

# Nederlands Instituut voor Visserij Onderzoek (RIVO) BV

Postbus 68  
1970 AB IJmuiden  
Tel.: 0255 564646  
Fax.: 0255 564644  
Internet:postkamer@rivo.dlo.nl

Postbus 77  
4400 AB Yerseke  
Tel.: 0113 572781  
Fax.: 0113 573477

## Rapport

Nummer: C083/05

## Nader onderzoek baggerspecie Rotterdamse haven: TIE-fase II onderzoek

Pim Leonards, Christiaan Kwadijk, Sicco Brandsma en Judith van Hesselingen

Opdrachtgever:	RIKZ Drs. J.C. Klamer Postbus Postbus 207 9750 AE Haren
Project nummer:	3.44.12280.22
Contract nummer:	65050972
Akkoord:	Prof. Dr. J. de Boer Hoofd Milieu en Voedselveiligheid
Handtekening:	_____
Datum:	9 december 2005
Aantal exemplaren:	10
Aantal pagina's:	22
Aantal tabellen:	4
Aantal figuren:	2
Aantal bijlagen:	3

# Inhoudsopgave:

Inhoudsopgave:.....	2
Samenvatting.....	3
1. Inleiding.....	4
2. Doel.....	4
3. Materialen en methoden.....	4
3.1 Validatie extractie en zuivering AhR-agonisten .....	4
3.2 Vaststellen AhR-agonisten in baggerslib .....	6
3.3 Berekenen bijdrage geïdentificeerde verbindingen DR-CALUX activiteit .....	7
3.4 Opstellen onderzoeksplan TIE fase II.....	7
4. Resultaten en discussie.....	8
4.1 Validatie extractie en zuivering AhR-agonisten .....	8
4.2 Vaststellen AhR-agonisten in baggerslib en berekening bijdrage geïdentificeerde verbindingen DR-CALUX activiteit.....	10
4.3 Vervolgonderzoek TIE fase II .....	11
5. Conclusies.....	14
6. Referenties.....	14
7. Bijlagen .....	17

## Samenvatting

Baggerslib wordt momenteel niet alleen chemisch maar ook biologisch met bioassays beoordeeld. Een van de gebruikte assays is de DR-CALUX die reageert op verbindingen met een dioxine-achtige toxiciteit. In 2005 zijn in een aantal slibmonsters verhoogde DR-CALUX activiteiten gemeten. Nader onderzoek was daarom gewenst om de verhoogde toxiciteit te verklaren. In het onderhavige onderzoek werd een eerste aanzet tot het nader onderzoek gegeven. Nagegaan werd of een groep van niet-klassieke dioxine-achtige verbindingen (o.a. PAK's, imidazolen, pyridines, diaryltriazenen) verantwoordelijk kunnen zijn voor de verhoogde DR-CALUX activiteit. Het onderzoek richtte zich op de validatie van de extractie- en zuiveringsmethode (zogenaamde SPECIE-07-E protocol) die gebruikt werden voor het isoleren van de verbindingen uit het slib. Doel van het onderzoek was om de rendementen van de verbindingen na extractie (Soxhlet) en de zuivering (multi-layer silica (MLS)) te bepalen. Het doel was dus niet om de methode voor deze verbindingen te optimaliseren. De extractierendementen van de verbindingen varieerden sterk (0% tot 130%). Acceptabele rendementen werden gevonden voor PAK's en diaryltriazenen, maar lagere rendementen voor pyridines. Ook voor benzylimidazole, diaminotolueen en indole-carbinol waren de rendementen laag. Alle onderzochte verbindingen werden echter tijdens de MLS zuivering verwijderd. Dit betekent dat deze verbindingen geen bijdrage kunnen leveren aan de DR-CALUX activiteit in de slibmonsters die volgens het protocol (Soxhlet en MLS) worden opgewerkt. De methode lijkt voornamelijk geschikt om dioxinen, furanen en PCB's te isoleren. In twee slibmonsters uit de Rotterdamse haven die verhoogde DR-CALUX activiteit vertoonden werden daarom de gehalten aan dioxinen, furanen en PCB's bepaald. In één monster kon het grootste deel van de toxiciteit (70%) met de chemische metingen worden verklaard. De DR-CALUX activiteit in het andere monster kon voor 25% worden verklaard. Het is momenteel onduidelijk welke stoffen de resterende toxiciteit veroorzaken. Het onderzoek werd afgesloten met een onderzoeksplan voor vervolgonderzoek.

## 1. Inleiding

Sinds 1999 wordt baggerspecie uit de Rotterdamse haven getest aan de CTT (Chemie-Toxiciteits-Test). Het slib wordt niet alleen chemisch beoordeeld (o.a. PCB's, PAK's, olie) maar ook met behulp van een bioassay (DR-CALUX) die reageert op stoffen met een dioxine-achtige toxiciteit. In 2005 werden in een aantal baggerspeciemonsters significant verhoogde DR-CALUX activiteiten waargenomen. De monsters waren volgens het RIKZ SPECIE-protocol opgewerkt en werden gemeten met de DR-CALUX assay. Momenteel is het onduidelijk waardoor deze verhoogde activiteiten werden veroorzaakt. Nader onderzoek was daarom gewenst in de vorm van een TIE-fase II onderzoek. In het huidige onderzoek wordt een eerste stap gezet om een beter inzicht te krijgen in welke stoffen met een dioxine-achtige werking de extractie- en zuiveringsmethoden van het SPECIE-protocol doorstaan. Naast de klassieke stoffen, zoals dioxinen en PCB's, werden een breed scala aan niet-klassieke AhR-agonisten voor het SPECIE-07-E protocol gevalideerd. Vervolgens werd een onderzoeksplan opgesteld voor vervolgonderzoek binnen een TIE-fase II.

## 2. Doel

De doelstellingen van het onderhavige onderzoek waren:

- Het valideren van het SPECIE-07-E protocol voor niet-klassieke AhR-agonisten.
- Het vaststellen van AhR-agonisten in twee baggerslib monsters die volgens het SPECIE-protocol zijn bewerkt.
- Berekenen van de bijdrage van de geïdentificeerde stoffen aan de vastgestelde DR-CALUX activiteit van de slibmonsters.
- Het opstellen van een onderzoeksvoorstel voor een vervolgonderzoek binnen TIE-fase II.

## 3. Materialen en methoden

### 3.1 Validatie extractie en zuivering AhR-agonisten

Ah-receptor (AhR) agonisten kunnen volgens Denison en Heath-Pagliuso (1998) worden gesplitst in klassieke AhR-liganden en Ah-induceerders en de niet-klassieke AhR liganden en induceerders, zie tabel 1. De verbindingen van de eerste groep kunnen een zogenaamde "vlakke" molecuul configuratie aannemen. Hieronder vallen gechloreerde en gebromeerde dibenzo-p-dioxins (dioxinen), dibenzofuranen (furanen), bifenylen (PCB's) en difenylethers en gesubstitueerde

PAK's en flavonoiden. De niet-klassieke AhR liganden bevatten zowel synthetische verbindingen (o.a. imidazolen, pyridines, en diaminotolueen), als natuurlijke verbindingen (o.a. indoles, tryptofaan derivaten en brevetoxin), zie tabel 1.

Tabel 1: Klasse van Ah-agonisten volgens Denison en Heath-Pagliuso (1998).

	Verbinding
<b>Klassieke AhR-ligands en inducers</b>	Gechloreerde dibenzo-p-dioxinen
	Gechloreerde dibenzofuranen
	Gechloreerde bifenylen
	Gebromeerde difenyl ethers
	Gesubstitueerde PAK's
	Gesubstitueerde flavonoiden
<b>Niet-klassieke AhR-ligands en inducers</b>	
	Synthetisch
	Methylenedioxybenzenes
	Imidazoles en pyridines
	2-(4'-Chlorophenyl)benzothiazole
	1,3-Diaryltriazenes
	Thiazolium, YH439
	2,3-Diaminotoulene
	Natuurlijk
	Indoles (indole 3-carbinol en indolo-[3,2]-carbazole
	Tryptofaan derivaten
	Geoxideerde carotenoiden
	Heterocyclische amines
Brevetoxine (PbTX-6)	

Om vast te stellen welke AhR-agonisten in slibmonsters aanwezig kunnen zijn werd in de eerste fase van het onderzoek een validatiestudie voor de niet-klassieke AhR-agonisten uitgevoerd waarbij gebruik werd gemaakt van het SPECIE-07-E opwerkingsprotocol (Felzel en Besselink, 2004). Het doel van deze studie was dus niet om een analytische methode te optimaliseren voor het analyseren van de niet-klassieke AhR-agonisten in slibmonsters maar om na te gaan welke van de niet-klassieke AhR-agonisten aanwezig kunnen zijn in de extracten van slibmonsters na opwerking volgens het SPECIE-07-E protocol. Vervolgens werden de gehalten van deze AhR-agonisten in twee slibmonsters bepaald.

#### *Validatiestudie niet-klassieke AhR-agonisten*

Nagegaan werd welke niet-klassieke AhR-agonisten (tabel 2) aanwezig waren in de extracten na opwerking volgens het SPECIE-07-E protocol om een beeld te krijgen van welke stoffen de extractie- en zuiveringsprocedure doorstaan. Van de klassieke AhR-agonisten werden de recoveries niet bepaald omdat deze in eerdere onderzoeken zijn vastgesteld (Leonards en van der Veen, 2001; Leonards et al., 2005).

Een mengstandaard van niet-klassieke AhR-agonisten werd in toluen bereid (380 – 750 ng/ml), zie tabel 2. Het brevetoxine werd in het huidige onderzoek niet meegenomen omdat dit toxine niet in Europese wateren voorkomt en het daarom geen waarde heeft om deze stof in Nederlandse slibmonsters te bepalen.

De recoveries van de mengstandaard (3 x 1 ml) werden in drievoud werden volgens Soxhlet-extractie (hexaan:aceton, 3:1, v/v) bepaald. Na extractie werd een interne standaard toegevoegd (1ml van CB 112, 100 ng/ml) en het extract werd met een rotatieverdamer ingedampt tot enkele ml's. Vervolgens werd het extract onder stikstof tot 1 ml ingedampt en gemeten met GC-MS in de electron impact (EI) mode.

Voor bepaling van de recoveries van de zuiveringstap met de multi-layer silica (MLS) kolom werd in drievoud 1 ml van het standaardmengsel op de MLS kolommen gebracht. De MLS kolom bestond uit silica, 44% zwavelzuur silica, 33% NaOH silica, en 10% zilvernitraat silica (volgens SPECIE-07-E). De MLS kolom werd met 130 ml hexaan geëluëerd en CB 112 (1 ml, 100 ng/ml) werd als interne standaard toegevoegd. Vervolgens werden de extracten ingedampt tot circa 1 ml en gemeten met GC-MS.

### 3.2 Vaststellen AhR-agonisten in baggerslib

Deze fase van het onderzoek was gericht op het bepalen van de gehalten van de klassieke en de niet-klassieke Ah-receptor verbindingen in twee slibmonsters: code 2244932 (baggervak 23) en code 2244933 (baggervak 72). De monsters werden volgens het SPECIE-07 protocol opgewerkt (Soxhlet en MLS). De slibmonsters werden door het RIKZ bij het RIVO afgeleverd. Het RIVO heeft de monsters gevriesdroogd. De gehalten aan dioxinen, furanen en PCB's werden door het RIKILT bepaald. De gehalten aan niet-klassieke AhR-agonisten werden door het RIVO bepaald.

Van de volgende verbindingen konden geen commerciële standaarden worden verkregen of de standaarden werden niet op tijd voor het onderzoek geleverd: indolo-[3,2]-carbazole, 2-(4'-chlorophenyl)benzothiazole, indole-3-acetaldehyde, thiazolium (YH439), heterocyclische amines, 4-tert-butyl-1,2-(methylenedioxy)benzeen. De levering van enkele stoffen werd sterk vertraagd door de formaliteiten bij de douane (levertijd was soms meer dan 8 weken).

Tabel 2: Te bepalen recoveries van analytische standaarden na opwerking volgens het SPECIE-protocol met Soxhlet extractie en multi-layer silica zuivering. Recoveries van gechloroerde dioxinen, furanen en PCB's werden in eerder onderzoek vastgesteld (Leonards en van der Veen, 2001). In het huidige onderzoek werd een mengsel van standaarden (Standaardmix) bereid van de met "X" gemarkeerde stoffen. Van deze stoffen werden de recoveries bepaald.

Verbinding	Standaard mix	Verbinding	Standaard mix
<b>PAK's</b>			
Acenafteen		Benz[c]acridine	X
Fluorantheen		Dibenzo[a,h]acridine	X
Anthraceen		5-methylchryseen	X
Fluoreen		Dibenzo[a,k]fluorantheen	
Pyreen		Dibenzo[a,h]pyrene	X
Benz[a]pyreen		Dibenzo[a,i]pyrene	X
Fenanthreen		Dibenz[a,h]anthraceen	X
Peryleen		Benzo[a]anthraceen	
Benzo[b]fluorantheen		Benzo[j]fluorantheen	X
Benzo[k]fluorantheen		Dibenzo[a,e]fluorantheen	X
Benzo[ghi]peryleen	X	Benzo[c]phenanthreen	
Indeno[1,2,3-cd]pyreen		Piceen	X
<b>Gesubstitueerde flavonoiden</b>			
Daidzeine	X	<b>Imidazoles</b>	
Glyciteine	X	1-benzylimidazole	X
Genisteine	X	Clotrimazole	X
Daidzine	X	Isosafrole	X
Genistine	X	<b>Methylenedioxybenzenes</b>	
Naringenine	X	4-tert-butyl-1,2-(methylenedioxy)benzeen	
Hesperetine	X	<b>1,3-diaryltriazenes</b>	
Baicaleine	X	2,5-diphenyloxazol	X
Chrysin	X	<b>Pyridines</b>	
Resveratrol	X	4-phenylpyridine	X
Alizarine	X	4-benzylpyridine	X
<b>2-(4'-chlorophenyl)benzothiazole</b>			
<b>2,3-diaminotoulene</b>			
	X	1-benzylimidazole	X
<b>Indoles</b>			
indole 3-carbinol	X	4,4'-bimethylenedipyridine	X
indolo-[3,2]-carbazole		4-ter-butylpyridine	X
<b>Thiazolium, YH439</b>			
<b>Heterocyclische amines (2 verbindingen)</b>			
<b>Oxidized carotinoids</b>			
Astaxanthin	X	<b>Tryptofaan derivaten</b>	
1-β-Apo-8'-carotenal	X	indole-3-acetaldehyde	

### 3.3. Berekenen bijdrage geïdentificeerde verbindingen DR-CALUX activiteit

Op basis van de gehalten van de geïdentificeerde verbindingen werd de bijdrage aan de DR-CALUX activiteit berekend voor de twee slibmonsters.

### 3.4. Opstellen onderzoeksplan TIE fase II

Gebaseerd op de resultaten van het onderhavige onderzoek werd een onderzoeksplan opgesteld voor vervolgonderzoek. De focus in dit onderzoek lag op target analyse van specifieke stoffen.

## 4. Resultaten en discussie

### 4.1 Validatie extractie en zuivering AhR-agonisten

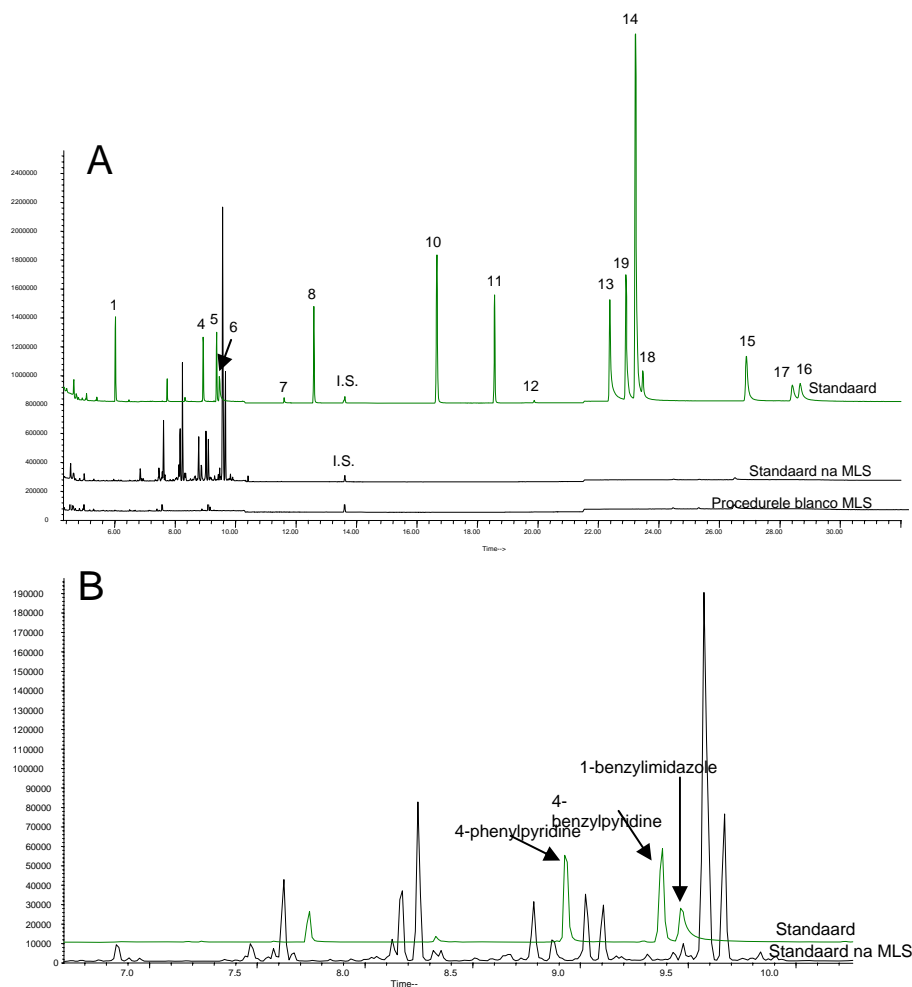
In tabel 3 worden de recoveries van de analytische standaard na Soxhlet-extractie weergegeven. De gemiddelde recoveries varieerden tussen de 0% en 130% met een variatiecoëfficiënt van 2% tot 56%. Voor de (gesubstitueerde) PAK's zijn de recoveries acceptabel (86% tot 130%). Recoveries van de pyridines zijn lager en liggen tussen de 56% en 73%. Voor 1-benzylimidazole, 2,3-diaminotolueen en indole-3-carbinol zijn de recoveries laag; 37%, 0% en 11% respectievelijk. Een acceptabele recovery (88%) werd gevonden voor 2,5-diphenyloxazol.

Tabel 3: Weergegeven zijn de recoveries van analytische standaarden (n=3) na Soxhlet-extractie (hexaan:aceton, 3:1, v/v). Het gemiddelde (Gem.), standaard deviatie (SD) en variatiecoëfficiënt (V.C, in %) zijn weergegeven.

Verbinding	Soxhlet 1	Soxhlet 2	Soxhlet 3	Gem.	SD	V.C.
<b>Pyridines</b>						
4-ter-butylpyridine	61	61	60	61	1.0	2
4-phenylpyridine	67	66	69	68	1.2	2
4-benzylpyridine	72	72	75	73	1.6	2
4,4'-bimethylenedipyridine	93	36	40	56	32	56
<b>Imidazolen</b>						
1-benzylimidazole	44	25	41	37	10	28
<b>2,3-diaminotolueen</b>	0	0	0	0		
<b>1,3-diaryltriazenes</b>						
2,5-diphenyloxazol	90	87	86	88	2.2	2
<b>Indoles</b>						
indole-3-carbinol	10	11		11	0.6	5
<b>PAK's</b>						
benzo[c]acridine	92	90	87	90	2.7	3
dibenzo[a,h]acridine	114	114	107	112	3.7	3
5-methylchrysene	94	92	89	91	2.6	3
benzo[j]fluoranthene	125	121	116	121	4.5	4
dibenzo[a,e]fluoranthene	99	98	86	94	7.1	8
dibenzo[a,h]pyrene	98	92	69	86	15	18
dibenzo[a,i]pyrene	141	131	117	130	12	9
benzo[ghi]perylene	93	91	86	90	3.5	4
dibenzo[a,h]anthracene	100	97	96	97	2.1	2
picene	91	91	86	89	2.7	3



De recoveries van alle onderzochte verbindingen na de MLS kolom zijn 0%, bijlage 1. Opvallend is dat er een aantal pieken zichtbaar zijn in het MLS-chromatogram (retentietijd tussen 8 en 10 minuten) die niet zichtbaar zijn in de procedurele blanco. Dit duidt op de omzetting van de onderzochte verbindingen naar afbraakproducten door gebruik van de MLS-kolom. Er is vervolgens een GC-MS full scan van het MLS extract uitgevoerd om de identiteit van de verbindingen te achterhalen (zie bijlage 2 voor de resultaten). De identiteiten van de hoogste pieken in het chromatogram konden niet worden achterhaald.



*Figuur 1: A: GC-MS SIM-chromatogram van een standaard van de onderzocht stoffen, een chromatogram van de standaarden na MLS zuivering en een procedurele blanco van de MLS zuivering. Opvallend zijn de extra pieken na MLS behandeling in het retentietijdgebied tussen de 8 en 10 minuten. B: Uitvergroting van het GC-MS tussen de 6 en 11 minuten. 1: 4-terbutylpyridine; 2: 3-methyl-o-phenylendiamin; 3: indole-3-carbinol; 4: 4-phenylpyridine; 5: 4-benzylpyridine; 6: 1-benzylimidazole; 7: 4,4'-bimethylenedipyridine; 8: 2,5-diphenyloxazol; 10: benzo[c]acridine; 11: 5-methylchrysene; 12: benzo[j]fluoranthene; 13: dibenzo[a,h]acridine; 14: picene; 15: dibenzo[a,e]fluoranthene; 16: dibenzo[a,h]pyrene; 17: dibenzo[a,i]pyrene; 18: benzo[ghi]perylene; 19: dibenzo[a,h]anthracene.*

Geconcludeerd wordt dat bij gebruik van het SPECIE-07-E protocol waarbij Soxhlet-extractie wordt gecombineerd met MLS zuivering er geen pyridines, imidazolen, diaminotolueen, diaryltriazonen, indolen en PAK's in de extracten aanwezig zijn en dus niet kunnen bijdragen aan de DR-CALUX respons in extracten van baggerslib. De stoffen die wel aanwezig kunnen zijn in slibextracten zijn dioxinen, furanen en PCB's.

#### 4.2 Vaststellen AhR-agonisten in baggerslib en berekening bijdrage geïdentificeerde verbindingen DR-CALUX activiteit

In tabel 4 worden de gehalten aan dioxinen, furanen en PCB's in de twee monsters baggerspecie (2244932 en 2244933) weergegeven. De TEQ-gehalten werden berekend met de DR-CALUX TEF-waarden gerapporteerd in Behnish et al. (2003). Voor een overzicht van DR-CALUX TEF's zie bijlage 3. Het TEQ-gehalte (dioxinen, furanen en PCB's) in monster 2244932 was 54 pg TEQ/g drooggewicht en in monster 2244933 was dit 31 pg TEQ/g droge stof. In beide monsters leveren de dioxinen en furanen de grootste bijdrage aan het TEQ-gehalte. De TEQ-gehalten werden ook met de DR-CALUX bepaald en waren 77 en 126 pg TEQ/g ds. in monster 2244932 en 2244933, respectievelijk. Opgemerkt moet worden dat de DR-CALUX activiteiten in extracten zijn bepaald die geëxtraheerd werden met de ASE en gezuiverd met zure silica. Aan de hand van de chemische metingen (dioxinen, furanen en PCB's) kan 70% van de DR-CALUX activiteit van monster 2244932 (baggervak 23) en 25% van de activiteit van monster 2244933 (baggervak 72) verklaard worden. Het is momenteel onduidelijk welke stoffen verantwoordelijk zijn voor de resterende DR-CALUX activiteit in monster 2244933. Mogelijke opties voor verbindingen die de ZS extractie- en zuiveringstappen doorstaan zijn enkele PAK's en polychlooraftalenen (PCN's). PCN's zijn eerder aangetoond in baggerspecie uit de Rotterdamse haven (Stronkhorst et al., 2002).

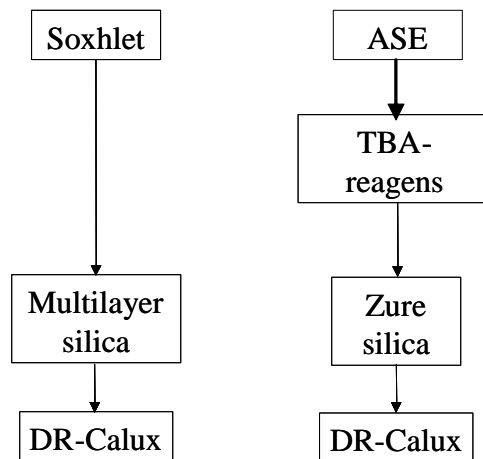
Tabel 4: Dioxinen, furanen en PCB-gehalten in twee monsters baggerslib (2243932 en 2243933). Tevens zijn de TEF-waarden ( $EC_{50TCDD}$ ) van de DR-CALUX aangegeven (Behnish et al., 2003) en de TEQ-gehalten.

RIKZ code Eenheid	2244932 ng/kg ds	2244933 ng/kg ds	DR-CALUX TEF	2244932 pg TEQ/g ds.	2244933 pg TEQ/g ds.
<b>Dioxines</b>					
2,3,7,8-TCDF	12	8.5	0.32	3.96	2.70
1,2,3,7,8-PeCDF	12	7.5	0.21	2.57	1.58
2,3,4,7,8-PeCDF	11	7.4	0.5	5.66	3.71
1,2,3,4,7,8-HxCDF	51	29	0.13	6.64	3.78
1,2,3,6,7,8-HxCDF	19	10	0.039	0.73	0.39
2,3,4,6,7,8-HxCDF	15	8.5	0.11	1.62	0.93
1,2,3,7,8,9-HxCDF	6.4	3.5	0.18	1.15	0.64
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	178	98	0.032	5.71	3.15
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	22	12	0.041	0.90	0.48
OCDF	564	407	0.0001	0.06	0.04
2,3,7,8-TCDD	12	4.5	1	12.43	4.50
1,2,3,7,8-PeCDD	1.5	1.2	0.54	0.81	0.64
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.0	1.5	0.3	0.60	0.44
1,2,3,6,7,8-HxCDD	4.8	3.6	0.14	0.68	0.50
1,2,3,7,8,9-HxCDD	3.1	2.6	0.066	0.20	0.17
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	79	63	0.046	3.64	2.92
OCDD	929	603	0.0005	0.46	0.30
<b>Dioxinen TEQ</b>	<b>34</b>	<b>18</b>		<b>51</b>	<b>29</b>
<b>non-ortho-PCB's</b>					
PCB 81	13	7.6	0.0042	0.053	0.032
PCB 77	858	470	0.0013	1.12	0.61
PCB 126	27	20	0.067	1.83	1.36
PCB 169	5.5	3.5	0.0034	0.019	0.012
<b>Non-ortho CB TEQ</b>	<b>2.88</b>	<b>2.12</b>		<b>3.0</b>	<b>2.0</b>
<b>mono-ortho-PCB's</b>					
PCB 123	Interferentie	Interferentie			
PCB 118	8316	4653			
PCB 114	71	43	0.000048	0.0034	2.07E-03
PCB 105	1387	951	0.000012	0.0166	1.14E-02
PCB 167	542	341	0.0000082	0.0044	2.80E-03
PCB 156	1065	642	0.00021	0.2238	1.35E-01
PCB 157	175	110	0.00008	0.0140	8.81E-03
PCB 189	209	120	0.0000067	0.0014	8.03E-04
<b>Mono-ortho CB TEQ</b>	<b>1.65</b>	<b>0.97</b>		<b>0.26</b>	<b>0.16</b>

### 4.3 Vervolgonderzoek TIE fase II

In het onderhavige onderzoek werd de MLS zuiveringsmethode geëvalueerd als onderdeel van het SPECIE-7-E protocol. In het SPECIE-protocol worden twee methoden beschreven voor de opwerking van sedimenten. Het betreft i) een extractie met Soxhlet gevolgd door een zuivering met MLS of ii) een extractie met Accelerated Solvent Extraction (ASE), een ontzwalling met TBA-reagens en een zuivering met ZS (figuur 2). In een studie uit 2002 werden beide extractie- en zuiveringsmethoden voor sediment voor de DR-Calux met elkaar vergeleken om eventuele verschillen in de DR-Calux respons te achterhalen (Leonards et al., 2002). Geconcludeerd werd

dat er kleine verschillen (-20% tot +15%) tussen beide methoden in DR-CALUX activiteit werden gevonden. De vergelijking was echter gebaseerd op één type sediment. In een recente studie waarbij sediment van het Zeehavenkanaal met de DR-CALUX werd onderzocht werden wel verschillen tussen de ZS- en de MLS-methode aangetoond. De DR-CALUX van het sediment gezuiverd met ZS was 6 tot 13 maal hoger dan na zuivering met MLS. Dit duidt op locatie specifieke verschillen. Mogelijk dat PAK's een rol kunnen spelen in de verklaring van het verschil tussen ZS en MLS. In Lamoree et al. (2004) werden de recoveries van een breed scala aan verbindingen (PAK's, S-PAK's, N-PAK's, PCB's en OCP's) voor de ZS methode bepaald. Geconcludeerd werd dat een aantal laag moleculaire PAK's (2-3 ringen), zoals fluoreen, fenantheen, fluorantheen, maar ook benzo[b]fluorantheen en 4-methyldibenzothiofeen, na ZS zuivering in de extracten werd aangetroffen. Een aantal organochloor pesticiden en PCB's werden tevens in de ZS fractie teruggevonden. Er lijkt dus een verschil in verwijdering van verbindingen tussen de MLS en ZS methode te zijn.



*Figuur 2: Twee extractie- en zuiveringsmethoden voor sediment volgens het SPECIE-07-E protocol.*

#### *Korte termijn*

Om op korte termijn met het TIE-fase II onderzoek verder te komen is nader onderzoek op de volgende gebieden noodzakelijk:

- Onderbouwing van de verschillen tussen de ZS- en MLS-zuiveringsmethode. Welke niet-klassieke Ah-agonisten worden met ZS verwijderd?
- Vergelijking van de DR-CALUX activiteit van diverse slibmonsters na opwerking met ZS en MLS om inzicht te krijgen in de mogelijke verschillen tussen de zuiveringsmethoden. Zijn er gegevens beschikbaar of is nieuw onderzoek noodzakelijk?

Als de ZS en MLS methoden verder onderbouwd zijn kan het TIE-fase II onderzoek zich richten op het achterhalen van de dioxine-toxiciteit in de slibmonsters. Hierbij kan gedacht worden aan het inzetten van effect-directed-analysis (EDA) waarbij het fractioneren van PAK's en mogelijk PCN's belangrijk kan zijn.

#### *Lange termijn*

Om verder te kunnen komen met het TIE-fase II onderzoek op de lange termijn is het noodzakelijk om een duidelijk beeld te krijgen van de meerwaarde van de DR-CALUX binnen de CTT. De volgende drie verschillende doelen kunnen worden onderscheiden:

- De DR-CALUX wordt ingezet voor de bepaling van de totale dioxine-achtige toxiciteit.
- De DR-CALUX wordt ingezet om persistente stoffen met een dioxine-achtige toxiciteit op te sporen.
- De DR-CALUX wordt ingezet om voornamelijk verbindingen met een "vlakke" molecuul configuratie, zoals dioxinen, furanen en dioxine-achtige PCB's, op te sporen.

In een werkgroep, bestaande uit o.a. eindgebruikers van de CTT en onderzoekers, zou moeten worden uitgewerkt welk doel wordt nagestreefd. De meerwaarde van de DR-CALUX zou naar ons idee vooral moeten liggen bij het integrale karakter van de assay en zich dus moeten richten op totale dioxine-achtige vervuiling van slib. Dit beeld kan niet alleen met chemische metingen worden verkregen.

Doel 3 wordt momenteel afgedekt door het SPECIE-07-E protocol indien gebruik wordt gemaakt van Soxhlet of ASE met MLS zuivering, de voornaamste verbindingen in dit extract lijken dioxinen, furanen en PCB's. Voor het eerste doel moet een niet-destructieve zuiveringsmethode (bijv. gelpermeatie chromatografie) na extractie van het slib worden ingezet. Deze methode is momenteel in ontwikkeling onder andere binnen het Zeehavenkanaal onderzoek (Klamer et al., 2004; Klamer et al., 2005) en het Europese project MODELKEY. De methode zou eventueel gecombineerd kunnen worden met een afbraakstap met bijv. S9 microsomen om een persistentiestap in te bouwen (doel 2). Het huidige SPECIE-07-E protocol waarbij ASE extractie met ZS zuivering wordt gebruikt zit tussen doel 2 en 3 en verwijdert verbindingen die niet zwavelzuur persistent zijn. Afhankelijk van het gekozen doel kan de methode verder worden geoptimaliseerd.

## 5. Conclusies

- Voor een aantal groepen van de onderzochte verbindingen (PAK's en diaryltriazenen) werden acceptabele extractierendementen met Soxhlet gevonden. Lagere rendementen werden voor pyridines gevonden. Voor 1-benzylimidazole, 2,3-diaminotolueen en indole-3-carbinol waren de rendementen laag.
- Alle onderzochte niet-klassieke agonisten (PAK's, inclusief N-PAK's, imidazoles, pyridines, indoles, diaryltriazenes, diaminotoulene, en een reeks van natuurlijke stoffen) werden met de MLS zuivering verwijderd. Dit betekent dat deze verbindingen geen bijdrage kunnen leveren aan de DR-CALUX activiteit in slibmonsters die volgens het SPECIE-07-E protocol met Soxhlet en MLS zijn opgewerkt.
- Onduidelijk is of deze groepen van verbindingen ook worden verwijderd tijdens een alternatieve zuiveringstap met ZS. De ZS zuivering wordt als alternatief in het SPECIE-07-E genoemd en sinds 2002 gebruikt.
- Nader onderzoek is noodzakelijk om mogelijke verschillen tussen de ZS- en MLS-methode te onderbouwen.
- Er moet eenduidigheid komen in het SPECIE-07-E protocol op het gebied van de zuiveringsmethoden (MLS of ZS).
- Voor de lange termijn moet worden besloten wat het voornaamste doel is van de inzet van de DR-CALUX in de CTT en moet daaraan een gepaste extractie- en zuiveringsmethode van slib worden gekoppeld.

## 6. Referenties

- Behnisch, P.A., K. Hosoe, S. Sakai, 2003. Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environ. Int.* 29, 861-877.
- Denison, M.S., S. Heath-Pagliuso. 1998. The Ah receptor: A regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 557-568.
- Felzel, E.C. en H.T. Besselink. 2004. Vriesdrogen, extractie en opschoning van sedimentmonsters ter bepaling van 2,3,7,8-TCDD Toxische Equivalenten (TCDD-TEQs) met behulp van de DR CALUX bioassay van BDS. RIKZ standaardvoorschrift, SPECIE-7-E, Den Haag.

- 
- Klamer, H.J.C., J. Jorritsma, L. van Vliet, F. Smedes, J.F. Bakker. 2004. Dioxine-achtige toxiciteit in baggerslib van het zeehavenkanaal, Delfzijl : Toxiciteit Identificatie en Evaluatie (TIE) met DR-CALUX, RIKZ, rapport no. RIKZ/2004.013.
- Klamer, H.J.C., P.E.G. Leonards, M.H. Lamoree, L.A. Villerius, J. Åkerman, and J.F. Bakker. 2005. A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments. *Chemosphere* 58 (11), 1579-87.
- Lamoree M., K. Swart, H. Senhorst en B. van Hattum. 2004. Validation of the acidic sample clean-up procedure for the DR-CALUX assay. IVM rapport L-04/03, Amsterdam.
- Leonards, P.E.G. en I. van der Veen. 2001. Chemische validatie van analysemethoden in sediment voor de toepassing van de DR-CALUX. RIVO rapport nr. C076.01, IJmuiden.
- Leonards, P.E.G., I. van der Veen, M. Lohman, E. Felzel en S. Man. 2002. Vergelijking van extractie- en zuiveringsmethoden voor sediment voor analyse met de DR-Calux assay. RIVO Rapport nr. C048/02, IJmuiden.
- Leonards, P.E.G., A. Stein, S. Brandsma en C. Kwadijk. 2005. Analyse van natuurlijke stoffen in sediment en baggerslib. RIVO rapport nummer C077/05, IJmuiden.
- Stronkhorst J., Leonards P., Murk A.J. 2002. Using the dioxin receptor-calux in vitro bioassay to screen marine harbor sediments for compounds with a dioxin-like mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (12), 2552-2561.





## 7. Bijlagen

Bijlage 1: Weergegeven zijn de recoveries (%) van analytische standaarden (n=3) na MLS zuivering.

Recovery (%)	MLS 1	MLS 2	MLS 3	Gemiddeld
4-ter-butylpyridine	0	0	0	0
4-phenylpyridine	0	0	0	0
4-benzylpyridine	0	0	0	0
1-benzylimidazole	0	0	0	0
4,4'-bimethylenedipyridine	0	0	0	0
2,3-diaminotoluene	0	0	0	0
2,5-diphenyloxazol	0	0	0	0
indole-3-carbinol	0	0	0	0
benzo[c]acridine	0	0	0	0
dibenzo[a,h]acridine	0	0	0	0
5-methylchrysene	0	0	0	0
benzo[j]fluoranthene	0	0	0	0
dibenzo[a,e]fluoranthene	0	0	0	0
dibenzo[a,h]pyrene	0	0	0	0
dibenzo[a,i]pyrene	0	0	0	0
benzo[ghi]perylene	0	0	0	0
dibenzo[a,h]anthracene	0	0	0	0
picene	0	0	0	0

Bijlage 2: GC-MS screening van de analytische standaarden van tabel 2 na zuivering met MLS. Weergegeven zijn de retentietijd (R.T. in min.), naam van de geïdentificeerde stof, CAS nummer, totale signaal van de piek (Tot. Signal), en twee identificatie parameters van de pieken (weighted en reverse fit waarden).

R.T.	Name	CAS	Tot.Signal	Weighted	Reverse
4.314	2-Undecene, 4,5-dimethyl-, [R*,R*-(E)]-	55170928	112251	67	70
4.323	Cyclopentane, butyl-	2040951	106351	73	74
4.359	2-Pyridinecarboxylic acid, 6-methyl-	934601	14006	39	69
4.384	Heptane, 3-ethyl-2-methyl-	14676290	203133	75	81
4.424	5,7-Dimethyloctahydrocoumarin	EPA-109815	25792	69	73
4.463	6-Dodecenol	52957149	28630	53	78
4.524	Bicyclo[3.3.1]nonane	280659	57101	68	84
4.538	Decane, 5-methyl-	13151354	48077	62	74
4.558	N-Benzyl-2-phenethylamine	3647710	66747	67	80
4.621	1H-Indene, octahydro-, trans-	3296502	35774	66	78
4.657	Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	622968	67976	67	85
4.665	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	526738	62665	74	74
4.722	Ethaneperoxoic acid, 1-cyano-4-methyl-1-phenylpentyl ester	58422745	17225	64	71
4.853	Nonane	111842	51059	70	90
4.857	Nonane	111842	44190	70	91
4.926	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	556672	15152	83	83
4.967	Heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl-	13475826	803098	95	95
5.018	Decane	124185	429028	98	98
5.326	Bicyclo[3.2.2]nona-6,8-dien-3-one, 6,8-dimethyl-	52351061	10278	64	68
5.367	Pentane, 2,2,4,4-tetramethyl-	1070877	21669	82	82
5.449	1-Butanol, 2-methyl-, propanoate	2438202	11768	80	80
5.473	Benzamide, 3-methyl-, O-[(phenylamino)carbonyl]oxime	EPA-112265	6278	71	71
5.621	Tetradecane, 1-iodo-	19218941	12558	69	69
5.986	Benzene, (1,1-dimethylethyl)methyl-	27138212	45535	94	95
6.013	5-Acetyl-2-methylpyridine	42972463	11561	82	82
6.034	Pentane, 2,3,3-trimethyl-	560214	6927	75	75
6.152	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylpropyl)-	1595160	17027	61	65
6.226	4'-Methylpropiophenone	5337939	15443	79	82
6.424	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	541026	15072	87	87
6.651	Phenacyl thiocyanate	5399304	6444	70	70
6.783	Benzene, (1-ethyl-1-methylpropyl)-	1985973	20275	55	55
6.787	1-Dodecene	112414	22373	59	82
6.82	Ethaneperoxoic acid, 1-cyano-4,4-dimethyl-1-phenylpentyl ester	58422756	12886	72	72
6.867	Benzene, 1-(1-ethylpropyl)-4-methyl-	22975582	366310	85	85
6.92	Bicyclo[3.2.2]nona-6,8-dien-3-one, 6,8-dimethyl-	52351061	40460	83	87
6.971	Benzene, 1-ethyl-4-(2-methylpropyl)-	100319402	30074	77	80
7.363	Benzamide, N,N-diethyl-	1696179	29214	68	76
7.387	Benzene, (1,1-dimethylethyl)methyl-	27138212	15611	69	79
7.462	Benzene, (1-ethyl-1-methylbutyl)-	4468400	90776	67	70
7.491	Ethanal, 2-methyl-2-[4-(1-methylethyl)phenyl]-	EPA-131875	410965	82	82
7.512	Disiloxane, hexamethyl-	107460	6593	42	76
7.566	1-Methyl-4-(1R-methyl-3R,4-dihydroxybutyl)-benzene	EPA-145773	49094	74	87
7.59	Phenol, m-tert-butyl-	585342	33630	86	89
7.613	3-Cyclohexen-1-amine, 6-(4-methylphenyl)-2,5-diphenyl-, (1à,2à,5à,6à)-	42715140	58741	90	90
7.633	Benzene, [1-(2-propenyloxy)-3-butenyl]-	98088483	225505	78	82
7.684	2-Pentanone, 4-methyl-4-phenyl-	7403421	127255	76	78

R.T.	Name	CAS	Tot.Signal	Weighted	Reverse
7.735	1H-Indene-1-methanol, à-methyl-, acetate	63839850	6145	78	78
7.772	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	540976	11430	88	88
7.858	Benzene, 1,1'-(1,1,2,2-tetramethyl-1,2-ethanediyl)bis[4-methyl-	734178	54542	74	78
7.953	1,5-Diphenylhex-3-ene	103240604	10162	67	75
8.017	Heptane, 2,6-diphenyl-3-methyl-	EPA-161225	27776	59	61
8.035	Cesium acetate	3396110	22793	84	99
8.048	1,3-Dithiane, 2,2'-[(3,4-diphenyl-1,2-cyclobutanediyl)bis(methylene)]bis-	74744595	15242	53	53
8.071	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl), (1S-cis)-	483772	29454	63	74
8.075	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl), (1S-cis)-	483772	21423	68	78
8.125	Benzene, (1-methylheptyl)-	777220	89997	69	70
8.149	1-Propanone, 2-chloro-1-(2,4-dimethylphenyl)-2-methyl-	54965536	699040	80	83
8.182	1,3,5-Cycloheptatriene, 3,4-diethyl-7,7-dimethyl-	EPA-156997	365773	79	80
8.266	2,5,8-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	68269158	1411442	84	84
8.34	2-Hexanone, 5-methyl-5-phenyl-	14128611	164092	79	81
8.371	2-Hexanone, 5-methyl-5-phenyl-	14128611	125823	82	85
8.488	1H-Isoindole, 2,3-dihydro-	496128	15472	61	77
8.502	3-Cyclohexen-1-amine, 6-(4-methylphenyl)-2,5-diphenyl, (1à,2à,5à,6à)-	42715140	11642	78	91
8.53	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1-methyl-8-(1-methylethyl)-	81603432	17295	68	68
8.608	Furan, 2-methoxy-5-methyl-4-phenyl-	EPA-137688	14828	55	73
8.629	6(1H)-Azulenone, 2,3-dihydro-1,4-dimethyl-	77809019	6499	52	73
8.676	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-2,2,5,7-tetramethyl-	EPA-146114	20084	66	72
8.691	à-Cubebene	17699148	85347	70	70
8.743	Cycloisolongifolene, 9,10-dehydro-	EPA-156816	20388	60	61
8.798	syn-Tricyclo[5.1.0.0(2,4)]oct-5-ene, 3,3,5,6,8,8-hexamethyl-	EPA-161995	268210	74	76
8.832	Benzene, (1-methyl-1-propylpentyl)-	54932911	33762	60	60
8.891	Benzene, 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl), (R)-	16982006	194623	77	80
8.931	Pyrazine, isopropenyl-	34413326	19073	63	79
8.998	Benzene, 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl), (R)-	16982006	14341	49	49
9.021	1-Methyl-3-phenyl-2,4,5-trioximidazolidine	16935469	56151	64	77
9.045	Cycloisolongifolene, 9,10-dehydro-	EPA-156816	564286	81	81
9.12	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	128392	793709	73	75
9.182	Butylated Hydroxytoluene	128370	122538	87	87
9.211	Benzene, 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl), (R)-	16982006	50059	78	78
9.244	1,2-Bis(diethylamino)-1,2-bis(4-cyanophenyl)ethane	EPA-193300	8077	60	60
9.311	1H-Indene, 5-hexyl-2,3-dihydro-	54889553	8624	47	49
9.333	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl), (1S-cis)-	483772	124870	77	78
9.386	Cesium acetate	3396110	5886	84	99
9.417	N-TFA-L-prolyl-à-aminobutyric acid butyl ester	63085096	8376	44	87
9.452	Naphthalene, 6-(1-ethylpropyl)-1,2,3,4-tetrahydro-	54889564	117014	68	68
9.496	Neoisolongifolene, 8,9-dehydro-	EPA-151635	70429	79	79
9.53	Benzene, 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl), (R)-	16982006	42113	61	62
9.593	Neoisolongifolene, 8,9-dehydro-	EPA-151635	4471561	76	76
9.686	Benzene, 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl), (R)-	16982006	1223969	88	89
9.77	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,6,7,7a,7b-hexahydro-1,1,7,7a-tetramethyl-, [1aR-(1aà,7à,7aà,7bà)]-	34143969	16208	56	76
9.816	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,6,7,7a,7b-	34143969	13827	58	77

9.857	hexahydro-1,1,7,7a-tetramethyl-, [1aR-(1aà,7à,7aà,7bà)]-Cycloisolongifolene, 8,9-dehydro-	EPA-151280	53869	66	66
9.894	1H-Indene, 5-hexyl-2,3-dihydro-	54889553	17215	56	58
9.926	1H-Indene, 5-hexyl-2,3-dihydro-	54889553	62431	71	71
R.T.	Name	CAS	Tot.Signal	Weighted	Reverse
9.952	Silane, ethylmethyl-1-naphthalenyl-	74685828	5007	51	54
10.067	2,4-Pyrimidinediamine, 6-methyl-N4-phenyl-	7781295	734	80	80
10.292	3,5-Dimethyl-4-octanone	7335173	12370	73	73
10.354	Anthracene, 1,2,3,4-tetrahydro-9,10-dimethyl-	94573509	29425	68	74
10.434	Anthracene, 1,2,3,4-tetrahydro-9,10-dimethyl-	94573509	101343	74	74
10.476	Bis(1,2,2-trimethylpropyl) methylphosphonate	7040586	12386	53	56
10.854	1-Octadecene	112889	17682	87	89
11.004	1-Heptyn-3-ol	7383199	7463	61	66
11.257	N-Amino-7,8-dimethoxy-3-methyl-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine	EPA-147898	6712	60	78
11.36	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	17851535	52017	84	84
11.711	Propanoyl chloride, 2,2-dichloro-	26073267	12098	61	68
11.836	Pentanoic acid	109524	5083	64	64
11.945	Didodecyl phthalate	2432908	10629	45	48
12.08	Acetaldehyde, 2-butenylhydrazone	75268074	7285	67	67
13.305	Butanoic acid	107926	3542	72	72
13.546	Aziridine, 2-methyl-	75558	7129	58	97
13.552	Formic acid, 2-methylpropyl ester	542552	7751	61	76
13.643	1,1'-Biphenyl, 2,3',4,4',5-pentachloro-	31508006	25241	91	92
15.945	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	103231	26262	84	84
17.183	3,4-Hexanedione, 2,2,5-trimethyl-	20633038	7991	76	76
17.199	3,4-Hexanedione, 2,2,5-trimethyl-	20633038	9148	76	76
17.911	1,3,2'-Tris(trimethylsilyloxy)-N-(2-hydroxyoctadec-3-enoyl)nonadecaphingadienine	EPA-105654	4341	43	51
18.159	Octane, 2,7-dimethyl-	1072168	9208	74	74
18.168	Octane, 2,7-dimethyl-	1072168	9668	74	74
18.361	3-Butene-1,2-diol, 1-(2-furanyl)-	19261133	17507	72	81
18.366	3-Butene-1,2-diol, 1-(2-furanyl)-	19261133	18635	71	80
18.685	2,4,4-Trimethyl-1-pentyl methylphosphonofluoridate	EPA-216707	6283	60	60
18.971	3-Hexanone, 2,5-dimethyl-	1888579	9835	75	75
19.118	3-Butene-1,2-diol, 1-(2-furanyl)-	19261133	36689	72	79
19.4	3-Methyl-4,5-diamino-1,2,4(4H)-triazole	EPA-145604	11218	51	57
19.408	3-Butenoic acid, 2,2-diethyl-	38477053	13272	51	58
19.908	Squalene	7683649	36286	69	69
20.082	Benzoic acid, 4-bromo-, 2-[dodecahydro-6-(2-penten-4-ynyl)pyrrolo[1,2-a]quinolin-1-yl]ethyl ester, [1R-[1à,3aà,5aà,6à(Z),9aà]]-	63983573	4403	41	47
20.092	Benzoic acid, 4-bromo-, 2-[dodecahydro-6-(2-penten-4-ynyl)pyrrolo[1,2-a]quinolin-1-yl]ethyl ester, [1R-[1à,3aà,5aà,6à(Z),9aà]]-	63983573	4907	39	48
20.096	1H-Benz[ <i>g</i> ]indole-2,3-dicarboxylic acid, 6,7,8,9-tetrachloro-3a,9b-dihydro-1-methyl-, dimethyl ester	68464482	5064	33	39
20.789	3-Butene-1,2-diol, 1-(2-furanyl)-	19261133	20299	66	79
21.468	3-Butene-1,2-diol, 1-(2-furanyl)-	19261133	26845	68	77
23.772	2,3-Dimethoxycarbonyl-4-(3-oxobutyl)-6,7-dimethoxy-1,4-oxy-1,4-dihydronaphthalene	EPA-148214	4169	32	36
26.55	Benzenepropanoic acid, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, octadecyl ester	2082793	32731	79	79
26.57	4,8-Dibromo-2,6-diphenyl-bicyclo(3,3,1)nona-2,6-diene	EPA-148459	4455	28	34
26.594	3-(2,2,6-Trimethyl-3-piperiden-4-yl)-2(2-methyl-2-aminopropyl)-1-methylindole	50527509	7718	35	43

Bijlage 3: Overzicht van TEF-waarden (EC<sub>50TCDD</sub>) voor de DR-CALUX assay. Stoffen zijn op CAS nr. geordend.

CAS	Naam	DR-CALUX TEF	Opm.	CAS	Naam	DR-CALUX TEF	Opm.
50-32-8	benzo[a]pyrene	2,50E-04		5887-88-6	1,2,3,4,5,6-hexachloronaphthalene	2,00E-03	
53-70-3	dibenzo[ah]anthracene	1,10E-03		19408-74-3	1,2,3,7,8,9-hexachlorodibenzodioxin	0,066	
56-55-3	benzo[a]anthracene	1,10E-04		21967-41-9	Baicalin	4,10E-06	EC25
57-97-6	7,12-dimethylbenz[a]anthracene,	5,41E-07		31508-00-6	2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl	1,00E-09	
72-48-0	Alizarin	4,20E-06	EC25	32598-13-3	3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl	0,0013	
82-05-3	7H-benz[de]anthracen-7-one	5,80E-07		32598-14-4	2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl	1,20E-05	
85-01-8	phenanthrene	1,40E-06		32774-16-6	3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl	0,0034	
118-74-1	hexachlorobenzene	1,00E-04		35822-46-9	1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzodioxin	0,05	
129-00-0	pyrene	1,78E-06		38380-08-4	2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl	0,0001	
189-55-9	dibenzo[a,i]pyrene	1,65E-04		39001-02-0	1,2,3,4,6,7,8,9-octachlorodibenzofuran	0,0001	
189-64-0	dibenzo[a,h]pyrene	7,14E-05		39227-28-6	1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzodioxin	0,3	
191-24-2	benzo[g,h,i]perylene	2,74E-04		40321-76-4	1,2,3,7,8-pentachlorodibenzodioxin	0,54	
191-30-0	dibenzo[a,l]pyrene	4,90E-06		40957-83-3	Glycitein	3,10E-06	EC25
192-65-4	dibenzo[a,e]pyrene	1,80E-05		51207-31-9	2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran	0,32	
192-97-2	benzo[e]pyrene	5,15E-07		55673-89-7	1,2,3,4,7,8,9-heptachlorodibenzofuran	0,041	
193-39-5	indeno[1,2,3-cd]pyrene	7,60E-04		57117-31-4	2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran	0,5	
194-63-8	dinaphtho[2,1-b;1',2'-d]furan	4,52E-07	EC25	57117-41-6	1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran	0,21	
195-19-7	benzo[c]phenanthrene	4,49E-07		57117-44-9	1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzofuran	0,039	
204-91-1	dinaphtho[2,1-b;2',3'-d]furan	1,10E-03	EC25	57465-28-8	3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl	0,067	
205-82-3	benzo[j]fluoranthene	3,68E-04		57653-85-7	1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzodioxin	0,14	
205-99-2	benzo[b]fluoranthene	9,20E-04		58863-14-2	1,2,3,4,5,6,7-heptachloronaphthalene	3,00E-03	
206-44-0	fluoranthene	2,27E-08		60044-26-0	3,3',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl	0,0023	HK2449
207-08-9	benzo[k]fluoranthene	5,40E-04		60348-60-9	2,2',4,4',5-pentabromodiphenylether	4,00E-06	
207-93-2	dinaphtho[1,2-b;1',2'-d]furan	7,87E-04	EC25	60851-34-5	2,3,4,6,7,8-hexachlorodibenzofuran	0,18	
213-46-7	picene	4,11E-05		67562-39-4	1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzofuran	0,032	
215-58-7	dibenzo[ac]anthracene	1,92E-04		67922-24-1	1,2,6,8-tetrachloronaphthalene	1,70E-05	
218-01-9	chrysene	1,01E-04		67922-27-4	1,2,3,4,5,7-hexachloronaphthalene	2,00E-05	
224-41-9	dibenzo[a,j]anthracene	3,70E-04		70362-50-4	3,4,4',5-tetrachlorobiphenyl	0,0001	
224-42-0	dibenzo[a,i]acridine	2,60E-05		70648-26-9	1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran	0,13	
225-11-6	benzo[a]acridine	7,20E-07		71859-30-8	2,2',4,4',5,5'-pentabromodiphenylether	5,00E-07	
225-51-4	benzo[c]acridine	8,00E-07		72918-21-9	1,2,3,7,8,9-hexachlorodibenzofuran	0,11	
226-36-8	dibenzo[a,h]acridine	1,30E-03		77102-82-0	3,3',4,4'-tetrabromobiphenyl	0,024	HK2449
239-69-0	dinaphtho[1,2-b;2',1'-d]furan	8,16E-04	EC25	84030-79-5	dibenzo[a,k]fluoranthene	1,23E-03	
239-90-7	dinaphtho[1,2-b;2',3'-d]furan	1,15E-02	EC25	90948-28-0	1,2,4,5,6,8-hexachloronaphthalene	7,00E-06	
242-51-3	dinaphtho[2,3-b;2',3'-d]furan	2,78E-04	EC25	103426-94-4	1,2,3,5,7,8-hexachloronaphthalene	2,00E-03	
466-72-0	Genistein	5,40E-06	EC25	103426-95-5	1,2,3,5,6,8-hexachloronaphthalene	2,00E-03	
480-40-0	Chrysin	9,30E-07	EC25	103426-96-6	1,2,3,4,6,7-hexachloronaphthalene	4,00E-03	
480-41-1	Naringenin	2,50E-07	EC25	103426-97-7	1,2,3,5,6,7-hexachloronaphthalene	1,00E-03	
486-66-8	Daidzein	4,30E-06	EC25	149867-79-9	1,2,6,7-tetrachloronaphthalene	1,70E-04	
486-66-8	Daidzein	1,10E-06	EC25	150205-21-3	1,2,3,7,8-pentachloronaphthalene	4,60E-05	
491-67-8	Baicalein	4,60E-06	EC25	150224-20-7	1,2,4,5,6-pentachloronaphthalene	1,60E-06	
501-36-0	Resveratrol	1,80E-06	EC25		3,3',4,4',5-pentabromodiphenylether	9,30E-05	
520-33-2	Hesperitin	3,40E-07	EC25		2,3,3',4,4',5,6-hexabromodiphenylether	< 4,6E-5	
529-59-9	Genistin	3,10E-06	EC25		2,3',4,4',6-pentabromodiphenylether	1,10E-05	
1606-67-3	1-aminopyrene	2,05E-04			2,2',4,5',6-pentabromobiphenyl	0,0028	
1746-01-6	2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin	1			3,3',4,4',5-pentabromobiphenyl	0,16	
1825-31-6	1,4-dichloronaphthalene	3,50E-08			3,3',4,4'-tetrabromodiphenylether	0,0022	
2381-21-7	1-methylpyrene	2,07E-06			2,4-dichloronaphthalene	2,00E-08	
2498-66-0	benz[a]anthracene-7,12-dione	6,70E-07			1,2,3,6,7,8-hexachloronaphthalene	2,10E-03	
3268-87-9	1,2,3,4,6,7,8,9-octachlorodibenzodioxin	0,0001			Glycitin	6,50E-07	EC25
3697-24-3	5-methylchrysene	9,48E-05			6'-Acetyldaidzin	4,10E-07	EC25
5385-75-1	dibenzo[a,e]fluoranthene	9,30E-06			6'-Malonyldaidzin	2,70E-07	EC25
5436-43-1	2,2',4,4'-tetrabromodiphenylether	1,00E-06			6'-Malonylgenistin	1,30E-07	EC25