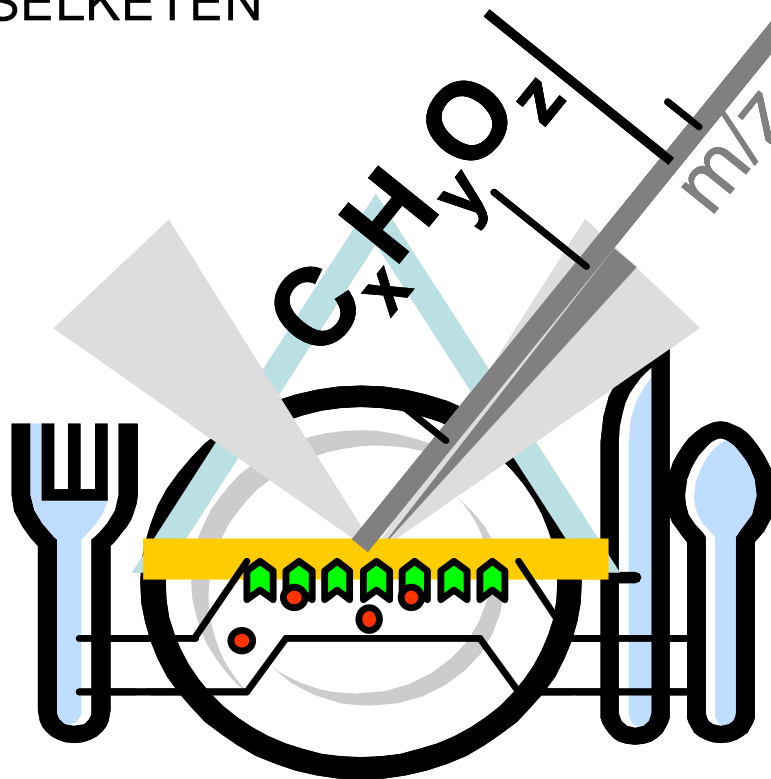


# SPEUREN NAAR ONBEKENDE CONTAMINANTEN IN DE VOEDSELKETEN



[=figuur 0]

Druk en lay-out: Wageningen UR Communication Services,

© Copyright 2008 M.W.F. Nielen, Wageningen UR

ISBN: xxx-xx-xxxx-xxx-x

## **SPEUREN NAAR ONBEKENDE CONTAMINANTEN IN DE VOEDSELKETEN**

Mijnheer de Rector Magnificus, geachte collega's, beste familieleden,  
vrienden en belangstellenden,

'De chemicus als Sherlock Holmes', zo luidt de kop boven een interview uit 2002 met mijn hooggeleerde collega Rainer Stephany van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, het RIVM. Het interview gaat over het speuren naar de aanwezigheid van hormonen in slachtvee<sup>1</sup>. Net voordat Crime Scene Investigation dé televisiehit zou worden, en forensische opleidingen als paddenstoelen uit de grond zouden schieten, werd er in dit artikel reeds gesproken over 'echt detectivewerk'. Een afdruk van dit artikel hangt sindsdien op mijn werkkamer aan de muur. Niet omdat ik toen al kon bevroeden dat het in 2008 zou komen tot een fusietraject van de desbetreffende RIVM afdeling met het RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid. Maar omdat de kop boven dit artikel appelleert aan de kern waar het om draait in de analytische scheikunde in het algemeen en bij mijn leeropdracht in het bijzonder: de vraag wat zit er in, hoeveel, en waar komt het vandaan. Deze vraag was (en is) voor mij persoonlijk dermate interessant, dat ik een wetenschappelijke loopbaan als analytisch chemicus verkoos boven het destijds lucratieve beroep van apotheker. Omdat de bevindingen van de analytisch chemicus kunnen leiden tot bestuurs- en/of strafrechtelijke consequenties, met financieel-economische en sociale gevolgen, moet hij (of zij) niet alleen zorgen dat hij wetenschappelijk correct handelt. De bevindingen moeten in de rechtszaal overeind kunnen blijven, een aspect dat ook de echte detective voortdurend in zijn achterhoofd moet houden. De kop boven het interview 'De chemicus als Sherlock Holmes' kan ook andersom worden gelezen: het door Sir Arthur Conan Doyle gecreëerde fictieve karakter Sherlock Holmes is namelijk een chemicus met een brede wetenschappelijke interesse<sup>2</sup>. Sterker nog, hij is in 2002 zelfs benoemd tot het enige fictieve erelid van de Royal Society of Chemistry, op grond van zijn

bijdragen aan de forensische wetenschap. Een ander fictief karakter, Gil Grissom uit de televisieserie CSI, heeft met Sherlock Holmes zijn gedrevenheid en zijn voorliefde voor objectiviteit en logica gemeen. Gil Grissom is echter een bioloog en entemoloog<sup>3</sup>; ook onder speurneuzen is de trend van chemie naar life sciences blijkbaar onontkoombaar!

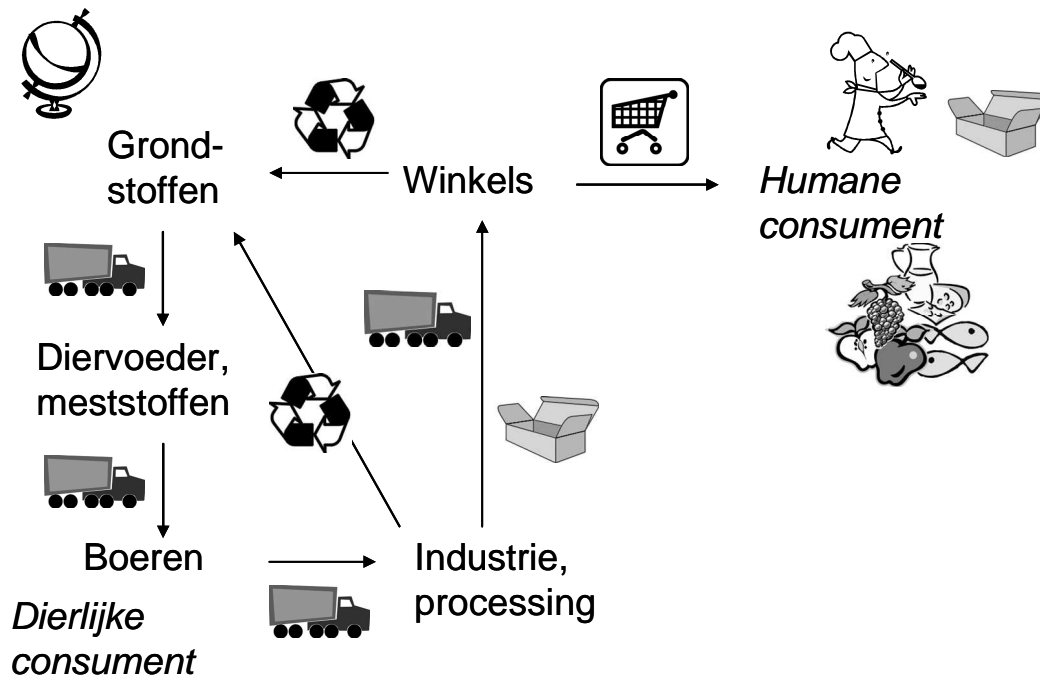
In deze rede wil ik u laten meekijken in de 'gereedschapskist' van de speurder naar onbekende contaminanten; wat heeft hij nodig, welke wetenschappelijke disciplines en technieken zijn daarbij essentieel en behulpzaam? En kan dit proactief zoeken naar nieuwe risico's leiden tot het vinden van 'de graal', een onbekende voedselcontaminant? Alvorens dit te doen is het echter noodzakelijk om stil te staan bij de complexiteit van het contaminantenprobleem.

## **Contaminanten in de voedselketen**

*"H.L. Mencken once said, 'There's an easy solution to every human problem – neat, plausible...and wrong.' So if the solution to our problem is not neat, plausible and wrong; then it could be messy, unlikely and right. Right?"*

*–Gil Grissom.*

De voedselketen zoals vereenvoudigd weergegeven in figuur 1 is bijzonder complex en vele lokale en globale factoren dragen bij aan de uiteindelijke kwaliteit en veiligheid van het voedsel op ons bord<sup>4</sup>. Diervoedergrondstoffen worden geïmporteerd uit alle delen van de wereld onder verschillende klimatologische-, oogst- en opslagomstandigheden. Daarnaast kunnen reststromen uit de voedingsindustrie en uit de productie van biobrandstoffen verwerkt worden in diervoeders. Deze primaire stromen dragen bij aan het voorkomen van microbiologische en chemische contaminanten in de voedselketen. Bij chemische contaminanten kan onder meer gedacht worden aan milieuverontreinigingen, resten van pesticiden en diergeneesmiddelen gebruik, stoffen die uit verpakkingen migreren, en aan natuurlijke toxinen afkomstig van schimmels en planten. De diervoederproducent zal proberen om hieruit een goed product te maken en afhankelijk van de verlangde



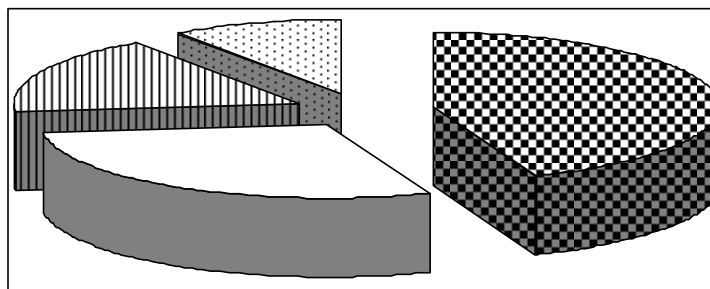
Figuur 1. Vereenvoudigde weergave van de voedselketen<sup>4</sup>

specificaties één of meerdere additieven of diergeneesmiddelen kunnen toevoegen. Dit laatste kan dan weer leiden tot versleping, het voorkomen van diergeneesmiddelresten in niet-gemedicineerde diervoederstromen. Vervolgens kunnen agrarische bedrijven middels hun pesticiden en antibiotica gebruik bijdragen aan het voorkomen van contaminanten in de voedselketen. De voedingsindustrie verwerkt en bewerkt, de winkel bewaart en verkoopt, en uiteindelijk belandt het voedsel na vele transport- en opslag schakels bij de consument. Ook de consument zelf draagt bij aan voedselcontaminatie, bijvoorbeeld door slechte hygiëne tijdens de bereiding, te hoge bewaartemperatuur, én door de chemie tijdens het bereiden van ons eten: ongewenste stoffen kunnen gevormd, afgebroken, of later in het lichaam juist geactiveerd worden. De feitelijke chronische blootstelling van de consument aan deze complexe cocktail van voedselcontaminanten is niet eenvoudig vast te stellen. Dat geldt evenzeer voor de vaststelling van de gecombineerde effecten van zoveel verschillende stoffen op relatief lage afzonderlijke concentratieniveaus! Voedselincidenten komen wat dat betreft gemakkelijker aan het licht. In een recente retrospectieve studie is gebleken dat daarbij de menselijke factor een belangrijke is, met name onwetendheid en frauduleus

en illegaal handelen<sup>5</sup>. Een recent fraude dieptepunt is het inmengen van de stof melamine in babymelkpoeder in China, met als voorlopig resultaat 54000 zieke en 4 overleden kinderen. De in mijn ogen prehistorische standaardmethode voor het eiwitgehalte in voeding moest vroeg of laat wel leiden tot ernstige fraudegevallen. Deze methode ziet namelijk het verschil niet tussen een echt eiwit en een willekeurig ander stikstofhoudend molecuul. Overigens lijkt niet de contaminant melamine zelf, maar met name de combinatie van melamine met een andere contaminant, cyanuur-zuur, de veroorzaker van de nierstenen<sup>6</sup>. Een voorbeeld van risico's tengevolge van illegaal handelen dicht bij huis is de acute intoxicatie na het eten van vlees, veroorzaakt door residuen van de verboden groeibevorderaar clenbuterol. Gedocumenteerde cases zijn in de literatuur beschreven voor Portugal, Spanje, Frankrijk en Italië<sup>7</sup>.

Binnen de Europese Unie bestaat een waarschuwing en informatiesysteem, het Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Daarmee kan een beeld worden verkregen over contaminanten in de voedselketen voor zover die gemeld zijn (figuur 2). In de periode 2003-2007 bestond 90% van alle meldingen uit chemische contaminanten (44%), natuurlijke toxines (29%) en microbiologische gevaren (17%)<sup>8</sup>. Ook die

### juli 2003 - juni 2007



**Chemisch**

**Mycotoxines**

**Microbiologisch**

**Overigen, incl. fraude, etikettering, verpakking, hygiene, biologisch, etc.)**

Figuur 2. Voedselcontaminatie volgens de rapportage van het RASFF<sup>4,8</sup>, totaal 12.641 meldingen.

microbiologische gevaren zijn in Nederland zeker relevant: in 2007 werden door consumenten bij de Voedsel en Waren Autoriteit 621 voedselinfecties gemeld waarbij sprake was van 120 ziekenhuisopnames<sup>9</sup>. Maar microbiologische contaminatie vormt geen onderdeel van mijn leeropdracht. Er kunnen wat mij betreft kritische kanttekeningen gezet worden bij het RASFF beeld. Immers, alleen die chemische stoffen die in een lidstaat daadwerkelijk en met enige regelmaat gemeten worden kunnen uiteindelijk leiden tot een RASFF melding: 'meten is weten', maar ook, 'niet-meten is niet-weten'! Dit laatste is uiteraard niet erg geruststellend voor de consument, maar in zekere zin wel voor producenten en overheden: waar je geen weet van hebt, hoef je ook niet direct actie op te ondernemen.

Volgens de Europese voedselveiligheidsverordening (EG) 178/2002 dient de Europese Voedselveiligheids Autoriteit, de EFSA, procedures op te stellen om nieuwe risico's te kunnen opsporen, de zogenaamde 'emerging risks'<sup>10</sup>. Hieronder valt het proactief zoeken naar toekomstige risico's voor de humane en diergezondheid tengevolge van chemische stoffen in diervoeders en voedselproducten. Daarbij kan het gaan om (i) onvolledig gekarakteriseerde bekende risico's, om (ii) onbekende nieuwe vormen van bekende risico's en om (iii) nog volledig onbekende risico's. Enkele voorbeelden van onvolledig gekarakteriseerde bekende risico's in de voedselketen zijn perfluorstoffen, endocriene stoffen, specifieke metalen, specifieke plantentoxines, etc. Emerging risks zijn zeker niet denkbeeldig en kunnen onverwacht snel actueel worden. Zo stroomde er in juli 2008 met perfluorverbindingen verontreinigd bluswater de Ringvaart van de Haarlemmermeerpolder en het Noordzeekanaal in. Uit voorzorg werd er daarom maar aangeraden om geen vis te vangen en te consumeren<sup>11</sup>.

## **Onbekende contaminanten**

*"You see, but you do not observe"*

*--Sherlock Holmes*

Ondanks het feit dat zowel onbekende nieuwe vormen van bekende contaminanten als volledig onbekende voedselcontaminanten onder de

definitie van 'emerging risks' vallen, wordt er niet erg actief naar deze stoffen gezocht. Terwijl dit toch voor een speurder de krenten in de pap zouden moeten zijn. Sherlock Holmes en Gil Grissom willen ook niet iedere week dezelfde moord oplossen, maar worden juist uitgedaagd door nieuwe onbekende situaties! Een specifieke categorie contaminanten waarbij onbekende nieuwe vormen verwacht mogen worden zijn de natuurlijke toxines zoals schimmeltoxines (mycotoxines), plantentoxines en schelpdiertoxines. Deze stoffen kunnen in gebonden vormen voorkomen, bijvoorbeeld geconjugeerd met suikers of vetzuren. De fysisch-chemische eigenschappen veranderen hierdoor dermate dat deze contaminanten geheel of gedeeltelijk gemist worden in de analyse. Chemisch gezien is het echter waarschijnlijk dat deze conjugaten zullen splitsen in het maag-darmkanaal. Hierdoor is de feitelijke blootstelling van mens en dier aan deze stoffen hoger dan berekend op basis van de analyse van de vrije toxines. Een voorbeeld is het voorkomen van geglucoosileerde vormen van de *Fusarium* mycotoxines deoxynivalenol (DON) en zearalenon in tarwe, maïs en andere gewassen<sup>12</sup>.

Fermentatieprocessen in de voedingsindustrie kunnen de verhouding tussen het voorkomen van de vrije en de geglucoosileerde vormen sterk beïnvloeden zoals recent aangetoond voor bier<sup>13</sup>. In sommige bieren is het gehalte aan geglucoosileerd deoxynivalenol erg hoog. Bij de veronderstelde splitsing in de maag kan dan een dusdanige blootstelling ontstaan dat al bij twee halve liters bier de nog acceptabele dagelijkse inname norm wordt overschreden. Het ligt zeer voor de hand dat alle natuurlijke toxines in meer of mindere mate geconjugeerd voor zullen komen. Bovendien is het denkbaar dat onder invloed van de klimaatverandering de aard en de mate van deze conjugatie zal wijzigen waardoor men bedacht moet zijn op nieuwe onbekende vormen van de bekende natuurlijke toxines.

Een categorie contaminanten waarbij volledig onbekende stoffen verwacht kunnen worden is een subklasse van de diergeneesmiddelen, de verboden groeibevorderaars. Niet alleen de natuur is chemisch creatief, er wordt door de mens chemisch gesleuteld aan steroïdhormonen en beta-agonisten ten behoeve van illegale toepassing in de veehouderij. Verhoogde spieraanzet, snellere groei en betere voederconversie zijn economisch gezien bijzonder verleidelijk en lucratief. In analogie met de sportdoping problematiek

worden er stoffen gesynthetiseerd en gemodificeerd met het expliciete doel dat ze niet opgespoord kunnen worden door de controlelaboratoria. Bovendien worden deze stoffen in tegenstelling tot reguliere farmaceutica niet onderworpen aan uitgebreide studies om de werking en de veiligheid te karakteriseren. Bij nieuwe illegale varianten van beta-agonisten zijn acute intoxicaties na consumptie van vlees zeker mogelijk, zoals de clenbuterol-historie ons heeft geleerd<sup>7</sup>. In het geval van nieuwe varianten van steroïdhormonen is een voorzorgbeginsel gerechtvaardigd. Lage doseringen van steroïden kunnen al leiden tot fysiologische effecten en specifieke consumenten zoals prepuberale kinderen zijn extra kwetsbaar.

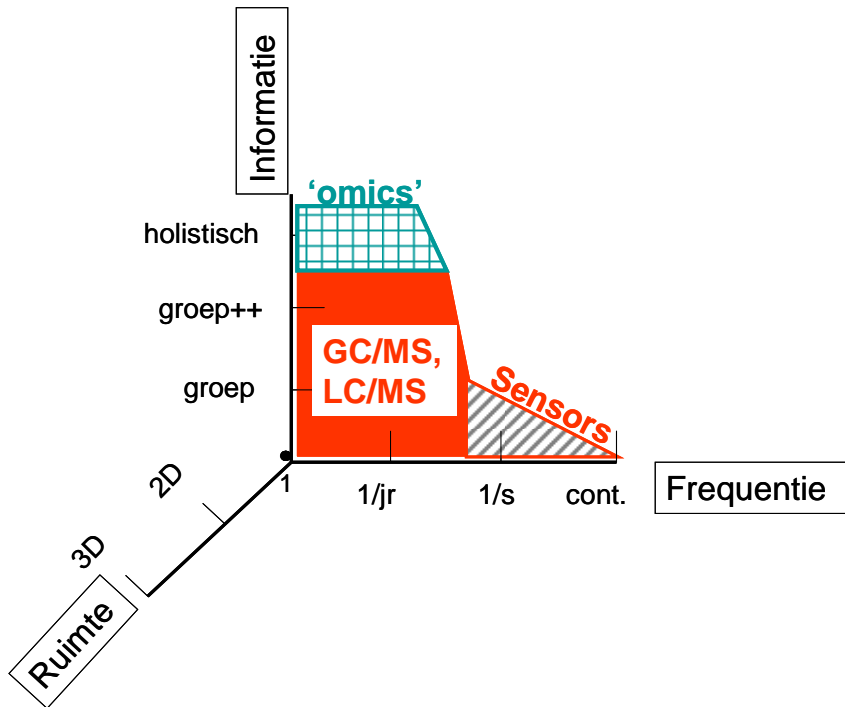
## De gereedschapskist

*“It is a capital mistake to theorize before one has data. Insensibly one begins to twist facts to suit theories, instead of theories to suit facts.”*

*–Sherlock Holmes*

Meten is weten. Zonder harde meetgegevens is er geen kennis over de werkelijke blootstelling aan voedselcontaminanten en ook geen theorievorming over het gedrag van contaminanten in de voedselketen. Een arsenaal aan meetmethoden bevindt zich in de analytisch-chemische ‘gereedschapskist’. Op een hoger abstractieniveau kunnen deze meetmethoden gepositioneerd worden binnen een driedimensionaal onderzoeksveld van informatie op de y-as versus meetfrequentie op de x-as versus ruimte (ofwel: meetpositie in het monster) op een z-as, zie figuur 3. In de oorsprong bevindt zich het minimumscenario waarbij slechts eenmalige informatie wordt verkregen over de aanwezigheid van één chemische stof in het gemiddelde monsterextract. Op de meetfrequentie-as, van eenmalige tot continuumeting, komen we de ontwikkeling van instrumentele analysemethoden en sensoren tegen. Op de ruimte-as, van een gemiddelde tot een 3D resultaat binnen het te onderzoeken monster, is de ontwikkeling en toepassing van imaging technieken cruciaal. Vooralsnog zijn er echter voor contaminanten nauwelijks ontwikkelingen en toepassingen op deze as





*Figuur 3. Driedimensionaal analytisch-chemisch onderzoeksveld voor de analyse van voedselcontaminanten.*

beschreven. Wellicht dat imaging massaspectrometrie hierin verandering kan gaan brengen<sup>14</sup>. Een interessante ontwikkeling op dat terrein is de zogenaamde DESI techniek: het oppervlak van een te onderzoeken object kan onder omgevingscondities geanalyseerd worden door het te beschieten met geladen oplosmiddel druppeltjes. Eigenlijk alsof je het monster onder een soort chemische microscoop legt. Dankzij een subsidie van NWO was het mogelijk om een dergelijk instrument naar Wageningen te halen. De eerste resultaten zijn nu nog slechts één-dimensionaal, maar al wel veel belovend voor het zoeken naar voedselcontaminanten. Zoals bijvoorbeeld pesticiden-residuen in graankorrels<sup>15</sup> of giftige plantentoxines in Jacobskruiskruid. De toepasbaarheid van deze technologie voor forensisch onderzoek was al langer bekend. De analyse van sporen van cocaine op dollarbiljetten en van explosieven, vormen de geijkte voorbeelden. Maar ook bij hormonen criminaliteit kan de DESI-techniek van pas komen. Recent is dit aannemelijk gemaakt door de succesvolle identificatie van sporen van corticosteroiden in een stofmonster, afkomstig van een gesimuleerd forensisch onderzoek<sup>16</sup>. Op de informatie-as wordt steeds meer verlangd en is ook steeds meer mogelijk, dankzij de ontwikkelingen op het gebied van snelle en

comprehensive chromatografie, fast-scanning triple-quadrupool tandem massaspectrometrie en full-scan hoge resolutie accurate massaspectrometrie. Hele groepen van contaminanten kunnen snel gemeten worden<sup>17</sup> en er kan tevens gericht worden gezocht naar *in silico* voorspelde structuurvarianten zoals metabole omzettingsproducten. Natuurlijk, het gaat om honderden stoffen, soms op een laag concentratieniveau en in aanwezigheid van een overmaat aan storende componenten uit de monstermatrix. Op zichzelf al een gigantische uitdaging voor een analytisch chemicus, maar het is in ieder geval wél duidelijk waarnaar gezocht moet worden! De analysemethode zal dan ook ingeregeld worden op het gevoelig en selectief meten van één of meerdere groepen van de bekende voedselcontaminanten, inclusief voorspelde chemische varianten. Het grote manco van zo'n gerichte benadering is dat de analysemethode feitelijk blind is voor onbekende nieuwe vormen van contaminanten, en ook de volledig onbekende contaminanten worden gemist. (Overigens, is het dankzij de full-scan massaspectrometrie wel mogelijk om retrospectief in de meetgegevens te zoeken zodra er een nieuw risico gedefinieerd is. Vooropgesteld dat de nieuwe stof zich tijdens de monsteropwerking, scheiding en ionisatie vergelijkbaar gedraagt als de bekende stoffen waarvoor de methode werd ontworpen).

De complete informatie over de gehele 'soep' van voedselcontaminanten in een monster, zou in potentie kunnen worden verkregen met holistische 'omics'-benaderingen. Het met behulp van goede alignmentprogramma's en multivariate statistiek speuren naar afwijkingen ten opzichte van een 'normaal' chemisch profiel kan leiden tot zowel de identificatie van bekende- als ook van volledig onbekende voedselcontaminanten, analoog aan metabolomics onderzoek en het ontdekken van nieuwe metabole biomarkers. Een te groot optimisme is in dit verband echter niet gerechtvaardigd. Niet alleen vanwege het simpele feit dat het praktisch en financieel onhaalbaar is om op monsters uit de voedselketen een groot aantal verschillende instrumentele analysemethoden los te laten. Nodig om daarmee het gehele dynamische bereik aan fysisch-chemische eigenschappen en concentraties van stoffen te kunnen afdekken. Nee, ook en vooral niet omdat die 'normaalsituatie' een bottleneck in plaats van een uitdaging kan zijn. In tegenstelling tot vergelijkend 'omics'-onderzoek onder

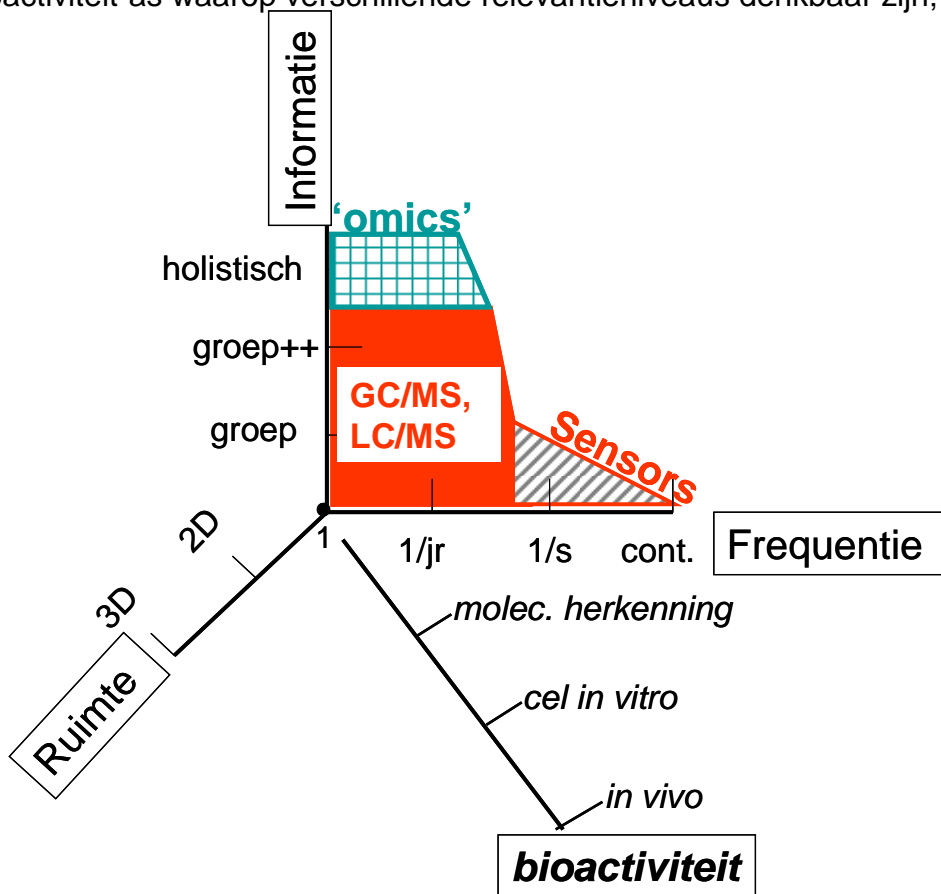
goed gedefinieerde laboratoriumomstandigheden is de fluctuatie van het chemisch profiel naar verwachting bijzonder groot, tengevolge van het complexe karakter van de voedselketen en het grote aantal bronnen van inherente biologische variatie. Desalniettemin is het bijzonder interessant om de grenzen van deze 'omics'-benaderingen te onderzoeken zoals onder andere in het promotieonderzoek van Jeroen Rijk gebeurt.

## De verbeterde gereedschapskist

*"Why do they think they can fool us?"*

*--Gil Grissom*

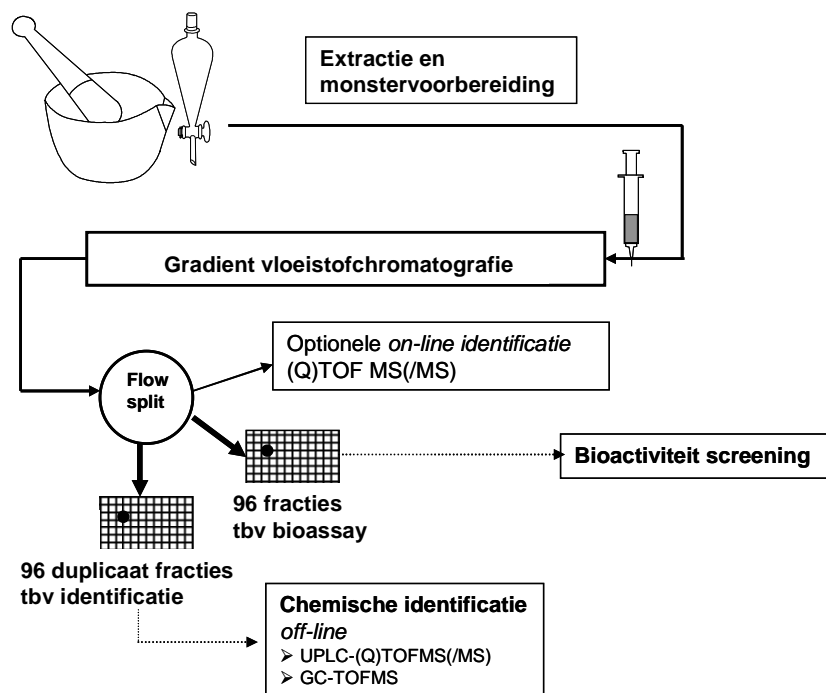
Het is mijn stellige overtuiging dat het succesvol proactief speuren naar nieuwe risico's een vierde dimensie vereist binnen het analytische onderzoeksveld (figuur 4). Deze vierde dimensie wordt gevormd door een bioactiviteit-as waarop verschillende relevantieniveaus denkbaar zijn; van een



Figuur 4. Vierdimensionaal analytisch-chemisch onderzoeksveld voor het speuren naar onbekende contaminanten in de voedselketen.

(gedeeltelijke) moleculaire herkenning tot aan effectmetingen in levende organismen en de consumenten mens en dier. Terecht zijn er op deze as ethische restricties met betrekking tot het proefdiergebruik. Gelukkig wordt er binnen de toxicologie veel aandacht besteed aan alternatieven zoals het gebruik van celweefsel. Dat celsystemen ook robuust en gevoelig genoeg kunnen zijn voor het speuren naar contaminanten heeft het promotieonderzoek van Toine Bovee uitgewezen<sup>18</sup>. Bedenk echter dat ook een dergelijke benadering zijn beperkingen heeft. Effecten in celsystemen kunnen verschillen van de *in vivo* situatie, zoals recent hier betoogd door mijn hooggeleerde collega Tinka Murk in haar inaugurele rede<sup>19</sup>.

Door combinaties te maken van bioassays en full-scan hoge resolutie accurate massaspectrometrie (figuur 5) ontstaat een stuk gereedschap dat bijzonder geschikt is voor het speuren naar biologisch relevante onbekende contaminanten. Zo is het mogelijk gebleken om het illegale designer steroidhormoon tetrahydrogestrinon (THG) op te sporen in urine met behulp van een androgeen-specifieke bioassay en hoge resolutie vloeistofchromatografie met quadrupool time-of-flight massaspectrometrie<sup>20</sup>.



Figuur 5. Generieke opzet voor bioactiviteit-gestuurde identificatie van onbekende contaminanten in de voedselketen.

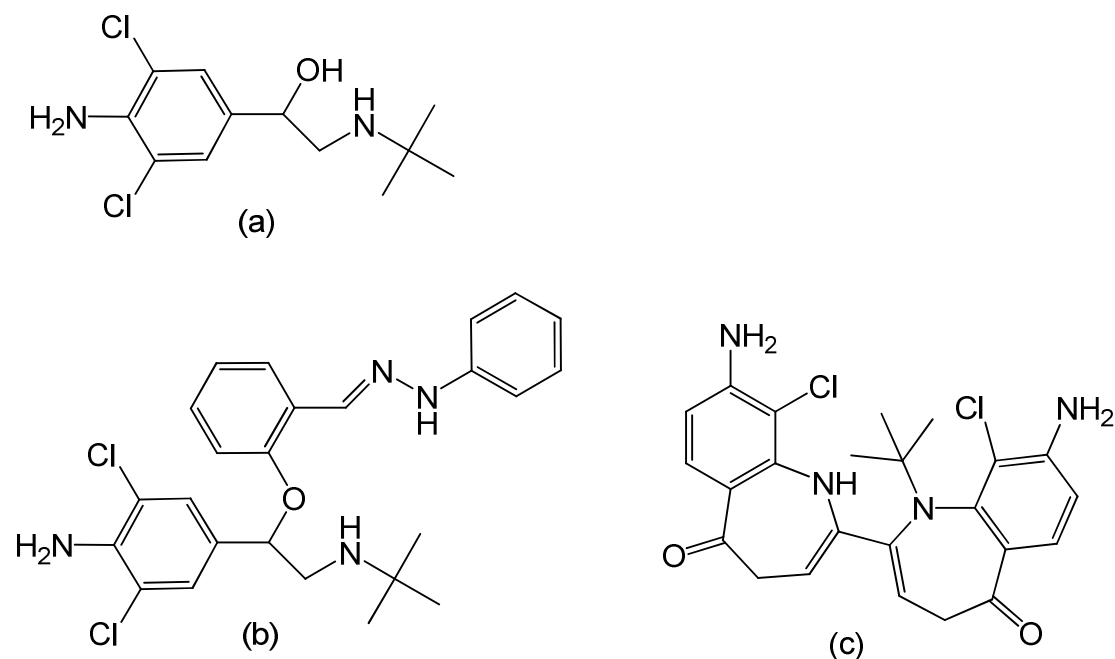
Zelfs contaminanten die pas actief worden na metabole activering kunnen in de bioassay na uitbreiding met een eenvoudige leverenzymbehandeling worden opgespoord<sup>21</sup>. Het mag duidelijk zijn dat de beschikbaarheid van robuuste bioassays en daarmee de samenwerking met toxicologen en moleculair biologen essentieel is voor mijn leeropdracht.

De ontwikkeling van bioassays vraagt tijd, waardoor dit gereedschap slechts in beperkte mate beschikbaar is. Bovendien zijn sommige bioassays te langzaam en/of te bewerkelijk in de uitvoering. Vandaar dat het soms nodig is om een stap terug te doen op de bioactiviteit-as en de optie van de moleculaire herkenning in functionele bindingsassays te benutten. Hierbij kan onder meer gedacht worden aan moleculaire interactie met de receptor, met transporteiwitten, of met tegen de contaminant opgewekte antilichamen. Kennis van oppervlaktechemie, biochemie, immunochemie, en van micro en nano sensortechnologie is vereist om te komen tot werkende concepten. Vervolgens is analytisch-chemische kennis vereist om deze concepten te vertalen in robuust en betrouwbaar gereedschap voor het detecteren van contaminanten op de relevante concentratieniveaus. Dit lijkt simpeler dan het in werkelijkheid is: interacties met transmembraanreceptoren zoals de beta-adrenerge receptor gaan bijvoorbeeld rap verloren in afwezigheid van het structurerende celmembraan. Met de nodige inspanning is het gelukt om een receptorassay te maken die werkt voor het opsporen van beta-agonisten in diervoeder<sup>22</sup>. Ook de toepassing op forensische monsters is succesvol gebleken. Er wordt nog wel gewerkt aan een alternatief voor het radioactieve label in deze methode.

Bij de ontwikkeling van bindingsassays op basis van antilichamen is het een uitdaging om hoger op de informatie-as te komen. Anastasia Meimaridou werkt als onderdeel van het EU-project CONFIDENCE<sup>23</sup> aan multiplex flowcytometrische concepten voor de gecombineerde immunoscreening van hele groepen van milieucontaminanten en diergeneesmiddelen. Hiertoe maakt zij gebruik van kleurgecodeerde microbolletjes, waarbij per kleur een verschillende bindingspartner wordt geïmmobiliseerd. Vervolgens wordt in een flowcytometer met twee typen lasers zowel de kleur (het type bindingsassay) als het gehalte gemeten. In theorie levert dit een informatie-inhoud op van honderden gelijktijdig gemeten

voedselcontaminanten. Uiteraard afhankelijk van de kruisreactiviteit van de gebruikte antilichamen en mits een wederzijdse beïnvloeding van de assays geen roet in het eten gooit. Parallel hieraan onderzoekt Wouter Biesta in het IP/OP project Nanoplex<sup>24</sup> of multiplex screening ook mogelijk is op basis van gemodificeerde silicium quantum dots.

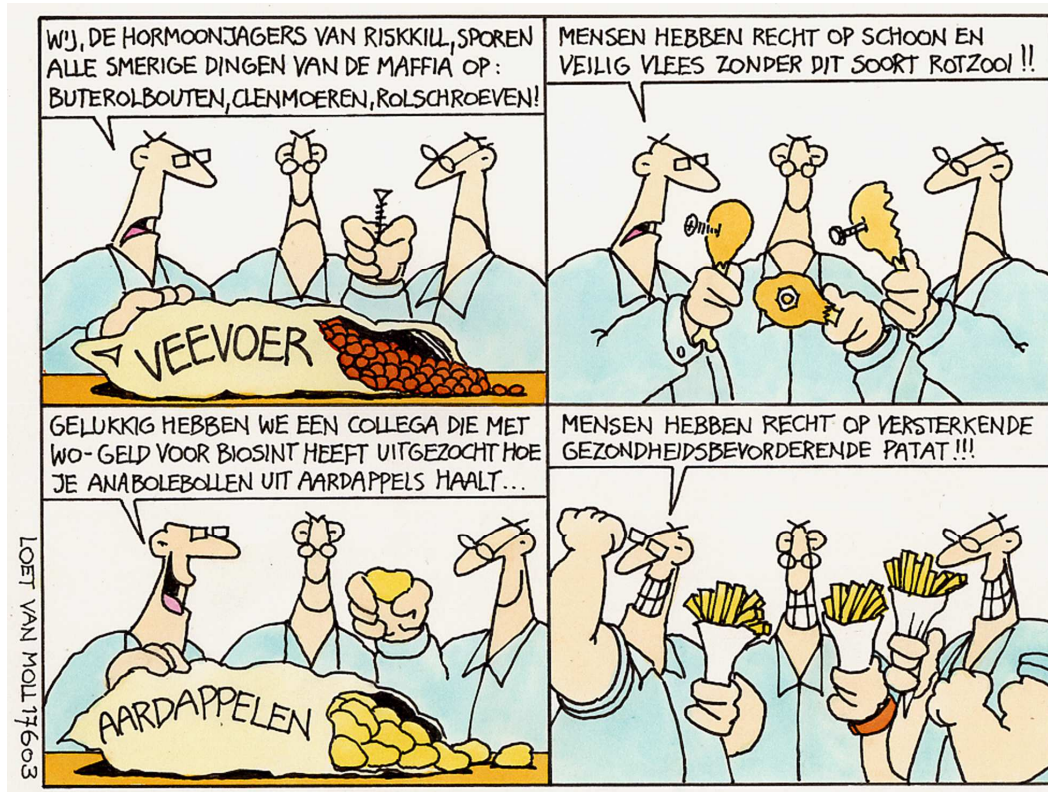
Zoals bij de bioassays kan door het maken van combinaties van functionele bindingsassays en full-scan hoge resolutie accurate massaspectrometrie een gereedschap worden verkregen dat bijzonder geschikt is voor het speuren naar biologisch relevante onbekende contaminanten. Een succesverhaal is de vondst in diervoeder van een onbekende designvariant van de verboden groeibevorderaar clenbuterol. Op basis van het bindingsgedrag in een op clenbuterol-gerichte immunoassay, én het gedrag in de beta-agonisten receptorassay, én het gedrag in de vloeistofchromatografie, én het fragmentatiepatroon in de massaspectrometrie,



*Figuur 6. De bekende beta-agonist clenbuterol (a), het structuurvoorstel voor de onbekende designvariant 'clenbuterol-R' (b)<sup>25</sup> en een recent beschreven nieuwe designvariant (c)<sup>26</sup>.*

kon een structuur voor de onbekende contaminant 'clenbuterol-R' aannemelijk worden gemaakt (figuur 6b)<sup>25</sup>. Ook zonder de proef op de som middels een chemische synthese afdoende voor de Belgische rechter om deze illegale

praktijk te ontmantelen. Dat de strijd tegen deze vorm van synthetische creativiteit nimmer definitief gestreden is moge blijken uit een recente vondst van een andere designvariant met hetzelfde molecuulgewicht<sup>26</sup> (figuur 6c). Chemische structuren kunnen trouwens ook leiden tot grote creativiteit bij



Figuur 7. Perceptie van de striptekenaar Loet van Moll in het Wb op de ontdekking van de onbekende contaminant 'Clenbuterol-R'<sup>27</sup>. ©Loet van Moll, gereproduceerd met toestemming van de striptekenaar.

striptekenaars: Loet van Moll maakte voor het Wageningse periodiek Wb een strip naar aanleiding van de vondst van 'clenbuterol-R' met de volgende tekst (figuur 7), ik citeer: 'Wij, de hormoonjagers van RISKILL, sporen alle smerige dingen van de maffia op: buterolbouten, clenmoeren, rolschroeven. Mensen hebben recht op schoon en veilig vlees zonder dit soort rotzooi!!'<sup>27</sup>. Maar dit terzijde.

## De toekomstige gereedschapskist

*“Do you ever worry that technology’s going to make us obsolete?”*

*“No.”*

*--Gil Grissom*

Als je bedenkt wat voor onderzoeksinspanningen er nog geleverd moeten worden in het kader van de verbeterde gereedschapskist is het nogal prematuur om te spreken over een toekomstige gereedschapskist. Desalniettemin wil ik graag een tipje van de sluier oplichten. Naar mijn verwachting zal het format van de bioactiviteit-as drastisch veranderen. Zowel cel bioassays als functionele bindingsassays zullen omgezet worden naar micro en nano formats omwille van de snelheid van de meting en het terugdringen van het verbruik aan relatief kostbare bioreagentia. Dat heeft ook gevolgen voor de opzet van de bioactiviteit-gestuurde identificatie zoals eerder besproken (figuur 5). Alleen het omzetten van de analytische scheiding naar micro en nano formats zal niet afdoende zijn; verregaande integratie van de bioactiviteitsmeting en de identificatie is nodig. In het promotieonderzoek van Gerardo Marchesini is hiertoe een belangrijke eerste aanzet gegeven met antibiotica in kip als modelsysteem<sup>28</sup>: het vleesextract met daarin de antibioticaresiduen wordt in de eerste stap geïnjecteerd over een surface plasmon resonance (SPR) chip. In real-time wordt daar de competitie van het extract met de moleculaire interactie van antilichamen en een geïmmobiliseerd antibioticum-analogon gemeten. Vervolgens worden de verdachte extracten voor een opzuivering geherinjecteerd over een immunoaffiniteit ‘recovery’ chip, en tenslotte geëluëerd naar een nanovloeistofchromatografie/electrospray ionisatie chip. Door deze integratie zijn de door de recovery chip afgevangen minuscule hoeveelheden toch voldoende gebleken voor de massaspectrometrische identificatie van het antibioticum enrofloxacin en de bioactieve metaboliet ciprofloxacin. Ondertussen wordt dit onderzoek voortgezet met het speuren naar onbekende paralytische schelpdiertoxines.

Afhankelijk van de selectiviteit van de moleculaire herkenning en de massaspectrometer is het denkbaar om de nanoscheiding te versimpelen of



zelfs achterwege te laten. Recente experimenten van Dick Hooijerink met SPR en DESI massaspectrometrie lijken wat dat betreft veelbelovend. Een verdere integratie is denkbaar door het optische SPR effect tevens te benutten voor de desorptie/ionisatie in de massaspectrometrie<sup>29</sup>.

## Onderwijs aspecten

*“[...] you never know what you need until you find it.” “Or until you lose it.”*

*–Gil Grissom*

Binnen Wageningen UR en elders wordt door onderzoekers en studenten heel veel gemeten. Analytisch chemici zijn bij uitstek bijzonder kritisch ten aanzien van alle aspecten die bijdragen tot een meetresultaat: ‘meten = weten’ gaat uiteraard alleen op als er correct en fit-for-purpose gemeten is. Binnen Nederland zijn er diverse analytische onderzoeksgroepen gesneuveld, onder de life science trends, of eenvoudigweg onder de bezuinigingsdwang. In landen als Spanje is men met succes in dit gat gesprongen en komt de Analytische Scheikunde weer tot bloei. Mijns inziens verdient de Analytische Scheikunde een volwaardigere plaats binnen BSc opleidingen dan thans mogelijk is. Immers, ook binnen de life sciences moet men kritisch staan ten aanzien van ieder meetresultaat alvorens conclusies te trekken. Bovendien zou men zich immer moeten afvragen of een andersoortige meting niet tot een betrouwbaarder en relevanter resultaat zou hebben geleid!

Dat gezegd hebbende is het mijn uitdaging om binnen de beperkte mogelijkheden bij te dragen aan het onderwijs. De uitbreiding van het onderwijs in de massaspectrometrie binnen de BSc course *Analytical Methods in Organic Chemistry* is vanuit mijn leeropdracht gezien een goede ontwikkeling. En ik ben uiteraard verheugd dat het speuren naar onbekende risico’s een plaats heeft gekregen binnen de MSc course *Food Toxicology*.

In samenwerking met de onderzoekschool VLAG en Europese partners ben ik voornemens een advanced PhD course te ontwikkelen op het gebied van de detectie van chemische voedselcontaminanten.

## **Maatschappelijke aspecten bij het speuren naar onbekende contaminanten**

*“Amazing the advances we make in science and the primitive uses we find for them”*  
--Gil Grissom

Consumenten en milieuorganisaties verlangen veilig voedsel waar ‘niets’ aan contaminanten inzit. Zo worden bijvoorbeeld ook lage gehalten aan pesticiden onder de toegelaten norm niet acceptabel geacht. Hierdoor is het denkbaar dat supermarkten strengere eisen zullen gaan stellen aan toeleveranciers en daarmee verder zullen gaan dan de overheidsnormering. De voedingsmiddelenindustrie en de overheid richten zich echter primair naar de Europese wet- en regelgeving en normstelling, en lopen liever niet voor de muziek uit. Men spreekt bij voorkeur over voedselkwaliteit en wil liever niet geassocieerd worden met het begrip voedselcontaminant. Voedselkwaliteit is namelijk een belangrijk Nederlands exportproduct en het handelsbelang zit niet te wachten op een incident over voedselcontaminanten. Begrijpelijk wordt de contaminantenanalyse primair gericht op die groepen van stoffen die hetzij het productieproces verstoren, zoals bijvoorbeeld antibiotica in de zuivelindustrie, hetzij kunnen leiden tot een groot afbreukrisico bij afnemers, zoals bijvoorbeeld specifieke mycotoxines in de diervoederindustrie. Voor de overige contaminanten is ‘niet of nauwelijks meten’ misschien op de korte termijn een verleidelijke en goedkope oplossing. Een proactieve houding ten aanzien van nieuwe vormen van bekende- en van volledig onbekende contaminanten kan echter een grote schadepost voorkomen. Het noodgedwongen terugroepen van partijen diervoeder of voedsel inclusief vervolgschade kan immers in de miljoenen euro’s lopen. Dus het belang van het proactief zoeken naar onbekende contaminanten ligt niet uitsluitend bij de Europese Voedselveiligheid Autoriteit maar bij alle actoren!

Voor een kansrijke speurtocht naar onbekende contaminanten in de voedselketen is het noodzakelijk dat de overheid doorgaat met het *gericht* en *onafhankelijk* bemonsteren van de voedselketen. Een (administratief) toezicht op een bemonstering en analyse door een private partij ten behoeve van

zelfcontrole kan uiteraard een aanvullende optie zijn, maar nooit de enige: er is wat mij betreft een grens voor de terugtrekkende overheid in toekomstige Toezicht op Controle (ToC) arrangementen. Ten aanzien van onbekende voedselcontaminanten kan men in alle redelijkheid van een sector slechts in beperkte mate een proactieve houding verwachten. Daarentegen is mijns inziens de verwachting van een proactieve houding bij de overheid gerechtvaardigd. Reeds in 2001 werd tijdens de Europese conferentie over illegaal hormoongebruik geconcludeerd dat het risico van misbruik zeer gevoelig is voor de handhavingfactoren 'controles en sancties'. Van proactief controleren en handhaven kan dus ook bij uitstek een preventieve werking uitgaan! Ik vrees echter dat het proactief handhaven door bezuinigingen bij de rijksoverheid in toenemende mate onder druk zal komen te staan. De Voedsel en Waren Autoriteit (VWA) en de Algemene Inspectie Dienst (AID) verkeren in een fase van reorganisatie en herprioritering van taken. Voorwaar een zorgwekkende ontwikkeling voor het proactief zoeken naar nieuwe risico's tengevolge van onbekende voedselcontaminanten.

Streng normering van voedselveiligheid kan leiden tot ongewenste handelsbarrières voor ontwikkelingslanden<sup>30</sup>. Dat wil wat mij betreft niet zeggen dat de in Europa vastgestelde normen versoepeld zouden moeten worden. Ik ben het eens met de Minister van LNV dat maatwerk zoals overgangsregelingen, training en scholing nodig zijn; bij dit laatste moet natuurlijk Wageningen UR een nadrukkelijke rol spelen.

## **Dankwoord**

Mijnheer de rector, aan het einde van mijn rede wil ik graag een woord van dank uitspreken.

De Raad van Bestuur van Wageningen UR wil ik bedanken voor het instellen van deze leerstoel en het in mij gestelde vertrouwen. Hierin wil ik graag de leden van de toetsingscommissie betrekken en de directie van het RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid. In dit verband ben ik ook dank verschuldigd

aan de initiatoren van dit traject, de toenmalige RIKILT-directeur Kees de Gooijer en de toenmalige rector Bert Speelman.

Hooggeleerde collega Han Zuilhof, leerstoelgroepouder Organische Chemie. Jouw excellente wetenschappelijke inzichten en mijn pragmatische analytisch-chemische inslag vertonen nauwelijks een overlap....., en dat was nou precies de bedoeling! Uit deze complementariteit moet iets moois kunnen groeien; ik kijk dan ook uit naar een boeiende en plezierige samenwerking. Voormalig leerstoelgroepouder hooggeleerde Ernst Südholter en zeergeleerde UHD Teris van Beek, de chemie tussen ons klikte erg snel en ik dank jullie hartelijk voor de ondersteuning tijdens het benoemingstraject. Ook voor jullie enthousiasme om al ruim voor mijn benoeming mee te willen doen in een NWO-Middelgroot aanvraag voor de eerste DESI-massaspectrometer in Nederland. Hooggeleerde collega en kamergenoot Cees van Rijn, ik kijk uit naar voortzetting van onze discussies over nanotechnologie, wellicht vinden we elkaar in een nanowire sensor voor voedselcontaminanten. Alle andere medewerkers, Aio's, postdocs en studenten van Organische Chemie wil ik hartelijk danken voor de prettige sfeer en de interessante discussies, ik voel mij erg bij jullie thuis!

Hooggeleerden Ivonne Rietjens en Tinka Murk, ook de inbreng van Toxicologie is cruciaal voor mijn vakgebied en ik verheug mij dan ook op de voortzetting van een goede samenwerking.

Binnen het RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid is het een voorrecht om in het kader van het WOT-Thema Dierbehandelingsmiddelen, de EU projecten BIOCOP en CONFIDENCE, en het Kennisbasisprogramma, te mogen werken met zoveel verschillend deskundige projectleiders, collega's en medewerkers. Dank voor het enthousiasme en de betrokkenheid, samen vormen jullie een prachtig 'orkest'. Teveel RIKILT-mensen om hier persoonlijk te bedanken maar één ding is zeker, zonder jullie kan ik maar weinig!

Mijn periode bij AKZO Corporate Research wil ik hierbij niet onvermeld laten. Het werken in een industriële setting was niet alleen bijzonder leerzaam, het

bod mij destijds ook ongekende ontplooiingsmogelijkheden. Een groot aantal publicaties op het gebied van de capillaire zone electroforese en de time-of-flight massaspectrometrie zijn de stille getuigen uit deze periode. Collega en kamergenoot Ab Buijtenhuijs verdient een bijzondere vermelding voor zijn deskundigheid op het gebied van polymeerscheidingen, schaatsen, fietsen, gemeentepolitiek, karakters....., hadden we het ooit wel eens nergens over?

Waarde promotor, emeritus hooggeleerde Brinkman, beste Udo, voor mij was het destijds duidelijk dat de Vrije Universiteit voor een analytische Aio de 'place to be' was en aldaar heb ik dan ook gesolliciteerd. Onder de bezielende leiding van jou, en de te vroeg overleden hooggeleerde Roland Frei, deed ik mijn promotieonderzoek. In een voor die tijd opmerkelijk internationale setting waar het een voortdurend komen en gaan was van postdocs en visiting scientists. Verschillende Aio's en postdocs zijn ondertussen hoogleraar in binnen- en buitenland en daar mag je met recht trots op zijn. Udo, jij bent de politieke besluitvorming ver vooruit en hebt het pensioen al jaren geleden volledig afgeschaft. Ik hoop derhalve dat ik nog lang mag genieten van een prettige samenwerking.

Zonder de zorg en stimulansen van je liefhebbende ouders is het nagenoeg onmogelijk om zover te komen. Mijn ouders hebben mij bijgebracht dat het heel vanzelfsprekend is om al je mogelijkheden te benutten. Bij ons thuis heerste een klimaat waar intellectuele en politieke discussies volop gevoerd konden worden. Dat bijna alle kinderen tegelijk gingen studeren zal niet makkelijk geweest zijn, maar de voldoening dat iedereen goed terecht is gekomen kwam later. Het is bijzonder jammer dat mijn vader deze dag niet meer mee heeft kunnen maken maar gelukkig wist hij wel dat het goed zou komen.

Lieve Maria, Anne en Jorieke, drie fantastische meiden. Jullie hebben mogen meegenieten van alle ups en downs en mij altijd onvoorwaardelijk gesteund. Ook als ik voor de zoveelste keer in korte tijd op reis ging. Sorry voor die ene verjaardag die ik heb gemist. Als ik tijd heb gaan we maar weer eens naar CSI kijken.

## Tenslotte

*“And this theory is based on...?” “Nothing. I’m just trying to help.”*

*--Gil Grissom*

Geachte aanwezigen, het speuren naar onbekende contaminanten in de voedselketen is geen vanzelfsprekendheid maar een fascinerende uitdaging. Relevante nieuwe risico's zullen alleen worden gevonden door slimme combinaties van bioactiviteit- en fysisch-chemische metingen. Medewerking van de actoren in de voedselketen en een proactieve houding van de overheid zijn daarbij kritische succesfactoren.

Dank voor uw aandacht. Ik heb gezegd.

## Referenties

1. “Hormonen in vlees. De chemicus als Sherlock Holmes”, *rivm.nl*, 2 (2002), nr 5.
2. Voor een uitgebreide synopsis over het karakter van Sherlock Holmes, zie bijvoorbeeld [http://en.wikipedia.org/wiki/Sherlock\\_Holmes](http://en.wikipedia.org/wiki/Sherlock_Holmes). Voor een verzameling quotes, zie <http://sherlock.buildmy.ws/les/q.detection.html>.
3. Voor een uitgebreide synopsis over het karakter van Gil Grissom, zie [http://en.wikipedia.org/wiki/Gil\\_Grissom](http://en.wikipedia.org/wiki/Gil_Grissom). Voor een verzameling quotes, zie <http://www.crimelab.nl/quotes.php?series=1&season=99&episode=99&characters=Gil%20Grissom>.
4. M.W.F. Nielen and H.J.P. Marvin, “Challenges in chemical food contaminants and residue analysis”, chapter 1 in *Food Contaminants and Residue Analysis*, Y. Pico ed., in: *Comprehensive Analytical Chemistry* vol. 51, Elsevier, 2008, 1-27.
5. T.J. Hagenars, A.R.W. Elbers, G. Kleter, F. Kreft, S.P.J. van Leeuwen, C. Waalwijk, L.A.P. Hoogenboom and H.J.P. Marvin, “Pro-active approaches to the identification of emerging risks in the food chain: Retrospective case studies”, Wageningen University and Research Center, Animal Sciences Group, Report ASG06-I01112 (2006).
6. World Health Organization, “Melamine and cyanuric acid: toxicity, preliminary risk assessment and guidance on levels in food”, 25 september 2008, [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/Melamine.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine.pdf).
7. J. Barbosa, C. Cruz, J. Martins, J.M. Silva, C. Neves, C. Alves, F. Ramos, M.I. Noronha da Silveira, “Food poisoning by clenbuterol in Portugal”, *Food Addit. Contam.*, 22 (2005) 563.

8. G.A. Kleter, A. Prandini, L. Filippi and H.J.P. Marvin, "Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) during a four-year period", *Food Chem. Toxicol.* (2008) *in press*, doi:10.1016/j.fct.2007.12.022.
9. "Meer meldingen van voedselinfecties bij de VWA in 2007", Voedsel en Waren Autoriteit, Nieuwsbericht, 16 juni 2008.
10. Verordening (EG) Nr 178/2002 van het Europees Parlement en de Raad van 28 januari 2002, *Off. J. Eur. Communities*, L31 (2002) 1.
11. "Rijkswaterstaat zet extra pompen gemaal IJmuiden in voor afvoer vervuild water Noordzeekanaal", persbericht Hoogheemraadschap Rijnland 19 juli 2008.
12. F. Berthiller, C. Dall'Asta, R. Schuhmacher, M. Lemmens, G. Adam and R. Krska, "Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 3421.
13. K. Lancova, J. Hajslova, J. Poustka, A. Krplova, M. Kostelanska, M. Zachariasova, P. Dostalek and L. Sachambula, "Transfer of *Fusarium* mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer", *Food Addit. Contam.*, 25 (2008) 732.
14. V. Kertesz and G.J. Van Berkel, "Improved imaging resolution in desorption electrospray ionization mass spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22 (2008) 2639.
15. J. Schurek, L. Vaclavik, H. Hooijerink, O. Lacina, J. Poustka, M. Sharman, M. Caldwell, M.W.F. Nielen and J. Hajslova, "Rapid control of strobilurin fungicides in wheat using DART accurate time-of-flight and DESI linear ion trap mass spectrometry", *Anal. Chem.* (2008) *accepted for publication*.
16. M.W.F. Nielen, H. Hooijerink, F.C. Claassen, M.C. van Engelen and T.A. van Beek, "DESI Mass Spectrometry: a rapid screening tool for veterinary drug preparations and forensic samples from hormone crime investigations", *Anal. Chim. Acta* (2008) *in press*, doi:10.1016/j.aca.2008.08.036.
17. A.A.M. Stolker, P. Rutgers, E. Oosterink, J.J.P. Lasaroms, R.J.B. Peters, J.A. van Rhijn and M.W.F. Nielen, "Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS", *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (2008) 2309.
18. T.F.H. Bovee, "Development, validation and routine application of the *in vitro* REA and DR-CALUX<sup>®</sup> reporter gene bioassays for the screening of estrogenic compounds and dioxins in food and feed", proefschrift Wageningen Universiteit (2006), ISBN nr. 90-8504-393-X.
19. A.J. Murk, "De som der delen. Rationele risicoschatting van milieucontaminanten", inaugurele rede Wageningen Universiteit, 4 september 2008.
20. M.W.F. Nielen, T.F.H. Bovee, P. Rutgers, A.R.M. Hamers, J.A. van Rhijn and L.A.P. Hoogenboom, "Urine testing for designer steroids by liquid chromatography with

- androgen bioassay detection and electrospray QTOFMS identification”, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 424.
21. J.C.W. Rijk, T.F.H. Bovee, M.J. Groot, A.A.C.M. Peijnenburg and M.W.F. Nielen, “Evidence of the indirect hormonal activity of prohormones using liver S9 metabolic bioactivation and an androgen bioassay”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 392 (2008) 417.
  22. S. Boyd, H.H. Heskamp, T.F.H. Bovee, M.W.F. Nielen and C.T. Elliott, “Development, Validation and Implementation of a Receptor Based Bioassay Capable of Detecting a Broad Range of Beta-agonist Drugs in Animal Feedstuff”, *Anal. Chim. Acta*, (2008) *in press*, doi:10.1016/j.aca.2008.09.035.
  23. FP7 EU-project: “Contaminants in food and feed: inexpensive detection for control of exposure, acronym CONFIDENCE”, [www.confidence.eu](http://www.confidence.eu).
  24. Project in het kader van het IP/OP Bionanotechnologie-programma van Wageningen UR: “Functionalised silicon nanoparticles in multiplex diagnostic platforms, acronym Nanoplex”, projectleider W. Haasnoot.
  25. M.W.F. Nielen, C.T. Elliott, S.A. Boyd, D. Courtheyn, M.L. Essers, H.H. Hooijerink, E.O. van Bennekom and R.E.M. Fuchs, “Identification of an unknown beta-agonist in feed by liquid chromatography/bioassay/ quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry with accurate mass measurement”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003) 1633.
  26. G. Boatto, N. Culeddu, C. Testa, B. Neri, G. Brambilla, J. Barbosa and C. Cruz, “Identification of a probable new adrenergic agonist by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry”, *Anal. Chim. Acta*, 586 (2007) 223.
  27. Loet van Moll, strip 17603 in het Wageningse periodiek Wb.
  28. G.R. Marchesini, J. Buijs, W. Haasnoot, H. Hooijerink, O. Jansson and M.W.F. Nielen, “Nanoscale Affinity Chip Interface for Coupling Inhibition SPR Immunosensor Screening with nano-LC TOF MS”, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 1159.
  29. L.C. Chen, J. Yonehama, T. Ueda, H. Hori and K. Hiraoka, *J. Mass Spectrom.*, 42 (2007) 346.
  30. “Normen voor voedselveiligheid hoeven geen handelsbelemmeringen te betekenen voor ontwikkelingslanden”, persbericht Ministerie van LNV, 12 juni 2008.