

RIVM rapport 310302002 / 2004

**Hormonen in importvlees**

Een evaluatie van recente gegevens over gehalten aan  
van nature voorkomende hormonen

P.R. Kootstra, H.J. van Rossum, P.W. Zoontjes,  
P.L.W.J. Schwillens, K.L. Wubs, H.A. Herbold, R.W. Stephany,  
S.S. Sterk en L.A. van Ginkel

Contact: S.S. Sterk  
Laboratorium voor Analytisch Voedings- en Residu-onderzoek  
saskia.sterk@rivm.nl

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van de Voedsel en Waren  
Autoriteit in het kader van het VWA/RBT project 310302 “Monitoring  
Dierbehandelingsmiddelen”.

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, tel. 030-2749111; fax 030-2742971

## **RAPPORT IN HET KORT**

### **Hormonen in importvlees**

Een evaluatie van recente gegevens over gehalten aan van nature voorkomende hormonen

Consumptie van vlees, geïmporteerd uit Zuid-Amerika, met name Argentinië en Brazilië, leidt niet tot inname van lichaamsvreemde hormonen. Bovendien zijn er geen aanwijzingen voor inname van verhoogde hoeveelheden lichaamseigen hormonen.

Onderzoek naar het illegaal gebruik van groeibevorderende stoffen vindt binnen de Europese Unie plaats in het kader van Nationale residu controleprogramma's, uitgevoerd in het kader van Europese regelgeving. Onderzoek vindt plaats zowel gedurende de boerderijfase als ten tijde van de slacht. Veelal richt dit onderzoek zich op excreta zoals urine of mest, of op orgaanvlees. Bij import van buiten de Europese Unie is als regel uitsluitend het voor consumptie bedoelde spiervlees beschikbaar. Het systematisch onderzoek van dit materiaal heeft tot op heden slechts zeer beperkt plaatsgevonden waardoor gegevens over de blootstelling van de consument nauwelijks beschikbaar zijn. Dit rapport beschrijft de resultaten van onderzoek van circa 300 monsters rund- en varkensvlees op lichaamseigen en lichaamsvreemde hormonen.

Geen van de lichaamsvreemde hormonen waarop onderzoek is verricht werd aangetroffen. In zes monsters varkensvlees werden nortestosteron en boldenon aangetroffen. De aanwezigheid van deze hormonen betekent dat ook vlees van beren (niet gecasteerde mannelijke varkens) wordt geëxporteerd. In één monster rundvlees overschreed het gehalte aan  $17\beta$ -oestradiol de voorlopige grenswaarde van 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Trefwoorden: Residu, hormoon, voeding, vlees, analyse.

## ABSTRACT

### **Hormones in imported meat**

An evaluation of recent data on levels of natural hormones

Consumption of meat imported from South America, mainly Argentina and Brazil, does not result in the intake of exogenous hormones. In addition, there are no indications for the intake of elevated amounts of endogenous (natural) hormones.

Testing for the illegal use of growth promoting compounds within the European Union is conducted within the framework of national residue control programmes that are based on European legislation. Such testing takes place “on farm” and after slaughter. Most of the tests are conducted on excreta like urine and manure, and on organ tissues. However, in the case of imports only the muscle tissue intended for consumption is available. Systematic testing of this material has, however, been very limited, so that the available information on the actual intake by consumers is limited. This report describes the results of the analyses of approximately 300 samples of bovine and porcine meat imported from South America, for the presence of xenobiotic and endogenous hormones. None of the xenobiotic hormones analyzed for was detected in these analyses. In six samples of pork meat nortestosterone and boldenone were detected. The presence of these hormones indicates that boar meat is exported too. In one sample the level of 17 $\beta$ -oestradiol exceeded the provisional reference value of 0.1  $\mu$ g/kg.

Keywords: Residue, hormone, food, meat, analysis.

# Inhoud

<b>Samenvatting</b>	<b>5</b>
<b>1. Inleiding</b>	<b>6</b>
<b>2. Materialen en methoden</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Materialen</i>	7
2.2 <i>Methoden</i>	7
2.3 <i>Kwaliteitsborging</i>	8
2.4 <i>Lichaamseigen hormonen</i>	9
<b>3. Resultaten</b>	<b>11</b>
3.1 <i>Resultaten onderzoek varkensvlees</i>	13
3.2 <i>Grenswaarden voor afwijkende gehalten</i>	15
3.3 <i>Resultaten onderzoek importvlees 2003</i>	15
<b>4. Discussie</b>	<b>16</b>
<b>Referenties</b>	<b>19</b>

## Samenvatting

Gegevens over gehalten aan van nature voorkomende hormonen in rund- en varkensvlees zijn slechts in zeer beperkte mate voorhanden. Moderne instrumentele analysemethoden waarmee het met voldoende juistheid en nauwkeurigheid mogelijk is kwantitatieve analyses van voor consumptie geschikte monsters spiervlees te onderzoeken zijn nog niet zo lang beschikbaar. Bovendien is spiervlees vanuit het oogpunt van opsporing en handhaving veelal niet het meest voor de hand liggende onderzoeksmateriaal.

Recent is echter de belangstelling voor het onderzoek van monsters importvlees toegenomen. Deze interesse is met name ingegeven door het handelsconflict tussen de Europese Unie en de Verenigde Staten over de rechtmatigheid van de importbeperkingen die de EU hanteert ten aanzien van vlees. De EU eist garanties dat vlees zoals dat naar de EU wordt geëxporteerd uitsluitend afkomstig is van dieren die niet met een hormonale groeibevorderende stof zijn behandeld.

In vervolg op het onderzoek van importvlees afkomstig uit de Verenigde Staten (3,4) heeft onderzoek plaatsgevonden van importvlees afkomstig uit Zuid-Amerika, met name Argentinië en Brazilië. Uit dit onderzoek zijn de volgende conclusies te trekken.

In geen van de 330 onderzochte monsters werden residuen van lichaamsvreemde (xenobiotische) groeibevorderende stoffen aangetroffen.

In één monster rundvlees was het gehalte aan  $17\beta$ -oestradiol zodanig dat van een afwijking kan worden gesproken. Een behandeling met een preparaat dat  $17\beta$ -oestradiol bevat is een mogelijke verklaring.

In zes van de onderzochte monsters varkensvlees werd  $17\beta$ -nortestosteron aangetroffen. In vier van deze monsters was tevens  $17\beta$ -boldenon aanwezig. Deze bevinding duidt er op dat ongecastreerde mannelijke varkens (beren) worden geëxporteerd.

Voorts wordt vastgesteld dat de kwantitatieve verdeling van de gemeten gehalten aan  $17\beta$ -oestradiol overeenkomt met die zoals bepaald voor monsters rundvlees afkomstig van jonge vleesrunderen uit "Hormone Free Cattle" programma (4) van de Verenigde Staten van Amerika. Deze verdeling is significant afwijkend van de verdeling zoals vastgesteld voor de lokale markt in de Verenigde Staten die voor alle soorten rundvlees een gemiddeld gehalte aan  $17\beta$ -oestradiol laat zien dat een factor 5 hoger ligt (3).

Het onderzoek werd uitgevoerd met behulp van massa spectrometrische methoden waarbij ten behoeve van de kwantificering gebruik werd gemaakt van isotoop verrijkte interne standaarden. De juistheid en reproduceerbaarheid van de methoden werden getoetst door het onderzoek van met referentiestoffen verrijkte monsters.

Nu gedetailleerde gegevens bekend zijn met betrekking tot monsters rundvlees afkomstig uit Noord- en Zuid-Amerika wordt aanbevolen het onderzoek uit te bereiden door analyse van monsters afkomstig van landen binnen de EU.

# 1. Inleiding

Binnen Nederland vindt controle op het illegaal gebruik van (hormonale) groeibevorderende stoffen in de regel plaats door onderzoek van excreta. Voorbeelden zijn het onderzoek dat wordt uitgevoerd in het kader van het Nationaal Residu Controle-programma op basis van Raadsrichtlijn 96/23/EG (1), enkele bedrijfszelfcontrole programma's, opsporingsprogramma's van de Algemene Inspectiedienst (AID) en het programma "Monitoring dierbehandelingsmiddelen" zoals dat door het RIVM in opdracht van de VWA wordt uitgevoerd. Incidenteel worden aanvullend monsters ogen, haar of orgaanweefsel onderzocht. Deze aanpak biedt de beste garantie illegaal gebruik van stoffen op te sporen, maar geeft geen inzicht in de daadwerkelijke belasting van de consument. Daar komt bij dat het vlees zoals dat in de winkels wordt aangeboden maar ten dele afkomstig is van landen binnen de EU. Een groot gedeelte is afkomstig uit bijvoorbeeld de Verenigde Staten van Amerika of uit landen uit Zuid-Amerika.

Onderzoek enkele jaren geleden uitgevoerd in opdracht van de Europese Commissie (3,4) bracht aan het licht dat vlees zoals dat wordt geïmporteerd uit de Verenigde Staten veelvuldig residuen van een aantal hormonen bevatte. Hoewel het steeds om stoffen ging die in de Verenigde Staten zijn toegelaten, in gehalten onder de daar geldende Maximale Residu Limiet (MRL), was deze situatie niet conform de in het kader van het "Hormone Free Cattle program" gemaakte afspraken die bepalen dat vlees dat vanuit de Verenigde Staten naar de EU geëxporteerd wordt afkomstig moet zijn van dieren die niet met in de EU verboden stoffen zijn behandeld. Deze bevinding heeft vervolgens geleid tot een aantal aanpassingen van het controle programma waarbij ook het analytisch residu onderzoek aanzienlijk is verbeterd. Als vervolg op deze bevindingen is echter besloten het onderzoek van monsters vlees verder te intensiveren waarbij ook importvlees uit andere delen van de wereld wordt betrokken.

Het onderzoek naar residuen van toegediende groeibevorderende stoffen wordt gecompliceerd indien het gaat om stoffen die ook van nature aanwezig (kunnen) zijn. Hierbij gaat het vooral om de steeds aanwezige natuurlijke hormonen  $17\beta$ -oestradiol,  $17\beta$ -testosteron en progesteron. Is de kernvraag bij analytisch residu onderzoek op lichaamsvreemde (xenobiotische) stoffen die naar de betrouwbaarheid van de identificatie, bij lichaamseigen stoffen gaat het tevens om het gehalte. Om toediening van natuurlijke hormonen aan te kunnen tonen is een uitspraak noodzakelijk ten aanzien van het gehalte. Het gehalte dient dusdanig af te wijken in vergelijking met een voor niet behandelde dieren vastgestelde referentiewaarde, dat een behandeling zeer aannemelijk is. Op dit moment zijn er uitsluitend aanbevolen attentiewaarden voor de screening op natuurlijke hormonen in serum (6). Daarnaast hanteert Nederland een referentiewaarde van  $2 \mu\text{g/l}$  voor  $17\beta$ -oestradiol in monsters urine afkomstig van mannelijke kalveren jonger dan 26 weken. Aanvullend geldt hierbij dat deze bevinding bij minimaal drie dieren uit een zelfde groep gedaan moet zijn

Voor monsters spiervlees zijn slechts in zeer beperkte mate referentiewaarden beschikbaar. Bovendien zijn deze veelal verkregen met behulp van methoden met een beperkte specificiteit. Met dit onderzoek is getracht de beschikbare gegevens verder aan te vullen en, vooral voor  $17\beta$ -oestradiol, te komen tot een verdere onderbouwing van grenswaarden voor het natuurlijke gehalte. Bovenal wordt echter inzicht verkregen in de belasting van de Nederlandse consument met zowel xenobiotische als endogene hormonen ten gevolge van de consumptie van uit Zuid-Amerika geïmporteerd vlees.

## 2. Materialen en methoden

### 2.1 Materialen

De monsternamen werden uitgevoerd door inspecteurs van de Voedsel en Waren Autoriteit/Keuringsdienst van Waren. Bemonsterd werden partijen importvlees vooral afkomstig uit Zuid-Amerika.

### 2.2 Methoden

Analyses werden uitgevoerd met binnen ARO operationele methoden. Eventuele aanpassingen of afwijkingen werden in de betreffende laboratoriumjournals genoteerd. Onderstaande tabel (Tabel 1) bevat een beschrijving op hoofdlijnen.

Tabel 1: *Overzicht toegepaste analysemethoden bij het onderzoek van monsters spiervlees op groeibevorderende stoffen.*

Analysemethode	Monstervoorbewerking en extractie	Extractzuivering	Isolatie en detectie
Lichaamseigen hormonen in importvlees	Verrijking van 5 gram vlees met interne standaarden (0,05 ppb) – vertering met Subtilizine gedurende 2 uur bij 50°C – incubatie met glucosidase en glucuronidase bij pH 5,2- extractie met TBME – droogdampen en opnemen in methanol/water	Ontvetting door wassen met heptaan – na indampen ontvette methanol/water fractie oplossen residu in water en extractie met TBME – droogdampen – HPLC fractionering op Lichrocard 125-4 Superspher 100 RP 18 endcapped	Derivatisering met behulp van HFBA-droogdampen en opnemen derivaat in iso octaan - GC-MS
Lichaamsvreemde hormonen in importvlees	Verrijking van 5 gram vlees met interne standaarden (0,05 ppb) – vertering met Subtilizine gedurende 2 uur bij 50°C – extractie met TBME – droogdampen en opnemen in methanol/water	Ontvetting door wassen met heptaan – na indampen ontvette methanol/water fractie oplossen residu in water en extractie met TBME – droogdampen – HPLC fractionering op Lichrocard 125-4 Superspher 100 RP 18 endcapped	Derivatisering met behulp van HFBA-droogdampen en opnemen derivaat in iso octaan - GC-MS
Zeranol en metaboliëten in importvlees	Verrijking van 5 gram vlees met interne standaarden (0,5 ppb) – vertering met Subtilizine gedurende 2 uur bij 50°C – extractie met TBME – droogdampen.	SPE zuivering met behulp van C18 en Amino kolommen – droogdampen eluaat	Derivatisering met behulp van HFBA-anhydride – droogdampen en opnemen derivaat in GC-MS (NCI)
Stanozolol in importvlees	Verrijking van 5 gram vlees met interne standaarden (0,5 ppb) – vertering met Subtilizine gedurende 2 uur bij 50°C – extractie met TBME	Overbrengen ingedampte residu on SFE-extractiebuis. SFE met ongemodificeerd CO <sub>2</sub>	Opnemen residu in LC-eluens an analyse met LC-MS (APCI)

Analysemethode	Monstervoorbewerking en extractie	Extractzuivering	Isolatie en detectie
17 $\beta$ -trenbolon in importvlees	Verrijking van 5 gram vlees met interne standaarden (0,5 ppb) – vertering met Subtilizine gedurende 2 uur bij 50°C – extractie met TBME – droogdampen en opnemen in methanol/water	Ontvetting door wassen met hexaan – opbrengen methanol/water mengsel op IAC-kolommen – na spoelen elutie met 70% ethanol – droogdampen en opnemen in LC-eluens	LC-MSD reversed phase LC op, APCI (+) ionisatie, detectie m/z 271 en 273 (interne standaard)
Gestagenen in importvlees	Verrijking van 2 gram vlees met interne standaarden (0,5 ppb) – vertering met Subtilizine gedurende 2 uur bij 50°C – Extractie met TBME – droogdampen	Ontvetting door wassen met heptaan – droogdampen en opnemen in TRIS-buffer en extractie met TBME – droogdampen Indien noodzakelijk ontvetting via florisil	Opnemen in LC eluens en analyse met LC-MSMS (APCI)
Beta-agonisten in importvlees	Verrijking van 5 gram vlees met interne standaarden (0,05 ppb) – vertering met Subtilizine gedurende 2 uur bij 50°C – Extractie met TBME – droogdampen en opnemen in LC eluens	Fractionering met LC	Derivatisering met BSTFA tot TMS-derivaten – na droogdampen opnemen in isooctaan en analyse met GC-MS

Validatie van de gebruikte analysemethoden vindt plaats conform ARO procedure 475, gebaseerd in de criteria voor residu onderzoek zoals beschreven in Beschikking van de Commissie 2002/657 EG (7).

### 2.3 Kwaliteitsborging

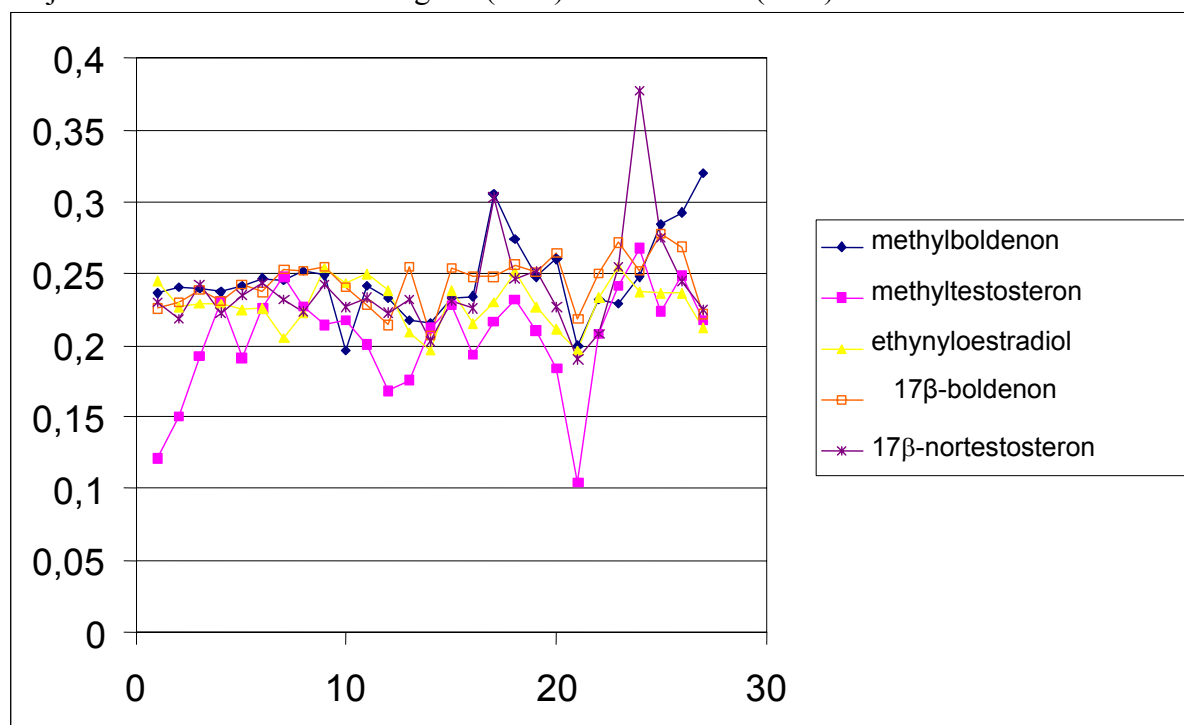
De kwaliteitsborging vond in de regel plaats door het analyseren van verrijkte monsters. Op basis van deze resultaten wordt per meetserie informatie over de validiteit van het actuele onderzoek verkregen. Doordat per meetserie steeds een ander onbekend monsters verrijkt wordt onderzocht, wordt vooral de robuustheid van de methode vastgesteld. Feitelijk omvat deze robuustheid tevens de binnen-laboratorium reproduceerbaarheid, uitgebreid met een matrix gerelateerde component. Gegevens uit de actuele kwaliteitsborging worden systematisch aan het validatiedossier van de betreffende analysemethode toegevoegd. De resultaten voor methylboldenon, methyltestosteron, ethynyløestradiol, 17 $\beta$ -boldenon en 17 $\beta$ -nortestosteron zijn in Tabel 2 samengevat. De binnen laboratorium reproduceerbaarheid, variërend van 7 tot 18%, voldoet op het niveau van 0,25  $\mu$ g/kg aan de gestelde criteria (7). Om eventuele tijdtrends adequaat te kunnen volgen zijn de individuele waarden in Figuur 1 grafisch weergegeven.



Tabel 2: Resultaten onderzoek verrijkte monsters (0,25 µg/kg).

	methylboldenon	methyltestosteron	ethynyl-estradiol	17β-boldenon	17β-nortestosteron
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
N	27	27	27	27	27
Gemiddelde	0,246	0,205	0,229	0,244	0,239
std. Dev.	0,029	0,037	0,017	0,018	0,035
RSD (%)	12	18	7	7	15

De juistheid is voor alle stoffen goed (82%) tot uitstekend (98%).



Figuur 1: Overzicht resultaten (µg/kg) onderzoek verrijkte monsters spiervlees per meetserie.

Hoewel de variabiliteit gedurende de periode van onderzoek iets lijkt toe toenemen, is er geen sprake van een significante trend.

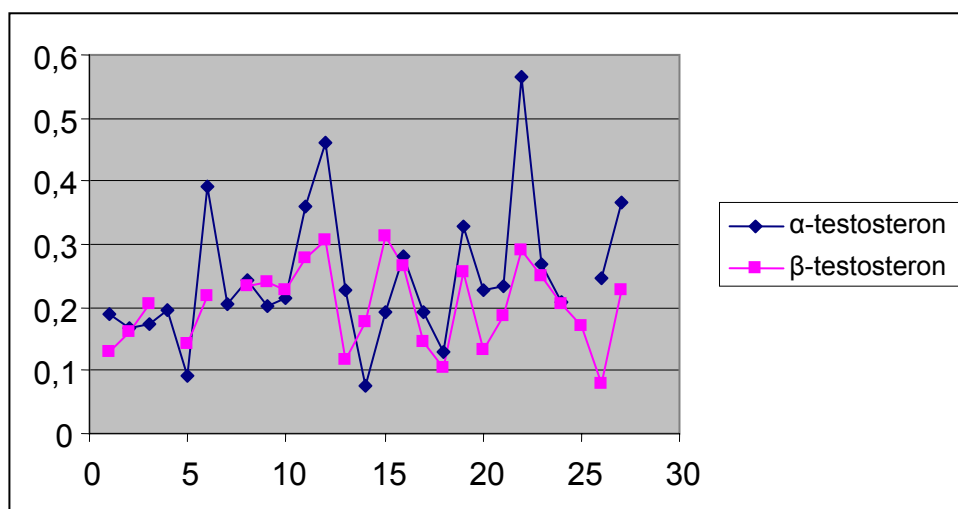
#### 2.4 Lichaamseigen hormonen

Voor de natuurlijke hormonen vond kwaliteitsborging op vergelijkbare wijze plaats. Echter, hierbij vond steeds correctie plaats voor het gehalte aangetroffen in het niet verrijkte monster. De resultaten zijn samengevat in Tabel 3.

Tabel 3: Overzicht van de verrijkte(spiked) monsters spiervlees.

parameter	17α-testosteron	17β-testosteron	17α-oestradiol	17β-oestradiol	17α-nortestosteron	17β-nortestosteron	progesteron	oestron
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
spike niveau	0,250	0,250	0,100	0,100	0,250	0,250	1,000	0,100
N	26	25	26	27	27	27	23	25
gemiddelde	0,248	0,202	0,125	0,095	0,281	0,269	1,004	0,102
std. dev.	0,110	0,065	0,048	0,038	0,037	0,049	0,366	0,099
RSD (%)	44	32	39	40	13	18	36	97

De variabiliteit is aanzienlijk groter dan bij het onderzoek op de lichaamsvreemde hormonen. De binnen laboratorium reproduceerbaarheid wordt nadelig beïnvloed doordat het nu om een verschilmeting gaat waarbij de onzekerheden in twee meetresultaten worden gecombineerd. De juistheid van de methode is echter voor alle stoffen goed (80%) tot uitstekend (102%). Om eventuele trends in de tijd vast te stellen zijn de individuele waarden voor  $17\alpha$ -testosteron en  $17\beta$ -testosteron respectievelijk  $17\alpha$ -oestradiol en  $17\beta$ -oestradiol in Figuur 2 grafisch weergegeven.



Figuur 2a: Resultaten ( $\mu\text{g/kg}$ ) onderzoek verrijkte monsters op testosteron.

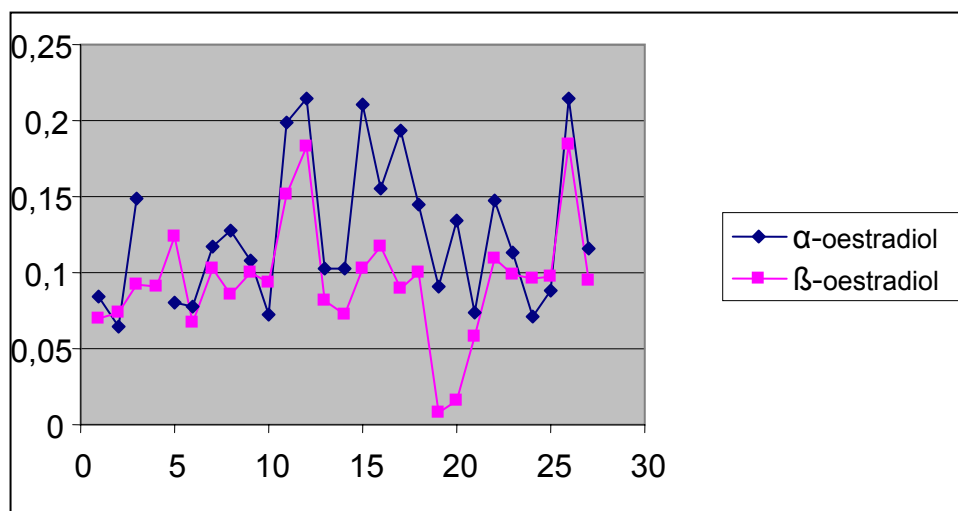


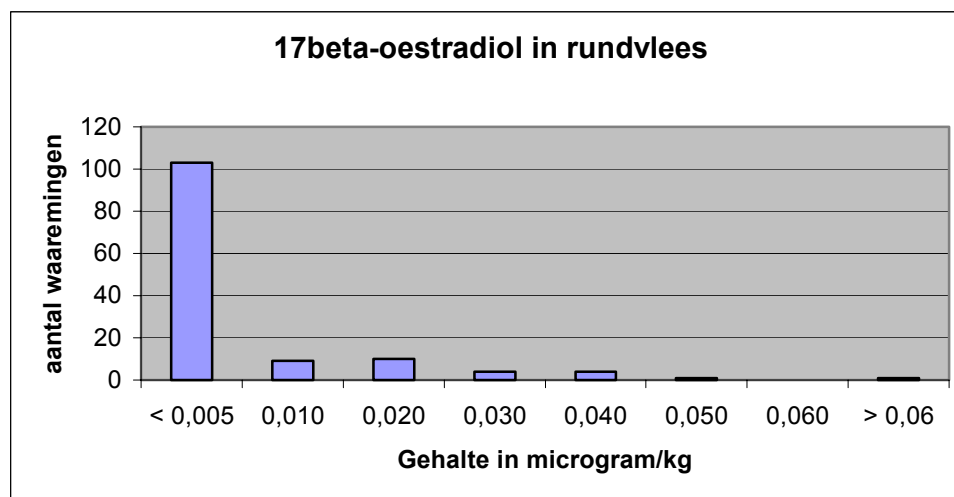
Figure 2b: Resultaten ( $\mu\text{g/kg}$ ) onderzoek verrijkte monsters op oestradiol.

Hoewel de variabiliteit voor een aantal stoffen aanzienlijk is, is er geen sprake van een significante trend in de tijd.

### 3. Resultaten

Uitspraken over de aanwezigheid van niet lichaamseigen stoffen zijn primair gebaseerd op bevestiging van de identiteit van de betreffende stof. Kwantificering is van minder belang en kan zich beperken tot een vergelijking met de relevante “Minimum Required Performance Limit (MRPL)”. Hoewel MRPL waarden voor anabole stoffen in monsters spiervlees nog niet zijn vastgesteld, wordt door het RIVM in zijn functie als EU Communautair Referentielaboratorium (CRL) een waarde van 0,2 µg/kg geadviseerd voor alle niet lichaamseigen stoffen. Voor de lichaamseigen hormonen is de situatie gecompliceerder, maar tegelijkertijd ook overzichtelijker. Naast bevestiging van de identiteit speelt echter ook de kwantificering een belangrijke rol. Natuurlijke gehalten zijn zeer laag. Om 17β-oestradiol in spiervlees te kunnen meten dient de bepaalbaarheidsgrens van een analysemethode maximaal 0,005 µg/kg te bedragen. Een MRPL heeft echter betrekking op de controle op illegaal gebruik, en in het algemeen op verhoogde gehalten. Op basis van de in dit rapport beschreven resultaten kan een voorstel voor een MRPL worden gedaan. Gecompliceerd is echter het feit dat tot op heden onvoldoende kwantitatieve gegevens beschikbaar zijn over de gehalten van de diverse anabole stoffen in spiervlees. Om een bijdrage te leveren aan de nadere onderbouwing van eventuele grenswaarden zijn in totaal circa 130 monsters importvlees, verzameld in 2001, kwantitatief onderzocht op de diverse natuurlijke hormonen, inclusief nortestosteron en boldenon. Van beide stoffen is inmiddels bekend dat deze in een aantal species van nature aanwezig kunnen zijn.

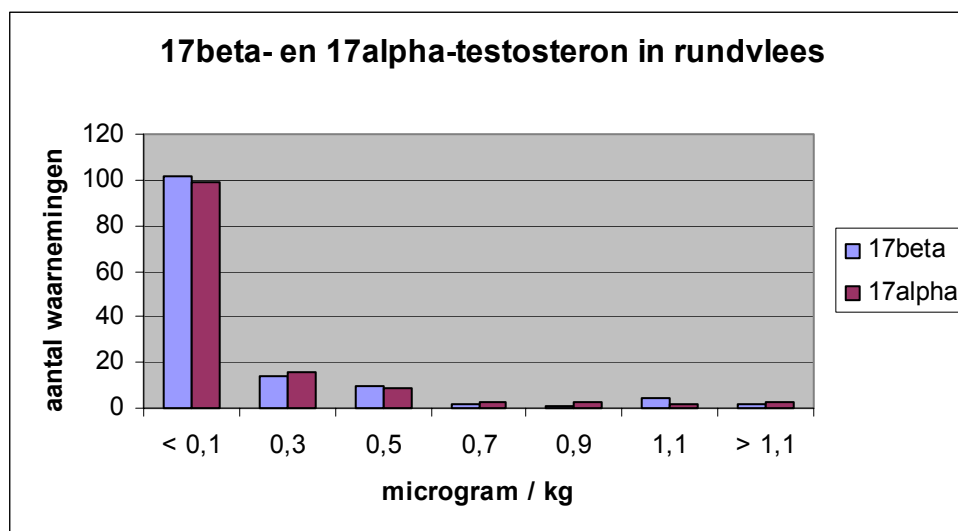
De resultaten voor 17β-oestradiol zijn samengevat in Figuur 3a.



Figuur 3a: Verdeling gehalte 17β-oestradiol in 132 monsters rundvlees.

In 78% van de monsters was 17β-oestradiol niet aantoonbaar (< 0,005 µg/kg), terwijl in 99% van de monsters het gehalte lager was dan 0,05 µg/kg. Slechts in één monster werd een relatief hoog gehalte aangetroffen (> 0,1 µg/kg). De metaboliet 17α-oestradiol was incidenteel aantoonbaar in gehalten boven de detectiegrens van 0,1 µg/kg.

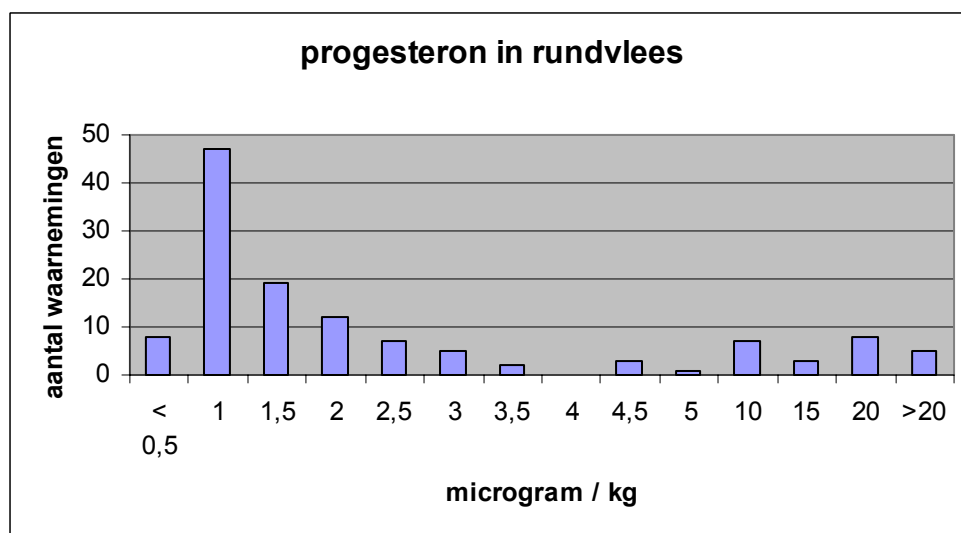
Figuur 3b vat de resultaten samen voor  $17\alpha$ - en  $17\beta$ -testosteron.



Figuur 3b: Verdeling gehalten  $17\alpha$ - en  $17\beta$ -testosteron in 132 monsters rundvlees.

In 76% van de monsters waren zowel het  $17\alpha$ - als  $17\beta$ -testosteron gehalte lager dan de aantoonbaarheidsgrens van  $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ , terwijl in 99% van de monsters het gehalte lager was dan  $1,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Voor zowel  $17\alpha$ - als  $17\beta$ -testosteron geldt dat het gehalte in één geval hoger was dan  $1,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Dit betrof overigens twee verschillende monsters.

In Figuur 3c zijn de resultaten voor progesteron samengevat.

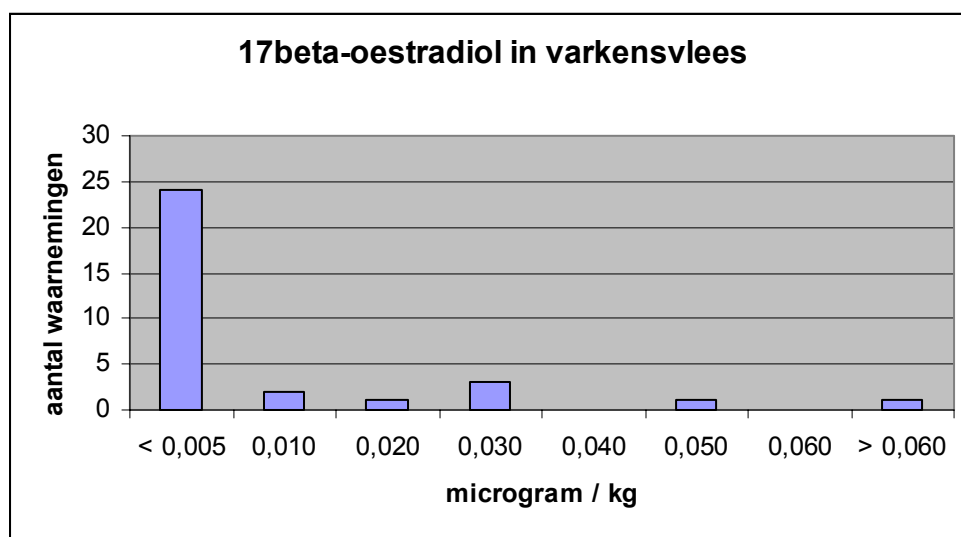


Figuur 3c: Verdeling gehalte progesteron gehalte in 132 monsters rundvlees.

Progesteron is een hormoon dat in veel hogere gehalten, tot waarden boven  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ , in rundvlees wordt aangetroffen. In 6% van de monsters was het gehalte lager dan de aantoonbaarheidsgrens van  $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ , in 4% hoger dan  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

### 3.1 Resultaten onderzoek varkensvlees

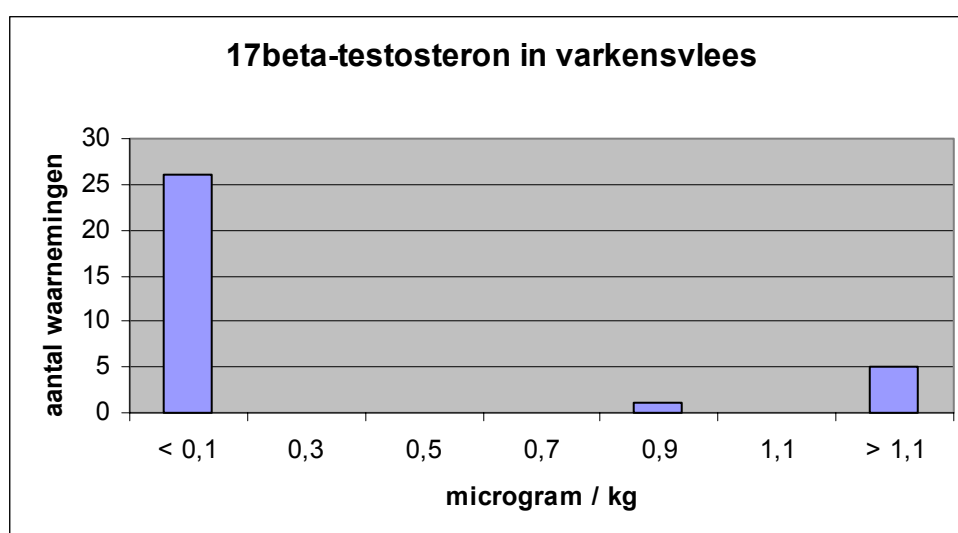
In Figuur 4a zijn de resultaten samengevat voor  $17\beta$ -oestradiol in 32 monsters varkensvlees.



Figuur 4a: Verdeling gehalte  $17\beta$ -oestradiol in 32 monsters varkensvlees.

In 75% van de monsters was het gehalte lager dan  $0,005 \mu\text{g}/\text{kg}$ , in 97% lager dan  $0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$ . In één monster was het gehalte hoger. Het  $17\alpha$ -oestradiol is bij het varken geen metaboliet en werd ook niet aangetroffen.

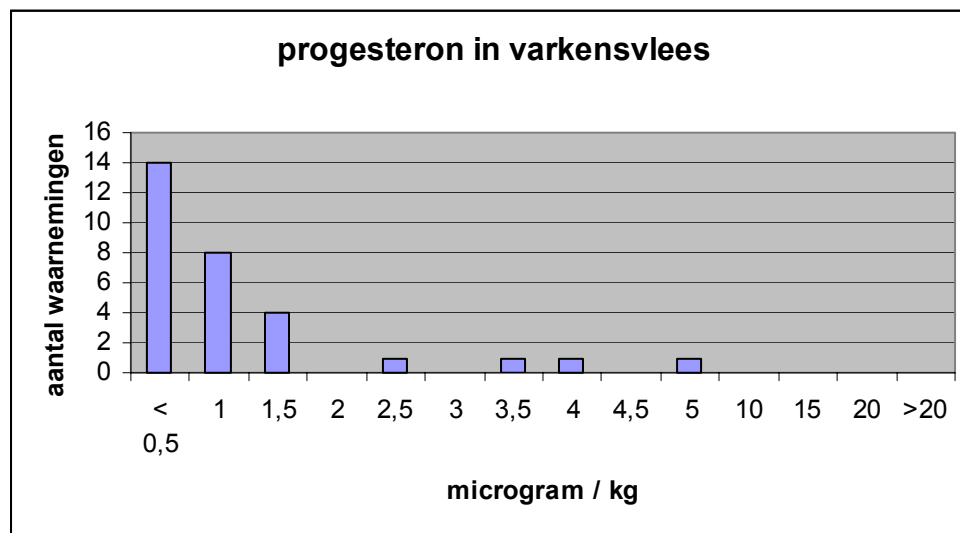
Figuur 4b vat de resultaten samen voor  $17\beta$ -testosteron.



Figuur 4b: Verdeling gehalte  $17\beta$ -testosteron in 32 monsters varkensvlees.

In 81% was de aanwezigheid van  $17\beta$ -testosteron niet aantoonbaar. In 16% van de monsters was het gehalte echter hoger dan  $1,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Het  $17\alpha$ -testosteron was in geen van de monsters aantoonbaar.

Figuur 4c vat de resultaten verkregen voor progesteron samen.



Figuur 4c: Verdeling gehalte progesteron in 32 monsters varkensvlees.

In 47% van de monsters was progesteron niet aantoonbaar. De hoogste gemeten gehalten bedroegen circa  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Bekend is dat in ongecastreerde mannelijke varkens (beren)  $17\beta$ -nortestosteron van nature aanwezig is (2). Vermoed wordt dat dit eveneens geldt voor  $17\beta$ -boldenon. In Tabel 2 zijn de resultaten voor alle natuurlijke hormonen waarnaar onderzoek is verricht en waarbij de aanwezigheid van  $17\beta$ -nortestosteron werd aangetoond samengevat. In vier van de in totaal zes monsters werd naast  $17\beta$ -nortestosteron tevens  $17\beta$ -boldenon aangetroffen. De gehalten aan  $17\beta$ -boldenon waren beduidend lager dan die voor  $17\beta$ -nortestosteron. Daarnaast is het zo dat de gehalten aan  $17\beta$ -oestradiol en  $17\beta$ -testosteron tot de hoogst gemeten waarden behoren. Voor progesteron is dit in mindere mate het geval.

Tabel 4: Resultaten onderzoek monsters varkensvlees ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) positief bevonden op  $17\beta$ -nortestosteron.

Monster-Nummer	$17\alpha$ -testosteron	$17\beta$ -testosteron	$17\alpha$ -oestradiol	$17\beta$ -oestradiol	$17\alpha$ -nortestosteron	$17\beta$ -nortestosteron	progesteron	$17\beta$ -boldenon
2001M1720	<0,1	0,9	<0,1	0,03	<0,1	0,39	0,3	0,05
2001M1727	<0,1	1,6	<0,1	0,05	<0,1	0,67	0,1	0,05
2001M1728	<0,1	1,8	<0,1	0,02	<0,1	0,16	0,4	<0,05
2001M1733	<0,1	1,4	<0,1	0,03	<0,1	0,56	0,4	0,09
2001M1734	<0,1	1,4	<0,1	0,03	<0,1	0,46	0,4	0,09
2001M1738	<0,1	1,4	<0,1	0,08	<0,1	0,65	1,1	<0,05

### 3.2 Grenswaarden voor afwijkende gehalten

Noodzakelijk voor onderzoek op illegaal gebruik van lichaamseigen groeibevorderende stoffen is het vaststellen van grenswaarden. Bij gehalten hoger dan deze grenswaarden kan er, statistisch, van een afwijkende situatie worden gesproken. In het geval van natuurlijke (anabole) steroïden, is een behandeling met een hormoonhoudend preparaat een mogelijke verklaring.

Op basis van de bovenbeschreven resultaten is geconcludeerd dat het voor  $17\beta$ -oestradiol mogelijk is een referentiewaarde vast te stellen waarboven het aannemelijk is dat er sprake is van een dergelijke afwijkende situatie. Ten behoeve van de evaluatie van de in 2003 ontvangen monsters import rundvlees is deze waarde gesteld op  $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$  vlees.

Voor  $17\beta$ -testosteron is deze waarde gesteld op  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  vlees.

### 3.3 Resultaten onderzoek importvlees 2003

Resultaten van het onderzoek van monstermaterialen verzameld in 2003 zijn in onderstaande tabel samengevat.

Tabel 5: Overzicht uitgevoerde analyses en resultaten: monsterverzameling 2003.

Onderzoek	Aantal monsters	Resultaten	Rapportage - briefnummer
Lichaamseigen hormonen in importvlees ( $\alpha$ -oestradiol, $\beta$ -oestradiol, $\alpha$ -testosteron, $\beta$ -testosteron, Progesteron)	200	Alle monsters "conform"*	1248/2003
Lichaamsvreemde hormonen in importvlees ( $\beta$ -nortestosteron, $\beta$ -boldenon, methyltestosteron, ethinyloestradiol, methylboldenon, ethylnortestosteron)	200	Alle monsters "conform"	1248/2003
Zeranol en metabolieten in importvlees	200	Alle monsters "conform"	1249/2003
Stanozolol in importvlees	200	Alle monsters "conform"	1259/2003
$17\beta$ -Trenbolon in importvlees	200	Alle monsters "conform"	0600/2004
Gestagenen in importvlees (medroxyprogesteron, delmadinon, megestrol, isofluprenon, flurogeston, melengestrol)	200	Alle monsters "conform"	0690/2004
Beta-agonisten in importvlees (cimaterol, cimbuterol, zilpaterol, ractopamine, clenproperol, clenbuterol, broombuterol, mabuterol, mapenterol, isoxsuprine)	200	Alle monsters "conform"	0689/2004

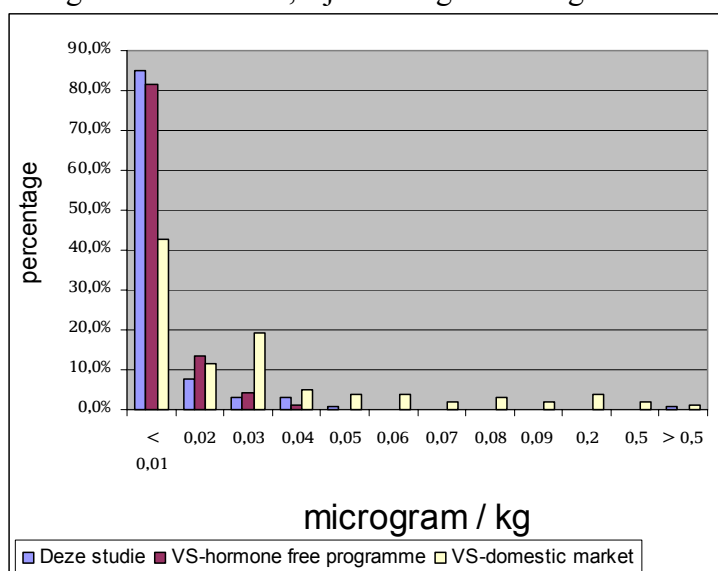
\* Een monster vertoonde een gehalte groter dan de vastgestelde grenswaarde van  $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$

In geen van de onderzochte monsters werden residuen van lichaamsvreemde hormonen aangetroffen. Op basis van het hierboven geformuleerde criterium voor  $17\beta$ -oestradiol wordt eveneens geconcludeerd dat er geen aanwijzingen zijn verkregen die duiden op het gebruik van  $17\beta$ -oestradiol.

## 4. Discussie

Onderzoek van 200 monsters importvlees van uitstekende kwaliteit, bemonsterd in 2003 en begin 2004, afkomstig uit Zuid-Amerika, vooral uit Brazilië en Argentinië, heeft geen aanwijzingen opgeleverd dat dit vlees afkomstig is van dieren behandeld met een niet lichaamseigen groeibevorderende stof. De beperking ligt per definitie in het aantal stoffen waarop het onderzoek is uitgevoerd. Gekozen is voor de stoffen waarvan het gebruik in sommige delen van de wereld is toegestaan, aangevuld met enkele stoffen waarvan het gebruik bij andere onderzoeken inmiddels is aangetoond. Hierbij werd zowel onderzoek verricht op de hormonale groeibevorderaars als op de beta-agonisten. Uit het in 2001 uitgevoerde onderzoek van monsters varkensvlees moet overigens wel worden geconcludeerd dat ook zogenaamd berenvlees naar de EU wordt geëxporteerd. De aanwezigheid van zowel  $17\beta$ -nortestosteron en  $17\beta$ -boldenon wijzen hier op. Bovendien was in één monster rundvlees het gehalte aan  $17\beta$ -oestradiol  $> 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$  hetgeen duidt op een mogelijke behandeling met een  $17\beta$ -oestradiol bevattend preparaat.

Voor de natuurlijke hormonen is gesteld dat het niet mogelijk is een grenswaarde vast te stellen waarbij natuurlijke gehalten zich onderscheiden van waarden verkregen na toediening. De enige mogelijk uitzondering hierop is het  $17\beta$ -oestradiol. Ter verdere onderbouwing van een dergelijke waarde zijn de resultaten van deze studie vergeleken met die eerder verkregen tijdens onderzoek van monsters importvlees vanuit de Verenigde Staten (3,4). Dit onderzoek had betrekking op twee groepen monsters, monsters afkomstig van het “Hormone Free Cattle” program (HFC) en monsters genomen op de lokale Verenigde Staten-markt. Hoewel van de HFC-monsters is vastgesteld dat een aantal wel degelijk afkomstig was van behandelde dieren kan gesteld worden dat deze groep vooral betrekking heeft op onbehandelde jonge dieren. Gezien de registratie in de Verenigde Staten van een aantal voor de groeibevordering bedoelde preparaten, waarvan een aantal onder andere  $17\beta$ -oestradiol bevat, is het aannemelijk dat een aanzienlijk gedeelte van de monsters genomen op de lokale markt in de Verenigde Staten afkomstig is van behandelde en/of oudere dieren. De resultaten van deze twee in samenstelling sterk verschillende groepen, samen met de resultaten verkregen in deze studie, zijn samengevat in Figuur 5.



Figuur 5: Verdeling  $17\beta$ -oestradiol gehalten importvlees Zuid-Amerika (deze studie) VS “hormone free cattle”programme en de lokale VS markt.



De kerngegevens van de drie verdelingen zijn samengevat in Tabel 6.

*Tabel 6: Kerngegevens verdeling 17 $\beta$ -oestradiol waarden drie populaties rundvlees.*

Gehalte of %	Deze studie	VS-HFC	VS-domestic
< 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$	85%	81%	43%
$\leq$ 0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	99%	100%	93%
$\geq$ 0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1	0	7
99%	$\leq$ 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$	$\leq$ 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$	$\leq$ 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

De gegevens uit deze studie komen goed overeen met die van het VS-HFC. Slechts in één geval was het gehalte aanzienlijk verhoogd en kan geconcludeerd worden dat sprake is van een afwijkende situatie. Een behandeling met een met 17 $\beta$ -oestradiol bevattend preparaat is een mogelijke verklaring. Het aantal waarden boven 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in de Verenigde Staten-domestic populatie was aanzienlijk groter. Bovendien is de verdeling van gehalten tussen 0,01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  significant verschillend. Uitgaande van een gehalte van 0,005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  voor die monsters waarin het gehalte niet meetbaar was, kan geconcludeerd worden dat het gemiddelde gehalte aan 17 $\beta$ -oestradiol in het Verenigde Staten-domestic market vlees (gemiddeld gehalte 0,039  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) een factor 5 hoger is dan dat in het vlees afkomstig van het Verenigde Staten HFC (gemiddeld gehalte 0,008  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of afkomstig uit Zuid-Amerika (gemiddeld gehalte 0,008  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Hierbij is echter uitdrukkelijk rekening te houden met de sterk verschillende samenstelling van de twee Verenigde Staten rundvlees populaties

In een recent overzichtsartikel zijn de meest relevante gehalten aan 17 $\beta$ -oestradiol zoals gemeten in eetbare delen van runderen samengevat (5). Voor niet drachtige runderen varieerde de mediaan van < 0,005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tot 0,044  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . De diversiteit in gehanteerde technieken was echter zeer groot. De corresponderende waarden verkregen voor de drie hierboven genoemde studies waren respectievelijk < 0,010  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Zuid-Amerika en Verenigde Staten–HFC) en 0,02  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Gezien de vergelijkbaarheid van de verdelingen zoals verkregen voor de populatie monsters afkomstig van respectievelijk Zuid-Amerika en het Verenigde Staten HFC-programma wordt geconcludeerd dat gehalten tot 0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  niet als afwijkend kunnen worden beschouwd. Gezien de toch nog beperkte omvang van de onderzochte en gecombineerde populatie wordt geadviseerd voorlopig een waarde van 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  te hanteren. Bij gemeten gehalten boven deze grenswaarden is vervolgens sprake van een afwijkende situatie. Een mogelijke verklaring hiervoor is het gebruik van een groeiverbeterende stof.

De consument heeft binnen de EU weinig te vrezen van residuen van groeibevorderende stoffen zoals aanwezig in uit de Verenigde Staten of Zuid-Amerika geïmporteerde vleesproducten. Indien vlees een gehalte aan 17 $\beta$ -oestradiol bevat overeenkomend met de geadviseerde grenswaarde van 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dan resulteert de consumptie van 300 gram vlees in een inname van 30 ng, overeenkomend met de consumptie van ongeveer 200 gram kippenei (5). Het gaat hier echter om een vergelijking tussen een uitzonderlijk hoog gehalte in spiervlees met een regulier gehalte in ei.

Gedurende het in 2003 en 2004 uitgevoerde onderzoek werd in één monster een gehalte > 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aangetroffen.

Consumptie van geïmporteerd vlees resulteert niet in een meetbare belasting van de consument met lichaamsvreemde hormonen of verhoogde gehalten aan lichaamseigen hormonen. De aanbevolen grenswaarde voor  $17\beta$ -oestradiol wordt slechts sporadisch overschreden. Echter ook in die situatie blijft de inname beperkt en vergelijkbaar met de inname via de consumptie van bijvoorbeeld eieren of melk (5).

Een belangrijk hiaat in de huidige kennis, met name ook ten aanzien van de belasting met niet-lichaamseigen groeibevorderende stoffen, heeft betrekking op onderzoek van monsters vlees geproduceerd binnen de EU.

## Referenties

1. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products.  
Official Journal of the European Communities (1996): L125, 10-31.
2. Ginkel, L.A. van, Stephany, R.W., Zoontjes, P.W., Rossum, H.J., Blitterswijk, H. van, Zuydendorp, J. van. Het voorkomen van nortestosteron in eetbare delen van niet gecasteerde mannelijke varkens. Tijdschr. Diergeneeskd. 114 (1989) 331–314.
3. Stephany, R.W., Andre, F. Results of hormone residue analyses of bovine meat and liver originating from the USA domestic market. CRL report 389002093 (2000).
4. Stephany, R.W., Andre, F. Results of hormone residue analyses of bovine meat and liver imported into the EU and originating from the USA hormone free cattle program. CRL report 389002091 (1999).
5. Stephany R.W., Sterk, S.S. en Ginkel, L.A. van. Levels of endogenous hormones in edible tissues – an overview of current knowledge. Proceedings EuroResidue V conference Noordwijkerhout, NL, May 10-12 (2004) 111–121.
6. Commission of the European Communities 4141/VI/90 – Rev 3a. Recommendations for dealing with the illegal use of natural sex hormones in bovine fattening animals.
7. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 laying down performance criteria for the analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animal and animal products according to Council Directive 96/23/EC.  
Journal of the European Communities (2002): L221, 8-36.