

rivm

National Institute
for Public Health
and the Environment

Report 320100007/2010

C.W. Noorlander | J.D. te Biesebeek | M.J. Zeilmaker

Dietary intake of polybrominated diphenyl ethers in The Netherlands based on concentration data collected in 2004, 2006 and 2008

RIVM report 320100007/2010

Dietary intake of polybrominated diphenyl ethers in the Netherlands based on concentration data collected in 2004, 2006 and 2008

C.W. Noorlander
J.D. te Biesebeek
M.J. Zeilmaker

Contact:
M.J. Zeilmaker
Centre for Substances and Integrated Risk Assessment
Marco.Zeilmaker@rivm.nl

This investigation has been performed by order and for the account of Dutch Food and Consumer Product Safety Authority, within the framework of 320100, Flame retarding substances in the food chain, programme 9, question 1.12

© RIVM 2010

Parts of this publication may be reproduced, provided acknowledgement is given to the 'National Institute for Public Health and the Environment', along with the title and year of publication.

This RIVM report is a revised version of RIVM report 320100005/2009 (not publicly available). This report is extended with measurements performed by RIKILT of food samples collected in 2008 (Appendix C), which were compared to measurements performed by the Dutch Food and Consumer Product Safety Authority (VWA) already presented in report 320100005/2009. Intake calculations based on the results of RIKILT were presented as well and are taken into account in the discussion.

Abstract

Dietary intake of polybrominated diphenyl ethers in the Netherlands based on concentration data collected in 2004, 2006 and 2008

Flame retardants added to consumer products, such as textiles and electronics, are able to enter the human food chain via the environment. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are commonly used flame retardants. The human intake of two PBDEs, -99 and -100, appears to have increased in the Netherlands between 2004 and 2008. A provisional human limit value is currently only available for PBDE-99, and concentration data indicate that this limit was exceeded during the study period. As knowledge of the health effects of PBDEs is limited, regular monitoring of PBDE concentrations in food products is recommended until a decrease in exposure is observed.

These are the conclusions of an investigative study carried out by the RIVM in collaboration with the Dutch Food and Consumer Product Safety Authority. The concentrations of several PBDEs were tested in food items commonly available in the Netherlands in 2004, 2006 and 2008. Four PBDEs were detected in food, namely, PBDE-47, -99, -100 and -209, with the highest concentrations found in fatty fish and crustaceans. PBDE-209 was measured only in 2008 and high concentrations were observed in all food categories. The life-long dietary intake of these compounds in humans was calculated using the concentration data. The intake of PBDE-47 did not differ between 2004 and 2008, the intake of PBDE-100 was comparable in 2004 and 2006, but higher in 2008, and the intake of PBDE-99 was two-fold higher in 2006 than in 2004 and slightly higher in 2008.

Since adverse health effects of PBDEs cannot be ruled out at the present estimated intake levels, caution should be exercised with respect to the use of brominated flame retardants. To assess the possible risks, it is recommended to establish human limit values of PBDE-47, -100 and -209.

Key words:

PBDE, brominated flame retardants, exposure, food, dietary intake, risk assessment

Rapport in het kort

Inname van polygebromeerde difenylethers via voeding in Nederland gebaseerd op concentraties gemeten in 2004, 2006 en 2008

In consumentenproducten zoals kleding en elektronica, zitten vlamvertragers die via het milieu in voedsel terecht kunnen komen. Voorbeelden hiervan zijn polygebromeerde difenylethers (PBDE's). Van twee PBDE's (PBDE-99 en -100) lijkt de inname tussen 2004 en 2008 te zijn gestegen. De voorlopige limietwaarde, die alleen voor PBDE-99 beschikbaar is, is in de onderzochte jaren overschreden. De kennis over de gezondheidseffecten van PBDE's is echter beperkt. Daarom wordt aanbevolen om de concentraties in voeding structureel te monitoren totdat ze zijn verminderd.

Dit blijkt uit onderzoek van het RIVM in samenwerking met de Voedsel en Waren Autoriteit. Hiervoor zijn de concentraties van meerdere PBDE's in voedingsmiddelen in Nederland in 2004, 2006 en 2008 gemeten. Daarmee is aangetoond dat vier PBDE's in voeding aanwezig zijn: PBDE-47, -99, -100 en -209. De hoogste concentraties van deze vier zijn waargenomen in vette vis en schaaldieren. PBDE-209 is alleen gemeten in 2008 en in alle onderzochte voedingscategorieën zijn relatief hoge concentraties aangetroffen. Op basis van de gemeten concentraties is berekend hoeveel van deze stoffen mensen gedurende hun leven via voeding binnenkrijgen. De inname van PBDE-47 lijkt niet te zijn toegenomen tussen 2004 en 2008. De inname van PBDE-100 is in 2004 en 2006 gelijk gebleven, maar is hoger in 2008. De inname van PBDE-99 is verdubbeld in 2006 ten opzichte van 2004, en wat hoger in 2008.

Omdat gezondheidsrisico's van PBDE's niet uit te sluiten zijn bij de huidige innameniveaus, blijft voorzichtigheid geboden met het gebruik van vlamvertragers. Met het oog hierop wordt aanbevolen om de limietwaarden van PBDE-47, -100 en -209 vast te stellen, zodat de risico's in kaart kunnen worden gebracht.

Trefwoorden:

PBDE, gebromeerde vlamvertragers, blootstelling, voeding, risicoschatting

Contents

Summary	11
1 Introduction	13
2 Material and methods	15
2.1 Food samples	15
2.2 Analytical method	15
2.3 PBDEs measurements	15
2.4 Intake calculations	16
2.5 Human Limit Value	17
3 Results	19
3.1 Concentrations of PBDEs in food categories	19
3.2 Contribution of food categories to intake	27
3.3 Intake calculations	33
3.4 Intakes exceeding the Human Limit Value	37
4 Discussion and recommendations	39
4.1 Concentrations of PBDEs in food categories	39
4.2 Intake calculations	40
4.3 Intakes exceeding the Human Limit Value	41
4.4 Health impact assessment	42
4.5 Refinement of the risk assessment of PBDEs	42
4.6 Recommendations	42
References	45
Appendix A. Analytical methods	47
RIVM	47
VWA	53
RIKILT	65
Appendix B. Concentrations of PBDEs in fish	75
Appendix C. Measurements by RIKILT	77
Appendix D. Comparison of statistical methods	81

Summary

Brominated flame retardants, like polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), are environmental contaminants which have entered the human food chain. This report presents the outcome of PBDE dietary intake calculations of the years 2004, 2006 and 2008 as determined by the 'total diet method', i.e. a combination of food consumption data, PBDE-concentration measurements in pooled samples of specific food categories, and statistical modeling. As only PBDEs -47, -99, -100 and -209 could be detected in the majority of Dutch food samples, the intake calculations were restricted to these four PBDE congeners.

The highest concentrations of PBDE-47, -99, and -100 were observed in fatty fish and crustaceans. When the different time points are compared, for PBDE-47 the highest concentrations were observed in 2008 in 11 of the 15 food categories. For PBDE-99 and PBDE-100, a time trend from 2004 to 2008 was not observed for the concentrations of these PBDEs in food; the highest concentrations in 2008 were observed in only 7 and 4 food categories, respectively.

The life-long average intakes of PBDE-47, -99, and -100 in 2008 are higher compared to the intake in 2004 and 2006 (although for PBDE-47 the confidence intervals of the different time points overlap). For PBDE-47, the increase in 2008 was expected, since an increase in the concentrations between 2006 and 2008 was indicated above. For the other two PBDEs the increase of the intake is explained by the apparently larger effect of the increased concentrations of meat, butter and cheese than that of the decreased concentrations for bread, eggs, fruit and vegetables. PBDE-209 was measured in 2008 only. The average life-long intake of this PBDE was high compared to the other measured PBDEs.

The food categories collected in 2008 were measured by two different laboratories, VWA and RIKILT. The concentrations in the food categories are in 88% of the samples lower compared with the results from the VWA. To account for the uncertainties that arise from the different results between the two laboratories, the highest concentration data (i.e. those of VWA) were used as 'worst case scenario'.

A small fraction of the Dutch population (roughly 2.5% to 5%) exceeded a provisional Human Limit Value (HLV) of 230 pg/kg bw/day for PBDE-99 in 2004. This limit value is based on the extrapolation of reproductive toxicity from experimental animals to man (Bakker et al., 2008). The percentage exceeding the HLV amounted around 50% in 2006 and increased further in 2008 to roughly 75% of the Dutch population. This indicates that for a fraction between 2.5% and 75% of the Dutch population adverse health effects cannot be ruled out. In addition, the intake calculations based on data of RIKILT indicates that a negligible fraction (<1%) of the Dutch population exceeds the provisional HLV for PBDE-99. HLVs have not been derived for the other PBDE congeners (in the present case PBDE-47, -100, and -209). Therefore, further research on the HLVs is recommended. Though the present report focuses on the toxicological evaluation of PBDE-99, it might be discussed whether a risk-benefit analysis for flame retardants should be performed in the future.

In conclusion, it is recommended to monitor PBDE concentrations in food products regularly until a decrease in exposure is observed below a particular HLV. Particularly the food category milk is of interest, since milk is the most important source of intake for PBDE-47, -100 and -209. The potential risk due to exposure to PBDE-99 indicates that caution should be exercised with other PBDEs and/or brominated flame retardants. We therefore recommend performing additional studies on exposure assessment and the estimation of HLVs of other PBDEs. Until risk assessment concludes that the concentrations in food do not pose a negligible risk, it is recommended to monitor PBDE concentrations in food products regularly.

1 Introduction

Brominated flame retardants are a group of brominated organic substances that have an inhibitory effect on the ignition of combustible materials. Brominated flame retardants are applied to textiles, wiring, furniture, industrial paints and incorporated into plastics and foams, and they are commonly used in electronic products to reduce the flammability of the product. About one-third of the total world production of brominated flame retardants consists of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) (De Wit, 2002; Domingo, 2004).

PBDEs are additives mixed into polymers and are not chemically bound to the plastic or textile. Therefore, they may be released relatively easy from products. The human intake of these substances mainly occurs via diet, ingestion of house dust and inhalation of indoor air. Of these routes dietary intake is assumed to be the dominant route of intake for most of the PBDEs in the Netherlands (Zeilmaker et al., 2008). Just as for PCBs and dioxins, food products of animal origin with high fat content (fatty fish, meat and dairy products) are expected to be major contributors to dietary exposure. The contamination of human food products by PBDEs is not well known. However in recent years a number of studies have been carried out to measure the PBDE concentrations in food. A large number of measurements in fish is reported, but mainly as an indicator of environmental pollution and to a much less extent in fish for consumption. A number of new studies assessing the dietary intake of PBDEs is reported. These studies demonstrate that the Dutch population is exposed to a considerable amount of PBDEs (De Mul et al., 2005; Bakker et al., 2008).

Exposure assessment of persistent, lipophilic contaminants is usually estimated indirectly by combining the results of monitoring of food categories with habitual food consumption patterns as revealed by food consumption surveys ('total diet method') (De Mul et al., 2005). The 'total diet method' is a combination of food consumption data, PBDE-concentration measurements in pooled samples of specific food categories, and statistical modeling.

In the present study, food products from relevant food categories purchased in the Netherlands were analyzed for nine predominant PBDEs (PBDE-28, -47, -49, -99, -100, -153, -154, -183 and -209). The food categories are assumed to represent the majority of the food products containing PBDEs. The dietary exposure to PBDEs in the Dutch population was estimated using PBDE concentration data in Dutch food categories collected in 2004, 2006 and 2008 in combination with consumption data of the third Dutch National Food Consumption Survey 1997/1998 (DNFCS-3). The intake calculations of PBDE-209 in 2008 are the first ones using the 'total diet method', in previous years PBDE-209 was not measured.

A risk assessment could be performed for PBDE-99 only, as a provisional Human Limit Value (HLV) is only available for this congener (De Winter-Sorkina et al., 2006). The PBDE-99 intake appeared to be close to its HLV (Bakker et al., 2008). This raised the question whether the exposure, and in the case of PBDE-99 its associated health risk, is increasing and if so, whether measures can be taken or advice be given to reduce the PBDE exposure. To answer this question the 2004 research was repeated in 2006 and 2008, i.e. individual food items were collected and pooled into specific food categories. Subsequently, the PBDE concentrations of these food categories were measured. The PBDE concentration data are combined with food consumption data to estimate the long-term intake.

This report presents the outcome of PBDE intake calculation using the food samples which have been collected in 2004, 2006 and 2008.

2 Material and methods

2.1 Food samples

Individual food products were collected by thirty RIVM employees in Dutch supermarkets. The food products were prepared to make pooled food samples, with each sample corresponding to a certain food category. For example the sample of the food category 'cheese' consisted of a weighed pool of all sorts of cheese mentioned in the DNFC3-3 consumed by the Dutch population (see De Mul et al., 2005). The food products were ranked in food categories according to type of fat or oil. In total, the selected food products covered 95% of the consumption in each food category. These categories were complemented with food in which fat soluble compounds have occasionally been found, i.e. flour and vegetables/fruit. In total, 15 food categories were sampled in 2004, 16 food categories in 2006 and 15 food categories in 2008. For a complete overview of the food categories see Table 1, 2 and 3.

2.2 Analytical method

Analysis was performed according to standard operating procedures of RIVM, VWA and RIKILT. For a complete description of the analytical methods see Appendix A (in Dutch).

2.3 PBDEs measurements

In 2004 the PBDE analysis (PBDE-17, -28, -47, -66, -85, -99, -100, -138, -153, -154, -183) was performed by the RIVM, except for the fish and crustacean data which were analyzed by the Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies (IMARES, Wageningen University) (PBDE-28, -47, -49, -66, -71, -75, -77, -85, -99, -100, -119, -138, -154, -183, -190, -209, for details, see De Mul et al., 2005).

In 2006 the PBDE analysis (PBDE-17, -28, -47, -49, -66, -71, -75, -77, -85, -99, -100, -119, -138, -153, -154, -183, -190, -209) was performed by the Dutch Food and Consumer Product Safety Authority, Department East (VWA), except for the fish, crustacean and the milk data which were performed by the Dutch Consumers' Association (Consumentenbond, 2005), RIVM and RIKILT.

Fish and crustacean data of 2004 and 2006 presented an average of multiple samples which were measured separately, while concentrations in the other food categories were measured in one sample consisting of different products.

In 2008, the PBDE analysis (PBDE-28, -47, -49, -99, -100, -153, -154, -183, and -209) was performed by the Dutch Food and Consumer Product Safety Authority, Department East (VWA). In addition, RIKILT has performed a PBDE analysis on the food samples collected in 2008 as well.

Samples with concentrations below the limit of detection (LOD), the so-called non-detects, were assigned to ½LOD. For the measurements performed by RIVM, the LOD was 1-2 pg/g wet product. For the measurements performed by the VWA, the LODs were as follows: the LOD of PBDE-28, -47, -49, -99, -100, -153, and -154 was 2-5 pg/g wet product, the LOD of PBDE-183 was 25 pg/g wet product

(‘splitless injection’) or 5-10 pg/g wet product (‘large volume injection’), and the LOD of PBDE-209 was 20-50 pg/g wet product.

2.4 Intake calculations

The intake calculations with the ‘total diet method’ consist of the following four steps:

A. Measurement of food consumption

Food consumption data were obtained from DNFCS-3 (Kistemaker et al., 1998). This database contains information on which products are consumed and in what amount by ~6250 individuals on two consecutive days. In total 1207 different consumed food products are listed in DNFCS-3. For each of these products a comprehensive description, including the fat percentage, is available from the Netherlands Food Composition table (NEVO-table). The availability of the fat content as product specification makes DNFCS-3 a suitable starting point for the calculation of the intake of fat soluble compounds, such as dioxins and PBDEs. Based on their fat content, 714 of the 1207 NEVO food products were expected to contain fat soluble compounds.

B. Linking PBDE concentrations with food products

Where possible, consumed foods were directly linked to PBDE concentrations. For example, industrial oils (e.g. cooking fat), vegetable oils (e.g. cooking fat fluid), bakery products (e.g. cakes), bread (e.g. bread rolls) and milk were directly linked to the PBDE concentrations as determined in the corresponding food category. For the other (more complex) food products, a conversion model for primary agricultural products (CPAP, Van Dooren et al., 1995) was used to split food products into their constituting primary agricultural products (including their mass fractions). The congener concentrations of all the separate ingredients, corrected for their fraction, were added to get the PBDE congener concentration in the consumed food. As no information on the effect of processing such as cooking, baking and frying on the concentration of PBDEs in food products is available, no correction for such effects was made.

C. Individual intake assessment

The total daily intake was derived by coupling the food consumption data with the corresponding 2004, 2006 and 2008 PBDE concentrations for each individual in DNFCS-3. In this way a total of 12.500 PBDE intakes were obtained, containing individual PBDE intakes over two separate, consecutive, days.

D. Statistical analysis of individual intakes

Regarding the human health risk of PBDE, the persistent nature of these compounds in the human body together with the diffuse dietary intake warrants the calculation of the long-term intake of these compounds. In the Netherlands the so-called Beta-Binomial-Normal (BBN) model as implemented in the Monte Carlo Risk Assessment software (MCRA) release 6.1 and 6.2 (De Boer and Van der Voet, 2007) is currently used for this purpose. The BBN model allows for the calculation of a long-term intake distribution as a function of age and sex. From the long-term intake distribution a life-long averaged intake is derived, by integrating the intake over each age and then dividing by age. The BBN method not only allows for the calculation of statistical intake characteristics as percentile values but also for their corresponding confidence intervals.

2.5 Human Limit Value

The calculation of the provisional HLV for PBDE-99 from food is described in detail in Bakker et al. (2008). This calculation resulted in an allowed range for the intake of food of 230-300 pg/kg bw/day. In this calculation, a background intake of house dust of 1.8 ng/day was taken into account in this calculation of a human limit value. In this report we used the lower limit (230 pg/kg bw/day) of the calculated range for a HLV. The lowest value of the range was used since this leads to the most conservative approach for risk assessment.

3 Results

3.1 Concentrations of PBDEs in food categories

PBDE-47, -99 and -100 were found in the majority of the analyzed food samples collected in 2004 and 2006. The concentrations of these congeners are presented in Table 1 (2004), Table 2 (2006) and in Figure 1A (2004) and 1B (2006). A measure for variance is not given since only one sample per food category was measured. When PBDE concentrations were not detected, values are presented as ½LOD. In 2004, this was the case for the food category bread (PBDE-100), pork (PBDE-100), vegetables (PBDE-99 and -100), fruit (PBDE-99 and -100), beef (PBDE-100), chicken (PBDE-100), butter (PBDE-100), vegetable oil (PBDE-47 and -100) and industrial oil (PBDE-47, -99 and -100). In 2006, the food categories vegetables (PBDE-100) and milk (PBDE-99 and -100) are presented as ½LOD. PBDE concentrations in milk were measured both by RIVM and RIKILT. More detailed fish data are presented in Appendix B. When compared on whole product basis bread, vegetables and fruit contained the lowest PBDE concentrations (< 10 pg/g product), followed by chicken, beef and milk (Figure 1A and 1B). Industrial and vegetable oil, cheese, pork, eggs and butter contained levels ranging from 10 up to 100 pg/g product. The highest concentrations were found in marine animals, with levels in excess of 100 pg/g product.

Table 1. Concentrations of PBDEs (pg/g product or pg/g fat) in food categories sampled in the year 2004 measured by RIVM (all categories except fish) and RIVO (fish categories) (non-detects are assigned ½LOD).

Category	Fat %	Concentrations		
		PBDE-47	PBDE-99	PBDE-100
Fatty fish ^a	^b	1725	490	530
Bread	1	10	4	1*
Pork ^c	26	142	138	58*
Eggs ^c	10	220	221	136
Crustaceans ^d	^b	455	315	135
Vegetables	0	4	1*	1*
Cheese ^c	31	209	183	78
Fruit	0	4	1*	1*
Beef ^c	16	113	128	63*
Chicken/poultry ^c	9	181	204	54*
Butter ^c	81	13	23	25*
Lean fish ^e	^b	171	33	88
Vegetable oil	57	10*	26	15*
Industrial oil	35	15*	20*	25*
Milk ^c	1	2010	36	72

* Value is ½LOD

^a Average of mackerel, herring, eel and salmon including some samples <LOD = ½LOD

^b No percentage: average concentrations of multiple species fish (lean fish: Dutch Consumers' Association mentions a mean of 1.8% for cod, coalfish, plaice, sole and tilapia whereas VU/IVM mentions 1.5% for lean fish, RIVM 1.2% and RIKILT 1.4%; fatty fish: Dutch Consumers' Association mentions a mean of 20.6%

for herring, eel, mackerel and fresh salmon, VU/IVM mentions 12.4% and, RIVM 9.4% and RIKILT 13.1%).

^c Concentrations in pg/g fat

^d Average of mussel and shrimp including samples <LOD = ½LOD. Mussel and shrimp samples consisting of a pool of 15 different subsamples.

^e Average of cod, coalfish, plaice and sole including samples <LOD = ½LOD. Samples of each fish species consisting of a pool of 15 different subsamples.

Table 2. Concentrations of PBDEs (pg/g product or pg/g fat) in food categories sampled in the year 2006 measured by VWA (all categories except crustaceans, lean fish and milk), Dutch consumers' association (crustaceans and lean fish) and RIVM/RIKILT (milk) (non-detects are assigned ½LOD).

Category	Fat %	Concentrations		
		PBDE-47	PBDE-99	PBDE-100
Fatty fish	10	928	193	341
Bread	<1	9	4	3
Pork ^a	16	203	177	42
Eggs ^a	29	130	136	49
Crustaceans ^d	^b	107	29	30
Bakery products	12	15	14	5
Vegetables	<1	8	16	3*
Cheese ^a	25	110	99	14
Fruit	<1	13	7	3
Beef ^a	9	127	98	29
Chicken/poultry ^a	8	65	93	24
Butter ^a	74	88	62	13
Lean fish ^e	^b	147	6	41
Vegetable oil	^c	21	30	9
Milk ^{a, f}	1/1	2667/546	278*/182	278*/23*

* Value is ½LOD

^a Concentrations in pg/g fat

^b No percentage: average concentrations of multiple species fish (lean fish: Dutch Consumers' Association mentions a mean of 1.8% for cod, coalfish, plaice, sole and tilapia whereas VU/IVM mentions 1.5% for lean fish, RIVM 1.2% and RIKILT 1.4%; fatty fish: Dutch Consumers' Association mentions a mean of 20.6% for herring, eel, mackerel and fresh salmon, VU/IVM mentions 12.4% and, RIVM 9.4% and RIKILT 13.1%).

^c Not measured by VWA-O (RIVM mentions 83.1% and 67.9% for vegetable and industrial oil, VU/IVM mentions 71% en 85%)

^d Average of mussel and shrimp including samples <LOD = ½LOD. Mussel and shrimp samples consisting of a pool of 15 different subsamples.

^e Average of cod, coalfish, plaice, sole and tilapia including samples <LOD = ½LOD. Samples of each fish species consisting of a pool of 15 different subsamples.

^f Two values are given since milk was measured by RIVM and RIKILT, respectively.

PBDE-47, -99, -100, and -209 could be detected in the majority of food categories which were collected in 2008. PBDE-100 was not detected in the food categories flour, vegetables/fruit and vegetable oil, and those values are ½LOD. The concentrations of the congeners 47, 99 and 100 are presented in Table 3 and Figure 1C. The other PBDEs were not detected in the food categories, with the exception of PBDE-49 which was measured in crustaceans (26 pg/g), of PBDE-153 which was measured in butter (18 pg/g) and of some other PBDEs which were detected in fatty fish (PBDE-28 (40 pg/g), PBDE-49 (131 pg/g), PBDE-153 (29 pg/g), and PBDE-154 (71 pg/g)). The food categories milk, flour and vegetable/fruit contained the lowest PBDE concentrations. Highest concentrations of PBDE-47, -99, and -100 were observed in fatty fish and crustaceans (Figure 2). PBDE-209 showed high levels in the majority of the food categories.

Table 3. Concentrations of PBDEs (pg/g product) in food categories sampled in the year 2008 measured by VWA (non-detects are assigned ½LOD)

Category	Fat %	Concentrations			
		PBDE-47	PBDE-99	PBDE-100	PBDE-209
Fatty fish	14	694	146	179	316
Flour	2	25	4	2*	61
Pork	21	73	40	15	150
Eggs	9	56	21	13	291
Crustaceans	2	189	89	52	120
Bakery products	17	76	55	16	135
Vegetables/fruit	0	14	3	2*	31
Cheese	28	84	34	14	253
Beef	13	69	25	14	332
Chicken/poultry	9	73	39	18	177
Butter	79	142	83	25	191
Lean fish	1	74	13	16	133
Vegetable oil	65	193	62	3*	516
Industrial oil	84	97	60	20	359
Milk	1	17	5	3	33

* Value is ½LOD

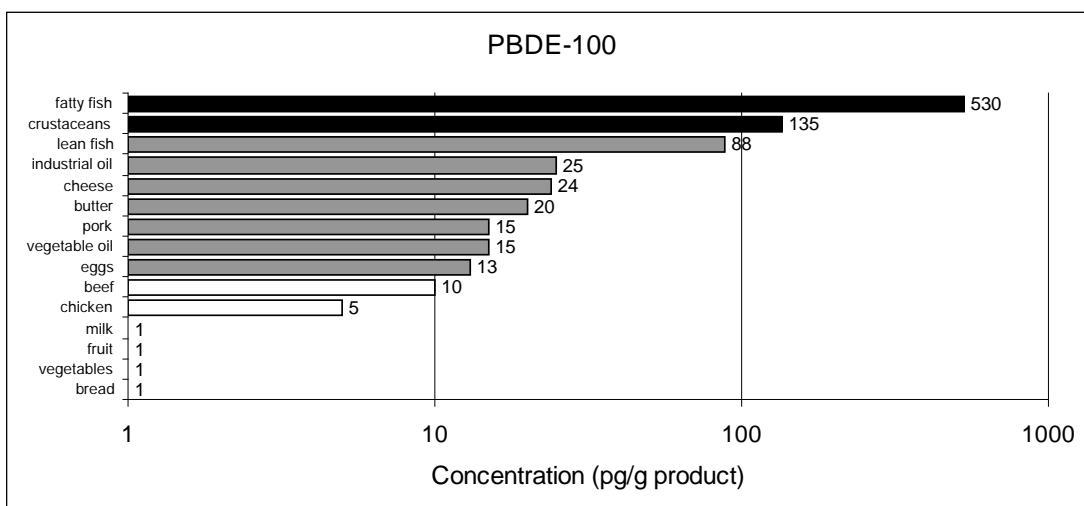
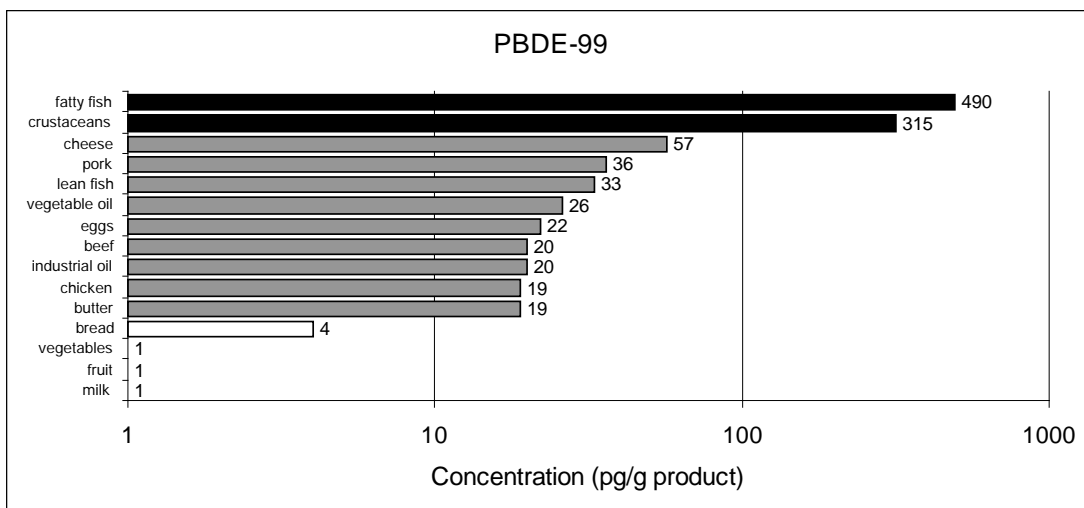
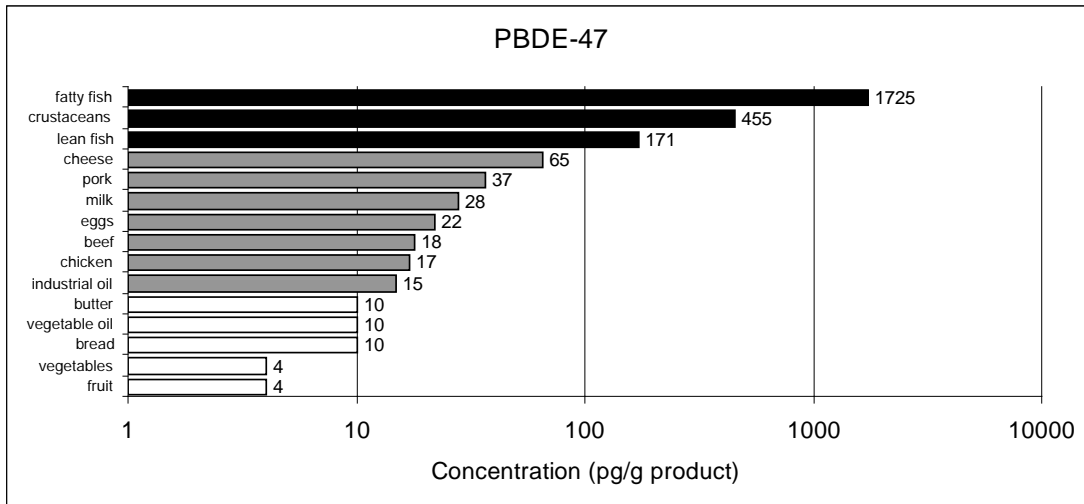


Figure 1A. Concentrations of PBDE-47, -99 and -100 in food categories in 2004. White bar: concentration < 10 pg/g, grey bar: concentration between 10-100 pg/g, black bar: concentration > 100 pg/g.

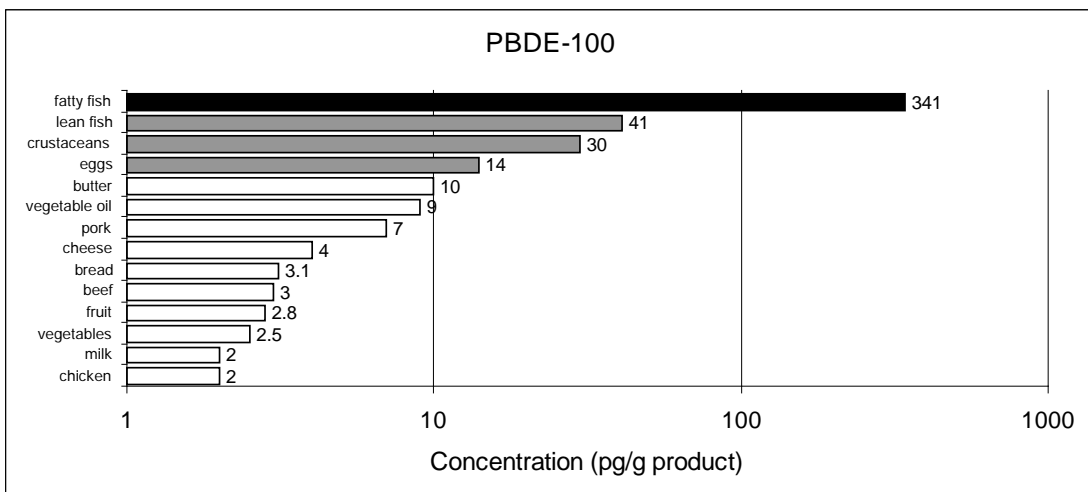
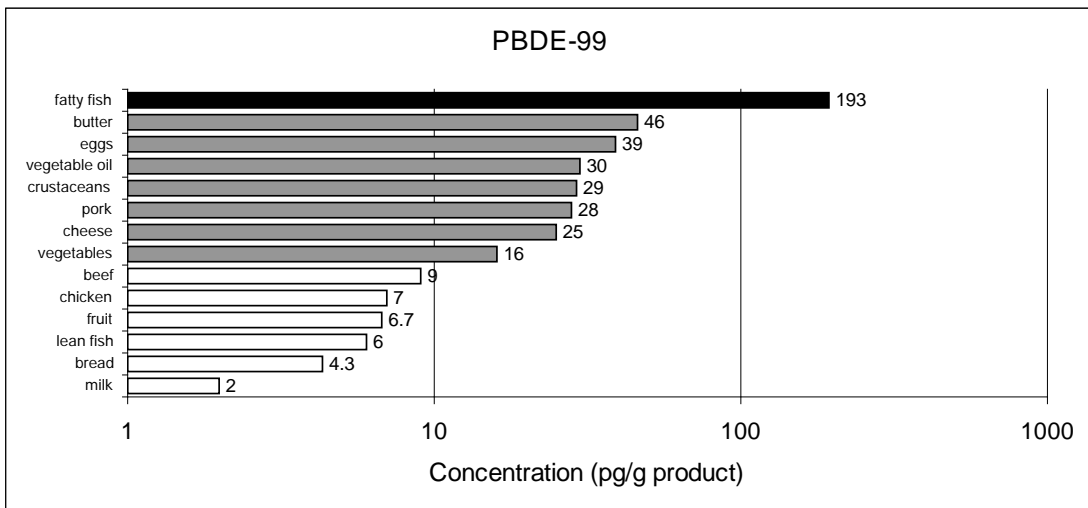
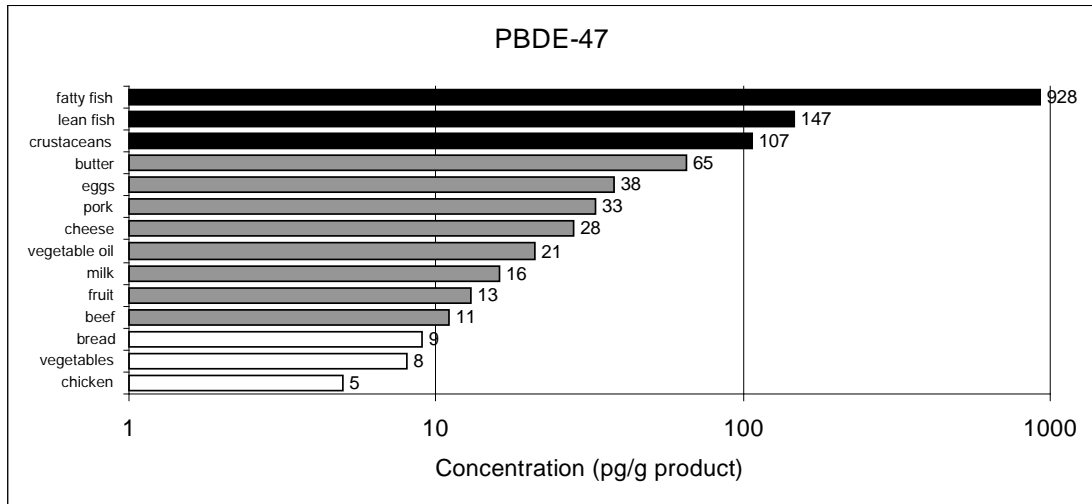


Figure 1B. Concentrations of PBDE-47, -99 and -100 in food categories in 2006.

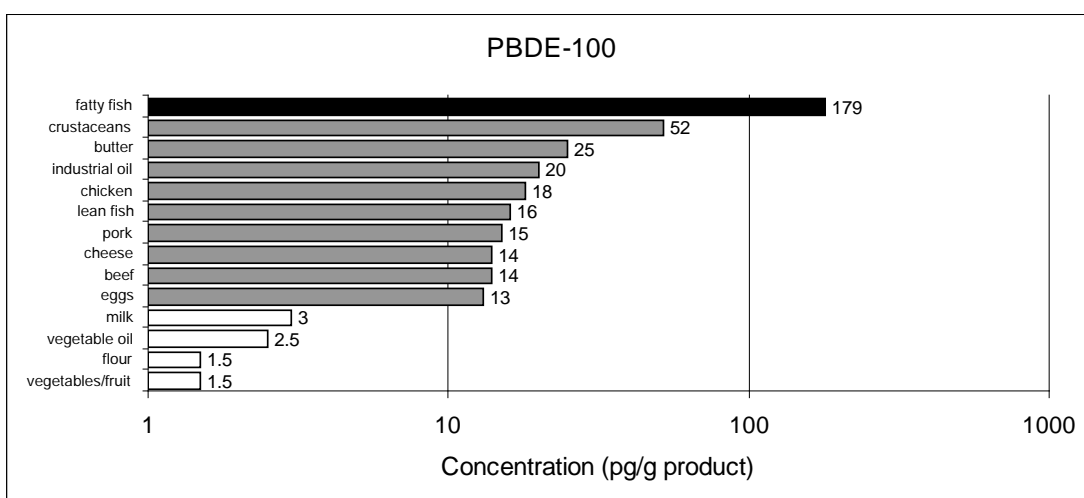
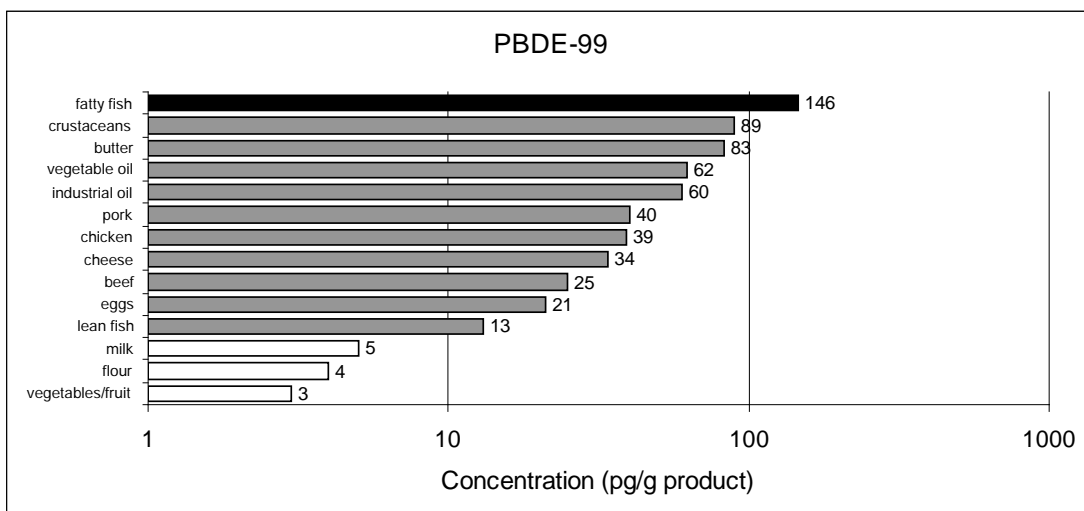
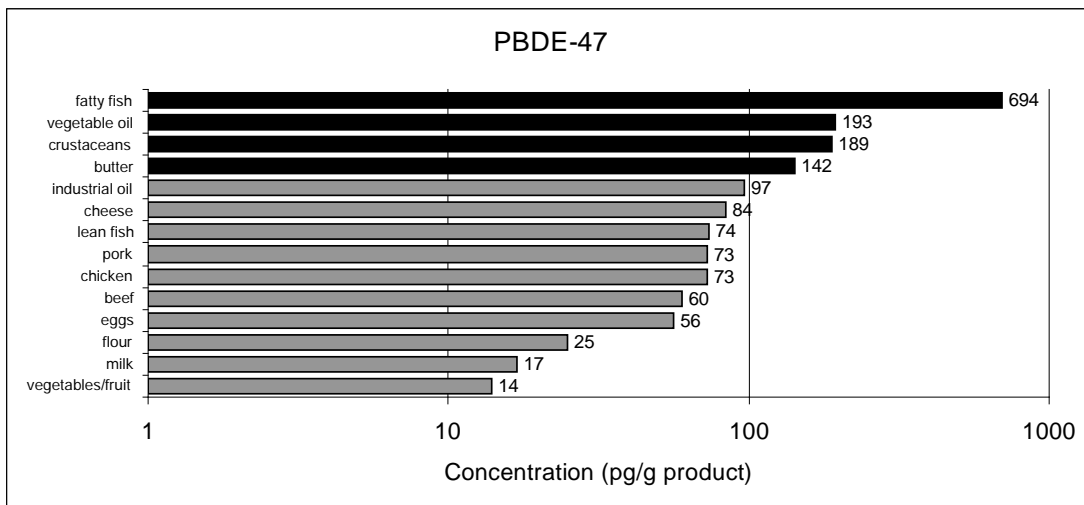


Figure 1C. Concentrations of PBDE-47, -99, -100, and -209 in food categories in 2008.

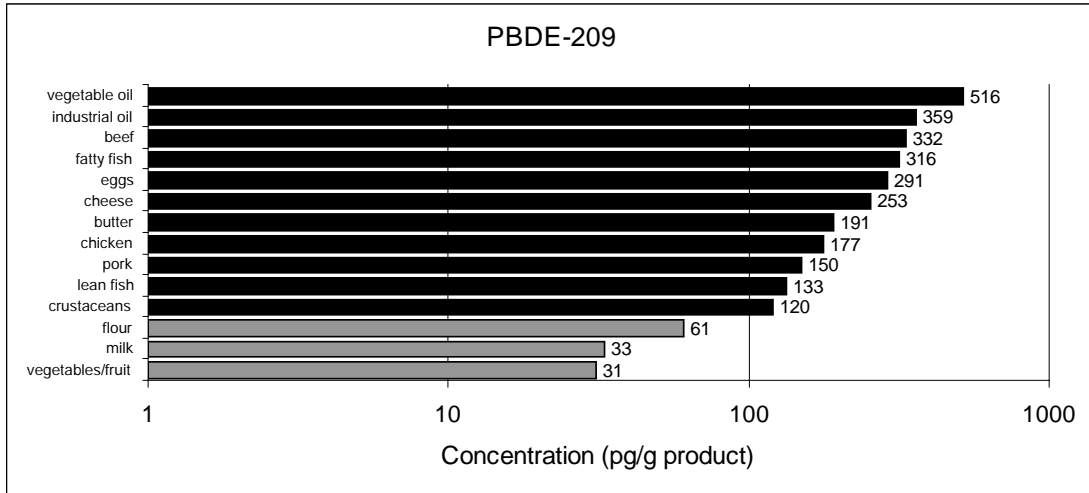


Figure 1C. (continued) Concentrations of PBDE-47, -99, -100, and -209 in food categories in 2008.

Comparison of concentrations in 2004, 2006 and 2008

Figure 2A shows the concentrations of PBDE-47 in food categories in 2004, 2006 and 2008. The concentration of PBDE-47 was highest in 2008 compared to 2004 and 2006 for the food categories beef, bread, butter, cheese, chicken, eggs, fruit, industrial oil, pork, vegetable oil and vegetables. For the categories crustaceans, fatty fish, lean fish and milk, the highest concentrations were measured in 2004. Lowest PBDE-47 concentrations were measured in 2006 compared to 2004 and 2008 for the categories beef, bread, cheese, chicken, crustaceans, milk and pork.

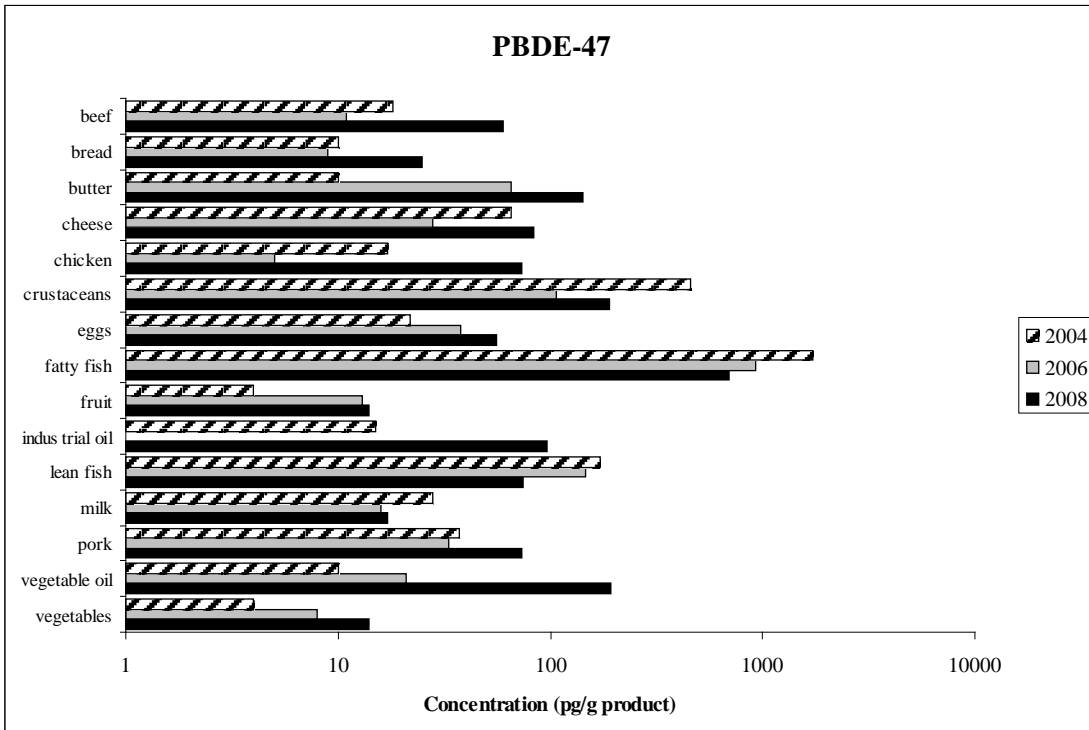


Figure 2A. Comparison of concentrations of PBDE-47 in food categories in 2004 (hatched bar), 2006 (grey bar) and 2008 (black bar).

Notes: Industrial oil was not measured in 2006. Vegetables and fruit were combined to one food category in 2008, the concentration of this category was used for both vegetable and fruit in this table.

The concentration of PBDE-99 was highest in 2008 compared to 2004 and 2006 for the food categories beef, butter, chicken, industrial oil, milk, pork and vegetable oil (Figure 2B). For the categories cheese, crustaceans, fatty fish and lean fish the highest concentrations were measured in 2004. Highest PBDE-99 concentrations in 2006 were observed in the categories eggs, fruit and vegetables compared to 2004 and 2008. The concentrations in bread were similar for the three time points.

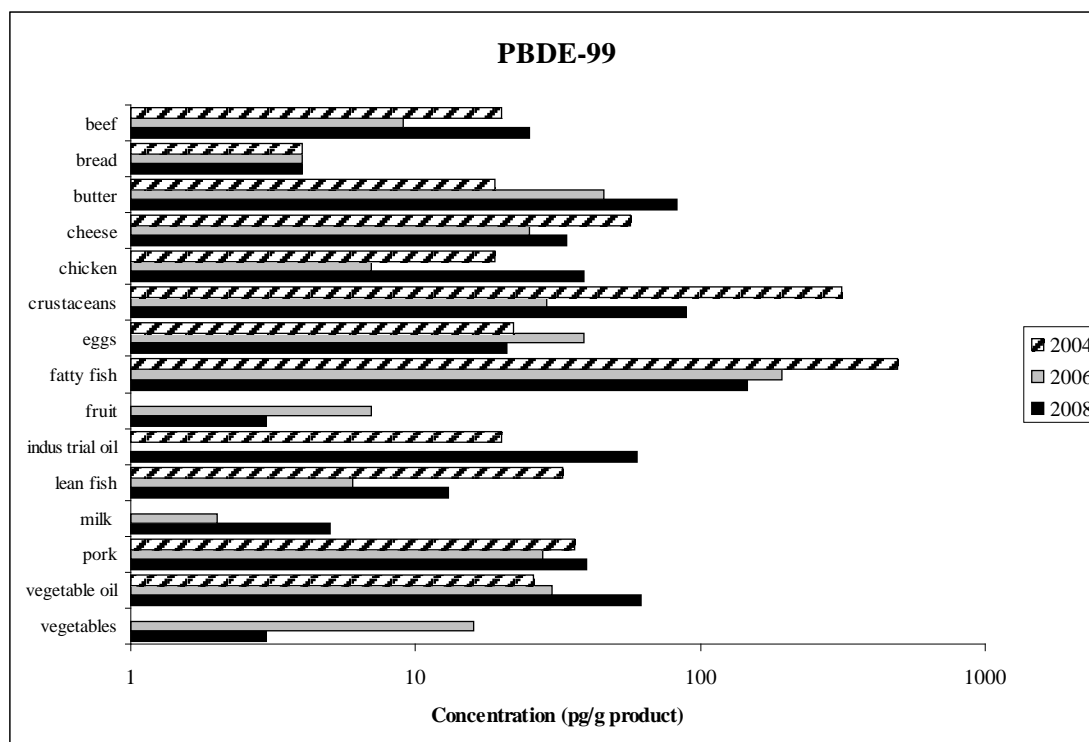


Figure 2B. Comparison of concentrations of PBDE-99 in food categories in 2004 (hatched bar), 2006 (grey bar) and 2008 (black bar).

Notes: Industrial oil was not measured in 2006. Vegetables and fruit were combined to one food category in 2008, the concentration of this category was used for both vegetable and fruit in this table. Concentrations of 1 pg/g product were measured in 2004 in the categories fruit, milk and vegetables.

The concentration of PBDE-100 was highest in 2008 compared to 2004 and 2006 for the food categories beef, butter, chicken and milk (Figure 2C). For the categories cheese, crustaceans, fatty fish, industrial oil, lean fish and vegetable oil highest concentrations were measured in 2004. Highest PBDE-100 concentrations in 2006 compared to 2004 and 2008 were observed in the categories bread, eggs, fruit and vegetables.

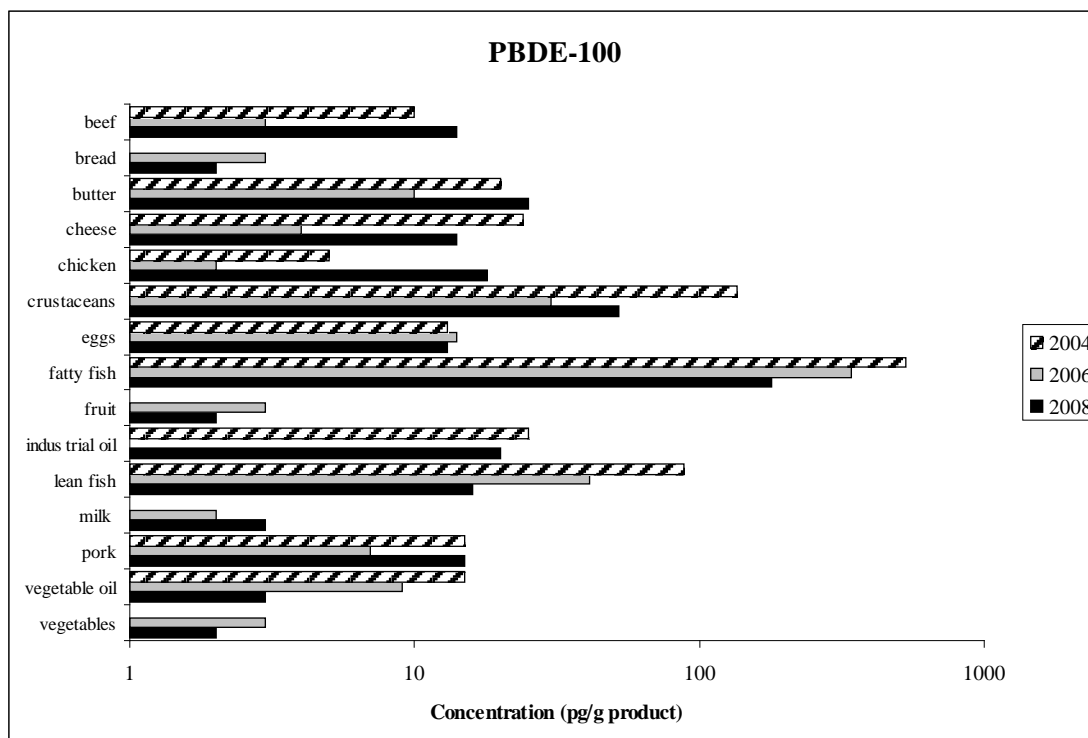


Figure 2C. Comparison of concentrations of PBDE-100 in food categories in 2004 (hatched bar), 2006 (grey bar) and 2008 (black bar).

Notes: Industrial oil was not measured in 2006. Vegetables and fruit were combined to one food category in 2008, the concentration of this category was used for both vegetable and fruit in this table. Concentrations of 1 pg/g product were measured in 2004 in the categories bread, fruit, milk and vegetables.

3.2 Contribution of food categories to intake

The ‘total diet method’ allows for the analysis of the contribution of various food categories to the total individual intake (as obtained from the two consecutive days in the DNFC3-3). Figure 3 presents these contributions for the 2004, 2006 and 2008 intake calculations for PBDE-47, -99, -100, and -209. In general, the contribution of a category is high when a particular category is frequently consumed in relative large amounts and contains high concentrations of PBDEs.

For PBDE-47, milk is the most important source of the intake, with milk accounting for almost half of the 2004 and 2006 intake (note that dairy products are also included in the consumption data). The remaining half was found divided over all other food categories, with none of them contributing more than 15% of the total exposure. The dominance of milk as source of PBDE-47 results from the high concentration of milk in 2004 and 2006 in combination with a high milk consumption. A dominance of milk as revealed for PBDE-47 was not found with PBDE-99 and -100. The reason for this is the relative low concentration of these congeners in milk (see Figure 1, PBDE-47 versus -99 and -100).

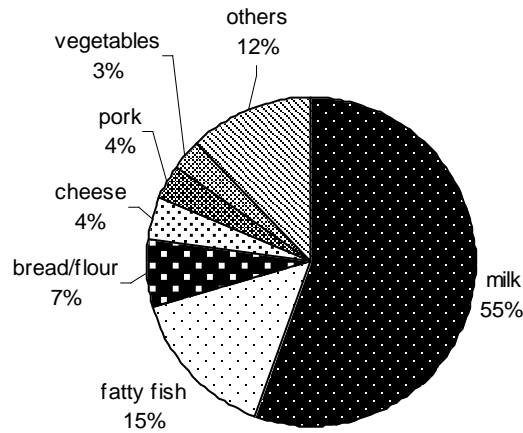
Main contributions to the 2004 intake of PBDE-99 are fatty fish (17%), pork (14%), cheese (14%), bread/flour (11%) and oils (11%). In 2006, vegetables (32%), milk (14%), pork (10%) and fruit (10%) contribute most to the intake. The high contribution of vegetables to the 2006 intake and fatty fish to the 2004 intake stems from the relatively high measured concentrations (see Figure 1). In 2004 fatty fish, oils and milk contributed 26%, 14% and 11% to the intake of PBDE-100, respectively. Milk contributed 24%

of the PBDE-100 intake in 2006, followed by fatty fish (16%), vegetables (13%), bread/flour (11%) and fruit (11%).

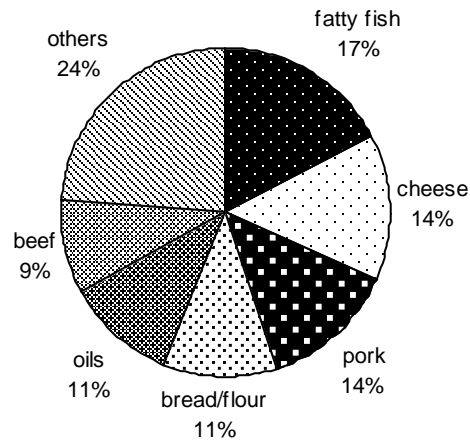
In 2008, milk is also the most important source of intake for PBDE-47, -99, -100, and -209, accounting between 26% and 35% of the intake. The intake is derived from both the concentration measured in food and the consumption. The high contribution of milk results from high consumption of milk and dairy products, since the concentrations of PBDEs in milk are rather low (3-33 pg/g), and in case of PBDE-99 and -100 about the detection limit (2-5 pg/g). Therefore, intake calculations based on PBDE-99 and -100 concentrations in milk are rather uncertain.

In 2008, the remaining percentage of intake of PBDE-47 was divided over other food categories, with none of them contributing more than 12% of the total exposure. Moderate contributions to the intake of PBDE-99, were oils (15%) and bakery products (14%). For PBDE-100, beside milk other categories showed a contribution less than 9%. PBDE-209 showed comparable intake percentages to PBDE-99, with moderate contributions of oils (15%) and beef (14%).

PBDE-47



PBDE-99



PBDE-100

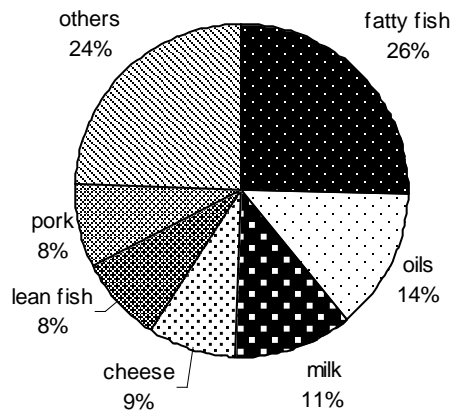
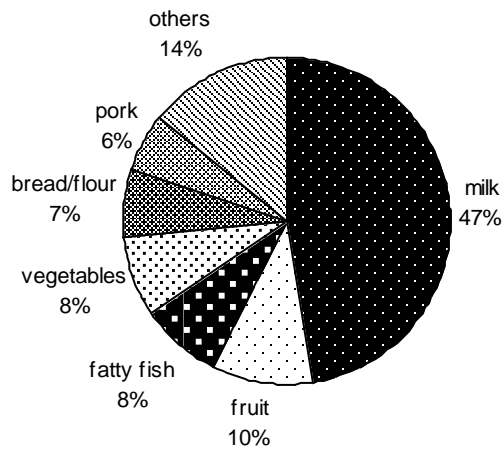
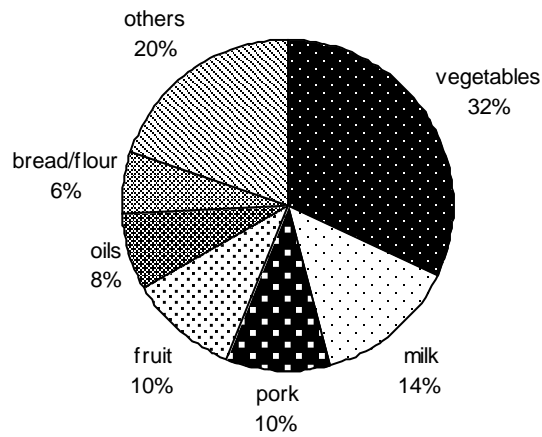


Figure 3A. The contribution of various food categories to the total individual intake (as obtained from the two consecutive days in the DNFC3-3) of PBDE-47, PBDE-99 and PBDE-100 in 2004.

PBDE-47



PBDE-99



PBDE-100

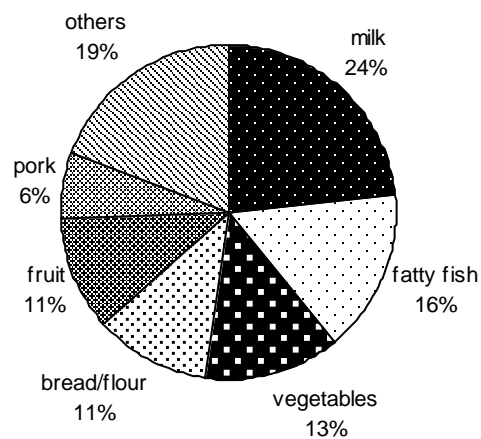
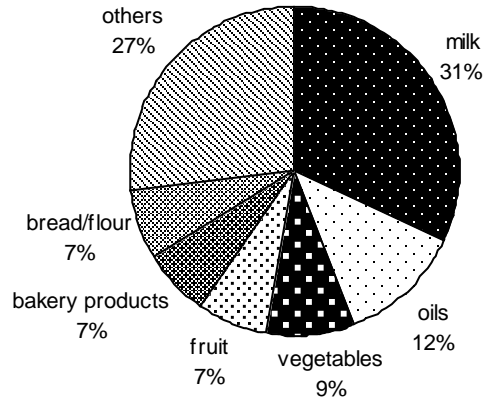


Figure 3B. The contribution of various food categories to the total individual intake (as obtained from the two consecutive days in the DNFC3-3) of PBDE-47, PBDE-99 and PBDE-100 in 2006.

PBDE-47



PBDE-99

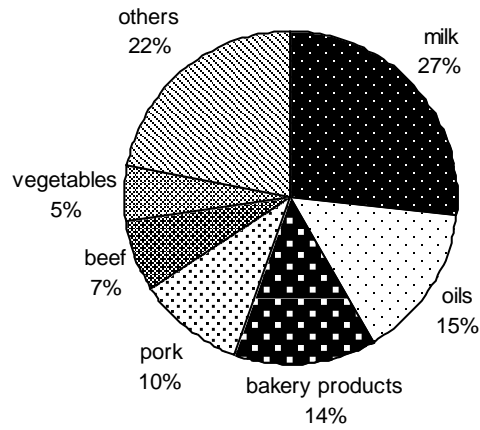
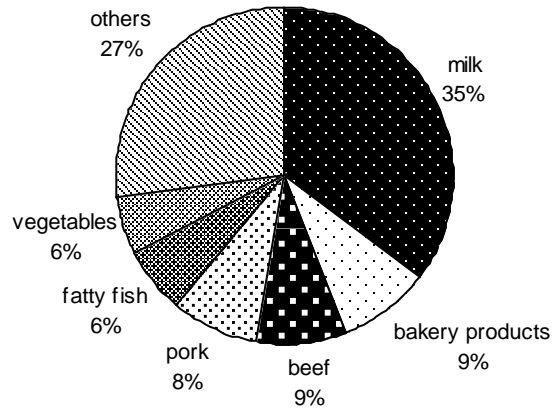


Figure 3C. The contribution of various food categories to the total individual intake (as obtained from the two consecutive days in the DNFC3-3) of PBDE-47, PBDE-99, PBDE-100, and PBDE-209 in 2008.

PBDE-100



PBDE-209

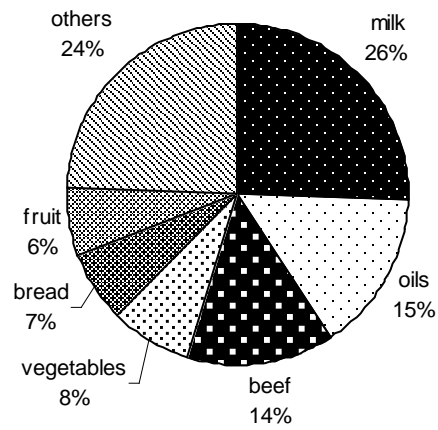


Figure 3C. (continued) The contribution of various food categories to the total individual intake (as obtained from the two consecutive days in the DNFC3) of PBDE-47, PBDE-99, PBDE-100, and PBDE-209 in 2008.

3.3 Intake calculations

Due to different consumption patterns, the dietary intake to PBDEs appeared to be age and sex dependent (data not shown). Intakes are presented separately for males and females (see Table 4). Table 4 also presents the percentiles of the life-long average intake of 2004, 2006 and 2008. In addition, 95% Confidence Intervals (CIs) are reported, which reflect the uncertainty of the sampling of the participants of DNFCS-3 and of the sampling of the foods. Note that CIs are wider in 2004 and 2006 compared to 2008.¹

PBDE-47 and -100

In case of PBDE-47 and -100, the percentile values of the life-long average intake of 2004 and 2006 are similar. In 2008, all percentiles of the life-long average intake of PBDE-100 are higher compared to those in 2004 and 2006. This is also the case for the best estimate for the intake of PBDE-47, but here the CIs are overlapping. This means that due to the relatively large sampling uncertainty, for PBDE 47 the intakes cannot be considered higher in 2008. For PBDE-47 the median intake amounted around 500 pg/kg bw/day for 2004 and 2006, while in 2008 the median intake amounted around 780 pg/kg bw/day. For PBDE-100, this was about 90 pg/kg bw/day in 2004 and 2006. In 2008, the median intake of PBDE-100 was around 125 pg/kg bw/day.

PBDE-99

The calculated median of the life-long average intake of PBDE-99 in 2006 is almost two-fold higher than in 2004, around 250 pg/kg bw/day versus 140 pg/kg bw/day, respectively. Subsequently, the life-long average intake in 2008 slightly is higher compared to 2006 (277 pg/kg bw/day versus 250 pg/kg bw/day). As 2004, 2006 and 2008 CIs of percentile values do not overlap it can be concluded that the life-long average intake of PBDE-99 has increased roughly two-fold between 2004 and 2008.

PBDE-209

The percentiles of the dietary intake of PBDE-209 are high compared to the other measured PBDEs (Figure 4). A comparison over time can not be made, since this is the first measurement and calculation of PBDE-209 using the 'total diet method'.

¹ The fact that confidence intervals are wider in 2004 and 2006 compared to 2008 is due to the sampling and measurement method. In 2004 and 2006, the fish categories consist of the several samples which were measured separately, while in 2008 only one combined sample was measured. The presence of more samples in one food category allows the calculation of the sampling uncertainty, whereas this calculation cannot be performed when only one sample was measured. In the latter case the confidence interval thus only reflects the uncertainty in the sampling of participants of the food consumption survey and not in the sampling of foods

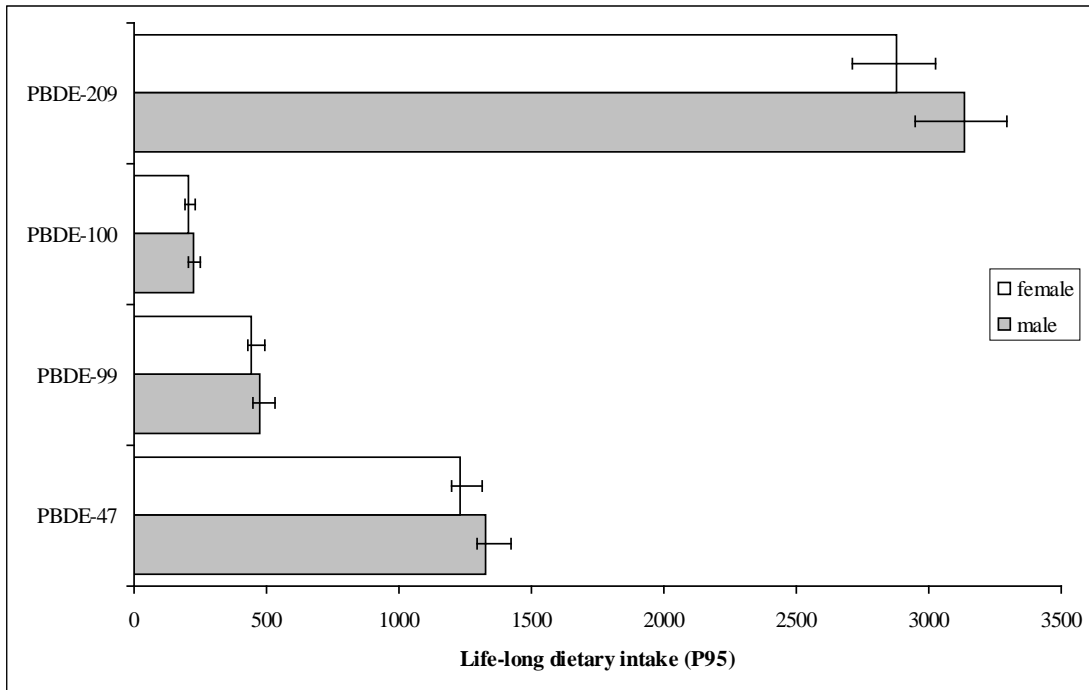


Figure 4. The 95th percentile (P95) of the life-long dietary intake of PBDE-47, -99, -100, and -209 in 2008. Error bars represent the 95% confidence intervals (reflecting the sampling uncertainty of the participant of DNFC3-3).

Table 4. Percentiles of age-dependent dietary intake of PBDE-47, -99, -100, and -209 (pg/kg bw/day). Samples below the LOD were set at ½LOD. Between brackets: 95% confidence interval.

PBDE-47	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	female	male	female	male	female	male	female
life-long average intake 2004	551 (504-834)	501 (459-758)	1147 (1038-1752)	1046 (947-1587)	1321 (1189-2024)	1203 (1085-1835)	1556 (1393-2399)	1417 (1268-2170)
life-long average intake 2006	497 (334-833)	446 (310-781)	917 (557-1682)	860 (520-1574)	1031 (614-1930)	966 (573-1801)	1180 (687-2258)	1105 (641-2109)
life-long average intake 2008	811 (794-862)	751 (734-797)	1328 (1298-1421)	1230 (1200-1313)	1460 (1425-1566)	1353 (1318-1448)	1630 (1588-1755)	1510 (1468-1622)

PBDE-99	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	female	male	female	male	female	male	female
life-long average intake 2004	150 (139-182)	129 (119-156)	257 (235-314)	221 (202-276)	284 (259-350)	246 (223-301)	321 (290-397)	277 (250-342)
life-long average intake 2006	256 (235-272)	241 (221-255)	397 (363-425)	374 (341-399)	432 (393-463)	406 (370-435)	477 (432-513)	447 (406-481)
life-long average intake 2008	287 (273-321)	267 (262-297)	475 (447-532)	440 (430-495)	524 (491-588)	484 (473-546)	584 (546-660)	541 (527-613)

PBDE-100	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	female	male	female	male	female	male	female
life-long average intake 2004	93 (85-103)	83 (76-92)	162 (145-182)	144 (129-161)	180 (159-203)	161 (143-180)	204 (179-231)	182 (160-204)
life-long average intake 2006	94 (71-120)	86 (61-110)	158 (116-208)	144 (105-191)	174 (127-231)	159 (116-212)	195 (142-262)	178 (129-240)
life-long average intake 2008	130 (122-144)	120 (113-134)	223 (208-248)	207 (193-231)	248 (230-276)	229 (213-256)	279 (258-313)	259 (239-290)

PBDE-209	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	female	male	female	male	female	male	female
life-long average intake (2008)	1981 (1877-2070)	1817 (1725-1899)	3137 (2950-3297)	2876 (2714-3028)	3424 (3212-3612)	3140 (2954-3317)	3797 (3539-4016)	3480 (3256-3694)

3.4 Intakes exceeding the Human Limit Value

The intake calculation of PBDE-99 in 2004 shows that the provisional HLV of PBDE-99 of 230 pg/kg bw/day corresponds with the 95th percentile of the male intake (95% CI: 235-314 pg/kg bw/day) and the 97.5th percentile of the female intake (95% CI: 223-301 pg/kg bw/day) (see Table 5). From these results it can be concluded that roughly 2.5% to 5% of the Dutch population in 2004 exceeded the HLV of PBDE-99 (note that due to considerable overlap between the CIs of the 95th percentile and 97.5th percentile more accurate conclusions cannot be drawn).

Considering the intake calculations of 2006, for both males and females, the provisional HLV of PBDE-99 of 230 pg/kg bw/day clearly is lower than the 95th percentile value and is just below the 95% CI of the 50th percentile in males (235-272 pg/kg bw/day) and overlaps with the 95% CI of the 50th percentile in females (221-255 pg/kg-bw/day) (see Table 5). This indicates that the percentage of the Dutch population whose PBDE-99 intake exceeds the HLV of PBDE-99 may have increased from 2.5-5% in 2004 to almost 50% in 2006.

The intake calculations of PBDE-99 in 2008 show that the provisional HLV corresponds with the 95% CI of the 25th percentile in both male and female (see Table 5). The median of the 25th percentile of females is just below the HLV. This indicates that roughly 75% of the PBDE-99 intake of the Dutch population in 2008 exceeded the HLV of PBDE-99.

Table 5. Percentiles of dietary intake of PBDE-99 (pg/kg bw/day). Between brackets: 95% confidence interval. In grey: the intakes which exceed the HLV of 230 pg PBDE-99/kg bw/day.

	P25 (2.5-97.5)	P50 (2.5-97.5)	P75 (2.5-97.5)	P95 (2.5-97.5)	P97.5 (2.5-97.5)	P99 (2.5-97.5)
2004						
Male	-	150 (139-182)	-	257 (235-314)	284 (259-350)	321 (290-397)
Female	-	129 (119-156)	-	221 (202-276)	246 (223-301)	277 (250-342)
2006						
Male	-	256 (235-272)	-	397 (363-425)	432 (393-463)	477 (432-513)
Female	-	241 (221-255)	-	374 (341-399)	406 (370-435)	447 (406-481)
2008						
Male	234 (222-262)	287 (273-321)	353 (335-394)	475 (447-532)	524 (491-588)	584 (546-660)
Female	217 (213-243)	267 (262-297)	327 (321-366)	440 (430-495)	484 (473-546)	541 (527-613)

4 Discussion and recommendations

4.1 Concentrations of PBDEs in food categories

The food categories bread/flour, vegetables/fruit and milk (except for PBDE-47 in 2004 and 2006) contained the lowest PBDE concentrations. Important notes on these findings are that the concentrations of PBDE-99 and -100 in milk, flour and vegetables/fruit are about or below the detection limit (2-5 pg/g) and only one measurement per food category is performed. Measurements about or below the detection limit contain a relatively high uncertainty. When these results are used for intake calculations, these data may lead to an uncertain contribution of the particular food category to the total intake. This implies especially for milk: this food category contributes for about 30% when using the data from VWA (2008). Using the data from RIKILT (see Appendix C), milk contributes for about 10% to the total intake.

The highest concentrations of PBDE-47, -99, and -100 were observed in fatty fish and crustaceans. High levels in fish were also observed by many others (Darnerud et al., 2006; Tomy et al., 2004; Frederiksen et al., 2009). In addition, high concentrations of PBDE-47, -99 and -100 in fatty fish and crustaceans were also observed by RIKILT, who have analysed the same samples of the food categories in 2008 (see Appendix C). The high concentrations of PBDEs are assumed to stem from fish being at the top of the marine food chain.

When the different time points are compared, for PBDE-47 the highest concentrations were observed in 2008 in 11 of the 15 food categories. These results suggest an increase of PBDE-47 concentrations in food in 2008, compared to 2004 and 2006. However, the fact that measurements were performed by different laboratories may also explain the different concentrations. Therefore, the focus should be on the samples of 2006 and 2008, which were all measured at the VWA, except for fish and milk. Indeed, the concentrations of these thirteen food categories all increase from 2006 to 2008. Since it is not very likely that this is caused by coincidence as a result of the low sample size of the food, this finding indicates an increase with time for PBDE-47 concentrations in food between 2006 and 2008.

For PBDE-99 and PBDE-100, a time trend from 2004 to 2008 was not observed for the concentrations of PBDEs in food; the highest concentrations in 2008 were observed in only seven and four food categories, respectively. Addressing the food categories that were measured at the VWA in 2006 and 2008, a similar pattern for both PBDEs is found: the concentrations of meat, butter, cheese are higher in 2008 than in 2006, while for bread, eggs, fruits and vegetables they were not. Hence, an unequivocal time trend in the concentrations of PBDE-99 and -100 is not present.

As mentioned earlier, the samples collected in 2008 are also measured by RIKILT and the results of PBDE-47, -99 and -100 are compared with the results from the VWA. The measured fat percentages show only small differences between the laboratories, except for milk (1.4% versus 1%). The concentrations in the food categories are in 88% of the samples lower compared to the results from the VWA (see Appendix C). This indicates that due to the absence of standardized analytical methods significant differences between laboratories may occur and this will lead to unwanted uncertainty to the intake calculations. To account for the uncertainties that arise from the different results between the two laboratories, the highest concentration data (i.e. those of VWA) were used as 'worst case scenario'.

Food and house dust are the main routes of exposure to PBDEs with food being the dominant route of exposure for adults (determined for PBDE-47, -99, -100, and -183) (Zeilmaker et al., 2008). In

concordance with the other PBDEs, PBDE-209 showed high levels in the majority of the food categories. However, the concentrations of PBDE-209 in house dust are even higher compared to food. Furthermore, human exposure of PBDE-209 via house dust may exceed that from food (Oomen et al., 2008). The high exposure to PBDE-209 and the relative high contribution from house dust to the total PBDE-209 exposure warrants a derivation of a HLV for PBDE-209 and a toxicological risk assessment.

4.2 Intake calculations

The life-long average intakes of PBDE-47, -99, and -100 in 2008 are higher compared to the intake in 2004 and 2006 (although for PBDE-47 the confidence intervals of the different time points overlap). For PBDE-47, the increase in 2008 was expected, since an increase in the concentrations between 2006 and 2008 was indicated above. For the other two PBDEs the increase of the intake is explained by the apparently larger effect of the increased concentrations of meat, butter and cheese than that of the decreased concentrations for bread, eggs, fruit and vegetables.

The life-long median intake of PBDE-47 is about 7-fold lower when data from RIKILT are used compared to data from VWA. For PBDE-99 and PBDE-100, the P50 is about 3-fold and 5-fold lower, respectively. These differences, though substantial, lead to intake calculations for sum of PBDE-47, -99 and -100 intake which are within (VWA: 89 ng/day) or at the lower end (RIKILT: 17 ng/day) of the reported range of the dietary intake in various European countries (range: 27 -106 ng/day, Bocio et al., 2003; Harrad et al., 2004; Darnerud et al., 2006; Knutsen et al., 2008; Zeilmaker et al., 2008; Fromme et al., 2009).

- **Food consumption survey**

The calculations reported here are based on food consumption data collected from April 1997 to March 1998. These consumption data were linked to PBDE measurements in food samples which were collected in 2004, 2006 and 2008. Changes in food consumption after 1998 have not been taken into account. Here bias may have been introduced by linking rather old food consumption data to actual food monitoring results.

- **Food sampling protocol**

The food sampling protocol assures the sampling of almost all food items expected to contain PBDEs, i.e. the food items comprising the total daily fat intake together with vegetables, fruit and bread. Furthermore, as with the exception of the inclusion of bakery products as a food category in 2006 and 2008, the same protocol was used for the 2004, 2006 and 2008 intake calculations. This will probably not have introduced systematic bias in the calculations.

- **Analytical method for PBDE measurements**

The intake calculations were mainly based on two different analytical methods, i.e. a method applied in 2004 by RIVM (LOD: 1- 2 pg/g product, De Winter-Sorkina et al. (2006)) and in 2006 by the VWA (LOD: 2-5 pg/g product). Though both methods slightly differed in sensitivity to detect PBDEs in food, the absence of ring testing, i.e. the extent to which these analytical methods are comparable, cannot systematically be evaluated. However, it should be kept in mind that, even after appropriate ring testing, differences between the results of analytical methods between different laboratories may amount up to a factor of 2-3 (Van Leeuwen et al., 2006). In addition, differences between the laboratories of VWA and RIKILT have been shown in concentration measurements of samples collected in 2008. For PBDE-47, concentrations measured by VWA are about 5-fold higher compared to RIKILT, while for PBDE-99 and -100, the concentrations are on average 3-fold higher.

- Handling of non-detects**

All non-detects were substituted with values corresponding to $\frac{1}{2}$ LOD. Although it is likely that all foods are contaminated by PBDEs during growth and/or production, due to the presence of PBDEs in soil, air and surface water, it is uncertain if assigning $\frac{1}{2}$ LOD is close to the real situation. The US Food and Drugs Administration stated that assigning $\frac{1}{2}$ LOD to congeners with a concentration below LOD for vegetables and fruits results in overestimates of exposure (FDA, 2004).
- Statistical method used to analyze individual food intake data**

In this report the BBN method was used for the 2004, 2006 and 2008 intake calculations. With regard to the year 2004, using the same food monitoring data and food consumption data, PBDE intake calculations have previously been performed with earlier statistical methods (STEM: De Winter-Sorkina, 2006, Bakker et al., 2008; Nusser in: De Mul et al., 2005). As with the BBN method the Nusser method and the STEM method both estimate the long-term PBDE intake and its distribution characteristics, i.e. percentile values. Apart from the incorporation of an extended uncertainty analysis of the intake calculation in the BBN method (calculation of the uncertainty of distribution characteristics), the three methods contain some slight differences in the way individual PBDE intake data are statistically handled. As a methodological comparison between these methods is beyond the scope of this report, we suffice hereby comparing their outcomes of the 2004 intake calculations (Appendix D). When compared on the basis of the median intakes the PBDE-47, -99 and -100 intakes as calculated with the BBN method are 10 to 30% higher than the values calculated with either the Nusser or the STEM method. Similarly, percentile values were consistently estimated 10 to 30% higher in comparison with the STEM-method, but 20 to 40% lower when compared with the Nusser method. These differences show that there is a relatively small model uncertainty when calculating dietary PBDE intakes with the BBN, STEM or Nusser method on the basis of the DNFC-3 and the PBDE measurements shown in Table 1.

4.3 Intakes exceeding the Human Limit Value

When taking the intake calculations of 2008, the provisional HLV of PBDE-99 of 230 pg/kg bw/day is at the 25th percentile. This limit value is based on the extrapolation of reproductive toxicity from experimental animals to man (Bakker et al., 2008). A previous risk assessment showed that in 2004 a low, though significant, fraction (roughly 2.5% to 5%) of the Dutch population exceeds a provisional human limit for PBDE-99. The present report confirms this conclusion. This percentage amounted around 50% in 2006 and increased further in 2008 to roughly 75% of the Dutch population. Given the uncertainties mentioned above with regard to the PBDE measurements in the food samples and their corresponding intake calculations, the calculated percentages should not be interpreted as a clear time-trend. Merely they indicate that a substantial fraction (minimum: 2.5%, maximum: 75%) of the Dutch population has a long-term PBDE-99 intake which exceeds the provisional HLV for this contaminant. Furthermore, it should be noted that this excess maximally amounts a factor of 2. Though small, such an excess may be of toxicological significance and stresses the importance of the monitoring of PBDEs in Dutch food. In addition, the intake calculations based on data of RIKILT showed the provisional HLV of PBDE-99 at the 99th percentile for males and >99th percentile for females, which indicates that a negligible fraction of the Dutch population exceeds the provisional HLV for PBDE-99. This indicates that the intake calculations are uncertain due to variation between laboratories in concentration measurements.

4.4 Health impact assessment

Though the present report focuses on the toxicological evaluation of PBDE-99, it might be discussed whether a risk-benefit analysis for flame retardants should be performed in the future. To perform such analysis, both risks and anticipated benefits have to be accurately identified, evaluated, and described. Discussion on the general principles or approaches for conducting a quantitative risk-benefit analysis is still ongoing. Currently, the methodology for assessing risks to human health is in development.

4.5 Refinement of the risk assessment of PBDEs

The HLV for PBDE-99 used in this report is derived by means of the so-called 'Body Burden' approach. In this procedure, which mirrors the SCF/WHO/JECFA derivation of the HLV of the dioxin 2,3,7,8-TCDD, reproductive toxicity is extrapolated from experimental animals to man. In short the HLV is the human exposure level which, after prolonged exposure, leads to a Whole Body Concentration (WBC) in women of reproductive age at which no reproductive toxicity is expected in male off-spring which have been exposed to PBDE-99 *in utero*. In order to calculate the HLV, it was assumed that one-compartmental kinetics suffices to describe PBDE kinetics in man and that humans have a *constant* daily PBDE intake per kg body weight. Given these assumptions and a half-life of around 2 years for PBDE-99 (Bakker et al., 2008) this would lead to near 'steady state' WBC after the age of 10-15 years, i.e. well before a woman's reproductive age.

However, in real life the human intake of persistent contaminants per kg body weight is variable and steadily decreases from childhood until a stable level is reached during adulthood (e.g. Table 4, PBDE-209). Averaging this exposure over the entire life span than might end up with an exposure which underestimates the WBC and its corresponding toxic risk during childhood, early adulthood and probably during a part of reproductive age. This underestimation can only be avoided by replacing a risk assessment based on a comparison between the average life-long exposure and the HLV by a risk assessment which is based on 1) a simulation of the age dependent human WBC as function of age specific intake data and 2) on a comparison of the simulated WBC with its corresponding no adverse WBC (which already is part of the HLV derivation).

4.6 Recommendations

- **Monitoring of PBDEs in food**

As the life-long average intake of PBDE-47, -99, and -100 in 2008 is higher compared to the intake in 2004 and 2006 (although for PBDE-47 the confidence intervals of the different time points overlap), it is recommended to monitor these PBDE concentrations in food products regularly (four-yearly) until a decrease in exposure is observed below a particular HLV.

Particularly the food category milk is of interest, since milk is the most important source of intake for PBDE-47, -99, -100 and -209, accounting between 25% and 33% of the individual intake. In addition, a substantial fraction (minimum: 2.5%, maximum: 75%) of the Dutch population has a long-term PBDE-99 intake which exceeds the provisional HLV. Hence, monitoring of PBDEs in food and intake calculations remain necessary to confirm whether the human health risk associated with the dietary intake of PBDE-99 is increasing in the Netherlands. Moreover, PBDE-209 was measured in 2008 only, and therefore monitoring this congener in food over time is also recommended.

- **Risk assessment of PBDEs**

To date, PBDE-99 is the only PBDE for which a provisional HLV is derived and consequently the only congener for which a quantitative risk assessment can be performed. The potential health risk as revealed for PBDE-99 indicates that caution should be exercised with other PBDEs. In this context, HLV values should be derived for other PBDEs as well, in particular PBDE-47, -100, and -209 and the calculated HLVs should be compared with the intake assessment as reported here.

References

Bakker MI, De Winter-Sorkina R, De Mul A, Boon PE, Van Donkersgoed G, Van Klaveren JD, Baumann BA, Hijman WC, Leeuwen SPJ, De Boer J, Zeilmaker MJ (2008) Dietary intake and risk evaluation of polybrominated diphenyl ethers in The Netherlands. *Mol Nutr Food Res* 52, 204-216.

Bocio A, Llobet JM, Domingo JL, Corbella J, Teixido A, Casas C (2003) Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Foodstuffs: Human exposure through the diet. *J Agric Food Chem* 51, 3191-3195.

Consumentenbond (2005) Verantwoorde vis; gezondheid en duurzaamheid van 15 vissoorten. Available at http://www.consumentenbond.nl/morello-bestanden/93079/Rapport_Vis_2005.pdf

Darnerud PO, Atuma S, Aune M, Bjerselius R, Glynn A, Grawé KP, Becker W (2006) Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market basket data. *Food Chem Toxicol* 44(9),1597-1606.

De Boer WJ and Van der Voet H (2007) MCRA, Release 6, a web-based program for Monte Carlo Risk Assessment, On line Manual, documenting MCRA Release 6.0.

De Mul A, Winter-Sorkina R de, Boon PE, Van Donkersgoed G, Bakker MI, Van Klaveren JD (2005) Dietary intake of brominated diphenyl ether congeners by the Dutch population. Report 2005.006, RIKILT Institute of Food Safety, Wageningen.

De Winter-Sorkina R, Bakker MI, Wolterink G, Zeilmaker MJ (2006) Brominated flame retardants: occurrence, dietary intake and risk assessment. Report no. 320100002, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven.

De Wit CA (2002) An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46, 583-624.

Domingo JL (2004) Human exposure to polybrominated diphenyl ethers through the diet. *J Chromatogr* 1054, 321-326.

FDA (2004) PCDD/PCDF exposure estimates from TDS samples collected in 2001-2004. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, CFSAN/Office of Plant and Dairy Foods. Available at www.cfsan.fda.gov/~lrd/dioxee.html.

Frederiksen M, Vorkamp K, Thomsen M, Knudsen LE (2009) Human internal and external exposure to PBDEs-a review of levels and sources. *Int J Hyg Environ Health* 212(2),109-134.

Fromme H, Körner W, Shahin N, Wanner A, Albrecht M, Boehmer S, Parlar H, Mayer R, Liebl B, Bolte G (2009) Human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDE), as evidenced by data from a duplicate diet study, indoor air, house dust and biomonitoring in Germany. *Environment International* 35, 1125-1135.

Harrad S, Wijesekera R, Hunter S, Halliwell C, Baker R (2004) Preliminary assessment of UK human dietary and inhalation exposure to polybrominated diphenyl ethers. *Environ Sci Technol* 38, 2345-2350.

Kistemaker C, Bouman M, Hulshof KFAM (1998) De consumptie van afzonderlijke producten door Nederlandse bevolkingsgroepen-Voedelinconsumptie peiling 1997-1998 (Consumption of food products by Dutch population groups-Dutch National Food Consumption Survey 1997-1998, TNO report V98.812, TNO-Voeding, Zeist, the Netherlands.

Knutsen HK, Kvalem HE, Thomsen C, Frøshaug M, Haugen M, Becher G, Alexander J, Meltzer HM (2008) Dietary exposure to brominated flame retardants correlates with male blood levels in a selected group of Norwegians with a wide range of seafood consumption. *Mol Nutr Food Res* 52, 182-183.

Oomen AG, Janssen PJCM, Dusseldorp A, Noorlander CW (2008) Exposure to chemicals via house dust. Report no. 609021064, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven.

Tomy GT, Palace VP, Halldorson T, Braekevelt E, Danell R, Wautier K, Evans B, Brinkworth L, Fisk AT (2004) Bioaccumulation, biotransformation, and biochemical effects of Brominated diphenyl ethers in juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Environ Sci Technol* 1, 38(5), 1496-1504.

Van Dooren MMH, Boeijen I, Van Klaveren JD, Van Donkersgoed G (1995) Conversie van consumeerbare voedingsmiddelen naar primaire agrarische producten (Conversion of foods to primary agricultural commodities), RIKILT report 95-17, RIKILTDLO, Wageningen, the Netherlands.

Van Leeuwen SPJ, Van Cleuvenbergen R, Abalos M, Pasini AL, Erikson U, Cleeman M, Hajslova and De Boer J (2006) New certified and candidate certified reference materials for the analysis of PCBs, PCDD/Fs, OCPs and BFRs in the environment and food. *Trends in Analytical Chemistry* 25 (4), 397-409.

Zeilmaker MJ, Bokkers BGH, Noorlander CW, Te Biesebeek JD, Jekel AA, Schothorst RC (2008) Polybrominated diphenyl ethers: occurrence in Dutch duplicate diets and comparison with intake from European house dust. Report no. 320100003, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven.

Appendix A. Analytical methods

RIVM

Componenten

De volgende 11 PBDE's zijn geanalyseerd. Deze selectie is gemaakt op de hoogst voorkomende congenere in biologische matrices. De nummering van de PBDE's is analoog aan die van de PCB's.

BDE 17	2,2',4-tribromodiphenyl ether
BDE 28	2,4,4'-tribromodiphenyl ether
BDE 47	2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether
BDE 66	2,3',4,4'-tetrabromodiphenyl ether
BDE 85	2,2',3,4,4'-pentabromodiphenyl ether
BDE 99	2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether
BDE 100	2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether
BDE 138	2,2',3,4,4',5'-hexabromodiphenyl ether
BDE 153	2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenyl ether
BDE 154	2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether
BDE 183	2,2',3,4,4',5',6-heptabromodiphenyl ether

Extractiemethode

De uitgevoerde extractiemethode is een vloeistof/vloeistofextractie, beschreven in SOP LOC/148/01; extractie van vet uit melk en bloedplasma voor de bepaling van PCDD/F's, planaire PCB's en/of overige PCB's in het extraheerbare vet. Hierbij worden het vet en alle vetoplosbare stoffen uit de melk geëxtraheerd. Voor de bepaling van de PBDE's is echter een deel van het overgebleven vetextract van de PCB/OC-analyse gebruikt.

Clean upmethode

De clean up vindt plaats op een automatisch HPLC-systeem over een silica-kolom, beschreven in SOP LOC/206/00: 'De bepaling van OC's, indicator PCB's en mono-ortho PCB's in moedermelk'. Hierbij worden het vet en een deel van de eventueel storende componenten verwijderd. Er is 1 ml vetoplossing (45 mg vet/ml hexaan) over het systeem geleid. De verkregen isohexaanfracties zijn drooggedampt aan de lucht en opgenomen in 0,5 ml hexaan. Deze fracties zijn voldoende storingsvrij, zodat zij direct geanalyseerd kunnen worden.

GC-MS-methode

De ¹³C₁₂-gelabelde interne standaardmix (zes componenten) is voor de clean-up aan het vetextract toegevoegd. Vooraf is er een experiment uitgevoerd om het extractierendement van de PBDE's uit melk vast te stellen. Alleen als het extractierendement hoog genoeg is, is het geoorloofd om de ¹³C₁₂-standaard pas na de extractie toe te voegen. Het experiment is uitgevoerd met tien deelmonsters melk, waaraan de ¹³C₁₂-standaard vóór de extractie is toegevoegd en de overeenkomende oude vetmonsters, waaraan de ¹³C₁₂-standaard na extractie is toegevoegd. In de tabel hieronder zijn de gehalten vergeleken van beide deelmonsters. Het gevonden gehalte van het vetmonster is gedeeld door het gevonden gehalte van het melkmonster maal 100%. Dit is alleen gedaan voor de congenere waarvan de waarden aantoonbaar waren.

Tabel A1. Extractierendement, uitgedrukt als gevonden gehalte vet/gevonden gehalte melk * 100% voor een gemiddelde van 10 monsters.

	BDE17	BDE28	BDE47	BDE66	BDE100	BDE99	BDE85	BDE154	BDE153	BDE138	BDE183
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
gemiddelde (n=10)	*	104	105	*	95	94	*	*	99	*	146
sd		18.5	16.4		9.2	10.2			11.9		79
RSD (%)		17.8	15.6		9.6	10.9			12.0		54

* waarden rond de bepalingsgrens

Voor alle PBDE's ligt het extractierendement rond de 100%, behalve voor BDE183. BDE183 gedraagt zich afwijkend, hiervoor is geen verklaring te geven. Uit Tabel 6A blijkt dat de reproduceerbaarheid (en dus ook de meetonzekerheid) van het met de moedermelkmonsters meegenomen kwaliteitsmonster ook afwijkend is voor BDE 183 ten opzichte van de overige PBDE's. Op basis van dit experiment is besloten de oude moedermelkvetten te gebruiken voor de PBDE-analyse. De monsters zijn geanalyseerd met een GC-MSD(EI) voorzien van een PTV-injector. Het injectievolume is 100 µl. De gebruikte apolaire GC-kolom is een DB-5MS 30m x 0,25 mm x 0,1 µm.

Voor de berekening is er gekozen voor een éénpuntskalibratie op een gemiddelde van de spuitstandaard. De monsters zijn hierop berekend middels isotoop-verdunning. De gekozen m/z-waarden zijn afkomstig uit het molekuulioncluster of het M-2Br-cluster. Uit het meest gevoelige (en minst verstoorde) cluster zijn twee ionen gekozen en uit een tweede cluster is ter verificatie nog een derde ion gekozen.

Tabel A2. m/z-waarden.

	¹² C ₁₂		verificatie	¹³ C ₁₂	
Tri-BDE	[M+2] ⁺ 405,80	[M+4] ⁺ 407,80	[M-2Br+2] ⁺ 247,97	[M+2] ⁺ 417,84	[M+4] ⁺ 419,84
Tetra-BDE	[M+2] ⁺ 483,71	[M+4] ⁺ 485,71	[M-2Br+2] ⁺ 325,88	[M+2] ⁺ 495,75	[M+4] ⁺ 497,75
Penta-BDE	[M-2Br+2] ⁺ 403,79	[M-2Br+4] ⁺ 405,79	[M+4] ⁺ 563,62	[M-2Br+2] ⁺ 415,83	[M-2Br+4] ⁺ 417,83
Hexa-BDE	[M-2Br+2] ⁺ 481,70	[M-2Br+4] ⁺ 483,70	[M+4] ⁺ 641,53	[M-2Br+2] ⁺ 493,74	[M-2Br+4] ⁺ 496,74
Hepta-BDE	[M-2Br+4] ⁺ 561,61	[M-2Br+6] ⁺ 563,60	[M+6] ⁺ 721,44	[M-2Br+4] ⁺ 573,65	[M-2Br+6] ⁺ 575,64

vet= ion voor berekening

tweede ion uit hetzelfde Broomcluster = controle ion voor m/z-verhouding (identificatie)

ion uit het andere Broomcluster = controle ion (verificatie/confirmatie)

Voorwaarden berekening:

* Alles kleiner dan de bepalingsgrens = 3* ruis wordt niet geïntegreerd.

* Waarden met een te grote afwijking van de relatieve retentietijd ten opzichte van ¹³C₁₂-PBDE's weglaten.

* De twee ionen uit hetzelfde broomcluster mogen qua verhouding niet meer dan 15% afwijken in vergelijking met de verhouding van de gemiddelde standaard conform LOC SOP/115/04; analyse van 2,3,7,8-polychloordibenzo-p-dioxinen en 2,3,7,8-polychloordibenzofuranen in extracten van biotisch materiaal. Bij waarden rond de bepalingsgrens mag deze afwijking groter zijn, tot 50%. Bij waarden met een afwijking >50% is de gevonden waarde als bepalingsgrens aangehouden en als zodanig gerapporteerd.

Als maar een van de twee ionen wordt aangetoond, wordt of de vastgestelde bepalingsgrens gerapporteerd of de gevonden waarde als bepalingsgrens gerapporteerd, afhankelijk van welk ion is aangetoond.

Het ion uit het tweede cluster is meegenomen ter confirmatie, er wordt wel naar verhoudingen gekeken, maar er zijn geen grenzen gesteld. Het derde ion dient aanwezig te zijn als de andere twee dit ook zijn, mits dit te verwachten is op grond van gevoeligheid en gevonden gehalten. Het derde ion is vaak minder gevoelig in vergelijking met de andere twee ionen.

Bepalingsgrenzen

De te verwachten gehalten in moedermelk zijn, voor de PBDE's met de hoogste concentraties, 0,5-2 ng/g vet. De overige PBDE's komen voor op een niveau van 0,01-0,1 ng/g vet. De bepalingsgrenzen zijn visueel vastgesteld aan de hand van 3* ruis in de moedermelkchromatogrammen.

Tabel A3. Vastgestelde bepalingsgrenzen.

	BDE17	BDE28	BDE47	BDE66	BDE100	BDE99	BDE85	BDE154	BDE153	BDE138	BDE183
	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet
bepalingsgrenzen	0.03	0.02	0.03	0.06	0.05	0.05	0.08	0.05	0.04	0.1	0.09

Blanco-waarden

Met de moedermelkmonsters zijn een 15-tal procedure blanco's meegenomen. Hiervoor is een oplossing van slaolie, met hieraan de ¹³C-standaard toegevoegd, gebruikt.

Tabel A4. Gehalten procedure-blanco's.

	BDE17	BDE28	BDE47	BDE66	BDE100	BDE99	BDE85	BDE154	BDE153	BDE138	BDE183
	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet
gemiddelde vetorgel blanco (n=15)	<0.03	<0.02	0.07	<0.06	<0.05	0.08	<0.2*	<0.05	<0.04	<0.1	<0.09
sd			0.02			0.02					
RSD			32.0			29.4					

* In de vetorgel blanco zit een storing, die niet in de monsters zit. De storing komt waarschijnlijk uit de slaolie, gebruikt voor de procedure-blanco.

Voor deze gevonden waarden is geen correctie uitgevoerd.

Lineairiteit MSD

Het lineair bereik van de detector voor PBDE's is niet groot, circa 2 decaden. De concentratierange loopt 0 tot 1,25 ng/ml, met een spuitconcentratieniveau van 0,25 ng/ml en een detectiegrens van 0,00625 ng/ml. De moedermelkmonsters 1998 hebben gehalten dicht rond de bepalingsgrens. De gehalten van de hoogst voorkomende PBDE in moedermelk; BDE 47 liggen qua piekhoogte een factor 10 lager tot maximaal een factor 2 hoger dan de spuitconcentratie. Alle gehalten vallen dus binnen het

lineaire gebied van de detector, het is dus geoorloofd om de berekening op een éénpuntskalibratie uit te voeren.

Herhaalbaarheid standaard

De herhaalbaarheid van de standaard is vastgesteld aan hand van de spuitstandaard die 32 maal met de monsters is meegespoten. Na elke 10 monsters zijn er 2 standaarden gespoten.

Tabel A5. Herhaalbaarheid standaard.

	BDE17	BDE28	BDE47	BDE66	BDE100	BDE99	BDE85	BDE154	BDE153	BDE138	BDE183
	piekhoogte	piekhoogte	piekhoogte	piekhoogte	piekhoogte	piekhoogte	piekhoogte	piekhoogte	piekhoogte	piekhoogte	piekhoogte
zonder correctie voor 13C-PBDE's											
gemiddelde standaard (n=32)	213526	250348	211346	113666	187419	220920	188568	180154	97621	159195	94691
sd	11169	13262	12136	6121	9625	11559	12886	10530	8083	17005	13088
RSD (%)	5.2	5.3	5.7	5.4	5.1	5.2	6.8	5.8	8.3	10.7	13.8
	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte	gecorrigeerde piekhoogte
met correctie voor 13C-PBDE's											
gemiddelde standaard (n=32)	0.910	1.067	1.107	0.596	0.864	1.019	0.869	1.001	0.541	0.881	0.946
sd	0.026	0.028	0.029	0.027	0.032	0.033	0.043	0.028	0.017	0.046	0.029
RSD (%)	2.8	2.6	2.6	4.5	3.7	3.2	4.9	2.8	3.1	5.2	3.1

Reproduceerbaarheid monsters

De reproduceerbaarheid van de methode is vastgesteld aan de hand van het kwaliteitsmonster moedermelk 99M0474. Dit monster is een aantal keer meegenomen toen de moedermelkmonsters geëxtraheerd werden. Ook hiervan is toen een deel van het geëxtraheerde vet achtergehouden van de PCB/OC-analyse. Tijdens de validatie (1 mei 2002) van de methode zijn een vijftal van deze vetextracten geanalyseerd. En samen met de moedermelkmonsters van 1998 zijn zij later (28 juni 2002) allemaal nogmaals meegenomen. Deze monsters zijn niet allemaal op dezelfde dag geëxtraheerd en/of gecleaned en/of gespoten. De onderstaande tabel geeft dus een goede indruk van de reproduceerbaarheid van de methode voor moedermelkmonsters.

Tabel A6. Reproduceerbaarheid kwaliteitsmonster moedermelk 99M0474.

	BDE17	BDE28	BDE47	BDE66	BDE100	BDE99	BDE85	BDE154	BDE153	BDE138	BDE183
	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet	ng/g vet
99M0474-07	0.04	0.13	1.65	0.09	0.36	0.62	0.10	0.07	1.04	0.06	0.18
99M0474-11	0.09	0.14	1.68	<0.1	0.37	0.59	0.13	<0.08	1.05	<0.09	0.20
99M0474-12	<0.05	0.15	1.65	<0.1	0.33	0.59	<0.12	<0.08	1.04	<0.09	0.16
99M0474-14	0.05	0.16	2.04	0.07	0.37	0.65	0.07	0.06	1.00	0.06	0.15
99M0474-15	0.06	0.14	1.98	0.12	0.34	0.61	<0.12	<0.08	1.10	<0.09	0.27
99M0474-26	<0.02	0.14	1.64	0.07	0.35	0.59	0.10	0.06	1.11	0.10	0.16
99M0474-07	<0.03	0.14	1.67	0.08	0.37	0.61	<0.08	0.07	1.04	<0.1	0.18
99M0474-08	<0.03	0.16	2.40	0.08	0.39	0.64	<0.08	0.06	1.01	<0.1	0.46
99M0474-09	<0.03	0.17	2.05	0.07	0.37	0.61	<0.08	0.07	1.10	<0.1	0.74
99M0474-10	<0.03	0.16	2.03	0.08	0.36	0.58	<0.08	0.06	1.04	<0.1	0.62
99M0474-11	<0.03	0.12	1.75	0.09	0.37	0.62	0.08	0.07	1.04	<0.1	0.25
99M0474-12	<0.03	0.15	1.71	0.09	0.39	0.67	0.12	0.05	1.08	<0.1	0.16
99M0474-15	<0.03	0.16	2.00	0.07	0.41	0.60	<0.08	0.06	1.06	<0.1	0.23
99M0474-25	0.06	0.18	1.54	0.10	0.38	0.55	0.10	0.08	1.04	<0.1	0.55
gemiddelde 99M0474		0.15	1.84	0.08	0.37	0.61		0.07	1.05		0.31
sd		0.02	0.24	0.01	0.02	0.03		0.01	0.03		0.20
RSD		10.9	13.1	16.4	5.6	5.0		12.3	3.2		64.5

De reproduceerbaarheid van de methode is voor alle PBDEs <16% behalve voor BDE 183. De reproduceerbaarheid sterk wijkt af voor BDE 183 (RSD = 64,5%). Hier is geen verklaring voor te geven,

de component wordt niet zichtbaar gestoord en de verhouding van de m/z-waarden voldoet aan de criteria. Ook de procedure blanco is blanco.

Ringonderzoek BSEF/Quasimeme

Voorafgaand aan de analyses van de moedermelkmonsters 1998 is er deelgenomen aan een ringonderzoek; BSEF/Quasimeme Interlaboratory Study on Brominated Flame Retardants (onderzoeksplannummer: V/529102/01/OC-02/02). Naast een standaard, forel- en mosselmonster is er ook een moedermelkmonster geanalyseerd. De resultaten van dit ringonderzoek zijn samengevat in Tabel A7.

Tabel A7. Resultaten ringonderzoek BSEF/Quasimeme.

QBC003BT moedermelk	Gehalte LOC µg/kg melk	assigned value µg/kg melk	assigned error %	CV %	aantal labs	Z-score	recovery* %
BDE28	<0.005	0.004		115	12		
BDE47	0.065	0.061		25	20		106.3
BDE99	0.017	0.018		69	18		95.9
BDE100	0.010	0.010		53	12		100.3
BDE153	0.017	0.018		48	13		96.8
BDE154	0.001	0.003		76	10		49.0
BDE183	0.003	0.003		98	7		104.3
BDE209		0.034		120	5		
HBCD							
TBBP-A							
Dimethyl-TBBP-A							

* Gevonden gehalte LOC/assigned value van het ringonderzoek* 100%

De gehalten zijn op produktbasis weergegeven uitgedrukt in µg/kg **melk**. Voor BDE 47 komt 0,065 µg/kg **melk** overeen met 2,66 ng/g **vet**. De waarden liggen in dezelfde range van de gehalten die gevonden zijn voor de moedermelkmonsters 1998.

De assigned values zijn indicatief, er is door Quasimeme geen assigned error berekend. De CV voor de afzonderlijke congenen is groot in dit monster. Dit is te wijten aan de lage gehalten van dit monster, waar veel laboratoria toch problemen mee hebben. Alleen voor BDE 47 is de CV redelijk (25%). Voor BDE 47, de component met het beste resultaat, scoren we goed (afwijking 6%), maar ook voor de andere componenten lijkt ons resultaat niet af te wijken van de resultaten behaald door het hele deelnemersveld.

Conclusie

Er zijn geen aanwijzingen voor systematische afwijkingen in gehalten PBDE's in moedermelk, bepaald met de door ons ontwikkelde analysemethode. De spreidingen voor de PBDE's in het kwaliteitsmonster zijn zeer bevredigend te noemen (RSD<16%), met uitzondering van BDE 183 (RSD = 65%). De meetonzekerheid behaald door de laboratoria die hebben deelgenomen aan de bepaling van de PBDE's in moedermelk in het kader van het Quasimeme ringonderzoek bedraagt 50-200% (2*RSD). De binnenlab reproduceerbaarheid is 10-30% (2*RSD) voor alle PBDE's, behalve voor BDE 183 (2*RSD = 130%).

VWA

Bepaling van PBDE-17, -28, -47, -49, -66, -71, -75, -77, -85, -99, -100, -119, -138, -153, -154, -183 and -190 met behulp van GC-MS

ONDERWERP

De methode met behulp van een splitless injectie en een capillair van 30 meter lengte is geschikt voor de bepaling van BDE's t/m 190 in levensmiddelen. BDE 209 wordt bepaald met behulp van oncolumn injectie op een capillair van 10 meter lengte.

BEGINSEL

Na toevoegen van ^{13}C -labels als interne standaard wordt geëxtraheerd volgens een gemodificeerde vetextractie volgens Smedes. Na clean up met behulp van Florisil en GPC wordt geanalyseerd met behulp van GC/MS. Detectie vindt plaats met behulp van massa-spectrometrie op selectieve ionen.

REAGENTIA, OPLOSSINGEN, HULPSTOFFEN EN MEDIA

Vanwege lichtgevoeligheid van de BDE verbindingen worden standaardoplossingen in bruine flesjes bewaard. Nieuwe batches aan oplosmiddelen moeten vooraf getest worden op eventuele aanwezigheid van BDE's (50 ml concentreren tot 50 μl).

- Iso-Octaan; Baker ultra-resi-analyzed
- Hexaan; Merck Suprasolv of Baker ultra-resi-analyzed
- Dichloormethaan; Merck Suprasolv of Baker ultra-resi-analyzed
- Methanol; Merck Suprasolv of Baker ultra-resi-analyzed
- Iso-Propanol, Baker ultra-resi-analyzed
- Cyclohexaan, Baker ultra-resi-analyzed
- Hexaan – Dichloormethaan = 95 – 5 volumedelen en 50 – 50 volumedelen
- LC-Florisil: Supelco 10 gram in 60 ml tubes
- Native BDE Stock solution; 28-47-99-100-153-154-183-209; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in nonane (BDE209 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$); Promochem, Cambridge Isotope Lab. EO-5278
- BDE- ^{13}C -interne standaard; 28-47-99-100-153-154-183-209; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in nonane (BDE209 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$); Promochem, Cambridge Isotope Lab. EO-5277
- Native Polybrominated Diphenylether Analytical Standard solution; BDE1 t/m 190; 100 – 300 ng/ml n-Nonane; Promochem, Cambridge Isotope Lab. EO-5113.
- Polybrominated Diphenylether Analytical Standard Solution labeled and unlabeled; BDE1 t/m 190; 100 300 ng/ml n-Nonane; Promochem, Cambridge Isotope Lab. EO-5099
- BDE-Standaard (100 ng/ml); pipetteer 1,0 ml native BDE Stock solution en voeg toe 9,0 ml iso-octaan.
- BDE-standaard (20 ng/ml); pipetteer 2,0 ml BDE-Standaard en voeg toe 8,0 ml iso-octaan.
- Interne Standaard (100 ng/ml); pipetteer 1,0 ml BDE- ^{13}C -interne standaard en voeg toe 9,0 ml iso-octaan.
- Interne Standaard (10 ng/ml); pipetteer 1,0 ml Interne Standaard (100 ng/ml) en voeg toe 9,0 ml iso-octaan.
- NIST1588b: Cod Liver Oil certified reference material

APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

- Vortex
- PP centrifugebuizen 45 ml, Omnilabo
- Ultraturrax, rotorstaaf 18 x 200 mm
- Glazen vials bruin, 16 ml met schroefdop
- Reageerbuizen glas 18 x 150 mm en 16 x 125 mm
- Rotavapor, Büchi of gelijkwaardig

- Roterende vacuumverdamper, Speedvac 2010
- SPE opstelling zonder vacuumondersteuning
- GPC opstelling:
 - *Isocratische HPLC pomp
 - *UV-detector 225 nm
 - *Autosampler met 400 µl injector capaciteit
 - *MachereyNagel GPC 50-5 300 x 7,7 mm, Cat. nr. 719402; 2 stuks
 - *Fractieverzamelaar: Aspec XL
- GC/MS:
 - *Agilent 7683 autosampler
 - *Agilent GC 6890
 - *Analytische kolom; Varian VF-17ms, 30 meter, 0,25 mm ID, 0,15 µm filmdikte.
 - *Agilent 5973 MSD; quadropool ingesteld op selectieve massa's.

WERKWIJZE

Voorbehandeling

Gebruik bij voorkeur nieuw glaswerk, bestaand glaswerk moet gespoeld worden met oplosmiddel. Na afloop van de extracties wordt het glaswerk opnieuw gespoeld met oplosmiddel en gereserveerd voor de volgende reeks aan analyses. Vermijd het reinigen via een wasmachine.

Monstervoorbewerking

Homogeniseer het monster, van verse eieren wordt de eidooier afgescheiden.

Vetextractie

Vis, vlees, eidooier

Weeg af 2,5 gram product (W gram) in een PP centrifugebuis, pipetteer hierbij 50 µl IS-10 ng/ml (= 0,5 ng absoluut), voeg toe 25 ml cyclohexaan en 5 ml iso-propanol. Ultraturax tot homogeen, voeg toe 5 ml water en Ultraturax opnieuw. Om carry-over via de rotorstaaf te vermijden, wordt na elk monster 1x met heet water, 1x met methanol en 1x met Cyclohexaan gespoeld. Centrifugeer 10 min 4000 rpm en 10 °C. Breng de cyclohexaan fase (en geen waterfase) over in een voorgespoeld glazen kolfje en verwijder het oplosmiddel met behulp van een rotavapor. Blaas stikstof in het kolfje onder ronddraaien om het restant aan isopropanol te verwijderen. Weeg het verkregen residu (R gram).

Gevriesdroogde producten (boerenkool 2,5 gram afwegen)

Weeg af 5 gram product (W gram) in een nieuwe voorgespoelde glazen fles van 250 ml, pipetteer hierbij 50 µl IS-10 ng/ml (= 0,5 ng absoluut), voeg toe 90 ml Hexaan-DCM=1-1 en schud gedurende 2 uur met 200 slagen/min. Laat 1 nacht overstaan en breng met behulp van een 5 ml Finnpijet het extract op een papierfilter met circa 7 gram watervrij natriumsulfaat (voorgespoeld met 2 x 10 ml DCM), spoel het filter na met 10 ml DCM. Ga verder zoals onder 'Vis, vlees, eidooier'.

Standaard controlemonster

Weeg af 150 mg NIST1588b (W^{ref}) in een PP centrifugebuis, voeg toe 2,5 gram blanco vis en pipetteer hierbij 50 µl IS-10 ng/ml, en extraheer zoals onder 'Vis, vlees, eidooier'. Blanco opwerking (bij voorkeur een blanco vis): Weeg af 2,5 gram blanco vis, pipetteer hierbij 50 µl IS-10 ng/ml en extraheer zoals onder 'Vis, vlees, eidooier'.

Florisil clean up

1 x 10 g Florisil max. 0,5 g vet

2 x 10 g Florisil max. 1,5 g vet

Voorbehandeling: 10 g Florisil, klop en druk het kolommateriaal aan met behulp van een 5 ml Finnpijpettip.

	Florisil 5 gram	Florisil 10 gram
Maximale vetbelading	200 mg	500 mg
Voorspoelen	15 ml DCM	25 ml DCM
Voorspoelen	15 ml 5% DCM	25 ml 5% DCM
Opbrengen en opvangen	3 x 5 ml 5% DCM	3 x 5 ml 5% DCM
Naspoelen en opvangen	15 ml 5% DCM	25 ml 5% DCM

Conditioneer: (apart van elkaar) de Florisil kolom(men) met DCM en 5% DCM/Hexaan. Zie tabel voor de maximale vetbelading. Wanneer meer dan 0,5 g vet in bewerking moet worden genomen, maak dan een serieschakeling van 2 Florisil kolommen. Breng het vetresidu met behulp van 3 x 5 ml 5% DCM op de kolom, vang op in een voorgespoeld glazen kolfje van 100 ml en spoel na. Let op dat de blauwe band die langzaam door de kolommen elueert niet wordt opgevangen. Verdamp het oplosmiddel met behulp van een rotavapor tot net droog. Spoel het residu met behulp van 3 x 1 ml 50% DCM/Cyclohexaan over in een glazen buis van 16 x 125 mm, spoel de wand na met 1 ml en verdamp onder licht verwarmen met behulp van stikstof inblazen tot net droog. Weeg het residu. Los het residu op in 400 µl 50% DCM/Hexaan, breng over in een AS-vial met insert.

GPC

GPC 50-5: (MachereyNagel GPC 50-5) 2 stuks 300 x 7,8 mm in serie

Mobiele fase: Hexaan – DCM = 50 – 50

Tijd	Flow	Tijd	Flow
0 min	1,0 ml/min	22 min	1,5 ml/min
3 min	1,5 ml/min	25 min	1,0 ml/min

Vanwege het maximaal injecteren van het AS-vial volume bestaat de kans dat er lucht wordt aangezogen, waardoor de LC-pomp vanwege het onderschrijden van de MinimumPressure een error produceert. Minimum pressure instelling derhalve op 0 bar.

Voorzorg: de maximale vetbelading per injectie is 16 mg. Naar gelang de hoeveelheid residu na de Florisil clean up wordt het injectievolume aangepast.

Injecteer 400 µl en vang een fractie op van **14 t/m 22 min** in een glazen buis van 18 x 150 mm.

Concentreer bij voorkeur met behulp van een roterende vacuumverdamp(er) (Speedvac) tot een volume van circa 0,5 ml (instelling: 45 °C, ramp 2, vacuum 5 mbar, circa 35 minuten). Controleer of na deze tijd er buizen aanwezig zijn waarvan het volume beduidend minder is als de rest van de buizen. Dit duidt op kookvertraging, consequentie: alle moeite vergeefs, opnieuw beginnen. Spoel de wand na met 1 ml iso-octaan en concentreer: plaats de buizen in een Aluminium blok van 40 °C, verdamp het oplosmiddel met behulp van stikstof inblazen tot net droog (er treden verliezen op wanneer te lang wordt doorgegaan met afblazen). Voeg toe 50 µl iso-octaan, los op met behulp van een Vortex. Breng over met behulp van een Finnpijpet in een autosampler vial met conische insert.

Kalibratie (in bruine AS-vials)

BDE1 t/m 190 (inclusief labelled):

Verdun 20 µl ‘Polybrominated Diphenylether Analytical Standard Solution labeled and unlabeled’ met 980 µl iso-octaan (conc vanaf 2 t/m 5 ng/ml)

Alternatief: BDE 28-47-99-100-153-154-183- 209

Pipetteer 50 µl BDE100 (BDE-Standaard (100 ng/ml)), 50 µl IS100 (Interne Standaard (100 ng/ml)) en voeg toe 900 µl iso-octaan (5 ng/ml).

Analyse

Neem bij elke monsterserie een opgewerkte blanco en een SCM / Standaardadditie mee. Vooraf dient getest te worden of een opgewerkte blanco voldoet aan een maximaal niveau van 5 pg/g. Na afloop van de analyses worden de monsterextracten met 100 µl iso-octaan naverdund en nogmaals geanalyseerd met behulp van een oncolumn LargeVolume injectie voor de analyse op BDE 209 via 10 meter STX500 (WV513B).

GC

Rate	Temperature	Time
	100 °C	1 min
8 °C/min	320 °C	6,5 min

Pulsed Splitless 2 bar / 1 min injectievolume: 5 µl
Injector/transferline; 300 °C
Helium constant flow ; 1,0 ml/min

MS

Electron impact in SIM mode

Window	SIM	Dwell msec
12,00 – 14,00 min	248 / 250 / 260 / 262	80
14,00 – 18,00 min	325,9 / 327,9 / 329,9 / 337,9 / 339,9 / 341,9	50
18,00 – 21,50 min	405,9 / 407,9 / 417,9 / 419,9	80
21,50 – 24,50 min	323,9 / 325,9 / 327,9 / 337,9 / 483,8 / 485,8 / 487,8 / 497,8 / 499,8	40
24,50 – 26,40 min	403,9 / 405,9 / 415,9 / 417,9 / 563,7 / 565,7 / 575,7 / 577,7	40
26,40 – 29,90 min	483,8 / 485,8 / 495,8 / 563,7 / 565,7 / 575,7 / 577,7 / 643,6 / 645,6 / 655,6	40
29,90 – 35,00 min	561,7 / 563,7 / 573,7 / 575,7 / 721,5 / 723,5 / 733,5 / 735,5	40

BEREKENING EN RAPPORTAGE

Identificeer de aanwezigheid van de BDE's met behulp van de bijlage:

Kalibreer en bereken de concentraties (na evt correctie voor de blanco waarde):

Respons: $Y = \text{Area}^{\text{comp}} * \text{Conc}^{\text{IS}} / \text{Area}^{\text{IS}}$

Functie: $Y = aX$

Inweeg: $W \text{ gram}$

Product : $((Y-b) / a) * 1000 / W$ pg/g

Bepaal de ion ratio's (verhouding qualifier / quantifier ion) van de kalibraties en van de monsters.

Bepaal de absolute terugvinding van de interne standaarden in de monsters.

Analyse resultaten <100 pg/g afronden op 0,1 pg/g en >100 pg/g afronden op 1 pg/g.

Na analyse word 100 µl iso-octaan extra toegevoegd en nogmaals geanalyseerd op 10 meter STX500 analytische GC capillair (WV513B)

KWALITEITSCONTROLES

Opmerking: Wanneer niet aan onderstaande criteria voldaan wordt, beslist de teamleider over goedkeuring van de serie en eventueel benodigde acties.

Acceptatie analysesysteem

- De retentietijd, piekvorm en respons van de multicomponent standaardoplossing van 2 ng/ml dient vergelijkbaar te zijn met voorgaande analyses.
- De S/N ratio van de qualifiers van deze standaard dient groter dan 6 te zijn.

Acceptatie analyseserie

- De gehalten van een opgewerkte blanco mag, gebaseerd op een inweeg van 2,5 gram, niet meer zijn als 5 pg/g.
- De absolute terugvinding van de interne standaarden in de monsters dient voor alle interne standaarden meer dan 50% te zijn.
- Resultaten van het NIST controle monster mogen geen alarmsituatie in een controlekaart geven.

Identificatie analyten

- De S/N verhouding van de qualifiers dient voor positief bevonden monsters groter dan 6 te zijn.
- Het verdient aanbeveling positief bevonden monsters nogmaals te analyseren op een analytische GC capillair van een andere polariteit.
- Van een positief bevonden monster mag de ionratio en de relatieve retentietijd (t.o.v de interne standaard) maximaal met het onderstaande percentage afwijken van het gemiddelde uit de kalibratieoplossingen.

Maximale afwijking Ionratio	Relatieve retentietijden
20%	0,5% maximale afwijking

Opmerkingen

- Het concentreren van de Florisil en GPC fractie met behulp van stikstof inblazen tot net droog is kritisch. Gebruik bij grotere series de SpeedVac, echter er bestaat een risico op kookvertraging.

- Vanwege lichtgevoeligheid van BDE dient zoveel mogelijk onder gedempte lichtomstandigheden gewerkt te worden, standaardoplossingen worden in bruine flesjes bewaard.

- Er dient zoveel mogelijk nieuw of zorgvuldig gespoeld glaswerk gebruikt te worden. Oplosmiddelen moeten voor gebruik eerst getest worden op de afwezigheid van Bde's.

- Een LOD van 5 tot 10 pg/g is haalbaar gebruikmakend van de splitless injector v/d Agilent MSD voor de BDE's t/m 153, olopend tot 25 pg/g voor BDE 183. Wanneer er een oncolumn LV injector en een 10 meter capillair wordt gebruikt, is de LOD 5 pg/g t/m BDE 183 en voor BDE 209 100 pg/g.

Agilent splitless DB17: Retentietijden, Concentraties, Ionratio's
 Agilent DB17 Splitless; Conc ng/ml, Rt in min, SIM parameters

BDE	Conc ng/ml	Rt min	Quan	Qual1	Ratio %	Qual2	Ratio %	Qual3	Ratio %
28-13C	2	19,81	417,9	419,9	101,7				
2	2	12,22	250	248	113,7				
1	2	12,31	250	248	129,9				
3	2	12,48	250	248	106,7				
10	2	15,48	327,9	325,9	50,9	329,9	51,7		
7	2	15,90	327,9	325,9	50,5	329,9	50,9		
11	2	16,10	327,9	325,9	52,3	329,9	46,2		
8 - 12 - 13	6	16,42	327,9	325,9	49,8	329,9	49,6		
15	2	16,74	327,9	325,9	53	329,9	49,8		
30	2	18,26	405,9	407,9	96,6				
32	2	19,34	405,9	407,9	102,2				
25	2	19,96	405,9	407,9	92,4				
17	2	19,59	405,9	407,9	96				
28	2	19,81	405,9	407,9	103,9				
35	2	19,96	405,9	407,9	100				
33	2	20,02	405,9	407,9	103,8				
37	2	20,39	405,9	407,9	95,7				
75	2	21,94	485,8	483,8	70,3	487,8	65,2	325,9	135
49	2	22,23	485,8	483,8	72,4	487,8	68,8	325,9	204,3
71	2	22,60	485,8	483,8	69,1	487,8	69,8	325,9	232,1
47-13C	2	22,68	497,8	499,8	62,2	337,9	108,3		
47	2	22,68	485,8	483,8	71,5	487,8	63,4	325,9	110,6
66	2	23,10	485,8	483,8	68,8	487,8	62,8	325,9	202,8
77	2	23,70	485,8	483,8	72,3	487,8	69,7	325,9	22,9
100-13C	3	24,70	575,7	577,7	97,3	415,9	130,6	417,9	118
100	3	24,70	565,7	563,7	96,1	403,9	108	405,9	109,8
119	3	24,96	565,7	563,7	109,7	403,9	218,9	405,9	225,2
99-13C	3	25,27	575,7	577,7	95,4	415,9	173,6	417,9	181,6
99	3	25,27	565,7	563,7	108,2	403,9	162,2	405,9	158,2
118	3	25,73	403,9	405,9	93,8	565,7	37,9	563,7	37,5
116	3	25,94	403,9	405,9	94,4	565,7	21,2	563,7	24
126	3	26,51	565,7	563,7	108,1				
85	3	26,61	565,7	563,7	94,1				
155	4	26,52	483,8	485,8	78	643,6	55,3	645,6	41,8
154	4	26,89	483,8	485,8	65,7	643,6	44,1	645,6	29,5
153-13C	4	27,57	495,8	655,6	28,9				
153	4	27,57	483,8	485,8	70,2	643,6	33,6	645,6	25,5
138	6	28,95	483,8	485,8	63,7	643,6	36,3	645,6	21,5
166	4	29,15	483,8	485,8	70,5	643,6	20,9	645,6	18,6
183-13C	5	30,31	575,7	573,7	92,9	735,5	45,2	733,5	42,1
183	5	30,31	561,7	563,7	105	721,5	49,6	723,5	47,1
181	5	32,35	561,7	563,7	78	721,5	8,5	723,5	6,8
190	5	32,83	563,7	561,7	103,1	721,5	66,2	723,5	64,6

Bepaling van BDE-209 met behulp van GC-MS

ONDERWERP

De methode met behulp van een oncolumn injectie en een capillair van 10 meter lengte is geschikt voor de bepaling van BDE 28 t/m 209 in levensmiddelen.

BEGINSEL

Na toevoegen van ^{13}C -labels als interne standaard wordt geëxtraheerd volgens een gemodificeerde vetextractie volgens Smedes. Na cleanup met behulp van Florisil en GPC wordt geanalyseerd met behulp van GC/MS. Detectie vindt plaats met behulp van massa-spectrometrie op selectieve ionen.

REAGENTIA, OPLOSSINGEN, HULPSTOFFEN EN MEDIA

Vanwege lichtgevoeligheid van de BDE verbindingen worden standaardoplossingen in bruine flesjes bewaard. Nieuwe batches aan oplosmiddelen moeten vooraf getest worden op eventuele aanwezigheid van BDE's (50 ml concentreren tot 50 μl).

- Iso-Octaan; Baker ultra-resi-analyzed
- Hexaan; Merck Suprasolv of Baker ultra-resi-analyzed
- Dichloormethaan; Merck Suprasolv of Baker ultra-resi-analyzed
- Methanol; Merck Suprasolv of Baker ultra-resi-analyzed
- Iso-Propanol, Baker ultra-resi-analyzed
- Cyclohexaan, Baker ultra-resi-analyzed
- Hexaan – Dichloormethaan = 95 – 5 volumedelen en 50 – 50 volumedelen
- LC-Florisil: Supelco 10 gram in 60 ml tubes
- Native BDE Stock solution; 28-47-99-100-153-154-183-209; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in nonane (BDE 209 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ; Promochem, Cambridge Isotope Lab. EO-5278
- BDE- ^{13}C -interne standaard; 28-47-99-100-153-154-183-209; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in nonane (BDE 209 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ; Promochem, Cambridge Isotope Lab. EO-5277
- BDE-Standaard (100 ng/ml); pipetteer 1,0 ml native BDE Stock solution en voeg toe 9,0 ml iso-octaan.
- BDE-standaard (20 ng/ml); pipetteer 2,0 ml BDE-Standaard en voeg toe 8,0 ml iso-octaan.
- Interne Standaard (100 ng/ml); pipetteer 1,0 ml BDE- ^{13}C -interne standaard en voeg toe 9,0 ml iso-octaan.
- Interne Standaard (10 ng/ml); pipetteer 1,0 ml Interne Standaard (100 ng/ml) en voeg toe 9,0 ml iso-octaan.

APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

- Vortex
- PP centrifugebuizen 45 ml, Omnilabo
- Ultraturrax, rotorstaaf 18 x 200 mm
- Glazen vial's bruin, 16 ml met schroefdop
- Reageerbuizen glas 18 x 150 mm en 16 x 125 mm
- Rotavapor, Büchi of gelijkwaardig
- Roterende vacuumverdamer, Speedvac 2010
- SPE opstelling zonder vacuumondersteuning
- GPC opstelling:
 - *Isocratische HPLC pomp
 - *UV-detector 225 nm
 - *Autosampler met 400 μl injector capaciteit
 - *MachereyNagel GPC 50-5 300 x 7,7 mm, Cat. nr. 719402; 2 stuks
 - *Fractieverzamelaar: Aspec XL
- LC-GC/MS opstelling bestaande uit:

- *Autosampler Thermoquest AS2000 met 100 µl SampleLoop
- *Phoenix LC Syringe pump
- *Silica-CN LC kolom; Phenomenex Luna-CN 50-2 mm 3 µm
- *Mobiële fase: Hexaan – DCM = 94 – 6
- *Schakelkraan (E3) 10-poorts (backflush mode)
- *Schakelkraan (E4) 6-poorts (overbrengen BDE-fractie naar GC/MS)
- *Backflush loop van 3 ml
- *Backflush fles van ca 1 liter gevuld met dichloormethaan onder een overdruk van 10 psi gebracht (Dionex LC-fles)
- *Trace GC met large volume injector
- *Transferline; fused silica
- *Retention gap (Siltek 10 meter 0,53 mm ID) met press-fit gekoppeld aan Retaining column (Restek STX_CI Pest 2, 3 meter, ID 0,53 mm, fase dikte 0,42 µm).
- *Analytische kolom; Restek STX500, 10 meter, 0,25 mm ID, 0,15 µm filmdikte.
- *MS; quadrapool ingesteld op selectieve massa's

WERKWIJZE

Voorbehandeling

Gebruik bij voorkeur nieuw glaswerk, bestaand glaswerk moet gespoeld worden met oplosmiddel. Na afloop van de extracties wordt het glaswerk opnieuw gespoeld met oplosmiddel en gereserveerd voor de volgende reeks aan analyses. Vermijd het reinigen via een wasmachine.

Monstervoorbewerking

Homogeniseer het monster, van verse eieren wordt de eidooier afgescheiden.

Vetextractie

Vis, vlees, eidooier

Weeg af 2,5 gram product (W gram) in een PP centrifugebuis, pipetteer hierbij 50 µl IS-10 ng/ml (= 0,5 ng absoluut), voeg toe 25 ml cyclohexaan en 5 ml iso-propanol. Ultraturax tot homogeen, voeg toe 5 ml water en Ultraturax opnieuw. Om carry-over via de rotorstaaf te vermijden, wordt na elk monster 1x met heet water, 1x met methanol en 1x met Cyclohexaan gespoeld. Centrifugeer 10 min 4000 rpm en 10 °C. Breng de cyclohexaan fase (en geen waterfase) over in een voorgespoeld glazen kolfje en verwijder het oplosmiddel met behulp van een rotavapor. Blaas stikstof in het kolfje onder rondraaien om het restant aan isopropanol te verwijderen. Weeg het verkregen residu (R gram).

Gevriesdroogde producten (boerenkool 2,5 gram afwegen)

Weeg af 5 gram product (W gram) in een nieuwe voorgespoelde glazen fles van 250 ml, pipetteer hierbij 50 µl IS-10 ng/ml (= 0,5 ng absoluut), voeg toe 90 ml Hexaan-DCM=1-1 en schud gedurende 2 uur met 200 slagen/min. Laat 1 nacht overstaan en breng met behulp van een 5 ml Finn timer het extract op een papierfilter met circa 7 gram watervrij natriumsulfaat (voorgespoeld met 2 x 10 ml DCM), spoel het filter na met 10 ml DCM. Ga verder zoals onder 'Vis, vlees, eidooier'.

Standaard additie

Weeg af 2,5 gram blanco vis in een PP centrifugebuis, pipetteer hierbij 50 µl IS-10 ng/ml (= 0,5 ng), 50 µl BDE-Standaard 20 ng/ml (= 1 ng) en extraheer zoals onder 'Vis, vlees, eidooier'.

Blanco opwerking (bij voorkeur een blanco vis)

Weeg af 2,5 gram blanco vis, pipetteer hierbij 50 µl IS-10 ng/ml en extraheer zoals onder 'Vis, vlees, eidooier'.

Florisil clean up **1 x 10 g Florisil max. 0,5 g vet** **2 x 10 g Florisil max. 1,5 g vet**

Voorbehandeling: 10 g Florisil, klop en druk het kolommateriaal aan met behulp van een 5 ml Finnpiptip.

	Florisil 5 gram	Florisil 10 gram
Maximale vetbelading	200 mg	500 mg
Voorspoelen	15 ml DCM	25 ml DCM
Voorspoelen	15 ml 5% DCM	25 ml 5% DCM
Opbrengen en opvangen	3 x 5 ml 5% DCM	3 x 5 ml 5% DCM
Naspoelen en opvangen	15 ml 5% DCM	25 ml 5% DCM

Conditioneer: (apart van elkaar) de Florisil kolom(men) met DCM en 5% DCM/Hexaan. Zie tabel hierboven voor de maximale vetbelading. Wanneer meer dan 0,5 g vet in bewerking moet worden genomen, maak dan een serieschakeling van 2 Florisil kolommen. Breng het vetresidu met behulp van 3 x 5 ml 5% DCM op de kolom, vang op in een voorgespoeld glazen kolfje van 100 ml en spoel na. Let op dat de blauwe band die langzaam door de kolommen elueert niet wordt opgevangen. Verdamp het oplosmiddel met behulp van een rotavapor tot net droog. Spoel het residu met behulp van 3 x 1 ml 50% DCM/Cyclohexaan over in een glazen buis van 16 x 125 mm, spoel de wand na met 1 ml en verdamp onder licht verwarmen met behulp van stikstof inblazen tot net droog. Weeg het residu. Los het residu op in 400 µl 50% DCM/Hexaan, breng over in een AS-vial met insert.

GPC

GPC 50-5: (MachereyNagel GPC 50-5) 2 stuks 300 x 7,8 mm in serie
Mobiele fase: Hexaan – DCM = 50 – 50

Tijd	Flow	Tijd	Flow
0 min	1,0 ml/min	22 min	1,5 ml/min
3 min	1,5 ml/min	25 min	1,0 ml/min

Vanwege het maximaal injecteren van het AS-vial volume bestaat de kans dat er lucht wordt aangezogen, waardoor de LC-pomp vanwege het overschrijden van de MinimumPressure een error produceert. Minimum pressure instelling derhalve op 0 bar.

Voorzorg: de maximale vetbelading per injectie is 16 mg. Naar gelang de hoeveelheid residu na de Florisil cleanup wordt het injectievolume aangepast.

Injecteer 400 µl en vang een fractie op van 14 t/m 22 min in een glazen buis van 18 x 150 mm. Concentreer bij voorkeur met behulp van een roterende vacuumverdamp(er) (Speedvac) tot een volume van ca 0,5 ml (instelling: 45 °C, ramp 2, vacuum 5 mbar, ca 35 minuten). Controleer of na deze tijd er buizen aanwezig zijn waarvan het volume beduidend minder is als de rest van de buizen. Dit duidt op kookvertraging, consequentie: alle moeite vergeefs, opnieuw beginnen. Spoel de wand na met 1 ml iso-octaan en concentreer: plaats de buizen in een Aluminium blok van 40 °C, verdamp het oplosmiddel met behulp van stikstof inblazen tot net droog (er treden verliezen op wanneer te lang wordt

doorgegaan met afblazen). Voeg toe 200 µl iso-octaan, los op met behulp van een Vortex. Breng over met behulp van een Finnpijet in een autosampler vial met conische insert.

Kalibratie (in bruine AS-vial's)

BDE 28-47-99-100-153-154-183- 209

Pipetteer 50 µl BDE100 (BDE-Standaard (100 ng/ml)) , 50 µl IS100 (Interne Standaard (100 ng/ml)) en voeg toe 900 µl iso-octaan (5 ng/ml, BDE209 50 ng/ml).

Analyse

Neem bij elke monsterserie een opgewerkte blanco en een Standaardadditie mee , sluit af met een kalibratiestandaard.

GC

Initial temp	Initial time	Rate	Final temp	Final time
70 °C	4 min	10 °C/min	250 °C	0 min
		25 °C/min	320 °C	15,2 min
Helium Flow	Initial time	Rate	Helium Flow	Final time
1,5 ml/min	20 min	0,5 ml/min	3,0 ml/min	17 min
Event 4	SVE time	Evaporation pressure	Event 5	Event 3
1,0 -> 2,4 min	3,6 min	120 kPa	0,1 -> 1,5 min	2,5 -> 25 min

Autosampler AS2000

Preclean; 2 x 150 µl iso-octaan postclean; 4x150 µl iso-octaan
 Bubble elimination: No
 Injection: 120 µl Draw speed: 5 µl/sec

LC-pomp

Mobiele fase: Hexaan – DCM = 94 - 6

Time	Flow	Time	Flow
0 min	360 µl/min	23,6 min	250 µl/min
23,5 min	360 µl/min	47,0 min	250 µl/min

Post-run: 0.1 min Injection 0.5 min Standby 0 min Target 0 min
 Cycles: 1 Auto-inject Yes; Autorun in subset No
 Backflush fles gevuld met dichloormethaan en met perslucht op 10 psi gebracht

MS

Electron impact in SIM mode

Multiplier	380 V	
Window	SIM	Dwell / Span
19,0 – 22,8 min	405,9 – 407,9 – 417,9 – 419,9 – 483,8 – 485,8 – 497,8 – 499,8	0,05 sec / 0,20 amu
22,8 – 23,8 min	561,7 – 563,7 – 565,7 – 573,7 – 575,7 – 577,7	0,05 sec / 0,20 amu
23,8 – 24,8 min	483,8 – 485,8 – 495,8 – 497,8 – 643,6 – 655,6	0,05 sec / 0,20 amu
24,8 – 28,0 min	561,7 – 563,7 – 573,7 – 575,7 – 721,5 – 723,5 – 733,5 – 735,5	0,05 sec / 0,20 amu
33,0 – 38,0 min	796,5 – 798,5 – 800,5 – 808,5 – 810,5 – 812,5	0,20 sec / 0,40 amu

BEREKENING EN RAPPORTAGE

Identificeer de aanwezigheid van de BDE's met behulp van de bijlage:

Kalibreer en bereken de concentraties (na evt correctie voor de blanco waarde):

Respons: $Y = \text{Area}^{\text{comp}} * \text{Conc}^{\text{IS}} / \text{Area}^{\text{IS}}$

Functie: $Y = aX$

Inweeg: W gram

Product : $((Y-b) / a) * 1000 / W$ pg/g

Bepaal de ion ratio's (verhouding qualifier / quantifier ion) van de kalibraties en van de monsters.

Bepaal de absolute terugvinding van de interne standaarden in de monsters. Analyse resultaten

<100 pg/g afronden op 0,1 pg/g en >100 pg/g afronden op 1 pg/g.

KWALITEITSCONTROLES

Acceptatie analysesysteem

- De retentietijd, piekvorm en respons van de kalibratie standaardoplossing van 5 ng/ml dient vergelijkbaar te zijn met voorgaande analyses.
- De S/N ratio van de qualifiers van deze standaard dient groter dan 6 te zijn.

Acceptatie analyseserie

- De gehalten van een opgewerkte blanco mag, gebaseerd op een inweeg van 2,5 gram, niet meer zijn als 5 pg/g.
- De absolute terugvinding van de interne standaarden in de monsters dient voor alle interne standaarden meer dan % te zijn.
- Resultaten van het standaard geadderde blanco monster mogen geen alarmsituatie in een controlekaart geven.

Identificatie analyten

- De S/N verhouding van de qualifiers dient voor positief bevonden monsters groter dan 6 te zijn.
- Van een positief bevonden monster mag de ionratio en de relatieve retentietijd (t.o.v de interne standaard) maximaal met het onderstaande percentage afwijken van het gemiddelde uit de kalibratieoplossingen.

Maximale afwijking Ionratio	Relatieve retentietijden
20%	0,5% maximale afwijking

DIVERSEN

Opmerkingen

- Het concentreren van de Florisil en GPC fractie met behulp van stikstof inblazen tot net droog is kritisch. Gebruik bij grotere series de SpeedVac, echter er bestaat een risico op kookvertraging.
- Vanwege lichtgevoeligheid van BDE dient zoveel mogelijk onder gedempte lichtomstandigheden gewerkt te worden, standaardoplossingen worden in bruine flesjes bewaard.
- Er dient zoveel mogelijk nieuw of zorgvuldig gespoeld glaswerk gebruikt te worden. Oplosmiddelen moeten voor gebruik eerst getest worden op de afwezigheid van Bde's.
- Onder optimale condities is een LOD van 5 pg/g t/m BDE 183 en voor BDE 209 van 100 pg/g haalbaar.

BDE 28 t/m BDE 209 ; retentietijden , SIM's en kwalificatie ratio's

Bijlage: TraceMS-LV-SiCN STX500 10 meter

BDE	Rt min	Quan	Qual1	% Ratio 1	Qual 2	% Ratio 2	Qual 3	% Ratio 3
28	20,47	405,9	407,9	98				
28-13C	20,47	417,9	419,9	96				
47-13C	22,31	497,8	499,8	64				
47	22,31	485,8	483,8	68				
100	23,23	563,7	565,7	96	561,7	51		
100-13C	23,23	575,7	577,7	96	573,7	51		
99	23,46	563,7	565,7	96	561,7	51		
99-13C	23,45	575,7	577,7	96	573,7	51		
154	24,06	483,8	485,8	63	643,6	50		
154-13C	24,06	495,8	497,8	67	655,6	56		
153	24,34	483,8	485,8	64	643,6	37		
153-13C	24,34	495,8	497,8	64	655,6	40		
183	25,21	561,7	563,7	96	721,5	27	723,5	25
183-13C	25,21	573,7	575,7	96	733,5	24	735,5	27
209	35,78	798,5	800,5	94	796,5	71		
209-13C	35,78	810,5	812,5	90	808,5	77		

RIKILT

Gebromeerde vlamvertrager bevattende extracten Gehalte bepaling met behulp van GC-NCI-MS

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

1.1 Toelichting

De methode is toepasbaar voor de analyse van 23 Polybroomdiphenylethers (PBDE's); HBCDD (som van de isomeren van Hexabroomcyclododecaan; alle isomeren van HBCDD elueren als 1 piek, circa 3 seconden eerder dan BDE 183); en PBB 153 (Polybroombiphenyl; deze coelueert met PBDE 154), in extracten van diverse matrices van dierlijke en plantaardige oorsprong (m.n. (dier)voeding, grondstoffen daarvan en vegetatie)). Dit RSV beschrijft de analyse van de extracten met behulp van GC-MS en de analytische kwaliteitscontrole. Voor bereiding van extracten van de monsters wordt verwezen naar de RSVs A0561 (isolatie van vet) en A1054 (Zuivering met behulp van een geautomatiseerd Power-Prep cleanup systeem).

2 DEFINITIE

Rapportagegrens (RG): niveau waarboven data worden gerapporteerd. De detectiegrens of bepalinggrens kan lager zijn dan de rapportagegrens.

Bepalingsgrens (LOQ): laagste niveau waarvoor adequate terugvindingen en herhaalbaarheid is aangetoond.

Blanco monster: een hoeveelheid monster waarbij in een eerdere meting geen aantoonbare/ of een acceptabel lage hoeveelheid PBDE's is gevonden.

Blanco monster + spike: een blanco monster waaraan een bekende hoeveelheid (6250 pg) te bepalen componenten is toegevoegd.

3 BEGINSEL

Eventueel na voorgaande isolatie van het vet wordt aan het monster een bekende hoeveelheid interne standaard toegevoegd, waarna het monster geëxtraheerd en gezuiverd wordt met de gebruikelijke methoden (RSV A0561, RSV A1054). Na concentratie van de fractie A, na de zuivering met behulp van de PowerPrep (RSV A1054), wordt het monster opgenomen in een bekende hoeveelheid oplosmiddel met een bekende concentratie van de recovery standaard (¹³C-PCB 209). Fractie A bevat de PBDE's; mono-ortho- en indicator PCB's. De fractie wordt geanalyseerd met behulp van capillaire gaschromatografie en massaspectrometrie. De gaschromatografische scheiding vindt plaats op een 'fused silica' capillaire kolom gecoat met een apolaire fase waarvan de selectiviteit en de dimensies dusdanig zijn, dat er voldoende scheiding wordt verkregen tussen de te meten congenere. Monsters worden automatisch geïnjecteerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een PTV-injector.

Massaspectrometrie wordt uitgevoerd in de Negatieve Chemische Ionisatie (NCI)-mode met methaan als ionisatie gas, bij een 'electron energy' van 70 eV. Om maximale gevoeligheid te verkrijgen worden de t/m octa gebromeerde BDE's gekwantificeerd op broomionen bij m/z 79 en 81. Het nadeel hiervan is dat er geen gelabelde interne standaarden gebruikt kunnen worden. De nona- en deca-gebromeerde BDE's (BDE 206 t/m 209) kunnen gedetecteerd worden op een groot fragment van het molecuul, [C6Br6O], gebruikmakend van dit fragment is isotoopverdunding mogelijk met een m/z verschil van 6 ten opzichte van de ¹³C gelabelde analoge standaard.

4 REAGENTIA EN HULPSTOFFEN

Veiligheid:

Raadpleeg bij gebruik van chemicaliën de gevaarsetikettering op de verpakking, zonodig aangevuld met controle van de veiligheidsvoorschriften. Deze zijn te vinden in het Chemiekaartenboek. Gebruik de aanbevolen persoonlijke beschermingsmiddelen.

Alle chemicaliën dienen van 'pro-analyse' kwaliteit te zijn of hoger.

Verwijzing naar een product en/of fabrikant dient enkel ter informatie en identificatie en houdt geen uitsluiting in van andere producten en/of fabrikanten die mogelijk ook voldoen.

De bereiding van referentiestandaarden en de extracten voor de bereiding van standaarden in matrix wordt geschreven in het betreffende RSV voor monstervoorbewerking (RSV A0561 en A1054).

4.1 Chemicaliën

4.1.1 Iso-Octaan (IO); Biosolve 99,9%.

4.1.2 ¹³C-PCB 194; EC-1418-3; 40 µg/ml in nonaan.

4.1.3 ¹³C-PCB 209; EC-1410-3; 40 µg/ml in nonaan.

4.1.4 ¹³C-PBDE 209; EO-5003-0; 50 µg/ml in nonaan.

4.1.5 PBDE mix EO-5103 (2,5 µg/ml); (bestaande uit PBDE's 17-28-47-66-71-85-99-100-138-153-154-183-190-209); LGC-promochem.

4.1.5a PBDE mixture 10 (50 µg/ml, exacte concentraties op certificaat); S-4559-50-T; (bestaande uit PBDE's 17-28-47-49-66-71-75-77-85-99-100-119-138-153-154-183-190-209); Chiron via Campro Scientific.

4.1.6 BDE-49 oplossing (50 µg/ml); LGC-promochem.

4.1.7 BDE-75 oplossing (50 µg/ml); LGC-promochem.

4.1.8 BDE-77 oplossing (50 µg/ml); LGC-promochem.

4.1.9 BDE-119 oplossing (50 µg/ml); LGC-promochem.

4.1.10 BDE-128 oplossing (50 µg/ml); LCG-promochem.

4.1.11 BDE-203 oplossing (50 µg/ml); LCG-promochem.

4.1.12 BDE-205 oplossing (50 µg/ml); LCG-promochem.

4.1.13 BDE-206 oplossing (50 µg/ml); LCG-promochem.

4.1.14 BDE-207 oplossing (50 µg/ml); LCG-promochem.

4.1.15 BDE-208 oplossing (50 µg/ml); LCG-promochem.

4.2 Reagentia

4.2.1 ¹³C-PCB 194-1000 oplossing; 1,0 µg/ml; verdun 3 ml uit de ampul (4.1.2) in 120 ml iso-octaan.

4.2.2 ¹³C-PCB 209-1000 oplossing 1,0 µg/ml; verdun 3 ml uit de ampul (4.1.3) in 120 ml iso-octaan.

4.2.3 ¹³C-PCB 209-2.5 oplossing; 2,5 pg/µl; Maak in een maatkolf van 100 ml een verdunning van ¹³C-PCB 209-1000 oplossing (4.2.2), pipetteer 250 µl ¹³C-PCB 209-1000 oplossing (4.2.2) en vul met iso-octaan aan tot 100 ml.

4.2.4 BDE-128-1000 oplossing; 1,0 µg/ml; verdun 1,2 ml uit de ampul (4.1.10) in 60 ml iso-octaan.

4.2.5 ¹³C-PBDE 209-1000 oplossing; pipetteer 200 µl ¹³C-PBDE 209 (4.1.4) in een maatkolf van 10 ml en vul aan met iso-octaan.

4.2.6 IS BFR 50-25-12.5 oplossing; resp. 50; 25 en 12,5 pg/µl; Maak in een maatkolf van 100 ml een verdunning van ¹³C-PBDE 209; BDE 128 en ¹³C-PCB 194, pipetteer 5000 µl ¹³C-PBDE 209-1000 oplossing (4.2.5); 2500 µl BDE-128-1000 oplossing (4.2.4) en 1250 µl ¹³C-PCB 194-1000 oplossing (4.2.1) in een maatkolf van 100 ml en vul aan met iso-octaan.

4.2.7 BDEmix-100; 100 pg/µl; Maak in een maatkolf van 10 ml een verdunning in iso-octaan van respectievelijk, 400 µl PBDE mix 5103 (4.1.5); 20 µl BDE-49 (4.1.6); 20 µl BDE-75 (4.1.7); 20 µl BDE-77 (4.1.8) en 20 µl BDE-119 (4.1.9). Vul aan tot 10 ml met iso-octaan.

4.2.8 BDEmix-10; 10 pg/µl; Pipetteer 1 ml BDEmix-100 oplossing (4.2.7) in een maatkolf van 10 ml en vul aan met iso-octaan (4.2.1) en meng.

4.2.9 BDEmix-1; 1 pg/μl; Pipetteer 100 μl BDEmix-100 oplossing (4.2.7) in een maatkolf van 10 ml en vul aan met iso-octaan (4.2.1) en meng.

4.2.10 IJk oplossingen GC-MS; Bereid volgens onderstaande verdunningstabel tot concentraties Natieve BDE's 0; 50; 200; 500; 2000; 8000 en 20.000 pg/ml, ¹³C-PCB 194 2500 pg/ml; ¹³C-PCB 209 500 pg/ml en BDE 128/¹³C-PBDE 209 beide 10.000 pg/ml. Voor BDE 138 en BDE 209 gelden afwijkende concentraties, BDE 138 is op een concentratie van 152 ipv 100 aanwezig in de stock oplossing, BDE 209 op 400 ipv 100. In de onderstaande verdunningstabel zijn de niveaus weergegeven als pg/0,5 ml, deze niveaus corresponderen met de hoeveelheid component [pg] in de hoeveelheid monster welke in bewerking is genomen.

Tabel A8. Verdunningstabel

Code oplossing Conc. [pg/ml]	BDE mix [μl]	IS opl. [μl] (4.2.6) (¹³ C-PBDE 209; BDE 128 en ¹³ C-PCB 194)	IS BFR 50-25-12.5; 50;25;12.5 pg/μl	IS opl. [μl] ¹³ C- PCB 209-2.5;2.5 pg/μl (4.2.3)	Iso-octaan (4.2.1)
Cal PBDE 0	0	4000		2000	Tot 10 ml
Cal PBDE 50	50 (10 pg/μl (4.2.8))	4000		2000	Tot 10 ml
Cal PBDE 200	200 (10 pg/μl (4.2.8))	4000		2000	Tot 10 ml
Cal PBDE 500	500 (10 pg/μl (4.2.8))	4000		2000	Tot 10 ml
Cal PBDE 2000	200 (100 pg/μl (4.2.7))	4000		2000	Tot 10 ml
Cal PBDE 8000	800 (100 pg/μl (4.2.7))	4000		2000	Tot 10 ml
Cal PBDE 20000	2000 (100 pg/μl (4.2.7))	4000		2000	Tot 10 ml

4.2.11 Cylinder methaangas met reduceerventiel, gereduceerd tot een druk van 1 bar.

5 APPARATUUR

5.1 Gebruikelijk laboratorium glaswerk.

5.2 Glazen buizen, 10 ml; 50 ml, met schroefdop en teflon inlage.

5.3 Gilson pipetten. 25, 50, 250 en 1000 ml positieve displacement pipetten.

5.4 Bovenweger, nauwkeurigheid 0,01 g, Mettler PM2000.

5.5 Analytische balans. Nauwkeurigheid 0,1 mg.

5.6 GC-Trace-MS systeem; Trace GC; CTC Combi PAL; Best PTV injector

5.7 GC Kolommen system:

Analytische kolom: 30 m Restek CLPesticides 0,25 mm ID, 0,25 μm filmdikte, Helium flow 2,0 ml/min in constant flow mode.

5.8 Best liner: gedeactiveerde glasliner (pyrex).

6 WERKWIJZE

6.1 Algemeen

De monster voorbereiding wordt uitgevoerd met behulp van een PowerPrep-systeem. De zuiverings methode is gelijk aan die voor de analyse van PCB's PCDD's en PCDF's, en gezamenlijk beschreven in RSV A1054. Een hoeveelheid monster, die in 500 μl eindextract terecht komt, wordt gespiked met respectievelijk 10.000 pg ¹³C-BDE 209; 5000 pg BDE-128 en 2500 pg ¹³C-PCB 194 (afkomstig van 200 μl 4.2.6). Het eindextract wordt opgenomen in een oplossing welke 250 pg ¹³C-PCB 209 bevat (afkomstig van 100 μl 4.2.3).

6.2 Voorzorgsmaatregelen

Raadpleeg bij gebruik van chemicaliën de gevaaretikettering op de verpakking, zonodig aangevuld met controle van de veiligheidsvoorschriften. Deze zijn te vinden in het Chemiekaartenboek. Voor bijvullen stikstof vat en gebruik organische oplosmiddelen: gebruik de aanbevolen persoonlijke beschermingsmiddelen (zie RSV F0071). Het afval dat ontstaat bij deze bepaling dient te worden afgevoerd volgens de bepalingen in RSV F0012.

6.3 Voorbehandeling van het monster

Monsters worden voorbehandeld volgens RSV A561 en A1054.

6.4 Proefeenheid

Afhankelijk van het type monster en vetpercentage wordt een geschikte hoeveelheid in bewerking genomen (RSV 1054). Levensmiddelen 10 gram (op productbasis); veevoer 10 gram; vet 2,5 gram; visolie 0,5 gram.

6.5 Kwaliteitscontroles

6.5.1 Terugvinding

Per onderzochte matrix wordt minimaal 1 terugvindingsmonster meegenomen:

Vis/Visolie: NIST 1588A en blanco Peruaanse visolie.

Vet/melkvet/levensmiddelen: Controle monster 3019.

Veevoeder: een monster op een spike niveau van 6250 pg.

6.5.2 Blanco's

De opgewerkte monsters worden vergezeld van de volgende blanco's:

blanco chemicaliën;

een blanco die volgens dezelfde extractie methode als de monsters is opgewerkt.

6.6 Omschrijving procedure

6.6.1 Algemeen

Voordat begonnen wordt met het analyseren van een meetserie moet worden aangetoond dat het systeem voldoet aan de specificaties. De meetserie wordt geanalyseerd volgens injectievolgorde beschreven in 6.6.4.

6.6.2 Controle van het systeem en onderhoud.

Zie onder andere RSV T0299. Controleer de tuning van de MS, piekvorm; piekhoogte en massatoewijzing van m/z. Indien de massatoewijzing niet correct is (afwijking > 0,25 amu), dient een kalibratie te worden uitgevoerd. Deze massakalibratie kan alleen in EI worden gedaan, hiertoe de CI bron wisselen voor een EI bron. Na stabiliseren van de bron de massakalibratie uitvoeren. Na de massakalibratie wordt de CI bron weer terug geplaatst.

6.6.3 Instrument methode

De instrumentcondities zijn vastgelegd in een methode, (PBDE NCI 30 m). Deze methode wordt geselecteerd in de sequence van de X-calibur software en beschrijft onder andere de volgende parameters:

6.6.3.1 Injectiecondities

Injector:	Best-PTV, solvent split mode
Liner	Pyrex gedeactiveerd glas liner voor Best injector.
Injectievolume	10 µl
Vent flow	200 ml/min
Split flow	50 ml/min
Clean flow	100 ml/min
Inlaatdruk tijdens injectie	druk behorend bij de actuele gassnelheid
Injectiesnelheid	1,3 µl/s
Temperatuurprogramma	50 °C (0 min) dan met 6 °C/s naar 70 °C (0 min) dan met 10 °C/s naar 280 °C (29 min), vervolgens met 10 °C/s naar 340 °C (2 min).
Solvent valve temp	160 °C
Vent tijd	0 s

Splitless tijd 120 s

6.6.3.2 GC condities

Carrier gas Helium, constante flow 2,0 ml/min.
Temp. GC oven 150 °C (5 min) dan met 25°C/min naar 290 °C, vervolgens 20 min 290 °C.

6.6.3.3 MS condities

De condities voor MS detectie zijn vastgelegd in MS tune methode (PBDE NCI 1.3.tune). Deze methode wordt geselecteerd binnen de X-calibur instrument methode, onder method options van de MS.

Transfer line 280 °C
Bron temperatuur 250 °C
Ionisatie Electron Impact, 70 eV
Detector voltage 500 V
CI gas flow 1,3 ml/min

SIM scan events:

Functie 1: 6,5-33 min

Mass[amu]	Span[amu]	Dwell time[sec]
79,00	0,50	0,05
81,00	0,50	0,05

Functie 2: 6,5-15 min

Mass[amu]	Span[amu]	Dwell time[sec]
439,70	0,50	0,02
441,70	0,50	0,02
509,70	0,50	0,02
511,70	0,50	0,02

Functie 3: 15-33 min

Mass[amu]	Span[amu]	Dwell time[sec]
484,50	0,50	0,05
486,50	0,50	0,05
494,50	0,50	0,05
496,50	0,50	0,05

6.6.4 Injectievolgorde

De extracten verkregen bij de monstervoorbewerking en kalibratiestandaarden worden geanalyseerd in onderstaande volgorde:

- aantal oplosmiddelen, iso-octaan, totdat het systeem 'schoon' is, vaak is 3 voldoende.
- Kalibratielijjn; 100 µl van de kalibratieoplossingen in een insert.
- aantal oplosmiddelen, iso-octaan, totdat het systeem 'schoon' is en geen overdracht meer zichtbaar is uit de laatst geïnjecteerde standaardoplossing, vaak is 2 voldoende.
- Monsters en/of controlemonsters.
- na elke 6 tot 12 monsters de kalibratiestandaard 200 pg/ml voorafgegaan en gevolgd door een oplosmiddel.
- De sequence wordt afgesloten met een kalibratielijjn.

6.6.5 Kwantificeringsion(en)

Zie voor de kwantificeringsionen onderstaande Tabel A9.

Tabel A9. Kwantificeringsionen

	Quantificering [m/z]	Qualifier 1
BDE 17	79,0	81,0
BDE 28	79,0	81,0
BDE 47	79,0	81,0
BDE 49	79,0	81,0
BDE 66	79,0	81,0
BDE 71	79,0	81,0
BDE 75	79,0	81,0
BDE 77	79,0	81,0
BDE 85	79,0	81,0
BDE 99	79,0	81,0
BDE 100	79,0	81,0
BDE 119	79,0	81,0
BDE 138	79,0	81,0
BDE 153	79,0	81,0
BDE 154	79,0	81,0
BDE 183	79,0	81,0
BDE 190	79,0	81,0
BDE 209	486,5	484,5
PBB 153	79,0	81,0
HBCDD	79,0	81,0
Interne standaarden		
13C-PCB 194	441,7	439,7
BDE 128	79,0	81,0
13C-PCB 209	509,7	511,7
13C-BDE 209	494,5	496,5

6.6.6 Aandachtspunten en Troubleshooting

Bij het analyseren van PBDE's gelden een aantal punten welke aandacht behoeven.

- Thermolabiel; vooral de sterker gebromeerde PBDE's zijn thermolabiel boven 300 °C. Dit is tevens de reden waarom zowel injector- als GC-temperatuur hier niet boven komen.
- Lichtlabiel; PBDE's zijn gevoelig voor licht, werk onder uitsluiting van licht.
- Instabiel in verschillende oplosmiddelen; onder andere BDE-209 is niet stabiel in toluen, voorkom aanwezigheid hiervan in de te injecteren oplossing.
- Gevoelig voor contaminatie; gezien het frequente gebruik van vlamvertragers in producten in onze omgeving is het noodzakelijk onnodige handelingen tijdens opwerking en meting te voorkomen. Gebruik bij voorkeur materialen voor eenmalig gebruik.
- Gevoelig voor contaminatie van GC; Vervuiling van liner en voorste gedeelte van GC-kolom zorgt voor verlaging van de respons van PBDE's. Handelingen bij elke meetserie: vervang septum, snijdt 5 cm van de analytische kolom. Handelingen indien noodzakelijk, vervang GC-kolom, vervang liner, reiniging van injector, vervang Filament, reiniging van de CI-Bron.

- Gevoelig voor actieve plaatsen in de CI-bron; Na het reinigen van de CI-bron kan een verlaagde respons optreden voor lage concentraties. Er blijkt een afhankelijkheid te bestaan tussen hoeveelheid methaan en deze verlaagde respons, een hogere methaangas flow lijkt het responsverloop te verbeteren. Tevens geeft een verhoging van de repeller voltage vermindering van dit effect.

7 RESULTATEN

7.1 Algemeen

Na de analyse kan een kwantitatieve dataverwerking worden gedaan. Gebruik hiervoor Processing methode (PBDE A1088). Kwantificering vindt plaats op basis van interne standaarden. ¹³C-PCB 194 wordt gebruikt als interne standaard voor de componenten, BDE 17; 28; 47; 49; 66; 71; 75; 77; 85; 99; 100; 119; 138; 153; 154; 183 en 190. ¹³C-PCB 209 wordt gebruikt als interne standaard voor BDE 209. Het resultaat van de processing wordt in de Quanbrowser van X-calibur gecontroleerd, eventueel aangepast en vervolgens kunnen de gehalten (pg/ml) naar Excel geëxporteerd worden. De data wordt vervolgens in Excel omgerekend naar de eenheid waarin gerapporteerd wordt.

7.2 Beoordeling van de resultaten

7.2.1 Kalibratie; lineariteit - keuze kalibratiemodel

De lineariteit van de ijklijn wordt met name in het lage concentratiegebied gecontroleerd. Het ten opzichte van de regressielijn berekende gehalte voor de tweede standaard (200 pg/ml) mag een afwijking hebben van maximaal 25% (gemeten waarde van 150 - 250 pg/ml). Het onderlinge verschil tussen de beide laagste standaardniveaus, uitgedrukt in afwijking ten opzichte van de verwachte waarde, mag 25% zijn. Afhankelijk van de responsafwijking van de berekende waarde van de laagste standaarden ten opzichte van de ware waarde, wordt een kalibratie met lineaire regressie (als aan bovenstaande voorwaarden wordt voldaan), volgens Average RF of volgens de zogenoemde 'cubic spline' gekalibreerd (let op: Een interne standaardkalibratie is gebaseerd op het verband tussen de ratio 'Component oppervlak/Interne standaard oppervlak' uitgezet tegen de concentratie. Het waargenomen responsprobleem bij lage concentratie wordt veroorzaakt door een te kleine absolute hoeveelheid component in de bron. Hierdoor is het belangrijk dat de recovery voor de interne standaarden voldoen hoog is). Ter voorkoming van bovenstaande kalibratiefout is een externe standaardberekeningswijze bij gebruik van 'cubic spline' betrouwbaarder, waarbij in Excel voor de interne standaard gecorrigeerd kan worden.

7.2.2 Piek identificatie.

Ruwe data wordt geprocessed met X-calibur software. Pieken worden van ruis onderscheiden en bij overeenkomende retentietijd aan een component toegekend. Bij de beoordeling van het overeenkomen van de retentietijd wordt een afwijking van circa 2 sec als acceptabel aanvaard (0,03 min). Opmerking: hierbij dient rekening te worden gehouden dat een eventuele retentietijdverschuiving (ten gevolge van contaminatie) die wordt waargenomen bij de interne standaarden ook bij componenten optreedt. De componenten zijn op dit moment 'mogelijk aanwezig'.

7.3 Kwaliteitscontrole

Via de Quanbrowser binnen X-calibur worden de retentietijden en piekintegratie gecontroleerd en gecorrigeerd.

In de blanco chemicaliën mogen geen target compounds worden aangetroffen boven de in Tabel A10 (zie hieronder) vermelde waarden. De voor de congenere BDE 47; 49; 99; 100 en 209 worden afhankelijk van de gevolgde opwerkings procedure verschillende achtergrond niveaus gevonden. Het betreft absolute waarden welke gevonden mogen worden in het te meten extract (in pg). Afhankelijk van de ingewogen hoeveelheid monster vertaalt dit zich naar een bijdrage in het gehalte.

Tabel A10. Blanco waarden prevalidatie

	Blanco waarden prevalidatie [pg in opgewerkt extract]		
	Blanco Powerprep [pg]	Blanco ASE extractie Powerprep [pg]	Blanco Smedes extractie Powerprep [pg]
BDE 17			
BDE 28		2	2
BDE 47	50	300	300
BDE 49	2	3	3
BDE 66		2	2
BDE 71			
BDE 75			
BDE 77			
BDE 85			
BDE 99	10	100	100
BDE 100	2	20	20
BDE 119			
BDE 138			
BDE 153			
BDE 154			
BDE 183			
BDE 190			
BDE 209	200	800	800
PBB 153			
HBCDD			

Indien hogere hoeveelheden aangetroffen worden:

- a) worden deze stoffen indien aangetroffen in de monsters niet gerapporteerd, {contaminatie} of
- b) dient de oorzaak van de contaminatie te worden achterhaald en dienen de monsters opnieuw te worden geanalyseerd.

De respons voor componenten in het blanco monster mag niet meer zijn dan 30% van de rapportagegrens. Hieruit volgen verschillende rapportagegrenzen voor diverse opwerkingstrajecten (zie 7.4.4).

7.3.1 Terugvindingsmonsters

Van de componenten die gespiked zijn wordt de terugvinding berekend. Voor referentiemonsters wordt de gevonden waarde vergeleken met de gecertificeerde waarde. Indien het terugvindingspercentage afwijkt of de gevonden waarden afwijken van de gecertificeerde waarde dient de oorzaak te worden opgespoord en verholpen en heranalyse van de monsters plaats te vinden.

7.3.1.1 Berekening terugvinding

De gehalten aan componenten in de monsters worden in beginsel niet gecorrigeerd voor terugvinding, maar in bepaalde gevallen is het te rechtvaardigen dit wel te doen. In dergelijke gevallen wordt gecorrigeerd voor de terugvinding die is verkregen in dezelfde serie, aangenomen dat het terugvindingsmonster representatief is. Of er voor terugvinding is gecorrigeerd, en met welke

waarde, dient te worden geregistreerd in het labjournaal en in het Excel-sheet met de berekeningen. Een eventuele correctie wordt als volgt berekend:

$$\text{Terugvinding in spike} [\%] = \frac{C_{\text{spike}} [\mu\text{g} / \text{kg}]}{C_{\text{spike-niveau}} [\mu\text{g} / \text{kg}]} * 100\%$$

$$C_{\text{terugvinding gecorrigeerd}} = \frac{C_{\text{monster}}}{\text{Terugvinding in spike} [\%]} * 100\%$$

7.3.1.2 Toetsing

De terugvinding is acceptabel tussen 60-140%.

Voor componenten die bij de validatie een gemiddelde terugvinding lager dan 70% hadden, moet de terugvinding liggen in het bereik:

$$[\text{gemiddelde historische terugvinding} \pm 2x \text{RSD}_R]$$

waarbij:

- gemiddelde historische terugvinding = de gemiddelde terugvinding uit voorgaande series met een minimum van n = 10. Indien n < 10 dan wordt de gemiddelde terugvinding uit de validatie aangehouden met een relatieve spreiding van 40%.
- RSD_R = relatieve standaarddeviatie onder reproduceerbaarheidscondities.

7.3.1.3 Responsverloop

Het responsverloop van twee opeenvolgende standaarden die in de serie om de 6-12 injecties gemeten wordt mag niet groter zijn dan 40%.

$$\text{responseverloop} = \frac{|C_{st.1} - C_{st.2}|}{(C_{st.1} + C_{st.2}) / 2} * 100\%$$

Monsters welke geanalyseerd zijn tussen bracketstandaarden met een groter verschil dan 40% moeten opnieuw worden geanalyseerd.

7.4 Rapportage gehalten

De gehalten van de componenten eventueel gecorrigeerd voor terugvinding en/of vochtpercentage worden gerapporteerd. Indien gecorrigeerd is voor terugvinding en/of vochtgehalte, dan wordt dit aangegeven en geregistreerd. Indien er sprake is van een heranalyse wordt de waarde uit de tweede analyse gerapporteerd.

7.4.1 Correctie naar 12% vocht:

De gehalten van contaminanten in diervoeder vallend onder EU regeling 2002/32 dienen te worden uitgedrukt op basis van 12% vocht. Het gevonden gehalte in het product dient als volgt te worden omgerekend:

$$C_{12\% \text{ vocht gecorrigeerd}} = \frac{(100 - 12) * C_{\text{monster}}}{100 - \text{vocht}\%_{\text{product}}}$$

7.4.2 Correctie voor terugvinding

Zie 7.3.1.1

7.4.3 Afronding gehalten

Gehalten worden gerapporteerd in µg/kg, op 1 significant cijfer voor waarden ≥ 0,001 en < 0,01, op 2 significante cijfers voor waarden ≥ 0,01 en < 10 µg/kg en op hele getallen voor waarden ≥ 10 µg/kg.

7.4.4 Rapportagegrenzen

Tabel A11. Rapportagegrens

	Matrix Opwerking Cleanup inbewerking	Vetten Direct Powerpr. 2,5 gram	Overigen ASE Powerpr. 10 gram	Overigen Smedes Powerpr. 10 gram
component		RG [pg/g]	RG [pg/g]	RG [pg/g]
BDE 17		10	2	2
BDE 28		10	2	2
BDE 47		70	100	100
BDE 49		10	2	2
BDE 66		10	2	2
BDE 71		10	2	2
BDE 75		10	2	2
BDE 77		10	2	2
BDE 85		10	2	2
BDE 99		15	40	40
BDE 100		10	10	10
BDE 119		10	2	2
BDE 138		10	2	2
BDE 153		10	2	2
BDE 154		10	2	2
BDE 183		25	5	5
BDE 190		25	5	5
BDE 209		300	300	300
PBB 153	coelutie met BDE 154			
HBCDD	Elueert vlak voor BDE 183			

8 REGISTRATIE

De volgende zaken worden geregistreerd:
gebruikte identificatie - rekenmal (EXCEL-bestand);
of en hoe correctie voor recovery heeft plaatsgevonden.

Appendix B. Concentrations of PBDEs in fish

Average concentrations of PBDE-47, -99 and -100 (pg/g product) in fish and crustaceans, sampled and analyzed by RIVO/RIVM (2004) and VWA/Dutch Consumers' Association (2006). Samples below LOD set as ½LOD.

Species	2004		Concentration			2006		Concentration		
	Source	Fat (%)	PBDE-47	PBDE-99	PBDE-100	Source	Fat (%)	PBDE-47	PBDE-99	PBDE-100
Cod	RIVO	0.8	200	5*	200	CA ²	0.6	45	2.3*	9.1
Coalfish	RIVO	1.1	200	50*	80	CA ²	0.7	7.8	2.8*	1.1*
Plaice	RIVO	0.9	250	30*	80	CA ²	2.6	302	6.5*	65
Sole	RIVO	1.2	200	80	80	CA ²	2.1	135	5.3*	103
Tuna fish	RIVM	1.2	5	1*	1*	CA ²	1	20	2.5*	1*
Mackerel	RIVO	11	670	520	130	VWA	109	928 ¹	193 ¹	341 ¹
Herring	RIVO	17.2	2900	740	930	VWA	10	928 ¹	193 ¹	341 ¹
Eel	RIVO	27.8	2500	320	880	VWA	10	928 ¹	193 ¹	341 ¹
Salmon	RIVO	11.9	830	380	180	VWA	10	928 ¹	193 ¹	341 ¹
Mussels	RIVO	2.2	530	200	220	CA ²	2.9	199	55	58
Shrimp	RIVO	2.2	380	430	50*	CA ²	1.6	15	2.3*	2.3*
Tilapia	RIVO	-	-	-	-	CA ²	3.4	370	15*	64

* Value is ½LOD

¹ Pooled sample of mackerel, herring, eel and salmon

² Consumers' Association

Appendix C. Measurements by RIKILT

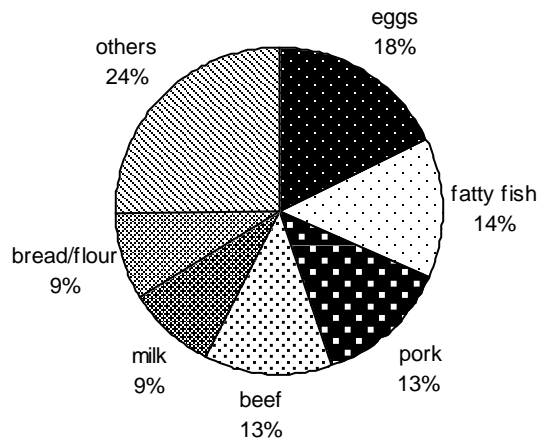
Table C1. Concentrations of PBDEs (pg/g product) in food categories sampled in the year 2008 measured by RIKILT (non-detects are assigned ½LOD)

Category	Fat %	Concentrations		
		PBDE-47	PBDE-99	PBDE-100
Fatty fish	15.1	379	118	149
Flour	1.7	5*	3.3	1*
Pork	22.5	25	31	4
Eggs	8.3	67.7	13.1	4.8
Crustaceans	1.6	259.5	118.2	63.1
Bakery products	16.9	5*	8.8	5*
Cheese	26	22	13.3	2.8
Beef	11.3	16.5	10.7	2.6
Chicken/poultry	7.4	7	5.8	1*
Butter	74.9	62.4	44.5	5*
Lean fish	1.74	37	2.8	11.8
Vegetable oil	64.9	10*	21	5*
Industrial oil	83.3	10*	24.6	5*
Milk	1.42	1	0.8	0.4*

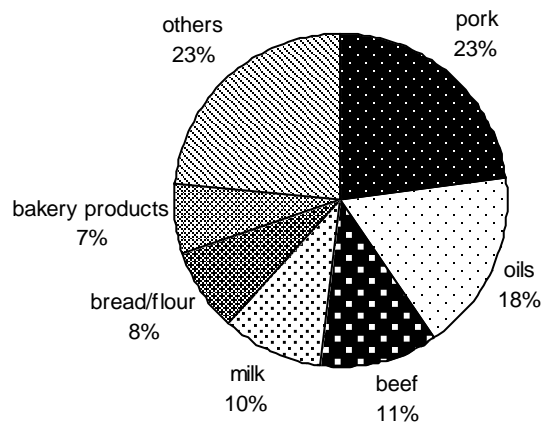
* Value is ½LOD

Note: the food category vegetables/fruit is not measured

PBDE-47



PBDE-99



PBDE-100

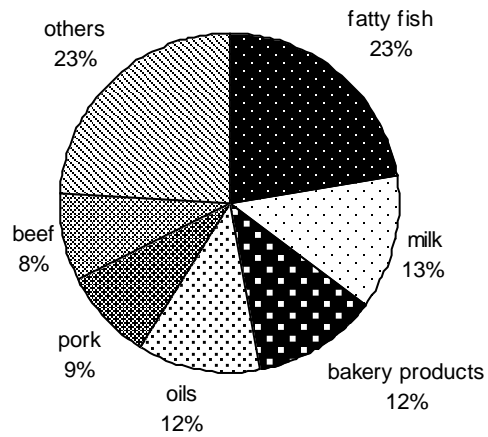


Figure C1. The contribution of various food categories to the total individual intake of PBDE-47, PBDE-99 and PBDE-100 in 2008 (based on measurements performed by RIKILT).

Table C2. Percentiles of age-dependent dietary intake of PBDE-47, -99, and -100 (pg/kg bw/day) based on measurements performed by RIKILT. Samples below the LOD were set at ½LOD. Between brackets: 95% confidence interval.

PBDE-47	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	female	male	female	male	female	male	female
life-long average intake	118 (107-251)	110 (100-143)	206 (183-437)	191 (173-252)	229 (202-486)	212 (191-281)	258 (226-551)	240 (215-319)

PBDE-99	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	female	male	female	male	female	male	female
life-long average intake	89 (80-187)	80 (75-102)	151 (135-322)	135 (125-174)	167 (148-358)	150 (138-193)	188 (166-404)	168 (154-218)

PBDE-100	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	female	male	female	male	female	male	female
life-long average intake	27 (24-34)	25 (23-43)	47 (42-60)	44 (39-77)	53 (47-67)	49 (44-86)	60 (53-77)	55 (49-97)

Note: the food category vegetables/fruit is not measured and therefore not included in the intake calculations

Appendix D. Comparison of statistical methods

Comparison of three different statistical methods for intake calculations in 2004: BBN, STEM and Nusser. The table shows percentiles of the age-dependent dietary intake to PBDE (pg/kg bw/day). Samples below the LOD were set at half the LOD. Between brackets: 95% confidence interval.

PBDE-47	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	Female	male	female	male	Female	male	female
BBN	551 (504-834)	501 (459-758)	1147 (1038-1752)	1046 (947-1587)	1321 (1189-2024)	1203 (1085-1835)	1556 (1393-2399)	1417 (1268-2170)
STEM	400		930		1090		1320	
Nusser	400				1590			

PBDE-99	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	Female	male	female	male	Female	male	female
BBN	150 (139-182)	129 (119-156)	257 (235-314)	221 (202-276)	284 (259-350)	246 (223-301)	321 (290-397)	277 (250-342)
STEM	110		190		210		240	
Nusser	120				350			

PBDE-100	P50 (2.5-97.5)		P95 (2.5-97.5)		P97.50 (2.5-97.5)		P99 (2.5-97.5)	
	male	Female	male	female	male	Female	male	female
BBN	93 (85-103)	83 (76-92)	162 (145-182)	144 (129-161)	180 (159-203)	161 (143-180)	204 (179-231)	182 (160-204)
STEM	80		128		140		155	
Nusser	80				310			

RIVM

National Institute
for Public Health
and the Environment

P.O. Box 1
3720 BA Bilthoven
The Netherlands
www.rivm.nl