

**Agrotechnological Research Institute (ATO-DLO)**  
P.O. Box 17, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

Instituut voor  
Agrotechnologisch  
Onderzoek  
ATO-DLO  
Bornsesteeg 59  
Postbus 17  
6700 AA Wageningen

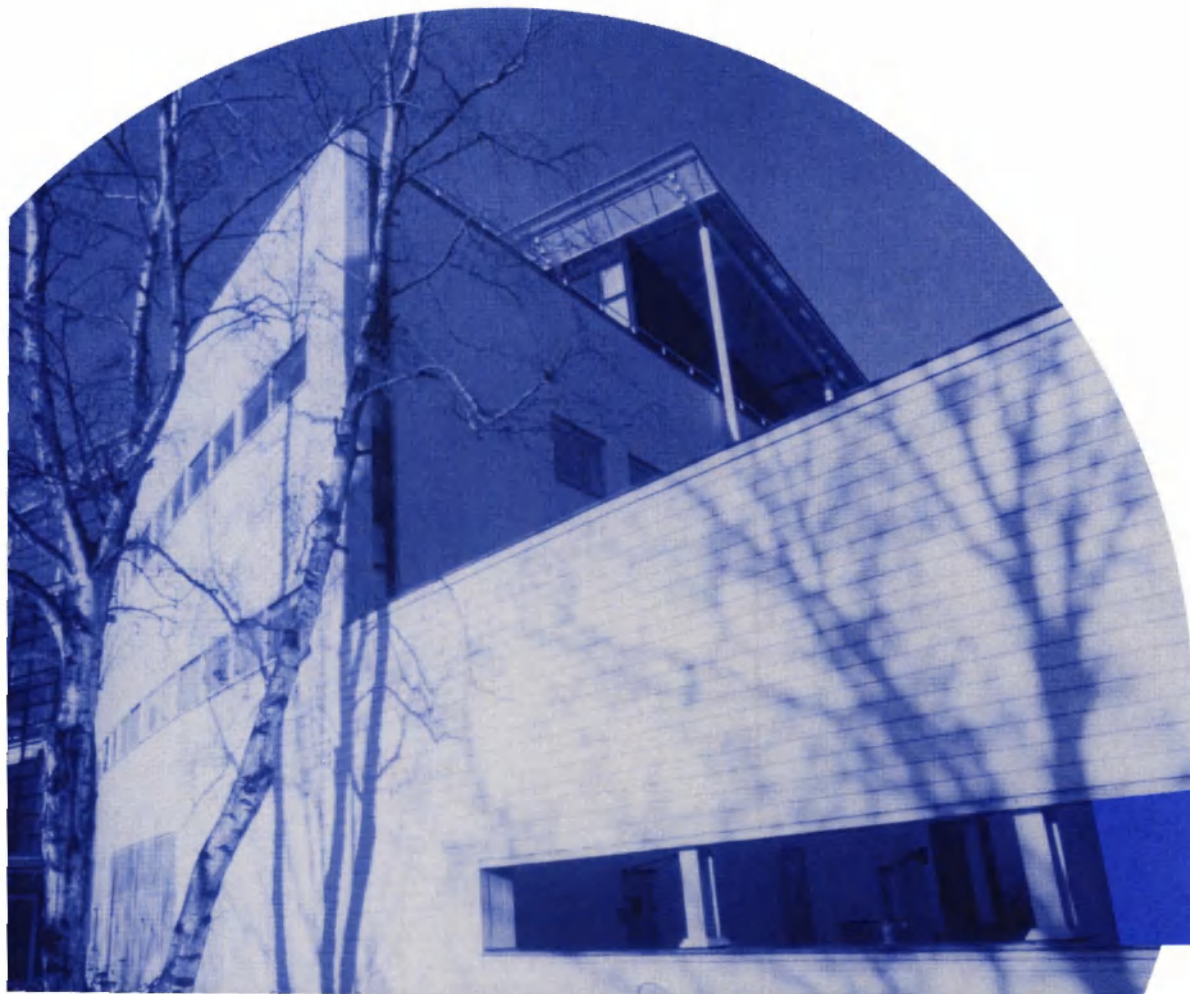


## **Inventarisatie verlaging CCC-gehalte in peren**

Ir J.A. Verschoor (ATO-DLO)  
A.C.R. van Schaik (ATO-DLO)  
Ir J.P.J. de Wild (ATO-DLO)  
W.A. Traag (RIKILT-DLO)

**VERTROUWELIJK**

**Rapport B417 / 1999-08-25**



**ato-dlo**

# Onderzoek naar mogelijkheden om het chloormequat gehalte in bewaarde Conference-peren te verlagen.

Ir. J.A. Verschoor,  
A.C.R. van Schaik,  
Ir. J.P.J. de Wild (ATO-DLO)  
W.A. Traag (RIKILT-DLO)

Rapport in opdracht van:

- Produktschap voor de  
Tuinbouw (PT) Den Haag  
- VTGFP Den Bosch  
- Nederlandse Fruittelers  
Organisatie (NFO) Den Haag

Uitvoering onderzoek door:

Agrotechnologisch Onderzoek  
Instituut (ATO-DLO)  
Bornsesteeg 59  
Postbus 17  
6700 AA Wageningen.

&

Rijks Instituut Land en  
Tuinbouwproducten (RIKILT-  
DLO)  
Bornsesteeg 45  
Postbus 230  
6700 AE Wageningen

22410594

# Inventarisatie verlaging CCC - gehalte in peren

<i>Hoofdstuk</i>	<i>bladzijde</i>
<b>Samenvatting</b>	<b>1</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>2</b>
<b>2 Proefopzet</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Materiaal</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Methoden om het CCC-gehalte te verlagen</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Kwaliteitsbepalingen</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Analyse van CCC in peren</b>	<b>8</b>
<b>3 Resultaten en discussie</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Initiële CCC-metingen</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Distributie van CCC in de peer</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Invloed behandelingsmethoden op CCC</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Effecten behandelingen op kwaliteit</b>	<b>14</b>
<b>4 Conclusies</b>	<b>16</b>
<b>5 Aanbevelingen vervolgonderzoek</b>	<b>17</b>
<b>Bijlagen</b>	
<b>Bijlage 1 : Methode voor de bepaling van CCC in peren</b>	<b>18</b>
<b>Bijlage 2 : analyseresultaten van het CC onderzoek</b>	<b>19</b>
<b>Bijlage 3 : Steekproefgrootte CCC-monsters</b>	<b>20</b>
<b>Bijlage 4 : CCC in peren</b>	<b>22</b>

# Samenvatting

In een samenwerkingsverband van de DLO-Instituten ATO en RIKILT is onderzoek uitgevoerd naar behandelingsmethoden om het CCC-gehalte in bewaarde peren te verlagen. Belangrijke eisen aan de methode waren kwaliteitshandhaving en snelle en praktische uitvoerbaarheid. Het ATO richtte zich op de behandelingsmethoden, het RIKILT op de meting van CCC en de distributie in de vrucht.

Voor het onderzoek werden partijen Conference-peren met een respectievelijk CCC gehalte gekozen van ca. 5 en 10 ppm. De peren van beide partijen werden o.a. bewaard in hoge zuurstof- en koolzuurgasconcentraties. Verder werd een warm waterbehandeling (zg. heatshock) uitgevoerd bij 37°C met een tijdsduur van respectievelijk 24 en 48 uur. Tevens werden bij 24 uren waterbehandeling deels Agral en NaCl aan het water toegevoegd.

Voor de meting van CCC werd gebruik gemaakt van de LCMS methode die momenteel ook voor graan gebruikt wordt. De lokalisatie van CCC in peren is duidelijk verschillend. Het blijkt dat ongeveer 50% van de totale hoeveelheid CCC in de schilregio voorkomt, terwijl er nauwelijks verschillen zijn tussen cortex (vruchtvlees) en klokhuis.

De behandelingen met hoog O<sub>2</sub> en CO<sub>2</sub> hadden geen invloed op het CCC-gehalte in de peren. De 'heatshock' behandeling van 24 uur, al dan niet in combinatie met de uitvloeier Agral, leidde in beide partijen tot een vermindering van 25-30% CCC. Een langere behandelingsduur had minder resultaat evenals zouttoevoeging. Door de warmwaterbehandeling onstond schade op de schil van de vrucht in de vorm van bruine plekken. De kleur van de behandelde peren was ook iets geler terwijl de behandelde peren steviger waren dan de niet behandelde na uitstalling. Er is nog verder onderzoek nodig om de methode te finetunen en eventueel voor de praktijk te implementeren.

# 1 Inleiding

In een groot aantal partijen bewaarde Conference-peren van het groeiseizoen 1998 is geconstateerd dat het residugehalte van CCC duidelijk te hoog is. CCC wordt bij de teelt van peren gebruikt als groeiregulator. De norm voor het CCC-gehalte in peren ligt in Nederland op 3 ppm, ook in een aantal traditionele exportlanden, zoals Engeland, wordt deze norm gehanteerd.

Geschat werd dat in Nederland maar 50 % van de partijen aan deze norm konden voldoen. In de partijen met een te hoog residugehalte varieerde dit van een lichte tot soms een sterke overschrijding van de norm.

Vanwege het belang van de producenten, afzetorganisaties, handel en consument was het noodzakelijk dat er onderzoek werd uitgevoerd naar een praktische methode om het CCC-gehalte in de peren omlaag te brengen.

Eisen aan de behandelingsmethode:

- Korte behandelingsduur (enkele dagen tot enkele weken)
- Praktisch uitvoerbaar, bij voorkeur uitvoerbaar in koel/CA-cellen
- Handhaving kwaliteit peren (stevigheid, kleur en smaak) voor distributie en consument.

Het onderzoek werd uitgevoerd door het ATO en RIKILT. Het ATO richtte zich op beïnvloeding van het CCC-gehalte in de peren via diverse behandelingen. Voor de keuze van de behandelingsmethoden was nauwelijks informatie beschikbaar behalve onderzoek wat al door VTGFP was uitgevoerd. Gekozen is daarom voor methoden die de biochemische activiteit voor een korte periode verhogen waardoor een grotere kans op CCC afbraak. Het RIKILT richtte zich hoofdzakelijk op de meting van CCC en de verdeling van CCC in de peren. Dit laatste kon weer van belang zijn om gehalten via specifieke methoden te verlagen.

Het onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van het PT, de NFO en het VTGFP.

Algemene wetenswaardigheden over CCC in peer (normering, analyse, toxicologie, consumptie) zijn te vinden in bijlage 4.

## 2 Proefopzet

Na een inventarisatie van relevante kennis voor dit onderzoek (literatuur, contacten met producent BASF, onderzoekers in België (VCBT), TNO, Veilingen) is een proefopzet voorgesteld aan de opdrachtgevers. Omdat kennis over de distributie van CCC binnen de vrucht ontbrak, werd besloten om ook dit aspect in het onderzoek mee te nemen. Het is duidelijk dat deze kennis essentieel is om het juiste type behandeling te kunnen selecteren: als het CCC homogeen over de vrucht verspreid zou zijn is een oppervlaktebehandeling bijvoorbeeld relatief ineffectief. De tijdsdruk -een mogelijke behandeling zou nog relevant kunnen zijn voor peren die nog in opslag waren- was echter een beperkende factor, waardoor het onmogelijk was vóór het uitvoeren van de experimentele behandelingen nog onderzoek te doen naar de distributie in de vrucht: dus werd dit onderzoek tegelijk met de behandelingen uitgevoerd. Een andere beperkende factor bij dit onderzoek was het aantal monsters dat op CCC geanalyseerd kon worden. Zowel analysecapaciteit als -kosten zorgden ervoor dat het aantal monsters -en dus experimenten- beperkt moest blijven. Dit leidde ertoe dat bij het screenen van behandelingen de nadruk lag op extreme behandelingen, zodat eventuele effecten zo duidelijk mogelijk naar voren zouden komen. Ondanks deze benadering is steeds afgewogen of een experimentele behandeling vertaald zou kunnen worden naar een praktijkbehandeling.

Eén van de problemen die bij het vaststellen of een behandeling mogelijk succesvol is een rol speelde, is het feit dat de spreiding van het CCC-gehalte binnen een partij zeer groot was. Een statistische analyse van de resultaten van eerder door VTGFP uitgevoerd onderzoek naar deze spreiding tussen individuele peren resulteerde in de conclusie dat een tot dan toe gebruikelijke steekproefgrootte van 10 peren veel te klein was om betrouwbare conclusies te kunnen trekken over het partijgemiddelde. Als gevolg van deze observatie werd de minimale steekproefgrootte vergroot naar 50 vruchten per monster. Voor een uitgebreide analyse: zie bijlage 3.

## 2.1 Materiaal

In dit onderzoek zijn peren gebruikt van drie verschillende herkomsten.

Eén partij (Blanco, A) is afkomstig van een niet met CCC bespoten partij, aangeleverd door Fruitmasters. Dit materiaal is van groot belang om de methode waarmee CCC bepaald wordt te kunnen valideren. Het dient als blanco, maar is ook nodig om recovery-bepalingen te kunnen doen.

Voor het onderzoek naar CCC reductiebehandelingen en naar distributie van CCC in de vrucht is gebruik gemaakt van twee partijen peren. De twee partijen met CCC werden aangeleverd door the Greenery en Fruitmasters. Het CCC residu van deze partijen was herhaaldelijk bepaald t.b.v. certificering en oriënterend onderzoek van de veilingen. Hierbij was voor één partij (Laag, B) vastgesteld dat de CCC-concentratie (4 ppm) juist boven de wettelijk toegestane norm van 3.0 ppm lag (het afkeuringscriterium lag op 3.7 ppm). De andere partij (Hoog, C) overschreed deze norm zeer duidelijk. Ondanks pogingen om de maatsortering van deze partijen uniform te kiezen, is dit door praktische omstandigheden niet gelukt. In onderstaande tabel wordt de materiaalkeuze schematisch weergegeven.

**Tabel 1: Aard en codering proefmateriaal**

Tekstcode	Monstercode	Concentratie CCC (ppm)	Maatsortering
blanco	A	0	ongesorteerd
laag	B	4	(55-60 mm)
hoog	C	10	(60-65 mm)

## 2.2 Methoden om het CCC-gehalte te verlagen

Om met een gerichte behandeling een reductie van CCC in peren te kunnen bewerkstelligen is eigenlijk kennis nodig omtrent het metabolisme van CCC in de vrucht. Uit literatuuronderzoek en uit contacten met derden (TNO, BASF, VCBT., etc.) bleek dat dergelijke gegevens niet beschikbaar zijn. Tevens zijn er geen gegevens omtrent de distributie van CCC binnen de peer. Door dit gebrek aan informatie hebben wij gekozen om zoveel mogelijk gegevens omtrent het CCC-metabolisme in graan, waarover wel literatuurgegevens beschikbaar zijn te extrapoleren naar de peer.

### Behandelingen

Er werden twee typen behandelingen uitgevoerd:

- behandelingen d.m.v. extreme zuurstof- en koolzuurconcentraties
- behandelingen d.m.v. heatshock in water

In graan breekt CCC tijdens de groei (dus bij hoge metabole activiteit) in snel tempo af, en het is onduidelijk of oppervlaktebehandelingen effect hebben. Om deze redenen werden behandelingen geselecteerd waarvan verondersteld mag worden dat ze sterke stimulatie van de metabole activiteit van de vrucht tot gevolg hebben: aanpassing aan extreme O<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub>- concentraties kan leiden tot fermentatie (0 % O<sub>2</sub> + 0 % CO<sub>2</sub>) of oxidatieve stress (80% O<sub>2</sub>), met en zonder de extra stress van 20 % CO<sub>2</sub>.

Het toepassen van een heatshock leidt tot grote metabole activiteit: naast het versnellen van de normale ademhaling wordt een aanpassingsmechanisme geactiveerd dat als doel heeft het organisme te beschermen tegen de gevolgen van blootstelling aan extreme temperatuur. Naast de productie van zg. "heatshock proteins" verandert bv. de samenstelling van celwanden. Omdat de warmteoverdracht in water veel beter is dan in lucht werd de behandeling uitgevoerd in water, dit had als voordeel dat een eventueel was-effect ook meegenomen kon worden. Getracht werd dit was-effect te stimuleren door het toevoegen van zout (osmotische werking) of een oppervlakte-actieve stof ("zeep"werking) aan het behandelwater. Uit praktische overwegingen werd hiervoor als zout normaal keukenzout (NaCl) gebruikt, en als oppervlakte-actieve stof Agral (nonylfenolpolyglycoether), een uitvloeier die ook gebruikt wordt bij de applicatie van gewasbeschermingsmiddelen in de fruitteelt.

Als controle voor beide typen behandelingen werden steeds peren van partij "laag" en "hoog" (B en C) direct uit ULO-bewaring (3% O<sub>2</sub>, 0.5% CO<sub>2</sub>, -0.5°C) genomen zonder behandeling. De controles (0) werden wel hetzelfde behandeld als de behandelde peren (1 t/m 7) voor wat betreft de periode direct na de behandeling (3 tot 4 dagen bewaring in lucht bij 0°C) en het uitstalleven (3 dagen bij 18°C , 80 % RV) .



**Tabel 2: Uitvoeringsschema CCC-reductiebehandelingen**

Behandeling	Code	Omschrijving	Behandelduur	Nakoeling (lucht, 0°C)	Uitstalleven (18°C, 80 % RV)
Controle	0	Onbehandeld	geen, uit ULO	3 / 4 dagen	3 dagen
Extreme O <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub> – concentraties		%O <sub>2</sub> / %CO <sub>2</sub>	7 dagen (0°C)	3 dagen	
	1	0 / 0			
	2	80 / 0			
	3	80 / 20			
Heatshock		Toevoeging	(37°C)	4 dagen	
	4	-	24 uur		
	5	-	48 uur		
	6	0.5% NaCl	24 uur		
	7	0.005% Agral	24 uur		

CCC-  
analyse

kwaliteits  
bepaling

Alle behandelingen werden in triplo uitgevoerd met peren van herkomst B en C, steeds met 70 peren per batch.. Per batch van 70 werden 50 peren gebruikt ter analyse van CCC op het RIKILT-DLO, de overige 20 werden gebruikt voor kwaliteitsbepalingen na een uitstalperiode van 3 dagen bij 18°C. De behandelingen werden uitgevoerd in RVS containers van ca. 65 liter, de gasbehandelingen door gas van de aangegeven concentraties langs het product te laten stromen (500 ml/min.). De heatshockbehandelingen werden in soortgelijke containers uitgevoerd met water van de juiste temperatuur, al dan niet met toevoegingen (statisch). Na de behandelperiode werden de peren met koud stromend water afgespoeld en gedurende 4 dagen gekoeld bewaard in lucht.

Na deze afkoelperiode werden monsters van 50 peren per behandeling (in triplo) ter bepaling van het CCC-gehalte naar het RIKILT-DLO gebracht.

De resultaten van de analyses zijn vervolgens statistisch geanalyseerd m.b.v. een ANOVA.

## 2.3 Kwaliteitsbepalingen

Om te kunnen bepalen of de uitgevoerde experimentele behandelingen zouden kunnen resulteren in ongewenste schade werden enige algemene kwaliteitsmetingen aan de behandelde peren gedaan. Omdat in dit onderzoek de focus vooral lag in het vinden van effectieve behandelingen, moest vooral naar extreme behandelingen worden gekeken. Gezien de praktische aard van de problematiek moest echter ook in dit stadium van het onderzoek de kwaliteit van de behandelde peren bekeken worden, met name op het optreden van mogelijke schade.

Door het uitvoeren van enige snelle tests voor de uitvoering van de behandelingen konden nog enige aspecten die van grote invloed bleken op de kwaliteit worden aangepast: de behandeltemperatuur, concentratie zout en Agral van het water voor de heat-shock behandeling. Er was echter onvoldoende gelegenheid om in dit stadium deze aspecten te optimaliseren naar productkwaliteit.

Zoals in voorgaand hoofdstuk is beschreven werden van elke behandelde batch van 70 peren steeds 20 vruchten gebruikt voor kwaliteitsbepalingen. Dit gebeurde steeds na een uitstalperiode van 3 dagen bij 18°C om eventueel latent aanwezige schade ook de kans te geven om tot expressie te komen.

De volgende kwaliteitskenmerken werden bepaald:

- stevigheid (penetrometer)
- % gewichtsverlies (weging)
- uitwendige bruinverkleuring
- optreden van “Hol en Bruin”
- overige schade

## 2.4 Analyse van CCC in peren

### Meetmethode

Na extractie met methanol wordt het extract gefiltreerd over celite. Vervolgens wordt het extract verdund met water/methanol en gemeten met behulp van vloeistofchromatografie-massaspectrometrie waarbij voor CCC specifieke ionen worden gemeten. De methode is beknopt weergegeven in bijlage 1

### Bemonsteringsschema

Initiële metingen: van de geselecteerde peren zijn de volgende meetmonsters bereid

#### Eén batch peer A

- 50 peren malen en homogeniseren
  - vier potten elk circa 800 gram uitvullen rest verwijderen
  - Pot peerA1 vijf subsamples analyseren
  - Pot peerA2 vijf subsamples spiken op 3,0 mg/kg en analyseren
- 50 peren voor 3D experiment
  - schil malen en in tweevoud analyseren
  - vruchtvlees malen en in tweevoud analyseren
  - klokhuis malen en in tweevoud analyseren

#### Duplo batches peer B en peer C

- Tweemaal 50 peren halveren, Tweemaal helft malen en homogeniseren
- Pot peerB1 vijf subsamples analyseren
- Pot peerB2 vijf subsamples analyseren
- De resterende 100 helften worden gebruikt voor een 3D experiment
- schil malen en in tweevoud analyseren
- vruchtvlees malen en in tweevoud analyseren
- klokhuis malen en in tweevoud analyseren

### Meting behandelde peren

Vervolgens zijn 42 batches van elk 50 peren welke conform hoofdstuk 2.2 zijn behandeld in bewerking genomen.

### 3 Resultaten en discussie

#### 3.1 Initiële CCC-metingen

De monsters zoals beschreven in 2.4 zijn gemeten.

In eerste instantie zijn de peren onderzocht welke aangeleverd waren met de vermelding dat geen CCC was gebruikt, de zogenaamd blanco peren (peren A). Deze peren bevatte inderdaad geen aantoonbare hoeveelheid CCC. Vervolgens zijn uit deze partij vijf subsamples genomen welke ieder (onafhankelijk) gespiked zijn op 3,0 mg/kg. Deze monsters zijn met de beschreven methode geanalyseerd. De resultaten zijn vermeld in tabel 3. (V.C. is de variatie coëfficiënt in procenten)

**Tabel 3: Resultaten kwaliteitscontrolemonsters**

Monster	Gehalte in mg/kg	Recovery (%)
QAsp1	1,86	62,1
QAsp2	2,09	69,7
QAsp3	2,10	69,9
QAsp4	2,05	68,4
QAsp5	2,18	72,8
	Gem	68,6
	Std	3,98
	V.C. (%)	5,80

Alhoewel van de toegevoegde 3 ppm de terugvinding lager is dan verwacht kan de methode, gezien de geringe spreiding, gebruikt worden.

Vervolgens zijn de twee batches peren onderzocht welke waren aangeleverd met de classificatie "laag gecontamineerd" (peren B). De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 4a en 4b

**Tabel 4a: Resultaten onderzoek peren B (laag) batch 1**

Monsters	Gehalte in mg/kg	
Peer B1.1	4,94	
Peer B1.2	5,05	
Peer B1.3	6,22	
Peer B1.4	4,38	Zonder
Peer B1.5	4,85	Peer B1.3
	Gem 5,09	4,80
	Std 0,68	0,30
	V.C. (%) 13,42	6,15

**Tabel 4b: Resultaten onderzoek peren B (laag) batch 2**

Monster	Gehalte in mg/kg
Peer B2.1	4,28
Peer B2.2	4,08
Peer B2.3	3,81
Peer B2.4	3,84
Peer B2.5	4,07
	Gem 4,02
	Std 0,20
	V.C. (%) 4,87

Vervolgens zijn de twee batches peren onderzocht welke waren aangeleverd met de classificatie "hoog gecontamineerd" (peren C). De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 5a en 5b

**Tabel 5a: Resultaten onderzoek peren C (hoog) batch 1**

Monster	Gehalte in mg/kg
Peer C1.1	10,86
Peer C1.2	9,91
Peer C1.3	9,68
Peer C1.4	9,80
Peer C1.5	9,29
	Gem 9,91
	Std 0,58
	V.C. (%) 5,87

**Tabel 5b: Resultaten onderzoek peren C (hoog) batch 2**

Monster	Gehalte in mg/kg
Peer C2.1	10,96
Peer C2.2	9,77
Peer C2.3	11,47
Peer C2.4	11,58
Peer C2.5	10,08
	Gem 10,77
	Std 0,82
	V.C. (%) 7,57

### 3.2 Distributie van CCC in de peer

Nadat de initiële metingen waren uitgevoerd is een zogenaamd 3D experiment uitgevoerd. Het doel van dit experiment was na te gaan waar de CCC zich in de peer bevindt; de schil, het klokhuis of in het vruchtvlees.

Hiertoe zijn, zie 2.3, de peren geschild en van de klokhuisen ontdaan.

De schillen, het vruchtvlees en de klokhuisen zijn gehomogeniseerd in bewering genomen. Dit is voor de drie monsters peren gedaan dus zowel voor de blanco, de laag gecontamineerde en de hoog gecontamineerde.

De resultaten van de blanco peren spraken voor zich. De schil, het klokhuis en het vruchtvlees bevatte geen aantoonbare hoeveelheid CCC.

De resultaten van de laag gecontamineerde peren zijn gegeven in tabel 6 en die van de hoog gecontamineerde peren in tabel 7. Uit het onderzoek blijkt dat een groot deel van de aanwezige CCC zich in de schil bevindt. Het schillen van de peer verdient derhalve dan ook aanbeveling om de inname bij consumptie te reduceren.

**Tabel 6: Resultaten 3D experiment: peren B (laag)**

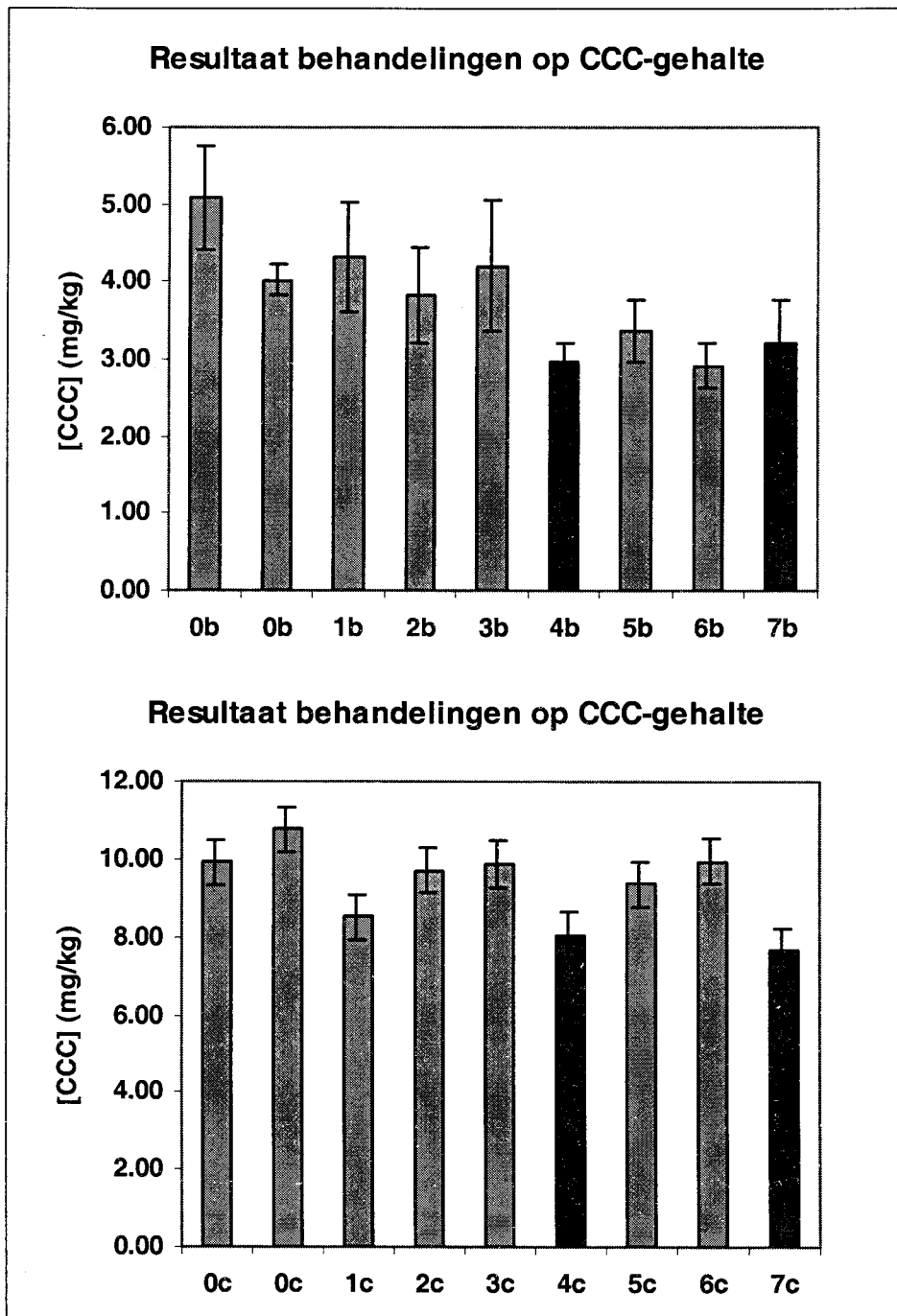
Peren B	CCC (mg/kg)	Gewicht (g)	Hoeveelheid CCC (mg)	% CCC
Schil	15,57	448,5	6,98	62,66
Vruchtvlees	1,58	2440,8	3,85	34,54
Klokhuis	1,23	253,8	0,31	2,80
Totaal	-	3143,1	11,14	3,55

**Tabel 7: Resultaten 3D experiment: peren C (hoog)**

Peren C	CCC (mg/kg)	Gewicht (g)	Hoeveelheid CCC (mg)	% CCC
Schil	34,55	563,2	19,46	50,50
Vruchtvlees	4,87	3521,4	17,14	44,47
Klokhuis	5,20	372,4	1,94	5,03
Totaal	-	4457,0	38,53	8,65

### 3.3 Invloed behandelingsmethoden op CCC

Voor een overzicht van het effect van de uitgevoerde behandelingen: zie onderstaande figuur.



**Figuur 1 :** Resultaat van de behandelingen op het CCC-gehalte in peren met een laag CCC-gehalte (herkomst B, ca. 4 ppm, bovenste grafiek) en een hoog CCC-gehalte (herkomst C, ca. 10 ppm, onderste grafiek). Behandelingen: 0 = controle, 1 t/m 3 = %O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> resp. 0/0, 80/0 en 80/20, 4 t/m 7 = heatshock resp. 24 uur, 48 uur, 24 uur met 0.5 % zout en 24 uur met 0.005 % Agral. De CCC-reductie als gevolg van behandeling 4 en 7 is statistisch betrouwbaar ( $p < 0.05$ ).

Om te bepalen welke behandelingen succesvol zijn werd bij de statistische analyse m.b.v. een ANOVA gekeken welke behandelingen voor beide herkomsten een significante reductie ( $p < 0.05$ ) ten opzichte van de onbehandelde controle gaven. Dit bleek het geval te zijn voor behandeling 4 en 7, resp. 24 uur heatshock in water (gemiddeld 26 % reductie) en 24 uur heatshock in water met 0.005% Agral (gemiddeld 27 % reductie). Andere behandelingen zijn niet significant verschillend. De extreem  $O_2/CO_2$ -behandelingen sorteren geen effect, en wat opvalt is dat de 48 uur heatshock niet leidt tot reductie van het CCC-gehalte, terwijl 24 uur heatshock dit wel doet. Verder lijkt toevoeging van zout aan het behandelwater eerder concentratieverhogend te werken (net niet significant).

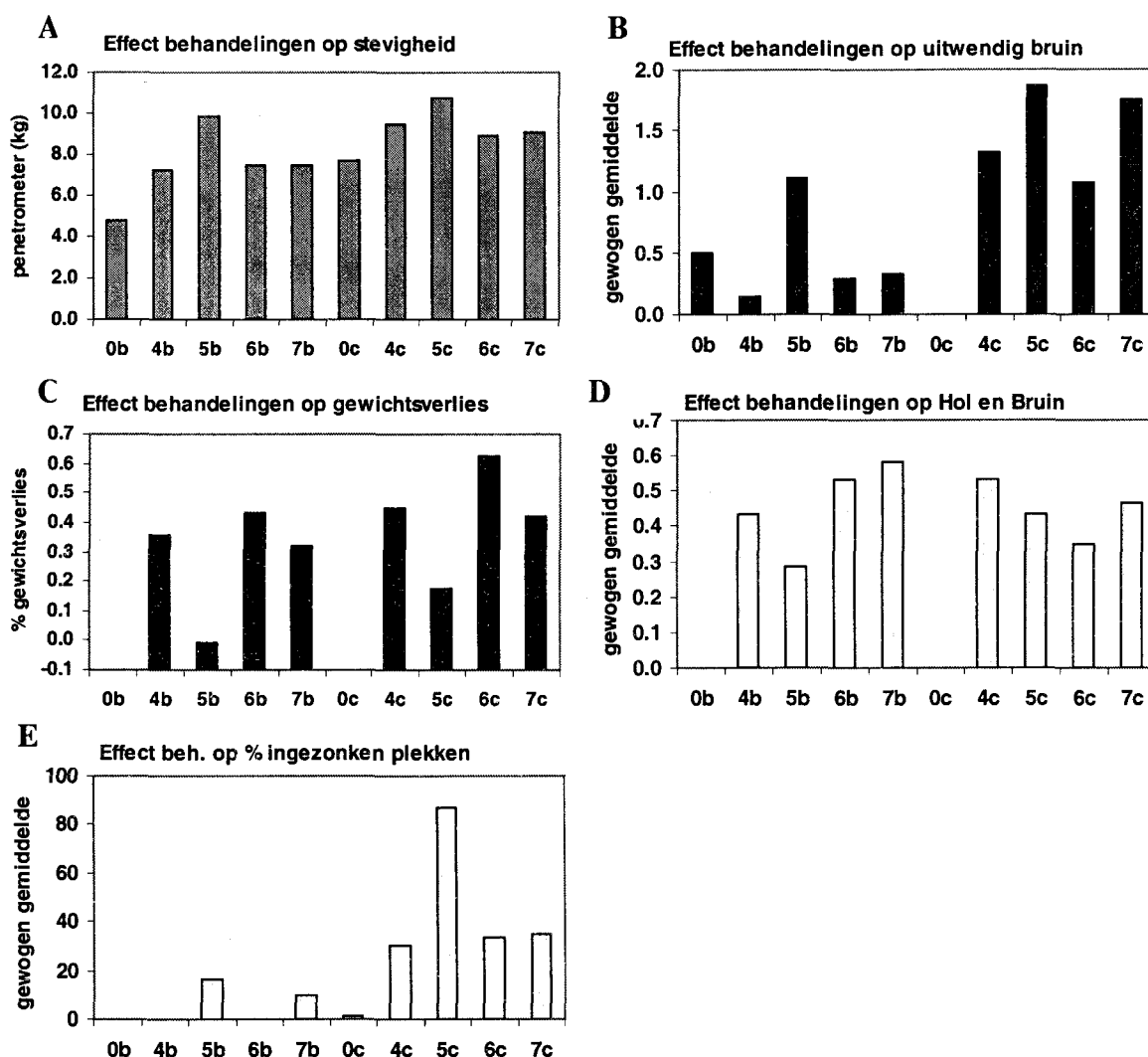
Het is duidelijk dat er een effect is van de 24 uur heatshock-behandeling (met en zonder Agral) is, over de aard van de werking valt slechts te speculeren. Van het behandelwater zijn overigens monsters genomen en ingevroren, om eventueel in een later stadium te analyseren. Dit zou informatie kunnen geven over de aard van het behandelings-effect: is de CCC opgelost in het behandelwater of is het door de peren zelf gemetaboliseerd ?



### 3.3 Effecten behandelingen op kwaliteit

Omdat de extreem O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-behandelingen geen effect sorteren, zijn de effecten van deze behandelingen op de kwaliteit niet relevant voor dit onderzoek. Daarbij waren er geen duidelijke afwijkingen waarneembaar t.o.v. de onbehandelde controle. De resultaten worden hier dan ook niet gepresenteerd.

In onderstaande figuren wordt het effect van de verschillende heatshock-behandelingen op stevigheid, gewichtsverlies, uitwendig bruin, "Hol en Bruin" en het voorkomen van ingezonken plekken -een specifiek bij (met name de 48 uur) heatshock voorkomende afwijking- weergegeven.



**Figuur 2:** Resultaat van de heatshock-behandelingen op verschillende kwaliteitskenmerken van peren (grafieken A t/m F) met een laag CCC-gehalte (herkomst B, ca. 4 ppm, linkerdeel grafieken) en een hoog CCC-gehalte (herkomst C, ca. 10 ppm, rechterdeel grafieken). Behandelingen: 0 = controle, 4 t/m 7 = heatshock resp. 24 uur, 48 uur, 24 uur met 0.5 % zout en 24 uur met 0.005 % Agral.

Het effect van de heatshock-behandelingen op de stevigheid van de peren (grafiek A) is een duidelijke toename t.o.v. de controles (0b, 0c). Zoals bekend kan een heatshock-behandeling effect hebben op de celwandstructuur van vruchten, bovendien is mogelijk de afrijping zoals deze normaal plaatsvindt tijdens een uitstalperiode geremd. Dit was niet waarneembaar aan de kleur van de peren, de behandelde peren waren i.h.a. iets meer vergeeld dan de bijbehorende controlepartijen. Deze vergeling leek overigens niet geheel op de chlorofylvergeling zoals deze normaal bij rijping optreedt, maar was wat meer bronskleurig. De stevigheidstoename is het grootst bij de langst behandelde peren (5b, 5c). Dit lijkt niet het gevolg van extra uitdroging, juist deze lang behandelde peren hebben een relatief gering gewichtsverlies t.o.v. de controle (grafiek C).

In grafieken **B** en **D** staan de gewogen gemiddelden van resp. uitwendig bruin (lokale bruinverkleuringen van de schil) en "Hol en Bruin" (grafiek **E**), een bekende afwijking in Conference die gerelateerd is aan o.m. het CO<sub>2</sub>-gehalte van de bewaaratmosfeer. Deze gewogen gemiddelden zijn gemiddelden per 20 beoordeelde peren, dus door vermenigvuldiging met een factor 5 kunnen de percentages verkregen worden. De ca. 2% toename van het voorkomen van "Hol en Bruin" a.g.v. de heatshock-behandeling lijkt voor de diverse behandelingen en herkomsten niet duidelijk te verschillen. Omdat de schade slechts als een lichtbruine puntvormige schade bij het klokhuis optradt (eerste zichtbare fase van "Hol en Bruin") en in een lage frequentie, is de gesignaleerde uitgebreide uitwendige schade van veel groter belang.

De uitwendige schade is duidelijk het grootst bij de peren van herkomst c. Deze peren waren groter dan die van herkomst b (resp. 60-65 mm en 55-60 mm). Met name bij peren van herkomst c werd een hoog percentage bruine ingezonken plekken in de schil waargenomen. Ook een langere behandelduur (48 uur) leidde duidelijk tot meer schade bij beide partijen (b en c). De ingezonken plekken lijken het gevolg van lokale necrose en verdroging van het juist onder de schil gelegen vruchtvlees, waarschijnlijk als gevolg van een laesie in de schil. De bruine plekken op de schil zonder inzinkingen zijn mogelijk het gevolg van hetzelfde probleem, waarbij kennelijk minder schade aan het onder de schil gelegen weefsel is opgetreden. Direct na de behandeling waren incidenteel al iets ingezonken groene plekjes op de schil waarneembaar, maar even als voor de andere bruine verkleuring van de schil, was de schade direct na de behandeling veel geringer dan na de uitstalperiode van 3 dagen bij 18°C. Daarnaast werd geobserveerd dat de kleur van de stelen van de behandelde peren wat donkerder (soms zwart) was dan de controles.

Dit alles geeft aan dat voor het geschikt maken van de heatshock-behandeling voor praktische toepassing, zeker aandacht besteedt dient te worden aan preventie van met name uitwendige schade. Door kleine variaties in behandelduur en -temperatuur kunnen dergelijke beschadigingen mogelijk vermeden worden, met name omdat de behandeltemperatuur zeer kritisch (hoog) gekozen is. Optimalisatie hiervan viel buiten het kader van dit onderzoek.

## 4 Conclusies

- Een heatshockbehandeling (37°C) van 24 uur in water met / zonder 0.005% Agral vermindert het CCC-gehalte van Conference (met een residu van 4-10 ppm) significant met resp. 26 en 27 %
- De overige behandelingen (extreme zuurstof/koolzuur-condities, heatshock 24 uur met 0.5% zout, heatshock 24 uur hadden geen aantoonbaar effect
- Een heatshockbehandeling kan leiden tot een beter stevigheidsbehoud na een uitstalperiode
- Een heatshockbehandeling kan leiden tot uitwendige schade aan de schil: bruine en ingezonken bruine plekken
- CCC is in de vrucht niet homogeen verdeeld: in de schil, het vruchtvlees en het klokhuis bevinden zich resp. 63, 34 en 3 % bij de peren met een gemiddeld CCC-gehalte van 4 ppm, en resp. 51, 44 en 5 % bij de peren met een gemiddeld CCC-gehalte van 10 ppm.

## 5 Aanbevelingen vervolgonderzoek

Het lijkt mogelijk om met een heatshockbehandeling het CCC-gehalte van gecontamineerde peren met ongeveer een kwart te verlagen. In de praktijk betekent dit dat een dergelijke behandeling alleen relevant zou kunnen zijn voor partijen met een residu dat juist boven de wettelijke norm ligt (tot maximaal 5 ppm). Het is moeilijk in te schatten of de te ontwikkelen behandeling effectiever zou kunnen zijn dan de hier bij deze snelle inventarisatie toegepaste methode.

Voor het ontwikkelen van een in de praktijk toepasbare methode is echter nader onderzoek nodig om:

- Uitwendige schade aan de peren te voorkomen
- Het behandelingseffect te optimaliseren (behandeltemperatuur en –duur, additieven)
- De technische en economische uitvoerbaarheid te toetsen

Om gericht tot een succesvolle behandeling te kunnen komen, is meer kennis over het afbraakmechanisme van CCC in de peer vereist.

Preventieve maatregelen tegen normoverschrijding zijn natuurlijk verreweg het effectiefste middel, maar indien ook komend seizoen verhoogde CCC-gehalten in peren verwacht kunnen worden (bijvoorbeeld door ophoping in het gewas ?) dient in een vroeg stadium tot nader onderzoek besloten te worden teneinde genoeg tijd te hebben om voor het einde van het bewaar seizoen tot een praktische behandeling te komen.

# Bijlagen

## Bijlage 1 : Methode voor de bepaling van CCC in peren

### Monstervoorbereiding

- Weeg 20 gram monster af in een erlenmeyer
- Voeg toe 20 ml methanol en UT gedurende 30 sec
- Sluit af en schudt gedurende 4 uur
- Voeg toe 10 ml celite 545 en schudt krachtig
- Breng een filtreerpapiertje in een Brugger trechter
- Bevochtigt het papiertje met een beetje water 1:1
- Breng op het filtreerpapiertje een dun laagje celite 545 aan
- Schakel de vacuümpomp aan en filtreer het extract.
- Breng extract kwantitatief over in een maatcilinder van 100 ml
- Spoel het Buchner opvangvat na met tweemaal 10 ml water/methanol (1:1)
- Vul de maatcilinder aan tot 100 ml met water/methanol (1:1) en meng
- Vul een autosamplervial en vries het restant van het extract in.
- Biedt de vials aan voor analyse.

### Meetmethode

LC-kolom      Waters symmetry C18  
Eluens        Water + pentafluorpropionzuur (5 mMolair) (op pH 4 brengen met ammonia)  
                  Methanol (88:12 V/V) \*1  
Flow            0,2 ml/min  
Injectievol.   10 ul\*2  
Meting single MS mode M/Z 122 en 124

## Bijlage 2 : analyseresultaten van het CC onderzoek

gehalte in mg/kg  
gecorrigeerd voor recovery

	gem. [CCC](mg/kg)	std. [CCC](mg/kg)	Penetrometer (kg)	ggem UB	ggem HB	% ingezonken plekken	% gewichtsverandering
0b	5.1	0.7	4.8	0.5	0.0	0.0	
0b	4.0	0.2			0.0	0.0	
1b	4.3	0.7			0.0	0.0	
2b	3.8	0.6			0.0	0.0	
3b	4.2	0.8			0.0	0.0	
4b	3.0	0.3	7.2	0.2	0.4	0.0	-0.4
5b	3.4	0.4	9.9	1.1	0.3	16.7	0.0
6b	2.9	0.3	7.5	0.3	0.5	0.0	-0.4
7b	3.2	0.6	7.4	0.3	0.6	10.0	-0.3
0c	9.9	0.6	7.7	0.0	0.0	1.3	
0c	10.8	0.8			0.0	0.0	
1c	8.5	0.8			0.0	0.0	
2c	9.7	1.9			0.0	0.0	
3c	9.9	2.0			0.2	0.0	
4c	8.1	0.8	9.5	1.3	0.5	30.0	-0.5
5c	9.4	1.3	10.8	1.9	0.4	86.7	-0.2
6c	9.9	0.3	8.9	1.1	0.4	33.3	-0.6
7c	7.7	1.4	9.0	1.8	0.5	35.0	-0.4

### Bijlage 3: Steekproefgrootte CCC-monsters

#### Omschrijving

Partijen peren (ieder van enkele tonnen) moeten onderzocht worden op CCC gehalte. Gevraagd wordt hoeveel peren onderzocht moeten worden om met een zekere betrouwbaarheid (90% en 95%) en verschillende nauwkeurigheden (0.05, 0.10, ..., 1.00 ppm) uitspraken te doen over het *gemiddelde* gehalte CCC in de partij.

#### Methode

Uit een steekproef van omvang  $n$  wordt het gemiddelde gehalte CCC in de partij geschat als:

$$\overline{CCC} = \frac{\sum_{i=1}^n CCC_i}{n}$$

Bij niet teruglegging en als de steekproefomvang klein is t.o.v. de partijomvang (is het geval) is de standaard afwijking van *het steekproefgemiddelde*:

$$s_{\overline{CCC}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

waarbij  $s$  de standaard afwijking van het CCC gehalte van individuele peren in de partij is.

De benodigde steekproefgrootte hangt behalve van de standaardafwijking van het steekproefgemiddelde, ook van de gewenste betrouwbaarheid en de gewenste nauwkeurigheid af. Stel dat we steekproefomvang  $n$  zoeken zodanig dat met 95% betrouwbaarheid het gemiddelde CCC gehalte ligt tussen  $(\overline{CCC} - D)$  en  $(\overline{CCC} + D)$ . D.w.z. dat in 95 van de 100 gevallen het werkelijke gemiddelde CCC gehalte ligt binnen het steekproefgemiddelde  $\pm D$ .

Bij een normale benadering is  $D$  dan 1.96 maal de standaard afwijking van de schatting. Dus:

$$\begin{aligned} D &= 1.96 \cdot s_{\overline{CCC}} \\ &= 1.96 \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \end{aligned}$$

Zodat de steekproefomvang  $n$  groter of gelijk moet zijn aan:

$$n \geq \left( 1.96 \cdot \frac{s}{D} \right)^2$$

Is de gewenste betrouwbaarheid 90% (i.p.v. 95%), dan moet 1.96 in de formule vervangen worden door 1.645.

## Resultaten

De standaard afwijking van het CCC gehalte van individuele peren in een partij is geschat als 1.780886

De tabel laat voor enkele  $D$  de benodigde steekproefomvang zien bij 90% en 95% betrouwbaarheid.

Benodigde steekproefomvang		
<i>0.05</i>	3433	4874
<i>0.10</i>	859	1219
<i>0.15</i>	382	542
<i>0.20</i>	215	305
<i>0.25</i>	138	195
<i>0.30</i>	96	136
<i>0.35</i>	71	100
<i>0.40</i>	54	77
<i>0.45</i>	43	61
<i>0.50</i>	35	49
<i>0.55</i>	29	41
<i>0.60</i>	24	34
<i>0.65</i>	21	29
<i>0.70</i>	18	25
<i>0.75</i>	16	22
<i>0.80</i>	14	19
<i>0.85</i>	12	17
<i>0.90</i>	11	15
<i>0.95</i>	10	14
<i>1.00</i>	9	13

## Conclusie

Accepteert men een foutenmarge van 5% van de norm ( $D = 0.05 \times 3 \text{ ppm} = 0.15 \text{ ppm}$ ) en wil men het in 95 van de 100 gevallen goed hebben (95% betr.), dan moet de steekproefomvang minstens 542 zijn.

Bij een steekproefomvang van 10 kan men dus met 90% betrouwbaarheid zeggen dat het werkelijke partij gemiddelde ligt tussen het steekproefgemiddelde - 0.95 ppm en het steekproefgemiddelde + 0.95 ppm.

N.B. Op grond van de centrale limietstelling is de normale benadering gerechtvaardigd voor een steekproefomvang groter dan circa 30.

Bij een kleinere steekproefomvang is het beter om een t-verdeling te nemen. Men zou dan op iets grotere aantallen komen dan in de tabel vermeld.



## **Bijlage 4 : CCC in peren (algemeen)**

### Inleiding

Chlormequat chloride (CCC) is een quaternair ammonium zout ( $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ ) en behoort tot de groep van groeiregulatoren. Middelen op basis van deze actieve stof zijn in Nederland toegestaan voor gebruik in de teelt van haver, tarwe, peer en diverse siergewassen. Het middel wordt veel toegepast in de perenteelt. Door het toepassen wordt de bloemvorming gestimuleerd hetgeen een groter aantal vruchten oplevert. Een bijkomend voordeel is dat het vroegtijdig afvallen van het fruit voorkomen wordt. De stof wordt onder andere door de wortels en mogelijk ook door het blad opgenomen en verspreid zich door de hele plant. Het middel is dus systemisch en zal zich ook in het vruchtvlees bevinden. Het schillen of afspoelen van de schil is dan ook niet afdoende om het middel te verwijderen. Natuurlijke groeihormonen worden in zeer kleine hoeveelheden door de plant geproduceerd en deze kleine hoeveelheden zijn i.h.a. voldoende om de groei te regelen. Van chlormequat is bij toepassing door bespuiting van de bomen echter een aanzienlijke hoeveelheid nodig om de groei negatief te beïnvloeden.

Het maximaal toelaatbare gehalte in peren in Nederland is 3 mg/kg op productbasis (berekend als chloormequat-kation).

De in Engeland door enkele grootwinkelbedrijven geconstateerde overschrijdingen van de norm in peren, welke door TNO zijn bevestigd, zouden veroorzaakt kunnen zijn door de weersomstandigheden in het voorjaar van 1998. Tengevolge van de overvloedige regenval en de lage temperaturen heeft er mogelijk onvoldoende afbraak plaatsgevonden. Er zijn echter ook geruchten over (illegaal) gebruik later in het seizoen, waardoor de wachtermijn van 90 dagen niet kon worden aangehouden en de residuen hoger werden

### Residunormen

De norm voor peren is 3 mg/kg (Europees geharmoniseerd, sinds Richtlijn 96/32 van kracht werd; de voordien geldende harmonisatie in Richtlijn 76/895 stond nationaal hogere residuenormen toe). De Nederlandse norm was tot mei 1997 hoger (10 mg/kg), omdat er proefgegevens zijn waaruit blijkt dat soms hogere residuen kunnen voorkomen bij de toegestane gebruiksomstandigheden. In Europa is de norm in Richtlijn 96/32 lager gesteld omdat enerzijds de toxicologie omstreden was bij de opstelling van de norm, en anderzijds het datapakket voor de onderbouwing van de residu-norm onvoldoende was. Om die laatste reden is de norm ook tijdelijk: als er geen bijkomende gegevens komen vervalt de norm eind april 2000, tot een nul-tolerantie op het niveau 0,05 mg/kg. In de Codex is er geen vaste eis voor het aantal proefnemingen als grondslag voor de norm; de bestaande norm daar is 3 mg/kg, en er is een concept-norm in bespreking van 10 mg/kg, gebaseerd op de Nederlandse proeven.

De in jan/febr. 1999 gevonden gehalten zijn structureel hoog en soms uitzonderlijk hoog (tot ca 20 mg/kg), en moeilijk verklaarbaar vanuit nu toegestane GAP (goed agrarisch gebruik, gelijk te stellen aan het toegestane gebruik). Het is niet duidelijk of het slechte weer in zomer en herfst 1999 hiervoor de verklaring kan zijn. Er zijn (nog onbevestigde) geruchten over illegaal gebruik later in het seizoen, om de peren te

behoeden voor voortijdige val. Dat zou een mogelijke verklaring voor de hogere gehalten kunnen zijn.

Naast een residunorm voor peren zijn er residunormen voor granen en druiven. Wereldwijd gezien is het gebruik in granen de belangrijkste toepassing van chloormequat. De EU-normen zijn 1 mg/kg voor druiven, 5 mg/kg voor haver en 3 mg/kg voor de andere granen. In de Codex zijn de bestaande normen voor granen wat hoger (haver 10 mg/kg, overige 5 mg/kg); sinds 1994 zijn er voorstellen in bespreking voor een verlaging van deze normen, voor tarwe naar 2, rogge 3, gerst 0,5 mg/kg; haver blijft hoog op 10 mg/kg.

### Controle

Het door Engelse bedrijven vinden van de normoverschrijdingen in exportperen vanuit Nederland roept de vraag op waarom dit niet in Nederland zelf is geconstateerd en hoe de controle in Nederland eruit ziet. Chloormequat is niet met een multimethode te detecteren en vereist speciaal onderzoek; daarom is er geen veelvuldige controle op, tenzij daar redenen voor zijn. De hoge norm die vroeger in Nederland geldig was, gaf ook weinig aanleiding om normoverschrijding te vrezen. Sinds enkele jaren is er, in relatie tot verplichtingen vanuit de EU om de controleinspanning vooraf en achteraf te rapporteren, in Nederland een Nationaal Plan voor de controle op residuen van bestrijdingsmiddelen in plantaardige producten. In het kader van dit plan worden jaarlijks ca. 5000 monsters geanalyseerd op residuen van bestrijdingsmiddelen. Er zijn echter zeer veel bestrijdingsmiddelen, en de prioriteiten voor het onderzoek worden gesteld aan de hand van de kans op normoverschrijding en het belang van de stof en van het product (met het oog op de consumptie en de eventuele risico's voor de volksgezondheid). In dit plan waren voor 1998 20 analyses van peer op chloormequat voorzien; dit onderzoek blijkt achteraf niet te zijn uitgevoerd (waarschijnlijk i.v.m. de drastische reorganisatie bij de IGB en de grote vermindering van het aantal onderzochte monsters). Het (in 1996) uitgevoerde onderzoek door de Inspectie W en V dat in 1998 werd gerapporteerd gaf als resultaat: 14 monsters (van de 24) met residuen chloormequat, gemiddelde hierin 1,5 mg/kg (spreiding 1,1 - 2,0). De detectiegrens was 0,56 mg/kg. Dat gaf dus geen reden voor verontrusting, en de conclusie was dat geen extra aandacht nodig was voor dit residu in peren. Na het bekend worden van de huidige residuproblemen rond chloormequat is de IGB met spoed weer begonnen met dit onderzoek. Het is gebruikelijk dat de producenten, c.q. de veilingen ook controles uitvoeren om een vinger aan de pols te houden.

### Analysemethodieken

Gezien de chemische en fysische eigenschappen van chlormequat is de analyse bijzonder lastig. Tengevolge van de moleculaire structuur, het betreft een quaternair ammonium zout met een molecuulgewicht van 158, kan de interpretatie van de analyseresultaten leiden tot vals positieve resultaten. Er zijn in de literatuur twee principieel verschillende methoden beschreven.

Bij de eerste methode wordt na een extractie een opzuivering en een derivatisering het uit chlormequat gevormde ethyn (acetyleen) met behulp van gaschromatografie en

b.v. massaspectrometrie gemeten. Een nadeel van deze methode is dat er niet gemeten wordt aan het intacte molecuul maar aan een derivaat. Theoretisch bestaat de mogelijkheid dat er van "nature" aanwezige stoffen de bepaling kunnen interfereren. Een voorbeeld van zo'n interferentie is het etheen dat door de vrucht geproduceerd wordt. Een oplossing voor dit bekend probleem is het afdampen van eventueel aanwezig etheen tijdens de opwerking.

De tweede methode is recentelijk gepubliceerd (wordt vermoedelijk ook in Engeland en door TNO gebruikt) is gebaseerd op een meting met vloeistof chromatografie gekoppeld aan een massaspectrometer. De opwerking is relatief simpel waardoor de totale analysetijd ten opzichte van de gaschromatografische methode kort is.

Vraagtekens kunnen geplaatst worden bij de specificiteit van de analyse. Door het lage molecuulgewicht en de gekozen parameters is het niet denkbeeldig dat van "nature" aanwezige verbindingen de methoden storen en aanleiding geven tot vals negatieve resultaten

### Toxicologie van Chloormequat.

Het leidend principe bij bestrijdingsmiddelen is dat deze alleen voor gebruik kunnen worden toegelaten als er een dosis kan worden vastgesteld die als veilig voor de gezondheid kan worden beschouwd. Deze veilige dosis wordt uitgedrukt als de aanvaardbare dagelijkse inname (ADI) en geldt voor de inname gedurende het gehele leven. De basis hiervoor zijn dierproeven, en de ADI wordt afgeleid van de laagste relevante veilige dosis voor dieren, met een passende veiligheidsfactor (meestal 100). In gevallen waarin duidelijk is dat de stof acuut toxische eigenschappen heeft, wordt sinds enige jaren ook een acute referentie dosis vastgesteld. ADI's kunnen nationaal worden vastgesteld, of op Europees niveau; internationaal hebben de door de expertgroepen van de WHO vastgestelde ADI's een groot gezag en worden meestal nationaal overgenomen.

Chloormequat heeft in 1997 door de JMPR (WHO) opnieuw een ADI gekregen, van 0,05 mg/kg, nadat deze enige jaren ingetrokken is geweest omdat bij de herbeoordeling in 1994 werd geconstateerd dat er onvoldoende gegevens waren voor het vaststellen van een ADI volgens de huidige maatstaven (de oude ADI, die op hetzelfde niveau lag, dateerde uit 1972).

In het JMPR-report 1997 staat vermeld dat chloormequat matig acuut oraal toxisch was voor ratten, muizen, hamsters, cavia's en apen (LD50 = 200-1000 mg/kg lg), terwijl konijnen en honden gevoeliger bleken (LD50 = 50-80 mg/kg lg). De ADI van 0,05 mg/kg lg wordt vervolgens met een veiligheidsfactor 100 afgeleid uit de studie met de laagste NOAEL (4,7 mg/kg lg, equivalent aan 150 mg/kg in het volledige voer), namelijk een 1 jaar durend toxiciteitsonderzoek bij honden. Het effect bij de dosis met het laagste effect (bij 2 maal de NOAEL, dus ca 10 mg/kg lg) was diarree, speekselvloed en overgeven. Er waren redelijk wat andere studies (hoewel niet alle even goed gerapporteerd) over andere proefdieren, met soms veel hogere NOAELs. Een beetje verborgen in een tabel (niet vermeld in de tekst) is vermeld als LD50 bij de kat: 7-50 mg/kg. Chloormequat wordt door de WHO als "slightly hazardous" geclassificeerd. In Nederland is geen gevaarssymbool vereist voor Cycocel en de andere chloormequat-formuleringen. Er wordt door de JMPR geen beschouwing gewijd aan en geen conclusie getrokken over (de noodzaak van) een ARfD. De lage LD50 van de kat en de trouwens ook relatief lage LD50-waarden van hond en konijn wijzen echter duidelijk op acute toxiciteit van chloormequat. De afstand tussen LD50

en NOAEL bij de hond is nogal klein (factor 10), de dosis-effect relatie is dus steil. Inmiddels is nationaal overeenstemming bereikt over de gedachte dat de JMPR eigenlijk een ARfD had moeten vaststellen, omdat het dossier voldoende aanwijzingen bevat om te concluderen dat chloormequat acuut toxisch is. Het RIKILT heeft ook literatuurgegevens gevonden die wijzen op een mogelijk hoge gevoeligheid van de mens voor deze stof. Er is een melding van een dodelijk ongeluk door het inslikken van een slok van een chloormequat-houdend middel en er zijn enkele referenties over gebruik bij zelfdoding gevonden. Deze gegevens zijn door het RIKILT aan het RIVM en aan VWS doorgegeven. Een hieruit voortkomende voorlopige schatting van het RIVM van de acute toxiciteit komt uit op het gelijk stellen van de Acute Referentie Dosis aan de ADI.

Een ADI geldt voor 'life long' exposure. Het is dus wetenschappelijk niet terecht om de consumptie van een enkele dag te vergelijken met een ADI. Beleidsmatig wordt er van uitgegaan dat de ADI voor de gemiddelde consumptie niet mag worden overschreden. Daarbij is nationaal of internationaal nog niet precies vastgelegd in hoeverre met de uiteenlopende consumptie van bepaalde groepen consumenten (waaronder leeftijdsgroepen) rekening moet worden gehouden, bij de toetsing of de ADI wordt overschreden. Er is overeenstemming over het feit dat we bij de toetsing van de mogelijkheid van overschrijding van de ADI uit mogen gaan van de maximaal te verwachten gemiddelde gehalten van de betreffende stof in het voedingsmiddelenpakket, omdat niemand chronisch steeds aan de uitschieters zal worden blootgesteld. Wetenschappers zijn het er ook over eens dat beperkte overschrijding van de ADI (bijv. met een factor 2 ~ 3) op een enkele dag niet gevaarlijk is, mits de stof niet acuut toxisch is. Meestal is de acute toxiciteit van een stof immers veel lager dan de chronische toxiciteit bij langdurige blootstelling, en de ADI is dan op het laatste effect gebaseerd, omdat het effect dat op het laagste doseringsniveau optreedt meestal bepalend is voor de ADI. Daarnaast is zijn er natuurlijk ook nog altijd de nodige veiligheidsfactoren, doorgaans een factor 100 t.o.v. het niveau van geen effect bij het gevoeligste proefdier. Gevoelsmatig is het voor een consument vaak moeilijk te begrijpen dat een tijdelijke overschrijding van de ADI niet erg zou zijn. Er wordt immers gesproken over de Aanvaardbare Dagelijkse Inname. Het is dus van belang duidelijk en consistent te zijn bij voorlichting hierover aan het algemene publiek. In grote lijnen kunnen we hier spreken van een internationaal breed gedragen beleid.

Als er sprake is van acute toxiciteit van een stof wordt de beoordelingsbasis anders. Sinds enkele jaren is het gebruikelijk geworden om voor acuut toxische stoffen ook een advieswaarde op te stellen voor de gevaarsaspecten van een kortdurende inname (een maaltijd, of een dag bijv.), de acute referentiedosis (ARfD). Deze advieswaarde wordt afgeleid van de bekende acute gezondheidseffecten, eveneens met een veiligheidsfactor, en is in het ergste geval gelijk aan de ADI, maar meestal een factor 3 tot 20 hoger dan de ADI (als het verschil nog groter zou zijn, is het niet meer relevant om een ARfD op te stellen). Een belangrijk verschil met de ADI is de interpretatie, want het gaat nu niet meer om de gemiddelde consumptie over een langere tijd, maar over de blootstelling gedurende een maaltijd of een dag, die niet mag worden overschreden. De bepaling van de inname ziet er dan heel anders uit, want we moeten nu rekening houden met de hoogste residuen die in de praktijk kunnen optreden in een portie voedingsmiddel, en met de hoogste individuele consumptie.

### Innameberekeningen

De toetsing van de vraag of er mogelijk een risico voor de volksgezondheid aanwezig is wordt uitgevoerd door de geschatte inname te vergelijken met de ADI, resp. de ARfD. Daarbij is kennis van de voedselconsumptiegegevens onontbeerlijk.

### Perenconsumptie in Nederland

In 1997/98 is de meest recente Nederlandse Voedselconsumptiepeiling uitgevoerd. Uit deze peiling blijken de volgende feiten:

Populatie	perenconsumptie (kg p.p. per dag) (gemiddeld)	Perenconsumptie gebruikers (kg p.p. per dag) (gemiddeld)	% gebruikers (over 2 dagen)
1-4 jaar	0.006	0.050	11,5
alle leeftijden	0.007	0.095	8

De voedselconsumptiepeiling is een tamelijk nauwkeurige methode die de consumptie meet over twee dagen.

Het gemiddeld gewicht van een 1-4 jarige = 13,8 kg.

Het gemiddelde gewicht van de totale populatie = circa 65 kg.

De gevonden concentratie in de besmette perenmonsters liep op tot 15 ~ 20 mg/kg. Er is niet precies bekend hoe vaak deze besmetting optreedt; doorgaans zijn dergelijke uitschieters een incident, maar het lijkt er in dit geval op dat er sprake was van meer structurele problemen in een belangrijk deel van de perenoogst.

Met de bovenvermelde gegevens kan uitgerekend worden wat de inname is in relatie tot de ADI en de ARfD op basis van de perenconsumptie en de veronderstelling dat de concentratie 15 mg/kg is.

### Totale bevolking, chronisch

Voor de totale bevolking ligt de theoretische gemiddelde inname van chloormequat via peren op  $0.007 * 15 = 0.105/65 = 0.0016$  mg/kg, als alle peren 15 mg/kg bevatten. Dit is 3 % van de ADI. (Rekenformule: gemiddelde consumptie \* gevonden concentratie/lichaamsgewicht).

Voor perenconsumenten op basis van de gemiddelde geconsumeerde hoeveelheden in 2 dagen komt dezelfde rekensom uit op 43 % van de ADI ( $0.095 * 0.015/65$ ). Dit is waarschijnlijk nog een overschatting van de theoretische belasting, omdat de consumenten die toevallig op de opschrijfdagen peren aten niet gelijkgesteld mogen worden aan een groep structureel op dit niveau consumerende perenliefhebbers. In het ergste geval kan worden gekeken naar kinderen die elke dag peren consumeren (Dit is overigens een weinig voorkomende situatie). Een kind tussen 1-4 jaar eet dan gemiddeld 50 gram peren. Met de gevonden concentratie is dat dan 108 % van de ADI. Het is een buitengewoon onwaarschijnlijke gebeurtenis dat een kind elke dag peren eet en dat deze peren de concentratie bevatten van 15 mg chloormequat. Dit is nadrukkelijk dus wel een worst-case benadering van de chronische inname, want de gemiddelde gehalten aan chloormequat in peren zullen op lange termijn gezien belangrijk lager zijn.

Aan de andere kant is in deze berekening nog geen bijdrage van residuen van

chloormequat in granen opgenomen. Theoretisch kan dat hoog zijn (bij berekening van de TMDI met de MRLs); in de praktijk is het waarschijnlijk zeer laag. De conclusie kan zijn dat chronische overschrijding van de ADI bij chloormequat onwaarschijnlijk is, zelfs niet als de norm zou worden opgetrokken om hogere residuen bij toegestaan gebruik te accommoderen.

#### Acute risico's bij volwassenen en kinderen

Een probleem bij de acute innameberekening is dat nationaal en internationaal nog niet besloten is wat hiervoor het uitgangspunt is bij de hantering van de consumptiecijfers. Internationaal lopen enkele landen voorop bij de beleidsvorming. In de Verenigde Staten gebruikt men probabilistische berekeningen voor de kans op een hoge inname, met een kans van 99,99% als grenswaarde voor beleidsbeslissingen. Engeland hanteert een berekening die uitgaat van de 97,5-percentiel van de gebruikers; Duitsland hanteert de gemiddelde consumptie van 4-6-jarige meisjes. De WHO heeft t.b.v. een internationale gegevensdatabank de nationale cijfers van de 97,5-percentiel van de dagconsumptie van de eters van producten opgevraagd, en van de grootte van een eenheid van de producten. Voor peer heeft Nederland (berekend door RIKILT-DLO op basis van de VCP-1992) opgegeven: 4,92 g/kg lichaamsgewicht (lg van 63 kg gemiddeld) voor de hele bevolking, en 10,00 mg/kg lg voor kinderen van 6 jaar en jonger (gemiddeld lg 17 kg). Dat komt dus neer op ca 300 g peer voor een volwassene en ca 170 g voor een kind. De individuele gegevens gaan tot ca 800 g voor een volwassene als maximum en ca 300 g voor een kind. De hoogst gevonden getallen bij de VCP kunnen foute opgaven bevatten en niet realistisch zijn; in dit geval kunnen we echter spreken van waarschijnlijk nog wel realistische dagconsumptiecijfers.

Uit deze gegevens kan worden afgeleid dat de acute inname bij de 97,5-percentiel voor kinderen bij een chloormequatgehalte van 5 mg/kg op het niveau van de ARfD van 0,05 mg/kg lg ligt. Hogere gehalten kunnen dus bij de huidige stand van de kennis een risico met zich mee brengen (al kan bedacht worden dat de veiligheidsfactor nog aanzienlijk is). Aangezien ook niet kan worden uitgesloten dat individuele peren een hoger gehalte bevatten dan het gemiddelde van een partij, zoals dat in een mengmonster wordt bepaald, is overschrijding van de huidige norm van 3 mg/kg vanuit oogpunt van volksgezondheid niet aanvaardbaar, in relatie tot de mogelijke risico's van acute toxiciteit. Deze conclusie werd in een gemeenschappelijk overleg op 10 februari 1999 van betrokken overheidsvertegenwoordigers en experts van instituten getrokken.