

Forschung - EU-Projekt

Determination of the Origin of Hormones in Cattle by Isotope Ratio Mass Spectrometry – ISOSTER –

Projektdauer

48 Monate: 01.01.2002 bis 31.12.2005

Fördervolumen

1.8 Mio Euro

Projektpartner

1. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (**BgVV**), Dr. A. Preiß-Weigert, Berlin
2. Deutsche Sporthochschule (**DSHS**), Prof. W. Schänzer, Köln
3. Central Science Laboratory (**CSL**), M. Sharman, York, England
4. Laboratoire D'Etudes des Residues et des Contaminants dans les Aliments, (**LABERCA**), Prof. F. André, Nantes, Frankreich
5. Queen's University Belfast, Dr. G. Kennedy, (**QUB**), Nordirland
6. **TNO** Nutrition and Food Research, Dr. R. Schilt, Zeist, Niederlande
7. **Thermo Finnigan MAT**, Dr. A. Hilker, Bremen
8. **Micromass**, Dr. F. Fourel, Manchester, England
9. **Dionex**, Dr. D. Haufe, Idstein

Projektkoordination

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (**BgVV**), Dr. A. Preiß-Weigert

Am Projekt beteiligte BgVV Dienststellen:

Mehrere Fachbereiche (2, 3, 5 und 6) sind am Projekt beteiligt.

Bestimmung des Ursprungs von Steroidhormonen beim Rind

Problemstellung

Zur Kontrolle des illegalen Einsatzes von synthetisch hergestellten natürlichen Steroidhormonen in der Rindermast soll im Rahmen eines EU-Projektes ein Nachweisverfahren für Urin und verschiedene Gewebe entwickelt werden.

Steroidhormone werden seit mehr als 30 Jahren zur Wachstumsförderung bei Rindern eingesetzt. Dabei wird zwischen körperfremden Hormonen (z.B. Trenbolon, Zeranol, Boldenon) und physiologischen Hormonen (z.B. Estradiol, Progesteron, Testosteron) unterschieden. Die Nebenwirkungen von Hormonen umfassen u.a. genotoxische, neurobiologische und karzinogene Effekte. Die Bewertung der Risiken, die für den Verbraucher durch den Verzehr von Lebensmitteln, die von hormonbehandelten Tieren gewonnen werden, entstehen können, führte in einzelnen Ländern zu unterschiedlichen Ergebnissen (Karg und Meyer 1999, Kastner und Pawsey 2002).

In den USA ist in der Rinderproduktion zur Wachstumsförderung der Einsatz dreier natürlich vorkommender Hormone (Progesteron, 17β -Testosteron und 17β -Estradiol) und dreier synthetischer Hormone (Trenbolonacetat, Zeranol und Melengestrolacetat) in Form von Implantaten zugelassen. Dagegen ist in der EU der Einsatz aller Substanzen, die eine hormonale Wirkung haben, zur Wachstumsförderung seit 1988 (88/146/EEC ersetzt durch 96/22/EC) verboten. Aus Ländern, in denen der Gebrauch dieser Hormone erlaubt ist, ist der Import von Tieren, Fleisch oder Fleischprodukten in die EU verboten oder unterliegt strengen Regelungen.

Die Richtlinie 96/23/EC verpflichtet zur Überwachung dieser Substanzen und deren Rückständen in Tieren und Tierprodukten. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit zur Entwicklung eines Kontrollsystems zur Feststellung des Vorhandenseins und der Konzentration von anabolen Steroiden in Fleisch, Schlachtkörpern und Ausscheidungen von lebensmittelliefernden Tieren. Geeignete Methoden zum Nachweis der illegalen Anwendung müssen daher entwickelt und validiert werden. Diese Aufgabe fällt im wesentlichen den nationalen Referenzlaboren zu, zu denen auch das BgVV gehört.

Unter den Substanzen, die in der EU verboten sind und illegal zur Wachstumsförderung angewendet werden, gewinnt der Einsatz natürlicher Hormone immer mehr an Bedeutung.

Für die natürlichen Hormone ist der Nachweis der illegalen Anwendung schwierig, da keine absoluten und definierten Methoden existieren, um zwischen endogenen und verabreichten natürlichen Hormonen zu unterscheiden. Im Gegensatz hierzu ist bei den synthetischen Hormonen Gas Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) eine effiziente analytische Kontrollmethode (z.B. Andre et al 1994, Marchand et al 2000, Teale und Houghton 1991).

Wissenschaftliche Zielstellung / Methodik

Gas Chromatographie-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-C-IRMS) ist ein neuer Ansatz, um den Ursprung (biosynthetisiert oder synthetisiert) der natürlich in Rinderurin und Gewebe vorhandenen Steroidhormone nachzuweisen.

Dabei wird das Verhältnis der beiden $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotope in den Hormonmolekülen bestimmt. Synthetisch hergestellte Steroide haben ein anderes Isotopenverhältnis als die im Tier biosynthetisierten. Der Vergleich des Isotopenverhältnisses der Steroide und ihrer Metaboliten mit dem von endogenen Vorstufen soll eine Aussage darüber erlauben, ob synthetisch aus einer Pflanzenart gewonnene Hormone verabreicht wurden.

Das Ziel dieses Projektes ist die

- Entwicklung und Validierung einer GC-C-IRMS Methode zum Nachweis der illegalen Verabreichung von natürlichen Hormonen im Rinderurin, die als offizielle Kontrollmethode eingesetzt werden kann.
- Weiterhin sollen auch Verfahren zum Nachweis der Steroidhormone in Matrices wie Faeces, Muskel, Niere und Fett entwickelt werden.

Hierdurch soll der gesamte Bereich der Kontrolle, also die Probenahme auf der Farm, im Schlachthaus, im Handel und an den Grenzen abgedeckt werden.

Bislang gibt es verschiedene Ansätze zur Kontrolle einer illegalen Verabreichung von natürlichen Hormonen:

- Die Definition einer physiologischen Grundkonzentration. Hierfür wird ein physiologischer Hormonspiegel für unterschiedliche Gewebe und unterschiedliche Tiere ermittelt und eine Entscheidungsgrenze definiert, oberhalb der Tiere als illegal behandelt betrachtet werden müssen. (Arts et al 1991, Scippo et al 1994). Aufgrund der Variabilität der Hormonkonzentrationen ist diese Methode nur sehr eingeschränkt verwendbar.
- Die Festlegung von Steroidspiegeln und Verhältnissen. Hierfür wird die Konzentration des zu untersuchenden Hormons oder eines Metaboliten in Relation zu einer Vorstufe bestimmt (Schänzer und Donike 1993). Da die verabreichten natürlichen Hormone genauso metabolisiert werden wie die biosynthetischen, können die Verhältnisse des verabreichten Hormons/Metabolit zu ihren Vorstufen verschoben sein. Diese Methode wird zur Aufdeckung eines illegalen Einsatzes im Humandoping und beim Pferdesport verwendet (Bonnaire et al 1995, Houghton et al 1992,). Auch für Rinder wurde dieser Nachweis getestet (Fritsche et al 1999). Diese Methode hat den Nachteil, dass auch die Hormonmuster und die Verhältnisse zueinander durch Faktoren wie Alter, Aufzucht und Gewebearbeit beeinflusst werden. Außerdem kann die Methode durch die gleichzeitige Verabreichung der entsprechenden Vorstufe unbrauchbar gemacht werden (Dehennin 1994).

Um die Nachteile der beschriebenen Methoden zu umgehen und den Missbrauch von Testosteron im Sport direkt nachzuweisen, wurde GC-C-IRMS als Nachweismethode getestet (Aguilera et al 1999, Becchi et al 1997, Horning et al 1997, Shackleton et al 1997). Das Prinzip der Methode basiert auf dem Unterschied des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Verhältnisses von endogenen Steroiden verglichen mit dem von synthetisch hergestellten. Pflanzen bevorzugen jeweils einen von zwei möglichen Stoffwechselwegen zum Einbau von CO_2 . Die danach unterschiedenen sogenannten C3- und C4-Pflanzen weisen dadurch unterschiedliche Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffes in ihren Molekülen auf. Während die endogenen Hormone im Tier aus einer Mischung dieser beiden Pflanzenarten entsprechend der Futterzusammensetzung gebildet werden, werden die synthetischen Hormone nur aus einer Pflanzenart (bevorzugt Soja) hergestellt. Daher kann die Verabreichung eines solchen synthetisch hergestellten natürlichen Hormons zu einer signifikanten Änderung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Verhältnisses bei dem Hormon und seinen Metaboliten, nicht aber bei den ebenfalls bestimmbaren Vorstufen im Tier führen.

Tierversuche (BgVV)

Einige Studien zur Bestimmung von biosynthetischem und synthetischem Testosteron in Rinderurin (Ferchaud et al 1998) und Galle (Mason et al 1998) wurden bereits durchgeführt. Nach Testosteron-Verabreichung wurde das Isotopenverhältnis von Testosteron und/oder Metabolit signifikant im Verhältnis zu einer Vorstufe verändert.

Es zeigte sich aber, dass das Isotopenverhältnis der biosynthetischen Hormone stark von der Zusammensetzung der Fütterung abhängt (Ferchaud et al 2000). Dieser Einfluss wird im Rahmen des Projektes eingehender in Tierversuchen untersucht werden, um die physiologi-

sche Schwankungsbreite der Isotopenverhältnisse festzustellen und damit die Anwendungsgrenzen der GC-C-IRMS zu ermitteln.

Je nach Alter und Geschlecht der Rinder werden unterschiedliche Hormone zur Wachstumsförderung verabreicht. Eine genaue Kenntnis des natürlichen Steroidprofils, also der absoluten Konzentrationen und der Verhältnisse der einzelnen Hormone zueinander, in jeder Altersgruppe und bei den Geschlechtern ist notwendig, um für den Nachweis die jeweils geeignetsten Zielmoleküle auswählen zu können.

Die Untersuchungen werden mit der folgenden Zielsetzung durchgeführt:

- Entwicklung einer validierten Methode zum Nachweis der Verabreichung natürlicher Hormone im Urin von Rindern.
- Ausweitung der Methode zum Nachweis der Verabreichung natürlicher Hormone in verschiedenen Geweben von Rindern.
- Untersuchung des Einflusses der Ernährung auf das Isotopenverhältnis
- Untersuchung des Einflusses der Verabreichung von natürlichen Hormonen auf das Steroidprofil

Der erste Tierversuch dient dazu, die durch Alter und Geschlecht der Tiere bedingten Unterschiede im Hormonspiegel im Urin herauszuarbeiten und damit die Auswahl geeigneter Analyten für die GC-C-IRMS Analyse zu ermitteln. Dieser Versuch soll auch genügend Probenmaterial ergeben, um einen Ringversuch zur Validierung der Methode im Urin zu ermöglichen. Eine Behandlung ist dafür nicht erforderlich und die Probenahme des Urins erfolgt nichtinvasiv.

Um Probenmaterial mit einem veränderten Isotopenverhältnis als Positivmatrix zu erhalten, werden zwei Tiere (eine Färsen, ein Ochse) mit geeigneten Implantaten oder durch Injektion eines natürlichen Hormons (Konzentration im zur Wachstumsförderung angewendeten Bereich) behandelt werden.

In einem zweiten Tierversuch soll der Einfluss der Verabreichung eines natürlichen Hormons auf das Isotopenverhältnis unter Berücksichtigung des Alters und Geschlechts untersucht werden. Gewonnen werden soll Urin und verschiedene Gewebearten. Hierbei sollen jeweils 4 Bullen, Ochsen, Färsen, Kälber beiderlei Geschlechts und trockenstehende Kühe eingesetzt werden. Jeweils zwei Tieren werden Hormone verabreicht, die anderen beiden bleiben unbehandelt.

Eine statistische Auswertung der beiden Versuche ist wegen der geringen Tierzahl und der erwarteten großen Schwankungsbreite nicht möglich, sie dienen dazu, die verschiedenen Einflussfaktoren zu untersuchen und die geeignetste Gruppe für den dritten Tierversuch auszuwählen.

Hierbei sollen dann 12 Tiere behandelt und 12 Tiere als Kontrolltiere eingesetzt werden, um eine statistisch abgesicherte Aussage über die Eignung des Nachweisverfahrens zu ermöglichen.

Entwicklung der Analysemethoden

Probenvorbereitung (BgVV, DSHS, LABERCA, QUB, TNO, DIONEX)

Entwicklung und Optimierung der Extraktions-, Hydrolyse- und Aufreinigungstechniken für die Matrices Urin, Faeces, Muskel, Niere und Fett:

Unter den heutigen gerätetechnischen Voraussetzungen beträgt die für die GC-C-IRMS benötigte Mindestmenge 10 ng Analyt pro Messung, wobei die Anforderungen an die Reinheit

der zur Messung eingesetzten Analyten außerordentlich hoch sind. Die Konzentrationen der Steroidhormone, ihrer Metabolite und Precursor in den Matrices Muskel, Niere, Fett, Faeces und Urin liegen im unteren $\mu\text{g/kg}$ bzw. im ng/kg Bereich. Die benötigten Probenmengen für die Aufarbeitung liegen somit deutlich über den in der Rückstandsanalytik üblichen Mengen. Deshalb bedarf die Extraktion und Aufreinigung der Analyten aus den genannten Matrices einer sorgfältigen Methodenentwicklung unter Einsatz hochleistungsfähiger Probenvorbereitungstechniken, beispielsweise der accelerated solvent extraction, ASE, oder der semipräparativen, multidimensionalen HPLC.

Jeder Projektpartner ist hierbei für eine Matrix verantwortlich: BgVV entwickelt die Probenvorbereitungsmethode für Faeces, LABERCA für Muskel, QUB für Niere, TNO für Fett. Dionex unterstützt das BgVV in der Optimierung der Extraktionsbedingungen mittels der ASE sowie in der Erarbeitung einer Applikation für die multidimensionale HPLC zur Probenaufreinigung von Faeces-Proben.

Optimierung der GC-C-IRMS (BgVV, DSHS, CSL, LABERCA, TNO, Thermo Finnigan MAT, Micromass)

Optimierung der GC-C-IRMS Bedingungen in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern, die IRMS-Geräte herstellen

Zur Erhöhung der Nachweisgrenzen werden die Gerätehersteller zusammen mit den im Projekt vertretenen Geräteanwendern maßgeschneiderte Applikationen erarbeiten und gegebenenfalls deren Anwendung in Trainingskursen vertiefen.

Die für den Probeneinlass wesentlichen Peripherietechniken – Derivatisierungen, Gaschromatographie, Injektionsmethoden, z.B. Large Volume Injektion, sowie der Einsatz verbesserter Combustion-Interfaces sind ebenfalls Gegenstand der Optimierung.

Validierung der GC-C-IRMS Methode für Urin

Die für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse der Steroide im Urin vorliegenden Methoden aus dem Sportdoping und der europäischen Lebensmittelüberwachung vorliegenden Methoden sollen nach deren Optimierung in einem Ringversuch validiert werden.

Literatur

R. Aguilera, D.H. Catlin, M. Becchi, A. Phillips, C. Wang, R.S. Swerdloff, H.G. Pope, C.K. Hatton,

Screening urine for exogeneous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstanediols

Journal of Chromatography B, 727, 95-105, 1999

F. Andre, B. Le Bizec, M.-P. Montrade, D. Maume, F. Monteau, P. Marchand

Development in residue assay and metabolism study of growth-promoters by mass spectrometric analysis

Analyst, 119, 2529-2535, 1994

C.J.M. Arts, , M.J. van Baak, H. van den Berg, R. Schilt, P.L.M. Berende, J.M.P. den Hartog,

Concentrations of the Endogenous Steroid Hormones Oestradiol-17 β , Testosterone and Progesterone in veal Calves in Connection with the Control for Illegal Administration

Archiv für Lebensmittelhygiene, 41, 53-76, 1990

C.J.M. Arts, M.J. van Baak, J.M.P. den Hartog

Control System for Detection of the Illegal Use of Naturally Occuring Steroids in Calves

Journal of Chromatography, 564, 429-444, 1991

M. Becchi, R. Aguilera, Y. Farizon, M.-M. Flament, H. Casabianca, P. James,

Gas Chromatography/Combustion/Isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 8, 304-308, 1994

Y. Bonnaire, L. Dehennin, P. Plou, P.L. Toutain

Testosterone administration to mares: Criteria for detection of testosterone abuse by analysis of metabolites in plasma and urine

Journal of Analytical Toxicology, 19, 175-181, 1995

L. Dehennin

On the origin of physiologically high ratios of urinary testosterone to epitestosterone: consequences for reliable detection of testosterone administration by male athletes

Journal of Endocrinology 142, 353-360, 1994

V. Ferchaud, B. Le Bizec, F. Monteau, F. Andre

Determination of the exogenous character of Testosterone in bovine urine by Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry

Analyst, 123, 2617-2620, 1998

V. Ferchaud, B. Le Bizec, F. Monteau, F. Andre

Characterization of exogenous testosterone in livestock by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: influence of feeding and age

Rapid Communications in Mass Spectrometry 14, 652-656, 2000

S. Fritsche, G. Schmidt, H. Steinhart

Gas chromatographic-mass spectrometric determination of natural profiles of androgens, progestogens, and glucocorticoids in muscle tissue of male cattle

European Food Research and technology, 209, 393-399, 1999

S. Fritsche, H. Steinhart

Differences in natural steroid hormone patterns of beef from bulls and steers

Journal of Animal Science 76; 1621-1625, 1998

S. Horning, H. Geyer, U. Flenker, W. Schänzer

Detection of exogenous Steroids by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Analysis

in: Recent Advances in Doping Analysis (5)

Schänzer, W.; Geyer, H.; Gotzmann, A.; Mareck-Engeleke (Eds)

Proceedings of the Manfred Donike Workshop 15th Cologne Workshop on Dope Analysis
23rd to 28th February 1997

E. Houghton, L. Grainger, M.C. Dumasia, P. Teale

Application of Gas Chromatography/Mass Spectrometry to steroid analysis in equine sports:
Problems with enzyme hydrolysis

Organic Mass Spectrometry, 27; 1061-1070, 1992

H. Karg, H.H.D. Meyer

Aktualisierte Wertung der Masthilfsmittel Trenbolonacetat, Zeranol und Melengestrolacetat
(Überlegungen zum „Hormonstreit“ zwischen der EU und den USA bei der WTO)

Archiv für Lebensmittelhygiene, 50, 25-48, 1999

J.J. Kastner, R.K. Pawsey

Harmonising sanitary measures and resolving trade disputes through the WTO-SPS frame-
work: Part I: a case study of the US-EU hormone treated beef dispute

Food Control 13, 49-55, 2002

P. Marchand, B. le Bizec, C. Gade, F. Monteau, F. Andre

Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography
coupled to mass spectrometry

Journal of Chromatography A, 867, 219-233, 2000

P.M. Mason, S.E. Hall, I. Gilmour, E. Houghton, C. Pillinger, M.A. Seymour,

The Use of Stable Carbon Isotop Analysis to Detect the Abuse of Testosterone in Cattle
Analyst, 123, 2405-2408, 1998

W. Schänzer, M. Donike,

Metabolism of anabolic steroids in man: Synthesis and use of reference substances for iden-
tification of anabolic steroid metabolites

Analytica Chimica Acta, 275, 23-48, 1993

M.L.Scippo, G. Degand, A. Duyckaerts, G. Maghuin-Rogister, P.Delahaut

Control of the illegal administration of natural steroid hormones in the plasma of bulls and
heifers

Analyst, 119, 2639-2644, 1994

C.H.L. Shackleton, E. Roitman, A. Phillips, T. Chang

Andostanediol and 5-Androstenediol profiling for detecting exogenously administered di-
hydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: Potential use in ngas
chromatography ratio mass spectrometry

Steroids, 62, 665-673, 1997

P. Teale, E. Houghton

The development of a gas chromatography/mass spectrometric screening procedure to de-
tect the administration of anabolic steroids to the horse

Biological Mass Spectrometry, 20, 109-114, 1991