



CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACIÓN

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

JORNADAS DE REFERENCIA

Majadahonda, 9-10 de Junio de 2026

Francisco Javier Arteaga García
Unidad de Zoonosis del CNA –AESAN OA



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

25 años cuidando de tu alimentación



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



Centro
Nacional de
Alimentación

Control de hormonas naturales en muestras biológicas: un reto por abordar



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



Centro
Nacional de
Alimentación

Determinadas sustancias promotoras del crecimiento pueden tener un **origen diferente a la administración intencionada**.



Esto plantea un reto importante en su control, debido a que se exige **probar** el abuso.

Para abordar esta cuestión, el EURL ha elaborado el **Reflection paper 2.0**:

- Origen de estas sustancias
- Métodos analíticos
- Investigación
- Estrategias de control



EURL Reflection paper 2.0:

Natural growth promoting substances in biological samples

Presence - and formation - of hormones and other growth promoting substances in food producing animals.

Current approaches for enforcement and research needs for full implementation in residue control

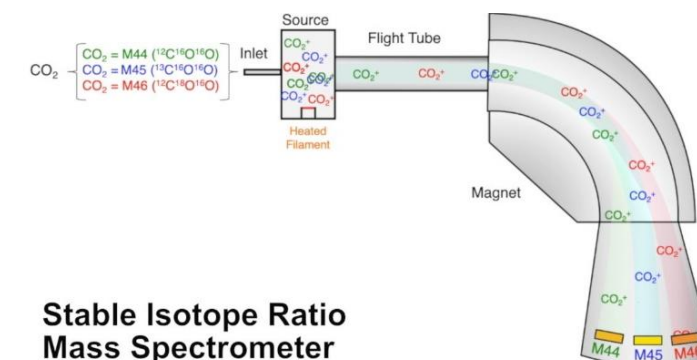
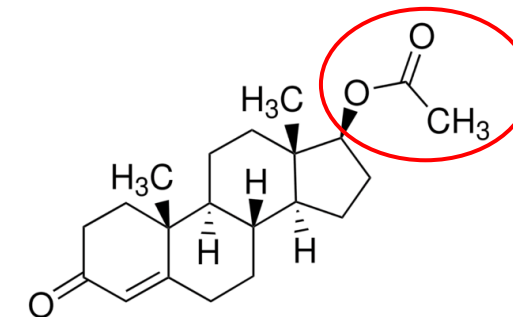
De los grupos de los que somos LNR, las **hormonas** son el grupo más importante.

Actualmente, los únicos métodos que **prueban** el abuso son:

- Detección de **ésteres de hormonas en pelo/plasma/suero**, dado que estos no se forman en la naturaleza
- Técnicas basadas en el **ratio isotópico (IRMS)**, donde la diferencia en el contenido de ^{13}C y el ^{12}C permite la discriminación del origen de la molécula.

Recomendaciones EURL:

- Implementar programas nacionales de determinación de **ésteres en pelo**
- Implementar un **método de screening** para discriminar entre no tratado y sospechoso de haber sido tratado y posteriormente **confirmar por IRMS**
- Continuar la investigación en métodos de screening como el **perfil de esteroides** o los **niveles umbral de metabolitos**, así como **seguir recogiendo datos**.



Enfoque desde otros laboratorios



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición

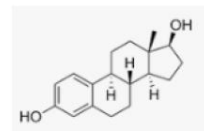
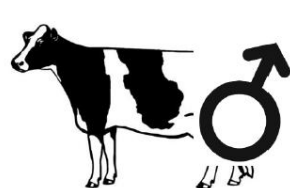


Centro
Nacional de
Alimentación

Países Bajos (WFSR como LNR)



Aplican CCα → se preguntan si su definición es válida para hormonas naturales



17-beta-estradiol

Concentration 8 µg/L (CCα 0,36 ug/L)

17β-Estradiol	Aquaculture	Endogenous, no current criteria for discrimination
	Bovine	Endogenous, limited quantitative criteria available for serum and muscle. Currently no criteria for discrimination based on urine analyses. Some laboratories have implemented GC-CLIR-MS for confirmation.
	Horses	Endogenous, no current criteria for discrimination
	Porcine	Endogenous, no current criteria for discrimination
	Poultry	Endogenous, no current criteria for discrimination
	Sheep / Goats	Endogenous, no current criteria for discrimination

Países Bajos (WFSR como LNR)



En respuesta a esto, han intentado establecer “**valores umbral**” a partir de los datos obtenidos en control oficial (¿todos los animales son “**no tratados**”?):

>50 hallazgos → umbral en el percentil 99 (deja el 99% de los valores por debajo)



Farm, male

17a-estradiol
210
171
0,25 ug/L
13 ug/L
120 (70%) (<1 ug/L)
148 (86%) (<2 ug/L)
167 (98%) (< 5 ug/L)
170 (99%) (< 10 ug/L)

Proposed Signal Limit: 10 ug/L

<50 hallazgos → límite según valores e información conocida (más subjetivo)



Slaughterhouse, male

17a-testosteron	
male	female
20	115
20	114
2,7 ug/L	0,49 ug/L
234 ug/L	127 ug/L
4 (20%) (< 10 ug/L)	12 (11%) (< 2 ug/L)
10 (50%) (< 25 ug/L)	55 (48%) (< 5 ug/L)
15 (75%) (< 50 ug/L)	81 (71%) (< 10 ug/L)
18 (90%) (<100 ug/L)	106 (93%) (< 50 ug/L)
2 (10%) (> 100 ug/L)	100 µg/L (99%-waarde)

Proposed Signal Limit: 100 ug/L

Países Bajos (WFSR como LNR)



Por lo tanto, la información emitida puede ser:

1. Concentración < CCα → conforme
2. Concentración > CCα pero < “valor umbral” → “detectado”
3. Concentración > “valor umbral” → “no conforme”

En el último caso, se avisa a la autoridad competente y se la recomienda una inspección, toma de nuevas muestras, etc.

Beproeversrapport 202049675-V01		SOP-A-1160 - Screening van hormonen - GC-MS/MS			
Monstergegevens		Verdacht, zie vervolgonderzoek Q			
Zegelnummer: 65303010		SOP-A-1160 - Bevestiging van hormonen - GC-MS/MS			
Datum monstername: 04-09-2025		Parameter	Resultaat	Beslisgrens CCα ⁽¹⁾	Wettelijke Norm ⁽²⁾
Datum monsterontvangst: 05-09-2025		17a-nortestosteron	6,4 µg/l	0.25 µg/l	5 µg/l
Datum start analyse: 08-09-2025		17a-testosteron	12 µg/l	0.25 µg/l	30 µg/l
Product: urine rund		17b-testosteron	0.36 µg/l	0.25 µg/l	1 µg/l
Resultaat ⁽⁴⁾ NIET CONFORM		Oordeel ⁽⁴⁾ > SIGNAALLIMIETQ			

Bélgica (LNR)



- Aplican CCα (<MMPR) en las no naturales
- Aplican otros límites en las que pueden tener origen natural (información a la autoridad competente)
- Determinan ésteres en pelo

Substances	marker	group	matrix	species	
17β-oestradiol	17β-oestradiol	A1c	muscle	all species	NC if > CCα
		A1c	plasma/ serum	all species	<u>Soft info if > CCα</u> <u>NC if > 0.1 ppb</u>
<u>17β-oestradiol</u> <u>ester</u>	<u>17β-oestradiol</u> <u>ester</u>	A1c	<u>hair</u>	all species	<u>NC if > CCα</u>
		A1c	<u>plasma/</u> <u>serum</u>	all species	<u>NC if > CCα</u>

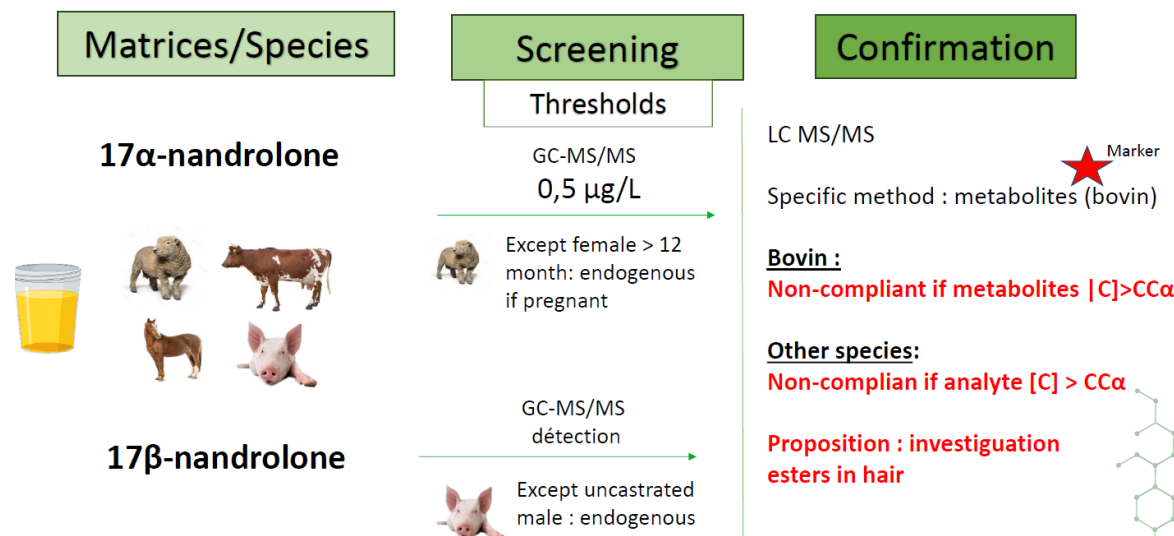
Para hormonas naturales, utilizan **método de screening** → si se supera umbral, confirman con **IRMS** o con **ésteres en pelo**.

Matrices/Species	Screening	Confirmation
	Analytical thresholds	GC-C-IRMS
17 α -estradiol	GC-MS/MS 20 μ g/L	Isotopic deviation Non compliant if Met - ERC < - 3 ‰
17 β -estradiol	10 μ g/L	
17 α -testosterone	GC-MS/MS 50 μ g/L	GC-C-IRMS
17 β -testostérone	10 μ g/L	Isotopic deviation Non compliant if Met - ERC < - 3 ‰

Matrices/Species	Screening	Confirmation
	Analytical thresholds	
17 β -estradiol	GC-MS/MS 20 μ g/kg	LC-MS/MS
17 β -testostérone	20 μ g/kg	Esters of estradiol and testosterone Non-compliant if analyte [C] > CCα

Para **nandrolona** y **boldenona**, la estrategia a aplicar depende de la **especie**, la **edad**, el **género** o incluso del **estado gestacional** del animal estudiado. En determinados casos se analizan **metabolitos**, **ésteres en pelo** o simplemente el **CCalfa**.

Nandrolone



En general, proponen que se establezcan **umbrales a nivel europeo**, y que se realicen **experimentos con animales tratados** para demostrar si el enfoque de los umbrales es válido o no.

República Checa (LNR)



Utilizan **ésteres en pelo y plasma** como método de confirmación.

Animals	Matrix	Analyte	CCa	Technique
Young Bovine	Plasma	Estradiol	0.004 ug/L	GC-MS/MS
Bovine, porcine	Plasma	Estradiol acetate	0.024 ug/L	GC-MS/NCI
		Estradiol benzoate	0.018 ug/L	
		Estradiol cypionate	0.028 ug/L	
		Estradiol enanthate	0.020 ug/L	
		Estradiol valerate	0.023 ug/L	
Bovine, porcine	Hair	Estradiol acetate	4.4 ug/kg	GC-MS/NCI
		Estradiol benzoate	2.6 ug/kg	
		Estradiol cypionate	8.8 ug/kg	
		Estradiol enanthate	3.4 ug/kg	
		Estradiol valerate	4.1 ug/kg	

Encontraron dos marcadores de uso ilegal de nortestosterona en porcino, y están verificando su ausencia en la población general de porcino.

Estrategia del CNA



- ★ Método para **hormonas sintéticas (+ estilbenos + RALs) y semi-naturales (nortestosterona y boldenona)** con validación finalizada y pendiente de revisión.

Alfa-boldenona	(ABOL)	Beta-trembolona	(BTB)	Etinilestradiol	(EE)
Alfa-Clostebol	(ACLOS)	Beta-zearalenol	(BZLE)	Hexestrol	(HEX)
Alfa-Metilboldenona	(AMBOL)	Boldenona	(BOL)	Hidroxi-estanozolol	(OHSTNZ)
Alfa-metiltestosterona	(AMTEST)	Cloroandrostendiona	(CLAD)	Taleranol	(TAL)
Alfa-nortestosterona	(ANT)	Clostebol	(CLOS)	Zearalanona	(ZLA)
Alfa-trembolona	(ATB)	Dienestrol	(DE)	Zearalenona	(ZLEA)
Alfa-zearalenol	(AZLE)	Dietilestilbestrol	(DES)	Zeranol	(ZER)
Beta-nortestosterona	(BNT)	Estanozolol	(STNZ)		

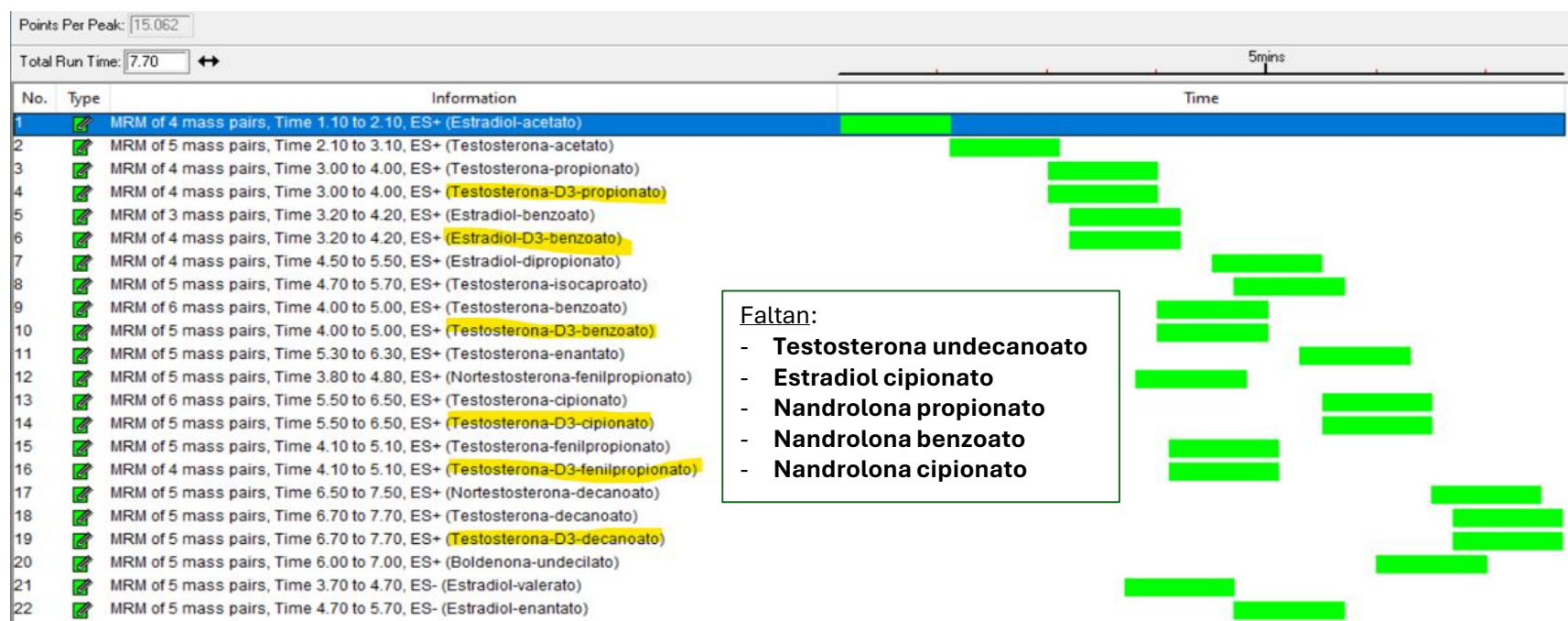


- ★ Desarrollando actualmente un método para el análisis de **ésteres de hormonas en pelo**.

Estrategia del CNA



Alcance previsto: **21 analitos** (5 pendientes de llegar) → 9 ésteres de **testosterona** (acetato, propionato, isocaproato, benzoato, enantato, cipionato, fenilpropionato, decanoato, undecanoato), 5 de **nandrolona** (fenilpropionato, decanoato, propionato, benzoato, cipionato), 6 de **estradiol** (acetato, benzoato, dipropionato, valerato, enantato, cipionato) y 1 de **boldenona** (undecilato).



Estrategia del CNA

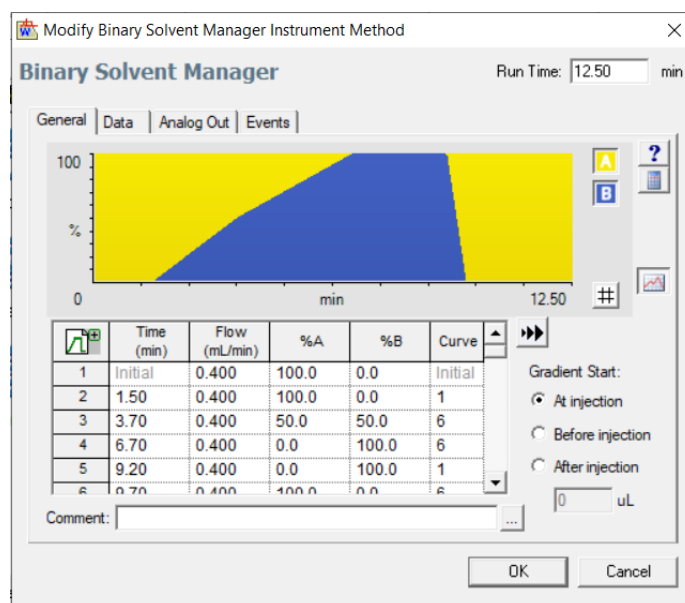


Equipo MS: **Xevo TQ-Absolute** trabajando en modo ESI+ y - simultáneamente.

Cromatografía: **Acquity I-class** trabajando en gradiente con:

FM A = agua:ACN 40:60 + 0,1 mM NH_4F

FM B = ACN + 0,1 mM NH_4F



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

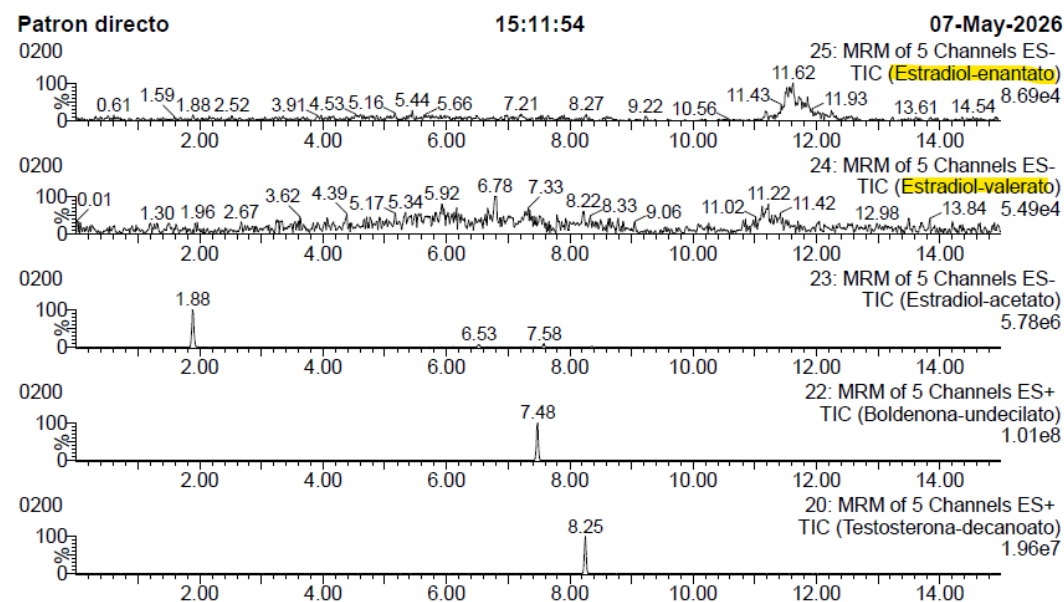


agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



Centro
Nacional de
Alimentación

Principales problemas hasta ahora: la detección de algunos ésteres de estradiol (enantato, valerato, dipropionato...) ha sido complicada



Se probaron FM:

- con y sin ácido fórmico 0,1%
- con y sin formiato amónico 5 mM (+0,1% fórmico)
- con y sin fluoruro amónico 0,1 mM

También se probó:

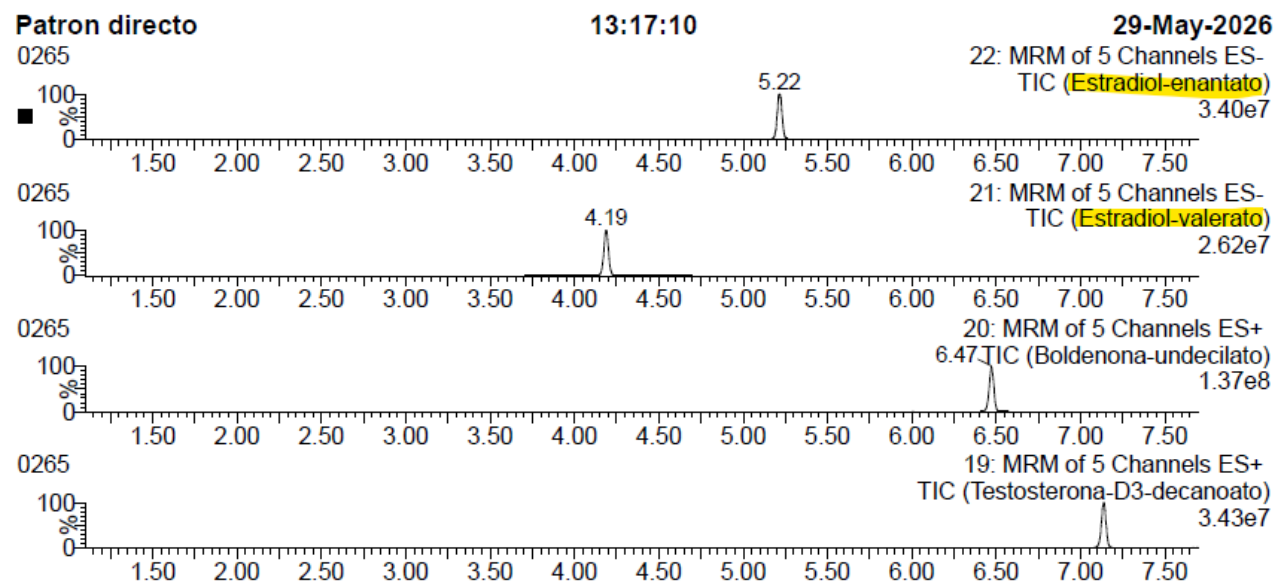
- ESI+ y ESI-
- monitorizar iones precursores diferentes al molecular (desaturación en la fuente → quinonas)
- aumentar la concentración de estos analitos x10 y x3 (MMPR = 10 ppb, apuntamos inicialmente a 1 ppb)

Estrategia del CNA



Finalmente logramos verlos:

- **ESI-** (la idea inicial era hacer el método únicamente en positivo)
- Concentración **x3** frente al resto, y utilizando **fluoruro amónico** en concentración muy baja (0,1 mM)



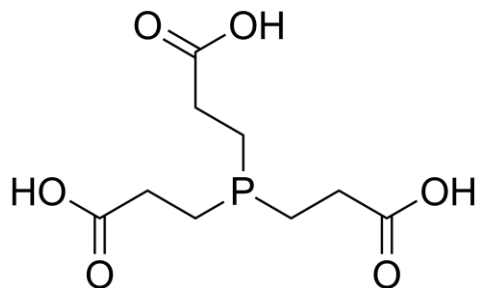
Próximos pasos → comenzar extracción en muestras

Estrategia del CNA



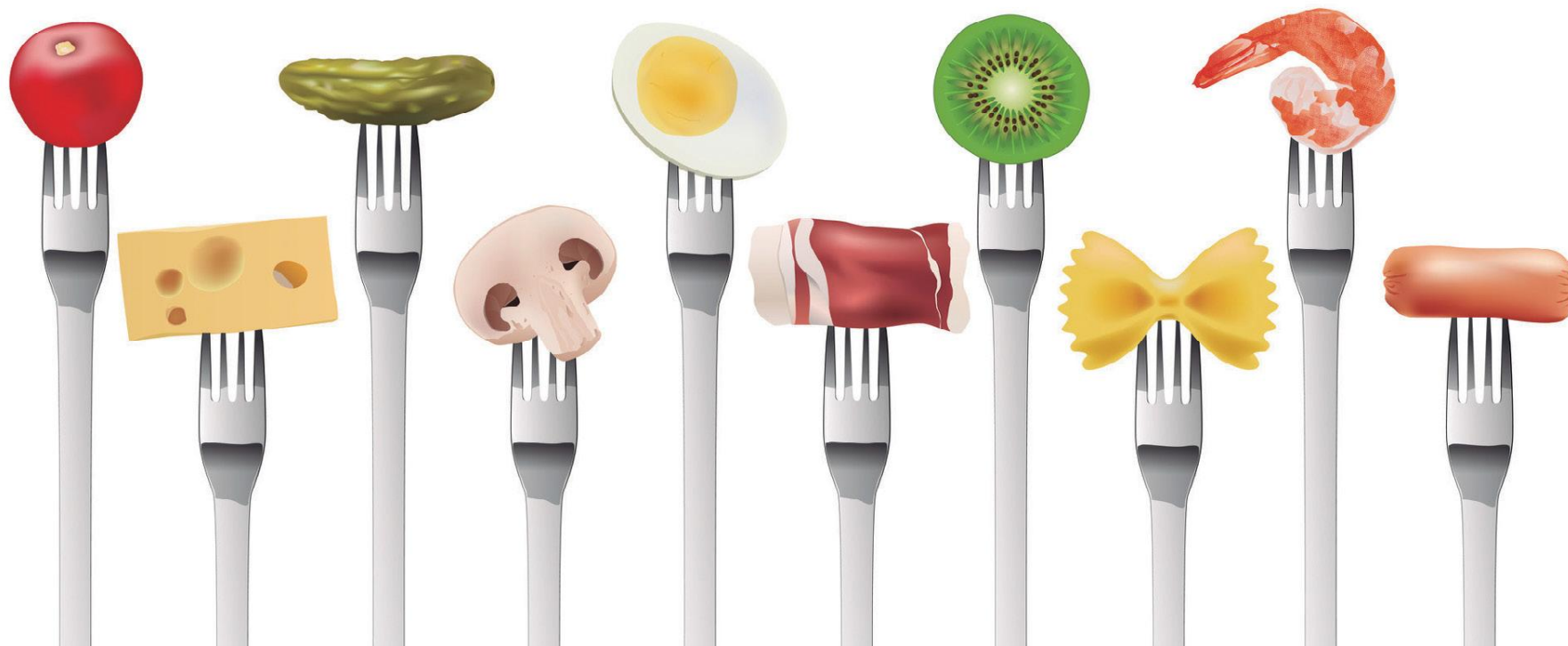
Tenemos **método de extracción**, desarrollado en el CNA y utilizado en un PT organizado por el EURL en 2021, con resultado satisfactorio:

- **200 mg** de muestra (pelo limpio y triturado)
- Digestión con **TCEP** (tris-(2-carboxietil) fosfina)
- Purificación mediante SPE con **Bond Elut C18**
- Evaporación en corriente de N₂ y resuspensión en FM



Seguiremos informando...

Gracias por su atención
¿PREGUNTAS?



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



Centro
Nacional de
Alimentación