

projectnr. 512.0000

Ontwikkeling van bevestigingsstrategieën voor residuen van legaal en illegaal toegepaste
therapeutica met behulp van massaspectrometrie.

projectleider: drs.J.A.van Rhijn

Rapport 94.29

september 1994

GC-MS bepaling van β -agonisten met behulp van gelijktijdige bepaling van twee
verschillende derivaten

drs.J.A.van Rhijn, H.H. Heskamp

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telefax 08370-17717

Copyright 1994, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (2x)

public relations en secretariaat (2x)

bibliotheek (3x)

leesplanken

J. de Jong

A. Roos

W. Traag

T. Zuidema

R. Schilt

M. Essers

Y. Duprè

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

ABSTRACT

GC-MS bepaling van β -agonisten met behulp van gelijktijdige bepaling van twee verschillende derivaten.

GC-MS analysis of β -agonists by simultaneous determination of two different derivatives (in Dutch)

Report 94.29

September 1994

drs.J.A.van Rhijn, H.H. Heskamp

DLO Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

11 pages, 8 references, 7 annexes

To meet the requirements of the European Community for confirmatory analysis of clenbuterol and related compounds using low-resolution mass spectrometry, usually two different techniques (EI and CI) have to be applied to confirm its presence in extracts of urine. This report describes the application of two different derivatives and the simultaneous analysis of these two different derivatives in one gas chromatographic-mass spectrometric analysis. With the described technique EC requirements can more easily be met in one analysis run. Data on linearity, repeatability and equivalence of the combined technique to separate determinations are presented as well as results of the analysis of a number of urine samples.

Keywords: GC-MS, β -agonists, TMS, tBDMS, urine

INHOUD	p.
1 INLEIDING	1
2 MATERIAAL EN METHODEN	
2.1 Chemicaliën	1
2.2 Derivatiseringsprocedures	2
2.3 Werkoplossingen	2
2.4 GC-MS analyse	3
3 ONDERZOEK	
3.1 Lineariteit van het tBDMS-derivaat	4
3.2 Lineariteit en gevoeligheid van de gecombineerde TMS/tBDMS bepaling	4
3.3 Herhaalbaarheid	5
3.4 Analyse van urine-extracten	5
3.5 Analyse van QA monsters	5
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE	
4.1 Lineariteit van het tBDMS-derivaat	6
4.2 Lineariteit en gevoeligheid van de gecombineerde TMS/tBDMS bepaling	6
4.3 Herhaalbaarheid	7
4.4 Analyse van urine-extracten	8
4.5 Analyse van QA monsters	9
4.6 EG criteria	10
5 CONCLUSIES	12
LITERATUUR	13
5 figuren	
2 bijlagen	

1 INLEIDING

Volgens EG-richtlijnen dient de bevestiging van de identiteit van een analyt met GC-MS bij voorkeur op vier karakteristieke ionen gebaseerd te zijn [1]. Voor de bevestiging van β -agonisten wordt het analyt omgezet in een vluchtiger verbinding, veelal het trimethylsilyl(TMS)-derivaat, waarna analyse van dit derivaat plaatsvindt met behulp van GC-MS. De Electron Impact (EI) spectra van het TMS-derivaat van β -agonisten bevatten echter in het algemeen slechts weinig karakteristieke fragmenten die geschikt zijn voor confirmatiedoeleinden. Hetzelfde geldt voor het chemische ionisatie(CI)-spectrum en het is dan ook gebleken dat voor de bevestiging van β -agonisten conform EG-criteria deze beide ionisatietechnieken elk afzonderlijk niet in alle gevallen voldoen. Een mogelijk alternatief is toepassing van beide technieken naast elkaar voor het verkrijgen van in totaal vier karakteristieke ionen. Het is echter evident dat hiervoor twee verschillende analyses moeten worden uitgevoerd hetgeen een aanzienlijke stijging van de totale analysetijd en analysekosten tot gevolg heeft.

Een ander alternatief, passend binnen de EG-richtlijnen, zou het toepassen van een tweede derivaat zijn.

Dit rapport beschrijft de toepassing van twee verschillende derivaten voor de confirmatie van de aanwezigheid van β -agonisten in urine-extracten. De twee derivaten zijn het TMS-derivaat zoals dat ook wordt toegepast voor de gecombineerde EI- en CI-meting, het tweede derivaat is het t-butyl(dimethyl)silyl(tBDMS)-derivaat. Dit derivaat heeft bovendien als voordeel boven het TMS-derivaat dat het veel minder gevoelig is voor hydrolyse [2]. Beide derivaten worden in één meetoplossing gebracht en in dezelfde analysegang geanalyseerd.

Voor de beschreven procedure zijn lineariteit en herhaalbaarheid onderzocht. Tevens is aandacht besteed aan de mate van overeenkomst tussen de analyseresultaten die verkregen worden met behulp van de twee derivaten enerzijds en de analyseresultaten die verkregen worden met afzonderlijke EI- en CI-bepalingen anderzijds. Daarnaast wordt de bewijskracht van de voorgestelde procedure in het licht van de EG-criteria bediscussieerd.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Chemicaliën

Alle gebruikte chemicaliën zijn van pro analyse kwaliteit en de oplosmiddelen werden bovendien voor gebruik gedroogd op natriumsulfaat. Clenbuterol werd betrokken van Sigma, clenbuterol-d6 en salbutamol-d6 en mapenterol zijn "custom made substances". Mabuterol is een gift van Boehringer-Ingelheim, Cimaterol is een gift van dr G.Kristiansen, Danish Meat Research Institute, Roskilde en broombuterol is een gift van dr L.van Ginke, RIVM.

De gebruikte oplossingen, reagentia en stockoplossingen zijn beschreven in RSV A0663 [3].

2.2 Derivatiseringsprocedures

Derivatiseringen werden uitgevoerd met BSTFA (Pierce 38830) waarmee het 1-TMS-derivaat wordt verkregen en met MTBSTFA (Pierce 48920) waarmee het 1-tBDMS-derivaat wordt verkregen. Beide derivatiseringsreacties worden uitgevoerd bij 60°C gedurende resp. 40 en 60 minuten zoals beschreven in RSV A0663 [3].

2.3 Werkoplossingen

In essentie wordt in de beschreven experimenten gewerkt met twee verschillende typen meetoplossingen; enerzijds oplossingen waarin van elk analyt slechts één derivaat aanwezig is (TMS of tBDMS) en anderzijds oplossingen waarin beide derivaten aanwezig zijn in gelijke hoeveelheden. Meetoplossingen die slechts één derivaat bevatten worden bereid door na voltooiing van de derivatiseringsreactie het derivatiseringsreagens af te dampen en het residu op te nemen in een oplossing van 5 ng/ μ l PCB138 in toluen. Het eindvolume bedraagt 20 μ l voor monsterextracten en 40 μ l voor standaarden.

Meetoplossingen die beide derivaten bevatten worden bereid door het extract dan wel de standaard te splitsen in gelijke delen en de delen met verschillende reagentia te behandelen. Na voltooiing van de derivatiseringsreacties worden de reagentia afgedampt en de residuen worden beide opgenomen in ethylacetaat. De corresponderende oplossingen worden gecombineerd tot een oplossing die beide derivaten bevat. Vervolgens wordt de ethylacetaat afgedampt en het residu wordt opgenomen in de reeds genoemde volumina PCB-oplossing in toluen. Deze laatste procedure is schematisch weergegeven in figuur 1.

2.4 GC-MS analyse

De resultaten zijn grotendeels verkregen met een HP-MSD 5971A massaspectrometer gebruikt in chemische ionisatiemode met ammonia als reagensgas. Met name een deel van de resultaten van het oriënterend onderzoek zijn verkregen met behulp van een Finnigan ITS40 in chemische ionisatie mode met isobutaan als reactiegas. Data-acquisitie vond plaats in multiple ion detection (MID) mode, de diagnostische ionen worden genoemd in bijlage 2. Kwantificering vond plaats m.b.v. een ijkcurve waarbij een isotoopverdunding werd gebruikt met clenbuterol-d6 als interne standaard. Voor salbutamol werd gebruik gemaakt van salbutamol-d6 als interne standaard. Voor de overige componenten werd gebruik gemaakt van clenbuterol-d6 als interne standaard.

3 ONDERZOEK

In eerste instantie heeft het onderzoek zich gericht op clenbuterol. Daarnaast zijn met name door analyse van de QA monsters die in elke serie worden meegenomen, data verzameld omtrent de mogelijkheden die toepassing van twee derivaten voor de overige β -agonisten biedt. Om die reden wordt ook in dit rapport in detail ingegaan op de experimenten die uitgevoerd werden met clenbuterol als testcomponent. De rapportage voor de overige β -agonisten beperkt zich tot de analytische omstandigheden en de resultaten behaald voor het QA monster waaraan 3 ng/ml van alle analyten is toegevoegd.

3.1 Lineariteit van het tBDMS-derivaat bij GC-MS analyse

Voor het tBDMS-derivaat werd de lineariteit bij GC-MS analyse onderzocht door een ijkreeks bestaande uit oplossingen met een concentratie van 0,1 , 0,2 , 0,5 , 1,0 en 2,0 ng/ μ l clenbuterol te analyseren. Al deze oplossingen bevatten tevens clenbuterol-d6 als interne standaard in een concentratie van 0,75 ng/ μ l. Deze ijkreeks werd op twee verschillende wijzen bereid; enerzijds (ijklijn 1) door reeds verdunde oplossingen van clenbuterol elk afzonderlijk te derivatiseren met MTBSTFA zoals beschreven in paragraaf 2.2 , anderzijds (ijklijn 2) door reeds gederivatiseerde stockoplossingen van clenbuterol en clenbuterol-d6 te verdunnen tot de genoemde concentraties. Het doel van dit experiment is ten eerste het vaststellen van het bestaan van een lineair verband tussen de respons en de clenbuterolconcentratie bij gebruik van het tBDMS-derivaat. Ten tweede kunnen uit vergelijking van ijklijn 1 en ijklijn 2 wellicht conclusies getrokken worden over de derivatiseringsefficiency voor MTBSTFA op verschillende concentratieniveaus. De resultaten van dit experiment worden bediscussieerd in paragraaf 4.1.

3.2 Lineariteit en gevoeligheid van de gecombineerde TMS/tBDMS bepaling

Voor de gecombineerde TMS/tBDMS bepaling werd de lineariteit onderzocht, tevens werd de gevoeligheid van de bepaling van clenbuterol met tBDMS vergeleken met de gevoeligheid van de bepaling van clenbuterol met TMS. Daartoe werden twee sets van ijkoplossingen bereid die resp. 0,1 , 0,2 , 0,5 , 1,0 en 2,0 ng/ μ l van elk derivaat bevatten. Daarnaast bevatten deze oplossingen elk 0,75 ng/ μ l van de interne standaarden clenbuterol-d6 en salbutamol-d6. Deze oplossingen werden na verdunning gederivatiseerd met resp BSTFA en MTBSTFA. Na derivatisering werden de corresponderende oplossingen gecombineerd zoals beschreven in paragraaf 2.3. De resultaten van dit experiment zijn beschreven in paragraaf 4.2.

3.3 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

De herhaalbaarheid werd bepaald voor de tBDMS-derivaten afzonderlijk en voor de mix van TMS- en tBDMS-derivaten. Voor de TMS-derivaten afzonderlijk was de herhaalbaarheid reeds eerder bepaald [4]. Standaarden van 0,2 ng/ μ l en 1,0 ng/ μ l werden daartoe elk in tienvoud gederivatiiseerd en geanalyseerd.

De resultaten van dit experiment worden besproken in paragraaf 4.3

De resultaten die behaald werden door analyse van de QA monsters die in elke serie worden meegenomen, geven een beeld van de reproduceerbaarheid van de methode. De resultaten hiervan worden weergegeven in paragraaf 4.5.

3.4 Analyse van urine-extracten

Aansluitend op de bepaling van de gevoeligheid, lineariteit en de herhaalbaarheid van de methode is een aantal extracten van urinemonsters met gebruikmaking van deze methode onderzocht op hun clenbuterolgehalte.

De urine-extracten verkregen volgens de procedure beschreven in RSV A622 werden gesplitst en drooggedampt onder N_2 bij 60°C. Aan het ene deelmonster werd MTBSTFA-derivatiseringsreagens toegevoegd, aan het andere deelmonster werd BSTFA-derivatiseringsreagens toegevoegd. Na afloop werden de extracten drooggedampt en met behulp van ethylacetaat samengevoegd zoals beschreven in paragraaf 2.3. De resultaten zijn weergegeven in tabel 4 en worden besproken in paragraaf 4.4.

3.5 Analyse van QA monsters

Bij elke serie monsters worden tenminste twee QA monsters meegenomen. Met name uit de analyseresultaten voor deze QA monsters blijkt de toepasbaarheid van de methode voor andere β -agonisten dan clenbuterol en tevens blijkt de lange-termijn performance van de methode.

Een QA monster bestaat uit een blanco urine waarin de afwezigheid van de analyten is bewezen door GC-MS analyse. Aan 5 ml aliquots van deze urine wordt van elke analyt 15 ng toegevoegd, hetgeen overeenkomt met een spike niveau van 3 ng/ml voor elke analyt. Vervolgens worden deze oplossingen als een gewoon monster behandeld. Het betreft hier dus in vèrgaande mate onafhankelijk van elkaar bereide QA monsters en de resultaten die hiermee worden verkregen geven een redelijk beeld van de reproduceerbaarheid van de totale analysegang, d.w.z. toevoeging van de spike, extractie, clean-up en GC-MS meting.

De resultaten van de analyse van een groot aantal QA monsters worden besproken in paragraaf 4.5.

4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1 Lineariteit van het tBDMS-derivaat bij GC-MS analyse

In tabel 1 worden de resultaten weergegeven voor zowel de ijkreeks voor clenbuterol welke verdund werd vóór derivatisering (ijklijn 1) als voor de ijkreeks welke werd samengesteld uit reeds gederivatiseerde stockoplossingen (ijklijn 2).

Zoals verwacht mocht worden blijkt er een goed lineair verband te bestaan tussen de respons en de clenbuterolconcentratie bij gebruik van het tBDMS-derivaat. Dit geldt voor beide ijklijnen en daaruit kan geconcludeerd worden dat, in tegenstelling tot de verwachting, de derivatiseringsprocedure geen duidelijke bijdrage levert aan de spreiding van het analyseresultaat. Dit is een duidelijke aanwijzing dat de reproduceerbaarheid van de MTBSTFA-derivatisering bij zowel hoge als lage concentraties, goed is.

De ijkcurven corresponderend met de gegevens in tabel 1 zijn weergegeven in figuur 2.

Tabel 1: ijklijnen 1 en 2 voor clenbuterol tBDMS-derivaat.

Ijklijn	Gem. RRF	Std. afw.	Var. coëff. (%)	Lin.regressie $Y = aX + b$		Corr.coëff.
				a	b	
Ijklijn 1	2,16	0,19	9,07	1,913	0,095	0,9978
Ijklijn 2	2,11	0,22	10,6	2,105	0,016	0,9974

RRF= relatieve responsfactor

4.2 Lineariteit en gevoeligheid van de gecombineerde TMS/tBDMS bepaling

In tabel 2 zijn voor clenbuterol de resultaten weergegeven van de analyse van ijkoplossingen die beide derivaten in gelijke hoeveelheden bevatten. De verschillende concentraties in de ijkoplossingen bedroegen resp. 0,1 , 0,2 , 0,5 , 1,0 en 2,0 ng/ μ l. Voor de lineariteit worden resultaten behaald die vergelijkbaar zijn met hetgeen in paragraaf 4.1 is beschreven.

Uit de resultaten blijkt dat de gevoeligheid voor beide derivaten eveneens vergelijkbaar is; de helling van de ijklijn is een maat voor de gevoeligheid en deze bedraagt 2,08 en 2,11 voor resp het TMS- en het tBDMS-derivaat. De bepalingsgrens voor het tBDMS-derivaat is over het algemeen iets lager (ca een factor 2) dan voor het TMS-derivaat omdat de signaal/ruis-verhouding voor de diagnostische ionen m/z 391 en m/z 393 beter is. Dit geldt zowel voor standaardoplossingen als

voor urine-extracten. Desondanks zijn voor bevestiging beide derivaten van belang zodat de bepalingsgrens in feite gelijk is aan de bepalingsgrens van het meest ongunstige derivaat.

Wanneer de methode wordt toegepast op urine-extracten moet het urine-extract gesplitst worden in twee gelijke delen en dientengevolge is de bepalingsgrens in urine-extracten tenminste een factor twee hoger dan uit experimenten met standaarden berekend wordt. De bepalingsgrens voor het TMS-derivaat van clenbuterol bedraagt onder deze omstandigheden ca 0,2 ng/ml in de urine waarbij uitgegaan wordt van een signaal/ruis-verhouding van tenminste 10 benodigd voor confirmatie. De bepalingsgrens voor de overige componenten varieert van 0,2 ng/ml voor salbutamol, tot 0.4 ng/ml voor cimaterol, terbutaline en mabuterol.

In het algemeen blijkt uit de resultaten dat de procedure die gevolgd moet worden om de beide derivaten in één meetoplossing te brengen, geen afbreuk doet aan de performance van de methode.

De ijkcurven corresponderend met de gegevens in tabel 2 zijn weergegeven in figuur 3.

Tabel 2: IJklijnen voor de mix clenbuterol TMS- en tBDMS-derivaten.

Derivaat	Gem. RRF	Std. afw.	Var. coëff. (%)	Lin.regressie $Y = aX + b$		Corr.coëff.
				a	b	
TMS	2,08	0,06	2,91	2,027	0,022	0,9997
tBDMS	2,11	0,20	9,42	1,977	0,018	0,9987

RRF = relatieve responsfactor

4.3 Herhaalbaarheid

In tabel 3 worden voor clenbuterol de resultaten van het herhaalbaarheidsexperiment weergegeven zoals die verkregen zijn met standaardoplossingen van twee verschillende concentraties te weten 0,2 en 1,0 ng/ μ l. Er is gekozen om uitsluitend met standaardoplossingen te werken omdat daarmee de herhaalbaarheid van uitsluitend de detectiemethode vastgesteld kan worden. De reproduceerbaarheid van de gehele procedure wordt beoordeeld aan de hand van de analyse van QA monsters (§§ 3.5 en 4.5).

Zowel meetoplossingen die beide derivaten bevatten als meetoplossingen die alleen het tBDMS-derivaat bevatten zijn geanalyseerd. Ter vergelijking zijn tevens de resultaten opgenomen van een herhaalbaarheidsexperiment met alleen het TMS-derivaat zoals dat reeds eerder werd uitgevoerd [4].

Tabel 3: Herhaalbaarheid voor TMS/tBDMS-derivaten van clenbuterol.

Derivaat	std. 0,2 ng/ul			std. 1,0 ng/ul		
	X gem.	Std.afw.	Var.coëff. %	X gem.	Std.afw.	Var.coëff. %
tBDMS	0,18	0,01	8,13	0,97	0,05	5,52
tBDMS mix	0,18	0,01	9,33	0,96	0,05	5,85
TMS	0,19	0,01	5,37	1,00	0,06	5,74
TMS mix	0,19	0,02	10,6	1,04	0,08	7,98

Uit vergelijking van de resultaten in tabel 3 blijkt dat het mengen van de derivaten geen aantoonbare invloed heeft op de herhaalbaarheid op de onderzochte niveaus. De variatiecoëfficiënten bedragen 8 tot 10% voor de standaard van 0,2 ng/ μ l en 5 tot 8% voor de standaard van 1,0 ng/ μ l. Een uitzondering daarop wordt gevormd door de gegevens die overgenomen zijn uit eerder onderzoek; hiervoor wordt een lagere variatiecoëfficiënt bepaald voor de 0,2 ng/ μ l standaard.

De vergelijking van de gegevens verkregen uit de gemengde derivaatoplossingen en de oplossingen die alleen het tBDMS-derivaat bevatten, geeft aan dat in beide gevallen een vergelijkbare spreiding wordt gevonden, m.a.w. dat combinatie van de derivaten niet leidt tot een grotere spreiding.

4.4 Analyse van urine-extracten

Met de beschreven procedure zijn een groot aantal praktijkmonsters geanalyseerd. Deze monsters werden voorafgaand aan de analyse, volgens RSV A622 [5] gezuiverd. Een zeer groot deel van de voor GC-MS bevestiging aangeboden monsters bevatte clenbuterol en de rapportage is dan ook sterk gericht op deze component.

Een representatief chromatogram verkregen door toepassing van de twee derivaten is weergegeven in figuur 4.

De resultaten zijn weergegeven in correlatiegrafieken in figuur 5 a-b. Tevens zijn de resultaten waaruit deze grafieken zijn samengesteld in tabelvorm weergegeven in bijlage 1.

Een deel van deze monsters was reeds op de gebruikelijke wijze met EI en CI geanalyseerd. De correlatie tussen de resultaten uit EI-meting enerzijds en CI-meting anderzijds (figuur 5a) is over het algemeen goed te noemen. Voor enkele monsters worden afwijkingen tussen EI en CI gevonden. Daarbij moet worden opgemerkt dat een verschil van een factor twee of meer leidt tot heranalyse en verwerping van het eerste resultaat. In die zin geeft de gepresenteerde dataset dan

ook een enigszins geflatteerd beeld. Overigens komt een dergelijk afwijking zelden voor. De resultaten behaald met de gecombineerde bepaling van het TMS- en tBDMS-derivaat zijn weergegeven in figuur 5b. Deze dataset is eveneens ontdaan van de grootste afwijkingen (d.w.z. een verschil van een factor 2 of meer) en geeft dus een beeld dat vergelijkbaar is met figuur 5a. Ook hier is de correlatie tussen beide gehalten goed, al moet daarbij direct worden opgemerkt dat uit figuur 5b blijkt dat het tBDMS-derivaat een enigszins hoger gehalte geeft dan het TMS-derivaat. In de beoordeling van de mate van vergelijkbaarheid van de verschillende procedures, is het van belang te constateren dat de resultaten die verkregen worden met het TMS- en tBDMS-derivaat zowel goed met elkaar overeenstemmen als met de resultaten die verkregen worden met de EI/CI-metingen. Toepassing van de TMS/tBDMS-procedure zou in geen van de onderzochte monsters leiden tot een andere uitspraak dan die welke verkregen wordt door toepassing van de EI/CI-metingen.

4.5 Analyse van QA monsters

In tabel 4 worden de resultaten weergegeven van 68 onafhankelijke QA monsters, allen met toevoeging van de analyten op een niveau van 3 ng/ml. De gepresenteerde data hebben betrekking op de reproduceerbaarheid van de methode.

Het blijkt dat voor clenbuterol en salbutamol, waarvoor isotoopverdunding wordt toegepast,

Tabel 4 Gemiddelde resultaten voor de analyse van β -agonisten in een QA monster waaraan 3 ng/ml per component is toegevoegd.

Component	TMS derivaat		tBDMS derivaat	
	Gemiddelde (ng/ml)	VC (%)	Gemiddelde (ng/ml)	VC (%)
Clenbuterol	3,1	17	3,2	13
Salbutamol	3,0	15	3,3	18
Cimaterol	3,0	24	3,2	20
Terbutaline	2,9	33	3,1	27
Mabuterol	3,1	30	2,8	27
Mapenterol	3,1	26	2,9	22

nauwkeurige en reproduceerbare gehaltebepaling mogelijk is. Voor de overige componenten wordt clenbuterol-d6 gebruikt als interne standaard. Mede daardoor moet een hogere variabiliteit geaccepteerd worden. Uit de gepresenteerde data blijkt inderdaad een grotere spreiding dan voor clenbuterol en salbutamol, echter nog steeds redelijk voor analyses op residu-niveau [8]. Het gemiddelde gehalte bepaald uit alle waarnemingen komt echter goed overeen met de toegevoegde hoeveelheid.

4.6 EG-criteria

In richtlijn 93/256/EEG [1] worden de criteria weergegeven waaraan bevestigingsonderzoek van o.a. β -agonisten moet voldoen. Daarin wordt aangegeven dat bevestigingsmethoden "...volledige of aanvullende informatie leveren voor de ondubbelzinnige identificatie van de analyt..."(art 1.1.1). Voor lage-resolutie-massaspectrometrische bevestigingsmethoden wordt vervolgens aangegeven dat "...de intensiteiten van bij voorkeur tenminste vier diagnostische ionen..." moeten worden gemeten. Daarnaast bestaat de mogelijkheid dit te bereiken door gebruik te maken van "...de resultaten van tenminste twee onafhankelijke GC-LRMS-methoden met verschillende derivaten en/of ionisatietechnieken, die telkens twee of drie diagnostische ionen produceren. Het moleculaire ion is bij voorkeur een van de vier gekozen diagnostische ionen." (art 2.4.4.2).

De beschreven methode voldoet voor een aantal componenten te weten, clenbuterol, mabuterol, mapenterol en broombuterol aan deze voorwaarden, dat wil zeggen dat gebruik gemaakt wordt van twee verschillende derivaten waarbij elk derivaat tenminste twee diagnostische ionen produceert. Bovendien wordt van beide derivaten het moleculaire ion gemeten. Hierbij moet wel een kanttekening gemaakt worden; van beide derivaten wordt weliswaar het moleculaire ion gemeten maar ook diens ^{37}Cl -isotoop. In feite wordt daarmee tweemaal het bestaan van het chloorcluster bevestigd. Wanneer dit zou worden uitgevoerd voor één enkele verbinding dan zou voor die verbinding tweemaal dezelfde eigenschap worden aangetoond en daarmee zou de bewijskracht van het geheel niet toenemen door meting van het tweede chloorcluster.

In dit geval wordt de meting echter uitgevoerd op twee verschillende gaschromatografisch gescheiden componenten en daarmee wordt, althans gedeeltelijk, de verwantschap tussen deze beide componenten aangetoond. Aangezien de hypothese is dat beide analyten derivaten van clenbuterol zijn, heeft het aantonen van die verwantschap betekenis voor het vaststellen van de identiteit. Daarnaast geeft de aanwezigheid van beide derivaten en het bestaan van een vaste relatie tussen de retentietijden van beide derivaten een goede indicatie voor de identiteit van het analyt. Bovendien geeft het massaverschil het bewijs dat beide signalen afkomstig zijn van één verbinding die tot de beide derivaten is omgezet.

Concluderend kan gesteld worden dat de optelsom van de genoemde parameters tezamen met de gebruikelijke meting van de ionintensiteiten met de daarbij getolereerde spreiding en de in de screeningsprocedure aangetoonde β -agonist-activiteit, een ondubbelzinnige identificatie van het analyt mogelijk maakt.

Voor een aantal andere componenten te weten salbutamol, cimaterol en terbutaline, kan niet aan de eis van vier diagnostische ionen worden voldaan. Deze componenten worden met de beschreven methode wél gedetecteerd maar voor confirmatie is aanvullend werk nodig.

5 CONCLUSIE

De beschreven methode heeft blijkens de resultaten van de beschreven experimenten een analytische performance die vergelijkbaar is met de gecombineerde EI/CI-metingen. Van belang is dat de resultaten van beide derivaten goed met elkaar én met de EI/CI-meting correleren.

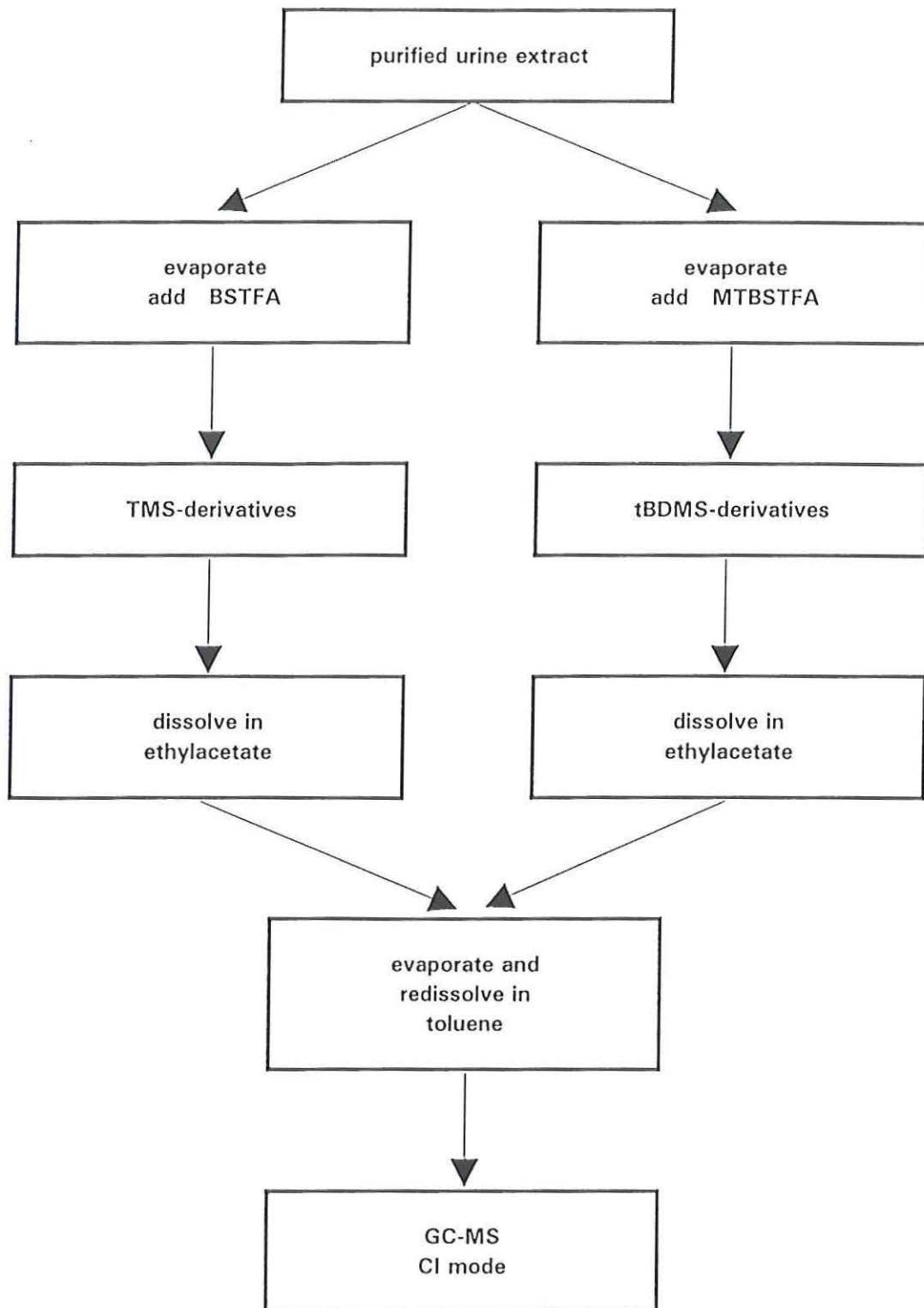
De identificatie van het analyt is gebaseerd op de combinatie van parameters van twee verschillende derivaten. Daarmee kan de identiteit van het analyt ondubbelzinnig worden aangetoond. In die zin voldoet de methode aan de EG-criteria.

De beschreven methode is toepasbaar voor clenbuterol, mabuterol, mapenterol en broombuterol. Voor de overige componenten te weten salbutamol, cimaterol en terbutaline is echter aanvullend werk noodzakelijk.

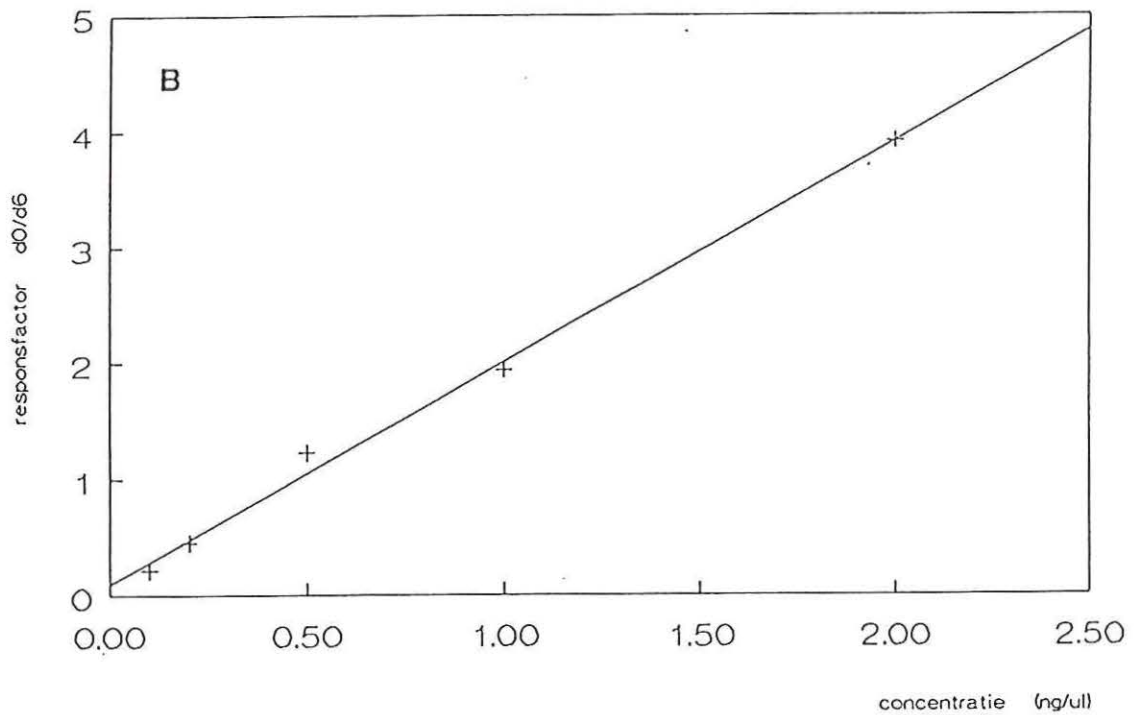
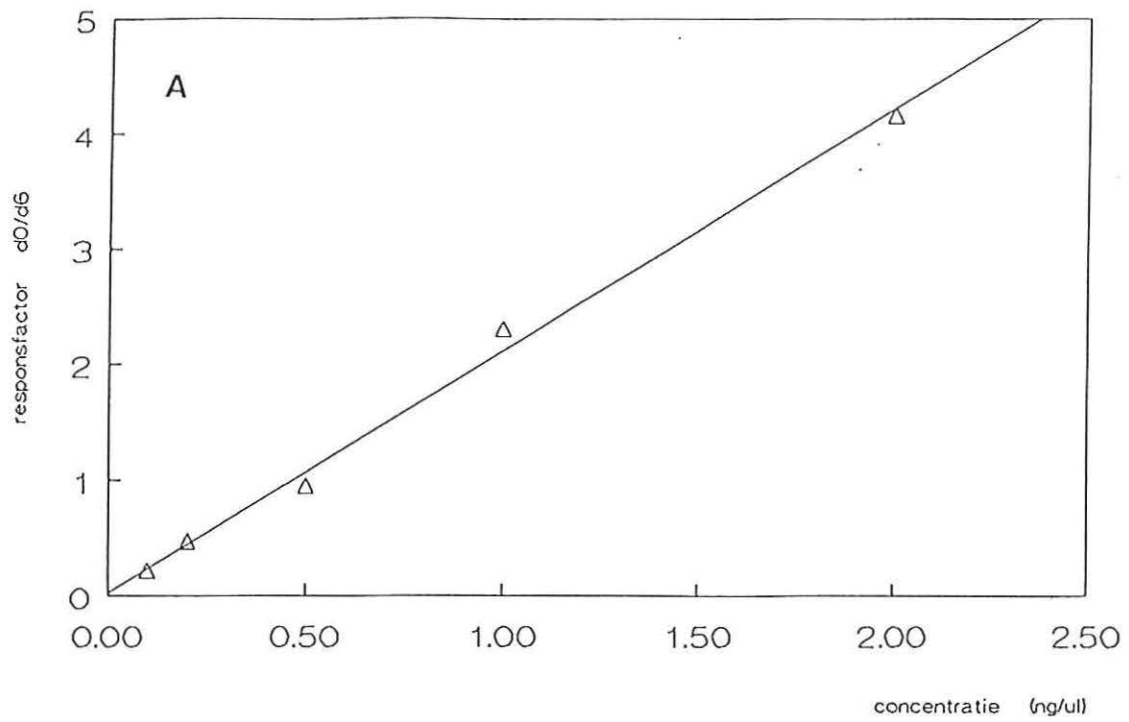
LITERATUUR

- 1 Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen, Richtlijn 93/256/EEG, L118, (1993) p. 64.
- 2 A.C. Bazan and D.R. Knapp, J. Chromatogr., 236 (1982) 201.
- 3 RIKILT standaard voorschrift A0663, Extracten van urine - Bevestiging van clenbuterol met chemische ionisatie GC-MS - gelijktijdige analyse van twee derivaten, 04-02-1994
- 4 H.H. Heskamp en J.A. van Rhijn, GC-MS bepaling van β -agonisten met behulp van de ITS Magnum, RIKILT rapport 93.12.
- 5 RIKILT Standaard voorschrift A0622, Urine - extractie van β -agonisten uit urine met immunoaffiniteitschromatografie en bevestigingsonderzoek met GC-MS (EI), Concept 15-09-1994.
- 6 J.A. van Rhijn, W.A. Traag and H.H. Heskamp, J. Chromatogr., 619 (1993) 243.
- 7 J.A. van Rhijn, H.H. Heskamp, M.L. Essers, H.J. van de Wetering, H.C.H. Kleijnen and A.H. Roos, J.Chromatogr., aangeboden voor publicatie.
- 8 W. Horwitz, L.R. Kamps and K.W. Boyer, J.Assoc.Off.Anal.Chem., 63 (1980) 1344.

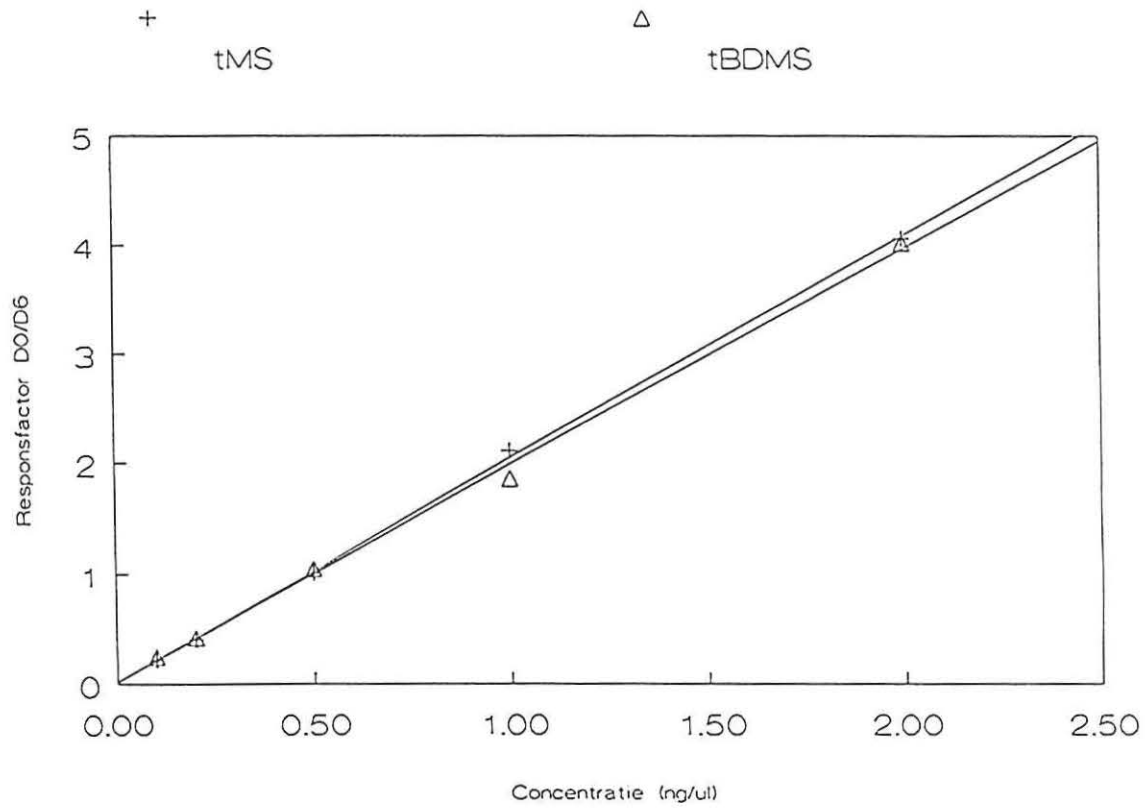
- Figuur 1 Schematische weergave van de gevolgde derivatiseringsprocedure voor het verkrijgen van twee derivaten in één meetoplossing.
- Figuur 2 IJklijnen voor clenbuterol-1-tBDMS bereid door (A) derivatisering van verdunde oplossingen en (B) door verdunning van een reeds gederivatiseerde stockoplossing.
- Figuur 3 IJklijnen voor clenbuterol-1-TMS (+) en clenbuterol-1-tBDMS () verkregen door analyse van beide derivaten in één meetoplossing.
- Figuur 4 Chromatogram van een urine-extract.
- Figuur 5 Correlatie tussen de analyseresultaten voor clenbuterol verkregen door (A) EI- en CI-meting van het TMS-derivaat en (B) CI-meting van het TMS- en tBDMS-derivaat.
- BIJLAGE 1 Analyse resultaten voor clenbuterol in urine verkregen door EI- en CI-meting van het TMS-derivaat en door gelijktijdige meting van het TMS- en tBDMS-derivaat.
- BIJLAGE 2 Analyten en karakteristieke ionen.



Figuur 1 Schematische weergave van de gevolgde derivatiseringsprocedure voor het verkrijgen van twee derivaten in één meetoplossing.

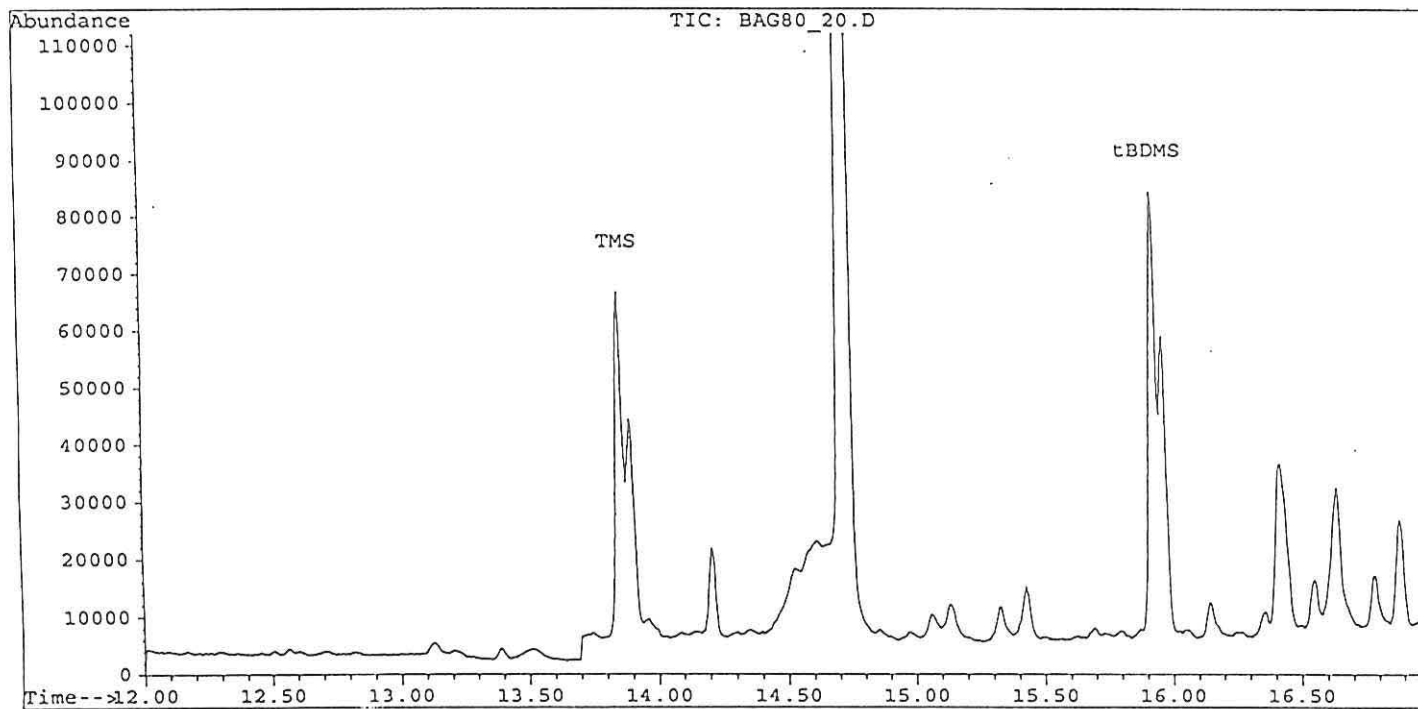


Figuur 2 IJklijnen voor clenbuterol-1-tBDMS bereid door (A) derivatisering van verdunde oplossingen en (B) door verdunning van een reeds gederivatiseerde stockoplossing.

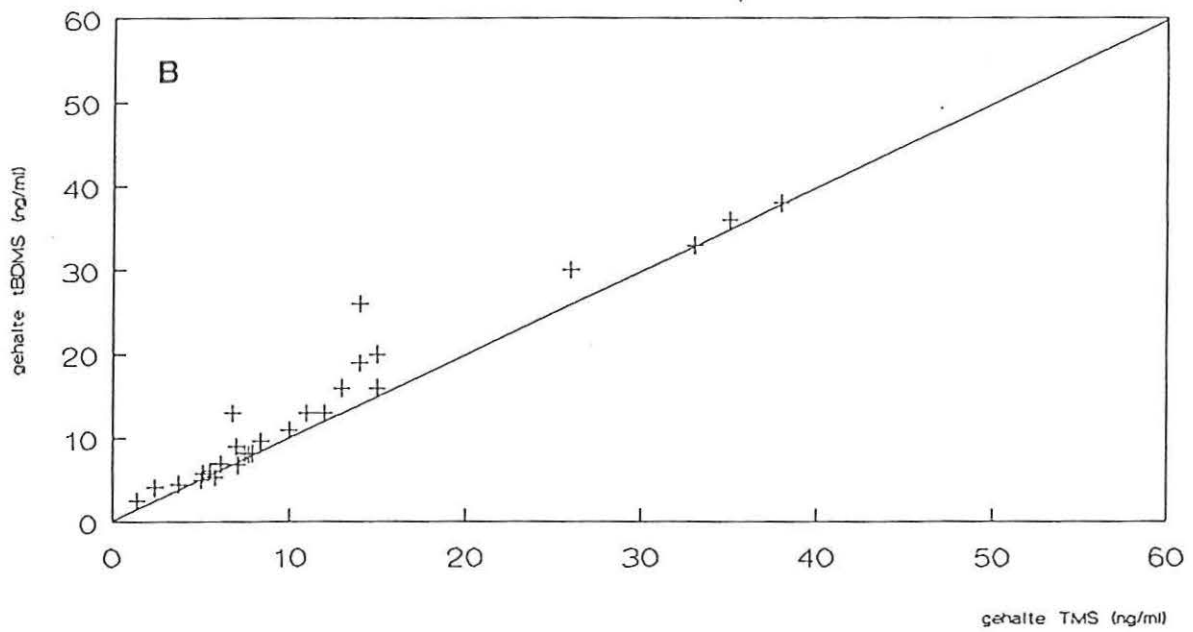
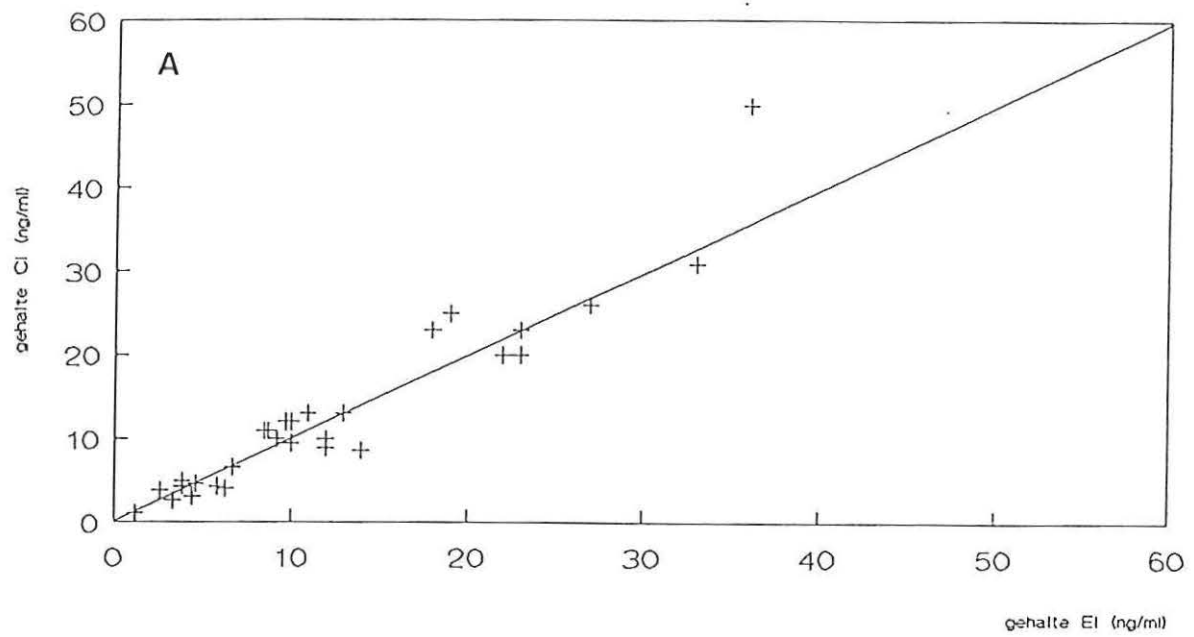


Figuur 3 IJklijnen voor clenbuterol-1-TMS (+) en clenbuterol-1-tBDMS (Δ) verkregen door analyse van beide derivaten in één meetoplossing.

File : C:\HPCHEM\1\DATA\931220\BAG80_20.D
Operator : HH
Acquired : 21 Dec 93 1:31 am using AcqMethod AID2
Instrument : 5971 - In
Sample Name: 23005A
Misc Info :
Vial Number: 20



Figuur 4 Chromatogram van een urine-extract.



Figuur 5 Correlatie tussen de analyseresultaten voor clenbuterol verkregen door (A) EI- en CI-meting van het TMS-derivaat, (B) CI-meting van het TMS- en tBDMS-derivaat,

BIJLAGE 1

Analyse resultaten voor clenbuterol in urine verkregen door EI- en CI-meting van het TMS-derivaat en door gelijktijdige meting van het TMS- en tBDMS-derivaat.

TMS	tBDMS	EI	CI
2.4	1.1		
5.1	7.2		
12	17		
5.6	7.7		
0.2	0.2		
14	16		
2.3	0.2		
43	56		
1.5	2.5		
16	24		
7.6	6.4		
14	8		
30	29		
10	13		
11	14		
6.8	13	11	13
14	26	18	19
7.1	17	12	8.9
17	34	27	26
15	20	23	20
8.4	9.7	12	10
7.9	8.2	10	9.5
7.1	6.8	9.7	12
7	9	8.5	11
7.5	8.2	8.7	11
11	13	18	23
14	19	23	23
10	11	14	8.6
4.3	9.4	10	12
5.1	5.8	5.8	4.3
3.7	4.5	3.8	4.3
2.6	6.5	3.8	4.9
1.4	2.5	2.6	3.8
2.4	4.1	22	20
2	6.4	3.3	2.6
26	36	18	23
0.9	4.6	1.2	1.1
6.7	9.3	22	20
12	13	9.2	10
6.1	6.9	6.7	6.6
38	38	36	50
33	33	19	25
5.5	6.1	4.6	4.6
15	16	13	12.7
7.7	8.1	6.7	6.5
35	36	33	31
5.8	5.3	6.3	4
5	5	4.4	3.1

BIJLAGE 2 Analyten en karakteristieke ionen

Component	Diagnostische ionen	
	TMS derivaat	tBDMS derivaat
Clenbuterol	349, 351	391, 393
Salbutamol	456	582
Cimaterol	292	334
Terbutaline	442	568
Bromobuterol	437, 439, 441	479, 481, 483
Mabuterol	383, 385	425, 427
Mapenterol	397, 399	439, 441

