

Projectnr.: 71.520.03
Borging diergeneesmiddelen RVV

Projectleider: J.A. van Rhijn

Rapport 2005.002

maart 2005

De vergelijking van vijf sulfonamide referentiematerialen van RIKILT en Laboratorium VWA/RVV

B.J.A. Berendsen¹⁾, P.J. Assink²⁾, J.A. van Rhijn¹⁾

¹⁾ RIKILT - Instituut van voedselveiligheid

²⁾ Laboratorium VWA/RVV

Business Unit Analyse & Ontwikkeling
Cluster Dierbehandelingsmiddelen

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475422
Telefax 0317-417717
Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2005, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

VERZENDLIJST

EXTERN:

Laboratorium VWA/RVV

INHOUDSOPGAVE	blz
SAMENVATTING	2
1 INLEIDING	3
2 MATERIAAL EN METHODE	4
2.1 Bereiding standaardoplossingen	4
2.2 Vergelijkende analyses	4
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	6
3.1 Vergelijking standaardoplossingen	6
3.2 Vergelijking nieuwe mengstandaardoplossingen	6
3.3 Bewaartermijn referentiematerialen	8
4 CONCLUSIE	9

SAMENVATTING

In het kader van de borging van Laboratorium VWA/RVV door RIKILT zijn de gehalten van vijf sulfonamiden standaardoplossingen vergeleken met als doel het verschil in bepaalde gehalten van sulfadimethoxine in borgingsmateriaal te verklaren.

Hiertoe zijn door zowel RIKILT als Laboratorium VWA/RVV standaardoplossingen bereid van sulfadiazine, sulfadimidine, sulfadoxine, sulfadimethoxine en dapson. De standaardoplossingen van beide laboratoria zijn uitgewisseld en door beide partijen geanalyseerd.

Vergelijking van de analyseresultaten van deze standaardoplossingen toont aan dat er geen significante verschillen in de gehalten van de referentiematerialen bestaat. Ook zijn geen verschillen geconstateerd tussen de wijze van verrekening van de zuiverheid of tegenionen.

Het verschil in bepaald gehalte sulfadimethoxine in de borgingsmaterialen tussen Laboratorium VWA/RVV en RIKILT kan niet verklaard worden door een verschil in de standaarden.

1 INLEIDING

Uit het borgingsprogramma voor Laboratorium VWA/RVV blijkt dat er structureel afwijkende waarden voor de analyse van sulfadimethoxine in vlees worden gevonden tussen Laboratorium VWA/RVV en RIKILT. Deze afwijking wordt niet waargenomen voor sulfadimidine, dat tevens aanwezig is in de borgingsmonsters.

Voor het verkrijgen van een overeenkomstig resultaat is het met name van belang dat de basis van de analyses, te weten de standaardstoffen en de bereiding van standaardoplossingen overeenkomen. Als een eerste stap in het achterhalen van de verschillen worden derhalve de gebruikte referentiematerialen vergeleken.

Dit rapport beschrijft de uitgevoerde experimenten en de hieruit verkregen resultaten en conclusies van de vergelijking van de referentiematerialen van vijf sulfonamides: sulfadiazine, sulfadimidine, sulfadoxine, sulfadimethoxine en dapson.

Het onderzoek werd uitgevoerd in het kader van de NRL taak van RIKILT.

2 MATERIAAL EN METHODE

2.1 Bereiding standaardoplossingen

Voor de standaardvergelijking zijn zowel door Laboratorium VWA/RVV als door RIKILT standaardoplossingen bereid van sulfadiazine (SD), sulfadimidine (SDD), sulfadoxine (SDX), sulfadimethoxine (SDMX) en dapson (DAP). Van elke stof zijn de gebruikte batches vermeld in tabel 1.

Tabel 1. Identificatie van de gebruikte standaardstoffen

Omschrijving	Component	Leverancier	Batchnummer	Ontvangst
Laboratorium VWA/RVV	Sulfadiazine	Sigma	19F0627	jan-1994
	Sulfadimidine	Sigma	24H0699	apr-1995
	Sulfadoxine	Sigma	46809	apr-1994
	Sulfadimethoxine	Sigma	98F0349	jan-1994
	Dapson	Sigma	43H3414	jan-1994
RIKILT	Sulfadiazine Na	Sigma	033K1183	Mrt-2004
	Sulfadimidine	Riedel - de Haen	46802	Feb-2004
	Sulfadoxine	Hoffmann - La Roche		Mrt-2002
	Sulfadimethoxine	Sigma	127H0798	Mrt-2002
	Dapson	Aldrich	30325 04609TA	Okt-2003

Van elke stof is een stockoplossing bereid van 100 µg/ml in methanol.

Bij RIKILT wordt op 0,02 mg nauwkeurig, 5 tot 10 mg van de referentiestof ingewogen in een bruin, glazen flesje. Er wordt berekend hoeveel gram methanol toegevoegd dient te worden, om een concentratie van 100 µg/ml te verkrijgen, rekening houdend met de zuiverheid en eventuele tegen-ionen van het referentiemateriaal. De hoeveelheid methanol wordt op 0,01 gram nauwkeurig toegevoegd op een bovenweger.

Laboratorium VWA/RVV berekent, rekening houdend met de zuiverheid en eventuele tegenionen van het referentiemateriaal, hoeveel mg referentiemateriaal ingewogen dient te worden voor de bereiding van 100 ml van een 100 µg/ml oplossing. De berekende hoeveelheid wordt op een analytische balans op 0,1 mg nauwkeurig ingewogen in een maatkolf van 100 ml. De maatkolf wordt aangevuld tot de maatstreep met methanol en gehomogeniseerd.

Met beide methodes wordt een hoofdstandaardoplossing van 100 µg/ml verkregen.

2.2 Vergelijkende analyses

De bereide hoofdstandaardoplossingen van de te vergelijken referentiematerialen zijn onderling uitgewisseld. Hieruit hebben beide laboratoria afzonderlijk mengstandaarden bereid, doorverdund en geanalyseerd.

Laboratorium VWA/RVV heeft twee standaardoplossingen bereid van 50 ng/ml uitgaande van zowel de stockoplossingen van Laboratorium VWA/RVV als van RIKILT. Hierbij werd DAP in een afzonderlijke oplossing gebracht, omdat de retentietijd van DAP in de HPLC-ASTED-UV analyse vrijwel gelijk is aan de retentietijd van SDX. De oplossingen afkomstig van Laboratorium VWA/RVV en van RIKILT zijn in duplo met HPLC-ASTED-UV gemeten. Voor elke component is de gemiddelde piekoppervlakte berekend.

RIKILT heeft een mengstandaardoplossing van de vijf sulfonamiden van RIKILT en van Laboratorium VWA/RVV bereid met een concentratie van 500 ng/ml in water. Beide oplossingen zijn in zesvoud geanalyseerd met behulp van LC-MS/MS. Voor elke analyse is de piekoppervlakte van het meest intense product-ion bepaald. Voor elke component is de gemiddelde oppervlakte berekend en de bijbehorende standaarddeviatie.

Voor zowel de analyses uitgevoerd door Laboratorium VWA/RVV als door RIKILT zijn de verkregen piekoppervlaktes voortkomend uit de standaardoplossing van RIKILT uitgedrukt als percentage van de piekoppervlaktes van de Laboratorium VWA/RVV standaardoplossing:

$$\text{Overeenkomst} = \frac{Opp_{RIKILT}}{Opp_{LabVWA/RVV}}$$

waarin: *Overeenkomst* = de overeenkomst van de RIKILT standaardoplossing met de Laboratorium VWA/RVV standaardoplossing;
Opp_{RIKILT} = Gemiddelde piekoppervlakte van de RIKILT standaardoplossing;
Opp_{Lab VWA/RVV} = Gemiddelde piekoppervlakte van de Laboratorium VWA/RVV standaardoplossing.

Bij een perfecte overeenkomst van de referentiematerialen, bereiding van verdunningen en analyse zal de overeenkomst 100% zijn.

Het Laboratorium VWA/RVV heeft voor elke component een duplo-analyse uitgevoerd. Uit de resultaten is een gemiddelde overeenkomst van beide standaardoplossingen berekend. Wanneer de overeenkomst tussen 95 en 100% ligt, wordt verondersteld dat de beide standaardoplossingen een overeenkomstig gehalte hebben en dat de referentiematerialen derhalve overeenkomen.

Uit de RIKILT analyses (n=6) is voor elke component een gemiddelde piekoppervlakte en standaarddeviatie berekend. Aan de hand van een F-toets is bepaald of de varianties van de analyses van beide standaardoplossingen overeenkomen. Als dit het geval is, is door middel van een t-toets, met 95% betrouwbaarheid, bepaald of de standaardoplossingen van RIKILT en Laboratorium VWA/RVV overeenkomen. Dit wil zeggen dat berekend wordt of de gemiddelde piekoppervlaktes, met bijbehorende standaarddeviatie, van beide standaardoplossingen niet significant van elkaar afwijken. Wanneer dit het geval is kan worden geconcludeerd dat de standaardoplossingen een gelijk gehalte sulfonamiden bevatten en dat de referentiematerialen van RIKILT en Laboratorium VWA/RVV overeenkomen.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Vergelijking standaardoplossingen

Laboratorium VWA/RVV heeft de analyses uitgevoerd op 2 augustus 2004, RIKILT op 19 juli 2004. De resultaten van de vergelijking zijn weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Resultaten van de vergelijking van de Laboratorium VWA/RVV batches en RIKILT batches

Component	Overeenkomst	Overeenkomst
	Analyse Lab. VWA/RVV	Analyse RIKILT
SD	98%	131%
SDD	91%	99%
SDX	100%	131%
SDMX	100%	105%
DAP	101%	105%

Laboratorium VWA/RVV vindt voor SD, SDX, SDMX en DAP een goede overeenkomst tussen de standaardoplossingen van Laboratorium VWA/RVV en RIKILT. Voor SDD wordt een overeenkomst van 91% berekend; de standaardoplossing van Laboratorium VWA/RVV geeft een hogere respons voor SDD dan de standaardoplossing van RIKILT.

De variatiecoëfficiënt van de RIKILT-analyses van de vijf sulfonamiden varieert van 4 tot 11%, dat mede veroorzaakt wordt door een lichte toename in de gevoeligheid van het systeem gedurende de analyseserie. Het toevoegen van interne standaard aan de standaardoplossingen kan hiervoor corrigeren. De statistische vergelijking aan de hand van de RIKILT-analyses tonen aan dat er een significant verschil bestaat in het gehalte SD en SDX in de beide standaardoplossingen. Het gehalte SDMX en DAP in de standaardoplossingen van Laboratorium VWA/RVV en RIKILT verschilt niet significant.

Alleen voor SDMX en DAP vinden Laboratorium VWA/RVV en RIKILT overeenkomstige resultaten. Er wordt geconcludeerd dat de referentiematerialen van SDMX en DAP van RIKILT en Laboratorium VWA/RVV vergelijkbaar zijn. Voor de overige sulfonamiden vindt vervolgonderzoek plaats.

3.2 Vergelijking nieuwe mengstandaardoplossingen

Er is een nieuwe vergelijking uitgevoerd om het verschil in de analyseresultaten van SD, SDD en SDX te achterhalen. Hierbij zijn niet de stockoplossingen, maar de mengstandaardoplossingen uitgewisseld. Zo wordt voorkomen dat er sprake is van verschillende doorverdunding van een van de stoffen door Laboratorium VWA/RVV of RIKILT. Aangezien in dit geval dezelfde oplossingen worden geanalyseerd, moeten de resultaten van RIKILT en Laboratorium VWA/RVV overeenkomen.

Zowel door Laboratorium VWA/RVV als door RIKILT zijn nieuwe hoofdstandaardoplossingen van de vijf sulfonamiden bereid. Hieruit zijn door beide laboratoria twee standaardoplossingen bereid. Eén mengstandaardoplossing van SD, SDD, SDX en SDMX met een gehalte van 50 ng/ml in water en één

standaardoplossing van DAP van 50 ng/ml in water. De standaardoplossingen van Laboratorium VWA/RVV en RIKILT zijn uitgewisseld en door beide laboratoria geanalyseerd volgens de eerder beschreven methodes. Hierbij heeft RIKILT alvorens de oplossingen te analyseren interne standaard (d7-sulfadimidine) toegevoegd aan de oplossingen om te corrigeren voor verloop van gevoeligheid gedurende de analysegang.

Laboratorium VWA/RVV heeft de analyses uitgevoerd op 23 september 2004, RIKILT op 24 september 2004. De resultaten van de vergelijking van de nieuwe standaardoplossingen zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 3. Resultaten van de vergelijking van de Laboratorium VWA/RVV batches en RIKILT batches

Component	Overeenkomst	Overeenkomst
	Analyse Lab. VWA/RVV	Analyse RIKILT*
SD	96%	101%
SDD	98%	103%
SDX	97%	101%
SDMX	99%	98%
DAP	105%	-

* Berekend aan de hand van de responsfactor (piekoppervlakte component / piekoppervlakte interne standaard)

Laboratorium VWA/RVV vindt voor alle componenten een overeenkomst tussen de 95 en 105%, wat erop duidt dat de standaardoplossing van Laboratorium VWA/RVV en RIKILT vergelijkbaar zijn. Bij gebruik van de interne standaard ligt de variatiecoëfficiënt van de RIKILT-analyses tussen 5 en 8%. De statistische berekeningen aan de hand van de RIKILT analyses tonen aan dat het berekende gehaltes SD, SDD, SDX en SDMX in de standaardoplossingen van Laboratorium VWA/RVV en RIKILT, niet significant verschillen.

Uit deze experimenten wordt geconcludeerd dat de referentiematerialen van SD, SDD, SDX en SDMX van RIKILT en Laboratorium VWA/RVV vergelijkbaar zijn.

RIKILT rapporteert voor DAP geen resultaten, omdat er sprake is van een onstabiel signaal tijdens de analyse. Aangezien Laboratorium VWA/RVV bij deze analyse en zowel Laboratorium VWA/RVV als RIKILT bij voorgaande analyse van DAP geen afwijking hebben geconstateerd, wordt geconcludeerd dat ook geen significant verschil bestaat tussen de standaardstoffen DAP van Laboratorium VWA/RVV en RIKILT.

Het verschil in overeenkomst dat in het eerste experiment is waargenomen zou verklaard kunnen worden door twee aspecten:

1. De uitgewisselde hoofdstandaardoplossingen zijn bewaard bij 4 tot 8 °C. De analysedatum van Laboratorium VWA/RVV en RIKILT liggen enkele weken uit elkaar. Hierdoor zouden ongewenste effecten opgetreden kunnen zijn, zoals afbraak van de componenten.
2. Er is een fout opgetreden bij de bereiding van de mengstandaardoplossingen of doorverdunding bij één van beide laboratoria.

3.3 Bewaartermijn referentiematerialen

In dit onderzoek valt op dat de referentiematerialen (vaste stof) van Laboratorium VWA/RVV van oudere batches afkomstig zijn (variërend van januari 1994 tot april 1995) dan de materialen van RIKILT (variërend van maart 2002 tot maart 2004). Hieruit kan geconcludeerd worden dat de gebruikte materialen van de onderzochte sulfonamiden tenminste gedurende 10 jaar bruikbaar zijn. Een langere bruikbaarheid kan aan de hand van deze analyses niet vastgesteld worden.

4 CONCLUSIE

Het gehalte van de standaardstoffen sulfadiazine, sulfadimidine, sulfadoxin, sulfadimethoxine en dapson van Laboratorium VWA/RVV en RIKILT verschillen niet significant van elkaar. Ook wordt op een overeenkomstige manier rekening gehouden met eventuele tegenionen en zuiverheid.

Er is vastgesteld dat de uitgangsmaterialen van de onderzochte sulfonamiden tenminste gedurende 10 jaar stabiel en derhalve bruikbaar zijn.

Het verschil in bepaald gehalte sulfadimethoxine in de borgingsmaterialen tussen Laboratorium VWA/RVV en RIKILT kan niet verklaard worden door een verschil in de standaarden.