

Project 505.0070

Ontwikkelen methoden voor het verrichten van identificaties cq.
confirmaties

Projectleider: W.A. Traag

Rapport 89.30

April 1989

Gaschromatografie - Massaspectrometrische
analyse van chloormadinon-acetaat

W.A. Traag



Medewerker: E.O. van Bennekom

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, Rijkskwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproduk-
ten.

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

EXTERN:

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

INHOUD	<u>blz</u>
1 INLEIDING	3
2 DEFINITIE	3
3 ONDERZOEK	4
3.1 Spectrale informatie	4
3.2 Reproduceerbaarheid	4
4 RESULTATEN	4
5 DISCUSSIE	6
6 CONCLUSIE	7
LITERATUUR	8

1 INLEIDING

Door het Centraal Laboratorium van de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (CL-RVV) is in een monster vlees een nog niet eerder aangetoond anabolicum aangetroffen.

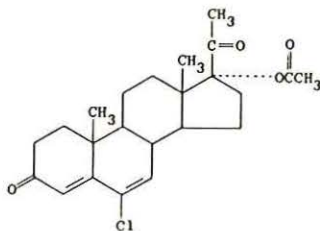
Dit anabolicum is door het CL-RVV geïdentificeerd, met behulp van massaspectrometrie, als chloormadinon-acetaat.

Daar deze component nog niet eerder door het RIKILT is onderzocht en derhalve niet opgenomen is in het desbetreffende voorschrift is aanvullend GC-MS onderzoek verricht teneinde ook van deze component massaspectrometrische criteria op te stellen.

Het onderzoek is verricht met behulp van massaspectrometrie met zowel Electron Impact (EI) als Chemische Ionisatie (CI), waarbij zowel de component direct (ongederivatiseerd) als na derivatiseren (MO-derivaat) is geanalyseerd.

2 DEFINITIE

Naam : Chloormadinon acetaat
Merknamen : Gestrafortin, Lormin, Lukran, Lutestral, Luforal, Matrol, Normenon, Menstridyl, Gero, Verton.
Brutoformule : $C_{23}H_{29}ClO_4$
Molecuulgewicht : 404.94
Structuurformule:



Toepassing : Anabolicum

3 ONDERZOEK

3.1 Spectrale informatie

Van de te onderzoeken verbinding is een standaardoplossing gemaakt in methanol met een concentratie van 100 ng/ μ l.

Van deze standaardoplossing is een aliquot drooggedampt en gederivatiiseerd volgens intern voorschrift A.437 (1) waarbij een methoxylamine (MO)-derivaat bereid is.

Van zowel de ongederivatiseerde standaardoplossing als van de standaardoplossing na derivatiseren is 2 μ l geïnjecteerd op de gaschromatograaf van de Finnigan 4500. De gaschromatografische condities zijn aangehouden conform intern voorschrift A.437 (1).

In eerste instantie is het Electron Impact (EI) spectrum opgenomen waarbij de massaspectrometer gescand is van m/z 40 tot m/z 550 (figuur 1,2). Aansluitend zijn de standaarden geanalyseerd met Chemische Ionisatie (CI) met methaan als reactiegas met een druk van 0,6 Torr en een brontemperatuur van 150°C, waarbij de massaspectrometer gescand is van m/z 100 tot m/z 550 (figuur 3).

3.2 Reproduceerbaarheid

Nadat uit bovengenoemd onderzoek spectrale gegevens werden verkregen is de reproduceerbaarheid van de HP-MSD getoetst voor chloormadinon acetaat (MO-derivaat).

Een standaardoplossing van 2 ng/ μ l in iso-oktaan, waaraan 2 ng/ μ l van de interne standaard PCB 138 was toegevoegd is 10 maal geanalyseerd op de HP-MSD in de "Multiple Ion Detection" mode. De massaspectrometer was ingesteld op de volgende massa's m/z 360 (PCB 138); 295, 330 358, 373 en 433 (chloormadinon-acetaat MO-derivaat).

4 RESULTATEN

In figuur 1 is het EI spectrum van de ongederivatiseerde standaard gegeven en in figuur 2 het spectrum van de gederivatiseerde standaard. Figuur 3 is het spectrum van ongederivatiseerd chloormadinon-acetaat onder Chemisch Ionisatie omstandigheden, waarbij positieve ionen zijn gemeten. Het meten van negatieve ionen gaf een zwakkere respons.

Het gederivatiseerde chloormadinon-acetaat gaf onder de toegepaste chemische ionisatie omstandigheden geen goed meetbaar signaal.

Een chromatogram van chloormadinon-acetaat (MO-derivaat), concentratie 2 ng/ μ l, gemeten op de HP-MSD in "Multiple ion detection" is gegeven in figuur 4. Door de afwezigheid van vrije draaibaarheid van de C=N band ontstaan twee isomeren (syn en anti) welke gaschromatografisch gescheiden zijn.

De resultaten van het reproduceerbaarheidsexperiment zijn als volgt weergegeven.

In tabel 1 zijn de resultaten van de 10 analyses vermeld waarbij naast de relatieve retentietijd van zowel de interne standaard als die van de twee chloormadinon acetaat (MO-derivaat) componenten, het oppervlak gegeven is van het meest intense ion, respectievelijk m/z 360 van PCB 138 en m/z 330 van chloormadinon-acetaat (MO-derivaat). Ook zijn statistische grootheden zoals gemiddelde, standaarddeviatie en variatiecoëfficiënt vermeld.

In tabel 2 zijn de spectrale gegevens van chloormadinon acetaat (MO-derivaat) (component 1) gegeven.

De relatieve intensiteit van de gemeten ionen, uitgedrukt als fractie van het meest intense ion (m/z 330), is hier vermeld. De spectra zijn op twee verschillende manieren verkregen namelijk:

- a) door het spectrum op de top van de chromatografische piek te nemen.
- b) door het spectrum te nemen over de gehele chromatografische piek waarbij de scans, waaruit de chromatografische piek is opgebouwd, zijn gemiddeld. De relatieve intensiteit van de gemeten fragmentionen worden verkregen door het oppervlak van de desbetreffende ion-profiel te relateren aan het oppervlak van het ion-profiel van het meest intense ion.

Ook is hier het gemiddelde, de standaarddeviatie en de variatiecoëfficiënt gegeven.

Tevens is het window rond het gemiddelde ($\pm 10\%$), zoals vereist conform de EEG criteria vermeld.

In tabel 3 is dit gedaan van de 2^e component van chloormadinon acetaat (MO-derivaat).

5 DISCUSSIE

Voor het verkrijgen van een redelijk respons in de Electron Impact mode, waarbij het gehele spectrum wordt opgenomen, moet van de ongederivatiseerde verbinding ca. 100 ng absoluut worden geïnjecteerd en van de gederivatiseerde verbinding ca. 10 ng.

Eén en ander vindt zijn oorzaak door adsorptie van de ongederivatiseerde verbinding aan de kolom hetgeen blijkt uit de tailende piek, terwijl de gederivatiseerde component twee (syn en anti vorm) symmetrische pieken oplevert.

Ook de spectrale informatie (EI-detectie) is bij de gederivatiseerde component beter. Met name het molecuul-ion en enkele diagnostische fragmenten zijn bij de gederivatiseerde verbinding ongeveer een factor 5 intenser ten opzichte van de base peak (het meest intense fragment ion).

Bij chemische ionisatie wordt geen of niet voldoende signaal verkregen van zowel de ongederivatiseerde verbinding als de gederivatiseerde verbinding. Niet uitgesloten mag worden dat bij toepassing van een ander reactie gas en/of omstandigheden of bij een ander merk massaspectrometer er wel een goed signaal verkregen wordt.

In bijlage 1 is het voorgestelde fragmentatiepatroon gegeven welke analoog is aan het fragmentatie patroon van medroxyprogesteron acetaat.

Geconcludeerd kan worden dat met de gebruikte derivatiseringsmethode er slechts één ketogroep omgezet wordt en wel de ketogroep op de derde plaats. Een kenmerkend fragment ion is m/z 295 welke blijkens de isotop verhouding geen chloor bevat.

Ook fragment ion m/z 344 is kenmerkend namelijk verlies van de acetaat groep.

Uit tabel 1 blijkt dat de reproduceerbaarheid van de interne standaard (PCB 138) goed is (VC 5.1%) echter de reproduceerbaarheid van de twee chloormadinon-acetaat (MO-derivaat) componenten is slecht (VC respectievelijk 37,0 en 35,4%).

Voor deze slechte reproduceerbaarheid van chloormadinon-acetaat (MO-derivaat) kon geen verklaring gevonden worden. Uit tabel 1 kan voor de spreiding van het chloormadinon acetaat (MO-derivaat) oppervlak geen wetmatigheid ontdekt worden. Er is bijvoorbeeld geen toename van het oppervlak in de tijd.

Uit tabel 2 en 3 blijkt dat de variatiecoëfficiënt van de relatieve intensiteit van de gemeten ionen met uitzondering van m/z 358 ongeveer 2 tot 5% bedraagt, dit komt overeen met waarden welke eertijds met de Finnigan 4500 zijn gevonden voor andere anabolica.

Spectra genomen over de gehele piek blijken een iets lagere variatiecoëfficiënt te vertonen dan spectra genomen op de top van de chromatografische piek. Uit tabel 2 blijkt dat het fragment ion m/z 358 het meest kritische ion is welke dan ook niet geschikt is voor confirmatie doeleinden.

Opgemerkt dient te worden dat het experiment uitgevoerd is op een vrij laag niveau namelijk 2 ng/ μ l. De signaalruis verhouding bedroeg voor het minst intense ion ca. 5 á 10.

Alhoewel er een groot aantal andere mogelijkheden zijn om spectra te extraheren lijkt het erop, dat spectra genomen over de gehele piek het meest betrouwbare resultaat geven.

6 CONCLUSIE

Het confirmeren van chloormadinon-acetaat in spuitplaatsen met behulp van gaschromatografie massaspectrometrie is goed mogelijk wanneer er gederivatiseerd wordt met methoxylamine, uitgevoerd conform het interne RIKILT voorschrift A 437 (1). De opwerking en zuivering vanuit de spuitplaats dient nog getoetst te worden op recovery.

Als ionisatie-techniek moet Electron Impact (EI) gebruikt worden gezien de respons en de spectrale informatie. Diagnostische ionen zijn naast het molecuul ion $M^+ = 433$ de fragmentationen m/z 373, m/z 330 en m/z 295.

Deze ionen dienen dan ook in het desbetreffende voorschrift te worden opgenomen.

De reproduceerbaarheid van chloormadinon-acetaat als MO-derivaat is qua absolute respons slecht: de variatiecoëfficiënt, van een standaard oplossing van 2 ng/ μ l, bedraagt ca. 35%.

De spectrale reproduceerbaarheid is goed, de variatiecoëfficiënt van de spectra van een standaardoplossing van 2 ng/ μ L, verkregen over de gehele piek is iets beter dan wanneer spectra genomen worden op de top van de gaschromatografische piek.

LITERATUUR

Intern RIKILT voorschrift A 437; Steroidhormonen - Derivatisering tot TMS en MOX-TMS derivaten van GC-MS onderzoek.

Tabel 1: Reproduceerbaarheid chloormadinon acetaat (MO-derivaat)

Stand no.	Chloormadinon acetaat					
	PCB 138		Comp 1		Comp 2	
	RT	INT m/z 360	RT	INT m/z 330	RT	INT m/z 330
s11	13.891	42331534	22.743	2751746	22.957	3957588
s12	13.893	44908962	22.74	5863228	22.953	8303050
s13	13.881	47438143	22.742	8711575	22.957	12613933
s14	13.882	44386973	22.739	5567783	22.952	8391328
s15	13.882	46280895	22.737	3461787	22.946	5573669
s16	13.882	48512872	22.735	3244903	22.949	5234438
s17	13.878	48567484	22.731	4271747	22.943	6925515
s18	13.879	50265554	22.736	8505948	22.952	13027771
s19	13.879	47167602	22.732	4799078	22.947	7569467
s20	13.877	49956331	22.733	6834984	22.945	10677912
Gem.	13.882	46981635	22.737	5401278	22.950	8227467
STD	0.0051	2405790	0.0039	1999094	0.0046	2910018
VC (%)	0.0368	5.12007	0.0173	37.0115	0.0202	35.3695

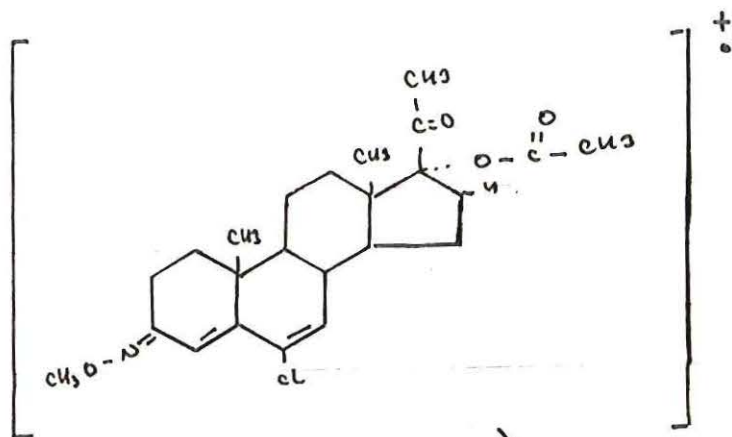
Tabel 2: Reproduceerbaarheid chloormadinon acetaat (M0-derivaat)
Spectrale informatie component 1

stand no.	Relatieve intensiteit top van de piek					Relatieve intensiteit gehele piek				
	295	330	358	373	433	295	330	358	373	433
st1	60.7	100	13.9	16.7	16.4	53.7	100	8.0	12.4	12.6
st2	54.8	100	12.6	16.1	13.2	52.3	100	9.0	14.2	11.4
st3	52.9	100	12.1	16.1	13.9	50.4	100	10.4	14.4	12.2
st4	55.7	100	12.7	16.1	13.9	52.4	100	9.3	13.8	12.7
st5	58.7	100	14.6	17.6	14.3	53.7	100	7.9	13.1	11.6
st6	57.8	100	14.4	19.4	14.9	51.7	100	9.8	15.3	13.1
st7	54.5	100	12.3	16.5	13.5	51.2	100	10.3	14.2	12.5
st8	57.7	100	13.9	16.6	13.7	53.9	100	9.0	15.2	12.6
st9	55.3	100	12.7	16.8	14.2	52.5	100	10.3	14.3	11.9
st10	54.4	100	13.3	14.2	14.3	53.3	100	9.0	13.7	12.5
Gem.	56.25	100	13.25	16.89	14.23	52.51	100	9.29	14.06	12.31
STD	2.27		0.85	0.95	0.85	1.11		0.87	0.83	0.50
VC (%)	4.03		6.42	5.61	5.99	2.11		9.33	5.92	4.09
Gem+10%	61.08	110	14.58	18.58	15.56	57.76	110	10.22	15.47	13.54
Gem-10%	50.63	90	11.93	15.20	12.81	47.26	90	8.36	12.65	11.08

Tabel 3: Reproduceerbaarheid chloormadinon acetaat (M0-derivaat)
Spectrale informatie component 2

stand no.	Relatieve intensiteit top van de piek					Relatieve intensiteit gehele piek				
	295	330	358	373	433	295	330	358	373	433
st1	56.7	100	12.4	16.3	16.8	50.7	100	8.6	13.7	13.4
st2	53.6	100	12.0	16.4	15.2	49.1	100	8.9	14.2	11.4
st3	50.7	100	11.1	15.7	14.5	47.9	100	9.7	14.6	13.3
st4	52.9	100	11.5	15.9	14.0	49.3	100	9.3	13.8	13.4
st5	52.3	100	12.2	14.7	14.7	49.9	100	9.4	14.1	13.1
st6	52.2	100	11.3	14.9	13.9	47.2	100	8.3	14.6	12.7
st7	49.2	100	11.6	15.5	13.8	47.8	100	9.2	14.2	13.2
st8	53.2	100	11.2	16.1	14.9	50.4	100	9.5	14.6	13.8
st9	49.8	100	11.5	15.8	14.2	49.2	100	9.1	14.3	12.8
st10	52.3	100	10.7	15.7	14.7	49.9	100	9.2	14.4	13.2
Gem.	52.29	100	11.55	15.70	14.67	49.14	100	9.12	14.25	13.03
STD	2.02		0.50	0.52	0.83	1.11		0.40	0.30	0.62
VC (%)	3.86		4.30	3.33	5.67	2.26		4.39	2.13	4.74
Gem+10%	57.52	110	12.71	17.27	16.14	54.05	110	10.03	15.68	14.33
Gem-10%	47.06	90	10.40	14.13	13.20	44.23	90	8.20	12.83	11.73

Page 1

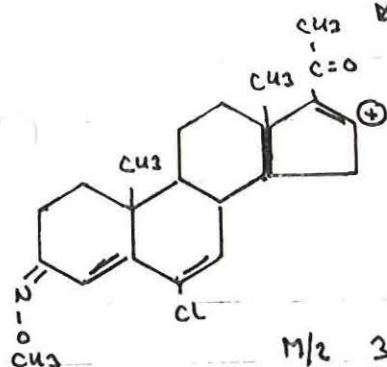


Chlormadinone acetate-mo
derivative

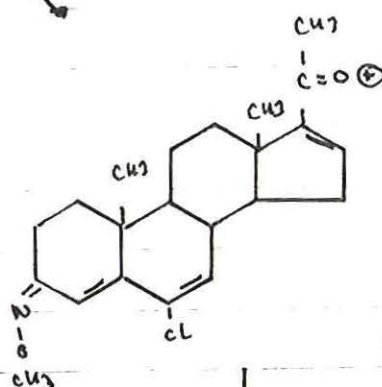
$M^+ = 433$

$- \text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$

$- \text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$

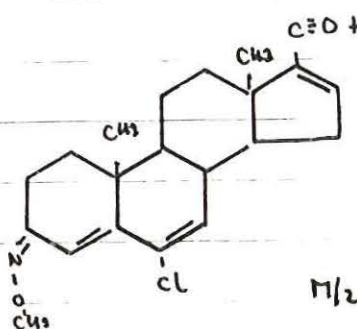


$m/z \ 373$



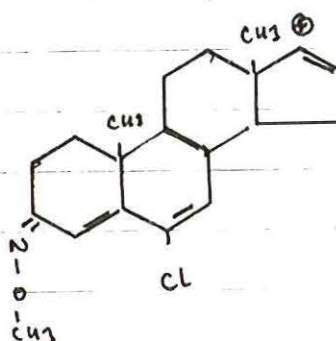
$m/z \ 373$

$- \text{CH}_3$



$m/z \ 358$

$- \text{C}(=\text{O})^+$



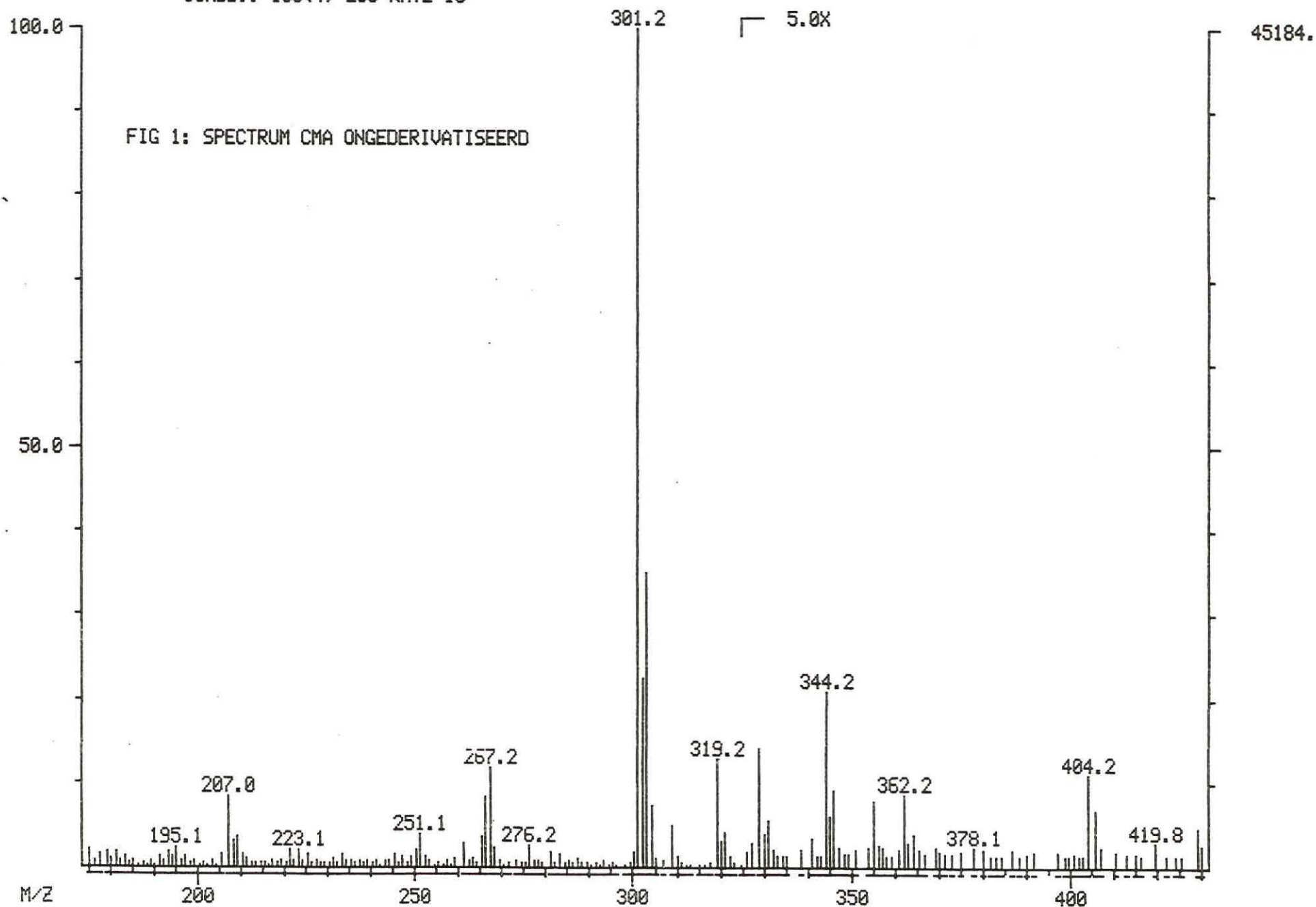
$m/z \ 310$

$- \text{Cl}$

MASS SPECTRUM
04/14/89 15:28:00 + 19:42
SAMPLE: ST CMA ONGEDERIVATISEERD
CONDS.: 130(4)-260 RATE 10

DATA: CMA #1 7
CALI: WT1 #2

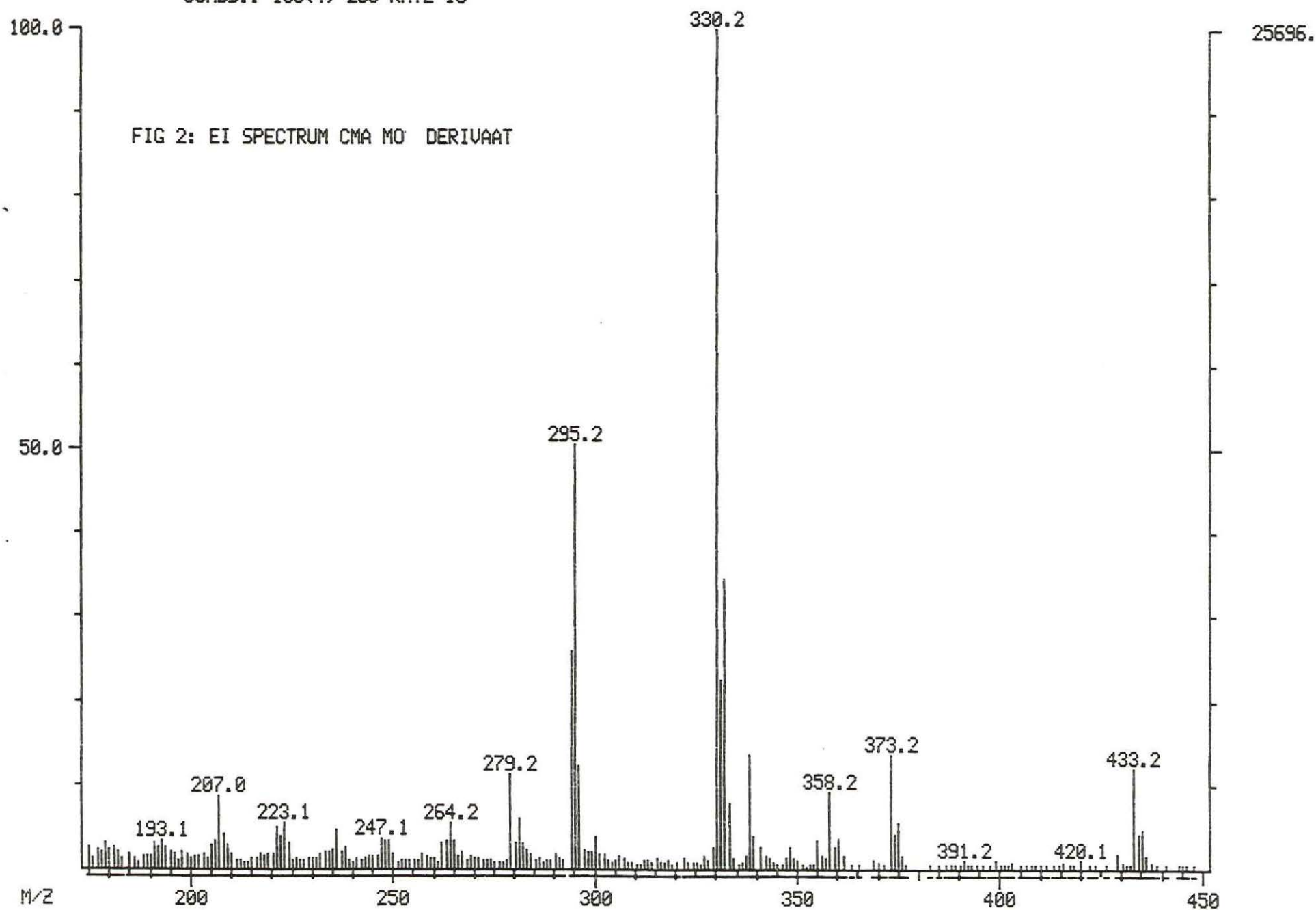
BASE M/Z: 301
RIC: 216064.



MASS SPECTRUM
04/14/89 16:00:00 + 19:51
SAMPLE: STANDAARD CMA MO.
CONDS.: 130(4)-260 RATE 10

DATA: CMAMOX 1489
CALI: WT1 #2

BASE M/Z: 330
RIC: 242944.



MID MASS SPECTRUM
04/20/89 8:32:00 + 9:17
SAMPLE: ST CMA IONISATIE CI MET CH4
CONDS.: 80(4)-20-280

DATA: CMACI #742
CALI: WT1 #2

BASE M/Z: 344
RIC: 323072.

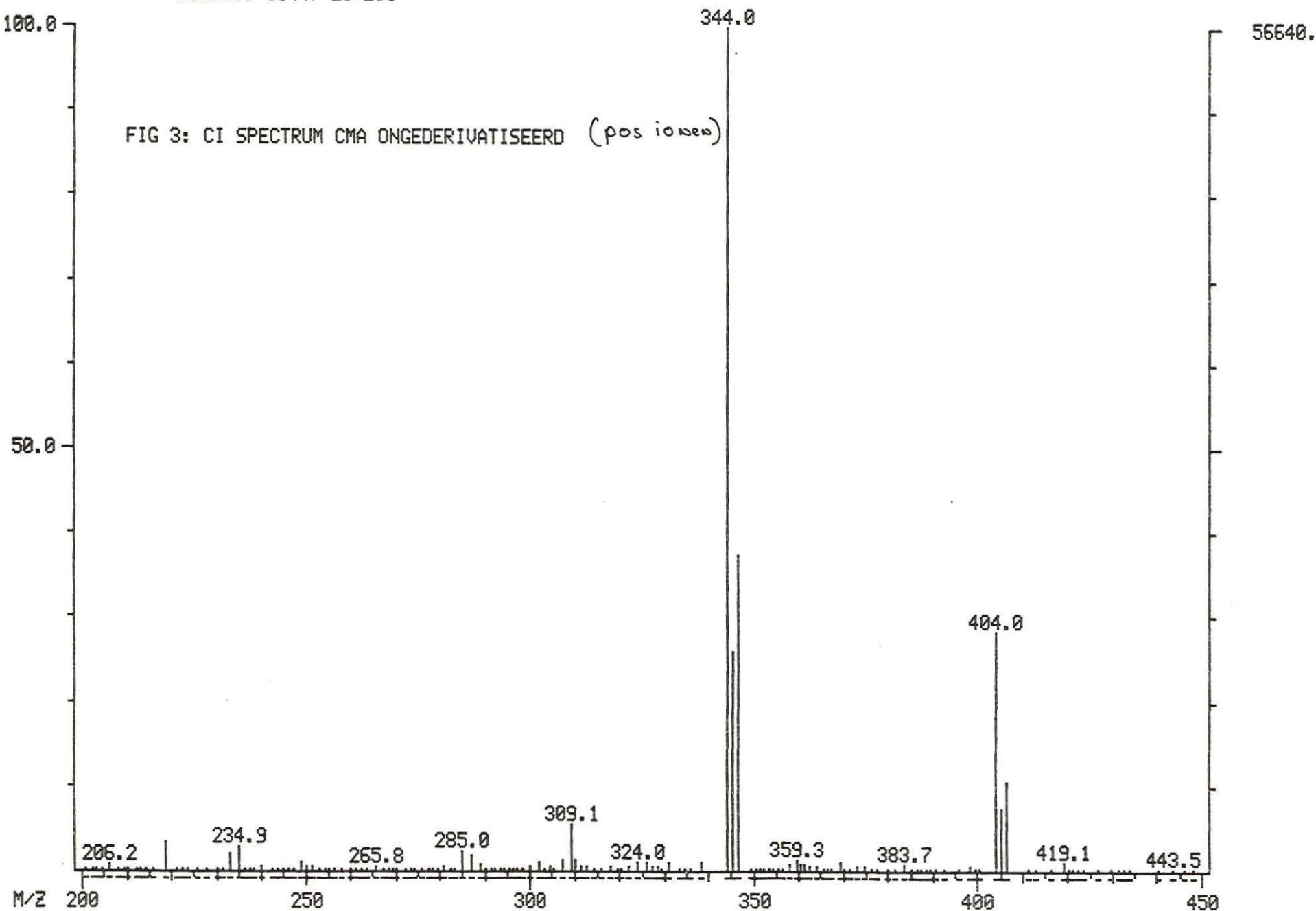


Fig 4: Analyse chloormadinon-acetaat-mo derivaat) conc. 2ng/ul
in "Multiple Ion Detection"

Name Info: ST CHLOORMADINONACETAAT MO. DER. 2 NG/UL MID

Misc Info:

Operator : WAT

Date : 3 May 89 2:18 pm

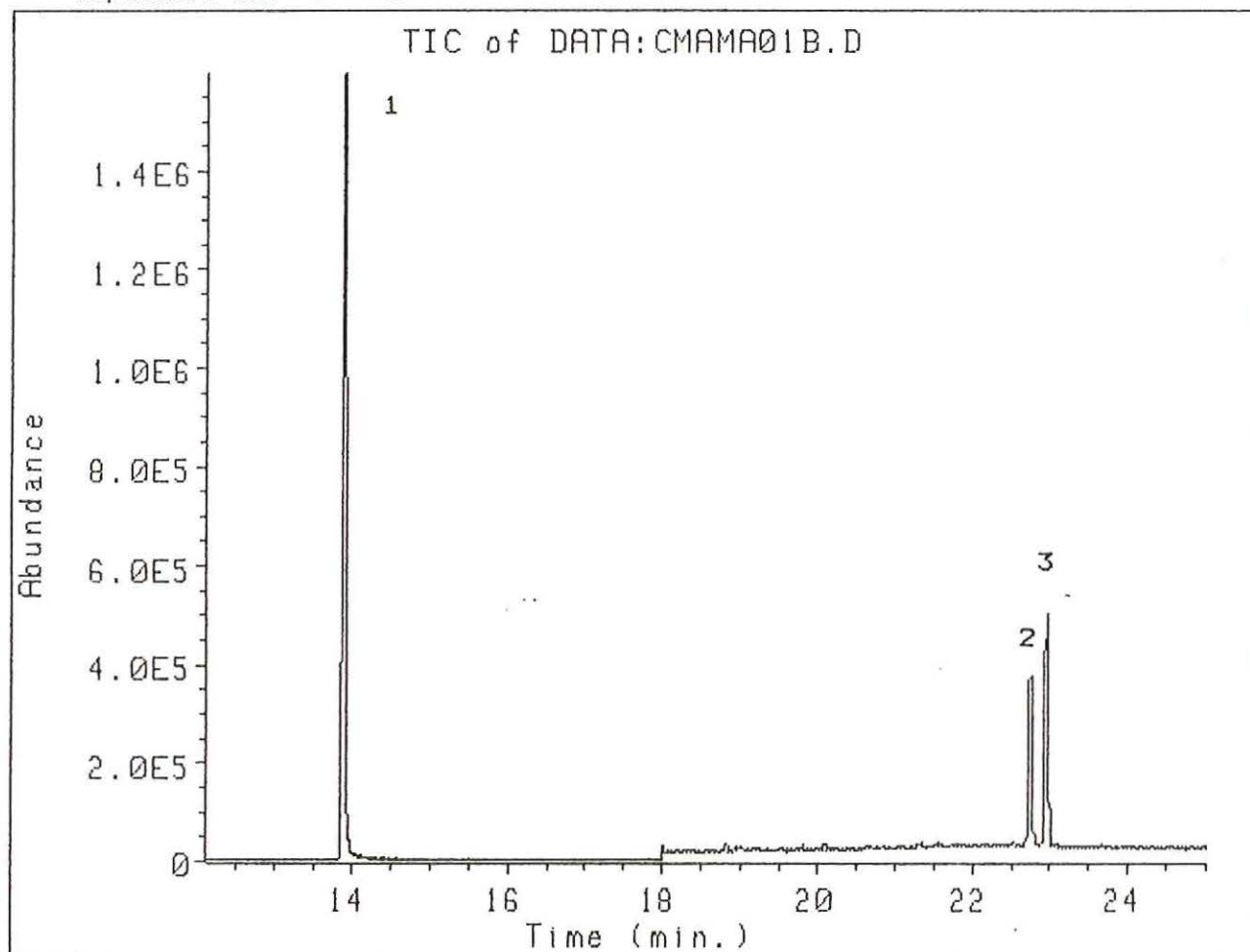
Instrument: MS_5970

Inlet : GC

Sequence index : 1

Als bottle num : 1

Replicate num : 2



1 = PCB 138 (i.s)

2 = Chloormadinon-acetaat-mo derivaat (comp. 1)

3 = Chloormadinon-acetaat-mo derivaat (comp. 2)