

**Contract nr NP/67/027**

**Een snelle *in vitro* biologische test voor  
controle van dioxine-achtige stoffen in  
voeding.  
(An *in vitro* bioassay for screening dioxin-like  
substances in food samples)**

**G. Schoeters – Milieutoxicologie  
R. Van Cleuvenbergen – Milieumetingen  
Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek  
Boeretang 200  
Mol  
Belgium**

2001/TOX/R/022

April 2001

# Inhoud

Voorwoord	4
Medewerkers aan de studie	6
Executive Summary	7
Operationele Samenvatting	10
1. Inleiding	13
1.1. Chemie en voorkomen van dioxines	13
1.2. Giftigheid van dioxines	14
1.3. Opsporen van stoffen met dioxine-achtige werking	15
2. Doelstelling van het project	17
3. Aanpak18	
3.1. Uitwerken van het biologisch testsysteem voor toepassing op voedingsstalen	18
3.1.1. Selectie van de meest geschikte bioassay	18
3.1.2. Bepaling van de gevoeligheid en specificiteit van de geselecteerde bioassay voor referentiestoffen	19
3.1.3. Optimalisatie van de bioassay en de meetmethode door miniaturisatie	20
3.1.4. Methode uitwerken voor toepassing van de bioassay voor voedingsvetten (melk, eieren, vlees, vis)	20
3.1.5. Bepaling van de betrouwbaarheid van de test	21
3.2. Vergelijking van de resultaten van chemische analyses en analyses met de bioassay	21
3.2.1. Melkstalen	21
3.2.2. Eieren en kazen	21
3.2.3. Dierlijke vetten afkomstig van vleesstalen	22
3.3. Analyse van diverse voedingsstalen	22
4. Resultaten	22
4.1. Beschrijving van de bioassay	22
4.1.1. Voorbereiding van de metingen	22
4.1.2. Staalvoorbereiding: extractie van de vetten	22
4.1.3. Vetdestructie en elutie van de PHAHs	23
4.1.4. Blootstelling van de levercelkweken aan voedingsextracten	24
4.1.5. Verwerken van de meetgegevens	24
4.2. Performantie van de bioassay	25
4.2.1. Detectielimiet	25
4.2.2. Kwantificatielimiet	25
4.2.3. Herhaalbaarheid	26
4.2.4. Reproduceerbaarheid	27
4.2.5. Lineariteit	27
4.2.6. Bespreking	28
4.3. Vergelijking van de meetgegevens bekomen via chemische methodes en via de bioassay	29
4.3.1. Overzicht van de stalen	29
4.3.2. Procedure voor chemische metingen	29
4.3.3. Resultaten	32
4.3.4. Bespreking	36
4.4. Analyse van voedingsstalen van verschillende aard	45
4.4.1. Verzameling van de stalen	45
4.4.2. Resultaten	45
4.4.3. Bespreking - Vergelijking met buitenlandse gegevens	49
5. Besluit aan aanbevelingen	51
5.1. Een bioassay voor screening van voedingswaren	51
5.2. Onderbouwing van de normering	51
5.2.1. Normen voor voedingswaren	51
5.2.2. De CALUX metingen vormen een bijkomend instrument om de normen te bewaken	51
5.2.3. Dagelijkse inname	52
5.3. Inzetbaar voor een beleid van duurzame ontwikkeling	54

5.4. Internationale perspectieven.....	54
6. Referenties	55
7. Trefwoordenlijst	59
8. Verslagen en documenten beschikbaar over de studie	61

## Inhoud Tabellen

Tabel 1: WHO TEFs voor humane risico beoordeling gebaseerd op de WHO vergadering in Stockholm, Zweden, 15-18 juni 1997.....	17
Tabel 2: Specifieke gevoeligheid van stoffen ten opzichte van de CALUX .....	20
Tabel 3: Kolomsamenstelling per voedingsmatrix.....	23
Tabel 4: Rendement van de vetextracties .....	23
Tabel 5: Detectielimiet.....	25
Tabel 6: Kwantificatielimiet.....	26
Tabel 7: Herhaalbaarheid: resultaten van identieke stalen gemeten op eenzelfde dag.....	26
Tabel 8: Reproduceerbaarheid: resultaten van identieke stalen die op volledig onafhankelijke wijze de procedure doorlopen.....	27
Tabel 9: Resultaten van de hoefmelkstalen.....	33
Tabel 10: Resultaten van mengmelkstalen.....	34
Tabel 11: Resultaten van de ei-stalen.....	35
Tabel 12: Resultaten van de kaasstalen.....	35
Tabel 13: Resultaten van de stalen van vleesvet .....	36
Tabel 14: Overzicht van de gevonden correlaties en hun significantie .....	40
Tabel 15: Verhouding chemische TEQ vs CALUX TEQ .....	42
Tabel 16: Resultaten van de vleesvetstalen gemeten met de CALUX.....	46
Tabel 17: Resultaten van de visvetstalen, gemeten met de CALUX.....	46
Tabel 18: Overzicht van al de resultaten gemeten met de CALUX uitgedrukt per g vet en per g vers product.....	47
Tabel 19: TEQ-dioxine furanen.....	49
Tabel 20: Overzicht van de PAH normen die gelden in België .....	51
Tabel 21: dagelijkse inname (g per dag) .....	53
Tabel 22: Dagelijkse innames berekend op basis van buitenlandse consumptiegegevens (tabel 20) en op basis van via CALUX gemeten mediaan gehaltenes.....	53

## Inhoud Figuren

Figuur 1: Structuur van dioxines, furanen en PCBs.....	14
Figuur 2: Principe van de binding van een stof met dioxine-activiteit (L) met de aryl hydrocarbon (Ah) receptor in de cel. ....	16
Figuur 3: Typisch verloop van standaard curves .....	28
Figuur 4: Correlatie tussen de chemische metingen (dioxines/furanen) en de bioassay metingen op melkstalen.....	37
Figuur 5: Correlatie tussen chemische metingen (coplanaire PCBs) en bioassay meting van melkstalen .....	37
Figuur 6: Correlatie tussen chemische metingen (som dioxines/ furanen + PCBs) en bioassay metingen van melkstalen.....	38
Figuur 7: Correlatie tussen de chemische metingen (dioxines/furanen) en de bioassay meting van melk-, kaas- en eistalen .....	38
Figuur 8: Correlatie tussen chemische metingen (coplanaire PCBs) en metingen met de bioassay .....	39
Figuur 9: Correlatie tussen de chemische metingen (som dioxines/furanen en PCBs) en de resultaten van de bioassay.....	39
Figuur 10: Verhouding chemische gegevens (pg TEQ/g vet) vs CALUX .....	43
Figuur 11: Gemiddelde CALUX – TEQ per g vet + St. Dev. voor verschillende voedingswaren..	48
Figuur 12: pg TEQ per g vers product.....	48

## Voorwoord

Ons project had als doelstelling om een snel meetsysteem uit te werken voor de bepaling van stoffen met een dioxine activiteit in de voeding. Dit meetsysteem zal dan kunnen ingezet worden als bewakingsinstrument voor het gehalte van dioxines in voedingswaren. Een tweede doelstelling was om een aantal voedingsstalen met deze technologie te screenen en zo de bijdrage van verschillende voedingswaren tot de dagelijkse inname van stoffen met dioxine activiteit te bepalen. De dioxine crisis die in België uitbrak in mei 1999 heeft zeer duidelijk de relevantie van ons project geïllustreerd. Nadat kippen gestorven waren werden hoge gehalten aan dioxines en PCBs aangetroffen in kippen en eieren. Tal van dieren dienden geslacht en vernietigd te worden. De crisis breidde zich uit naar koeien en varkens.

De chemische analyses waren zeer omslachtig. Er was een gebrek aan data over normale gehalten aan dioxines en PCBs in dierlijke vetten, zodat overheden over te weinig informatie beschikten om snel limietwaarden voor gehalten aan dioxines in andere voedingswaren dan melk op te stellen. Het gebruik van merker PCBs (die technisch gemakkelijker te meten zijn) als maat voor de aanwezigheid van stoffen met dioxine-achtige werking werd bemoeilijkt door het gebrek aan gegevens over het relatieve aandeel van dioxines en PCBs met dioxine activiteit ten opzichte van de merker PCBs. Deze informatie was nodig om normen op te stellen op basis van merker PCBs die voldoende bescherming bieden voor de menselijke gezondheid.

Op basis van de resultaten van dit project kunnen we een snelle en gevoelige test aanleveren voor de identificatie van voedingswaren met een hoog gehalte aan stoffen met dioxine-activiteit. De nadruk tijdens dit project lag op de ontwikkeling van de methode. Gedurende drie jaar (voor de aanvang van de dioxine crisis) hebben we gewerkt aan de optimalisatie van de test die gebaseerd is op het toxisch werkingsmechanisme van dioxine. Het systeem werd uitgewerkt voor toepassing op biologische stalen (oa. voeding). Dankzij optimalisatie en miniaturisatie zijn routine analyses nu mogelijk. Vetextractie en vetdestructie methodes werden ontwikkeld standaard voorschriften werden geschreven. De gevoeligheid en reproduceerbaarheid van de methode werd bepaald.

Alhoewel dat het project technisch moeilijk was (opsporen van zeer kleine hoeveelheden picograms dioxines) kan de test nu gebruikt worden voor screening en voor de bepaling en vergelijking van de dioxine activiteit in voedselstalen van verschillende aard of herkomst. Met de test kunnen veranderingen in gehalten aan stoffen met dioxine-activiteit opgevolgd worden in levende organismen met inbegrip van de mens. Tot onze spijt was ons testsysteem nog niet bruikbaar voor toepassing tijdens de dioxine crisis aangezien het nog onvoldoende was gevalideerd.

Als gevolg van de dioxine crisis is de interesse in dergelijke testsystemen wereldwijd gegroeid en hebben ook ander organisaties zich toegelegd op een vergelijkbare aanpak (RIKILT, Nederland; Xenobiotics, USA; Biodetection systems, Nederland; Paracelsus, UK). Ook het Wetenschappelijk Instituut voor Volksgezondheid heeft de technologie aangekocht van het Amerikaanse bedrijf Xenobiotics, met als doel de test in te zetten voor screening van stalen.

Wij hopen dat ons project zal bijdragen tot de verdere implementatie van het testsysteem waardoor een betere bewaking van onze voeding mogelijk wordt. Naast de specifieke procedures die ontwikkeld werden in het kader van dit project, beschikken wij nu ook over uitgebreide resultaten waarbij de chemische meetgegevens naast de resultaten van de bioassay gepresenteerd kunnen worden. Dit is een zeer belangrijke stap in de validatie van de meetmethode. Harmonisatie van deze snelle meettechnieken op internationaal vlak is de volgende stap die nu moet gezet worden naar implementatie toe.

Het eindrapport legt vooral de nadruk op de eindresultaten die bekomen werden met betrekking tot:

- 1) toepassing van de methode: overzicht van de protocols die ontwikkeld werden
- 2) vergelijking van de resultaten afkomstig van de bioassay en de chemische meetresultaten
- 3) meetresultaten met de bioassay in voedingsstalen van verschillende aard

Tussentijdse stappen die geleid hebben tot deze resultaten worden niet meer opgenomen in dit rapport maar werden gerapporteerd in de tussentijdse verslagen.

## **Medewerkers aan de studie**

Dit project werd tot stand gebracht dank zij de medewerking van

### **Wetenschappelijke medewerkers - Vito**

Marie Pierre Goyvaerts

Gudrun Koppen

Guy Vanermen

Koen Thonissen (Licentiaats student)

Corneel Zwijzen (Kwaliteitsmanager)

### **Biotechnische medewerkers - Vito**

Daniëlla Ooms

Frank Vander Plaetse

### **Technische steun - Vito**

Lily Dierckx (Secretariaat)

Eddy Janssen (Technisch medewerker)

Extern advies werd verkregen van Prof. Bram Brouwer - Biodetection Systems  
Amsterdam, Nederland

### **Voedingsstalen werden verkregen van**

- Ministerie van Landbouw
- Eetwareninspectie

## Executive Summary

Healthy products and food safety is what consumers expect from agriculture and the food industry. Adequate controls to protect public health, based on scientific knowledge, are a major task for the authorities.

This report describes the results of a three years study, performed at Vito (the Flemish Institute of Technological Research), which aimed to develop a monitoring tool to detect elevated concentrations of persistent polyhalogenated aromatic hydrocarbons (PHAHs) with dioxin-like activity in food products. This project was initiated well before the dioxin crisis. The Belgian dioxin crisis was a sinister demonstration of the urgent need for adequate food monitoring programs for dioxins and related compounds in human food products. The benefits of an adequate control program for society, for economy and for public health has been widely accepted now. It fits into the framework of sustainable development.

As a result of this study we have now available a validated bioassay which is ready for use to screen different food items for their concentration of compounds with dioxin-like activity. After comparing various bioassays we chose for the CALUX assay, based on genetically engineered rat liver cells cultured *in vitro*. The cells emit a light signal that can be quantified if dioxin-like substances bind to the intracellular arylhydrocarbon (Ah) receptor. The binding affinity to the receptor has been shown directly related with toxic potency. The most toxic dioxin congener (tetrachloro-p-dioxin = 2,3,7,8 TCDD) has the highest known binding affinity and is used as a standard in each series of measurements. The results of the bioassay measurements are expressed in toxic equivalents of 2,3,7,8-TCDD (TEQ). The cellular method was optimised and miniaturised to allow routine-analyses in 96- well plates. A further step was to expose the cells to PHAHs, which are present in milkproducts, in eggs, and meat. A standard procedure was developed for fat extraction and further isolation of the compounds from the fat extract. This step was necessary to overcome possible interference of the light signal with compounds of the food matrix. A major challenge was to obtain low background signals and a low limit of detection, this was technically more difficult than initially expected. Starting from 1 g of animal fat, we obtained a limit of detection of about 0,1 pg TEQ/ g lipid and a limit of quantification of about 0,4 pg TEQ/ g lipid which is comparable to the results obtained with chemical analysis of dioxins/ furans with HRGC-MS. The repeatability (variability of samples analysed in the same run) showed a coefficient of variation (CV) of 10%, intralaboratory reproducibility based on independent runs of the same samples showed more variation (CV of 26% for samples above 2 pgTEQ/ g lipid).

Results from the bioassay have been compared to results from chemical analyses (HRGC-MS) on the same food substances (62 milksamples, 17 cheese samples, 6 samples of animal fat, 5 samples of eggs). In milk samples, a significant correlation ( $p < 0,0001$ ) was found between CALUX-TEQ and TEQ-dioxins/furans, TEQ- PCBs and TEQ (PCDD/F + PCBs) with respective Spearman 's Rank correlation coefficients of 0,72, 0,67, 0,73. Results from eggs were also significantly correlated. No significant correlation was observed with the cheese data and the meat fat data. This may be due to the low concentrations measured in the cheese samples (average below 1 pg TEQ/ g lipid) and the few meat samples that were analysed within a narrow concentration range. All samples which showed chemical TEQ values above the current limit values in Belgium showed elevated CALUX TEQ concentrations, above 6 pg TEQ adjusted on a lipid weight basis. No false negative results were obtained.

The CALUX- TEQ values were higher than the chemically determined PCDD/F-TEQ or the PCB-TEQ. However if the TEQ values of PCDD/F and PCBs were combined, the CALUX TEQ was somewhat lower. The bioassay measures directly the dioxin activity of the mixture of compounds present in the extracts, taking into account dioxins, furans and coplanar PCBs and their possible interactions. This may be toxicologically more relevant than the information obtained from chemical measurements. It certainly guarantees a more conservative approach than if only dioxins/furans TEQ values are determined as is usually done.

### *Recommendations*

- 1. Based on the good correlation between CALUX -TEQ and chemically measured TEQ levels the CALUX bioassay can be recommended as a screening tool for routine measurement of potentially toxic PHAHs in food. The bioassay allows to screen rapidly a large number of food samples. Positive samples are identified. The bioassay is however not specific. In order to identify the compounds that contribute to an elevated CALUX signal, subsequent chemical analyses are needed to identify the nature of the compounds that contribute to the toxic signal. We suggest a protocol in which chemical analyses are limited to those food items that turn out positive in the bioassay. These costly and laborious chemical analyses should be applied on positive samples, which are definitely the relevant ones for further research. Since no false negatives are identified with the bioassay in our study, this approach can be highly recommended as a result of our study.*
- 2. If CALUX TEQ results are increased in comparison with the results from chemical analyses (marker PCBs or PCDD/F- TEQ), the samples may need further follow up to identify the chemicals which contribute to the CALUX signal. It may be possible to identify contamination with other persistent halogenated hydrocarbons that are not included in the conventional package of chemical measurements.*

In a second part of the study, various meat samples(34 samples) and fishery products (34 samples) were purchased from different food stores and processed for CALUX measurements. The study was too limited to obtain representative data for the selected food items and to draw definite conclusions. Meat samples contained average levels of CALUX- TEQ between 1 and 2 pg TEQ/g lipid, fish samples showed concentrations that went up to 39 pg TEQ/g lipid. If expressed per g fresh tissue, median concentrations were highest in herring (2,2 pg TEQ), followed by pork (0,7 pg TEQ) and eggs (0,7 pg TEQ). For risk assessment (contribution to TEQ body burden) we need to take also into account the relative contribution of these food items to the average diet. Using published food consumption data from abroad (since no up to date food consumption data exist in Belgium), combined with the median TEQ concentrations measured in this study, daily TEQ intake levels were calculated. Due to the above mentioned limitations they should be considered only as indicative.

Apart from the absolute TEQ values, interesting information can be obtained from the variability among samples from a selected foodproduct.

Pooled samples (milk, eggs) showed relative low coefficients of variation, while CV of individual milk and chicken samples went up to 0,80 and 0,50 respectively. Beef and pork



samples showed less variation. Fish samples also, had high variation coefficients, except for the salmon samples.

The bioassay allows to characterise a group of food items based on their TEQ concentration and on the heterogeneity among samples in TEQ values. This information allows prioritisation of food items that need further follow up.

#### *Recommendation*

3. *This assay can be used to detect rapidly, unknown contamination in food samples and may help to identify yet unknown sources of contamination. We recommend to use this screening assay regularly on a representative set of samples. Samples should be analysed on an individual basis. Samples with high coefficients of variation indicate that part of the consumers may be exposed to elevated TEQ concentrations in their food which do not occur in food items from a different origin. Food items showing high coefficients of variation require further systematic screening in relation to their origin or their processing.*
4. *CALUX is a promising tool for monitoring as part of a food surveillance campaign or for study of environmental levels of PHAHs in animal fat tissue. The next step for further implementation is an international validation study which is a prerequisite for further acceptance.*

## Operationele Samenvatting

Van de landbouw en de voedingsindustrie wordt verwacht dat ze aan de consument gezonde en veilige producten aanbiedt. Het is de taak van de overheid om voldoende kwaliteitsgaranties in te bouwen, die gebaseerd zijn op wetenschappelijke gegevens.

Dit eindrapport geeft de resultaten weer van een studie die gedurende drie jaar werd uitgevoerd aan de Vito (Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek). De bedoeling was om een monitoringsinstrument te ontwikkelen dat kan ingezet worden om verhoogde concentraties aan persistente gehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen (PHAHs) met dioxine activiteit op te sporen in voedingswaren. De studie werd geïnitieerd voor de dioxine crisis. De Belgische dioxinecrisis (1999) illustreerde op een sinistere wijze de dringende noodzaak van een goed uitgebouwd voedselbewakingsprogramma voor dioxines en verwante stoffen in de menselijke voeding. De voordelen van een dergelijk monitoringsprogramma voor economie, voor de maatschappij, voor volksgezondheid zijn momenteel algemeen aanvaard en kaderen in elk beleid gericht naar duurzame ontwikkeling.

Als resultaat van onze studie beschikken we nu over een gevalideerde bioassay die kan ingezet worden om voedingswaren te screenen op de aanwezigheid van verhoogde concentraties aan stoffen met dioxine-activiteit. Op basis van een vergelijkende studie opteerden we om te werken met het CALUX testsysteem waarvan we de toepassing op voedingsstalen hebben uitgewerkt. Dit CALUX testsysteem is gebaseerd op een genetisch gemodificeerde rat lever cellijn die *in vitro* wordt gekweekt. De cellen geven een kwantificeerbaar lichtsignaal nadat stoffen met dioxine activiteit binden op de intracellulaire aryl hydrocarbon (Ah) receptor. De bindingsaffiniteit met de receptor kan direct in verband gebracht worden met het toxisch potentieel van de stof. De meest giftige dioxine - congener (tetrachloro-p-dioxin = 2,3,7,8 TCDD) heeft de hoogste bindingsaffiniteit en wordt als standaard gebruikt in elke meetreeks. De resultaten van de bioassay meting kunnen dan ook uitgedrukt worden in toxiciteitsequivalenten van 2,3,7,8 TCDD (TEQ) en op die manier vergeleken worden met chemische dioxine metingen. De celkweek methode werd geoptimaliseerd en geminiaturiseerd zodat routine analyse in 96 well platen mogelijk werd. In een volgende stap moesten de cellen worden blootgesteld aan PHAHs die aanwezig zijn in melkproducten, eieren en vlees. Een standaard procedure werd ontwikkeld voor vetextractie en isolatie van de stoffen uit het vetextract om interferentie van het lichtsignaal met andere componenten uit de voedingsmatrix maximaal te vermijden. Het is belangrijk om het achtergrond signaal zo laag mogelijk te houden en daardoor een lage detectielimiet te bekomen. Technisch was dit een grote uitdaging. Uitgaande van 1 g dierlijk vet bekwamen we een detectielimiet van ongeveer 0,1 pg TEQ per g vet, de kwantificatielimiet is ongeveer 0,4 pg TEQ/g vet wat vergelijkbaar is met deze van chemische dioxine metingen met HRGC-MS.

De herhaalbaarheid (precisie onder dezelfde experimentele condities in een kort tijdsbestek), uitgedrukt door de variatiecoëfficiënt (CV), bedraagt ongeveer 0,10. De intralaboratorium reproduceerbaarheid (precisie over verloop van tijd) is lager (cv van 0,26 voor stalen met gehalten groter dan 2 pg TEQ/g vet).

De resultaten van de bioassay werden vergeleken met de resultaten van chemische analyses (HRGC-MS) die werden uitgevoerd op dezelfde voedingsstalen (62 melkstalen, 17 kaasstalen, 6 vleesvetstalen, 5 eierstalen). De correlatie tussen CALUX-TEQ en TEQ-dioxines/furanen, TEQ-PCBs en TEQ-dioxines/furanen +PCBS was hoog significant ( $p <$

0,0001) met respectievelijke Spearman's Rank correlatiecoëfficiënten van 0,72, 0,67 en 0,73 in melkstalen. Dezelfde significante correlaties werden terug gevonden voor de resultaten van de eistalen. De kaas- en vleesvetstalen vertoonden echter geen significante correlatie tussen de CALUX metingen en de chemische metingen. Dit is mogelijk te wijten aan de bijzonder lage gehalten die in de kaasstalen werden aangetroffen (gemiddeld <1 pg TEQ/g vet) en in het klein aantal vleesvetstalen dat werd gemeten en bovendien een zeer kleine spreiding tussen de gemeten gehalten vertoonde. In alle stalen die de norm voor dioxines in voedingswaren overschreden, werden verhoogde CALUX-TEQ concentraties gemeten boven 6 pg TEQ/g vet. Geen enkel van deze stalen scoorde negatief met CALUX.

De CALUX-TEQ waarden lagen gemiddeld boven de chemische PCDD/F TEQ metingen. Wanneer echter de chemische TEQ waarden van dioxines/furanen en PCBs werden gecombineerd was de bekomen TEQ waarde hoger dan de gemeten CALUX waarde. Dit kan verklaard worden doordat het biologisch meetsysteem rechtstreeks de binding meet met de intracellulaire Ah receptor van de aanwezige dioxines, furanen en PCBs in het extract en dus ook direct eventuele interacties tussen de stoffen mee in rekening brengt. Toxicologisch is dit alleszins een relevante benadering. Het bouwt ook extra veiligheid in tov de meting van alleen maar de dioxine/furanen TEQ die meestal wordt uitgevoerd.

#### *Aanbevelingen*

- 1. CALUX metingen verdienen ingezet te worden als screeningsinstrument voor de routine matige bepalingen van potentieel giftige PHAHs in voedingswaren. De bioassay laat toe om relatief snel een groot aantal stalen te screenen. Stalen met verhoogde concentraties kunnen worden geïdentificeerd. De bioassay is echter niet specifiek. Om zeker te weten welke stoffen verantwoordelijk zijn voor het verhoogde CALUX signaal moeten de positieve stalen verder chemisch geanalyseerd worden. Wij suggereren voor een monitoringsprogramma een procedure waarbij de chemische analyses beperkt worden tot stalen die positief scoren in de CALUX. De kostelijke en arbeidsintensieve chemische metingen zouden dan gebeuren alleen maar op relevante stalen die verder dienen onderzocht te worden. Vermits wij in onze studie geen vals negatieve stalen identificeerden met de CALUX kunnen wij deze werkwijze aanbevelen als een resultaat van deze studie.*
- 2. Wanneer CALUX TEQ waarden variëren tov merker PCB metingen of PCDD/F-TEQ metingen, kan dit te wijten zijn aan de aanwezigheid van andere chemische stoffen. De aard van deze stoffen dient geïdentificeerd om uit te sluiten dat het hier om andere gehalogeneerde persistente stoffen gaat die in de voedingsketen terechtkwamen.*

In een tweede deel van de studie werden diverse voedingsstalen onderzocht (34 vleesstalen, 34 visserijstalen) die aangekocht werden in verschillende voedingszaken. Deze stalen werden alleen maar met CALUX gemeten. De studie was te beperkt om een beeld te geven van de gehalten in representatieve voedingsstalen en om definitieve conclusies te trekken met betrekking tot de gemeten gehalten. Vleesstalen bevatten gemiddelde CALUX-TEQ waarden tussen 1 and 2 pg TEQ/vet, visstalen vertoonden gemiddeld hogere concentraties die in haringstalen opliepen tot 39 pg TEQ/ vet. Wanneer deze gegevens worden uitgedrukt per g vers product, waren de mediaan concentraties het hoogst in de haringstalen (2,2 pg TEQ), gevolgd door stalen varkensvlees (0,7 pg TEQ) en

de eistalen (0,7 pg TEQ). Wanneer we de bijdrage van voedingswaren tot de TEQ lichaamsbelasting willen inschatten, vb. in het kader van een risicobeoordeling, moeten we bijkomend rekening houden met de relatieve bijdrage van de voedingswaren tot het algemeen dieet. Om dit in te schatten hebben we beroep gedaan op buitenlandse voedselconsumptiegegevens vermits er voor België geen recente gegevens beschikbaar zijn. Dagelijkse TEQ innames werden berekend door de voedselconsumptiegegevens te combineren met de mediaan TEQ gehalten die we gemeten hebben in de diverse voedingswaren. Omwille van bovenvermelde beperkingen dienen deze berekeningen erg voorzichtig te worden geïnterpreteerd.

Naast gegevens over absolute TEQ gehalten in de gemeten voedingsstalen, wordt ook belangrijke informatie bekomen wanneer de spreiding van de gehalten tussen verschillende soorten stalen vergeleken wordt. De variatiecoëfficiënt van mengmonsters (melk en eieren) was relatief laag: metingen van individuele melk- en kipstalen toonden CV die respectievelijk opliepen tot 0,80 en 0,50. Stalen van rundvet en varkensvet vertoonden een kleinere spreiding. Visstalen, met uitzondering van de zalmstalen, hebben hoge variatiecoëfficiënten. Een groep stalen kan dus gekarakteriseerd worden op basis van de gemiddelde TEQ gehalten en op basis van de heterogeniteit tussen de stalen. Deze informatie kan gebruikt worden om stalen of voedingswaren te identificeren die prioritair verder onderzocht moeten worden.

#### *Aanbevelingen*

3. *Dit biologisch meetsysteem kan worden gebruikt om snel verhoogde gehalten in voedingsstalen op te sporen en kan op die manier bijdragen tot het identificeren van ongekende besmettingsbronnen. Wij bevelen dan ook aan om deze metingen op regelmatige basis uit te voeren op een representatieve set van stalen. De stalen dienen individueel geanalyseerd te worden. Wanneer de variatiecoëfficiënt aangeeft dat de spreiding tussen de gemeten CALUX TEQ gehalten groot is betekent dit dat er gevaar bestaat dat een deel van de consumenten blootgesteld wordt aan verhoogde gehalten die bij stalen van een andere locatie of oorsprong niet voorkomen. Door verdere systematische controles kunnen eventueel ongekende besmettingsbronnen worden geïdentificeerd.*
4. *CALUX is een beloftevol instrument dat kan ingezet worden als deel van een bewakingsprogramma voor voedselveiligheid maar ook voor de studie van omgevingsstalen (natuurlijke populaties) waarbij gehalten aan PHAHs in dierlijke vetten kunnen opgevolgd worden in functie van tijd en locatie. De volgende stap die nu moet genomen worden is een internationale validatiestudie die een noodzakelijke voorwaarde is voor verdere internationale acceptatie van de test en de meetresultaten.*

## 1. Inleiding

Het belang van voedselveiligheid voor de volksgezondheid werd de laatste jaren sterk benadrukt door een aantal crises met grote impact op de samenleving, economie en voedingsindustrie. De dioxine crisis die in België uitbrak in 1999 heeft meer dan ooit aangetoond dat het nodig is om de aanwezigheid van contaminanten in de voeding te bewaken om blootstellingsrisico's van gevaarlijke stoffen voor de mens te beperken. Ons project werd geïnitieerd voor de dioxinecrisis omdat we toen reeds het belang inzagen om specifiek stoffen met een dioxine activiteit in de voeding te kunnen opsporen.

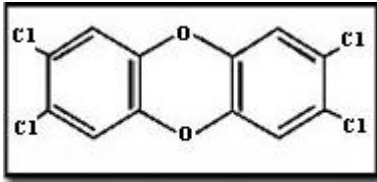
Het is niet de bedoeling om uitgebreid in te gaan op de verspreiding en toxiciteit van dioxine-achtige stoffen. Daarvoor kunnen wij verwijzen naar een aantal reviews die recent verschenen zijn zoals het rapport dat gemaakt werd in opdracht van de Europese commissie door DETR (oktober 1999), de draft voor externe review van EPA (Juni 2000), IARC/WHO monografie 69 (1996) en Air Quality Guidelines for Europe , 2000, de Milieu-Natuurrapporten van de Vlaamse Milieumaatschappij, (MIRA-T 1998 - MIRA-S 2000).

### 1.1. *Chemie en voorkomen van dioxines*

Gehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen (PHAHs) vormen een grote groep van stoffen die in mengsels van variërende samenstelling voorkomen en die verspreid zijn in alle milieucompartimenten en in levende organismen. Polychloorbiphenylen (PCBs), polychloorterphenylen (PCT's) en naftalenen (PCN's) werden in de afgelopen decennia veelvuldig gebruikt voor commerciële doeleinden (bv. in transformator vloeistoffen, als verfadditief of verdunningsmiddel.), sinds de vroege jaren '80 worden ze niet meer geproduceerd in de geïndustrialiseerde landen, maar ze komen nog in het milieu terecht door lekken, door recyclage of door onzorgvuldige stockage. Polybroombifenylen en polybroomdiphenylethers worden nog steeds geproduceerd en gebruikt oa. als vlamvertragers. Polychloor dibenzo-p-dioxines (PCDDs) en -dibenzofuranen (PCDFs) zijn nevenproducten van de synthese van primaire gehalogeneerde producten en anderzijds worden ze gevormd bij onvolledige verbrandingsprocessen. Deze stoffen zijn chemisch en thermodynamisch relatief stabiel waardoor ze langdurig in diverse milieucompartimenten kunnen verblijven. België behoorde ook voor de dioxine crisis tot de koplopers onder de West-Europese landen wat betreft de gehalten aan dioxine-achtige stoffen die in het milieu worden teruggevonden. Verder blijken deze stoffen als gevolg van hun vetoplosbare eigenschappen gemakkelijk te accumuleren in de voedselketen. De mens, als top van de voedselketen, kan via de voeding een belangrijke hoeveelheid PHAHs opstapelen. Opname via voeding, met een hoog gehalte aan dierlijke vetten vormt voor de algemene bevolking waarschijnlijk de belangrijkste bijdrage voor de lichaamsbelasting (Schechter et al, 1994; Patandin et al, 1999). Uit wereldwijd verzamelde gegevens blijkt dat de concentraties van PCBs, PCDDs en PCDFs zodanig kunnen oplopen in voedsel (melk, vis) en organismen dat ze een beduidend risico vormen voor milieu en gezondheid.

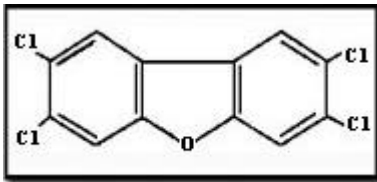
## Figuur 1: Structuur van dioxines, furanen en PCBs

### Structuur van 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxine



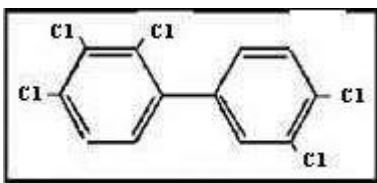
Het aantal chlooratomen en hun plaats op de basisstructuur kan variëren: er kunnen 75 verschillende dioxine - congeneren voorkomen

### Structuur van 2,3,7,8 tetrachlorodibenzofuraan



Het aantal chlooratomen en hun plaats op de basisstructuur kan variëren: er kunnen 135 verschillende furan - congeneren voorkomen

### Structuur van 2,3,3',4,4'chlorobifenyl (PCB 105)



Het aantal chlooratomen en hun plaats op de basisstructuur kan variëren: er kunnen 209 verschillende PCB-congeneren voorkomen

### **1.2. Giftigheid van dioxines**

De giftigheid van deze stoffen is verbonden met hun specifiek werkingsmechanisme (Reviews by Safe, 1990, 1994; Nebert, 1993). Recent werd het verband tussen dioxine en kanker herbevestigd (Kogevinas et al, 1997, IARC 1996), immunologische effecten, verstoring van ontwikkeling en interferentie met de hormoonhuishouding werden aangetoond in dierproeven (Van Den Berg et al., 1998, Giesy, 1998). Aanwijzingen hiervoor werden eveneens gevonden in bevolkingsonderzoeken (Birnbaum, 1995; Kimbrough, 1995; Koopman-Esseboom et al, 1996; Mocarelli et al, 2000; Weisglas-

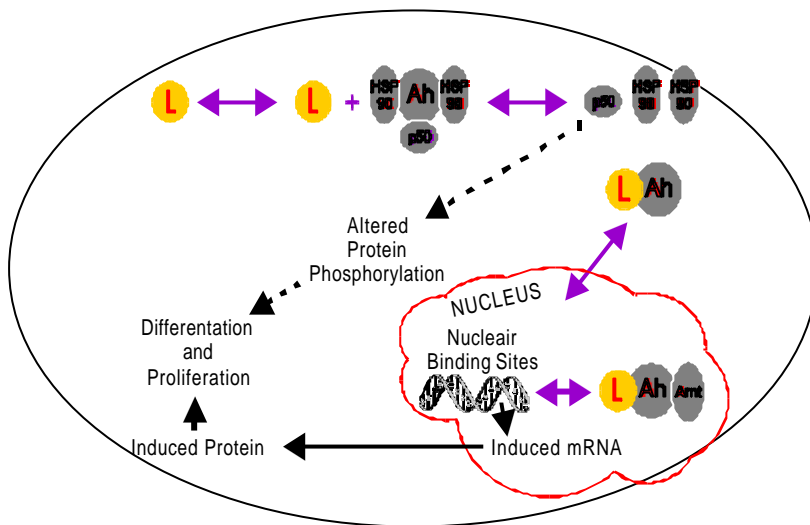
Kuperus et al, 2000). De limiet voor dagelijkse inname werd teruggebracht van 10 pg TEQ/kg.dag naar 1-4 pg TEQ/kg.dag (Van Leeuwen, 2000).

### ***1.3. Opsporen van stoffen met dioxine-achtige werking***

Omwille van de giftigheid is het bijzonder belangrijk om de niveaus van deze stoffen te bepalen in de vetten die we via de voeding opnemen. De PHAH's komen voor in complexe mengsels. Bepaling van de verschillende isomeren en congenen van dioxines, dibenzofuranen en biphenylen is mogelijk via chemisch analytische weg maar is zeer duur en omslachtig. Klassiek gebeurt de analyse van gehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen in omgevingsstalen door de chemische meting (GC-HRMS) van enkele vertegenwoordigers van deze stofgroepen. Dioxines, dibenzofuranen, biphenylen en terphenylen kunnen op hun basisingstructuur verschillende aantallen chloor- of broomatomen hebben, ook de plaats van deze halogenen op de basisstructuur kan variëren. Zo kunnen er 75 dioxines voorkomen, 135 verschillende PCDF's, 209 verschillende PCB's (Figuur 1). Het is niet mogelijk steeds al deze stoffen chemisch te meten. Voor een dioxine bepaling worden meestal 17 dioxine-isomeren (congeneren) gemeten. Deze stoffen hebben chlooratomen op de plaatsen 2-,3-,7-,8- en worden beschouwd als ultratoxisch. De meest giftige congener blijkt 2,3,7,8-tetrachloordibenzo-p-dioxine te zijn. Dit werd bevestigd in dierexperimenten. Tevens bleek dat de relatieve giftigheid van de congenen rechtstreeks in relatie staat met hun bindingsaffiniteit voor de Arylhydrocarbon (Ah) receptor. Voor elk congener werd deze affiniteit voor de Ah receptor vergeleken met die van 2,3,7,8-TCDD. Men spreekt dan van toxicologische equivalentie factoren (TEF-waarden) waarbij 2,3,7,8-TCDD de standaard is. De concentraties van een beperkt aantal congenen worden gemeten en vermenigvuldigd met de respectievelijke TEF waarde. Deze waarden worden opgeteld en op die manier bekomt men een resultaat voor een ongekend mengsel dat wordt uitgedrukt in TEQ-dioxine. Hierbij refereert men dus naar de toxiciteit van 2,3,7,8-TCDD. Aan deze methode zijn heel wat beperkingen verbonden: het is onmogelijk om alle relevante stoffen die kunnen voorkomen in het mengsel te meten, deels omdat er geen standaarden voor zijn of omdat hun TEF-waarde niet gekend is, of omdat hun gehalte zo laag is dat ze onder de chemisch detectielimiet liggen. Verder is er geen internationale eensgezindheid over welke TEF waarden gehanteerd dienen te worden voor de verschillende stoffen. Mengselinteracties (additie of antagonisme) worden niet meegenomen. De bewerking van de stalen voor extractie, isolatie, en scheiding van de congenen is erg omslachtig. De kostprijs en de tijdsduur van een klassieke chemische bepaling is zodanig hoog dat een intensieve monitoring voor elk van de isomeren van deze PCBs, PCDDs en PCDFs niet haalbaar is.

De bedoeling van dit project was om na te gaan of een biologisch testsysteem waarmee effectief de globale toxiciteit van het aanwezige mengsel van PHAH's gemeten wordt kan ingezet worden voor snelle en gevoelige screening van voedingswaren. De meetmethode die werd uitgewerkt berust op het specifieke werkingsmechanisme van dioxines. De potentiële toxiciteit van een mengsel wordt rechtstreeks gemeten aan de hand van de specifieke effecten die dat mengsel heeft op *in vitro* gekweekte levercellen. Deze levercellen bevatten de intracellulaire Aryl hydrocarbon receptor (Ah receptor). Potente stoffen in het mengsel binden op deze receptor. Binding op deze receptor initieert een ketting van reacties die leiden tot de giftigheid van deze stoffen. De mate van giftigheid wordt bepaald door de bindingsaffiniteit van stoffen met deze receptor. Zo heeft de meest giftige dioxine congener (2,3,7,8 TCDD) de hoogste bindingsaffiniteit.

**Figuur 2: Principe van de binding van een stof met dioxine-activiteit (L) met de aryl hydrocarbon (Ah) receptor in de cel.**



Principe van de binding van een stof met dioxine-activiteit (L) met de aryl hydrocarbon (Ah) receptor in de cel: in de cytosol blijken heat shock eiwitten (HSP90 en P50) te associëren met het complex. Dit complex bindt als een transcriptiefactor aan DNA in de kern. Het is een heterodimeer dat bestaat uit een ligand bindend Ah receptor eiwit en een DNA bindend eiwit (Arnt) (Nebert et al, 1993).



**Tabel 1: WHO TEFs voor humane risico beoordeling gebaseerd op de WHO vergadering in Stockholm, Zweden, 15-18 juni 1997**

Congeneer	TEF-waarde	Congeneer	TEF-waarde
<b>PCDDs</b>		<b>Non-ortho PCBs</b>	
2,3,7,8-TCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,7,8-PnCDD	1	PCB 81	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 169	0,01
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01		
OCDD	0,0001		
<b>PCDFs</b>		<b>Mono-ortho PCBs</b>	
2,3,7,8-TCDF		PCB 105	0,0001
1,2,3,7,8-PnCDF	0,1	PCB 114	0,0005
1,2,4,7,8-PnCDF	0,05	PCB 118	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,5	PCB 123	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
2,3,4,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,1	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,01		
	0,0001		

## 2. Doelstelling van het project

- 1) Een snelle en goedkope methode uitwerken die toelaat om voedingswaren te controleren op de aanwezigheid van toxische gehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen

De belangrijkste doelstelling was om een bioassay, waarvan reeds was aangetoond dat die op een reproduceerbare en kwantitatieve wijze reageert op zuivere PHAHs en PHAH mengsels, bruikbaar te maken voor de analyse van voedingswaren. Van de methode werd verwacht dat ze op een snellere en goedkopere manier dan via de huidige chemische analysetechnieken voedingswaren met hoge gehalten aan dioxines kan identificeren. De bioassay is een effectgerichte methode die reageert op het mengsel van toxisch relevante stoffen. Dit vormt een bijkomend voordeel ten opzichte van de chemische analyses die een beperkte set van stoffen opsporen. Het was de bedoeling om de test uit te werken voor voedingsstoffen die dierlijke vetten bevatten. In de eerste plaats zijn dit melk en eieren. Nadien werd dit uitgebreid naar vlees en vis. De test werd gevalideerd en de correlatie met chemische bepalingen werd onderzocht.

## 2) Onderbouwing van de normering

De tweede doelstelling was om de gevalideerde bioassay toe te passen op een aantal representatieve voedingswaren en op die manier informatie te verzamelen over de gehalten aan PHAHs die in onze voeding aanwezig zijn. De informatie zal een beter inzicht verschaffen over de bijdrage van verschillende voedingswaren tot de lichaamsbelasting waarover de WHO advieswaarden formuleerde. Het was ook de bedoeling om op die manier onderbouwing te geven voor het opstellen van normen voor dioxine-achtige stoffen in voedingswaren. Dit is intussen achterhaald. Door de dioxine crisis zijn op dringende wijze normen moeten geformuleerd worden voor dioxines en merker PCBs in melk en dierlijke vetten. Onze effectgerichte metingen laten wel toe om te evalueren in welke mate de huidige normen voor dioxines en PCBs een voldoende lage totale TEQ (gemeten door de bioassay) garanderen voor verschillende voedingswaren.

## 3) Bijdragen tot een beleid van duurzame ontwikkeling

Het is de bedoeling om een eenvoudige meetmethode te ontwikkelen die kan bijdragen om een beter inzicht te verkrijgen in stofstromen en hun transfer doorheen de voedselketen. Ook door metingen te doen van voedingswaren die van verschillende locaties komen kan vervuiling beter in kaart worden gebracht. Ons project heeft daartoe de aanzet gegeven. Binnen het tijdsbestek van dit project was het echter maar gedeeltelijk mogelijk een aantal van deze metingen uit te voeren.

## 4) Participatie in internationaal onderzoek en verbintenissen

Het was de bedoeling om met het uitwerken van deze bioassay en de toepassing ervan voor het monitoren van dioxine-achtige stoffen in de voeding aan te sluiten bij internationale studies en acties op dat vlak. Dit kadert dan ook in de toenemende bezorgdheid omtrent voedselveiligheid, en mogelijk in initiatieven zoals het nieuwe Belgisch agentschap voor voedselveiligheid en het nog op te richten Europees agentschap.

# 3. Aanpak

Hieronder volgt een overzicht van de werkwijze gehanteerd in het project. In het kort worden de belangrijkste bevindingen die geleid hebben tot het uiteindelijke protocol aangegeven. De tussentijdse stappen die werden genomen zullen niet meer in dit rapport uitgebreid aan bod komen. Daarvoor wordt verwezen naar de tussentijdse rapporteringen. Het uiteindelijke protocol, de reproduceerbaarheid, de meetresultaten die werden behaald met het uiteindelijke protocol worden toegelicht in de resultaten sectie.

### ***3.1. Uitwerken van het biologisch testsysteem voor toepassing op voedingsstalen***

#### *3.1.1. Selectie van de meest geschikte bioassay*

Bij de aanvang van de studie werden verschillende levercelsystemen die de aryl hydrocarbon receptor (Ah) bevatten onderling vergeleken.

De humane Hep2 cellijn (ATCC), de rat H4IIE cellijn (ATCC) en de viscellijn PLHC-1 (Dr. Hightower, Univ. of Connecticut, US) werden getest voor wat betreft hun respons op PCB126. Deze PCB induceert in de levercellen na binding met de Ah receptor, enzymes die verbonden zijn met het metaboliserende cytochroom P450 1A1 enzymesysteem.

De omzetting van 7-ethoxyresorufine tot het fluorescente resorufine door het enzyme 7-ethoxyresorufine O-deethylase wordt gemeten (= EROD activiteit) en is een maat voor de inductie van de Ah receptor. De uitvoering van deze testen gebeurde aan de hand van VITO protocol TCELE009 met aanpassingen voor de viscellijn.

Als alternatief werd de CALUX leverceltest gebruikt. Deze cellijn is een genetisch gemanipuleerde ratleverlijn (El-Fouly, 1994), die bekomen werd van Prof. B. Brouwer, Univ. Wageningen. De cellen bevatten een lichtgevend luciferase boodschappergen dat gekoppeld is aan een gensequentie die men het dioxine responsive element (= DRE) noemt. Deze sequentie wordt geactiveerd wanneer het complex van de arylhydrocarbon receptor met de dioxine-achtige stof bindt op het DRE. Tengevolge van de aanwezigheid van dioxine-achtige stoffen in de cel wordt bijgevolg meetbaar licht geproduceerd.

Vergelijking van de EROD meting in de verschillende cellijnen geeft aan dat de gevoeligheid vergelijkbaar is. Na 24 uur incubatie met PCB126 is er signaalinductie in de drie cellijnen vanaf  $1E-10$  M.

Vergelijking van de EROD meting met de CALUX meting in de ratlevercellijn geeft aan dat de CALUX meting voordelen heeft tov de EROD meting. De gevoeligheid van beide methodes voor PCB 126 is vergelijkbaar (signaal vanaf  $1E-10$ M). De EROD test leidt echter tot een reductie van het fluorescentie signaal bij hogere PCB concentraties, bij de CALUX test treedt een saturatie van het signaal op bij de hogere concentraties. Bij een staal met ongekende concentraties zullen de resultaten van de CALUX gemakkelijker te interpreteren zijn dan de resultaten van de EROD test.

De CALUX methode werd uiteindelijk behouden voor verder onderzoek in dit project.

### *3.1.2. Bepaling van de gevoeligheid en specificiteit van de geselecteerde bioassay voor referentiestoffen*

De gevoeligheid van de CALUX leverceltest werd bepaald na incubatie van de cellen gedurende 6, 24 en 48 uur met referentiestoffen waarvan de relatieve toxiciteit ten opzichte van dioxines vanuit de literatuur gekend is (zie tabel 2). PCB 126 werd geselecteerd als non-ortho PCB met een toxiciteitsequivalentiefactor (TEF) van 0,1. Als mono-ortho PCB werd PCB 118 geselecteerd met een TEF waarde van 0,0001. Benzo-a pyreen werd getest als vertegenwoordiger van de polycyclische aromatische koolwaterstoffen met gekende potentie om te binden aan de aryl hydrocarbon receptor. Deze stof is echter niet persistent maar wordt in levercellen afgebroken door de enzymes die na binding met de Ah receptor worden geïnduceerd. Ook pentachlorophenol werd meegetest omwille van zijn gekende bindingsaffiniteit met de Ah receptor. De teststoffen werden verdund in DMSO. 0,5 % DMSO werd toegevoegd aan het weefselcultuurmilieu. De cellen werden uitgeplaat in 24- well platen. De teststoffen werden toegevoegd 24 uur nadat de cellen werden uitgeplaat, wanneer de celculturen confluent en adherent waren. Luminescentie werd gemeten, het eiwit gehalte werd bepaald met de Bradford methode (Coomassi Brilliant blue G-250, Bio-Rad protein assay). De testresultaten werden uitgedrukt als lichtproductie (AUF) per g eiwitgehalte. De experimenten werden drie maal herhaald. De dosis-antwoord curves werden statistisch verwerkt met het Graph-path programma. Sigmoïde curve fitting werd uitgevoerd. De effectieve stofconcentratie die 50 % van het maximum signaal geeft (EC50) werd berekend, evenals de concentratie die voldoende is om een statistisch significant signaal inductie te geven (LOEC,  $p < 0,05$ ).

**Tabel 2: Specifieke gevoeligheid van stoffen ten opzichte van de CALUX**

	LOEC (M)			IC 50 (M)		
	6 hr	24 hr	48 hr	6 hr	24 hr	48 hr
2,3,7,8 TCDD	1E-11	1E-12	1E-11	6,6E-10	3E-11	2,3E-11
Benzo-a-pyreen	1E-9	1E-8	1E-6		1,1E-6	3E-4
PCB126	1E-10	1E-10	1E-12	1,4-10	7,2E-11	1E-10
PCB 118	1E-7	1E-6	1E-7	7E-7	5,3E-7	1,7E-7
Pentachlorofenol		1E-5	1E-5	6,8E-6	6,5E-6	5,6E-6

Zoals verwacht is TCDD de stof die bij de laagste concentratie signaal geeft. De grootste gevoeligheid wordt bereikt na 24 uur incubatie. PCB 126 is minder toxisch dan TCDD. PCB 118 is na 24 uur 1 miljoen maal minder giftig is dan TCDD. Benzo-a-pyreen induceert luminescentie, maar het signaal vermindert met de tijd door de metabolisatie. Door de meting op twee tijdstippen uit te voeren kan men persistente stoffen onderscheiden van niet-persistente gehalogeneerde PHAHs. Pentachlorofenol induceert luminescentie bij hogere concentraties dan TCDD, maar deze concentraties zijn toch nog milieurelevant.

### 3.1.3. Optimalisatie van de bioassay en de meetmethode door miniaturisatie

Een belangrijke verbetering was om de test te brengen van een celkweekmodel in 24 well platen naar een celkweek model in 96-well platen (zie uiteindelijk protocol). Dit is een belangrijke stap naar het uitvoeren van routinematige bepalingen, waarbij meer testen kunnen uitgevoerd worden met minder materiaal.

### 3.1.4. Methode uitwerken voor toepassing van de bioassay voor voedingsvetten (melk, eieren, vlees, vis)

Deze stap was ongetwijfeld technisch de moeilijkste.

Volgende stappen werden uitgetest:

- Extractie van vetten uit voedingsmatrices: om geen interferentie van het signaal met de voedingsmatrix te hebben worden de vetten eerst uit de voedingswaren geëxtraheerd in hexaan.

Het rendement van de extractie voor verschillende voedingswaren werd bepaald in functie van volgende variabele:

→Toevoegen van diethylether aan hexaan

→Volume waarin het staal op de kolom moet worden gebracht

- Destructie van vetten over zure silica kolom en elutie van gehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen:

Het rendement van de elutie werd bepaald in functie van volgende variabelen:

→Elutievolume

→Toevoegen van diethylether aan hexaan

→Hoeveelheid vet dat op kolom werd gebracht

- Uittesten van de bronnen die aanleiding geven tot de hoge achtergrondwaarde
  - Aanpassing van de laboratorium praktijken: afwas en schoonmaakprocedures
  - Testen van de componenten die in aanraking komen met het testsysteem
    - Solventen / DMSO
    - Materialen
- Efficiëntie van de transfer van de uitgedampte fractie naar het weefselcultuurmilieu
- Gebruik van commerciële kolommen: chromabond kolommen werden getest in vergelijking met glaskolommen (eigen ontwerp)
- Volume van kolommen

Deze bevindingen werden gerapporteerd in het tussentijdsverslag van december 1999 en resulteerden uiteindelijk in een standaard procedure.

### *3.1.5. Bepaling van de betrouwbaarheid van de test*

Met het uiteindelijke standaard protocol werd de betrouwbaarheid van de methode bepaald.

Volgende karakteristieken van het testsysteem werden bepaald

- Detectielimiet: de laagste hoeveelheid die nog kan geïdentificeerd worden
- Kwantificatielimiet: de laagste hoeveelheid die kan gekwantificeerd worden
- Herhaalbaarheid: drukt de precisie uit onder dezelfde experimentele condities in een kort tijdsbestek
- Reproduceerbaarheid: drukt de precisie uit over verloop van de tijd
- Lineariteit: de dosis-antwoord curves werden geanalyseerd met als doel een geschikte functie te identificeren die toelaat om de data over een bepaalde concentratie range te evalueren

## ***3.2. Vergelijking van de resultaten van chemische analyses en analyses met de bioassay***

Dezelfde stalen werden geanalyseerd volgens chemische meetmethodes en met de bioassay.

### *3.2.1. Melkstalen*

Stalen werden geanalyseerd die verzameld werden gedurende de meetcampagnes georganiseerd door het ministerie van Landbouw: er werden mengmelkstalen geanalyseerd en stalen die afkomstig zijn van hoeses die gelegen zijn in de buurt van verbrandingsoven of industriële installaties. In totaal werden 60 melkstalen, afkomstig van 2 campagnes geanalyseerd via de twee methodes.

### *3.2.2. Eieren en kazen*

Mengstalen van 5 eieren werden aangeleverd door de eetwareninspectie, 20 kazen werden geanalyseerd van verschillende oorsprong en aard.

### 3.2.3. *Dierlijke vetten afkomstig van vleesstalen*

Een beperkte set van dierlijke vetten (kip, varken) werd geanalyseerd in het kader van een ringtest die werd opgezet door het ministerie van landbouw. Ook van deze stalen beschikken we over de chemische meetgegevens en over de bioassay metingen.

### 3.3. *Analyse van diverse voedingsstalen*

Volgende voedingsstalen werden geanalyseerd: rundvlees, varkensvlees, kip, gemengd gehakt (varken/rund), lam, zalm, roodbaars, haring, makreel, garnalen, bovenop de hoger vermelde melkstalen, eieren en kazen. Het was niet mogelijk om binnen het tijdsbestek van de studie representatieve stalen te analyseren. Meestal werd er uit 5 verschillende voedingszaken (grootwarenhuizen) op twee verschillende tijdstippen producten aangeschaft. De eierstalen en kazen werden aangeleverd door de eetwareninspectie. De melkstalen waren afkomstig van de staalname campagnes die regelmatig door het ministerie van landbouw worden georganiseerd.

## 4. Resultaten

### 4.1. *Beschrijving van de bioassay*

#### 4.1.1. *Vorbereiding van de metingen*

Zowel bij de staal voorbereiding als bij het uitvoeren van de bioassay zelf, worden ultra zuivere producten (pro analyse) gebruikt om contaminatie te vermijden. Tevens ondergaat al het te gebruiken glaswerk en materiaal een aangepaste wasprocedure met BIOTEX. Er wordt nagespoeld met aceton en ethanol. Net voor gebruik wordt alles steeds met hexaan voorgespoeld. Vito procedure TENVIO02.

Er wordt gewerkt in een laboratorium dat uitsluitend bestemd is voor het werken met dioxines en waar de passende veiligheidsvoorschriften worden gerespecteerd (BVEIL004- werken met toxische stoffen, BVEIL005- het werken met genotoxische, carcinogene, mutagene en ultratoxische stoffen, BVEIL007- veiligheid aangaande ontvlambare producten, BVEIL0015- sorteren van afvalstoffen, BVEIL0016- het gebruik en veiligheid van gasflessen).

#### 4.1.2. *Staalvoorbereiding: extractie van de vetten*

- Dioxine-achtige verbindingen stapelen zich op in het vet van de voedingsstalen. Onze procedure vereist dat de vetten uit de stalen worden geëxtraheerd en vervolgens gedestruëerd. Vloeibare stalen zoals melk en eidooiers dienen vooraf eerst te worden gedroogd. Dit gebeurt door lyofilisatie of droogvriezen. Vaste voedingsstalen worden eerst fijn gemalen. Bij vleesstalen werd vet weefsel geïsoleerd, bij visstalen werden alleen de filets gebruikt.
- Het vet wordt uit de voedingstalen geëxtraheerd dmv een vaste fase kolom techniek. Het fijn gemalen of gelyofiliseerd voedingstaal wordt gemengd met een op voorhand vast gelegde hoeveelheid kiezelgel en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . De verhoudingen staal/kiezelgel/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , proefondervindelijk bepaald, zijn matrix en vetgehalte

afhankelijk. Essentieel komt het erop neer om een droog en vloeibaar poeder te bekomen om maximaal vet uit de matrix te kunnen extraheren. Met dit mengsel wordt een glazen kolom gevuld. Op de kolom wordt een vast volume aan een solventmengsel aangebracht. Er is gekozen voor hexaan en aceton. De verhoudingen aan hexaan en aceton zijn matrix afhankelijk. Door de verschillende samenstelling van de vetten in voedingsmiddelen kan de oplosbaarheid ervan in hexaan en aceton sterk verschillend zijn. Door de verhouding tussen de twee solventen te wijzigingen per matrix kan een optimaal rendement worden bekomen. De uitloogfractie van de kolom wordt opgevangen in een glazen recipiënt en uitgedampt op 37°C onder een continue stroom van stikstofgas. De bekomen hoeveelheid vet wordt gravimetrisch bepaald. De procedure wordt beschreven in SOP TMETI026.

**Tabel 3: Kolomsamenstelling per voedingsmatrix**

Staal	Staal/kieselgel/ Nasulfaat	Hexaan/aceton
Zalm	2/1/1	2/1
Pladijs	2/1/1	2/1
Roodbaars	2/1/1	2/1
Haring	2/1/1	2/1
Makreel	2/1/1	2/1
Rund	10/6/6	2/1
Varkensspek	1/2/2	2/1
Kip	1/2/2	2/1
Gehakt	1/1/1	2/1
Lam	1/1/1	2/1
Melk	1/1/1	1/1
Ei	1/2/2	2/1
Kaas	1/1/1	2/1

**Tabel 4: Rendement van de vetextracties**

	avg %	St. dev	n	cv
Eidooier	74	4	5	5
Sardienen	117	14	2	17
Smeerkaas	113	5	6	4
Parmesan	89	1	5	2
Boter	113	4	5	4
Melk	69	1	5	2
Zalm	99	6	6	6
Garnalen	40	4	6	9
Rund	73	2	7	2
Varkensspek	75	2	7	2

#### 4.1.3. Vetdestructie en elutie van de PHAHs

Om de dioxine-achtige stoffen zo zuiver mogelijk te kunnen toevoegen aan de cellijn wordt het geëxtraheerde vet vervolgens gedestruëerd op een vaste fase kolom. De procedure is op punt gesteld voor het destrueren van 1 gram vet (SOP TMETI026). De

drager is gelaagd en bevat zowel een laag zuur kiezelgel (44% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), waar de destructie plaats grijpt, als een laag basisch kiezelgel (33% NaOH), die onderaan in de kolom als buffer dienst doet. Het vet wordt in 5 ml hexaan opgelost en boven op de kolom gebracht, hieraan wordt nog 15 ml hexaan toegevoegd. Vervolgens wordt de kolom met 20 ml hexaan geëluëerd. Deze procedure wordt drie maal herhaald. Het eluaat wordt opgevangen en tot ongeveer 0.5 ml uitgedampt bij een temperatuur van 37°C, onder een continue stroom van stikstofgas. Het extract wordt overgebracht in een klein recipiënt waarin 7,5 µl DMSO is aangebracht en vervolgens verder uitgedampt. Dit extract wordt in een koelkast bewaard tot het aan de cellen kan worden toegevoegd.

#### *4.1.4. Blootstelling van de levercelkweken aan voedingsextracten*

De CALUX bioassay maakt gebruik van de genetische getransformeerde H4IIE ratten hepatoma cellijn. Hoe deze cellijn onderhouden wordt, wordt beschreven in SOP TCELV022. Het gebruik van deze cellijn voor het uitvoeren van de CALUX bioassay is terug te vinden in SOP TCELE020.

##### - Blootstellen van de cellen

In SOP TCELV022 wordt beschreven hoe de cellen in een 96 well plaat worden gebracht ter voorbereiding van het uitvoeren van de CALUX bioassay. De cellen worden gegroeid in 100µl  $\alpha$  - MEM (ICN) + 10 % fetaal kalfsserum (Hyclone) tot ongeveer 60% confluentie. Een deel van elke plaat is voorzien voor het aanbrengen van een 2,3,7,8-TCDD standaardreeks. De standaard die gebruikt werd is een zuivere 2,3,7,8 TCDD standaard (CIL), aangemaakt in DMSO (2 µM) (ACROS). De concentratie werd gecontroleerd via GC-HRMS. Voor elk experiment wordt een verdunningsreeks van deze standaard aangemaakt in DMSO die dan verder wordt verdund met weefselcultuurmilieu zodat de uiteindelijke concentratie DMSO in elke well 1% bedraagt. De standaard reeks die op elke plaat wordt toegevoegd bestaat uit een medium controle, een solvent controle (1% DMSO) en 9 verschillende TCDD concentraties (log 2 diluties) gaande van 0.39 pM tot 100 pM. Elke verdunning wordt in triplicaat getest.

Aan de in DMSO bewaarde extracten wordt weefselcultuurmedium toegevoegd tot het bekomen van 1% DMSO. Triplicaat kulturen (100µl/well) worden blootgesteld aan deze oplossingen.

De platen worden bij 5% CO<sub>2</sub> en bij 37°C gedurende 22 uur geïncubeerd.

De reactie wordt stopgezet door aan de cellen een lysisbuffer (Promega) toe te voegen en vervolgens de platen bij -80°C in te vriezen.

Na het ontdooien van de platen wordt er LAR (luciferine assay reagent-Promega) toegevoegd. Het effect van de dioxine-achtige stoffen op de cellen wordt bepaald dmv luminescentiemeting (VICTOR2-Wallac). Het effect uitgedrukt in cps (counts per seconds) is recht evenredig met de hoeveelheid TCDD.

#### *4.1.5. Verwerken van de meetgegevens*

Voor de berekening wordt gebruik gemaakt van het soft ware pakket-Graph-Path (versie 2 01 June 24, 1996). In excel werden templates gemaakt waar op standaard manier de individuele gegevens van de luminometer worden ingebracht. Zowel voor de gegevens van de standaard curve als voor die van de stalen worden via Excel het rekenkundig gemiddelde, de mediaan, de standaard deviatie en de variatie coëfficiënt berekend. Voor



elk staal wordt de inductiefactor berekend tov de DMSO controle. Het signaal van elke verdunning wordt gedeeld door het signaal van de DMSO controle. Deze laatste heeft een inductiefactor die gelijkgesteld is aan één. Op basis van de gegevens van de standaard reeks worden de detectie- en kwantificatielimiet berekend. Via het Graph path programma wordt een sigmoidale curve met variabele helling gefit doorheen de gegevens van de standaard reeks. Aan de hand van interpolatie van de resultaten op de standaardcurve worden de waarden voor de onbekende stalen afgeleid en uitgedrukt in pg TEQ/g vet.

Betrouwbare meetgegevens dienen aan volgende voorwaarden te voldoen:

- de variatie coëfficiënt tussen de replica moet < 20%
- de inductie bij 25 pM (0.805 pg) moet > 6
- de gemeten luminescentie (uitgedrukt in cps) moet groter zijn dan de detectielimiet
- de meting is kwantificeerbaar indien de gemeten luminescentie groter is dan de kwantificatielimiet
- indien er meerdere verdunningen zijn uitgetest, zal voorkeur worden gegeven aan de waarden die het dichtst gelegen zijn bij de EC<sub>50</sub> voor TCDD zijnde ongeveer 10 pM. De EC<sub>50</sub> is de concentratie die 50% van de maximale TCDD respons geeft.

## 4.2. Performantie van de bioassay

### 4.2.1. Detectielimiet

De detectielimiet wordt als volgt bepaald: de waarde van DMSO-controle in cps uitgedrukt + 3 maal de standaard afwijking.

De detectielimiet wordt bepaald op basis van de gegevens van de standaard curve die per microtiter plaat wordt aangebracht. De detectielimiet wordt per microtiterplaat berekend.

**Resultaten:** Detectielimiet bepaald op basis van 39 microtiterplaten. De voorgeschreven procedure vertrekt van een staal van 1 g vet; na verdunning resulteert dit in 0,13 g vet per well. Op basis van deze gegevens kunnen we de detectielimiet ook uitdrukken in pg/g vet.

**Tabel 5: Detectielimiet**

	pM	pg/g vet
<b>mediaan</b>	0,4	0,1
<b>stdev</b>	0	0
<b>cv</b>	0	0
<b>nn</b>	39	39
<b>min</b>	0,4	0,1
<b>max</b>	0,4	0,1

### 4.2.2. Kwantificatielimiet

De kwantificatielimiet wordt bepaald als de laagste geteste concentratie die significant verschillend is van de waarde van DMSO met een probabilliteit van minder dan 0.01. Een meting is kwantificeerbaar wanneer de gemeten luminescentie groter is dan die van de kwantificatielimiet.

De kwantificatielimiet wordt bepaald op basis van de gegevens van de standaard curve die per microtiter plaat wordt aangebracht. De kwantificatielimiet wordt per microtiterplaat berekend.

Resultaten: Kwantificatielimiet bepaald op basis van 38 microtiterplaten. De voorgeschreven procedure vertrekt van een staal van 1 g vet; na verdunning resulteert dit in 0,13 g vet per well. Op basis van deze gegevens kunnen we de detectielimiet ook uitdrukken in pg/g vet.

**Tabel 6: Kwantificatielimiet**

	pM	pg/g vet
<b>mediaan</b>	1,6	0,4
<b>stdev</b>	2,1	0,51
<b>cv</b>	116	117
<b>n</b>	38	38
<b>min</b>	0,4	0,09
<b>max</b>	12,5	3,02

#### 4.2.3. Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid wordt bepaald aan de hand van stalen die op eenzelfde dag de voorbereidingsprocedure ondergaan en op hetzelfde ogenblik aan de bioassay worden toegevoegd. Dit geeft de interne variabiliteit aan van de procedure wanneer stalen binnen een kort tijdsbestek worden getest. Vb. één reeks stalen die in één run worden geanalyseerd.

De herhaalbaarheid werd getest met botervetstalen. Voor elke reeks werd telkens het staal gesplitst en de replica's doorliepen de procedure op dezelfde dag.

Resultaten:

**Tabel 7: Herhaalbaarheid: resultaten van identieke stalen gemeten op eenzelfde dag**

	<b>Reeks 1</b>	<b>Reeks 2</b>	<b>Reeks 3</b>	<b>Reeks 4</b>
	pg/g vet	pg/g vet	pg/g vet	pg/g vet
	2,79			
	2,31			
	2,30	1,773	3,97	4,379
	2,39	1,514	4,457	2,455
	2,22	1,795	4,939	3,677
	2,43	1,455	4,297	2,724
	2,58	1,487	4,182	3,035
	2,81	2,001	4,51	2,992
<b>avg</b>	<b>2,48</b>	<b>1,67</b>	<b>4,39</b>	<b>3,21</b>
<b>stdev</b>	<b>0,23</b>	<b>0,22</b>	<b>0,33</b>	<b>0,35</b>
<b>cv</b>	<b>9,00</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>11</b>

## Besluit:

De herhaalbaarheid zoals gegeven door de variatie coëfficiënt bedraagt 10%.

### 4.2.4. Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid wordt bepaald aan de hand van stalen die de procedure op onafhankelijke wijze doorlopen dwz op verschillende tijdstippen de voorbereidingsprocedure ondergaan en op verschillende tijdstippen aan de bioassay worden toegevoegd.

Hiertoe werden 3 stalen gesplitst (2 botervet stalen en 1 roomvet), de replica-stalen doorliepen de procedure onafhankelijk van elkaar.

## Resultaten

**Tabel 8: Reproduceerbaarheid: resultaten van identieke stalen die op volledig onafhankelijke wijze de procedure doorlopen**

	<b>Staal 1</b>	<b>Staal 2</b>	<b>Staal 3</b>
	<b>pg/g vet</b>	<b>pg/g vet</b>	<b>pg/g vet</b>
	3,39	1,773	
	2,392	1,592	
	3,97	2,79	1,89
	4,379	2,098	0,51
	3,002	2,66	1,738
	1,842		0,588
	2,85		0,83
	3,453		0,263
<b>avg</b>	<b>3,16</b>	<b>2,18</b>	<b>0,97</b>
<b>stdev</b>	<b>0,82</b>	<b>0,53</b>	<b>0,68</b>
<b>cv</b>	<b>26</b>	<b>24</b>	<b>70</b>
<b>n</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>6</b>

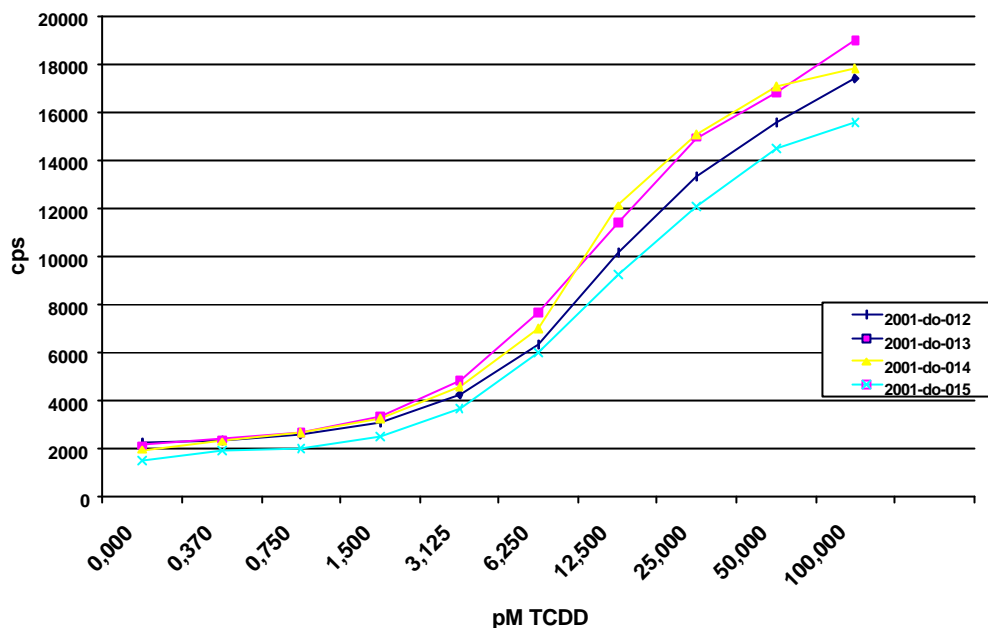
## Besluit

De reproduceerbaarheid van de test bepaald aan de hand van botervetstalen is 26%. Het roomvetstaal geeft een grotere variatie aan, we noteren echter dat de concentratie aan dioxine-achtige stoffen in dit staal erg laag is.

### 4.2.5. Lineariteit

De onderstaande figuur 3 geeft het typische verloop van de TCDD standaard curves weer zoals die op elke microtiterplaat worden aangebracht. Elke lijn is afkomstig van een onafhankelijke test.

**Figuur 3: Typisch verloop van standaard curves**



De meetresultaten van ongekende stalen moeten boven de kwantificatielimiet liggen van de overeenkomstige curve. Wanneer het signaal op de plateaufase ligt, of de plateaufase nadert, wordt het staal opnieuw verdund (1/1) en gemeten. Bij voorkeur worden meetresultaten gebruikt die dicht bij de EC50 waarde liggen van de standaardcurve.

#### 4.2.6. Bespreking

We kunnen de performantie van onze test vergelijken met resultaten van een recent gerapporteerde validatie studie van de CALUX bioassay voor toepassing op koemelkstalen (Bovee et al, 1998). In grote lijnen zijn de bevindingen erg vergelijkbaar. Wel ligt onze detectielimiet en kwantificatielimiet iets lager (resp.13 fg en 0,4 pg/g vet tegenover resp.50fg en 1 pg/g vet). Ons testsysteem gebeurt in 96 well platen, wat toelaat om sneller meer stalen te analyseren dan in 24 well platen zoals gerapporteerd door Bovee. Er wordt een herhaalbaarheid gerapporteerd met een variatie van 10% bij een staal van 6 pg TEQ/g vet, wat overeenkomt met de herhaalbaarheid die wij hebben gemeten. De reproduceerbaarheid tussen onafhankelijke experimenten varieert tussen 4% en 54% (Bovee), wij vonden bij stalen rond 2 pg TEQ/g vet een herhaalbaarheid van 26%, voor het staal botervet met een waarde kleiner dan 1 pgTEQ/g vet liep de variatiecoëfficiënt op tot 70%.

Alhoewel vergelijkbare bioassays ook elders recent gebruikt worden voor toepassing op voedingsstalen (vb. WIV), zijn resultaten betreffende de performantie van deze bioassays niet in de open literatuur beschikbaar waardoor verdere vergelijkingen niet mogelijk zijn.

Een commercieel beschikbare bioassay gebaseerd op een getransformeerde muizencelijn zou een detectielimiet hebben < 0,2 pg/g voor complexe mengsels van dioxines en furanen in dierlijke voeding (Cooke et al, 2000).

### **4.3. Vergelijking van de meetgegevens bekomen via chemische methodes en via de bioassay**

#### **4.3.1. Overzicht van de stalen**

Zoals hoger vermeld werden 60 melkstalen geanalyseerd die verzameld werden gedurende de meetcampagnes georganiseerd door het Ministerie van Landbouw: er werden 26 mengmelkstalen (MM) geanalyseerd en 34 stalen die afkomstig zijn van hoeves (HM) die gelegen zijn in de buurt van verbrandingsoven of industriële installaties. Alle melkstalen, die afkomstig zijn van drie campagnes, werden onderzocht met de CALUX, van alle melkstalen beschikken we over de chemische meetgegevens van dioxines/furanen, voor 34 stalen beschikken we ook over de meting van de coplanaire PCBs en kunnen we dus totale TEQ waarden berekenen.

Bijkomend werden mengstalen van 5 eieren en 20 kazen aangeleverd door de eetwareninspectie. Voor deze stalen beschikken we naast de chemische meetgegevens van dioxines en furanen ook over de meting van non-ortho (PCBs 77, 81, 126, 169) en mono-ortho PCBs (PCB 105, 118, 156, 157, 167) (=coplanaire PCBs) en over de meting van merker PCBs (PCB28, 52, 101, 118, 138, 153, 180).

Een beperkte set van dierlijke vetten (kip, varken) werd geanalyseerd in het kader van een ringtest die werd opgezet door het Ministerie van Landbouw. Ook van deze stalen beschikken we over de chemische meetgegevens van dioxines en furanen en over de bioassay metingen.

Alleen de resultaten die bekomen werden met metingen uitgaande van 1 g vetstalen worden opgegeven. Oorspronkelijk werd de procedure uitgevoerd uitgaande van 100 mg vetstalen. Dit blijkt echter te weinig uitgangsmateriaal te zijn om betrouwbare resultaten te bekomen.

#### **4.3.2. Procedure voor chemische metingen**

##### **4.3.2.1. Bepaling van PCDD/F en non-ortho PCB's in melk, kaas, eieren en vlees/dierlijk vet**

###### Vorbereiding en extractie

*Melk, yoghurt:* indampen op zandbad tot een visieuze massa bekomen wordt, gevolgd door chemische droging met silica en natriumsulfaat.

*Melkpoeder:* toevoeging van ultrapuur water tot een visceuze massa bekomen wordt, gevolgd door chemische droging met silica en natriumsulfaat.

*Boter, kaas:* opsmelten, gevolgd door chemische droging met silica en natriumsulfaat, of rechtstreeks vermalen in een blender met silica en natriumsulfaat.

*Vlees en dierlijk vet:* vermalen in een blender met silica en natriumsulfaat.

In al de vier gevallen wordt de vetextractie uitgevoerd d.m.v. een kolomextractie met n-hexaan/acetone (1/2), gevolgd door een gravimetrische bepaling van de hoeveelheid vet.

## Zuivering

- +/- 7g vet wordt opgelost in n-hexaan en gespiked met de overeenkomstige  $^{13}\text{C}$ -gemarkte congenen.
- Chromatografie over een gecombineerde grote silica/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ -silica/NaOH kolom voor afscheiding van de aanwezige vetten.  
*Kolomvulling:*  
20 g silica 33% NaOH 1N (onder)  
100 g silica 44%  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
laagje  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
*Elutie:* 700 ml n-hexaan
- Chromatografie over een kleine gecombineerde silica/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ -silica/NaOH kolom voor verwijdering van eventueel resterende sporen vet.  
*Kolomvulling:* 2 g silica 33% NaOH (onder)  
10 g silica 44%  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
laagje  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
*Elutie:* 200 ml n-hexaan
- Hoge druk vloeistofchromatografie (HPLC) over een koolstofkolom voor scheiding volgens planariteit.
- Adsorptiechromatografie over een aluminakolom voor scheiding volgens polariteit en vergemakkelijking van de finale solventwissel.  
*Kolomvulling:* 12.5 g basische alumina  
laagje  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
*Elutie:* 50ml n-hexaan + 100 ml n-hexaan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (98/2) = eerste fractie.  
150ml hexaan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50/50) = tweede fractie.  
tweede fractie in tipje brengen en solventwissel naar nonaan.
- Recovery standaard spiken.

## Instrumentele meting van PCDD/F en non-ortho PCB's via HRGC-HRMS.

Methode geldend voor melk, kaas, eieren en vlees/dierlijk vet.

De scheiding en detectie gebeurt via capillaire gaschromatografie - hoge resolutie massaspectrometrie (GC-HRMS) in de 'selected ion recording' (SIR) modus, gebruikmakend van een kolom met apolaire stationaire fase (DB-5MS).

Identificatie van de PCDD/PCDF en co-PCB's gebeurt m.b.v. de overeenkomstige  $^{13}\text{C}$ -gemarkte congenen, welke in diverse stadia van de analyse aan het staal worden toegevoegd.

Kwantificering van de PCDD/PCDF en co-PCB's gebeurt m.b.v. de 16  $^{13}\text{C}$ -gemarkte congenen.

Door toevoegen van zgn. 'recovery'-standaarden, nl.  $^{13}\text{C}$ - 1,2,3,4- $\text{T}_4\text{CDD}$  en  $^{13}\text{C}$ - 1,2,3,7,8,9- $\text{H}_6\text{CDD}$  kan men de recuperatierementen van de afzonderlijke interne standaarden berekenen, welke een maat zijn voor verliezen tijdens de analyse; de analyseresultaten zijn hiervoor via de toegepaste kwantificeringsmethode automatisch gecorrigeerd.

De analyse gebeurt op basis van 'Selected Ion Recording' (SIR), waarbij de componenten worden gedetecteerd door de selectie en registratie van de twee meest intense ionen van het moleculair ion cluster van de natieve PCDD/PCDF en co-PCB's en de <sup>13</sup>C-gemerkte congenere. Het totale aantal te meten ionen voor de complete analyse is verdeeld in verschillende acquisitiegroepen van een bepaald aantal ionen. Deze groepen worden na elkaar op zekere tijdstippen gedurende de run en voor een zekere periode geactiveerd zodanig dat deze parallel lopen met de tijdsintervallen waarin de overeenkomstige componenten elueren. De juiste tijdsintervallen worden vooraf met behulp van standaarden bepaald. Binnen een groep vindt selectie van de ionen plaats doordat, bij een constante magnetische veldsterkte, de versnelspanning gevarieerd wordt (met synchrone aanpassing van de voltages van de ESA's). Ter correctie van het systeem ('magnetic drift') wordt gebruik gemaakt van een 'lock'-massa van een referentiestof, perfluorokeroseen (PFK), waarvan gedurende de run een bepaalde constante hoeveelheid in de bron wordt ingelaten.

#### Methodekarakteristieken

De aantoonbaarheidsgrenzen bedragen 0.02 tot 0.1 pg/g vet afhankelijk van de congener, overeenkomend met ca 0.3 pg totaal TEQ/g vet. De bepaalbaarheidsgrens bedraagt 0.6 pg totaal TEQ /g vet.

De binnen-laboratorium reproduceerbaarheid, bepaald op basis van gecertificeerde referentiematerialen bedraagt 10 tot 15%. De gemiddelde terugvinding is gelegen tussen 95 en 120%.

#### **4.3.2.2. Bepaling van indicator- en mono-ortho PCB's.**

##### Vetextractie.

De vetextractie wordt zoals hierboven uitgevoerd d.m.v. een kolomextractie met n-hexaan/acetone (1/2). De hoeveelheid vet wordt gravimetrisch bepaald.

##### Clean-up

- 0,4 g vet oplossen in n-hexaan en spiken met <sup>13</sup>C-gemerkte PCB-congenere.
- kolomchromatografie toepassen:  
*kolomvulling*: 6 g aangezuurd silicagel (silica 40% zwavelzuur)  
1g gedesactiveerd aluminiumoxide (aluminiumoxide 10% water)  
laagje Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bovenopelutie met 20 ml n-hexaan
- extract indampen onder N<sub>2</sub>-stroom en solventwissel naar nonaan; het eindvolume bedraagt 100 µl, daarna spiken met recovery C<sup>13</sup>-PCB-178

##### Meting.

De meting gebeurt via capillaire gaschromatografie-lage resolutie massaspectrometrie (GC-LRMS), in SIM-modus op een apolaire HT-5 kolom. De kwantificatie gebeurt aan de hand van isotoopdilutie.

#### Methodekarakteristieken

De aantoonbaarheidsgrenzen bedragen 0.2 tot 1 ng/g vet afhankelijk van de congener.

De herhaalbaarheid, bepaald op basis van gecertificeerde referentiematerialen, bedraagt 3 tot 5 % voor congeneergehalten van 20 tot 300 ng/g vet. De terugvindingen zijn gelegen tussen 80 en 125%.

#### *4.3.3. Resultaten*

Onderstaande tabellen geven de resultaten van de CALUX metingen en de chemische meetresultaten bekomen op dezelfde stalen. De resultaten werden gerangschikt naar stijgende TEQ gehalten, met de CALUX resultaten als referentie.



**Tabel 9: Resultaten van de hoevermelkstalen**

		<b>CALUX</b> pgTEQ/g vet	<b>PCDD/F</b> pgTEQ/g vet	<b>Coplaire</b> pgTEQ/g vet	<b>Som</b> pgTEQ/g vet
		1,1	4,2		
		1,2	2,8		
		1,3	1,7		
		1,4	1,6	3,0	4,6
		1,8	2,0		
		1,9	2,4		
		2,0	2,2	3,0	5,2
		2,1	2,7	3,7	6,4
		2,1	3,5	4,2	7,7
		2,3	4,7		
		2,5	1,6	1,7	3,3
		2,6	2,4		
		2,6	3,8		
		2,9	1,9		
		3,0	2,1	2,6	4,7
		3,1	2,3		
		3,1	2,7	2,9	5,6
		3,1	3,9	4,0	7,9
		3,2	2,5		
		3,3	2,3	5,1	7,4
		3,3	4,3		
		3,7	2,1	3,0	5,1
		3,7	4,0	2,1	6,1
		3,8	4,1	3,4	7,5
		4,2	2,2	4,0	6,2
		4,2	2,5	3,1	5,6
		5,2	2,9	3,7	6,6
		5,6	4,6		
		6,2	5,1		
		6,6	5,6	4,5	10,1
		7,0	5,7	6,8	12,5
		7,4	5,6		
		8,4	5,3		
		14,3	7,2		
		20,0	4,9	11,0	15,9
	Gemiddelde	4,3	3,4	4,0	7,1
	Mediaan	3,1	2,8	3,6	6,3
	Standaard deviatie	3,8	1,4	2,1	3,0
	Variatie	0,9	0,4	0,5	0,4

**Tabel 10: Resultaten van mengmelkstalen**

		<b>CALUX</b> pgTEQ/g vet	<b>PCDD/F</b> pgTEQ/g vet	<b>Coplaire</b> pgTEQ/g vet	<b>Som</b> pgTEQ/g vet
		0,7	1,0	1,5	2,5
		0,9	1,1		
		0,9	1,1	1,3	2,4
		0,9	0,8	1,0	1,8
		1,1	1,5	1,9	3,4
		1,2	1,6		
		1,2	1,2		
		1,4	1,7		
		1,4	1,0		
		1,5	0,9	1,0	1,9
		1,5	2,0	2,3	4,3
		1,5	0,8		
		1,6	1,6		
		1,7	1,1		
		1,7	1,6		
		1,9	1,7	1,8	3,5
		1,9	1,4	2,0	3,4
		2,0	1,7	1,9	3,6
		2,0	1,2	1,2	2,4
		2,2	1,7	2,3	4,0
		2,3	1,3	1,5	2,8
		2,3	2,4	2,4	4,8
		2,3	1,2	1,7	2,9
		2,4	1,2	1,8	3,0
		2,9	1,9	1,8	3,7
		3,1	1,8	1,9	3,7
		3,5	1,7	2,3	4,0
	Gemiddelde	1,8	1,4	1,9	3,4
	Mediaan	1,7	1,4	1,9	3,6
	Standaard deviatie	0,7	0,4	0,4	0,8
	Variatie	0,4	0,3	0,2	0,2

**Tabel 11: Resultaten van de ei-stalen**

Ei	ref nr.	CALUX pgTEQ/g vet	PCDD/F pgTEQ/g vet	Coplaire pgTEQ/g vet	Som pgTEQ/g vet	PCB ng/g vet
	4306	1,44	0,7	1,1	1,8	23
	4304	1,83	0,64	0,83	1,47	14
	4305	1,94	0,75	0,93	1,68	13
	4303	2,45	2,5	2,3	4,8	34
	4307	2,91	4,5	3,5	8	66
Gemiddelde		2,11	1,82	1,73	3,55	30,00
Mediaan		1,94	0,75	1,10	1,80	23,00
Standaard deviatie		0,57	1,69	1,15	2,84	21,83
Variatie		0,27	0,93	0,66	0,80	0,73

**Tabel 12: Resultaten van de kaasstalen**

Kaas	CALUX pgTEQ/g vet	PCDD/F pgTEQ/g vet	Coplaire pgTEQ/g vet	Som pgTEQ/g vet	PCB ng/g vet
	0,40	1,2	1,7	2,9	38
0,76	0,71	0,95	1,66	28	
0,77	0,61	0,95	1,56	32	
1,17	0,44	0,88	1,32	26	
1,39	0,53	0,95	1,48	20	
1,51	1	1,2	2,2	19	
1,55	0,41	0,72	1,13	20	
1,75	0,82	0,75	1,57	18	
1,98	0,58	0,78	1,36	22	
2,22	0,85	1,6	2,45	19	
2,31	1,7	0,55	2,25	12	
2,33	2,1	1,4	3,5	31	
2,54	0,68	0,35	1,03	13	
3,12	0,97	1,6	2,57	20	
3,34	0,99	0,93	1,92	19	
3,38	0,52	1,5	2,02	22	
3,48	1,9	1,2	3,1	21	
Gemiddelde	2,00	0,94	1,06	2,00	22,35
Mediaan	1,99	0,84	0,95	1,96	20,50
Standaard deviatie	0,96	0,51	0,39	0,72	6,73
Variatie	0,48	0,54	0,37	0,36	0,30

**Tabel 13: Resultaten van de stalen van vleesvet**

<b>Vleesvet stalen Min. Landbouw</b>	<b>Referentie</b>	<b>CALUX pgTEQ/g vet</b>	<b>PCDD/F pgTEQ/g vet</b>
Animal fat	A1	7,00*	7,6*
(bovine)	A2	6,00*	4,9*
Pork fat	C1	7,00*	6,6*
Pork fat	C2	3,00	0,2
Pork fat	C3	11,00*	2,0*
Pork fat	C5	7,00*	7,22*
Gemiddelde		6,83	4,75
Mediaan		7,00	5,75
Standaard deviatie		2,56	3,03
Variatie		0,38	0,64

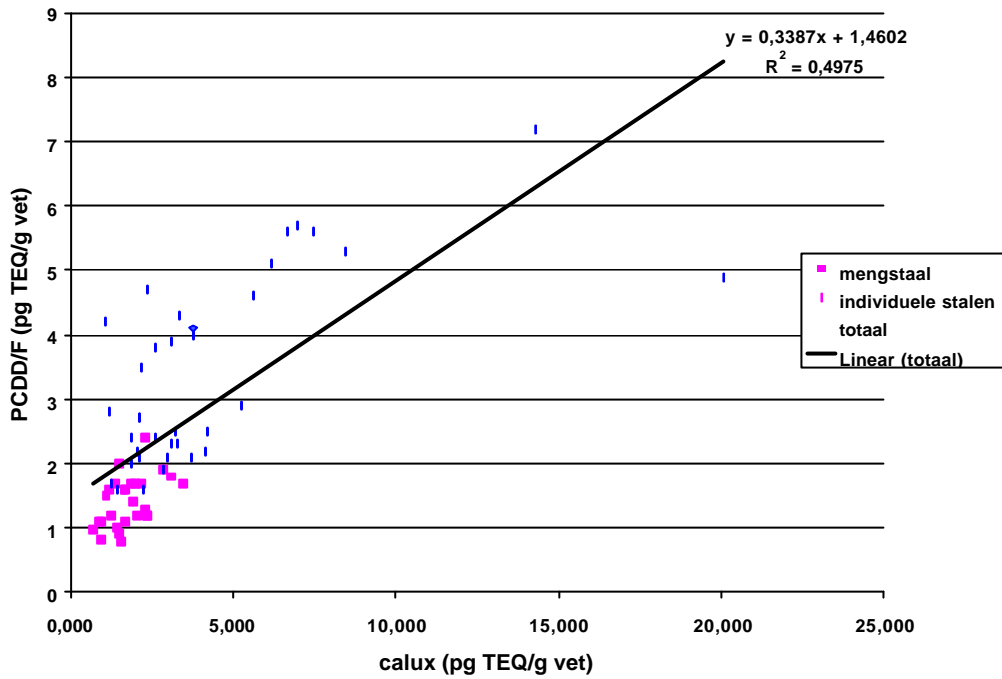
\* Stalen die positief scoren boven de wettelijke norm van 3 pg TEQ/g vet.

#### 4.3.4. Bespreking

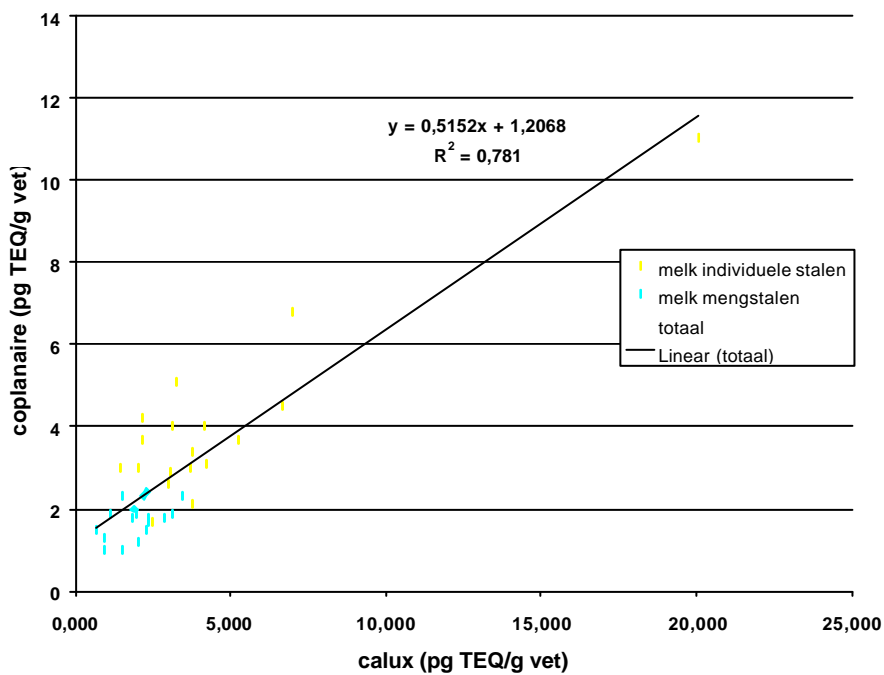
##### 4.3.4.1. Correlaties tussen chemische metingen en bioassay metingen

Onderstaande figuren geven de correlaties weer tussen de chemische meetresultaten en de TEQ-CALUX metingen. Lineaire regressies werden berekend met behulp van Excell 97 (microsoft). De significantie van de correlaties met inbegrip van Spearman rank correlatie (non-parametrische test) werd berekend met STATISTICA en wordt aangegeven in onderstaande tabel 14.

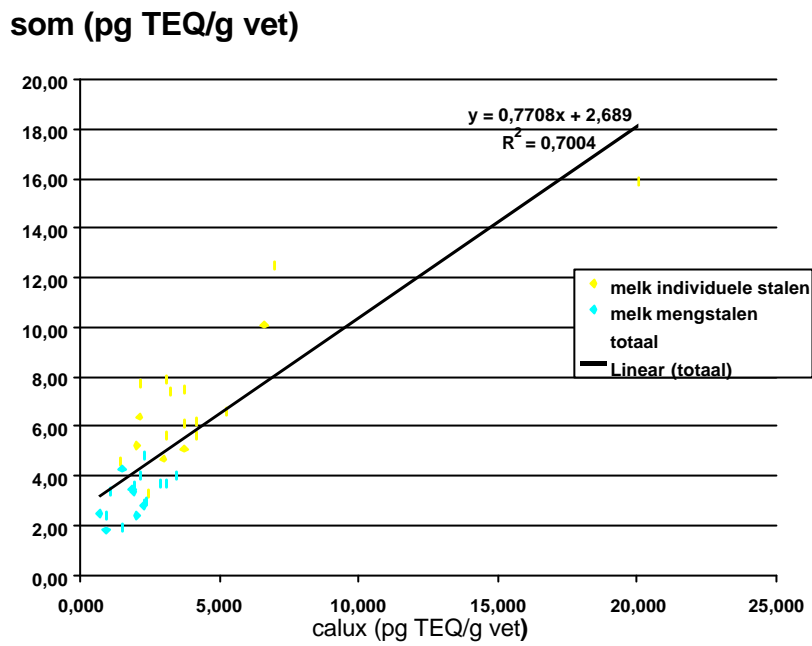
**Figuur 4: Correlatie tussen de chemische metingen (dioxines/furanen) en de bioassay metingen op melkstalen**



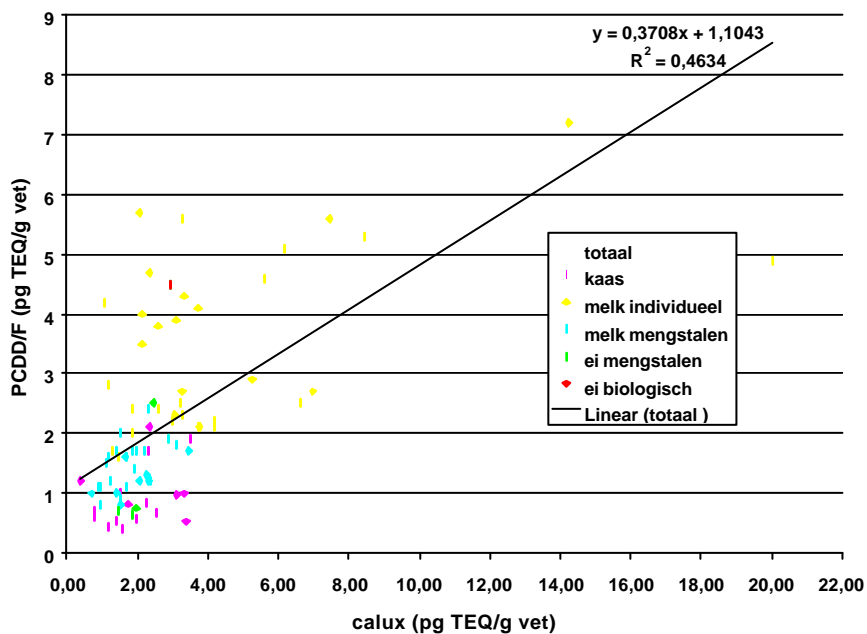
**Figuur 5 : Correlatie tussen chemische metingen (coplaire PCBs) en bioassay meting van melkstalen**



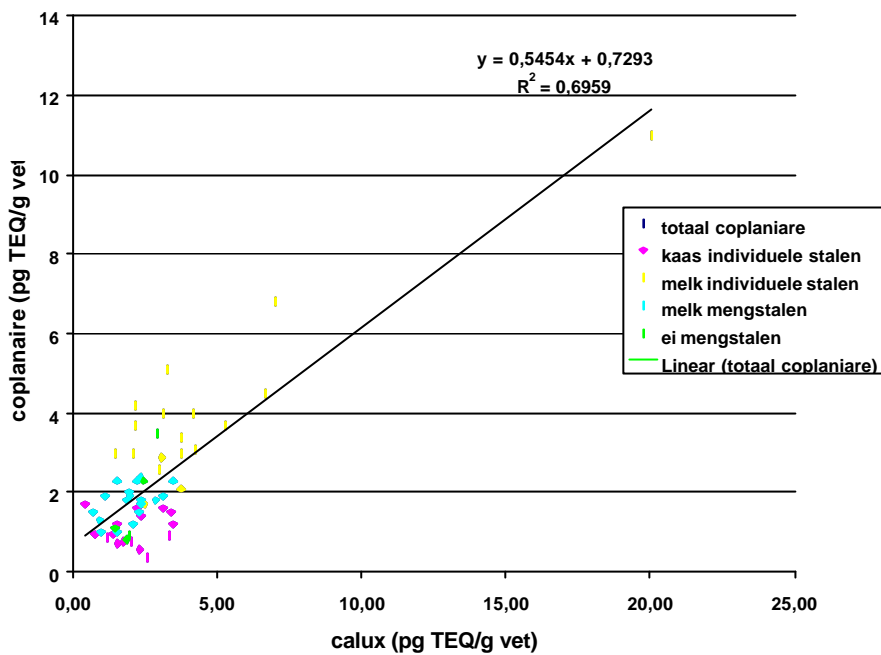
**Figuur 6: Correlatie tussen chemische metingen (som dioxines/ furanen + PCBs) en bioassay metingen van melkstalen**



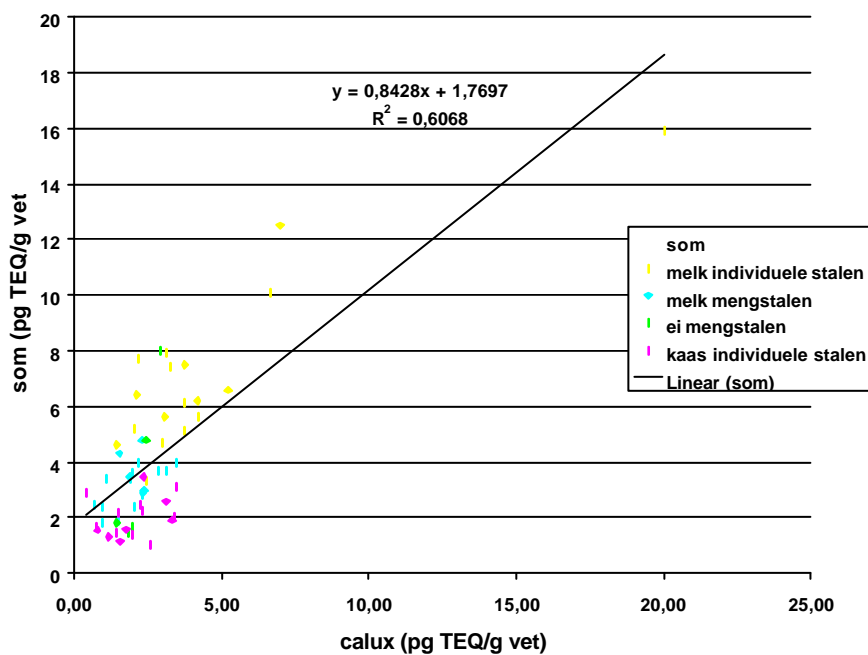
**Figuur 7: Correlatie tussen de chemische metingen (dioxines/furanen) en de bioassay meting van melk-, kaas- en eistalen**



**Figuur 8: Correlatie tussen chemische metingen (coplanaire PCBs) en metingen met de bioassay**



**Figuur 9: Correlatie tussen de chemische metingen (som dioxines/furanen en PCBs) en de resultaten van de bioassay**



**Tabel 14: Overzicht van de gevonden correlaties en hun significantie**

TEQ CALUX vs	TEQ dioxines/furanen					
	r <sup>2</sup>	r	p	N	Spearm.r	p
Melk	0,500	0,710	< 0,0000	62	0,72	<0,000
Dierlijke vetten	0,033	0,182	0,731	6	0,33	0,52
Kaas	0,107	0,328	0,199	17	0,28	0,27
Ei	0,882	0,939	0,018	5	0,9	0,037
TEQ CALUX vs	TEQ coplanaire PCBs					
	r <sup>2</sup>	r	p	N	Spearm.r	p
Melk	0,780	0,88	< 0,000	36	0,67	0,0001
Kaas	0,009	0,090	0,721	17	0,02	0,93
Ei	0,841	0,917	0,028	5	0,70	0,19
TEQ CALUX vs	TEQ som					
	r <sup>2</sup>	r	p	N	Spearm.r	p
Melk	0,700	0,840	< 0,0000	36	0,73	<0,000
Kaas	0,081	0,285	0,268	17	0,30	0,24
Ei	0,867	0,931	0,021	5	0,70	0,19
TEQ CALUX vs	Som merker PCBs					
	r <sup>2</sup>	r	p	N	Spearm.r	p
Melk						
Dierlijke vetten						
Kaas	0,307	- 0,554	0,021	17	- 0,42	0,09
Ei	0,713	0,845	0,071	5	0,60	0,28

Het is niet de bedoeling om dieper in te gaan op de meetresultaten in functie van de herkomst van de stalen. Over de chemische meetresultaten werd immers eerder gerapporteerd naar de opdrachtgevers toe. Zoals verwacht en parallel aan de chemische meetresultaten geven de mengmelk monsters lagere TEQ waarden dan de monsters genomen op individuele hoeves. De correlatie tussen de CALUX-TEQ en de TEQ dioxines/furanen, uitgedrukt per g vet is hoog significant ( $p < 0,0001$ ), de correlatiecoëfficiënt bedraagt 0.71. Dit is vergelijkbaar met de correlatie van 0,74 die gevonden werd in de eerder vermelde studie van Bovee (1998) voor 22 melkstalen, die allen onder de Nederlandse norm van 6 pg TEQ/g vet lagen, en geanalyseerd werden via CALUX en via GC-MS (dioxines/furanen). Wanneer de coplanaire PCBs mee in rekening worden gebracht dan neemt de correlatie tussen chemische metingen en CALUX metingen verder toe (tot 0,84).

De onderzochte kazen en ei-monsters lagen allen beneden de in België toegelaten norm van 5 pg TEQ (dioxines/furanen) per g vet (KB 29 december 1999).

De dierlijke vetten die afkomstig waren van de ringstudie georganiseerd door het Ministerie van Landbouw, waren afkomstig van de dioxine crisis. Zowel de meetresultaten bekomen via chemisch analytische weg, als die bekomen via de CALUX bioassay geven verhoogde waarden aan.



Voor wat betreft de melkstalen en de eieren is er een statistisch significante lineaire correlatie tussen de chemisch-analytisch gemeten dioxines/furanen TEQ en de TEQ gemeten met de bioassay. Wanneer de data logaritmisch getransformeerd werden blijven dezelfde conclusies gelden.

Voor de kazen geldt bovenstaande bevinding niet. De CALUX TEQ is niet gecorreleerd met de dioxines/furanen TEQ, noch met de TEQ van co-planaire PCBs, noch met de totale TEQ (TEQ van dioxines+furanen+coplanaire PCBs), en zelfs omgekeerd gecorreleerd met de merker PCBs. Overigens blijkt er ook geen correlatie tussen de chemisch gemeten merker PCBs en de chemisch gemeten TEQ waarden in de kazen. De oorzaak hiervoor is niet meteen duidelijk. Dit kan te wijten zijn aan specifieke eigenschappen van de kaasmatrix die op één of andere manier niet voldoende gedestruëerd wordt en toch interfereert met het biologisch meetsysteem (via de Ah-receptor of het luciferase systeem). Het is ook mogelijk dat het dioxine-furanen-PCB mengsel dat in kazen aanwezig is een biologische activiteit vertoont die niet evenredig is met de aanwezige concentraties van de chemisch gemeten congenere. Mogelijk kan dat een gevolg zijn van het specifieke rijpingsproces van kazen dat de chemische samenstelling van het PCB/dioxine mengsel dat normaal aanwezig is in dierlijk vet (vlees, melk) beïnvloedt. Dit dient echter verder te worden uitgezocht. Bijkomend geldt dat de TEQ-gehalten van de kazen gemiddeld erg laag zijn.

Uit de resultaten van de melkstalen kunnen we afleiden dat al de stalen die boven de wettelijk opgelegde norm van 5 pg TEQ–dioxines/furanen per g vet scoren, waarden in de CALUX hebben boven 6,2 pg TEQ. Eén staal dat juist beneden de chemische TEQ norm ligt, scoort hoog met de CALUX. Dit staal blijkt bij nadere analyse een verhoogd gehalte te hebben van coplanaire PCBs. Uit bovenstaande tabellen blijkt dat melkstalen die positief geklasseerd werden op basis van de chemische TEQ metingen, ook positief scoren met de bioassay. Uit de bovenstaande reeks van resultaten hebben we geen enkele vals negatieve waarde.

Wat betreft de varkensvetstalen (Ministerie van Landbouw) scoren alle stalen die positief zijn volgens de wettelijke norm ook positief in de CALUX. Eén staal scoort positief in de CALUX en negatief bij de chemische metingen. Voor varkensvet wordt wettelijk een cut off waarde voorgesteld van 3 pg TEQ–dioxines/furanen per g vet (KB 28 december 1999).

#### **4.3.4.2. Relatieve bijdrage van PCBs/dioxines aan CALUX TEQ**

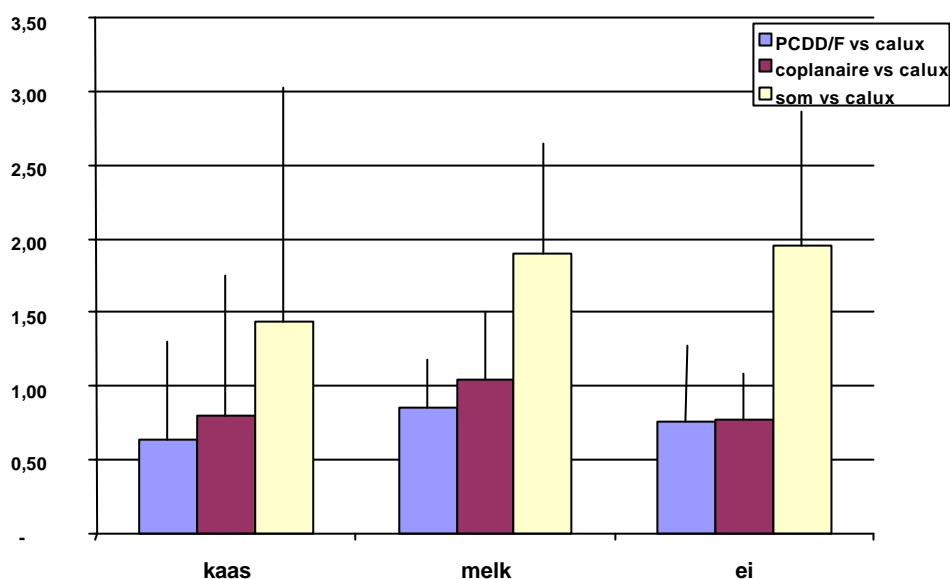
Onderstaande tabellen geven de verhouding aan van de chemisch gemeten TEQ waarden tov de CALUX TEQ. De chemisch gemeten waarden van elk staal (pg TEQ/g vet) wordt gedeeld door de overeenkomstige CALUX TEQ meting (pg TEQ/g vet).

**Tabel 15: Verhouding chemische TEQ vs CALUX TEQ**

<b>TEQ-PCDD/F / TEQ- CALUX</b>						
<b>Staal</b>	<b>avg</b>	<b>stdev</b>	<b>cv %</b>	<b>n</b>	<b>min</b>	<b>max</b>
<b>Kaas</b>	0,64	0,66	104	17	0,15	3,03
<b>Melk</b>	0,85	0,32	38	36	0,24	1,63
<b>Ei</b>	0,76	0,52	68	5	0,35	1,55
<b>TEQ-Coplaire / TEQ- CALUX</b>						
	<b>avg</b>	<b>stdev</b>	<b>cv %</b>	<b>n</b>	<b>min</b>	<b>max</b>
<b>Kaas</b>	0,80	0,95	119	17	0,14	4,30
<b>Melk</b>	1,05	0,46	43	36	0,55	2,19
<b>Ei</b>	0,77	0,32	41	5	0,45	1,2
<b>TEQ-Som / TEQ- CALUX</b>						
	<b>avg</b>	<b>stdev</b>	<b>cv %</b>	<b>n</b>	<b>min</b>	<b>max</b>
<b>Kaas</b>	1,44	1,6	111	17	0,41	7,33
<b>Melk</b>	1,90	0,74	39	36	0,79	3,63
<b>Ei</b>	1,96	0,82	46	5	0,8	2,75
<b>Merker PCB / TEQ CALUX</b>						
	<b>avg</b>	<b>stdev</b>	<b>cv %</b>	<b>n</b>	<b>min</b>	<b>max</b>
<b>Kaas</b>	18536	22 651	122	17	5 120	96 077
<b>Melk</b>						
<b>Ei</b>	13 385	6 535	49	5	6697	22 674

**Figuur 10: Verhouding chemische gegevens (pg TEQ/g vet) vs CALUX**

**gemiddelde + st. deviatie**



Uit bovenstaande gegevens blijkt dat het CALUX signaal een hogere TEQ aangeeft dan bekomen wordt op basis van de chemische TEQ meting van dioxines en furanen. Dit is te begrijpen omdat CALUX de biologische activiteit meet van alle stoffen die in het mengsel aanwezig zijn die kunnen binden met de Ah receptor, dit zijn zowel de dioxines, de furanen als de coplanaire PCBs. Ook andere studies gaven hogere bioassay- TEQ metingen in vergelijking met dioxine/furanen- TEQ bekomen op basis van GC-MS metingen in vliegast, water stalen, visweefsel (Hu et al, 1995, Bovee et al, 1998, Chittim et al, 1994, Till et al, 1997).

Onze gegevens van de melk-, ei- en kaasstalen geven echter ook aan dat de CALUX TEQ lager is dan de som van de TEQ afkomstig van dioxines/furanen en van coplanaire PCBs die berekend wordt op basis van chemische metingen. Mogelijk zijn er congenere of andere stoffen in het mengsel die antagonistisch werken. Sommige experimentele gegevens wijzen in die richting vb. PCB 153 zou bij hogere concentraties antagonistisch zijn voor TCDD (Sanderson et al, 1996). Van glucocorticoiden en van bilirubines werd aangetoond dat ze kunnen interfereren met het signaal (Donato et al, 1990; Devaux et al 1992; Sinal 1997). We weten niet of deze stoffen ook daadwerkelijk in de extracten voorkomen. Ook indol derivaten, die oa. voorkomen in groenten (Chen 1995), heterocyclische amines gevormd tengevolge van thermisch behandeling van vlees

(Degawa 1989) en geoxideerde essentiële aminozuren zoals geoxideerd tryptofaan (Sindhu et al,1996) kunnen Cyp 1A afhankelijke metaboliserende enzymen induceren.

We mogen ook niet vergeten dat de chemische TEQ op een reductionistische manier bekomen wordt door een selectie van de “belangrijkste” congenere te meten. Terwijl de bioassay rechtstreeks de biologische activiteit van het aanwezige mengsel meet en rekening houdt met de interactie tussen alle componenten die in het geëxtraheerde mengsel aanwezig zijn

Anderzijds kunnen we niet met zekerheid uitsluiten dat tijdens de procedure een deel van de gehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen achterblijft. Rendementberekeningen uitgevoerd door vetstalen te spiken met gekende hoeveelheden TCDD gaven variabele resultaten. We schrijven dit in de eerste plaats toe aan de moeilijkheden om op correcte wijze het TCDD opgelost in DMSO of in nonaan in de vetfractie te krijgen.

**Besluit:** Voor melk-, eier- en vleesvetstalen kan de bioassay als een screeningstest ingezet worden.

### *Voordelen van de test*

**Correlatie met de chemische meetgegevens:** deze studie bevat voor de eerst keer resultaten van een grote reeks stalen (90) die parallel werden gemeten met de bioassay en via chemisch analytische weg. De goede correlaties tussen TEQ waarden die werden bekomen voor melk, ei en vleesvetstalen zijn het belangrijkste argument voor het verder aanwenden van de biologische meetmethode voor het opsporen van stalen met verhoogde TEQ waarden. Alle stalen die boven de chemisch opgelegde norm scoorden op basis van de chemische meetresultaten gaven ook verhoogde waarden > 6 pg TEQ/g vet in de CALUX test. Er werd geen enkel vals negatief staal geïdentificeerd.

**Snelheid:** de totale duur van de meetprocedure (exclusief de vetextractie) bedraagt 4 dagen. Voor onze opstelling en werkwijze geldt dat ongeveer een 100 tal stalen kunnen geanalyseerd worden binnen een tijdsspanne van drie weken door één laborant (exclusief de vetextractie).

**Kostprijs:** de snelheid van uitvoering heeft een rechtstreeks gevolg voor de kostprijs van de test

**Gevoeligheid:** uit bovenstaande informatie blijkt dat de detectielimiet en kwantificatielimiet van de biologische test vergelijkbaar zijn met deze van de chemische TEQ metingen.

### *Nadelen van de test*

**Grotere variabiliteit:** alhoewel we op dit moment nog maar alleen beschikken over de intralaboratorium variabiliteit wijzen onze gegevens er toch op dat de variabiliteit van de test groter is dan deze van de chemische TEQ metingen wanneer deze gebeuren in een gecertificeerd laboratorium. Het kweken en gebruiken van de cellijn zelf is waarschijnlijk één van de belangrijkste variabelen, ook het kwantitatief werken met kleine volumes vet (destructie, elutie, uitdampen) introduceert waarschijnlijk bijkomende variabiliteit.

**Minder specifiek:** in principe kan het CALUX systeem reageren met elke component die kan interageren met de Ah receptor. Een positief signaal in de CALUX moet gevolgd worden door een chemische meting, indien we zekerheid willen hebben omtrent de chemische stof die het signaal veroorzaakt. De toegepaste procedures voor vetdestructie en elutie van de gehalogeneerde koolwaterstoffen zijn erop gericht om storende interferenties

te minimaliseren. Er moet tevens zorg voor gedragen worden dat er met zeer zuivere componenten (solventen, extractoren etc.) gewerkt wordt om achtergrond signalen zo laag mogelijk te houden. Naast interferentie met het signaal transductiesysteem kan er ook interferentie ontstaan bij de luciferase reactie. Het verdient aanbeveling om voor een specifieke matrix telkens de correlatie tussen chemische TEQ en CALUX TEQ te bepalen om zodoende de juiste randvoorwaarden voor interpretatie te bepalen.

**Technologie:** voor het uitvoeren van de test is het nodig om over een goed uitgerust laboratorium te beschikken met infrastructuur voor in vitro celkweken en voor het werken met ultratoxische stoffen. Ervaren personeel dient ingezet dat voldoende vertrouwd is met de principes van goede laboratoriumpraktijken.

#### **4.4. Analyse van voedingsstalen van verschillende aard**

##### *4.4.1. Verzameling van de stalen*

Naast de hierboven vermelde melkstalen, eistalen en kazen, werden bijkomend een aantal voedingsstalen geanalyseerd met als doel een beeld te bekomen van de concentraties aan dioxine-achtige stoffen in voedingsstalen die behoren tot ons algemeen dieet. Deze voedingsstalen werden uitsluitend met de bioassay geanalyseerd. De bekomen TEQ waarden zijn dus gebaseerd op de biologische activiteit van de geëxtraheerde vetten uit de stalen.

Volgende voedingsstalen werden bijkomend geanalyseerd: rundvlees, varkensvlees, kip, gemengd gehakt (varken/rund), lam, zalm, roodbaars, haring, makreel, garnalen. Het was niet mogelijk om binnen het tijdsbestek van de studie representatieve stalen te analyseren. Meestal werd er uit 5 verschillende voedingszaken (grootwarenhuizen - verschillende ketens) op twee verschillende tijdstippen producten aangeschaft (periode december 00 - januari 01). De visstalen werden op de markt gekocht, aan verschillende kramen, in de periode december 00 - januari 01. Zoals eerder vermeld werden de eierstalen en kazen aangeleverd door de eetwareninspectie. De melkstalen waren afkomstig van de staalname campagnes die regelmatig door het ministerie van landbouw worden georganiseerd.

##### *4.4.2. Resultaten*

Hieronder worden de resultaten gegeven van de meting van individuele vlees- en visvetstalen, gerangschikt volgens stijgende gehalten. Onderstaande stalen werden alleen gemeten met de CALUX bioassay. De gegevens van melk-, kaas- en eivetstalen werden eerder gerapporteerd in tabellen 9,10,11,12.

**Tabel 16: Resultaten van de vleesvetstalen gemeten met de CALUX**

CALUX (pg TEQ/ g vet)					
	Rund	Kip	Varken	Gehakt	Schaap
	1,62	0,16	1,41	0,91	0,36
	1,71	0,67	1,55	1,02	1,36
	1,75	0,87	1,59	1,08	1,41
	1,96	1,27	1,81	1,18	
	1,97	1,46	1,82	1,26	
	2,04	1,52	1,86	1,27	
		1,69	1,89	1,59	
		2,06	2,01	1,84	
			2,06		
Gemiddelde	1,84	1,21	1,78	1,27	1,04
Mediaan	1,85	1,36	1,82	1,22	1,36
Standaard deviatie	0,17	0,61	0,22	0,31	0,59
Variatie	0,09	0,50	0,12	0,24	0,57

**Tabel 17: Resultaten van de visvetstalen, gemeten met de CALUX**

CALUX (pg TEQ/ g vet)						
	Roodbaars	Haring	Makreel	Pladijs	Zalm	Garnalen
	2,57		1,51		3,60	
	5,50	2,96	1,80		3,85	
	6,83	4,17	1,81	7,93	3,93	
	7,31	12,51	2,24		4,44	
	7,49	19,07	2,28	25,77	4,47	6,01
	13,03	21,85	2,98		4,75	
	17,05	22,78	7,29		4,94	
	38,99		9,13		5,03	
					5,06	
Gemiddelde	12,35	13,89	3,63	16,85	4,45	6,01
Mediaan	7,40	15,79	2,26	16,85	4,47	
Standaard deviatie	11,67	8,78	2,90	12,62	0,55	
Variatie	0,95	0,63	0,80	0,75	0,12	

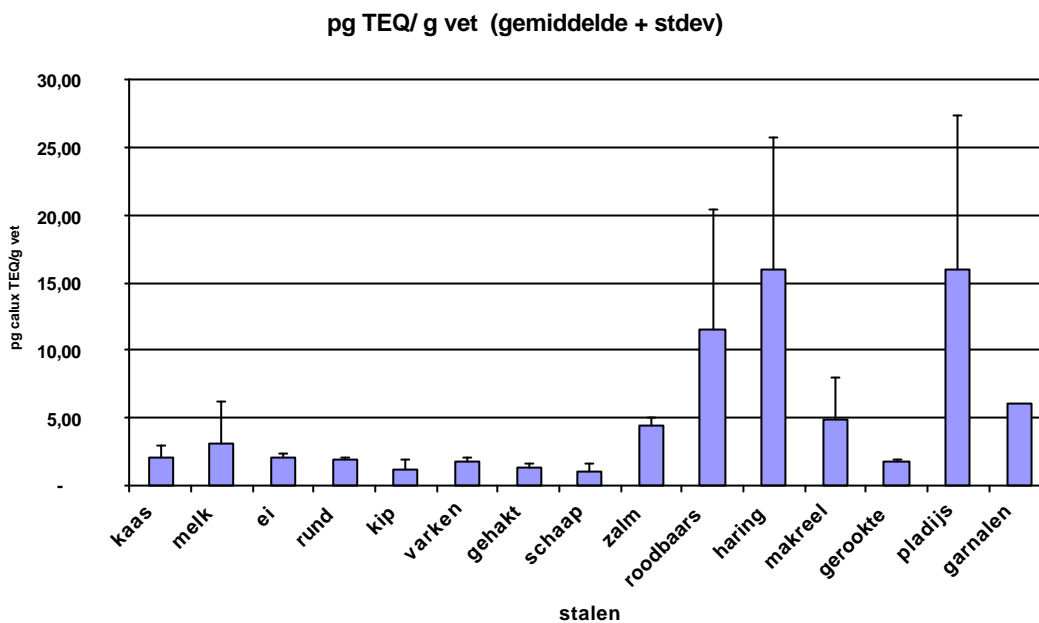
In onderstaand overzicht worden de bekomen waarden van alle gemeten stalen opgenomen. De voorlaatste kolom geeft TEQ waarde per g vers product. Voor de berekening per g vers product werd de TEQ waarde per g vet vermenigvuldigd met het

gemiddelde vetgehalte voor het desbetreffende voedingsstaal zoals kon afgeleid worden van de Nubel tabel (1999).

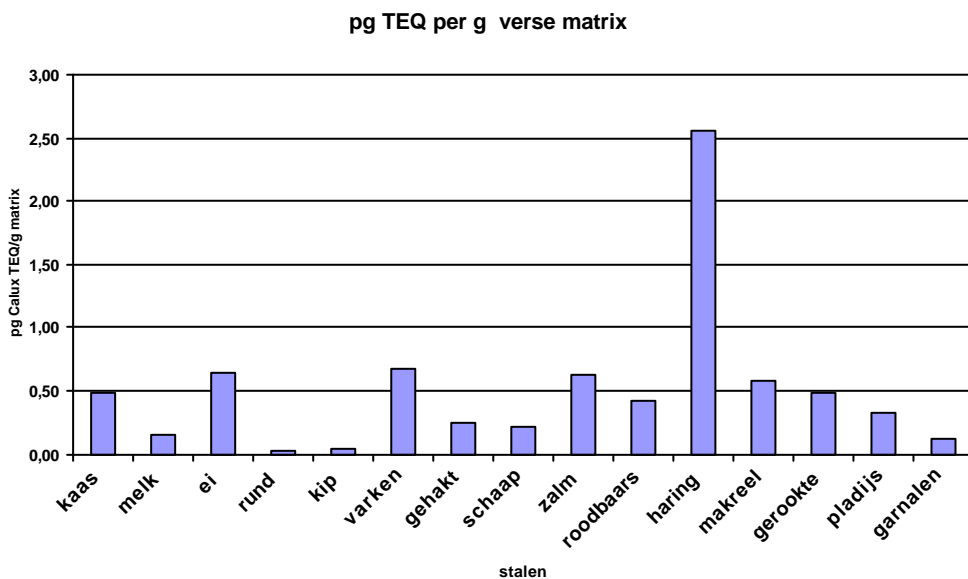
**Tabel 18: Overzicht van al de resultaten gemeten met de CALUX uitgedrukt per g vet en per g vers product**

Staal referentie	CALUX pgTEQ/gvet							pgTEQ/g product	
	avg	stdev	mediaan	cv	n	min	max	CALUX	% vet
<b>Kaas</b>	2,0	1,0	2,0	48,2	17,0	0,4	3,5	0,5	24,0
<b>Melk individueel</b>	4,3	3,8	3,1	87,8	35,0	1,1	20,0	0,2	4,0
<b>Melk gemengd</b>	1,8	0,7	1,7	38,8	27,0	0,7	3,5	0,1	4,0
<b>Ei</b>	2,1	0,6	1,9	27,1	5,0	1,4	2,9	0,7	33,0
<b>Rund</b>	1,8	0,2	1,9	9,3	6,0	1,6	2,0	0,0	1,6
<b>Kip</b>	1,2	0,6	1,4	50,4	8,0	0,2	2,1	0,0	3,0
<b>Varken</b>	1,8	0,2	1,8	12,3	9,0	1,4	2,1	0,7	38,0
<b>Gehakt</b>	1,3	0,3	1,2	24,2	8,0	0,9	1,8	0,3	20,0
<b>Schaap</b>	1,0	0,6	1,4	56,8	3,0	0,4	1,4	0,2	20,0
<b>Zalm</b>	4,5	0,5	4,5	12,3	9,0	3,6	5,1	0,6	14,0
<b>Roodbaars</b>	12,3	11,7	7,4	94,6	8,0	2,6	39,0	0,4	3,6
<b>Haring</b>	13,9	8,8	15,8	63,2	6,0	3,0	22,8	2,2	16,0
<b>Makreel</b>	4,8	3,2	3,0	67,1	5,0	2,2	9,1	0,6	12,0
<b>Gerookte makreel</b>	1,7	0,2	1,8	10,0	3,0	1,5	1,8	0,5	28,0
<b>Pladijs</b>	16,8	12,6	16,8	74,9	2,0	7,9	25,8	0,3	2,0
<b>Garnalen</b>	6,0		6,0		1,0			0,1	2,0

**Figuur 11: Gemiddelde CALUX – TEQ per g vet + St. Dev. voor verschillende voedingswaren**



**Figuur 12: pg TEQ per g vers product**





#### 4.4.3. Bespreking - Vergelijking met buitenlandse gegevens

De vleesstalen die werden getest gaven alle relatief lage waarden aan, die onder de huidige toegelaten norm liggen. Uitzondering vormden de melkstalen, waarvan sommige uit bedrijven afkomstig waren die gelegen waren in de nabijheid van industriële installaties.

Interessante informatie wordt verschaft door de variatiecoëfficiënt van stalen die individueel gemeten werden (dus niet van mengstalen). Deze variatiecoëfficiënt is een maat voor de spreiding van het TEQ gehalte tussen de stalen. Zo blijken de stalen kipvlees een grotere variabiliteit te hebben dan de stalen rundvlees en varkensvlees. De eieren hebben een kleine variatiecoëfficiënt wat logisch is omdat het mengstalen zijn. Zoals eerder vermeld is de spreiding tussen de melkstalen groot wat hoofdzakelijk te wijten is aan de stalen van de individuele hoeves. De spreiding tussen de kaasstalen onderling is ook groot. Dit kan te maken hebben met de verschillende oorsprong van de stalen (geitenkaas, biologische, ambachtelijke kazen etc.) of met specifieke componenten van de kaasmatrix.

Wanneer we de gehalten in de stalen vergelijken met eerder gevonden waarden, dan liggen de mengmelkstalen gemiddeld lager dan eerder gerapporteerd (MIRA-T, 1999), terwijl de hoogste waarde die werd teruggevonden 14,3 pg TEQ / g vet is.

De CALUX-TEQ gehalten van de overige vleesvetstalen, lagen in elk geval beneden deze gerapporteerd in verband met de dioxinecrisis (staalname tussen eind mei en augustus 1999). Onderstaande tabel geeft de TEQ-dioxine-furanen die werd gerapporteerd (Van Larebeke et al, 2001).

**Tabel 19: TEQ-dioxine furanen**

Aard stalen	Aantal stalen	Pg I-TEQ/g vet*
Rund	19	3,9 + 5,2
Melk	63	1,9 + 0,8
Kip	62	170 + 488
Eieren	55	32 + 104
Varken	137	3 + 6

\* Rekenkundig gemiddelde + Stand dev.

Onze resultaten zijn ook vergelijkbaar met de resultaten van de SCOOP studie (2000), waar nationale gemiddelde waarden worden gerapporteerd voor eieren, melk (producten), vlees (producten), vetten en oliën meestal beneden 1 pg I-TEQ per g vet en gaande tot 2-3 pg I-TEQ per g vet.

In de SCOOP studie werden over het algemeen lagere waarden gevonden in I-TEQ per g vet in varkensvet dan in rund, kip of schaaap. Dit werd in onze studie niet bevestigd. We moeten wel opmerken dat wij telkens de totale TEQ meten via de CALUX methode. Beperkte meetresultaten geven aan dat het TEQ gehalte aan dioxine-achtige PCBs gemiddeld één tot 2 maal het dioxine-furanen TEQ gehalte bedraagt (SCOOP).

De resultaten van de visserijstalen, alhoewel beperkt in aantal (34 stalen), kunnen we vergelijken met gegevens van de SCOOP studie en met gegevens van een Nederlandse studie (RIVO rapport, 2000).

Onze waarden liggen tussen 1,5 en 26 pg TEQ/g vet, terwijl in de Nederlandse studie gehalten werden gerapporteerd tussen 3,7 en 565 pg TEQ (tcdd/F + PCBs) / g vet.

Op productbasis (uitgedrukt per g vers gewicht) liggen de gehalten tussen 0,09 pg TEQ/g vis en 7,68 pg TEQ/g vis, in de Nederlandse studie werden gehalten gerapporteerd tussen 0,03 en 37 pg TEQ (TCDD/F en PCBs)/g product. In de SCOOP studie werden gehalten gerapporteerd tussen 0,25 en 10-20 pg I-TEQ/g op product basis.

De grootste variatie werd aangetroffen bij haring, roodbaars, makreel, pladijs terwijl de zalmresultaten een kleinere variatie vertoonden. De oorzaak is niet meteen duidelijk, wel is het mogelijk dat de zalm, als kweekvis, een meer constante voedingsbron (en dus ook contaminatie) heeft tegenover de andere vissen die waarschijnlijk van verschillende locaties komen. Er werd geen navraag gedaan over de oorsprong van de onderzochte vis. Elk exemplaar van een bepaalde soort kwam wel uit een andere handelszaak. De studie was te beperkt om interpreteerbare informatie te bekomen met betrekking tot de relatie tussen de gemeten gehalten en de herkomst van de stalen. Wel lijkt het aangewezen om meer data over gehalten in vissen te verzamelen. Vooral de vetrijke vissen (haring) waarbij de variabiliteit in de TEQ waarde hoog blijkt te zijn zouden verder moeten worden onderzocht.

Het verdient aanbeveling om deze stalen ook chemisch te onderzoeken, zodat nagegaan kan worden welke stoffen aan de oorsprong liggen van de verhoogde TEQ waarden.

Binnen de Europese Commissie wordt momenteel gediscussieerd over een EU norm van 3 pg TEQ (TCDD/F) per g versproduct voor humane consumptie van vis. Deze norm zou gelden voor TEQ-TCDD/F en niet voor de totale TEQ waarde zoals wij die meten in ons testsysteem. Uit meetgegevens van oa. SCOOP en de studie (Quick scan en Full Scan, 2000) van het Nederlands instituut voor visserijonderzoek blijkt dat de relatieve verhouding van TEQ-TCDD/F en TEQ-PCBs erg verschilt tussen verschillende visstalen. Het blijkt niet mogelijk momenteel een duidelijke trend hierin te onderkennen of om op eenvoudige wijze de totale TEQ af te leiden van de dioxine TEQ meting of de meting van merker PCBs. Het verdient dus aanbeveling om ook over gegevens te beschikken die de totale TEQ waarde geven vermits toch wordt aangenomen dat de totale TEQ bepalend is voor de toxiciteit van een staal.

Belangrijk, als men discussieert over de bescherming van volksgezondheid, is dat men beschikt over goed onderbouwde consumptiegegevens. Naarmate een product met een hoge TEQ belasting een belangrijker aandeel inneemt in de voedselkorf, zal zijn bijdrage tot de dagelijkse TEQ inname en de TEQ lichaamsbelasting hoger zijn. In België zijn er geen recente gegevens beschikbaar. In Nederland heeft men sinds 1987 reeds drie voedingsconsumptiestudies (totale dieetstudies uitgevoerd). Ook zijn er gegevens over de belangrijkste visserijproducten die in Nederland geconsumeerd worden (Temminghoff, 1998,1999). Daaruit blijkt dat haring een belangrijk aandeel inneemt van de geconsumeerde visserijproducten. We vermoeden dat dit ook voor België geldt.

Met betrekking tot de dagelijkse inname van PCBs, PCDDs en PCDFs blijkt het bereidingsproces het gehalte aan deze stoffen te kunnen reduceren. Het koken, roken, bakken in de pan en in de oven blijkt het totale PCB gehalte te verminderen (Abik et al.,1995; Salama et al, 1998). Ook het gehalte PCDDs en PCDFs kan tijdens het bereidingsproces verlagen (Scheckter et al, 1998). Waarschijnlijk is dit vooral te wijten aan de afname van het natgewicht en vetgehalte tijdens de bereidingswijze.

## 5. Besluit aan aanbevelingen

### 5.1. Een bioassay voor screening van voedingswaren

Omwille van onzekerheden mbt de specificiteit en omwille van het ontbreken van internationale acceptatie van de test kan op dit moment de meetmethode alleen worden voorgesteld als een screeningsmethode. De test laat toe om producten te identificeren met verhoogde TEQ gehaltes, die bijgevolg verder chemisch moeten worden onderzocht. Omwille van zijn goede correlatie met chemisch gemeten TEQ waarden (60 melkstalen, 5 eistalen), en de mogelijkheid om grote aantallen monsters vrij snel te screenen kan deze test ingezet worden in diverse screeningsprogramma's voor voedselveiligheid. Op groepsniveau, vb. in functie van de aard van het staal, kunnen uitspraken gedaan worden over gemiddelde gehaltes en de spreiding die een gegeven soort staal kenmerkt. Deze informatie is nuttig om voedingswaren te identificeren die prioritair verder worden onderzocht.

### 5.2. Onderbouwing van de normering

#### 5.2.1. Normen voor voedingswaren

In België werden er door het KB van 28 december 1999 bindende normen opgelegd voor zowel PCBs in voedingswaren als voor PCDDs en PCDFs.

#### **Tabel 20 Overzicht van de PAH normen die gelden in België**

##### *PCDDs en PCDFs*

- Melk, rund, kip, dierlijke vetten en oliën, eieren en afgeleide producten met meer dan 2% vet, overschrijden de norm wanneer ze meer dan 5 pg WHO-TEQ (PCDD/PCDF) per g vet bevatten. Ze mogen niet op de markt gebracht worden.
- Varken en afgeleide producten met meer dan 2% vet mogen maximaal 3 pg WHO-TEQ (PCDD/PCDF) bevatten.

##### *PCBs: deze normen gelden voor de som van de merker PCBs (28,52,101,118, 153 en 180)*

- Melk en afgeleide producten met meer dan 2% vet mogen maximaal 100 ng/g vet bevatten
- Rund, varken, kip, dierlijke vetten en oliën, eieren en afgeleide producten met meer dan 2% vet mogen maximaal 200 ng/g vet bevatten.

#### 5.2.2. De CALUX metingen vormen een bijkomend instrument om de normen te bewaken

De CALUX metingen laten toe om op basis van totale TEQ waarden producten te discrimineren, met verhoogde gehaltes. Bovengaan de studie heeft aangetoond dat de TEQ waarde die wij meten niet identiek is aan de bovenvermelde I-TEQ, maar zij biedt een beter gefundeerde bescherming vermits naast de TEQ van dioxines en furanen ook TEQ van dioxine-achtige PCBs worden meegemeten.

Deze methode kan toelaten om snel risicostalen te identificeren die dan vervolgens chemisch verder kunnen gemeten worden als men wenst te weten welke chemische stoffen aan de basis van de TEQ waarde liggen.

Op basis van de resultaten van onze studie moet het duidelijk zijn dat zowel melkstalen als visstalen verhoogde gehalten kunnen bevatten. Een aantal van de melk stalen overschrijdt de toegestane norm. Voor visstalen blijkt er nog geen norm te zijn vastgelegd. Vis draagt relatief gering bij tot de voedselkorf en heeft ook nutritionele voordelen die moeten meegenomen worden bij de risicobeoordeling. Toch valt het op dat de spreiding tussen de stalen erg groot is. Wat aangeeft dat niet alle vis systematisch besmet is met hoge gehalten PAHs. Het verdient aanbeveling om op een meer gedifferentieerde manier hier op in te gaan zodat de risico's voor verhoogde gehalten kunnen in kaart gebracht worden.

### 5.2.3. *Dagelijkse inname*

Het belang van het opleggen van normen is de bescherming van de volksgezondheid. Internationale organisaties (WHO ECEH en ICPS, 1999) stellen dat de limiet voor opname van dioxine-achtige stoffen maximaal 1-4 pg I TEQ/kg lichaamsgewicht zou mogen bedragen met nadruk op de lagere range, als men wil voorkomen dat schadelijke gezondheidseffecten bij de algemene bevolking zouden optreden. Mogelijk is deze norm nog vrij hoog zoals momenteel wordt gesteld door oa. EPA.

Voeding zou voor de algemene bevolking voor meer dan 90 % bijdragen tot de dagelijkse TEQ belasting. Deze gegevens zijn afkomstig van voedselconsumptiestudies die de gemiddelde dieetsamenstelling van de bevolking beschrijven gecombineerd met de gemiddelde TEQ gehalten die gemeten werden in representatieve voedingswaren.

In België zijn geen recente voedselconsumptiegegevens beschikbaar. We hebben een oefening gemaakt waarbij we onze gemeten TEQ gehalten (via CALUX) combineerden met beschikbare buitenlandse consumptiegegevens uit Nederland en Duitsland, met de verwachting dat de Belgische consumptiegegevens vergelijkbaar zijn. Deze beschikbare consumptiegegevens werden gecombineerd met de mediaan gehalten die we in ons project gemeten hebben.

**Tabel 21: dagelijkse inname (g per dag)**

	<b>Duitsland (SCOOP) adulten</b>	<b>Nederland Liem, 1997 adulten</b>	<b>Nederland Pantandin, 1999 3,5 jarigen</b>
	<b>Vetiname gemiddelde</b>	<b>Vetiname mediaan</b>	
varken	6,08	8,9	13*
Rund	4,23	3,1	12*
Kip	2,25	0,9	8*
Gemengd vlees	23	9,3	
Melk	7,7	9,5	533*
Boter	15,6	4,1	1*
Melkproducten	7,3		
Kaas		8,6	15*
Eieren	4,1	1,6	10*
vis	19,9*	0,3	2,3*

\* versgewicht

**Tabel 22: Dagelijkse innames berekend op basis van buitenlandse consumptiegegevens (tabel 20) en op basis van via CALUX gemeten mediaan gehaltenes.**

	<b>Duitsland (SCOOP) adulten</b>	<b>Nederland Liem, 1997 adulten</b>	<b>Nederland Pantandin, 1999 3,5 jarigen</b>
	<b>TEQ-inname gemiddelde</b>	<b>TEQ-inname mediaan</b>	<b>TEQ-inname gemiddelde</b>
varken	10,9	16,0	0,9
Rund	8,0	5,9	0,4
Kip	3,2	1,3	0,3
Gemengd vlees	27,6	11,2	6,2
Melk	13,1	16,2	37,3
Boter	26,5	7,0	1,7
Melkproducten	12,4		0,0
Kaas		17,2	7,5
Eieren	7,8	3,0	6,3
vis	11,9	2,4	18,4
<b>TOTAAL</b>	<b>121,5</b>	<b>80,1</b>	<b>79,0</b>

Onze berekeningen vormen een onderschatting omdat zowel bij de Duitse als bij de Nederlandse gegevens de TEQ inname via voedingswaren van vegetarische oorsprong en via dierlijke vetten afkomstig van andere toegepaste bereidingen dan opgenomen in de tabel (vb. koekjes, deegwaren etc.) niet werden meegerekend. Inname via bodemstof en inhalatie werd in geen enkel scenario meegerekend. Bovenstaande gegevens dienen zeer voorzichtig geïnterpreteerd te worden omwille van het gebruik van 1) buitenlandse

consumptiegegevens en omwille van 2) het beperkt aantal metingen dat we via CALUX uitvoerden, zodat we geen waarden hebben van representatieve voedingswaren.

Wanneer we de bekomen dagelijkse innames uitdrukken per kg lichaamsgewicht (ongeveer 65 kg voor een adult, 12 kg voor een 3,5 jarige) dan liggen de bekomen waarden in de range van wat we verwachten: meer dan 2 pg TEQ per kg per dag bij Duitse eetgewoontes, meer dan 1 pg TEQ per kg per dag bij Nederlandse eetgewoontes. Bij kinderen liggen deze waardes veel hoger omwille van het kleinere lichaamsgewicht.

### ***5.3. Inzetbaar voor een beleid van duurzame ontwikkeling***

#### Bescherming van de volksgezondheid – controle van dagelijkse inname via voeding

- Door snel vele stalen te kunnen screenen kan men een instrument aanbieden om de stalen met hoge waarden te identificeren. Dit is vooral nodig voor voedingswaren met een hoog vetgehalte die een belangrijk deel uitmaken van de voedselkorf.
- Wanneer CALUX TEQ waarden variëren tov merker PCB metingen of chemische TEQ metingen, kan dit te wijten zijn aan de aanwezigheid van andere chemische stoffen. De aard van deze stoffen dient geïdentificeerd om uit te sluiten dat het hier om andere gehalogeneerde persistente stoffen gaat.
- Spreiding van de TEQ waarde tussen stalen bepalen: wanneer de spreiding groot is betekent dit dat er gevaar bestaat dat sommige delen van de populatie blootgesteld worden aan verhoogde gehalten die bij stalen van een andere locatie of oorsprong niet voorkomen. Door verdere systematische controles kunnen eventueel ongekennde besmettingsbronnen worden geïdentificeerd.

#### Identificeren van bronnen, beter bewaken van stofstromen:

Voorals stalen die onderling een grote spreiding vertonen dienen verder onderzocht te worden naar hun aard en herkomst. Dit is een unieke kans om nieuwe nog ongekennde besmettingsbronnen te identificeren. Door de snelheid van de procedure kunnen individuele monsters onderzocht worden ipv mengmonsters, die alleen maar toelaten gemiddelde gehalten te bepalen voor vb gebruik in voedingsconsumptiestudies en analyse van temporale trends.

### ***5.4. Internationale perspectieven***

Er is de duidelijke vraag van nationale en Europese overheden naar meer informatie omtrent de gehalten van contaminanten in de voeding. Voedselveiligheid is één van de belangrijkste eisen die de consument stelt aan de voedingsindustrie. Ook via SCOOP wordt de aanbeveling gedaan om een Europese database samen te stellen die toelaat om temporele trends op te volgen in de verschillende landen. Onze snelle testmethode zou een middel kunnen zijn om snel veel gegevens te verzamelen van individueel gecollecteerde stalen. De totale TEQ waarde wordt gemeten wat een betere bescherming garandeert dan wanneer alleen I-TEQ waarden worden gemeten of merker PCBs.

Een belangrijk nadeel momenteel is dat het testsysteem niet internationaal gevalideerd is en de meetresultaten dus ook niet internationaal kunnen geaccepteerd worden voor vergelijking met andere studies. Een internationale validatie studie is dus de volgende stap die moet gezet worden naar acceptatie van de test wat een expliciete voorwaarde is voor verdere implementatie in de risico beoordeling.

## 6. Referenties

Bernard A., Hermans C., Broeckaert F., De Poorter G., De Cock A., Houins G. Food contamination by PCBs and dioxins. Brief communications. Nature vol. 401

Birnbaum L.S. (1995). Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. V. Immunologic effects. Environ health Perspect 103: 2, 157-160.

Bovee T.F.H., Hoogenboom L.A.P., Hamers A.R.M., Traag W.A., Zuidema T., Aarts J.M., Brouwer A. and Kuiper H.A. (1998). Validation and use of the CALUX-bioassay for the determination of dioxins and PCBs in bovine milk. Food Additives and Contaminants 15:8, 863-875.

Cooke M., Clark G.C., Goeyens L., Bayens W., (2000) Environmental bioanalysis of dioxin. Today's chemist at Work, July, 2000, 34-40.

De Fré R., Wevers M., Mensink C., Viaene P., Nouwen J. Schoeters G. (Vito). Verspreiding van producten van onvolledige verbranding. Milieu- en natuurrapport Vlaanderen thema's MIRA-T 1998.

Denison M.S., Rogers W.J., Fair M. (1996). Application of the CALUX bioassay system for the detection of dioxin-like chemicals (Ah receptor ligands) in whole serum samples and in extracts from commercial products. Organohalogen Compounds 27: 280-284.

Chittim B.G., Bunce N.J., Hu K., Tashiro C.H.M. and Tei B.R. (1994). Comparison of GC-MS with an in vitro bioassay for PCDDs and related compounds in environmental samples. Chemosphere, 29, 9-11, 1783-1788.

Deveaux A., Personen M., Monod G. and Andersson T. (1992). Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes. Biochemical Pharmacology 43: 898-901.

Donato M.T., Gomez-Lechon M.J. and Castell J.V. (1990). Effects of xenobiotics on monooxygenase activities in cultured human hepatocytes. Biochemical Pharmacology, 39: 1321-1326.

El-Fouly M.H., Richter C., Giesy J.P., Denison M.S. (1994). Production of a novel recombinant cell line for use as a bioassay system for detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-like chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 13: 1581-1588.

EU-Directorate General Health and Consumer Protection, (2000). Assessment of dietary intake of dioxins and related PCBs by the population of EU memberstates. Reports on tasks for scientific cooperation, Report SCOOP Task 3.2.5 (Dioxins)

Giesy J.P. and Kannan K. (1998) Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment. Critical Reviews in Toxicology 28 (6): 511-569

Hu K.. and Bunce N.J. (1995). Screening assay for dioxin-like compounds based on competitive binding to the murine hepatic Ah receptor. 2. Application to environmental samples. *Environ. Sci. Technol.* 29:2603-2609.

IARC/WHO (1997). Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 69, ISBN 92-832-1269-X, Lyon, France

Kimbrough R.D. (1995) Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: an update. *Critical Reviews in Toxicology* 25: 2, 133-163.

Kogevinas M., Becher H., Benn T., Bertazzi PA., Boffetta P., Bueno de Mesquita HB., Coggon D., Colin D., Flesch-Janys D., Fingerhut M., Green L., Kauppinen T., Littorin M., Lynge E., Mathews J.D., Neuberger M., Pearce N., Saracci R., (1997). Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins. An expanded and updated international cohort study. *Am. J. Epidemiol.* 1997 Jun. 15, Vol. 145 (12): 1061-1075.

Koninklijk Besluit van 28 december 1999: Belgisch Staatsblad ( 31-12-1999) 50495.

Koopman-Esseboom C., Weisglas-Kuperus N., de Ridder MAJ., e.a. (1996). Effects of PCB/dioxin exposure and feeding type on the infants mental and psychomotor development. *Pediatrics* 97: 700-706.

Leonards P.E.G., Lohman M., de Wit M;M., Booy G., Brandsma S.H., de Boer J. (2000). Actuele situatie van gechloreerde dioxines, furanen en polychloorbifenylen in visserij-producten: Quick- en Full-Scan. RIVO rapport nr. C034/00 September 2000: 1-31.

Liem A.K.D.,Theelen R.M.C. (1997). Dioxins:chemical analysis, exposure and risk assessment. Proefschrift Univ. Utrecht, 22 oktober 1997

Mocarelli P., Gerthoux P.M., Ferrari E., Patterson Jr D.G., Kieszak S.M., Brambilla P., Vincoli N., Signorini S., Tramacere P., Carreri V., Sampson E.J., Turner W.E., Needham L.L. (2000). Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet* 355: 1858-1863.

Nebert D.W, Puga A., Vasilion V., (1993). Role of the Ah receptor and the dioxin inducible (Ah) gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 685: 624-640.

Patandin S., Dagnelie P.C., Mulder P.H.H., Op de Coul E., van der Veen J.E., Weisglas-Kuperus N., and Sauer P.J.J. (1999). Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: a comparison between breast-feeding, toddler, and longterm exposure. *Environ Health Perspect* 107: 45-51.

Safe S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology* 21: 1, 51-88.



Safe S. H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 24(2): 87-149.

Salama A.A., Mohamed M.A.M., Duval B., Potter T.L. and Levin R.E. (1998). Polychlorinated biphenyl concentration in raw and cooked North Atlantic Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) filets. *J. Agric. Food Chem.*, 1359-1362.

Sanderson J.T., Aarts J.M., Brouwer A., Froese K.L. Denison M.S. and Giesy J.P. (1996). Comparison of Ah receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-O-deethylase induction on H411E cells: implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 137: 316-325.

Schechter A., Stratin J., Wright C., Kelly M., Papke O., Lis A., Ball M., Olson JR. (1994). Congener-specific levels of dioxins and dibenzofurans in U.S. food and estimated daily dioxin toxic equivalent intake. *Environ Health Perspect* 102: 962-966.

Schechter A., Dellarco M., Papke O., Olson J. (1998). A comparison of dioxins, furans and coplanar PCBs in uncooked and broiled ground beef, catfish and bacon food. *Chemosphere* 37: 9-12, 1723-1730.

Temminghoff M., (1998). Voedsel Consumptie Peiling 1988-1998. Nederlands Visbureau, Productschap Vis, Rijswijk.

Temminghof M. Vis, schaal- en schelpdieren Nederland. Marktontwikkeling 1995-1998. Presentatie 3 maart 1999, GfK Nederland en Nederlands Visbureau, Rijswijk

Till M., Behnisch P., Hagenmaier H., Bock K.W. and Schrenk D. (1997) Dioxinlike components in incinerator fly ash: a comparison between chemical analysis data and results from a cell culture bioassay. *Environ Health Perspect* 105: 1326-1332.

UK Department of the Environmental Transport and the regions (DETR), Compilation of EU dioxin exposure and health data –summary report , EC DG Environment, October 1999.

US EPA , National Center for Environmental Assessment , Office of Research and Development, Washington DC, Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. June 2000.

Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T.C., Brunström B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C. van Leeuwen R. Liem D., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt DD;, Tysklind M., Younes M., Waern F., and Zacharewski T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 106: 775-792.

Van Larebeke N., Schoeters G., Milieu- en natuurrapport Vlaanderen: scenario's Hoofdstuk 5.1. Gevolgen voor de mens, Vlaamse Milieu Maatschappij - Mira-S 2000

Van Larebeke N., Hens L., Schepens P., Covaci A., Baeyens J., Everaert K., Bernheim J.L., Vlietinck R. and De Poorter G. (2001). The Belgian PCB and dioxin incident of January-June 1999: Exposure data and potential impact on health. *Environment Health Perspect* 109: 01-09.

Van Leeuwen F.X.R. and Younes M.M. (2000). Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI). *Food additives and Contaminants* 17: 223-240.

Van Leeuwen F.X.R. et al. (2000). Dioxins: WHO's Tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere*, 40: 1095-1101.

Weisglas-Kuperus N., Patandin S., Berbers G.U.M., Sas T.C.J., Mulder P.G.H., Sauer P.J.J. and Hooijkaas H. (2000). Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch Preschool children. *Environ Health Perspect*

WHO, Air quality guidelines for Europe, second edition, nr 91, Copenhagen, 2000.

WHO, Assessment of the health risk of dioxins; Re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI). WHO European Centre for Environment and Health (WHO-ECEH) – International Programm on Chemical Safety (IPCS) EHBI 0102001 – September 1999.

World Health Organization, “Assessment of the health risk of dioxins: Re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI)” Genève, Zwitserland rapport EHBI 010201 (1999).

## 7. Trefwoordenlijst

**2,3,7,8 TCDD:** 2,3,7,8 –tetrachlorodibenzo-p-dioxine: het meest giftige dioxine congeneer met chloor atomen op positie 2,3,7 en 8 van het dioxine skelet.

**Congeneer:** isomeer met eenzelfde basis structuur maar met chlooratomen op verschillende plaatsen van deze basisstructuur

**Coplaire PCBs:** non – ortho PCBs en mono-ortho PCBs: PCB congenen die een vlakke ruimtelijke structuur kunnen aannemen. Deze configuratie vergemakkelijkt de binding met de intracellulaire Aryl hydrocarbon receptor

**HRMS:** hoge resolutie massa spectrometrie

**IARC:** Internationaal Agentschap voor kanker onderzoek

**I-TEF:** Internationaal toxische equivalentiefactor = toxische equivalentiefactor voor een mengsel van dioxines en furanen die internationaal geharmoniseerd is volgens het TEF schema, gepubliceerd door NATO/CCMS in 1998.

**Merker PCBs:** PCB congenen (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) die in hoge concentraties voorkomen in omgevingsstalen en die daardoor vrij gemakkelijk routinematig geanalyseerd kunnen worden. Deze PCBs zijn niet de meest toxische , de meting geeft eerder een maat voor de algemene PCB concentratie in het staal en niet zozeer voor de toxiciteit van het mengsel.

**Mono-ortho PCBs:** PCB 105, 118, 156, 157, 167: Deze PCBs hebben één chloor atoom op een ortho positie van het PCB skelet. Zij kunnen nog binden met de Ah receptor en kregen dan ook een TEF waarde toegekend.

**Non-ortho PCBs:** PCB 77, 81, 126, 169: Deze PCBs hebben geen chloor atoom op de ortho positie van het PCB skelet. Daardoor kunnen ze gemakkelijker een vlakke ruimtelijke structuur aannemen, waardoor ze kunnen binden met de Ah receptor. Aan al de non-ortho PCBs werd een TEF waarde toegekend

**PCB:** polygechloreerde bifenyl

**PCB – TEQ:** PCB bijdrage aan de toxische equivalentiefactor van het mengsel

**PCDD:** polygechloreerde dibenzo-p-dioxines

**PCDF:** polygechloreerde dibenzofuranen

**PHAHs:** poly gehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen

**SCOOP:** Scientific Co-operation on Questions relating to Food (Directive 93/5/EEC)

**TEF:** Toxiciteits Equivalentie Factor : factor die de relatieve toxiciteit van een congeneer aangeeft ten opzicht van het meest toxische dioxine.

**TEQ:** Toxiciteitsequivalenten van 2,3,7,8-TCDD . Maat waarin de toxiciteit van een mengsel wordt uitgedrukt relatief tov. 2,3,7,8-TCDD. De toxiciteit wordt berekend door de gemeten concentraties van 17 individuele congenere (dioxines en furanen) en eventueel PCBs te vermenigvuldigen met hun overeenkomstige WHO-TEF waarde (tabel 1).

**TEQ:** toxiciteits equivalenten van 2,3,7,8-TCDD

**WHO:** World Health Organisation

## **8. Verslagen en documenten beschikbaar over de studie**

- Eindwerk Koen Thonissen, (1998) UIA, licentiaat biologie  
Opsporen van stoffen met een dioxine -achtige werking via een in vitro levercelsysteem
- Contractverslag: december 1999 referentie :1999/TOX/072
- Contract verslag: oktober 2000 referentie: 2000/TOX/R/054
- Interlaboratorium vergelijking voor de CALUX op stalen afkomstig van het federaal Ministerie van Landbouw en het Ministerie van Volksgezondheid Referentie: 2000/TOX/R/046
- MP Goyvaerts, D Ooms, G Schoeters, R Van Cleuvenbergen (2001) Dioxin activity in animal fat, TEQ measurements by chemical analyses and by CALUX bioassay, Poster presentation, SETAC 2001, Madrid.