

LA CONTAMINAZIONE DA DIOSSINE NEGLI ALIMENTI IN ITALIA NEL BIENNIO 1999-2000

G. Scortichini, G. Diletti, A.F. Forti & G. Migliorati

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise «G. Caporale», Teramo - Italia

RIASSUNTO

In Italia il monitoraggio della contaminazione degli alimenti da policlorodibenzo-p-diossine (PCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF) nell'ambito del Piano Nazionale Residui (PNR) è condotto, dal 1999, dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise «G. Caporale» (IZSA&M), dietro mandato del Ministero della Salute. Nel biennio 1999-2000 sono stati esaminati 238 campioni, comprendenti principalmente le seguenti matrici: carne (specie bovina, suina, avicola), pesce (trota, spigola, anguilla, orata), uova, latte, grasso (specie bovina, suina, avicola), mangimi semplici e composti. Le analisi eseguite, i cui risultati sono stati espressi in termini di Equivalenti di Tossicità Internazionali o I-TEQ (NATO/CCMS, 1988) e di Equivalenti di Tossicità dell'Organizzazione Mondiale della Sanità o OMS-TEQ (Van den Berg et al., 1998), hanno evidenziato livelli di contaminazione comparabili a quelli riscontrati in analoghi studi condotti in altri paesi europei per matrici quali: latte (media 0,81 pg I-TEQ/g grasso), carne (media 0,73 pg I-TEQ/g grasso), grasso (media 0,51 pg I-TEQ/g grasso). Il tenore più alto in diossine e furani è stato riscontrato nei campioni di pesce (media 5,28 pg I-TEQ/g grasso) e soprattutto nei mangimi per pesci (media 6,60 pg I-TEQ/g grasso), prodotti che hanno, inoltre, mostrato una netta corrispondenza dei profili di contaminazione. Altre matrici edibili (latte, carne, uova) hanno evidenziato la presenza di 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD e soprattutto di OCDD; questo fatto potrebbe essere messo in relazione con l'introduzione sul territorio nazionale di partite di colina cloruro, additivo normalmente utilizzato in zootecnia, contaminate da tali congeneri.

PAROLE CHIAVE

Alimenti, HRGC/HRMS, Policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), Policlorodibenzofurani (PCDF)

Introduzione

I policlorodibenzofurani (PCDF) e le policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), più comunemente noti come «diossine», costituiscono una classe di molecole dotate di proprietà chimiche e fisiche simili, nonché di un'elevata tossicità.

Questi composti si formano come sottoprodotti indesiderati nella combustione ed in altri processi chimici industriali, e la loro presenza si è rivelata pressochè ubiquitaria nell'ambiente (8, 27, 37); inoltre il loro carattere fortemente lipofilo li rende estremamente persistenti ed in grado di concentrarsi in diversi livelli della catena alimentare (fenomeni di bioaccumulo); non a caso le più alte concentrazioni di PCDD/PCDF sono

state rinvenute in alimenti come carne, pesce, latte (26).

Per quanto concerne la tossicità, un approfondito studio condotto dalla United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) ha indicato diossine e furani 2,3,7,8-sostituiti come agenti capaci di provocare il cancro (34) e ha successivamente indotto l'International Agency For Research on Cancer (IARC) a classificare la 2,3,7,8-TCDD come «cancerogeno di prima classe» (22). Tali composti agiscono interferendo con il recettore degli idrocarburi aromatici (AhR) coinvolto nella mediazione di molti eventi intracellulari, alterandone la normale funzionalità (4, 24).

L'esposizione umana a PCDD/PCDF

DIOXINS CONTAMINATION OF FOOD IN ITALY: AN OVERVIEW OF THE SITUATION 1999-2000

Summary

The Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise «G. Caporale» (IZSA&M) has been monitoring contamination of food by the polychlorinated dibenzodioxins (PCDD) and polychlorinated dibenzofurans (PCDF) as part of the National Surveillance Plan (NSP) in Italy since 1999, on license from the Italian Ministry of Health.

Between 1999 and 2000, 238 samples (including meat, fish, eggs, milk, fat, feedstuffs) were analysed. The results of the tests were expressed in terms of international toxic equivalents (I-TEQs from NATO/CCMS, 1988) and World

può avvenire con modalità differenti: mediante inalazione di aria, per assorbimento cutaneo o tramite consumo di alimenti contaminati.

L'assunzione con la dieta, in particolare, contribuisce all'esposizione giornaliera alle diossine in misura superiore al 90% (14, 29, 38).

Contrariamente a molti paesi europei, dove già da alcuni anni erano disponibili dati sui profili di contaminazione da PCDD/PCDF negli alimenti (7, 10, 16, 17, 33), in Italia fino al 1999 non è mai stato realizzato un piano di monitoraggio così esteso per individuare i livelli di contaminazione «background» da diossine dei prodotti alimentari.

Nel 1999, in conseguenza della crisi verificatasi in Belgio, l'allora Ministero della Sanità (oggi Ministero della Salute) ha introdotto il controllo di PCDD/PCDF nell'ambito del Piano Nazionale Residui (3), attuando così le misure specifiche previste dall'Unione Europea (6).

L'incarico di effettuare tali prove è stato affidato all'IZSA&M (accreditato secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025), individuato dal Ministero come laboratorio autorizzato all'analisi di diossine e furani. Negli anni 1999-2000 sono stati analizzati in totale 238 campioni tra alimenti per l'uomo (carne, latte, uova, grasso, pesce) e zootecnici (mangimi semplici e composti), provenienti da quasi tutto il territorio nazionale.

La conduzione di un monitoraggio su così vasta scala ha permesso, quindi, come primo obiettivo, di tracciare una mappa dei livelli di contaminazione «background» di molte importanti matrici commestibili; in più, la definizione dei profili di contaminazione negli alimenti può permettere l'individuazione dell'origine della contaminazione stessa (aree prossime ad impianti di incenerimento, agglomerati industria-

li), nonché la scoperta di casi di contaminazioni alimentari dovute a sorgenti esterne (es. colina cloruro nei mangimi).

Nel 2001 il Consiglio dell'Unione Europea ha emesso la Direttiva 2001/102/CE (5) ed il Regolamento (CE) N. 2375/2001 (28) che, stabilendo i tenori massimi consentiti di PCDD e PCDF negli alimenti zootecnici ed in quelli destinati al consumo umano, hanno di fatto reso ancora più marcata l'esigenza di svolgere una stretta attività di controllo per la ricerca di tali residui.

Materiali e Metodi

La ricerca di PCDD/PCDF è stata eseguita applicando il Metodo EPA 1613 Revisione B (35); la tecnica è basata sulla diluizione isotopica e sulla rivelazione in spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS), integrata da un sistema di valutazione dei risultati fondato sui criteri stabiliti dall'Istituto Superiore di Sanità (Laboratorio Nazionale di Riferimento) (13). A tale metodica di riferimento sono state apportate alcune variazioni nelle fasi di estrazione e purificazione, per adattare la procedura stessa all'analisi di campioni di alimenti.

Campioni esaminati

Negli anni 1999 e 2000 sono stati prelevati ed esaminati 238 campioni provenienti da 14 regioni italiane (Figura 1).

In dettaglio, il quadro delle analisi effettuate è stato il seguente:

- 73 campioni di carne (17 bovini, 35 suini, 21 avicoli);
- 40 campioni di grasso (17 bovini, 17 suini, 6 avicoli);
- 39 campioni di latte bovino;
- 37 campioni di mangimi semplici e composti, di cui 5 per acquacoltura;
- 29 campioni di uova di gallina;
- 20 campioni di pesce (9 trote, 4 spigole, 4 orate, 2 anguille, 1 cefalo);

Health Organization toxic equivalents (WHO-TEQs). These results showed contamination levels comparable to those detected in similar studies conducted in other European countries for products such as milk (mean: 0.81 pg I-TEQ/g fat), meat (mean: 0.73 pg I-TEQ/g fat) and fat (mean: 0.51 pg I-TEQ/g fat).

The highest dioxin content was found in fish (mean: 5.28 pg I-TEQ/g fat) and fish feeds (mean 6.60 pg I-TEQ/g fat). These two matrices also showed complete duplication of contamination profiles.

Other edible matrices (milk, meat, eggs) revealed the presence of HpCDD and OCDD. This could be due to the introduction into Italy of the animal feed additive choline chloride contaminated by these congeners.

Keywords

Contamination, Dioxin, Food, High resolution gas chromatography, High resolution mass spectrometry, Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, Polychlorinated dibenzo-furans.

Introduction

Polychlorinated-dibenzo-furans (PCDF) and polychlorinated-dibenzo-*p*-dioxins (PCDD), generally known as 'dioxins', represent a broad class of molecules that share chemical and physical properties and very high toxicity.

These compounds form as undesirable by-products in combustion and other industrial processes, and they are almost ubiquitous in the environment (8, 27, 37). Furthermore, their lipophilicity makes them extremely persistent and able to move up the food chain and to concentrate at different levels in it (bioaccumulation): in fact, The highest PCDDs/PCDFs content was detected in meat, milk, fish, etc. (26).

Regarding toxicity, an in-depth survey performed by the United States Environmental Protection Agency (EPA) indicated 2,3,7,8-substituted dioxins and furans as potentially carcinogenic (34) and incited the International Agency for Research on Cancer (IARC) to characterise 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) as a «first-class cancer promoter» (22). These molecules can interfere with the



Figura 1: Distribuzione geografica dei campioni analizzati..

Figure 1: Sampling areas and number of samples collected in Italy, 1999-2000.

Tutti i prelievi sono stati effettuati da parte dei Servizi Veterinari delle Aziende Sanitarie Locali competenti per ciascun distretto di campionamento considerato. I campioni sono stati prelevati presso mattatoi, allevamenti, aziende agricole, stabilimenti di produzione e trasformazione.

Preparazione ed estrazione dei campioni

Tutti i campioni sono stati omogeneizzati; i campioni di carne, pesce e uova sono stati successivamente liofilizzati.

Un'aliquota rappresentativa di campione è stata miscelata con terra di diatomee e quindi fortificata con la specifica soluzione standard di PCDD/PCDF, contenente 15 congeneri $^{13}\text{C}_{12}$ -marcati, fornita, come tutti gli standard necessari per l'analisi, dalla Wellington Laboratories (Ontario, Canada). Successivamente, i campioni sono stati sottoposti ad estrazione accelerata con solventi (miscela n-esano/acetone, 80:20, v/v) utilizzando il sistema ASE 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

Il grasso raccolto è stato portato a secco su evaporatore rotante e quindi

determinato per via gravimetrica.

I campioni di latte sono stati, invece, dapprima addizionati di alcool etilico in un imbuto separatore per denaturare le proteine, e poi estratti mediante una miscela di etere etilico/etere di petrolio (1:1, v/v); l'estratto è stato a sua volta portato a secco su rotavapor e pesato, quindi fortificato con la soluzione dei 15 congeneri marcati.

Purificazione dei campioni

Il grasso estratto è stato sottoposto ad una doppia partizione liquido-liquido (prima con acido solforico e poi con idrossido di potassio) ed in seguito purificato per mezzo del sistema automatico Power Prep (Fluid Management System Inc, Watertown, MA, USA). Il sistema è equipaggiato con tre diversi tipi di colonne (silice acida/basica, allumina e carbone) disposte in successione, attraverso cui vengono fatti passare i campioni precedentemente addizionati di uno specifico standard di clean-up ($^{37}\text{Cl}_4$ -2,3,7,8-TCDD). Gli eluati contenenti i PCDD/PCDF sono stati evaporati a secchezza ed il residuo ottenuto ridisciolti in nonano (10 μl) e for-

aryl hydrocarbon receptor (AhR), which plays a leading role in many intracellular functions, altering its normal activity (4, 24). Human exposure to PCDD/PCDF can take place in different ways, such as by air inhalation, skin absorption or through the consumption of contaminated food.

Dietary intake, in particular, can contribute to the daily exposure to dioxins to a level of over 90% (14, 29, 38).

Patterns of dioxin contamination in foods have been available in other European countries for some years (7, 10, 16, 17, 33). In Italy, the first extensive monitoring survey for the determination of background contamination levels for PCDD/PCDF was conducted in 1999.

As a consequence of the crisis experienced in Belgium, the Italian Ministry of Health introduced dioxin control in food within the framework of the National Surveillance Plan (NSP) (3), in accordance with the specific measures prescribed by the European Union (6).

The Ministry recognised the Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise «G. Caporale» (IZSA&M) (an accredited laboratory in accordance with standard ISO/IEC 17025) as the official laboratory for the analysis of PCDD and PCDF within the NSP.

Between 1999 and 2000, a total of 238 samples, including products for both human (meat, milk, eggs, fat and fish) and animal (simple and composed feeds) consumption, were examined from almost all regions of Italy.

A map of background contamination levels was drawn up for many important edible matrices based on this extensive monitoring programme. These profiles can facilitate the recognition of pollution sources (solid waste incineration facilities, cement kilns, etc.), as well as the discovery of cases of food contamination by an external source (e.g. choline chloride in fish feeds).

The European Commission (EC) has recently approved Directive 2001/102/EC (5) and Regulation 2001/2375/EC (28) establishing the maximum permitted levels for PCDD

tificato con 10 µl di standard interno ($^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4-TCDD e $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDD).

Analisi strumentale

L'analisi dei campioni è stata eseguita mediante gas cromatografia ad alta risoluzione/spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS), operando in modalità SIM (Single Ion Monitoring) ad una risoluzione di 10.000; le masse utilizzate per la determinazione di PCDD/PCDF sono riportate nel metodo EPA 1613.

Il sistema HRGC/HRMS utilizzato è costituito da uno spettrometro di massa MAT 95 XL Finnigan (Bremen, Germania) accoppiato ad un gas cromatografo capillare Trace Series 2000 Thermoquest (Milano, Italia), dotato di autocampionatore A200S; l'analisi dei 17 congeneri di PCDD/PCDF è stata condotta su colonna capillare DB-5 MS (60 m x 0,25 mm, 0,1 µm; J&W Scientific, Folsom CA, USA).

Le condizioni cromatografiche sono state ottimizzate al fine di ottenere la completa separazione dei diversi PCDD/PCDF 2,3,7,8-cloro-sostituiti; il programma di controllo della temperatura del forno è consistito in una fase isoterma iniziale a +120°C della durata di 2', seguita da un primo riscaldamento a +10°C/min, fino a +220°C; da un'altra fase isoterma di 10', da un riscaldamento a +235°C a +3°C/min; da un'ulteriore isoterma di 7' e da un innalzamento finale della temperatura a +4°C/min fino a +315°C. La temperatura dell'interfaccia GC/MS è stata impostata a +290°C e quella dell'iniettore a +240°C; le iniezioni sono state effettuate in modalità splitless con un volume di 1-2 µl, per un periodo di 1' e con flusso di splittaggio di 70 ml/min. La ionizzazione in impatto elettronico (EI) è stata condotta fissando la temperatura della sorgente ionica a

+250°C ed il voltaggio a 55 eV.

Le concentrazioni dei diversi congeneri sono state calcolate sulla base di rette di taratura costruite su 5 punti, alle concentrazioni prescritte dal metodo EPA 1613.

Controllo qualità

Il controllo qualità si è basato:

- sulla preparazione ed analisi di uno o più campioni di «bianco reagenti», parallelamente a ciascuna serie di campioni in analisi;
- sulla valutazione dei recuperi degli standard marcati (intervallo di accettabilità 20% - 150%);
- sulla verifica della conformità delle condizioni di separazione cromatografica rispetto alle prescrizioni del metodo, iniettando la soluzione «window defining and isomer specificity mix»;
- sull'analisi di un materiale di riferimento certificato costituito da latte in polvere (CRM 607);
- sull'analisi in duplicato di campioni con il Laboratorio Nazionale di Riferimento.
- sulla costante partecipazione a prove valutative interlaboratorio organizzate da enti riconosciuti a livello internazionale.

Risultati

I risultati ottenuti nel presente studio sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

Il contenuto di PCDD/PCDF riscontrato nei campioni esaminati è stato espresso sia come concentrazione analitica (pg/g grasso) sia in termini di Tossicità Equivalente (I-TEQ e OMS-TEQ); gli equivalenti di tossicità sono stati calcolati adottando lo schema proposto dalla NATO/CCMS (23) e da Van den Berg *et al.* (36), che prevedono entrambi l'attribuzione di uno specifico Fattore di Tossicità (I-TEF e OMS-TEF, rispettivamente) a ciascun congenere. In Tabella 1 sono riportati i valori medi di I-TEQ per singola matrice, le relative mediane e gli intervalli di oscillazione dei risultati.

and PCDF in food and feeds. As these limits are very low (parts per trillion [ppt]), PCDD/PCDF research must be conducted under strict controls, because of their significant effects on public health.

Materials and Methods

The PCDDs/PCDFs analysis was conducted using the EPA method 1613 (35). This technique, based on isotope dilution and detection by high-resolution mass spectrometry (HRMS), was complemented by a results evaluation system founded on the criteria set by the Italian Ministry of Health (National Reference Laboratory) (13). This method was used with some changes in extraction and purification procedures, so as to adapt it (originally developed for environmental matrices) to the analysis of food samples.

Sampling

Between 1999 and 2000, 238 samples were examined from 14 regions in Italy (Fig. 1).

The entire list of samples was as follows:

- 73 meat samples (17 beef, 35 pork, 21 poultry);
- 40 fat samples (17 beef, 17 pork, 6 poultry);
- 39 bovine milk samples;
- 37 simple and mixed fishfeeds (5 of which were from aquaculture);
- 29 poultry egg samples;
- 20 fish samples (9 trout, 4 gilthead, 4 sea-basses, 2 eels, 1 grey mullet).

All samples were collected by the local veterinary services in each sampling area. Samples were taken from slaughterhouses, farms and production and processing facilities.

Sample preparation

All samples were homogenised. Then, meat, fish and eggs were freeze-dried.

A representative aliquot of samples was mixed with diatomaceous earth and spiked with the specific PCDD/PCDF standard solution, a mixture of $^{13}\text{C}_{12}$ -labelled 2,3,7,8-congeners (Wellington Laboratories, Ontario, Canada). Fat extraction was performed by accelerated solvent extraction (ASE) using an ASE 200 instrument (Dionex, Sunnyvale, California, USA) with a mixture of n-hexane/acetone 80:20 (v/v). The extract was

Tabella 1: Valori medi di I-TEQ per singola matrice (*).**Table 1:** Average I-TEQ (pg TEQ/g fat) values for matrix taken into account*.

Matrice Product	Media Mean	Mediana Median	Min Min	Max Max
Pesce/Fish	5,28	5,33	0,29	14,37
Mangime (pesci)/Feedingstuffs (fish)	6,80	5,08	1,43	13,23
Mangime (altre specie)/Feedingstuffs (other)	0,63	0,32	0,01	4,25
Uova/Eggs	0,25	0,23	0,07	0,46
Carne/Meat	0,73	0,37	0,04	3,93
Grasso/Fat	0,59	0,51	0,11	1,66
Latte/Milk	0,81	0,40	0,06	3,83

(*) I valori di I-TEQ sono stati calcolati considerando per i congeneri al di sotto del LOD un contributo alla tossicità totale pari alla metà del limite suddetto

(*) I-TEQ values were calculated assigning a contribution to the total toxicity equal to half the limit of detection (LOD) for congeners below the LOD.

Per il calcolo dei valori di I-TEQ, in tutti i casi di «non rivelabilità» di uno o più isomeri si è stabilito di assegnare ad ognuno di questi un contributo alla tossicità totale pari alla metà del valore del limite di determinazione (LOD) (13); il LOD è stato calcolato in modo sistematico per ciascun congenero in ciascun campione.

Il calcolo degli OMS-TEQ è stato effettuato invece in modalità «upper-bound», presupponendo cioè che tutti i valori dei diversi congeneri inferiori al LOD siano pari al LOD stesso (5, 28).

Discussione

Il PNR ha prescritto la ricerca di furani e diossine negli alimenti per uso umano e zootecnico in quelle matrici edibili (latte, grasso, carne, uova, pesce e mangimi) la cui assunzione rappresenta la principale via di esposizione a tali contaminanti. L'eterogeneità delle matrici esaminate ha indotto a suddividere i dati finali in base alla natura dell'alimento, allo scopo di individuare specifici profili di contaminazione e di consentire

evaporato a uno stato secco in un evaporatore rotatorio e il residuo di grasso è stato pesato.

Le campioni di latte sono stati prima miscelati con alcool etilico in un imbuto separatore per precipitare le proteine, e poi il grasso è stato estratto utilizzando una miscela di etere dietilico/etero petrolifero 1:1 (v/v). L'estratto è stato essiccato, pesato e spuntato con la soluzione standard sopra descritta.

Purification of samples

Dopo una doppia estrazione liquido-liquido (la prima con acido solforico e la seconda con idrossido di potassio), l'estratto di grasso è stato purificato con un sistema automatico a tre colonne Power Prep (Fluid Management System, Watertown, Massachusetts, USA), equipaggiato con tre diverse colonne pre-paccate (silice multistrato, alluminio e carbonio).

Dopo l'aggiunta del campione standard di purificazione specifico ($^{37}\text{Cl}_4\text{-}2,3,7,8\text{-TCDD}$), i campioni sono passati attraverso le tre colonne. Gli eluati contenenti PCDD/PCDF congeneri sono stati essiccati in un flusso di azoto e il residuo è stato disciolto in nonano (10 μl) e fortificato con 10 μl di soluzione standard interna (contenente $^{13}\text{Cl}_{12}\text{-}1,2,3,4\text{-TCDD}$ e $^{13}\text{Cl}_{12}\text{-}1,2,3,7,8,9\text{-HxCDD}$).

Instrumental analysis

Tutti i campioni sono stati analizzati con cromatografia a gas ad alta risoluzione/alta risoluzione spettrometria di massa (HRGC/HRMS). Lo spettrometro di massa è stato operato normalmente in modalità di ionizzazione a campo (EI) in modalità di monitoraggio selettivo (SIM) a una risoluzione di 10.000. La determinazione di PCDD/PCDF congeneri è stata effettuata tenendo conto delle masse in g/l secondo il metodo EPA 1613 (Tabella 3).

Il sistema HRGC/HRMS consisteva di un MAT 95 XL (Finnigan, Bremen, Germania) spettrometro accoppiato con un Trace Series 2000 (Thermoquest, Milano, Italia) cromatografo equipaggiato con un A200S autosampler.

La separazione dei 17 PCDD/PCDF isomeri è stata effettuata su una colonna capillare GC DB-5 MS (60 m, 0,25 mm, 0,1 μm spessore film, J&W Scientific, California, USA).

Le condizioni operative sono state ottimizzate per ottenere la completa separazione dei 17 2,3,7,8-

Tabella 2: Livelli medi di singoli congeneri (in pg/g grasso) in ciascuna matrice (*).**Table 2:** Average level of each congener (pg/gfat) in each matrix*.

Congenero Congener	Pesce Fish	Mangime (pesci) Feedingstuffs (fish)	Mangime (altre specie) Feedingstuffs (other)	Latte Milk	Carne Meat	Grasso Fat	Uova Eggs
2378-TCDF	13,65	14,54	0,22	0,10	0,30	0,62	0,28
2378-TCDD	1,07	0,48	0,18	0,11	0,18	0,21	0,12
12378-PeCDF	1,23	1,44	0,13	0,12	0,16	0,23	0,10
23478-PeCDF	4,89	7,91	0,19	1,02	0,28	0,38	0,15
12378-PeCDD	1,35	0,95	0,23	0,26	0,30	0,31	0,21
123478-HxCDF	0,66	0,42	0,14	0,17	0,18	0,18	0,09
123678-HxCDF	0,67	0,42	0,12	0,22	0,14	0,17	0,08
234678-HxCDF	0,70	0,37	0,19	0,20	0,16	0,22	0,10
123789-HxCDF	0,66	0,13	0,15	0,14	0,24	0,28	0,11
123478-HxCDD	0,52	0,17	0,18	0,16	0,23	0,31	0,15
123678-HxCDD	0,57	0,58	0,46	0,22	0,24	0,31	0,16
123789-HxCDD	0,52	0,12	0,26	0,25	0,25	0,38	0,13
1234678-HpCDF	0,53	0,41	0,42	0,13	0,20	0,26	0,10
1234789-HpCDF	0,56	0,14	0,23	0,14	0,21	0,28	0,10
1234678-HpCDD	0,93	1,30	21,06	0,28	0,93	0,90	0,60
OCDF	0,86	0,28	1,45	0,31	0,41	0,50	0,19
OCDD	1,42	6,75	65,97	1,32	3,58	3,37	2,23
OMS-TEQ/WHO-TEQ	6,74	7,15	0,91	1,04	0,82	0,98	0,53

(*) I valori analitici medi sono stati calcolati considerando per i congeneri al di sotto del LOD un contributo pari al limite suddetto.

(*) Congeners below the limit of detection (LOD) were assigned a contribution to total toxicity equal to the LOD.

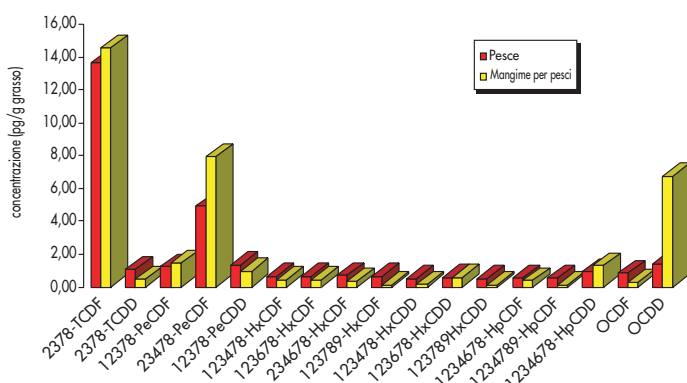


Figura 2: Confronto tra i profili di contaminazione del pesce e del mangime per pesci.

Figure 2: Comparison of contamination patterns in fish and fish feed.

confronti con le corrispondenti situazioni di altri Paesi europei. I livelli di contaminazione più elevati sono stati riscontrati nei pesci e nei mangimi destinati alla loro alimentazione, con un I-TEQ medio di 5,28 e 6,80 pg-TEQ/g grasso, rispettivamente.

Per il pesce, tale valore è in linea con quelli riscontrati in altri paesi dell'Unione Europea (Spagna 6,61, Germania 5,60, Olanda 6,65, espressi come pg-TEQ/g grasso) (7, 21, 33). Tale matrice esibisce, inoltre, un profilo di contaminazione sovrapponibile a quelli riscontrati nelle nazioni sopra citate; in tutti i casi prevalgono, infatti, i congeneri a basso grado di clorurazione come 2,3,7,8-TCDF (media 13,65 pg/g grasso), 1,2,3,7,8-PeCDF e 2,3,4,7,8-PeCDF (1,23 e 4,89 pg/g grasso), 2,3,7,8-TCDD (1,07 pg/g grasso) e 1,2,3,7,8-PeCDD (1,35 pg/g grasso) (Tabella 2). Naturalmente ai fini del calcolo è essenziale considerare la variabilità del contenuto in lipidi che caratterizza le varie specie di pesci; al riguardo, il monitoraggio condotto in Italia tra il 1997 ed il 1998 ha dimostrato che, a causa del fenomeno di biomagnificazione, la percentuale di contaminazione è maggiore nelle specie ittiche che si trovano ad un livello più alto

nella rete trofica. Dal punto di vista qualitativo, tale studio ha evidenziato una netta prevalenza dei congeneri a struttura furanica (soprattutto 2,3,4,7,8-PeCDF) su quelli di tipo diossinico, in analogia con i risultati sovraindicati (1).

La corrispondenza di profili riscontrata nei campioni di pesce si è estesa anche ai mangimi utilizzati nel loro allevamento (Figura 2); in generale, però, i livelli di contaminazione dei prodotti per acquacoltura europei sono risultati 8 volte superiori a quelli del Sud America (18). L'alto I-TEQ del pesce di allevamento è molto probabilmente dovuto ad un fenomeno di accumulo delle diossine nella catena alimentare, legato all'uso di mangimi con un elevato tenore in farine di pesce e grassi contaminati.

Le altre matrici destinate al consumo umano (latte, carne, grasso, uova) hanno mostrato valori di I-TEQ inferiori all'unità (0,81-0,73-0,59-0,25 pg-TEQ/g grasso, rispettivamente) (Tabella 1).

Il contenuto medio di diossine rilevato nel latte (0,81 pg-TEQ/g grasso) è di poco superiore agli 0,65 pg-TEQ/g grasso, di recente indicati in Francia come livello di contaminazione medio di tale alimento (ARILAIT 1998) (20); questo risultato è praticamente identi-

chlorosubstituted PCDD/F congeners; the injector temperature was +240°C; interface temperature +290°C; oven temperature programme +120°C (2 min), 10°C/min to +220°C, 10 min at +220°C, +3°C/min to +235°C, 7 min at 235°C, 4°C/min to +315°C; injection mode splitless; split flow 70 ml/min; ion source temperature +250°C. The concentrations of the different congeners were calculated on the basis of a 5 point calibration curve and the standard concentrations were indicated in EPA method 1613.

Quality assurance

The quality control included the following:

- the preparation and analysis of blank samples for each analysis batch;
- the recovery estimate for the labelled standards (tolerance range of 20%-150%);
- the use of the «window defining mix» solution to verify the correspondence between the adopted chromatographic conditions and the indications from EPA method 1613;
- the analysis of certified reference material consisting of powdered milk (CRM 607, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium);
- the analysis of duplicate samples in collaboration with the National Reference Laboratory.

Results

Results are shown in Tables 1 and 2. The PCDD and PCDF content detected in samples was expressed as both analytical concentration (pg/g fat) and toxic equivalents (I-TEQs and WHO-TEQs). Toxic equivalents were calculated according to the NATO/CCMS (23) and to the World Health Organization schemes (36), in which each congener was assigned a specific toxicity factor (I-TEF and WHO-TEF). The average I-TEQ values, medians and variation ranges calculated for each matrix are presented in Table 1.

In all cases in which one or more isomers were «not detectable», each of them were allotted a contribution to the total toxicity equal to half the limit of detection (LOD). The LOD was calculated in a systematic way for each congener in each sample (13).

WHO-TEQs were calculated accor-

co a quello emerso in un recente monitoraggio in Germania (0,78 pg-TEQ/g grasso), nazione in cui dal 1990 ad oggi si è registrata una graduale ma progressiva riduzione della contaminazione di tale alimento (10). La diminuzione riscontrata va probabilmente messa in relazione con la tempestiva emanazione, in quei Paesi, di linee guida e limiti di azione per le concentrazioni di PCDD/PCDF nel latte e derivati (2, 31) da parte degli organi governativi preposti (CSHPF in Francia e Ufficio Federale per la Salute in Germania).

Studi condotti sulla biodisponibilità delle diossine nel latte hanno dimostrato che la presenza di queste sostanze è influenzata dal metabolismo: in media, la percentuale di diossine a basso grado di clorurazione è leggermente superiore a quella delle diossine a più elevato grado di clorurazione (25).

Alcuni furani ad alta clorosostituzione, inoltre, subiscono processi di trasformazione ed eliminazione molto rapidi (32). Queste osservazioni giustificano la prevalenza di 2,3,4,7,8-PeCDF riscontrata nei campioni esaminati.

La stessa gamma di congeneri, con un rapporto simile tra i valori totali (espressi in pg/g grasso) di PCDF e PCDD (generalmente PCDF/PCDD < 1), è stata ritrovata in corrispondenti controlli effettuati in vari paesi stranieri, quali Germania (17), Spagna (7), Belgio (9) e Irlanda (12).

Anche nell'analisi dei campioni di carne, il valore di I-TEQ (0,73 pg-TEQ/g grasso) è risultato paragonabile ai risultati ottenuti in diverse nazioni dell'Unione Europea: Germania 0,61 (17), Belgio 0,80 (9), Francia 0,65 (ARILAIT 1998) (20). Dagli stessi lavori il suino è risultato la specie animale col più basso contenuto in

PCDD/PCDF.

Questi dati sottolineano come nella valutazione dei risultati sia necessario tenere sempre presente l'influenza esercitata sulla composizione delle carni da molteplici variabili come il tipo di alimentazione adottata per l'animale, il luogo di allevamento, l'età dello stesso all'atto della macellazione, il suo tenore in grassi; nella fattispecie, il maiale viene di norma macellato a 6 mesi e la sua percentuale di grasso è la più alta tra gli animali da reddito. Ciò si traduce in un ridotto accumulo di diossine nell'animale ed in una loro maggior diluizione nel grasso (19).

Il profilo di contaminazione della carne emerso dal monitoraggio nazionale è dominato da OCDD (3,58 pg/g grasso), OCDF (0,41 pg/g grasso), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (0,93 pg/g grasso) e si sovrappone perfettamente ai patterns individuati in altri paesi (7, 17). È da notare come il valore dell'I-TEQ totale sia relativamente basso nonostante la notevole presenza di OCDD: questo è dovuto alla scarsa tossicità riconosciuta a tale congenere, espressa dal suo modesto I-TEF (0,001).

La contaminazione rilevata nel grasso (0,59 pg I-TEQ/g grasso) è paragonabile a quella osservata nella carne sia in termini di tossicità totale (0,73 pg I-TEQ/g grasso) sia come specifica distribuzione dei congeneri; ciò è facilmente comprensibile alla luce della stretta correlazione esistente tra le due matrici all'interno dell'organismo animale.

I livelli di contaminazione più bassi tra gli alimenti analizzati, in termini di tossicità totale, sono stati rinvenuti nelle uova (0,25 pg I-TEQ/g grasso).

Il valore osservato è al di sotto della media europea (cfr. Germania 0,81 pg TEQ/g grasso, Spagna 1,22 pg TEQ/g grasso) (7, 21); uno studio combinato franco-tedesco ha

condotto l'approccio, in cui ogni congeneri al di sotto del LOD è stato assegnato una contribuzione alla tossicità totale pari al LOD stesso (5, 28).

Discussion

The NSP prescribed PCDD/PCDF research for those foods and feeds (milk, fat, meat, eggs, fish and feeds) that, when consumed, represent the main route of exposure for these contaminants. The variety of matrices induced to divide the final data in accordance with the nature of the food, with the aim of drawing specific contamination profiles and allowing comparisons between the situation in Italy and in other European countries.

Fish and fish feed showed the highest percentage of positive samples, with the following average I-TEQs: 5.28 pg-TEQ/g fat and 6.60 pg-TEQ/g fat, respectively.

For fish, the results are comparable to those obtained in Spain (mean: 6.61 pg-TEQ/g fat), Germany (mean: 5.60) and The Netherlands (mean: 6.65) (7, 21, 33). This matrix showed a contamination pattern similar to that found in the above countries. In all cases, a clear prevalence of the less chlorinated isomers 2,3,7,8-TCDF (13.65 pg/g fat), 1,2,3,7,8 and 2,3,4,7,8-PeCDF (1.23 and 4.89), 2,3,7,8-TCDD (1.07) and 1,2,3,7,8-PeCDD (1.35) was detected (Table 2). Fat amounts varied significantly depending on the different fish species. In this respect, the monitoring of the situation in the Adriatic Sea from 1997 to 1998 revealed that most contaminated species were those at the top of the food chain. This survey also demonstrated a massive prevalence of polychlorinated dibenzo-furans (2,3,4,7,8-PeCDF especially) on the polychlorinated dibenzo-dioxins, in analogy with the above-mentioned results (1).

This overlapping pattern has extended from fish samples to fish feeds (Fig. 2). However, the typical contamination levels in Europe were eight times higher than those recorded in South America (18).

As dioxins tend to accumulate at different levels in the food chain, the high I-TEQ value calculated for rearing fish is probably due to the use of feedstuffs with

addirittura evidenziato un contenuto medio di PCDD/PCDF nelle uova di gallina pari a 2,96 pg I-TEQ/g grasso, con risultati compresi tra 0,24 e 5,68 pg I-TEQ/g grasso (20).

L'eterogeneità di questi dati potrebbe trovare spiegazione nel fatto che i livelli di contaminazione delle uova risentono fortemente delle modalità di allevamento e di alimentazione delle galline.

Diversi studi (11, 17, 19) hanno dimostrato che le uova prodotte da galline cresciute in gabbia risultano meno contaminate di quelle di galline allevate al suolo; in quest'ultimo caso le uova possono raggiungere valori di tossicità totale addirittura tripli di quelli delle galline allevate in gabbia. I profili di contaminazione delle uova rispecchiano spesso quelli propri del suolo, in cui generalmente prevalgono gli isomeri a più alto grado di clorurazione: OCDD, OCDF, HpCDD e HpCDF. Inoltre, da studi metabolici e di biodisponibilità condotti in Svizzera (30) è emerso che, a differenza di quanto accade nel latte, nelle uova la velocità di trasformazione di TCDF e 1,2,3,7,8-PeCDF è pressochè uguale agli altri congeneri 2,3,7,8-clorosostituiti. Non stupisce quindi che nei campioni esaminati predominino contemporaneamente congeneri a diverso grado di clorurazione, quali TCDF, 2,3,4,7,8-PeCDF, PeCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, OCDD ed OCDF.

Una notazione a parte meritano i mangimi non destinati all'acquacoltura, che hanno presentato un I-TEQ medio di 0,63 pg TEQ/g grasso. Questo valore è relativamente basso e non si traduce, a differenza di quanto rilevato nei pesci, in un significativo effetto di accumulo di tali contaminanti negli alimenti di origine animale analizzati (latte, carne, uova, grasso).

I congeneri più rappresentati nei mangimi sottoposti ad analisi sono stati gli epta e gli octaclorurati, soprattutto OCDD (65,97 pg/g grasso) e 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (21,06 pg/g grasso). Tale caratteristico pattern di contaminazione potrebbe essere dovuto all'introduzione nel territorio e nel mercato nazionale di partite di cloruro di colina contaminate. Il cloruro di colina, noto anche come vitamina B4, è un additivo comunemente impiegato nella preparazione delle premiscele in mangimistica ed è disponibile essenzialmente in forma liquida. Le formulazioni commerciali impiegate nella preparazione dei mangimi richiedono, per il suo uso, l'associazione con vettori vegetali come la segatura di legno, i gusci delle mandorle e la crusca. Nel giugno 2000, ricerche di diossine effettuate nel contesto di un allarme comunitario, presso laboratori tedeschi, hanno evidenziato la presenza di considerevoli quantità di PCDD/PCDF in alcune serie di premiscele.

Studi condotti in Spagna, paese di origine della contaminazione, hanno dimostrato che quest'ultima non era dovuta alla colina ma al carrier vegetale, ed in modo particolare alla segatura di legno di pino (15).

Proprio il profilo di contaminazione della segatura, caratterizzato da alti valori di OCDD (circa 20 ng/g prodotto fresco) e degli HpCDF (tra 2 e 8 ng/g), risulta qualitativamente sovrapponibile a quello delineato per i mangimi analizzati. Negli stessi mangimi, inoltre, OCDD e HpCDD sono presenti negli stessi rapporti in cui figurano nei patterns di contaminazione dei prodotti (latte, uova, carne, grasso) derivanti da animali nutriti con quei tipi di alimenti.

I profili di contaminazione ottenuti costituiscono, quindi, una prima banca dati con cui poter

significant amounts of contaminated fishmeal and fat in their diet.

The other products for human consumption (milk, meat, fat, eggs) exhibited I-TEQ values below 1 (0.81-0.73-0.59-0.25 pg-TEQ/g fat respectively) (Table 1).

The average amount of dioxin in milk (0.81 pg-TEQ/g fat) slightly exceeded 0.65 pg-TEQ/g fat, recently indicated in France as the medium contamination level for milk (20). Furthermore, the results obtained in Italy are very similar to data collected in a recent survey in Germany (0.78 pg/g fat). In these countries, a progressive decrease in milk contamination has been observed in recent years (10) due to the enforcement of regulations setting strict limits for PCDD/PCDF content in milk and dairy products (2, 31).

Studies on the bioavailability of dioxins in milk demonstrated that the presence of these substances is influenced by metabolism: on average, dioxins with a low degree of chlorination are slightly prevalent (25).

Some highly chlorinated furans undergo quick transformations and removal processes (32). This can explain why 2,3,4,7,8-PeCDF was the isomer found most frequently in the samples analysed.

The same range of congeners, with a similar PCDD/PCDF ratio (PCDF/PCDD<1) resulted from analogous controls carried out in Germany (17), Spain (7), Belgium (9) and Ireland (12).

The average I-TEQ value calculated for meat (0.73 pg-TEQ/g fat) is close to data from Germany 0.61 pg/g fat (17), Belgium 0.80 (9), France 0.65 (20). The same issues revealed that pork has the least PCDD/PCDF contamination of all meats. These data highlight that meat composition in the animal depends on multiple factors, such as the type of feeding, method of farming, age at slaughter and fat content. In particular, pigs are usually slaughtered at six months and their fat percentage is among the highest of meats. Pork has a scarce accumulation of PCDD/PCDF in the body of the animal and a greater dilution of these compounds in fat (19).

OCDD (3.58 pg-TEQ/g fat), OCDF (0.41), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD

comparare i risultati di monitoraggio da condurre nei prossimi anni, in analogia con quanto già realizzato in altri paesi (Germania, Gran Bretagna, Spagna). Ciò consentirebbe non soltanto di seguire l'andamento nel tempo dei livelli di diossine, ma anche di verificare l'efficacia di eventuali misure protettive volte a limitarne l'emissione nell'ambiente e la presenza nella catena alimentare, al fine di ridurre l'esposizione dell'uomo a tali contaminanti.

Ringraziamenti

Si ringraziano i signori L. Torreti e R. Scarpone per il contributo fornito al presente lavoro.

Bibliografia/References

1. Bayarri S., L. Turrio Baldassarri, N. Iacovella, F. Rodriguez & A. di Domenico (2001). - PCDDs, PCDFs, PCBs and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. *Chemosphere*, **43**, 601-610.
2. CSHPF (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France) (1998). - Recommandations sur la dioxine (avis du 17 Marzo 1998).
3. DLgs. n. 336, 4 agosto 1999. - Attuazione delle direttive 96/22/CE e 96/23/CE concernenti il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze β -agoniste nella produzione di animali e le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti. G.U. n. 230, 30 settembre 1999.
4. De Vito M.J. & L.S. Birnbaum (1995). - Dioxins: model chemicals for assessing receptor-mediated toxicity. *Toxicology*, **102**, 115-123.
5. Direttiva 2001/102/CE del Consiglio, del 27 novembre 2001, che modifica la direttiva 1999/29/CE del Consiglio relativa alle sostanze e ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali. G.U.C.E. n. L 006, 10 gennaio 2002, 45-49.
6. Direttiva 96/23/CE del Consiglio, del 29 aprile 1996, concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE. G.U.C.E. n. L 125 del 23/05/1996, 10-32.
7. Domingo J.J., M. Schumacher, S. Granero & J.M. Llobet (1999). - PCDDs and PCDFs in food samples from Catalonia, Spain. An assessment of dietary intake. *Chemosphere*, **38**, 3517-3528.
8. Fiedler H., K.R. Cooper, S. Bergek, M. Hjelt & C. Rappe (1997). - PCDDs and PCDFs in food samples collected in southern Mississippi, USA. *Chemosphere*, **34**, 1411-1419.
9. Focant J.F., A.C. Massart, G. Eppe, C. Pirard, J.E. André, C. Xhrouet & E. De Pauw (2001). - Levels and trends of PCDDs/PCDFs and cPBCs in Belgian foodstuffs one year after the «dioxin crisis». *Organohalogen Compounds*, **51**, 243-246.
10. Fürst P. & K. Wilmers (1999). - PCDD/PCDF levels in dairy products from north Rhine-Westfalia 1990-1998. *Organohalogen Compounds*, **43**, 325-328.
11. Fürst P., C. Fürst & K. Wilmers (1993). - PCDD/PCDF in commercial chicken eggs; dependence on the type of housing. *Organohalogen Compounds*, **13**, 31-34.
12. Hamm S., J. Fuchs, M. Post, R. Grümping & A. Maulshagen (2001). - Levels of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in Irish cow's milk. *Organohalogen compounds*, **51**, 306-309.
13. ISS (Istituto Superiore di Sanità) (1999). - Linee-guida per interventi analitici mirati al rilevamento di PCB, PCDD, PCDF in prodotti alimentari. (ISS-XEN-99-4; Version 01/07/99). [<http://www.iss.it/diossina/diossina.htm>]
14. Liem A.K.D. & R.M.C. Theelen (1997). - Dioxins: Chemical Analysis, Exposure and Risk Assessment: National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
15. Llerena J.J., E. Abad, J. Caixach & J. Rivera (2001). - A new episode of PCDDs/PCDFs feed contamination in Europe: the choline chloride. *Organohalogen Compounds*, **51**, 283-286.
16. MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (1992). - Dioxins in Food, Food Surveillance Paper No. 31, publ. HMSO, UK.
17. Malisch R. (1998). - Update of PCDD/PCDF intake from food in Germany. *Chemosphere*, **37**, 1687-1698.
18. Malisch R. (2001). - PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in feedingstuffs for fish. *Organohalogen Compounds*, **51**, 287-290.
19. Malisch R., A. Gleadle & C. Wright (1999). - PCDD/F in meat samples from domestic farm animals and game. *Organohalogen Compounds*, **43**, 265-269.
20. Malisch R., F. Le Querrec, B. Schnepp & D. Fraisse (1999). - German (0.93) were the congeners found most frequently in the meat contamination profile from this national survey. This result can be matched perfectly with patterns seen in other European countries (7, 17). In spite of the massive quantity of OCDD detected, the I-TEQ is relatively low. This is due to the characteristically low TEF (0.001) of this isomer.

As meat and fat are closely related in the animal body; it is not surprising that the PCDD/PCDF contamination levels in fat samples (mean: 0.59 pg-TEQ/g) and also the specific distribution of congeners are similar to the above data in meat.

In terms of total toxicity, eggs proved to be the least PCDD/PCDF contaminated of all matrices investigated (0.25 pg-TEQ/g fat).

This value is below the European mean (Germany: 0.81 pg-TEQ/g fat, Spain: 1.22) (7, 21); a Franco-German study actually indicated 2.96 pg-TEQ/g fat as the average PCDD/PCDF content in eggs, with values ranging from 0.24 to 5.68 pg-TEQ/g fat (20).

The variability of these data could be explained by different farming and feeding practices. Several studies demonstrated that eggs from hens kept in wire cages were usually less contaminated than those from chickens grazing on soil (11, 17, 19). It was also reported that eggs from foraging hens can reach toxicity values three times higher than those of caged hens.

The contamination profiles for eggs often reflect that of the soil, where hepta and octa-chlorinated congeners frequently prevail. Moreover, studies on metabolism and bioavailability conducted in Switzerland highlighted that, unlike milk, the transformation rate for TCDF and 1,2,3,7,8-PeCDF is almost equal to the other 2,3,7,8-substituted isomers (30). This could justify why the samples examined contained congeners with different degrees of chlorination, such as TCDF, 2,3,4,7,8-PeCDF, PeCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, OCDD and OCDF.

The remaining feeds analysed (those not used for fish farming) showed an average I-TEQ equal to 0.63 pg-TEQ/g fat; this relatively low value indicates that, unlike for fish, these contaminants do not accumulate much in the other matrices of

French joint project: PCDD/PCDF in food samples from upper Rhine river valley. *Organohalogen Compounds*, **43**, 369-372.

21. **Mayer R.** (2001). - PCDD/F levels in food and canteen meals from Southern Germany. *Chemosphere*, **43**, 857-860.

22. **Mc Gregor D.B., C. Partensky & J. Wilbourn** (1997). - IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC Press, Lyon, France, **69**, 666.

23. NATO/CCMS (North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society) (1988). - International Toxicity Equivalency Factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. Report No. 176.

24. **Okey A.B., D.S. Riddick & P.A. Harper** (1994). - The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-TCDD and related compounds. *Toxicological Letters*, **70**, 1-22.

25. **Olling M., H.J.G.M. Derks, P.L.M. Berende, A.K.D. Liem & A.P.J.M. de Jong** (1991). - Congener-specific bioavailability of PCDDs/PCDFs and coplanar PCBs in cows: laboratory and field measurements. *Chemosphere*, **23**, 1377-1385.

26. **Päpke O. & P. Fürst** (1995). - Dioxinkonzentrationen in Lebensmitteln und Humanproben. *Organohalogen Compounds*, **22**, 143-171.

27. **Rappe C.** (1993). - Sources of exposure, environmental concentrations and exposure assessment of PCDDs/PCDFs. *Chemosphere*, **27**, 211-225.

28. Regolamento (CE) n. 2375/2001 del Consiglio, del 29 novembre 2001, recante modifica del regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. G.U.C.E. n. L 321, 6/12/2001, 1-5.

29. **Safe S.H.** (1998). - Development validation and problems with the toxic equivalency factor. Approach of risk assessment of dioxins and related compounds. *Journal of Animal Sciences*, **76**, 134-141.

30. **Schuler F., P. Schmid & C. Sch-**

latter (1997). - The transfer of PCDD/PCDF from soil into eggs of foraging chicken. *Chemosphere*, **34**, 711-718.

31. **Schuster J. & J. Dürkopp** (Umweltbundesamt) (1993) (as editors). *Bundesgesundhbl. Sonderheft/93*, S: 1-14.

32. **Slob W., M. Olling, H.J.G.M. Derks & A.P.J.M. de Jong** (1995). - Toxicokinetics of eight ¹³C-labelled PCDDs and PCDFs in lactating cows. *Chemosphere*, **31**, 3827-3838.

33. **Theelen R.M.C., A.K.D. Liem, W. Slob & J.H. Van Wijnen** (1993). - Intake of chlorine substituted dioxins, furans and planar PCBs from food in the Netherlands: median and distribution. *Chemosphere*, **27**, 1625-1635.

34. U.S.EPA (United States Environmental Protection Agency) (1994). - Health Assessment for 2,3,7,8-TCDD and Related Compounds. Public Review Draft, EPA/600/BP-92/001a-c.

35. U.S.EPA (United States Environmental Protection Agency) Method 1613 Rev. B: «Tetra through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS».

36. **Van den Berg M., L. Birnbaum, A.T.C. Bosveld, B. Brunstrom, P. Cook, M. Feeley M., J.P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S.W. Kennedy, T. Kubiak, J.C. Larsen, F.X.R. van Leeuwen, A.K.D. Liem, C. Nolt, R.E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillit, M. Tysklind, M. Younes, F. Waern & T. Zacharewski** (1998). - Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives*, **106**, 775-792.

37. WHO (World Health Organisation) (1992). - Toxic Substances Journal 12. Special Issue: Tolerable Daily Intake of PCDDs and PCDFs. Taylor & Francis, Basingstoke, Hampshire, UK.

38. WHO/ICPS (World Health Organisation/International Programme on Chemical Safety) (1989). - Environmental Health Criteria 88: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans (Geneva: World Health Organisation).

animal origin taken into account (milk, meat, eggs, fat). OCDD (65.97 pg/g) and 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (21.06 pg/g) were the prevalent isomers in feed.

This contamination profile could be due to the importation of contaminated lots of choline chloride from abroad. Choline chloride, better known as vitamin B4, is an additive commonly used in the preparation of pre-mixed products; it is mainly available in liquid form and therefore must be mixed with plant carriers such as almond shells when prepared commercially. In June 2000, the PCDD/PCDF research performed in some German laboratories, within the framework of a Community alert, highlighted that high levels of PCDD/PCDFs were present in some commercial preparations.

Further investigations conducted in Spain (the country in which contamination was first recorded) demonstrated that this phenomenon was due to the plant carrier, and in particular to pine sawdust (15). Sawdust itself, with its high OCDD values (about 20 ng/g fw) and HpCDFs (from 2 to 8 ng/g), showed the same contamination pattern as the feeds mentioned above.

Moreover, the OCDD/HpCDD ratio calculated in the feeds examined gave the same value as for those products (milk, eggs, meat, fat) from animals fed on that kind of feed.

Finally, the contamination patterns recorded in this survey could provide useful data for the comparison of results of other similar national monitoring surveys. This information would not only enable researchers to establish the trend of background levels of dioxins in food over the years, as has been done in other countries (Germany, United Kingdom, Spain), but would also enable the verification of the efficiency of precautionary measures taken to limit their presence in the environment and food chain, thereby reducing human exposure to these contaminants.

Autore per la corrispondenza: G. Scortichini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale per l'Abruzzo e il Molise «G. Caporale» (IZSA&M)
Via Campo Boario - Teramo, Italia
Telephone +39-0861-332242 - Fax +39-0861-332251
E-mail: g.scortichini@izs.it