

Project 505.0620

Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van hormonen
(R. Schilt)

Rapport 87.61

September 1987

Massaspectrometrisch onderzoek van
nortestosteron en nortestosteron
di-heptafluorboterzuerderivaat

drs R. Schilt

Goedgekeurd door: dr F.A. Huf

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

8761

Verzendlijst

Intern

directeur
sectorhoofden
projectgroepleden
leden BENELUX groep Hormonen en anti-hormonen
bibliotheek

Extern

directie VD
directie RVV
AGRALIN, PUDOC

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

Abstract

Massaspectrometrisch onderzoek van nortesttosteron en nortestosteron-di-fluorboterzuurderivaat

Mass spectrometric investigations of nortestosterone and its di-heptafluorbutyric derivate.

Report nr. 87.61

September 1987

State Institute for Quality Control of Agricultural Products
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands.

2 tables, 17 figures.

Keywords: mass spectrometry, nortestosterone, di-heptafluor derivate

Inhoud

Abstract	2
Samenvatting	4
1. Inleiding	5
2. Apparatuur en techniek	5
3. Nortestosteron	6
3.1 Massaspectra	6
3.2 Structuuropheldering fragment-ionen	6
3.3 Conclusie	6
4. Nortestosteron-di-heptafluorboterzuur	6
4.1 Derivatisering	6
4.2 Massaspectra	7
4.3 Structuuropheldering fragment-ionen	7
4.4 Structuuropheldering met hoge resolutie MS	7
4.5 Conclusie	8
5. Conclusie en discussie	8

Samenvatting

In dit rapport wordt het massaspectrometrisch gedrag van nortestosteron en het nortestosteron als di-heptafluorboterzuur derivaat besproken. Naast spectra zijn ook de fragmentatie mechanismen weergegeven. Van het derivaat zijn de fragmentionen met hoge resolutiemassaspectrometrie onderzocht.

1. Inleiding

Naar aanleiding van keuringsonderzoek van (nek)vleesmonsters door het Laboratorium der Bromatologie (Gent, België) o.l.v. van Prof. C. H. van Peteghem is het massaspectrometrisch gedrag van 17-beta, 19-nortestosteron en het di-heptafluorboterzuur derivaat in samenwerking met de afdeling Massaspectrometrie Organische Scheikunde, o.l.v. Prof. N.M.M. Nibbering door R. Fokkens onderzocht.

Voor de identificatie van organische verbindingen op residu-niveau moet het GCMS-onderzoek van standaardstof en monster voldoen aan een aantal criteria, zoals retentietijd en fragmentatiepatroon. De te onderzoeken ionen moeten relevante structuurinformatie bevatten en in een juiste onderlinge verhouding voorkomen. Indien het onderzoek op deze wijze op vier fragmenten wordt uitgevoerd is de kans op een vals-positieve identificatie aanvaardbaar gering.

2. Apparatuur en techniek

Bij het onderzoek is gebruik gemaakt van een V.G. MICROMASS ZAB-2HF hoge resolutie MS-MS, gekoppeld aan een V.G. 11/250 data systeem, met omgekeerde geometrie. Dit betekent dat de eerste selectie door een hoog veld magneet en de tweede selectie door een elektrisch wordt verricht. Tussen de magneet en elektrisch veld is een vacuumruimte aanwezig waarin een collision-gas, bijvoorbeeld helium, kan worden gebracht. Door botsingen van de door de magneet geselecteerde ionen en het gas ontstaat verdere fragmentatie die met de elektrisch veld selector kan worden geregistreerd. De bereikte specificiteit neemt door deze techniek aanzienlijk toe.

Indien geen collision-gas wordt gebruikt treedt alleen spontane fragmentatie op van het door de magneet geselecteerde ion, de zogenaamde MIKES-MS. Ook met deze techniek neemt de hoeveelheid informatie over de ionen toe.

Als ionisatiemethode is de electron-impact techniek (EI) toegepast. Door de energie van de elektronenbundel te verlagen van de standaardwaarde 70eV naar bijvoorbeeld 15 eV, wordt een mildere ionisatie en minder fragmentatie verkregen.

De monsters zijn via een direct insertion probe in de ionenbron geïntroduceerd. De te onderzoeken verbinding kan door verwarming van de probe in dampfase worden gebracht. Door verwarming kunnen echter meer thermische processen naast de puur massaspectrometrische processen optreden.

Ter controle van de voorgestelde fragmentatiemechanismen van het di-HFB derivaat is de elementsamenstelling van de ionen onderzocht met hoge resolutie massaspectrometrie. Het oplossend vermogen bedroeg bij deze metingen 20000 (10% valley definition).

3. Nortestosteron

3.1 Massaspectra

Het EI spectrum van 17-beta, 19-nortestosteron (Sigma N-7252), bij een probe temperatuur van 125 graden, is gegeven in figuur 1. In figuur 2 is het spectrum opgenomen bij een electronenbundel van 15 EV i.p.v. 70 eV.

In figuur 3 is het MIKES spectrum weergegeven (70 eV, 125 graden) van het molekuulion m/z 274. Duidelijk zijn de fragmenten m/z 256, m/z 215 en m/z 110.

De extra informatie die wordt verkregen na botsing van het molekuulion m/z 274 met helium is zichtbaar in figuur 4.

3.2 Structuuropheldering fragment-ionen

Fragment-ion m/z 256 ontstaat door afsplitsing van een watermolekuul (figuur 5). Bij dit proces kan mogelijk ook sprake zijn van een thermische bijdrage.

Ion m/z 215 ontstaat waarschijnlijk door een afsplitsing van de D-ring (figuur 6).

Het reactiemechanisme voor de vorming van het fragment m/z 110 is gegeven in figuur 7. Hierbij ontstaat een brokstuk van de A-ring.

3.3 Conclusie

Bij het massaspectrometrisch onderzoek van nortestosteron als zodanig kunnen de volgende structuurinformatie bevattende ionen worden gebruikt:

- m/z 274
- m/z 256
- m/z 215
- m/z 110

4. Nortestosteron-di-heptafluorboterzuur

4.1 Derivativering

Voeg aan een droog residu toe 200 μ l acetonitril en 50 μ l HFBA. Verwarm in een gesloten vaatje gedurende 30 minuten bij 60 graden. Damp het solvens en de overmaat reagens af onder stikstof. Neem het derivaat op in een inert, vluchtig oplosmiddel, bijvoorbeeld hexaan.

4.2 Massaspectra

Het EI-spectrum van het di-HFB derivaat is weergegeven in figuur 8 (70 eV, 70 graden). Opvallend is het verschil t.o.v. de door Prof. van Peteghem genoemde massafragmenten (m/z 666.1, 453.2, 306.2), namelijk m/z 666, 452 en 306.

Onder analoge condities, behalve een probe temperatuur van 130 graden, is het EI-spectrum, figuur 9, opgenomen. Direkt in het oog springt de toename in intensiteit van het m/z 453 ion t.o.v. het m/z 452 ion. In figuur 10 is de temperatuursinvloed op de m/z 452/453 intensiteitsverhouding nogmaals weergegeven. In figuur 11 is de verhouding van de ionen m/z 306/307 opgenomen en in figuur 12 de cluster rond het parent-ion bij beide temperaturen. Bij hogere temperatuur treedt meer fragmentatie op.

Het MIKES spectrum (70 eV, 70 graden) van het molekuul-ion m/z 666 is weergegeven in figuur 13. De fragmentatie als gevolg van de inwendige energie resulteert in de vorming van het ion m/z 452 en het ion m/z 306.

4.3 Structuuropheldering fragment-ionen

Fragment-ion m/z 452 ontstaat door een afsplitsing van heptafluorboterzuur na een McLafferty omlegging (figuur 14). Het vooral bij hogere temperatuur gevormde ion met m/z 453 ontstaat door afsplitsing van een heptafluorboterzuur radicaal na een bandbreuk (figuur 15). Dit betreft een thermisch proces dat meer energie vraagt dan een McLafferty omlegging. Zeker bij GCMS-analysen zal dit thermische proces door de verhoogde temperaturen in de eventuele interface tussen GC en MS en de ionenbron optreden.

Het ion met m/z 306 (figuur 16) wordt op analoge wijze gevormd als het m/z 110 fragment (A-ring) bij het ongederivatiseerde nortestosteron (figuur 7).

Het fragment met m/z 133 wordt gevormd na afsplitsing van de A- en B-ring (figuur 17).

4.4 Structuuropheldering met hoge resolutie MS

Ter controle van de juistheid van de voorgestelde fragmentatiemechanismen zijn exacte massametingen verricht aan de bovengenoemde ionen. Op grond van deze massa's kan de elementsamenstelling worden vastgesteld.

Het blijkt dat de berekende massa's (tabel 1) in alle gevallen overeenkomen met de gemeten massawaarden (tabel 2).

4.5 Conclusie

Bij het massaspectrometrisch onderzoek van nortestosteron als di-heptafluorboterzuur derivaat kunnen de volgende structuurinformatie bevattende ionen worden gebruikt:

- m/z 666
- m/z 453 / 452 *
- m/z 306
- m/z 133

* NB. Vooral bij het gebruik van de onderlinge intensiteitsverhoudingen van de geselecteerde fragmenten moet extra aandacht worden geschonken aan de intensiteit van fragmenten die door thermische ontleding kunnen worden gevormd. De meetcondities moeten dusdanig worden gekozen dat de thermische bijdrage constant is.

5. Conclusie en discussie

Door het optreden van thermische processen bij de fragmentatie van het nortestosteron-di-HFB derivaat staat niet onomstotelijk vast dat aan de in Nederland toegepaste criteria van vier massafragmenten in een overeenkomende onderlinge massaverhouding kan worden voldaan. Indien de keus tot drie fragmenten wordt beperkt kan uiteraard in het geheel niet aan de Nederlandse criteria worden voldaan.

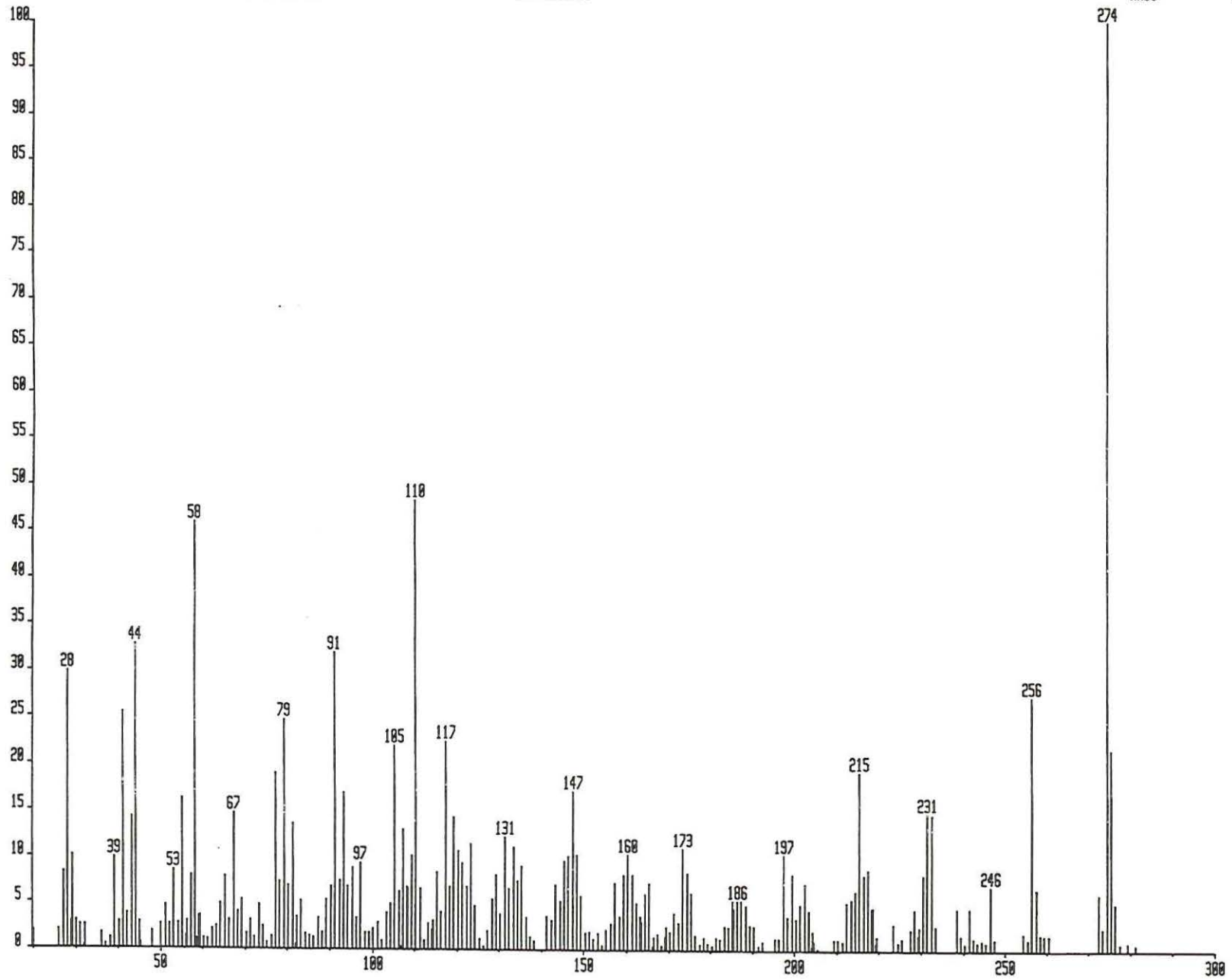
Ook gezien de ten opzichte van mono-TMS derivaten relatief lage intensiteiten van de hogere massafragmenten biedt de HFB derivatisering geen extra voordelen.

Momenteel lijkt de op het RIKILT toegepaste derivatiseringstechniek bij de identificatie van nortestosteron een aantal voordelen te bieden.

50FHNR#4* x1 8gd=1 16-JUL-87 10:02+0:06:20 ZABHF EI+
Bp#=#0 I=10v H#=#281 TIC=659064000 Acnt:RIKILT Sys:750PEI
Text:NORTESTOSTERON EIMS-70EV-PROBE 125 C. Cal:C750PEI

HMR: 35593000
MASS: 274

figuur 1

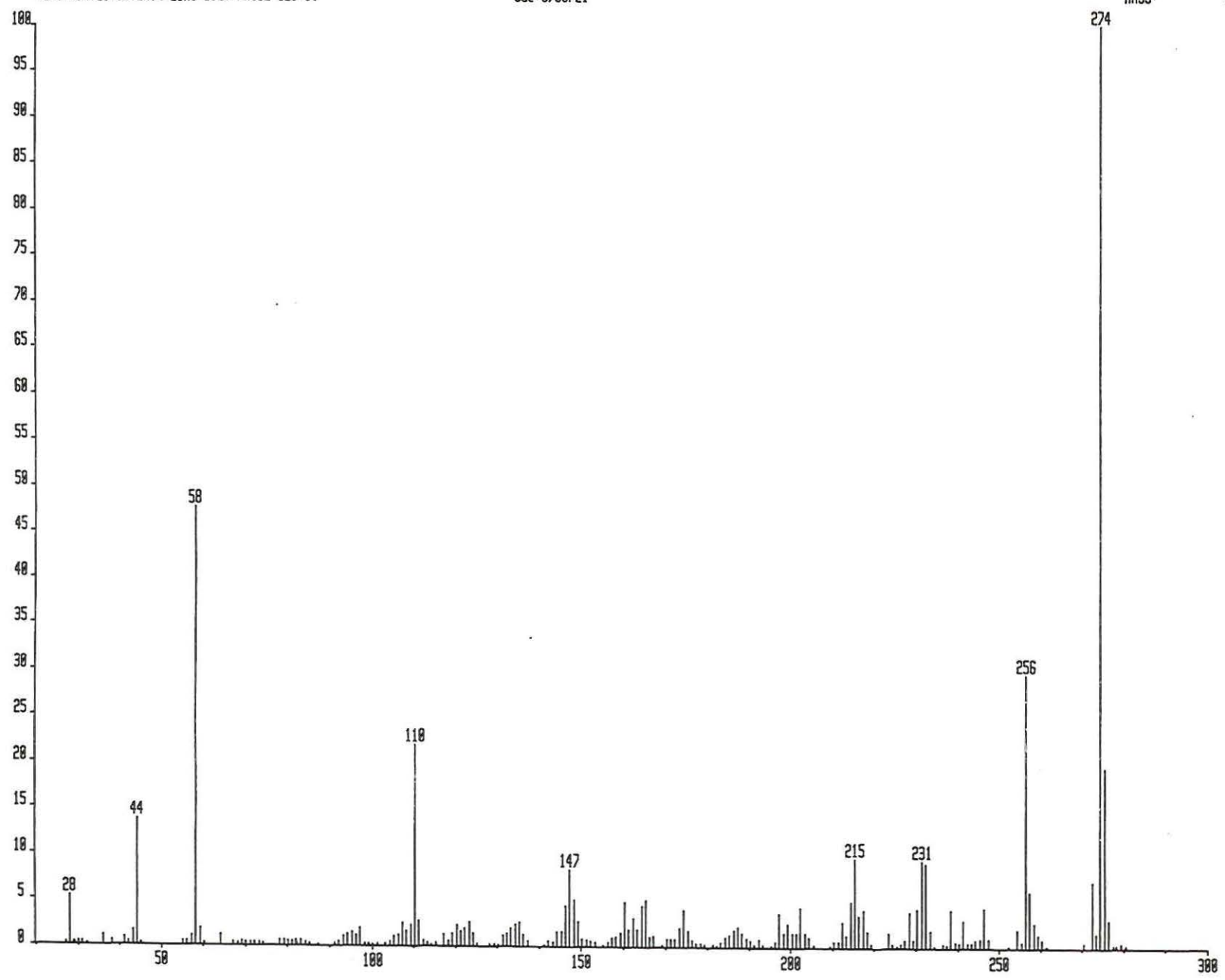


50FHNR1#3* x1 Bgd=1 16-JUL-87 10:11:01:58 ZABHF
BpM=0 I=3.8v Hw=354 TIC=129173000 Acnt:MS
Text: NORTESTOSTERON EIMS-15EV-PROBE 125 C.

EI+
Sys:750PEI
Cal:C750PEI

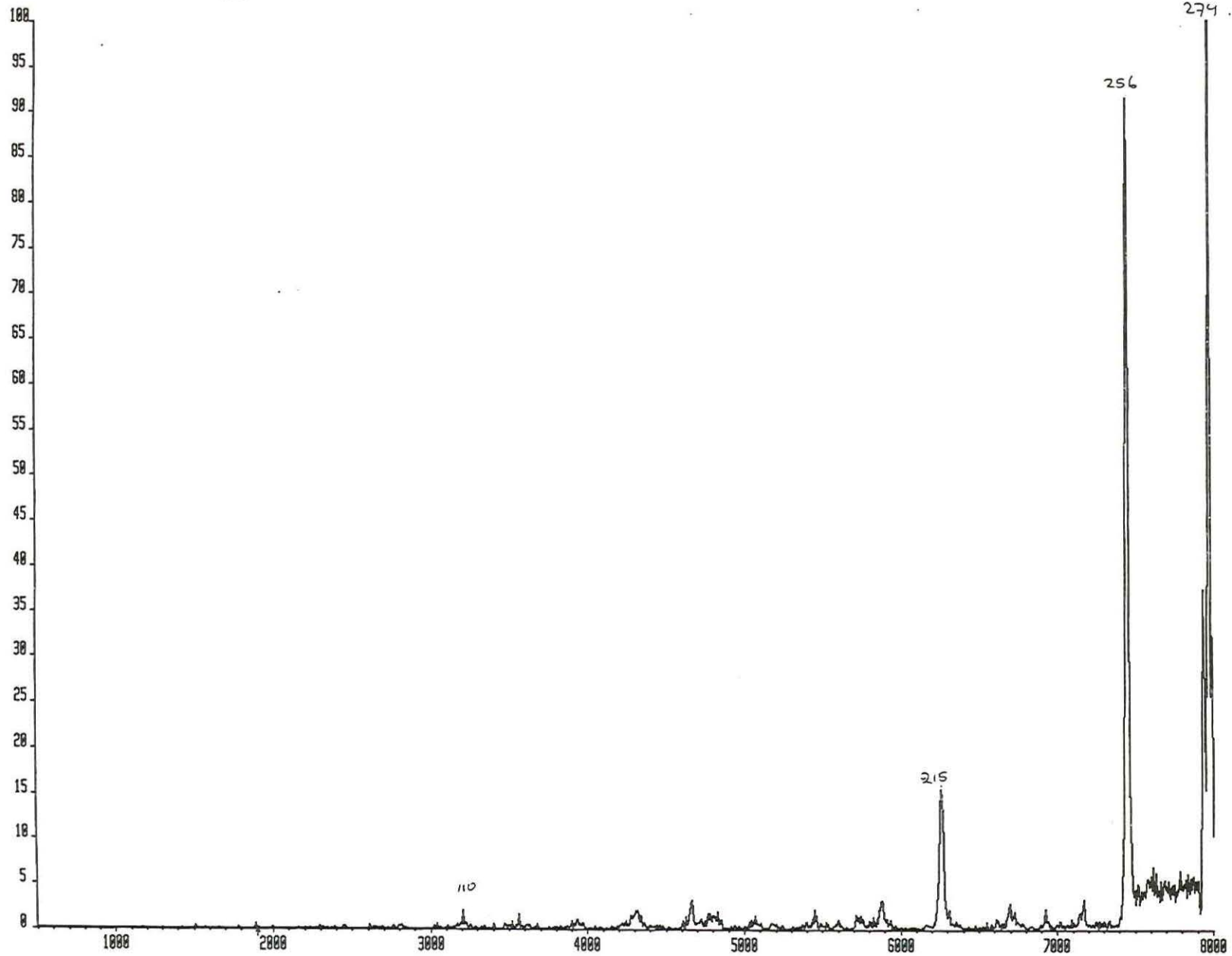
HMR: 24745000
MASS: 274

figuur 2



50FHNR281e x1 Bgd=1 16-JUL-87 10:14:01:32 ZABHF EI+
BpM=0 I=10v M=0 TIC=0 Acnt:AVEIRO Sys:RMIKES
Text:NORTESTOSTERON EI-MIKES M+=274.
x2.5*

HMR: 458744932

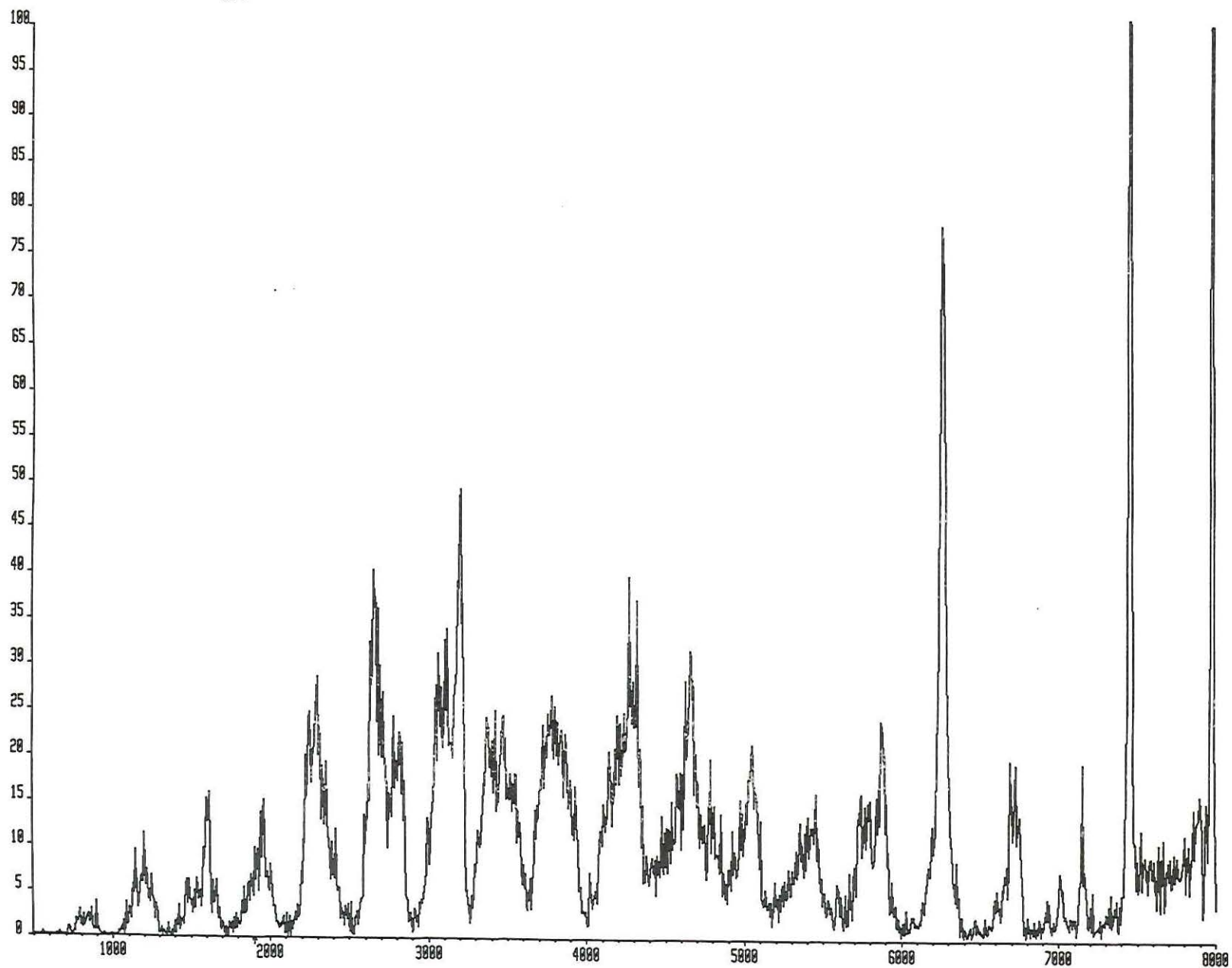


figuur 3

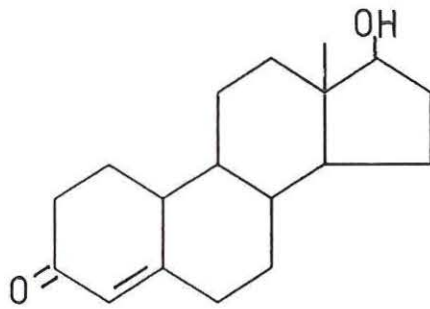
50FHNR2R#1* x1 Bgd=1 16-JUL-07 10:17:01:33 ZABHF EI+
BpM=0 I=10v Ha=0 TIC=0 Acnt:AVEIRO Sys:RFNIKES
Text:NORTESTOSTERON EI/MIKES/CR M=274.
x4.7*

HNR: 450744992

figuur 4



figuur 5

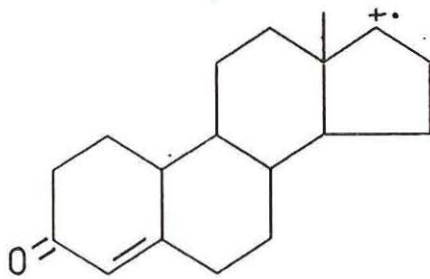


m/z 274

17-beta, 19-nortestosteron

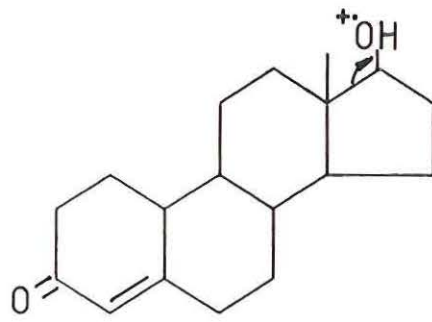


-H₂O

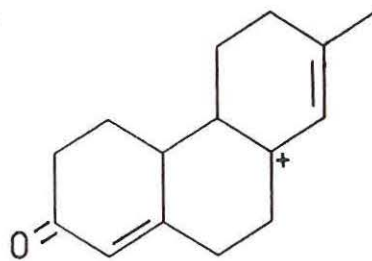
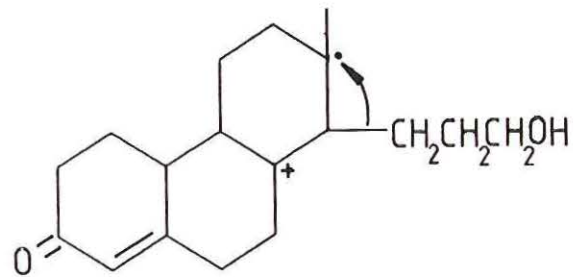
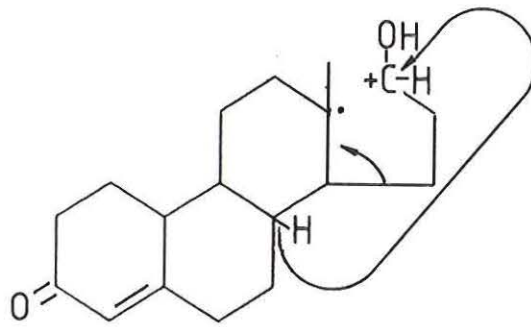


m/z 256

figuur 6



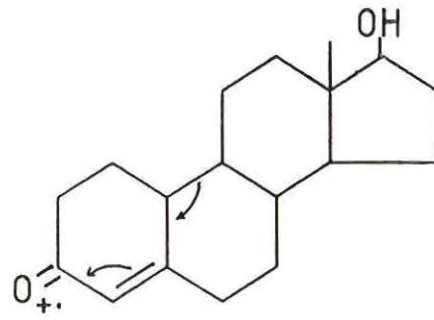
m/z 274



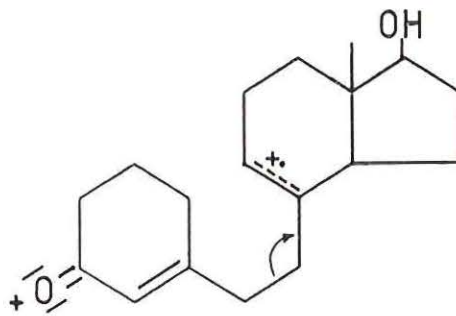
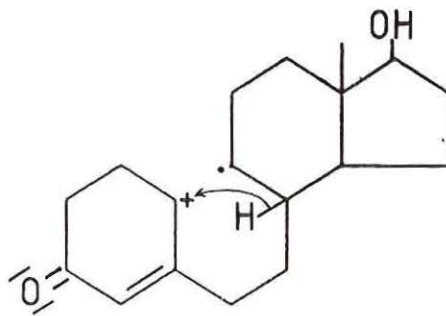
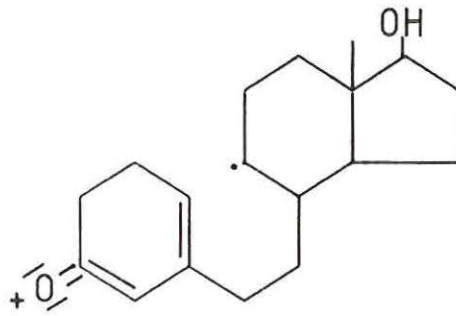
m/z 215

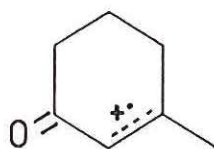
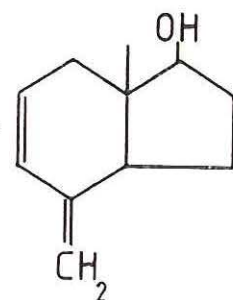
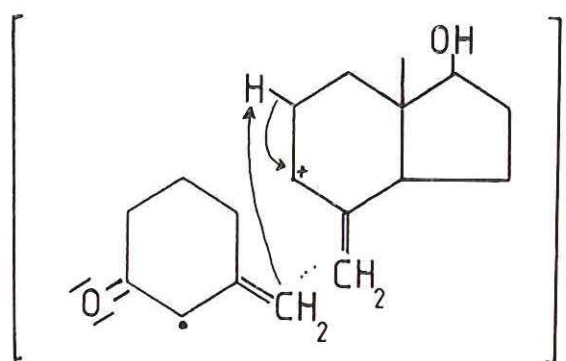
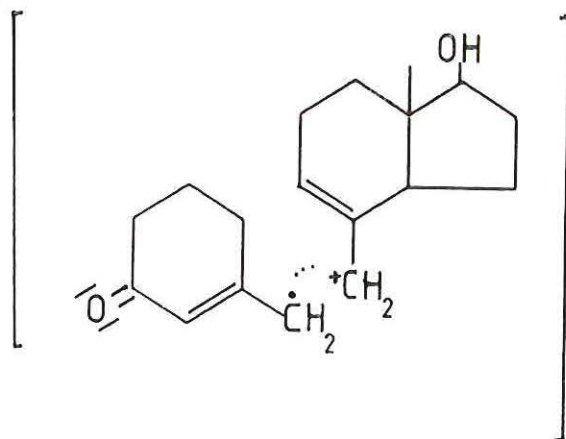
$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}^\bullet$

figuur 7



m/z 274





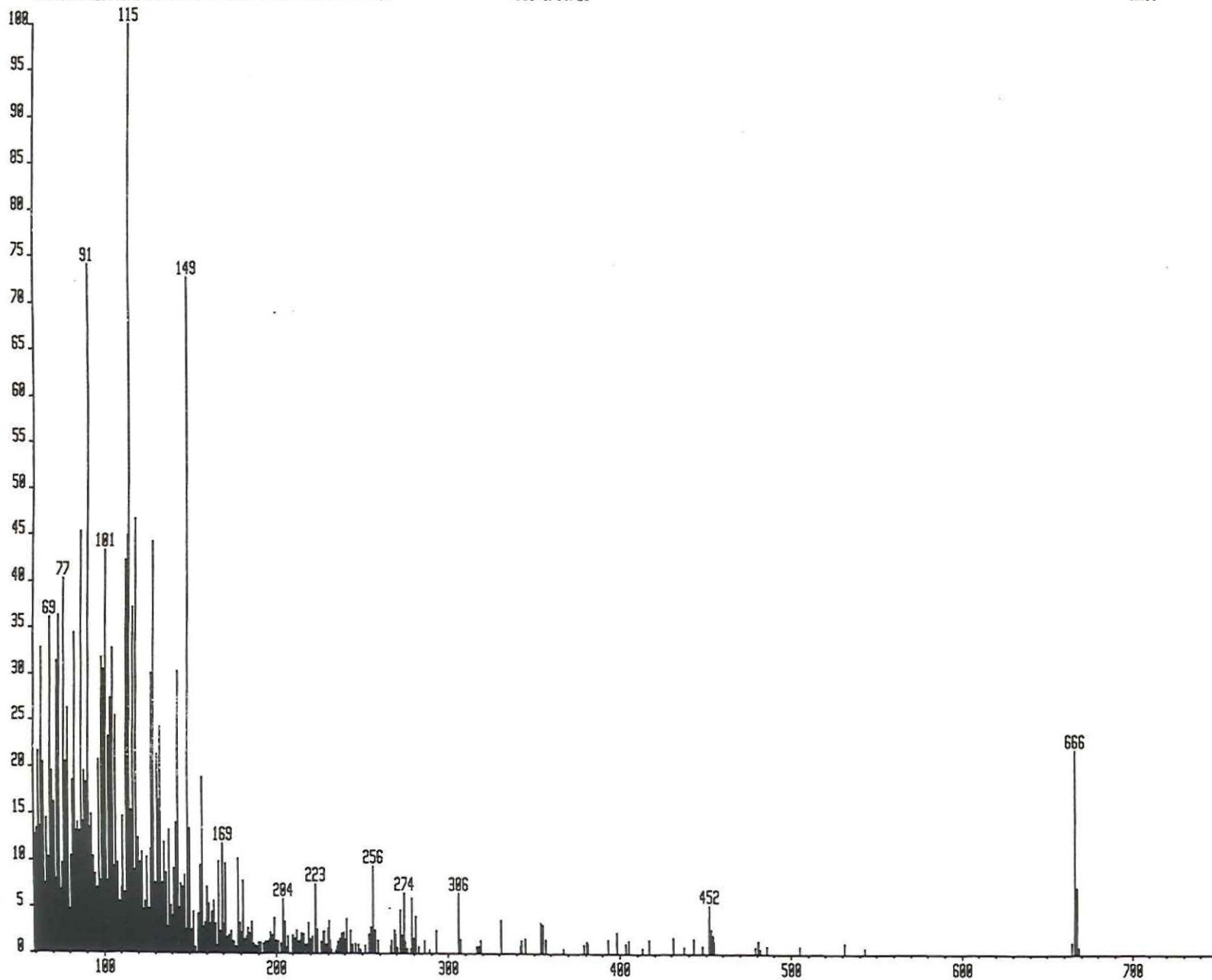
m/z 110

C₇H₁₀O

50FHNR3#4* x1 Bgd=1 16-JUL-87 11:27*0:06:00 ZABHF EI+
BpM=17 I=10v Ha=669 TIC=2198505904 Acnt:RIKILT Sys:750PEI
Text:NORTESTOSTERON-2XHF8 IN ISOCTANE EIMS-70EV-70C. Cal:C750PEI

HMR: 43636000
MASS: 115

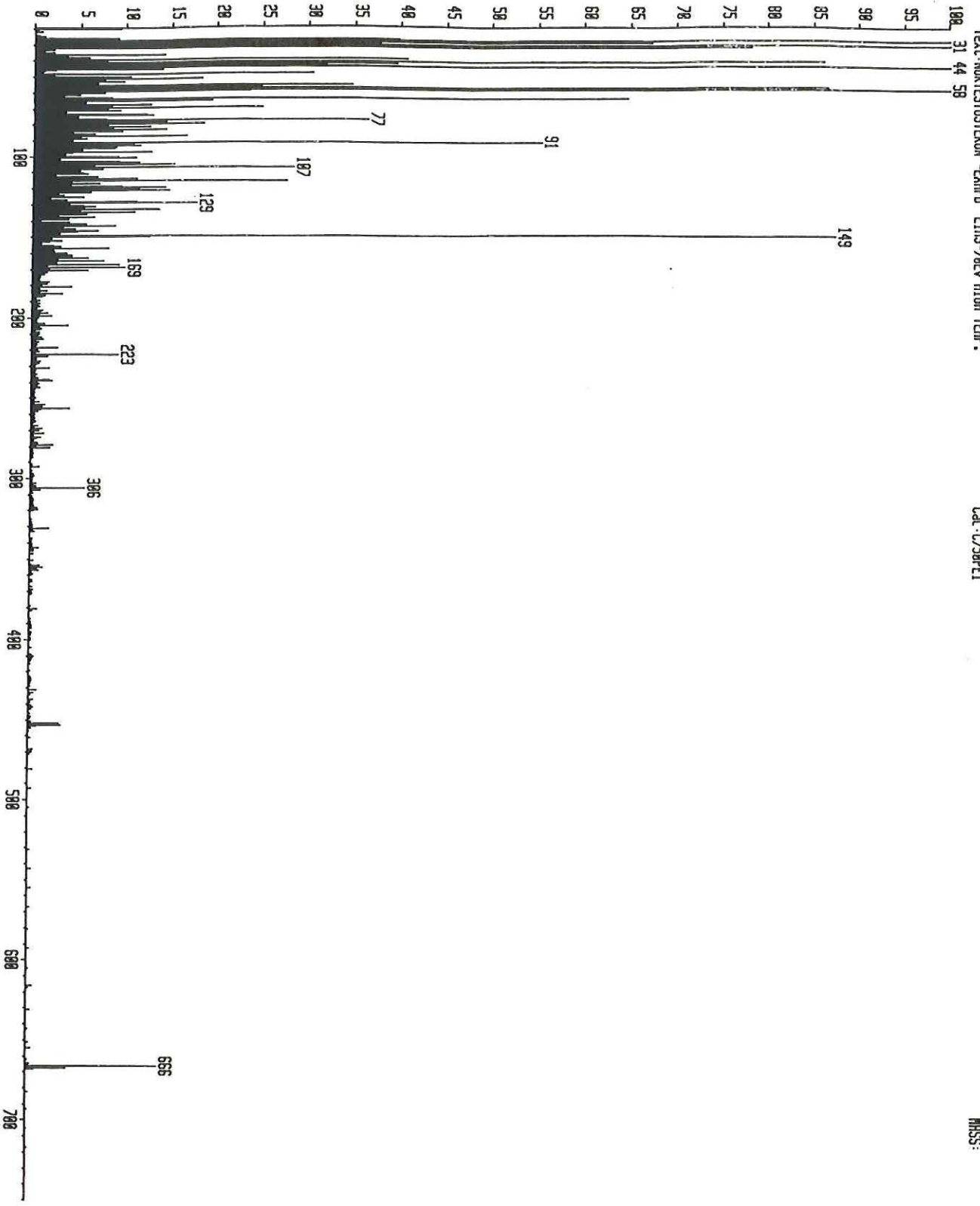
figuur 8



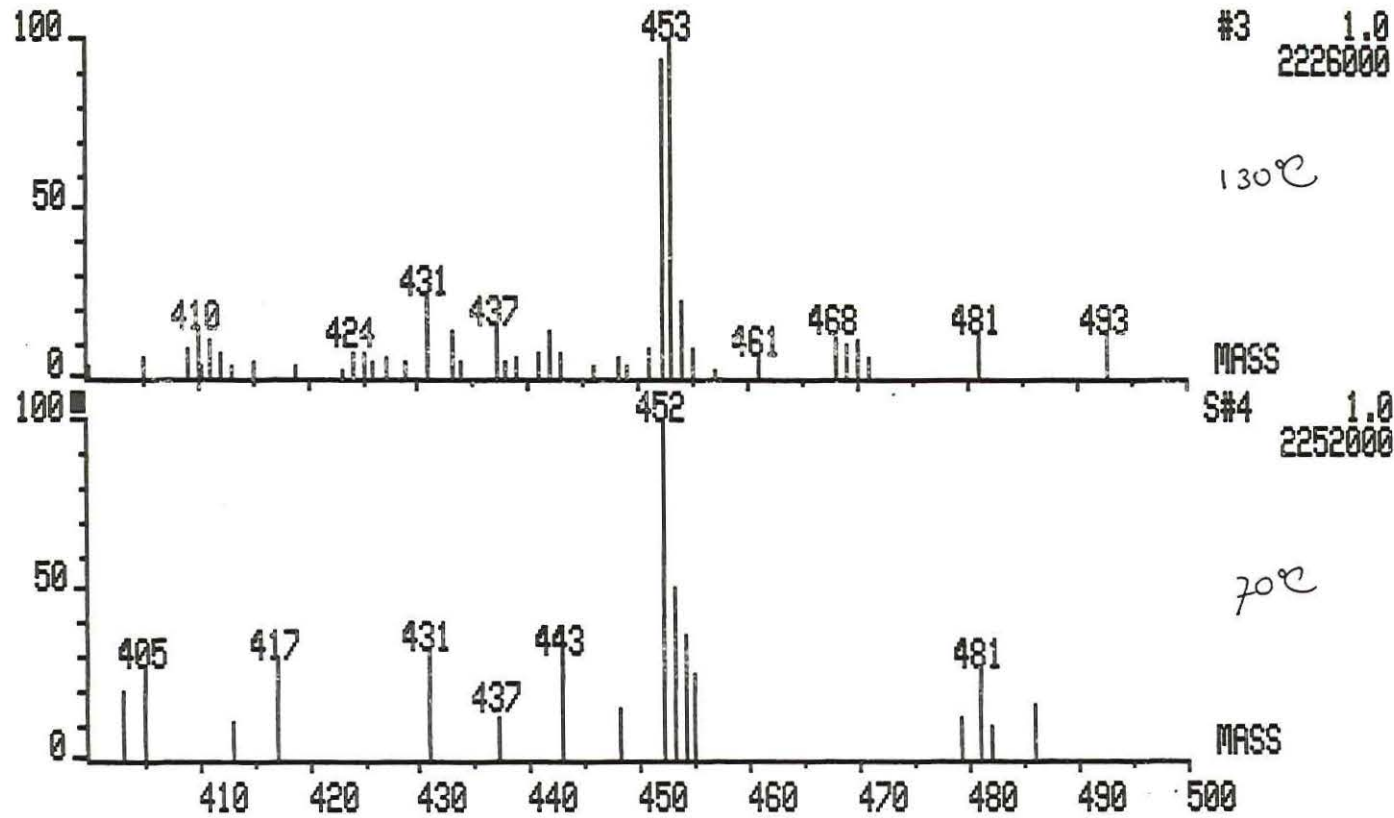
figuur 9

SF7H0833* x1 Bgd=1 16-JUL-87 13:47:01:19 ZRRHF EI+
BpH=0 I=10v Ha=717 TIC=19329692 Rcnt: RIKILI Sys: 758PEI
Text: NORTESTOSTERON -2XHF8 EIMS-70EV HIGH TEMP. Cal: C758PEI

HR: 65534000
MGSS: 58

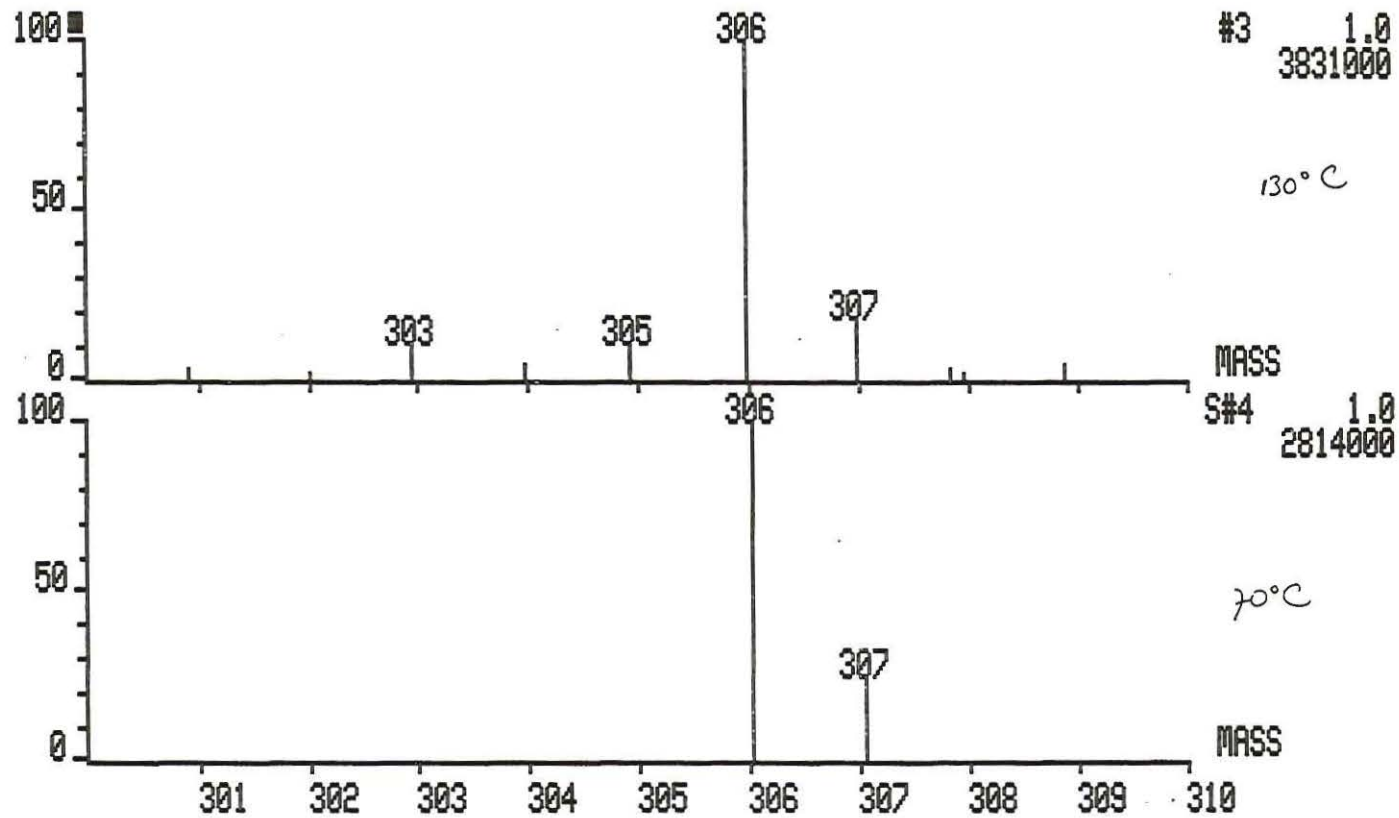


50FHNR3#4* x1 Bgd=1 16-JUL-87 11:27+0:06:00 ZABHF EI+
BpM=17 I=10v Hm=669 TIC=2198505984 Acnt:RIKILT Sys:750PEI
Text:NORTESTOSTERON-2XHFB IN ISOCTANE EIMS-70EV-70C. PT=0 Cal:C750PEI



figuur 10

50FHNOR6#3* x1 Bgd=1 16-JUL-87 13:47+0:01:18 ZABHF EI+
BpM=0 I=10v Hm=717 TIC=1932996992 Acnt:RIKILT Sys:750PEI
Text:NORTESTOSTERON -2XHFB EIMS-70EV HIGH TEMP. PT=0 Cal:C750PEI

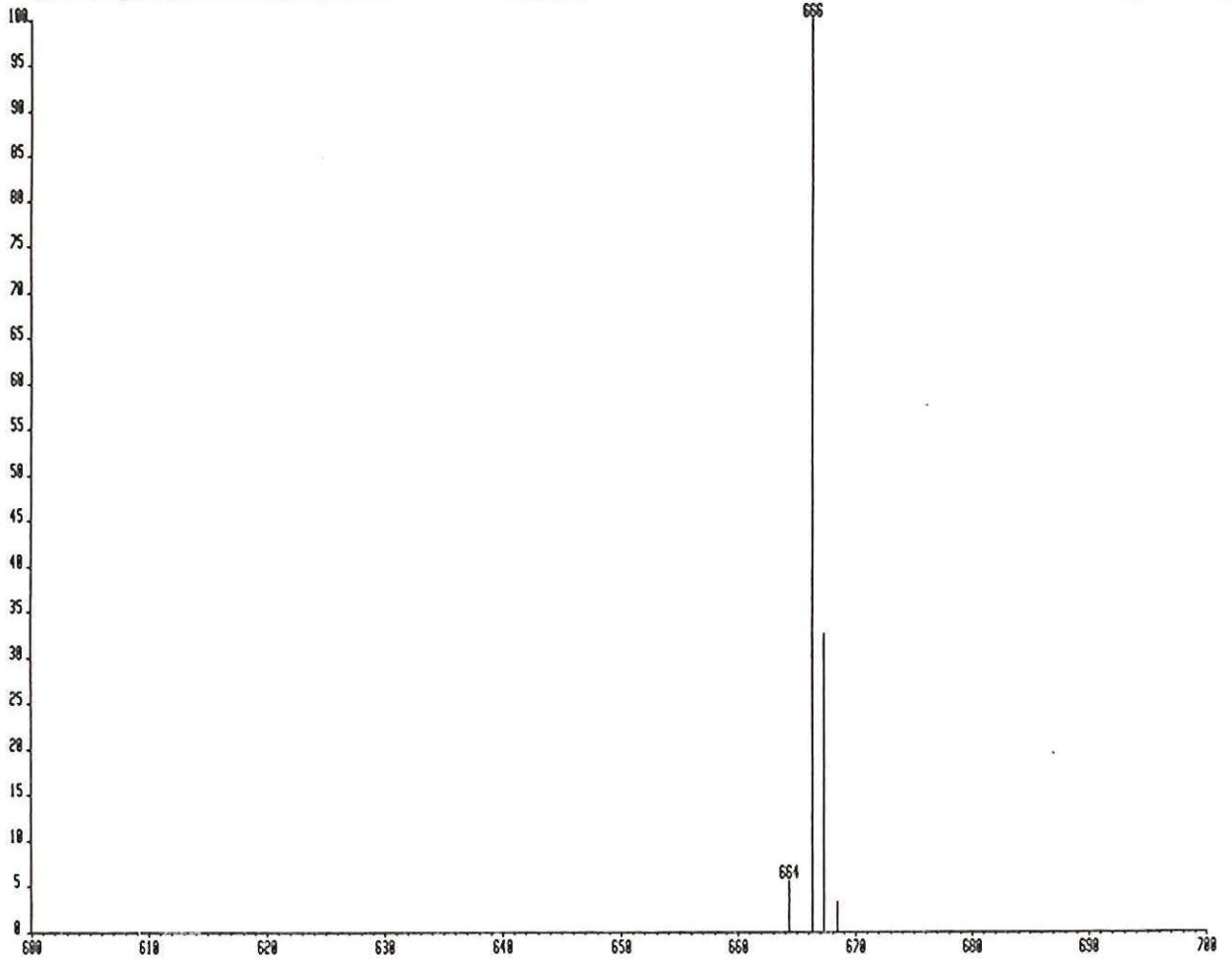


figuur 11

SOFINOR344 xl Dgd=1 16-JUL-87 11:27:06:00 Z800F EI+
DpH=17 I=10v Ha=669 TIC=219858584 Rent:RIKILT Sys:750PE1
Text:MORTESTOSTERON-Z80FB IN ISOCUTANE EINS-70EV-70C. Cal.:C750PE1

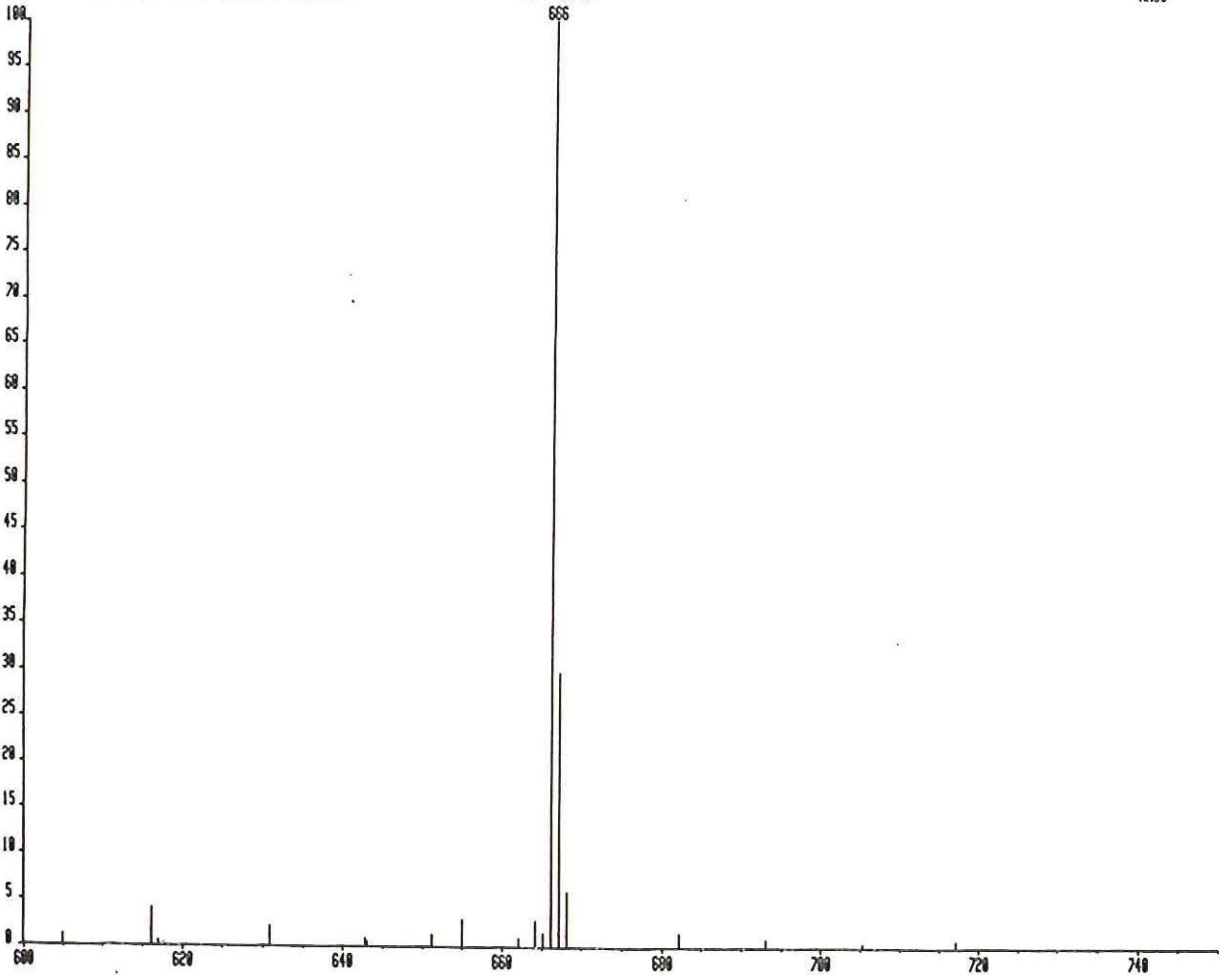
figuur 12

HPR: 953800
MSS: 666



SOFINOR613 xl Dgd=1 16-JUL-87 13:47:01:10 Z800F EI+
DpH=8 I=10v Ha=717 TIC=133236692 Rent:RIKILT Sys:750PE1
Text:MORTESTOSTERON-Z80FB EINS-70EV HIGH TEMP. Cal.:C750PE1

HPR: 923800
MSS: 666



50FHNOR6M#1* x1 F:MIKES 16-JUL-87 13:57+0:02:59 ZABHF EI+

BpM=0 I=10v Hm=0 TIC=0

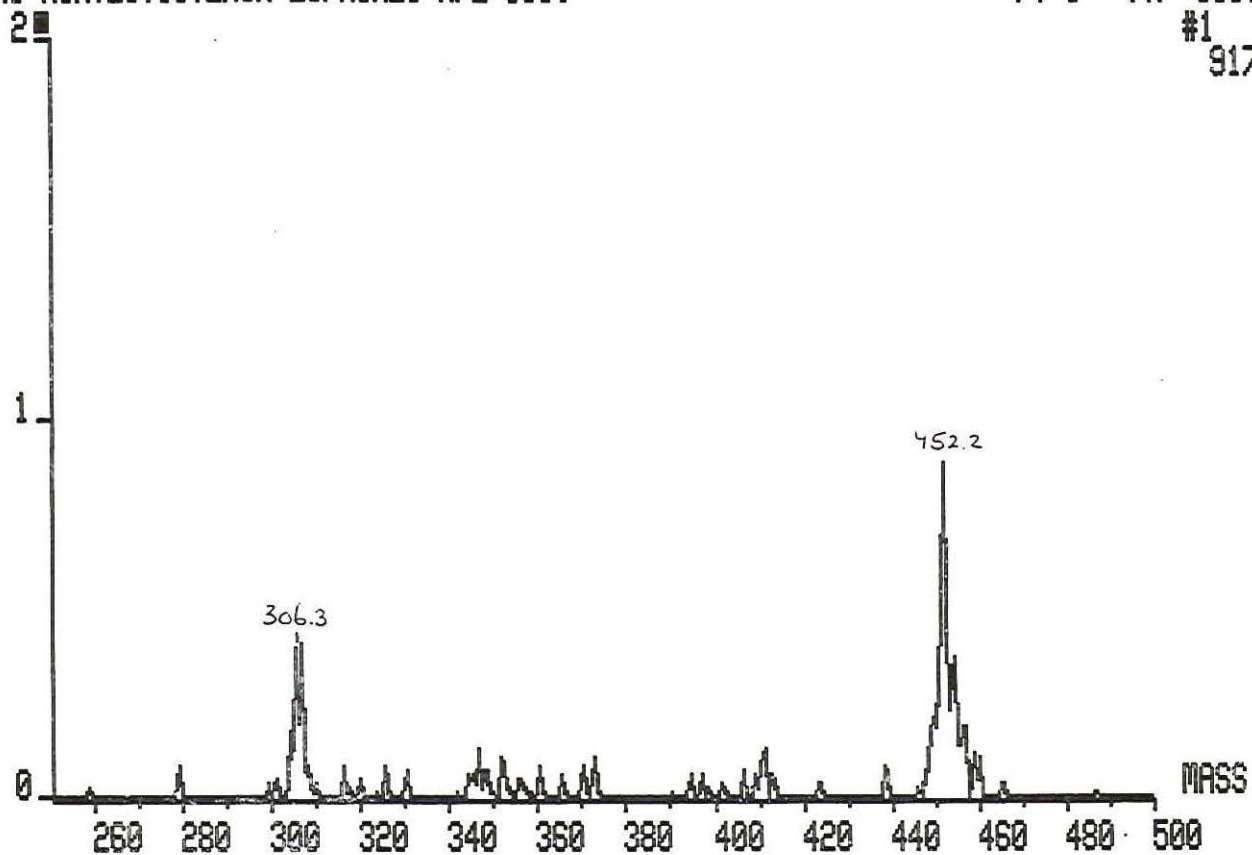
Acnt:RIKILT Sys:RFMIKES

Text:NORTESTOSTERON EI/MIKES M/Z=666.

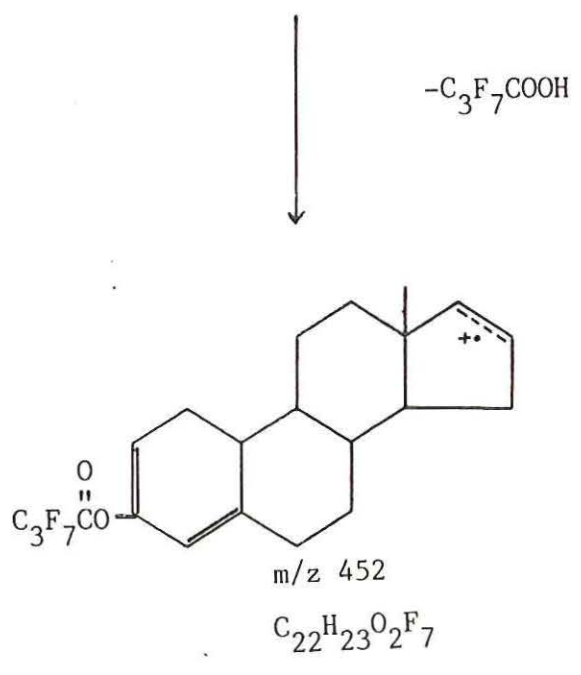
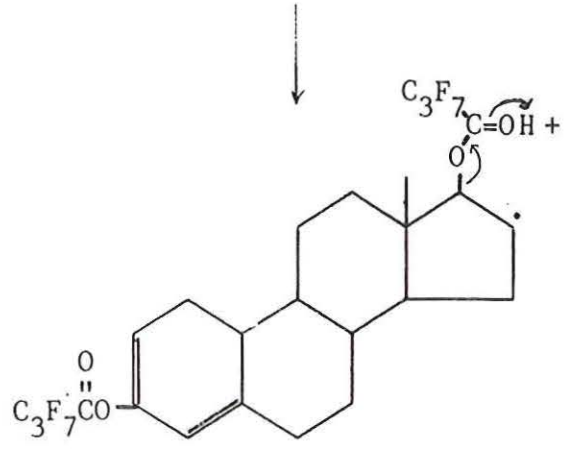
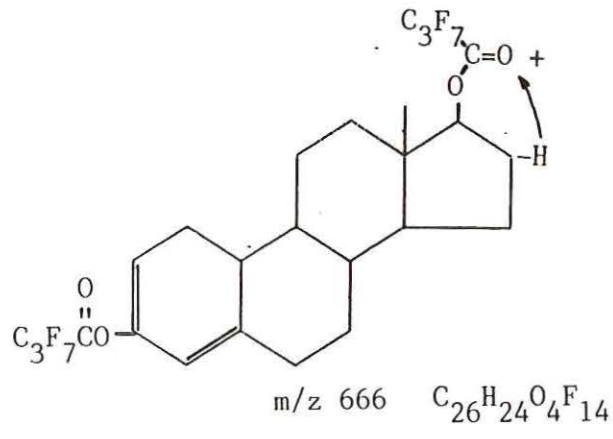
PT=0 FM:666.000

#1 50.0
917489984

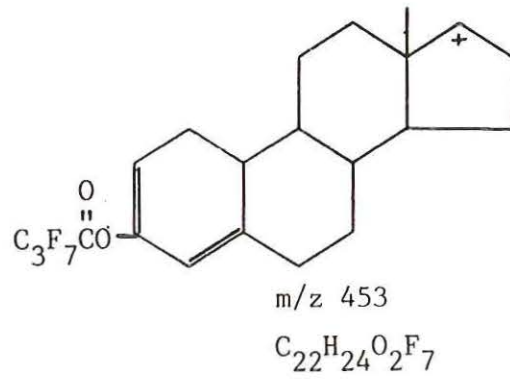
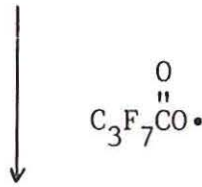
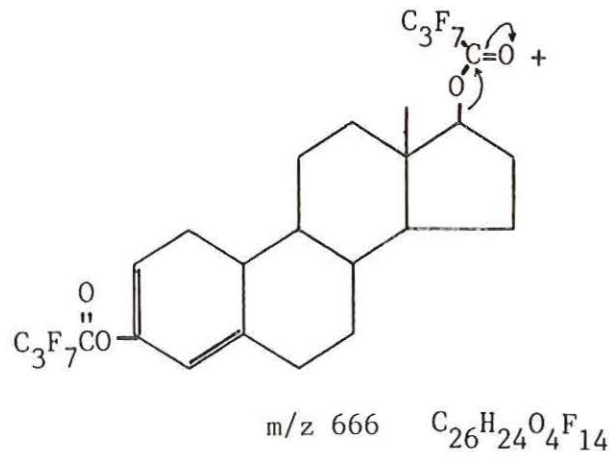
figuur 13



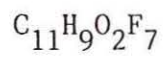
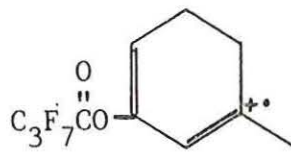
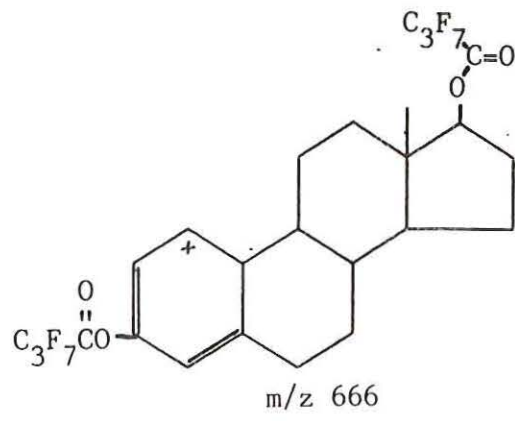
figuur 14



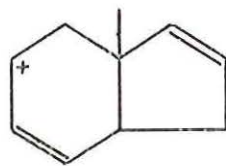
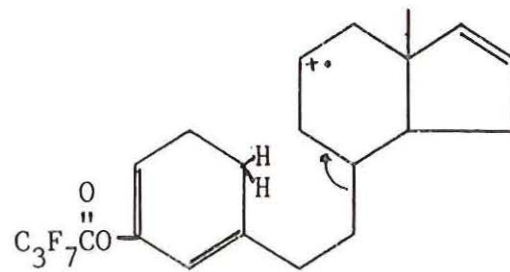
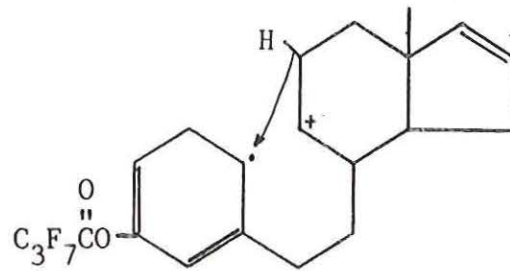
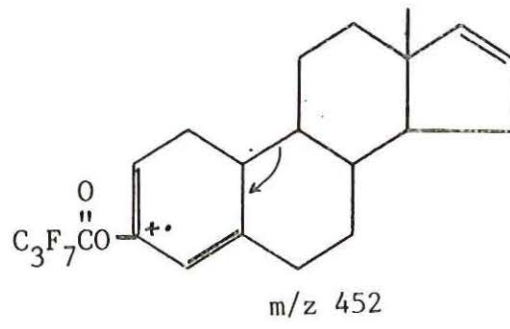
figuur 15



figuur 16



figuur 17



m/z 133

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}$

tabel 1

ACCURATE MASS MEASUREMENTS:

NORTESTOSTERON-DI HFB DER.

MASS	REF.MASS*	DECADEBOX	EXP.FOUND	CALC MASS	PPM	ELEM.COMP
666	654.96008	1.0170786	666.14590	666.14511	1.2	C ₂₆ H ₂₄ O ₄ F ₁₄
453	442.97286	1.0230124	453.16674	453.16645	0.6	C ₂₂ H ₂₄ O ₂ F ₇
452	442.97286	1.0207375	452.15901	452.15863	0.8	C ₂₂ H ₂₃ O ₂ F ₇
306	304.98244	1.0034956	306.04856	306.04908	1.7	C ₁₁ H ₉ O ₂ F ₇
133	130.99202	1.0161070	133.10193	133.10173	1.6	C ₁₀ H ₁₃

* perfluorokerosine

tabel 2

Mass Calculation Mode

Formula	Mass
C ₂₆ H ₂₄ O ₄ F ₁₄	666.1451050200
C ₂₂ H ₂₄ O ₂ F ₇	453.1664529900
C ₂₂ H ₂₃ O ₂ F ₇	452.1586279500
C ₁₁ H ₉ O ₂ F ₇	306.0490773900
C ₁₀ H ₁₃	133.1017255200