



**WETENSCHAPPELIJK COMITE  
VAN HET FEDERAAL AGENTSCHAP VOOR DE VEILIGHEID  
VAN DE VOEDSELKETEN**

**ADVIES 28-2008**

**Betreft: Vergelijking van de resultaten van analyses op dioxinen (PCDD/F) en dioxineachtige PCB's die werden verkregen met de methoden CALUX en GC-HRMS (dossier Sci Com nr. 2007/30 : eigen initiatief)**

Advies goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 10 oktober 2008.

### **Samenvatting**

Het Wetenschappelijk Comité opende op eigen initiatief een dossier om na te gaan of de resultaten die worden verkregen met de CALUX-methode (Chemical Activated LUciferase gene eXpression), toegepast volgens de in België aangewende gebruiksvoorwaarden, geschikt zijn om gebruikt te worden in kwantitatieve risico-evaluatie.

De biologische CALUX-test is een screeningmethode die het gehalte aan verbindingen met dioxineactiviteit in een monster evalueert. Monsters die na de eerste screening verdacht zijn, ondergaan een bevestigingstest met een kwantitatieve methode (GC-HRMS, Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry).

De analyseresultaten van het controleprogramma 2005, 2006 en 2007 van het FAVV voor zuivelproducten, eieren, vis, dierlijk vet en plantaardige olie die werden verkregen met de CALUX-methode en met de GC-HRMS-methode werden met elkaar vergeleken. Er werden een aantal hypothesen geformuleerd en bestudeerd om de verschillen tussen de resultaten van beide methoden te kunnen verklaren.

Voor de onderzochte levensmiddelenmatrices werd in het algemeen aangetoond dat de biologische CALUX-test tot een overschatting van het resultaat leidt in vergelijking met de GC-HRMS methode, vooral bij lage niveaus van verontreinig. De CALUX-test heeft daarentegen de eigenschappen van een goede screeningmethode (laag percentage vals negatieven). Uit de studie blijkt echter dat de resultaten bekomen met de CALUX-methode, toegepast volgens de in België geldende gebruiksvoorwaarden, niet geschikt zijn om het risico van de blootstelling aan polychloordibenzo-p-dioxinen, polychloordibenzofuranen (PCDD/F) en dioxineachtige polygechloreerde bifenylen (DL PCB's) via de voeding kwantitatief te beoordelen. De blootstelling van de consument aan dioxinen en DL PCB's kan dus niet worden geraamd aan de hand van de gegevens van screeningtests zoals de CALUX-test. Deze methode meet niet specifiek de 17 dioxine- en 12 DL PCB-congeneren.

In het geval grote verschillen tussen de CALUX- en de GC-HRMS-methode worden waargenomen raadt het Wetenschappelijk Comité aan om verdere chemische analyses uit te voeren om de aard te kunnen bepalen van eventuele co-eluerende stoffen met dioxineactiviteit.

## Summary

Advice 28-2008 of the Scientific Committee of the FASFC on the comparison of analyses results of dioxins (PCDD/F) and dioxin-like PCBs obtained by the CALUX and GC-HRMS methods

The Scientific Committee started a self tasking study to assess whether the results obtained by the CALUX method (Chemical Activated LUCiferase gene eXpression), in terms of use of this method in Belgium, are appropriate to be used in quantitative risk assessment.

The CALUX biological test is a screening method that assesses the level of compounds with a dioxin activity present in a sample. Samples that are suspected after the first screening are subjected to a confirmation analysis by a quantitative method (GC-HRMS, Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry).

The analytical results from the FASFC control program 2005, 2006 and 2007 for dairy products, eggs, fish, animal fat and vegetable oil, obtained by the CALUX and the GC-HRMS method, have been compared. Different assumptions were formulated and investigated in order to explain the divergent results between the two methods.

It was shown in general, that for the investigated foods, the biological CALUX-test results in an overestimation in comparison with the GC-HRMS analysis, especially for the low contamination levels. The CALUX test has on the other hand the characteristics of a good screening method (low percentage of false negatives). However, this study indicates that the results provided by the CALUX method under the Belgian conditions of use of the method are not appropriate to be used in a quantitative risk assessment of dietary exposure to polychloro-dibenzo-p-dioxines, polychloro-dibenzofuranes (PCDD/F) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL PCB). The exposure of the consumer to dioxins and DL PCB's can not be estimated with the data of a screening method such as the CALUX method. This method does not measure specifically the 17 dioxins and 12 DL PCB congeners.

In addition, the Scientific Committee recommends, when a significant difference is detected between results obtained by the CALUX and the GC-HRMS method, to carry out further chemical analyses in order to identify the nature of any co-eluting substance with a dioxin activity.

## Sleutelwoorden

Dioxinen, dioxineachtige PCB's, CALUX, GC-HRMS, levensmiddelen

## 1. Referentietermen

### 1.1. Doelstelling

Het doel van dit eigen initiatief dossier bestaat erin na te gaan of de resultaten die worden verkregen met de CALUX-methode toegepast, volgens de in België geldende gebruiksvoorwaarden, geschikt zijn om gebruikt te worden in een kwantitatieve risico-evaluatie.

### 1.2. Wettelijke context

VERORDENING (EG) nr. 1881/2006 van de Commissie van 19 december 2006 tot vaststelling van de maximumgehalten aan bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen.

VERORDENING (EG) nr. 1883/2006 van de Commissie van 19 december 2006 tot vaststelling van bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële controle op het gehalte aan dioxinen en dioxineachtige PCB's in bepaalde levensmiddelen.

RICHTLIJN 2002/70/EG van de Commissie van 26 juli 2002 tot vaststelling van voorschriften voor de gehaltebepaling van dioxinen en dioxineachtige PCB's in diervoeders.

AANBEVELING VAN DE COMMISSIE (2006/88/EG) van 6 februari 2006 inzake de reductie van de aanwezigheid van dioxinen, furanen en PCB's in diervoeders en levensmiddelen

MINISTERIEEL BESLUIT van 16 JANUARI 2006 tot vaststelling van de criteria voor analysemethoden voor de officiële controle op de maximumgehalten aan lood, cadmium, kwik, 3-MCPD, dioxines en voor de gehaltebepaling van dioxineachtige PCB's in voedingsmiddelen.

MINISTERIEEL BESLUIT van 26 JANUARI 2006 tot vaststelling van de wijze van monstervoorbereiding en de criteria voor analysemethoden voor de gehaltebepaling van dioxinen en dioxineachtige PCB's in diervoeders.

Overwegende de besprekingen tijdens de werkgroepvergaderingen van 10 december 2007, 19 februari 2008, 21 maart 2008, 23 april 2008, 4 juli 2008 en 26 september 2008, en de plenaire zitting van 10 oktober 2008.

**geeft het Wetenschappelijk Comité het volgende advies :**

## 2. Inleiding

Polychloordibenzo-p-dioxinen (PCDD) en polychloordibenzofuranen (PCDF) die gezamenlijk «dioxinen» worden genoemd, zijn twee families van gehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen. Deze verbindingen zijn wijd verspreid en kunnen door hun lipofiele eigenschappen gemakkelijk in de voedselketen accumuleren (Van Wouwe *et al.*, 2004). Zeventien van de 210 congenere die tot de groep van de PCDD en de PCDF behoren, staan bekend als toxisch en dragen bij aan het toxiciteitsequivalent (TEQ).

Er bestaan 209 congenere van gepolychloreerde bifenylen (polychlorinated biphenyls, PCB) waarvan er 12 toxicologische eigenschappen hebben die lijken op die van dioxinen (EFSA, 2005). Deze verbindingen worden aangeduid met de term «dioxineachtige PCB's» (dioxin-like PCB, DL-PCB of PCB DL).

### 3. Beschrijving van de CALUX-methode

Er bestaan verschillende methoden om de gehalten aan dioxinen en dioxineachtige PCB's te bepalen (Scippo *et al.*, 2008). Men onderscheidt de zogenaamde 'referentiemethode' van de alternatieve of opsporingsmethoden. Gaschromatografie (GC) in combinatie met hoge resolutie massaspectrometrie (HRMS) geldt als referentiemethode voor het identificeren en kwantificeren van PCDD/F en DL PCB in complexe matrices. De toepassing van deze methode en van toxische equivalentiefactoren (TEF) wordt beschouwd als de best bruikbare methode om de hoeveelheid toxische equivalenten van verbindingen met dioxineactiviteit te bepalen. Bij de opsporingsmethoden maakt men een onderscheid tussen biologische tests en fysisch-chemische methoden.

Om de hoeveelheid toxische equivalenten van dioxinen te ramen worden eveneens biotechnologische methoden toegepast. Deze raming wordt uitgevoerd aan de hand van een biologische respons zoals de enzymactiviteit, de expressie van reportergenen, de binding tussen ligand en receptor of de antigeen-antistofbinding. Dergelijke biokatalytische detectiemethoden zoals de CALUX-test (Chemically activated luciferase gene expression), de immunochemische Aryl hydrocarbon (Ah) test, EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase) en *enzyme immuno assays* werden voorgesteld om deze verbindingen op te sporen in diverse matrices zoals levensmiddelen, sedimenten, bodem en as (JECFA, 2002).

De meest gebruikte biologische test is de CALUX-test. Deze test geeft een globale toxicologische respons die is uitgedrukt in toxiciteitsequivalent (TEQ). Om verwarring met de in het geval van fysisch-chemische analyses (GC-MS) berekende TEQ's te vermijden, gebruiken sommige auteurs de term BEQ (Bioanalytical Equivalents) (Denison *et al.*, 2007). De fysisch-chemische methoden die een alternatief zijn voor HRMS zijn lage resolutie tandemmassaspectrometrie (MS/MS) en de combinatie van zgn. exhaustieve tweedimensionele chromatografie (GCxGC) en *Time Of Flight Mass Spectrometry* (TOFMS). Deze methoden worden weinig gebruikt in levensmiddelenmatrices (Eppe *et al.*, 2006).

Met de biologische Ah-CALUX-test (Aryl hydrocarbon –"Chemically activated luciferase gene expression") kan de activeringsgraad van de Ah-receptor worden gemeten. Deze CALUX-test steunt op een levercellijn van muizen waarbij in het genoom het luciferasegen van een lichtkever (reportergen) werd ingebracht onder controle van een promotoregio met een element dat reageert op dioxinen (DRE). Een andere test, DR-CALUX®, werkt volgens hetzelfde principe maar gebruikt een andere cellijn (cellijn van ratten). Blootstelling van deze cellen aan dioxineachtige verbindingen leidt tot synthese en vervolgens tot het activeren van de transcriptie van het reportergen van een eiwit, nl. het enzym luciferase, dat in aanwezigheid van zijn substraten (ATP en luciferine) een emissie van licht katalyseert door chemiluminiscentie. De voortgebrachte hoeveelheid licht is evenredig met de mate waarin het complex ligand-Ah receptor gebonden is op het DRE en dus met het toxiciteitsequivalent (TEQ) van de in de omgeving aanwezige dioxinen, en dat binnen een bepaald concentratiebereik. De respons (hoeveelheid licht) die wordt vastgesteld voor een onbekend monster, wordt vergeleken met de respons die werd verkregen voor bekende TCDD-concentraties. 2,3,7,8-TCDD is de referentieverbinding (kalibratiecurve). Deze test is nuttig om een eerste screening van de monsters te doen waarbij het aanwezige TEQ-niveau meteen wordt geraamd. Alleen de monsters die na die eerste screening verdacht zijn, ondergaan een veel duurdere fysisch-chemische bevestigingsanalyse.

Een aantal stoffen die in de omgeving en in het organisme aanwezig zijn kunnen zich gedragen als agonisten (PAK, polybroomverbindingen, sommige polyfenolen) of als antagonist (PCB-OH, andere polyfenolen) van de Ah-receptor. Wanneer, één van deze verbindingen eveneens wordt geëxtraheerd tijdens de extractie-opzuiveringsfase van het monster, kan bijgevolg het resultaat van de CALUX-analyse groter (als er meer agonisten zijn) of kleiner (bij aanwezigheid van antagonist) zijn dan een resultaat dat men verkrijgt met de bevestigende GC-HRMS methode. Deze laatste methode meet immers enkel de 29 in de wetgeving vastgelegde specifieke verbindingen (7 dioxinen, 10 furanen en 12 DLPCB's, Verordening 1881/2006/EG).

Bovendien wordt de biologische significantie van de CALUX-bepalingen beperkt door het feit dat de testrespons het verzadigingspunt bereikt wanneer een hoge concentratie dioxineachtige verbindingen aanwezig is. De CALUX-resultaten van monsters met een hoge concentratie dienen dus niet als kwantitatief beschouwd te worden, maar als een indicatie voor een hoge concentratie.

De CALUX-resultaten kunnen dus niet worden vergeleken met die van de referentiemethode. De CALUX-test kan alleen worden gebruikt als opsporingstest (screening) om snel na te gaan of een groot aantal monsters al dan niet verontreinigd zijn. Als het resultaat van de CALUX-test aangeeft dat het monster de toegestane maximumconcentratie vermoedelijk overschrijdt, moet dit steeds worden bevestigd door middel van een GC-HRMS analyse (Verordening 1883/2006/EG en Richtlijn 2002/70/EG).

Een screeningmethode maakt het per definitie niet mogelijk om de verbindingen die verantwoordelijk zijn voor de eventueel vastgestelde respons, te identificeren of precies te kwantificeren. Een abnormaal hoge respons (in vergelijking met een aan de biologische methode eigen beslissingsdrempel) leidt ertoe dat het monster als vermoedelijk niet-conform wordt verklaard.

Alleen de bevestigingsmethode zal het mogelijk maken om de aanwezigheid van de in de wet beoogde groep van 29 congenen te identificeren en te bepalen.

De wetgeving voorziet twee strategieën voor screening aan de hand van een bioassay:

- de kwantitatieve methode die het resultaat van een onbekend monster vergelijkt met de referentiewaarden van een kalibratiecurve die met 2,3,7,8-TCDD werd uitgezet. Het resultaat is dus kwantitatief (wordt in België toegepast).
- de kwalitatieve methode die het resultaat van een onbekend monster vergelijkt met het resultaat van een referentiecontrolemonster dat verontreinigd is tot de toegestane maximumlimiet. Het resultaat is dan «conform» of «verdacht» (wordt in Nederland toegepast).

In beide gevallen moet een beslissingsgrens worden vastgesteld om een monster als verdacht te kunnen aanduiden.

Daarnaast bestaan er nog verschillende mogelijkheden op het vlak van de opzuivering van de monsters.

In sommige gevallen wordt enkel een zure silicakolom gebruikt waarmee de 29 congenen samen worden opgezuiverd (PCDD/PCDF en DL PCB's) en waarbij slechts één fractie wordt onderzocht. In andere gevallen wordt een verder doorgedreven opzuivering met een zure silicakolom en een actieve koolkolom uitgevoerd. In dit geval worden twee fracties verkregen: een fractie PCDD+PCDF en een fractie DL PCB's.

De in dit advies vermelde CALUX-resultaten werden verkregen met een muizencellijn, met gebruik van de kwantitatieve methode en met fractionering van de dioxinen-furanen en de DL PCB's.

De biologische tests leveren informatie over de toxicologische effecten en zijn potentieel efficiënter en goedkoper om de risico's te beoordelen dan de chemische methoden (Huie *et al.*, 2007).

De bepaling van de toxiciteitsequivalenten van dioxinen steunt op de veronderstelling dat alle verbindingen met dioxineactiviteit werken door middel van signaaltransductie via de Ah-receptor. Er werd aangetoond dat de kracht van de binding van de congenen aan de Ah-receptor recht evenredig is met de toxiciteit (Huie *et al.*, 2007).

De resultaten van de biologische tests komen echter niet meteen tegemoet aan de wetgeving die maximumgrenzen vastlegt voor de toxiciteitsequivalenten van de 29 moleculen, waarbij geen rekening wordt gehouden met andere potentiële dioxineachtige verontreinigingen, zoals bv. polybroomverbindingen.

#### 4. Vergelijking van de CALUX en GC-HRMS analyseresultaten

Het Wetenschappelijk Comité vergeleek de analyseresultaten van de CALUX screening methode met de analyseresultaten van de GC-HRMS methode voor dioxinen, DL PCB's en de som van dioxinen en DL PCB's voor de volgende matrices: zuivelproducten, eieren, vis, dierlijk vet en plantaardige olie. De matrix «zuivelproducten» omvat koemelk, geitenmelk, paardenmelk, boter, kaas en yoghurt. De matrix «dierlijk vet» omvat vet en vlees van runderen, kalveren, varkens, gevogelte, schapen en paarden. De vergelijking werd gemaakt op basis van de gegevens uit het controleprogramma van het FAVV voor 2005, 2006 en 2007.

De GC-HRMS methode geeft een resultaat voor elk congeneer. De, in toxiciteitsequivalenten (TEQ) uitgedrukte concentratie, wordt berekend door voor alle congenen met dioxineactiviteit de producten van de concentratie van het congeneer (gemeten met GC-HRMS) en de overeenstemmende toxische equivalentiefactor (TEF) bij elkaar op te tellen.

Voor niet-gedetecteerde congenen kan bij de berekening van de TEQ waarde de concentratie gelijkgesteld worden aan 0 (lower bound), de helft van de kwantificeerbaarheidsgrens (LOQ)<sup>1</sup> (middle bound) of de waarde van de LOQ (upper bound). Voor de statistische analyses uitgevoerd in het kader van dit advies werd de middle bound benadering gehanteerd.

De resultaten van de CALUX analyse, die groter zijn dan de actielimiet (namelijk boven 70% van de maximale limiet), moeten worden bevestigd bij middel van een kwantitatieve GC-HRMS methode. Er wordt opgemerkt dat de meeste resultaten van de GC-HRMS een bevestiging zijn van de resultaten van de CALUX analyse. Bijgevolg worden relatief veel monsters in de gebruikte databank gekenmerkt door vrij hoge dioxinegehalten. Het aantal monsters, het percentage monsters onder de actielimiet, het percentage monsters dat de maximumgrens overschrijdt, en het percentage vals positieve en vals negatieve resultaten zijn weergegeven in tabel 1 voor dioxinen en furanen (PCDD/F) en in tabel 2 voor de som van dioxinen en dioxineachtige PCB's (PCDD/F + PCB DL). In tabel 1 worden immers, met uitzondering van vis, weinig monsters met een gehalte lager dan de actielimiet waargenomen. De tabellen 1 en 2 tonen eveneens aan dat het aantal vals negatieve resultaten laag is en het aantal vals positieve resultaten relatief hoog is. Het feit dat het aantal vals negatieven laag is toont aan dat men vertrouwen in de methode kan schenken. Anderzijds is het hoog aantal vals positieven geen probleem, aangezien er nog een bevestiging met GC-HRMS wordt uitgevoerd. De CALUX methode voldoet bijgevolg aan de voorwaarden van een screeningsmethode.

Tabel 1: Karakteristieken van de monsters die voor de parameter **dioxine (PCDD/F)** werden geanalyseerd volgens de GC-HRMS en de CALUX methode

	<b>Dairy product</b>	<b>Egg</b>	<b>Fish</b>	<b>Animal fat</b>	<b>Vegetable oil</b>
Number of samples	53	25	28	127	38
% < Action level	32	48	86	34	37
% > Maximal level	3	0	4	13*	0
% false positive	28	28	7	39	45
% false negative	2	0	0	0	0

\* Maximal level for mixtures of animal fats

<sup>1</sup> Kwantificeerbaarheidsgrens (LOQ), de kleinste gemeten hoeveelheid van een analyt waarbij een analyt met een bepaalde zekerheids- en nauwkeurigheidsgraad kan worden gekwantificeerd.

De matrix «dierlijk vet» bestaat uit vet en vlees van runderen, kalveren, varkens, gevogelte, schapen en paarden. Omdat de maximumlimiet verschillend is voor de levensmiddelen die tot deze matrix behoren, werd de maximumlimiet van een mengsel van dierlijk vet beschouwd.

Tabel 2: Karakteristieken van de monsters die voor de parameter **dioxine (PCDD/F)+ PCB DL** werden geanalyseerd volgens de GC-HRMS en de CALUX methode

	Dairy product	Egg	Fish	Animal fat	Vegetable oil
Number of samples	45	22	21	96	27
% < reporting level <sup>1</sup>	7	36	62	23	15
% > Maximal level	29	0	14	26*	0
% false positive	16	0	5	28	56
% false negative	2	0	0	0	0

\* Maximal level for mixtures of animal fats

<sup>1</sup> The reporting level is comparable with the quantification limit, but it is higher.

De gemiddelde en mediane concentraties aan dioxinen gemeten via de CALUX methode zijn in het algemeen hoger dan deze die gemeten werden met de GC-HRMS methode (tabel 3). De resultaten van monsters geanalyseerd met beide methoden werden statistisch vergeleken met de "Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test" (Wilcoxon signed rank test voor gepaarde waarnemingen). Voor deze niet-parametrische test zijn de resultaten betrouwbaarder bij een groter aantal monsters. De statistische vergelijking toont aan dat de resultaten van beide methoden significant verschillend zijn ( $p < 0,05$ ) met uitzondering van de som van dioxines en PCB DL in vis (tabel 4). Maar voor beide matrices is het aantal stalen eerder laag.

Tabel 3: De gemiddelde en mediane concentraties van dioxinen en de som van dioxinen en DL PCB (pg TEQ/g fat) gemeten via CALUX en GC-HRMS voor verschillende levensmiddelenmatrices (gegevens van het controleprogramma van het FAVV 2005, 2006 en 2007)

	Dioxins		Dioxins + DL PCB	
	CALUX <sup>1</sup>	GC-HRMS <sup>2</sup>	CALUX <sup>3</sup>	GC-HRMS <sup>4</sup>
	Mean (median)	Mean (median)	Mean (median)	Mean (median)
<b>Dairy product</b>	3,41 (2,79)	1,43 (0,98)	31,36 (4,84)	31,58 (3,18)
<b>Egg</b>	1,97 (2,10)	0,95 (0,63)	3,62 (4,15)	1,54 (0,83)
<b>Fish<sup>5</sup></b>	1,69 (0,50)	0,59 (0,36)	4,19 (1,52)	2,87 (0,76)
<b>Animal fat</b>	2,30 (2,04)	0,95 (0,51)	3,79 (3,35)	2,62 (1,28)
<b>Vegetable oil</b>	0,77 (0,57)	0,17 (0,13)	1,84 (1,93)	0,31 (0,26)

<sup>1</sup> PCDD/PCDF measured with bio-assay (TEQ values)

<sup>2</sup> PCDD/PCDF measured with GC-HRMS (TEQ values)

<sup>3</sup> PCDD/PCDF measured with bio-assay (TEQ values) + dioxin-like PCB's measured with bio-assay (TEQ value)

<sup>4</sup> PCDD/PCDF measured with GC-HRMS + dioxin-like PCB's measured with GC-HRMS

<sup>5</sup> Values expressed in pg TEQ/g fish

Tabel 4: Statistische vergelijking van de met CALUX- en GC-HRMS-methode verkregen resultaten voor dioxinen en de som van dioxinen en DL PCB's (gegevens uit het controleprogramma van het FAVV 2005 en 2007)

	p value dioxins analyse	p value dioxins + DL PCB analyse
<b>Dairy product</b>	<0,01	<0,01
<b>Egg</b>	<0,01	<0,01
<b>Fish</b>	<0,01	0,08
<b>Animal fat</b>	<0,01	<0,01
<b>Vegetable oil</b>	<0,01	<0,01

The comparison does not take the measurement uncertainty into account.

## 5. Onderzoek van de hypothesen met betrekking tot de verschillende resultaten van de CALUX- en de GC-HRMS-methode

Om de verschillen tussen de resultaten verkregen met beide methoden te verklaren worden verschillende hypothesen naar voor geschoven. Een eerste hypothese zou zijn dat men *in vitro* geen toxische equivalentiefactoren (TEF) maar relatieve potentiewaarden (relative potency, REP) dient te gebruiken.

De REP-waarden zijn toxische equivalentiefactoren van congeneren gemeten in de biologische CALUX-test. Ze geven de mogelijkheden van de specifieke congeneren weer om de Ah-receptor te activeren, in vergelijking met de mogelijkheid van 2,3,7,8-TCDD.

Voor de biologische analyse mogen de REP-waarden worden beschouwd als gelijkwaardig met de TEF-waarden. In tegenstelling tot de TEF, die zijn afgeleid van een meta-analyse van toxiciteitsstudies die zowel *in vitro* als *in vivo* werden uitgevoerd (Van den Berg *et al.*, 1998, 2006), worden de REP-waarden met de CALUX-test zelf berekend door de EC50 (medium effective concentration) van de dosis-responscurve van 2,3,7,8 TCDD te delen door de EC50 van de curve van de onderzochte verbinding. De REP-waarden zijn specifiek voor de cellijn en verschillen lichtjes van de TEF-waarden (Van Wouwe *et al.*, 2004, Scippo *et al.*, 2004).

Wanneer de met GC-HRMS gemeten concentraties van elke congener vermenigvuldigd worden met de overeenstemmende REP-waarde wordt de verwachte CALUX-TEQ waarde bekomen. De WHO1998-TEQ waarde wordt verkregen door de met GC-HRMS gemeten concentraties van elke congener te vermenigvuldigen met de overeenstemmende TEF-waarde. Aangezien Van Wouwe *et al.* (2004) heeft aangetoond dat de experimentele CALUX-TEQ beter overeenstemt met de verwachte CALUX-TEQ dan met de WHO-TEQ in menselijke bloed, werden de verwachte CALUX-TEQ waarden vergeleken met de WHO-TEQ- en de experimentele CALUX-waarden.

Een andere hypothese betreft het feit dat de CALUX-methode iets anders kan meten dan de GC-HRMS-methode en zo enigszins discordante of zelfs totaal verschillende resultaten (outliers) kan opleveren.

Beide hypothesen werden onderzocht zoals hierna beschreven.

### 5.1 Statistische vergelijking van de gemiddelden van de met de CALUX- en de GC-HRMS-methode verkregen resultaten (verwachte CALUX, experimentele CALUX, WHO 1998-TEQ)

Het Wetenschappelijk Comité vergeleek de WHO 1998-TEQ concentraties, de experimentele CALUX-TEQ concentraties en de verwachte CALUX-TEQ concentraties met elkaar voor



dioxinen (tabel 5), dioxineachtige PCB's (tabel 6) en de som van dioxinen en dioxineachtige PCB's (tabel 7) in verschillende matrices van levensmiddelen die in 2005, 2006 en 2007 werden onderzocht in het kader van het controleprogramma van het FAVV. De gebruikte REP-waarden zijn deze van de muizencellijn.

De statistische vergelijking werd gemaakt met behulp van de "Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test" (Wilcoxon signed rank test voor gepaarde waarnemingen).

De statistische vergelijking laat voor de meeste matrices een significant verschil zien tussen de CALUX-methode en de GC-HRMS-methode (tabel 4). Voor dioxinen (tabel 5) liggen de verwachte CALUX-TEQ waarden echter veel dicht bij de WHO-TEQ waarden dan de experimentele CALUX-TEQ waarden. De statistische vergelijking (tabel 8) toont echter aan dat een significant verschil ( $p < 0,05$ ) tussen de verwachte CALUX waarden en GC-HRMS waarden blijft.

Voor dioxinen is het gemiddelde (of mediaan) van de verwachte CALUX-TEQ concentraties dikwijls iets groter dan het gemiddelde (of mediaan) van de WHO-TEQ concentraties, wat kan worden verklaard door het feit dat de REP-waarden voor dioxinen meestal groter zijn dan de WHO-TEF waarden (bijlage 1). Carbonnelle *et al.* (2004) hebben dezelfde trend vastgesteld.

De verschillen tussen het gemiddelde (of mediaan) van de verwachte CALUX-TEQ concentraties en het gemiddelde (of mediaan) van de WHO-TEQ concentraties zijn voor de DL PCB's groter dan voor de dioxinen. Uit tabel 6 blijkt dat de verwachte CALUX-TEQ concentraties kleiner zijn dan de WHO-TEQ concentraties, wat te wijten is aan het feit dat een aantal REP-waarden voor de DL PCB's kleiner zijn dan de WHO-TEF waarden (bijlage 1). De experimentele CALUX-TEQ concentraties zijn systematisch groter dan de verwachte CALUX-TEQ concentraties. Carbonnelle *et al.* (2004) stelden vast dat de experimentele CALUX concentraties en de verwachte CALUX concentraties significant kleiner zijn dan de WHO-TEQ concentraties, wat wijst op een onderschatting van de CALUX respons in vergelijking met de resultaten van de chemische analyse. De statistische vergelijking (tabel 8) toont een significant verschil ( $p < 0,05$ ) tussen verwachte CALUX waarden en experimentele waarden voor dioxinen, DL PCB en de som dioxinen en DL PCB. De statistische vergelijking tussen verwachte CALUX waarden en GC-HRMS toont ook een significant verschil voor DL PCB.

Tabel 5: Gemiddelde en mediaan voor dioxinen (TEQ) verkregen met de CALUX- en de GC-HRMS methoden (gegevens van het controleprogramma van het FAVV 2005, 2006 en 2007)

	Mean (median) of expected CALUX-TEQ <sup>1</sup>	Mean (median) of experimental CALUX-TEQ <sup>2</sup>	Mean (median) of WHO 1998-TEQ <sup>3</sup>
<b>Dairy product</b>	1,60 (1,09)	3,41 (2,79)	1,43 (0,98)
<b>Egg</b>	1,11 (0,69)	1,97 (2,10)	0,95 (0,63)
<b>Fish</b>	0,61 (0,35)	1,69 (0,50)	0,59 (0,36)
<b>Animal fat</b>	1,04 (0,55)	2,30 (2,04)	0,95 (0,51)
<b>Vegetable oil</b>	0,21 (0,16)	0,77 (0,57)	0,17 (0,13)

<sup>1</sup> Expected CALUX TEQ (pg/g fat or pg/g fish) =  $\sum \text{conc}_i \times \text{REP}_i$

<sup>2</sup> Experimental CALUX TEQ (bio-assay TEQ-value) (pg/g fat or pg/g fish)

<sup>3</sup> WHO-TEQ (pg/g fat or pg/g fish) =  $\sum \text{conc}_i \times \text{TEF}_i$

Tabel 6: Gemiddelde en mediaan voor DL PCB's (TEQ) verkregen met de CALUX- en de GC-HRMS-methoden (gegevens van het controleprogramma van het FAVV 2005, 2006 en 2007)

	Mean (median) of expected CALUX-TEQ <sup>1</sup>	Mean (median) of experimental CALUX-TEQ <sup>2</sup>	Mean (median) of WHO 1998-TEQ <sup>3</sup>
<b>Dairy product</b>	8,55 (0,74)	28,08 (1,98)	30,14 (1,71)
<b>Egg</b>	0,24 (0,19)	1,58 (1,50)	0,58 (0,38)
<b>Fish</b>	0,61 (0,16)	2,34 (1,00)	2,19 (0,38)
<b>Animal fat</b>	0,61 (0,24)	1,57 (1,24)	1,67 (0,64)
<b>Vegetable oil</b>	0,07 (0,07)	1,03 (0,63)	0,12 (0,09)

<sup>1</sup> Expected CALUX TEQ (pg/g fat or pg/g fish) =  $\sum \text{conc}_i \times \text{REP}_i$

<sup>2</sup> Experimental CALUX TEQ (bio-assay TEQ-value) (pg/g fat or pg/g fish)

<sup>3</sup> WHO-TEQ (pg/g fat or pg/g fish) =  $\sum \text{conc}_i \times \text{TEF}_i$

Tabel 7: Gemiddelde en mediaan voor dioxinen en DL PCB's (TEQ) verkregen met de CALUX- en de GC-HRMS-methoden (gegevens van het controleprogramma van het FAVV 2005, 2006 en 2007)

	Mean (median) of expected CALUX-TEQ <sup>1</sup>	Mean (median) of experimental CALUX-TEQ <sup>2</sup>	Mean (median) of WHO 1998-TEQ <sup>3</sup>
<b>Dairy product</b>	10,18 (2,01)	31,36 (4,84)	31,58 (3,18)
<b>Egg</b>	1,36 (0,82)	3,62 (4,15)	1,54 (0,83)
<b>Fish</b>	1,31 (0,47)	4,19 (1,52)	2,87 (0,76)
<b>Animal fat</b>	1,66 (1,00)	3,79 (3,35)	2,62 (1,28)
<b>Vegetable oil</b>	0,29 (0,25)	1,84 (1,93)	0,31 (0,26)

<sup>1</sup> Expected CALUX TEQ (pg/g fat or pg/g fish) =  $\sum \text{conc}_i \times \text{REP}_i$

<sup>2</sup> Experimental CALUX TEQ (bio-assay TEQ-value) (pg/g fat or pg/g fish)

<sup>3</sup> WHO-TEQ (pg/g fat or pg/g fish) =  $\sum \text{conc}_i \times \text{TEF}_i$

Tabel 8: Statistische vergelijking van de resultaten voor dioxinen, DL PCB's en de som dioxinen en DL PCB's verkregen met de CALUX- en de GC-HRMS-methode (gegevens van het controleprogramma van het FAVV 2005, 2006 en 2007)

	Comparison expected CALUX and experimental CALUX <sup>1</sup>	Comparison expected CALUX and WHO 1998-TEQ <sup>1</sup>	Comparison expected CALUX and experimental CALUX <sup>1</sup>	Comparison expected CALUX and WHO 1998-TEQ <sup>1</sup>	Comparison expected CALUX and experimental CALUX <sup>1</sup>	Comparison expected CALUX and WHO 1998-TEQ <sup>1</sup>
	p value Dioxines		p value PCB DL		p value Dioxines+ DL PCB	
<b>Dairy product</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Egg</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Fish</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Animal fat</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>Vegetable oil</b>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

<sup>1</sup> Wilcoxon matched-pairs sign-rank test

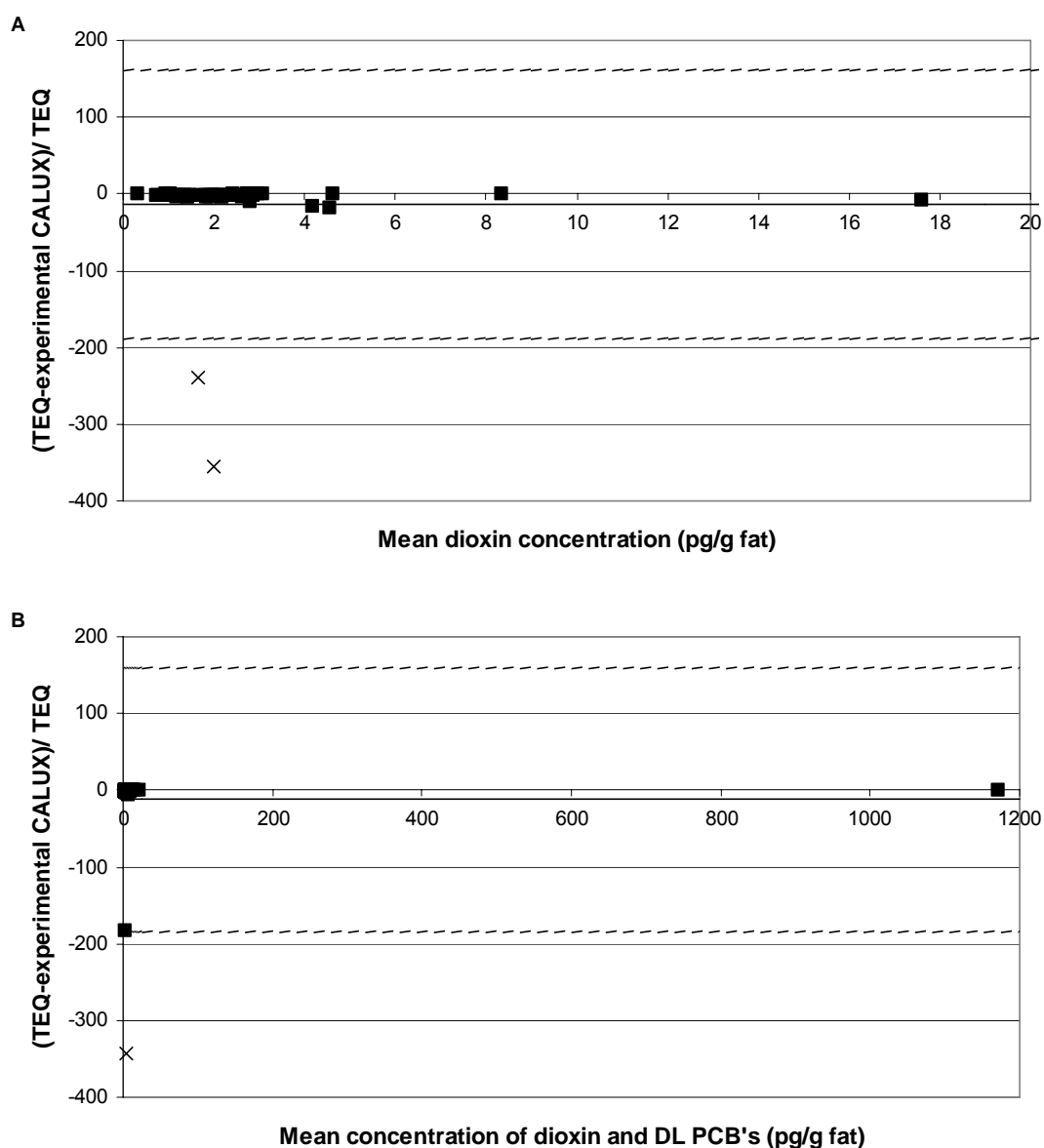
Deze vergelijking toont aan dat de experimentele CALUX-waarden, in het geval van de dioxines, een betere overeenstemming geven met de experimentele GC-HRMS gegevens wanneer de REP-waarden gebruikt worden dan wanneer de TEF-waarden gebruikt worden. Een omgekeerde tendens wordt echter waargenomen in het geval van de DL PCB's. Bovendien toont de statistische vergelijking aan dat de resultaten bekomen via beide methoden significant verschillend zijn.

## 5.2. Analyse van de concordantie of het verschil tussen de CALUX- en de GC-HRMS-methode (verwachte CALUX, experimentele CALUX, WHO 1998-TEQ) volgens de methode van Petrie & Watson (2006)

De concordantie tussen de CALUX en de GC-HRMS methode werd gekwantificeerd door toepassing van de door Petrie & Watson (2006) aanbevolen benadering. Het relatieve verschil  $d$  tussen 2 metingen werd berekend. De monsters die een verschil aangaven van meer dan 3 maal de standaardafwijkingen t.ov. het gemiddelde verschil werden meer in detail nagekeken. Deze monsters worden in de figuren 1 t.e.m. 4 weergegeven met kruisjes. De profielen van de dioxinen en de DL PCB's in deze monsters zijn weergegeven in bijlage 2.

### Zuivelproducten

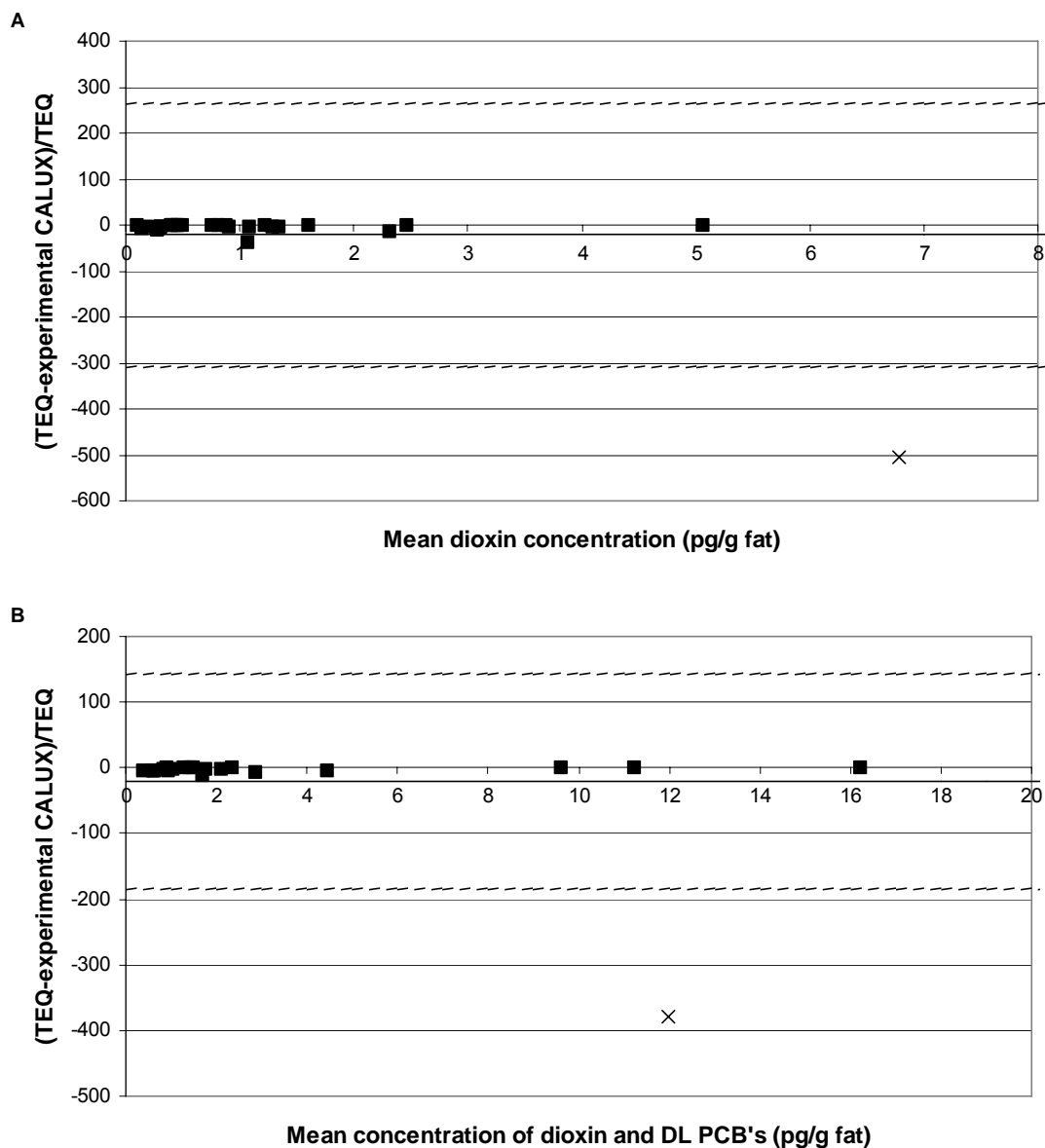
Bij de analyse van dioxinen en de som van dioxinen en DL PCB's valt het relatieve verschil tussen beide methoden in respectievelijk twee en één paardenmelkmonsters buiten de grens van gemiddelde  $\pm 3$  keer de standaardafwijking.



Figuur 1 : Relatief verschil tussen de WHO-TEQ concentratie bepaald met GC-HRMS en de experimentele CALUX-TEQ concentratie (Y-axis) voor zuivelproducten in functie van de gemiddelde concentratie bekomen met beide methoden (X-axis) voor dioxinen (A) en voor de som van dioxinen en DL PCB's (B) (■ relatief verschil, x extreme waarde voor  $d$ , — gemiddelde voor  $d$ , --- gemiddelde voor  $d \pm 3$  keer de standaardafwijking)

### Vis

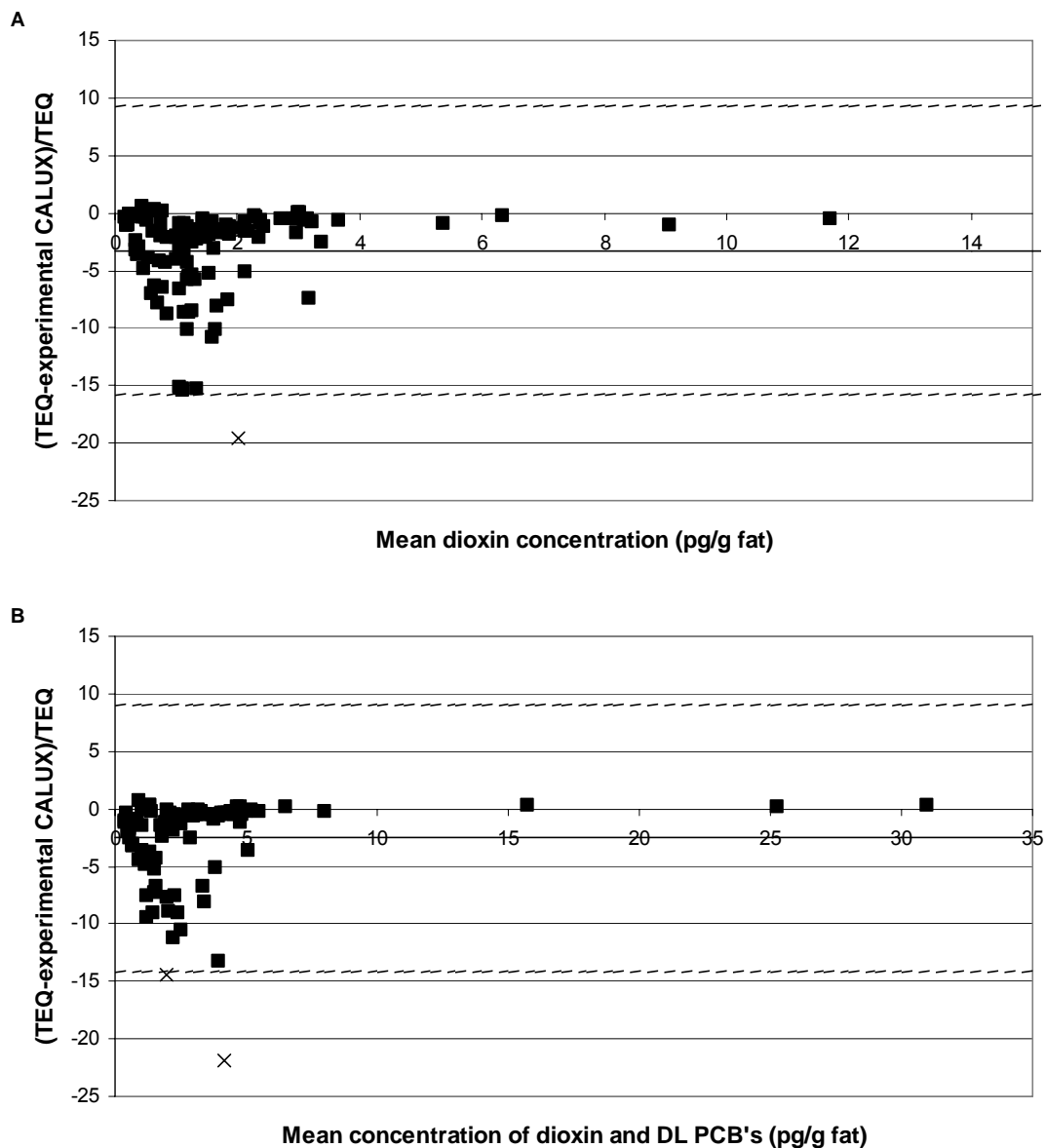
Bij de analyse van dioxinen en DL PCB's valt het relatieve verschil tussen beide methoden in één schaaldiermonster buiten de grens van gemiddelde +/- 3 keer de standaardafwijking.



Figuur 2 : Relatief verschil tussen de WHO-TEQ concentratie bepaald met GC-HRMS en de experimentele CALUX-TEQ concentratie (Y-axis) voor vis in functie van de gemiddelde concentratie bekomen met beide methoden (X-axis) voor dioxinen (A) en voor de som van dioxinen en DL PCB's (B) (■ relatief verschil, x extreme waarde voor d, — gemiddelde van d, ----gemiddelde van d +/- 3 keer de standaardafwijking)

### Dierlijk vet

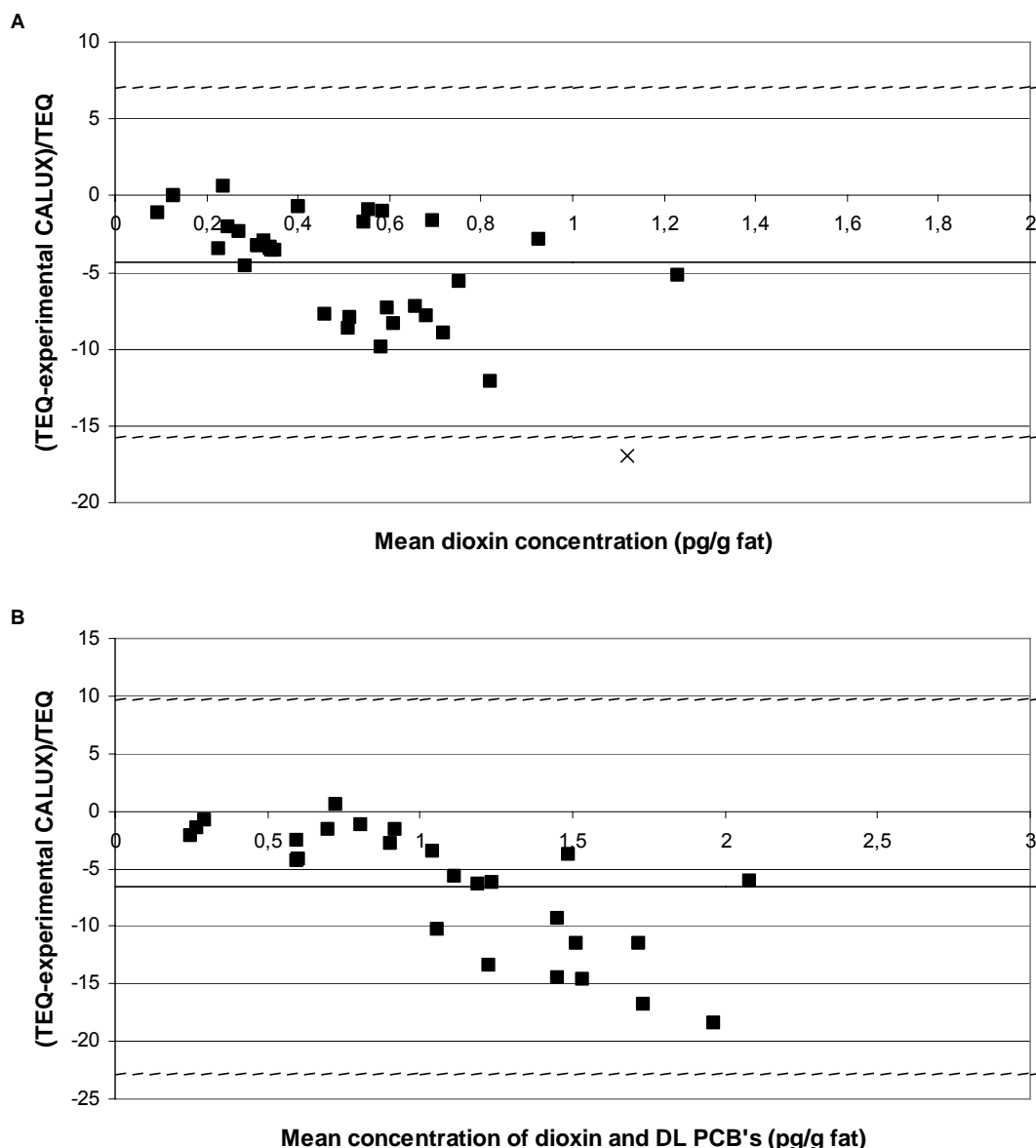
Bij de analyse van dioxinen valt het relatieve verschil tussen beide methoden in één monster van dierlijk vet buiten de grens gemiddelde  $\pm 3$  keer de standaardafwijking. Bij de analyse op DL PCB's van één monster van schapenvlees, rundsvet, gevogelte en gevogeltevet valt het relatieve verschil tussen beide methoden buiten de grens van gemiddelde  $\pm 3$  keer de standaardafwijking. Wat de som van dioxinen en DL PCB's betreft, valt het relatieve verschil tussen beide methoden buiten de grens van gemiddelde  $\pm 3$  keer de standaardafwijking in een monster van gevogelte en een monster van dierlijk vet.



Figuur 3 : Relatief verschil tussen de WHO-TEQ concentratie bepaald met GC-HRMS en de experimentele CALUX-TEQ concentratie (Y-axis) voor dierlijk vet in functie van de gemiddelde concentratie bekomen met beide methoden (X-axis) voor dioxinen (A) en voor de som van dioxinen en DL PCB's (B) (■ relatief verschil, x extreme waarde voor d, — gemiddelde van d, ---- gemiddelde van d  $\pm 3$  keer de standaardafwijking)

### Plantaardige olie

Bij de analyse van dioxinen valt het relatieve verschil tussen beide methoden in één monster van plantaardige olie buiten de grens van gemiddelde +/- 3 keer de standaardafwijking.



Figuur 4 : Relatief verschil tussen de WHO-TEQ concentratie bepaald met GC-HRMS en de experimentele CALUX-TEQ concentratie (Y-axis) voor plantaardige olie in functie van de gemiddelde concentratie bekomen met beide methoden (X-axis) voor dioxinen (A) en voor de som van dioxinen en DL PCB's (B) (■ relatief verschil, x extreem waarde van d, — gemiddelde van d, ---- gemiddelde van d +/- 3 keer de standaardafwijking)

De vergelijking van de resultaten van de GC-HRMS- en de CALUX-methode voor levensmiddelenmatrices volgens de methode van Petrie & Watson is weergegeven in tabel 9. Het relatieve verschil  $d$  tussen WHO-TEQ en experimentele CALUX-TEQ waarden wordt bepaald door de volgende formule:  $(GC-HRMS \text{ resultaat (WHO-TEQ)} - \text{experimentele CALUX resultaat}) / GC-HRMS \text{ (WHO-TEQ) resultaat}$ . Het relatieve verschil  $d$  tussen verwachte en experimentele CALUX waarden wordt bepaald door de volgende formule:  $(\text{verwachte CALUX resultaat} - \text{experimentele CALUX resultaat}) / \text{verwachte CALUX resultaat}$ . De vergelijking van de resultaten van de GC-HRMS- en de CALUX-methode werd ook gemaakt zonder de extreme monsters (voorgesteld met een kruis in figuur 1 t.e.m. 4). Deze vergelijking is weergegeven in tabel 10.

Voor dioxinen is het verschil tussen het WHO-TEQ resultaat en de experimentele CALUX-TEQ groter dan het verschil tussen het verwachte CALUX-TEQ resultaat en de experimentele CALUX-TEQ (tabel 9). Voor DL PCB's is het verschil tussen het WHO-TEQ resultaat en de experimentele CALUX-TEQ kleiner dan het verschil tussen het verwachte CALUX-TEQ resultaat en de experimentele CALUX-TEQ (tabel 9).

Als geen rekening wordt gehouden met extreme monsters (voorgesteld met een kruis in figuur 1 tem 4), verkleint het verschil tussen de CALUX- en de GC-HRMS-resultaten (tabel 10).

Tabel 9: Gemiddeld relatief verschil  $d$  tussen de WHO-TEQ en de experimentele CALUX-TEQ waarden en tussen de verwachte en de experimentele CALUX-TEQ waarden voor dioxinen, DL PCB's en de som van dioxinen en DL PCB's in zuivelproducten, eieren, vis, dierlijk vet en plantaardige olie

	Dioxins		DL PCB		Dioxins + DL PCB	
	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)
<b>Dairy product</b>	-13,27	-12,31	-10,64	-28,47	-12,28	-18,06
<b>Egg</b>	-1,58	-0,86	-6,20	-12,55	-2,49	-2,64
<b>Fish</b>	-21,83	-16,01	-15,74	-40,92	-20,11	-25,36
<b>Animal fat</b>	-3,38	-2,79	-3,46	-9,13	-2,56	-3,17
<b>Vegetable oil</b>	-4,33	-3,51	-10,02	-17,73	-6,55	-7,20

Tabel 10: Gemiddeld relatief verschil  $d$  tussen de OMS-TEQ en de experimentele CALUX-TEQ waarden en tussen de verwachte en de experimentele CALUX-TEQ waarden voor dioxinen, DL PCB's en de som van dioxinen en DL PCB's in zuivelproducten, eieren, vis, dierlijk vet en plantaardige olie (zonder de extreme waarden)

	Dioxins		DL PCB		Dioxins + PCB DL	
	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)
<b>Dairy product</b>	-2,10	-1,76	-0,28	-2,27	-0,60	-1,59
<b>Egg</b>	-1,58	-0,86	-6,20	-12,55	-2,49	-2,64
<b>Fish</b>	-3,93	-3,75	-2,33	-8,00	-2,22	-4,42
<b>Animal fat</b>	-3,16	-2,60	-1,97	-5,72	-2,09	-2,66
<b>Vegetable oil</b>	-3,99	-3,28	-9,76	-17,96	-6,16	-7,02

Men merkt op dat het verwijderen van de (weinig) extreme waarden, de convergentie tussen de twee methoden (experimentele CALUX en GC-HRMS) enorm verbeterd voor de matrices 'zuivelproducten' en 'vis'. De verbetering is echter aanzienlijk kleiner (of onbelangrijk) voor de matrices 'dierlijke vetten' en 'plantaardige olie'. Voor de matrix 'eieren', zijn er geen extreme waarden (en dus geen verbetering van de convergentie).

Voor dioxinen is de convergentie tussen de experimentele CALUX -en de GC-HRMS methode beter in de matrix 'eieren' en minder goed in de matrices 'vis' en 'plantaardige olie'. Voor DL PCB's, is de convergentie heel goed voor zuivelproducten en veel minder bevredigend voor eieren en plantaardige olie.

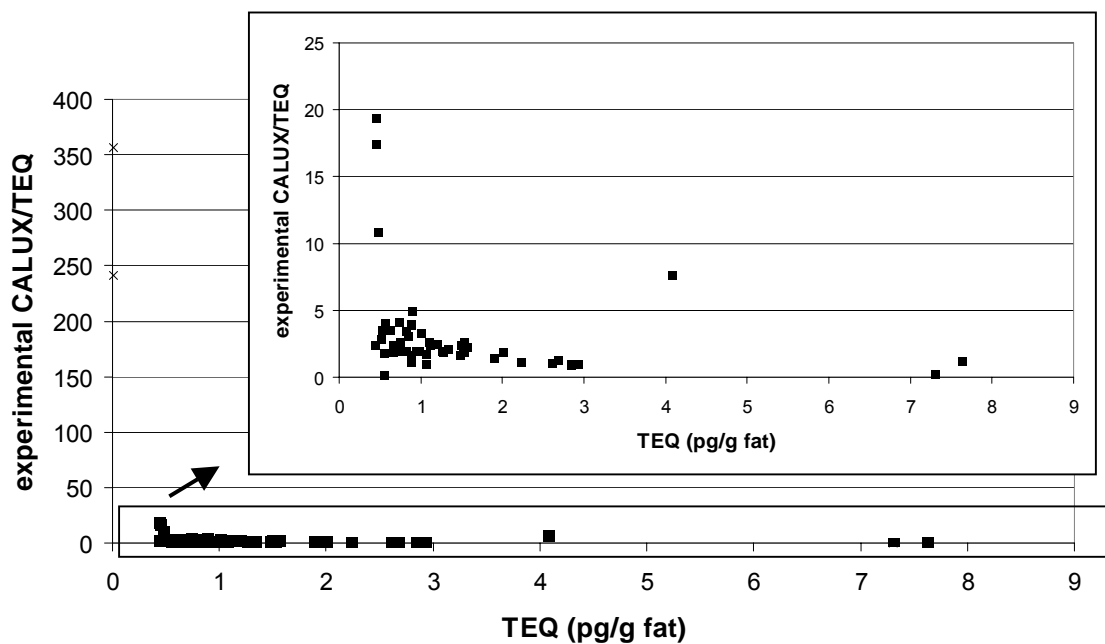
Wanneer de extreme waarden worden verwijderd, stellen we vast dat de convergentie tussen de resultaten verbeterd voor de aanpak 'verwachte CALUX' gebaseerd op het gebruik van de REP-waarden in plaats van de TEF-waarden voor dioxinen. Voor de DL PCB's wordt daarentegen een groter verschil waargenomen.

Het verschil tussen de 2 methoden blijft echter hoog. Zo is het verschil 86% voor dioxinen in eieren en duidelijk nog hoger voor dioxinen in andere matrices (176 tot 375%) alsook voor de DL PCB's onafhankelijk van de matrix (227% tot 1793%).

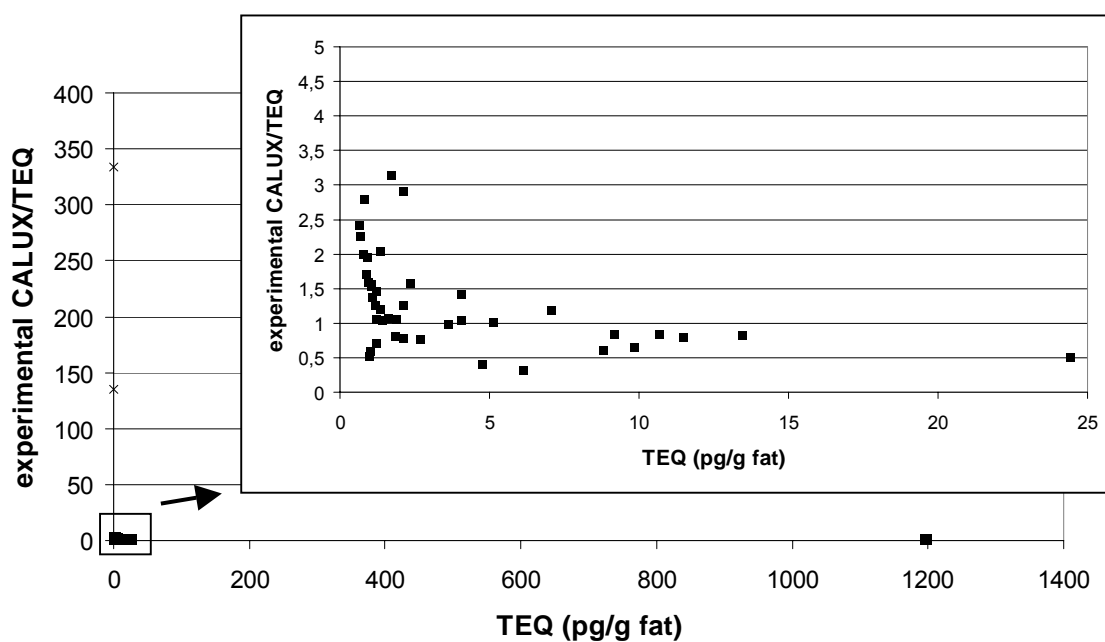
#### 5.4. Verschil tussen bepaling met CALUX en GC-HRMS in functie van de concentratie

Om het evenredige verschil te benadrukken dat zich voordoet bij de bepaling met de CALUX-methode, werd de verhouding tussen de experimentele CALUX en GC-HRMS (WHO-TEQ) uitgezet in een grafiek in functie van de met GC-HRMS gemeten concentraties van dioxinen en DL PCB's (figuren 5 t.e.m. 14) voor de onderzochte levensmiddelenmatrices.

##### Zuivelproducten



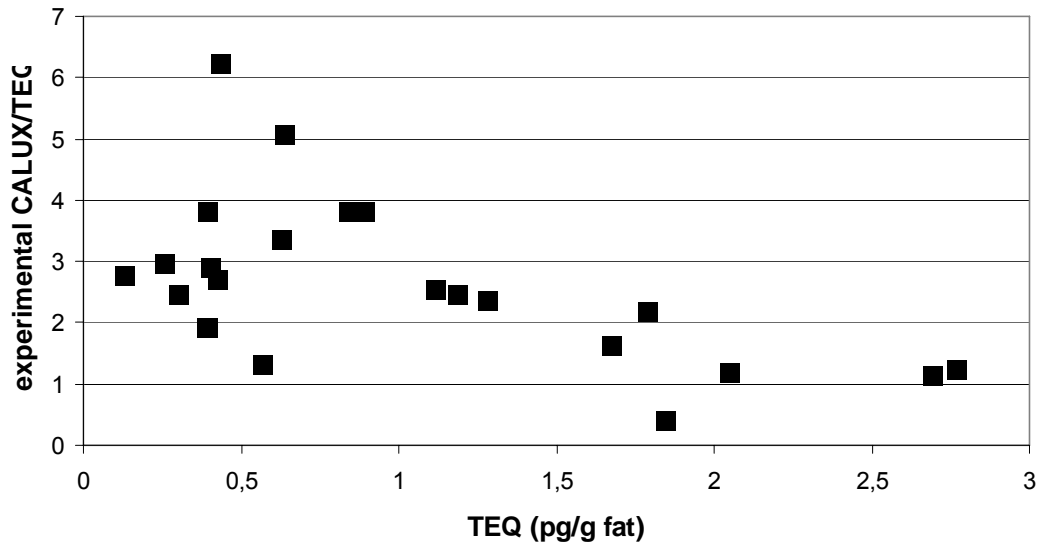
Figuur 5: Verhouding experimentele CALUX / GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de dioxineconcentratie in zuivelproducten (■ verhouding, x extreme verhouding)



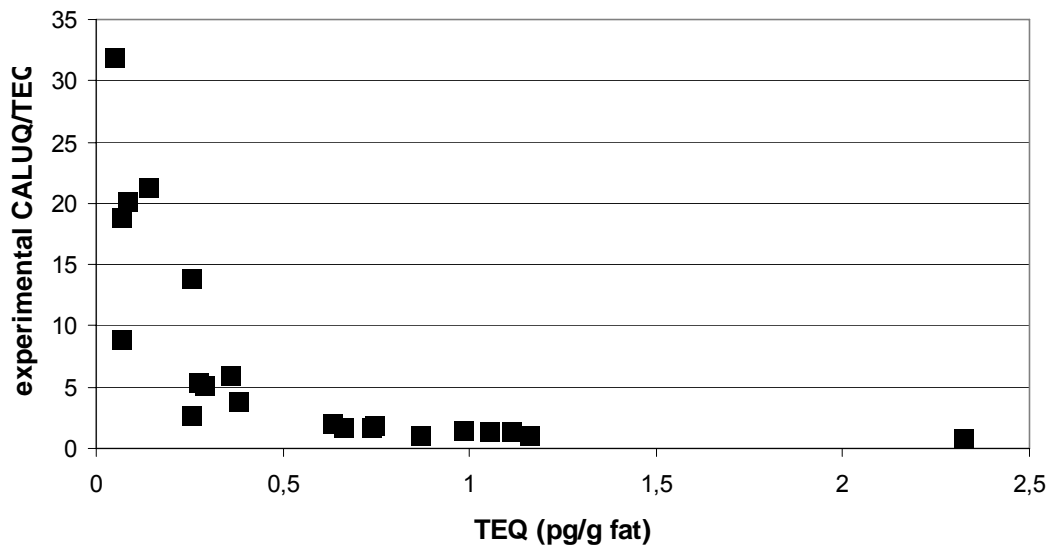


Figuur 6: Verhouding experimentele CALUX / GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de DL PCB-concentratie in zuivelproducten (■ verhouding, x extreme verhouding)

Eieren

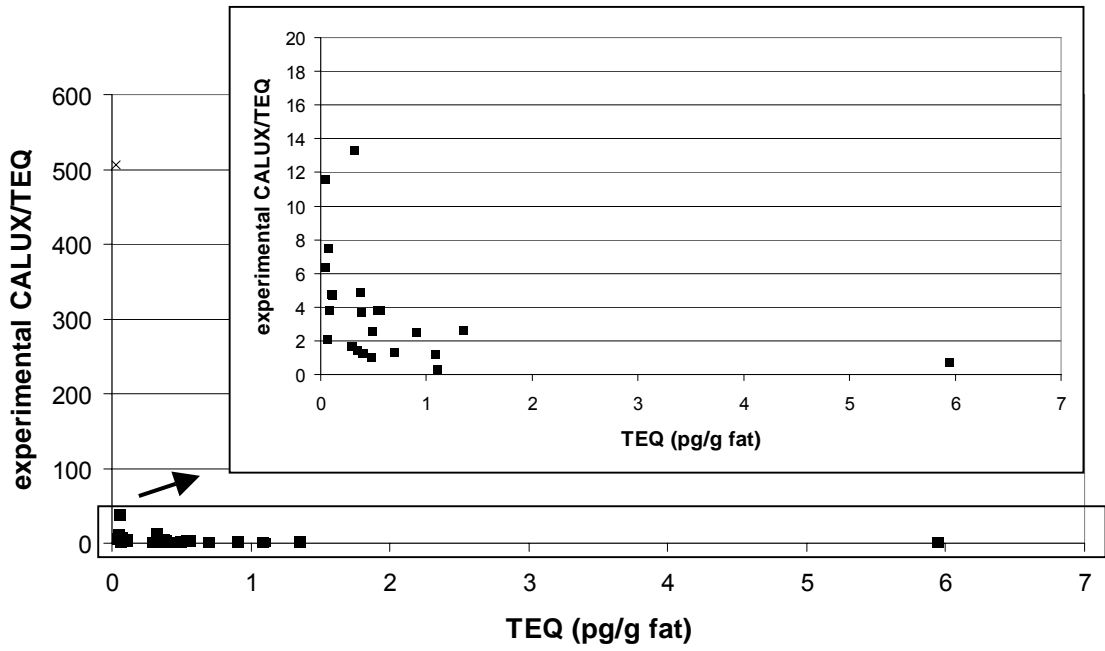


Figuur 7: Verhouding experimentele CALUX/ GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de dioxineconcentratie in eieren

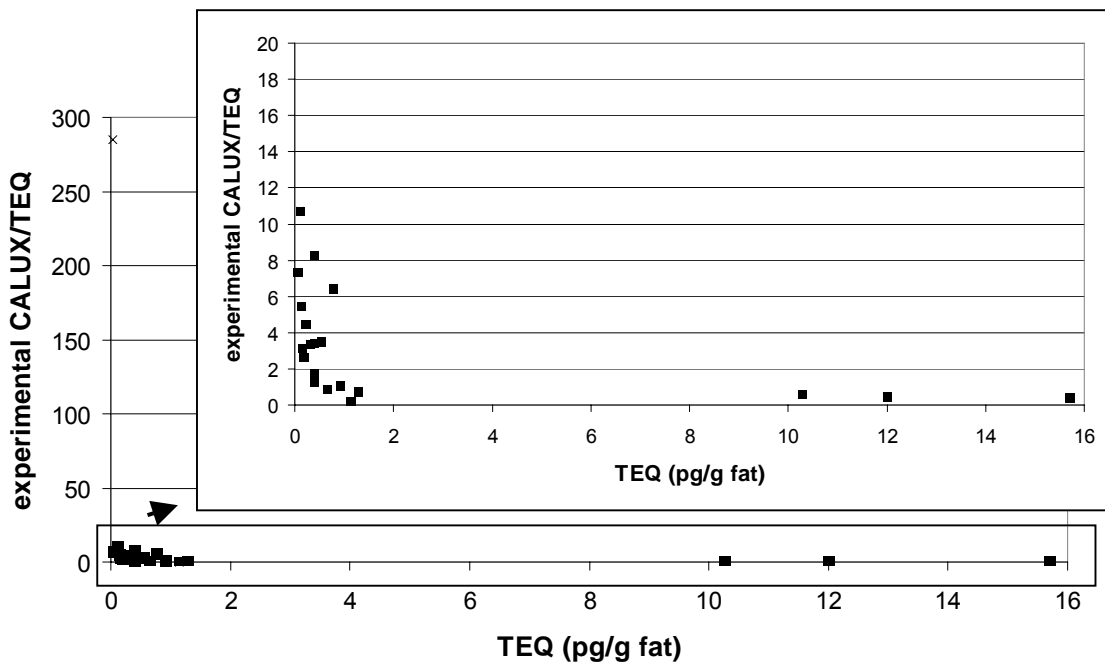


Figuur 8: Verhouding experimentele CALUX / GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de DL PCB-concentratie in eieren.

Vis

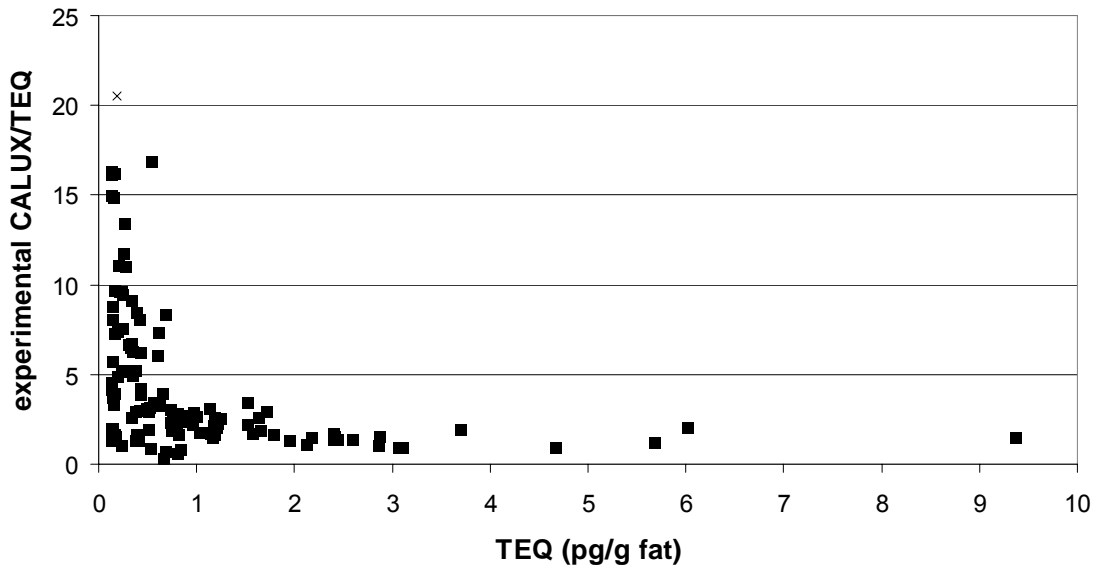


Figuur 9: Verhouding experimentele CALUX / GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de dioxineconcentratie in vis (■ verhouding, x extreme verhouding)

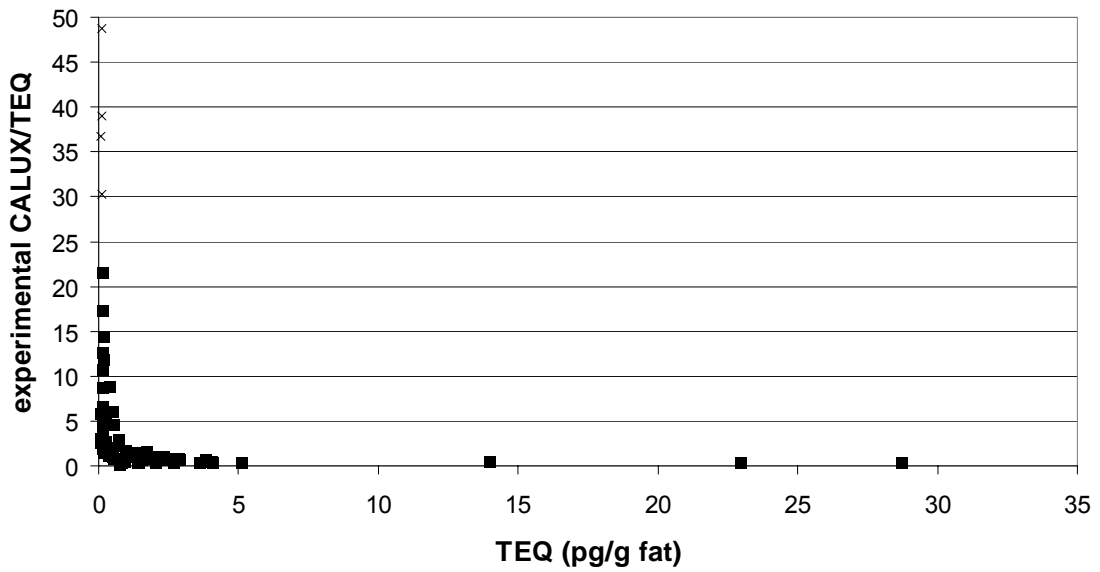


Figuur 10: Verhouding experimentele CALUX / GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de DL PCB-concentratie in vis (■ verhouding, x extreme verhouding)

Dierlijk vet

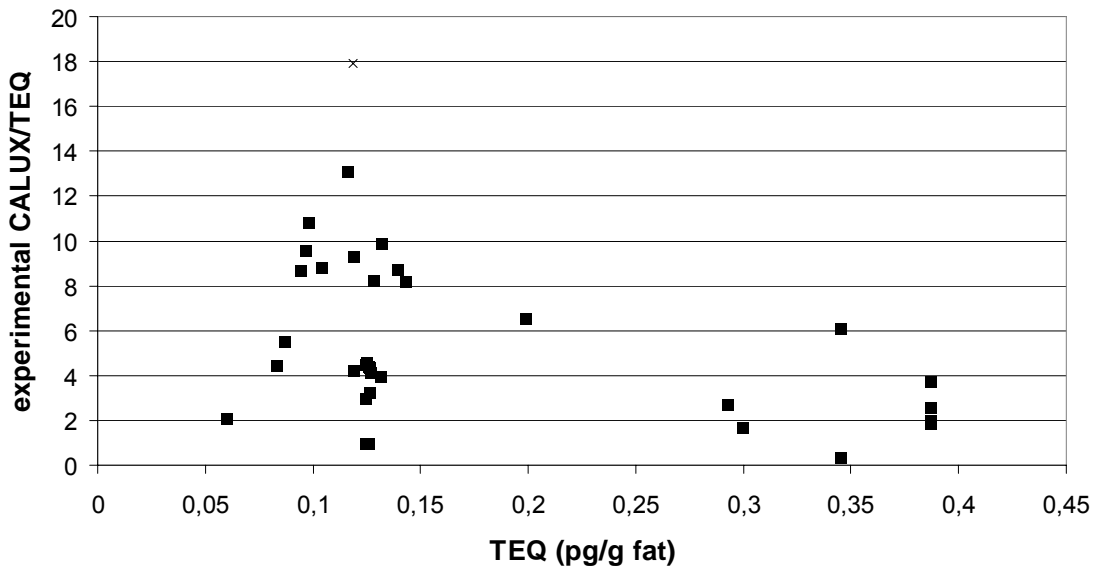


Figuur 11: Verhouding experimentele CALUX / GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de dioxineconcentratie in dierlijk vet (■ verhouding, x extreme verhouding)

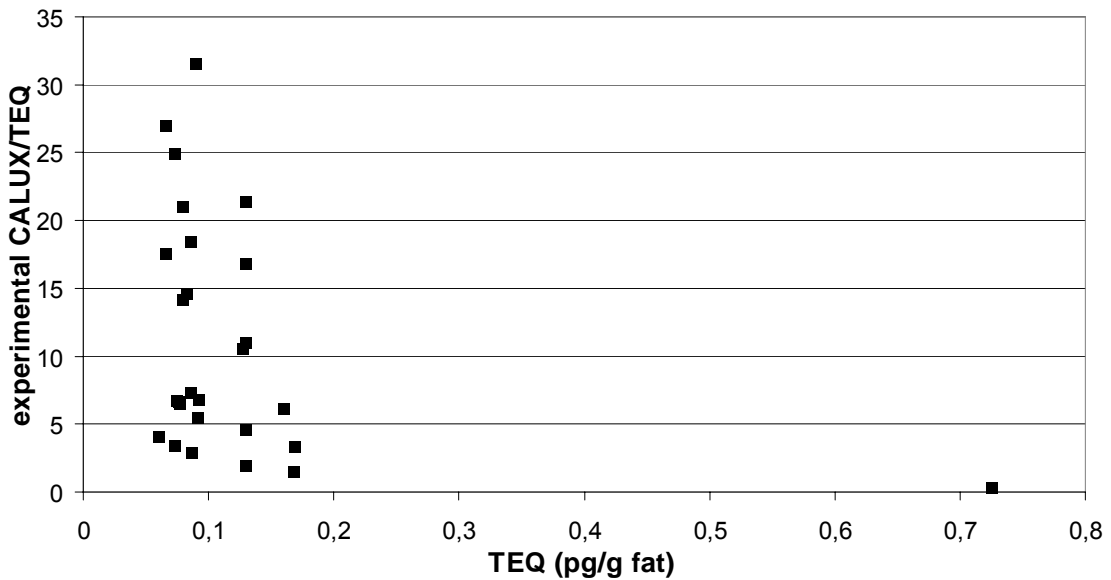


Figuur 12: Verhouding experimentele CALUX / GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de DL PCB-concentratie in dierlijk vet (■ verhouding, x extreme verhouding)

Plantaardige olie



Figuur 13: Verhouding experimentele CALUX/ GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de dioxineconcentratie in plantaardige olie (■ verhouding, x extreme verhouding)



Figuur 14: Verhouding experimentele CALUX/ GC-HRMS (WHO-TEQ) in functie van de DL PCB-concentratie in plantaardige olie

Voor dioxineconcentraties die de toegestane maximumwaarde overschrijden is de verhouding tussen de experimentele CALUX- en de GC-HRMS-concentratie ongeveer gelijk aan 1. Voor de kleinste concentraties kan die verhouding veel groter zijn. Er dient opgemerkt te worden dat 1) de kalibratiecurve voor de CALUX-methode gecentreerd is rond waarden die de toegestane maximumwaarde benaderen; 2) een hoge verhouding voor lage concentraties kan wijzen op de aanwezigheid van agonisten die tijdens de extractiefase en de opzuivering van het monster mee worden geëxtraheerd.

## 6. Discussie

De biologische CALUX-test is een screeningmethode waarvan de metingen steunen op een sigmoïdale kalibratiecurve die wordt verkregen met 2,3,7,8-TCDD. De metingen kunnen niet voor alle concentraties van de kalibratiecurve worden uitgevoerd maar alleen voor het rechtlijnige deel van de curve. De CALUX-test werd ontwikkeld en goedgekeurd voor concentraties die de toegestane maximumwaarde benaderen. De methode kan worden aangepast voor lagere concentraties maar is dan minder nauwkeurig dan voor waarden die in de buurt liggen van de toegestane maximumwaarde.

De GC-HRMS-analyse meet de concentraties van de uitgekozen dioxinen en dioxineachtige PCB's terwijl de biologische CALUX-test alle verbindingen detecteert die zich voordoen als agonist van de Ah-receptor. Daardoor kunnen de met CALUX gemeten waarden hoger zijn dan de met GC-HRMS gemeten waarden.

De verschillen (hogere resultaten voor CALUX) kunnen voortkomen uit de aanwezigheid van andere verbindingen dan dioxinen en dioxineachtige PCB's zoals broomdioxinen met affiniteit voor de Ah-receptor (Scippo *et al.*, 2008). Het effect van die verbindingen is relatief gezien, groter bij geringe concentraties. De onzekerheid op het CALUX-resultaat, als parameter die de specifieke aanwezigheid van PCDD/F en DL PCB's weergeeft, zal dus hoger zijn bij geringe concentraties.

Van Wouwe *et al.* (2004) vermelden dat het evenredige verschil door meerdere factoren kan worden verklaard :

- De eerste factor verwijst naar de kwantificatielimiet van de analyses met GC-HRMS. Als monsters weinig dioxineachtige congenen bevatten, liggen die meestal onder de kwantificatielimiet. Voor deze niet detecteerbare congenen, kan voor de berekening van de TEQ een waarde van 0 (lower bound), de helft van de LOQ (middle bound) of de waarde van de LOQ (upper bound) toegekend worden. Als de concentratie van die congenen wordt vastgesteld op 0, dragen zij niet bij aan de GC-HRMS TEQ-waarde. Daardoor worden de TEQ-waarden voor de chemische analyse bij geringe concentraties onderschat. De CALUX-test geeft een globale respons voor alle congenen. Het verschil tussen de resultaten die worden verkregen met CALUX en met GC-HRMS vergroot wanneer het aantal niet-gedetecteerde congenen toeneemt. Omgekeerd zal het gebruik van de upper bound waarden het verschil tussen de CALUX- en de GC-HRMS-resultaten wellicht verkleinen, hoewel dan sprake kan zijn van een overschatting. We leggen de nadruk op het feit dat, in deze studie de "middle bound" waarden werden gebruikt.
- Het verschil tussen de TEF- en de REP-waarden.
- De mogelijkheden van de biologische testen om alle verbindingen met affiniteit voor de Ah-receptor te meten kan het verschil tussen beide methoden grotendeels verklaren. Milieuverontreinigingen, zoals broomdioxinen, polychloorterfenylen (PCT), polychlooraftalenen (PCN), enz. kunnen bijdragen tot de CALUX-respons. Er zijn bijkomende analyses noodzakelijk om uit te maken of andere verbindingen voorkomen in de fractie dioxinen en DL PCB's en om na te gaan in welke verhouding deze bijdragen aan de CALUX TEQ-waarde. Verbetering van de detectiemethoden is noodzakelijk (Van Wouwe *et al.*, 2004).

Theoretisch zou, bij blootstellingsberekeningen, het CALUX-resultaat kunnen worden gebruikt in plaats van het GC-HRMS-resultaat op voorwaarde dat de verhouding tussen de resultaten bekomen met de CALUX-methode en deze bekomen met de GC-HRMS-methode gelijk is aan 1. Die verhouding zou, gelet op de hierboven beschreven analyse, min of meer gerespecteerd moeten worden voor waarden die in de buurt liggen van de toegestane maximumwaarde (waarden waarvoor de CALUX-test gevalideerd werd). In de andere gevallen zou het CALUX-resultaat een overschatting zijn van het gehalte aan de 29, in de regelgeving beoogde, congenen, maar zou het daarentegen meer rekening kunnen houden met de andere verbindingen met dioxineactiviteit die de regelgeving niet beoogt.

Het profiel van de extreme waarden, voorgesteld in bijlage 2, lijkt in overstemming te zijn met het profiel van andere monsters, voor welke een goede correlatie bestaat tussen de 2 methoden. Dit suggereert dat andere stoffen in het monster verantwoordelijk zijn voor het verschil tussen de twee methoden.

Niet alleen verontreinigingen zoals dioxinen, PCB's en PAK's gaan een binding aan met de Ah-receptor. Er zijn ook een groot aantal verbindingen van natuurlijke oorsprong die zich aan deze receptor kunnen binden en deze kunnen activeren (De Waard *et al.*, 2008). Extracten van aardappelen (frietten), kruisbloemigen, brood, hamburger en citrussap hebben voor de Ah-receptor de grootste agonistenactiviteit (De Waard *et al.*, 2008). Er dient echter opgemerkt te worden dat de in deze extracten aanwezige natuurlijke stoffen, niet co-elueren in de analysemethode voor dioxinen. Het is bovendien erg waarschijnlijk dat zij tijdens de spijsvertering gemetaboliseerd worden voordat zij terecht komen bij de cellen die veel Ah-receptoren bevatten.

## 7. Conclusies en aanbevelingen

De CALUX-test is vrij goedkoop, herhaalbaar en gevoelig. Daarnaast kan men er andere stoffen dan dioxinen die zich aan de Ah-receptor binden mee opsporen (Windal *et al.*, 2005). Bij validaties van de CALUX-methode voor mariene biologische matrices en menselijk plasma, die werden uitgevoerd door Windal *et al.* (2005) en door Van Wouwe *et al.* (2004), bleek een goede correlatie te bestaan tussen de dioxinefractie die werd gemeten met CALUX en deze die werd gemeten met GC-HRMS ook al is het duidelijk dat er een aanzienlijke verschil tussen de twee methoden bestaat op basis van de laagste niveaus van verontreinigende stoffen.

De resultaten van de biologische CALUX-test laten voor de onderzochte levensmiddelenmatrices een goede correlatie zien met de GC-HRMS-analyse ook al leidt ze doorgaans tot een overschatting vooral bij lage niveaus van verontreinig. De CALUX-test is ook een goede screeningmethode (Hoogenboom *et al.*, 2006). Als screeningsmethode, vertoont de CALUX methode, zoals toegepast in België in het kader van het controleprogramma van het FAVV, toereikende analytische performanties, voor zover het aantal vals negatieven zeer laag is (2% voor zuivelproducten en 0% voor andere matrices).

Het Wetenschappelijk Comité meent dat het belangrijk is dat aanbevelingen worden gedaan over het gebruik van de met de CALUX-methode verkregen resultaten.

De resultaten die worden bekomen met de CALUX-methode, zoals die in België wordt gebruikt, kunnen niet worden aangewend voor een kwantitatieve inschatting van het risico van de blootstelling via levensmiddelen voor PCDD/F en DL PCB congenere bedoeld in het kader van de wetgeving (Verordening 1881/2006). De blootstelling van de consument aan dioxinen en DL PCB's kan dus niet worden geraamd aan de hand van de gegevens van screeningtests zoals de CALUX-test. Deze methode meet niet specifiek de 17 dioxine- en 12 DL PCB-congenere.

Het Wetenschappelijk Comité raadt sterk aan om wanneer een groot verschil wordt vastgesteld tussen de CALUX- en de GC-HRMS-methode, bijkomende meer verfijnde chemische analyses uit te voeren om de aard te kunnen vaststellen van eventuele stoffen die met een dioxineactiviteit co-elueren.

Voor het Wetenschappelijk Comité,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert  
Voorzitter

Brussel, 10 oktober 2008

## Referenties

Carbonnelle S, Van Loco J, Van Overmeire I, Windal I, Van Wouwe N, Van Leeuwen S, Goeyens L. Importance of REP values when comparing the CALUX bioassay results with chemoanalyses results Example with spiked vegetable oils. *Talanta* 63, 1255–1259, 2004.

Denison, MS, Baston DS, Sorrentino C, He G, Hayashi A, Zhao B. Bioanalytical approaches for the detection and relative quantiation of halogenated dibenzo-p-dioxins and related chemicals. *Organohalogen Compounds*, Vol 69, 2007, pg 14-19. Dioxin 2007, 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Tokyo (Japan), 2-7 September 2007

De Waard W.J., Aarts J.M.M.J.G., Peijnenburg A.C.M., De Kok T.M.C.M., Van Schooten F.-J., Hoogenboom L.A.P. Ah receptor agonist activity in frequently consumed food items. *Food additives and Contaminants*, 25 (6), 779-787, 2008.

EFSA. 2005. Avis du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire à la demande de la Commission relative à la présence de polychlorobiphényles (PCB) autres que ceux de types dioxine dans l'alimentation humaine et les aliments pour animaux.

Eppe G., Focant J.-F., Pirard C., Xhrouet C., Maghuin-Rogister G., De Pauw E. 2006. Analyse des dioxines par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-HRMS, GC/MS/MS et GCxGC-TOFMS): Principes, applications et perspectives. *Chimie nouvelle* N°92 juin 2006.

Hui L.L., Hedley A.J., Nelson E.A.S., Malisch R., Wong T.W., Cowling B.J.; Agreement between breast milk dioxin levels by CALUX bioassay and chemical analysis in population survey in Hong Kong. *Chemosphere* 69, 1287-1294, 2007.

Hoogenboom R., Bovee T., Traag W., Hoogerbrugge R., Baumann B., Portier L., van de Weg G., de Vries J. The use of the DR CALUX bioassay and indicator polychlorinated biphenyls for screening of elevated levels of dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls in eel. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 945-957, 2006.

JECFA, 2002. WHO Food Additive Series: 48 Safety Evaluation of Certain Food Additive and Contaminants. WHO, Geneva.

Petrie A., Watson P. *Statistics for veterinary and animal science*. Volume 14, 2<sup>nd</sup> edition. Science B. (Ed) Blackwell Science, Edinburgh, 2006.

Scippo, Eppe G, Saegerman C, Scholl G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G, Focant J-F. Chapter XIV. Persistent organochlorine pollutants, dioxins and polychlorinated biphenyls. IN : *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 51, 457-506, 2008. Food Contaminants and Residue Analysis., Yolanda Picó (Ed.), Elsevier, Amsterdam.

Scippo M-L, Eppe G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G. DR-CALUX® screening of food samples: evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like PCBs. *Talanta*, 63, 1193-1202, 2004.

Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Hauws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE. The 2005 world health organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.*, 93 (2), 223-41, 2006.

Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld A T, Brunström B, Cook P, Feeley M, Giesy J P, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy S W, Kubiak T, Larsen J C, van Leeuwen F X, Liem A K, Nolt C, Peterson R E, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Waern

F, Zacharewski T.. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* 106 (12): 775–792, 1998.

Van Wouwe N, Windal I, Vanderperren H, Eppe G., Xhrouet C, Massart A-C, Debacker N, Sasse A, Baeyens W, De Pauw E, Sartor F, Van Oyen H, Goeyens L. Validation of the CALUX bioassay for PCDD/F analyses in human blood plasma and comparison with GC-HRMS *Talanta* 63, 1157–1167, 2004.

Windal I, Van Wouwe N, Eppe G, Xhrouet C, Debacker V, Baeyens W, De Pauw E, Goeyens L. Validation and Interpretation of CALUX as a Tool for the Estimation of Dioxin-Like Activity in Marine Biological Matrixes. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1741-1748, 2005.

## **Leden van het Wetenschappelijk Comité**

Het Wetenschappelijk Comité is samengesteld uit de volgende leden :

V. Baeten, D. Berkvens, C. Bragard, J-P. Buts, P. Daenens, G. Daube, J. Debevere, P. Delahaut, K. Dewettinck, K. Dierick, R. Ducatelle, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, J. Lammertijn, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, C. Saegerman, B. Schiffers, E. Thiry, J. Van Hoof, C. Van Peteghem

## **Dankbetuiging**

Het Wetenschappelijk Comité dankt het wetenschappelijk secretariaat en de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerpadvies. De werkgroep was samengesteld uit :

Leden Wetenschappelijk Comité	L. Pussemier (verslaggever), P. Daenens, A. Huyghebaert, G. Maghuin-Rogister, C. Saegerman
Externe experts	L. Goeyens (VUB), Marie-Louise Scippo (ULg), H. Vanderperren (Labo Tervuren)

## **Wettelijk kader van het advies**

Wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid artikel 8 ;

Koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen ;

Huishoudelijk reglement bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 13 januari 2006.

## **Disclaimer**

Het Wetenschappelijk Comité behoudt zich, te allen tijde, het recht voor dit advies te wijzigen indien nieuwe informatie en gegevens ter beschikking komen na de publicatie van deze versie.



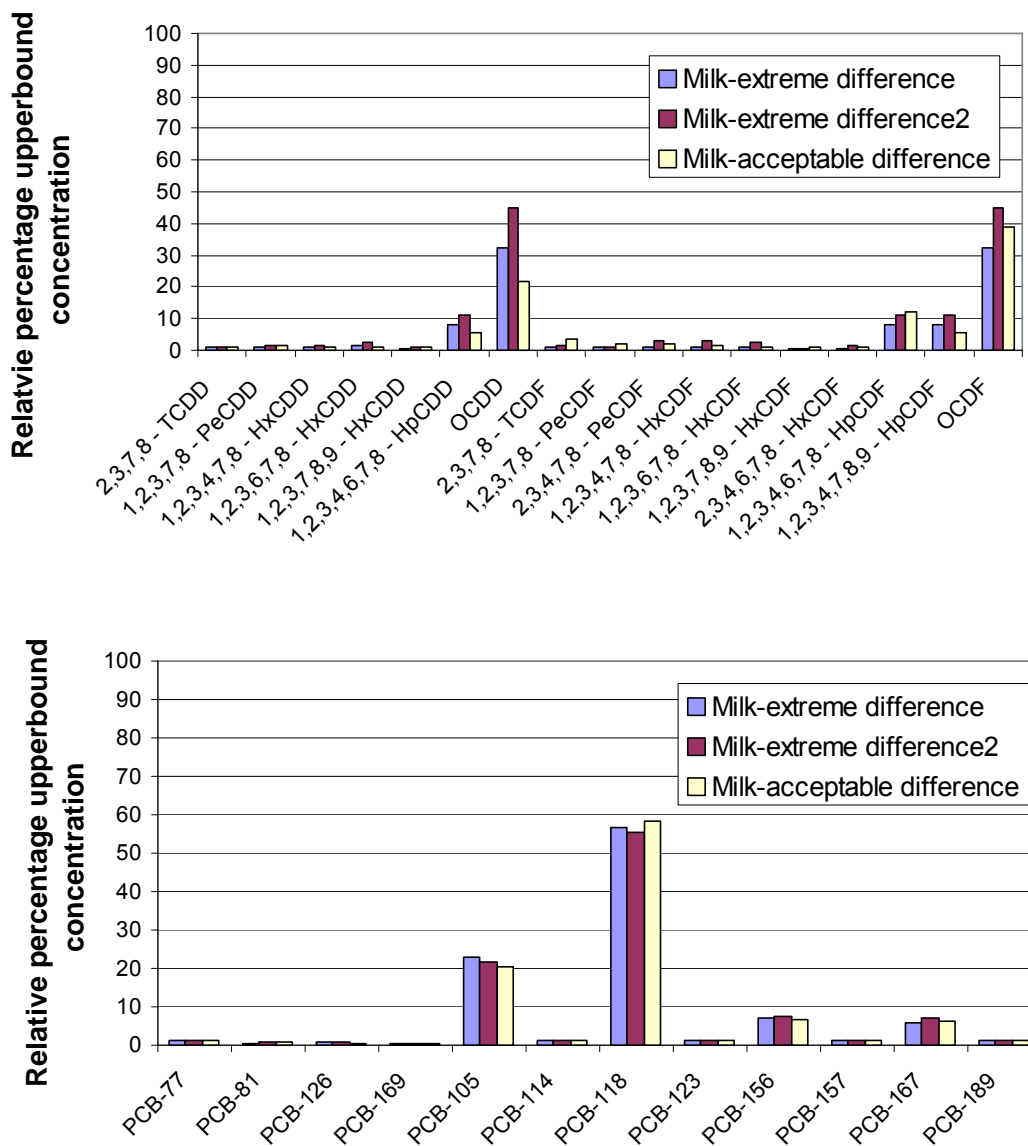
**Bijlage 1: Overzicht van de toxische equivalentiefactoren van de WHO en de REP-waarden<sup>1</sup> die werden gebruikt om de concentraties in toxische equivalenten (TEQ) te berekenen (Carbonelle *et al.*, 2004)**

Congeneren	Waarde WHO 1998-TEF	REP-waarde
2,3,7,8-TCDF	0.10	0.067
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.14
2,3,4,7,8-PeCDF	0.50	0.58
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.10	0.13
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.10	0.14
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.10	0.11
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.10	0.31
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.024
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.04
OCDF	0.0001	0.0016
2,3,7,8-TCDD	1.00	1.00
1,2,3,7,8-PeCDD	1.00	0.73
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.10	0.075
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.10	0.098
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.10	0.061
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.031
OCDD	0.0001	0.00034
PCB 81	0.0001	0.0045
PCB 77	0.0001	0.0014
PCB 126	0.10	0.04
PCB 169	0.01	0.0011
PCB 123	0.0001	$3 \times 10^{-7}$
PCB 118	0.0001	$1 \times 10^{-6}$
PCB 114	0.0005	0.00014
PCB 105	0.0001	$1 \times 10^{-6}$
PCB 167	0.00001	$3 \times 10^{-7}$
PCB 156	0.0005	0.00014
PCB 157	0.0005	$3 \times 10^{-6}$
PCB 189	0.0001	$2 \times 10^{-7}$

<sup>1</sup> REP-waarden voor cellen : hepatoom HL6.1 van muizen (Xenobiotic Detection System, Durham, US)

Bijlage 2: Profiel van dioxinen en DL PCB's in monsters waarvoor extreme verschillen tussen de twee analysemethoden werden vastgesteld (CALUX en GC-HRMS)

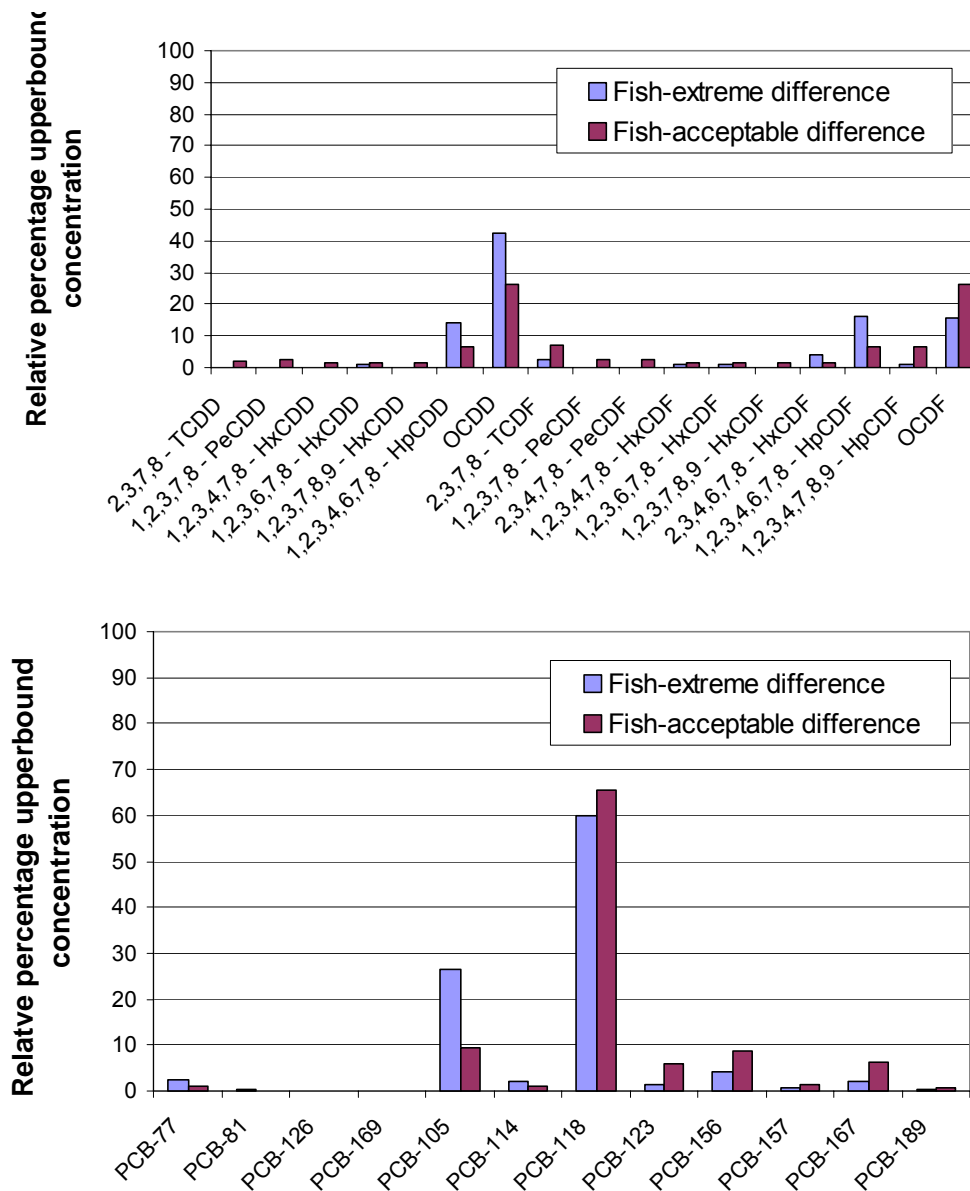
Zuivelproducten



Figuur 1: Profiel van dioxinen en DL PCB's in twee paardenmelkmonsters die als extreem werden geïdentificeerd en in één standaard paardenmelkmonster

Het standaardmonster is een paardenmelkmonster waarvoor de verhouding tussen het CALUX-resultaat en het GC-HRMS-resultaat ongeveer gelijk is aan 1 (=1,08).

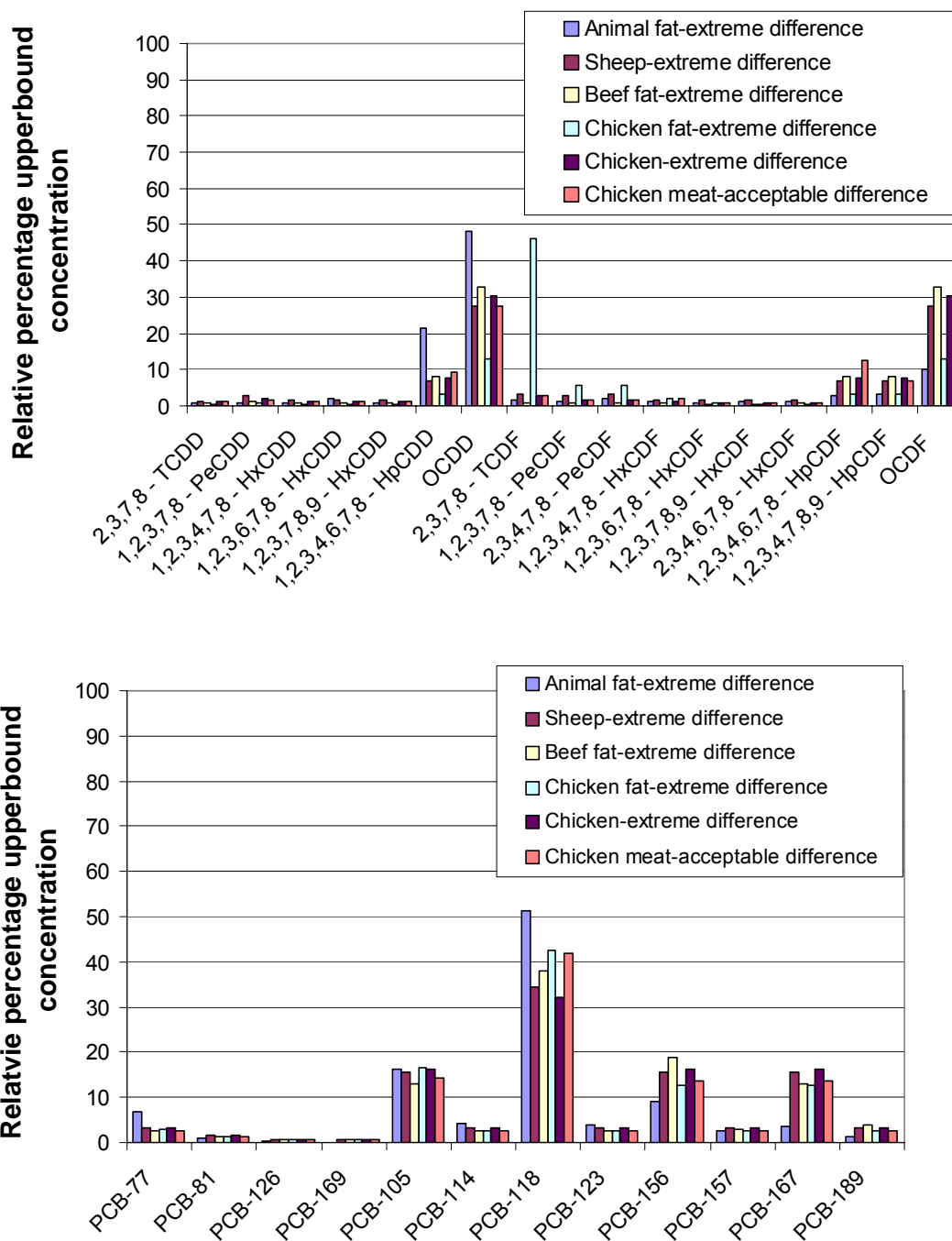
Vis



Figuur 2: Profiel van dioxinen en DL PCB's in een schaaldiermonster dat als extreem werd geïdentificeerd en in één standaard vismonster

Het standaardmonster is een vismonster waarvoor de verhouding tussen het CALUX-resultaat en het GC-HRMS-resultaat ongeveer gelijk is aan 1 (=1,05).

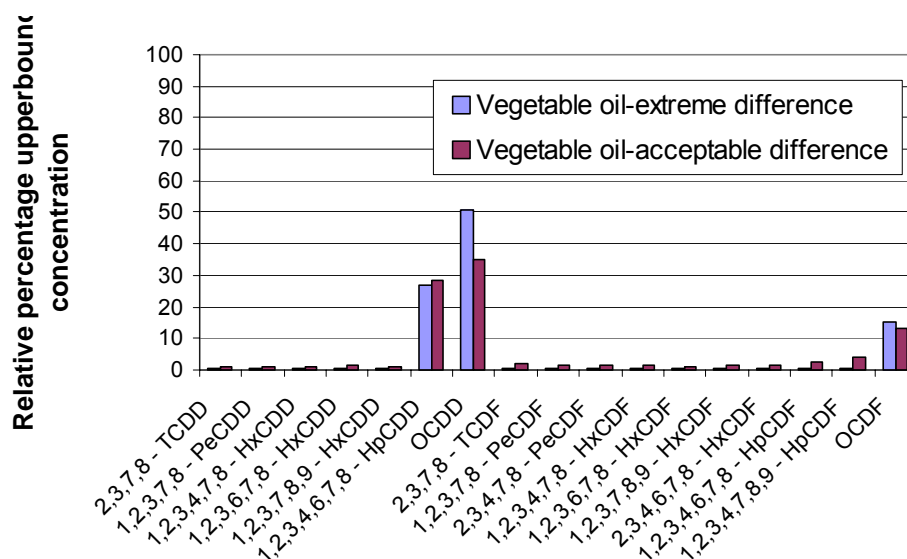
Dierlijk vet



Figuur 3: Profiel van dioxinen en DL PCB's in vijf monsters van dierlijk vet die als extreem werden geïdentificeerd en in één standaard monster

Het standaardmonster is een monster van kippenvlees waarvoor de verhouding tussen het CALUX-resultaat en het GC-HRMS-resultaat ongeveer gelijk is aan 1 (=1,09).

Plantaardige olie



Figuur 4: Profiel van dioxines in een monster van plantaardige olie dat als extreem werd geïdentificeerd en in één standaard monster van plantaardige olie

Het standaardmonster is een monster van plantaardige olie waarvoor de verhouding tussen het CALUX-resultaat en het GC-HRMS-resultaat ongeveer gelijk is aan 1 (=1,004).

Het profiel van de dioxinen in monsters die als extreem werden geïdentificeerd wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van HpCDD, OCCD en OCDF. Het profiel van de DL PCB's van de monsters die als extreem werden geïdentificeerd wordt gekenmerkt door een overheersing van de PCB-congeneren 105 en 118 en door de aanwezigheid van PCB 156 en 167. Het profiel van de standaardmonsters is gelijkaardig.