

Afdeling Organische Contaminanten/
Bestrijdingsmiddelen 1984-10-31
RAPPORT 84.107 Pr.nr. 505.0400
Onderwerp: Kwantitatieve massaspectro-
metrie van stilbeenhormonen (als HFB
derivaat) met behulp van isotoopver-
dunning

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afd. OCON (4x),
Projektleider (Tuinstra), Projektbeheer, circulatie.

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van bestrijdingsmiddelen en (organische) contaminanten
Onderwerp: Kwantitatieve massaspectrometrie van stilbeenhormonen (als HFB derivaat) met behulp van isotoopverduunning.

Doel:

Onderzoek naar de kwantitatieve toepassing van isotoopverdunnings-massaspectrometrie voor de analyse van stilbenen.

Samenvatting:

Voor de kwantitatieve bepaling van stilbenen zijn voor zowel diethylstilbestrol (DES), dienestrol (DE) en hexestrol (HEX) gelabelde verbindingen beschikbaar resp. DES (D6), DE (D2) en HEX (D4). Ten einde de mogelijkheden van kwantitatieve massaspectrometrie met behulp van isotoopverduunning na te gaan zijn een aantal experimenten uitgevoerd.

Conclusie:

Voor de kwantitatieve bepaling van stilbenen met behulp van GC-MS zijn de onderzochte gelabelde verbindingen DE (D2) en HEX (D4) niet geschikt.

De spectra voor DE en HEX welke verkregen worden bij gebruik van de gelabelde verbindingen zijn ten gevolge van interferentie niet één-duidig te interpreteren en leveren dus niet voldoende betrouwbare resultaten. In het algemeen kan gesteld worden dat voor een GC-MS bepaling met behulp van isotoopdilutie en gebruik makend van een machine met laagoplossend vermogen aan één van de twee volgende voorwaarden moet worden voldaan.

1. De te bepalen verbinding dient gaschromatografisch basislijn gescheiden te zijn van de gelabelde verbindingen.
2. Er dient om interferenties te voorkomen een verschil in AMU (atomaire mass units) waarde te zijn van minimaal drie, voor zowel het molecuulion als één der structuur afhankelijke fragmenten, tussen gelabelde en ongelabelde verbinding.

Het toepassen van de DES (D6) verbinding bij de analyse van anabolica kan gebruikt worden ter controle van de analyse. Ten gevolge van de wisselende cis-trans verbinding is kwantificatie moeilijk. Er kan dan ook slechts gesproken worden over de orde grootte.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra ✓
Medewerker/Samensteller: ing. P. Kienhuis/W.A. Traag
Projectleider: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Inleiding:

Voor het uitvoeren van kwantitatieve massaspectrometrie is de toepassing van isotoopverduunning de geeignende methode (1,2,3). Gebruikt wordt een stabiel gelabelde isotoop, van de te onderzoeken component, welke als interne standaard bij de gehele analysegang wordt gebruikt. De isotoop wordt aan het te onderzoeken monster toegevoegd alvorens de opwerking wordt gestart.

Aangenomen wordt, dat de isotoop zich chemisch en fysisch identiek gedraagt aan de niet gelabelde verbinding. Gedurende de gehele analysegang zal de verhouding van de ongelabelde verbinding en de gelabelde verbinding zich dan ook niet wijzigen.

Na opwerking kan massaspectrometrisch (b.v. met "multiple ion detection") de verhouding van de intensiteiten van de massaspectrometrische pieken van de gelabelde verbinding ($I(l)$) en de ongelabelde verbinding ($I(u)$) bepaald worden.

Uit deze verhouding kan, wanneer het verband tussen de massaspectrometrisch gemeten i_u/i_l en de bekende concentratie verhouding C_u/C_l bepaald is, het gehalte van de ongelabelde verbinding in het monster berekend worden.

Het verband tussen i_u/i_l en C_u/C_l wordt verkregen door het maken van een ijklijn.

De bekende concentratieverhouding wordt verkregen door standaarden te maken met een vaste hoeveelheid gelabelde verbinding en een variabele hoeveelheid van de ongelabelde verbinding.

Aansluitend wordt de verhouding van de massaspectrometrische signalen i_u/i_l grafisch uitgezet tegen de concentratie verhouding C_u/C_l .

Wanneer er een rechte lijn verkregen wordt welke door de oorsprong gaat (lineaire functie: $y = ax$) kan geconcludeerd worden dat er geen interferentie is (4,5).

In het algemeen dient er rekening mee gehouden te worden, dat er wel interferenties optreden b.v. doordat de gelabelde verbinding nog wat ongelabeld materiaal bevat. Bovendien kan er een massaspectrometrische interferentie ontstaan b.v. van de ^{13}C natuurlijke isotoop van de ongelabelde verbinding met een enkelvoudige deuterium label van de gelabelde verbinding.

Van belang is het dan ook om te weten of de gelabelde verbindingen vrij zijn van ongelabeld materiaal en welke fragmentionen van de gelabelde verbinding de fragmentionen van de ongelabelde verbinding interfereren en/of welke fragmentionen van de ongelabelde verbinding de fragmentionen van de gelabelde verbinding interfereren. Voorbeelden van ijklijnen bij verschillende interferenties zijn gegeven in bijlage 1.

Voor de kwantitatieve bepaling van de stilbenen zijn voor zowel diethylstilbestrol (DES), dienestrol (DE), hexestrol (HEX) gelabelde verbindingen beschikbaar. Ter beschikking gesteld door RIVM resp. Endoprep nr. H 145661, H 143275 en H 143274 (voor structuren zie bijlage 2).

Teneinde de mogelijkheden van kwantitatieve massaspectrometrie met behulp van isotoopverduunning na te gaan alsmede het kwantitatief bepalen van het gehalte aan DES, DE en HEX in urine ten behoeve van een ringonderzoek zijn een aantal experimenten uitgevoerd.

Experimenten

1. Analyse standaarden

Van de drie stilbenen alsmede van de overeenkomstige gelabelde verbindingen zijn volgens (6) HFB derivaten bereid welke massaspectrometrisch onderzocht zijn.

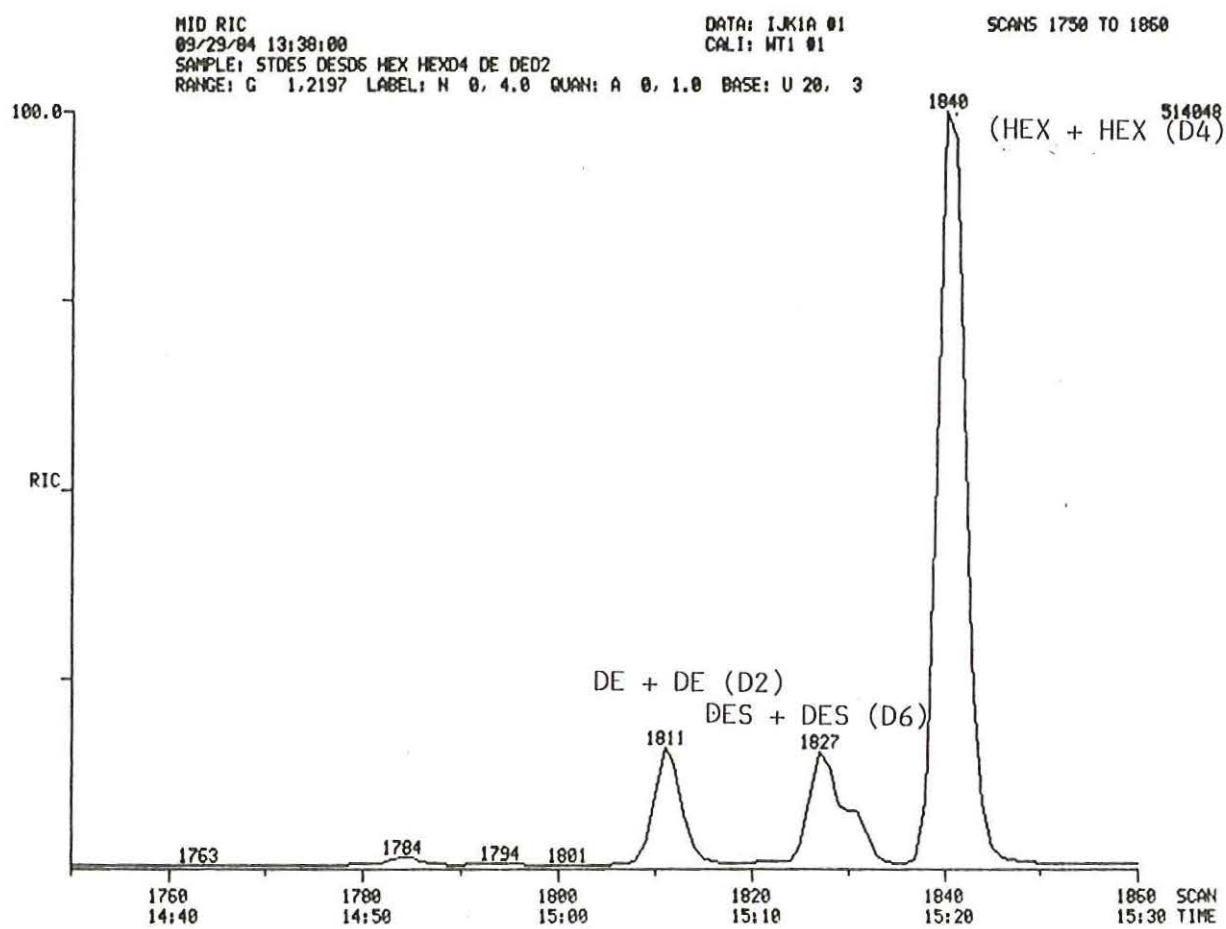
De EI (Electron Impact) spectra zijn gegeven in figuur 1 t/m 6, terwijl het veronderstelde fragmentatiepatroon gegeven is in bijlage 3.

2. IJklijn

In tabel 1 zijn de concentraties van de voor de ijklijn geprepareerde standaarden weergegeven.

Tabel 1 In bewerking genomen standaarden

St.no.	Hoeveelheid ongelabeld ng	Hoeveelheid gelabeld ng	Eindvolume µl
1	0	100	100
2	25	100	100
3	50	100	100
4	100	100	100
5	150	100	100
6	250	100	100
7	500	100	100



Figuur 1: Chromatogram stilbenen

In bijlage 4 zijn de drie met de hand getekende ijklijnen weergegeven. Aansluitend is met behulp van de kleinste kwadraten methode via het "upp software pakket" (7) en de DEC PDP 11/44 computer het verband tussen de geanalyseerde concentratie verhoudingen en de gemeten intensiteiten berekend (aangenomen is het volgende verband $Y = A X + B$) (zie bijlage 5).

3. Analysemonsters

Aan de hand van de resultaten verkregen bij punt 1 is een descriptor* voor de bepaling van stilbenen plus gelabelde verbindingen gemaakt (zie bijlage 6).

Aansluitend zijn een drietal urinemonsters (afkomstig van een experiment met dieren) in duplo geanalyseerd conform (6,7) waarbij aan de monsters 100 ng van de gelabelde verbinding was toegevoegd.

Gelet op de resultaten verkregen met radio-immuno-assay (RIA) kon uitgegaan worden van 1 ml urine en het eindextract volume kon gesteld worden op 100 μ l.

Na derivatisering zijn de monsters met behulp van de GC-MS geanalyseerd.

Discussie

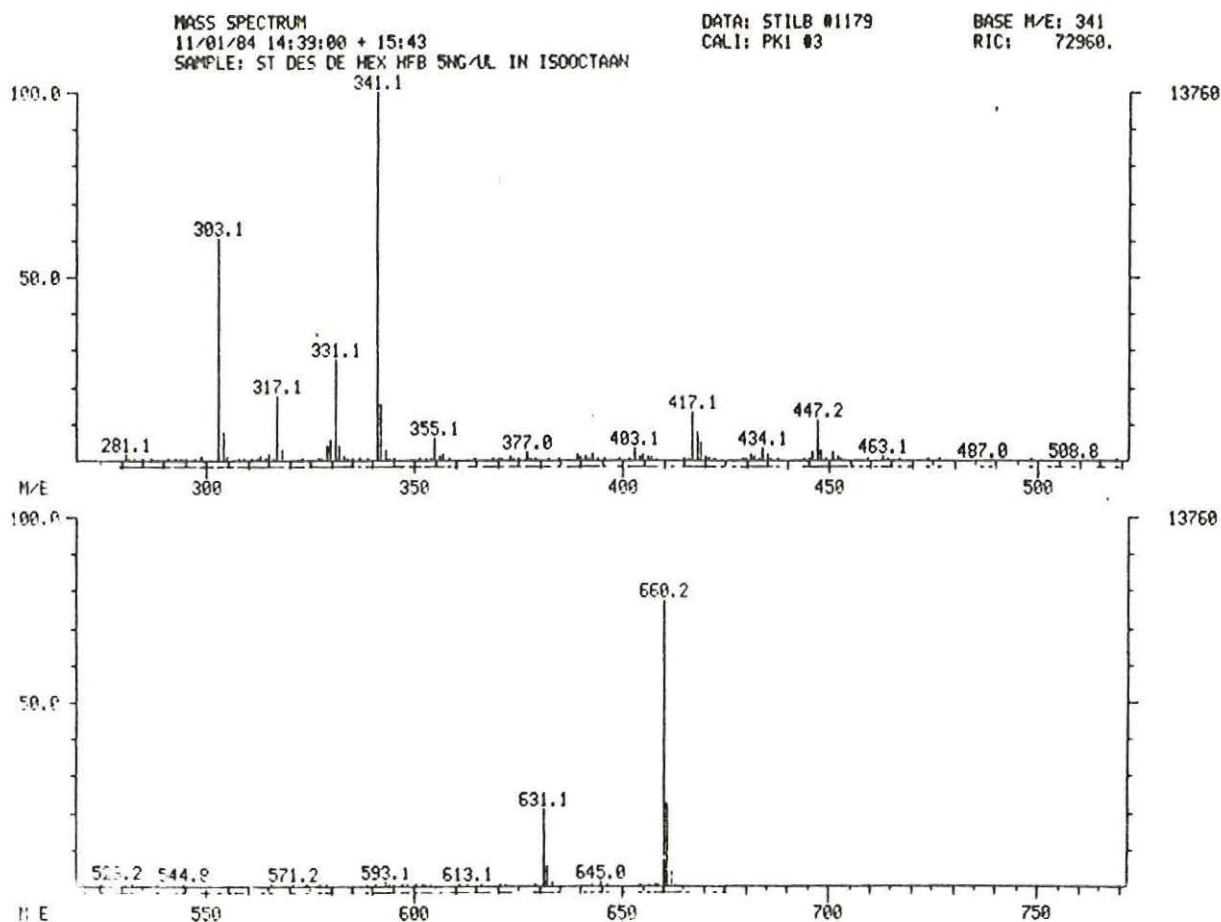
Het chromatogram van de analyse van het standaardenmengsel is gegeven in figuur 1. Hieruit blijkt dat er geen scheiding wordt verkregen tussen de gelabelde en de ongelabelde verbindingen. De interpretatie van de resultaten wordt hieronder per component besproken.

DES/DES (D6) (figuur 2,3)

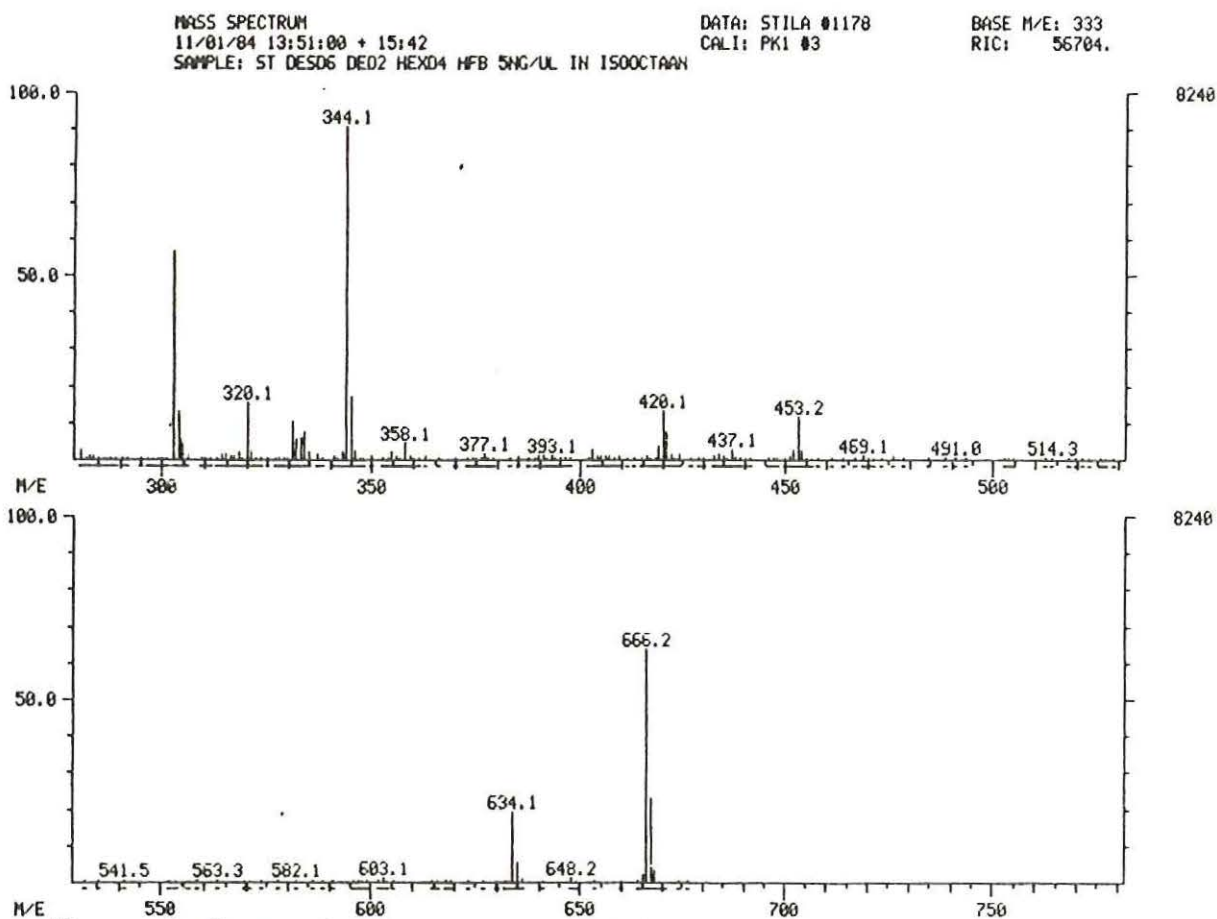
De belangrijkste fragmentionen 341; 417; 447; 631 en het M^+ 660 van DES worden niet geïnterfereerd door de overéénkomstige fragmentionen van de gelabelde verbinding (figuur 2). Met andere woorden fragmenten, uit de gelabelde verbinding, met slechts één deuterium worden niet gevormd (althans niet in het gemeten massabereik).

Ook bevat de gelabelde verbinding geen ongelabeld materiaal zodat het eventueel in het monster aanwezige DES niet beïnvloed wordt.

* Descriptor = programma voor het meten van een aantal geselecteerde massa's (MID = multiple ion detection).



Figur 2: Fragmentatiepatroon DES



Figur 3: Fragmentatiepatroon DES (D6)

Geconcludeerd kan worden dat voor een kwantitatieve analyse elk der fragmentionen gekozen kan worden.

Gezien de specificiteit en de respons wordt gekozen voor het M^+ 660 resp. M^+ 666.

De ijklijn welke verkregen is, zie bijlage 4 en 5, vertoont een zeer goed lineair verband, de laagste hoeveelheid DES welke is geïnjecteerd bedraagt 1,25 ng (dit komt overeen bij het volgen van de standaard-procedure met 0,3 ppb) de hoogste hoeveelheid bedraagt 25 ng (6,5 ppb).

Een probleem bij de kwantificatie van DES is de wisselende (niet bekende) cis-trans verhouding (2).

Kristallijn standaard DES bevindt zich in de transvorm. Na oplossen en uitvoeren van o.a. allerlei chemische en fysische stappen treedt er o.a. afhankelijk van het oplosmiddel een isomerisatie naar de cisvorm op. Dit betekent dat de met de GC-MS aangetoonde hoeveelheid trans-DES slechts een deel is van het oorspronkelijke aanwezige DES.

DE/DE (D2) (figuur 4,5)

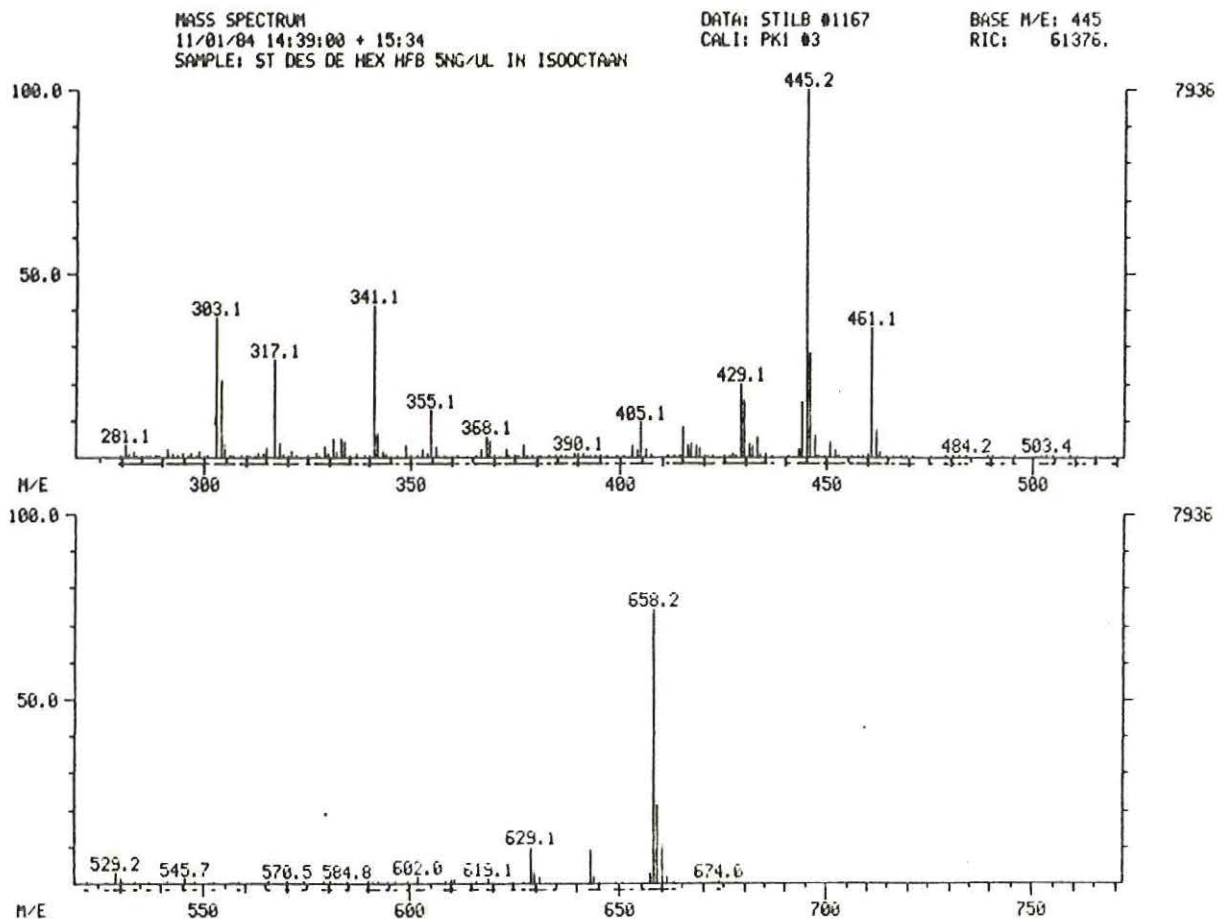
Daar bij de gelabelde verbinding slechts twee deuterium atomen ingebouwd zijn lijkt de kans op het optreden van interferentie ten gevolge van fragmenten met een enkelvoudige deuterium zeer wel mogelijk.

Uit het spectrum van de DE (D2) component blijkt echter dat de belangrijkste fragmentionen van DE te weten M/z 341; 445; 461; 629 en 618 nauwelijks door fragmenten van de gelabelde verbinding worden geïnterfereerd.

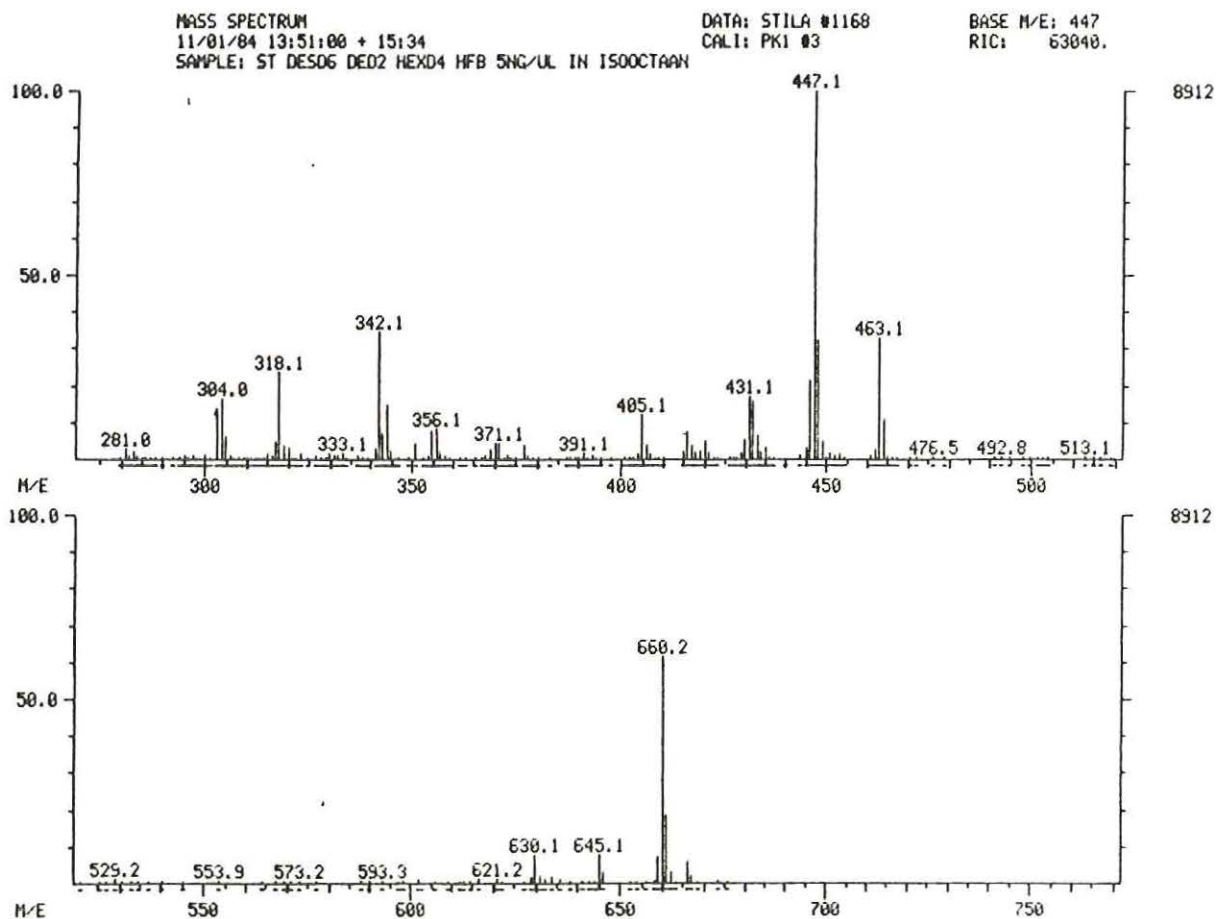
Wel interfereren de natuurlijke aanwezige isotopen van (DE met name ^{18}O) de fragmenten van de gelabelde verbinding, waardoor in een mengsel de intensiteit van een aantal fragmenten van de gelabelde verbinding te hoog was.

De intensiteit van het molecuulion van de gelabelde verbinding M/z 660 wordt, wanneer een gelijke hoeveelheid ongelabeld materiaal wordt geanalyseerd, met ca. 1,5% verhoogd.

Overigens bevat de gelabelde verbinding, blijkens het verkregen spectrum, nauwelijks ongelabeld materiaal.



Figuur 4: Fragmentatiepatroon DE



Figuur 5: Fragmentatiepatroon DE (D2)

Uit de grafische weergave van de ijklijn (bijlage 4) blijkt ook dat de ongelabelde verbinding de gelabelde verbinding interfereert. Dit blijkt uit het afwijken van de meetpunten, waarbij een relatief hogere concentratie aan ongelabeld materiaal is geanalyseerd, ten opzichte van detectie.

Een ander probleem bij de analyse van dienestrol in aanwezigheid van de gelabelde verbinding is de kwalitatieve interpretatie van het spectrum.

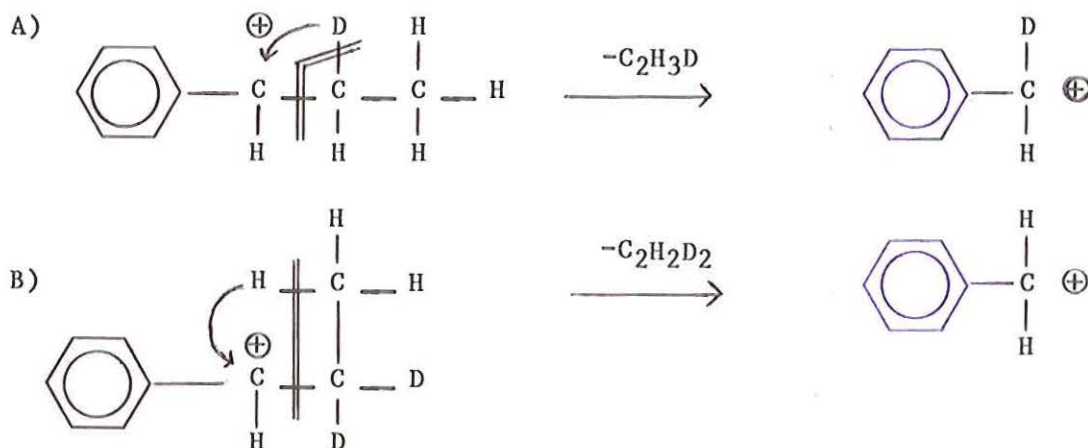
De twee verbindingen hebben dezelfde retentietijd, waardoor het spectrum van DE verstoord wordt door DE (D2). Immers bij aanwezigheid van relatief hoge concentratie aan de gelabelde verbinding zal het spectrum meer op de gelabelde verbinding lijken dan op dienestrol zelf.

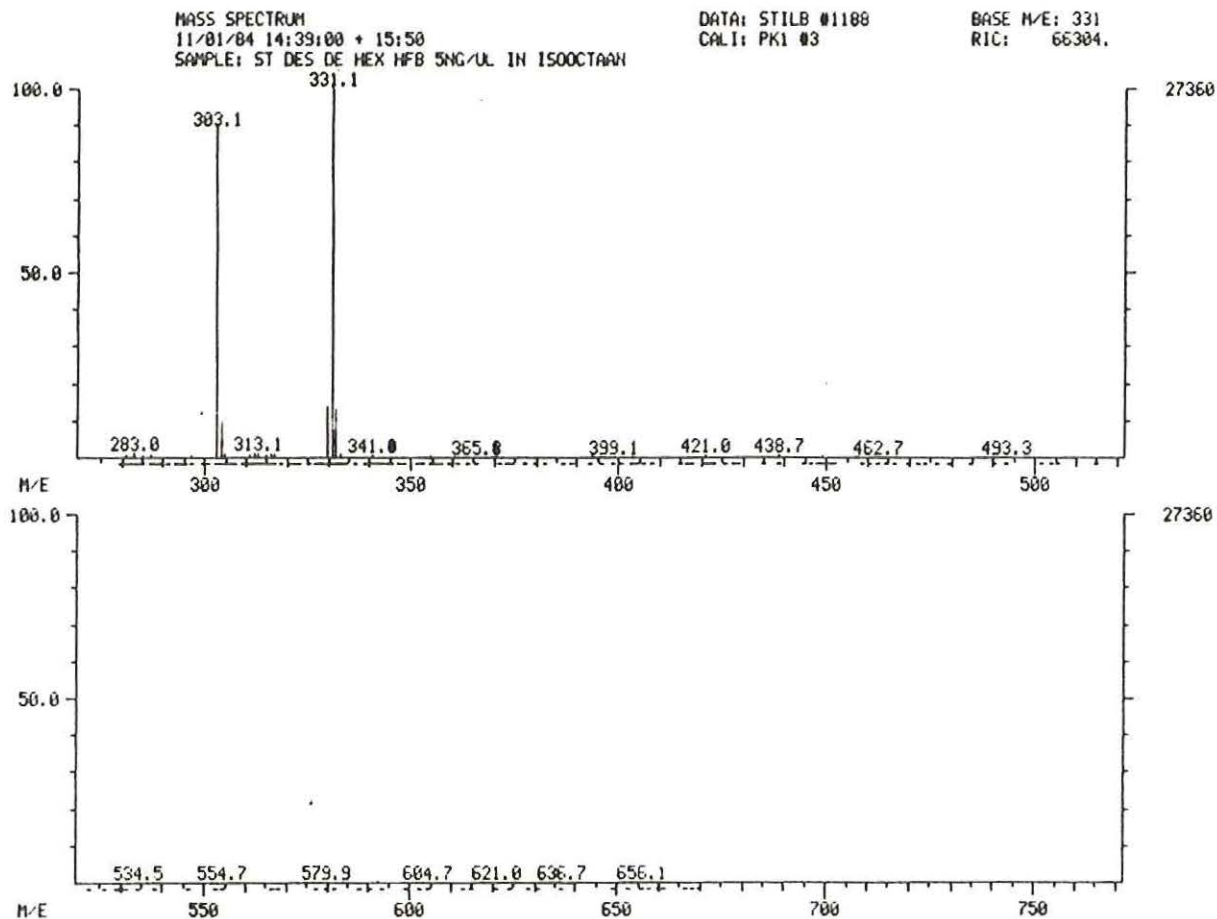
In dit geval zal de "base peak" niet M/z 445 maar M/z 447 zijn, waardoor de onderlinge verhouding van de fragmenten van dienestrol via een rekenkundige correctie berekend moeten worden. Ten gevolge van de noodzaak van een dergelijke correctie zal de kans, bij aanwezigheid van dienestrol (D2), op vals negatieve uitslagen toenemen.

HEX/HEX (D4)

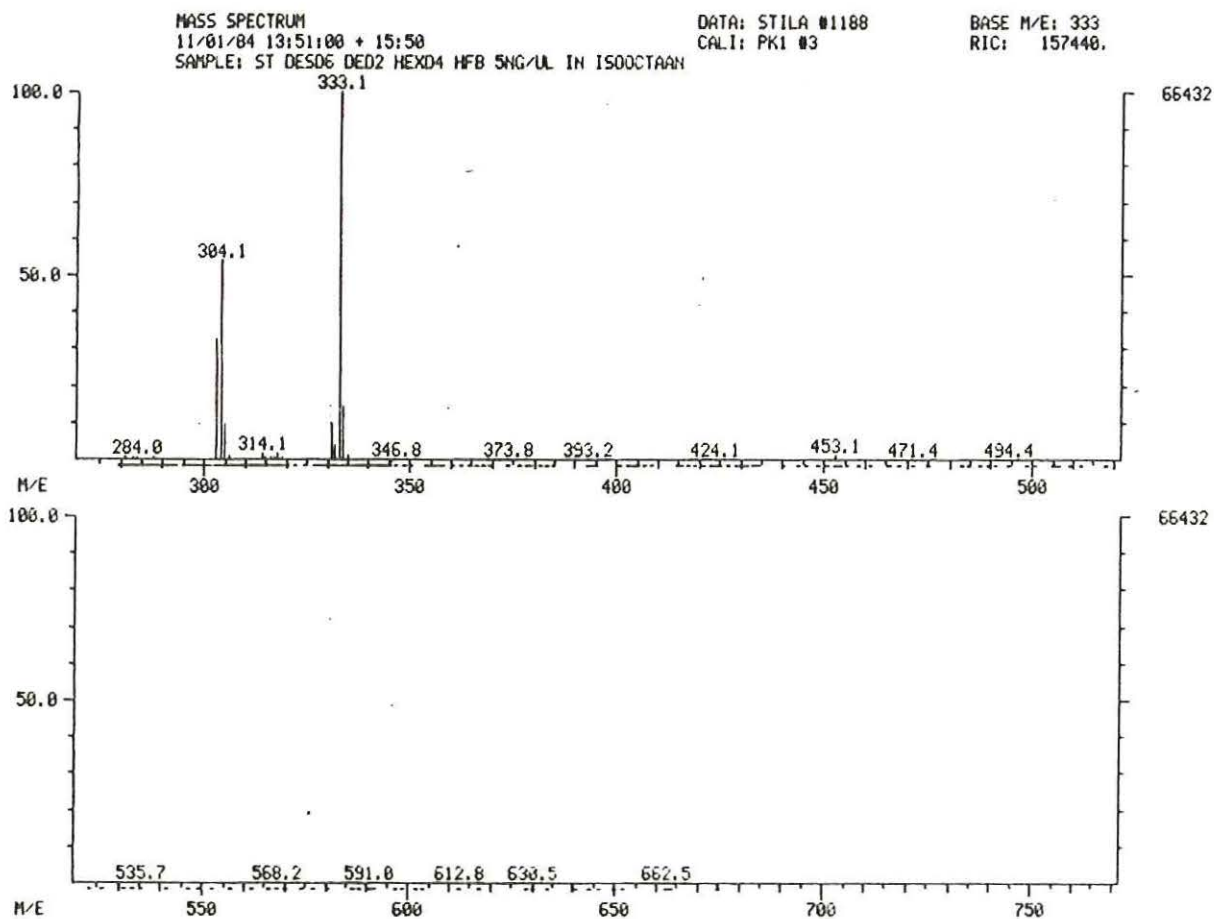
De problemen welke te verwachten zijn bij de analyse van hexestrol ten aanzien van hexestrol (D4) blijken direct uit het spectrum. De gelabelde verbinding geeft naast een signaal voor M/z 333 ook een signaal voor M/z 331 (ca. 10%). Belangrijker is echter de vorming van het fragmention met M/z 303 uit de gelabelde verbinding.

Naast het fragmentatiepatroon van HEX en HEX (D4) in bijlage 3C wordt hier de vorming van M/z 303 en M/z 304 schematisch weergegeven (alleen het belangrijkste deel van het molecuul is getekend).





Figuur 6: Fragmentatiepatroon HEX



Figuur 7: Fragmentatiepatroon HEX (D4)

Voor wat betreft de ijklijn welke is geconstrueerd aan de hand van de intensiteiten van M/z 331 en M/z 333 zou men een resultaat verwachten conform bijlage 1 (figuur 2). Dit blijkt niet uit bijlage 4 (hierbij is de lijn ten onrechte door de oorsprong getrokken, met andere woorden $Y = AX$) echter wel uit bijlage 5 ($Y = A X + B$ waarin $B = 0,24$). Voor wat betreft het kwantitatieve aspect zal systematisch, wanneer er geen correcties worden toegepast, een te hoog hexestrolgehalte berekend worden.

De mate waarin het gehalte te hoog zal zijn is afhankelijk van de relatieve concentratie.

De kwalitatieve interpretatie van het spectrum van hexestrol (in aanwezigheid van de gelabelde verbinding is zeer moeilijk en de verkregen resultaten zullen discutabel zijn en dus van geen enkele waarde.

Immers het spectrum geeft slechts twee fragmentionen te zien M/z 331 en M/z 303 waarbij de eerste, bij gelijke concentratie van HEX en HEX (D4), ca. 10% te hoog is en de tweede ca. 50% te hoog is.

Resultaten monsteronderzoek

De hierboven genoemde discussie werd bevestigd door de resultaten van een drietal onderzochte monsters afkomstig uit een dierproef en wel op een voldoende hoog niveau nl. ca. 50 ppb. In het diethylstilbestrol bevattende monster kon DES kwalitatief met de geldende criteria aangetoond worden.

Voor wat betreft het kwantitatieve aspect bleek niet het aanwezig zijn van een gelabelde verbinding problemen te scheppen, maar de niet constante cis-trans verhouding, zie ook (2).

In het dienestrol bevattende monster kon na het toepassen van een aantal correcties dienestrol aangetoond worden echter het kwantitatieve aspect werd bemoeilijkt door het niet lineair zijn van de ijklijn.

In het hexestrol bevattende monster kon ten gevolge van de interferentie van de gelabelde verbinding geen hexestrol met de op dat moment geldende criteria aangetoond worden.

Daar de ijklijn van hexestrol niet door de oorsprong gaat zal het gehalte bij kwantificering (bij toepassing van de functie $Y = AX$) te hoog zijn.

Conclusie

Voor de kwantitatieve bepaling van stilbenen met behulp van GC-MS zijn de onderzochte gelabelde verbindingen DE (D2) en HEX (D4) niet geschikt.

De spectra voor DE en HEX welke verkregen worden bij gebruik van de gelabelde verbindingen zijn ten gevolge van interferentie niet één-duidig te interpreteren en leveren dus niet voldoende betrouwbare resultaten. In het algemeen kan gesteld worden dat voor een GC-MS bepaling met behulp van isotoopdilutie en gebruikmakend van een machine met laagoplossend vermogen aan één van de twee volgende voorwaarden moet worden voldaan.

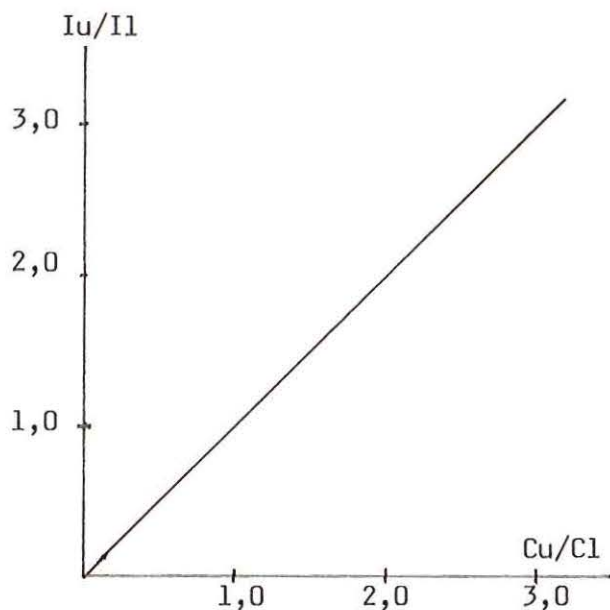
1. De te bepalen verbinding dient gaschromatografisch basislijn gescheiden te zijn van de gelabelde verbindingen.
2. Er dient om interferenties te voorkomen een verschil in AMU (atomaire mass units) waarde te zijn van minimaal drie, voor zowel het molecuulion als één der structuur afhankelijke fragmenten, tussen gelabelde en ongelabelde verbinding.

Het toepassen van de DES (D6) verbinding bij de analyse van anabolica kan gebruikt worden ter controle van de analyse. Ten gevolge van de wisselende cis-trans verhouding is kwantificatie moeilijk. Er kan dan ook slechts gesproken worden over de orde grootte.

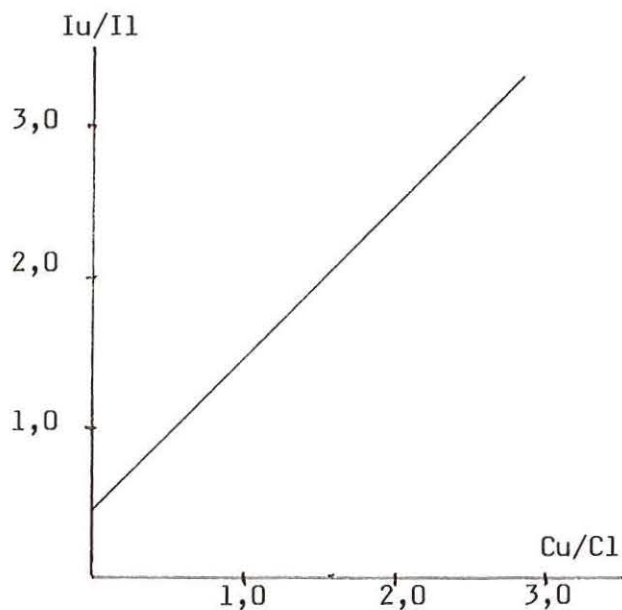
Literatuur

1. B.J. Millard, 1979. Quantitative mass spectrometry. Heyden and Sons London (UK) ISBN 0-85501-156-4.
2. J. Freudenthal: Chemisch Weekblad oktober 1979, 657-660.
3. J.A.A. Jonckheer, A.P. de Leenheer: Para Medica (1981) 1, 2-5.
4. J.F. Pickup, K. McPherson: Anal. Chem. 48 (1976) 1885-1890.
5. D. Picart, F. Jacolot, F. Berthon, H.H. Floch: Quantitative mass spectrometry in life sciences II June 13-16, 1978, Ghent Belgium.
6. L.G.M.Th. Tuinstra, W.A. Traag, H.J. Keukens, R.J. van Mazijk: Journal of Chromatography 279 (1983) 533-542.
7. R.A. Hilhorst: Uniform program package (UPP); Sprenger Instituut Wageningen.
8. L.G.M.Th. Tuinstra, W.A. Traag. RIKILT-rapport 81.92: Interpretatie van GC-MS resultaten van de bepaling van diethylstilbestrol in run-derurine.
9. Intern voorschrift F 74.

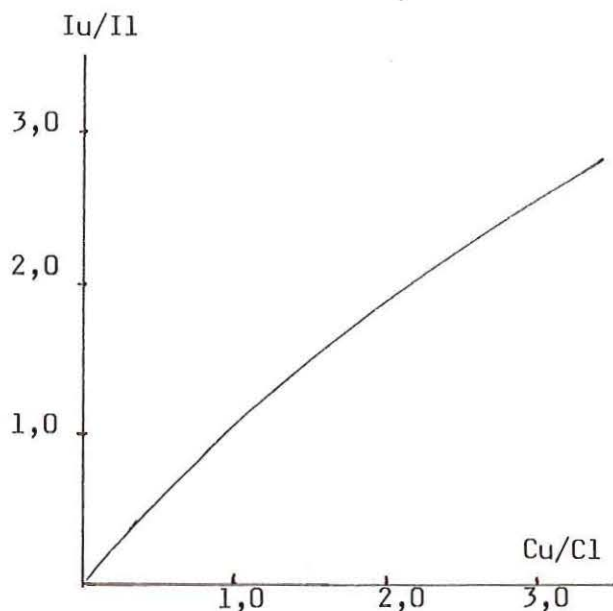
Bijlage 1: Verband tussen de verhouding van gemeten intensiteiten en de concentratie verhouding



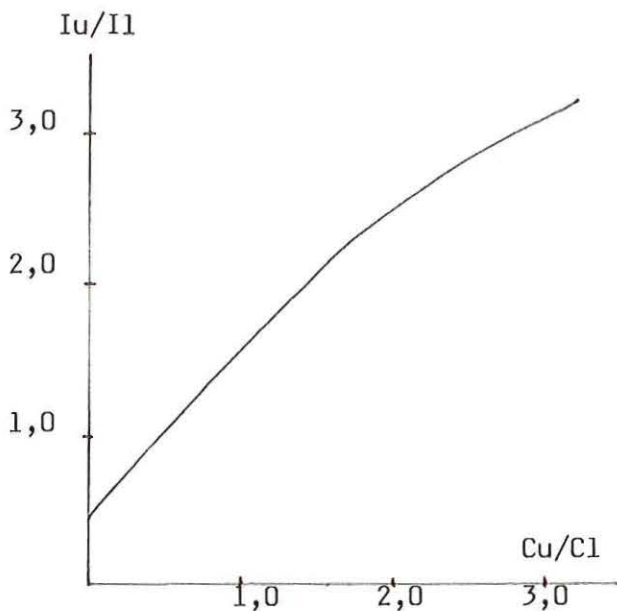
1: geen wederzijdse interferentie



2: interferentie van de gelabelde verbinding op de ongelabelde verbinding



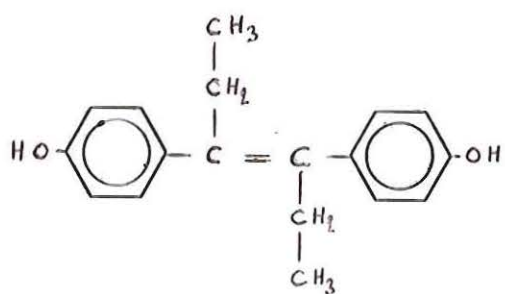
3: interferentie van de ongelabelde verbinding op de gelabelde



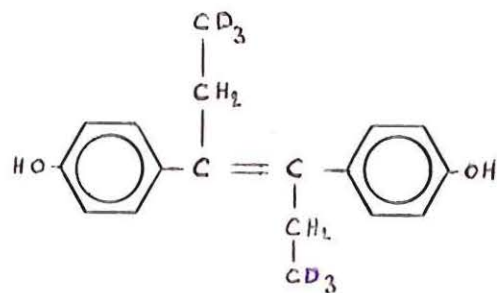
4: wederzijdse interferentie

Iu = intensiteit fragmentation van de ongelabelde verbinding
 I1 = intensiteit fragmentation van de gelabelde verbinding
 Cu = concentratie van de ongelabelde verbinding
 Cl = concentratie van de gelabelde verbinding

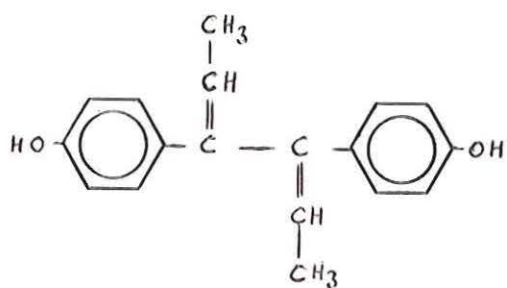
Bijlage 2 Structuur DES, DE, HEX



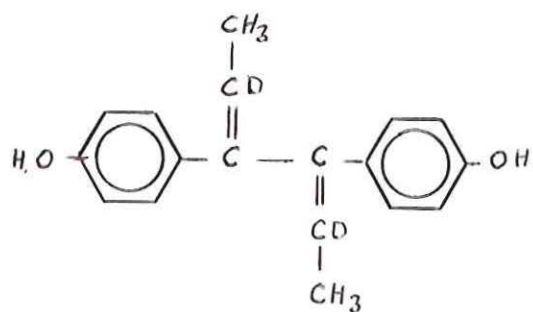
Diethylstilbestrol



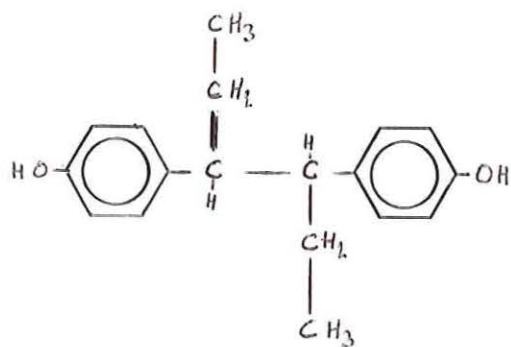
Diethylstilbestrol (D6)



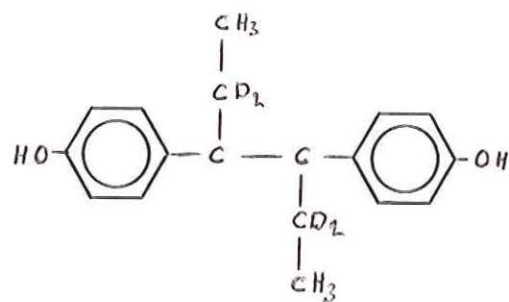
Dienestrol



Dienestrol (D2)

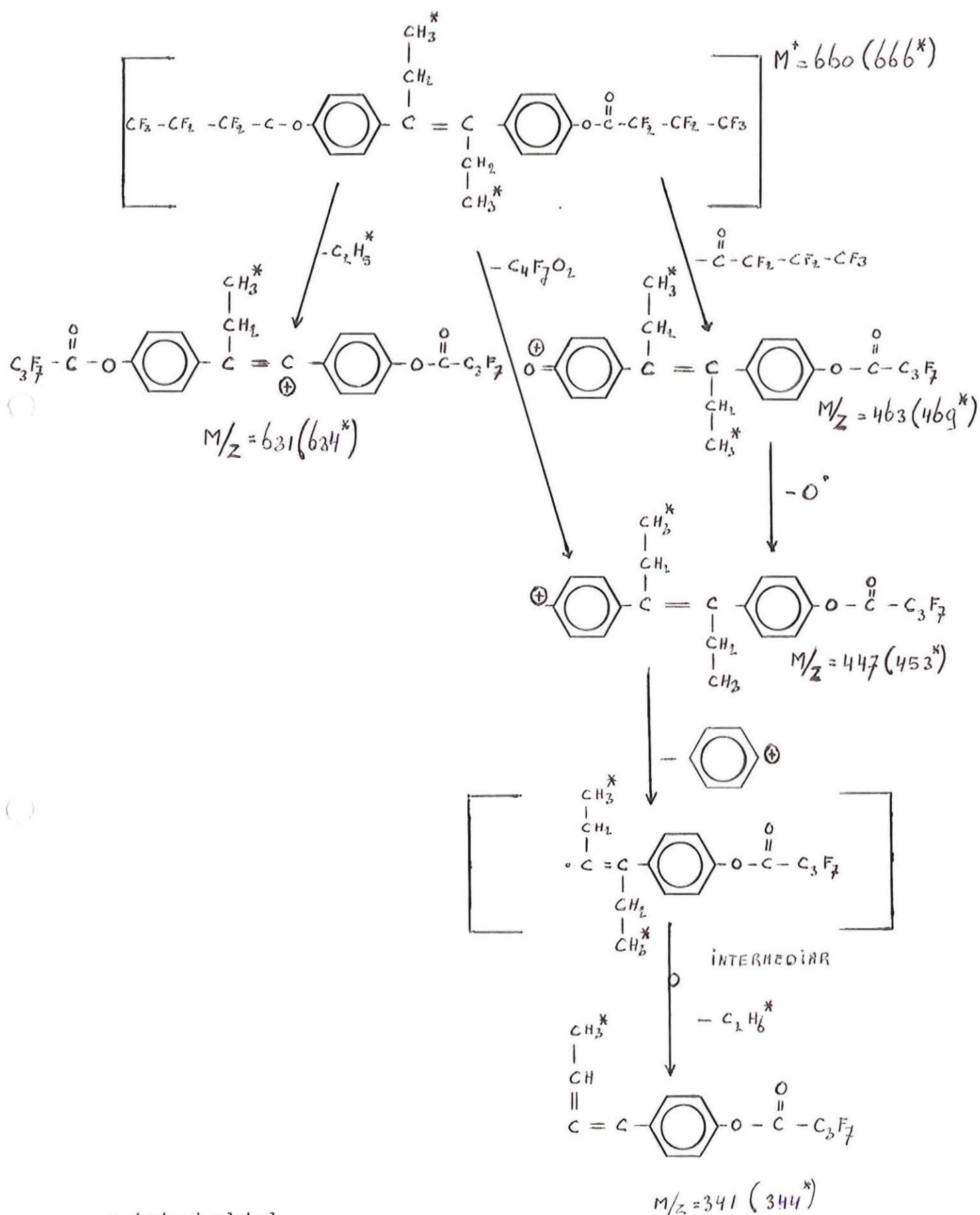


Hexestrol



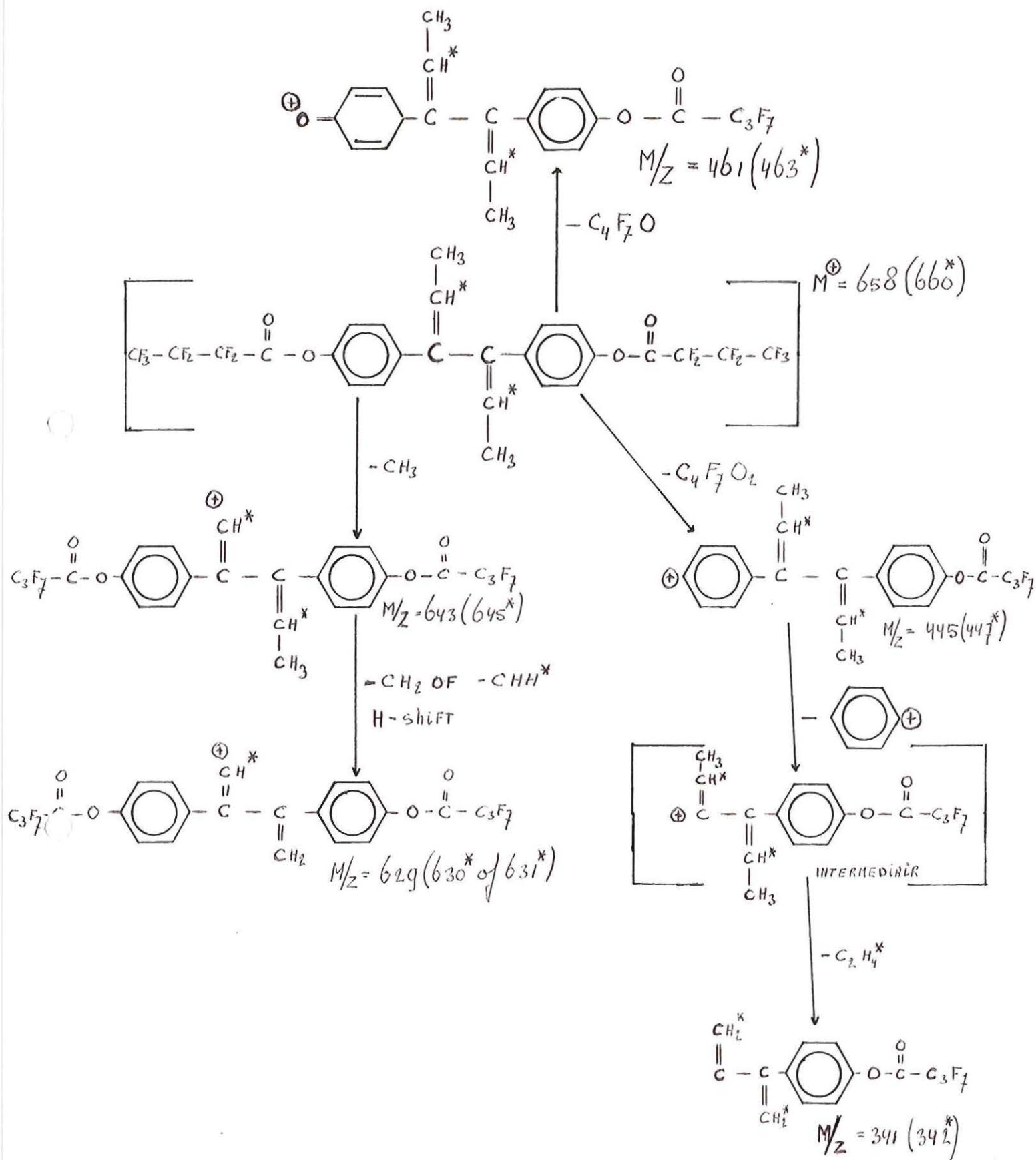
Hexestrol (D4)

Bijlage 3A Fragmentatiepatroon diethylstilbestrol en diethylstilbestrol (D6)
als HFB derivaten



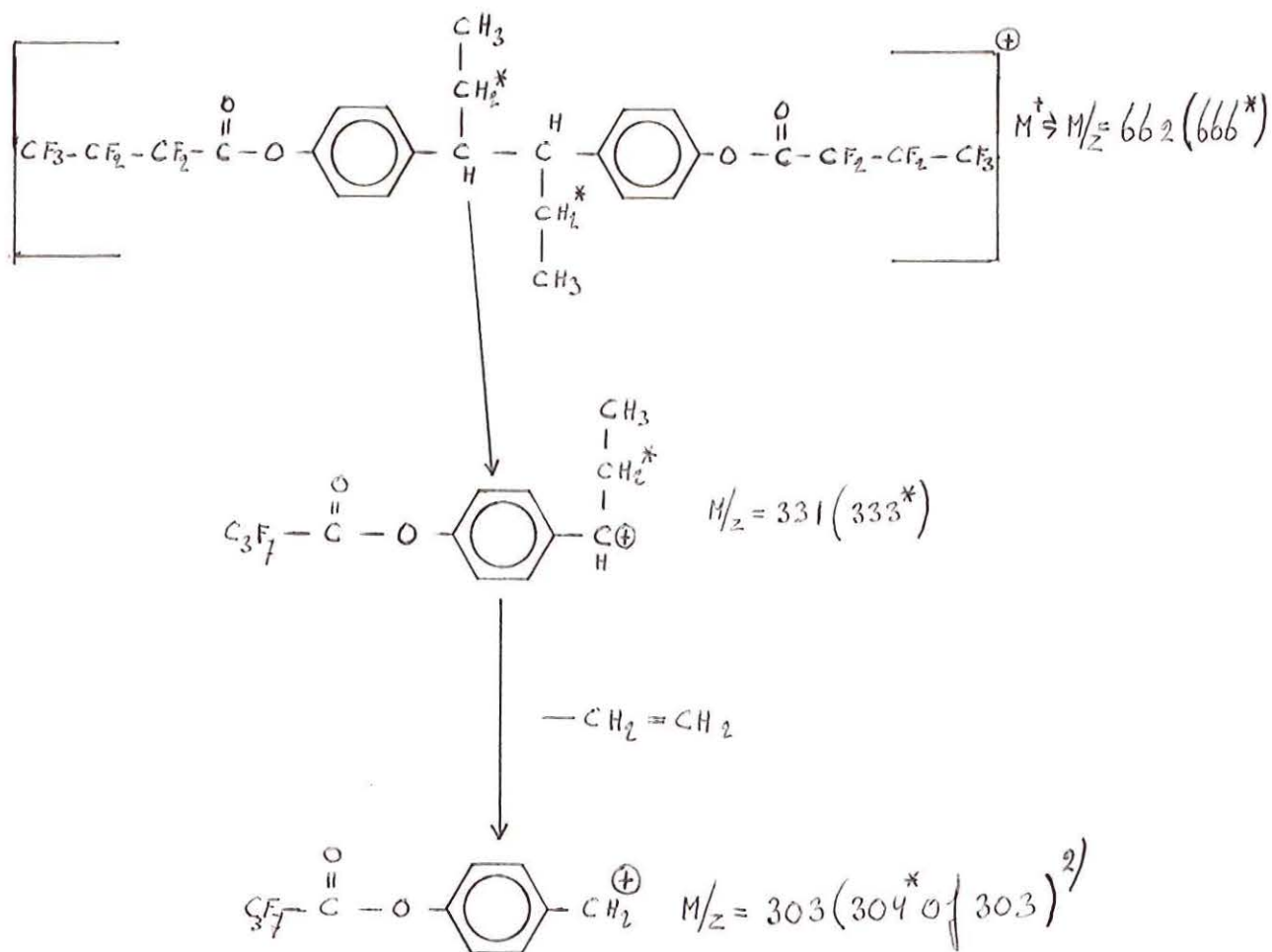
* deuteriumlabel
bij de M^+ zijn 6 D atomen aanwezig

Bijlage 3B Fragmentatiepatroon Dienestrol en Dienestrol dideutero (D2) als HFB derivaten



* Deuterium label plaats (maximaal 2 D-atomen aanwezig)

Bijlage 3C: Fragmentatiepatroon hexestrol en hexestrol tetradeutero (D4)
als HFB derivaten

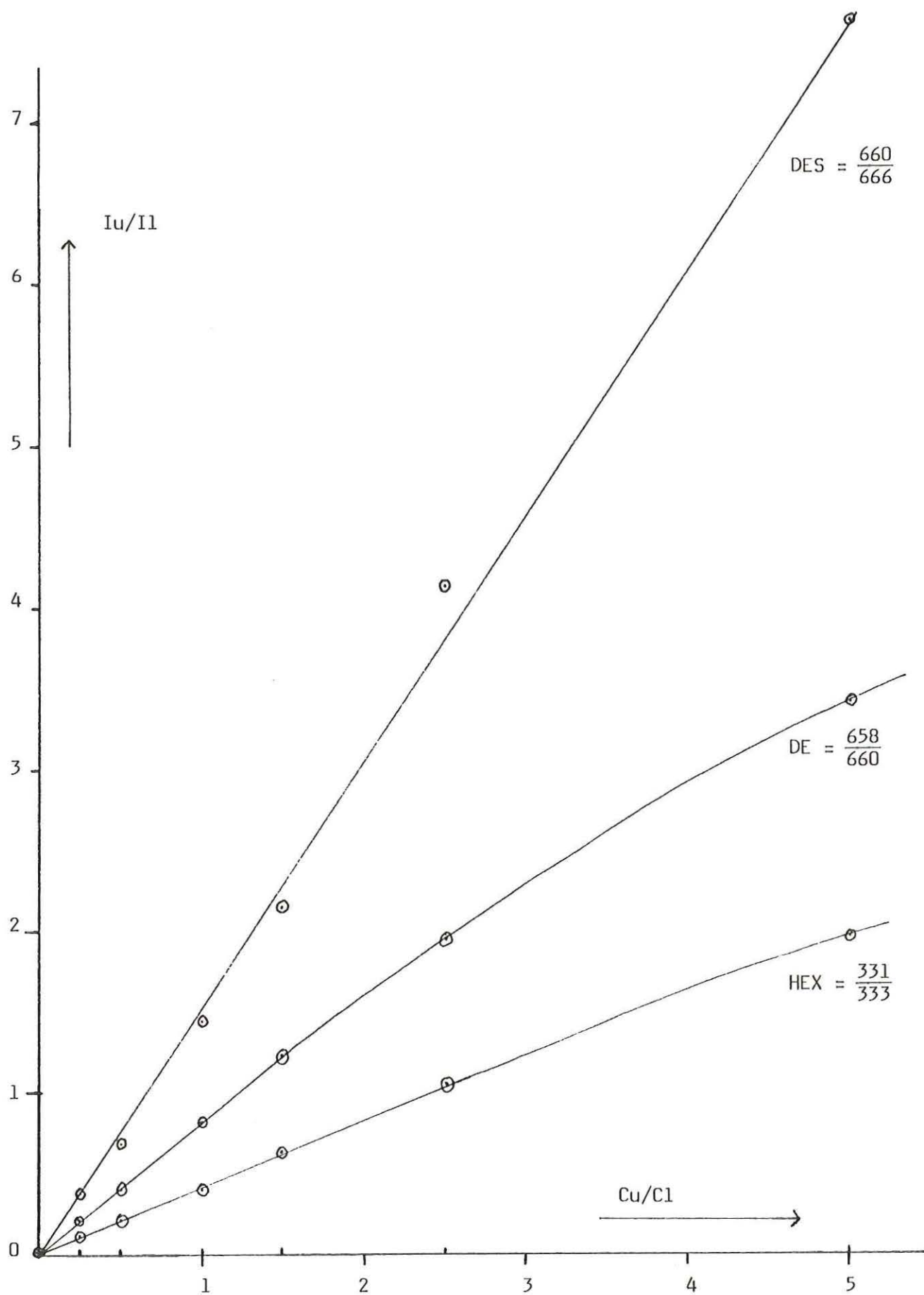


* Deuteriumlabel plaats (max. 4 D atomen aanwezig)

Opmerking:

- 1) Molecuulion wordt in de "Elektron Impact Mode" niet waargenomen.
- 2) Zowel afsplitsing D als H mogelijk (1 x D meest waarschijnlijk $M/z = 304$ echter ook D-H uitwisseling $M/z = 303$).

Bijlage 4: Grafische weergave van de verhouding van de geanalyseerde concentraties versus de verhouding van de gemeten intensiteiten



ISD
SUBSETS: DES

*** LINEAR REGRESSION ***
*** Y=A+B*X ***

VARIABLES:

X= X

Y= Y

INPUT DATA:

SUBS./OBS.	X	Y	WEIGHT
2 / 1	0	.016	1
2 / 2	.25	.373	1
2 / 3	.5	.681	1
2 / 4	1	1.45	1
2 / 5	1.5	2.15	1
2 / 6	2.5	4.12	1
2 / 7	5	7.632	1

N analysed: 7
N missing: 0

MEAN X AND Y: 1.53571 2.346

STD. DEV.: 1.7466 2.70875

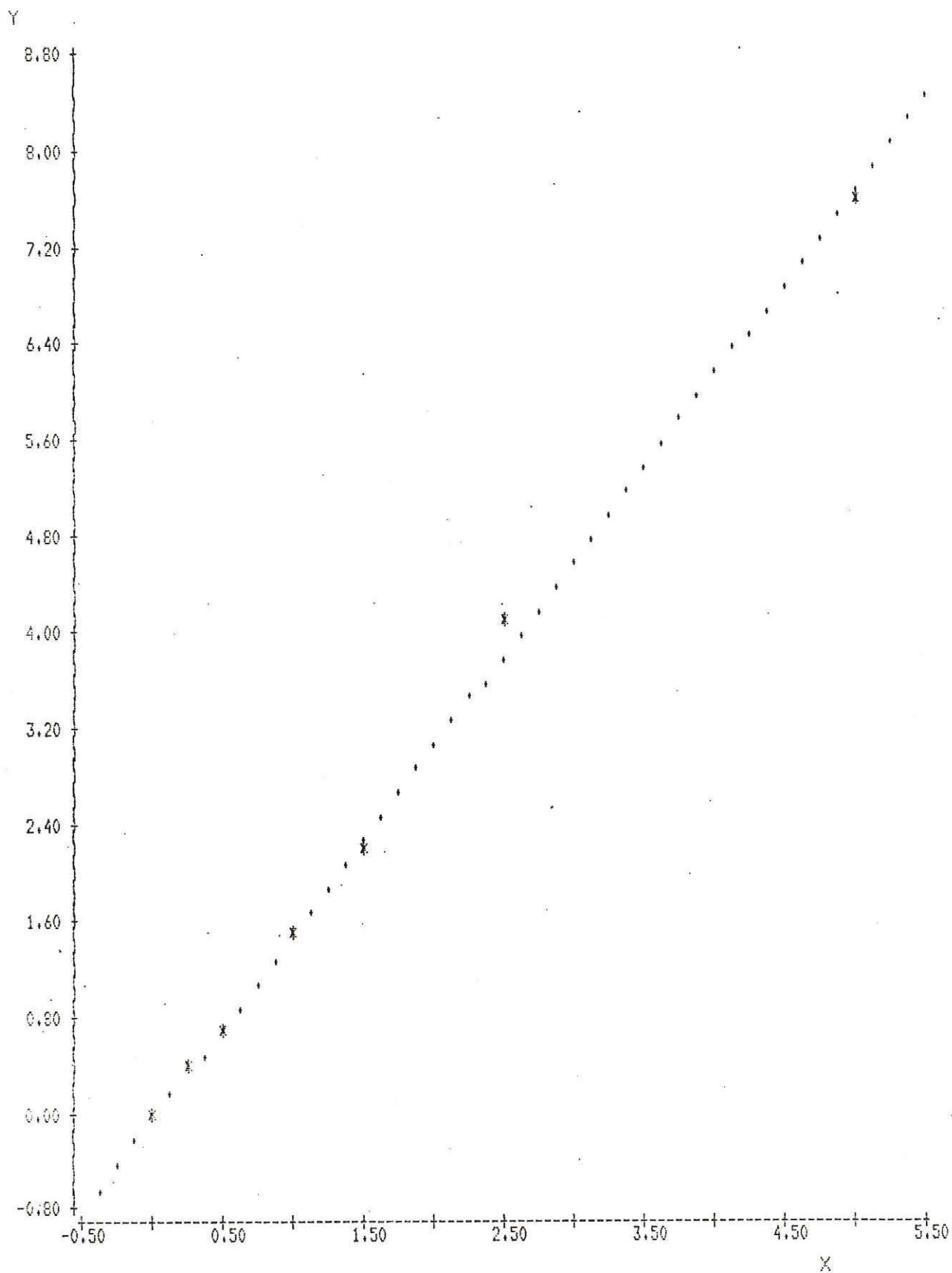
REGRESSION COEFFICIENTS:	STD. ERRORS:	T-VALUES:
A -.0325712	.0792544	-.410971
B 1.54884	.0355389	43.5814

RES. ST.ERR.: .152045
CORR. COEFF: .998686
D.F.: 5

TABLE OF RESIDUALS:

X	Y	Y(CAL)	E(I)
0	.016	-.0325712	.0485712
.25	.373	.354638	.018362
.5	.681	.741847	-.0608473
1	1.45	1.51627	-.0662659
1.5	2.15	2.29068	-.140684
2.5	4.12	3.83952	.280479
5	7.632	7.71161	-.0796141

SUM ERR.²: .115589
EXPL. PART: .997374



ISD

ISD
SUBSETS: HEX

*** LINEAR REGRESSION ***
*** Y=A+B*X ***

VARIABLES:

X= X

Y= Y

INPUT DATA:

SUBS./OBS.	X	Y	WEIGHT
3 / 1	0	.021	1
3 / 2	.25	.114	1
3 / 3	.5	.215	1
3 / 4	1	.391	1
3 / 5	1.5	.627	1
3 / 6	2.5	1.045	1
3 / 7	5	1.96	1

N analysed: 7

N missing: 0

MEAN X AND Y: 1.53571 .624714

STD. DEV.: 1.7466 .684035

REGRESSION COEFFICIENTS: STD. ERRORS: T-VALUES:

A .0236102 .0131604 1.79403

B .391417 .00590135 66.3266

RES. ST.ERR.: .0252476

CORR. COEFF: .999432

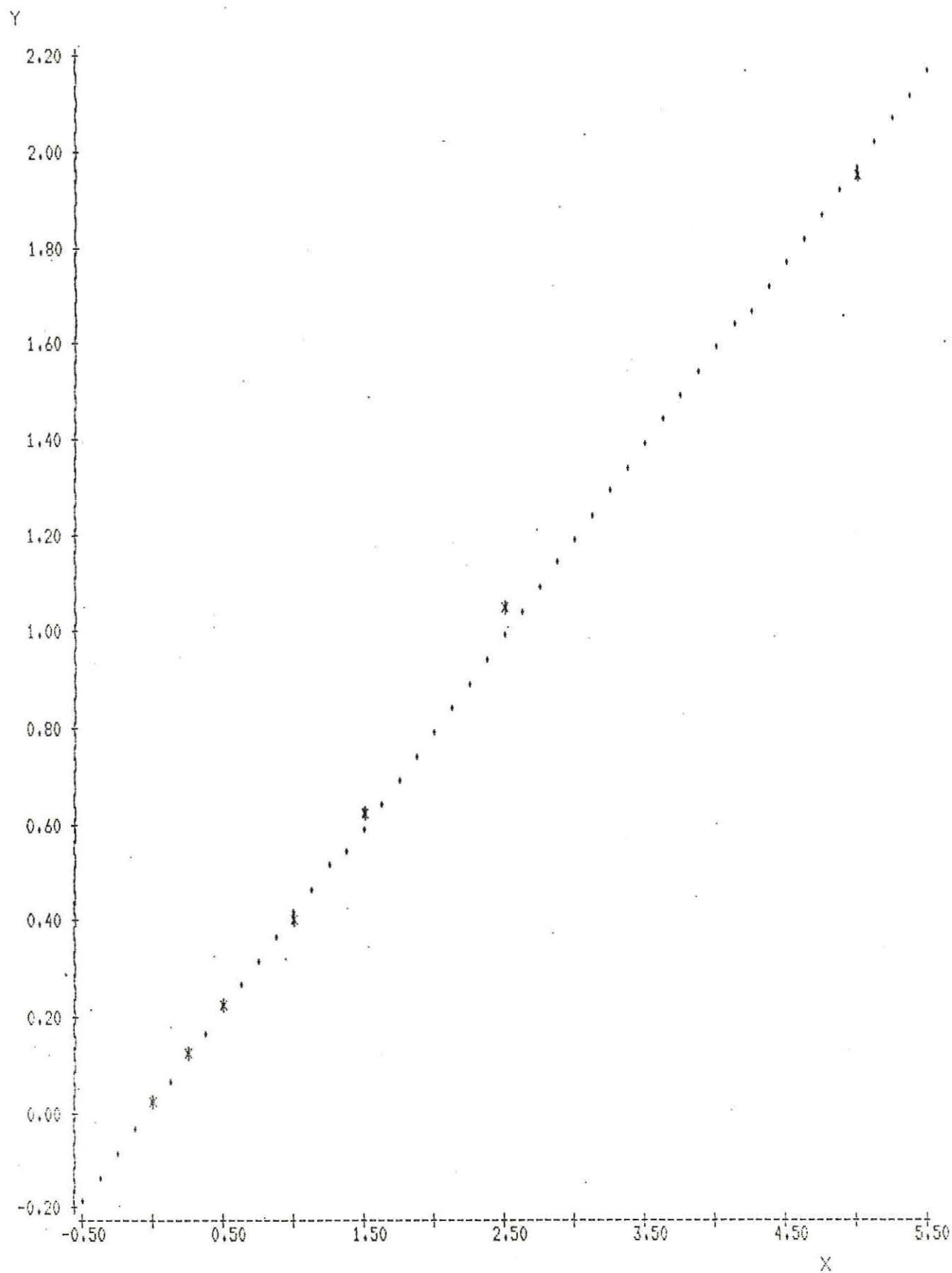
D.F.: 5

TABLE OF RESIDUALS:

X	Y	Y(CAL)	E(I)
0	.021	.0236102	-.00261024
.25	.114	.121464	-.00746439
.5	.215	.219319	-.00431854
1	.391	.415027	-.0240268
1.5	.627	.610735	.0162649
2.5	1.045	1.00215	.0428483
5	1.96	1.98069	-.0206932

SUM ERR.²: .0031872

EXPL. PART: .998865



ISD

ISD
SUBSETS: DE

*** LINEAR REGRESSION ***
*** Y=A+B*X ***

VARIABLES:

X= X
Y= Y

INPUT DATA:

SUBS./OBS.	X	Y	WEIGHT
1 / 1	0	.012	1
1 / 2	.25	.215	1
1 / 3	.5	.398	1
1 / 4	1	.816	1
1 / 5	1.5	1.223	1
1 / 6	2.5	1.945	1
1 / 7	5	3.421	1

N analysed: 7
N missins: 0

MEAN X AND Y: 1.53571 1.14714

STD. DEV.: 1.7466 1.20007

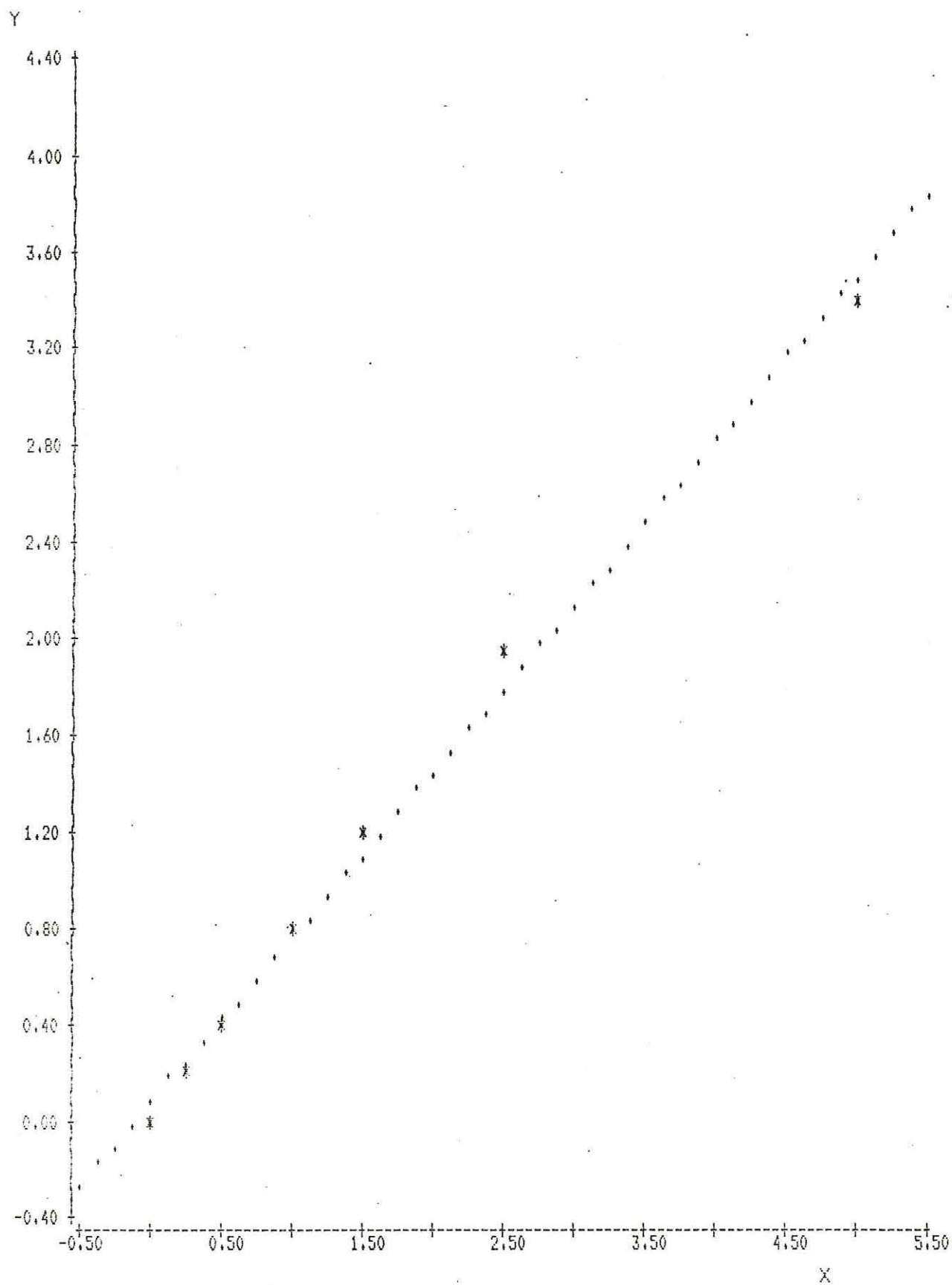
REGRESSION COEFFICIENTS:	STD. ERRORS:	T-VALUES:
A .0950932	.0527365	1.80317
B .685056	.0236479	28.9689

RES. ST.ERR.: .101172
CORR. COEFF: .997034
D.F.: 5

TABLE OF RESIDUALS:

X	Y	Y(CAL)	E(I)
0	.012	.0950932	-.0830932
.25	.215	.266357	-.0513571
.5	.398	.437621	-.039621
1	.816	.780149	.0358512
1.5	1.223	1.12268	.100323
2.5	1.945	1.80773	.137268
5	3.421	3.52037	-.0993712

SUM ERR.²: .051179
EXPL. PART: .994077



ISD

Bijlage 6: Descriptor voor de bepaling van stilbenen + gelabelde
verbindingen

MID DESC: A7
INST: 4521 CALI: WT1

MASS DEFECT AT 100 AMU 30 MMU

MASTER RATE 256

TOTAL ACQU TIME 0.210 SECS

TOTAL SCAN TIME 0.300 SECS

CENT SAMP INT 0.200 MS

MASS RANGE 1 TO 1024 AMU

16.	302.590	666.697	0.009	0.300	1	80	0	1	0	POS
INT	BEGIN	END	TIME	(SECS)	MPW	MFW	MA	TH	BL	ION
#	MASS	MASS	REQUEST	ACTUAL						
1.	302.590	303.591	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
2.	303.591	304.591	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
3.	330.599	331.599	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
4.	332.599	333.600	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
5.	340.602	341.602	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
6.	342.602	343.603	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
7.	343.603	344.603	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
8.	444.633	445.633	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
9.	446.633	447.634	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
10.	452.635	453.635	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
11.	628.688	629.688	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
12.	630.688	631.689	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
13.	633.689	634.690	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
14.	657.697	658.697	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
15.	659.697	660.698	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS
16.	665.699	666.699	0.015	0.013	3	80	25	1	0	POS