

Project 505.0070

Ontwikkelen methoden voor het verrichten van identificaties c.q.
confirmaties (W.A. Traag)

Rapport 88.43

Juni 1988

ONDERZOEK NAAR DE TOEPASBAARHEID VAN
DE ITD-MASSASPECTROMETER VOOR HET
ONDERZOEK NAAR ANABOLICA

W.A. Traag en L.G.M.Th. Tuinstra

Afdeling: Organische Contaminanten

Goedgekeurd door: dr F.A. Huf

Rijks-Kwaliteitsonderzoek voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-19110

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

projectleider

afdeling Organische Contaminanten (2x)

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

INHOUD	<u>blz</u>
1 INLEIDING	1
2 MATERIAAL	1
3 METINGEN	2
4 RESULTATEN	2
5 DISCUSSIES	3
6 CONCLUSIE	4

1 INLEIDING

Finnigan introduceerde enkele jaren geleden de Ion Trap detector, een compact apparaat dat met redelijke gevoeligheid in staat was volledige massaspectra te produceren. Dit jaar werd type 800 geïntroduceerd, dat afweek van zijn voorgangers doordat een "automatische gain control" (AGC) ervoor zorgde dat de meettijd aangepast werd aan het aantal geproduceerde ionen in de bron, hetgeen in de praktijk betekent dat het dynamisch bereik van de trap aanzienlijk vergroot wordt, zodat uiteenlopende concentraties aan componenten binnen één monster toch resulteert in bruikbare, reproduceerbare massa spectra.

Een andere belangrijke eigenschap van de ITD is gelegen in het feit dat slechts kleine hoeveelheden materiaal (200 pg) aangeboden behoeven te worden om een volledig spectrum te kunnen produceren, terwijl het meten van slechts enkele fragmenten uit het spectrum hooguit een gevoeligheidswinst van 2 á 3 opleveren in tegenstelling tot de gebruikelijke apparaten waar bij de overgang van volledige scan naar MID een winst van 10-100 makkelijk bereikt wordt.

Kortom ten opzichte van: de Finnigan 4500 en de HP-MSD zou verwacht kunnen worden dat de ITD 800 in de volledige scan mode een vergelijkbare gevoeligheid heeft als de andere twee apparaten in de MID mode. En dat zou interessant zijn, gezien de regelmatig terugkerende vraag, in hoeverre het mogelijk is om in monsterextracten van diverse, (maar bekende) oorsprong algemeen te kunnen screenen op ongewenste componenten. Dit kan niet wanneer in de MID mode gewerkt wordt (immers hier zoekt men naar van tevoren gedefinieerde componenten) maar wel in de volledige scan mode. Het verkregen spectrum kan of via een library search of via een analyse van het spectrum leiden tot de identificatie van een onbekende aanwezige component.

2 MATERIAAL

Testmengsel: TMS derivaten van hexestrol, diethylstilbestrol, diene-strol, estraandiol, estradiol (α,β), nortestosteron (α,β), testosteron (α,β), estron, trenbolon (α,β) zearalanone, zeranol, zearalenone en PCB 138(= 2,3,4 - 2,4,5 hexachlorobiphenyl).

Oplosmiddel: iso-octaan/decaan (4/1 v.v.)
Concentraties 200, 500, 1000, 1500, 2000 pg/ μ l.
allen bevatte 2 ng PCB 138/ μ l.

Experimentele omstandigheden

GC Carlo Erba 5300 Mega

Injectie: on column 1 μ l

Kolom : lengte 10m x 0,25mm, CP Sil 19-CB fused silica kolom, film
dikte 0,2 μ Chrompack the Netherlands.

Draaggas He; 1 ml/min

Temperaturen

kolom : 50 $^{\circ}$ (1 min) $\xrightarrow{40^{\circ}/\text{min}}$ 115 $^{\circ}$ $\xrightarrow{15^{\circ}/\text{min}}$ 200 $^{\circ}$ $\xrightarrow{3^{\circ}/\text{min}}$ 260 $^{\circ}$
interface : 270 $^{\circ}$ C
opensplit : 245 $^{\circ}$ C
exitnozle : 275 $^{\circ}$ C
manifold : 220 $^{\circ}$ C

ITD scan mode: Full scan 60 tot 550 scans/sec.

3 METINGEN

3.1 Met bovengenoemde concentratie reeks werd een lineariteits test
gedraaid van lage naar hoge concentratie.

3.2 Aan de hand van de injecties van de standaard met 1 ng/ μ l werd per
component van de 4 belangrijkste fragmenten de reproduceerbaarheid van
het "MID" spectrum bepaald.

3.3 Aan de hand van de standaard injectie van 10 ng/ μ l werden een aan-
tal spectra vergeleken met spectra van dezelfde componenten zoals ver-
kregen met de Finnigan 4500.

4 RESULTATEN

Figuur 1 is het RIC chromatogram van het 1000 pg/ μ l mengsel. Het is
duidelijk dat sommige componenten niet of nauwelijks gescheiden zijn.
Dit was ook niet te verwachten gezien de lengte van de kolom en
omdat er geen poging gedaan is door middel van temperatuur programme-
ring een en ander te optimaliseren.

Tengevolge van deze slechte scheiding konden een aantal componenten niet éénduidig terug gevonden worden op het lage niveau.

De spectra van de in figuur 1 aangegeven componenten waren redelijk goed, ter illustratie zie figuur 2 en 3. Respectievelijk Diethylstilbestrol en Estron.

In tabel I zijn de resultaten voor het lineariteits experiment gegeven van vier componenten.

In tabel II is, gecorrigeerd voor de interne standaard (PCB 138), de respons van de diverse TMS derivaten weergegeven als functie van de geïnjecteerde hoeveelheid.

In tabel III zijn dezelfde data gebruikt. Echter nu is de verkregen respons gedeeld door de erbij behorende geïnjecteerde hoeveelheid alweer gecorrigeerd voor de interne standaard (PCB 138). In figuur 4 A t/m O zijn een aantal lineariteits grafieken weergegeven, zoals door de computer van de ITD 800 gegenereerd. Uitgezet is het oppervlak van de piek tegen de geïnjecteerde hoeveelheid.

Voor de reproduceerbaarheid van het spectrum zijn per component drie massa's genomen die in de MID mode gebruikt worden (ontleend aan internvoorschrift A 437).

In tabel IV worden die massa's gegeven tezamen met de verkregen variatie coëfficiënt aan de hand van 6 injecties van een mengsel van 1000 pg/ μ l.

In figuur 2 is het spectrum gegeven van diethylstilbestrol-TMS: ter vergelijk zie figuur 5 het spectrum zoals verkregen met de Finnigan 4500.

In figuur 3 is het spectrum gegeven van estradiol verkregen met de ITD en in figuur 6 het spectrum zoals verkregen met de Finnigan 4500.

5 DISCUSSIE

De gevoeligheid van de Finnigan ITD 800 is zeer goed. Voor de steroïden (TMS derivaat) kon een redelijk spectrum worden verkregen, in full scan mode, vanaf 200 pg per component.

Bij de Finnigan 4500 en bij de HP-MSD is hiervoor minimaal 1-5 ng per component nodig.

Bij quadrupool machines, zoals de Finnigan 4500 en de HP-MSD, kan de gevoeligheid verhoogd worden door slechts enkele massa fragmenten te meten, waardoor de gevoeligheid van dezelfde orde grootte wordt, als bij de ITD 800 echter de specificiteit is dan ook een stuk minder.

Bij de ITD is het niet zinvol om slechts enkele massa fragmenten te meten daar dit geen winst qua gevoeligheid oplevert.

De herhaalbaarheid van de spectra (Tabel IV) is ronduit slecht.

In Tabel IV zijn de resultaten van twee componenten uitgewerkt. De overige anabolica vertoonden een zelfde slechte herhaalbaarheid. Bij de Finnigan 4500 worden van dezelfde componenten en voor dezelfde massa fragmenten waarde gevonden, voor wat betreft de variatie coëfficiënt, van maximaal 5%.

De lineariteit wijkt over het gehele gebied nogal af: vanaf 1 ng tot 2 ng wordt wel een redelijk lineair verband gevonden. Ook de spectra die van de anabolica (TMS derivaat) verkregen worden wijken af ten opzichte van de spectra zoals die verkregen worden met de Finnigan 4500, de HP-MSD en spectra vermeld in de literatuur.

CONCLUSIE

Uit de éénmalig uitgevoerde experimenten kunnen een aantal conclusies getrokken worden waarbij bedacht dient te worden dat de resultaten positief cq negatief beïnvloed worden door de ingestelde parameters.

- De gevoeligheid van de ITD is zeer goed - de gevoeligheid in Full scan komt ongeveer overeen met de gevoeligheid van Finnigan 4500 en de HP-MSD in "multiple ion detection"
- De herhaalbaarheid van de spectra is zeer slecht. Mogelijk kan dit verbeterd worden door de acquisitie uit te voeren bij een hogere scan snelheid
- De lineariteit is in het lage gebied (500-1000pg) slecht, daarboven is de lineariteit redelijk
- De verkregen spectra wijken af ten opzichte van de spectra zoals verkregen bij de Finnigan 4500 de HP-MSD en zoals vermeld in de literatuur waardoor library searches niet goed uitgevoerd zullen worden.

De eind conclusie is dan ook dat de ITD niet geschikt is voor confirmatie doeleinden noch voor identificatie van onbekenden door middel via een library search, tenzij deze bibliotheek zelf is opgebouwd.

Tabel I: Resultaten lineariteit van vier componenten. Interne standaard PCB 138 waarvan telkens 2000pg is geïnjecteerd

Geïnjecteerde hoeveelheid(pg)	Oppervlakte				PCB 138 (2000pg)
	Diënestrol	Diethyl- stilbestrol	Estradiol	Estron	
200	668	969	1114	-	2934
500	1443	2480	3317	1861	3410
1000	4524	6803	8826	5431	2761
1500	8559	11993	17081	96902	3633
2000	10985	14989	21773	12552	<u>3381</u>
					X 3225
					VC% 11,3

Tabel II: Resultaten lineariteit van vier componenten waarbij de respons is gecorrigeerd voor de interne standaard

Geïnjecteerde hoeveelheid(pg)	Oppervlakte			
	Diënestrol	Diethyl- stilbestrol	Estradiol	Estron
200	734	1065	1257	-
500	1364	2345	3137	1760
1000	5284	7946	10309	6344
1500	7585	10629	15138	8589
2000	10478	14297	20774	11973

Tabel III: Resultaten lineariteit van vier componenten. Vermeld is het quotient van de gecorrigeerde respons en de geïnjecteerde hoeveelheid

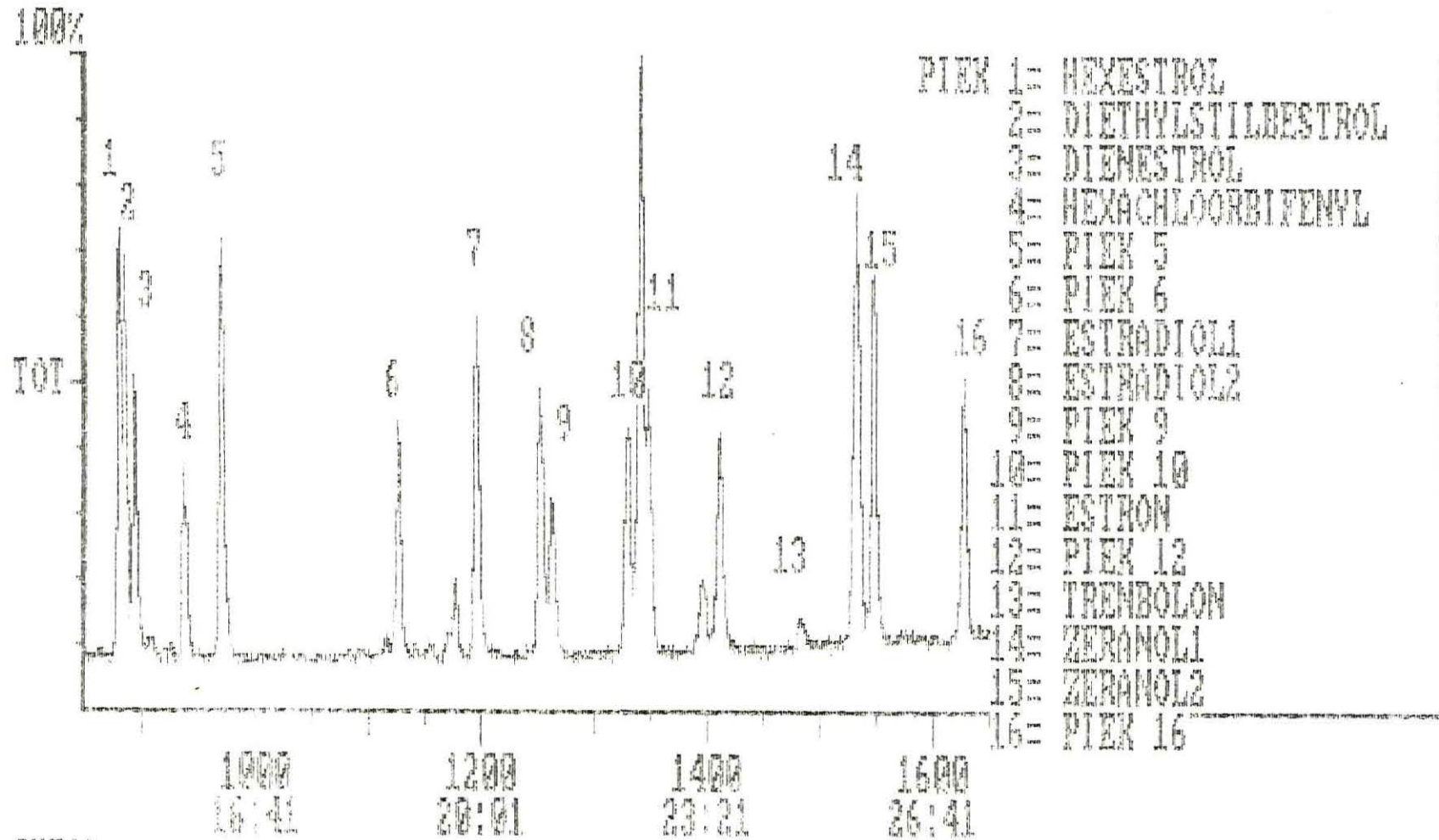
Geïnjecteerde hoeveelheid(pg)	Gecorrigeerde repons/geïnjecteerde hoeveelheid			
	Diënostrol	Diethyl- stilbestrol	Estradiol	Estron
200	3,67	56,33	6,29	-
500	2,73	4,69	6,27	3,52
1000	5,28	7,95	10,31	6,34
1500	5,06	7,09	10,09	5,73
2000	5,29	7,14	10,39	5,99

Tabel IV: Herhaalbaarheid van massa spectra van anabolica

Component	M/Z	Relatieve int %						x	VC%
		1	2	3	4	5	6		
Nortestosteron	215	61,1	23,1	43,8	34,8	44,4	38,3	44,3	32,2
	256	100	100	100	100	100	100		
	331	44,4	35,9	37,5	47,8	33,3	45,8	40,8	14,6
	346	55,6	35,9	75,0	34,8	72,2	33,3	51,1	37,6
Estraandiol	201	51,3	45,6	45,5	30,3	23,2	37,7	38,9	27,2
	242	100	100	100	100	100	100		
	332	44,7	26,7	24,8	33,3	42,6	24,0	34,4	22,5
	407	18,4	10,0	15,7	15,2	11,1	15,1	14,3	22,0

FIG 1: Totaal ionenstroom chromatogram van een mengsel anabolica

Chromatogram RIKILT3 Acquired: Nov-26-1997 13:25:04
 Comment: RIKILT MONSTER 1.0 uL ONCOLUMN 1000PG/UL
 Scan Range: 450 - 1689 Scan: 850 Int = 1979 @ 14:11 RIC: 100% = 27167



CHRO)

Background Subtract

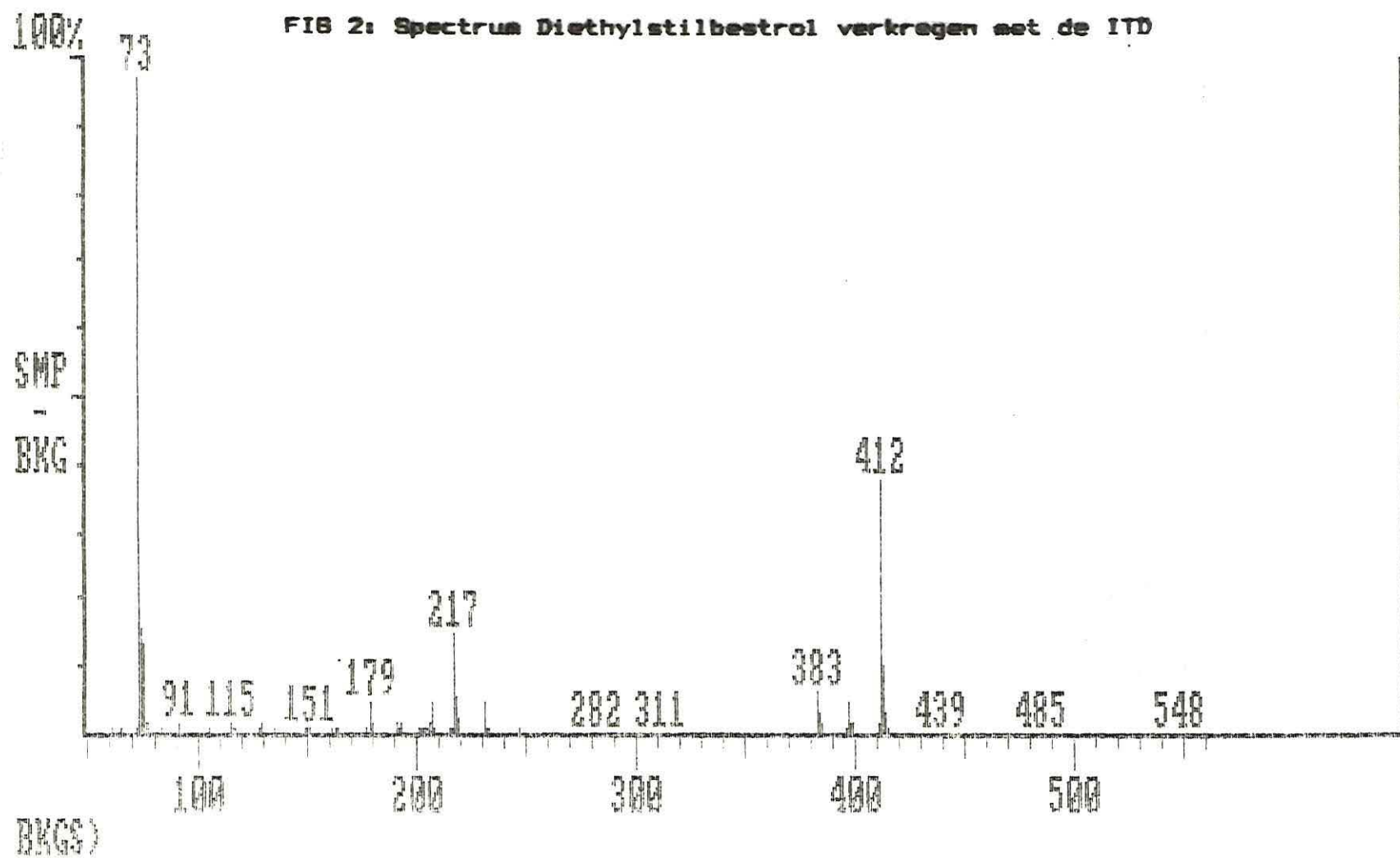
C:RIKILT3

Acquired: Nov-26-1987 13:25:04

Comment: RIKILT MONSTER 1.0 uL ONCOLUMN 1000PG/uL

Average of: 884 to 888 Minus: 868 to 872

100% = 3060



Background Subtract

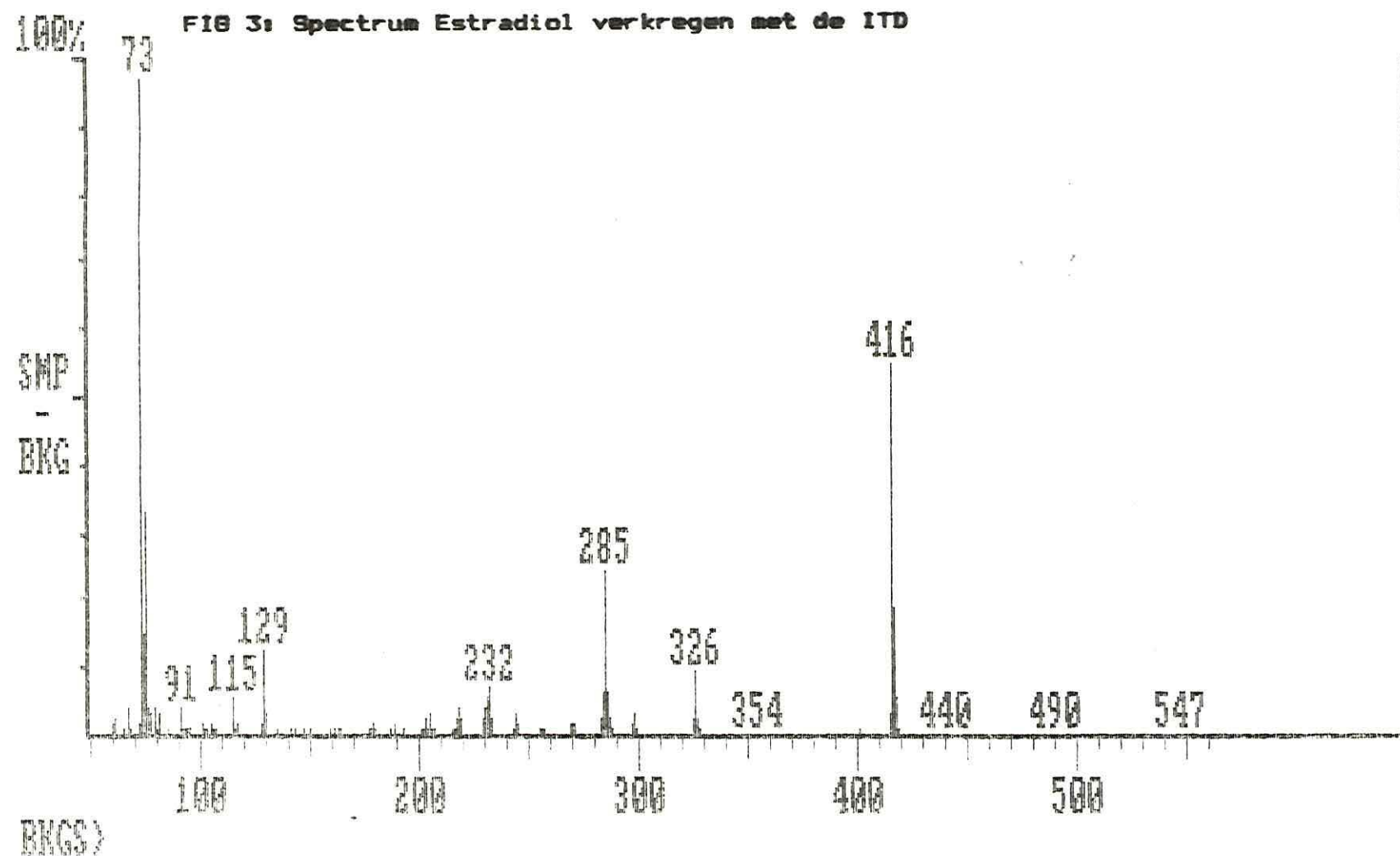
C:RIKILT3

Acquired: Nov-26-1987 13:25:04

Comment: RIKILT MONSTER 1.0 uL ONCOLUMN 1000FC/uL

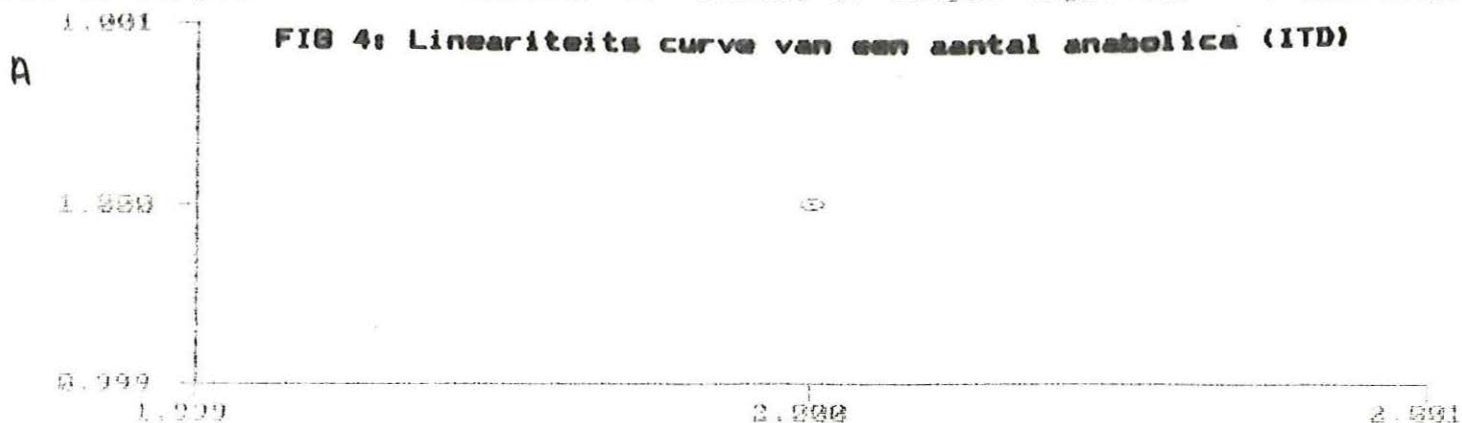
Average of: 1194 to 1198 Minus: 1184 to 1188

100% = 2337

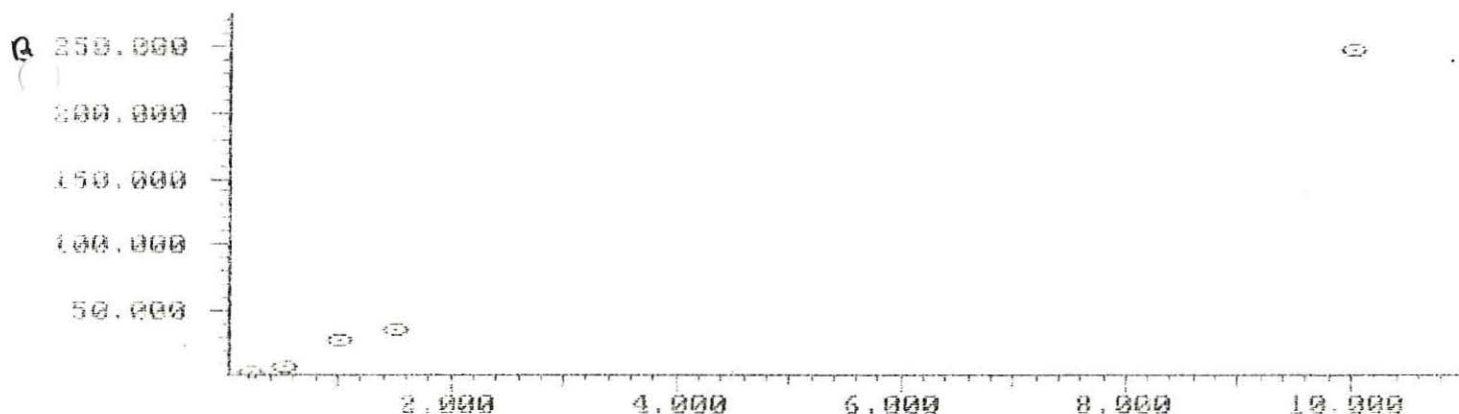


Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 1.999
 ANABOLICORBIKIFENYL Compound: 1 of 15 Calibration Points: 7
 (Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)

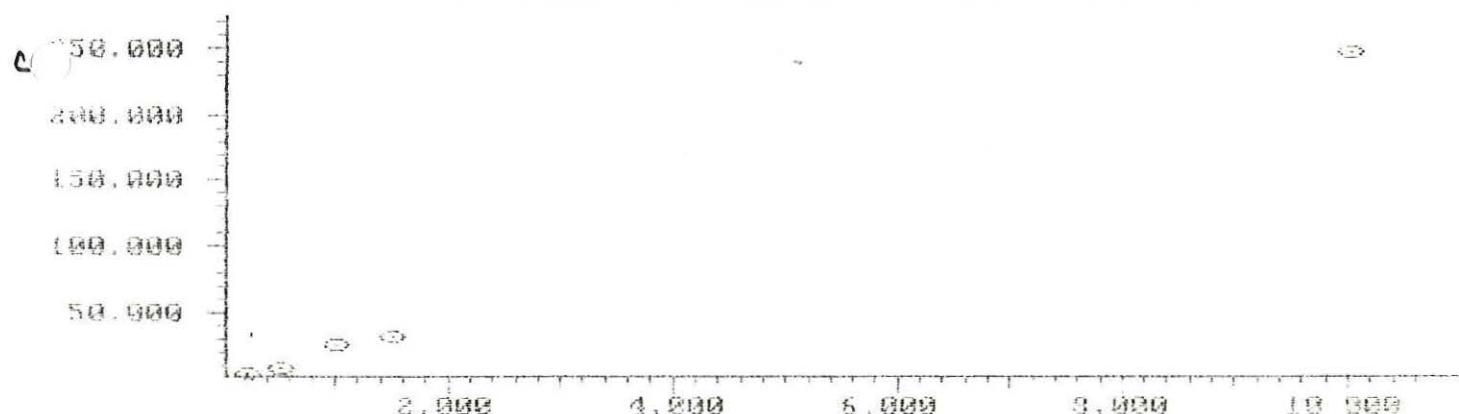
FIG 4: Lineariteits curve van een aantal anabolica (ITD)



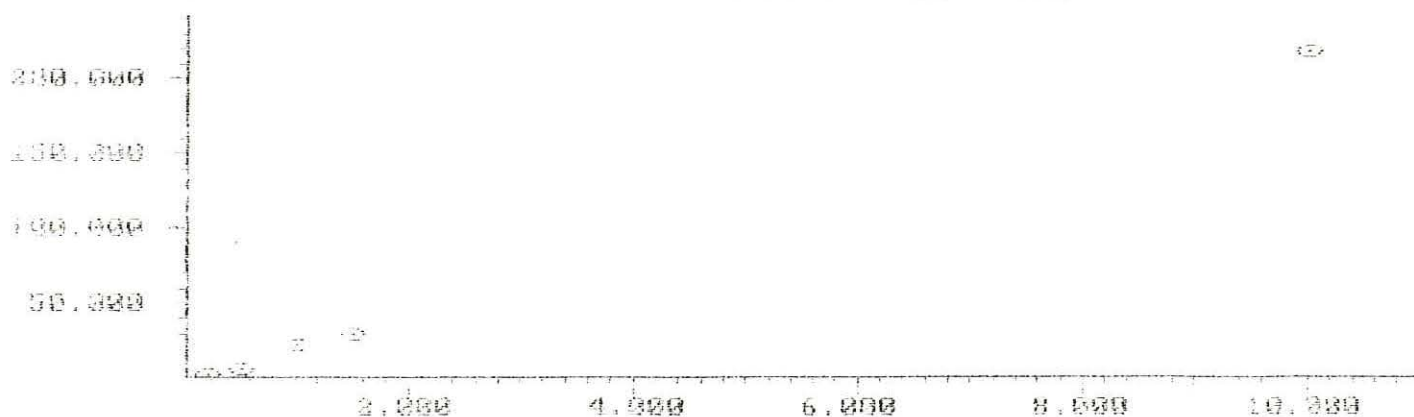
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.999
 ESTROGEN Compound: 2 of 15 Calibration Points: 5
 (Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



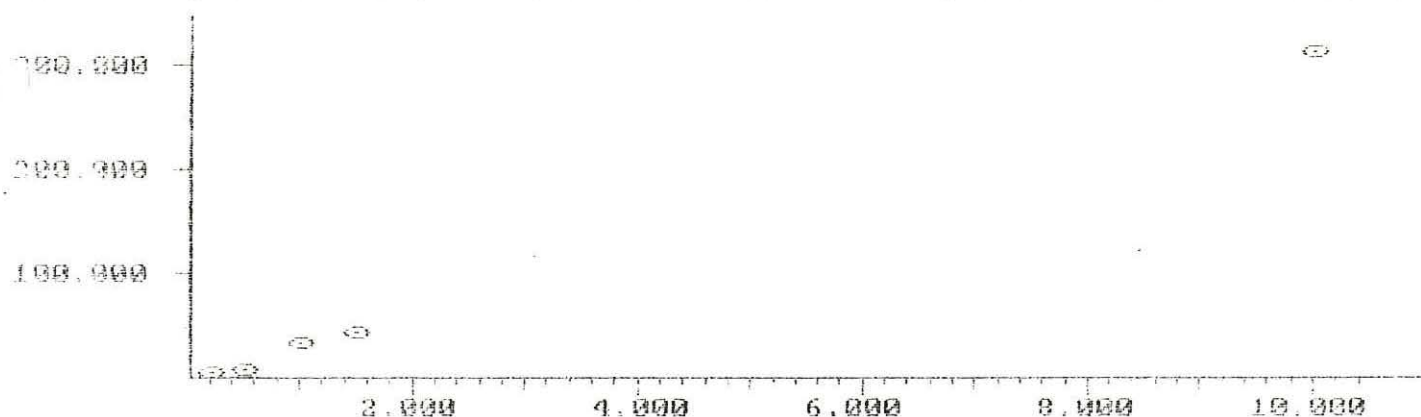
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.999
 ESTROGEN Compound: 3 of 15 Calibration Points: 5
 (Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



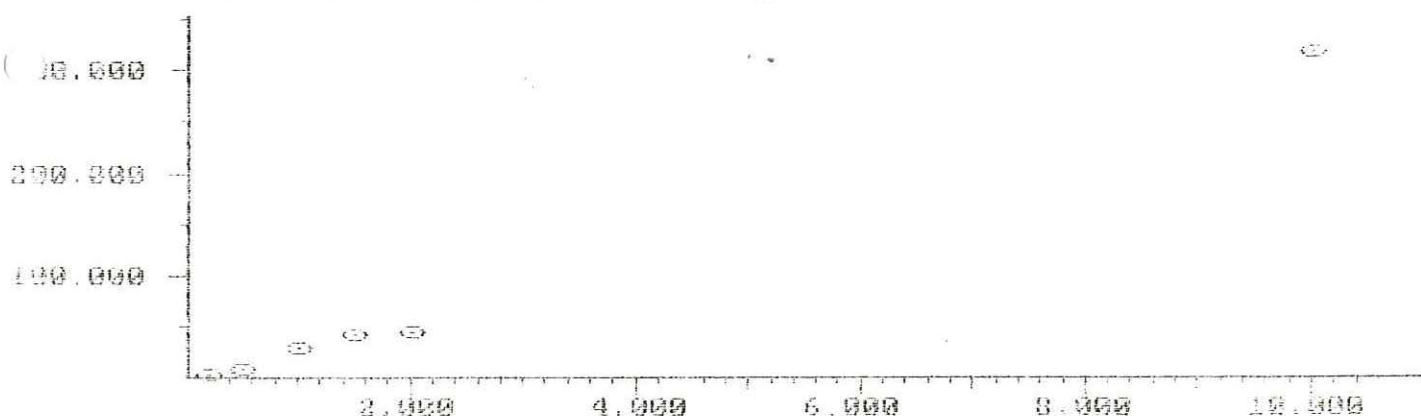
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.999
TREMESTROL Compound: 4 of 15 Calibration Points: 5
(Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



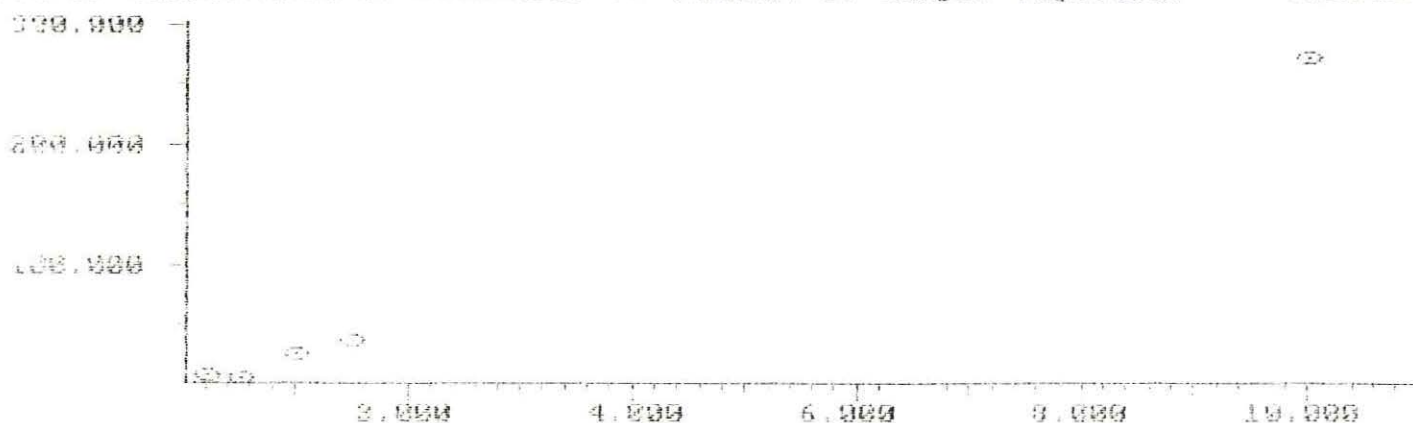
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.999
ESTR 5 Compound: 5 of 15 Calibration Points: 5
(Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



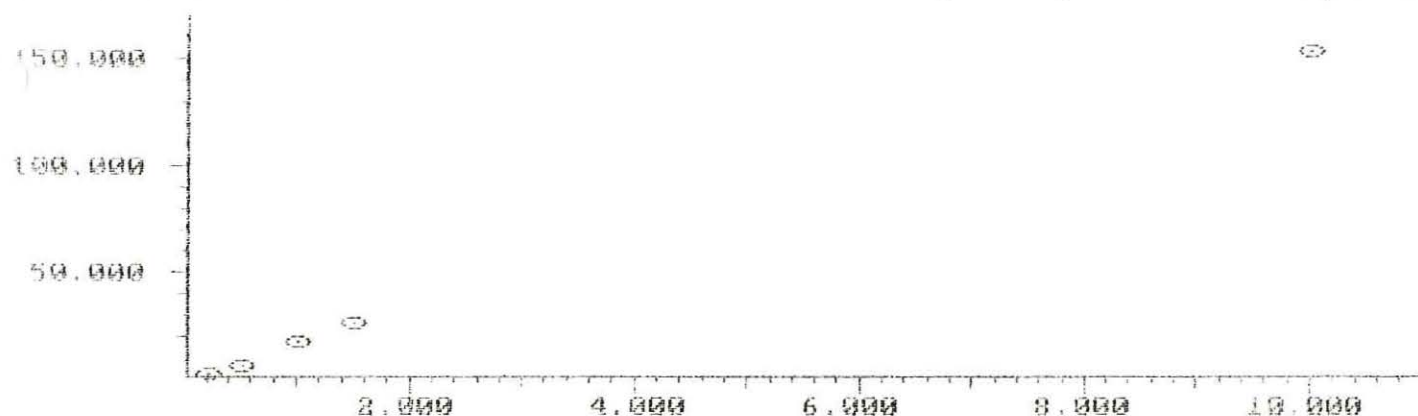
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.998
ESTRADIOL Compound: 6 of 15 Calibration Points: 6
(Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



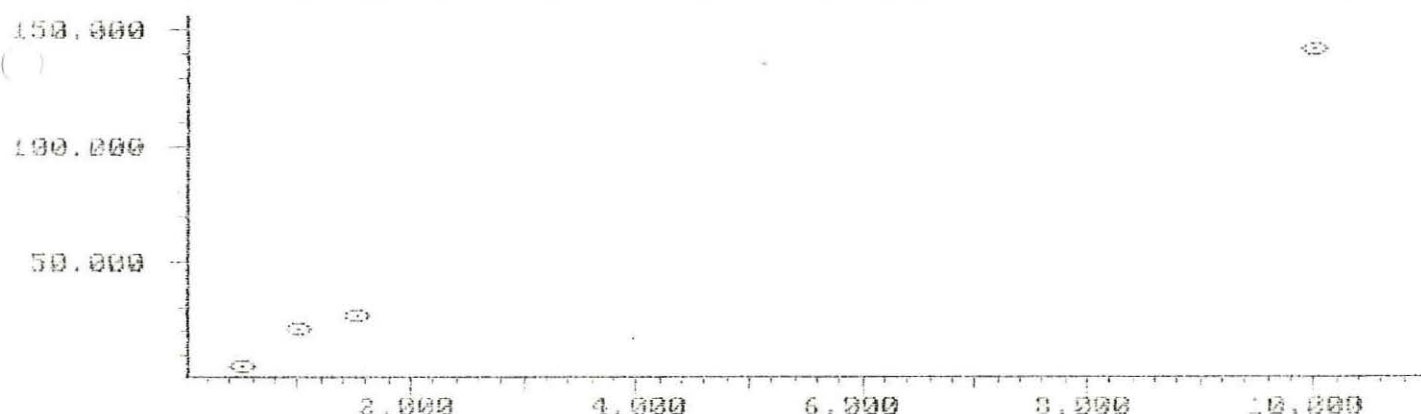
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.999
1790DIOL2 Compound: 7 of 15 Calibration Points: 5
(Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



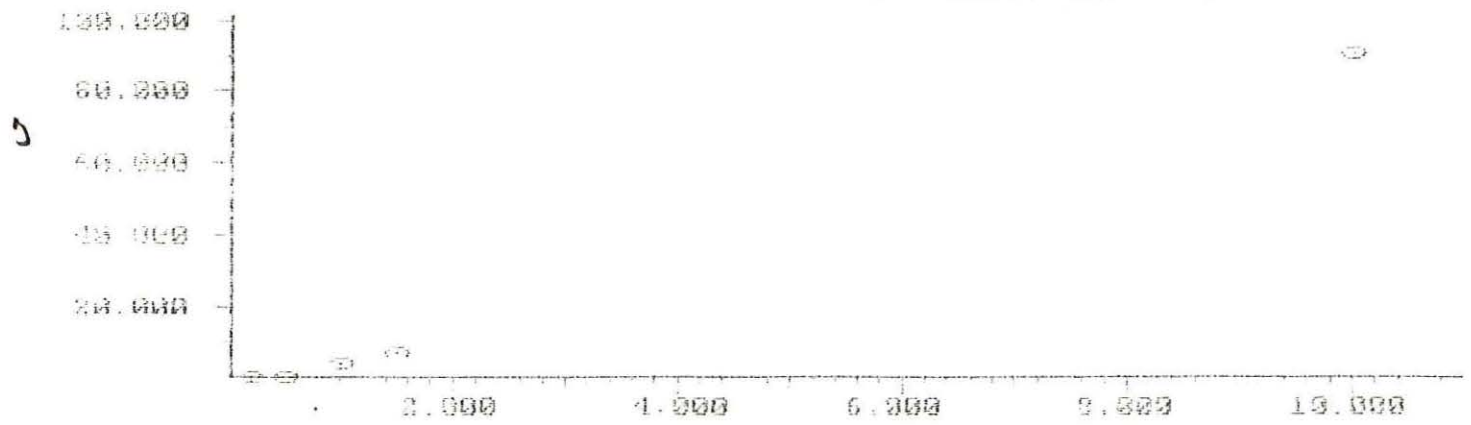
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.999
PIER 9 Compound: 8 of 15 Calibration Points: 5
(Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



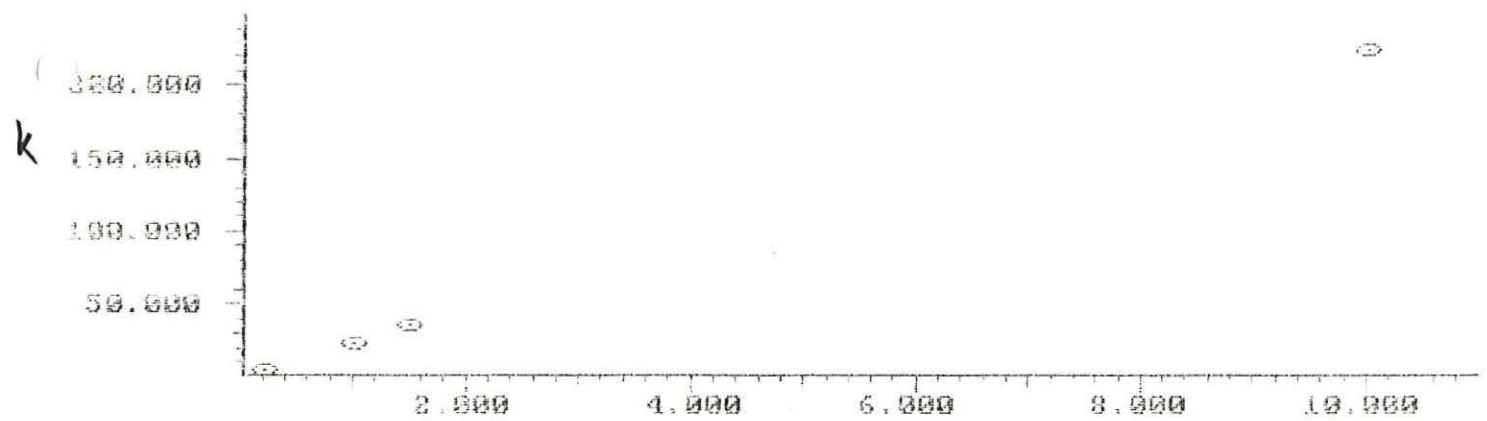
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.998
PIER 10 Compound: 9 of 15 Calibration Points: 4
(Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



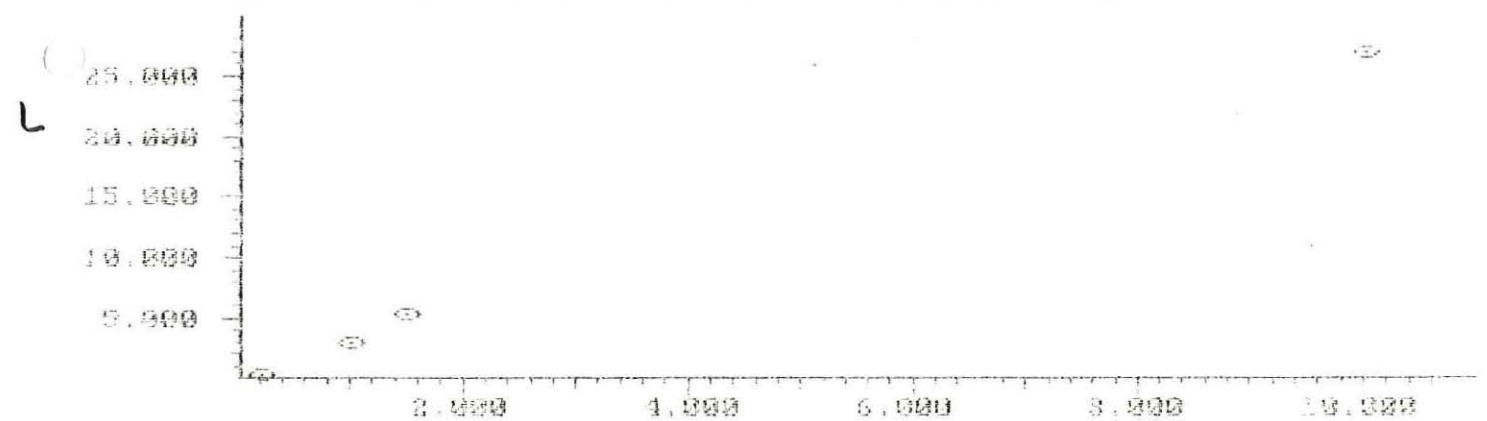
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.998
STRON Compound: 10 of 15 Calibration Points: 5
(Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



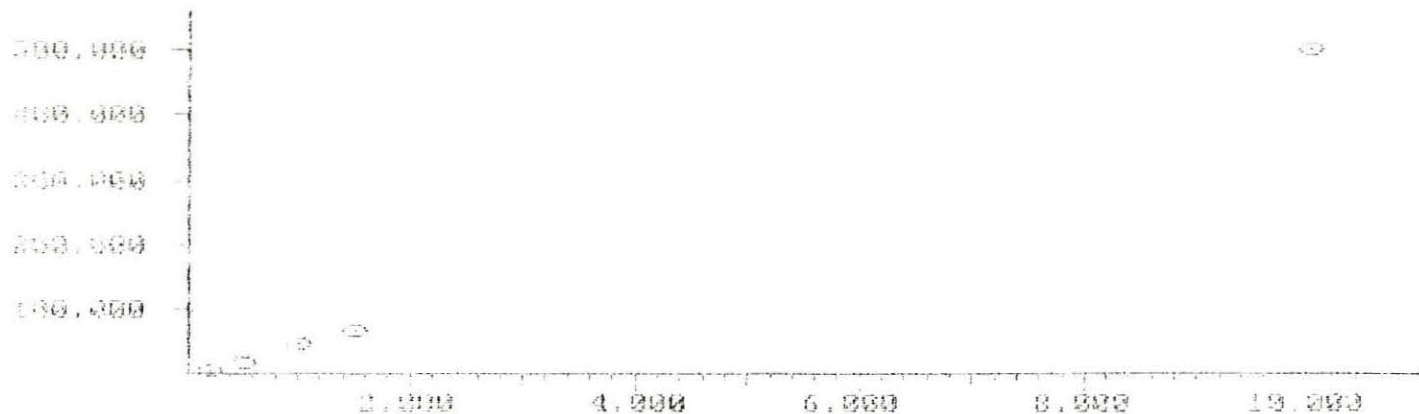
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 1.000
PEAK 12 Compound: 11 of 15 Calibration Points: 3
(Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



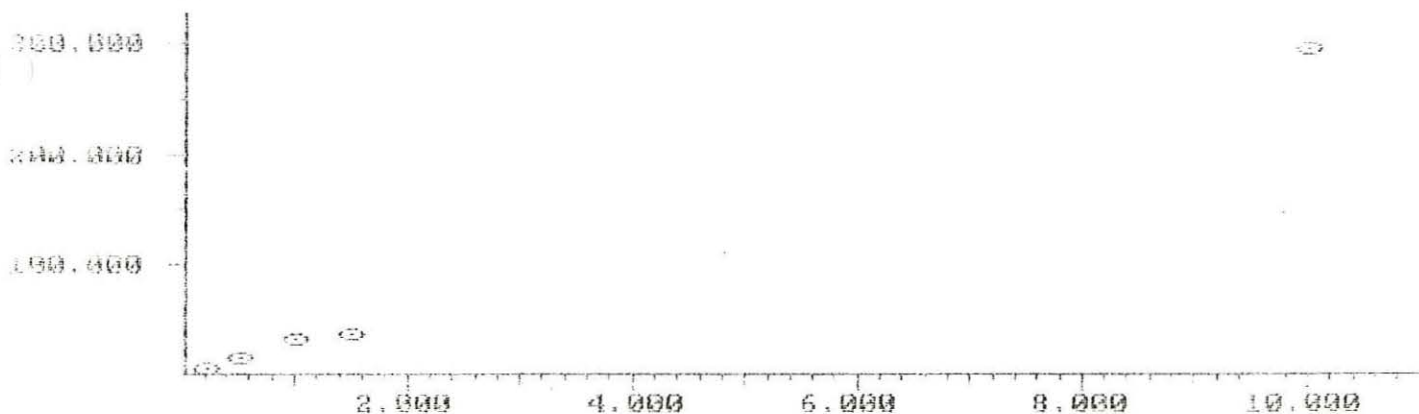
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.998
METHANOL Compound: 12 of 15 Calibration Points: 4
(Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



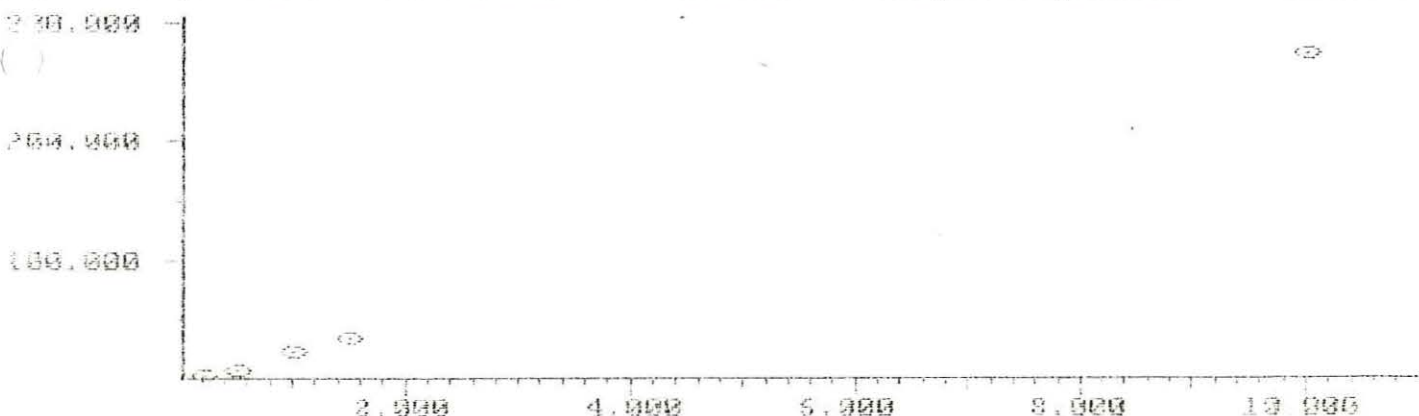
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.999
 Compound: 13 of 15 Calibration Points: 5
 (Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.999
 Compound: 14 of 15 Calibration Points: 5
 (Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



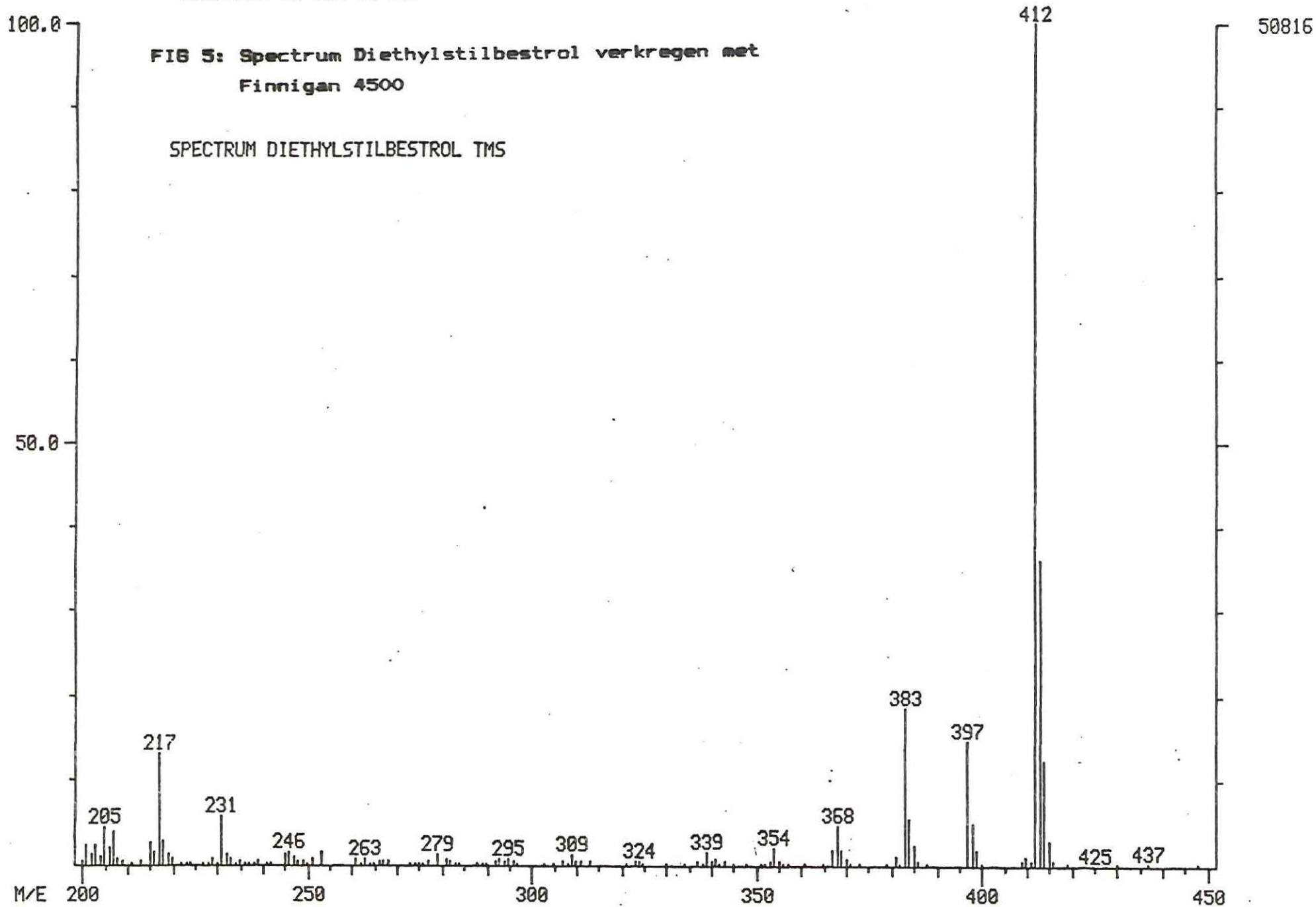
Calibration Plot (Int Stds) Filename: RIKILT Correlation Coeff: 0.999
 Compound: 15 of 15 Calibration Points: 5
 (Area of Sample/Area of Standard) vs (Amount of Sample Injected) (Lin/Lin)



MASS SPECTRUM
04/19/83 15:40:00 + 15:59
SAMPLE: ST DE EEST METEST TREN ZER TMS DER.
ENHANCED (S 15B 2N 0T)

DATA: STHUR1 #1199
CALI: WT5

BASE M/E: 412
RIC: 203520.



DATA: SYSTEM: #1362 945E M/E: 285
CALI: HT1 #1 RIC: 552096.

MO55 SPECTRUM
02/10/84 9:27:00 + 22:10
SAMPLE: ST ESTRON OSTRIOI 178 ESTRADIOI TMS DER.
ENHANCED (5 158 2N 0T)

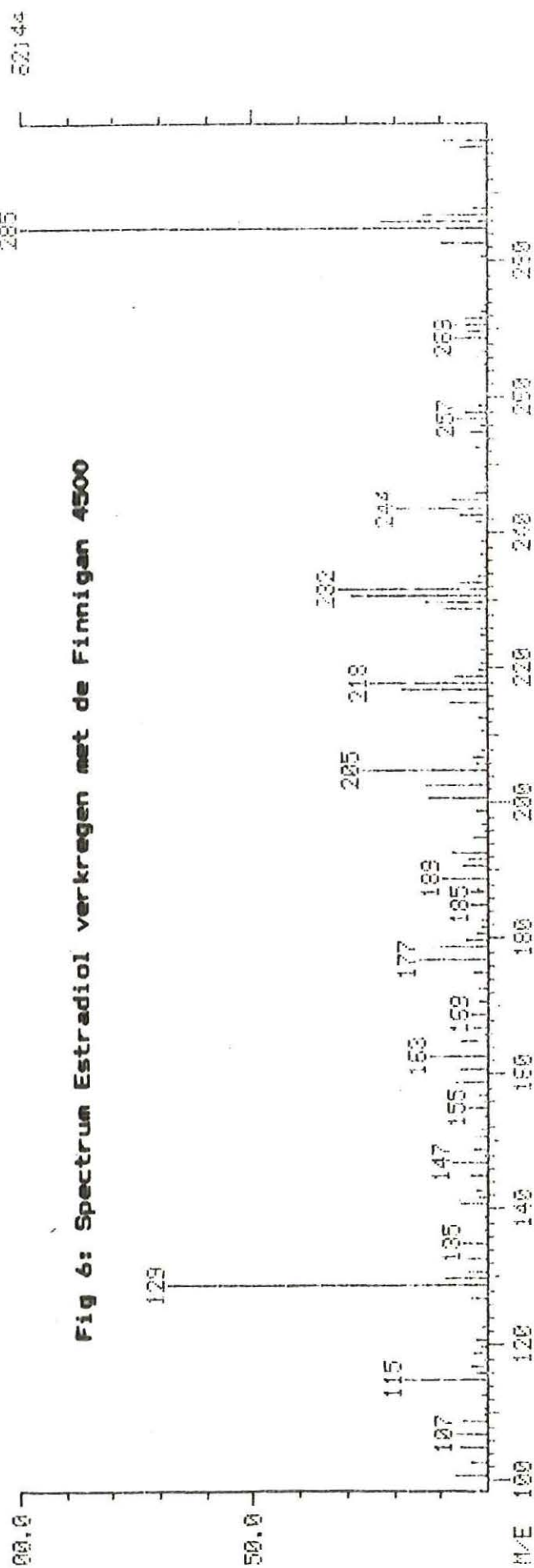


Fig 6: Spectrum Estradiol verkregen met de Finnigan 4500

