




**ANIMAL SCIENCES GROUP**  
**WAGENINGEN UR**



# Voorkomen van PAK's in voer, omgeving van dieren, melk en zuivelproducten alsmede een oriënterende studie in melkvee

C. A. Kan  
W.A. Traag  
L.A.P. Hoogenboom



**Rapport 03/0027745**

**Nutrition and Food**



## Copyright

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande toestemming van Animal Sciences Group van Wageningen UR te Lelystad.

## Nutrition and Food

Goedgekeurd door het divisiehoofd a.i.

Dr. J.D. van der Klis

# Voorkomen van PAK's in voer, omgeving van dieren, melk en zuivelproducten alsmede een oriënterende studie in melkvee

C. A. Kan

W.A. Traag

L.A.P. Hoogenboom

**NOVEMBER 2003**

project 221.15680.00

Kees Kan  
Animal Sciences Group, divisie voeding  
e-mail [kees.kan@wur.nl](mailto:kees.kan@wur.nl)

Wim Traag, Ron Hoogenboom  
RIKILT- Instituut voor Voedselveiligheid  
e-mail [wim.traag@wur.nl](mailto:wim.traag@wur.nl)  
e-mail [ron.hoogenboom@wur.nl](mailto:ron.hoogenboom@wur.nl)

## Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	4
Samenvatting en conclusies.....	5
Inleiding.....	6
Eigenschappen van PAK's .....	7
Gehalten aan PAK's in bodem, gewas en voedingsmiddelen en opname van PAK's door dieren (een literatuuroverzicht).....	9
Werkwijze literatuur overzicht.....	9
PAK's in bodem en opname door planten .....	9
PAK's in voeder en omgeving van de dieren.....	9
Opname van PAK's in het maagdarmkanaal.....	10
PAK's in dierlijke producten.....	11
PAK's in voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong.....	11
PAK's in moedermelk .....	12
Conclusies uit de literatuurgegevens.....	12
Dierproef.....	13
Proefopzet.....	13
Bemonstering.....	13
Uitvoering.....	13
PAK' analyse.....	14
CALUX-analyses.....	14
Analyseresultaten .....	14
Resultaten en discussie .....	15
PAK patroonverschillen tussen melk enerzijds en voer en mest anderzijds.....	17
CALUX - positieve stoffen .....	18
Conclusies uit de dierproef .....	19
Nog openstaande vragen .....	19
Literatuur .....	20

## Samenvatting en conclusies

1. PAK's komen hoogstwaarschijnlijk overal in de omgeving van de dieren voor.
2. Industriële activiteit heeft een duidelijke invloed op de PAK gehalten in (plantaardige) producten.
3. De totale belasting met PAK's van landbouwhuisdieren en herkauwers in het bijzonder in de Nederlandse situatie is onbekend, net zo als de mogelijke omzettingen in en uitscheiding door het dier.
4. Het is niet bekend wat de belangrijkste belastingsroute (ruwvoer, krachtvoer, lucht, grond etc) van herkauwers met PAK's is.
5. PAK's zijn vetoplosbaar en worden door de darm (van eenmagigen) snel geabsorbeerd.
6. Drie koeien zijn gedurende veertien dagen gevoerd met grasbrok met relatief hoge gehalten aan PAK's en gehalten in melk en mest gedurende en na het voeder van deze grasbrok zijn gemeten
7. De experimentele resultaten en de schaarse literatuurgegevens geven (voorshands) geen aanwijzing voor (significante) overdracht van voer naar melk.
8. Overdracht naar de melk is toch niet geheel uit te sluiten want het zou een verklaring kunnen zijn voor de variabele gehalten die in melkmonsters worden gevonden.
9. De uitscheiding van PAK's met de mest bij koeien is in voornoemde proef duidelijk meetbaar (ca 15 % van de opname).
10. De totale belasting van dieren kwam volgens Tsjechische berekeningen voor 99 % uit het voer en de blootstelling voor melkvee was bij hen 86 maal hoger dan voor vleesvarkens. Het lijkt zinvol deze rekenexercitie na te werken voor de Nederlandse situatie.

## Inleiding

PAK's (Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen) kunnen met name in kunstmatig gedroogde diervoedergrondstoffen worden aangetroffen. Dit blijkt onder meer uit analyses van het RIKILT in door de RVV bemonsterde partijen gedroogd gras. Daarnaast kunnen ingrediënten of diervoeders besmet raken tijdens brand of door neerslag na een brand. In de literatuur is gezocht naar gegevens omtrent de aanwezigheid van PAK's in diervoeders en de mogelijke overdracht van voer naar melk. In dit rapport worden de belangrijkste gegevens uit de literatuur samengevat.

De gegevens in de literatuur omtrent mogelijke overdracht van PAK's van voer naar melk zijn zeer beperkt. Daarom is een oriënterende studie met 3 melkkoeien uitgevoerd. Deze studie werd uitgevoerd n.a.v. het veelvuldig aantreffen van hoge PAK gehalten in partijen gedroogd gras.

In de studie is tevens gekeken naar de mogelijke overdracht van andere componenten (nog onbekende Ah-receptoragonisten) die een positief signaal gaven bij het testen van het gedroogde gras in de CALUX – bioassay, die gebruikt wordt om de aanwezigheid van dioxines te signaleren. Chemisch analytisch onderzoek kon echter de aanwezigheid van dioxinen in deze grasbrok niet bevestigen. Uitgaande van de stelling dat de CALUX - bioassay en de gebruikte clean-up van monsters specifiek zijn voor dioxinen, luidt de conclusie dan in de regel dat deze monsters een vals-positieve uitslag gaven.

Omdat een positief signaal in de CALUX–bioassay toch duidt op een mogelijk gezondheidsrisico – omdat de test oestrogenachtige stoffen aantoonst -, is aan mogelijke overdracht naar de melk ook aandacht besteed.

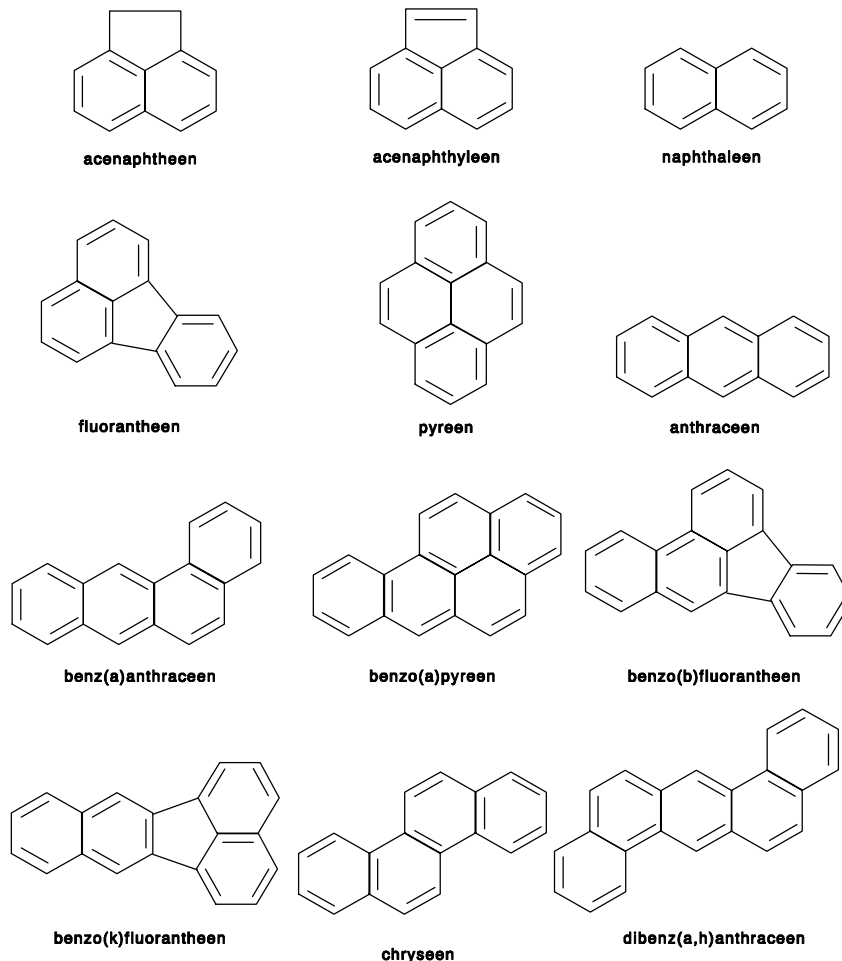
### Eigenschappen van PAK's

Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen (PAK's) zijn organische verbindingen opgebouwd uit twee of meer (aromatische) benzeenringen, soms gecombineerd met een aromatische ring met slechts vijf koolstofatomen. Binnen deze definitie vallen enige honderden verbindingen waarvan benzo(a)pyreen de bekendste is. Figuur 1 geeft een overzicht van de structuurformules van de meest voorkomende PAK's

Experimenteel is van meerdere van deze verbindingen aangetoond dat ze kankerverwekkende (carcinogene) eigenschappen bezitten. Benzo(a)pyreen is naast de bekendste verbindingen ook één van de PAK's met de sterkste carcinogene eigenschappen.

PAK's ontstaan door pyrolyse van organisch materiaal, een proces dat zowel in de natuur als door menselijk handelen kan optreden.

De meeste PAK's lossen slecht op in water maar goed in vet.



Figuur 1: Structuur van de verschillende PAK's

Het is niet moeilijk om een totaal gehalte aan PAK's te berekenen door de gehalten zonder meer bij elkaar op te tellen, maar de schadelijkheid is daaruit niet direct af te leiden omdat niet alle verbindingen carcinogeen zijn. Een mogelijkheid om monsters met een verschillend patroon aan polycyclische aromaten wat betreft schadelijkheid toch met elkaar te kunnen vergelijken, is door aan iedere component een B(enz)AP(yreen)EQ(uivalentie) of T(oxische) E(quivalent) F(actor) toe te kennen op basis van de carcinogene potentie. Daartoe worden gehalten van individuele PAK's met deze factor vermenigvuldigd en uiteindelijk opgeteld tot een totaal BaPEQ gehalte. Op deze wijze wordt de mogelijke schadelijkheid dan uitgedrukt in één getal. Deze systematiek wordt standaard toegepast bij de dioxines en dioxine-achtige PCB's.

De SCF (Scientific Committee on Food, 2002) heeft deze mogelijkheid recent ook onderzocht maar vindt dat er nog te weinig bewijs is voor de additiviteit van de effecten van verschillende PAK's. Dit vinden zij een voorwaarde voor het hanteren van dit principe. Ook zijn er (te) weinig data over de effecten na orale blootstelling aan individuele PAK's, om daaruit goede TEF waarden af te kunnen leiden. De SCF stelt voor om op basis van de resultaten van dierproeven, een totaal te berekenen door het gehalte van benz(a)pyreen met een factor 10 te vermenigvuldigen om zo rekening te houden met de andere carcinogene PAK's. In dit rapport is niet voor deze aanpak maar voor het hanteren van BAPEQ waarden gekozen.

De analyse wordt meestal beperkt op de volgende 16 verbindingen:

<i>Congeneer</i>	<i>Carcinogeen*</i>	<i>TEF**</i>
Naftaleen	?	0
Acenaftyleen	?	0,001
Acenafteen	?	0,01
Fluoreen	Nee	0
Fenantreen	?	0,001
Anthraceen	Nee	0
Fluoranteen	Ja ?	0,01
Pyreen	?	0,001
Benz[a]anthraceen	Ja	0,1
Chryseen	Ja	0,01
Benzo[b]fluoranteen	Ja	0,1
Benzo[k]fluoranteen	Ja	0,1
Benzo[a]pyreen	Ja	1
Indeno[123cd]pyreen	Ja	0,1
Dibenzo[ah]anthraceen	Ja	1
Benzo[ghi]peryleen	Nee ?	0

\* Scientific Committee on Food (2002)

\*\* Traag et al. (2001)



## **Gehalten aan PAK's in bodem, gewas en voedingsmiddelen en opname van PAK's door dieren (een literatuuroverzicht)**

### Werkwijze literatuur overzicht

Met de trefwoorden: PAH\*, cow\*, milk\*, polycyclic\*, aromatic\* en later nog gras\*, hay\*, ground\*, meat\*, liver\*, kidney\* en fat\* is gezocht in de databases CAB abstracts, Agricola en Agris. De relevant lijkende artikelen zijn aangevraagd en eventueel andere daarin voorkomende verwijzingen zijn eveneens opgevraagd.

### PAK's in bodem en opname door planten

Toediening van kunstmest of varkensmest gedurende tien jaar bleek geen meetbare invloed te hebben op het PAK gehalte van de bodem (Diercxsens and Tarradellas, 1987). Toediening van afvalwaterslib gedurende tien jaar gaf op zowel leem als klei aanleiding tot ca. 8 maal hogere PAK gehalten in de bodem toplaag in vergelijking met onbemeste bodem. Kampe en Leschber (1989) geven de resultaten na 20 jaar zware bemesting met afvalwaterslib op de PAK gehalten in bodem en gewassen. De gehalten in de bodem en de ondergrondse delen van planten waren hoger dan in het controle materiaal. De bovengrondse delen hadden dezelfde gehalten waarbij de auteurs de suggestie doen, dat depositie uit de lucht mogelijke verschillen, veroorzaakt door bodem contaminatie, te niet doet. Faber en Heijmans (1995) onderzochten de PAK gehalten in grond in de uiterwaarden van de Waal. Overstromingsfrequentie van de weilanden en PAK contaminatie bleken een hoge correlatie te hebben. De biologische beschikbaarheid van de PAK's op de sterk gecontamineerde plekken bleek relatief laag te zijn, wellicht mede omdat veel PAK's gebonden bleken te zijn aan kooldeeltjes in de bodem. Bryselbout et al. (2000) onderzochten de PAK gehalten in de bodem en planten nabij een snelweg in Frankrijk. Zij vonden een verschil in patroon zowel in bodem en planten in afhankelijkheid van de hoogte op het talud waar ze de monsters genomen hadden. De relatieve gehalten van de laag moleculaire componenten zoals naftaleen bleken toe te nemen naarmate de monsters hoger genomen werden. De hoogmoleculaire componenten zoals benzo[a]pyreen namen relatief af.

### PAK's in voeder en omgeving van de dieren

Lusky et al. (1992) onderzochten granen, groenvoeder, silage en ruwvoeder in twee streken in Duitsland. In de regio met aanzienlijk industriële activiteit lagen de gevonden gehalten slechts iets hoger dan in een landelijk gebied. Kwantitatief gesproken waren in deze steekproef de gehalten aan fluoranteen en pyreen het hoogst.

In Tsjechië is vrij uitvoerig onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van PAK's in veevoer, mest, stof en lucht in stallen en in veevoerfabrieken (Ciganek et al., 2000; Raszyk et al., 1998; Raszyk et al., 1999b). In alle monsters werden de 16 (standaard) onderzochte componenten gevonden. Chryseen, benz(a)anthraceen en benz(b)fluoranteen waren binnen de groep van carcinogene verbindingen het meest aanwezig in de monsters op en rond de boerderij. Van de overige PAK's waren fenantreen, fluoranteen en pyreen het meest aanwezig. Stof verzameld op een mengvoederbedrijf bevatte van de carcinogene componenten net als de monsters van de boerderij vooral chryseen, benz(a)anthraceen en benz(b)fluoranteen. Van de overige componenten kwamen vooral fenantreen, anthraceen en pyreen voor. Lucht bemonsterd in koeien- en varkensstallen bleek tenminste 3 maal meer PAK's te bevatten dan de buitenlucht. De carcinogene PAK's bleken daarbij vooral te zijn gebonden aan stof,

de andere PAK's kwamen voor in de gasfase. Ook nitro- en oxy-PAK's (beiden afbraakproducten van PAK's) werden aangetoond in de luchtmonsters. De gehalten aan nitro-PAK's waren laag, waarschijnlijk als gevolg van een geringe stabiliteit in zowel de lucht als gedurende de bemonstering. De gehalten aan oxy-PAK's waren hoger in de lucht buiten de stallen dan in de stallucht. Ciganek et al (2002) berekenden ook een totale belasting van vleesvarkens en melkvee uit hun gegevens en de meting van hydroxypyreen uitscheiding met de urine. De totale belasting kwam volgens hun berekeningen voor 99 % uit het voer en de blootstelling voor melkvee was 86 maal hoger dan voor vleesvarkens. Het lijkt zinvol deze rekenexercitie na te werken voor de Nederlandse situatie.

Grova et al. (2000) bestudeerden de PAK patronen in gras en melk afkomstig uit zowel een sterk belaste (industriële) Franse omgeving als afkomstig uit landelijk gebied ver van mogelijk verontreinigingsbronnen. Tot hun verrassing lagen de gehalten in gras uit de industriële omgeving met 83 ng/g slechts iets hoger dan de gehalten in het landelijk gebied (52 ng/g). De gehalten in de melk waren niet (significant) verschillend tussen beide herkomsten (37 en 27 ng/g vet resp.). Het patroon verschilde wel duidelijk tussen de gras- en de melkmonsters. De melk bevatte relatief veel naftaleen en weinig van de hoogmoleculaire carcinogene componenten.

Het RIKILT heeft ten behoeve van de RVV (ongepubliceerde gegevens) in 2000-2001 PAK gehalten in kunstmatig gedroogd gras uit Nederland onderzocht. De gehalten in de 45 onderzochte partijen varieerden van 0,6 tot 19 µg BAPEQ/ kg gedroogd product met een gemiddelde van 4,5 µg BAPEQ/kg. Het is nog niet mogelijk gebleken een verband te leggen tussen droogmethode, groeilocatie en PAK gehalte van het gedroogde materiaal. Recent (najaar 2002) zijn in een paar andere partijen gehalten van 38 en 51 µg BAPEQ/kg gevonden. Daarnaast kunnen PAK's ook via vetten en vetzuren in veevoer terechtkomen (Traag et al., 2001).

#### Opname van PAK's in het maagdarmkanaal

PAK's zijn vetoplosbare stoffen en dus valt te verwachten dat ze vanuit het voedsel door het maagdarmkanaal worden opgenomen. West en Horton (1976) gaven <sup>14</sup>C gelabeld benzpyreen en 3-methylcholantreen aan lacterende ratten, konijnen en schapen. Zij maten de uitscheiding van <sup>14</sup>C via melk en excreta. De overdracht bij de rat naar de melk was 0.19 % en bij het konijn en schaap veel lager met 0.003 en 0.01 %. In de excreta vonden zij een belangrijk deel van de <sup>14</sup>C terug in de water oplosbare fractie hetgeen duidt op een aanzienlijke omzetting tot wateroplosbare componenten. Rabache et al. (1985) gaven hoge gehalten benz(a)pyreen via het voer aan ratten en maten vervolgens de gehalten in darmweefsel, serum en excreta. De belangrijkste conclusies uit dit onderzoek waren, dat benz(a)pyreen werd teruggevonden in het serum – wat wijst op absorptie door het maagdarmkanaal – en dat de (lage) gehalten in de mest duiden op sterke absorptie door de darm dan wel afbraak of omzetting in het dier. De absorptie van het benz(a)pyreen schommelde tussen 89 en 99 %. Eisele (1985) verstreekte <sup>14</sup>C gelabeld naftaleen aan leghennen, jonge varkens en een melkkoe. In leghennen wordt de <sup>14</sup>C activiteit binnen 24 uur in alle belangrijke weefsels teruggevonden, maar na 48 uur was meer dan 75 % al weer uitgescheiden. De <sup>14</sup>C activiteit wordt ook teruggevonden in zowel eidooier als eiwit. In jonge (groeierende) varkens komt de meeste <sup>14</sup>C activiteit in het vet terecht. In de melkkoe werd de meeste radioactiviteit teruggevonden in de lever. De <sup>14</sup>C werd ook snel uitgescheiden met de melk zowel in het vet als in de rest. Aan het einde van de blootstelling verdween de <sup>14</sup>C activiteit binnen drie dagen uit de melk. Al deze gegevens suggereren, dat tenminste bij leghennen en melkvee omzetting van naftaleen tot goed wateroplosbare verbindingen een belangrijke rol speelt. Laurent et al. (2001) verstrekten <sup>14</sup>C gelabeld benz(a)pyreen en fenantreen aan varkens. Zij maten radioactiviteit in zowel aderlijk bloed als in bloed uit de poortader. De absorptie van beide componenten bleek parallel met de vetabsorptie te verlopen. Een indirecte schatting van PAK blootstelling, absorptie en metabolisme gebeurde door meting van het

gehalte aan hydroxypyreen in de urine van varkens en koeien (Raszyk et al., 1999a). Zij vonden hogere gehalten in de urine van zeugen dan van vleesvarkens, maar de gehalten in urine van koeien waren weer ca 30 maal hoger dan bij de zeugen. Zij schrijven dit verschil toe aan een hogere blootstelling van de koeien via verschillende mogelijke routes zonder daarvoor direct bewijzen te verschaffen.

Grova et al. (2002b) verstrekten  $^{14}\text{C}$  gelabelde TCDD (dioxine), fenantreen, benz(a)pyreen en pyreen via de bek aan geiten en volgden de radioactiviteit in plasma, melk, urine en faeces. In plasma werd voor alle componenten na 7 uur een piekwaarde gemeten. De radioactiviteit van fenantreen en pyreen kwam slechts voor ca. 2 % in de melk terecht en voor benz(a)pyreen was overdracht naar melk bij de geiten niet aantoonbaar. Gezien de gehalten in de mest lijkt benz(a)pyreen bij de geit slechts in geringe mate (ca 10 %) geabsorbeerd te worden door de darm. Fenantreen en pyreen worden door de darm van de geit wel geabsorbeerd maar het metabolisme is gezien de uitscheiding van radioactiviteit met de urine aanzienlijk. De radioactiviteit van de dioxine werd voor ca 8 % teruggevonden in de melk en ca 70 % bleef in het dier achter. Kortom een duidelijk verschil in opname en metabolisme tussen dioxine en PAK's bij de geit.

#### PAK's in dierlijke producten

Gräf et al. (1975) concludeerden nog dat de 3,4-benzopyreen in kippen en varkens al bij hun geboorte aanwezig was en daarna alleen maar afnam als gevolg van groei. Deze opvatting lijkt strijdig met alle gerapporteerde absorptiegegevens in het maagdarmkanaal. Lusky et al. (1992) onderzochten behalve voeders ook dieren uit twee verschillende regio's. In geen van de 82 onderzochte monsters hersenen, niervet, spier of rugspek konden zij boven de detectiegrens van 0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PAK's aantonen. Een studie uit Tsjechië waarvan alleen een samenvatting beschikbaar is (Zavadil and Bukovjan, 1998) meldt de aanwezigheid van fluoranteen, pyreen en fenantreen in het vet van konijnen die in de uiterwaarden van de Elbe gevangen waren. Beauchamp et al. (2002) gaven aan kuikens voeder met daarin tot 10 % papierafval met verhoogde PAK gehalten. Dit had geen invloed op de PAK gehalten in lever of buikvet.

Fries (1996) stelt in een overzicht dat PAK's zodanig wijd verspreid zijn in het milieu en zodanig persistent dat opname door dieren met name door gebruik van zuiveringsslib op landbouwgrond mag worden verwacht. Hij rapporteert vervolgens slechts een zeer geringe bio-accumulatie in experimenteel onderzoek en vermoedelijk efficiënte omzetting tot andere producten in het dier.

#### PAK's in voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong

Hopia et al. (1986) onderzochten een monster boter uit Finland als onderdeel van een studie in oliën en vetten voor menselijke consumptie. Binnen deze groep van producten was het PAK gehalte in boter het laagste. Zij gaan ervan uit dat de voedingsmiddelen van plantaardige herkomst de PAK's tijdens de groei of bewerking hebben opgenomen. Dennis et al. (1991) rapporteren een vergelijking van echte slagroom met een vervangend product. Het vervangende product met plantaardig vet heeft een duidelijk hoger PAK gehalte dan slagroom.

Hietaniemi (1996) geeft een samenvatting van de analyseresultaten van vele honderden voedselmonsters afkomstig uit Finland en uit andere landen. Hij wijst op regionale verschillen in PAK gehalten van de melk, waarbij de hoogste gehalten gevonden werden in monsters uit geïndustrialiseerde gebieden. De gehalten in kaas waren laag (1-4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en daar werden geen regionale verschillen gevonden. In geïmporteerde kazen werden soms aanzienlijk hogere gehalten (tot

125 µg/kg) gevonden. Vergelijkbare gehalten en verschillen werden gevonden in gedroogd ei poeder. Gehalten in vlees waren vrij laag (tot 70 µg/kg).

Bosset et al. (1997) vergeleken gerookte en niet gerookte Zwitserse kazen wat betreft PAK gehalte. Het rookproces bleek tot een duidelijk verhoging van het PAK gehalte aanleiding te geven.

Husain et al. (1997) onderzochten in Koeweit melk van koeien en schapen, eieren en lever van kip, schaaap en geit op PAK gehalten. Melk van schapen had duidelijk hogere PAK gehalten dan koemelk. De belasting van schaaap en geit met PAK's was vergelijkbaar, terwijl in eieren aanzienlijke hoeveelheden PAK's werden gevonden. Grova et al (2000; 2002a ) onderzochten melkmonsters van bedrijven zowel in de omgeving van potentiële PAK besmettingsbronnen als uit het landelijk gebied. Zij konden 8 verschillende componenten aantonen boven de detectiegrens nl. naftaleen, acenaftyleen, acenaftteen, fluoreen, anthraceen, fluoranteen, pyreen en benzo(a)anthraceen. Met andere woorden PAK's met meer dan vier aromatische ringen werden niet gevonden. De plaats van productie van de melk had alleen invloed op de gehalten aan naftaleen en fluoreen. Ook Kishikawa et al. (2003) vonden alle onderzochte PAK's in monsters koemelk uit Japan.

In haar recente rapport concludeert de SCF n.a.v. een Engels onderzoek dat melk en zuivelproducten zo'n 9% bijdragen aan de blootstelling van de bevolking aan PAK's ( 2002) De bijdrage vanuit andere dierlijke producten is lager.

Dit is een algemeen beeld en het neemt niet weg dat er producten kunnen zijn met een veel hogere besmetting. Het leidt dan bij dit type genotoxische carcinogenen wel automatisch tot een verhoogd potentieel risico (omdat aan genotoxische stoffen geen drempelwaarde kan worden toegekend).

#### PAK's in moedermelk

Lechner et al . (1991) konden in 41 moedermelk monsters van vrouwen wonend in de omgeving van de snelweg over de Brennerpas (Oostenrijk/Italië) geen benz(a)pyreen aantonen met een detectie grens van 1 µg/kg. Madhavan & Naidu (1995) onderzochten in India onder andere moedermelk en bloed uit de navelstreng. In beide matrices konden zij onder andere benz(a)pyreen en chryseen aantonen. Kishikawa et al. (2003) konden met detectie grenzen van 0.03 µg/kg of lager, vrijwel alle onderzochte PAK's aantonen in 51 monsters moedermelk uit Japan.

#### Conclusies uit de literatuurgegevens

- PAK's komen voor in ruwvoer, krachtvoer en lucht in en rondom (melk)vee bedrijven.
- Industriële activiteit kan leiden tot verhoging van PAK gehalten in gewassen en vetbevattende producten
- PAK's worden met het vet door de darm opgenomen en tamelijk efficiënt in of door het dier afgebroken
- PAK's komen voor in zuivelproducten en kunnen vermoedelijk zowel door overdracht als verwerking daarin terecht zijn gekomen. Op basis van de lipofiliteit kan overdracht van PAK's naar melk niet worden uitgesloten.

De vraag bleef daarom: geven verhoogde gehalten aan PAK's in kunstmatig gedroogd gras aanleiding tot verhoogde gehalten in de melk. Besloten werd in een oriënterende proef met drie melkkoeien hieromtrent een eerste indruk te verkrijgen.

## Dierproef

### Proefopzet

Drie melkgevende runderen (20-25 kg melk per dier per dag) werden gedurende een voorperiode van 10 dagen gewend aan een rantsoen van bijna 40 kg totaal gemengd rantsoen (waarvan 11 kg gedroogde grasbrok) en 2 kg krachtvoer per dag.

Het rantsoen bestond globaal uit 10 kg graskuil (45 % ds), 15 kg snijmaïskuil (30 % ds) 11 kg grasbrok (92 % ds) en 1 kg krachtvoer (90 % ds). De grasbrok, graskuil en snijmaïskuil werden betrokken van het melkveebedrijf van ID-Lelystad aan de Runderweg. De dieren werden gehouden in de Stofwisselingseenheid van ID-Lelystad.

De proefperiode was verdeeld in een hoofdperiode waarin de gecontamineerde grasbrok werd gevoerd en een naperiode waarin "schone" grasbrok werd gevoerd.

De dieren kregen in de hoofdperiode veertien dagen een rantsoen met daarin per dag 11 kg grasbrok van een gecontamineerde partij, die was aangekocht op basis van voorafgaande analyses door het RIKILT. In dezelfde partij werd naast een verhoogd PAK gehalte ook een sterk verhoogd signaal gemeten met de CALUX bioassay, hetgeen niet kon worden verklaard door het gehalte aan dioxines.

In de naperiode kregen de dieren wederom 10 dagen lang de "schone" grasbrok van ID-Lelystad in het rantsoen.

### Bemonstering

Gedurende de hoofdperiode en de naperiode werd dagelijks van ieder dier een monster van ca 1 l van de ochtendmelk genomen en ingevroren. Na één en twee weken hoofdperiode werd ook per dier een monster van de avondmelk genomen en ingevroren.

Aan het begin van de hoofdperiode, na zeven, tien en veertien dagen hoofdperiode en na zeven dagen naperiode werd per dier voor de vuist weg een mestmonster van ca 2 kg genomen en ingevroren.

Aan het begin en einde van de hoofdperiode werd een monster grasbrok van ca 1 kg genomen en ingevroren en aan einde van hoofd- en naperiode werd een monster van het totale rantsoen genomen en ingevroren.

### Uitvoering

De dierproef is uitgevoerd in de periode Oktober – November 2002

Alle monsters zijn naar het RIKILT gestuurd voor de analyses. De analyses van geselecteerde monsters zijn zowel met GC/MS als met de CALUX methode uitgevoerd.

### PAK' analyse

Monsters voer, mest of melkvet werden gespiked met gedeutereerde standaarden waarna de PAK's werden geëxtraheerd met cyclohexaan. Dit extract werd vervolgens met GPC verder opgezuiverd. Na indampen werden het eluaat geanalyseerd m.b.v. hoogresolutie GC en hoogresolutie MS (HRGC/HRMS) en gekwantificeerd aan de hand van de isotoopstandaarden.

### CALUX-analyses

Voor de CALUX-analyse werden monsters voer en mest (5 gram) eerst gemengd met methanol/water en vervolgens geëxtraheerd met hexaan/diethylether. Het extract werd gezuiverd op een kolom met 44% zure silica en het eluaat werd na indampen opgenomen in DMSO. Deze oplossing werd aan kweekmedium toegevoegd waaraan de CALUX-cellen gedurende 24 uur werden blootgesteld. In elke serie werden controlemonsters kippenvoer met gehalten van 0-3 ng TEQ/kg meegenomen ter correctie voor de blanco en de recovery. Melkvet (0,5 g) werd direct met hexaan/diethylether gemengd en opgezuiverd op zure silica zoals hierboven beschreven. In dit geval werden controlemonsters melkvet meegenomen in de range van 0-6 pg TEQ/g vet.

### Analyseresultaten

De volgende analyseresultaten zijn verkregen.

GC/MS analyse van de schone en gecontamineerde grasbrok (in vijfvoud gemeten)

GC/MS analyse van melk- en mestmonsters van dag 1, 15, 24 (dwz. eerste dag van blootstelling, laatste dag van blootstelling en laatste dag van naperiode).

GC/MS analyse van het totale voer aan einde van hoofd- en naperiode.

CALUX-analyses van boven genoemde melk-, gras- en mestmonsters.

Droge stof bepalingen van de mestmonsters.

## Resultaten en discussie

### PAK's in voer

De analyses van de PAK gehalten van de schone grasbrok gaven een gemiddeld gehalte van 0,3 µg BAPEQ/ kg product (Tabel 1). Dit gemiddelde gehalte werd in hoge mate bepaald doordat één van de vijf monsters voor benzo(a)pyreen, acenaftyleen en indenopyreen gehalten net boven de detectie grens bevatte, terwijl deze componenten in de andere monsters niet aantoonbaar waren. Het gemiddelde gehalte van de aangekochte gecontamineerde grasbrok was zo'n 100 maal hoger, namelijk 39 µg BAPEQ/kg product. Hierbij was het verschil tussen de vijf verschillende monsters zeer gering. Het gehalte was wel iets lager dan de 49 µg BAPEQ/kg die bij de eerste analyse van deze partij was gevonden.

De berekende PAK - inname via de grasbrok bedroeg daarmee zo'n 3,3 µg BaPEQ/dag in de voor- en naperiode en zo'n 430 µg BaPEQ tijdens de hoofdperiode. De opname via het totale voer kan ook berekend worden uit totale voeropname en de gehalten gemeten in het totale voer. Deze opname komt uit op ca 4 resp. 480 µg BaPEQ: hieruit blijkt dat de bijdrage van de overige voercomponenten aan de PAK inname niet erg groot is geweest

Tabel 1: Gemiddelde PAK gehalten in gras (n=5) en totaal rantsoen (n=1) in µg/kg

Component	Schone grasbrok	Gecontamineerde grasbrok	Schoon rantsoen	Gecontamineerd rantsoen
Acenaftyleen	0,7	3,5	<0,50	1,8
Acenaftéen	<0,5	2,0	0,80	1,2
Fenantreen	2,6	42	3,9	16
Fluoranteen	2,2	63	2,7	21
Pyreen	1,9	47	1,9	16
Benz[a]anthraceen	0,5	26	<0,50	8,2
Chryseen	0,8	32	0,72	12
Benzo[b]fluoranteen	0,8	29	0,73	9,1
Benzo[k]fluoranteen	<0,5	14	<0,50	4,3
Benzo[a]pyreen	0,6	25	<0,50	7,9
Indeno[123cd]pyreen	0,7	18	<0,50	5,4
Dibenzo[ah]anthraceen	<0,5	4,1	<0,50	1,2
Totaal gehalte in µg BAPEQ/kg vet [minimaal of lowerbound]	0,3	39	0,11	12
Totaal gehalte in µg BAPEQ/kg vet [maximaal of upperbound]	1,3	39		

*PAK's in melk*

De meetgegevens omtrent PAK gehalten in de melkmonsters zijn weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2: PAK gehalten in melk (in µg/kg vet

Component	Dag	1	1	1	15	15	15	24	24	24
	Dier	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Acenaftyleen		<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20
Acenafteen		<0,20	<0,20	0,60	<0,20	0,51	0,24	<0,20	<0,20	0,37
Fenantreen		2,3	1,4	19	0,34	1,9	1,6	0,58	0,37	2,2
Fluoranteen		0,55	0,28	3,4	<0,20	<0,20	0,22	<0,20	<0,20	0,21
Pyreen		1,5	0,68	2,3	0,59	0,69	0,99	0,38	0,38	0,78
Benz[a]anthraceen		<0,10	<0,10	0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Chryseen		<0,10	<0,10	0,21	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Benzo[b]fluoranteen		<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Benzo[k]fluoranteen		<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Benzo[a]pyreen		<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Indeno[123cd]pyreen		<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Dibenzo[ah]anthra- ceen		<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Totaal gehalte in ng BAPEQ/g vet										
[minimaal of lower bound]		0,009	0,005	0,069	0,001	0,003	0,005	0,001	0,001	0,005
Totaal gehalte in ng BAPEQ/g vet										
[maximaal of upper bound]		0,25	0,25	0,30	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

De variabiliteit tussen dieren in de gehalten van fenantreen en pyreen in melk is zeer aanzienlijk maar gemiddeld lijken deze gegevens niet te duiden op overdracht van PAK's van voer naar melk. Het zou echter kunnen zijn dat aanvankelijk de stoffen zeer snel vanuit voer naar melk gaan en dat daarna het metabolisme in pens en/of lever zodanig wordt geïnduceerd, dat aan het einde van de blootstelling (dag 15) de gehalten niet noemenswaardig afwijken van die aan het einde van de naperiode. Helaas ontbreken melkmonsters van de dagen voor de blootstelling zodat een echte uitgangswaarde niet (meer) is vast te stellen. In algemeenheid lijkt er weinig tot geen overdracht te zijn van de PAK's naar de melk hetgeen aansluit bij de schaarse resultaten van andere studies met geiten en runderen.



### *PAK's in mest*

De gehalten zoals die in de mest van de dieren na drogen zijn gevonden, staan vermeld in Tabel 3. De componenten die in het gecontamineerde rantsoen aanwezig zijn worden vrijwel allemaal ook teruggevonden in de mest. De verschillen in gehalten tussen dieren zijn in de mestmonsters tamelijk beperkt. De PAK's gehalten in mest waren op dag 1 (begin hoofdperiode) ca 13 µg BAPEQ/kg droge mest, op dag 15 (einde hoofdperiode) ca 19 µg BAPEQ/kg en op dag 24 (einde naperiode) ca 4,5 µg BAPEQ/kg droge mest. Dit duidt op een duidelijk lagere blootstelling in de naperiode. Uitgaande van een productie van ca 4 kg droge mest per dag en een gemiddeld gehalte in de mest van 15 µg/kg ds, is er 75 µg per dier per dag uitgescheiden tijdens de blootstelling. Te berekenen is daarmee, dat ca 15 % van de dagelijkse opname van PAK's via de mest is uitgescheiden. De rest (ca 85 %) is waarschijnlijk door de microflora van de pens of door de lever omgezet tot metabolieten die niet gemeten zijn.

### *PAK patroonverschillen tussen melk enerzijds en voer en mest anderzijds*

In de melkmonsters konden uitsluitend acenafteen, fenantreen, fluoranteen, pyreen en eenmaal benz[a]anthraceen worden aangetoond.

In het gecontamineerde voer en de mest konden daarentegen alle 16 componenten waarnaar gezocht werd, aangetoond worden.

Dit kan er op duiden dat de omzetting in de pens, de absorptie door de darm, lever metabolisme of overgang bloed naar melk een grote specificiteit vertoont. De gehalten liggen echter allemaal tamelijk dicht bij de detectie grens zodat kleine verschillen in absorptie en overdracht uitvergroot kunnen worden, indien de detectie grens voor een bepaalde component net niet overschreden wordt.

Tabel 3: PAK gehalten in koemest. Gehalten in ng/g droge stof

Component	Dag	1	1	1	15	15	15	24	24	24
	Dier	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Acenaftyleen		0,71	<0,50	**	1,1	1,2	0,57	<0,50	<0,50	<0,50
Acenafteen		<0,50	<0,50	**	<0,50	0,58	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50
Fenantreen		6,0	4,6	7,4	6,6	6,4	5,1	4,0	4,1	4,2
Fluoranteen		9,3	8,5	11	13	12	11	4,8	5,6	5,1
Pyreen		9,1	7,1	8,6	9,5	9,7	7,9	4,2	5,4	5,3
Benz[a]anthraceen		4,6	5,3	5,7	7,9	8,1	6,6	1,9	2,0	1,7
Chryseen		4,7	6,2	6,6	7,2	8,8	7,2	2,4	3,1	2,3
Benzo[b]fluoranteen		6,0	6,9	9,4	12	12	8,6	3,1	3,2	2,6
Benzo[k]fluoranteen		3,8	4,2	5,2	7,0	7,1	5,4	1,7	1,6	1,4
Benzo[a]pyreen		7,0	8,0	9,8	13	12	10,0	3,2	3,3	2,6
Indeno[123cd]pyreen		7,2	9,6	9,9	13	12	10	3,6	3,4	3,1
Dibenzo[ah]anthra- ceen		1,3	1,6	1,7	2,3	2,2	1,8	0,61	0,54	0,51
Totaal gehalte in ng BAPEQ/g produkt										
[minimaal of lower bound]		11	12	15	20	19	15	4,9	4,9	4,1
Totaal gehalte in ng BAPEQ/g produkt										
[maximaal of upper bound]		11	12	15	20	19	15	4,9	4,9	4,1

\*\* niet te meten door stoorsignalen

#### *CALUX - positieve stoffen*

Zowel het blanco gras als het gecontamineerde gras werden getest in de CALUX-assay. Het gecontamineerde gras gaf een signaal overeenkomend met zo'n 2 ng TEQ/kg, het schone gras een signaal overeenkomend met zo'n 0,5 ng TEQ/kg. Ter vergelijking, de norm voor dioxines in gras bedraagt 0,75 ng TEQ/kg. Het signaal werd echter niet veroorzaakt door dioxines of dioxine-achtige PCBs. In gevriesdroogde mestmonsters, genomen op dag 1 en dag 15 werd een verhoogde respons gemeten, overeenkomend met zo'n 1,5 en 2 ng TEQ/kg, terwijl in mest van dag 24 een signaal werd gemeten dat overeenkomt met minder dan 0,5 ng TEQ/kg. Melkmonsters genomen tijdens en na de blootstelling vertoonden geen respons die wijst op een overschrijding van de actiegrens of norm van respectievelijk 2 en 3 ng TEQ/kg vet.

### Conclusies uit de dierproef

1. Gehalten van chemisch bepaalde PAK's verschillen zeer aanzienlijk tussen de twee partijen grasbrok
2. Gehalten van PAK's in melk zijn het hoogst op dag 1 van de blootstelling en nemen daarna af.
3. Volledige overdracht van PAK's van gras naar de melk zou geresulteerd hebben in minimale PAK gehalten in melk van 3 µg BaPEQ/kg vet tijdens de voorperiode en 430 µg/kg vet tijdens de hoofdperiode. De gevonden gehalten lagen minstens 10,000 maal lager, waardoor er in deze proef met deze PAK bron geen sprake lijkt van overdracht van PAK's naar de melk.
4. PAK bepalingen in melkmonsters van dag 2, 3 en 4 kunnen aangeven of de gehalten in melk inderdaad snel terug lopen wat zou kunnen wijzen op inductie van metabolisme door de PAK's zelf al of niet in combinatie met de nog onbekende Ah-receptor agonisten.
5. De PAK gehalten in mest zijn gedurende de blootstelling ongeveer stabiel en lager aan het einde van de naperiode op schoon voer.
6. De uitscheiding van de PAK's via de mest is ca 15 % van de dagelijkse opname.
7. Het grootste deel van de PAK's is niet teruggevonden in mest of melk. Er is echter niet gekeken naar het voorkomen van mogelijke afbraakproducten van PAK's in melk, zoals dat b.v. het geval is bij aflatoxine B1. Dit kan belangrijk zijn, omdat juist bepaalde metabolieten van PAK's verantwoordelijk gehouden worden voor de carcinogene effecten.
8. CALUX metingen laten grote verschillen zien in de respons van de twee partijen gras. Er treedt echter geen verhoging op van het CALUX-sigitaal bij de melkmonsters verkregen tijdens de blootstellingsperiode. Er lijkt dus geen overdracht te zijn van de onbekende mogelijk dioxine-achtige stoffen naar de melk. Mestmonsters genomen tijdens de blootstelling waren wel verhoogd, hetgeen erop duidt dat de een deel van de CALUX positieve stoffen of niet zijn opgenomen, dan wel via de gal weer zijn uitgescheiden.

### **Nog openstaande vragen**

1. Deze overdrachtsproef is uitgevoerd met een partij met een specifiek patroon en gehalte aan PAK's. Het is aan te bevelen de proef te herhalen met een andere partij met zo mogelijk een ander patroon om de stelling dat PAK's niet overdragen van voer naar melk goed te kunnen onderbouwen.
2. Het verdient aanbeveling om het model van blootstelling van dieren, dat door Ciganek et al. (2002) is opgesteld ook voor de Nederlandse situatie door te rekenen.
3. Schatting van de blootstelling van dieren door het meten van het hydroxypyreen gehalte van urine kan meer zekerheid bieden over de totale blootstelling van landbouwhuisdieren in Nederland.
4. Incubatie van PAK's bevattend materiaal met penssap "in vitro" dan wel "in vitro" incubatie in de pens kan relatief gemakkelijk aanwijzingen geven of inderdaad de pensmicroflora verantwoordelijk is voor een groot deel van de verdwenen PAK's in herkauwers.

## Literatuur

- Beauchamp, C. J., Boulanger, R., Matte, J. and Saint-Laurent, G. (2002) Examination of the contaminants and performance of animals fed and bedded using de-inking paper sludge. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **42**, 523-528.
- Bosset, J. O., Bütikofer, U., Sieber, R., Dafflon, O., Koch, H. and Scheurer, L. (1997) Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe in Käse. *Agrarforschung* **4**, 411-414.
- Bryselbout, C., Henner, P., Carsignol, J. and Lichtfouse, E. (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbons in highway plants and soils. Evidence for a local distillation effect. *Analisis* **28**, 290-293.
- Ciganek, M., Raszyk, J., Kohoutek, J., Ansorgová, A., Salava, J. and Palác, J. (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs, nitro-pahs, oxy-pahs), polychlorinated biphenyls (pcbs) and organic chlorinated pesticides (ocps) in the indoor and outdoor air of pig and cattle houses. *Veterinarni Medicina UZPI* **45**, 217-226.
- Ciganek, M., Ulrich, R., Neca, J. and Raszyk, J. (2002) Exposure of pig fatteners and dairy cows to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Veterinarni Medicina Czech* **47**, 137-142.
- Dennis, M. J., Massey, R. C., Cripps, G., Venn, I., Howarth, N. and Lee, G. (1991) Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Additives and Contaminants* **8**, 517-530.
- Diercxsens, P. and Tarradellas, J. (1987) Soil contaminants by some organic micropollutants related to sewage sludge spreading. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **28**, 143-159.
- Eisele, G. R. (1985) Naphthalene distribution in tissues of laying pullets, swine and dairy cattle. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **34**, 549-566.
- Faber, J. H. and Heijmans, G. J. S. M. (1995) Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil detritivores. Paper presented at the New Approaches to the Development of Bioindicator Systems for Soil Pollution, Moscow, 1995.
- Fries, G. F. (1996) Ingestion of sludge applied organic chemicals by animals. *The Science of the Total Environment* **185**, 93-108.
- Gräf, W., Eff, H. and Schoirmair, S. (1975) Levels of carcinogenic, polycyclic aromatic hydrocarbons in human and animal tissues III rd communication. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene B* **161**, 85-103.
- Grova, N., Feidt, C., Crépineau, C., Laurent, C., Lafargue, P. E., Hachimi, A. and Rychen, G. (2002a) Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 4640-4642.
- Grova, N., Feidt, C., Laurent, C. and Rychen, G. (2002b) [<sup>14</sup>C] milk, urine and faeces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of [<sup>14</sup>C] polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Dairy Journal* **12**, 1025-1031.
- Grova, N., Laurent, C., Feidt, C., Rychen, G., Laurent, F. and Lichtfouse, E. (2000) Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *European Journal of Mass Spectrometry* **6**, 457-460.

- Hietaniemi, V. (1996) Levels and trends of pcbs, organochlorine pesticide residues and carcinogenic or mutagenic pah compounds in Finnish and imported foods and diets. Paper presented at the Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention., Cambridge UK, 1996.
- Hopia, A., Pyysalo, H. and Wickström, K. (1986) Margarines, butter and vegetable oils as sources of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Oil Chemists Society* **63**, 889-893.
- Husain, A., Naeemi, E., Dashti, B., Al-Omirah, H. and Al-Zenki, S. (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbons in food products originating from locally reared animals in kuwait. *Food Additives and Contaminants* **14**, 295-299.
- Kampe, W. and Leschber, R. (1989) Occurrence of organic pollutants in soil and plants after intensive sewage sludge application. In *Organic contaminants in waste water, sludge, and sediment: Occurrence, fate and disposal*, Quaghebeur, D., Temmerman, I. and Angeletti, G. eds, pp. 35-41. Elsevier Applied Science Publishers, Barking UK.
- Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., Akiyama, S. and Nakashima, K. (2003) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **789**, 257-264.
- Laurent, C., Feidt, C., Lichtfouse, E., Grova, N., Laurent, F. and Rychen, G. (2001) Milk-blood transfer of <sup>14</sup>c-tagged polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 2493-2496.
- Lechner, W., Huber, M., Bonn, G. K. and Daxenbichler, G. (1991) Analytik von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen in Fetthaltigen Biologischen Matrices - Untersuchung der Belastung von Muttermilch auf Benz-a-pyren entlang der Transitstrecken Tirols. *Wiener klinische Wochenschrift* **103**, 88-90.
- Lusky, K., Stoyke, M. and Henke, G. (1992) Untersuchungen zum Vorkommen von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) im Futter und bei Landwirtschaftlichen Nutztieren. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **43**, 67-68.
- Madhavan, N. D. and Naidu, K. A. (1995) Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta, maternal blood, umbilical cord blood and milk of Indian women. *Human and Experimental Toxicology* **14**, 503-506.
- Rabache, M., Billaud, C. and Adrian, J. (1985) Evolution du benzo(a)pyrène dans le tube digestif 1. Sa disparition. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* **55**, 113-117.
- Raszyk, J., Neca, J., Salava, J. and Palác, J. (1999a) A pilot study of 1-hydroxypyrene in the urine of pigs and cows. *Veterinarni Medicina UZPI* **44**, 359-363.
- Raszyk, J., Ulrich, R., Gajduskova, V., Salava, J. and Palác, J. (1998) Occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (pah) on pig and cattle farms. *Veterinarni Medicina UZPI* **43**, 17-25.
- Raszyk, J., Ulrich, R., Salava, J. and Palác, J. (1999b) Evaluation and occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in animal feed factories. *Veterinarni Medicina UZPI* **44**, 295-300.
- Scientific Committee on Food, S. (2002) *Opinion of the scientific committee on food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food*. EU, Brussels.

- Traag, W. A., Hoogenboom, L. A. P., Weg, G. v. d., Baars, A. J. and Schouten, T. (2001) *Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (pak's) in diervoeders, dierlijke vetten, plantaardige olien/vetten, vetzuren en dergelijke.*, Report RIKILT report 2001.006. RIKILT, Wageningen.
- West, C. E. and Horton, B. J. (1976) Transfer of polycyclic hydrocarbons from diet to milk in rats, rabbits and sheep. *Life Sciences* **19**, 1543-1552.
- Zavadil, L. and Bukovjan, K. (1998) Results of water-quality monitoring in the Elbe river below Pardubice. *Chemicke Listy* **92**, 551-561.