

Project 505.0070

Ontwikkelen methoden voor het verrichten van identificaties c.q. confirmatie:

Rapport 89.29

Maart 1989

Kwantitatieve Massaspectrometrie
van Clenbuterol met behulp van
van isotoopverdunding

W.A. Traag



Medewerkers: E.O. van Bennekom, J.M. Weseman, ing. P.G.M. Kienhuis

Goedgekeurd door: ir L.G.M.Th. Tuinstra



Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

Copyright 1989, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouw-
produkten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermel-
ding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

afdeling Organische Contaminanten

afdeling Biofarmaceutische Analyse

afdeling Diergeneesmiddelen

programmabeheer en informatieverzorging

circulatie

bibliotheek

EXTERN:

Centraal Laboratorium, Rijksdienst voor de Keuring voor Vee en Vlees,
dhr. L.M.H. Frijs

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	
1 INLEIDING	2
2 APPARATUUR	3
2.1 Gaschromatografie-massaspectrometrie	4
2.2 Massaspectrometrische instelling Finnigan en HP-MSD	4
2.2.1 HP-MSD instelling	4
2.2.1.1 Full Scan	5
2.2.1.2 Multiple Ion Selection	5
2.2.2 Finnigan instelling	5
2.2.2.1 Full Scan	5
2.2.2.2 Multiple ion detection	5
3 EXPERIMENTEN	5
3.1 Analyse standaarden	6
3.2 IJklijn	6
4 METINGEN	7
4.1 Standaarden	7
4.2 Monsteronderzoek	7
5 RESULTATEN EN DISCUSSIE	8
6 CONCLUSIE	8
LITERATUUR	9

1 INLEIDING

Voor het uitvoeren van kwantitatieve massaspectrometrie is de toepassing van isotoopverdunding de geëigende methode (1,2,3). Gebruikt wordt als interne standaard een stabiel gelabeld isotoop, van de te onderzoeken component. Deze isotoop wordt aan het te onderzoeken monster toegevoegd alvorens de analytische opwerking wordt gestart. Aangenomen wordt, dat de isotoop zich chemisch en fysisch identiek gedraagt als de overeenkomstige 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 massaspectrometrische pieken van de gelabelde verbinding ($I(1)$) en de ongelabelde verbinding ($I(u)$) bepaald worden. Uit deze verhouding kan, wanneer het verband tussen de massaspectrometrisch gemeten ($I(u)/I(1)$) en de bekende concentratie verhouding ($C(u)/C(1)$) bepaald is, het gehalte van de ongelabelde verbinding in het monster berekend worden. Het verband tussen ($I(u)/I(1)$) en ($C(u)/C(1)$) 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 ($I(u)/I(1)$) grafisch uitgezet tegen de concentratie verhouding ($C(u)/C(1)$).

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 enkelvoudig deuterium isotoop van de gelabelde verbinding.

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

In het algemeen kan gesteld worden dat voor een GC-MS bepaling met behulp van isotoopverdunding en gebruik makend van een MS met laagoplossend vermogen, in ieder geval, aan één van de twee volgende voorwaarden moet worden voldaan.

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

Voor de kwantitatieve bepaling van Clenbuterol is gelabeld Clenbuterol (D9) beschikbaar gesteld door Boehringer Ingelheim Vetmedica GMBH (voor structuren zie fig.2). Teneinde de toepassing van massaspectrometrie met behulp van isotoopverdunding in urine, vlees en lever te onderzoeken is een aantal experimenten uitgevoerd met de "Hewlett-Packard Mass Selective Detector" (Electron Impact). Ook zijn met Finnigan 4500 aanvullende experimenten (Chemical Ionisation) uitgevoerd om na te gaan of de gelabelde verbinding de bepaling met chemische ionisatie kwalitatief en dus ook kwantitatief zou storen.

2 APPARATUUR

2.1 Gaschromatografie-massaspectrometrie

Hewlett Packard massaspectrometer HP-MSD en de Finnigan 4500/INCOS massaspectrometer gekoppeld met de Finnigan 9610 gaschromatograaf. De gaschromatografen zijn beide voorzien van een fused silica capillaire kolom $l=25$ m; i.d.=0,22 mm, gecoat met een apolaire fase CP SIL-5-CB met een laagdikte van ca. 0,12 μ m.

Gaschromatografische en massaspectrometrische condities.

	Finnigan CI	HP-MSD (EI)
Draaggas	: Helium lineaire gassnelheid 30 cm/s	idem
Split	: 20 ml/min geopend 3 minuten na injectie	idem
Septumflush	: 3 ml/min geopend 3 minuten na injectie	idem
Temperatuur		
Injector	: 260°C	260°C
Oven	: 90-270°C	80-280°C
Rate	: 30°C/min tot 170°C daarna 12°C/min	15 C/min
Initial hold	: 3 min	2 min
Final hold	: 5 min	4 min
Injectie volume	: 4 µl	5 µl
Interface GC-MS	: Door de fused silica kolom direct door te voeren tot aan de bron is een directe koppeling gerealiseerd voor zowel de Finnigan als de HP-MSD. Temperatuur interface oven 260°C.	

2.2 Massaspectrometrische instellingen Finnigan en HP-MSD

Instelling bron

Electronen energie	: 70 eV	70 eV
Emissie stroomsterkte:	300 uA	250 uA
Temperatuur	: ca. 100°C	180-250°C
reactiegas	: ammonia forepressure 0,6 torr. High-vacuum $5,5 \times 10^{-5}$ torr.	---

2.2.1 HP-MSD instelling (EI)

2.2.1.1 Full scan

Meetbereik 40-450 AMU. Scansnelheid 1,05 scans/sec.

2.2.1.2 Multiple ion detection.

Massa	Component	Meettijd (s)	Ionisatie mode
86,15	Clenbuterol (D0) TMS	0,05	EI
243,15	"	0,05	"
262,20	"	0,05	"
		0.05	"
95,15	Clenbuterol (D9) TMS	0,05	"
359,85	PCB 138	0,025	"

2.2.2 Finnigan instelling (CI)

2.2.2.1 Full scan

Meetbereik 100 - 500 AMU, scan snelheid 0,5 scan/sec.

2.2.2.2 Multiple ion detection

Massa	Component	Meettijd (s)	Ionisatie mode
349	Clenbuterol (Do) TMS	0,053	PICI
351	"	0,053	PICI
358	Clenbuterol (D9) TMS	0,053	PICI
326	PCB 138	0,053	PICI

3 EXPERIMENTEN

3.1 Analyse standaarden

Van zowel Clenbuterol (D0) als Clenbuterol (D9) zijn TMS derivaten bereid welke massaspectrometrisch onderzocht zijn met zowel Electron Impact als met Chemische Ionisatie. De electron impact spectra zijn gegeven in fig. 3A en 3B en de spectra verkregen met chemische ionisatie in fig. 4a en 4B.

3.2 IJklijn

In tabel 1 zijn de concentraties van de voor de ijklijn bereide Clenbuterol standaarden gegeven. Naast deze standaard ijklijn is ook een ijklijn gemaakt in urine door toevoegen, voor opwerking, van de in tabel 1 genoemde hoeveelheden aan 10 ml urine.

Tabel 1 In bewerking genomen standaarden.

st.no	Hoeveelheid Ongelabeld ng	Hoeveelheid gelabeld ng	Eindvolume μL	Concentratie(DO) in urine μg/L
1 (U1)	0,0	25	25	0,0
2 (U2)	2,5	25	25	0,25
3 (U3)	5,0	25	25	0,5
4 (U4)	10.0	25	25	1
5 (U5)	50	25	25	5
6 (U6)	100	25	25	10

Na derivatisering en droogdampen zijn de monsters opgenomen in 25 μl ethylacetaat waaraan 2 ng/μl polychloorbifenyyl 138 toegevoegd was ter controle van de injectie.

4 METINGEN

In eerste instantie is een software programma (Macro Clen) geschreven waarmee de geanalyseerde standaarden en monsters uitgewerkt worden (zie bijlage 1). Met dit programma worden gegevens met betrekking tot de geanalyseerde monsters (soort en code) alsmede totaal ionenstroomchromatogrammen en chromatogrammen van geëxtraheerde ionen en een listing van het spectrum van het eventueel aanwezig Clenbuterol afgedrukt. Tevens vindt in dit programma een integratie van de gemeten componenten plaats waarmee naast een kwalitatieve interpretatie van de monsters ook het gehalte aan Clenbuterol in het monster berekend kan worden. Voor deze laatste stap is een calibratie programma, met behulp van de Report software van de HP-MSD, gemaakt.

4.1 Standaarden

De bij de ijklijn behorende standaarden 1 t/m 6 alsmede de ijklijn in urine U1 t/m U6 zijn geanalyseerd op de HP-MSD in "multiple ion detection" conform punt 2.2.1.2. Ook zijn een aantal standaarden geanalyseerd op de Finnigan 4500 met chemische ionisatie conform punt 2.2.2.2.

4.2 Monsteronderzoek

Aansluitend zijn een aantal serie's monsters zowel in urine, lever en vlees geanalyseerd. In bijlage 2c is een voorbeeld gegeven van een, bij één van de series behorende, ijklijn.

In bijlage 3 is een voorbeeld gegeven van een uitdraai van een standaard op een niveau van 2,0 µg/kg en in bijlage 4 een uitdraai van een positief monster (ca. 8 µg/kg).

5 RESULTATEN EN DISCUSSIE

De analyse resultaten voor de ijklijn, gemeten op de HP-MSD, zijn vermeld in tabel 2 en van de ijklijn in urine in tabel 3. In deze tabellen is het oppervlak van fragment ion M/z 86 (Clenbuterol Do) en het oppervlak van fragment ion M/z 95 (Clenbuterol (D9)) gegeven en de verhouding van Clenbuterol (Do) ten opzichte van Clenbuterol (D9). Tevens is voor zowel de ijklijn van de standaarden als de ijklijn in urine voor Clenbuterol (D9) het gemiddelde oppervlak, de standaarddeviatie en het variatiecoëfficiënt berekend.

In fig. 5 en fig. 6 is grafisch de verhouding Clenbuterol (Do)/(D9) uitgezet tegen de geanalyseerde concentraties respectievelijk van standaarden en van standaarden in urine. In tabel 4 is het gemeten oppervlak van de interne standaard hexachloorbifenyyl (PCB 138) vermeld, dit om de herhaalbaarheid van de HP-MSD te bepalen.

Onder de gebruikte gaschromatografische condities is er geen volledige scheiding tussen Clenbuterol (Do) en Clenbuterol (D9).

Beide componenten elueren met ongeveer dezelfde retentietijd op de gebruikte kolom (CP-SIL-5 CB) waarbij retentietijd van de gelabelde verbinding iets korter is dan de retentietijd van de ongelabelde verbinding.

Uit de Electron Impact spectra fig. 1A en 1B blijkt dat de spectra niet wederzijds beïnvloed worden. Met andere woorden het voor Clenbuterol karakteristieke ion M/z 86 komt niet voor in het spectrum van de gelabelde verbinding. Anderzijds blijkt ook uit de spectra dat het karakteristieke ion M/z 95 van Clenbuterol (D9) niet voor komt in de ongelabelde verbinding. Ook geldt dat de chemische ionisatie spectra niet wederzijds geïnterfereerd worden. Uit fig. 5 blijkt dat de lineariteit voor de standaarden reeks goed is, zodat binnen het gemeten bereik kwantitatief gewerkt kan worden. Bij de standaarden reeks in urine wijkt één monster nogal af. Wel blijkt uit zowel fig. 6 als uit tabel 2 en 3 dat de verhouding $D_0/D_9 (= I(u)/I(i))$ in de urine monsters significant hoger is dan in de standaarden. Dit werd veroorzaakt door een bijdrage vanuit de blanco urine. Bij latere serie's kwam dit niet meer voor. Uit tabel 2 en uit tabel 3 blijkt dat, gezien de variatie coëfficiënt van respectievelijk 11,4 en 9.7%, de herhaalbaarheid van de meting en van de opwerking goed is. Uit het gemiddelde oppervlak van de gelabelde verbinding kan dan ook berekend worden wat het gemiddelde terugvindingspercentage, is namelijk ca. 36%, hetgeen betekent dat er een aanzienlijke hoeveelheid Clenbuterol zowel gelabeld als ongelabeld tijdens de opwerkingsprocedure verloren gaat.

6 CONCLUSIE

Voor de kwantitatieve bepaling van Clenbuterol in urine, lever en vlees is toepassing van isotoop dilutie noodzakelijk. Door gebruik te maken van de softwaremogelijkheden van de HP-MSD is het mogelijk om monsters automatisch te analyseren en te interpreteren. Voor de interpretatie van de analyseresultaten wordt gebruik gemaakt van spectrale informatie waarbij het spectrum getoetst wordt aan de hand van criteria zoals gesteld in het voorschrift. Kwantitatieve informatie wordt eveneens verkregen waarbij de respons van Clenbuterol gecorrigeerd wordt voor de respons van de interne standaard (Clenbuterol D9)). De herhaalbaarheid van de HP-MSD is goed, de variatie coëfficiënt van Clenbuterol D9 bedraagt ca. 10-15%. Het is zowel in urine, lever en vlees mogelijk om Clenbuterol te bepalen vanaf ca. 0,5 $\mu\text{g/kg}$.

LITERATUUR

1. B.J. Millard, 1979. Quantitative mass spectrometry, Heyden en 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.

Tabel 2: Analyse resultaten HP-MSD onderzoek standaarden.

Monster	Concentratie		Oppervlak		Verhouding
	ng/μl				
	Do	D9	Do (M/Z=86)	D9 (M/Z=95)	
1	0	1,0	<10.000	47634545	0,0002
2	0,1	1,0	5450761	44518396	0,122
3	0,2	1,0	9758675	42118052	0,232
4	0,4	1,0	16576124	39956945	0,415
5	2,0	1,0	58945494	33610747	1,754
6	4,0	1,0	106860000	40786364	2,620
x̄ 41437508 *1					
s.d 4737774					
V.C. 11,4%					

Tabel 3: Analyseresultaten HP-MSD onderzoek standaarden in urine.

Monster	Concentratie		Oppervlak		Verhouding
	ng/μl				
	Do	D9	Do (M/Z 86)	D9 (M/Z=95)	
U1	0	1,0	680031	12810208	0,053
U2	0,1	1,0	3059955	15707944	0,195
U3	0,2	1,0	3634051	14543398	0,250
U4	0,4	1,0	8434155	13996176	0,603
U5	2,0	1,0	29499438	17009198	1,734
U6	4,0	1,0	47680178	14742784	3,234
x̄ 14801617 *1					
s.d 1440794					
V.C. 9,7					

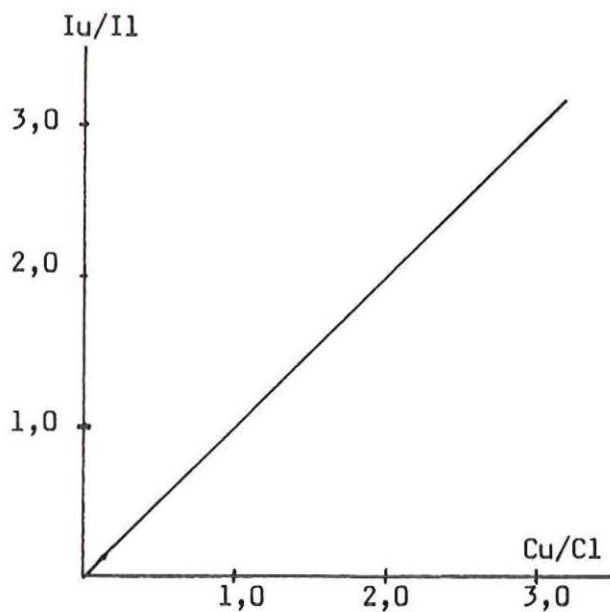
*1 Terugvindingspercentage bedraagt $14801617/41437508 \times 100\% = 35,7\%$

Tabel 4: Herhaalbaarheid hexachloorbifenyyl 138 in standaarden in urine

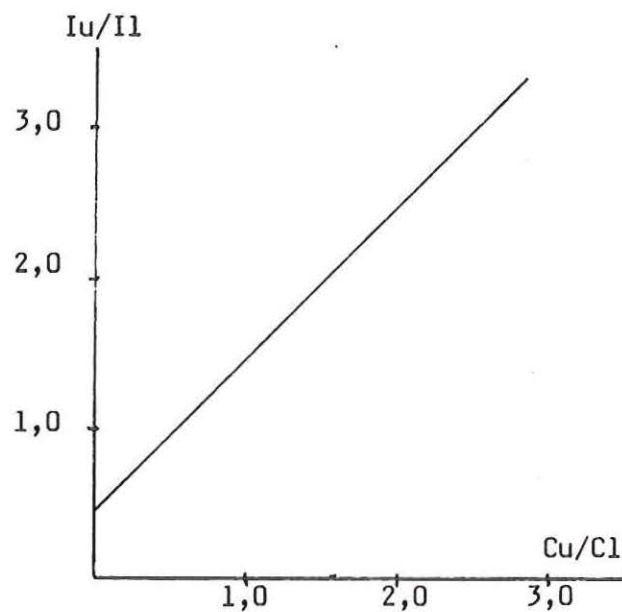
Monster	Oppervlak PCB 138 (Standaarden)	Monster	Oppervlak PCB 138 (urine monster)
1	77740909	U1	70292271
2	77687454	U2	59884330
3	55920056	U3	57698275
4	57955454	U4	52451051
5	77791993	U5	60530525
6	76661182	U6	60377991
$\bar{x}$	70626175		60205741
s.d	10630789		5803432
V.C. (%)	15,0%		9,6%

Fig 1:

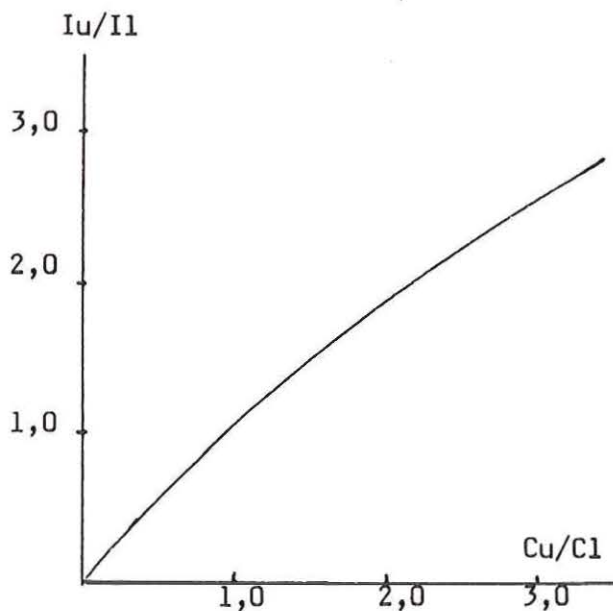
Verband tussen de verhouding van gemeten intensiteiten en de concentratie verhouding



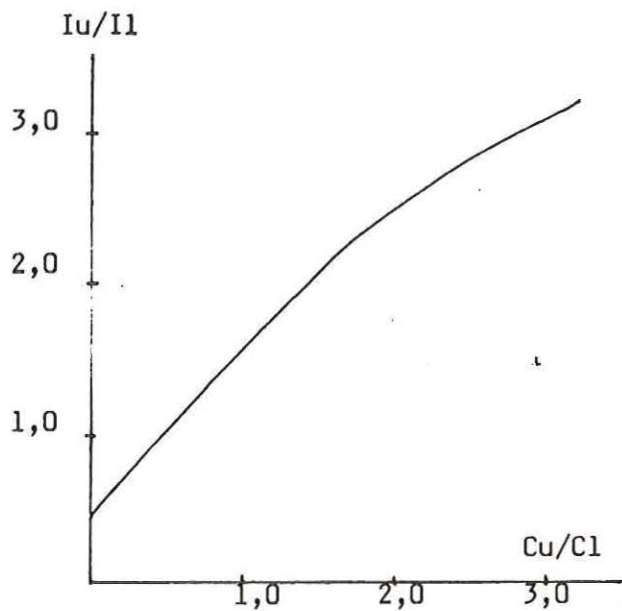
1: geen wederzijdse interferentie



2: interferentie van de gelabelde verbinding op de ongelabelde verbinding



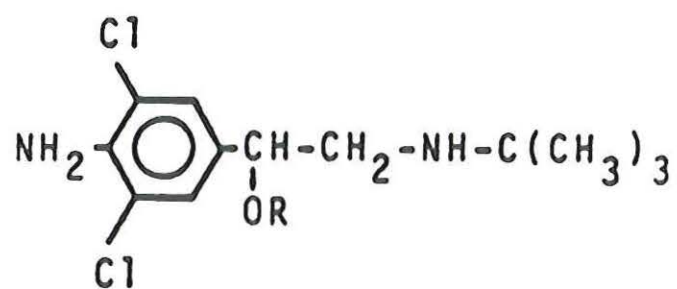
3: interferentie van de ongelabelde verbinding op de gelabelde



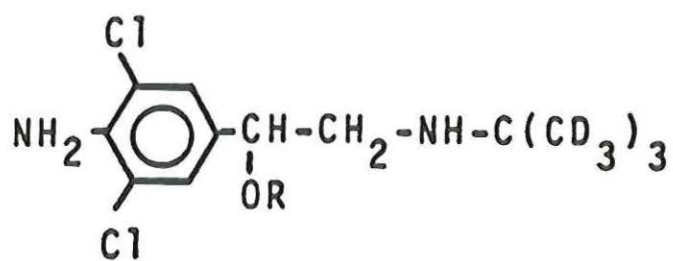
4: wederzijdse interferentie

I_u = intensiteit fragmenten van de ongelabelde verbinding
 I_l = intensiteit fragmenten van de gelabelde verbinding
 C_u = concentratie van de ongelabelde verbinding
 C_l = concentratie van de gelabelde verbinding

Fig 2:



Clenbuterol (R=H)



Clenbuterol(d9) (R=H)

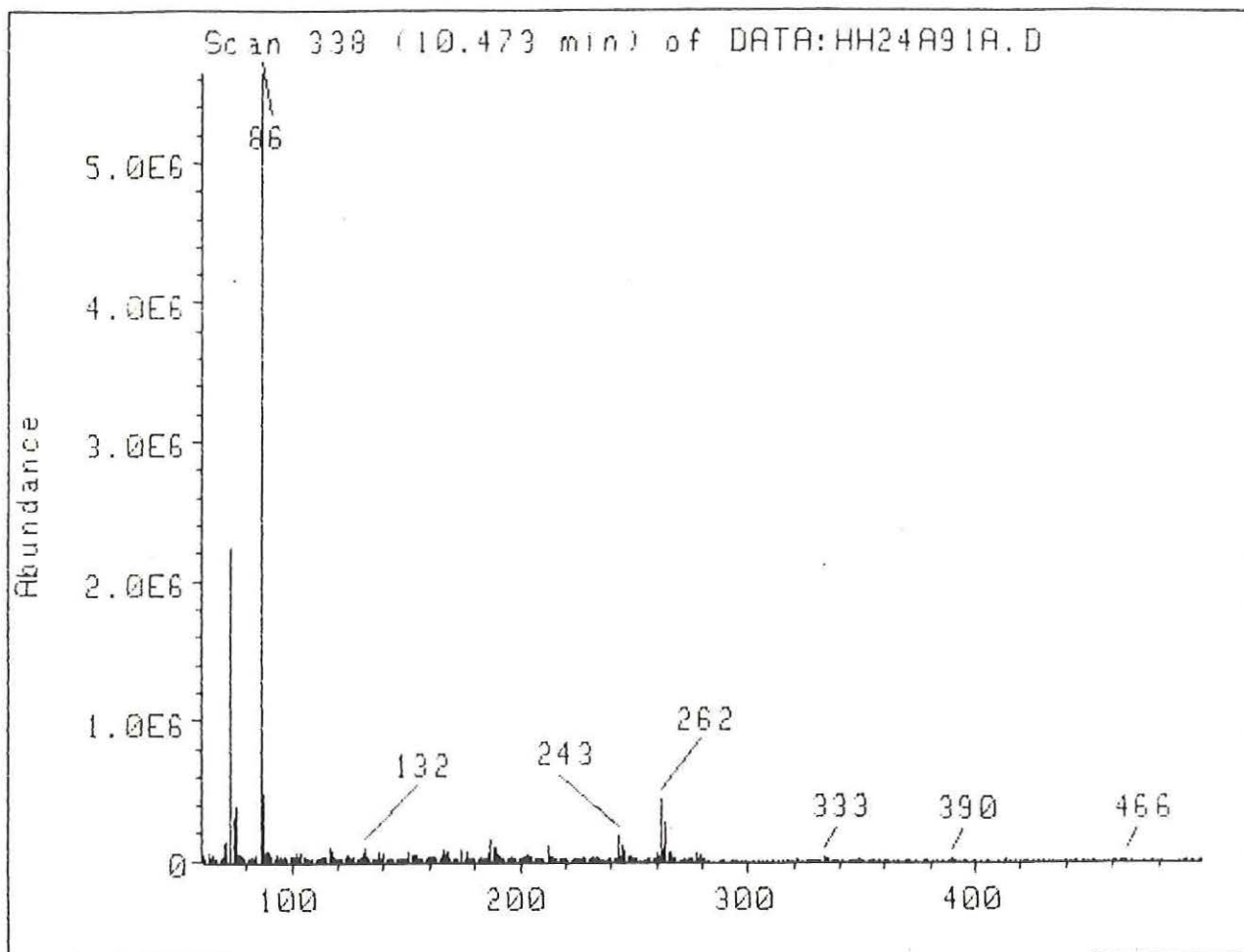


Fig 3a: EI spectrum Clenbuterol tms derivaat

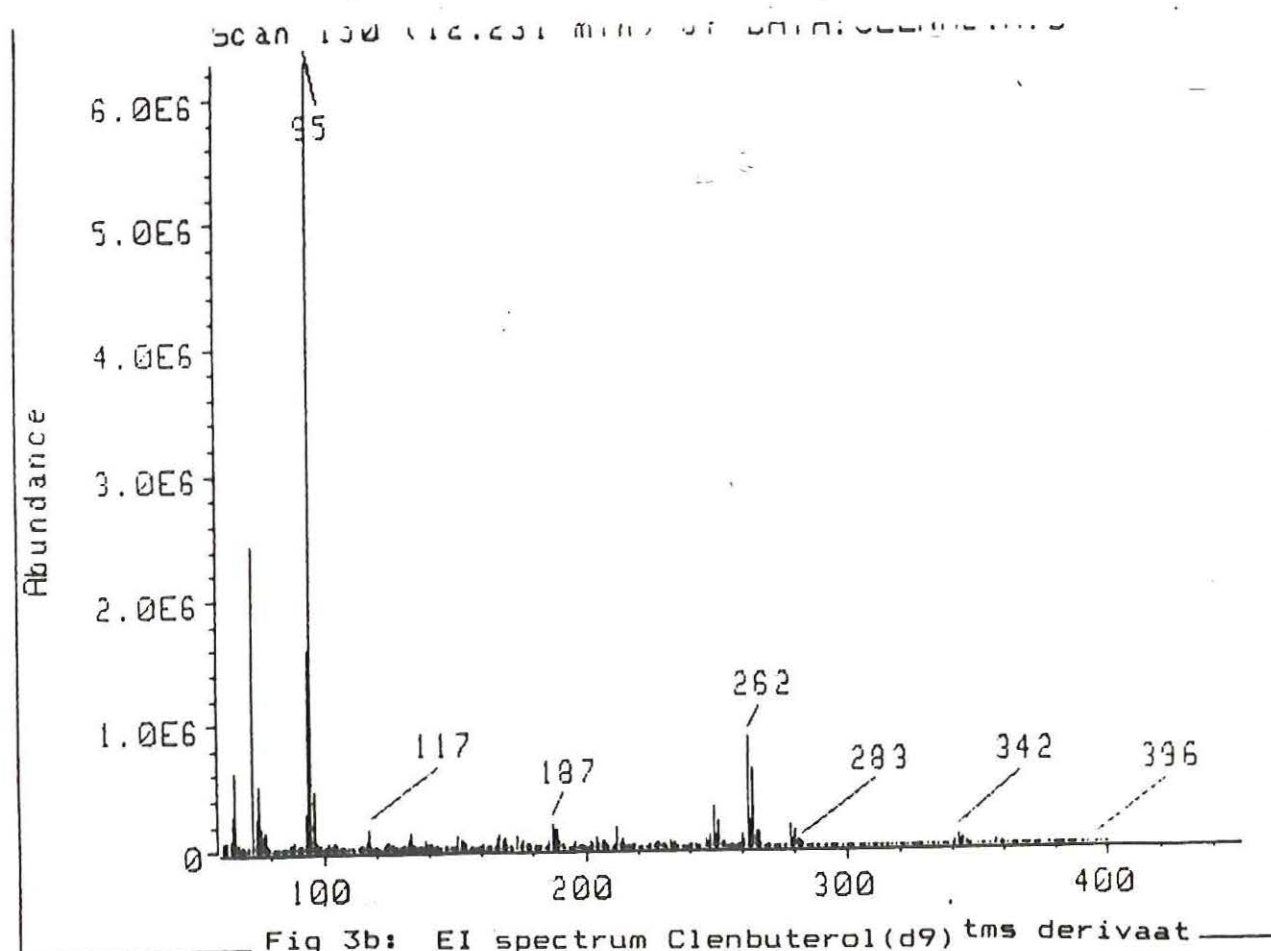
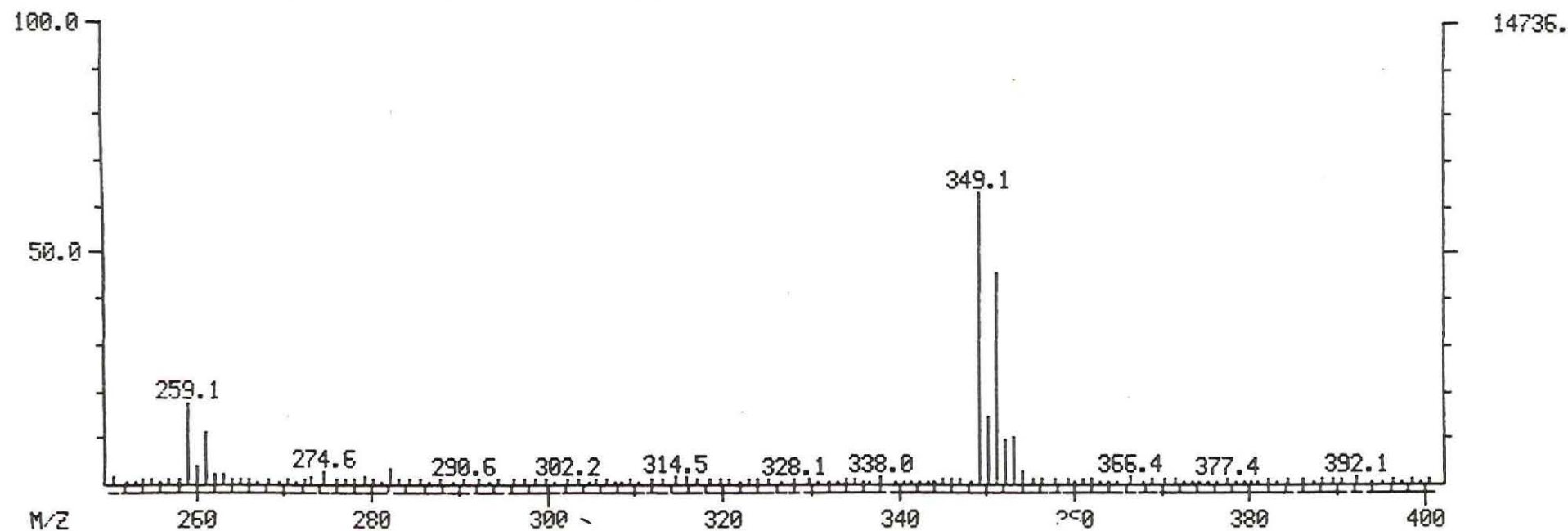
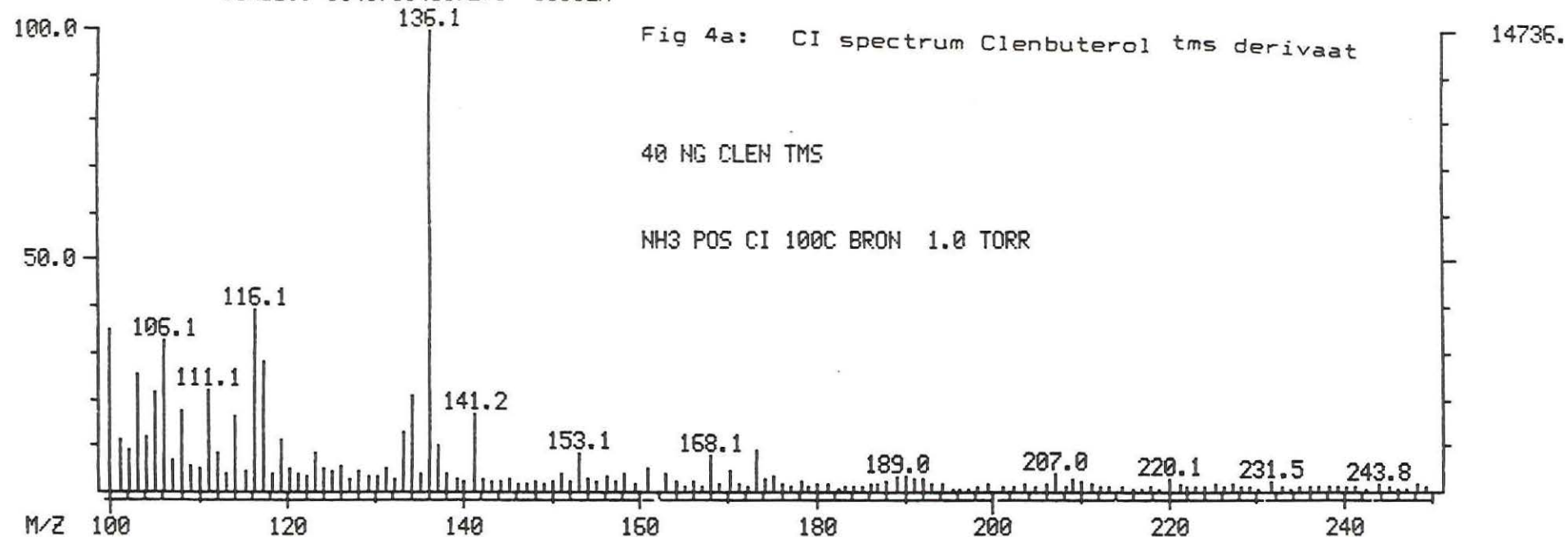


Fig 3b: EI spectrum Clenbuterol(d9) tms derivaat

MASS SPECTRUM
08/18/88 15:28:00 + 12:56
SAMPLE: ST CLEN-TMS 20NG/UL
CONDS.: 80(3)80(15)270 1500EM

DATA: CLEN12 #1294
CALI: PK1808 #3

BASE M/Z: 136
RIC: 158720.



MASS SPECTRUM

12/06/88 14:01:00 + 8:45

SAMPLE: STANDAARD CLENBUTEROL D9 10NG/UL

CONDS.: 90(3)90(30)170(12)270 NH3 100C BRON 0.6 TORR FP SIL5 .012

ENHANCED (S 15B 2N 0T)

DATA: D9CLEN1 #10

CALI: PK604EI #3

BASE M/Z: 112

RIC: 125568.

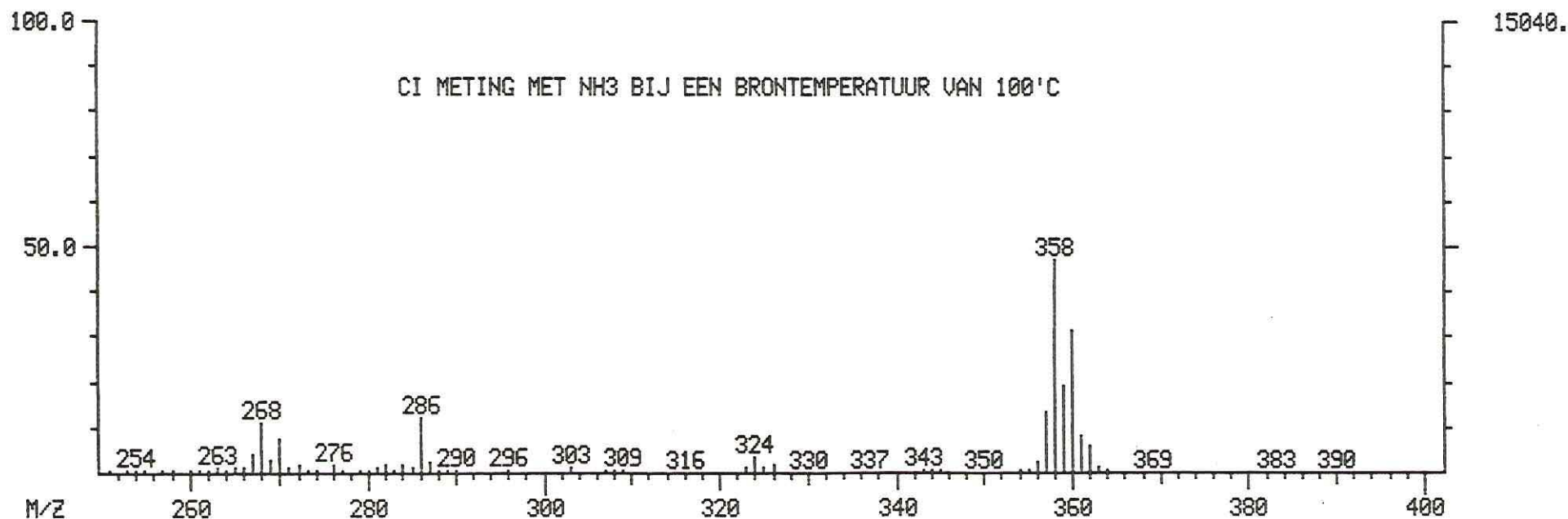
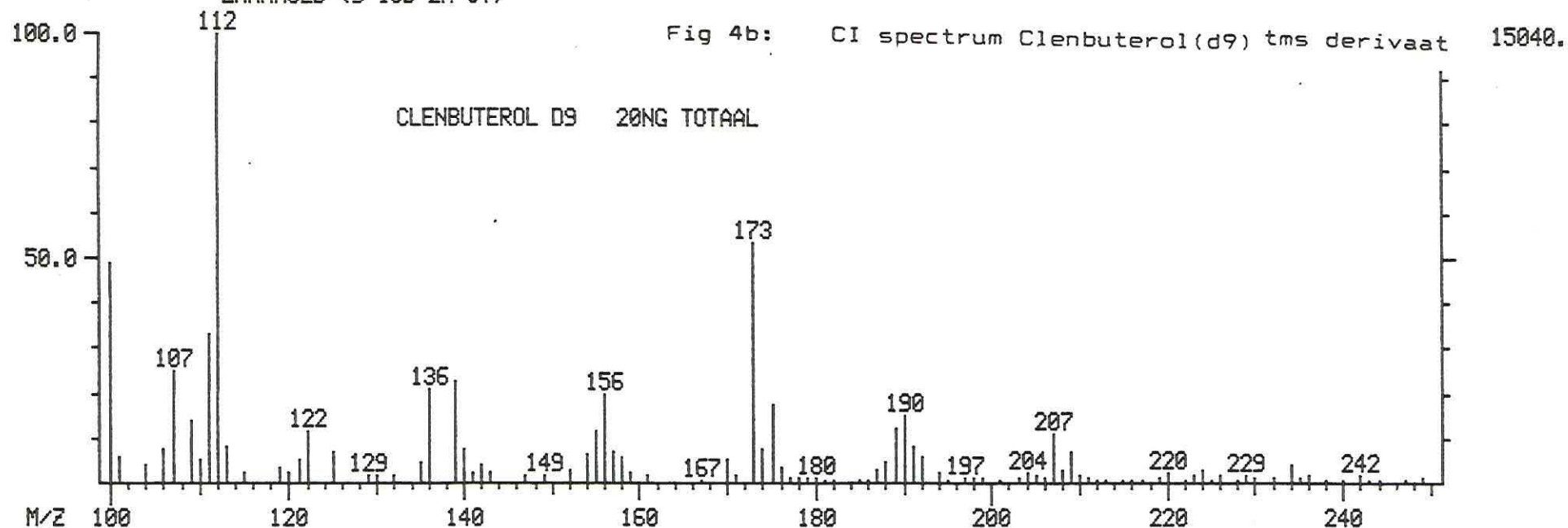
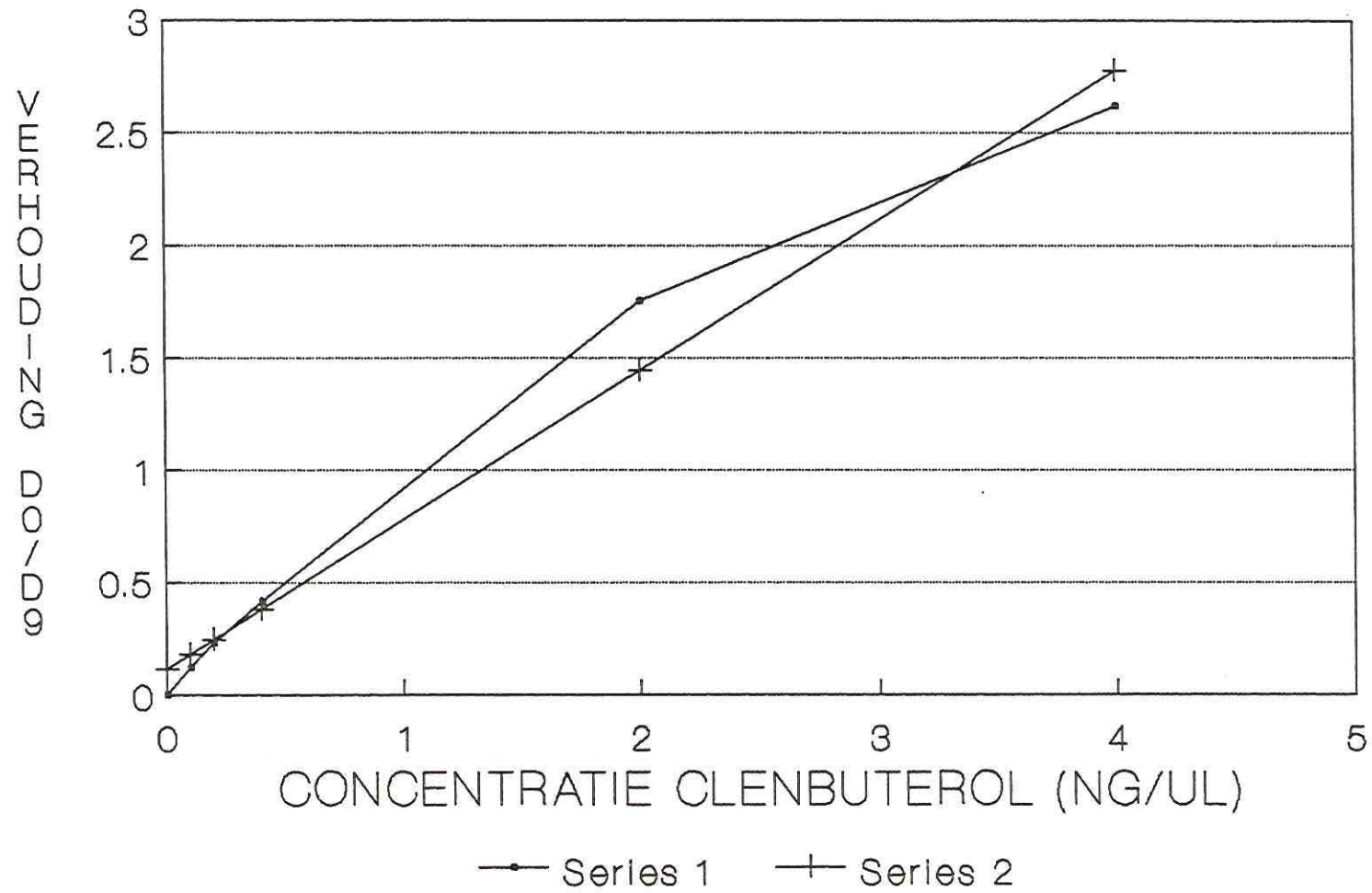
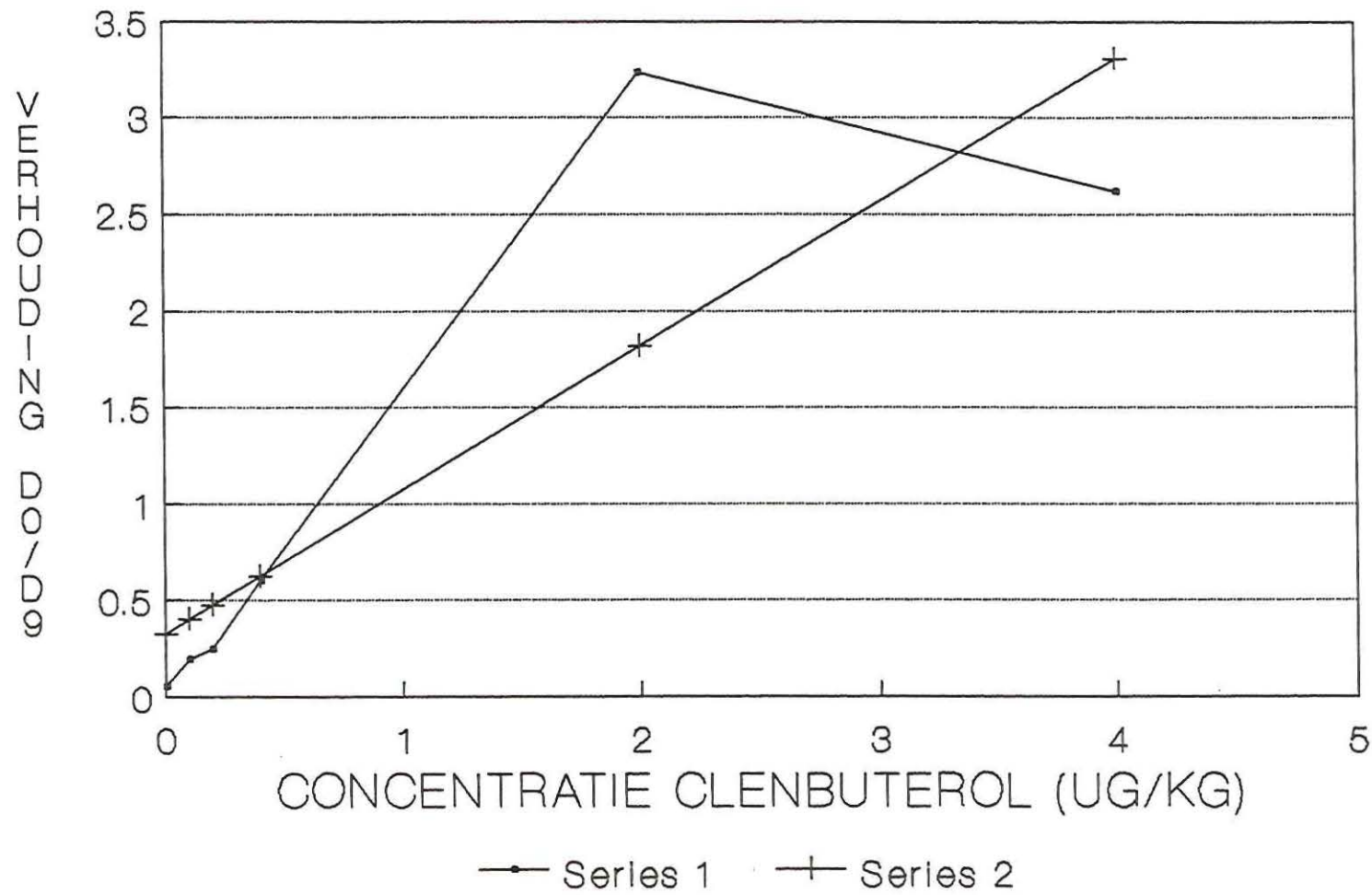


FIG 5: IJKLIJN CLENBUTEROL-TMS
STANDAARDEN (0.1 TOT 4 NG/UL)



SERIE 1 GEMETEN WAARDE, SERIE 2 LIN. REG

FIG 6: IJKLIJN CLENBUTEROL-TMS
STANDAARDEN IN URINE (0.1 TOT 4 UG/KG)



SERIE 1 GEGETEN WAARDE, SERIE 2 LIN. REG

Bijlage 1 Macro CLEN (procedure voor data editing)

```
NAME CLEN
  TAB HEADER ,PRINTER:
    TIC 16:25
    DR 3
    SCR
  WRITELN 701,#12
  CH 18.3:18.7,95.15
  THR 17,18.3
  INT
  DR 3
  SCR
  CH 18.4:18.9,86.15
  THR 17,18.4
  INT
  DR 3
  SCR
  WRITELN 701,#12
N=1
  WHILE N<=NPEAKS
    PEAKNUMBER N
    DR 3
    LIST ,PRINTER:
    NORMALIZE 1000
    LIST ,PRINTER:
    WRITELN 701,#10
    WRITELN 701,#10
    EXCHANGE
    N=N+1
  ENDWHILE
  STARTSET
    CH 18.3:18.7,95.15
    THR 17,18.3
    INT
    CH 18.4:18.9,86.15,243.10,262.10,277.05
    THR 13,18.4
    INT
    CH 23.0:24.0,359.8
    THR 17,23.0
    INT
  ENDSET
  WRITELN 701,#12
  QUIT
```

CALIBRATION

Module 2: Calibratie procedure voor Clenbuterol

Integration Results File: DATA:HK02A05A.1

Calibration Table File: DATA:CLEN.Q

Last Update: 1 May 89 2:13 pm

Calibrate By: Area Level Number: 4 Average Level

Level number exists, recalibration of this level assumed

----- Calibration Table Header Information -----

Title: BEPALING CLENBUTEROL IN URINE

Multiplier: 1.000 Sample Amount: 0.000 Uncal Peak RF: 0.000
Signal Correlation Window: 0.03010 min

Recognition Windows, as Absolute Minutes

Reference Peaks: 0.1000 Non-Reference Peaks: 0.1000

Next	Previous	List Cal Table	Save Cal Table	Recal Level	REPORT PARAMS	Edit Cal Table	EXIT
------	----------	-------------------	-------------------	----------------	------------------	-------------------	------

Bijlage 2a Calibratie procedure voor Clenbuterol

*** Calibration Table ***

BEPALING CLENBUTEROL IN LEVER

Last Update: 1 May 89 2:13 pm

Reference Peak Window: 0.10 Absolute Minutes

Non-Reference Peak Window: 0.10 Absolute Minutes

Sample Amount: 0.000 Uncalibrated Peak RF: 0.000 Multiplier: 1.000

Ret Time	Pk#	Signal	Descr	Amt ng/ul	Lvl	[Area]	Pk-Type	Partial Name
18.594	1	Mass	95.15 amu	0.4000	5	33958054	+ISTD 1	CLEN (D9)
				0.4000	2	35609616		
				0.4000	4	42243239		
				0.4000	1	43365440		
18.683	2	Mass	86.15 amu	0.04000	1	5379885		1 CLEN
				0.08000	2	8652073		
				0.4000	4	48023324		
				1.000	5	83573021		

Bijlage 2: Calibratie procedure voor Clenbuterol

Mar-86

Calibration Table : DATA:CLEN.Q

Ret Time	Pk#	Signal	Descr	Amt ng/ul	Lvl	RespFact	Pk-Type	Partial Name
18.594	1	Mass	95.15 amu	0.4000	5	11.78e-9	+1STD	1 CLEN (D9)

Compound name : CLEN (D9)

Curve Fit : Linear, Ignore Origin

Internal standard amount: 0.4000

Confirm Presence of Compound Based Upon:

signal	Descr	eXpected Resp	Limits
Mass	95.15 amu	100.00 %	+ 0 /- 0 %

EXTENDED PEAK INFO

Rev 3.1.1 31-Mar-86

Calibration Table : DATA:CLEN.Q

Ret Time	Pk#	Signal	Descr	Amt ng/ul	Lvl	RespFact	Pk-Type	Partial Name
18.683	2	Mass	86.15 amu	0.04000	1	7.435e-9		1 CLEN

Compound name : CLEN

Curve Fit : Linear, Include Origin

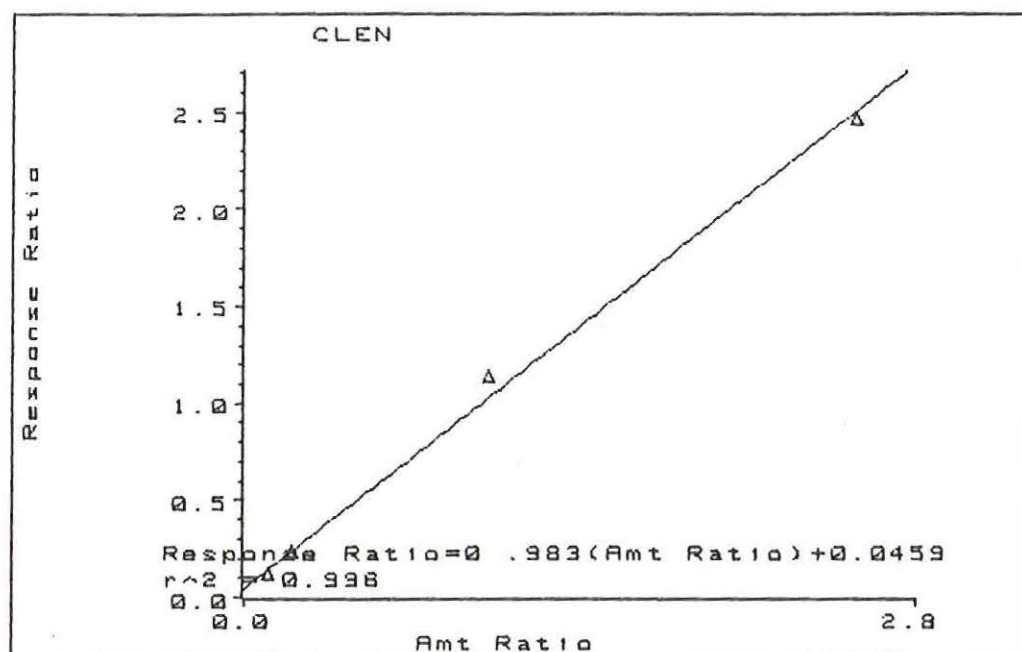
Quantitate Referenced to:

1STD 1 at 18.59 min. CLEN (D9)

Confirm Presence of Compound Based Upon:

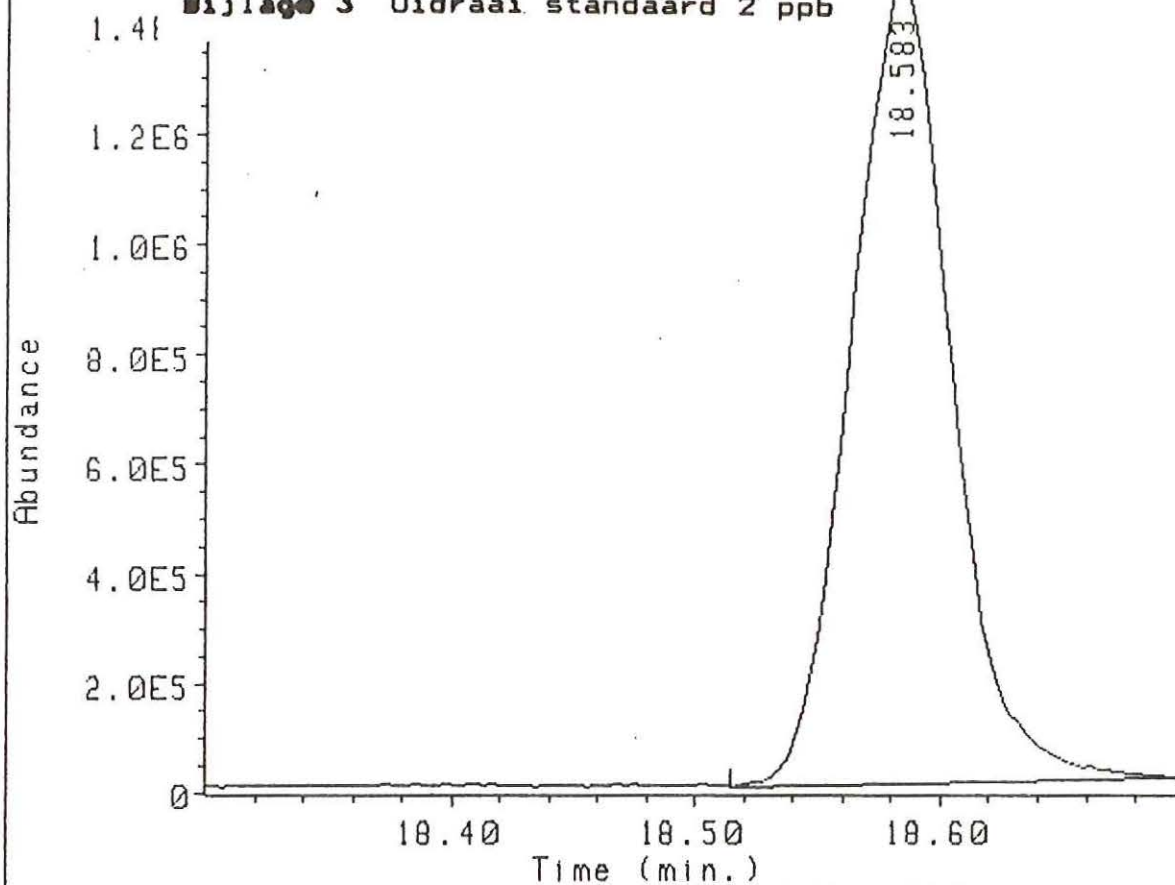
signal	Descr	eXpected Resp	Limits
Mass	86.15 amu	100.00 %	+ 0 /- 0 %
Mass	243.10 amu	20.00 %	+ 0 /- 19 %
Mass	262.10 amu	20.00 %	+ 0 /- 19 %
Mass	277.05 amu	20.00 %	+ 0 /- 19 %

Bijlage 28 : Calibratie procedure voor Clenbuterol

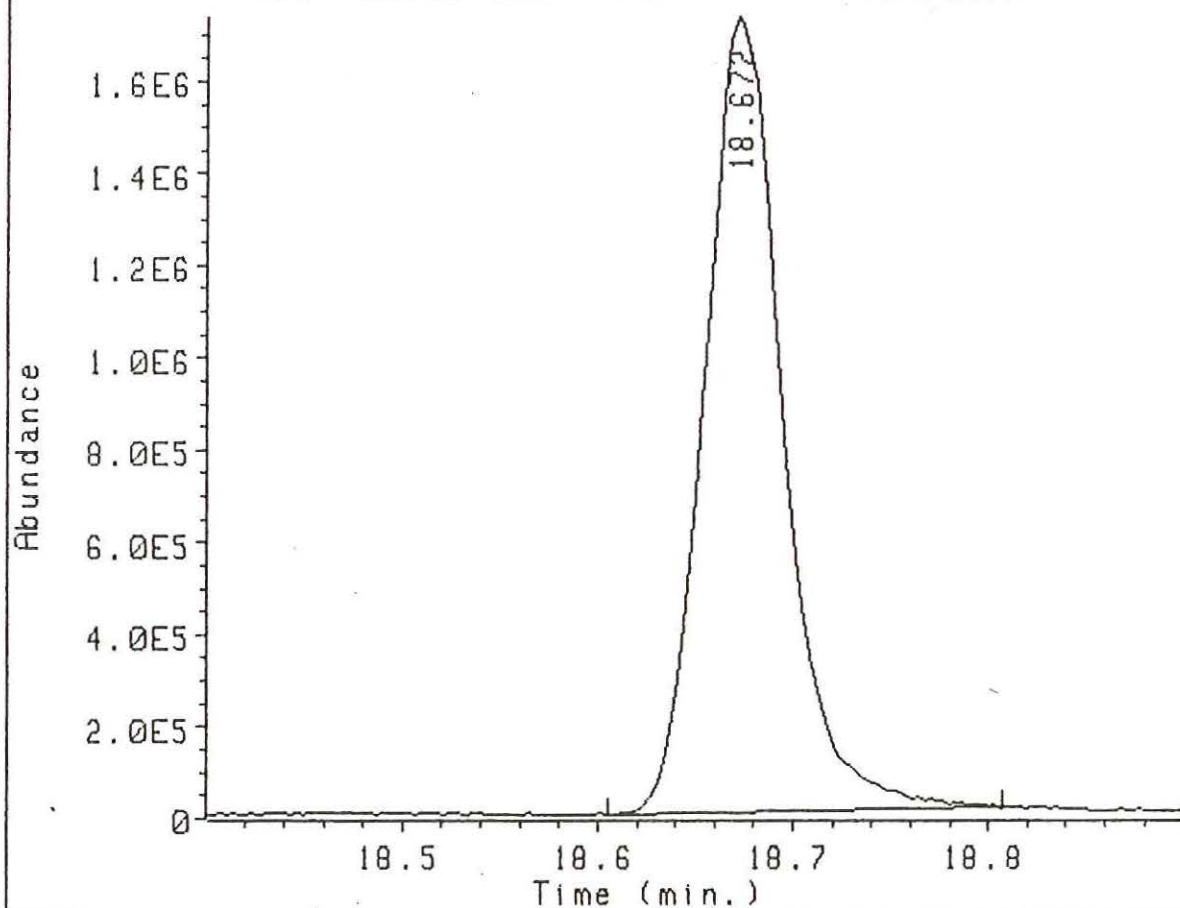


Ion 95.15 amu. from DATA:HK02A05A.D

Bijlage 3 Uidraai standaard 2 ppb



Ion 86.15 amu. from DATA:HK02A05A.D



*** Internal Standard ~~Bijlage 3~~ Uidraai standaard 2 pp

*** Time Reference Peaks ***

Peak Number	Expected RT	Actual_RT
1	18.594	18.582

Operator: HK

8 Mar 89 1:56 pm

Method File Name : CLEN.M

Sample Info : ST 2.0 PPB

Misc Info:

Integration File Name : DATA:HK02A05A.I

Method index : 1 Bottle Number : 5

BEPALING CLENBUTEROL IN URINE

Last Update: 1 May 89 2:25 pm

Reference Peak Window: 0.10 Absolute Minutes

Non-Reference Peak Window: 0.10 Absolute Minutes

Sample Amount: 0.000 Uncalibrated Peak RF: 0.000 Multiplier: 1.000

*** CLEN (D9) ***

Peak Num	Type	Int Type	Ret Time	Signal Description	Compound Name	Area	Amount
1	+ISTD	1BBA	18.582	Mass 95.15 amu	CLEN (D9)	41403932	0.4000 ng/ul

*** Qualifiers ***

Channel	Description	Exp Resp	Tolerance	Actual Resp
Mass	95.15 amu	100.00	+ 0/- 0%	100.00

*** CLEN ***

Peak Num	Type	Int Type	Ret Time	Signal Description	Compound Name	Area	Amount
2		1PV	18.672	Mass 86.15 amu	CLEN	48683775	0.4598 ng/ul

*** Qualifiers ***

Channel	Description	Exp Resp	Tolerance	Actual Resp
Mass	86.15 amu	100.00	+ 0/- 0%	100.00
Mass	243.10 amu	20.00	+ 0/-19%	3.35
Mass	262.10 amu	20.00	+ 0/-19%	8.23
Mass	277.05 amu	20.00	+ 0/-19%	1.29

*** Internal Standard Correction ***

(Corrected Amt Ratio) * (Amt [ISTD])

1.149 * (0.4000) = 0.4598

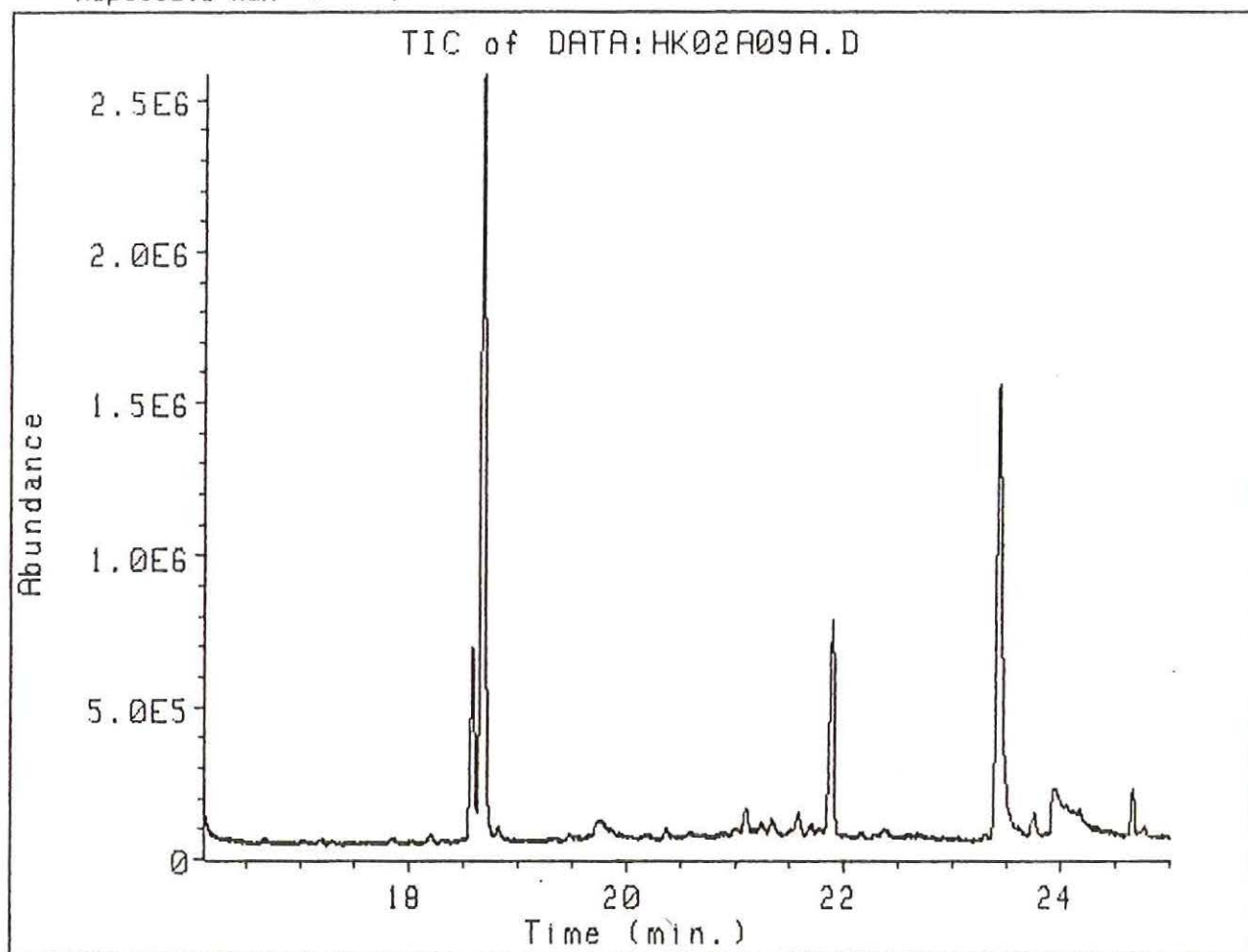
Data file: DATA:HK02A09A.D
File type: GC / MS DATA FILE

Bijlage 4 Uitdraai positief monster

Name Info:
Misc Info:
Operator : HK

Date : 8 Mar 89 5:06 pm
Instrument: MS_5970
Inlet : GC

Sequence index : 1
Als bottle num : 9
Replicate num : 1



Bijlage 4: Uitdraai positief monster

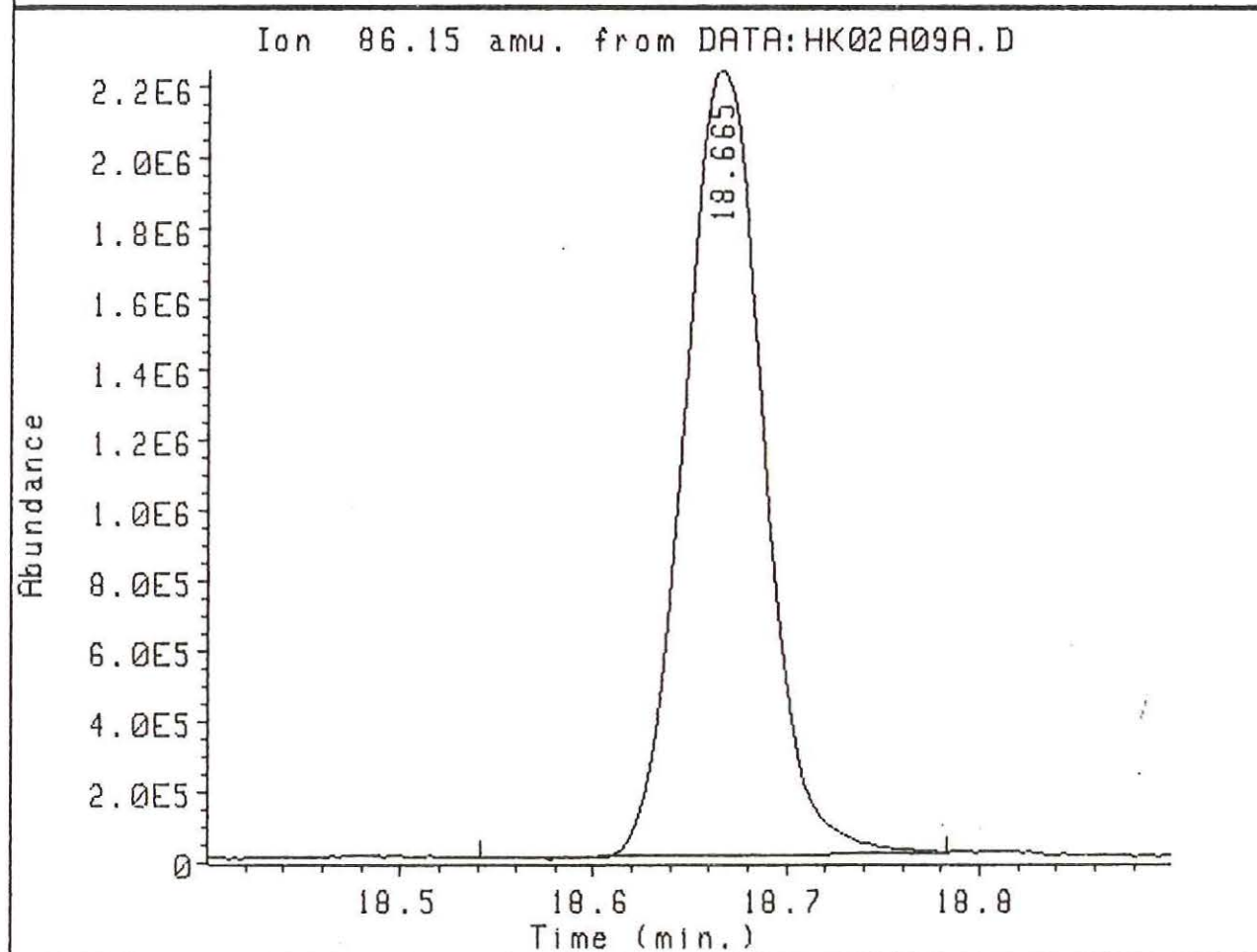
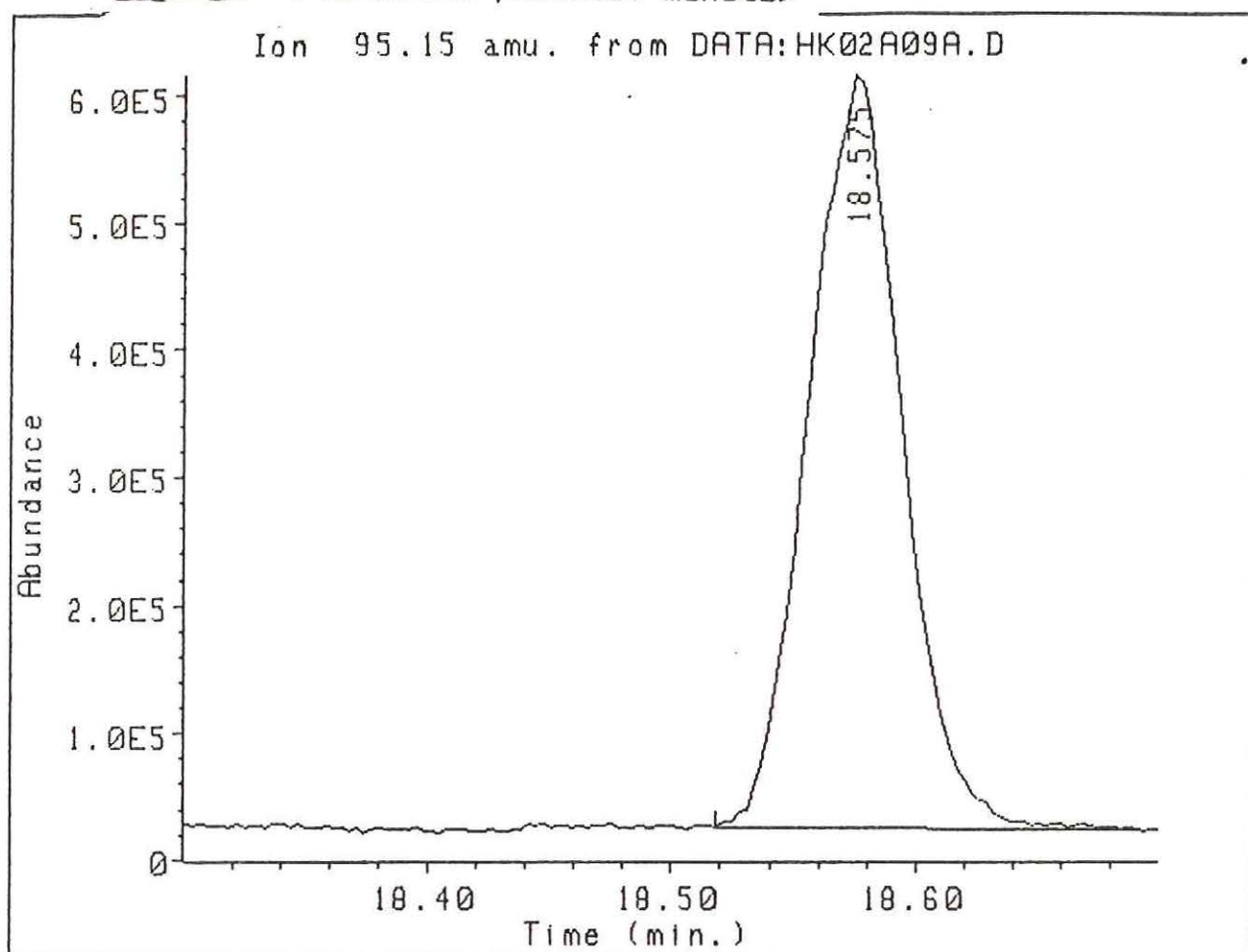
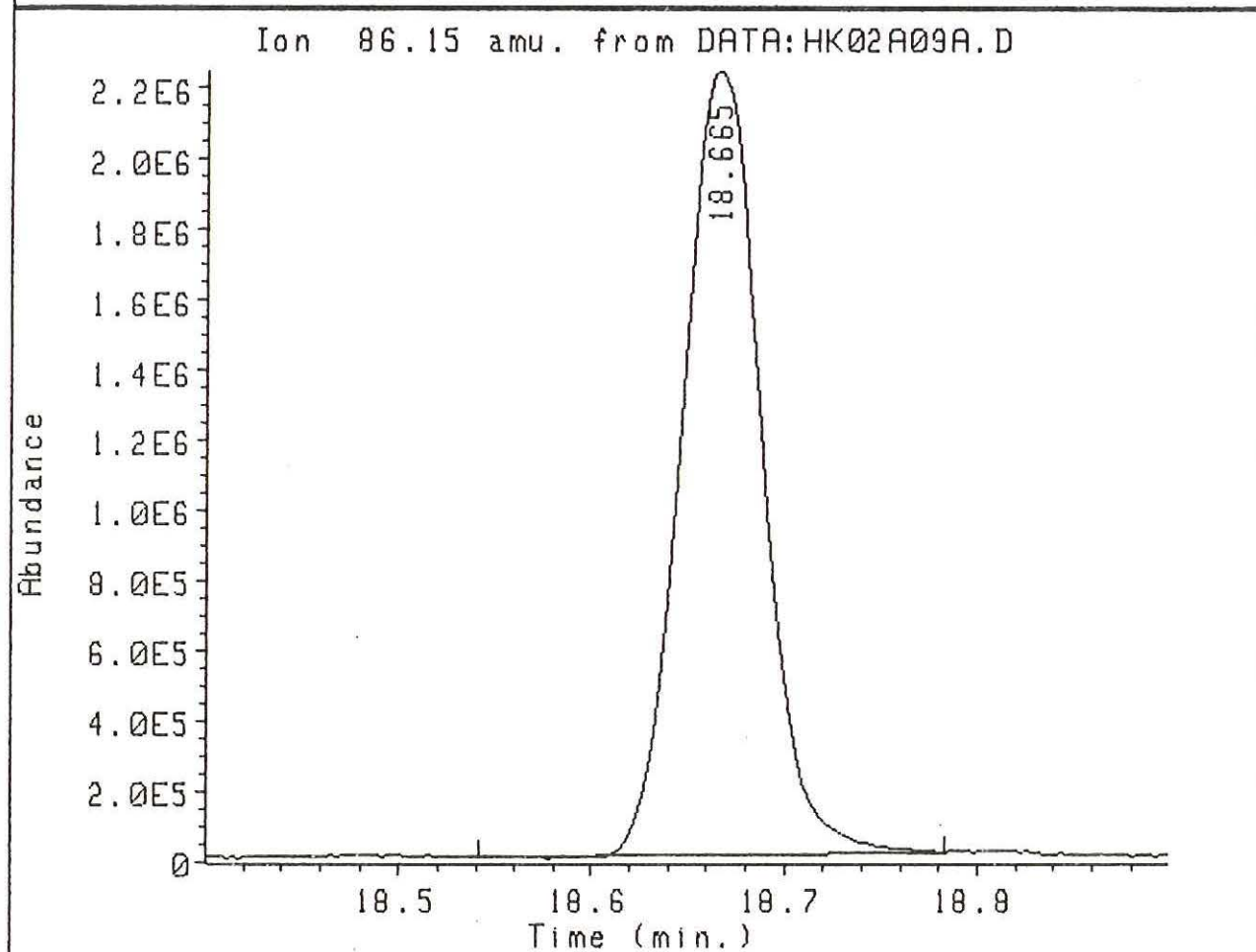
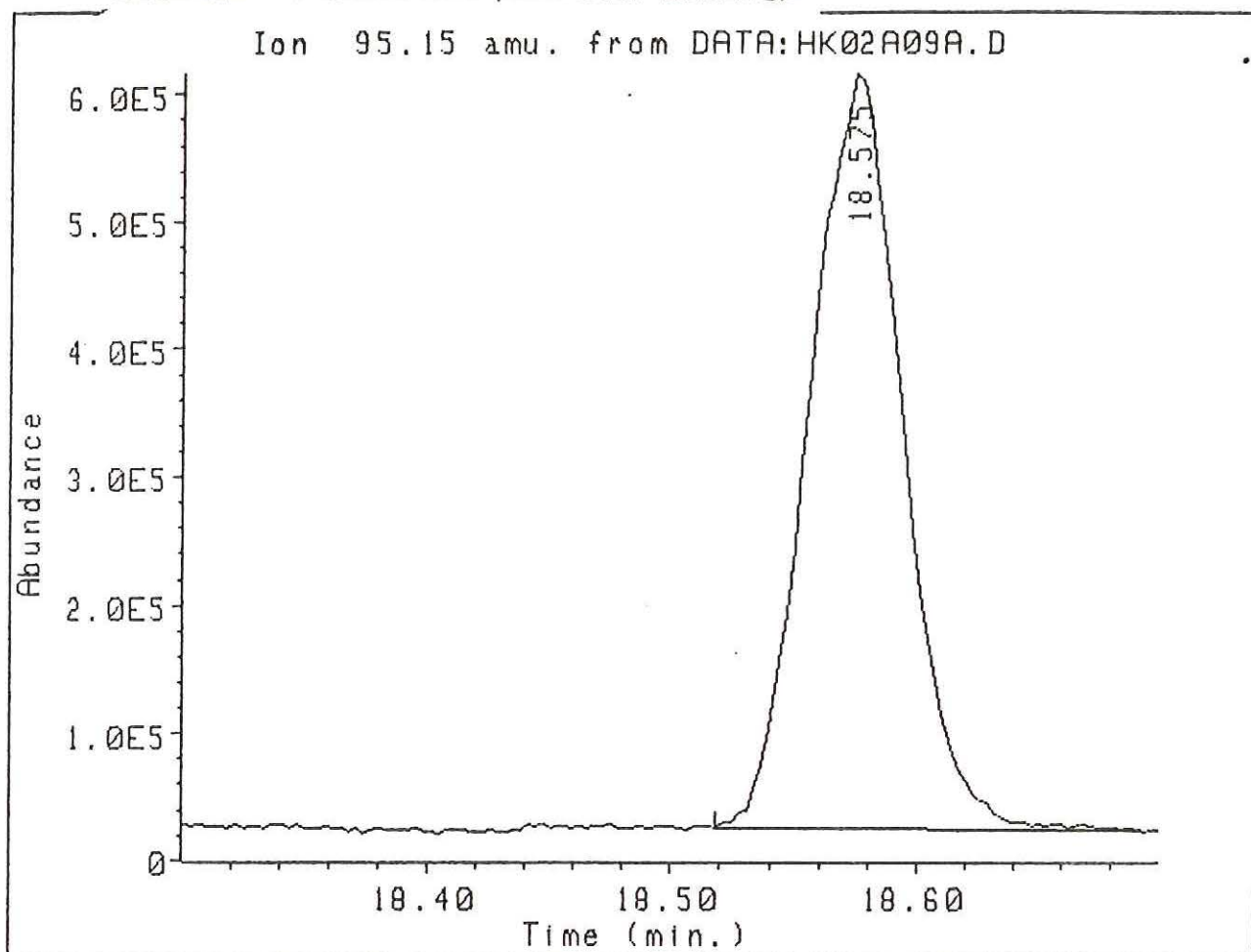


Fig. 4: Uitdraai positief monster



Bijlage 4 Uitdraai positief monster

*** Time Reference Peaks ***

Peak Number	Expected RT	Actual_RT
1	18.594	18.575

Operator: HK

8 Mar 89 5:06 pm

Method File Name : CLEN.M

Sample Info :

Misc Info:

Integration File Name : DATA:HK02A09A.I

Method index : 1 Bottle Number : 9

BEPALING CLENBUTEROL IN URINE

Last Update: 1 May 89 2:25 pm

Reference Peak Window: 0.10 Absolute Minutes

Non-Reference Peak Window: 0.10 Absolute Minutes

Sample Amount: 0.000 Uncalibrated Peak RF: 0.000 Multiplier: 1.000

*** CLEN (D9) ***

Peak Num	Int Type	Ret Time	Signal Description	Compound Name	Area	Amount
1	+ISTD 18BA	18.575	Mass 95.15 amu	CLEN (D9)	15767139	0.4000 ng/u1

*** Qualifiers ***

Channel	Description	Exp Resp	Tolerance	Actual Resp
Mass	95.15 amu	100.00	+ 0/- 0%	100.00

*** CLEN ***

Peak Num	Int Type	Ret Time	Signal Description	Compound Name	Area	Amount
2	IPV	18.665	Mass 86.15 amu	CLEN	64459511	1.645 ng/u1

*** Qualifiers ***

Channel	Description	Exp Resp	Tolerance	Actual Resp
Mass	86.15 amu	100.00	+ 0/- 0%	100.00
Mass	243.10 amu	20.00	+ 0/-19%	3.23
Mass	262.10 amu	20.00	+ 0/-19%	7.43
Mass	277.05 amu	20.00	+ 0/-19%	1.05

*** Internal Standard Correction ***

(Corrected Amt Ratio) * (Amt [ISTD])

4.112 * (0.4000) = 1.645