

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU
BILTHOVEN

Rapport nr. 573005 004

**Onderzoek naar het gebruik van medroxyprogesteron-,
chloormadinon-, megestrol- en melengestrol-acetaat
in slachtdieren**

Methodevalidatie en bewakingsonderzoek

P.W. Zoontjes, A.A.M. Stolker, R.W. Stephany en

L.A. van Ginkel.

september 1996

VERZENDLIJST

Verzendlijst behorende bij Rapport nr. 573005 004

1 - 8	Veterinaire Inspectie/Inspectie Gezondheidsbescherming
9	Veterinaire Inspectie Rotterdam
10	Veterinaire Inspectie 's Hertogenbosch
11	Veterinaire Inspectie Groningen
12	Veterinaire Inspectie Arnhem
13	Directeur-Generaal Volksgezondheid
14	Hoofdinspecteur voor Gezondheidsbescherming
15	Directie Gezondheidsbeleid (GZB)
16	Directie RVV
17	Directie RIKILT-DLO
18	Manager CLRVV
19	Inspectie Gezondheidsbescherming Zutphen
20	Inspectie Gezondheidsbescherming Goes
21	Inspectie Gezondheidsbescherming Leeuwarden
22	Inspectie Gezondheidsbescherming Rotterdam
23	Algemene Inspectie Dienst
24	Overleggroep Residu Analyse (ORA)
25	Benelux werkgroep SP/LAB/h
26	Depot van Nederlandse publikaties en bibliografie
27	De Ware(n)-Chemicus
28	Directie RIVM
29	Ir. H.P. van Egmond, Drs. S.S. Sterk en Dr. R.C. Schothorst
30	Hoofd voorlichting
31	Directeur S3
32-35	Auteurs
36	Bureau Rapportenregistratie
37-39	Bibliotheek RIVM
40-60	Bureau Rapportenbeheer
61-70	Reserve

INHOUD	<u>blz.</u>
Verzendlijst	2
Samenvatting	4
Summary	5
1. Inleiding	6
2. Materialen en Methode	9
2.1 Materialen	9
2.2 Methode	9
3. Resultaten	11
3.1 Validatie van de analysemethode	11
3.2 Bewakingsonderzoek 1994	18
4. Discussie	19
5. Conclusie	19
Referenties	20
Bijlage 1 : SOP ARO/ 399 : 'Analysis of kidney fat samples for gestagens.'	21 - 29

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU

Rapport nr. 573005 004

Onderzoek naar het gebruik van medroxyprogesteron-, chloormadinon-, megestrol- en melengestrol-acetaat in slachtdieren; Methodevalidatie en bewakingsonderzoek

P.W. Zoontjes, A.A.M. Stolker, R.W. Stephany en L.A. van Ginkel.

september 1996

SAMENVATTING

Ten behoeve van bewakingsonderzoek naar het voorkomen van residuen van stoffen met groeibevorderende werking werd onderzoek verricht naar de aanwezigheid van residuen van medroxyprogesteron-, melengestrol-, megestrol- en chloormadinon-acetaat in monsters niervet. Daar het gebruik van genoemde stoffen voor dit doel niet is toegestaan geldt geen Maximale Residu Limiet (MRL). Vanwege het feit dat de bestaande analysemethode arbeids- en tijdsintensief is, werd een nieuwe methode op basis van vaste fase extractie, gas chromatografische scheiding en massaspectrometrische detectie ontwikkeld.

De binnen-laboratorium reproduceerbaarheid op het concentratie niveau van 2 µg/kg bedraagt voor medroxyprogesteronacetaat, megestrolacetaat en melengestrolacetaat respectievelijk 19%, 14% en 18%, bepaald met monsters vet verrijkt met de betreffende analyten. Voor chloormadinon-acetaat is vanwege het ontbreken van een interne standaard alleen semi-kwantitatief onderzoek verricht. 197 Monsters niervet werden met behulp van de ontwikkelde methode geanalyseerd, één monster (0.5%) werd positief bevonden op medroxyprogesteron-acetaat. De aanwezigheid werd bevestigd op basis van de vier diagnostische ionen. De concentratie aan medroxyprogesteron-acetaat lag rond de identificatiegrens (ca. 2 µg/kg).

NATIONAL INSTITUTE FOR PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT

Report no. 573005 004

Studies on the use of acetates of medroxyprogesterone, chloromadinone, megestrol and melengestrol respectively, in slaughter animals; Method validation and surveillance

P.W. Zoontjes, A.A.M. Stolker, R.W. Stephany and L.A. van Ginkel.

September 1996

SUMMARY

This report describes the results obtained during the investigation of 197 samples of kidney fat for the presence of illegal anabolic compounds. The method used until now was laborious and the sample throughput was low. For this reason a new method was developed.

For the acetates of medroxyprogesterone, chloromadinone, megestrol and melengestrol there is no Maximum Residue Limit (MRL) since their use is prohibited. At the concentration level of 2 µg/kg the within-laboratory reproducibility was 19% for Medroxyprogesterone acetate, 14% for Megestrol acetate and 18% for Melengestrol acetate as determined with samples fortified with isotope labelled analytes. For Chloromadinone acetate only semi quantitative analysis was possible since a suitable isotope enriched internal standard was not yet available.

One sample of the 197 samples of kidney fat was found positive (0.5%). The identity of Medroxyprogesterone acetate was confirmed by the detection of four diagnostic ions. The concentration, however, was close to the identification limit, approximately 2µg/kg.

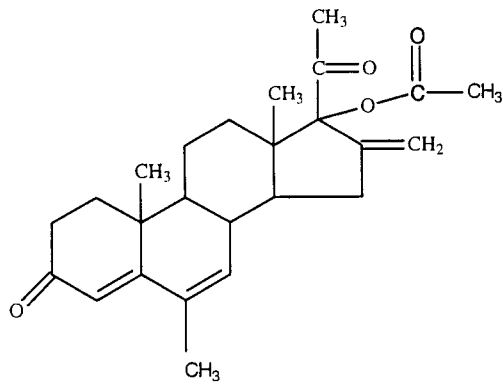
1. INLEIDING

Onderzoek naar het voorkomen van residuen van stoffen met groeibevorderende werking in slachtdieren vindt in Nederland plaats bij het Centraal Laboratorium van de Rijksdienst voor de Keuring van Vee en Vlees (CL-RVV) van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij (LNV) in het kader van de Vleeskeuring en het "Nationaal Plan Hormonen en Overige Stoffen". Daarnaast vindt echter ook regelmatig bewakingsonderzoek plaats bij het RIVM in opdracht van de Veterinaire Inspectie (VI) van het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS).

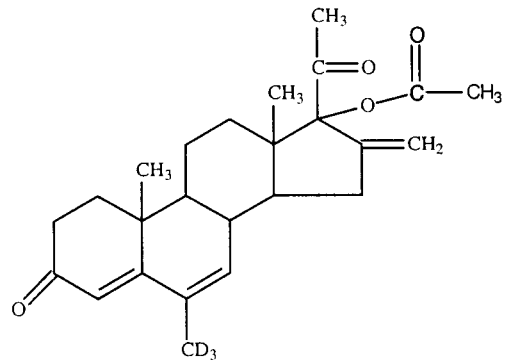
Onderdeel van deze keurings- en bewakingsprogramma's is het onderzoek op de steroïden medroxyprogesteronacetaat, melengestrolacetaat, megestrolacetaat en chloormadinonacetaat, tezamen aangeduid onder de naam "Gestagenen". Deze stoffen worden gemeten in niervet. Het gebruik van deze stoffen is verboden en derhalve is er geen MRL (Maximale Residu Limiet) van toepassing. De structuren van deze stoffen staan in Figuur 1a en 1b.

Methoden tot op heden in gebruik (3-6,8) zijn zeer bewerkelijk. Daarom werd geïnvesteerd in het ontwikkelen van een methode op basis van moderne extractie technieken gebruik makend van Solid-Phase Extractie kolommen (SPE). Gezien de noodzaak tot bevestigen van de identiteit van de aangetoonde residuen werd gekozen voor detectie met behulp van GC-MS (gaschromatografie-massa spectrometrie). De analyten werden voordat detectie met behulp van GC-MS plaatsvond gehydrolyseerd en gederivatiseerd. De identificatiegrens bedraagt ca. 2 µg/kg.

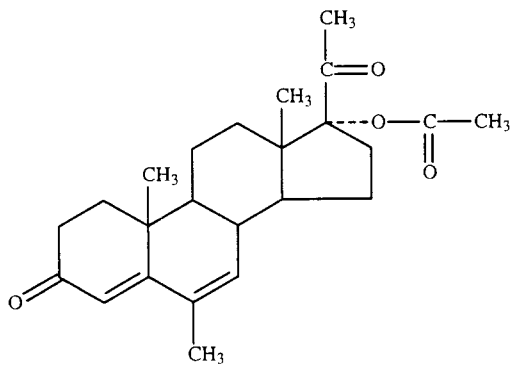
Dit rapport geeft de resultaten van de validatie van de in het standaardwerkvoorschrift (SOP) ARO/399 beschreven methode. Bovendien zijn de resultaten van het in 1994 met behulp van deze methode uitgevoerde onderzoek samengevat. Rapportage van onderzoeksresultaten heeft reeds eerder door middel van diverse brieffrapportages en integraal (onderzoeksplan 4.1994.01) plaatsgevonden (9,10).



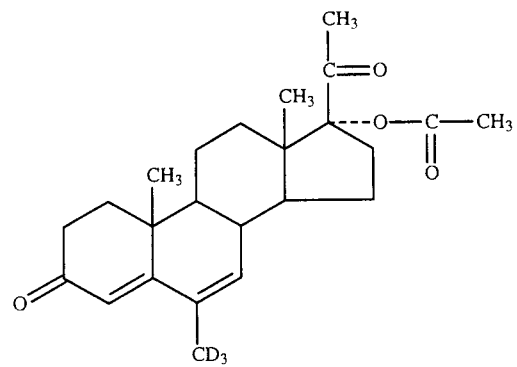
Melengestrolacetaat (mw 396)



Melengestrolacetaat-d3 (mw 399)

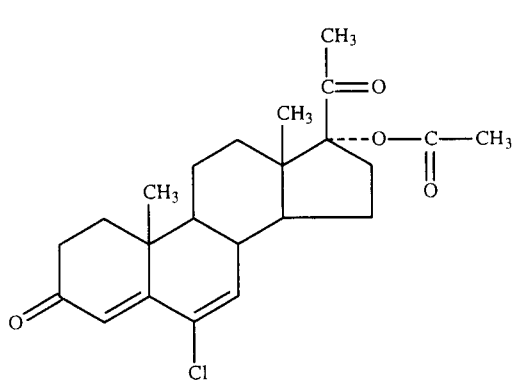


Megestrolacetaat (mw 384)

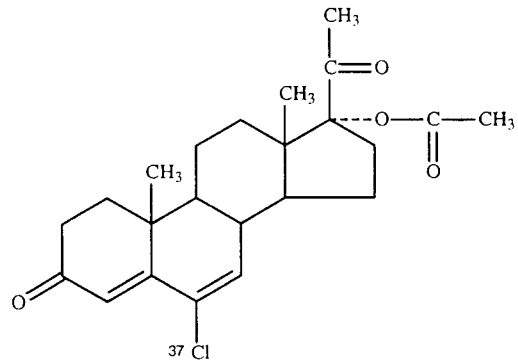


Megestrolacetaat-d3 (mw 387)

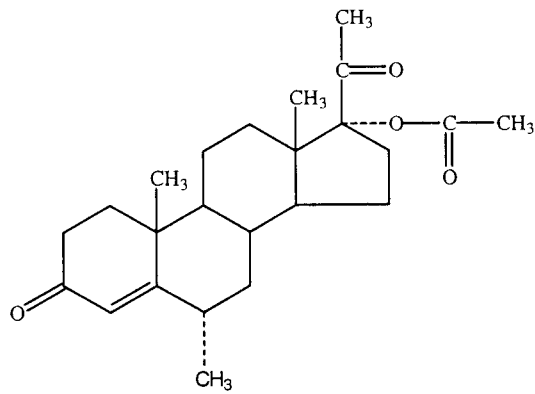
Figuur 1a : Structuurformules gestagenen



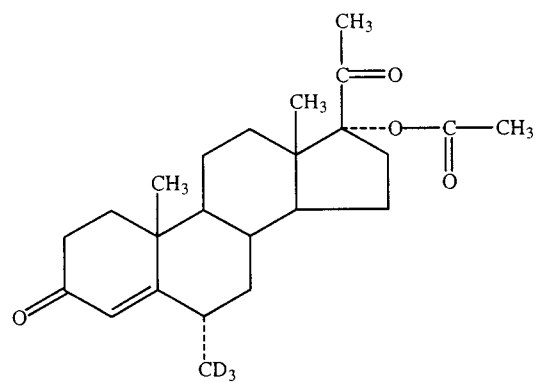
Chloormadinonacetaat (mw 404)



*Chloormadinonacetaat-³⁷Cl (mw 406)
(niet beschikbaar ten tijde van dit onderzoek)*



Medroxyprogesteronacetaat (mw 386)



Medroxyprogesteronacetaat-d3 (mw 389)

Figuur 1b : Structuurformules gestagenen

2. MATERIALEN EN METHODE

2.1 Materialen

De onderzochte monsters niervet (N = 197) werden door controleurs van de VI op slachtbedrijven verzameld en van een VI nummer voorzien. De grootte van de laboratoriummonsters lag tussen de 100 en 600 gram. De monsters werden geregistreerd in het AROMIS bestand CBMONSTER en tot het moment van analyse diepgevroren bij -20°C bewaard.

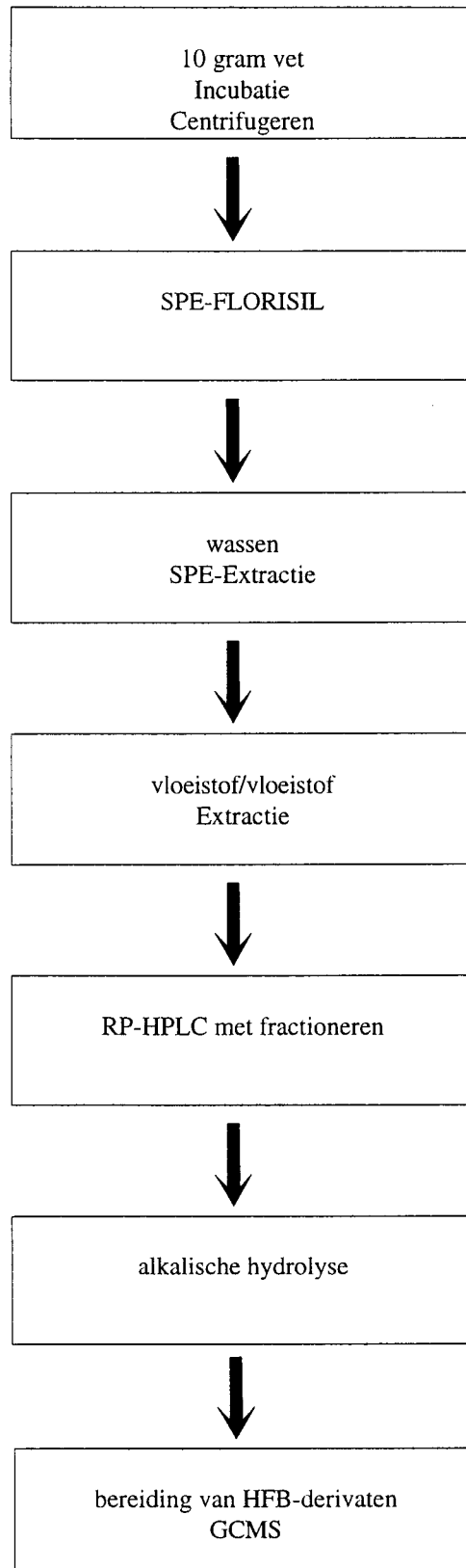
De standaarden die tijdens het onderzoek gebruikt werden staan geregistreerd in de AROMIS bestanden PREP\ROB (Referentie Objecten Bestand) .

Standaard	ARO-MIS (CB\PREP en/of CB\ROB) onder nummer
Medroxyprogesteronacetaat	H148854
Medroxyprogesteronacetaat-d3	93M3075
Melengestrolacetaat	H153456
Melengestrolacetaat-d3	94M1408
Megestrolacetaat	H148855
Megestrolacetaat-d3	94M0614
Chloormadinonacetaat	H152835

2.2 Methode

De details van de gebruikte methode worden beschreven in SOP 399 (Bijlage 1). Een analyseportie van 10 gram niervet wordt verrijkt met 2 µg/kg van de drie beschikbare interne isotoop gelabelde standaarden. Bovendien wordt bij iedere serie een blanco en een verrijkt monster meegenomen. Aan het verrijkte monster zijn zowel de isotoop gelabelde standaarden als de standaarden zelf toegevoegd. De testportie wordt opgelost in hexaan en gemengd met behulp van een Ultraturax. Na mengen, extractie en zuivering van het primaire extract vindt fractionering met behulp van HPLC (Hoge Druk Vloeistof Chromatografie) plaats. De HPLC fracties worden drooggedampt en gehydrolyseerd. Na de hydrolyse worden de fracties met HFBA gederivatiseerd en met behulp van GC-MS gemeten. De werkwijze is in onderstaand schema samengevat.

Stroomdiagram van de methode zoals uitvoerig beschreven is in SOP ARO/399 (bijlage 1)



3. RESULTATEN

3.1 Validatie van de analysemethode

De gebruikte analysemethode werd ontwikkeld omdat de bestaande methode te bewerkelijk was. Bovendien werd er naar gestreefd om de hoeveelheid chemicaliën die nodig is terug te brengen. Nadat de methode oriënterend was ontwikkeld en in een "Standard Operating Protocol (SOP)" was beschreven (Bijlage 1) is deze aan een validatie studie onderworpen. Doel van deze validatie was het vaststellen van de binnen laboratorium reproduceerbaarheid van de methode. Hiertoe werd een monster niervet waarin medroxyprogesteron-, melengestrol-, en megestrolacetaat niet aantoonbaar waren, verrijkt met 2 µg/kg van de genoemde analyten. Bovendien werden de bijbehorende interne isotoop gelabelde standaarden toegevoegd. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 1.

Tabel 1: Resultaten onderzoek verrijkte monsters niervet; aan 10 gram vet is toegevoegd 20 ng van de volgende gestagenen: medroxyprogesteronacetaat, melengestrolacetaat en megestrolacetaat. Resultaten gecorrigeerd voor terugwinning door middel van gebruik interne isotoop gelabelde standaard.

Aantal dagen (v)		16	
Aantal monsters per dag (n)		1	
totaal aantal (N)		16	
Nummer	Medroxyprogesteron-acetaat (µg/kg)	Megestrol-acetaat (µg/kg)	Melengestrol-acetaat (µg/kg)
1	1.84	1.74	1.88
2	1.74	1.74	1.28
3	1.92	1.82	1.82
4	2.00	1.94	2.20
5	2.11	1.92	1.92
6	2.74	2.01	1.84
7	1.92	1.64	2.06
8	2.51	2.01	2.07
9	1.89	2.38	1.50
10	1.86	1.85	1.61
11	1.82	1.70	1.92
12	1.83	1.58	2.58
13	1.94	1.97	1.40
14	1.91	2.45	1.87
15	3.20	1.52	2.16
16	2.05	2.12	2.41
Gemiddelde	2.08	1.90	1.91
SD	0.40	0.26	0.35
RSD %	19	14	18

Uit de resultaten in tabel 1 blijkt dat de methode juist is, dat wil zeggen geen systematische afwijkingen vertoont en bovendien een zeer acceptabele waarde voor de binnen laboratorium reproduceerbaarheid geeft.

Chloormadinon is gedurende dit experiment buiten beschouwing gebleven omdat kwantificering, bij afwezigheid van de juiste isotoop verrijkte interne standaard, niet mogelijk is. Een met 2 µg/kg verrijkt monster werd echter zonder uitzondering als positief beoordeeld. Op de volgende pagina's zijn een aantal representatieve chromatogrammen weergegeven.

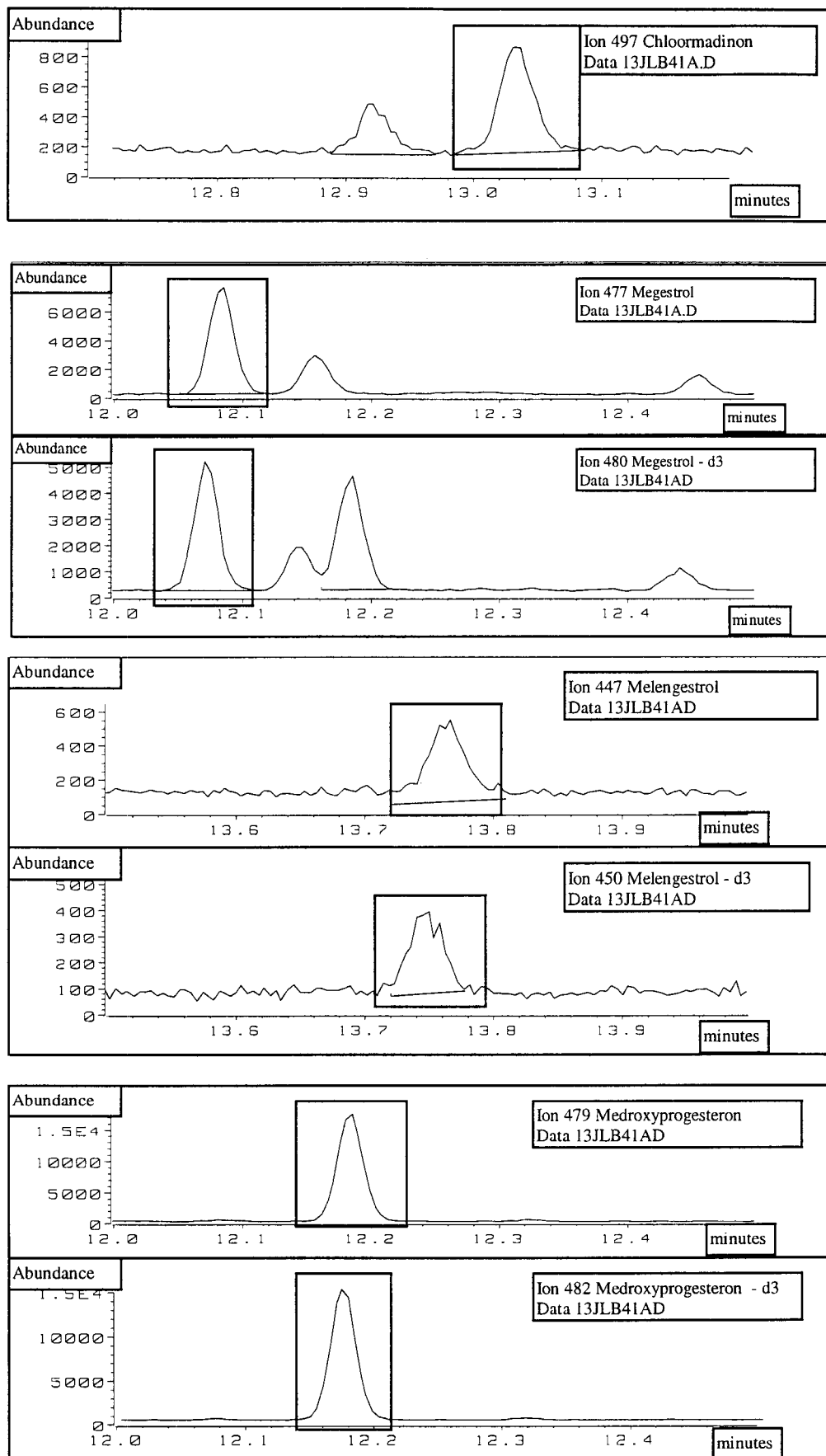
Figuur 2: mengsel van standaarden overeenkomend met 2 µg/kg.

Figuur 3: blanco monster verrijkt met de interne standaarden.

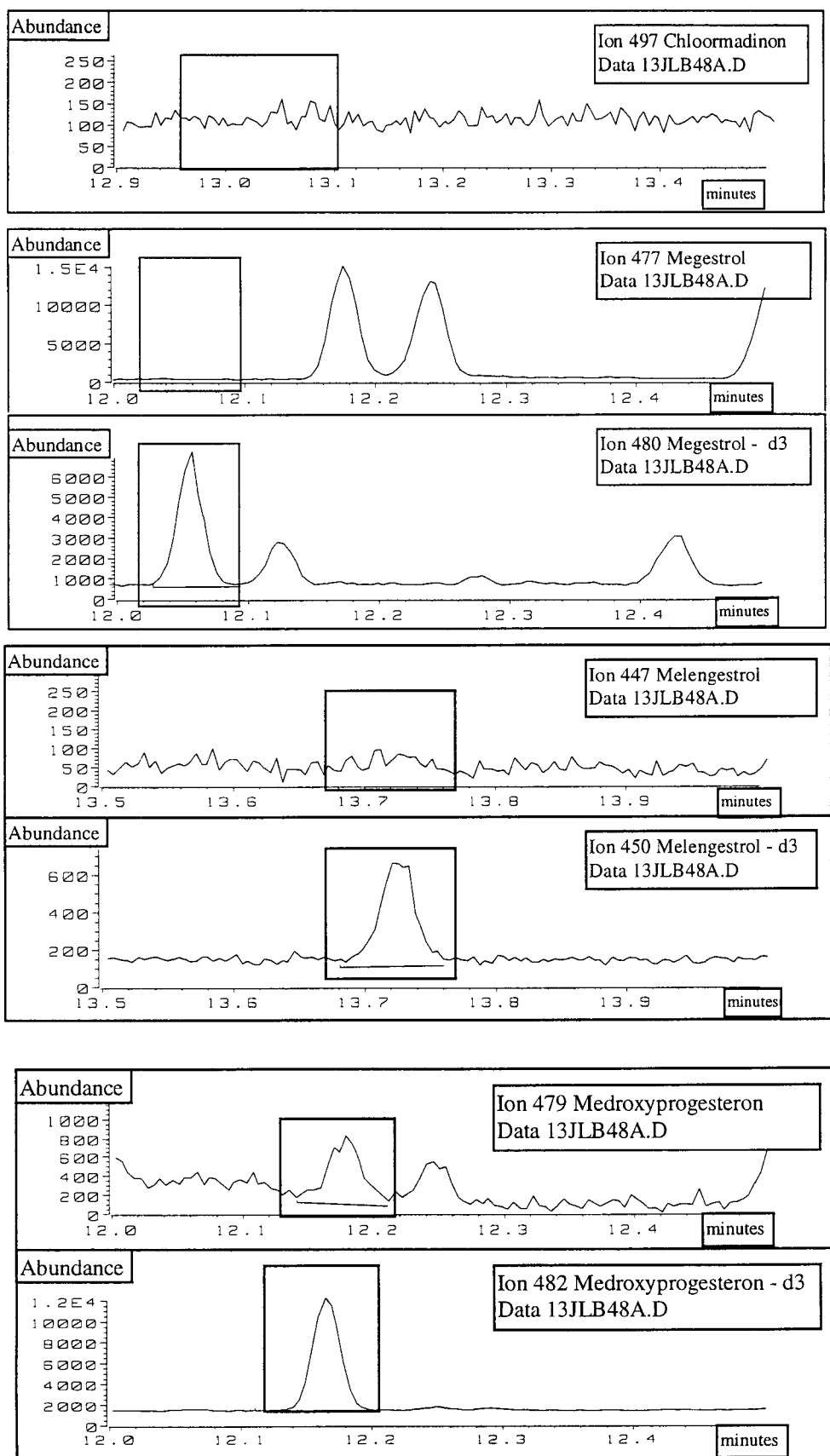
Figuur 4: als Figuur 3 maar nu eveneens verrijkt met de 4 analyten.

Figuur 5a en b : Screeningsresultaat monster 94M2361, positief op medroxyprogesteron t.o.v. blanco monster.

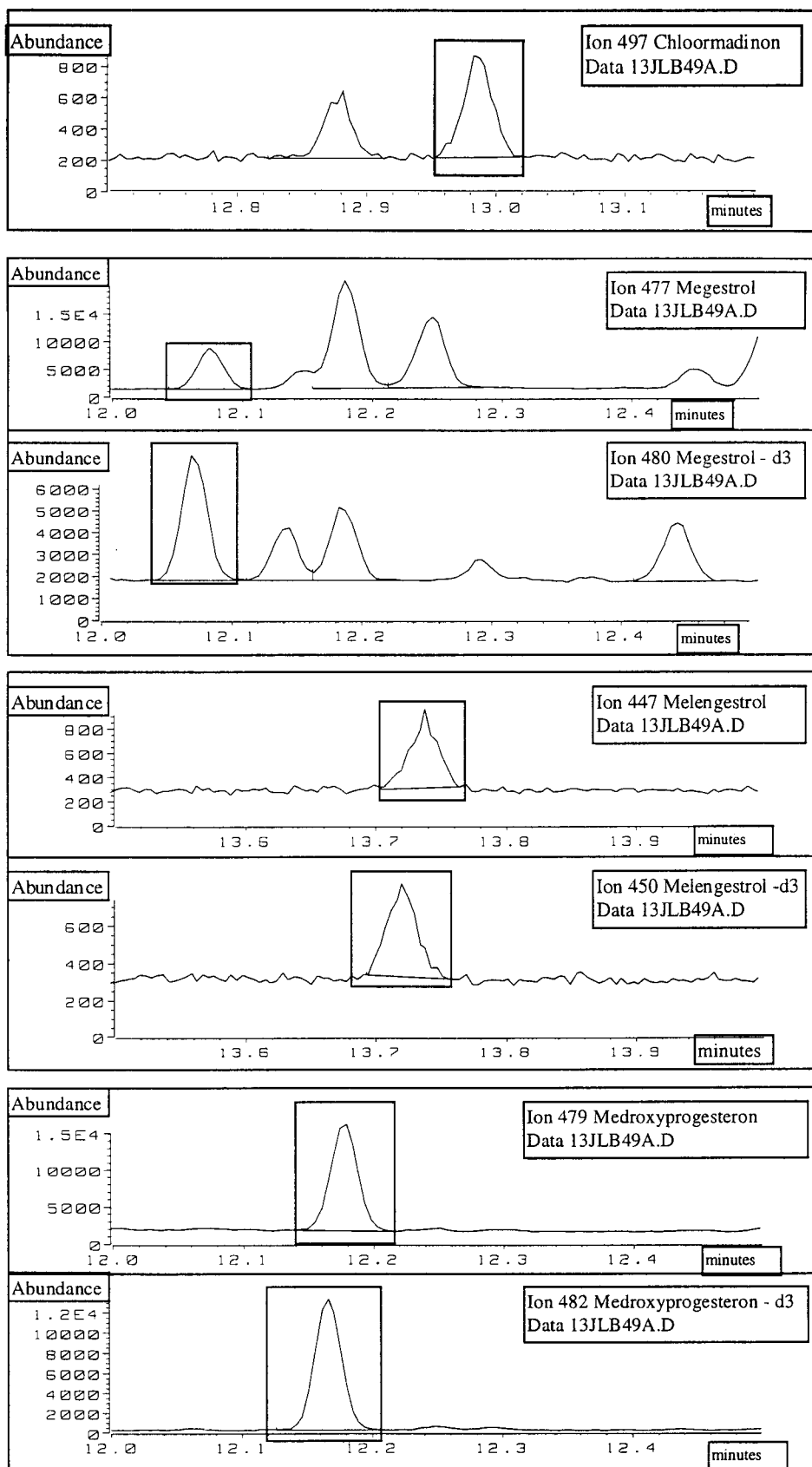
Figuur 6: bevestigingsonderzoek 94M2361.



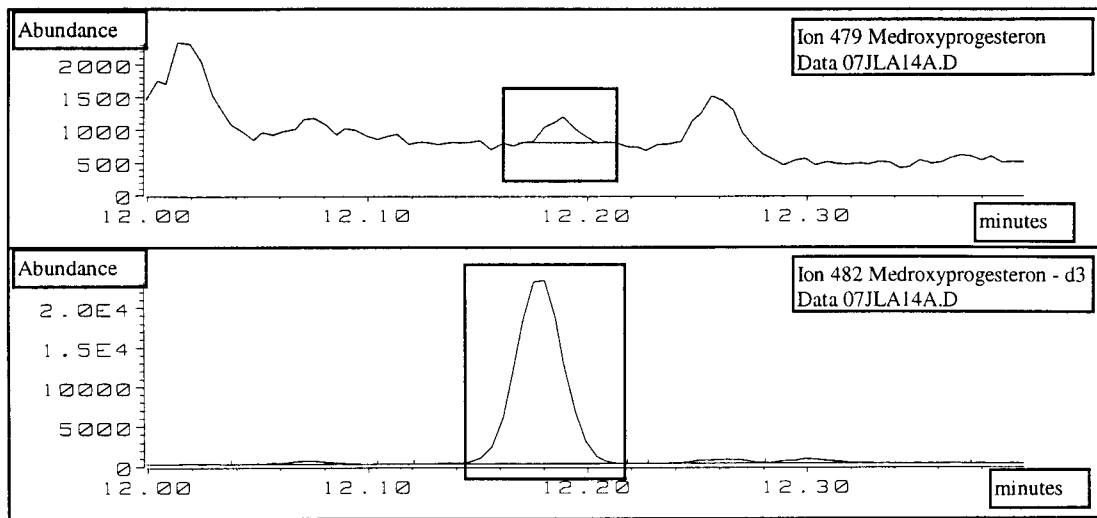
Figuur 2: standaarden 2µg/kg met interne standaarden



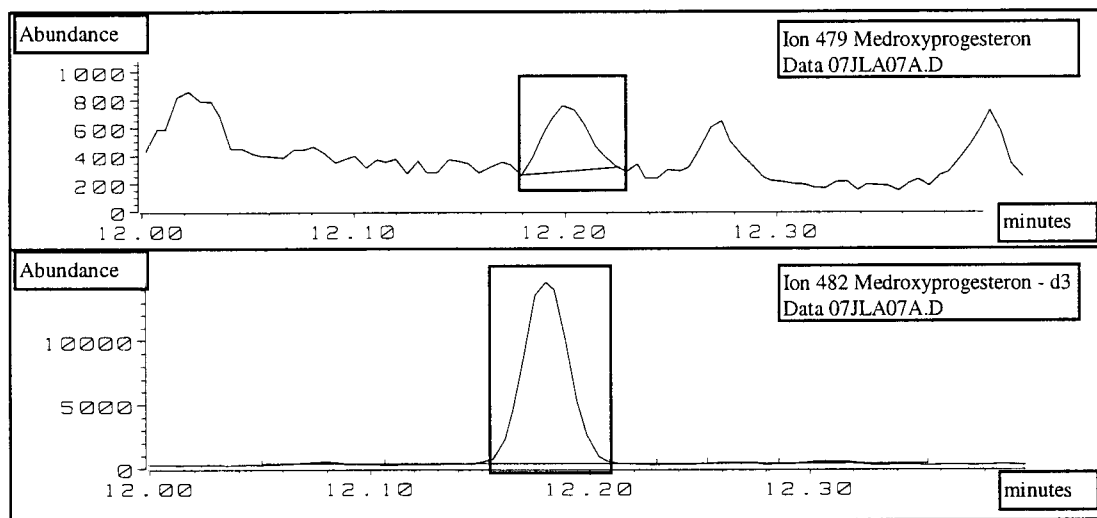
Figuur 3: Blanco monster niervet 94M4287 met een response voor Medroxyprogesteron < 0.1 µg/kg.



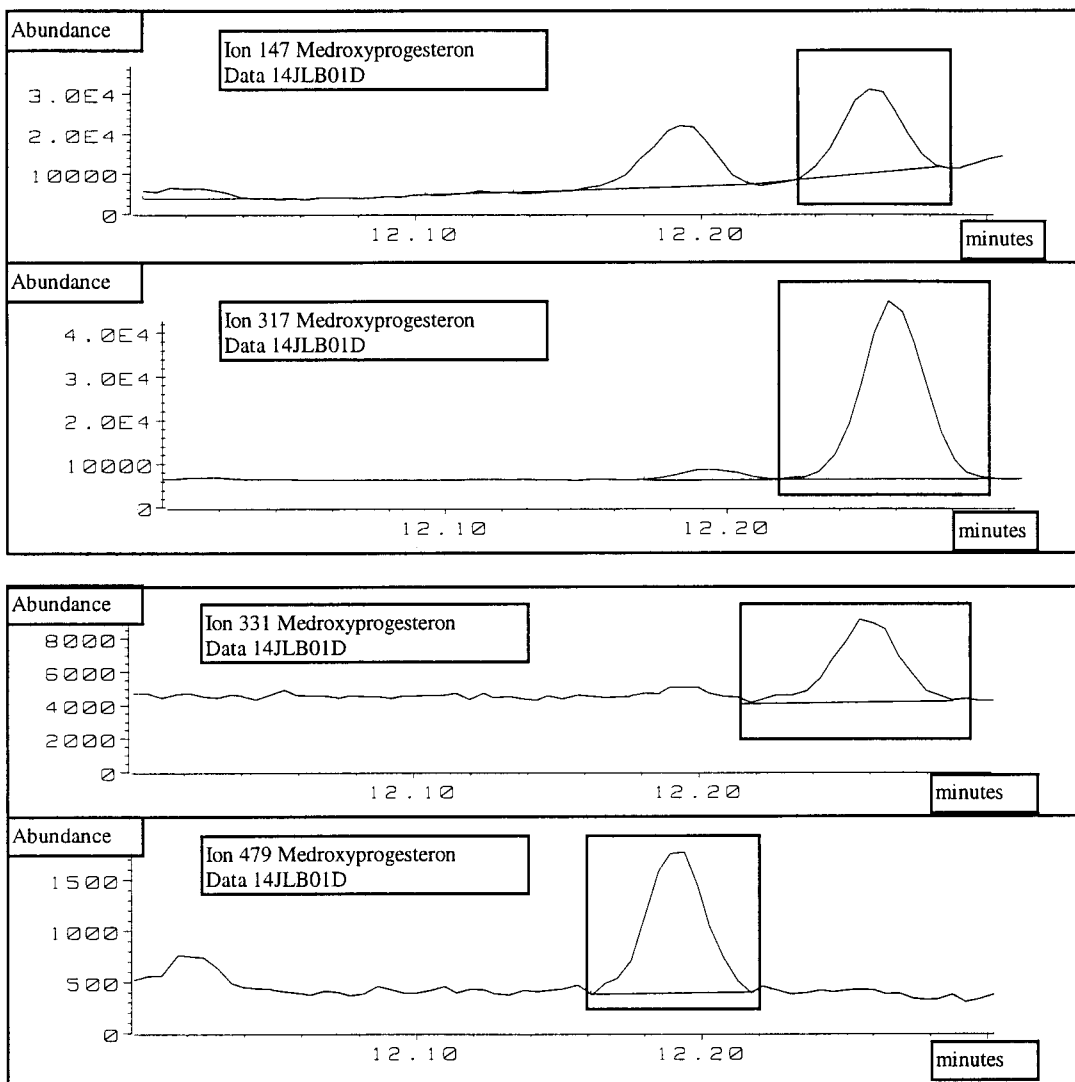
Figuur 4: monster niervet 94M4287 verrijkt met 2 µg/kg gestagenen.



Figuur 5a: Blanco niervet 94M4287 met een response voor Medroxyprogesteron < 0.1 µg/kg; ratio van ion m/z 479 t.o.v. de interne standaard van 2µg/kg m/z 482 bedraagt 0.016.



Figuur 5b: Screeningsresultaat van monster niervet 94M2361; ratio van ion m/z 479 t.o.v. de interne standaard van 2 µg/kg m/z 482 bedraagt 0.034 ⇒ monster positief.



Figuur 6 : Vier ionen bevestiging GC-MS; monster ARO 94M2361, bevestiging op grond van vier ionen afkomstig van twee gevormde HFB-derivaten, zie 3.2 Identificatie.

3.2. Bewakingsonderzoek 1994

Ten behoeve van een bewakingsonderzoek werden 197 monsters ontvangen. Deze werden conform de ontwikkelde procedure onderzocht. Per meetserie werd ten behoeve van de kwaliteitscontrole een blanco monster en een blanco monster verrijkt met 2.0 µg /kg onderzocht. Rapportage van de resultaten vond separaat plaats (9,10).

Bij het onderzoek werd 1 monster positief (Figuren 5 en 6) bevonden op medroxyprogesteron, een resultaat dat werd bevestigd op 4 ionen (afkomstig van twee gevormde isomeren van het mono HFB-derivaat) met massa-spectrometrie.

Identificatie

Zowel tijdens de screening als tijdens de bevestiging werd voor de derivatisering gebruik gemaakt van HFBA in aceton (1:4, V/V). Onder deze omstandigheden worden per analyt meerdere derivaten gevormd. Voor MP betreft het twee derivaten in een onderlinge verhouding van 1:3. In beide gevallen betreft het een monoHFB derivaat waarbij de reactie heeft plaatsgevonden op de 3-ketofunctie. Door aceton wordt verschuiving van het keto-enol evenwicht gestimuleerd waardoor de twee verschillende enol derivaten gevormd kunnen worden. Door tijdens de derivatisering het aceton door acetonitrile te vervangen kan de moleculaire verhouding tussen de twee derivaten worden beïnvloed en verschoven worden tot 1:9. Vanuit identificatieoogpunt een nadeel, voor de precisie van de kwantificering en voor de gevoeligheid een voordeel.

4. DISCUSSIE

De bij dit onderzoek gebruikte methode is geschikt gebleken voor screeningsonderzoek met een bepaalbaarheidsgrens van 2.0 µg/kg. Voor MP (medoxyprogesteron) bleek bevestiging conform de EG-criteria voor referentiemethoden op het niveau van ca 2 µg/kg goed mogelijk. De methode geeft een aanzienlijke tijdsbesparing ten opzichte van de voorheen gebruikte methode. Onderzoek op chloortestosteron is echter geen onderdeel meer van de methode. Gezien de ontwikkelingen bij het onderzoek van urine, waarbij metabolieten van chloortestosteron aantoonbaar zijn, kan het gebruik van chloortestosteron via urine-onderzoek worden opgespoord.

Nadeel van de methode is het nog steeds nodig zijn van een alkalische hydrolyse waardoor verliezen optreden door ontleding. Reproduceerbaarheid en gevoeligheid van metingen na uitvoeren van een alkalische hydrolyse zijn echter aanzienlijk beter, dan zonder toepassing van alkalische hydrolyse.

Gezien het feit dat er van de 197 monsters 1 monster positief bevonden werd, is het wenselijk om na te gaan of de matrix niervet ook geschikt is voor het onderzoek naar andere stoffen zoals nortestosteron en ethynyl-estradiol. Als dit mogelijk is, zou er over een breder gebied in één analyse gescreend kunnen worden, zonder dat dit veel meer werk oplevert. Het aantal positieven is vergelijkbaar met het onderzoek van 1993 toen er van de 83 monsters niervet er één positief werd bevonden op chloormadinonacetaat (8).

Inmiddels is aangetoond dat naast de genoemde gestagen ook delmadinon-acetaat gebruikt wordt. Er wordt gewerkt aan het opnemen van deze verbinding in de analysemethode. Ontwikkelingswerk naar de mogelijkheden ook andere groeibevorderende stoffen op te nemen kan de effectiviteit en efficiency van het onderzoeksprogramma verbeteren.

Ontwikkelingen ten aanzien van het gebruik van superkritische voestof extractie (SFE) zullen in de toekomst mogelijk van invloed zijn op de hier gevalideerde methode.

5. CONCLUSIE

Het aantal positieve bevindingen van gestagenen in niervet is vergelijkbaar met de resultaten van 1993 (in 1993: 1% positief). Slechts in één van de 197 onderzochte monsters niervet werden residuen van medoxyprogesteron acetaat aangetroffen. De identificatie grens (vier ionen bevestiging) is ca. 2µg/kg niervet.

De thans gebruikte methode voldoet goed aan de eisen voor residu methoden met betrekking tot gevoeligheid, juistheid en reproduceerbaarheid.

Uitbreiding van de analysemethode met andere gestagenen zoals delmadinonacetaat en eventueel ook andere groeibevorderende stoffen wordt aanbevolen.

REFERENTIES

1. Commission decision 93/256/EEC of 14 April 1993 laying down the methods to be used for detecting residues of substances having a hormonal or a thyrostatic action. Off. J Europ. Comm. 118 (1993)64-74.
2. Commision decision 93/257/EEC of 15 April 1993 laying down the reference laboratories for detecting residues. Off. J. Europ. Comm. 118 (1993) 75-79.
3. Automated extraction of acetylgestagens from kidney fat by matrix solid phase dispersion. Johan Rosén, Karl-karl Hellenäs and Paulina Törnqvist. *Analyst*. 1994 119.
4. Liquid chromatographic determination of melengestrol acetaat in feed
Harold M. Campbell and François Sauvé. *Journal of AOAC international* 76, 6, (1993) 1163 - 1167.
5. Analysemethode voor de bepaling van anabolica-residuen in niervet door middel van HPLC-TLC F. Smets, Brussel (B), 6 juli 1990 SP/Lab/h (90)18.
6. Bewakingsonderzoek naar gebruik van anabolica bij slachtdieren. Onderzoek van rundergehakt op residuen van boldenon, ethynylestradiol, medroxyprogesteron, chloormadinon en megestrol.
RIVM Rapport 388701 010, maart 1991.
L.A van Ginkel, R.W. Stephany, P.W. Zoontjes, H.J. van Rossum, F.X.R. van Leeuwen en P.L.W.J. Schwillens.
7. Toxicological evaluation of medroxyprogesterone acetate
RIVM, Toxicology Advisory Center, june 1987.
K. Otermann, R. van Leeuwen, P. Peters, C van der Kramers.
8. Bewakingsonderzoek 1993 naar het voorkomen van residuen van anabolica, beta-agonisten en tranquillizers in slachtdieren.
RIVM, Rapport 573005002, november 1995.
L.A van Ginkel, H.J. van Rossum, en P.L.W.J. Schwillens. , P.W. Zoontjes
G.H. Hägele, F.W. Janssen, R.W. Stephany.
9. Briefrapporten aan VWS/Veterinaire Hoofdinspectie 742/94 ARO, 1333/94 ARO, 1611/94 ARO, 2255/94 ARO, 0315/95 ARO.
10. Bewakingsonderzoek 1994 naar het voorkomen van residuen van beta-agonisten, gestagenen en tranquillizers in slachtdieren. RIVM Rapport nr. 573005 006, september 1996.
A.A.M. Stolker, H.J. van Rossum, P.L.W.J. Schwillens, P.W. Zoontjes, G.H. Hägele, F.W. Janssen, R.W. Stephany en L.A. van Ginkel.

Bijlage 1:

Title : Analysis of kidney fat samples for gestagens**SOP-no. : ARO/399****Appendices : 0****Revision no. : 1****Date : 961004****CONTENTS**

- 1. Introduction**
- 2. Scope**
- 3. Field of application**
- 4. References**
- 5. Definitions**
- 6. Principle of the method**
- 7. Materials**
- 8. Method of analysis**
- 9. Interpretation and Calculation**
- 10. Related documents**

1. Introduction

Throughout the European Union, the use of anabolic agents is prohibited in food producing animals. Also the Maximum Residue Levels (MRL) for residues of these anabolics in animal products is zero (non-detectable). Analytical strategies are needed for monitoring the use by checking biological samples.

2. Scope

This method of analyses describes the detection and confirmation of the presence of gestagens in samples of kidney fat. Within the field of application only semi-quantitative methods are needed. However, when isotope enriched internal standards are available and the purity of the standard used for identification and calibration is known, the method can be considered quantitative.

3. Field of application

The method is used to perform routine screening and confirmation analyses of samples. The limit of detection is 1.0 µg/kg for Chloromadinone(acetate)(CM(A)), Megestrole(acetate)(MGCA), Medroxyprogesterone(acetate)(MP(A)). For Melengestrole(acetate)(ML(A)). the limit of detection is 2 µg/kg. The limit of detection is based on the detection of the most abundant diagnostic ion with a response S/R ≥ 3 at the correct retention time. The limit of identification, ranges from 2.0 - 5.0 µg/kg. depending of the analyt The limit of identification equals the limit of detection as based on the diagnostic ion with the weakest intensity.

4. References

Commission decision 93/256/EEC of 14 April 1993 laying down the methods to be used for detecting residues of substances having a hormonal or a thyrostatic action.
Off. J. Europ. Comm. 118 (1993) 64-74.

Commission decision 93/257/EEC of 15 April 1993 laying down the reference laboratories for detecting residues.
Off. J. Europ. Comm. 118 (1993) 75-79.

N. Haagsma, G. Ellen, R.W. Stephany en W.G. de Ruis. Begrippen bij de bepaling van residuen in voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong. (Ware(n) Chemicus 21 (1991) 82-95.

5. Definitions

The amount of analyt in the test sample, determined according to the described method, is expressed as µg/kg of test sample regardless of the chemical form of the analyt. All other definitions are according to Haagsma et al.

6. Principle of the Method

The method is based on the use of isotope enriched compounds as internal standards. Samples are extracted (primary extract) with an organic solvent. The primary extract is cleaned on a SPE Florisil column and subsequent liquid - liquid partition. Further purification is achieved by High Performance Liquid Chromatography. The HPLC-fraction containing the gestagens is

derivatized and analysed by gas chromatography-mass spectrometry. Quantification is based on isotope dilution linear regression lines. Additional ions have to be monitored for confirmation of the identity of the analyt.

7. Materials

7.1. Standards

Standards are checked for identity (GC-MS and/or FTIR) and purity (HPLC). All reference substances available are registered in ARO-MIS CB\PREP.

Standards :

- Medroxyprogesteron acetate (MPA) (Cas# 71-58-9)
- Medroxyprogesteron acetate-d3 (MPA-d3) (RIVM/ARO 93M3072)
- Megestrol acetate (MGA) (RIVM/ARO H148855)
- Megestrol acetate-d3 (MGA-d3) (RIVM/ARO 94M0615)
- Melengestrol acetate (MLA) (RIVM/ARO H153456)
- Melengestrol acetate-d3 (MLA-d3) (RIVM/ARO 94M1411)
- Chloromadinone acetate (CMA) (cas# 302-22-7)
- Chloromadinone acetate-37Cl (CMA-³⁷Cl) (RIVM/ARO 94M5557)

The standards used for identification and calibration are registered in the ARO-MIS database CB\ROB. The isotope enriched internal standards are obtained through the "Bank of Reference Standards" (EC/MAT).

Stock solutions, containing 1 g/l, are prepared for all standards. in ethanol. These solutions are registered and stored in the dark at approximately -20°C (not higher than -10°C) for a period of maximum 5 years. A 10-fold dilution (0.1 g/l) of these standards is also stored under the same conditions. Working solutions are prepared by 10-fold dilution of the 0.1 g/l solution. These solutions are stored in the dark at approximately 4°C (range 1-10°C) for a maximum period of 6 months.

7.2. Chemicals

All listed chemicals are of Pro Analyse quality or better, unless stated otherwise.

Solutions are stored at room temperature and expire 6 months after preparation, unless stated otherwise. Water is twice distilled.

- 7.2.1. Methanol (Merck, art no. 6007).
- 7.2.2. n-Hexane (Merck, art no. 4367).
- 7.2.3. Sodium sulphate anhydrous (BDH, art no. 10398)
- 7.2.4. Florisil column 6 ml (Baker, art no. 7213-07)
- 7.2.5. Ethanol (Merck, art no. 983)
- 7.2.6. Acetonitrile (Merck, art no. 3.)
- 7.2.7. Glass microfibre filters GF/F (Whatman, 1825 047)
- 7.2.8. TBME tert-Buthylmethyl ether (Merck, art no. 1845)
- 7.2.9. SPE Solvent : Acetonitrile/water 95:5 Mix 95 ml acetonitrile with 5 ml water.
- 7.2.10. SPE Solvent : Methanol/water 40:60. Mix 40 ml methanol with 60 ml water
- 7.2.11. HPLC column Lichrospher 100 endcapped RP18 (5 mm) 125 x 4 mm (Merck, art no. 50828)

- 7.2.12. HPLC guard column Lichrospher 100 endcapped RP18 (5 mm) 4 x 4 mm (Merck, art no. 50962)
- 7.2.13. HPLC Eluens pump A : methanol/water 70:30, mix 700 ml methanol with 300 ml water and filter the solution through a (Whatman GF/F) filter (7.2.7.).
- 7.2.14. HPLC Eluens pump B : methanol 100 % (7.2.1)
- 7.2.15. Heptafluorbutyric acid anhydride (HFBA), (Pierce, art no. 63163).
- 7.2.16. Iso-octane (Merck, art no. 4718).
- 7.2.17. Acetone (Merck, art no. 14).
- 7.2.18. Acetic acid (Merck, art no. 63).
- 7.2.19. Sodium acetate (Merck, art no. 6268).
- 7.2.20. Acetate buffer, 2 mol/l, pH 5.2. Dissolve 25.2 g acetic acid (7.1.3.8.) and 129.5 g sodium acetate (7.1.3.9.) in 800 ml water. Adjust the pH (7.1.4.20.) at 5.2 ± 0.1 and add water to a final volume of 1000 ml.
- 7.2.21. Hydrochloric acid, 37% solution (Merck art no. 317).
- 7.2.22. Acidic buffer. Mix 1.7 ml hydrochloric acid (7.1.3.11.) with 98.3 ml 2 mol/l buffer (7.2.20).
- 7.2.23. Potassium hydroxide (Merck, art no. 5033).
- 7.2.24. Alkaline hydrolysis solution. Dissolve 0.56 g potassium hydroxide (7.2.23.) in 10 ml methanol (7.2.1.). **Make this solution fresh every day.**
- 7.2.25. Derivatization reagent : mix 1 part of HFBA (7.2.15.) with 4 parts of acetone (7.2.17.) v/v. Make this solution just before use.

7.3 Samples

Samples of kidney fat are stored in the dark at approximately -20°C , but not higher than -10°C , until analysis. As a rule quality control samples are included. Details on these samples are always included in the mandatory study plan.

7.4 Apparatus

For operating instructions and maintenance status see ARO-MIS database CBVINVENTAR.

Standard laboratory glassware and equipment is used, with in addition:

- 7.4.1. Glass centrifuge tubes 50 ml (Corex).
- 7.4.2. Vortex mixer.
- 7.4.3. Automatic pipettes (Gilson P100, P200, P1000 and P5000).
- 7.4.4. Refrigerated centrifuge (RC-3, Sorvall).
- 7.4.5. Centrifuge tubes RB100, glass (100 mm x 14/15 mm) (Renes, RB100 art no 31.00.50.).
- 7.4.6. Electric waterbath with thermostat adjustable $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (GFL) with nitrogen facility.
- 7.4.7. Incubator thermostat adjustable $\pm 3^{\circ}\text{C}$ (Salvis)
- 7.4.8. Heating module thermostat adjustable $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (Pierce 18790) with nitrogen facility.
- 7.4.9. Glass derivatization vials (Chromacol 2SV (A)) with screw caps (Chromacol 02-MTV) and aluminium caps (Chromacol 11-AC5).
- 7.4.10. HPLC equipment.
 - 7.4.10.1. HPLC gradient-system (2 pumps 2150 and a controller 2252) (Pharmacia).
 - 7.4.10.2. UV detector UV 2000 (Thermo Separations Products).
 - 7.4.10.3. Autoinjector AS3000 (Thermo Separations Products).
 - 7.4.10.4. Fraction collector 2112 Redirac (Pharmacia).

- 7.4.10.5. Workstation PC1000 to intergrate chromatograms and for switching valves (Thermo Separations Products).
- 7.4.11. GC-MS equipment.
 - 7.4.11.1. Gas chromatograph (Hewlett Packard, type 6890).
 - 7.4.11.2. Automatic injector (Hewlett Packard, type 7673A).
 - 7.4.11.3. Mass selective detector (Hewlett Packard, type 5972A).
 - 7.4.11.4. Workstation (Hewlett Packard, MSD Chem Station).
 - 7.4.11.5. Printer (Hewlett Packard, Laserjet 4 plus).
 - 7.4.11.6. GC-column, HP-1 Column id: 0.20 mm, film thickness 0.11 μm , length 25 m (Hewlett Packard, 19091Z-002).
- 7.4.12. pH-meter, (Schott, CG 837).
- 7.4.13. HPLC vials (Chromacol, 1.1-STVG).

- 7.4.14. Ultra turrax (Janke & Kunkel 20000 rpm).
- 7.4.15. SPE 21 solid phase system (Baker).
- 7.4.16. Adaptor (Baker, 7122-00).
- 7.4.17. Reservoir 75 ml (Baker, 7120-03).
- 7.4.18. Ultrasonic waterbath (Bransonic 32).
- 7.4.19. Caps for tube (7.4.5.).
- 7.4.20. pH-meter, (Applicon)

8. Method of analysis

- 8.1. Preparation of a primary extract

If a laboratory sample is considered suitable for analysis (adequate sample size, proper storage history and representative for analysis) the first step in the procedure is the preparation of a primary extract, including the procedures for sample cleanup and defatting.
- 8.2. Preparation of a primary fat extract
 - 8.2.1. Weigh 10 g of kidney fat (cut in small cubes) in a glass centrifuge tube (7.4.1.) and add 20 ng of a mixture of internal standards (200 μl from a mixture containing 0.1 ng/ μl (7.1.) of each compound. A Series of 16 samples includes a blank sample (see 8.2.1.1.) and a spiked sample (see 8.2.1.2.).
 - 8.2.1.1. Add internal isotope labelled standards at a level of 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for MLA-d3) to 10 g of blank kidney fat (= blank sample).
 - 8.2.1.2. Add standards and internal isotope labelled standards at a level of 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for MLA and MLA-d3) to 10 g of blank kidney fat (= "spiked" sample).
 - 8.2.2. Add 30 ml n-Hexane (7.2.2.) to each sample and also to the blank and spiked sample.
 - 8.2.3. Incubate 10 minutes at 50°C.
 - 8.2.4. Mix 30 seconds with the ultra turrax at 20000 rpm.
 - 8.2.5. Add 1.5 g Sodium sulphate anhydrous (7.2.3.).
 - 8.2.6. Mix by placing the tube on a Vortex (7.4.2.) for 30 seconds.
 - 8.2.7. Centrifugate (7.4.4.) 15 minutes at 3000 rpm at 4°C. Let the tubes stand for another 15 minutes at 4°C.
 - 8.2.8. Preparing the SPE column
 - 8.2.8.1. Place the Florisil (7.2.4.) columns on the SPE 21 system (7.4.15).

- 8.2.8.2. Condition the column with 3 x 5 ml n-Hexane (7.2.2.).
(Don't let the columns run dry).
- 8.2.8.3. Install adaptor (7.4.16.) and reservoir (7.4.17.) on the column.
- 8.2.8.4. Put the funnel, filled with glasswool, on the reservoir.
- 8.2.8.5. Pour the supernatant (8.2.7.) in the funnel.
- 8.2.8.6. As the sample has passed the funnel, remove the funnel.
- 8.2.8.7. Draw the supernatant slowly through the column by increasing the vacuum.
- 8.2.8.8. As the supernatant has passed through the column, increase the vacuum, and dry the column during 10 minutes.
- 8.2.8.9. Place a rack with tubes (7.4.5.) under the columns.
- 8.2.8.10. Elute the columns with 6 ml of ethanol (7.2.5.).
- 8.2.9. Washing and extracting
- 8.2.9.1. Evaporate the ethanol to dryness under a cold stream of nitrogen in a water-bath at 50°C.
- 8.2.9.2. Dissolve the dry residue in 2 ml of acetonitrile/water (7.2.9.) by placing the tube in an ultrasonic waterbath (7.4.18.) for two minutes, followed by placing the tube on a Vortex (7.4.2.) during 30 seconds.
- 8.2.9.3. Add 6 ml of n-hexane (7.2.2.) and put a cap (7.4.19) on the tube. Mix by placing the tube on a Vortex (7.4.2.) for 30 seconds.
- 8.2.9.4. Centrifugate (7.4.4.) 10 minutes at 2500 rpm at 20°C.
- 8.2.9.5. Remove the n-hexane.
- 8.2.9.6. Repeat steps 8.2.9.3 - 8.2.9.5.
- 8.2.9.7. Evaporated to dryness under a cold stream of nitrogen in a waterbath at 50°C.
- 8.2.9.8. Dissolve the dry residue in 2 ml of methanol/water (7.2.10) by placing the tube in an ultrasonic waterbath (7.4.18.) for two minutes, followed by placing on a Vortex (7.4.2.) during 30 seconds.
- 8.2.9.9. Add 6 ml of TBME (7.2.8.) and put a cap (7.4.19) on the tube. Mix by placing the tube on a Vortex (7.4.2.) for 30 seconds.
- 8.2.9.10. Centrifugate (7.4.4.) 5 minutes at 2500 rpm at 20°C.
- 8.2.9.11. Transfer the TBME to a clean tube (7.4.5.).
- 8.2.9.12. Evaporate the TBME to dryness under a cold stream of nitrogen in a water-bath at 40°C.
- 8.2.9.13. Repeat the procedure and combine the TBME extracts (8.2.9.9 - 8.2.4.12.).
- 8.2.9.14. Dissolve the dry residue in 120 µl HPLC eluens (7.3.3.) by placing the tube in an ultrasonic waterbath (7.4.18.) for two minutes, followed by placing on a Vortex(7.4.2.) during 30 seconds.
- 8.2.9.15. Transfer the extract into a HPLC-vial (7.4.13.).

8.3 HPLC purification

The following reversed phase system has proven to be adequate for extract purification :

Guard-column	: LichroCart 4-4 (7.2.12.)
Analytical column	: LichroCart 125-4 (7.2.11.)
Flow rate	: 0.8 ml/min
Injection volume	: 100 µl

A gradient system is required in order to collect all fractions.

The variability of the retention time should be less than 0.1 minute.

A standard mixture of compounds (approximately 50 ng of each compound) is injected at least 3 times, to monitor the retention times. Before starting analysing the samples, injection of a blank sample is recommended (control for carry-over).

The gradient conditions are :

Pump A Solvent (7.2.13.)

Pump B Solvent (7.2.14.)

0.1 minute to 5.0 minutes	A = 100 %	and	B = 0 %
5.0 minutes to 12.0 minutes	A = 100 %	to	A = 58 % + B = 42 %
12.0 minutes to 14.0 minutes			A = 58 % + B = 42 %
14.0 minutes to 15.0 minutes	B = 42 %	to	A = 0 % + B = 100 %
15.0 minutes to 17.0 minutes			A = 0 % + B = 100 %
17.0 minutes to 17.5 minutes	B = 100 %	to	A = 100 % + B = 0 %

The times during which the fraction is collected are calculated as follows:

start fraction : RT from the first peak + 0.3 minute - 1.0 minute.

end fraction : RT from the last peak + 0.3 minute + 1.0 minute

(0.3 minute describes the transfer time between the detector and the collecting tube).

The eluent is removed under a cold stream of nitrogen in a water bath at 50°C.

8.4 Alkaline hydrolysis

- 8.4.1. Pipet directly into the tubes (7.4.5) aliquots of the standard solutions. The following amounts are used ; 0, 10, 20, 40, and 50 ng of analytes respectively. The amount of the internal standard must be identical to the amount added to the samples.
- 8.4.2. Dry the standards under a cold stream of nitrogen in a water bath at 50°C.
- 8.4.3. The dry standards and HPLC fractions are dissolved in 0.2 ml alkaline hydrolysis solution (7.2.24.). This mixture is incubated at 37°C (7.4.7.) for 30 minutes. The hydrolysis is ended by the addition of 0.8 ml acidic buffer (7.2.22).
- 8.4.4. Add 6 ml TBME (7.2.8.) to the mixture. Mix by placing the tube on a Vortex (7.4.2.) for 30 seconds. Centrifugate for 5 minutes at 2500 rpm at 20°C, and transfer the TBME to a clean tube. Repeat the procedure of TBME extraction.
- 8.4.5. The combined supernatants (TBME) is evaporated to dryness under a stream of nitrogen in a waterbath (7.4.6.) at 40°C.

8.5 Derivatization

- 8.5.1. Dissolve the dry residue in 0.4 ml ethanol (7.2.5.) by placing the tube in an ultrasonic waterbath (7.4.18.) during 1 minute followed by placing on a Vortex (7.4.2.) during 130 seconds.
- 8.5.2. Transfer the residue to a derivatisation vial (7.4.9.).
- 8.5.3. The ethanol is evaporated in a heating module (7.4.8.) under nitrogen.
- 8.5.4. Add the 0.050 ml HFBA reaction mixture (7.2.25) and place the tube on a Vortex during 30 seconds followed by incubation of the reaction mixture during 1 hour at 60°C (7.4.7.).
- 8.5.5. After incubation, the reaction mixture is evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 50°C (7.4.8.) and the derivatized residue is dissolved in 0.025 ml iso-octane (7.2.16.) by placing

in an ultrasonic waterbath (7.4.18.) during 1 minute, followed by using a Vortex (7.4.2.) during 30 seconds.

8.5.6. The residue is transferred into a glass injection vial with glass insert and is closed with an aluminium cap (7.4.9.).

8.6 Gas chromatography-mass spectrometry

The following conditions are used during GC-MS analysis :

column	: HP-1 (7.4.11.6.)
injection	: 5 µl splitless
injector temperature	: 50°C
initial oven temperature	: 80°C (1 minute)
temperature programme	: 25°C/min
final temperature	: 300°C
temperature transfer line	: 280°C
solvent delay	: 7.2 minutes
monitored ions	: m/z 479 MP
	: m/z 482 MP-d3
	: m/z 477 MG
	: m/z 480 MG-d3
	: m/z 447 ML
	: m/z 450 ML-d3
	: m/z 497 CM
	: m/z 499 CM- ³⁷ Cl
dwelltime per ion	: 50 msec

9. Interpretation and calculation

9.1 Preliminary tests

The first step in interpreting the results is to check for

- adequate performance characteristics of the GC - MS system (MS-tuning).
- adequate sensitivity for external derivatized standards.
- adequate signal to noise ratio for internal standards (>5).

9.2 Control samples

The experiment is valid only if no signals corresponding any of the gestagens are present exceeding a level of 0.5 µg/kg within the chromatogram of the blank, the quantification of spiked compounds is between 50% and 200% of the target values.

9.3 Calculation of quantitative results

The area of the selected ion of the standard and the internal standard are calculated and their ratio is the response variable.

A calibration curve is constructed by linear regression analysis of the response variable versus the concentration.

Quantification is only valid if :

- the maximum of the signal origination from the analyt exceeds the noise + 3 SD,
- the coefficient of correlation for the calibration curve is better than 0.98,
- the numerical value of the intercept of the calibration curve does not deviate more than ± 3 SD from zero.

9.3. Identification

For identification according to the EC-criteria it is mandatory that at least 4 ions are monitored. Each ion monitored (response) should fulfil the criterion that the maximum exceeds the average noise + 3 SD. If this criterion is fulfilled the 3 different ratios are calculated. The same ratios are calculated for the standard analyt, preferably at the corresponding concentration. For positive identification the responses obtained for the unknown sample should preferably be within ± 10 % of the average value of the standard.

Table 1: Diagnostic ions monitored during confirmation analyses.

	HFBA ions most suitable derivative			
Medroxyprogesterone	147	317	331	479
Megestrole	381	421	477	520
Melengestrole	281	343	383	447
Chloromadinone	401	462	497	540

10. Related documents

ARO-MIS CB\AMAP 3770 or following : kwaliteitscontrole laboratorinm standaarden.
 ARO-MIS CB\AMAP 3202 or following : registratie immunochemische materialen.

For additional general laboratory procedures see: ARO/MIS CB\SOP