



HAL
open science

Etude de la biodisponibilité des HAP du sol chez le ruminant laitier

S. Lutz, C. Feidt, S. Jurjanz, G. Rychen

► **To cite this version:**

S. Lutz, C. Feidt, S. Jurjanz, G. Rychen. Etude de la biodisponibilité des HAP du sol chez le ruminant laitier. Séminaire 2004, Jan 2004, Vandoeuvre-Lès-Nancy, France. hal-02761718

HAL Id: hal-02761718

<https://hal.inrae.fr/hal-02761718>

Submitted on 4 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

ETUDE DE LA BIODISPONIBILITE DES HAP DU SOL CHEZ LE RUMINANT LAITIER

S. Lutz, C. Feidt, S. Jurjanz, G. Rychen

Laboratoire Sciences Animales USC INRA, ENSAIA, BP 172, 54505 Vandoeuvre

Résumé. Les activités anthropiques (voies routières, usines à gaz de ville, aciérie...) génèrent des polluants organiques persistants qui s'accumulent dans l'environnement. Bien que les émissions soient localisées, la volatilité de ces molécules augmente les surfaces affectées (dépôts possibles à plusieurs dizaines de kilomètres) et les niveaux de contamination dans l'environnement (de l'ordre du microgramme par gramme de matière sèche). Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont une classe de molécules organiques générées par les activités humaines. Le caractère cancérigène de certains composés en fait une famille de molécules très étudiée de par les risques toxicologiques qu'elle présente pour l'environnement et la santé humaine. L'homme, dernier maillon de la chaîne alimentaire, est susceptible d'accumuler ces molécules lipophiles à la suite d'ingestion quotidienne d'aliments contaminés, même faiblement. Au LSA, dont la sécurité des aliments (les produits laitiers en particulier) est l'une des thématiques de recherche, le transfert des HAP de l'aliment au lait est étudié. Les niveaux de contamination dans l'environnement étant connus, les quantités de HAP ingérées par des ruminants via l'herbe et le sol ont été estimées. Une expérimentation visant à déterminer la biodisponibilité des HAP du sol ainsi que le coefficient de transfert de ces molécules du sol au lait chez les vaches laitières a donc été mise en place. Le dispositif expérimental mis en œuvre reposait sur l'utilisation de ruminants laitiers. Une quantité connue de sol a été contaminée artificiellement avec 6 molécules à des doses proches des valeurs rencontrées dans les sols analysés précédemment. Ce sol a été donné à hauteur de 500 grammes par jour (quantité moyenne ingérée quotidiennement au pâturage) à des vaches laitières sur une période de 21 jours. Le lait collecté régulièrement a été analysé : le dosage des molécules natives ainsi que de leur métabolites (issus des molécules natives) a été fait par CG-SM sur le lait entier. Les teneurs en HAP natifs dans le lait n'ont pas augmenté par rapport à la concentration initiale dans le lait durant l'exposition chronique. En revanche, il y a une apparition de métabolites (non détectés en conditions initiales) dans le lait dès le 3^e jour d'apport de sol.

Bien qu'il n'y ait pas d'augmentation de la concentration en HAP dans le lait, l'apparition de ces métabolites montre une désorption des molécules du sol qui sont alors disponibles pour l'organisme.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules issues de la combustion incomplète de la matière organique : elles peuvent être d'origine naturelle (feux de forêts, éruptions volcaniques) ou anthropique (activités industrielles, trafic routier, chauffage domestique...).

Les pollutions dues à ces molécules organiques sont diffuses : elles impliquent des concentrations en polluants faibles mais sur des grandes surfaces ce qui en fait des composés ubiquistes [1]. Leur présence sur l'herbe et le sol favorise leur entrée dans la chaîne alimentaire via l'animal. Cependant, le transfert des HAP de l'aliment des ruminants au lait ainsi les concentrations dans le lait destiné à la consommation sont peu étudiées.

1. Niveaux de contamination en HAP de l'herbe et du sol dans le voisinage de sites potentiellement contaminants

Les niveaux sont très variables en fonction des sources, qu'elles soient naturelles ou liées aux activités humaines [2], des distances à la source [3] et des saisons [4]. Les

valeurs rencontrées fluctuent selon les auteurs : de 52 ng/g MS pour Grova et al. [5] à 153 ng/g MS pour Meharg et al. [6] ; Jones a mesuré des teneurs de 187 ng/g MS sur de la végétation prélevée en milieu rural [2]. Les concentrations relevées aux abords de sites contaminés sont comprises entre 81 ng/g MS en zone urbaine [5], 1461 ng/g MS à 6 mètres d'une autoroute [7] et jusqu'à 2365 ng/g MS sur de la végétation prélevée au lendemain d'un incendie de produits chimiques (polypropylène). Ces écarts sont dus à l'origine de l'émission mais également aux méthodes de dosages différentes.

Les variations de concentration dans le sol sont également hétérogènes. Les flux de HAP seraient, en France, de 5000 à 20000 tonnes par an. Il en découle des stocks importants dans les sols: environ 100000 tonnes de HAP seraient présents dans les sols (dont environ 4000 tonnes en zone urbaine et 200 tonnes en milieu rural). La persistance de ces molécules dans les sols étant de 2 à 10 ans, l'évolution de ces quantités en un an est faible [1]. La teneur en HAP dans les sols est dépendante de la distance aux sources de production. Les concentrations fluctuent de 106 à 3095 ng/g MS pour Tuhackova [8] et de 2700 à 18000 ng/g MS pour Meharg et al. [6]. Lors d'essais d'extractibilité des HAP du sol à l'aide de solvants doux, les molécules les plus hydrophobes (composés les plus lourds) sont moins extractibles que les composés plus légers et plus hydrophiles : la rétention, qui conditionne la disponibilité, est plus importante pour les grosses molécules [9].

2. Biodisponibilité des HAP de la matrice sol

Les études faites sur les HAP dans l'herbe ne mettent pas en évidence de contamination importante du lait de vaches laitières pâturant à proximité de sites d'émission de HAP [10]. Bien que les animaux ingèrent environ 15 kg de matière sèche par jour, la faible concentration en HAP dans l'herbe ne semble pas permettre une contamination du lait. Le sol, en revanche, avec des teneurs de 10 à 1000 fois plus importante que l'herbe, est susceptible d'être une source de contamination non négligeable pour les animaux qui peuvent ingérer près de 500 grammes de sol par jour, selon les conditions (adsorbé à l'herbe, présent sur les racines...), [11].

Des données existent sur l'ingestion de sol contaminé, cependant, la voie de sortie étudiée est fréquemment l'urine, les essais étant faits sur des souris. A la suite d'apport chronique sous forme de sol contaminé, des quantités significatives d'hydroxypyrene, indicateur de la dégradation du pyrène, sont observés dans les urines [12]. Il semblerait donc que les HAP présents dans le sol qu'ingèrent les animaux soient une source de contamination alimentaire. On note cependant le manque de données concernant le transfert, en condition contrôlée, des HAP du sol au lait. Il serait alors intéressant de connaître la part de molécules se libérant du sol, dans l'organisme. La biodisponibilité est considérée, chez un animal ingérant du sol contaminé, comme la part, le pourcentage d'un polluant désorbé du sol et retrouvée dans le système sanguin [13]. Elle se décompose en 2 parties :

- l'extractibilité, qui est la fraction de polluant qui pourra se solubiliser dans un solvant et être sous forme liquide
- l'absorption, qui est le passage du polluant présent dans la phase liquide à travers les barrières des différents tissus (US-EPA).

L'extractibilité conditionne la biodisponibilité puisque seuls les éléments dissous dans la phase liquide sont susceptibles d'être absorbés. Peu de données existent sur l'absorption et la biodisponibilité des HAP du sol vers le ruminant.

3. Teneurs en HAP dans les voies d'excrétion

Peu de données sur les concentrations en HAP dans le lait de vaches existent ; des teneurs dans le lait de 26 ng/g MG à 36 ng/g MG sont dosées dans le lait [5]. Les HAP peuvent également être excrétés sous d'autres formes que la forme native, transformés par différentes enzymes de l'organisme qui conjuguent ces molécules pour les rendre hydrophiles ; ces métabolites sont alors éliminés facilement par l'urine ou la bile [14]. Le 1-hydroxypyrene par exemple, dosé dans les urines, est souvent utilisé comme indicateur d'exposition aux HAP [15]. Selon certaines études, il faudrait une quantité minimale de HAP pour induire l'action de ces enzymes ; l'excrétion des métabolites est donc dépendante de la dose apportée [12].

BIODISPONIBILITE DES HAP DU SOL POUR LE RUMINANT LAITIER

1. Préparation du sol

500 grammes de terre (quantité journalière moyenne potentiellement ingérée par les ruminants) ont été contaminés avec six molécules (fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène et benzo[a]pyrène) diluées dans de l'acétonitrile (20 ml pour 500 grammes), à hauteur de 10 µg/g MS pour chaque molécule. Ces molécules ont d'abord été choisies en fonction de leurs paramètres physico-chimique. Le facteur influençant principalement le devenir d'une molécule dans l'environnement ou l'organisme est son hydrophobicité. Les molécules choisies, qui sont également principalement détectées dans le lait ([5] et [10]), sont représentatives de HAP ayant sensiblement les mêmes masses moléculaires.

Ce sol contaminé a mûri un mois protégé de la lumière à température ambiante et maintenu à 80% de sa capacité au champ.

2. Apport de sol aux animaux

Ce sol préparé a été administré quotidiennement et pour une période de 21 jours à des vaches laitières Prim'Holstein via une fistule ruminale. Des échantillons de lait représentatifs de la traite du soir ont été collectés individuellement pendant plusieurs jours. Les molécules natives et trois de leurs métabolites utilisés comme indicateur d'exposition aux HAP (2-hydroxyfluorène, 3-hydroxyphénanthrène et 1-hydroxypyrene) ont été dosés par chromatographie gazeuse/spectroscopie de masse (CG-SM) dans le lait entier.

3. Ingestion non contrôlée de HAP ingérés par les animaux

Les animaux en essai assimilent chaque jour une quantité non négligeable de HAP provenant de sources diverses, essentiellement orales. Pour contrôler ces apports, un dosage de HAP dans des matrices ingérées par les vaches sont effectuées ; un rapport entre ce qui est apporté volontairement (sol) pour être testé et ce qui est reçu par un autre biais (ration, eau) peut alors être calculé pour chaque molécule. La quantité apportée par le sol contaminé artificiellement est cependant très supérieure aux contaminations externes.

RESULTATS

1. Quantité de HAP ingérée

La part de HAP reçue par l'animal et ne provenant pas de la matrice sol est à considérer également. Elle est cependant très faible par rapport à la dose de HAP présente dans le sol, mais, à l'inverse du sol, elle est directement disponible pour l'animal. En effet, les molécules présentes dans l'eau sont absorbées directement ; celles adsorbées sur la ration suivront la même voie que l'aliment et seront majoritairement absorbées par l'organisme.

Les dosages effectués dans le sol sont donnés en ng/g MS. Il faut cependant noter que les concentrations attendues ne sont pas celles dosées dans le sol, sauf pour le BaP qui est présent à presque 5000000 ng (soit 5000 µg, correspondant à une concentration initiale de 10 µg/g MS) (tableau 1). Cette perte de molécule dans le sol a donc eu lieu lors de la maturation : bien que les barquettes aient été placées dans le noir, une légère photo-dégradation a pu se produire. Les pertes de ces molécules, proportionnelles à leur nombre de cycles (les plus légères étant davantage dégradées que les plus lourdes), seraient principalement dues à la volatilisation, lors du mélange du sol par exemple, et à la dégradation par les micro-organismes. Les quantités apportées réellement sont donc inférieures à celles attendues, particulièrement pour les molécules légères.

Le tableau ci-dessous résume les quantités de HAP ingérées dans la ration, l'eau et le sol respectivement ; sur cet essai, en moyenne, une vache laitière ingère 20 kg de matière sèche (ration) par jour et boit quotidiennement 75 litres d'eau.

Tableau 1. Quantité de HAP ingérée quotidiennement par les vaches laitières (en ng)

Molécules	Ration	Eau	sol
fluorene	116407	21930	1446000
phenanthrene	328942	66207	2685000
anthracene	40966	5011	2626500
fluoranthene	221255	1539	2377000
pyrene	231192	5337	3902000
BaP	2028	7	4991000

2. Teneurs en HAP dans le lait

Pour toutes les molécules, un traitement statistique est réalisé sur des moyennes à un jour de prélèvement. La concentration moyenne en chaque molécule en fonction du jour de prélèvement est soumise à une analyse de variance avec la procédure MIXED du logiciel SAS (SAS Inst. Inc., Cary NC, USA) avec l'option des mesures répétées. La structure de covariance entre les jours a été définie comme autorégressive après vérification des critères d'Akaike et de Schwarz-Bayesian. Les traitements sont comparés à base des moyennes ajustées par un test t de Tukey. Le niveau de HAP dans les laits prélevés à différents jours est très variable selon les animaux, cependant, aucune augmentation significative de la teneur en molécules mères (HAP) dans le lait n'est observée au cours du temps. Chaque vache a une réponse différente et très irrégulière selon la molécule. Aucun comportement, en fonction de l'individu ou en fonction de la molécule, ne semble se dessiner au cours de l'apport.

Le suivi de la concentration en fluorène permet de percevoir une augmentation dans la quantité de molécules excrétée au 3^{ème} jour ; au-delà, une diminution de la quantité s'amorce pour un animal, les 2 autres n'amorçant la diminution qu'au 16^{ème} jour. Une moyenne de 20000 ng de pyrène est excrétée, avec toutefois un écart de 5000 à 50000 ng au 16^{ème} jour entre 2 animaux.

Aucune tendance nette n'est à observer dans l'excrétion du phénanthrène ; bien qu'un animal ait une concentration plus élevée au 3^{ème} jour par rapport à J0, il n'y a pas, en moyenne, d'augmentation significative de la quantité de phénanthrène excrétée. De même pour l'anthracène et le fluoranthène, les quantités excrétées par animal sont divergentes en fonction de la molécule et de l'animal : les concentrations en une molécule donnée peuvent être jusqu'à 10 fois supérieures d'un animal à l'autre, au même jour de traite (de 7000 à plus de 30000 ng de fluoranthène excrété à J16).

On note toutefois que le benzo[a]pyrène, bien qu'il soit le plus concentré dans le sol, est inexistant dans le lait témoin ainsi que dans les laits prélevés au cours de la cinétique.

3. Quantité de métabolites détectée dans le lait

L'analyse statistique effectuée pour l'étude des métabolites est identique à celle des molécules mères. Les métabolites, dosés dans le même lait que les molécules mères, ne sont pas détectés dans les témoins. Bien que des molécules mères soient présentes dans le lait, il semblerait que les animaux n'aient pas été exposés aux HAP à des doses suffisamment importantes avant l'essai pour induire la production de métabolites. En revanche, dès le 3^{ème} jour, une apparition nette de métabolites est observée : malgré les variabilités importantes entre les animaux (de 15 à plus de 45 µg de 1-OH-pyrène excrété dans le lait à 19 jours), l'hydroxypyrene est le composé le plus abondant de ceux recherchés. Il n'est pas détecté dans le lait témoin mais apparaît dès le troisième jour. De plus, au 16^{ème} jour, l'augmentation de la teneur en hydroxypyrene est significativement supérieure à celle du 3^{ème} jour, mais n'est pas significativement différente de celle à 19 jours laissant suggérer un plateau à partir du 16^{ème} jour.

Le 2-OH fluorène est également assez présent dans le lait, avec, toutefois, une excrétion moins importante ; les variabilités inter-individuelles sont moins marquées. Le 3-OH phénanthrène est lui présent en quantité beaucoup plus réduite, et ce, pour les 4 vaches laitières en essai. L'amplitude de réponse des animaux, mêmes si les écarts sont conséquents, est identique pour tous : le métabolite du pyrène est le plus abondant, celui du fluorène et enfin du phénanthrène sont eux moins présents (figure 1). En moyenne de concentration, pour chaque métabolite, les teneurs aux 3^e, 16^e et 19^e jour ne sont pas significativement différentes pour une molécule, mais toujours significativement différentes des teneurs (nulle) au jour 0 (figure 1).

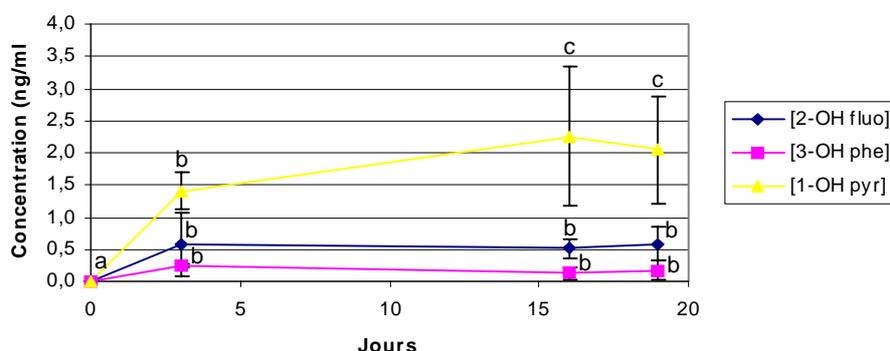


Figure 1. Concentration moyenne de 2-hydroxyfluorène, 3-hydroxyphénanthrène et 1-hydroxypyrene (en ng/ml) excretée au cours de la traite du soir. Les points d'une même courbe ayant des lettres identiques ne sont pas significativement différents.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Cette expérimentation avait pour but de déterminer la biodisponibilité des HAP du sol chez le ruminant laitier. Pour cela, une dose connue de HAP incorporée dans un sol a été donnée à 4 vaches laitières en lactation via la fistule ruminale. Bien qu'il existe quelques écarts dans les excréments de HAP, aucune variation nette de la teneur en molécules mères n'est observée dans le lait au cours de l'essai. Toutefois, les résultats obtenus mettent en évidence une apparition de métabolites au bout du 3^{ème} jour, ce qui est une confirmation de l'exposition aux HAP par l'organisme.

Les différences d'excrétion dans les métabolites peuvent être dues à plusieurs facteurs :

- bien que le pyrène soit le plus lipophile, au vu de la teneur en ses métabolites il semble être plus dégradé que le fluorène et le phénanthrène. D'après les connaissances sur l'affinité des HAP avec le sol, il serait le plus retenu. Cette abondance par rapport aux autres métabolites pourrait alors simplement s'expliquer par une plus forte teneur en fluorène en amont, dans le sol distribué.

- L'hydroxyfluorène est le métabolite trouvé ensuite en abondance, malgré le fait que le fluorène soit le moins concentré des 3 molécules mères. Cela pourrait être dû à une extraction plus adaptée aux propriétés chimiques de ce métabolite qu'à l'hydroxyphénanthrène. De plus, le fluorène, moins lié et moins retenu car peu hydrophobe, aurait tendance à mieux se désorber du sol pour se retrouver disponible pour l'absorption dans le rumen.

- L'hydroxyphénanthrène est détecté dans le lait mais en faible quantité. La technique d'extraction du lait peut ne pas être adaptée à ses caractéristiques.

Il semblerait donc, vu l'apparition des métabolites, que des molécules soient désorbées du sol suite à l'action de solvants « biologiques » dans l'organisme de l'animal. La présence de HAP dans le lait avant l'essai est probablement due à une contamination de fond du lait, suite à l'ingestion (herbe, sol) et l'inhalation de molécules dans leur environnement. Toutefois, cette concentration ne suffirait pas à induire les enzymes capables de métaboliser les molécules mères, une dose minimale étant nécessaire pour leur induction. Une fois l'apport de sol effectué, des molécules peu retenues par cette

matrice seraient libérées, disponibles pour l'organisme et ainsi transformées pour être éliminées par l'organisme sous forme de métabolites.

Cette expérimentation a permis de mettre en évidence une action de l'organisme sur les HAP présents dans le lait. Malgré une concentration des molécules mères invariables dans le lait, la disponibilité et l'extraction des HAP du sol sont montrées par l'apparition de métabolites ; ils confirment la présence de HAP et leur contact avec différents organes de détoxification, donc leur absorption. Ces métabolites seraient issus de la biotransformation des molécules natives, présentes dans le sol et rendues disponibles par l'action de sécrétions enzymatiques biliaires du tractus digestif. L'hypothèse posée était, après apport de sol, de trouver des molécules natives dans le lait. Un calcul de coefficient de transfert des HAP du sol au lait est impossible : aucune concentration représentative ne peut être calculée, les variabilités entre les animaux étant trop importantes. De plus, la quantité de molécules excrétée avant et pendant l'expérimentation n'étant pas différente, le coefficient calculé serait inférieur à celui avant l'essai. La contamination du sol est une étape à ne pas négliger : la concentration réelle après maturation n'est pas celle attendue. La dégradation et la volatilisation sont des paramètres dont il faut tenir compte.

La réponse obtenue n'est que partielle : une mobilisation d'une partie des HAP du sol est possible, mais une proportion précise ne peut pas être définie. Pour permettre d'affiner ces résultats, un essai *in vitro* pourrait aboutir à des conclusions plus pertinentes sur les parts de HAP extractibles du sol par des solvants biologiques. Ce genre de manipulation *in vitro* supposerait de mimer un jus de rumen (jus artificiel avec ajout de bactéries) dans lequel serait incorporé du sol contaminé. Le dosage des molécules, le temps de contact et plusieurs autres paramètres resteraient à définir. Mais la mise en place de cet essai permettrait de répondre à la question du pourcentage de sol extractible et donc disponible par l'animal. La notion de biodisponibilité intégrant le passage dans le système sanguin, une autre voie pourrait étudier le passage des HAP du compartiment rumen vers le sang (cinétique, comparaison de concentration entre les différentes veines et artères). Ce type d'essai nous indiquerait à quel niveau a lieu l'absorption, ainsi que dans quelles proportions.

REFERENCES

- [1] Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., Soulas G., 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols, transformations et dissipations. Forum « le sol, un patrimoine menacé ? », Paris.
- [2] Wild S.R., Jones K.C., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution* 88, 91-108.
- [3] Pathirana S., Connell D.W., Vowles P.D., 1994. Distribution of Polycyclic aromatic hydrocarbons in an urban roadway system. *Ecotoxicology and environmental safety* 28, 256-269.
- [4] Smith K.E.C, Thomas G.O., Jones K.C., 2001. Seasonal and species differences in the air-pasture transfer of PAH. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2156-2165.
- [5] Grova N., Feidt C., Crépineau C., Laurent C., Lafargue P.E., Hachimi A., Rychen G. Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons levels in milk collected near potential contamination sources. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4640-4642.
- [6] Meharg A.A., Wright J., Dyke H., Osborn D., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon dispersion and deposition to vegetation following a large scale chemical fire. *Environmental Pollution* 99, 29-36.
- [7] Bryselbout K., Henner P., Carsignol J., Lichtfouse E., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbon in highway plants and soil. Evidence for a local distillation effect. *Analisis* 28, 32-35.
- [8] Tuhackova J., Cajthaml T., Novak K., Novotny C., Mertelik J., Sasek V., 2001. Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environmental Pollution* 113, 255-262.
- [9] Kottler B.D., Alexander M., 2001. Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to

sequestration in soil. *Environmental pollution* 113, 293-298.

[10] Grova N., Laurent C., Feidt C., Rychen G., Laurent F., 2000. Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *J. Mass Spectrom.* 6, 457-460.

[11] Mayland H.F., Florence A.R., Rosenau R.C., Lazar V.A., Turner H.A., 1975. Soil ingestion by cattle on semiarid range as reflected by titanium analysis of feces. *Journal of range management* 28, 448-452.

[12] Reeves W.R., MC Donald T.J., Bordelon N.R., George S.E., Donnelly K.C., 2001. Impacts of aging on in vivo and in vitro measurements of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons availability. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1637-1643

[13] Bordelon N.R., Doennelly K.C., King L.C., Wolf D.C., Reeves W.R., George S.E., 2000. Bioavailability of the genotoxic components in coal tar contaminated soils in fischer 344 rats. *Toxicol Sciences* 56, 37-48.

[14] Beaune P.H., Lorient M.A., 2000. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques: aspects métaboliques. *M/S* 2000 16, 1051-1056.

[15] Viau C., Diakité A., Ruzgytė A., Tuchweber B., Blais C., Bouchard M., Vyskocil A., 2002. Is 1-hydroxypyrene a reliable bioindicator of measured dietary polycyclic aromatic hydrocarbon under normal conditions? *Journal of Chromatography B* 778, 165-177.