

SAASTEAINETE JÄÄKIDE SEIRE LOOMSETES TOIDUAINETES

A. Aluvee, A. Kolk, L. Ploom, T. Püssa, A. Valdmann

Seoses Eesti kutsumisega liitumisläbirääkimistele Euroopa Liiduga (EL) on muutunud aktuaalseks Eestis toodetavate toiduainete kvaliteedinõuete vastavusse viimine EL omadega. EL Nõukogu poolt on välja antud direktiiv (*Council directive*) 96/23/EC, mis sätestab nõuded teatud ainete ja nende jääkide seireks nii elusloomadel kui ka loomsetes toiduainetes. Direktiivis defineeritakse mõistet *residue* (eestikeelne vaste – *jääk*, õigemini *saasteaine jääk*) järgmiselt: “jääk” tähendab aine ja selle metaboliitide jääki, millel on farmakoloogiline toime, ning teisi inimese tervisele tõenäoliselt kahjulike ainete jääke, mis on sattunud loomsetesse toiduainetesse.

Saasteained võivad sattuda looma organismi juhuslikult (näiteks raskmetallid saastunud keskkonnast pärineva söödaga) või viiakse neid sinna sihilikult (loomade ravi ja profülaktika, kasvu stimuleerimine). Nii ühel kui teisel juhul võivad need jäägid ohustada inimese tervist. Et hoida kontrolli all keskkonna saastumisest ja inimese otsesest tegevusest tulenevat ohtu tervisele, on kehtestatud normatiivid, millest tuleb toidu käitlejatel kinni pidada. Seireprogramm ongi järelevalve loomsetes toidutoormes sisalduvate tervisele ohtlike ainete üle.

Vastavalt nimetatud direktiivile jaotatakse kontrollitavad ained järgmistesse rühmadesse.

A-rühm – anaboolset toimet omavad ained. Siia kuuluvad stilbeenid ja nende derivaadid ning soolad, antitüreoidsed ained, steroidid, β -agonistid, resortsüülhappe laktoonid, sealhulgas paljudes riikides laialdaselt kasutusel olnud kasvustimulaator zeranool.

B-rühm – veterinaarravimid ja saasteained;

- 1) – antibakteriaalsed ained, sh. sulfoonamiidid ja fluorokinoloonid;
- 2) – teised veterinaarravimid; siia kuuluvad anthelmintikumid, koktsidiostaatikud, karbamaadid ja püretroidid, rahustid, mittesteroidsed põletikuvastased jms. farmakoloogiliselt aktiivsed ained;
- 3) – teised ained ja keskkonna saasteained nagu kloor- ja fosfororgaanika, raskmetallid, mükotoksiinid, värvained jt.

Materjal ja meetodika

Uurimismaterjal pärines kogu Eesti territooriumilt, proove võtsid riiklikud veterinaarinspektorid.

Tabel 1. Proovide jaotus maakonniti

Table 1. Distribution of samples by counties

Maa- kond <i>County</i>	Ivermektiin (maks) <i>(liver)</i>	Enroflok- satsiin (lihas) <i>(muscle)</i>	Makroliidid (lihas/piim) <i>(muscle/ milk)</i>	β -agonistid (maks) <i>(liver)</i>	Nortestoste- roon (uriin) <i>(urine)</i>	Pb, Cd (neer/piim) <i>(kidney/milk)</i>	Kloor- amfenikool (lihas) <i>(muscle)</i>
Lääne-Viru	–	4	–	17	4	13	–
Harju	6	2	1	2	2	–	1
Hiiu	–	–	–	–	–	1	–
Jõgeva	11	5	1	–	2	–	1
Lääne	2	–	–	2	1	1	2
Järva	5	1	8	3	2	3	6
Ida-Viru	3	–	1	1	–	–	6
Põlva	1	5	–	2	–	1	2
Pärnu	12	1	–	2	2	1	–
Rapla	1	5	1	–	5	–	1
Saare	6	1	1	3	1	1	1
Tartu	3	7	2	1	2	1	2
Valga	4	1	4	–	2	–	2
Viljandi	17	7	4	7	4	12	–
Võru	2	1	1	2	–	–	1

Lisaks tabelis 1 toodud andmetele analüüsiti kromatograafiliselt 8 neeruproovi, mis FAST-testiga uurimisel olid osutunud antibakteriaalsete ravimijääkide suhtes positiivseteks.

Käesolevas töös on määratud aineid kõikidest põhirühmadest.

1. 19-nortestosteroon (A-rühm) määrati uriinist immuunanalüüsi meetodil. Uriinist eraldati tahke faasi ekstraksiooni (SPE) abil C-18 kolonniga 19-nortestosteroon, mis seejärel aurutati lämmastiku voolus kuivaks. Jääk lahustati väheses vees ja 19-nortestosterooni sisaldus määrati ELISA meetodil.

2. β -agonistid (A-rühm) määrati maksast immuunanalüüsi meetodil. Maks homogeniseeriti, tsentrifuugiti ja supernatandist määrati β -agonistide (klenbuterool, mabuterool, salbutamool, mapenterool, terbutaliin) sisaldus ELISA meetodil.

3. Klooramfenikool (B-1 rühm) määrati lihasest. Lihas homogeniseeriti, tsentrifuugiti, ekstraheeriti rasvad. Klooramfenikool eraldati tahkefaasekstraksiooniga (SPE) ja derivatiseeriti silaaniga. Analüüsiti gaasikromatograaf-massispektromeetriga (GC-MS).

4. Makroliidid enrofloxatsiin ja tsiprofloksatsiin (B-1 rühm) määrati lihasest ja piimast. Lihas homogeniseeriti ja tsentrifuugiti. Rasvad ekstraheeriti. Järelejäänud vesilahust analüüsiti fluorestsentsdetektoriga varustatud vedelikukromatograafia (HPLC).

5. Spiramütsiin ja tülosiin (B-1 rühm) määrati lihasest. Analüüdid ekstraheeriti homogeniseeritud lihasest atsetonitrili ning ioonpaarreagenti sisaldava puhverlahuse seguga, ekstrakt puhastati OASIS SPE-kolonnil. Ravimijäägid määrati HPLC-meetodil. Detekteerimine ja kvantiteerimine toimus UV-detektoriga lainepikkustel 232 nm (spiramütsiin) ja 280 nm (tülosiin).

6. Ivermektiin (B-2 rühm) määrati maksast. Homogeniseeritud maks puhastati tahkefaas-ekstraksiooni (SPE) teel C-18 kolonniga. Eluaat aurutati lämmastiku voolus kuivaks ja derivatiseeriti metüülimidiasooliga. Seejärel puhastati proov SPE (Si) kolonniga ja aurutati kuivaks. Jääk lahustati vedelikukromatograafiliseks (HPLC) analüüsiks mobiilfaasis ja määrati fluorestsentsdetektoriga.

7. Plii ja kaadmium (B-3 rühm) määrati nii neerust kui ka piimast. Orgaaniline aine eemaldati proovist kuivpõletamisega. Jääk lahustati tinavabas lämmastikhappes. Proov analüüsiti aatomabsorptsioonspektrofotomeetriselt (AAS) grafiitküvetiga.

Tulemused

Tabelis 2 on toodud analüüsitud tulemused. Enamik proove sisaldasid uuritud saasteainete jääke alla lubatud piirnормi või isegi alla detekteerimispiiri. Lubatud piirnормi ületasid ainult kaks 19-nortestosterooni ja kuus β -agoniste sisaldavat proovi. Viimased ületasid piirnормi vaid minimaalselt (0,02...0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Selliseid tulemusi peetakse erinevate ELISA kittide kasutamisel tavapärasteks. Et vältida võimalikke valepositiivseid tulemusi, kuuluvad immuunanalüüsil saadud positiivsed proovid kontrollimisele gaasikromatograaf-massispektromeetriga. See meetod on praegu väljatöötamisel. Ühe sea neeruproovi 19-nortestosterooni sisaldus ületas 19-kordselt maksimaalpiiri. Sama majandi teiste sigade vastav näitaja oli lubatud piirides. Ilmselt oli tegemist isasindiviidiga, tõenäoliselt krüptorhiidiga.

Tabel 2. Saasteainete jäägid proovides
Table 2. Content of residues in samples

Ühendid <i>Compounds</i>	Maatriks <i>Matrix</i>	Meetod <i>Method</i>	Detekteerimispiir <i>Limit of detection</i>	Lubatud piirnорм <i>Max. residue limit (MRL)</i>	Proovide arv <i>Number of samples</i>	Tulemused <i>Results</i>
1	2	3	4	5	6	7
19-nortestosteroon <i>19-nor-testosterone</i>	Uriin <i>Urine</i>	ELISA	3,0 $\mu\text{g}/\text{L}$	Positiivne detekteerimine <i>Pos. detection</i>	27	0,34-2,25 $\mu\text{g}/\text{L}$ – 25tk. 4,29 \pm 2,26 – 1 tk.* 57,38 \pm 37,69 – 1 tk.**
Spiramütsiin <i>Spiramycin</i>	Lihasküüsi <i>Muscle</i>	HPLC	22,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	24	< 42 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – 24 tk.
Tülosiin <i>Tylosin</i>	Lihasküüsi <i>Muscle</i>	HPLC	19,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	24	< 19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – 24 tk.
Klooramfenikool <i>Chloramphenicol</i>	Lihasküüsi <i>Muscle</i>	GC-MS	5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Positiivne detekteerimine <i>Pos. detection</i>	25	negatiivsed – 25 tk. <i>Negatives</i> – 25 s.

Tabeli 2 järg / Table 2 continue

1	2	3	4	5	6	7
Enrofloksatsiin ja tsiprofloksatsiin <i>Enrofloxacin and Ciprofloxacin</i>	Lihas <i>Muscle</i>	HPLC	10,0 µg/kg	30,0 µg/kg	26	< 10 µg/kg – 26 tk.
Ivermektiin <i>Ivermectin</i>	Maks <i>Liver</i>	HPLC	2,0 µg/kg	15,0 µg/kg	73	< 15,0 µg/kg – 73 tk.
Klenbuterool Mabuterool Salbutamool Mapenterool Terbutaliin <i>Clenbuterol Mabuterol Salbutamol Mapenterol Terbutaline</i>	Maks <i>Liver</i>	ELISA	0,3 µg/kg	1,0 µg/kg	42	0,48-0,99 µg/kg – 36 tk. 1,02-1,20 µg/kg – 6 tk.*
Plii (Pb) Kaadmium (Cd)	Neer <i>Kidney</i>	AAS grafiit- küvett	10,0 µg/kg 1,0 µg/kg	500 µg/kg 1000 µg/kg	24 24	49-169 µg/kg – 24 tk. 98-186 µg/kg – 24 tk.
Enrofloksatsiin <i>Enrofloxacin</i>	Piim <i>Milk</i>	HPLC	30 µg/L	30 µg/L	20	< 30 µg/L – 20 tk.
Plii (Pb) Kaadmium (Cd)	Piim <i>Milk</i>	AAS AAS	10 µg/L 1 µg/L		10 10	<10µg/L – 10 tk. <1µg/L – 10 tk

* nõrgalt positiivsed, kuuluvad täiendavale analüüsimisele GC-MS meetodil

** orikana märgitud kesik (proov nr. 123A) – tõenäoliselt krüptorhiid

Arutelu

Käesolev töö on teostatud EPMÜ toiduhügieeni laboris seireprogrammi ühe osana ega hõlma kõiki EL-s nõutud saastejääkide analüüse. Siiski saab tulemusi võrrelda Põhjamaade vastavate tulemustega. Näiteks saadi Rootsisis 1995. aastal teostatud seires samuti minimaalselt lubatavaid piirnorme ületavaid tulemusi 19-nortestosterooni jääkide analüüsil: 327-st proovist 8 positiivset (Johnsson jt., 1996). Taolisi tulemusi nii 19-nortestosterooni kui ka β-agonistide analüüsil on saadud ka Taanis ja Soomes. Ehkki 19-nortestosterooni on peetud mittenaturaalseks hormooniks, näitavad uuemad uuringud, et vähemalt kultidele ja täkkudele on see siiski "naturaalseks" hormooniks (Maghuin-Rogister jt., 1988; Hetzmann, 1994).

M. Minjajev (1997) tegi aastatel 1995...1996 antibakteriaalsete ainete (B-1 rühm) analüüse lihast FAST-testiga. Analüüsitud 245-st proovist osutus positiivseteks 4,1%. Samas ta analüüsis proove ka Põhjamaade testiga, mis andis tagasihoidlikuma tulemuse: 500-st proovist 0,8% positiivseid tulemusi. FAST-test on ligi 5 korda tundlikum ja oluliselt kiirem kui EL-s praegu kasutusel olevad taolised testid (Kolk jt., 1997). Nii ühel kui teisel juhul näitab see, et lihatööstusesse tuleb antibakteriaalsete ravimijääkidega saastunud loomi. Nende loomade proovide kromatograafilisel analüüsil me ei tuvastanud sulfoonamiidide, klooramfenikooli (levomütsetiini) ja tetratsükliinide jääke. Seega eeldab mikrobioloogilise testiga positiivseks osunud proovide konformatiivne analüüs võimalikult paljude antibakteriaalsete ravimijääkide kromatograafilist määramist, mis võib aga osutada väga kulukaks. Siiski tuleb arvestada tõsiasja, et EL-s keelustatud klooramfenikooli kasutamine on Eesti veterinaarpraktikas praegu veel ulatuslik (Aasmäe, 1997).

Ka raskmetallisaldus ei ületanud piirnormi, jäädes plii puhul 49 ja 169 µg/kg vahele ning kaadmiumi puhul 98 ja 186 µg/kg vahele. Need arvud ei ületa märkimisväärselt varem saadud tulemusi (Soidla jt., 1997).

Järeldused

1. Uuritud 329 proovist oli 321 saasteainete sisaldus tunduvalt madalam EL-s kehtivates maksimaalpiiridest. Vaid 6 proovi β-agonistide ja 1 proovi 19-nortestosterooni sisaldus ületas veidi lubatud maksimaalpiiri. Seire tulemused on analoogilised Põhjamaade vastavate tulemustega.

2. Ühe sea neeruproovi 19-nortestosterooni sisaldus ületas 19-kordselt maksimaalpiiri, mis ilmselt viitab isasindiviidile, tõenäoliselt krüptorhiidile.

3. ELISA meetodil lubatud maksimaalsaldust ületavad proovid tuleb täiendavalt analüüsida kromatograafiliselt; on vaja kiirendada vastavate meetodite väljatöötamist.

4. Saasteainete jääkide maksimaalsalduse Eesti piirnormide väljatöötamist on vaja kiirendada. Nende aluseks saab võtta nii EL-s kehtivaid piirnorme kui ka eeltoodud seire tulemusi.

Kirjandus

- Aasmäe B. Antibakteriaalsed ravimid Eesti veterinaarpraktikas. – Magistriväitekiri veterinaariamagistri teaduskraadi taotlemiseks. – Tartu, 1997. – 56 lk.
- Council Directive 96/23/EC. Official Journal of the European Communities. No. L 125/10...32. 1996.
- Heitzmann R. J. (ed.). Veterinary drug residues. Residues in food producing animals and their products: Reference materials and methods. Blackwell Science. p. 7...21, 1994.
- Johnsson H., Nordlander I. Examination of residues in fresh meat and live animals. Results of the control 1995. National Food Administration. Uppsala, p. 3, 1996.
- Kolk A., Minjajev M. Microbiological screening of antimicrobial veterinary drug residues in meat by FAST-test and Nordic test. – World Congress of Food Hygiene: Proceedings, p. 96. The Hague, 1997.
- Maghuin-Rogister G., Bosseloire A., Gaspar P., Dasnois C., Pelzer G. Identification de la 19-nortestosterone (nandrolone) dans l'urine de verrats non castrés. – Ann. Méd. Vét. 132, p. 437...440, 1988.
- Minjajev M. Põhjamaade meetodi ja FAST-testi võrdlev uuring antibakteriaalsete ravimite seires. – Magistriväitekiri. – Tartu, lk. 104, 1997.
- Soidla R., Kiis A., Kolk A. Heavy metals, pesticides and histamine in meat and fish. – Proc. of the Latvia University of Agriculture No. 12 (289). B-technical sciences, p. 73...80, 1997.

Tänuavaldus. Käesolevas töös kasutatud analüüsimeetodid on välja töötatud Eesti Teadusfondi rahalisel toetusel (grandi projekt nr. 2673).

Monitoring of Residues in Foods of Animal Origin

A. Aluvee, A. Kolk, L. Ploom, T. Püssa, A. Valdmann

Summary

Several substances and their residues in meat and milk were analysed according to the Council Directive 96/23/EC in Estonia. Altogether 329 samples were taken by the official veterinarians from all 15 counties. The content of residues of macrolides (spiramycin and tylosin), fluoroquinolons (enrofloxacin and ciprofloxacin), heavy metals (Pb and Cd) were far below maximum residue limits (MRL). Only 6 liver samples revealed ELISA results slightly exceeding MRLs for nortestosterone and 1 urine sample analysed for β -agonists. These samples will be analysed by HPLC additionally. The content of nortestosterone in one urine sample of a porker exceeded MRL 19 times. Apparently it was a cryptorchide since all the other samples from the same farm did not exceed the MRL.

It can be concluded that the level of residues in food producing animals in Estonia is quite comparable with that in Nordic countries. The only exception may be chloramphenicol which is still used in veterinary practice in farm animals although in this investigation project it was not detected.