



CSI-ACHTIG SPEURWERK OP RIKILT

Dioxine-detectives

Calamiteiten met dioxines verschijnen met regelmaat in het nieuws. Ze stellen RIKILT-onderzoekers Wim Traag en Ron Hoogenboom voor grote technische uitdagingen. Als ware detectives gaan ze op onderzoek uit om de bron van dioxineverontreinigingen te achterhalen.

Wim Traag (links) en Ron Hoogenboom bij de GC-HRMS-opstelling.

‘Dioxine neergeslagen bij brand in Weurt’, ‘Dioxine-uitstoot Thermphos ver boven de norm’ en ‘Te veel dioxine in paling grote rivieren’. Het zijn enkele krantenkoppen van de afgelopen paar maanden die duidelijk maken hoe vaak calamiteiten met dioxine voorkomen. De meest bekende was waarschijnlijk de Belgische dioxinecrisis in 1999, toen dioxineconcentraties in eieren en kippenvlees

de norm meer dan driehonderd keer overschreden. De meeste calamiteiten zijn gelukkig minder ernstig, maar technisch vaak niet minder uitdagend.

Schadelijke effecten

De naam dioxine wekt de suggestie van een enkele stof. In werkelijkheid gaat het om een groep van 210 verschillende organische verbindingen. Ze bestaan uit twee gechloreerde ben-

zeenringen die verbonden zijn door één of twee zuurstofbruggen – vandaar de naam, di-oxo = twee zuurstof. Zeventien van deze dioxines zijn zeer giftig. De meest giftige variant, Tetrachloordibenzodioxine (TCDD), is zelfs de meest giftige stof die door mensen wordt gemaakt. De stof veroorzaakt een vorm van huiduitslag, chlooracne, maar kan ook leiden tot kanker, verminderde vruchtbaarheid

en aantasting van het immuunsysteem, de schildklier en de lever. Door dat die zeventien dioxines zich ophopen in lichaamsvet, kan ook een langdurige blootstelling aan lage concentraties op termijn schadelijke effecten veroorzaken. Om die reden is de norm voor dioxinegehalten in levensmiddelen zeer laag. De toegestane wekelijkse inname is vastgesteld op 14 picogram per kilogram lichaamsgewicht. Daarbij worden alle concentraties van de verschillende dioxines op basis van hun relatieve schadelijkheid omgerekend naar concentraties van de meest giftige variant (TCDD) en vervolgens bij elkaar opgeteld.

24/7

Dioxines komen vrij bij verbranding van gechloreerde koolwaterstoffen, zoals PVC en andere plastics. Ze kunnen echter ook in de natuur ontstaan en worden bijvoorbeeld gevonden in sommige kleisoorten en kalkafzettingen. Polychloorbifenylen (PCB's), die vaak ook onder dioxines worden gerekend, zijn in het verleden veel gebruikt in industriële processen, bijvoorbeeld in transformatoren. Sommige dioxines kunnen ook voorkomen in PCB-mengsels en bepaalde bestrijdingsmiddelen, zoals pentachloorfenol en het ontbladeringsmiddel 2,4,5-T (*agent orange*). De controle op dioxines in voedingsmiddelen gebeurt in Nederland door het RIKILT, onderdeel van Wageningen University & Research Centre. Zij analyseren jaarlijks een kleine duizend steekproefmonsters en doen daarnaast onderzoek in verband met calamiteiten. Analytisch chemicus Wim Traag

'We werden we uitgelachen omdat het onmogelijk leek'

heeft samen met toenmalige collega Hans van Rhijn het dioxinelaboratorium van het RIKILT in 1989 opgezet naar aanleiding van een calamiteit met een vuilverbrandingsinstallatie. Traag is tevens projectleider voor voedingsgerichte calamiteiten. Sinds de Belgische dioxinecrisis heeft het labo-

ratorium de capaciteit nog verder opgevoerd. Traag vertelt: "We hebben nu meer mensen getraind dan we normaal gesproken nodig hebben. Als het moet werken we in ploegendienst, vierentwintig uur per dag, zeven dagen per week."

Fingerprint

Het resultaat van een dioxineanalyse op het RIKILT-laboratorium is niet alleen een totaalconcentratie aan dioxines, maar ook een overzicht van



Opstelling voor de zuivering van dioxinemonsters door middel van drie opeenvolgende kolommen. Op de tweede serie kolommen van links wordt net een monster van ei gezuiverd (rood is het vet van het ei).

de concentraties van de zeventien meest giftige varianten. Dit wordt het congenerepatroon genoemd. Traag legt uit: "Dit patroon werkt als een soort fingerprint. Je kunt zulke patronen naast elkaar leggen om ze te vergelijken, en daarmee de herkomst van de dioxines achterhalen." Zo vertonen dioxines van natuurlijke afkomst een heel ander congenerepatroon dan bijvoorbeeld dioxines uit PCB-

olie. Als projectleider voor voedingsgerichte calamiteiten behoort het tot de taak van RIKILT om in geval van een calamiteit met behulp van deze congenerepatronen uit te zoeken waar de gevonden dioxineverontreiniging vandaan komt. Dat levert CSI-achtige verhalen op. Zo vonden Traag

en zijn collega's in 2004 verhoogde dioxineconcentraties in de melk van een boerderij uit Lelystad. Vreemd genoeg leek het congenerepatroon op het patroon van een bepaalde kleisoort, kaoliniet. Traag onderzocht monsters van tal van locaties op de betreffende boerderij, maar kwam

nergens deze klei tegen. Het enige wat verontreinigd bleek te zijn, waren de aardappelschillen waarmee de koeien werden bijgevoerd. De schillen waren afkomstig van een nabijgelegen fritesfabriek [McCain, red.]. Het bleek dat deze fabriek sinds kort water met klei in plaats van water met zout gebruikte om aardappelen op soortelijk gewicht (maat voor de kwaliteit) te sorteren. De gebruikte Duitse mergelklei was de bron van de dioxinebesmetting. De dioxines zaten alleen op de schil van de aardappels, de frites zelf waren niet verontreinigd. Afgelopen jaar had Traag nog te maken met een dioxineverontreiniging in biologische eieren, waarbij hij uit het patroon kon afleiden dat dit afkomstig was van PCB-olie. De details van het patroon maakten nog meer duidelijk. Traag: "Het patroon leek niet helemaal op het patroon van de Belgische dioxinecrisis, toen PCB-olie vermengd was met kippenvoer.

Het leek meer op het patroon van een calamiteit in Ierland in 2008. Daar was veevoer gedroogd met het verbrandingsgas van olie die verontreinigd was met PCB's." Ook in dit geval bleek het voer de bron van de besmetting te zijn. Traag concludeerde dat de maïs, die de betreffende boerderij als kippenvoer had gebruikt, waarschijnlijk gedroogd is met verbrandingsgas van PCB-olie. Die conclusie moet overigens nog wel bevestigd worden.

Innovatief werk

Het vaststellen van de dioxineconcentratie en het bijbehorende congenerenpatroon stelt Traag en zijn collega's wel voor een grote technische uitda-

ging. "Het probleem bij dioxineanalyses is dat de gehalten zo laag zijn dat je heel gevoelige apparatuur nodig hebt om dat te meten, en heel ver moet gaan in de opzuivering", stelt Traag. Vandaar dat hij continu bezig is om de technologie verder te ontwikkelen. "Innovatie is voor ons echt een sleutelwoord. In onze laboratoriumopstellingen zit heel veel innovatief werk." Dergelijke ontwikkelingen maken dat de analyses hem na al die jaren nog steeds blijven boeien. Bovendien hebben ze gezorgd voor een flinke tijd- en kostenbesparing, vertelt Traag: "Toen we begonnen, hanteerden we een levertijd van veertien dagen met een kostprijs van fl. 4000 per monster. Nu kost een analyse nog maar € 700 met een levertijd van twee tot drie dagen."

Automatisch indampen

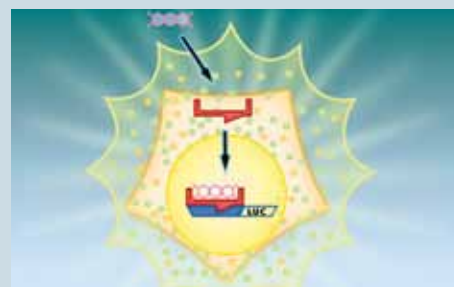
Het is standaardprocedure voor dioxi-

neanalyses binnen het RIKILT om de dioxines eerst uit monsters te extraheren en vervolgens te zuiveren met behulp van drie verschillende kolommen. Daarna worden de dioxines ingedampt en geanalyseerd met gaschromatografie, gekoppeld aan hoge resolutie massaspectrometrie (GC-HRMS).

Een belangrijke verbetering in de procedure was de invoering van een grootvolume-injectiesysteem bij de gaschromatograaf. Hiermee kunnen Traag en zijn collega's monsters van 100 μ l injecteren in plaats van 2 μ l. Traag vertelt: "Toen we hiermee begonnen, werden we op congressen uitgelachen omdat het iets onmogelijks leek, maar nu doen we het routinematig." Het grote voordeel van dit systeem is dat monsters veel minder hoeven te worden ingedampt. "Voorheen dampten we monsters in tot 10

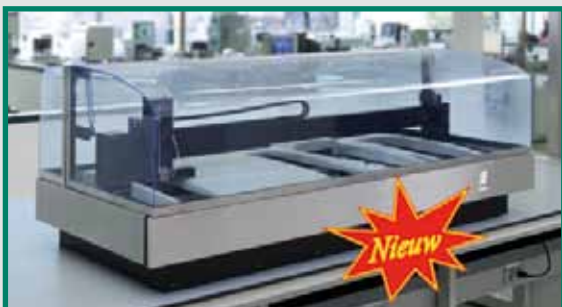
DR CALUX-test

De Dioxine-Receptor Chemisch geActiveerde Luciferase gen eXpressie (DR CALUX)-assay is gebaseerd op de biologische respons van cellen op dioxines en dioxineachtige stoffen. Als dioxine bij een cel komt, bindt het in de cel aan een speciale receptor, die vervolgens naar de celkern beweegt. In de celkern bindt deze dioxinereceptor dan aan een zogenaamd dioxinerespons-element. De cellen van de CALUX-assay zijn genetisch zo gemodificeerd, dat deze binding ertoe leidt dat een luciferasegen geactiveerd wordt, waardoor het lichtgevende enzym luciferase aangemaakt wordt. Dat enzym kan licht produceren. De lichtopbrengst van deze cellen is daarmee een indicatie voor de aanwezigheid van dioxines of dioxineachtige stoffen.



Principe van de DR CALUX-test.
(Illustratie: Idiomorf)

SKALAR



BluVision™ Discrete Analyzer

Met trots introduceren we onze meest recente ontwikkeling, de BluVision™ Discrete Analyzer voor de automatisering van colorimetrische bepalingen. De BluVision™ is in het bijzonder ontworpen voor laboratoria, die een grote variatie aan monstertypes en matrices analyseren, conform NEN 6604, EPA, ISO, DIN, etc.

Typische parameters zijn:
Ammonium, Fosfaat, Silicaat, Nitraat,
Sulfaat, Nitriet, Chloride, etc.



Ionisatie-element van de HR-MS.

μ l en moesten we goed oppassen dat we die laatste druppel niet ook verdampen. Nu dampen we monsters volledig automatisch in tot een volume van een halve milliliter.” Op dit moment werkt Traag samen met een Amerikaans bedrijf aan een nieuwe opstelling. Daarmee kan hij zelfs de complete extractie en opzuivering volledig automatisch laten verlopen. “Het apparaat om tussentijds het oplosmiddel te verwisselen is zelfs speciaal voor ons ontwikkeld”, vertelt Traag trots. Innovatie aan de kant van de analyse is op dit moment nog te hoog gegrepen. “Het zou mooi zijn als er alternatieven beschikbaar zouden komen

voor GC-HRMS, omdat deze techniek erg duur is.” Is tweedimensionale gaschromatografie, oftewel GCxGC, geen optie? Traag: “Die techniek hebben wij wel in huis, en gebruiken wij bijvoorbeeld om informatie te verzamelen over de herkomst van een dioxineverontreiniging. Maar voor de analyse van dioxines zelf is de techniek nu nog niet gevoelig genoeg.”

Nieuwe contaminanten

De onderzoekers konden al wel het aantal analyses met GC-HRMS verminderen door de invoering van een screeningtest. Hiermee kunnen ze snel onderscheid maken tussen schone en

verdachte monsters. Alleen bij foute boel is nadere analyse nodig met GC-HRMS. De test is geschikt voor grote aantallen monsters en mede daardoor relatief goedkoop.

Ron Hoogenboom is als toxicoloog verantwoordelijk voor de ‘DR CALUX-assay’ (zie kader). “Deze test werkt op een heel andere manier”, legt hij uit. “We meten niet de structuur van de stoffen, maar hun effect. Daardoor komen we ook nieuwe contaminanten op het spoor, die een vergelijkbaar effect veroorzaken als dioxines. Natuurlijk hebben we soms te maken met vals-positieve resultaten. Omdat we de DR CALUX-assay zelf meeontwikkeld hebben, kunnen we vrij goed inschatten wanneer dat het geval is. Zo niet, dan gaan we uitzoeken om wat voor nieuwe contaminant het gaat. Zo ontdekten we bijvoorbeeld broomdioxines, die ontstaan bij verbranding van broomhoudende vlamvertragers in meubels en apparatuur en bij de productie van broomhoudende verbindingen. We hopen op die manier schadelijke stoffen te ontdekken voordat echt een probleem ontstaat bij dieren of mensen. Dat is natuurlijk het mooiste, maar ook het moeilijkste.”

Els van den Brink

Fotografie: Marco Vellinga

- 14 sequentiële parameters mogelijk
- 15 mm optische weglengte voor lage detectielimieten
- 200 monster-, 10 spoedmonster-, 50 standaard/QC-, 36 reagentia- en 760 analyse posities



Typische toepassingsgebieden zijn drink-, afval-, grond- en oppervlakte water

Skalar uw partner in chemische automatisering

Skalar Analytical BV
Tinstraat 12
4823 AA Breda
Nederland
Tel: +31 (0)76 5486 486
Email: info@skalar.com

Skalar Belgium bvba
Antwerpsestraat 126
2850 Boom
België
Tel: +32 (0)3 888 96 72
Email: info@skalar.be

Internet: www.skalar.com