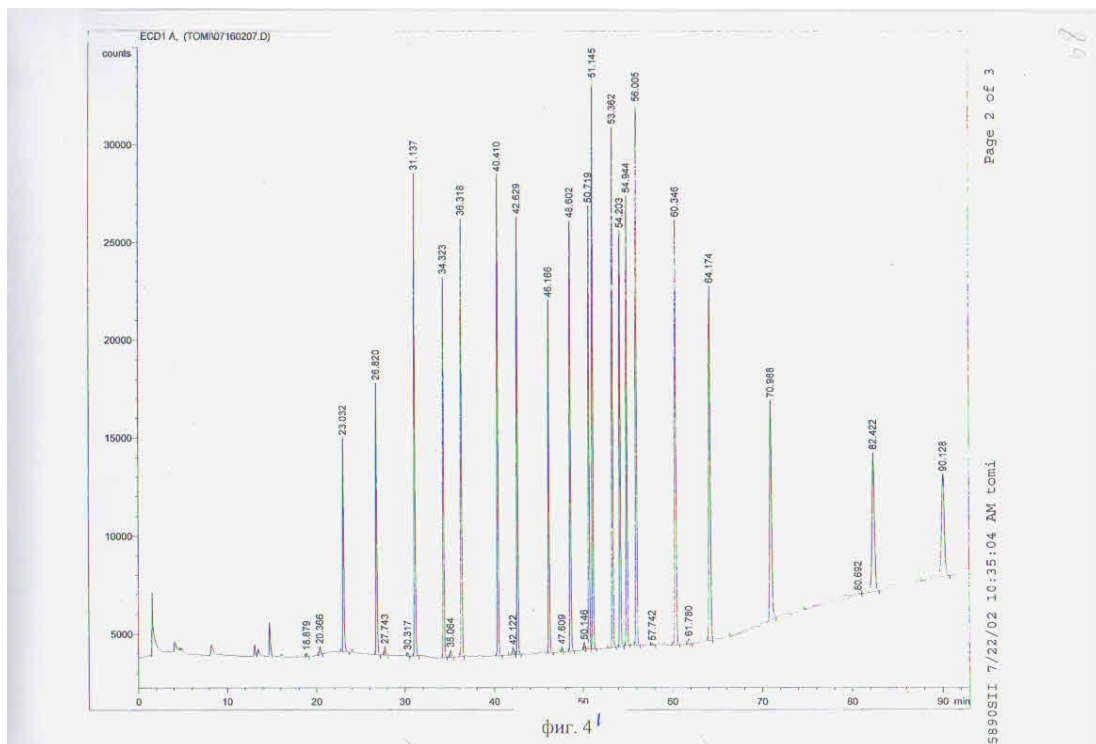
След оптимизиране на газохроматографските условия се инжектират пет стандартни разтвори на ПХБ №30 и №204 с концентрации близки до чувствителността (долната граница на линейния диапазон), до горната граница, а останалите три равномерно разположени между двете гранични точки. От получените резултати е построена корелационна права и е изчислена повтаряемостта. С тези данни е оформено калибрирането, което периодично се проверява и при необходимост се коригират газохроматографските условия.

При анализа са използвани стандартни разтвори на смеси от различен брой ПХБ. На фиг. 4 е представена хроматограма на стандартен разтвор от 101 броя ПХБ, а на фиг. 5 – стандартен разтвор от 14 броя ПХБ.



Фиг. 4

Хроматограма на стандартен разтвор от 101 броя ПХБ



Фиг. 5

Хроматограма на стандартен разтвор от 14 броя ПХБ

За статистическата обработка и анализ на резултатите е използвана програмата SPSS 16. Приложени са следните тестове:

- за определяне вида на разпределението (хомогенността на извадката - на "Колмогоров – Смирнов";
- за определяне на статистическите параметри и сравняване на сериите резултати - на "Студент-Фишер";
- за проверка на корелацията между отделни серии резултати: на «Спирман» при малка извадка и на «Пирсен» при достатъчно на брой данни.

РЕЗУЛТАТИ ОТ АНАЛИЗИТЕ И ОБСЪЖДАНЕ

I. СЪДЪРЖАНИЕ НА ПХБ В ПРОБИ ХРАНИ ОТ ЖИВОТИНСКИ ПРОИЗХОД ОТ ЩАТА МИЧИГАН И ОТ БЪЛГАРИЯ

От щата Мичиган са анализирани различни видове прясно и кисело мляко, сирена, сметана, майонеза, свинско месо и месни продукти, както и два вида риба. Както беше отбелязано, пробите са закупени от търговската мрежа. Резултатите са представени в таблица 1, където е дадено описание на пробата (производител, наименование), % съдържание мазнини във всяка проба, сума от установените ПХБ в пробата като ng/g мазнини.

Таблица 1: Анализирани проби от щата Мичиган

№	ВИД	ОПИСАНИЕ НА ПРОБИТЕ	% Мазнини	Σ ПХБ ng/g мазнини
1	прясно мляко	От ферма	3.3	110,0
2		«Мелоди»	1.5	957,0
3		«Майер» с витамин Д	3.3	38.5
4		Half and Half	12	11,0
5		Dean foods с витамин Д	3.3	18.2
6		Супер маркет	3.3	32.4
7		„Periwinkle”	4.2	315,0
8		Нескуик с какао	3.3	2.5
1	Кисело Мляко	Данон	3.5	56
2		Youlait	0.9	8
3		Нискомаслено	1.3	23.7
4		Плодово	1.1	2.1
1	сирене сметана	кремсирене «Маер»	33.3	288
2		Borden-colby	32.2	5.8
3		Масло Кремсирене	29	41.7

		«Филадельфия»		
4		Greek style feta	25	164
5		кремсирене”Spartan”	35.7	226
6		кисела сметана „Melody”	11.7	38.2
7		кисела сметана „Melody	20	30.8
8		Масло „Sisco”	86	6,5
9		маслосолено „Lovit”	62	44.8
1	майонеза	Kraft	26.7	144,0
2		Helman – Canada	78.6	7,0
3		Heinz с цели яйца	10.6	20.4
4		Heinz- tartar с яйца(сос)	1.1	168,0
1	Месо и месни продукти	свинско прясно «Маер»	5.4	49.4
2		свинска шунка медальон	4.8	116,0
3		кренвирши смес	28.6	5,4
4		Шунка пуешка	0.6	280,0
5		Говеждо прясно	0.7	53,0
1	Риби	Океанска –риба Тон	1.8	43.6
2		Бяла -Мичиганско езеро	8.8	47,0

Посочените в таблицата резултати показват, че при две от пробите прясно мляко се наблюдават високи стойности за ПХБ – 315 и 957 ng/g в сравнение с останалите, при които стойностите са значително по-ниски, ниски са и тези при пробите от кисело мляко. Твърде различни стойности се наблюдават при сирената, най-високи са те при кремсирената. При майонизите, месото и местните продукти също има високи стойности. От тази група храни висока е концентрацията на ПХБ при пробите от шунка. Стойностите за пробите от риба са много близки, въпреки, че рибите са различни – океанска и от езеро.

Не се наблюдава корелация между % съдържание на мазнините в пробите и съдържанието на ПХБ.

II. РЕЗУЛТАТИ ЗА СЪДЪРЖАНИЕ НА ПХБ В ПРОБИ ХРАНИ ОТ БЪЛГАРИЯ

Както бе отбелязано при пробонабирането, от България са анализирани общо 14 проби прясно и кисело мляко, 5 проби яйца, една проба от майонеза и една проба от месо на мечка. Данните на тези проби, както и получените резултати за всяка проба, като % мазнини и Σ ПХБ в ng/g мазнина са дадени в таблица 2.

Резултатите показват, че изследваните проби от прясно мляко се характеризират с твърде различни стойности, дори и тези, които са от един и същ район. Три от пробите прясна мляко показват значително високи стойности /393, 440 и 587 ng/g мазнина/ в сравнение с останалите, докато пробата прясно мляко с витамин

Д е с най-ниско съдържание - 4,4 ng/g мазнина. Едната от пробите кисело мляко също е с висока стойност – 247 ng/g мазнина.

Таблица 2: Анализирани проби от България

№	ОПИСАНИЕ НА ПРОБИТЕ	% МАЗНИНИ	Σ ПХБ ng/g мазнини
КРАВЕ МЛЯКО			
1	Ферма врачанско «Данон»	5,5	53,7
2	Ферма врачанско «Данон»	4,5	440,0
3	Ферма врачанско «Данон»	3,3	16,5
4	Ферма врачанско «Данон»	4,7	96,9
5	Ферма врачанско «Данон»	3,7	110,0
6	Ферма врачанско «Данон»	5,3	47,2
7	Ферма врачанско «Данон»	3,5	53,5
8	прясно «Данон» - 3%	2,9	587,0
9	прясно «Данон» с витамин Д - 3%	2,9	4,4
10	кисело «Данон» - 3,6%	3,8	49,0
11	кисело «На баба» - 4,5%	4,6	247,0
12	прясно «Маркели» - 3%	3,2	13,8
13	прясно «Велес» - 3%	2,9	61,8
14	прясно «Фибела» - 1,5%	1,7	393,0
Кокоши яйца			
1	частен стопанин	10,8	9,7
2	Гр. Сливница	11,9	5,5
3	магазин София	8,8	-
4	магазин София	12,0	-
5	магазин София	9,9	-
Разни			
1	Майонеза – магазин	31,2	
2	Дива мечка	14,9	142,0

Концентрациите на ПХБ в петте проби яйца и в майонезата са неочаквано ниски. Пробите от яйцата показват стойности от 8,8 до 12 ng/g мазнина. Както се вижда от таблицата, в две от пробите яйца се установяват много ниски концентрации, в една проба яйца и в майонезата се установяват концентрации по-високи от границата на откриване и по-ниски от границата на определяне (чувствителност). В две от пробите не се установява наличие на ПХБ. На фона на данните за яйца в литературата трудно може да се даде обяснение на установеното от нас. Безспорно пробите са прекалено малко, но тази тенденция за “чистота” на яйцата у нас следва да се проучи чрез допълнителни изследвания, включително проучване условията на живот и самата храна на кокошките-носачки.

Представянето на резултатите от изследванията е проблем за авторите, който и досега не е решен еднозначно, което безспорно много често силно затруднява интерпретацията на данните, особено когато се налага сравняването на различни скринингови проучвания. Единствено има съвпадение на представянето, когато трябва да се докаже доколко дадена храна е «опасна» или не от токсикологична гледна точка, т.е. дали TEQ е по-нисък или по-висок от приетия като норма за Европейския съюз (Regulation 1881/EO). В този случай TEQ се изчислява по дадената в изложението по-горе (виж «вредно действие») формула. Във всички останали случаи се използват три подхода за представяне (обобщаване) на получените резултати: чрез средната аритметична и нейното разсейване, чрез медианата и минимума и максимума, и чрез средната геометрична и нейния доверителен интервал. Няма общоприети критерии за това как да бъде избран подхода. Това се решава субективно от съответните научни колективи.

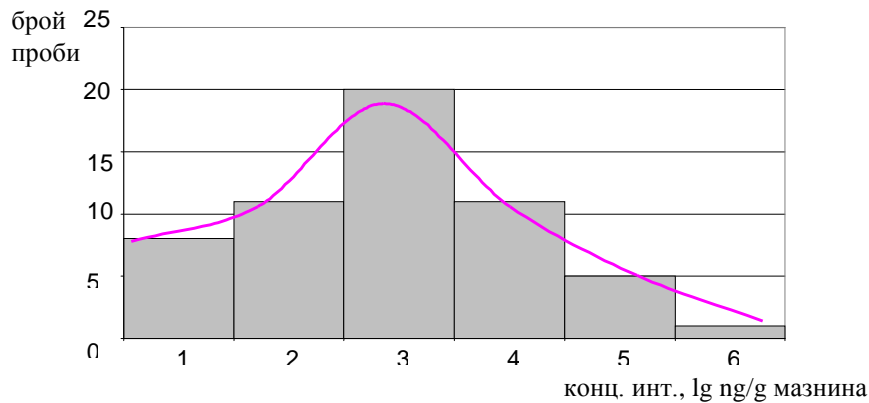
Поради факта, че по принцип резултатите за съдържание на ПХБ в дадена серия проби варират в широки граници и не следват нормално гаусово разпределение, използването на средната аритметична е неправилно от статистическа гледна точка и би могло да доведе до погрешни изводи.

За нас най-информативен и обективен подход е използването на **средната геометрична (X_g)**, тъй като в болшинството случаи резултатите следват нормално логаритмично разпределение. На фиг. 6 е дадено логаритмичното разпределение на същите резултати по концентрационни интервали. При направената обработката са включени всички изследвани проби. Резултатите показват, че десетичните логаритми следват нормално логаритмично разпределение, поради което резултатите са обработени статистически при използване на средна геометрична стойност и доверителния ѝ интервал на съответните групи. Илюстрираното разпределение на резултатите на фиг. 6 е доказано статистически с теста на Колмогоров-Смирнов.

Статистическите параметри са изчислени по следните формули:

Средна геометрична:

$$\text{anti lg}(\overline{\lg X_g}) = \frac{\lg X_1 + \lg X_2 + \lg X_3 + \dots + \lg X_n}{n}$$



Фиг. 6

Логаритмично разпределение на резултатите по брой проби в концентрационните интервали

Стандартно отклонение:

$$\lg S = \sqrt{\frac{\sum(\lg \bar{X}_e^2 - \lg \bar{X}_i)}{n-1}}$$

Интервал на разсейване на едичното определение:

$$\text{anti log}(\lg \bar{X}_e - t \cdot \lg S) \text{ (долна граница)} \quad \text{anti log}(\lg \bar{X}_e + t \cdot \lg S) \text{ (горна граница)}$$

Доверителен интервал на средната геометрична:

$$\text{anti log}(\lg \bar{X}_e - \frac{t \cdot \lg S}{n-1}) \text{ (долна граница)} \quad \text{anti log}(\lg \bar{X}_e + \frac{t \cdot \lg S}{n-1}) \text{ (горна граница)}$$

n - брой резултати в дадена серия

t - коефициента на „Стюdent-Фишер“ при P = 95% и N = n-1

N - степени свобода

В табл. 2 са представени статистическите параметри на резултатите за пробите от Мичиган и от България. Посочени са средните геометрични стойности $X_{ГП}$ доверителният интервал (без този за групата яйца) и минималната и максимална стойности. Средните геометрични стойности варират от 29.6 за мляко до 54 ng/g мазнини за месните продукти от щата Мичиган. За останалите групи храни – сирена и майонеза стойностите са много близки. Статистически достоверни разлики между отделните групи няма.

Таблица 2: Статистически параметри на резултатите на пробите от Мичиган и на българските проби млека и яйца

№	ГРУПИ	N	Xг	МИНИМУМ	МАКСИМУМ	ДОВЕРИТЕЛЕН ИНТЕРВАЛ
ПРОБИ МИЧИГАН						
1	Мляко	12	29.6	2.1	957	8.8 - 134
2	Сирене	9	44.7	5.8	288	13.1 - 153
3	Майонеза	4	43.1	7,0	280	5.4 - 340
4	Месни	5	54,0	5.4	280	9.8 – 296
5	Общо	32	39.6	2.1	957	23.4 - 67
-	Риба	2	45.2	43.7	47	-
ПРОБИ БЪЛГАРИЯ						
14	Мляко	14	72.3	4.4	587	31.2 - 165
-	Яйца	5	2.5	1.2	9.7	-

За пробите от България статистическа обработка е направена на пробите от прясно и кисело мляко. В таблицата стойността за млякото е обща стойност.

За пробите от щата Мичиган най-ниска стойност на сумата от ПХБ има при киселото мляко, при останалите групи храни – прясно мляко сирене и майонеза съществени разлики не се наблюдават. Малко по-високи стойности на ПХБ има при месните продукти, но стойността е по-ниска от тази при млякото / кисело и прясна/ от България. Независимо че пробите не са достатъчно на брой и не обхващат всички райони на България, като тенденция, може да се приеме, че установените концентрации за млякото независимо, че са около два пъти по-високи от тези за щата Мичиган все още са в долната част на замърсеност в сравнение с подобни изследвания в други страни, райони и континенти. В литературния обзор са представени резултати за различни видове храни от редица изследвания в различни райони на света.

III. СЪДЪРЖАНИЕ НА ПХБ В РАЗЛИЧНИ ВИДОВЕ РИБИ ОТ БЪЛГАРСКОТО ЧЕРНОМОРИЕ

Резултатите на определените концентрации на индивидуалните ПХБ в различни видове риби са представени в таблици 3-6, а сумарната концентрация на всички определени ПХБ в таблица 7.

Таблица 3. Резултати за карагъоз

Година	2003			2004						2005		
	Есен			Пролет			Есен			Пролет		
Район	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг
№ проба	F ₁₉	F ₁₆	F ₂₁	F ₃₄	F ₂₆	F ₃₃	F ₄₇	F ₅₂	F ₅₁	F ₅₉	F ₆₈	F ₆₁
Липиди g/ml	0.2379	0.1780	0.1879	0.1836	0.1599	0.2341	0.2549	0.2513	0.2126	0.2871	0.1154	0.1892
№ PCB's												
28	6,1	1,2	1,1	4,3	0,6	1,1				7,4	59,0	40,0
31	2,5					1,6	0,1	0,3		5,9	7,7	13,3
52				1,4		1,3						
77	7,4	0,2	1,1	7,4	0,8	7,7						
101					0,4	8,0		15,4			2,3	
105			0,1	5,2					0,1	2,9	6,9	
118	1,8	8,7	0,2	11,9	0,1							
126	1,3		5,8			3,0						
128	2,8				0,4	0,3						0,5
138	0,5					2,9					3,2	3,9
153					2,0							5,7
156												
169	2,5									0,3		
180					4,8							
Σ PCB's ng/g мазн.	24,6	10,1	8,3	30,2	9,1	34,9	0,1	15,7	0,1	16,5	79,1	63,4

Таблица 4. Резултати за кая

Година	2003			2004						2005		
	Есен			Пролет			Есен			Пролет		
Район	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг
№ проба	F ₂₄	F ₉	F ₁₄	F ₁	F ₂	F ₃	F ₃₉	F ₃₅	F ₄₃	F ₆₅	F ₅₈	F ₅₇
Липиди g/ml	0,0521	0,0173	0,0623	0,0326	0,0615	0,0299	0,0393	0,0336	0,0246	0,0372	0,0131	0,0478
№ PCB's												
28			34,8				35,9		19,5		0,2	5,0
31			1,8	33,8		1,0	1,0	7,5				
52			1,6				37,4					
77		49,4	6,3	11,9	33,7							
101	0,4	16,9	1,8					3,9		3,5	23,4	178
105			9,7				1,3					
118	0,2		2,2									
126				10,6		8,4						
128	0,1			13,7				3,0		4,0		9,2
138			0,3								42,3	
153			7,5				1,5				5,6	
156								32,8				
169										1,7		
180												
Σ PCB's ng/g мазн.	0,7	66,3	66,0	70,0	33,7	9,4	77,1	47,2	19,5	9,2	71,5	192,2

Таблица 5. Резултати за трицона

Година	2003			2004						2005		
	Есен			Пролет			Есен			Пролет		
Район	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг
№ проба	F ₁₀	F ₈	F ₁₅	F ₂₇	F ₁₈	F ₂₈	F ₄₆	F ₄₅	F ₄₄	F ₆₄	F ₆₇	F ₆₆
Липиди g/ml	0,1141	0,1222	0,0828	0,0986	0,0326	0,0126	0,0870	0,0677	0,0690	0,1052	0,0889	0,078
№ PCB's												
28	8,2				7,1	12,4		21,9	16,5	76	61	28
31	29,5	6,9	2,6		71,4	8,8			0,2	40	28,6	
52	2,1	23,3				1,7	4,7					
77		21,1										
101		13,7					2,9	1,3		5,0		
105		43,8					4,6		0,6		4,4	3,0
118		22,9			37,9						75,7	
126												
128		8,5	8,3	67 pg				0,3		3,9		2,0
138						2,4				6,2		
153							1,6					
156												
169		47,7										
180				0,8	23,4						50,4	
Σ PCB's ng/g мазн.	39,8	187,9	10,9	0,9	139,8	25,3	13,8	23,5	17,3	131,1	220,1	33

Таблица 6. Резултати за сафрид

Година	2003			2004						2005		
	Есен			Пролет			Есен			Пролет		
Район	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг	Север	Варна	Юг
№ проба	F ₇	F ₄₁	F ₁₃	F ₄	F ₃₈	F ₃₁	F ₃₆	F ₄₂	F ₃₇	F ₅₆	F ₆₃	F ₆₂
Липиди g/ml	0,1443	0,1887	0,0529	0,0615	0,0162	0,0766	0,1484	0,1720	0,1449	0,1061	0,026	0,0483
№ PCB's												
28	4,7	2,7		27,0			0,2				169	81
31		11,4	6,4		0,6							
52	0,4						1,2	1,2		34,5		
77			2,3	84,1		0,7		0,2				
101		0,4										
105						18,9						
118	0,7					2,3		3,4				
126			85,9	63,8								
128			1,4			0,3		0,2	4,2			
138											39,2	
153	2,5											
156	0,6			3,2								
169		0,2								11,6		
180					6,8				8,4			
Σ PCB's ng/g мазн.	8,9	14,7	96,0	178,1	7,4	22,2	1,4	5,0	12,6	46,1	208,2	81

Таблица 7. Резултати за сумарната концентрация на всички определени ПХБ в пробите от различните видове риби

ВИД	№	ВРЕМЕ НА УЛОВ	% МАЗНИНИ	Σ ПХБ ng/g МАЗНИНИ
Т Р И Ц О Н А	1	есен 2003	8,0	10.9
	2	есен 2003	3,3	187,9
	3	есен 2003	11.4	39,8
	4	пролет 2004	1.3	25.3
	5	пролет 2004	9.9	1,2
	6	пролет 2004	3.3	139,8
	7	есен 2004	6.8	23.5
	8	есен 2004	8.7	13.8
	9	есен 2004	6.9	17,3
	10	пролет 2005	7.7	33,0
	11	пролет 2005	8.9	220,1
		12	пролет 2005	10.5
С А Ф Р И Д	1	есен 2003	14.4	8.9
	2	есен 2003	5.3	96,0
	3	есен 2003	18.9	14.7
	4	пролет 2004	7.7	22.2
	5	пролет 2004	6.2	178,0
	6	пролет 2004	1.6	7.4
	7	есен 2004	14.8	1.4
	8	есен 2004	14.5	12.6
	9	есен 2004	17.2	4.8
	10	пролет 2005	10.6	46,1
	11	пролет 2005	4.8	81,0
	12	пролет 2005	2.6	208,2
К А Я	1	есен 2003	6.3	1.2
	2	есен 2003	1.7	66.3
	3	есен 2003	6.2	66,0
	4	пролет 2004	3.3	70,0
	5	пролет 2004	6.2	33.7
	6	пролет 2004	2.3	9.4
	7	есен 2004	3.4	47.2
	8	есен 2004	3.9	77.1
	9	есен 2004	2.5	19.5
	10	пролет 2005	4.8	192,2
	11	пролет 2005	1.3	65.9
	12	пролет 2005	3.7	9.2
К А Р А Г	1	есен 2003	17.8	10.1
	2	есен 2003	23.8	24.9
	3	есен 2003	18.8	8.3
	4	пролет 2004	16.0	8.7
	5	пролет 2004	23.4	34.9

Ъ О З	6	пролет 2004	18.4	30.2
	7	есен 2004	21.3	1.2
	8	есен 2004	25.1	15.7
	9	есен 2004	25.5	1.2
	10	пролет 2005	28.7	16.3
	11	пролет 2005	18.9	63.4
	12	пролет 2005	11.5	79,0
Л Е Ф Е Р	1	есен 2003	3.7	36.4
	2	есен 2003	20.3	1.2
	3	есен 2003	12.9	1.2
	4	есен 2004	20.1	20.7
	5	есен 2004	12.6	6.6
	6	есен 2004	14.5	1.2
ПАЛА МУД	1	есен 2003	7.4	13.9
	2	есен 2003	18.3	7.7
ЧЕРНА МИДА	1	пролет 2005	3	87.9
	2	пролет 2005	2.6	17.5
	3	пролет 2005	3.2	9.7

От таблицата се вижда, че при трицоната има три проби с стойности над 100 ng/g, при сафрида те са две, а при каята само една. Останалите стойности за значително по-ниски. При пробите от лефер и паламуд стойностите са по-ниски, но и броя на пробите е по-малък. От трите проби миди, само едната е с по-висока стойност.

Резултатите за сумарната концентрация на всички определени ПХБ в различните проби риби от таблица 7 са обработени статистически. Получените статистически параметри са представени в таблица 8. За всяка група са дадени: броят резултати (n); средната геометрична стойност (X_г); минималната и максимална концентрации и доверителния интервал на средната геометрична (без паламуда и черната мида).

Таблица 8. Статистическите параметри на групите

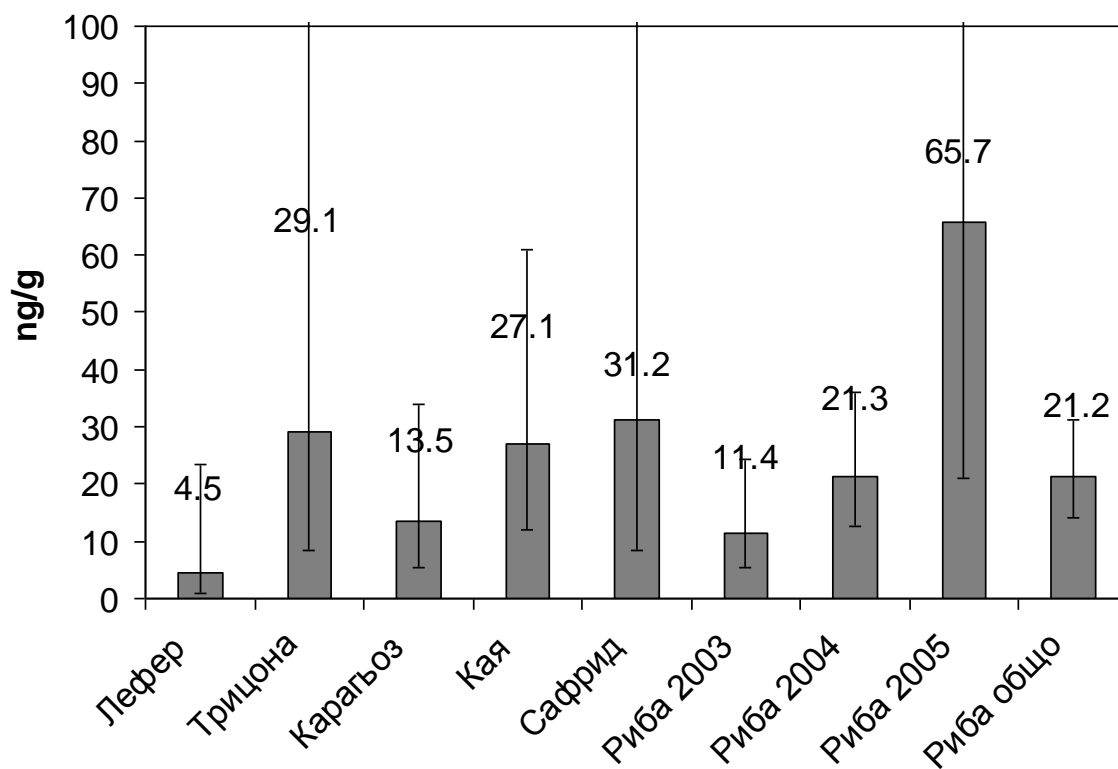
ГРУПИ	n	X _г	МИНИМУМ	МАКСИМУМ	ДОВЕРИТЕЛЕН ИНТЕРВАЛ
трицона	12	29.1	1.2	220,1	8.3 – 102
Сафрид	12	31.2	1.4	208,2	8.4 – 115
Кая	12	27.1	1.2	192,2	12.1 – 61
карагъоз	12	13.5	1.2	79,1	5.3 – 34
Лефер	6	4.5	1.2	36,4	1 – 23.3
Риба 2003	15	11.4	1.2	96,0	5.4 – 24.3
Риба 2004	27	21.3	1.2	220,1	12.6 – 36

Риба 2005	12	65.7	9.1	208,2	21 - 206
Риба общо	56	21.2	1.2	175,3	31.2 - 165
Паламуд	2	10.6	7.7	13.9	-
черна мида	3	24.6	9.7	87.9	-

В таблицата са отбелязани и резултатите за черна мида и паламуд, но те не са статистически обработени, поради малкият брой проби. Техните стойности са средноаритметични.

Средните геометрични стойности и доверителните им интервали по групи са представени и графично на фиг.7 :

Σ ПХБ



Фиг. 7

Средни геометрични стойности на ПХБ и доверителните интервали на изследваните видове риби

Резултатите от графиката показват, че при рибите трицона, кая и сафрид замърсяването е приблизително еднакво, по-ниски стойности има при карагъоза и при лефера, но при лефера анализираниите проби са по-малко. Резултатите по години

показват нарастване в 2004 г и в 2005 г., като в 2005 г. нарастването е по-голямо. Тенденцията за нарастване може да се обясни с появата на “прясно” замърсяване с ПХБ. Общо за всички изследвани риби стойността е 21,2 ng/g мазнини, което показва, че ниските стойности при лефер и карагъоз са оказали влияние.

Резултатите по видове риби са сравнени с **t-критерия** на Стюден-Фишер и получените стойности за коефициента **t** и статистическата сигурност **P** са дадени в таблица 9.

Таблица 9. Резултати от сравняване на видовете риби с критерия на „Стюdent-Фишер”

видове t видове \ P	лефер (1)	трициона (2)	карагъоз (3)	кая (4)	сафрид (5)
лефер (1)		* 0.044	0.18	* 0.038	* 0.04
трициона (2)	2.27		0.25	0.91	0.93
карагъоз (3)	1.46	1.19		0.19	0.23
кая (попчета) (4)	2.46	0.11	1.34		0.83
сафрид (5)	2.3	0.09	1.26	0.22	

t – коефициент на Стюdent-Фишер

P – статистическа достоверност

* – статистически достоверна разлика 95%

** – статистически достоверна разлика 99%

При извършеното сравнение на резултатите по видове риби се установява, че концентрациите в четирите вида (без лефера) не се различават съществено. Единствено при карагъоза те са недостоверно по-ниски в сравнение с останалите три. Средната геометрична стойност за лефера е няколко пъти по-ниска от останалите със статистическа достоверност около и малко над 95 %. Сериозните разлики, на този

етап не биха могли да се обяснят нито с по-особен начин на живот, нито със съществена разлика в храненето на лефера в сравнение с останалите четири вида риби. Най-вероятно се касае за случайно насложени обстоятелства и преди всичко на недостатъчния брой проби (само 6 за лефера и то набрани по 3 в две години). Направено е сравнение и по години на улов таблица 10:

Таблица 10. Резултати от сравняване по години на улов с критерия на „Студент-Фишер”

Година t Година	2003 (1)	2004 (2)	2005 (3)
2003 (1)		0.18	** 0.008
2004 (2)	1.38		* 0.047
2005 (3)	3.05	2.2	

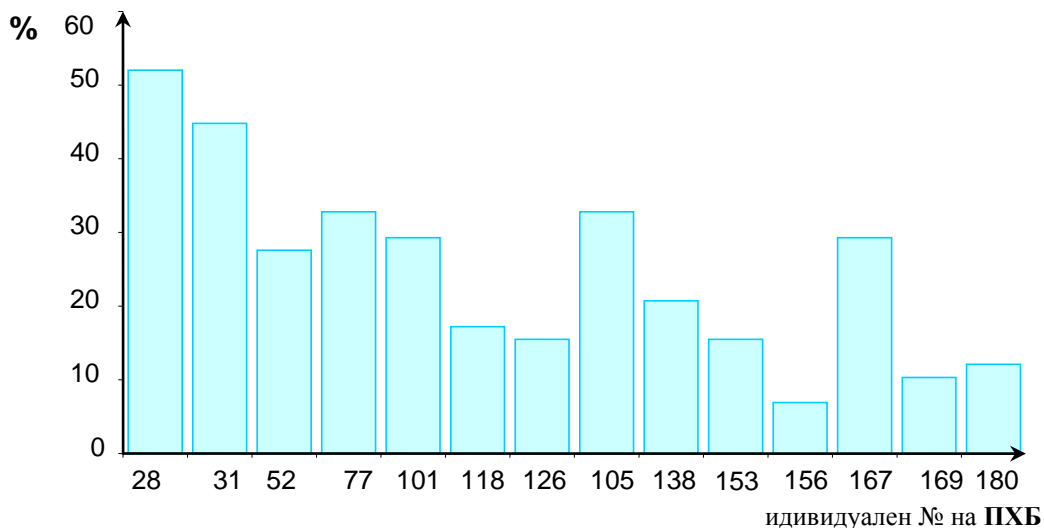
За разлика от сравняването по видове риба, това по години в динамика, категорично показва, че от 2003 до 2005 г. концентрациите във всички видове риба нарастват статистически достоверно (таблицы 9 и 10). Средните геометрични стойности са както следва: 11.4 за 2003 г., 31.3 за 2004 и 65.7ng/g мазнина за 2005 г. Съответно, статистическата достоверност е над 99% ($t = 3.05$) за увеличението през 2005 г. в сравнение с 2003 г. и малко над 95% ($t = 2.2$) за 2005, в сравнение с 2004 г. Между 2004 и 2003 г. достоверна разлика не се установява ($t = 1.38$), въпреки че средната геометрична за 2004г. е два пъти по-висока. В този случай, когато и пробите по години са повече на брой от тези по групи, а и стойността за 2005 г. е много по-голяма (близо 6 пъти) смятаме, че е налице тенденция за увеличаване на замърсеността на рибите, респективно на морето около Варненския залив. Тази на пръв поглед аномалия е установена и в много други изследвания. В последните 20 години на миналия век, след забраната за използване и производство на ПХБ – препарати, почти повсеместно се установява редукция на замърсеността на околната среда, храните и оттам и на експозицията. Впоследствие постепенно тази тенденция

не само се забавя, но вече в доста публикации се съобщават данни за повишаване на замърсеността в храни и особено в рибите и морските едивни организми, респективно в рибеното масло. Най-логичното обяснение на този факт, което се споделя от по-голяма част от специалистите е, че в последните години много от големите електрически съоръжения се амортизират и ПХБ-масла от тях се изхвърят в природата. Същото се случва и при подмяната на топлопреносните течности, битовите електроуреди и др. Не е за подценяване и замърсяването от огромния брой съоръжения за изгаряне на органични индустриални и битови отпадъци (т. нар. инсинератори), което често се извършва без да се вземат необходимите мерки за предпазване на околната среда.

Не се установява корелация между съдържанието на мазнини и концентрацията на ПХБ в рибите, като по този начин не се потвърди установеното в някои изследвания, че нивото на натрупване на ПХБ е обратнопропорционално на съдържанието на мазнини в рибата.

На фиг. 8 е представено процентното съдържание на всеки един от определените индивидуални ПХБ във всички проби риби.

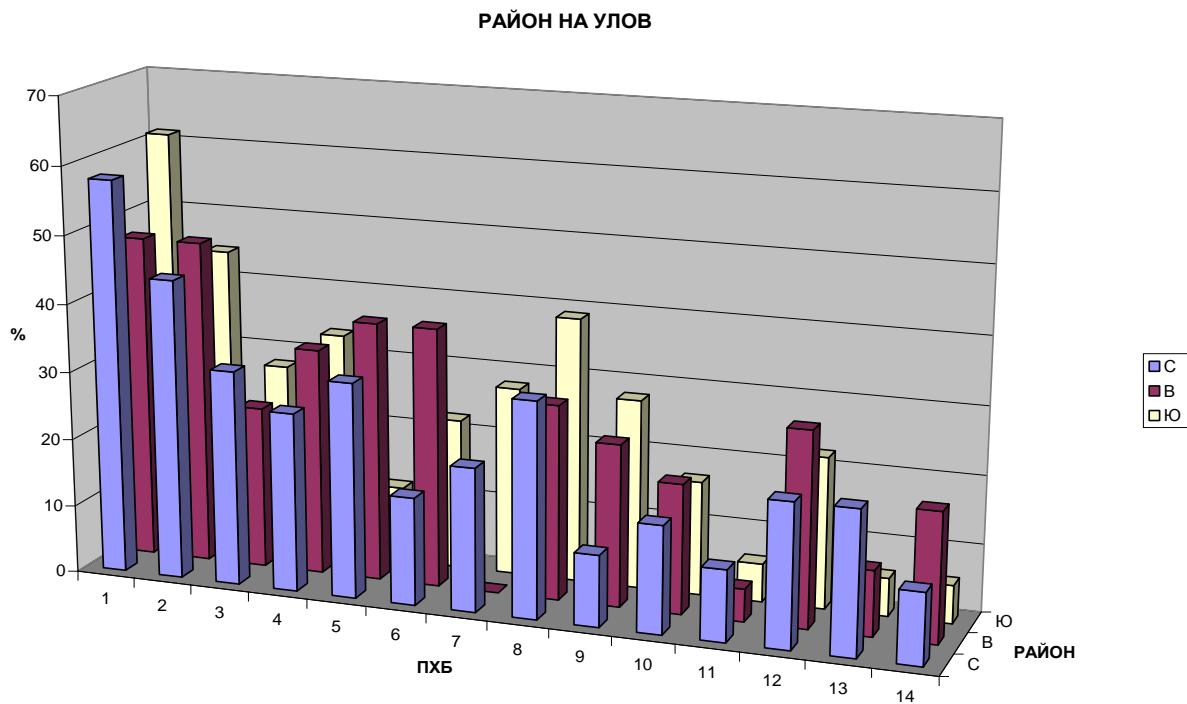
Определените 14 вида ПХБ се установяват в по-голям или по-малък брой проби. Най-висок процент положителни проби са за ПХБ № 28 (52%) и № 31 (44.8%); за 52, 77, 105 и 167 процентите варират около 30%, а за останалите около 10% – 15%. За индикаторните ПХБ (№ 28, 52, 101, 118, 138, 153 и 180) средният процент е 24.4 % (от 12.1% - 52 %), а за токсичните диоксиноподобните е 19.6% (от 10.3% – до 32.8%). В общи линии, и по отношение на установените видове ПХБ и на съответните проценти положителни проби, получените от нас резултати са подобни с редица публикувани резултати на скринингови изследвания за риби.



Фиг. 8

Процентно съдържание на определените различни видове ПХБ

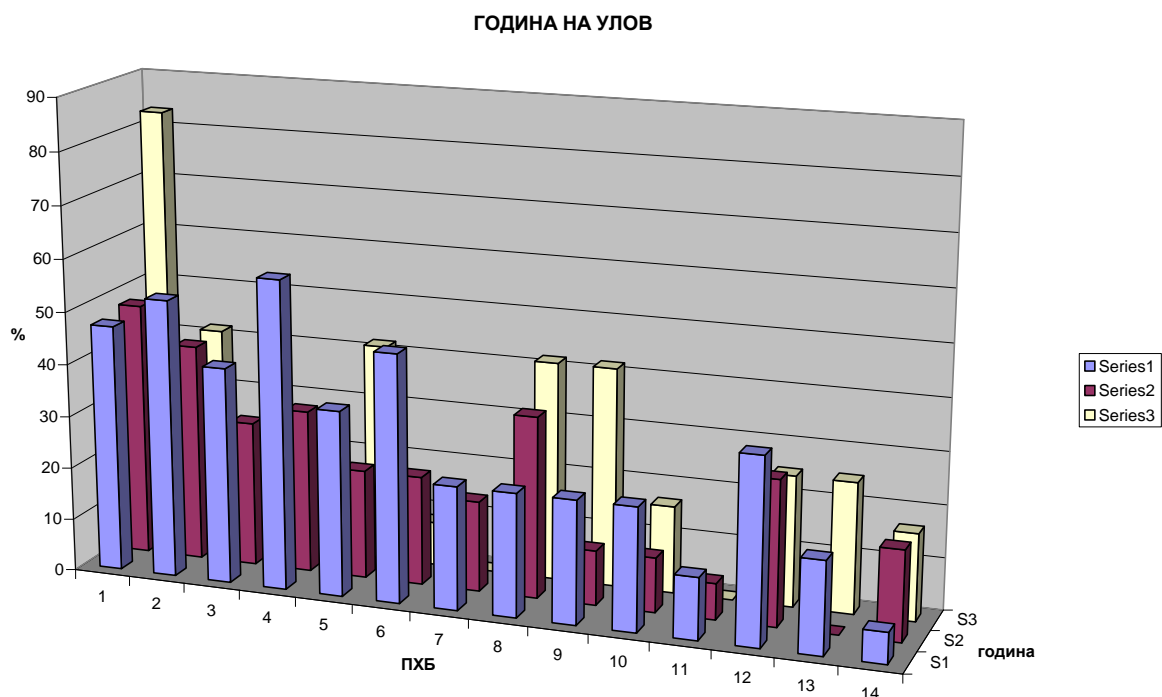
На фиг.9 и 10 са представени резултатите за процентното съдържание на положителните проби на индивидуалните ПХБ по район /Север, Варна, Юг / и по години на улов. От фигурите се вижда, че по райони на улов – Север, Варна, Юг - с най-високи % са ПХБ с № 28, 31, 52, 74,101 и 105, от тях три са индикаторни /фиг. 9/, средните проценти варират между 23% - 29%. По година на улов – резултатите са подобни с тези по райони. В 2005 г се наблюдава повишаване на процентите при ПХБ с № 138, 167 и 169, като № 138 е индикаторен /фиг. 10/, средните проценти са в интервала 21%.



Фиг. 9

Процентно разпределение на индивидуалните ПХБ в рибите по райони

Посочените номера от 1 до 14 съответстват на тези в таблица 25 и показват индивидуалния номер на ПХБ.

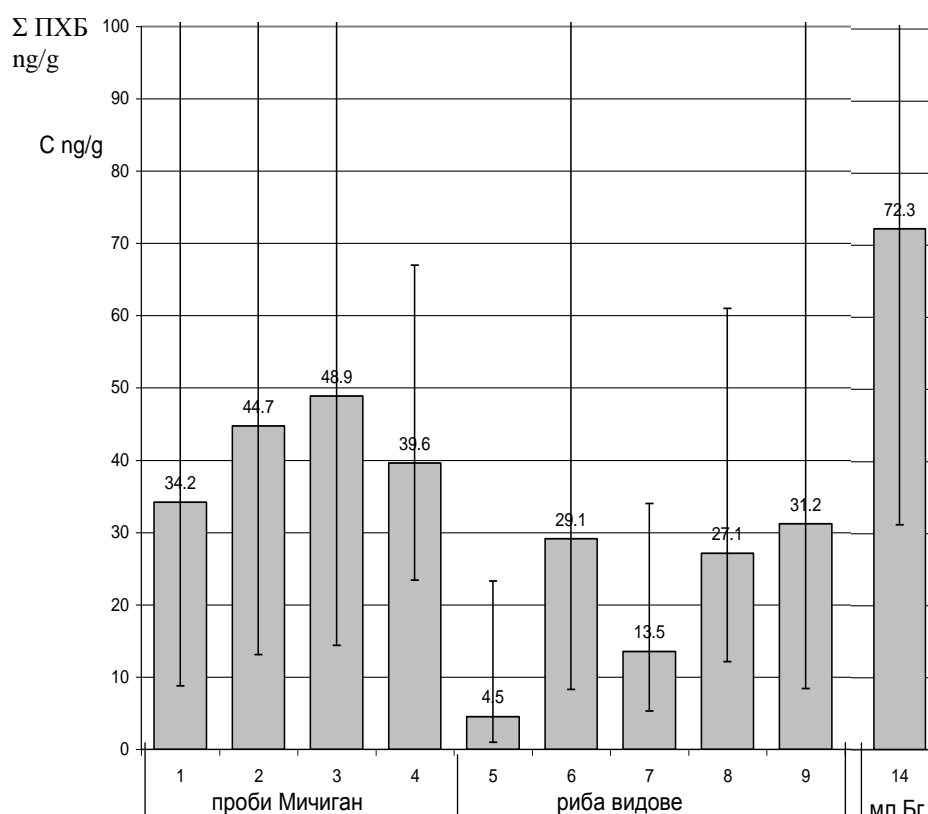


Фиг. 10

Процентно разпределение на индивидуалните ПХБ в рибите по години на улов

Независимо, че има известна разлика в резултатите, на този етап се наблюдава тенденция за нарастване на замърсяването по години – в 2005 г е най-голямо, а по райони – най- високо замърсяване се очертава в район Север. На базата на тези резултати не могат да се направят досотверни изводи, защото изследвания период не е голям. Това предполага продължаване на изследванията и включване в тях и на други видове риби.

Накрая са сравнени всички изследвани проби храни – от Мичиган и България, както и тези на черноморските риби. Резултатите са представени на фиг. 11.



фиг. 11

Средни геометрични стойности на ПХБ с доверителните им интервали

Проби Мичиган: 1. мляко; 2. сирене; 3. майонеза; 4. месни продукти;

Видове риби: 5. лефер; 6. трициона; 7. карагъоз; 8. кая; 9. сафрид; 10. мляко България

Всички видове черноморски риби показват по-ниски стойности на замърсяване от другите изследвани храни от щата Мичиган и от България. Храните от щата Мичиган се намират в долната скала на замърсяването с ПХБ. Това показва, че замърсяването на нашите черноморски риби също е ниско. Ако се сравнят резултатите за ПХБ, получени за нашите черноморски риби, с други резултати за

риби, посочени в литературния обзор, може да се направи заключение, че концентрациите на ПХБ са съизмерими и в редица случаи по-ниски.

В заключение трябва да се отбележи, че е необходимо в България да бъде въведена система за постоянен контрол на замърсяването с ПХБ и други устойчиви органични замърсители като хлорорганични пестициди, диоксини и други.

ИЗВОДИ

1. Разработена е стандартна оперативна процедура за определяне на ПХБ в храни от животински произход.

2. Използваният метод за анализ е валидиран, аналитичните параметри на метода са добри. Внедрена е ефективно действаща система за контрол на качеството на анализите при използване на ПХБ № 30 и №204 като вътрешен стандарт

3. Определени са концентрациите на 14 вида ПХБ в храни от животински произход (мляко – кисело и прясно, сирена, майонеза, масло, месо, месни продукти, яйца, риба) от щата Мичиган и от България. Установените концентрации на ПХБ в храните са в долната част на скалата, съставена от резултатите на изследвания в различни страни и райони.

4. Направена е статистическа обработка на резултатите и определената средна геометрична стойност е използвана за статистически анализ и сравняване на резултатите за различните видове храни.

5. Извършено е проучване в динамика за съдържанието на ПХБ в пет вида черноморски риби (карагьоз, трициона, сафрид, кая и лефер), които имат най-голямо значение за България. Не се открива корелация между концентрацията на ПХБ и липидното съдържание.

6. Сравняването на резултатите показва: по години на улов най-голямо е замърсяването в 2005 г.; по място на улов – район север и Варна; по сезон на улов - няма съществени разлики.

7. Определено е процентното съдържание на всеки един от 14-те изследвани ПХБ във всички проби. Най-висок процент (над 50%) има ПХБ № 28, който е от индикаторните. Сравнително висок е процентът на ПХБ № 31, 105, 77 и 167, от които 77, 105 и 167 са диоксиноподобни.

8. Определените средни стойности на ПХБ са по-ниски или близки до средното замърсяване, установено за риби в различни страни и райони. Използвайки рибите като индикатор за замърсяването с ПХБ, може да се направи заключение, че Черно море сравнително чисто.

П Р И Н О С И

1. Обобщени и систематизирани са голяма част на изследванията на водещи световни научни колективи и лаборатории за замърсяването с устойчиви органични замърсители, като ПХБ, диоксини, фурани и други.

2. Разработен и валидиран е цялостен аналитичен метод (процедура) за определяне на ПХБ в храни с високо съдържание на мазнини. Аналитичните и финансовите параметри са приемливи. С известна адаптация той може да се използва за едновременно определяне на полихлорирани бифенили и хлорорганични пестициди, както и за диоксини и фурани.

3. За първи път в България са изследвани храни от животински произход (мляко, млечни продукти, месо, яйца) за съдържание на ПХБ и резултатите са сравнени с подобни изследвания в други страни.

4. За първи път в България са изследвани различни видове черноморски риби, които имат най-голямо значение за България. Получените резултати могат да послужат за широкомащабно проучване за съдържанието на устойчиви органични замърсители и в други видове риби – черноморски и сладководни, както и за оценка на замърсяването на Черно море и други водни басейни.

Научни публикации и участия в научни конференции и конгреси във връзка с дисертацията

Публикации

1. Racheva T., **Rizov T.**, Makedonski L., Stancheva, M, Content determination of PCB's in Black Sea Fish, Ovidius University Annals of Chemistry, Volume 17, Number 1, pp 24-27, 2006
2. Stancheva M., Peycheva, K., Makedonski L., **Rizov T.**, Heavy Metals and PCBs Level of Bluefish (*Pomatomus Saltatrix*) from Bulgarian Black Sea Waters, Ovidius University Annals of Chemistry, Volume 21, Number 1, pp 41-48, 2010
3. M. Stancheva, **T. Rizov**, L. Makedonski, S. Georgieva, Organochlorine Pollutants in Bluefish (*Pomatomus Saltatrix*) from Bulgarian Black Sea Coast. Scientific papers, Vol. 37, Fasc. 5, University of Plovdiv, 2010
4. М. Станчева, С. Георгиева, Л. Македонски, **Т. Ризов**, Съдържание на полихлорирани бифенили и органохлорни пестициди в черноморски риби - паламуд и карагъоз, Научни трудове на Университет по хранителни технологии – Пловдив, том LVII, Свитък 2, стр. 41, 2010
5. **T. Rizov** and S. Georgieva, Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides in Black mussel and Goby from Black sea, Bulgaria, Medical University Varna, Scripta Scientifica Medica, Vol. 41, pp.283, 2011
6. **T. Rizov**, M. Stancheva, L. Makedonski, Polychlorinated Biphenyls in Fish for Bulgarian Black Sea, Region Varna, Medical University Varna, Scripta Scientifica Medica – приета за печат

Участия в научни конференции и конгреси

1. **T. Rizov**, Газхроматографски метод за определяне на полихлорирани бифенили в храни от североизточните щати на САЩ, VII Национален конгрес по хранене с международно участие, 15-17 май 2003, Варна, България,
2. **T. Rizov**, Gas Chromatographic Determination of PCBs in Eggs and Egg Products, 2nd Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 14-17 September 2003, Shile – Istanbul, Turkey
3. **T. Rizov**, A. Dimitrova, Polychlorinated Biphenyls in Eggs and Egg Product, III Mejdunarodna Eko-konferencija, 22-25 September 2004, Makedonia
4. **T. Rizov**, Газхроматографски метод за определяне на полихлорирани бифенили в млека от България и североизточните щати на САЩ, Пета национална конференция по химия, 21–23 септември 2004, София, България

5. M. Stancheva, **T. Rizov**, L. Makedonski, M. Moskovkina, Levels of PCBs in Fishes from Bulgarian Black Sea Coast, 5th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 23-26 September 2009, Fatza, Turkey
6. M. Stancheva, **T. Rizov**, L. Makedonski, S. Georgieva, Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Black mussel and Goby from Black Sea, Bulgaria, 1st Southeast European Conference of Chemotherapy and Infection, 6-9 May 2010, Golden Sands, Bulgaria
7. M. Stancheva, **T. Rizov**, L. Makedonski, S. Georgieva, Organochlorine Pollutants in Bluefish (*Pomatomus Saltatrix*) from Bulgarian Black Sea Coast, 8th Science Conference on Chemistry, 18-19 June 2010, Koprivshtitza, Bulgaria
8. М. Станчева, С. Георгиева, Л. Македонски, **Т. Ризов**, Университет по хранителни технологии – Пловдив, Съдържание на полихлорирани бифенили и органохлорни пестициди в черноморски риби - паламуд и карагьоз, Научна конференция с международно участие, 15-16 октомври 2010
9. M. Stancheva, S. Georgieva, L. Makedonski, **T. Rizov**, Organochlorine Pollutants in European Sprat from Bulgarian Black Sea Coast, 31st BALKAN MEDICAL WEEK, 28-31 October 2010, Athens-Greece